



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107614516 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201680029580.4

(22)申请日 2016.05.11

(30)优先权数据

62/159,899 2015.05.11 US

62/183,074 2015.06.22 US

62/185,921 2015.06.29 US

62/203,052 2015.08.10 US

62/220,366 2015.09.18 US

62/222,388 2015.09.23 US

62/236,506 2015.10.02 US

62/313,491 2016.03.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/031797 2016.05.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/183163 EN 2016.11.17

(71)申请人 非凡食品有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·尚卡尔 M·A·霍伊特

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

代理人 沈锦华

(51)Int.Cl.

C07K 14/39(2006.01)

C12N 15/00(2006.01)

C12N 15/81(2006.01)

C12R 1/84(2006.01)

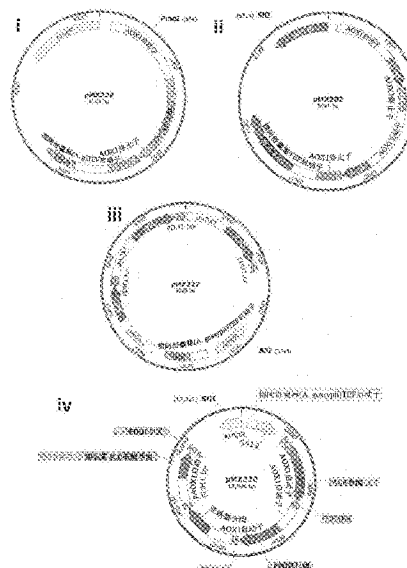
权利要求书3页 说明书30页 附图11页

(54)发明名称

用于基因工程改造甲基营养型酵母的表达构建体和方法

(57)摘要

本发明提供了用于基因工程改造甲基营养型酵母的方法和材料。



1. 一种包含重组核酸分子的甲基营养型酵母细胞,其中所述重组核酸分子包含编码转录激活因子的外源核酸,所述转录激活因子与至少一个甲醇诱导型启动子元件可操作地连接。

2. 根据权利要求1所述的酵母细胞,其中所述甲基营养型酵母细胞是选自由假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、毕赤酵母属(*Pichia*)和球拟酵母属(*Torulopsis*)组成的群组的酵母。

3. 根据权利要求1或2所述的酵母细胞,其中所述甲基营养型酵母细胞是毕赤酵母。

4. 根据权利要求1或2所述的酵母细胞,其中所述细胞是毕赤酵母属细胞。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的酵母细胞,其中所述细胞是巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的酵母细胞,其中所述重组核酸分子被稳定整合到所述甲基营养型酵母细胞的基因组中。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的酵母细胞,其中所述重组核酸分子是由复制型质粒在染色体外表达。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的酵母细胞,其中所述编码转录激活因子的外源核酸包含来自巴斯德毕赤酵母的Mxr1序列、来自多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)的Adr1序列、来自博伊丁氏假丝酵母(*Candida boidinii*)的Trm1序列或来自博伊丁氏假丝酵母的Trm2序列。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的酵母细胞,其中所述编码转录激活因子的外源核酸包含来自巴斯德毕赤酵母的Mxr1序列。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的酵母细胞,其中所述转录激活因子包含GenBank登录号ABD57365中所示的序列。

11. 根据权利要求10所述的酵母细胞,其中所述转录激活因子由GenBank登录号DQ395124中所示的核酸序列编码。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的酵母细胞,其中所述至少一个甲醇诱导型启动子元件选自由以下组成的群组:来自巴斯德毕赤酵母的醇氧化酶1AOX1启动子元件、来自博伊丁氏假丝酵母的AOD1启动子元件、来自多形汉逊酵母的MOX启动子元件、来自甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)的MOD1启动子元件、来自巴斯德毕赤酵母的DHAS启动子元件、来自巴斯德毕赤酵母的FLD1启动子元件和来自巴斯德毕赤酵母的PEX8启动子元件。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的酵母细胞,其中所述至少一个甲醇诱导型启动子元件为来自巴斯德毕赤酵母的醇氧化酶1AOX1启动子元件。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的酵母细胞,其还包含含有至少一个编码多肽的异源核酸的核酸分子,所述多肽与至少一个甲醇诱导型启动子元件可操作地连接。

15. 根据权利要求14所述的酵母细胞,其中所述异源核酸编码参与铁辅因子生物合成的至少一种多肽。

16. 根据权利要求15所述的酵母细胞,其中所述铁辅因子是血红素。

17. 根据权利要求16所述的酵母细胞,其中参与血红素生物合成的至少一种多肽选自由ALA合酶、ALA脱水酶、胆色素原脱氨酶、UPG III合酶、UPG III脱羧酶、CPG氧化酶、PPG氧化酶和亚铁螯合酶组成的群组。

18. 根据权利要求16所述的酵母细胞,其中参与血红素生物合成的至少一种多肽包含两种或更多种选自由ALA合酶、ALA脱水酶、胆色素原脱氢酶、UPG III合酶、UPG III脱羧酶、CPG氧化酶、PPG氧化酶和亚铁螯合酶组成的群组的肽。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的酵母细胞,其中所述酵母细胞缺乏用于选择的异源序列。

20. 一种在细胞中表达异源多肽的方法,所述方法包含:

提供前述权利要求中任一项所述的酵母细胞;

将重组核酸分子引入甲基营养型酵母细胞中,所述重组核酸分子包含至少一种编码多肽的异源核酸,所述多肽与至少一个巴斯德毕赤酵母醇氧化酶1AOX1启动子元件可操作地连接;以及

在适于表达所述重组核酸分子的条件培养所述细胞,从而表达所述异源多肽。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述异源多肽是球蛋白家族成员PF00042。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述异源多肽是植物血红蛋白。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述植物血红蛋白是豆血红蛋白。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述豆血红蛋白具有选自由SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6组成的群组的序列。

25. 根据权利要求20至24中任一项所述的方法,其中所述引入步骤包含选自由转导、电穿孔、基因枪(biolistic particle delivery)和化学转化组成的群组的技术。

26. 根据权利要求20至25中任一项所述的方法,其中培养所述细胞的所述条件包含添加铁或其药理学上或代谢上可接受的盐。

27. 根据权利要求20至26中任一项所述的方法,其中所述培养步骤包含在甲醇存在的情况下培养所述细胞。

28. 根据权利要求20至26中任一项所述的方法,其中所述培养步骤包含在甲醇不存在的情况下培养所述细胞。

29. 根据权利要求20至28中任一项所述的方法,其中所述培养步骤包含在没有选择的情况下培养所述细胞。

30. 一种包含重组核酸分子的甲基营养型毕赤酵母细胞,其中所述重组核酸分子包含:

编码来自巴斯德毕赤酵母的Mxr1转录激活因子序列的核酸;

编码球蛋白家族成员(PF00042)的核酸;和

编码参与血红素生物合成的至少一种多肽的核酸。

31. 根据权利要求30所述的酵母细胞,其中所述编码所述Mxr1转录激活因子序列的核酸可操作地与甲醇诱导型启动子元件连接。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中所述球蛋白家族成员是豆血红蛋白。

33. 根据权利要求30至32中任一项所述的酵母细胞,其中所述编码所述球蛋白家族成员的核酸可操作地与甲醇诱导型启动子元件连接。

34. 根据权利要求30至32中任一项所述的酵母细胞,其中所述编码所述球蛋白家族成员的核酸可操作地与组成型启动子元件连接。

35. 根据权利要求30至34中任一项所述的酵母细胞,其中所述编码参与血红素生物合

成的至少一种多肽的核酸可操作地与甲醇诱导型启动子元件连接。

36. 根据权利要求30至34中任一项所述的酵母细胞, 其中所述编码参与血红素生物合成的至少一种多肽的核酸可操作地与组成型启动子元件连接。

37. 根据权利要求30、31、33或35中任一项所述的酵母细胞, 其中所述甲醇诱导型启动子元件是来自巴斯德毕赤酵母的醇氧化酶I AOX1启动子元件。

38. 根据权利要求30、34或36中任一项所述的酵母细胞, 其中所述组成型启动子元件是来自巴斯德毕赤酵母的转录延伸因子EF-1 α 基因TEF1启动子元件。

用于基因工程改造甲基营养型酵母的表达构建体和方法

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及DNA构建体和使用这种DNA构建体基因工程改造甲基营养型酵母的方法。

背景技术

[0002] 甲基营养型酵母如巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 通常用于表达重组蛋白。本发明提供了可用于在甲基营养型酵母中有效表达一或多种多肽的构建体。

发明内容

[0003] 本发明描述了巴斯德毕赤酵母 (*P. pastoris*) 菌株的用途, 所述菌株从AOX1启动子开始过表达转录激活因子Mxr1以增加同样从AOX1启动子开始表达的转基因的表达量, 从而显著提高一或多种蛋白质的重组产量。另外, 从AOX1启动子开始的Mxr1的表达产生正反馈环路, 其允许当抑制表达碳源耗尽时, 在正常地专性诱导物甲醇不存在的情况下从AOX1启动子开始表达的其它转基因。Mxr1的表达导致蛋白质产量显著增加。

[0004] 一方面, 本发明提供了一种包括重组核酸分子的甲基营养型酵母细胞。所述重组核酸分子通常包括编码与至少一种甲醇诱导型启动子元件可操作地连接的转录激活因子的外源核酸。代表性甲基营养型酵母可以是假丝菌属 (*Candida*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)、毕赤酵母属 (*Pichia*) 或球拟酵母属 (*Toruplosis*)。代表性甲基营养型酵母是巴斯德毕赤酵母。

[0005] 在一些实施方案中, 所述重组核酸分子被稳定地整合到甲基营养型酵母细胞的基因组中。在一些实施方案中, 所述重组核酸分子是由复制型质粒在染色体外表达。

[0006] 在一些实施方案中, 所述编码转录激活因子的外源核酸包含来自巴斯德毕赤酵母的Mxr1序列、来自多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*) 的Adr1序列、来自博伊丁氏假丝酵母 (*Candida boidinii*) 的Trm1序列和来自博伊丁假丝酵母的Trm2序列。编码转录激活因子的代表性核酸如DQ395124所示。代表性转录激活因子具有如ABD57365所示的氨基酸序列。

[0007] 在一些实施方案中, 至少一种甲醇诱导型启动子元件为来自巴斯德毕赤酵母的醇氧化酶1 (AOX1) 启动子元件、来自博伊丁氏假丝酵母的AOD1启动子元件、来自多形汉逊酵母的MOX启动子元件、来自甲醇毕赤酵母 (*Pichia methanolica*) 的MOD1启动子元件、来自巴斯德毕赤酵母的DHAS启动子元件、来自巴斯德毕赤酵母的FLD1启动子元件或来自巴斯德毕赤酵母的PEX8启动子元件。

[0008] 在一些实施方案中, 所述甲基营养型酵母细胞还包括核酸分子, 所述核酸分子包括至少一种编码与至少一个甲醇诱导型启动子元件可操作地连接的多肽的异源核酸。在一些实施方案中, 所述至少一种异源核酸编码一或多种参与铁辅因子, 如血红素 (例如ALA合酶、ALA脱水酶、胆色素原脱氨酶、UPG III合酶、UPG III脱羧酶、CPG氧化酶、PPG氧化酶和/或亚铁螯合酶) 生物合成的多肽。在一些实施方案中, 参与铁辅因子生物合成的一或多种多

肽与至少一种甲醇诱导型启动子元件连接。

[0009] 另一方面,本发明提供了一种在细胞中表达异源多肽的方法。这种方法通常包括:提供如本文所述的甲基营养型酵母细胞;将重组核酸分子引入甲基营养型酵母细胞中,所述重组核酸分子包含至少一种编码与至少一种巴斯德毕赤酵母醇氧化酶1(AOX1)启动子元件可操作地连接的多肽的异源核酸;以及在适于表达重组核酸分子的条件培养所述细胞,从而表达异源多肽。

[0010] 在一些实施方案中,细胞培养的条件包括添加铁或其药学上或代谢上可接受的盐。在一些实施方案中,所述引入步骤包括诸如转导、电穿孔、基因枪或化学转化技术。在一些实施方案中,所述培养步骤包括在甲醇的存在情况下培养细胞。

[0011] 另一方面,本发明提供了包括与其激活的启动子可操作地连接的转录激活因子的重组生物。在一些实施方案中,本发明提供了表达与启动子可操作地连接的多肽的重组生物。再一方面,本发明提供了如本文所述在不添加诱导物的情况下从诱导型启动子表达多肽的方法。

[0012] 除非另外定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与相关方法和组合物所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述相似或等同的方法和材料可用于实践或测试相关方法和组合物,但合适的方法和材料如下所述。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的,而不是限制性的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献的全部内容均通过引用并入本文。

附图说明

[0013] 图1是描述血红素生物合成途径涉及步骤的示意图。

[0014] 图2是用于构建生产菌株MXY0183的质粒的示意图。

[0015] 图3是显示来自亲本菌株Bg11的生产菌株MXY0183和MXY0207的产生示意图。

[0016] 图4是显示质粒pGAB和pMx354的示意图。

[0017] 图5是显示来自亲本菌株Bg11的抗生素选择自由生产菌株MXY0291和MXY0338的产生示意图。

[0018] 图6是通过共转化引入含有Mxr1和LegH变异体3的线性DNA片段以产生菌株MXY0291的示意图。

[0019] 图7是显示在天然毕赤酵母非-pAOX1组成型启动子控制下表达LegH的线性构建体的示意图。

[0020] 图8是显示菌株MXY0183相关的表型变化的照片。显示诱导开始时(0小时)和诱导后72小时的摇瓶。1,MXY0051;2,MXY0118;3,MXY0183。

[0021] 图9显示了来自改良的巴斯德毕赤酵母菌株的LegH的产生。图A是显示在摇瓶中生长的巴斯德毕赤酵母菌株的裂解物的SDS凝胶:51,MXY0051;118,MXY0118;183,MXY0183。图B是比较来自菌株MXY0118、MXY0183和MXY0207的LegH产量的表格。

[0022] 图10显示了菌株MXY0206的实验数据。图A是在抑制表达碳源生长48小时后菌株MXY0183(左)和MXY0206(右)的摇瓶培养物的照片。图B是在BMY培养基中生长48小时后菌株MXY0183(左)和MXY0206(右)的摇瓶培养物的细胞团块的照片。图C是显示血红素加载的LegH的相对产量(在不存在任何诱导剂的情况下)的图。

[0023] 图11是显示当在甲醇与甘油或甲醇与葡萄糖存在下2L发酵罐中生长的本文所描述的菌株的相对产量的汇总表。

具体实施方式

[0024] 本发明在此提供了允许基因工程改造细胞以提高多肽的重组表达的核酸构建体。在一些实施方案中,本文提供了核酸构建体,所述核酸构建体允许基因工程改造细胞以在诱导分子的不存在的情况下从诱导型启动子提高多肽的重组表达。不受任何特定机制的束缚,本方面所述方法产生正反馈环路,其中转录激活因子的低水平天然表达诱导与转录激活因子可操作地连接的启动子。这导致转录激活因子以及一或多个靶多肽的表达增加,其中所述靶多肽可操作地连接到同一诱导型启动子。

[0025] 本文提供了允许基因工程改造甲基营养型酵母细胞的核酸构建体。尽管本文使用毕赤酵母(即,巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*))举例说明所述方法,但可以使用毕赤酵母属的其它物种或来自假丝酵母属、汉逊酵母属、毕赤酵母属和球拟酵母属的任意物种。

[0026] 基因工程改造甲基营养型酵母细胞通常包括将重组核酸分子引入细胞。如本文所述,重组核酸分子通常包括编码转录激活因子的外源核酸,所述转录激活因子与至少一个诱导型启动子元件可操作地连接。

[0027] 本文所描述的方法中使用的重组核酸分子通常是DNA,但是RNA分子可以在适当的环境下使用。如本文所用,“外源”是指从外部来源引入到细胞基因组的任何核酸序列,其中所述外部来源可以是相同或不同的生物体或合成产生的核酸。例如外源核酸可以是来自一种微生物(例如甲基营养型酵母的一个属或一种)的核酸,其被引入到不同的属或种的甲基营养型酵母中,然而,外源核酸也可以是来自甲基营养型酵母的核酸,尽管存在相应的天然核酸序列,但其作为额外拷贝被重组导入到甲基营养型酵母中。例如巴斯德毕赤酵母含有编码Mxr1转录激活因子的内源核酸;额外的巴斯德毕赤酵母Mxr1核酸(例如重组导入到巴斯德毕赤酵母中或修饰内源性巴斯德毕赤酵母Mxr1核酸)被认为是外源的。

[0028] 转录激活因子和编码转录激活因子的核酸(例如编码转录激活因子的外源核酸)是本领域已知的。例如来自巴斯德毕赤酵母的转录激活因子为Mxr1序列,但是合适的转录激活因子也可以是多形汉逊酵母(Adr1序列;参见例如GenBank登录号AE0102000005、碱基858873至862352的核酸序列和GenBank登录号ESX01253的氨基酸序列)和博伊丁氏假丝酵母(Trm1序列;参见例如GenBank登录号AB365355的核酸序列和GenBank登录号BAF99700的氨基酸序列;Trm2序列;参见例如GenBank登录号AB548760的核酸序列和GenBank登录号BAJ07608的氨基酸序列)。代表性巴斯德毕赤酵母Mxr1核酸序列可以在例如GenBank登录号DQ395124中找到,而代表性巴斯德毕赤酵母Mxr1多肽序列可以在例如在GenBank登录号ABD57365中找到。

[0029] 转录激活因子如Mxr1可以在低水平下正常表达。因此,希望将外源性核酸(即转录激活因子)置于可诱导的启动子的控制之下。如本文所用,“可操作地连接”是指启动子或其它表达元件相对于核酸编码序列以这样一种方式定位使其指导或调控核酸表达的(例如框内)。

[0030] 当基因工程改造甲基营养酵母时可以使用许多诱导型启动子。例如可以使用甲醇诱导型启动子或其启动子元件。甲醇诱导型启动子是本领域已知的。例如通常使用的来自

巴斯德毕赤酵母的甲醇诱导型启动子是来自醇氧化酶1 (AOX1) 基因的启动子或其一部分, 其强烈转录以对甲醇做出响应。但是, 可以使用其它甲醇诱导型启动子或其启动子元件, 包括但不限于来自博伊丁氏假丝酵母的醇氧化酶 (AOD1) 启动子 (参见例如GenBank登录号 YSAAOD1A)、来自多形汉逊酵母的醇氧化酶 (MOX) 启动子 (参见例如GenBank登录号 X02425)、来自甲醇毕赤酵母的MOD1或MOD2启动子 (参见例如雷蒙德 (Raymond) 等人, 1998, 酵母 (Yeast), 14:11-23; 和中川 (Nakagawa) 等人, 1999, 酵母 (Yeast), 15:1223-30)、来自巴斯德毕赤酵母的DHAS启动子 (参见例如GenBank登录号 FJ752551) 或其启动子元件、来自巴斯德毕赤酵母的甲醛脱氢酶 (FLD1) 启动子 (参见例如GenBank登录号 AF066054) 或来自巴斯德毕赤酵母的PEX8启动子 (参见例如昌西 (Kranthi) 等人, 2010, 酵母 (Yeast), 27:705-11)。在一些实施方案中, 所述转录激活因子是来自巴斯德毕赤酵母的Mit1序列 (参见例如GenBank登录号 CAY70887)。已知所有这些启动子都是由甲醇诱导的。

[0031] 本领域技术人员将会理解, 本文所述的重组核酸分子可以稳定地整合到甲基营养型酵母细胞的基因组中, 或者可以由复制型质粒在染色体外表达。实现两者的方法在本领域中是众所周知并且常规使用的。

[0032] 正如本文所证明的, 所述毕赤酵母中甲醇调节的转录激活因子可结合AOX1启动子, 并且与Mxr1协同作用以激活AOX1启动子的转录。在一些实施方案中, 两种甲醇调节的转录激活因子 (例如Mxr1和Mit1) 可以可操作地与甲醇诱导型启动子元件连接。

[0033] 如本文所述包括重组核酸分子的菌株可以用于调节 (例如过表达) 甲基营养型酵母细胞中的第二重组核酸分子。第二重组核酸分子可以包括, 例如编码一或多种目的多肽的一或多种异源核酸。类似于编码转录激活因子的外源性核酸, 异源核酸指相对于基因组或生物基因组不是天然的任何核酸序列 (例如异源核酸可以是来自一种微生物的核酸 (例如甲基营养型酵母的一个属或种), 其被引入到不同的属或种的甲基营养酵母中)。

[0034] 简单地举例来说, 编码一或多种目的多肽的异源核酸可以是参与血红素辅因子生物合成的核酸。本文示例说明的是从巴斯德毕赤酵母基因组的序列确定和注释的编码参与血红素生物合成的8种不同酶的核酸。例如编码ALA合酶、ALA脱水酶、胆色素原脱氨酶、UPG III合酶、UPG III脱羧酶、CPG氧化酶、PPG氧化酶和亚铁螯合酶的异源核酸可以在本文所述的甲基营养型酵母菌株中表达。为了基因工程改造甲基营养型酵母以含有一种以上的异源核酸 (例如转基因), 可以结合甲醇诱导型和组成型启动子或其元件的组合以进一步增强这种核酸的表达。

[0035] 以前关于酿酒酵母的研究确定了ALA脱水酶和胆色素原脱氨酶作为血红素生物合成中的限速酶 (参见例如霍夫曼 (Hoffman) 等人, 2003, 生物化学与生物物理学研究通讯 (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 310 (4):1247-53)。但是, 来自甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAP) 启动子的巴斯德毕赤酵母个体血红素酶的异源表达未能克服与含有血红素辅因子的重组蛋白的表达相关的限制 (参见克雷纳 (Kraener) 等人, 2015, 微生物细胞工厂 (Microb. Cell Fact.), 13:14:4)。如本文所述, 通过共表达来自甲醇诱导型启动子的整个血红素生物合成途径实现了在巴斯德毕赤酵母中高效表达含有蛋白质的重组血红素, 尽管可以理解, 参与血红素生物合成途径的一或多种基因可以从一或多个组成型启动子开始表达。

[0036] 除了参与铁辅因子生物合成的酶之外, 应当理解, 可以存在编码包括植物血红蛋

白在内的球蛋白家族蛋白成员 (Pfam数据库中的PF00042) 的核酸。在本文的实施例中, 存在编码大豆豆血红蛋白 (LegH) 的核酸。LegH是一种与铁辅因子(血红素) 结合的蛋白质, 使其在415nm处具有特征吸收并有明显的红色。所述LegH蛋白质(也称为LGB2) 天然存在于大豆根瘤中(参见例如UniprotKB登录号P02236), 并且在此使用的核酸序列经密码子优化用于在巴斯德毕赤酵母中的表达。参见例如WO 2014/110539和WO 2014/110532。

[0037] 可选地, 编码目的多肽的异源核酸可以是, 例如但不限于, 脱水蛋白、植酸酶、蛋白酶、过氧化氢酶、脂肪酶、过氧化物酶、淀粉酶、转谷氨酰胺酶、氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、连接酶或抗此类多肽的抗体。在其它实施方案中, 异源核酸可以编码参与小分子如乙醇、乳酸、丁醇、己二酸或琥珀酸的生成途径的一或多种酶。

[0038] 与编码转录激活因子的外源核酸类似, 编码目的多肽的异源核酸可以与诱导型启动子元件(例如甲醇诱导型启动子元件) 可操作地连接, 或者编码目的多肽的异源核酸可以与组成型启动子或组成型启动子元件可操作地连接。以上讨论了诱导型启动子及其元件。组成型启动子和组成型启动子元件是本领域已知的。例如来自巴斯德毕赤酵母的常用组成型启动子是来自转录延伸因子EF-1 α 基因 (TEF1) 的启动子或其一部分, 其以组成型方式强烈转录。但是, 可以使用其它组成型启动子或其启动子元件, 包括但不限于来自巴斯德毕赤酵母的甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 启动子(参见例如GenBank登录号U62648.1)、来自潜在糖基磷脂酰肌醇 (GPI) -锚定蛋白的启动子GCW14p (PAS_chr1-4_0586) (参见例如GenBank登录号XM_002490678)、或来自巴斯德毕赤酵母的3-磷酸甘油酸激酶基因 (PGK1) 的启动子(参见例如GenBank登录号AY288296)。

[0039] 与本文所述的重组核酸分子类似, 第二重组核酸分子可以稳定地整合到甲基营养型酵母细胞的基因组中, 或者可以由复制型质粒在染色体外表达。

[0040] 本领域技术人员应该理解, 可以结合诱导型(例如甲醇诱导型) 和组成型启动子(或其启动子元件) 的组合以进一步增加与其可操作地连接的任何核酸的表达。

[0041] 本领域技术人员将会理解的是, 编码目的多肽(与启动子元件可操作地连接) 的异源核酸可以与本文所述的重组核酸分子分离, 或者可以与编码转录激活因子的外源核酸邻接, 所述外源转录激活因子与本文所述的重组核酸分子内含有的启动子元件可操作地连接。本领域技术人员还应该理解, 如果所述第二核酸分子与本文所述的重组核酸分子邻接, 则可以使用单个启动子或其启动子元件来驱动两个或全部的基因转录(例如编码转录激活因子的外源核酸以及编码目的多肽的一或多种异源核酸)。

[0042] 将核酸引入甲基营养型酵母细胞中的方法是本领域已知的, 包括但不限于转导、电穿孔、基因枪(biolistic particle delivery) 和化学转化。

[0043] 此外, 培养甲基营养型酵母细胞的方法在本领域中是已知的。参见例如毕赤酵母属协议: 分子生物学方法 (Pichia Protocols, Methods In Molecular Biology), 389, 克雷格 (Cregg) 编, 2007, 第2版, 胡马纳出版社 (Humana Press, Inc.)。在一些情况下, 可能需要向培养基中引入或添加甲醇, 尽管如本文所证明的, 并不需要甲醇以获得一或多种目的多肽的高水平表达。在一些情况下(例如当表达编码参与铁辅因子生物合成的酶的一或多种核酸时), 可能需要用铁或药理学上或代谢上可接受的(或GRAS) 盐。

[0044] 毕赤酵母菌株能够在甲醇上作为唯一碳源生长。甲醇利用是通过醇氧化酶作用将甲醇转化为甲醛引发的。所述甲基营养型酵母, 巴斯德毕赤酵母, 含有两种醇氧化酶基因

AOX1和AOX2。具有降低的醇氧化酶活性的菌株(“甲醇利用缓慢”或MutS菌株)通常比不具有降低的醇氧化酶活性的菌株产生更多由AOX1启动子表达的重组蛋白。两个AOX基因突变并且完全缺乏醇氧化酶活性的菌株不能代谢甲醇,但仍然可以通过甲醇诱导从AOX1启动子开始表达。这些菌株保留了使用其它碳源生长的能力,但是在添加甲醇后仍然能从AOX1启动子开始表达异源蛋白。由于这些菌株没有代谢甲醇(“减去甲醇利用”或Mut-菌株),诱导蛋白质表达需要更少的甲醇,并且携带这些突变的菌株避免了大规模发酵中甲醇进料有关的问题。参见例如齐鲁乌(Chiruvolu)等人,1997,酶与微生物技术(Enzyme Microb. Technol.), 21:277-83。本文确定Mut-菌株中从AOX1启动子开始的LegH表达大大提高了LegH产量。因此,在本文所述的方法中可以使用在AOX1基因和AOX2基因中都具有突变的甲基营养型酵母。

[0045] 目的蛋白或包含一或多种目的蛋白(例如血红素结合的LegH、脱水蛋白、植酸酶、蛋白酶、过氧化氢酶、脂肪酶、过氧化物酶、淀粉酶、转谷氨酰胺酶、氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、连接酶或抗体)的复合体可以从酵母细胞中纯化。纯化多肽的方法是本领域已知的。如本文所用,“纯化的”多肽是已经从天然伴随它的细胞组分中分离或纯化的多肽。典型地,当所述多肽为至少70%(例如至少75%、80%、85%、90%、95%或99%)干重时,所述多肽被认为是“纯化的”,与多肽和与之自然关联的天然存在的分子分离。由于化学合成的多肽天然地与天然伴随它的多肽分离,所以合成的多肽是“纯化的”。

[0046] 如本文所用,核酸可以包括DNA和RNA,并且包括含有一或多个核苷酸类似物或骨架修饰的核酸。核酸可以是单链或双链,其通常取决于其预期的用途。本发明还提供了与给定序列不同的核酸和多肽。相对于给定的核酸或多肽序列,核酸和多肽可以具有至少50%的序列同一性(例如至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性)。

[0047] 在计算序列同一性百分比时,两条序列进行比对,然后确定两条序列之间核苷酸或氨基酸残基的相同匹配数目。将相同匹配数目除以比对区域的长度(即比对的核苷酸或氨基酸残基的数目)并乘以100以得到序列同一性百分值。应该理解为,对比区域的长度可以是一或两个序列的一部分,最长为最短序列的全长尺寸。还可以理解为,单个序列可以与一个以上其它序列比对,因此,在每个比对的区域上都可以具有不同的序列同一性百分比值。

[0048] 可使用计算机程序ClustalW和默认参数进行两个或多个序列的比对以确定序列同一性百分比,从而允许核酸或多肽序列在其整个长度上进行比对(全局比对)。陈纳(Chenna)等人,2003,核酸研究(Nucleic Acids Res.), 31(13):3497-500。ClustalW计算出查询与一或多个目的序列之间的最佳匹配,并比对它们以确定同一性、相似性和差异。可以在一或多个残基的空位插入到查询序列、目的序列或两者中,以使序列比对最大化。为了核酸序列的快速配对比对,可以使用默认参数(即,字大小:2;窗口大小:4;评分方法:百分比;顶对角线数目:4;空位罚分:5);为了比对多个核酸序列,可以使用以下参数:空位开放罚分:10.0;空位拓展罚分:5.0;和重量转换:是的。为了快速配对比对多肽序列,可以使用以下参数:字大小:1;窗口大小:5;评分方法:百分比;顶对角线数:5;和空位罚分:3。对于多肽序列的多重比对,可以使用以下参数:权重矩阵:代矩阵(blosum);空位开放罚分:10.0;空

位拓展罚分:0.05;亲水间隙:开;亲水残基:甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys);以及特定残基空位罚分:开启。例如ClustalW可以运行在贝勒医学院的搜索启动网站(the Baylor College of Medicine Search Launcher website)或者在万维网的欧洲生物信息学研究所网站(the European Bioinformatics Institute website on the World Wide Web)上运行。

[0049] 可以将变化引入核酸分子内,从而导致编码的多肽的氨基酸序列发生变化。例如可以使用诱变(例如定点诱变、PCR介导的诱变)或通过化学合成具有这种变化的核酸分子将变化引入核酸编码序列中。这种核酸变化可导致在一或多个氨基酸残基的保守和/或非保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是其中的氨基酸残基被具有相似侧链的不同氨基酸残基替代的取代(参见例如戴霍夫(Dayhoff)等人(1978,蛋白质序列和结构地图集(Atlas of Protein Sequence and Structure),5(增刊3):345-352),其提供了用于氨基酸取代的频率表),并且非保守取代是其中氨基酸残基被不具有相似侧链的氨基酸残基替代的取代。如本文所述可以修饰核酸和/或多肽序列以改善一或多种性质,包括但不限于提高表达(例如转录和/或翻译)、更严谨的调控、失调、分解代谢物阻遏减少、修饰的特异性、分泌、热稳定性、溶剂稳定性、氧化稳定性、蛋白酶抗性、催化活性和/或颜色。

[0050] 如本文所用,“分离的”核酸分子是在所述分离的核酸分子来源的生物体的基因组中不含天然地侧接所述核酸一或两个末端的核酸分子(例如通过PCR或限制性内切酶消化产生的cDNA或基因组DNA片段)。通常将这种分离的核酸分子引入到载体中(例如克隆载体或表达载体)以便于操作或产生融合核酸分子,下文将更详细地讨论。另外,分离的核酸分子可以包括工程化的核酸分子如重组核酸分子或合成核酸分子。

[0051] 可以使用本领域常规技术分离核酸。例如可以使用任何方法分离核酸,所述方法包括但不限于重组核酸技术和/或聚合酶链式反应(PCR)。记载的常规PCR技术,例如PCR引物:实验室手册(PCR Primer:A Laboratory Manual),迪芬巴赫和维克斯列尔(Dieffenbach&Dveksler)编,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),1995。重组核酸技术包括,例如可用于分离核酸的限制酶消化和连接。作为单个核酸分子或作为一系列寡核苷酸,分离的核酸也可以化学合成。

[0052] 多肽可以通过已知的方法从天然来源(例如生物样品)纯化,例如DEAE离子交换、凝胶过滤和羟基磷灰石层析。多肽也可以通过例如在表达载体中表达核酸来纯化。另外,纯化的多肽可以通过化学合成获得。多肽的纯度可以使用任何适当的方法例如柱层析法、聚丙烯酰胺凝胶电泳或HPLC分析来测量。

[0053] 本发明还提供了含有核酸(例如编码多肽的核酸)的构建体或载体。包括表达构建体或载体在内的构建体或载体是可商购的,或者可以通过本领域常规的重组DNA技术制造。包含核酸的构建体或载体可以具有与这样的核酸可操作地连接的表达元件,并且还可以包括诸如编码选择性标记(例如抗生素抗性基因)序列。含有核酸的构建体或载体可以编码嵌合或融合多肽(即,与异源多肽可操作地连接的多肽,其可以位于多肽的N-末端或C-末端)。代表性的异源多肽是可用于纯化编码的多肽的那些异源多肽(例如6xHis标签、谷胱甘肽S-转移酶(GST))。

[0054] 表达元件包括指导和调节核酸编码序列表达的核酸序列。表达元件的一个实施例

是启动子序列。表达元件还可以包括内含子、增强子序列、应答元件或调节核酸表达的可诱导元件。表达元件可以是细菌、酵母、昆虫、哺乳动物或病毒来源的,并且载体可以含有来自不同来源的元件的组合。

[0055] 如本文所述载体可以被引入到宿主细胞中。正如本文所用,“宿主细胞”是指引入核酸的特定细胞,并且还包括携带该载体的这种细胞的子代。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如核酸可以在细菌细胞(例如大肠杆菌(E.coli))或昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS细胞)中表达。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。在体内和体外均将核酸引入宿主细胞的许多方法是本领域技术人员熟知的,包括但不限于电穿孔、磷酸钙沉淀、聚乙二醇(PEG)转化、热休克、脂质转染、显微注射和病毒介导的核酸转移。

[0056] 可以使用任何数量的扩增技术(参见例如PCR引物:实验室手册(PCR Primer:A Laboratory Manual),1995,迪芬巴赫和维克斯列尔(Dieffenbach&Dveksler)编,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港);和美国专利第4,683,195号、第4,683,202号、第4,800,159号和第4,965,188号)和适当的一对寡核苷酸(例如引物)来检测核酸。已经开发了许多对原始PCR的修饰,并可用于检测核酸。

[0057] 核酸也可以使用杂交来检测。Sambrook等人(1989,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第2版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港;章节7.37-7.57、9.47-9.57、11.7-11.8和11.45-11.57)详细讨论了核酸之间的杂交。Sambrook等人公开了适用于小于约100个核苷酸的寡核苷酸探针的Southern印迹条件(第11.45-11.46节)。在长度小于100个核苷酸的序列与第二序列之间的 T_m 可以使用第11.46节中提供的公式计算。Sambrook等人额外地公开了大于约100个核苷酸的寡核苷酸探针的Southern印迹条件(参见第9.47-9.54节)。可以使用Sambrook等人在第9.50-9.51节中提供的公式计算长度大于100个核苷酸的序列与第二序列之间的 T_m 。

[0058] 含有核酸的膜被预杂交和杂交的条件,以及洗涤含有核酸的膜以除去过量和非特异性结合的探针的条件,在杂交的严密性方面中起重要作用。这种杂交和洗涤可以在适当的中等或高度严格条件下进行。例如通过降低洗涤液中的盐浓度和/或提高洗涤温度,可以使洗涤条件更为严格。简单地举例来说,高度严格条件通常包括在65℃在0.2X SSC中洗涤膜。

[0059] 另外,解释杂交量可能会受下述条件影响,例如通过标记的寡核苷酸探针的比活性、探针已经与之杂交的模板核酸上的探针结合位点的数量、以及放射自显影曝光量或其它检测介质。本领域普通技术人员很容易理解,尽管可以使用任何数量的杂交和洗涤条件来检查探针核酸分子与固定的靶核酸的杂交,但是更重要的是,检查在相同的杂交、洗涤和曝光条件下探针与靶核酸的杂交。优选地,所述靶核酸在相同的膜上。

[0060] 如果与一种核酸杂交比与另一种核酸杂交至少多于5倍(例如至少6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍或100倍),则认为核酸分子与一种核酸杂交但不与另一核酸杂交。杂交的量可以在膜上或从使用的放射自显影(例如PhosphorImager)或密度计(Molecular Dynamics,加州森尼韦尔(Sunnyvale,CA))直接定量。

[0061] 可以使用抗体来检测多肽。使用抗体检测多肽的技术包括酶联免疫吸附测定

(ELISA)、Western印迹、免疫沉淀和免疫荧光。抗体可以是多克隆的或单克隆的。对多肽具有特异性结合亲和力的抗体可以使用本领域公知的方法制备。可以使用本领域已知的方法将所述抗体附着到固体支持物上,例如微量滴定板。在多肽的存在下,形成抗体-多肽复合物。

[0062] 通常使用可检测标记来完成检测(例如扩增产物、杂交复合物或多肽)。术语“标记”旨在包括使用直接标记以及间接标记。可检测的标记包括酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。

[0063] 可用于制备缺乏选择序列(即,缺乏可选择的标记)的菌株的方法描述于本文中。这些方法包括使用环状质粒DNA载体和线性DNA序列;所述环状质粒DNA载体包含选择标记和DNA复制起点(也称为自主复制序列(ARS)),而且所述线性DNA序列含有通过同源重组整合到毕赤酵母基因组中的序列。所述线性DNA分子可以额外地包括编码一或多种目的蛋白的核酸序列,例如但不限于血红素结合的LegH、脱水蛋白、植酸酶、蛋白酶、过氧化氢酶、脂肪酶、过氧化物酶、淀粉酶、转谷氨酰胺酶、氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、连接酶、一或多种参与小分子(如乙醇、乳酸、丁醇、己二酸或琥珀酸)生成途径的酶、或抗任何此类蛋白质的抗体。

[0064] 可以用通过在环状质粒上存在选择标记而选择的DNA分子和转化子二者来转化毕赤酵母细胞。然后可以使用例如PCR针对将所述线性DNA分子整合到所述基因组中来筛选转化子。一旦鉴定出具有正确整合所述无标记线性DNA分子的转化子,就可以在不存在选择环状质粒的情况下使细胞生长。由于携带标记的质粒在缺乏选择的情况下不能稳定地维持,选择松弛后,质粒通常非常快地丢失。所得到的菌株在不存在选择用异源序列的情况下携带所述整合的线性DNA。因此,该方法可用于构建缺少选择性标记(例如异源选择标记)的毕赤酵母菌株,而对重组蛋白产量影响极小至无影响。

[0065] 根据本发明,可以使用本领域技术范围内的常规分子生物学、微生物学、生物化学和重组DNA技术。这些技术在文献中有充分的解释。在下面的实施例中将进一步描述本发明,这些实施例不限制权利要求中描述的相关方法和组合物的范围。

[0066] 实施例

[0067] A部分. 材料与方法

[0068] 实施例1-聚合酶链式反应

[0069] 使用Phusion Hi-fidelity DNA聚合酶(新英格兰生物实验室(New England Biolabs))从基因组DNA或质粒DNA模板中扩增目的基因。简而言之,在1-2U的Phusion DNA聚合酶存在下,将0.6 μ M的正向和反向引物分别与10-50ng模板DNA和400 μ M核苷酸混合物一起孵育。反应条件如下:

[0070]

1个循环	预变性	98°C	1min
25个循环	变性	98°C	10sec
	退火		20sec
	延伸	72°C	每kb 30 sec
1个循环	最后延伸	72°C	5min
1个循环	保持	4°C	持续

[0071] 实施例2-通过连接进行质粒构建

[0072] 在T4DNA连接酶(新英格兰生物实验室)存在下温育约50-100ng限制性内切酶消化的质粒和超过3倍摩尔量的PCR扩增插入片段。在16℃下进行连接超过2小时。将2μl连接反应物转化到DH10B电感受态大肠杆菌细胞(E.coli)中。

[0073] 实施例3-转化入大肠杆菌ElectroMax DH10B T1噬菌体-抗性感受态细胞

[0074] 通过使用设置在1.7kV的微脉冲发生器(MicroPulser)(BioRad),用1mm间距电击杯(BioRad,目录号165-2089),通过电穿孔将1.5-2μl的连接混合物转化到20μl的ElectroMax DH10B T1噬菌体-抗性感受态细胞(英杰(Invitrogen),目录号12033-015)中;在脉冲后将1ml SOC加入细胞中,并将细胞在37℃以200rpm转速的振荡温育1小时。将10μl的回收混合物涂布在含有浓度为100μg/ml氨苄青霉素的LB琼脂平板上。平板37℃温育过夜。

[0075] 实施例4-用于转化到巴斯德毕赤酵母(P.pastoris)中的线性化质粒DNA

[0076] 在1x CutSmart缓冲液中用SfiI限制性内切酶(新英格兰实验室,目录号R0123L)将质粒DNA在50℃下消化1-4小时,或也在1x CutSmart缓冲液中用PmeI限制性内切核酸酶(新英格兰实验室,目录号R0560L)将质粒DNA在37℃下消化1-4小时。使用Zymoclean Gel DNA回收试剂盒(Zymo Research,目录号D4002)从0.8%琼脂糖凝胶中纯化线性化的质粒。在20μl水中洗脱DNA。

[0077] 实施例5-巴斯德毕赤酵母(P.pastoris)转化-感受态细胞的制备

[0078] 选择的巴斯德毕赤酵母菌株在25ml YPD培养基中生长至指数生长中期(~20D)。通过以930×g离心15分钟收集细胞。将细胞沉淀重新悬浮在2ml 80%YPD和200mMHEPES的溶液中(pH 6.8)。加入75μl 1M DTT。将重新悬浮的细胞沉淀物在30℃以100rpm混合25分钟。向该悬浮液中加入40ml体积的冰冷无菌水,再通过以1125x g离心15分钟收集细胞并置于冰上。将该细胞沉淀物重新悬浮于40ml冰冷的水中,并如前所述收集以用于额外的两个洗涤步骤。然后将细胞沉淀重新悬浮于20ml冰冷的1M山梨醇中,和如前所述通过离心收集。将最终的细胞沉淀悬浮在0.3ml冰冷的无菌山梨糖醇中,等分并在-80℃下冷冻。

[0079] 实施例6-转化到巴斯德毕赤酵母中

[0080] 使用设置在1.15kV的基因脉冲仪(GenePulser)(BioRad)和1mm间距GenePulser电击杯(BioRad)将约30-100ng线性化的质粒DNA转化到30μl电感受态巴斯德毕赤酵母细胞(P.pastoris)中。加入1ml YPD/1M山梨糖醇并以1:1的比例与细胞混合。使细胞在30℃下以100rpm振荡恢复3小时。将100μl的回收混合物涂布在含有适当抗生素的YPD平板上,并将其余的细胞涂布在具有合适抗生素的YPD板上。将平板在30℃下孵育48小时。用合适的抗生素将初级转化平板划线到YPD平板上,并将平板在30℃温育48小时。将单克隆封接到含有抗生素的YPD平板上,并使用贴片进行菌落PCR或gDNA准备以证实整合到该染色体中,并在摇瓶中培养菌株用于进一步分析。

[0081] 实施例7-为生产LegH在摇瓶中生长培养物

[0082] 将来自新鲜贴片的菌株接种到生长培养基BMGY(用0.75%甘油补充BMY)上,并在30℃下以200rpm振荡生长过夜。第二天,通过用补充有0.1mM柠檬酸铁(III)的BMMY培养基(BMY+1%甲醇)稀释ON培养物,用甲醇诱导LegH的表达。该培养物生长至OD600为0.5-0.7。加入消泡剂至最终浓度为0.01%。该培养物总计生长72小时;通过加入1/10摇瓶体积的10x

BMMY培养基 (BMY+10%甲醇) 每24小时向培养物补充甲醇。诱导生长72小时后通过离心收获细胞。

[0083] 实施例8-摇瓶培养基

[0084] 通过将10g酵母提取物和20g大豆蛋白胨溶解在790ml水制备BMY培养基。通过高压灭菌将混合物灭菌,并冷却至室温。将100ml 1M磷酸钾缓冲液 (pH6.0) 和100ml的10X不含氨基酸的酵母氮源 (每100ml 13.4g YNB粉末;西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich)) 过滤灭菌 (0.2μm孔径的PES), 并添加到所述培养基。不需要调节pH值。

[0085] BMY培养基组分

[0086]

组分	每1L含量
酵母提取物	10g
大豆蛋白胨 (BD)	20g
不含氨基酸的酵母氮源10X溶液	100mL (得到13.4g/L的BMY)
1M磷酸钾缓冲液, pH 6.0	100mL

[0087] 将下列组分溶于水中,并高压灭菌。

[0088] 摇瓶的低渗透度培养基

[0089]

组分	含量, g/L
硫酸铵	15.7
磷酸二氢钾	9.4
二水硫酸钙	0.43
七水硫酸镁	11.7
二水合柠檬酸钠	1.13

[0090] 实施例9-发酵培养基和供料

[0091] 将下面所述的组分溶解并用水调节体积。这些成分是FCC食品级或等同的级别。将该培养基通过高压、通过蒸汽或与等同的方式灭菌。

[0092] 用于发酵的含95g/L甘油的低渗透度培养基

[0093]

组分	含量, g/L
硫酸铵	15.7
磷酸二氢钾	9.4
二水硫酸钙	0.43
七水硫酸镁	11.7
二水合柠檬酸钠	1.13
甘油, USP等级99.7%	95

[0094] 灭菌后,使所述培养基冷却至室温,并加入以下物质:

[0095]

组分	含量, g/L
痕量金属PTM1溶液	2

维生素溶液	4
Sigma 204消泡剂或等同物	1

[0096] 痕量金属PTM1溶液可以从Sunrise Science(目录号4052-A-B-1L)的粉末混合物获得。将袋A和袋B在950mL水中混合,并且加入5mL硫酸。混合时预计会有一些沉淀;将混合物过滤灭菌(孔径为0.2 μ m的PES),并且在4℃避光保存。

[0097] 维生素溶液配方

[0098]

组分	含量,g/L
生物素	0.2
泛酸钙	1
叶酸	0.2
纤维醇	1
盐酸	0.2
对氨基苯甲酸	0.2
盐酸吡哆辛	1
核黄素	0.5
盐酸硫胺素	1
B12	0.1

[0099] 可选择地,痕量金属PTM1可以如下制备:

[0100]

组分	含量,g/L
五水硫酸铜	6.0g
碘化钠	0.08g
一水硫酸锰	3.0g
二水钼酸钠	0.2g
硼酸	0.02g
氯化钴	0.5g
氯化锌	0.5g
七水硫酸亚铁	65.0g
生物素	0.2g
硫酸	5.0ml
水	至最后体积1L

[0101] 将组分混合在一起,过滤灭菌并在室温下保存。通过将17.5g AmberFerm 4000混入320mL水中并搅拌溶解来制备甘油进料混合物。将水-Amberferm混合物加入到850g甘油中并剧烈搅拌混合均匀。该进料混合物通过高压灭菌消毒。

[0102] 甘油进料溶液

[0103]

组分	含量,g/L
USP等级甘油	850

水	320
Sensient AmberFerm4000大豆水解物	17.5

[0104] 甲醇进料使用补充有12mL/L PTM1溶液的99-100%甲醇制备。

[0105] 实施例10-实验室规模的高氧转移发酵的方案

[0106] 种子摇瓶方案

[0107] 在无菌生物安全柜中,将低渗透压培养基和BMY以9:1的低-渗透率:BMY比率混合。将浓度为12.5g/L的甘油加入培养基中。使用USP食品级甘油/甘油(在50%v/v (63%w/w) 甘油/水溶液中99.7%纯度)并高压灭菌。将Sigma 204或等同的消泡剂以0.25mL/L的浓度添加到培养基中。回收甘油种子瓶,用70%IPA或乙醇在外部喷雾约5分钟,并在生物安全柜内室温下解冻。用甘油种子瓶接种到隔离的摇瓶;每1L摇瓶培养基使用1mL接种瓶。培养物在30℃振荡培养24小时(1秒钟200RPM)。通常使用实际培养基体积:标称摇瓶体积在1:10和1:5之间的比例。2.8L标称容积的烧瓶中加入250~500mL的培养基,常规使用成功。生长24小时后测定600nm处的OD;如果OD为15或更高,则将培养物用于接种发酵罐。如果OD值小于15,则再培养培养物1-2小时,再次测定OD。如果在15至30小时后没有达到OD 15,则认为种子烧瓶已经失败。

[0108] 发酵方案

[0109] 如本文所述制备发酵培养基和种子。初始容积应该是最大发酵罐容积的约40%,例如如果发酵罐的最大工作容积是10L,则初始容积为4L。这是因为该过程在发酵结束时将接近最大工作容积。以10%的接种物-发酵罐比率的摇瓶培养基接种发酵罐,例如如果在发酵罐中存在4L初始培养基,则该发酵罐用约0.4L的摇瓶种子接种。此时发酵罐中的总体积称为T0体积,例如在这个代表性的实例中4.4L。过程控制包括以下内容:30℃的温度、通过搅拌-曝气级联控制溶解氧以保持20%的饱和设定点;以及通过添加28%NH₄OH来控制pH,设定点将取决于该过程的阶段。

[0110] 分批阶段(从接种到甘油消耗,由DO飙升(DO spike)做信号):

[0111] 根据对溶解氧的PID控制的响应性,当细胞消耗培养基中存在的甘油时,可以观察到强的溶解氧峰值或搅拌通气速率的快速下降或两者的组合。当这种情况发生时,开始分批补料阶段。分批阶段的持续时间大约为20小时,但最多24小时被认为是可接受的。该pH设定值是5.0。分批阶段结束时湿细胞重量大约为220g/L。

[0112] 补料分批阶段:基于T0体积开始甘油进料以实现12-14g/L/hr的纯甘油。维持该联合制度,直到湿细胞重量达到大约35g/L,这将需要约7-10小时。pH设定值是5.0。

[0113] 产品化阶段:在开始过渡阶段之前取样。基于T0体积开始甲醇进料以达到1g/L/hr的纯甲醇,直到在发酵液中找到1-2g/L甲醇浓度。在剩余的发酵期间调整甲醇进料速率,以保持肉汤中甲醇浓度为0.25-1g/L。基于T0体积,甘油联合剂从12-14g/L/hr纯甘油降低至8-9g/L/hr的纯甘油,在2小时内线性地减少。每20分钟逐步降低进料速率也是可以接受的。将pH设定点改变为3.5,并使发酵自然地调整至新的设定点(即不添加酸)。

[0114] 生产阶段(从甘油进料结束缓降至发酵结束):该pH设定点为3.5。在发酵液中保持0.25-1g/L的甲醇浓度。基于T0体积,甘油的进料速率保持在纯甘油8-9g/L/hr。大约每12小时取样。样品在4℃以4000-7000RCF离心,轻轻倒出上清液。该上清液被保存在一个单独的试管中。将颗粒饲料和各个时间点的5mL上清液的3个样品在-80℃下冷冻。如果在生产过程

中不能保持15-20%的溶解氧,基于T0体积,即使在最大的通气速度和搅拌速度下,甘油进料速率可以降低到5g/L/hr的纯甘油。接种60小时后发酵结束。在1000L规模下,收获过程包括关闭进料和充气,将发酵液冷却至8℃,并使用尖锐物或盘式离心机浓缩糊状物。收获通常需要约5-10小时,并且不会导致产品质量的可察觉损失。对于实验室规模来说,除了3×5mL样品之外,最后还要收集额外的50mL样品。湿细胞重量>450g/L,旋转颗粒看上去是粉红色的,与来自预诱导样品的旋转颗粒相反,看起来更白。在诱导大约6-12小时之后,肉汤开始从白色到更明显的粉红色的颜色变始。

[0115] B部分 生产菌株的构建

[0116] 生产菌株MXY0183

[0117] 实施例11-将血红素生物合成路径的每种酶克隆到pGAN或pGAZ整合载体中

[0118] pGAN(具有nat选择标记)和pGAZ(具有zeocin选择标记)购自Biogrammatix, Inc(加州卡尔斯巴德(Carlsbad, CA))。将每个基因置于A0X1启动子的控制之下,并将FDH终止子直接置于每个基因的终止密码子之后。来自于野生型巴斯德毕赤酵母菌株的PCR扩增或来自先前的构建体的亚克隆扩增血红素生物合成途径中的基因。

[0119] 包括参与血红素生物合成的酶在内的血红素生物合成途径见图1。在血红素的生物合成过程中产生的中间体显示在框中,而且催化每个步骤的酶显示在右边。如酿酒酵母(*S. cerevisiae*)所示限速酶步骤用下划线表示。

[0120] 用含有限制性内切酶BsaI识别位点的引物PCR扩增ALA合酶、ALA脱水酶、UPGIII合酶、UPGIII脱羧酶、CPG氧化酶和PPG氧化酶的基因。寡核苷酸由ElimBiopharm合成。

[0121]

引物设计	基因	序列	SEQ ID NO:
MxO0187	ALAsynth_F	GAGGGTCTCGGATGGAGTTTGTCGCCCCGTC	19
MxO0188	ALAsynth_R	GAGGGTCTCGATTACAATCTGACTCCTGATGAGG	20
MxO0189	ALAddehyd_F	GAGGGTCTCGGATGGTGCATAAGGCTGAATACTTG	21
MxO0190	ALAddehyd_R	GAGGGTCTCGATTATTCAGATAACCACTCCAGG	22
MxO0191	UroporSynth_F	GAGGGTCTCGGATGCCAAAAGCCATTCTTCTGAAG	23
MxO0192	UroporSynth_R	GAGGGTCTCGATTAGTGCACITTTTTGTATAGAC	24
MxO0193	UroporDecarb_F	GAGGGTCTCGGATGAGTAGATTTCAGAACTGAAG	25
MxO0194	UroporDecarb_R	GAGGGTCTCGATTATGAGATCCAATGCG	26
MxO0195	CoproOx_F	GAGGGTCTCGGATGGCCATCGACTCTGATATC	27
MxO0196	CoproOx_R	GAGGGTCTCGATTATACCCATTCAATAGGAT	28
MxO0197	ProtoporOx_F	GAGGGTCTCGGATGCTGAAAAGTCTTGACCAAAA	29
MxO0198	ProtoporOx_R	GAGGGTCTCGATTAAATGCCACTGAGGGTAGC	30

[0122] 使用融合高保真聚合酶(Phusion High-Fidelity DNA Polymerase)(新英格兰实验室,目录号M0530L)从基因组DNA扩增基因。使用DNA Clean&Concentrator-5(目录号D4004)获得PCR产物并纯化,并将DNA在25μl水中洗脱。载体DNA、pGAZ和pGAN、以及PCR产物在37℃下以50μl反应体积用BsaI(新英格兰实验室,目录号R0535S)消化。

[0123] 线性化载体和消化的PCR产物使用Zymoclean Gel DNA回收试剂盒(Zymo Research目录号D4002)从0.8%琼脂糖凝胶纯化。DNA在20μl的H₂O中洗脱。使用T4DNA连接酶(新英格兰实验室,目录号M0202S)在16℃过夜设置10μl连接反应物。

[0124] 从先前构建的质粒亚克隆PBD和亚铁螯合酶基因:pJAZ PBD用BstBI(Bsp119I)

(ThermoScientific,FD0124) 和NotI (ThermoScientific,FD0596) 在1x快速消化缓冲液中在37℃下消化5分钟。pJAZ_Ferroch用MfeI (MunI,ThermoScientific,FD0753) 和NotI (ThermoScientific,FD0596) 在1x快速消化缓冲液中在37℃消化5分钟。

[0125] 使用Zymoclean Gel DNA回收试剂盒 (Zymo Research目录号D4002) 从0.8%琼脂糖凝胶纯化消化产物。DNA在20μl H₂O中洗脱。

[0126] 使用T4DNA连接酶 (新英格兰实验室, 目录号M0202S) 在16℃过夜, 在10μl反应物中建立的连接反应。

[0127] 通过电穿孔, 使用设置为1.7kV的MicroPulser (BioRad), 将1.5μl连接混合物转化到20μl的ElectroMax DH10B T1抗-噬菌体感受态细胞 (英杰, 目录号12033-015) 中; 细胞在37℃在1ml SOC下以200rpm振荡温育1小时。将10μl的回收混合物涂布在含有浓度为100μg/ml的氨苄青霉素的LB琼脂平板上。平板在37℃温育过夜。通过菌落PCR筛选菌落插入的存在情况。确认了基因的序列。

[0128]

设计	构建体	基因
pMx0308	pGAN-ALAsynth	ALA合酶
pMx0309	pGAN-ALAD	ALAD
pMx0310	pGAN-UPGIIIIsyn	尿卟啉原合酶
pMx0311	pGAN-UPGIIIIdcarb	尿卟啉原脱羧酶
pMx0312	pGAN-CPGoxi	CPG氧化酶
pMx0313	pGAN-PPGoxi	原卟啉氧化酶
pMx0314	pGAZ-ALAsyn	ALA合酶
pMx0315	pGAZ-ALAD	ALAD
pMx0316	pGAZ-UPGIIIIsyn	尿卟啉原合酶
pMx0317	pGAZ-UPGIIIIdcarboxilase	UPGIII脱羧酶
pMx0318	pGAZ-PPGoxidase	PPG氧化酶
pMx0319	pGAZ-CPG oxidase	CPG氧化酶
pMx0320	pGAN-PBD	PBD
pMx0321	pGAZ-PGC	PBD
pMx0322	pGAZ-Fc	亚铁螯合酶
pMx0323	pGAN-Fc	亚铁螯合酶

[0129] 实施例12-在质粒上装配血红素生物合成基因以整合到巴斯德毕赤酵母mutS的基因组中

[0130] 使用含有限制性内切酶位点的引物来PCR扩增整个盒“启动子-基因-终止子”, 以装配整合到毕赤酵母基因组中的质粒。

[0131] 在pGAN质粒 (pMx327) 上装配Paox1_UPS_FDHterm-Paox1_UPD_FDHterm-Paox1_CP0_FDH项

[0132] 使用pGAN-CPGoxidase (pMx312) 作为载体来克隆所述UPS和UPD盒。将UPG III合酶盒是从pMx310用引物PCR扩增至含有NheI和AphI限制性内切核酸酶识别位点的AOX1启动子/FDH1终止子, 相应地:

[0133]

引物设计	识别位点	序列	SEQ ID NO:
MxO0399	NheI-pAOX1-F	CAA TCG CTA GCA TCC AAC ATC CAA AGA CGAAAG G	31
MxO0401	SphI-FDH1-R	GGA TAG CAT GCA CCT TAT CAA GAT AGC TAG AAA TAG AAA TGG	32

[0134] 相应地将UPG III脱羧酶盒从pMx311用引物PCR扩增至含有SphI和AgeI用于限制性内切核酸酶识别位点的AOX1启动子/FDH1终止子和:

[0135]

引物设计	识别位点	序列	SEQ ID NO:
MxO0402	SphI-pAOX1I-F	CAA TAG CAT GCA ACA TCC AAA GAC GAA AGG TTG AAT G	33
MxO0404	AgeI-FDH1-R	CAT GGT ACC GGT ACC TTA TCA AGA TAG CTA GAA ATA GAA ATGG	34

[0136] 使用Phusion High-Fidelity DNA聚合酶(新英格兰实验室,目录号M0530L)质粒扩增来自于质的粒DNA。

[0137] 获得的PCR产物使用DNA Clean&Concentrator-5 (Zymo Research,目录号D4004)扩增,并且将DNA在25μl H₂O中洗脱。

[0138] 命名为载体的pGAN-CPGoxidase (pMx312)用NheI-HF(新英格兰实验室,目录号R3131S)和AgeI-HF(新英格兰实验室,目录号R3552S)在1x CutSmart缓冲液中37℃过夜消化。

[0139] UPG III合酶盒PCR产物在1x CutSmart缓冲液中用NheI-HF(新英格兰实验室,目录号R3131S)和SphI-HF(新英格兰实验室,目录号R3182S)在37℃过夜消化。

[0140] UPG III脱羧酶盒PCR产物在1x CutSmart缓冲液中用SphI-HF(新英格兰实验室,目录号R3182S)和AgeI-HF(新英格兰实验室,目录号R3552S)在37℃过夜消化。

[0141] 消化的载体和PCR产物使用Zymoclean Gel DNA回收试剂盒(Zymo Research,目录号D4002)从0.8%琼脂糖凝胶纯化。DNA在20μl H₂O中洗脱。

[0142] 用NheI-SphI消化的UPG III合酶盒、用SphI-AgeI消化的UPG III脱羧酶盒和用NheI-AgeI消化的载体两两之间的三种连接在10μl中在16℃下用T4DNA连接酶(新英格兰实验室,目录号M0202S)建立。

[0143] 通过电穿孔使用设定为1.7kV的MicroPulser (BioRad)将1.5μl连接混合物转化到20μl的ElectroMax DH10B T1抗-噬菌体感受态细胞(英杰,目录号12033-015)中;细胞在37℃,1ml SOC下温育1小时,同时以200rpm振荡。将10μl的回收混合物涂布在含有浓度为100μg/ml的氨苄青霉素的LB琼脂平板上。平板在37℃温育过夜。通过菌落PCR筛选菌落的存在情况。载体和插入物之间的连接序列被证实。

[0144] 装配Paox1_ALAsynthase_FDH1term-Paox1_PPGoxidase_FDH1term-Paox1_Fc_FDH1term盒-Paox_PBD_FDH1term盒(pMx330)

[0145] a.基因盒的PCR扩增:

[0146] 将ALA合酶盒用引物从pMx310将PCR扩增至相应地包含的NheI和XhoI限制性内切核酸酶的识别位点AOX1启动子/FDH1终止子:

[0147]

引物设计	识别位点	序列	SEQ ID NO:
MxO0399	NheI-pAOX1-F	CAA TCG CTA GCA TCC AAC ATC CAA AGA CGAAAG G	35
MxO0400	XhoI-FDH1-R	GAT ATT GCT CGA GAC CTT ATC AAG ATA GCT AGAAAT AGAAAT G	36

[0148] 将PPG氧化酶盒从pMx313用引物PCR扩增至含有XhoI和AflIII限制性内切核酸酶识别位点的AOX1启动子/FDH1终止子:

[0149]

引物设计	识别位点	序列	SEQ ID NO:
MxO0403	XhoI-pAOX1-F	CAA TCT CGA GAA CAT CCA AAG ACG AAA GGT TG	37
MxO0437	AflIII-FDH1-R	CAA CCA TTT CTA TTT CTA GCT ATC TTG ATA AGG TCT TAA GTC CA	38

[0150] 亚铁螯合酶盒从pMx323用引物PCR扩增至含有AflIII和AgeI限制性内切核酸酶的识别位点的AOX1启动子/FDH1终止子:

[0151]

引物设计	识别位点	序列	SEQ ID NO:
MxO0404	AgeI-FDH1-R	CAT GGT ACC GGT ACC TTA TCA AGA TAG CTA GAA ATA GAA ATG G	39
MxO0436	AflIII-pAOX1-F	TTA CTT AAG TCC AAC ATC CAA AGA CGA AAG GTT G	40

[0152] 使用以下引物从购自Biogrammatitics的pJAG质粒PCR扩增产G418标记:

[0153]

引物设计	识别位点	序列	SEQ ID NO:
MxO0438	MluI-G418-F	TCA CAG ACG CGT TGA ATT GTC C	41
MxO0439	BbvCI-G418-R	TTG CTC CTC AGC TTA GAA GAA CTC GTC CAA CAT CAA GTG	42

[0154] 使用Phusion High-Fidelity DNA聚合酶(新英格兰实验室,目录号M0530L)扩增质粒DNA。使用DNA Clean&Concentrator-5 (Zymo Research,目录号D4004)获得PCR产物并纯化,并将DNA在25μl的H₂O中洗脱。

[0155] b. 制备载体

[0156] 命名为载体的pGAZ-PBD (pMx321) 在1x CutSmart缓冲液中用NheI-HF(新英格兰实验室,目录号R3131S)和XhoI(新英格兰实验室,目录号R0146S)在37℃过夜消化。

[0157] 将pGAZ-ALAsyn-PBD (pMx328) 在1×NEBuffer3.1中用MluI(新英格兰实验室,目录号R0198S)和BbvCI(新英格兰实验室,目录号R0601S)在37℃过夜消化。

[0158] 在37℃用XhoI(新英格兰实验室,目录号R0146S)和AgeI-HF(新英格兰实验室,目录号R3552S)在1x CutSmart缓冲液中消化pGAG-ALAsyn-PBD (pMx332)。

[0159] c. 制备中间结构构建体并装配最终的盒子

[0160] 消化的载体和PCR产物使用Zymoclean Gel DNA回收试剂盒(Zymo Research,目录号D4002)从0.8%琼脂糖凝胶纯化。DNA在20μl H₂O中洗脱。

[0161] 用NheI-XhoI限制性内切核酸酶消化的pGAZ-PBD (pMx321) 载体与用相同的酶消化

的ALA合酶盒PCR产物在10 μ l反应中在16℃用T4DNA连接酶(新英格兰实验室,目录号M0202S)过夜连接,产生pGAZ-ALAsyn.-PBD质粒(pMx328)。

[0162] 用XhoI和AgeI-HF限制性内切酶消化的pGAG-ALAsyn-PBD(pMx332)使用T4DNA连接酶(新英格兰实验室,目录号M0202S)以三种方式相应地与用XhoI、AflIII和AflIII、AgeI-HF限制性内切核酸酶消化的PPG氧化酶盒和亚铁螯合酶盒PCR产物连接,以产生到pGAG-ALAsyn-PBD氧化酶(pMx330)

[0163] 通过电穿孔,使用设定为1.7kV的MicroPulser(BioRad),将1.5 μ l连接混合物转化到20 μ l ElectroMax DH10B T1抗-噬菌体感受态细胞(英杰,目录号12033-015)上,细胞在37℃,1ml SOC下温育1小时,同时以200rpm振荡。将10 μ l的回收混合物涂布在含有浓度为100 μ g/ml的氨苄青霉素的LB琼脂平板上。平板在37℃温育过夜。通过菌落PCR筛选菌落的存在情况。确认载体和插入片段之间的连接序列。

[0164]

消化	构建体	基因
pMx0327	pGAN-UPGsyn_UPGdecarb_CPGoxy	UPGsyn_UPGdecarb_CPGoxy
pMx0328	pGAZ-ALAsyn-PGC	ALAsyn-PBD
pMx0330	pGAG-ALAsyn_PBD_PPG_Fc	ALAsyn_PBD_PPG_Fc
pMx0332	pGAG-ALAsyn_PBD	G418marker

[0165] 实施例13-将具有基因盒的线性化质粒整合到巴斯德毕赤酵母Bg11基因组

[0166] 用于产生生产菌株MXY0183的质粒在图2中示出。进行导致生产菌株MXY0183的修改所采取的步骤描述于图3中。

[0167] 要引入巴斯德毕赤酵母Bg11基因组的第一酶是ALAD。使用PmeI限制酶(新英格兰生物实验室)使含有pAOX1驱动的ALAD(pMX229,图2i和图3)的质粒线性化。线性化的质粒从如前所述的0.8%琼脂糖凝胶纯化,并使用天然AOX1基因座处的同源重组转化到巴斯德毕赤酵母中,从而产生菌株MXY099(图3)。

[0168] 使用SfiI限制性内切酶将含有在命名为pMX282的pAOX1启动子(图2ii和图3)的控制下的两个拷贝的大豆LegH基因(优化用于巴斯德毕赤酵母的序列;SEQ ID NO:3)的质粒线性化。线性化的质粒从如前所述的0.8%琼脂糖凝胶纯化,并转化到含有ALAD的巴斯德毕赤酵母中,从而产生菌株MXY0118(图3)。使用qPCR并确定,可能是由于重组时质粒pMX282的多联化,菌株MXY0118含有数个拷贝的LegH基因。

[0169] 用SfiI限制性内切核酸酶线性化含有在AOX1启动子控制下的编码尿卟啉原III合酶(UPS)、尿卟啉原III脱羧酶(UPD)和卟啉原III氧化酶(CPO)(所述酶分别催化步骤4、5和6)的基因的质粒pMX327(图2iii和图3)并引入MXY0118中,从而产生菌株MXY0170(图3)。

[0170] 将来自巴斯德毕赤酵母基因组的编码ALA合酶(ALAS)、原卟啉III氧化酶(PPO)、亚铁螯合酶(FC)和胆色素原脱氨酶(PBD)(所述酶分别催化步骤1、7、8和3)的基因装配于质粒pMX330上(图2iv和图3)。pMX330用SfiI限制性内切酶线性化并转化到MXY0170中,导致菌株MXY0183的产生(图3)。使用PCR和qPCR确认MXY0183的基因型。

[0171] 生产菌株MXY0207

[0172] 实施例14-pGAB表达载体的构建

[0173] pGAB表达载体图(4A)通过使用来自土曲霉(*Aspergillus terreus*)的稻瘟净脱氨

酶(BSD)基因的开放阅读框更换pGAZ载体中的Zeocin抗性基因的开放阅读框(BioGrammatics有限公司,加州卡尔斯巴德)进行构建,从允许进行携带具有抗生素灭瘟素S的质粒的转化体的选择。

[0174] 如本文所述,BSD开放阅读框使用寡核苷酸引物Mx00476和Mx00477通过高保真度聚合酶链反应从商业合成DNA分子进行扩增。

[0175]

引物设计	说明	序列	SEQ ID NO:
Mx00477	BSD_反向	TTA GTC TTG CTC CTC AGC TTA GCC	43
Mx00476	BSD_正向	TCA CAG ACG CGT TGA ATT GTC C	44

[0176] BSD PCR产物通过通过在1xTBE缓冲液(TBE buffer) (89mM Tris、89mM硼酸、2mM EDTA、pH 8.3)中1%琼脂糖凝胶上的电泳分离,并使用SYBR安全DNA凝胶染料(生命科技,加州卡尔斯巴德)进行可视化。所需的DNA片段从琼脂糖凝胶分离并且DNA使用Zymoclean凝胶DNA回收试剂盒(Zymo Research,加州尔湾(Irvine,CA))回收。

[0177] 纯化的BSD PCR产物和pGAZ载体以10单位MluI和10单位BbvCI限制性内切核酸酶(新英格兰生物实验室)在37℃于1xNE缓冲液3.1(NEBuffer 3.1) (100mM NaCl、50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、100μg/ml BSA、25℃时pH为7.9)中消化1小时。消化的DNA产物使用如上所述的凝胶电泳进行回收。

[0178] 纯化的MluI和BbvCI消化的BSD PCR产物和pGAZ载体通过在1x T4DNA连接酶反应缓冲液(50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、1mM ATP、10mM DTT、25℃时pH为7.5)中通过400单位的T4DNA连接酶(新英格兰生物实验室)使用20μl反应,在16℃在20μl进行培养2小时。电转感受态大肠杆菌DH10B细胞使用2μl连接反应进行转化并且耐抗生素转化体在添加有100 μg/μl氨苄青霉素的LSB琼脂板上进行选择。

[0179] 实施例15-Mxr1表达载体的构建

[0180] Mxr1表达载体pMx354通过将Mxr1开放阅读框引入pGAB载体进行构建(图4B)。Mxr1开放阅读框插入pGAB,且翻译在紧邻来自巴斯德毕赤酵母的甲醇诱导型醇氧化酶1(AOX1)下游处开始,并且来自巴斯德毕赤酵母FDH1基因的转录终止子紧跟在翻译停止信号之后。

[0181] 编码Mxr1蛋白质的开放阅读框从分离自巴斯德毕赤酵母菌株Bg11MutS(购自BioGrammatics有限公司,加州卡尔斯巴德)的基因组DNA进行扩增。Mxr1开放阅读框使用引物Mx00495(TTT TGC GGC CGC ATG AGC AAT CTA CCC CCA ACT TTT G(SEQ ID NO:45))和Mx00496(AAA AGC GGC CGC CTA GAC ACC ACC ATC TAG TCG GTT(SEQ ID NO:46))从巴斯德毕赤酵母基因组DNA进行扩增,所述引物附至NotI限制性内切核酸酶识别位点。如本文所述,使用聚合酶链反应完成扩增。

[0182] 扩增的Mxr1PCR产物和pGAB载体以10单位NotI限制性内切核酸酶(新英格兰生物实验室)在37℃于1xNE缓冲液3.1(NEBuffer 3.1) (100mM NaCl、50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、100μg/ml BSA、25℃时pH为7.9)中消化1小时。消化后,NotI消化的pMx352载体使用5单位的磷酸酶(新英格兰生物实验室)在37℃于1x磷酸酶缓冲液(50mMBis-Tris-丙烷-HCl、1mM MgCl₂、0.1mM ZnCl₂、25℃时pH为6)中处理15分钟。

[0183] NotI消化的扩增的pMx352载体Mxr1片段和pMx352载体通过在1xTBE缓冲液(TBE buffer) (89mM Tris、89mM硼酸、2mM EDTA、pH 8.3)中1%琼脂糖凝胶上的电泳分离,并使用

SYBR安全DNA凝胶染剂(生命科技,加州卡尔斯巴德)进行可视化。所需的DNA片段从琼脂糖凝胶分离并且DNA使用Zymoclean凝胶DNA回收试剂盒(Zymo Research,加州尔湾)回收。

[0184] 含有Mxr1开放阅读框架的NotI消化片段通过连接引入在邻近AOX1启动子下游NotI位点的pGAB。含有137ng编码Mxr1开放阅读框架的NotI消化DNA和60ng NotI消化、磷酸酶处理的pMx352的混合物使用400单位的T4DNA连接酶(新英格兰生物实验室)于1x T4DNA连接酶反应缓冲液(50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、1mM ATP、10mM DTT、25℃时pH为7.5)中通过20μl反应,在16℃下于20μl反应中培养2小时。电转感受态大肠杆菌DH10B细胞使用2μl连接反应进行转化并且耐抗生素转化体在添加有100μg/μl氨苄青霉素的LSB琼脂板上进行选择。板在37℃下培养一夜。使用引物Mx00495和Mx00496通过PCR筛选处存在插入物的菌落。通过DNA测序确认最终载体的序列。

[0185] 克隆期间,6个附加的氨基酸序列被引入Mxr1的N-末端。Mxr1开放阅读框在“核苷酸序列”部分下示出,且来自克隆的氨基酸残基用下划线示出。含有在N末端具有6个附加氨基酸的毕赤酵母产生菌株和含有野生Mxr1(即,在N末端没有6个附加氨基酸)的毕赤酵母菌株在发酵罐中不能进行区分。

[0186] 实施例16-天然Mxr1表达载体的构建

[0187] 含有在pAOX1启动子(命名为pMX354)控制下的Mxr1转录调节基因的质粒用作PCR扩增的模板。AOX1启动子的3'端、LegH开放阅读框、和AOX1终止子使用如下所示的引物Mx00617和Mx00647从pMX354扩增。AOX1终止子、连接子和AOX1启动子的5'端使用引物Mx00618和Mx00646从pMX382扩增。

[0188]

引物设计	序列	SEQ ID NO.
Mx00646	ACTAGATGGTGGTGTCTAGTCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTG	47
Mx00647	TCTGACATCCTCTTGACTAGACACCACCATCTAGTCGGTTTTCTAG	48

[0189] PCR产物使用DNA Clean&Concentrator-5获得并纯化,并且DNA在12μl H₂O中洗脱,然后纯化的PCR产物结合并用作模板用以使用引物Mx00617和Mx00618进行随后一轮的PCR扩增。所得PCR产物由AOX1启动子的3'末端、Mxr1开放阅读框、AOX1终止子、短接头序列和AOX1启动子的5'端组成。所述PCR产物如本文所述获得并纯化。纯化的PCR产物使用Zero Blunt® TOPO® PCR克隆试剂盒(英杰,目录号K2800-20)克隆到pCR™-Blunt II-TOPO®载体中,以创建pMX402载体。

[0190] 实施例17-巴斯德毕赤酵母菌株MXY0206和MXY0207的构建

[0191] pMx354Mxr1表达载体(图4B)通过DNA转化被引入MXY0183菌株(图3)。

[0192] 通过使用20单位的PmeI限制性内切核酸酶(新英格兰生物实验室)在37℃于1x NE缓冲液4(NEBuffer 4)中(50mM乙酸钾、20mM三羟基甲甲烷酸盐、10mM乙酸镁、1mMDTT、25℃时pH为7.9)进行消化在AOX1启动子序列中唯一的PmeI位点线性化pMx354载体(1.5μg)。

[0193] PmeI消化的pMX354载体使用凝胶电泳进行纯化,并使用上述Zymoclean凝胶DNA回收试剂盒进行回收,线性化的pMX354载体通过对含杀稻瘟菌素的培养基进行转化和选择被引入菌株MXY0183。两个独立的克隆体通过转化获得,并且它们分别命名为MXY0206和MXY0207。通过PCR确认在AOX1启动子控制下的额外拷贝的Mxr1存在于这些菌株中。

[0194] 生产菌株MXY0291

[0195] 实施例18-菌株MXY0213和MXY0260的构建

[0196] 图5显示了构建含有7个血红素生物合成途径酶的无抗生素标记菌株MXY0213所采取的步骤。pAOX1下含有变异体Mxr1的线性DNA片段(N-末端处6个额外的氨基酸),在每个端具有与pAOX1启动子的同源性的情况下,使用共转化引入(图5和图6i)。该线性Mxr1表达盒与pIL75质粒通过共转化被同时引入毕赤酵母菌株MXY213。pIL75载体携带panARS自主复制序列(莱克和邓纳姆(Liachko&Dunham),2014,欧洲微生物学会联合会酵母研究(FEMS Yeast Res.),14:364-7),从而可以保持质粒载体(无需整合到转化细胞的基因组中)和用于选择具有抗生素G418的转化体的kanMX标记。转化细胞在添加有G418的培养基上选择,以使pIL75质粒上存在kanMX标记。毕赤酵母转化体通过菌落PCR筛选,以筛选出具有pIL75质粒并正确整合了Mxr1表达盒的转化体。

[0197] 实施例19-共转化以将LegH表达盒引入毕赤酵母

[0198] 含有在命名为pMX399的pAOX1启动子控制下的不同巴斯德毕赤酵母密码子优化的大豆蛋白LegH基因变异体(变异体3;SEQ ID NO:5)的质粒用作基因PCR扩增模板的来源。来自TOP0克隆质粒pMX401的骨干经过PCR扩增。插入物和载体使用Gibson套件(NEB Gibson装配试剂盒)进行装配以产生质粒pMX422。该质粒用作模板以使用如下引物Mx00617和Mx00618进行随后一轮的PCR扩增。

[0199]

引物设计	序列	SEQ ID NO:
Mx00617	AAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGAC	49
Mx00618	AAACTGTCAGTTTTGGGCCATTG	50

[0200] 所得PCR产物由(在5'端至3'的方向)AOX1启动子的3'、LegH变异体3开放阅读框、AOX1终止子、短接头序列和AOX1启动子的5'端组成(图6ii)。所述PCR产物如本文所述通过琼脂糖凝胶电泳获取和纯化。

[0201] 具有整合到基因组中的LegH表达盒的转化体通过PCR筛选并使用qPCR表征LegH基因拷贝数。

[0202] 实施例20-具有选择标记的质粒载体的转化体固化

[0203] 在其中LegH表达盒显示为通过菌落PCR正确整合并通过qPCR具有高拷贝数的克隆体中,通过放松对抗生素的选择,使得不再需要在G418上选择pIL75质粒。转化体在缺乏G418抗生素的培养基上划线培养单菌落。由于panARS质粒在选择缺失的情况下不能稳定地保持,所以pIL75在这种情况下会很快地从转化细胞流失。所得的毕赤酵母菌株MXY0291含有拷贝数与MXY0207相似的用于LegH表达的序列,但是没有用于选择的异源序列。

[0204] 生产菌株MXY0330、MXY0333和MXY0338**[0205] 实施例21-菌株MXY0306的构建**

[0206] 菌株MXY0291的基因型PCR显示一部分CPG氧化酶编码序列在该菌株构建的过程中被删除。全长CPG氧化酶编码区通过替换截断的拷贝进行恢复。简单地说,含有pAOX1启动子和全长CPG氧化酶编码区的线性DNA片段通过使用如下所示的引物Mx00866和Mx00867从质粒pMX312进行PCR扩增来产生。

[0207]

引物设计	序列	SEQ ID NO:
------	----	------------

Mx00866	ACGCTGTCTTGGAACTAATATGAC	51
Mx00867	TACCCATTCAATAGGATTTTGTAGTACCTGC	52

[0208] 线性pAOX1-CPG氧化酶DNA片段通过与pIL75质粒共转化引入菌株MXY0291。转化体在含有G418的培养基上选择,然后通过PCR筛选以出现全长CPG氧化酶编码区。含有全长CPG氧化酶的分选物被鉴定,随后如上所述固化需要在G418上选择的质粒载体。该菌株被命名为MXY0306(参见图5)。

[0209] 实施例22-杂交启动子菌株的线性构建体

[0210] LegH变异体3在本文所示的三种天然巴斯德毕赤酵母组成型启动子中的每一种的指导下表达。线性构建体如图7所示,并含有启动子3'半部分、LegH变异体3和FDH1转录终止子。紧接着是含有来自棉阿舒囊霉(*Ashbya gossypii*)的pTEF启动子、来自构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的乙酰胺酶基因和来自棉阿舒囊霉的TEF终止子的抗生素抗性盒。最后,构建体含有启动子的5'半部分。该线性盒使用下表所列出的寡核苷酸引物进行扩增以在5'端和3'端(与天然毕赤酵母基因组中各自的启动子同源)产生含有数百个碱基对的构建体。

[0211] 用于扩增线性构建体的引物

[0212]

引物设计	序列	SEQ ID NO:
MX00718	GAGCTTCTTCTACGGCCCCC	53
MX00723	TCCAGCAGAGTAAAATTTCTAGGGAC	54
MX00724	CTCTTTTAGGTTTAAAGTTGTGGGAACAGTAACA	55
MX00729	GTGGGTGCTTCTTTGCGTGG	56
MX00730	AGAATTGCCATCAAGAGACTCAGGACT	57
MX00735	GATAGAGAGAAATCGCAAACCTTGAGAGGAAG	58

[0213] 感受态MXY0306细胞使用每一个线性盒进行转化而含有amdS选择盒的转化体基于它们在含有乙酰胺(作为唯一氮源)的琼脂板上的生长能力进行选择。这些菌株被纯化,分离并且通过PCR确认存在在组成型启动子控制下的LegH(图5)。

[0214] 实施例23-核酸序列

[0215] Mxr1核酸序列(加下划线的核苷酸编码在克隆过程中引入的N末端的6个氨基酸)(SEQ ID NO:1)

[0216] ATGCGAGACCGCGCCGCATGAGCAATCTACCCCCAACTTTTGGTTCCACTAGACAATCTCCAGAAGAC
 CAATCACCTCCCGTGCCCAAGGAGCTGTCAATTCATGGGACCACACCCTCAGGAAAGCTACGCTTATTTGTCTGTCA
 GACATGTACTCGAGCATTTGCTCGTCAGGAACACTTGAAACGACACGAAAGGTCTCACACCAAGGAGAAACCTTTCA
 GCTGCGGCATTTGTTCTCGTAAATTCAGCCGTCGAGATCTGTTATTGAGACATGCCCCAAAACCTGCACAGCAACTGC
 TCTGATGCGGCATAACAAGACTAAGGCGCAAGGCAACTCGTCGGTCTTCTAATGCCGCGGGTTCCATATCTGGTTC
 TACTCCGGTGACAACGCCAAATACTATGGGTACGCCCAGATGGCGAGAAACGAAAAGTTCAGAACTGGCCGGCC
 GCCGGGACTCAAATGAACAGAAACTGCAACTGCAACAACAACATCTACAGCAACAACCACAGTTGCAATACCAACAA
 TCTCTTAAGCAGCATGAAAATCAAGTCCAGCAGCCTGATCAAGATCCATTGATATCCCCGAGAATGCAATTATTCAA
 TGATTCCAACCATCACGTAAACAATTTGTTTGATCTTGACTAAGAAGAGCTTCCTTCTCCGCCGTTAGTGGAATA
 ATTATGCCATTATGTGAATAATTTTCAACAAGATGCCTCTTCTACCAATCCAAATCAAGATTCAAATAATGCCGAA

TTTGAGAATATTGAATTTTCTACCCACAAATGATGCCCCGTTGAAGATGCTGAACTTGGATGAACAACATGGGTCC
AATTCCGAACCTTCTCTCTCGATGTGAACAGGAACATTGGTGATAGCTTTACAGATATACAACACAAGAATTCAGAGC
CTATTATATCCGAACCGCCCAAGGACACCGCTCCAAACGACAAGAAGTTGAATGGCTACTCTTTTACGAAGCCCC
ATCAAGCCATTAGAATCCCTATTTTCTGTCTCAGGAATACAAAAGAGAAACAAGTATAAAACAAATGACGACTCTCCAGA
CACCGTGGATAATAACTCCGCACCGGCTGCTAATACCATTCAAGAACTTGAGTCTTCTTTGAATGCATCCAAGAATT
TTTGCTTGCCAACTGGTTATTCTTCTATGGTAATTTGGACCAACAGACTTTCTCTAACACGTTATCATGCACTTCT
TCTAATGCCACAATTTGCGCCATTCTACTCGATAACTCCATTAATAATAACTCCACTAGTGACGTGAGACCAGAATT
TAGAACACAAAGTGTCACCTCTGAAATGAGTCAAGCCCCCTCCCCCTCCTCAAAAAACAACCTCGAAATATTCCACCG
AAGTTCTTTTTTACCAGCAACATGCGGTCGTTTATTCACTACGCTCTTTCCAAGTATCCTTTTTATTGGTGTGCCACT
CCAACCTCTTCCGGAGAACGAAAGACTAAATGAATATGCTGATTCAATCACCAACCGTTTCTTAAATCATTATCCTTT
CATACTGTCTACGATTCTCAAAGAATACTCCCTTTTCAAGGCAATTTTAGATGAGAATGAGTCGACTAAGAACTGGG
AAAATAATCAGTTTTACTTAGAGAACCAACGAATATCAATTGTTTGTCTTCCTCTTTTGGTGGCTACGATAGGTGCA
GTACTATCAAACAACAAAAAGGATGCTTCGAATTTATACGAAGCTTCAAGGCGTTGTATTCATGTTTACTTAGATTC
CAGGAAAAAGATACCCACTTCCTTGTCGCAATAACAATGACTCTCCACTTTGGCTAATTCAATCCCTGACGTTAT
CTGTTATGTATGGGTTATTTGCGGACAATGACATTAGTTGAATGTCGTGATCAGACAAGTTAACGCACTTAATTCT
CTGGTCAAGACTTCGGGCCTGAATAGGACCTCAATTATAGATCTTTTCAACATCAACAAACCTTTGGATAATGAACT
CTGGAATCAATTTCGTGAAAATAGAGTCCACCGTAAGGACAATCCACACGATTTTTCAAATCAGTTCCAACCTTAAGCG
CCTTGTAACATATTATTCCATCGTTGAAAATTGATGACCTAATGATTACTCTACCAGTTCCCACAACACTTTGGCAA
GCTGATTCTTTTGTGAAATTCAAAAGTCTAAGTTACGGAAAATCAGATCCCTTTTCAATATACAAGAGTACTACAGAA
TTTGATTGATTACAATCAGCCATTGAGCGATGGAAAATTTTGTATGAAAACCATGTAAGTGAGTTTGGACTCATAT
GCCTACAGAATGGTCTACACCAATACAGCTATTTCCAAAAATGACTGCTGTCAATAACAGAGAAGATGCGCTATTC
ACAAAGGTTGTTAATTCACCTTCACAGTTGGGATAGGATGATTTGCAATTCTGATTGTGTTCCAAAGAAGATATATCA
GCAGAGTTGCTTGATTTTGGACTCAAAGTTGCTTAATAATTTCCCTGATTGTCAAGAGCTCATTGAAAGTTTCGACCG
GAGACGTTAGTTCTTTGAATAAGTTAAAAGAAAACGTGTGGCTTAAAACTGGAATCAAGTGTGTGCTATCTATTAT
AACAGCTTCATGAACATTCCCTGCTCCCAGTATTCAAAAGAAGTACAATGACATAGAGTTTGTGGATGACATGATTAA
TTTGAGTCTAATCATCATCAAGATTATGAACTCATTTTCTATAACAATGTCAAAGACAATTATGAGGATGAAAATG
ACTTCAAATTGCAAGAGTTAAATTTAACAATTTGACAAATTTTGATGAGAAAATATCCTTGAATTTGACAATATTATTC
GATATATTTTTGATGATCTACAAGATAATTACCAATTACGAAAAGTTTATGAAGATCAAACACAAGTTTAATTACTA
CAATTCTAATTCGAATATAAGCTTCTTGATCATTTTGAAGTCTCCTCGGTTATCAATAACACCCAAATGAACCAGA
ATGATTATATGAAAACAGATATTGATGAAAAGCTTGATCAGCTTTTCCACATCTATCAAACATTTTTCCGGCTGTAT
CTGGATTTAGAAAAGTTTATGAAGTTCAAATTCAACTATCATGACTTTGAGACAGAGTTTTCAAGTCTCTCAATATC
CAATATACTGAACACTCATGCTGCTTCAACAATGACACAAATGCTGCTGATGCTATGAATGCCAAGGATGAAAAA
TATCTCCCACTTTGAATAGCGTATTACTTGCTGATGAAGGAAATGAAAATTCGGGTCGTAATAACGATTCAGAC
CGCCTGTTTCATGCTGAACGAGCTAATTAATTTTGAAGTAGGTTTGAAATTTCTCAAGATAGGTGAGTCATTTTTTGA
TTTCTTGATGAGAATAACTACAAGTTCATCCACTTCAAAAACTTAAATGACGGAATGTTCCACATCAGGATATACC
TAGAAAACCGACTAGATGGTGGTGTCTAG

[0217] Mxr1蛋白质序列(加下划线的克隆期间引入的N末端的6个氨基酸)(SEQ ID NO:2)
MRDRGRMSNLPPTFGSTRQSPEDQSPVPKELSFNGTTPSGKLRLFVCQCTRAFRARQHLKRHERSHTKEKPFSCG
ICSRKFSRRDLLLRHAQKLHSNCSDAAITRLRRKATRRSSNAAGSISGSTPVTPNTMGTPEDGEKRKVQKLGRRD

SNEQKLQLQQQHLQQQPQLQYQQSLKQHENVQQPDODPLISPRMQLFNDSNHVNNLFDLGLRRASFSAVSGNNYA
HYVNNFQQDASSTNPNDQSNNAEFENIEFSTPOMMPVEDAETWMNMGPINPNSLDVNRNIGDSFTDIQHKNSEPII
SEPPKDTAPNDKKLNGYSFYEAIPKPLESLFSVRNTRKNKYKTNDSDPTVDNNSAPAANTIQELESSLNASKNFCL
PTGYSFYGNLDQQTFSENTLSCTSSNATISPIILLDNSINNNSTSDVRPEFRTQSVTSEMSQAPPPPQKNNSKYSTEV
FTSNMRSFIHYALSKYPFIGVPTPTLPENERLNEYADSFTNRFLNHYPFIHVTILKEYSLFKAILDENESTKNWENN
QFYLENQRIISIVCLPLL VATIGAVLSNNKKDASNL YEASRRCIHVYLD SRKKIPTSLSANNDSPWLIIQSLTLSVM
YGLFADNDISLNVVIRQVNALNSLVKTSGLNRTSII DLFNINKPLDNELWNQFVKIESTVRTIHTIFQISSNLSALY
NIIPSLKIDDLMITLPVPTTLWQADSFVKFKSLSYGNQIPFQYTRVLQNLIDYNQPLSDGKFLYENHVSEFGLICLQ
NGLHQYSYFQKLTAVNNREDALFTKVVNSLHSDWRMISNSDLFPKKIYQQSCLILDSKLLNNFLIVKSSLKVSTGDV
SSLNKLKENVWLKNWNQVCAIYYNSFMNIPAPSIQKKYNDIEFVDDMINLSLII IKIMKLIFYNNVKDNYEDENDFK
LQELNLTDFDNFDEKISINLTILFDIFLMIYKII TNYEKFMIKHKFNYYNSNSNISFLHHFELSSVINNTQMNQNDY
MKTDIDEKLDQLFHIYQTFFRLYLDLEKFMKFKFNYHDFETEFSSLSISNII LNTHAASNNDTNAADAMNAADEKISP
TTLSNVLLADEGNENSGRNNDSDRLFMLNELINFEVGLKFLKIGESFFDFLYENNYKFIHFKNLNDGMFHIRIYLEN
RLDGGV*

[0218] 巴斯德毕赤酵母密码子优化的LegH核酸序列 (SEQ ID NO:3)

[0219] ATGGGTGCTTTACCGAGAAGCAGGAAGCACTTGTTTCCTCTTCGTTCAAGCTTTTAAGGCTAACATC
CCTCAATACTCTGTTGTGTTTTACACGTCCATTCTAGAAAAAGCTCCTGCTGCCAAGGACCTCTTCTTTTTCTGTG
CAACGGTGTAGATCCATCCAATCCCAAATTAACAGGTCACGCTGAGAAATTGTTGCGTTTAGTCAGAGATAGCGCTG
GACAATTGAAAGCAAATGGTACTGTGGTTGCTGATGCTGCCTTGGGCAGCATCCATGCACAGAAGGCAATTACAGAC
CCACAATTTGTTGTTGTGAAGGAAGCTCTGCTTAAACTATAAAGGAAGCCGTCGGAGACAAATGGAGTGACGAGTT
GTCATCAGCTTGGGAGGTAGCTTATGATGAGTTGGCCGAGCAATCAAAAAGGCATTCTAA

[0220] 巴斯德毕赤酵母密码子优化的LegH氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)

[0221] MGAFTEKQEALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPAAKDLFSFLSNGVDPSNPCLTGHA EKLFGL
VRDSAGQLKANGTVVADAALGSIHAQKAITDPQFVVVKEALLKTIKEAVGDKWSDELSSAWEVAYDELA AAA

[0222] IKKAF

[0223] 巴斯德毕赤酵母密码子优化的LegH变异体3核酸序列 (SEQ ID NO:5)

[0224] ATGGGTGCAATTTACAGAAAAACAAGAGGCTTTAGTATCCTCATCTTTTGAAGCTTTCAAAGCCAATATT
CCTCAATACTCCGTTGTTTTCTATACGTCCATTTTGGA AAAAGGCTCCAGCAGCTAAGGACCTTTTCTTTTCTTGTC
GAACGGCGTGGATCCCTCAAATCCTAAGCTGACTGGTCACGCCGAGAAGCTTTTTGGTTTGGTCAGAGACAGCGCCG
GACAGCTGAAAGCTAACGGTACAGTTGTGGCAGATGCTGCCTTGGGATCTATACATGCACAAAAGGCTATCACCGAC
CCACAGTTTGTGGTTGTAAAAGAGGCTCTACTCAAACTATCAAGGAAGCAGTTGGTGACAAATGGAGCGATGAATT
GTCCAGTGCATGGGAGGTGCTTACGATGAGTTAGCTGCTGCAATCAAAAAGGCTTTCTAA

[0225] 巴斯德毕赤酵母密码子优化的LegH变异体3氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)

[0226] MGAFTEKQEALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPAAKDLFSFLSNGVDPSNPCLTGHA EKLFGL
VRDGAGQLKANGTVVADAALGGINAQKAITDPQFVVVKEALLKTIKEAVGDKWSDELSSAWEVAYDELA AAAIKKAF

[0227] 巴斯德毕赤酵母pAOX1启动子 (SEQ ID NO:7)

[0228] GATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCCATTCTC
ACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTT
CTCCTCAACACCCACTTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCC

TTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCOCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTAT
TTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTCTGAGTGTGGGTCAAATAG
TTTCATGTTCCCCAAATGGCCCAAACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTC
ATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCAT
ACCGTTTGTCTTGTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCG
CTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAAATGGGGAAACACCCGCTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCC
ACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAA
CCCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCT
TACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACGACAACCTTGAGAAGATCA
AAAAACAATAATTATTCGAAACG

[0229] 巴斯德毕赤酵母pGAP启动子 (SEQ ID NO:8)

[0230] CGACTATTATCGATCAATGAAATCCATCAAGATTGAAATCTTAAATTGCCCCCTTCACTTGACAGGAT
CCTTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTCTGAAATATCTGGCTCCGTTGCAACTC
CGAACGACCTGCTGGCAACGTAAATTTCTCCGGGTAAAACTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACGTCTCTTC
CCTTCTCTCTCCTTCCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACTCTGCTGGAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCT
TGCAGCAATGCTCTTCCCAGCATTACGTTGCGGGTAAACCGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGGA
AAAGTCCCGGCCGTGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGAGATTATTGGAACCACCAGAATCGAATA
TAAAGGCGAACACCTTTCCCAATTTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTTATTTGTCCCTATTTTC
AATCAATTGAACAACATATCAAAACACG

[0231] 巴斯德毕赤酵母pGCW14启动子 (SEQ ID NO:9)

[0232] CAGGTGAACCCACCTAACTATTTTAACTGGGATCCAGTGAGCTCGCTGGGTGAAAGCCAACCATCTTT
TGTTTCGGGGAACCGTGCTCGCCCCGTAAAGTTAATTTTTTTTTTCCCGCGCAGCTTTAATCTTTCGGCAGAGAAGGC
GTTTTTCATCGTAGCGTGGAACAGAATAATCAGTTCATGTGCTATACAGGCACATGGCAGCAGTCACTATTTTGCTT
TTTAACCTTAAAGTCGTTTCATCAATCATTAACTGACCAATCAGATTTTTTGATTGCCACTTATCTAAAAATACTT
TTGTATCTCGCAGATACGTTTCAGTGGTTTCCAGGACAACACCCAAAAAAGGTATCAATGCCACTAGGCAGTCGGTT
TTATTTTTGGTCACCCACGCAAGAAGCACCCACCTCTTTTAGGTTTTAAGTTGTGGGAACAGTAACACCGCCTAGA
GCTTCAGGAAAAACCAGTACCTGTGACCGCAATTCACCATGATGCAGAAATGTTAATTTAAACGAGTGCCAAATCAAG
ATTTCAACAGACAAATCAATCGATCCATAGTTACCCATTCCAGCCTTTTCGTCGTCGAGCCTGCTTCATTCTGCCT
CAGGTGCATAACTTTGCATGAAAAGTCCAGATTAGGGCAGATTTTGAGTTTAAATAGGAAATATAACAAATATAC
CGCGAAAAAGGTTTGTATAGCTTTTCGCCTGGTGCCGTACGGTATAAATACATACTCTCCTCCCCCCCCTGGTTC
TCTTTTTCTTTGTTACTTACATTTTACCGTTCCGTCACTCGCTTCACTCAACAACAAAA

[0233] 巴斯德毕赤酵母pTEF1启动子 (SEQ ID NO:10)

[0234]

ATAACTGTGCCTCTTTTATCTGCCGCACTGCATGAGGTGTCCCCTTAGTGGGAAAGAGTACTGAGCCAACCCTGGA
GGACAGCAAGGGAAAAATACCTACAACCTGCTTCATAATGGTCGTAAAAACAATCCTTGTCGGATATAAGTGTGTGA
GACTGTCCCTTATCCTCTGCGATGTTCTTCTCTCAAAGTTTGCATTCTCTCTATCAGAATTGCCATCAAGAGAC
TCAGGACTAATTTGCGAGTCCACACGCACTCGTACATGATTGGCTGAAATTTCCCTAAAGAATTTCTTTTCACGA
AAATTTTTTTTTTACACAAGATTTTCAGCAGATATAAAATGGAGAGCAGGACCTCCGCTGTGACTCTTCTTTTTTTT
CTTTTATTCTCACTACATACATTTTAGTTATTCGCCAAC

[0235] 血红素的生物合成酶1-ALA合酶 (SEQ ID NO:11)

[0236] ATGGAGTTTGTGCGCCGTCAGTCCATGAATGCCTGTCCCTTTGTCAGGTCAACTTCTACCCACCATTG
AAGAAGTTGGCAGCAAACAGTTCTCTAGCTGCTACTGCTAGTCATTGTCCCGTGGTTGGCCCTGCTCTCCAACAGCA
GAGATACTACTCTCAACCTTCCAAGCCAGCCCAAGCCCAACCTCCGACATTGCTACTGGGATCAAGAAGGATGTTT
CTCCGATCCGTATGGACTCTAATGAAACCGCCTTTGATTACAATGGAATGTATGAGTCTGATCTTGCGAATAAACGT
AAAGATAACTCGTATCGTTATTTCAATAACATCAACCGTCTAGCCAAGGAGTTTCCCAAGGCACATCGCCAGACCGA
AGATGACAAGGTGACCGTCTGGTGCTCTAACGACTACTTAGGAATGGGTAGGCATCCTGAGATTATCAAAACCATGA
AGGCTACCATGGACAAGTACGGTTCCGGAGCAGGAGGAACTAGGAACATTGCAGGTCATAACCACGCCGCTATCAAT
TTGGAAAGCGAGTTGGCTTGCTTGAACAAGAAGGAAGCGGCTCTGGTGTTCATCATGTTTCATAGCTAACGATGC
AATCATCTCGTTGTTGGGACAAAAAATCAAAAAATTTGGTCATTTTCTCTGACCAGTCGAATCATGCTTCCATGATAT
TGGGTGTGCGTAACTCCAAAGCGAAGAAGCACATCTTCAAGCACACAATTTGAAGGATCTGGAGTCGCAGTTAGCT
CAGTACCCCAAGTCGACTCCTAAACTGATCGCCTTCGAGTCAGTTTACTCTATGTGTGGATCTGTGGCTCCCATTGA
GAAGATTTGCGATTTGGCTAAAAGGTACGGTGCCCTCACCTTCTGGATGAAGTTCATGCTGTTGGAATGTATGGTC
CTCATGGACAGGGTGTAGCTGAGCATTTGGACTTTGATCTGCATTTACAGTCTGGAATCGCCAGTCCTAGCGTGGTG
GACAAACGCACCATATTGGATCGTGTCGACATGATTACTGGTACTTGCGGAAAGTCATTTGGTACTGTTGGAGGTTA
CGTTGCTGGTAGTGCCAACCTAATTGATTGGTTAAGATCCTATGCGCCAGGTTTCATTTTCACTACCACACTTCCTC
CTGCTATCATGGCTGGTACAGCCACTTCTGTTCTGATTGTTAGGGCCGACATTGAGGCCCGTATCAAGCAACAGCTT
AATACTCGCTACGTCAAAGACTCATTTGAAAACCTTGGTATTCCAGTCATTCCAAACCCAAGTCACATTGTTCTGT
TCTAGTTGGAAATGCTGCAGATGCCAAGAAGGCATCCGATATGTTAATGAACAAACACCGTATTTATGTTCAAGCTA
TIAACTACCCTACTGTGCCTGTGCGTGAAGAACGACTAAGGATTACTCCTACTCCAGGTCATGGAAAGGAGATTTGT
GACCAGCTGATCAGCGCTGTGACGATGTTTTTACTGAGCTTAATTTACCAAGAATCAACAAATGGCAGTCCCAAGG
TGGTCATTGCGGTGTTGGTGATGCTAATTACGTACCAGAACCCAATCTGTGGACTCAGGACCAGCTCAGCTTGACAA
ACCAAGACTTGCACTCCAATGTGCACAACCCAGTGATTGAGCAGATCGAAACCTCATCAGGAGTCAGATTGTAG

[0237] 血红素的生物合成酶2-ALA合酶 (SEQ ID NO:12)

[0238] ATGGTGCATAAGGCTGAATACTTGGACGACCACCCAACTCAGATTTCCAGCATTCTTTCAGGAGGTTAC
AACCACCCATTACTTCGTGAATGGCAACATGAACGTCAACTCAACAAAAACATGTTTCATCTTTCCCCTGTTTGTAC
AGATCGACCAGACGAAGAAGAACTTATTCCTAGTCTACCTAATATCAAGAGGTTTGGCGTTAACAAGTTGATTTCCTT
ATGTAGGAGGTTTGGTTTCCAAAGGATTGAGGGCGGTGATCCTATTTGGTGTTCCTCTGAAGCCCGGTGTGAAGAT
GAAGAAGGAACGGCCGCTGATGATCCAGAGGGACCTGTTATCCAAGCCATCAAACACTTGAGAAAGAACTTTCCTGA
CCTGTATATCATCACCGATGTCTGTCTATGTGAGTACACCAGCCATGGACATTGTGGAATACTATATGAGGATGGCA
CTATCAACAGAGAGCTCTCAGTCCGTCTGATTGCTGCTGTAGCTGTCAAATATGCTCAAGCTGGAGCCAACTCTGTG
GCTCCTTCTGATATGACTGACGGCAGAATAAGAGATATTAAGAAGGCTTACTAAGTGCAGGACTGGCACATAAAAC
GTTTGTTATGTCTACGCTGCAAAATTCTCTGGTAATTTGTATGGCCCTTTCAGAGATGCTGCAGGTTCTGTCCAT
CTCAAGGGGACAGAAAATGTTACCAGCTTCCTTCTGGAGGAAAAGGGTTGGCCCATCGTGCTCTGATTCTGTGATATG
AATGAAGGCACTGATGGAATTATTGTCAAACCATCTACATTCTATTTGGACATTGTCGCTGATGCTTATCAGCTTTG
TAAAGACTATCCTATCTGCTGTTACCAGGTTTCTGGAGAGTACGCCATGCTACATGCAGCGGCAGAGAAGAATATTG
TTGATCTGAAATCAATCGCTTTTGAAGCTCATCAAGGATTCTTGCGGGCTGGAGCTCGTTTAATCATTAGTTACTTT
ACCCCTGAATTCTGGAGTGTTATCTGAATGA

[0239] 血红素的生物合成酶3-胆色素原脱氨酶 (SEQ ID NO:13)

[0240] ATGAACCAAATCGAACAGAGCGGACCCATTGATTGCAGTTCCTTGAAATTGGGGTCCCGAAAAGTCCGCTCTGGCTATAATCCAGGCAGAAATCGTCCGCCAATTGATATTGAAAGAATACCCTGAATTGGAGACGAAGTTGGTCAGTGTGTCCACCCTGGGGGACCAAGTCCAGAATAAAGCACTTTTCACGTTTGGAGGAAAATCTTTGTGGACCAAAGAACTTGAGATGTTGTTGTTGGAGAGTGTGGGAGGATTTGACCAAATAGACATGATTGTACACTCGTTGAAAGACATGCCAACTCATTTACCAGACGAATTTGAGCTGGGTTCATTATTGAAAGAGAAGACCCTAGAGACGCTTTGGTCGTGCAAGATGGTTTTATCTTACAAGTCATTGGCCGACCTTCCAGAGGGAGCTGTGGTCGGTACGTCTTCGGTTAGAAGATCGGCTCAACTACTGAAGAATTTCCCTCATCTGAAATTCAAATCTGTTAGAGGAAACCTTCAGACCAGACTAAGAAAATTAGATGATCCAGATTCCGAGTACTGCTGTCTCCTCCTTGCAGCAGCCGGTTTAATCAGGACAGGCTTACAACACAGAATTTCAATGTATTTGAACGACGATGTGATGTACCACTCCGTCGGACAAGGAGCATTAGGAGTAGAGATCAGAAAAGGTGACC AATTCATGAAAAATATCTGTGAAAAGATTGGGCATAGAACCACCACCCTTCGTTGTCTTGCAGAGAGAGCACTGCTGAGATATCTAGAGGGAGGCTGCTCGGTGCCAATTGGGGTCTCCACTATTTATAGCGAGGATACGAAGGAACTTACCATGAACTCCCTAGTCGTCAGTTGTAACGGTCGTGACTCGGTAACAGAATCAATGACTGAAGTCGTGACTACTGAAGAGCAAGCTGAAGATTTTCGGTGAAAGGCTGGCCAGAAGCTCATAGATCAAGGTGCGAAACGCATTCTTGACGAGATCAACTTCAACAAGATCAAAGAGATTAAGGAAGAGGGTTTACATTAA

[0241] 血红素的生物合成酶4-尿卟啉原III合酶 (SEQ ID NO:14)

[0242] ATGCCAAAAGCCATTCTTCTGAAGAATAAACTACACCGAAGGATCCTTATCTGGAGAACTTCGTAAGTAGTGGCTACTCGACCGATTTTCGTACCACTTTTATAGATCATATTCACATGGAGAAATCTGAGATCATCGCATTTCTCAAGACTGACTACTTTTTGCATAAACTTTGGCGTTTATTATTACGTCCCAAAGAGCTGTAGAAATGCTGAATGAGTGATGCAAAATACTGAGACGTACTGATCCTGAAATTACACAAATCATCTATAGTAAACCTGTCTATACAGTTGGCCCTGCCACCTACAGAATACTTGCGGATGCTGGCTTCGTGGATCTACGAGGCGGAGATAAGGCAGGAAACGGATCCATTCTAGCCAGATAATTTTGAATCATGACATTTACACTGGAATTGAAGATTCTCACAAGCATATAACCTTTTTACCCGACAAACAAGGAGAGACATAATTTCCCAATGTTTACTCTCTAACAACCTTCAACTTTACGAAAAGATTGTCTACAAGACTCTTCCTAGGGATGATATCGTGACTAGATTCAAGTCTGCCGTTGACAGCATCGACCAATCGCAAAGAAGTTCCAGTTGGGTGGTCTTCTTTTCGCTCAAGGAACAGAGGACATTGTAACGTATCTTCAACACACCAAAGACCAATTTAATATTGCATCTATCGGGCCAACCACAGAAAAATACCTTCTAAGCAAAAACCTGAAACCAAAGTTGTGGCACCTAAGCCAGAGCCTATCTCTTTACTATTGTCTATACAAAAAGTGCACTAA

[0243] 血红素的生物合成酶5-尿卟啉原III脱羧酶 (SEQ ID NO:15)

[0244] ATGAGTAGATTTCCAGAAGTGAAGAATGACCTTATTTTAAGGGCAGCTCGTGGTGAAAAAGTTGAACGTCCTCCCAATATGGATTATGAGACAGGCCGGAAGATATCTTCCGGAGTACCATGAGGTCAAAGGAGGTAGGGACTTCTTGAAACTTGCAAGGATGCTGAGATTGCTTCTGAAATTACTATCCAGCCGATTACGCATTTTGACGGTCTGATCGATG CAGCTATTATCTTCAGTGATATCTTGGTGATTCCTCAAGCTATGGGCATGGAAGTTAAGATGGTGGACAAAGTTGGCCACAGTTCCCAATCCGCTAAGAAAACCGTCTGACTTGGATCATTTGAAAAAGACGTTGACGTTTTGAAGGAACTCGATTGGGCCTTCAAAGCTATCTCATTGACCAGAAAAAACTCAATGGACGAGTGCCTTTGCTTGGATTTTGTGGTGCTCCTTGGACTCTACTGGTTTATATGACTGAAGGAGGCGGTACCAAGATGTTTCGATTTGCAAAGAGTGATCTACAAGTTTACCAAGGAATCTCATCAATTACTCCAACAGATCACTGACGTTGCAGTTGAATTCCTAGCTCAGCAAGTTGTGTCAGGTGCCCAAATGTTACAAGTTTTTGAATCTTGGGGCGGTGAATTGGGGCCTGATGAATTCGATGAGTTTTCTT TGCCTTATTTGAGACAGATTTCTCTAAACTTCCCCTGAGGTTGAAGGAACCTGGAATCACAGAGAATGTTCCCATAACTGTCTTTGCTAAAGGCTCTTGGTACGCCTTGGAGCAATTGTGCGACAGTGGTTATGATGTTGTCTCGTTGGATTG GTTATTCCGTCCAAGTGATGCTGTCCAGATTGCTAACGGAAGAATCGCATTGCAAGGTAATCTTGACCCTGGAACCA

TGTACGGCTCCAAAGAAACCATTTCCAAGAAAGTGGACAAAATGATCAAGGGTTTTGGTGGAGGAAAGCAAACTAC
ATAATTAATTTTGGACACGGGCACTCATCCATTCATGGATCCAGAACAGATCAGATGGTTCCTTACAAGAATGTCATC
GCATTGGATCTCAATAG

[0245] 血红素的生物合成酶6-尿卟啉原III氧化酶 (SEQ ID NO:16)

[0246] ATGGCCATCGACTCTGATATCAATCTAAGCTCTCCCAATGATTCCATCCGTCAAAGGATGTTTCGAGCTT
ATCCAGCGGAAGCAACTCGAAATTGTCGCTGCATTGGAGGCAATTGAAGGAAACGATACCAAATTTCTGTTCTGATTC
TTGGGAAAGAGGAGCCGAAGGTGGAGGAGGAAGATCTATGCTTATTCAAGATGGAAGAGTGTGTTGAAAAGGCTGGTG
TAAATATTTCCAAGGTTTCATGGCGTATTGCCTCCTCAAGCTGTGAGCCAGATGAGAAATGACCACTCCAAGCTAGAT
CTGCCTGCGGGAACCTCTCTGAAGTTCTTTGCCTGTGGGCTTTCTGTTGGTCATTCATCCCCATAATCCCCATGCTCC
AACTACCCATCTGAATTATCGCTACTTCGAAACTTGGGATGAACTGGAAAGCCTCACACCTGGTGGTTTGGGGGCG
GTGCTGATTTAACGCCTTCGTACCTGTATCCCGAGGATGCCAAGCAATTCCATCAAGCCCATAAGGATGCCCTGGAC
AAACACGATGTTAGCTTGTACCCGAGATTCAAAAAGTGGTGTGATGAATACTTTCTGATCAAACATCGAAATGAAAC
TAGAGGTATTGGGGGTATTTTCTTTGATGATTTTGACGAGTTTGATGCTGAGAGGTCCCTGAAGTTGGTTGAAGATT
GTTTCAATGCTTTCTTGAATCTTATCCCGCTATCACTCGAAAAAGGATGGACACCCCTTCAACTGATGCTGAGAAG
AACTGGCAACAAATTAGAAGAGGAAGATATGTCGAATTCAACTTAGTATTGGATAGAGGTACTCAATTTGGTTTGAG
AACGCCTGGATCTCGTGTTGAAAGTATTTTGATGTCGTTGCCAAGAACAGCTGGTTGGGTCTATGATCATCATCCAG
AGCCTGGCTCCAGAGAAGAGGAGTTATTGCAGGTACTACAAAATCCTATTGAATGGGTATGA

[0247] 血红素的生物合成酶7-原卟啉原氧化酶 (SEQ ID NO:17)

[0248] ATGCTGAAAAGTCTTGACCAAATTCCTCAATTGCCGTTTTAGGTTTCAGGGATATCTGGATTGACTTTC
AGCTTTTTTTTTGAATCGGTTGCGTCCCGATGTTAAGATCCATATCTTTGAAAAATCCAAGCAGGTTGGAGGATGGAT
CAGATCAGAAGAGCATGAACTTTTTCATTTTGAAAAGGGACCCAGAACTTTGAGAGGCACAAATACGGGTACCTTGA
TGTTGTTGGATCTTCTTACCAAGATAGGAGCAAATGACAAGGTCCTGGGACTGCACAAAGATTCTCTTGCTAATAAA
AAGTATCTGTTGTCCCCGTTCTCAGATGTTACGGAAACAACGCAAAGCTTCTTCAAGTGCCACAGGATTTTCAGCTC
TTTTGTAAAGTTCATGTTTGACCCGTTGTCTAAGGATCTCATTCTCGGTCTTTTGAAAGAACCATGGCAACCAAAT
TAAAGTATTCAGATGAGTCGGTTGACCATTTTTTCAACAGAAGATTTGCTACCAAATATCAGAGAATATCGTCAGC
GCAATTGTGCATGGAATCTATGCGGGCGACGTGAAGAAGTTAAGTGTGAAAGCCATCTTCCCTAGGCTCCCTGAGAT
GGAACAGGAAAGTGGCTCTATTATAAGGTATATGATCGCCCAATACAGGACAAAAAAGAACGTCAAACAAAAAGTTG
ACCCTTTTTTGGCAGATTATGAAAAATTGATCGGTACATCTTTGAGTTTCAAAAATATTTCTTTGTTTCTGAAAAAC
TTTCCCATGCTGAGTTTTCAGGGTGGACTACAGAACTTCCCATCTCATTGAAGAACCATTTATCACAGATTGAAAA
CATCAAGTTTCATTTTGACAGCAAAAATCAAAAACATTGCTTTGGAGAGCGGTAAGGTGGCATTGACTGACCATGATC
AGGTTTATCTTGTTGACCATGTGAGATCTACCATTAATACCAACGAATTGGCCAAAATCATTTACCCGTTGTTCCA
AGTTCTACTAAGAAAAAATCCGTTTTCAAATCCAAAGCGAATGGCCAGGGCTGGTCAAATGTTTGAGCTGGCTACA
CTATACAAATATACTAATGTGCAACATTTATATACCTAAGCACGTCTCAAAATCTATCACCGGATTTGGATACTTGG
TTCTCGATCAATGTCTTCTCAGGCATCCAACTTCTCGGTGTCATATTTGACTCAGACATCGAGACTGCAATGACT
CCTAATTTTACAGAGGCCAACATTACGGCGATAAACAGTAACTCTGCATCTCCCAAGCAACTCCAAAAGTTTTCTGA
CCAATTCGTCAATAATGATCTCCCTAAATACACCAAGTTGACGCTAATGCTTGGAGGTCATTATCTCAAGTCGGAGG
CAGACATGCCCGGTTCCGAGAGAGTAAACATGCTGTCAAGGCGATTCTGTCAAATCACCTGAATATTGATCTAGAT
GAGTTTGATCTTTGCCAGACTTCAAGATGGAATCACCAAGATCCCCAAGTGCATTCCCCAATATGAAGTTGGGTA
TCTTGATCTCAAGAGAAAGGTTTCAAGATGCAGCCTCCAAAGAGTTCAACGACCAAATAAGTTTTGGAGGCATGGCAT

TTGGTGATGGTGTGGGGATCCCTGACTGTGTCCAGAATGCATTCAAAGATTCGGCTACCCCTCAGTGGCATTAA

[0249] 血红素的生物合成酶8-亚铁螯合酶(SEQ ID NO:18)

[0250] ATGCTTAACCGTCGTTTCCAATCTACCGTGTCCCTCGAGTCTGAACAAGGGCACTGGAATAGTGTTTCATG
AATATGGGTGGTCCCTCCACTGTCAAGGAAACCTATGACTTTTTATTTCGTCTTTTCTCGACGGAGATTTAATCCC
GTTTGGCAGATTTCAGAACATCCTGGCCCGCTTCATTGCAAGTAGAAGAACACCCAAAATTGAATCCTACTACAAAG
CTATCGGAGGTGGGTCTCCTATCCGAAAGTGGTCTGAATACCAGAGTTCCTAACTATGTGAAAAATTAGACATTATC
AGTCCACAATCGGCTCCTCATAAGCCTTATGTTGCCTTCAGATACGCTAATCCTCTCACTGAAGATACTTTACAAAA
GATGAAAAATGATGGAATTACTAAGGCCATTGCCTTTTCTCAATATCCGCAATTTAGTTATTCAACCACCGGATCAT
CGATTAACGAACCTTTACAGGCAATCGAAAAATTTGGACCCTGATCAATCTATTAAATGGACAGTTATAGATCGCTGG
CCTGACCACCCAGCCTTAGTTAAAACTTTTCGAGCTCATATCAAAGATACTCTAAACAGATTCAAACTGAAAAATGG
ACTGACTGACACAAAAGACGTCGTCCTCCAATTCAGTGCTCATTCTTTACCAATGGATATTGTCAATAAAGGAGATT
CGTATCCTGCAGAAGTCGAGCGAGTGTCTTTGCCATTATGAAAGAACTTAACCTCTCAAATCCTTATAAATTAACC
TGGCAATCACAGGTTGGCCCAAAGCCTTGGCTGGGTGCTCAAACGAAAAAATTACCAAGCAGCTAGCATCCAGTGA
TGTTCTGGAGTCGTTTTGGTTCTATTGCCTTTACCTCTGATCATATTGAACTCTCCATGAACTGGATATTGAAC
TGATTCAAGAACTACCTAATCCTTCAAAAGTAAAGCGAGTTGAATCGTTGAACGGAGACCAAACCTTTTCATTGACTCC
TTGGCAGAACTAGTGAAGAGTCACATTGATTCGAAGGTTGTATTTTCCAACCAGTTGCCATTGGATTCCATGCTGGG
AGTAGTGTGAGATAATTCCCTCACAGATCCAAAAGAGTTTTTTCAGAGCCCATTTGA

[0251] C部分.结果与探讨

[0252] 实施例24-菌株MXY0183的表征

[0253] 菌株MXY0183的最佳生长条件包括目标pH为3.0至6.0和温度为28℃至35℃。为了生产LegH蛋白,菌株MXY0183必须是活的并有氧生长持续6天。

[0254] 与菌株MXY0183有关的基因的表达使得菌株产生表型变化。图8显示了诱导开始时(0小时)和诱导后72小时的摇瓶的照片。所述指定摇瓶#1含有宿主菌株MXY0051。所述指定摇瓶#2和#3分别含有中间菌株(例如MXY0118,含有多于10个拷贝的LegH基因和来自血红素生物合成途径ALA脱氢酶)和生产菌株(例如MXY0183,含有多于10个拷贝的LegH基因和来自血红素生物合成途径的8个酶)之一。72小时后,摇瓶#3中的特有红色说明血红素结合LegH产生。

[0255] 在摇瓶中生长后,如上所示巴斯德毕赤酵母菌株MXY0051、MXY0118和MXY0183被裂解并且蛋白质在SDS溶胶上运行(图9A)。箭头显示LegH蛋白质的位置。菌株MXY0183和菌株MXY0118中产生的LegH的对比显示在图9B中,这证实了菌株MXY0183对LegH蛋白质的血红素加载效率。

[0256] 实施例25-菌株MXY0207的表征

[0257] 然后,进行试验以确定在编码涉及血红素生物合成的8个酶的基因存在的情况下,过表达转录激活因子的效益。含有多于10个拷贝的LegH序列和编码涉及血红素生物合成的8个酶的基因的菌株MXY0183和含有多于10个拷贝的LegH序列、编码涉及血红素生物合成的8个酶的基因和Mxr1转录激活因子的姐妹菌株MXY0206和MXY0207于甘油(这些菌株的抑制表达碳源)存在的情况下在摇瓶培养物中生长。48小时后摇瓶培养物的照片如图10A所示,而来自在没有附加碳源的BMY培养基上生长48小时后的细胞的团块的照片如图10B所示;这些实验证明,当抑制碳源在菌株(其中Mxr1也从AOX1启动子表达)的生长培养基中消耗时,

在缺少诱导碳源的情况下,在AOX1启动子控制下的转基因(例如血红素酶)发生显著表达。摇瓶培养物在缺少诱导剂的情况下生长时的血红素加载的LegH的相对产量如图10C所示。这些实验证明,在缺少甲醇诱导的情况下,重组血红素加载的蛋白质的显著生产从AOX1启动子驱动的转基因在毕赤酵母菌株(其中Mxr1表达也由AOX1启动子驱动)中完成。

[0258] 选择菌株在2L发酵罐中生长,LegH和血红素加载的LegH的相对产量确定(图11)。与菌株MXY0183相比,菌株MXY0207产生更多的LegH并且能够产生足够的血红素以非常有效地血红素加载LegH蛋白质。

[0259] 实施例26-菌株MXY0291的表征

[0260] 如实施例18至20所述,菌株MXY0291被构建以重现MXY0207的LegH生产能力,并且不含抗生素抗性基因。可以确定菌株MXY0291含有16个拷贝的LegH变异体3,Mxr1和8个血红素生物合成酶中的7个。当在2L的发酵罐中生长时,与MXY0207相比,该菌株的LegH产量提高。所述提高在含有甲醇/甘油和甲醇/葡萄糖(d-葡萄糖)的诱导培养基中均可看见(图11)。

[0261] 实施例27-杂交启动子菌株的表征

[0262] 在已经含有在启动子pAOX1(以上称为MXY0291)控制下的若干拷贝的LegH、所有血红素生物合成酶和转录因子Mxr1的菌株中,在三种不同的组成型启动子pGAP、pGCW14和pTEF1下表达额外拷贝的大豆高血红蛋白(LegH)。当在葡萄糖(即D-葡萄糖)存在下用甲醇诱导时,组成型启动子和pAOX1驱动LegH的表达,同时只有pAOX1启动子驱动血红素酶的表达。这导致,与先前菌株MXY0291相比,LegH的产量进一步提高(图11)。

[0263] 应该理解的是,尽管本文已经结合许多不同方面描述了相关方法和组合物,但是各个方面的前述描述旨在说明而不是限制相关方法和组合物的范围。其它方面、优点和修改均在以下权利要求的范围内。

[0264] 本发明公开的方法和组合物可以用于所公开的方法和组合物的产物,可以联合所公开的方法和组合物的产物使用,可以用于制备所公开的方法和组合物的产物,或者是所公开的方法和组合物的产物。这些和其它材料在本文中公开,并且应该理解,公开了这些方法和组合物的组合、子集、相互作用、组等。也就是说,尽管对这些组合物和方法的各种单独和共同组合和排列的具体参考可能没有明确公开,但是在本文中每一个都进行了特别考虑和描述。例如如果公开和讨论了特定的相关组合物或特定的方法,并且讨论了许多组合物或方法,则除非特别指出相反情况,否则组合物和方法的每种组合和排列都进行了特别考虑。同样地,这些的任何子集或组合也进行了特别考虑并公开。

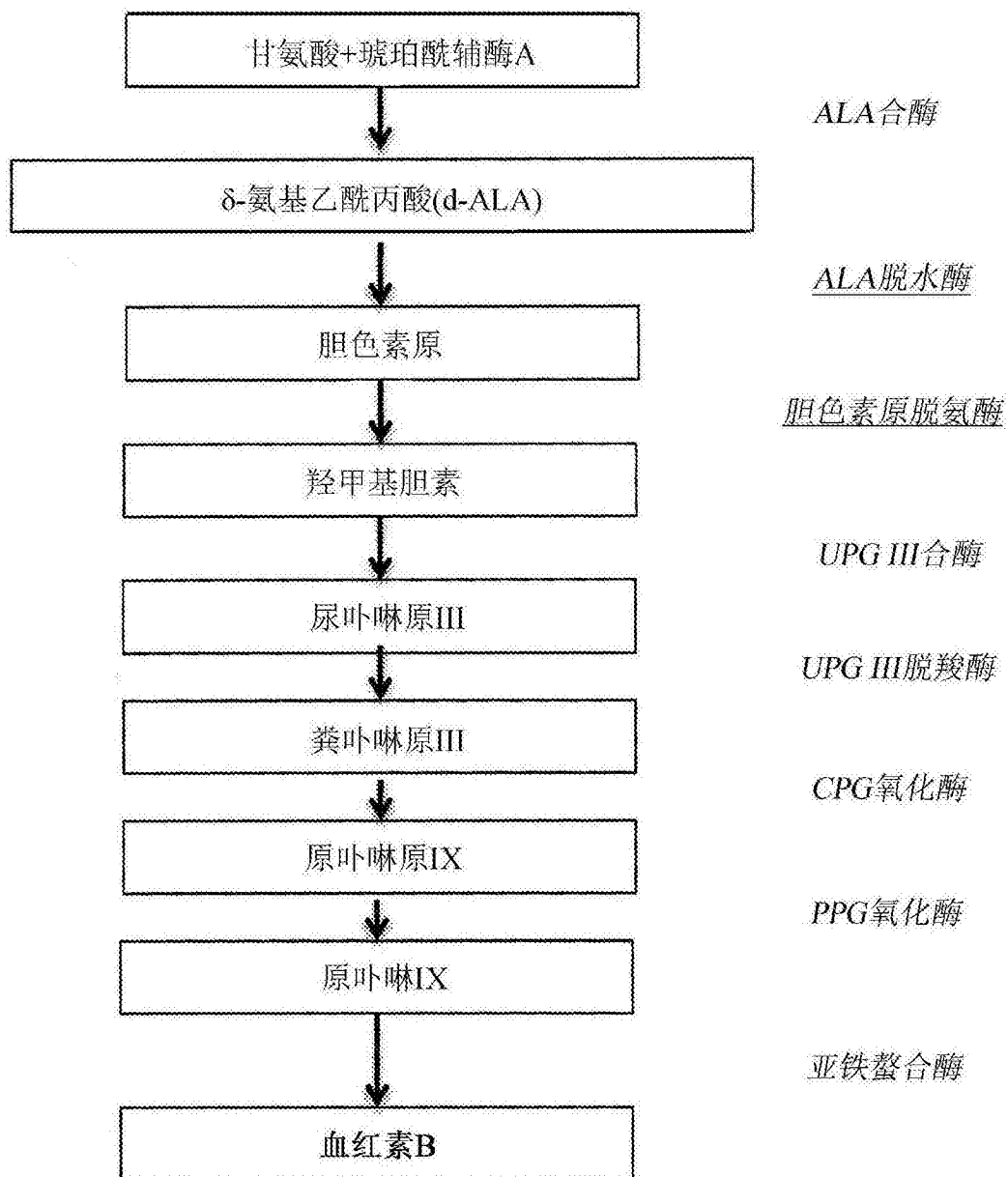


图1

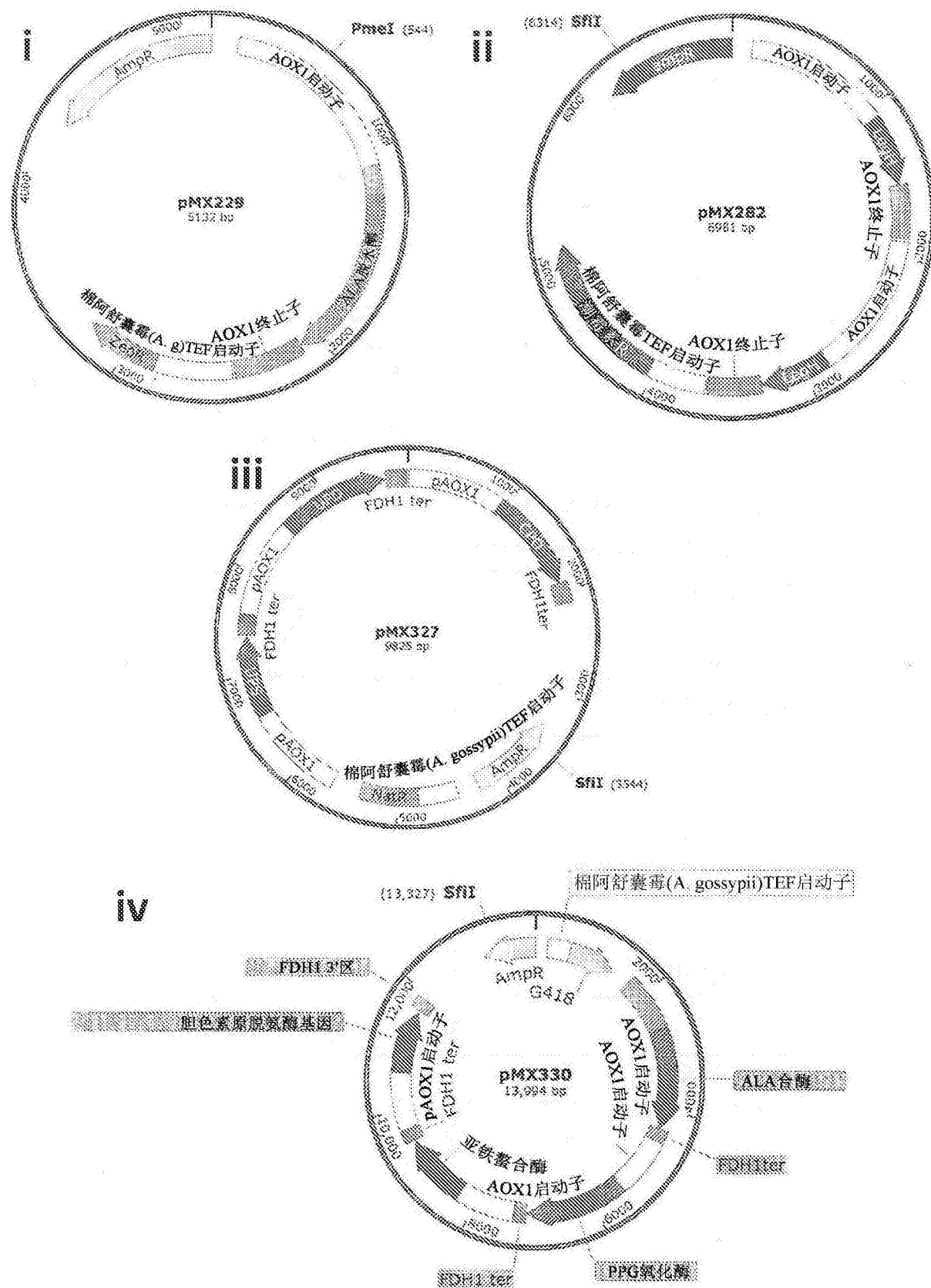


图 2

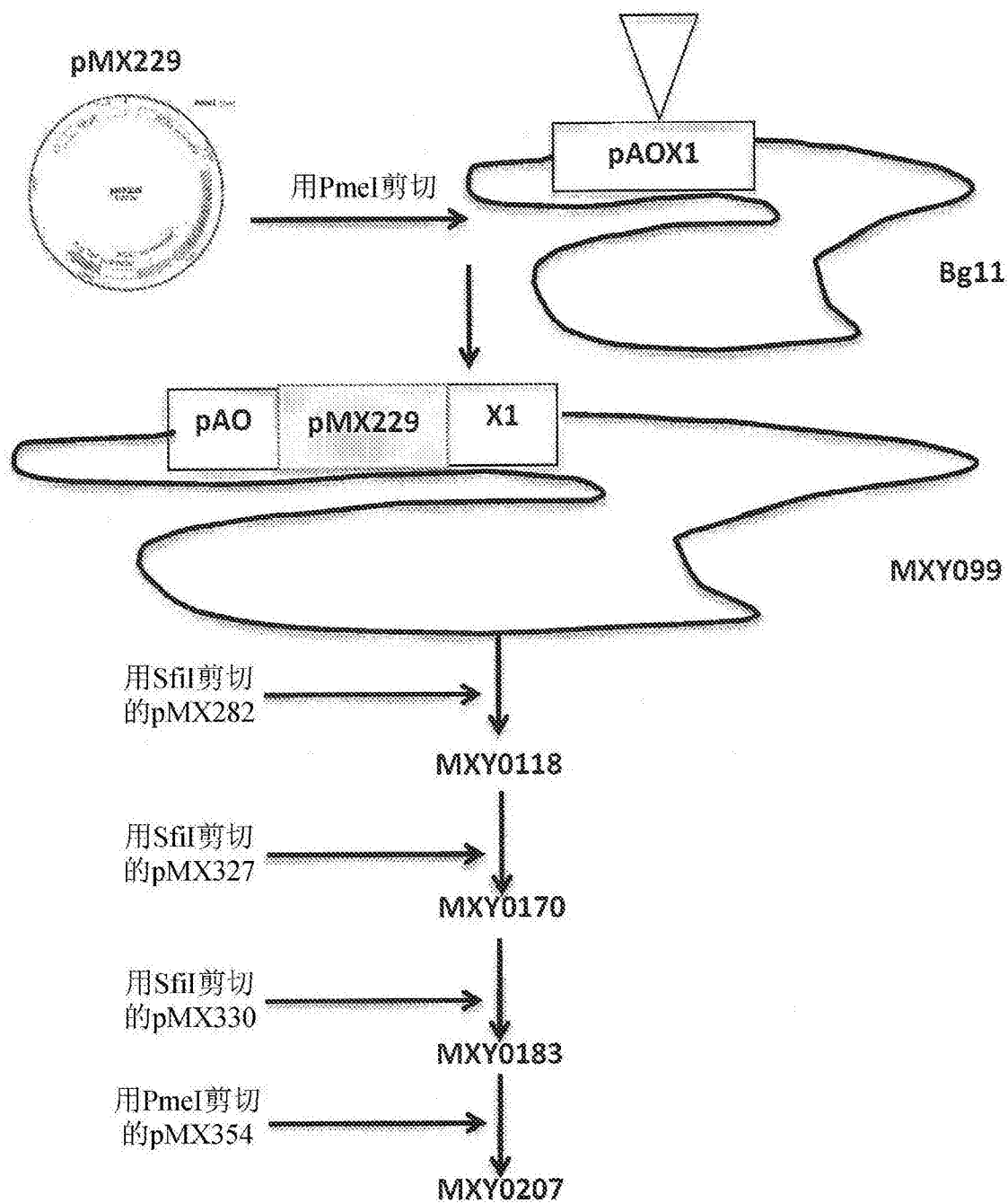


图3

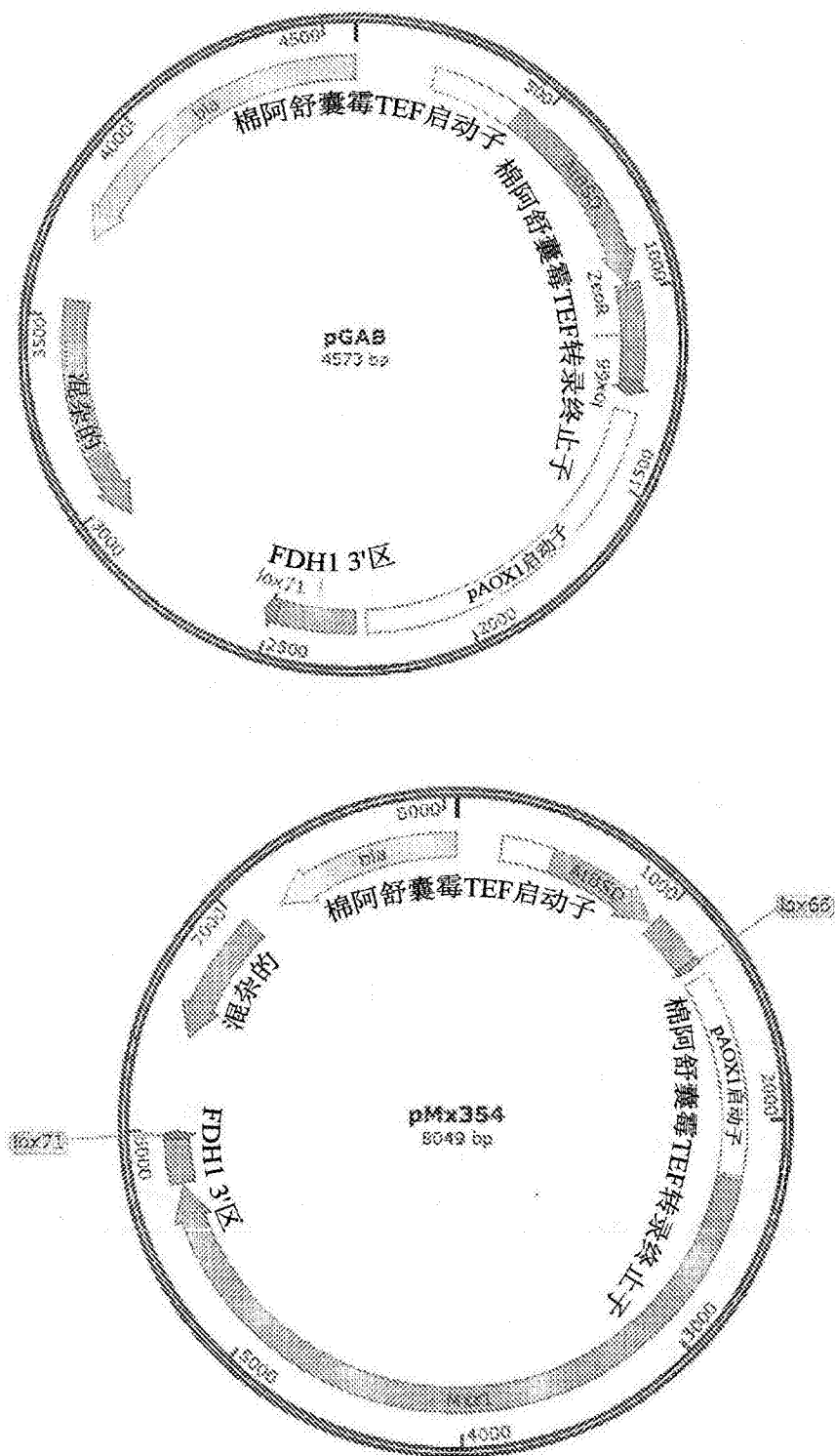


图4

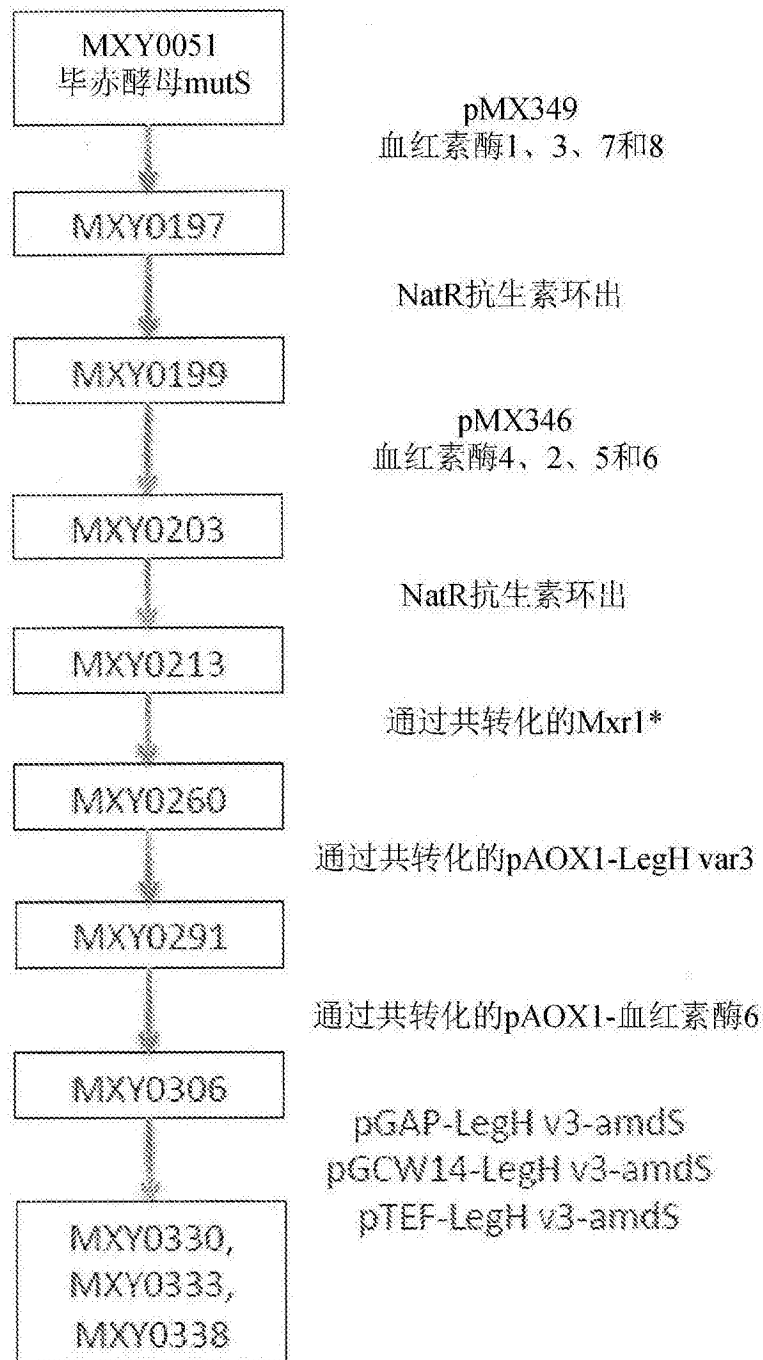


图5

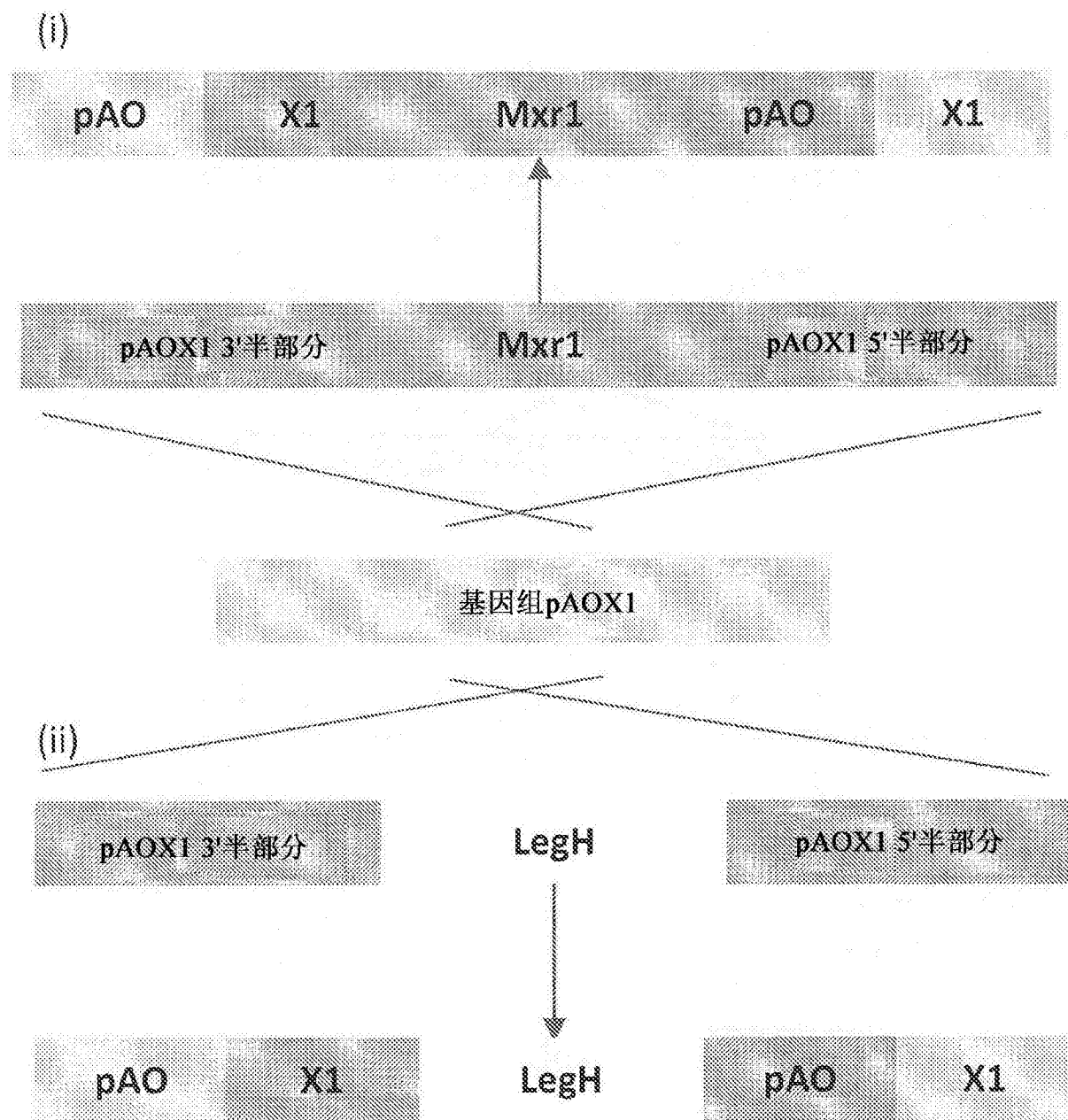


图6

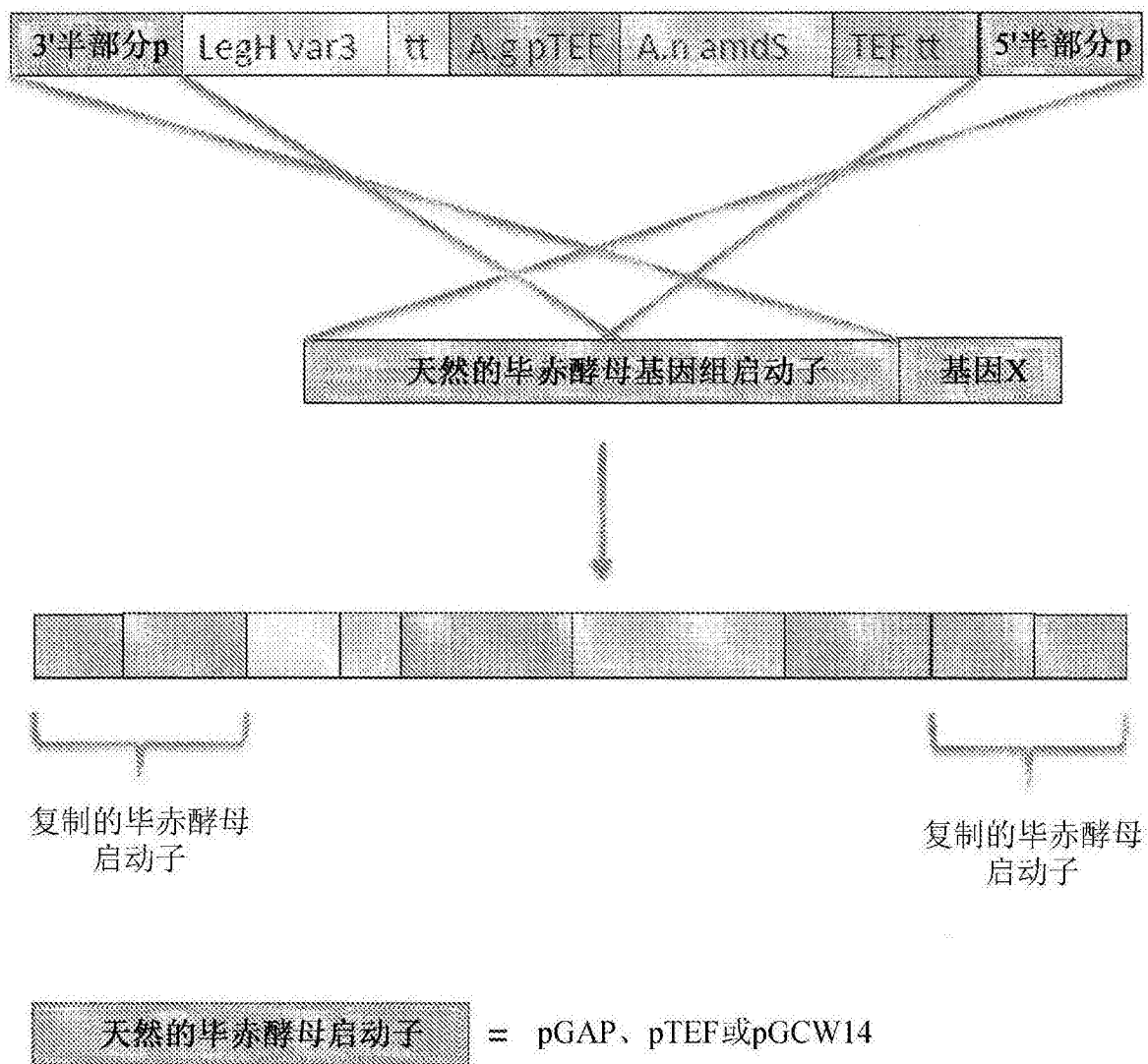


图7

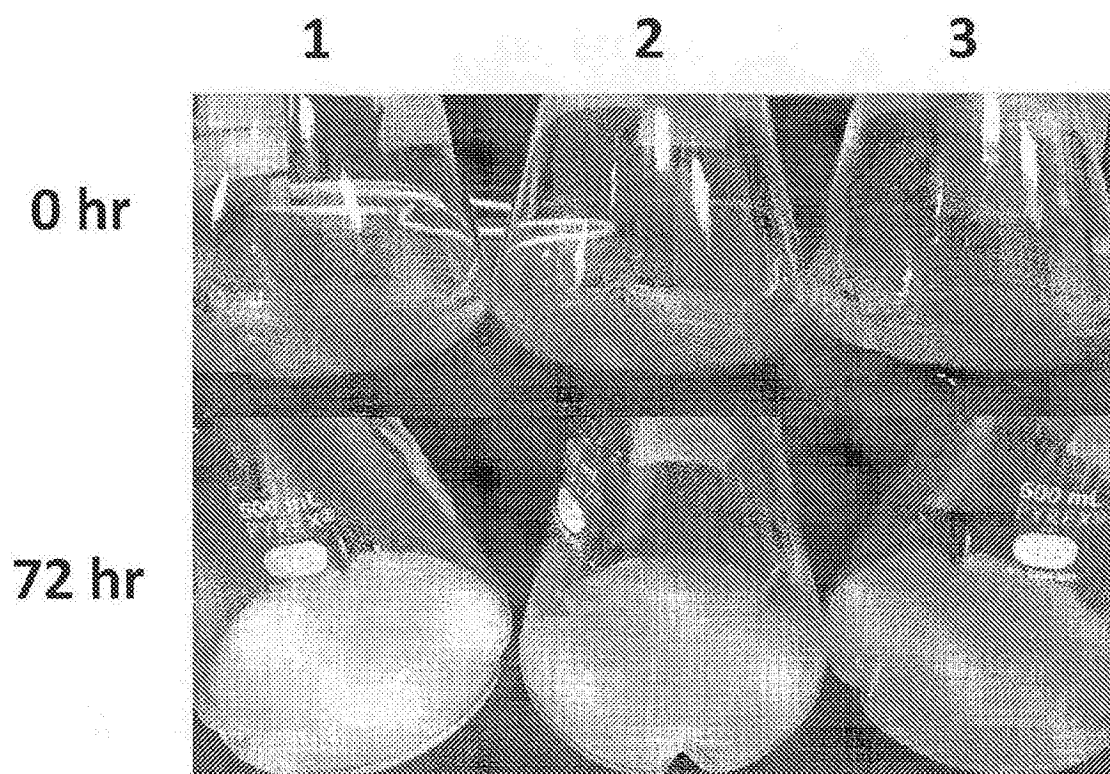


图8

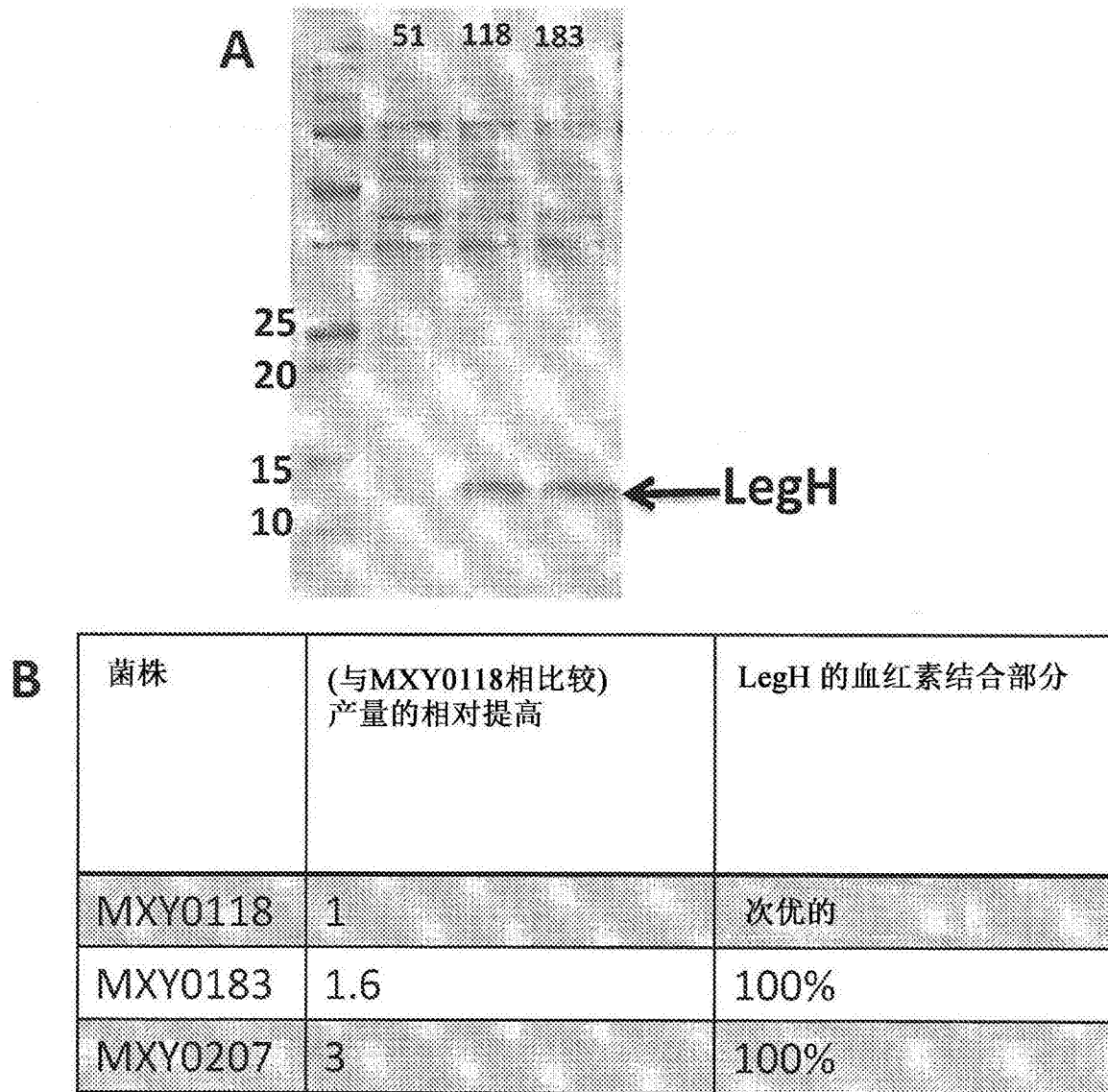
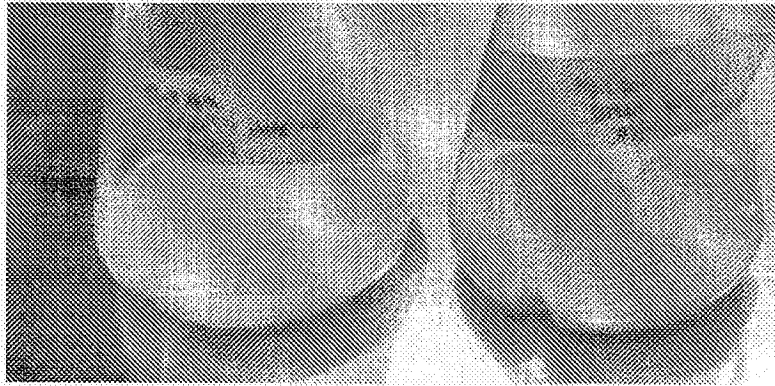
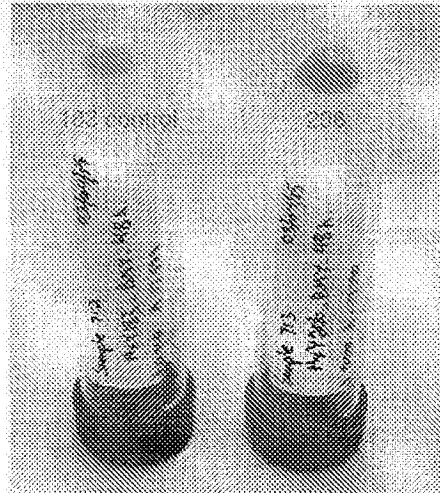


图9

A**B****C**

菌株	血红蛋白加载的LegH 的相对产量
183- BMGY	N/A
183- BMY	1
206- BMGY	3
206- BMY	5

图10

MXV菌株	甘油共进料时的产量	葡萄糖共进料时的产量
183	1X	1X
207	4.4X	4.4X
291	5.8X	5.8X
306	5.8X	5.8X
330	6.9X	6.9X
333	5.8X	5.8X
338	6.9X	6.9X

图11