[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12N 15/82
A01H 5/00

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 00803004.9

[43]公开日 2002年8月7日

[11]公开号 CN 1362996A

[22]申请日 2000.9.5 [21]申请号 00803004.9
[30]优先权
[32]1999.11.23 [33]DE [31]19956272.5
[86]国际申请 PCT/DE00/03119 2000.9.5
[87]国际公布 WO01/38508 德 2001.5.31
[85]进入国家阶段日期 2001.7.23
[71]申请人 MPB分子植物及蛋白质生物技术科隆有限公司
地址 德国科隆
[72]发明人 克劳斯·迪林
洛伦茨·比洛
[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书2页 说明书17页 附图页数0页

[54]发明名称 在宿主生物体中可控性收获后生产蛋白质的方法

[57]摘要

本发明涉及一种从转基因宿主生物体中获得所需蛋白质的方 法,编码这种蛋白质的基因仅在宿主生物体收获后表达,所述方 法的特征在于:(a)转基因宿主生物体含有编码所需蛋白质的基 因,且该基因仅在化学诱导剂存在时才表达,并且(b)与化学诱 导剂的接触是在宿主生物体收获后通过宿主生物体周围的相而发 生。本发明还涉及适合进行本发明方法的宿主生物体。

ISSN1008-4274

01.07.23

权 利 要 求 书

1、一种从转基因宿主生物体体中获得所需蛋白质的方法，其中编码这种蛋白质的基因只有在宿主生物体收获后才表达，所述方法的特征为:

(a)转基因生物宿主中含有编码所需蛋白质的基因，且该基因仅在化学诱导剂存在时表达；以及

(b) 与化学诱导剂的接触是在宿主生物体收获后通过宿主生物体周围的相而发生。

2、根据权利要求 1 的方法，其中相为气相。

3、根据权利要求 1 的方法，其中相为液相。

4、根据权利要求 2 的方法，其中步骤（b）包括改变宿主生物体周围的气相，用诱导剂溶液（悬浮液）雾化或用挥发性诱导剂灌溉。

5、根据权利要求 3 的方法，其中步骤(b)包括用病毒悬浮液感染。

6、根据权利要求 1 至 5 中任一项的方法，其中编码所需蛋白质的基因与一诱导性启动子有功能地连接。

7、根据权利要求 2、4、6 中任一项的方法，其中气相的改变为除氧，且启动子是在有氧情况下没有活性的启动子。

8、根据权利要求 7 的方法，其中启动子为 GapC4 启动子。

9、根据权利要求 2、4、6 中任一项的方法，其中步骤（b）中与化学诱导剂的接触经雾化诱导剂 RH5992 进行。

10、据权利要求 1 至 3 中任一项的方法，其中通过补偿转录和/或翻译的功能抑制来诱导编码所需蛋白质的基因的表达。

11、根据权利要求 10 的方法，其中编码所需蛋白质的基因与一个启动子有功能地连接，从而在启动子与基因之间插入一个核酸序列，该核酸序列具有以下特征：

(a) 其阻断所述基因的转录和/或翻译；以及

(b) 其可以在诱导后被切除，从而使所述基因表达。

12、根据权利要求 11 的方法，其中所述核酸是可以被诱导性重组酶切除的核酸。

13、根据权利要求 12 的方法，其中可切除的核酸和重组酶为重组酶-LBD 系统的组成部分。

14、根据权利要求 1 至 3 中任一项的方法，其中通过补偿转录、转录后、翻译或翻译后抑制蛋白的作用而表达编码所需蛋白质的基因。

15、根据权利要求 1 至 14 中任一项的方法，其中所述方法为至少两种权利要求 6、10、11 和 14 中定义的方法的组合。

16、根据权利要求 1 至 15 中任一项的方法，其中转基因生物体为实用植物。

17、根据权利要求 16 的方法，其中实用植物为小麦、大麦、玉米、甜菜、甘蔗、马铃薯、十字花科、豆科植物或烟草。

18、根据权利要求 1 的宿主生物体，其含有编码所需蛋白质的基因，且该基因仅在化学诱导剂存在时表达。

说 明 书

在宿主生物体中可控性收获后生产蛋白质的方法

本发明涉及一种从转基因宿主生物体内获得所需要蛋白质的方法，编码这一蛋白质的基因仅在宿主生物体收获后才表达，所述方法的特征在于所述基因只有在宿主生物体收获后经由周围相、尤其是气相或液相向宿主生物体提供的化学诱导剂存在时才表达。

天然存在的蛋白质的量通常非常少，不过其用作活性物质和材料的特征是非常令人感兴趣的。蛋白质通常还可以从重组的宿主生物体中获得，例如细菌，如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等，但是考虑到经济条件和足够的量，这种生产方式效率不高，所以不能进行商业应用。要想在低等生物中表达不易生产或根本就不能生产的更复杂的蛋白质，需要更多的具有固有的复杂蛋白生物合成机制的高等生物细胞作为宿主细胞进行蛋白质的生产。在这种情况下，转基因动物、植物、真菌、苔藓、藻类等作为新的重组宿主至今已有好多年了。随着分子生物学研究提供越来越多的特征得以阐明的蛋白质，这一技术的应用日益显得重要。

但是，外源蛋白的表达对宿主生物体的正常生理状态可能具有不利影响，例如影响或甚至抑制宿主的生长。另外，例如，如果栽培表达具有医用活性蛋白的转基因植物，据信当植物生长时，外源蛋白质对环境中的生物体可能具有潜在危害。因此，在转基因宿主生物体、特别是通过农业或园艺方法栽培的转基因宿主生物体中收获后生产外源蛋白质作为技术学模块进行经济、环境相容的蛋白质提取是非常重要的。通过表达参与生物合成途径的酶，还可以在转基因宿主生物体中制备其他（生物）化学物质。但是，这也可能会给宿主生物体带来不利影响，如抑制生长

或宿主生物体安全性问题。由于在宿主生物体内生产（生物）化学物质也基于蛋白质、尤其是酶的表达，所以可以使用相同的技术标准。

迄今所报道的收获后生产系统仅仅是基于植物材料的创伤，例如在烟草植物情况下是通过切割烟草叶子而产生创伤。其结果是，田间种植时的烟草不产生所需要的蛋白质，只有在回收步骤之前在收获后才产生蛋白质。但做到这一点非常困难，因为在农业或园艺培植时，一些情况可以造成植物的损伤，如施肥、大风或冰雹、碰撞、农具等，这些损伤可以诱导转基因植物（如烟草）的损伤诱导的启动子。以前的方法的另一个缺点是还很难做到诱导刺激物在全部植物物质上的单态分布。

所以本发明是基于提供所需要蛋白的收获后生产系统的技术问题作出的，本发明克服了现有技术中描述的方法的缺点，即保证了基因仅在收获后可靠表达，因此不必切割植物组织，并且诱导剂可以有效、均一地与相应的转基因宿主生物体细胞接触。

根据本发明权利要求书中所述的方法，可以解决这一技术问题。

本发明的方法中，通过经宿主生物体的周围相给予的化学诱导剂，诱导宿主生物体中外源基因的表达。宿主生物体的周围相可以为气相或液相，其中在气相中，通过改变气相的组成可以进行化学诱导，优选厌氧诱导；通过雾化固体或液体（生物）化学诱导剂的溶液（悬浮液）或者使用挥发性物质，使诱导剂分子在反应容器中呈均态分布。再者，也可以使用固体或液体（生物）化学诱导剂的溶液，在液相中进行化学诱导。使用本发明的方法可以大规模地生产制备高质量的蛋白质或其它（生物）化学物质，因此该发明可用于新型的生物医药和工程领域。

因此，本发明包括一种从转基因宿主生物体中获得所需蛋白的方法，编码这一蛋白质的基因只在宿主生物体收获后表达，该方法特征在于：

（a）转基因宿主生物体含有编码所需蛋白质的基因，该基因只有化学诱导剂存在时才表达；以及

（b）与化学诱导剂的接触在宿主生物体收获后通过宿主生物体周围的相，尤其是气相或液相而发生。

构建本发明方法所使用的核酸构建体的方法为本领域中熟练的技术人员所熟悉，这些方法还可以参见经典专著（参见 Sambrook 等，1989，分子克隆实验指南，第二版，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约）。核酸构建体优选地插入在载体中，载体优选质粒、粘粒、病毒、噬菌体或其他遗传工程中常见的载体。这些载体还有其它的功能单位以保证这些载体可以在宿主生物体内稳定存在，如细菌复制起始位点或用于在啤酒酵母中稳定的双微小 DNA。也可含有土壤杆菌 T-DNA 的“左边界”和“右边界”序列，以保证目的基因可以稳定地整合到植物基因组中。另外还可含有终止序列，保证转录正确终止和转录本的多聚腺苷酸化（Poly-A）。文献中有对这些元件的描述（参见：Gielen 等，EMBO J，1989，23-29），还可以根据需要进行互换。

对于在高等植物中插入外源基因，有大量克隆载体可用，这些载体中含有用于在大肠杆菌中复制的信号以及用于筛选转化的细菌细胞的标记基因。这种载体的例子例如，pBR322，pUC 系列，M13mp 系列，pACYC 等。外源基因可以插在载体的合适位点。所得到的载体可以用于转化大肠杆菌细胞。转化的大肠杆菌细胞在适当的培养基中培养，然后收获、裂解细菌，得到质粒。经过限制性分析、凝胶电泳和更进一步的生化和分子生物学方法的分析，可以确定质粒 DNA 的特征。经过上述处理，质粒 DNA

可以被切割，分离出的 DNA 片段可以与其它 DNA 序列进行连接。每种质粒 DNA 序列可以克隆在相同或不同的质粒中。

可以使用许多技术将 DNA 插入到植物宿主细胞中。这些技术包括：以根瘤土壤杆菌或生根土壤杆菌（Agrobacterium rhizogenes）作为转化剂用 T-DNA 转化植物细胞、原生质体融合、注射、DNA 的电穿孔、借助 biolistic 方法插入 DNA、以及其它可能的方法。

如果将 DNA 注射和电穿孔至植物细胞，所用的质粒没有特殊要求。使用简单的质粒就行，如 pUC 系列。但是，如果需要从转化的细胞中再生植物的话，质粒中还应当有选择标记。根据所需基因插入植物中方法不同，可能需要其他 DNA 序列。例如，如果用 Ti 或 Ri 质粒转化植物细胞，至少在 Ti 和 Ri 质粒 T-DNA 的右边界，但通常为左、右边界必须作为一个侧区与所插入的基因相连。

如果用土壤杆菌进行转化，则有利的是将待插入的 DNA 克隆到特殊的质粒中，尤其是中间载体或二元载体。由于中间载体的序列与 T-DNA 中的序列同源，所以通过同源重组，中间载体可以整合到土壤杆菌的 Ti 或 Ri 质粒中。这一质粒还含有 T-DNA 转移所必需的 vir 区。中间载体不能在土壤杆菌中复制。通过辅助质粒，中间载体可以转移到根瘤土壤杆菌中。二元载体既可以在大肠杆菌中复制也可以在土壤杆菌中复制。这类载体中含有一个选择标记基因和一个连接子或多接头，其由 T-DNA 的左右边界区围绕。

它们可以直接转化土壤杆菌。作为宿主细胞的土壤杆菌还应该含有一种带有 vir 区的质粒。vir 区为 T-DNA 转移到植物细胞中所必需的。还可以有其他 T-DNA。以这种方式转化的土壤杆菌可以用于转化植物细胞。

为了将 DNA 转入植物细胞，可以将植物的外植体与根瘤土壤杆菌或生根土壤杆菌共同培养。然后从所感染植物材料，如叶、茎节、根、原生质或在适宜培养基悬浮培养的植物细胞中可以再生出整个植株，所述培养基中可以含有抗生素或杀生物剂，用于筛选转化的细胞。然后检测所得到的植株中导入的 DNA 的存在。导入外源 DNA 的其它方法例如应用 biolistic 法或原生质体融合法。

单子叶植物转化的替代方法是通过 biolistic 方法的转化，通过电或化学方法来诱导原生质体摄取 DNA，对具有部分通透性的细胞进行电穿孔，向花中大量注射 DNA，向花粉微粒和前胚胎中微量注射 DNA，通过花粉萌发摄取 DNA，通过隆起将 DNA 摄入到胚胎中（见综述：Potrykus，植物生理学，1990，269-273）。尽管借助根瘤土壤杆菌，现在已成功地用 Ti 质粒载体系统转化双子叶植物，但是许多最新研究表明，单子叶植物也可用基于土壤杆菌的载体转化。

本发明方法所使用的转基因宿主生物体，理论上讲可以为任何物种的植物，即单子叶植物和双子叶植物。推荐使用的植物尤其是小麦、大麦、水稻、玉米、甜菜、甘蔗、马铃薯、十字花科，豆科植物或烟草。用于表达所需蛋白或用化学诱导剂处理的的植物部分，原则上涉及植物的任何部分，在任何情况下涉及这些植物的复制材料和收获产物，例如果实、种子、结节或鳞茎、根茎、秧苗、cuttings 等。

再者，任何蛋白质尤其是诊断蛋白、治疗蛋白和/或材料蛋白质，均可以用本发明的方法进行制备。蛋白质可以源自任一个体，尤其是人或动物。蛋白质可以是野生型的，也可以为经过修饰的。可以是融合蛋白或蛋白质片段。

在一个优选的实施方案中，按照本发明方法的步骤（b）通过宿主生物体周围的气相进行与化学诱导剂的接触。优选的方法通过改变宿主生物体周围的气相而进行，即气相作为诱导刺激物的载体，通过雾化诱导剂溶液或用挥发性的诱导剂灌溉来实施。改变宿主生物体的气相优选导致例如有关的启动子的诱导。单凭物理扩散效应，经过一定时间后诱导刺激物即可以达到均态分布。通过加快反应容器中气相的流动，可以显著缩短达到均态分布的时间。尤其在例如植物的叶子、海藻或苔藓组织中的紧密相邻的细胞中能够获得均一和快速渗透。尤其是致密的组织，如马铃薯块茎，本发明的对组织的快速渗透非常有利。

本领域的熟练技术人员熟悉合适的气体诱导剂，还熟悉在气相中气体进行有效交换的条件。例如参见 Anaerocult 系统（Merk, Darmatadt, 德国），该系统可以产生厌氧环境，在这种环境中，氧气被结合而释放出二氧化碳。在这一系统中，玉米的 GapC4 启动子可以通过二氧化碳气氛而厌氧诱导（Bulow, L.等，分子植物微生物间的相互作用，1999，182-188）。导入工业用氮气也可以达到同样的诱导效果。另一实例是用乙烯诱导“疾病发生相关蛋白质”的启动子，如 L 型苯丙氨酸氨裂合酶启动子，苯基苯乙烯酮合酶启动子或“富含羟脯氨酸糖蛋白”的启动子（Ecker,J.R. and Davis, R.W.，美国科学院研究进展，1987，84，5202-5206）。

本领域熟练技术人员对可溶性的适于雾化的诱导剂非常熟悉，还熟悉尽可能有效地雾化的条件。例如参见一种嵌合型转录诱导体系，其用可溶性诱导剂地塞米松诱导（植物杂志，1997，11，605-612；Kunkel，等，自然生物工程学，1999，17，916-918）。玉米的 Incwl 启动子可以通过加入蔗糖或 D-葡萄糖进行活化(Chen,W.H.，等，美国科学院研究进展，1999，96：10512-

10517)。水杨酸可以活化许多“疾病发生相关蛋白质”的启动子（Gaffney，等，自然，1993，261：754-756）。水杨酸甲酯为一种挥发性诱导剂，其在摄入植物中转化为水杨酸酯，后者具有上述的诱导作用（Shulaev,V，等，自然，1997，385，718-721）。诱导启动子的（生物）化学物质溶液的雾化具有以下优点：技术简单、待诱导组织周围的诱导剂呈均态分布，并可以进入组织。气相经有效的流动使诱导剂快速均匀分布。另外，实现了所得浓度不同的简单、高效的平衡，结果可以保证处理条件的可控性。在一个特别优选的实施方案中，农药 RH5992(tebufenozide, Rohm & Hass, Croyden,英国)用于雾化，RH5992 作为待诱导启动子的诱导剂，通过一种嵌合转录活化蛋白质发挥诱导功能（Gatz 和 Lenk, 植物科学进展，1998，3：352-358）。RH5992 特异性地激活启动子，一旦缺乏 RH5992，启动子则失活。在这种情况下，例如通过持续空气分布，薄雾状的诱导剂均匀地到达待诱导的组织中。通过从组织表面扩散到细胞中实现启动子的活性诱导。

本领域熟练技术人员熟悉适于灌溉的挥发性诱导剂和它们所诱导的启动子。尤其上面提到水杨酸甲酯，其在摄入植物中转化成水杨酸酯，后者如上所述具有诱导作用（Shulaev,V，等，见前上文）。挥发性诱导剂的另一例子为乙醇，它可以诱导转基因烟草中的构巢曲霉的 alcA 启动子（Caddick, M. X.等，自然生物工程学杂志，1998，16：177-180）。为了进行有效灌溉，用合适的气体载体介质将液体或固体（挥发性）诱导剂进行灌溉，以便转变为挥发性的气相，并优选进行有效气相循环，使诱导剂呈均态分布。

在一个优选的实施方案中，在本发明方法的步骤（b）中，经宿主生物体周围的液相进行与化学诱导剂的接触，这优选地用固体（生物）化学诱导剂的溶液或液体（生物）化学诱导剂进行。

例如参见上述对雾化的可溶性诱导剂的描述。有利的是通过病毒悬液供应化学诱导剂至宿主生物体，即用病毒感染宿主生物体，如在烟草情况下，使用烟草花叶病毒（TMV）。

本发明方法的一个特别优选的实施方案中，编码所需蛋白质的基因与一个诱导性启动子相连。合适启动子和其所涉及的抑制剂（气体、液体或固体、挥发性物质）均为本领域熟练技术人员所熟知。包括例如上述系统 GapC4/CO_2(Bulow,等，同前文)，玉米 Adh1 启动子/厌氧生态下（Ellis,等，EMBO J,1987，6：11-16），L 型苯丙氨酸氨裂合酶启动子，苯基苯乙烯酮合酶启动子或“富含羟脯氨酸的蛋白质”启动子/乙烯（Ecker,J.R.and Davis,同前文），嵌合型的转录诱导系统/地塞米松（植物杂志，见前文），玉米 Incw1 启动子/蔗糖或 D-葡萄糖（Chen,W.H.等，同前文），许多疾病相关蛋白质启动子/水杨酸或水杨酸甲酯（Gaffney 等，同前文；Shulaev，等，同前文），转基因烟草中的构巢曲霉 alcA 启动子/乙醇（Caddick,M.X,等，同前文）。

优选的启动子为在有氧条件下没有活性的启动子，如 GapC4 启动子或 Adh1 启动子，通过改变气相，如除氧，而发生诱导。在这种情况下，尤其优选无氧诱导的启动子 GapC4（德国专利：19547272），例如与收获的转基因植物组织（如转基因马铃薯的块茎）一起应用。大多数植物启动子在无氧情况下关闭，而 GapC4 启动子在有氧条件下关闭且通过简单除去氧就可以激活（Bulow,等，同前文）。这例如可以通过向反应空间或储存空间中通氮气或二氧化碳来实现。因此，即使对完整的马铃薯块茎而言，几小时内即可获得完全无氧的环境，从而可以诱导启动子以及外源基因表达。

在本发明另一个优选的实施方案中，编码所需蛋白的基因的表达通过补偿转录和/或翻译的功能抑制来诱导。转录抑制的一个

实例为大麦的 HRT 蛋白（抑制蛋白），该蛋白与大麦的α－淀粉酶启动子的“赤霉素植物激素应答元件”结合（Raventos, D.等，生物化学杂志，1998，273，23313-23320）。如果这一抑制蛋白在有氧条件下由 CaMV 35S 启动子调控在转基因植物中表达，则它与插入到编码所需蛋白的基因及其启动子之间的靶序列结合。一旦无氧条件产生，则 35S 启动子被关闭，抑制蛋白的新合成被终止，继而由于现存抑制蛋白的降解而使上述基因活化。

翻译抑制的一个实例为小麦胚芽提取物中的铁蛋白转录本的翻译受抑，其是通过表达大鼠肝脏中的一种 90kDa 抑制蛋白而被抑制，该蛋白可以与铁蛋白 mRNA 的 5’-非翻译区结合（Brown, P.H.，生物化学杂志，1982，264：13383-13386）。铁蛋白 mRNA 的抑制蛋白插在编码所需蛋白的 cDNA 序列之前，并且转基因植物表达这种抑制蛋白。

抑制蛋白的活性还可以直接受诱导剂或抑制剂调控。例如，通过加入吲哚乙酸(indoleacetic acid)或放线菌酮（cycloheximide）在 Pisum sativum 中发生 PS-IAA4/5 和 PS-IAA6 启动子的可调控转录活化，从而转录本仅有在这些激活剂存在时才产生（Koshiba,T, 等，分子生物学杂志，1995，253：396-413）。通过例如加入四环素，可以直接补偿转基因拟南芥类植物的 tet 操纵子的翻译性抑制（Ulmasov,B,等，植物分子生物学，1007，35：417-424）。

在一尤其优选的实施方案中，本发明的方法的特征是编码所需蛋白的基因与启动子功能性连接，从而在启动子与基因之间插入一个核酸序列，该序列具有以下特征：（a）它阻断基因的转录和/或翻译；以及（b）可以通过诱导加以删除，导致基因的表达。因此，在非诱导状态，所需基因的转录或翻译受阻，因此由该基因编码的外源蛋白也就不能合成。本发明方法的一个更为优选的实施方案中，插入的核酸可以被一个抑制性或诱导性的重组

酶切除。这种情况中，编码重组酶的基因可以独立地插入宿主植物中，或者也可以定位在插入的核酸序列上。局部特异性的重组以及因此这一核酸序列的切除仅发生在由（生物）化学的、物理的或遗传的诱导剂活化重组酶之后，结果所需基因直接定位在启动子下游，该启动子启动转录和翻译，以及外源蛋白的生物合成。活化重组酶的诱导剂例如参见上述有关启动子诱导体系的陈述。尤其应提到的是，重组酶基因可以定位于病毒如 TMV 上，并在感染宿主生物体后才被活化。

重组酶 LBD 系统（WO 95/00555）为本发明方法中最为优选的。其如下插在启动子和待表达的外源基因之间：

5’-启动子--R--重组酶 LBD--R--待表达的外源基因--终止子-3’

(R=重组酶 LBD 的重组位点)

重组酶通过与 LBD 结构域融合而失活。在收获植物材料后，将其与诱导剂如雌二醇一起保温，激活外源蛋白的产生，并与 LBD 结构域结合。结果是，重组酶被激活，编码重组酶的 cDNA 片段从两个重组位点处切除，故待表达的基因直接位于启动子下游。结果，待表达基因进行转录和翻译，从而在可控条件下制备外源蛋白。

本发明方法的另一个替代的优选实施方案特征为：通过补偿转录、转录后、翻译或翻译后抑制蛋白的作用，以及去除结合在核酸或蛋白质序列（这些核酸或蛋白质序列受外源刺激因子的诱导）上的抑制蛋白，可以使编码所需蛋白的基因表达。例如参见上述关于补偿转录和/或翻译的功能性抑制的描述。

最后，本发明涉及将上述各种诱导机制组合为例如两组分系统的方法。结果，例如在转基因植物中可以实现外源基因表达的更严格的调控，因此能够保证有非常高的生物学安全性，同时可

以避免可能对植物的正常生理造成的损害。例如，气体物质诱导的启动子，如厌氧诱导的玉米 GapC4 启动子，或者基于抑制蛋白的系统可以与另一种系统例如基于重组的系统联合使用，从而只有在启动子与基因结合后，通过可控性重组保证每个依赖诱导启动子的外源基因的转录。例如，上述重组酶 LBD 系统（WO 95/00555）可作为重组系统，其包括 5’端的重组位点，用于编码重组酶 LBD 蛋白的 cDNA 的重组，以及该重组酶 3’端的重组位点。在这种双组分系统中，启动子在有氧条件下没有活性。重组酶也通过与 LBD 结构域融合而失活。所以具有双重抑制作用。因此，外源基因不能在农业和园艺种植的条件下表达，即使双重抑制系统之一没有被环境刺激因素完全抑制时，也是如此。这种负作用随后可以被第二种（抑制）系统缓冲。在收获植物材料后，添加可以结合 LBD 结构域的诱导剂，用以产生外源蛋白，再者，在反应容器中建立无氧条件。这就保证了重组酶的活化，另一方面，编码重组酶的 cDNA 片段在两个重组位点处被切除，这样所要表达的基因直接位于厌氧启动子处。然后，产生厌氧环境，待表达的基因就可以进行转录、表达，外源蛋白就可以在可控的条件下产生。

本发明的另一方面涉及含有编码所需蛋白的基因的宿主生物体，该基因只在化学诱导剂存在时表达。该宿主生物体尤其是具有上述转基因特性的宿主生物体。有关文献见上述。

下面实施例阐述本发明。

实施例 1：scFv 在转基因马铃薯中的厌氧收获后制备

厌氧诱导的 GapC4 启动子(DE 19547272)通过 PCR 反应进行修饰，从而在 5’末端含有 HincII 和 NcoI 限制性酶切位点。下面为用于 PCR 反应的引物：

HincII-pGapC4 引物：

CATGTCAACACATAAGGAAGAAGAGGTAGAAAG

PGapC4-NcoI 引物：

CATGCCATGGATCGATGACGGGGTTGGCGAGTGTG

由 Artsaenko 等人（分子育种，1998，4：313-319）报道的 cDNA 序列编码的 scFv 抗体定位于内质网中，该序列通过连接子进行修饰（在 5’端与 CATGCCATGGCATG 连接，[5’-磷酸化寡核苷酸]；3’端与 GCTCTAGAGC 连接，[5’-磷酸化寡核苷酸]），从而在 5’末端含有 NcoI 限制性位点，3’末端含有 XbaI 位点。用 HincI 和 XbaI 两种内切酶将 CaMV35S 启动子从质粒 pRT100（Topfer,等，核酸研究，1987，15:5890）上切下来。将上述编码 GapC4 启动子和 scFv 抗体的两个核酸片段插进该质粒。用 HindIII 部分酶切，分离表达盒，并将其插入二元载体 pSR8-30 中（During，等，植物杂志，1993，3：587，598；Posch 等，植物分子生物学，1998，37：581-585）。即可获得表达载体 pSR8-30/Gap-scFv(ox)。

这种载体用于转化大肠杆菌（E.coli）SM10 菌株（Koncz 和 Schell,分子与普通遗传学，1986，204:383-396）。转化株与土壤杆菌 GV3101(Koncz 和 Schell，同上文)混合，28℃孵育过夜（Koncz 等，美国科学院研究进展，1987，84：131-135）。用羧苄青霉素进行筛选，羧苄青霉素抗性所需的 bla 基因存在于上述表达载体中。筛选的根瘤土壤杆菌克隆施加于马铃薯 Desiree 栽培品种的剪下的叶上，并在叶脉中段多次划刮，然后将叶子 20℃避光孵育 2 天。此后，冲洗下土壤杆菌，然后在马铃薯叶子上施加植物生长所需要的物质，从而优选地植物再生出芽来。另外，马铃薯叶子中未转化的细胞通过在植物的培养基中加入卡那霉素后（100mg/ml）后即可被杀死。剪下长出的芽，在不含有植物生长

物质而含有卡那霉素的培养基中使根部生长。马铃薯进一步常规培养。

如 Bulow 等（1999，见上述）所述，用“Anaerocult”系统（Merk，Darmstadt，德国）诱导剪下的叶子材料或整个植物或剪下的块茎组织，来检测 scFv 抗体的表达。经过 40 小时后，取出叶子，并研碎。通过产生的 c-myc 标签，用单克隆抗体 9E10-IgG（Cambridge Research Chemicals,，Northwich,，Cheshire, 英国）或蛋白质 L(Clontech,，Palo Alto, 加州，美国)进行 Western 印迹或 ELISA，来检测表达的 scFv 抗体。为了检测 scFv 抗体，需要分离全部马铃薯的蛋白，并用相应的方法检测。

在温室中（在盆中或在土层上）或自然条件下的大田中或园艺条件下，培育确定为表达阳性的转基因马铃薯。按正常的方法收获块茎并储藏。为了收获后生产 scFv 抗体，先将块茎放在钢制（或塑料）反应容器中，容器底部有一个通气阀门，气体从容器的顶部排出。用工业用氮气(或二氧化碳) 快速置换容器中的空气。通过慢速气流（每平方米底面积每小时通气 1 立方米）来调节反应容器中气相的恒定组成。40 小时后，从反应容器中取出块茎，匀浆、离心去除固体成分，收集水相上清，用色谱纯化 scFv 抗体。比较去除氧前、后样本中抗体的含量，发现除氧前样本中没有 scFv 抗体，而除氧后 scFv 抗体量显著增加。

实施例 2：转基因马铃薯中重组介导的收获后生产

按实施例 1 中方法，用连接子修饰 Artsaenko 等报道的 cDNA，该 cDNA 编码定位于内质网上的 scFv 抗体；从而使该 cDNA 的 5’ 端有 NcoI 限制性酶切位点，而 3’ 端有 XbaI 酶切位点。该核酸序列插在质粒 pRT100 的多接头序列中，即可获得 pRT100/scFv(ox)质粒。一合成核酸插入到 pRT100/scFv（ox）的

NcoI 位点，其含有两个 FRT 重组位点（Brchholz，等，核酸研究，1996，24：3118-3119），由此获得 pRT100/FRT-scFv 质粒。编码 FLP-重组蛋白酶 LBD 融合蛋白（WO 95/00555）的 cDNA，以 PCR 适应的 NcoI-XbaI 的形式插入到 pRT100 的 NcoI 位点中，使之在有义方向位于 CaMV35S 启动子（Odell 等，自然，1985，313：810-812）后（质粒 pRT100/FLP）。所用引物序列为：

NcoI-PLP-LBD 引物：

CATGCCATGCCACGGTTTGATATATTATGTAAAAC

FLP-LBD-XbaI 引物：

GCTCTAGATCAGACTGTGGCAGGGAAACCCTC

将来自 PRT100/FLP 的表达盒作为部分酶切的 PstI 片段插入在两个 FRT 重组位点之间，结果获得 pRT100/rec-scFv(ox)质粒。

用 HindIII 酶切后，分离 pRT100/rec-scFv(ox)质粒的表达盒，并将其插入二元载体 pSR8-30 中（During 等，植物杂志，1993，3：587-598；Porsch 等，植物分子生物学，1998，37：581-585），获得表达载体 pSR8-30/rec-scFv(ox)。用实施例 1 所述的方法产生转基因马铃薯。

体外培养的马铃薯植物在含 10^{-6}M 雌二醇（Sigma Chemicals, 圣路易斯，密苏里，美国）的培养基上反应，培养 2 天后检测 scFv 抗体。之后，收获马铃薯植物材料，并将其研磨碎，借助 Western 印迹或 ELISA 法，通过检测携带的 c-myc 标签(参见上文)或蛋白质 L，而检测表达的 scFv 抗体。为此，分离马铃薯中的所有蛋白质，用相应方法进行检测。

从体外培养克隆中挑选出阳性表达的马铃薯品系，将其种植在温室中。由于这些马铃薯株没经雌二醇处理，所以不发生重组。用相同的方法，在正常农业条件下田间种植。按正常的方法收获、储存。为了收获后生产 scFv 的抗体，块茎在反应容器中与

浓度为 10^{-6}M 的雾化雌二醇溶液保温。按实施例 1 中所述的技术方法操作。40 小时后，从反应容器中取出马铃薯块茎，匀浆、离心除去固体成分，收集水性上清，通过色谱纯化 scFv 抗体。比较雌二醇处理前后样本中抗体的含量，发现雌二醇处理前没有 scFv 抗体产生，而雌二醇处理后则 scFv 抗体显著升高。

01.07.23

序列表

<110> MPB 分子植物及蛋白质生物技术科隆有限公司

<120> 在宿主生物体中可控性收获后生产蛋白质的方法

<130> M 4375

<140> PCT/DE 00/03119
<141> 2000-09-05

<150> DE 199 56 272.5
<151> 1999-11-23

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：
引物

<400> 1

catgtcaaca cataaggaag aagaggtaga aag 33

<210> 2
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：
引物

<400> 2

catgccatgg atcgatgacg gggttggcga gtgtg 35

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

01.07.23

<220>
<223> 人工序列的描述：
引物

<400> 3

catgccatgc cacaatttga tatattatgt aaaac 35

<210> 4
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：
引物

<400> 4

gctctagatc agactgtggc agggaaaccc tc