

(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
2012 年 9 月 27 日 (27.09.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/126265 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/75 (2006.01) A61P 32/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12R 1/125 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/084333
- (22) 国际申请日: 2011 年 12 月 21 日 (21.12.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201110067373.7 2011 年 3 月 21 日 (21.03.2011) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 陈克平 (CHEN, Keping) [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。毛浪勇 (MAO, Langyong) [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。宁德刚 (NING, Degang) [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。姜姍彤 (JIANG, Shantong) [CN/CN]; 中国江

苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。李国辉 (LI, Guohui) [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。姚勤 (YAO, Qin) [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。袁弋 (YUAN, Yi) [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(74) 代理人: 南京知识律师事务所 (ZHISHI LAW FIRM OF INTELLECTUAL PROPERTY); 中国江苏省南京市新模范马路 5 号南京科技广场 B 座 9 楼, Jiangsu 210009 (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,

[见续页]

(54) Title: RECOMBINANT ENDOSPORE WITH HUMAN SERUM ALBUMIN PRESENTED ON SURFACE FOR ORAL ADMINISTRATION AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 用于口服的表面展示有人血清白蛋白重组芽孢及其制备方法

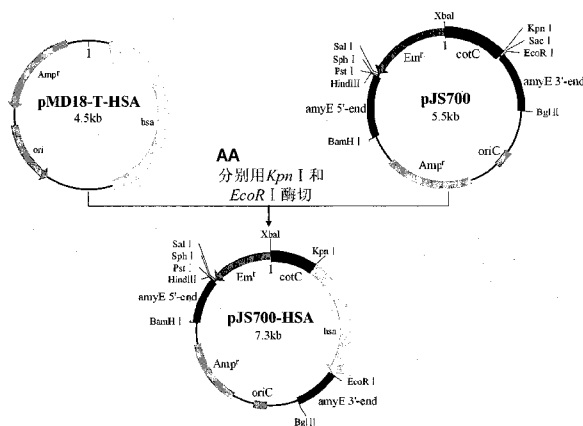


图2 / Fig.2

AA DIGEST RESPECTIVELY WITH KPN I AND ECOR I

(57) Abstract: A method for preparing *Bacillus subtilis* endospore with human serum albumin fusion protein presented on the surface and an oral product thereof. Capsid protein gene *cotC* of *Bacillus subtilis* endospore, as a molecular vector, is recombined with human serum albumin gene *hsa*, to construct an integrated recombinant plasmid that is expressed as a fusion, the recombinant plasmid that expresses human serum albumin HSA as a fusion is transformed into *Bacillus subtilis*, an exogenous gene is integrated to an amylase gene *amyE* at a specific site on the chromosome through homologous recombination, the recombinant strain has no amylase activity due to insertional inactivation of the amylase gene, a recombinant *Bacillus subtilis* strain that expresses CotC-HAS as a fusion is screened, and the recombinant strain is induced to produce endospore with human serum albumin presented on the surface. The endospore produced by the recombinant strain can be directly orally administered to animals.

[见续页]

WO 2012/126265 A1



RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(57) 摘要:

在枯草芽孢杆菌的芽孢表面展示人血清白蛋白融合蛋白的制备方法及其口服产品。利用枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因 *cotC* 为分子载体, 与人血清白蛋白基因 *hsa* 重组, 构建融合表达的整合型重组质粒, 将融合表达人血清白蛋白 HSA 的重组质粒转化枯草芽孢杆菌后, 通过同源重组使外源基因整合于染色体上特定位点的淀粉酶基因 *amyE* 中, 并使淀粉酶基因插入失活而导致重组菌株无淀粉酶活性, 筛选出含有融合表达 CotC-HSA 的重组枯草芽孢杆菌菌株, 诱导重组菌株产生的芽孢表面展示有人血清白蛋白。该重组菌株产生的芽孢可用于动物直接口服。

说明书

用于口服的表面展示有人血清白蛋白重组芽孢及其制备方法

技术领域

本发明涉及表面展示外源蛋白的重组芽孢的制备方法及产品，具体指的是在枯草芽孢杆菌芽孢表面展示人血清白蛋白 HSA 的重组芽孢，属于重组融合蛋白药物技术领域。

背景技术

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是由 585 个氨基酸组成的单链无糖基化的蛋白质，分子质量约为 66.5 kD (Mingetti, et al. 1986. J.Biol.Chem. 261,6757)，等电点在 4.7~4.9 之间。HSA 是人血浆中最丰富的蛋白质，占血浆总蛋白的 60%左右。在体液中人血清白蛋白可以运输脂肪酸、胆色素、氨基酸、类固醇激素、金属离子和许多治疗分子等，同时能够维持血液的渗透压保持在一个适当的水平。由于 HSA 作为血液最重要的运载工具和血浆蛋白成份，在机体内发挥着重要的生理功能，因而在临床医学实践中具有十分广泛的用途，被大量用来治疗各种休克、烧伤、战伤、外科手术和工伤事故等各种病因引起的血容量减少病人，以及慢性肾炎、肝炎、肝硬化和晚期恶性肿瘤病人，营养不良水肿症、低白蛋白血症和无白蛋白血症病人等。HSA 对细胞具有较高的营养价值。HSA 由较多的必需氨基酸组成，是均衡、齐全的氨基酸来源。滋养细胞的蛋白质约 1/3 来自肝脏合成的 HSA。肝脏每日合成的 HSA 几乎全部被各种组织细胞消耗，HSA 离开血液系统，抵达细胞膜，进入细胞内，水解后再合成各种蛋白质。由于 HSA 适应症多、用量大（每个病人每天用 HSA 的量将近 10g），因此 HSA 拥有巨大的市场需求量。目前 HSA 的全球市场年需求量约 600t，其中中国对 HSA 的年需求量约为 70t。临床上 HSA 主要是靠收集人的血液通过分级过滤获得，但是人血浆来源有限，价格昂贵，并且来源复杂，容易导致血源性污染，如肝炎病毒，艾滋病毒等。目前已有通过基因工程的方法用酵母发酵生产重组人血清白蛋白上市，但要实现药物级重组人血清白蛋白的大规模生产，发酵法仍然有许多的缺点和不足，因为重组人血清白蛋白产品对纯度要求极高，纯度要求达到 99.999999%以上，任何微量的杂蛋白都可能造成严重的免疫反应。这使得发酵法生产重组人血清白蛋白的分离纯化方法和步骤复杂，生产成本较高。

枯草芽孢杆菌为环境友好型细菌，在营养缺乏时，能形成处于代谢休眠状态的芽孢，在适宜条件下芽孢又能萌发成具有繁殖能力的营养细胞。芽孢容易培养，比重大易分离、不需要复杂的分离纯化操作。芽孢是生命世界中抗逆性最强的一种结构，其稳定性好，能耐氧化，耐高温，能长期耐 60℃高温，在 120℃的温度下能存活 20 分钟，并且在抗化学药物和抗辐射等方面也十分突出，可在恶劣环境中存活几年至几十年。芽孢在酸性胃环境中能保持活性，可以耐唾液和胆汁的攻击，可以顺利通过动物消化道，可作为极端环境（如胃肠道）下异源蛋白或生物活性分子的载体(Oggioni MR, et al. 2003. Vaccine. 21: 96-101)。枯草芽孢杆菌以孢

说明书

子状态进入消化道后，迅速由休眠状态复活，在短期内繁殖成高含菌量的优势种群，消耗掉肠道内大量氧气，并能产生过氧化氢、细菌素，建立微生态平衡，促进有益厌氧微生物的繁殖，抑制有害细菌（大肠杆菌、沙门氏杆菌）的生长，因而能预防腹泻、下痢等肠胃道疾病。目前市场上已经有口服枯草芽孢杆菌活菌胶囊产品，北京紫竹药业有限公司，国药准字 S20030018 (<http://www.777aaa.com/html/yao/200791823402711963569029.htm>)，表明枯草芽孢杆菌芽孢可以通过人口服使用而产生药效性。

本发明的目的在于利用芽孢独特的抗逆性，以益生菌枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白为载体，通过芽孢表面展示技术将人血清白蛋白展示在芽孢表面，使人血清白蛋白获得快速大量表达的同时具有良好的抗逆性，适用于快速大量制备具有药效性的重组人血清白蛋白的口服营养品。该产品在保持了枯草芽孢杆菌芽孢生理特性的基础上同时具有人血清白蛋白的药效性和营养功能，迄今尚未见类似的报道和发明专利。

发明内容

为了解决现有技术存在的问题，本发明提供了一种表面展示人血清白蛋白 HSA 的重组芽孢的制备方法和产品。本发明以枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白 CotC 为载体，通过芽孢表面展示技术将人血清白蛋白展示在枯草芽孢杆菌的芽孢表面，可用于动物直接口服，成为一种新型的人血清白蛋白药物营养品或者动物营养品，其在安全性、耐受性、药效学以及药代动力学等方面与人源 HSA 具有类似的功效。相对于其它注射型人血清白蛋白产品，本发明表面展示人血清白蛋白的制备方法和分离过程简单快速，具有更广泛的应用价值。这种产品的发明克服了当前人血清白蛋白来源于血液制品的限制，同时也克服了重组酵母发酵生产的人血清白蛋白分离纯化过程复杂的缺点，在药学领域具有良好的应用前景。

本发明所采用的技术方案为：

一种表面展示人血清白蛋白 HSA 的重组芽孢的制备方法及其产品，利用枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因为分子载体，与人血清白蛋白基因重组，构建融合表达的整合型重组质粒，并转化枯草芽孢杆菌获得枯草芽孢杆菌重组菌株，诱导重组菌株产生芽孢，在芽孢表面展示有人血清白蛋白。

本发明的一个具体操作是：通过 RT/PCR 的方法从人体肝脏组织的 cDNA 文库中扩增获得人血清白蛋白 HSA 的 cDNA，将获得的基因插入到克隆载体 pMD18-T 中保存。然后将人血清白蛋白基因 *hsa* 插入到融合表达的质粒 pJS700 的 *KpnI* 和 *EcoRI* 酶切位点之间，构建好整合型重组质粒 pJS700-HSA，用该质粒转化枯草芽孢杆菌，采用耗竭法诱导宿主菌产生芽孢，在芽孢表面展示有融合蛋白 CotC-HSA。

说明书

本发明选择具有良好的转化能力并且可以产生芽孢的枯草芽孢杆菌菌株为重组质粒的转化菌株，例如 *Bacillus subtilis* 168 及其衍生的一系列菌株(Bacillus Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, The Ohio State University, West 12th Avenue, Columbus, Ohio, 43210, USA); 选择芽孢衣壳蛋白基因 *cotC* (Gene Bank 序列号: NP_389653) 作为表面展示蛋白的分子载体，选择人血清白蛋白基因 *hsa* 为重组基因。枯草芽孢杆菌为环境友好型细菌，其在营养缺乏时会分化形成休眠体芽孢，芽孢具有极强的抗逆性，可以耐酸和碱，存活能力较强，并且其比重大，容易进行分离纯化。枯草芽孢杆菌的培养方法简单方便，生长迅速，营养要求简单，容易进行工业放大培养。在枯草芽孢杆菌的芽孢表面展示人血清白蛋白，使人血清白蛋白获得快速大量表达的同时具有良好的抗逆性和稳定性，并且分离纯化简便快捷。

本发明涉及发明所选择的芽孢衣壳蛋白基因 *cotC* 与 *hsa* 基因编码序列重组后构建的重组质粒，在此重组质粒中含有芽孢衣壳蛋白基因的启动子、不含终止密码子的编码序列与 *hsa* 基因的编码序列重组后的基因，可在枯草芽孢杆菌分化形成芽孢时融合表达 CotC-HSA。通过构建整合型重组质粒，使得融合基因 *cotC-hsa* 整合于枯草芽孢杆菌染色体上的特定位点并稳定的进行遗传，避免了质粒在枯草芽孢杆菌细胞中容易丢失的缺点。

带有融合表达 CotC-HSA 的表达载体可以通过热击法或电穿孔法转化宿主细胞。成功转化的细胞，通过进一步筛选带有本发明构建的融合基因的细胞，可以通过本领域熟知的方法加以鉴定，如收集细胞，裂解后提取 DNA，然后进行 PCR 鉴定等，也可以在诱导表达后用 HSA 抗体进行 western blot 检测。

本发明还涉及本发明构建的融合表达 CotC-HSA 的重组整合型质粒转化枯草芽孢杆菌筛选所得到的重组菌株，这些重组菌株诱导形成的芽孢表面展示有重组人血清白蛋白，并可以通过 Western blot 检测其芽孢表面展示的重组蛋白 HSA。

本发明涉及基因 *hsa* 编码序列片段克隆的引物序列：

hsa-F: ATGGTACCATGAAGTGGGTAACCTTT (SEQ ID NO.1)

hsa-R: GCGAATTCTTATAAGCCTAAGGCAGCT (SEQ ID NO.2)

本发明涉及枯草芽孢杆菌淀粉酶基因 *amyE* (Gene Bank 序列号: NP_388186) 片段扩增的引物序列：

amyE-F: ATTGCTCGGGCTGTATGACTGG (SEQ ID NO.3)

amyE-R: GTTACACCATCACTGTTCGTTTCCTT (SEQ ID NO.4)

本发明的突出优点表现为：本发明将人血清白蛋白 HSA 展示在枯草芽孢杆菌表面，利用芽孢所具有的独特抗逆性，使得人血清白蛋白顺利通过动物体消化屏障。本发明构建的表面

说明书

展示人血清白蛋白 HSA 的枯草芽孢杆菌重组芽孢,可用于动物直接口服,成为一种新型的人血清白蛋白营养品或者动物营养品,相对于其它注射型人血清白蛋白样品,制备方法和分离过程简单快速,并且具有更好的稳定性和更广泛的应用价值。这种产品的发明克服了当前人血清白蛋白来源于血制品的限制,同时也克服了重组酵母发酵生产的人血白蛋白分离纯化过程复杂的缺点。

附图说明:

图 1 发明人克隆的人血清白蛋白 *hsa* 基因编码序列在 Gene Bank 中搜索比对结果。

图 2 融合表达 CotC-HSA 整合型重组质粒 pJS700-HSA 的构建方法及其结构图谱。*amyE* 5'-end 和 *amyE* 3'-end 分别表示淀粉酶基因编码序列的 5'端和 3'端,通过同源重组整合在 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)染色体的淀粉酶基因中。*Amp*^r, *Em*^r 分别表示氨苄青霉素抗性基因和红霉素抗性基因,在大肠杆菌和 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)中作为筛选标记。*cotC-hsa* 为在 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)的芽孢中融合表达 CotC-HSA 重组蛋白的基因片段,该片段含有 *cotC* 基因的启动子序列、不含有 *cotC* 终止密码子的 CotC 编码序列,以及 HSA 的全部编码序列。*oriC* 为大肠杆菌复制子片段。

图 3 重组菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)/pJS700-HSA 的淀粉酶活性分析。A: 野生型菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)和重组菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)/pJS700-HSA 于淀粉平板上培养; B: 在淀粉平板上野生型菌株和重组菌株的碘液染色。

图 4 *Em*^r-*cotC-hsa* 基因片段在 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)染色体中的整合示意图。

图 5 PCR 检测重组菌株中的 *Em*^r-*cotC-hsa* 片段。M: 250bp DNA Ladder Marker; 分别以 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻) (Wild-type, WT)和 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)/pJS700-HSA (Transgenic, TG)的染色体为模板,以 *amyE*-F/*amyE*-R、*hsa*-F/*hsa*-R、*hsa*-F/ *amyE*-R 和 *amyE*-F/*hsa*-R 为四组引物对(引物对的在染色体中的位置见附图 4)进行 PCR 鉴定重组基因。

图 6 转基因重组菌株表面展示 HSA 重组芽孢的 western blot 鉴定。M 为 prestained protein MW marker, 1 为野生型菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)培养 48h 后的提取物作为对照, 2 和 3 分别为重组菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)/pJS700-HSA 培养 8h 和 48h 后的提取物。

图 7 口服重组芽孢对小鼠血清白蛋白含量的影响。对照组为给小鼠灌生理盐水; 野生型组为给小鼠灌野生型芽孢, 剂量 2 mg/(g·d); 低剂量组和高剂量组为给小鼠灌重组芽孢, 剂量分别为 1 mg/(g·d)和 2 mg/(g·d)。

图 8 口服芽孢对小鼠体重的影响。4 条曲线分别表示对照组, 野生型芽孢处理组, 重组芽孢小剂量和大剂量处理组 30 天时间里小鼠体重的变化。

说明书

具体实施方式

实验材料：

各种限制性内切酶、T₄ DNA ligase、*LA Taq*、*Taq*酶，pMD18-T载体均购至宝生物工程（大连）有限公司，PCR引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成，测序由百奥迈科(Biomics)生物技术有限公司完成，用于本发明的所有DNA片段的回收均采用Omega Bio-Tek Gel Extraction Kit分离纯化，大肠杆菌菌株DH5 α （中国普通微生物保藏管理中心CGMCC，北京市朝阳区北辰西路1号院，中科院微生物研究所，100101）为本实验室保存，其它试剂均为国产分析纯。

在本发明中所使用的术语，非特别说明的情况下，一般为本领域普通技术人员所理解的含义。以下实施例中未作具体说明的实验操作方法均参照《分子克隆实验指南》（Sambrook等编著，科学出版社，1992年版）、试剂盒说明书、及产品说明书进行。以下的实施例只是为了举例说明本发明，并非以任何方式限制本发明的范围。在以下实施例中，未详细描述的一些过程和方法都为本领域技术人员熟悉和了解的常规方法。所用试剂的来源、商品名，均在首次出现时标明，其后所用相同试剂如无特殊说明，均与首次标明的相同。本发明实施例中涉及的由发明人保存的生物材料，均可向公众提供20年。

实施例 1：人血清白蛋白 *hsa* 基因的克隆、测序及鉴定

人体肝脏组织样品由南通大学医学院刘继兵博士提供。取人体肝脏组织，放入用液氮预冷的研钵中，加入液氮进行研磨，用RNA提取试剂盒分离信使RNA (mRNA)，通过RT/PCR技术获得人血清白蛋白基因的cDNA序列。

人血清白蛋白 hsa 基因片段的PCR扩增引物为：

hsa -F: ATGGTACCATGAAGTGGGTAACCTTT

hsa -R: GCGAATTCTTATAAGCCTAAGGCAGCT

PCR反应体系按TaKaRa *LA Taq*使用说明书严格进行，20 μ L反应体系中含TaKaRa *LA Taq* 0.2 μ L，10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg²⁺ Plus) 2 μ L，dNTP Mixture（各2.5 mM）3.2 μ L，模板DNA 100ng，上下游引物(20 μ M)各0.4 μ L，最后加灭菌超纯水补齐到20 μ L。PCR条件为：94 $^{\circ}$ C变性5min，94 $^{\circ}$ C 1min，56 $^{\circ}$ C 40 s，72 $^{\circ}$ C 2min，30个循环。PCR产物大小为1845bp，包括人血清白蛋白 hsa 基因的编码序列。为了便于克隆，上游引物 hsa -F中添加了*Kpn*I 限制性酶切位点，下游引物 hsa -R中添加了*Eco*RI 位点。扩增片段按TaKaRa pMD18-T Simple Vector（TaKaRa，宝生物工程（大连）有限公司）说明书的方法，克隆于pMD18-T载体中，转化大肠杆菌DH5 α ，筛选克隆菌株，提取质粒，通过PCR及*Kpn*I和*Eco*RI双酶切，琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆，并对重组质粒进行测序，克隆片段的测序由百奥迈科(Biomics)生物技术有限公司完成。克隆

说明书

的重组质粒命名为pMD18-T-HSA, 重组子菌株命名为DH5 α /pMD18-T-HSA。阳性重组菌株保存在含有15%甘油的LB培养基中, 冻存于-80℃。

测序结果在GenBank中(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行搜索比对, 结果见图1。

实施例2: 以CotC为载体表面展示HSA的枯草芽孢杆菌重组芽孢的制备与应用

1. 重组整合型质粒pJS700-HSA的构建

质粒 pJS700 (李倩. 以 CotX 为分子载体表面展示 WSSV 囊膜蛋白 Vp19 和 Vp28 的枯草芽孢杆菌重组芽孢的研究[D]. 江苏镇江: 江苏大学, 2010:36-38) 由江苏大学环境学院宁德刚副教授惠赠, 该质粒大小约为 5.5kb。在 pJS700 质粒中, *amyE* 5'-end 和 *amyE* 3'-end 分别表示淀粉酶基因 *amyE* (Gene Bank 序列号: NP_388186) 编码序列的 5'端和 3'端, 通过同源重组整合在 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻) 染色体的淀粉酶基因中。*Amp*^r, *Em*^r 分别表示氨苄青霉素抗性基因和红霉素抗性基因, 在大肠杆菌和 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻) 中作为筛选标记。*cotC* 为枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白 CotC 基因, 该基因片段含有 *cotC* 基因 (Gene Bank 序列号: NP_389653) 的启动子序列、不含有 *cotC* 终止密码子的 *CotC* 编码序列。*oriC* 为大肠杆菌复制子片段。分别用 *Kpn*I 和 *Eco*RI 酶切质粒 pMD18-T-HSA 和 pJS700, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 *hsa* 片段和 pJS700, 用 T₄ DNA ligase 连接两双酶切后纯化好的片段, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 转化物涂布于含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板中 37℃ 培养过夜, 次日挑选阳性单克隆菌株于含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 培养 12 至 16h, 提取质粒, 通过 PCR 及 *Kpn*I 和 *Eco*RI 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆, 鉴定正确后将重组整合型质粒命名为 pJS700-HSA, 阳性重组菌株命名为 DH5 α /pJS700-HSA。该重组整合型质粒 pJS700-HSA 中含有重组基因 *cotC-hsa*, 该质粒的构建过程及其图谱见图 2。

2. 融合表达重组芽孢的枯草芽孢杆菌菌株的筛选与鉴定

将整合型重组质粒 pJS700-HSA 转化 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻) (Bacillus Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, The Ohio State University, West 12th Avenue, Columbus, Ohio, 43210, USA), 用含有 0.4 μ g/mL 红霉素 (购自 SIGMA 公司) 的 LB 平板筛选重组子, 从平板上挑选单菌落接种于含 1% 淀粉的 LB 平板中, 37℃ 过夜培养, 次日用碘-碘化钾溶液对淀粉平板染色来鉴定重组菌株。1% 淀粉平板的制备方法: 100mL LB 固体培养基中加可溶性淀粉 0.1g, 高压蒸汽灭菌后倒制平板。碘-碘化钾溶液的配制: 碘化钾 2g, 碘 1g, 蒸馏水 300mL, 先将碘化钾溶于少量去离子水中, 待全部溶解后再加入碘, 振荡溶解后稀释至 300mL, 避光保存在棕色玻璃瓶中, 用时可稀释 2~10 倍。取适量碘-碘化钾溶液滴于淀粉平板上, 菌落周围产生透明圈表明重组基因没有插入淀粉酶基因 *amyE* 中, 菌落及其周围颜色变蓝表明重组基因

说明书

成功的插入到了 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)染色体上的淀粉酶基因 $amyE$ 中, 因而导致淀粉酶基因 $amyE$ 没有活性, 见图3。

为了进一步证明重组菌株中淀粉酶基因的失活是由于 Em^r -*cotC*-*hsa*的插入所致, 分别以 $amyE$ -F/ $amyE$ -R、*hsa*-F/*hsa*-R、*hsa*-F/ $amyE$ -R、 $amyE$ -F/*hsa*-R为引物对, 以枯草芽孢杆菌的染色体为模板, PCR扩增鉴定重组菌株中是否含有 Em^r -*cotC*-*hsa*基因片段。 Em^r -*cotC*-*hsa*片段在 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)染色体中的整合示意图见图4。PCR反应体系按TaKaRa LA Taq使用说明书严格进行, 20 μ L反应体系中含TaKaRa LA Taq 0.2 μ L, 10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg²⁺ Plus) 2 μ L, dNTP Mixture (各2.5 mM) 3.2 μ L, 模板DNA 100ng, 上下游引物(20 μ M)各0.4 μ L, 最后加灭菌超纯水补齐到20 μ L。PCR反应条件根据各个引物对的特征分别设置。在重组菌株中分别检测到约5.0 kb、1.8 kb、4.3 kb和2.3 kb的扩增片段, 而野生型菌株中只检测到约1.1 kb的淀粉酶基因, 鉴定结果见图5。这表明重组菌株染色体上含有 Em^r -*cotC*-*hsa*重组基因, 并且 Em^r -*cotC*-*hsa*重组片段成功的插入到了淀粉酶基因中。将鉴定后的重组菌株命名为 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)/pJS700-HSA。

枯草芽孢杆菌染色体的提取方法为: 挑单菌落接于LB加相应抗生素的培养基中, 在37 $^{\circ}$ C摇床中培养至OD₆₀₀为1.0~2.0。取1.5mL菌液于Eppendorf管中, 8000rpm离心10min, 弃上清, 加100 μ L pH8.0的TE缓冲液 (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 洗沉淀, 离心去上清, 再加100 μ L TE悬浮沉淀; 向悬浮液中加入30 μ L 100mg/ml溶菌酶溶液, 不要摇晃, 在37 $^{\circ}$ C培养箱中放1h, 加50 μ L 10%SDS和20 μ L 20mg/mL蛋白酶K, 37 $^{\circ}$ C继续培养1h; 补TE至300 μ L, 分别加150 μ L苯酚和氯仿抽提, 12000rpm离心10min, 取上清; 再加300 μ L氯仿, 12000rpm离心5min, 取上清, 加1/4体积5M的NaCl, 2倍体积的无水乙醇, 室温下沉淀DNA 2h, 12000rpm离心10min, 收集沉淀, 用500 μ L 70%的乙醇洗沉淀, 待挥发干后, 加10 μ L TE缓冲液溶解沉淀, 取1 μ L用琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度, 剩余的可放于-20 $^{\circ}$ C中保存备用。

3. 表面展示人血清白蛋白重组芽孢的诱导及鉴定

用DSM培养基诱导重组菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)/pJS700-HSA形成芽孢。DSM培养基的配方为: 0.8% nutrient broth (营养肉汤Difo), 0.1% KCl, 0.025% MgSO₄ · 7H₂O, 1.0mM Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 10 μ M MnCl₂, 1.0 μ M FeSO₄。将野生型菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)和重组菌株分别接种于DSM培养基中, 重组菌株分别取8h和48h培养物进行处理, 野生型菌株取48 h的培养物进行处理。芽孢蛋白的处理方法: 12000rpm $\times$ 10min离心收集菌体, 重悬于相同体积的GTE Buffer (50mM葡萄糖, 20mM pH7.5 Tris-HCl, 10mM EDTA, 2mg/mL溶菌酶)中, 37 $^{\circ}$ C处理30分钟用以破坏营养细胞, 12000rpm $\times$ 10min沉淀芽孢, 用pH7.4的PBS洗3次后重悬于相同体积的SDS-DTT缓冲液 (0.1mM pH 7.4 PBS, 50mM DTT, 1.5%SDS)中, 65 $^{\circ}$ C水浴

说明书

处理10min, 进行SDS-PAGE电泳, 转移到PVDF膜上, 以兔抗HSA血清为一抗, Western blot检测重组菌株和野生型菌株的芽孢蛋白。结果显示: 野生型菌株48h和重组菌株8h的培养物中都没有检测到HSA, 而重组菌株培养48h后, 由于营养耗尽, 细胞分化形成芽孢, 在芽孢形成的过程中, HSA随着芽孢衣壳蛋白CotC一同得到表达, 因而能检测到HSA, 见图6。这表明重组芽孢中人血清白蛋白HSA通过衣壳蛋白载体CotC将其展示在了重组芽孢的表面。

4. 小鼠口服重组芽孢实验分析重组芽孢的生理功能

小鼠灌胃实验在江苏大学实验动物中心进行, 该实验获得了江苏大学动物实验伦理委员会的批准, 并且实验过程完全按照实验动物中心的要求进行。雄性的SPF级ICR小鼠(5个星期大小, 18—22 g), 在进行实验前在实验环境中适应两个星期。每10只小鼠一笼, 培养条件为: 保持室温 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 饮食和饮水自由。适应过后, 我们首先进行重组芽孢的急性毒理实验分析。取20只ICR小鼠(公母各半), 用重组芽孢对小鼠进行灌胃, 灌胃剂量为5 mg/(g·d)。之后对实验小鼠观察两周, 实验小鼠没有出现不良反应。接着取40只小鼠, 将它们随机分为4组: 一空白对照组(给小鼠灌生理盐水), 一野生型处理组(给小鼠灌野生型芽孢, 剂量为2 mg/(g·d)), 两个重组芽孢处理组(一小剂量组, 剂量为1 mg/(g·d), 一大剂量组, 剂量为2 mg/(g·d))。收集的芽孢真空冷冻干燥称重后重悬于生理盐水中, 分装备用。用重悬于生理盐水中的芽孢给小鼠灌胃, 灌胃的过程中每天对小鼠进行观察和称体重。30天后, 挖小鼠眼球取血, 分离血清, 进行生化参数的检测。小鼠血清的生化检测由江苏大学附属医院(江滨医院)完成。实验数据表示为平均值±标准差。统计学分析用独立样本的t检验。 $P < 0.05$ 表明实验结果具有统计学意义。实验结果表明, 口服大剂量重组芽孢的小鼠血清中白蛋白明显高于其他各组, $P < 0.01$, 见图7。这表明口服重组芽孢能够提高动物体血清中的白蛋白含量。而小鼠的体重各组并没有大的区别, 见图8, 这表明口服芽孢并不会引起小鼠胃肠道等的不适。

权 利 要 求 书

1. 一种表面展示人血清白蛋白重组芽孢的制备方法，其特征在于：利用枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因为分子载体，与人血清白蛋白基因重组，构建融合表达的整合型重组质粒，并转化枯草芽孢杆菌得到枯草芽孢杆菌重组菌株，诱导重组菌株产生的芽孢表面展示人血清白蛋白的重组芽孢。
2. 按照权利要求 1 所述的表面展示人血清白蛋白重组芽孢的制备方法，其特征在于：所述的枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因为 *cotC*。
3. 按照权利要求 2 所述的表面展示人血清白蛋白的重组芽孢的制备方法，其特征在于：所述的融合表达的整合型重组质粒是将枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因 *cotC* 与人血清白蛋白基因重组构建的质粒。
4. 按照权利要求 3 所述的表面展示人血清白蛋白的重组芽孢的制备方法，其特征在于：所述的枯草芽孢杆菌重组菌株是整合型重组质粒转化枯草芽孢杆菌所得到的菌株，该菌株染色体上含有适用于枯草芽孢杆菌的选择标记基因、以及芽孢衣壳蛋白基因与人血清白蛋白基因的编码序列重组后的基因，这些基因插入淀粉酶基因中导致重组菌株的淀粉酶基因失活。
5. 按照权利要求 4 所述的表面展示人血清白蛋白的重组芽孢，其特征在于，重组芽孢是枯草芽孢杆菌重组菌株诱导形成的枯草芽孢杆菌的芽孢，芽孢表面展示有人血清白蛋白 HSA。
6. 一种表面展示人血清白蛋白重组芽孢，其特征在于：是通过以下方法制备：利用枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因为分子载体，与人血清白蛋白的基因重组，构建融合表达的整合型重组质粒，并转化枯草芽孢杆菌得到枯草芽孢杆菌重组菌株，诱导重组菌株产生的芽孢表面展示人血清白蛋白的重组芽孢。
7. 按照权利要求 6 所述的表面展示人血清白蛋白的重组芽孢，其特征在于，用枯草芽孢杆菌通过重组技术在芽孢表面展示人血清白蛋白，该重组芽孢可用于人体或动物口服使用。

说明书附图

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Transcripts						
NM_000477.5	Homo sapiens albumin (ALB), mRNA	3363	3363	100%	0.0	99%
Genomic sequences[show first]						
NT_022778.16	Homo sapiens chromosome 4 genomic contig	409	3404	100%	3e-111	100%
NW_001838914.1	Homo sapiens chromosome 4 genomic contig	409	3398	100%	3e-111	100%

图1

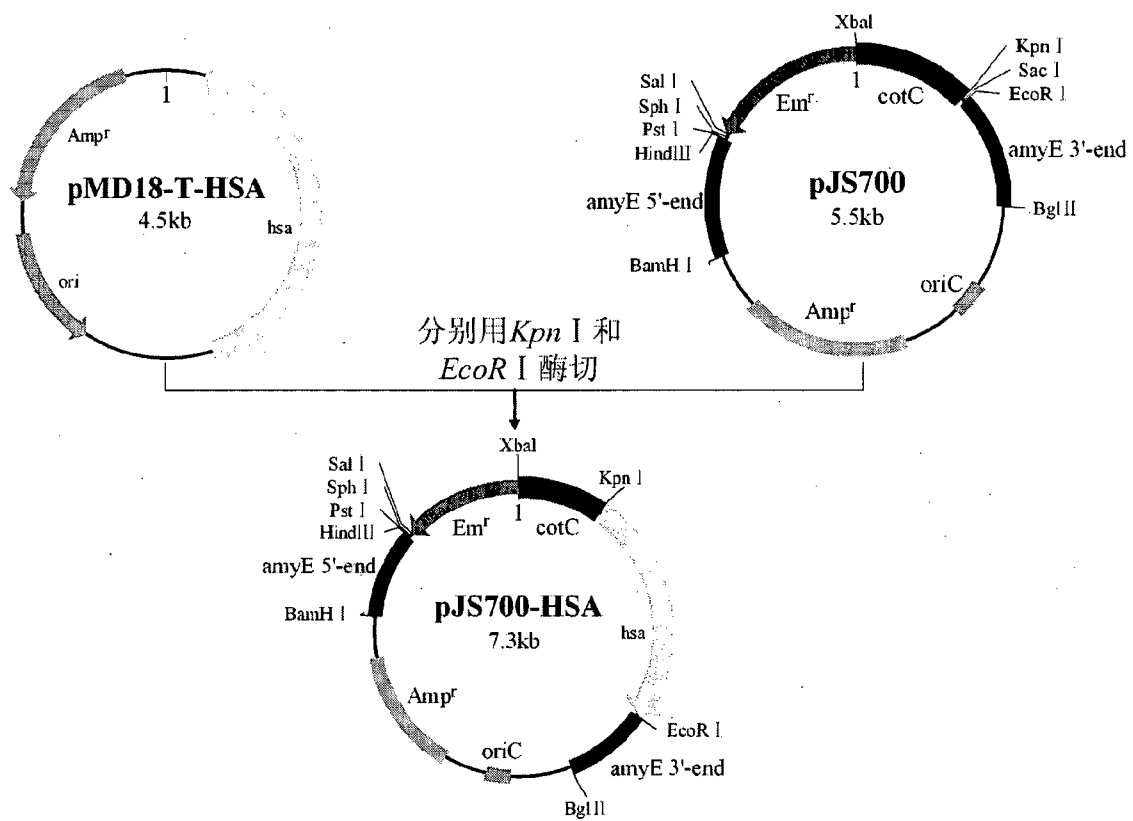


图2

说明书附图

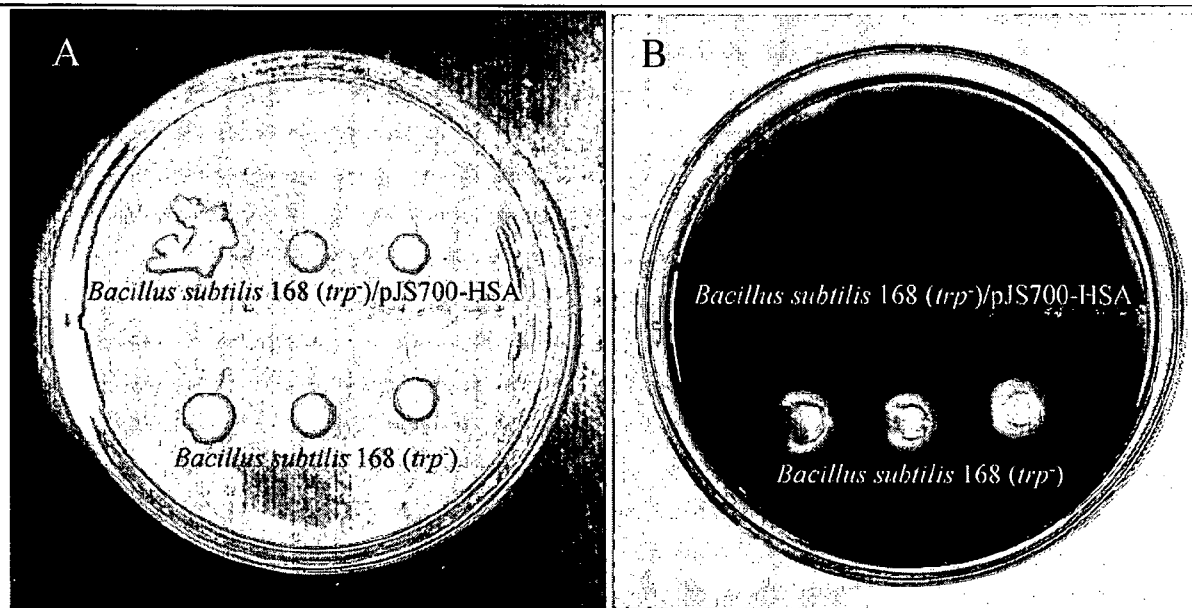


图3

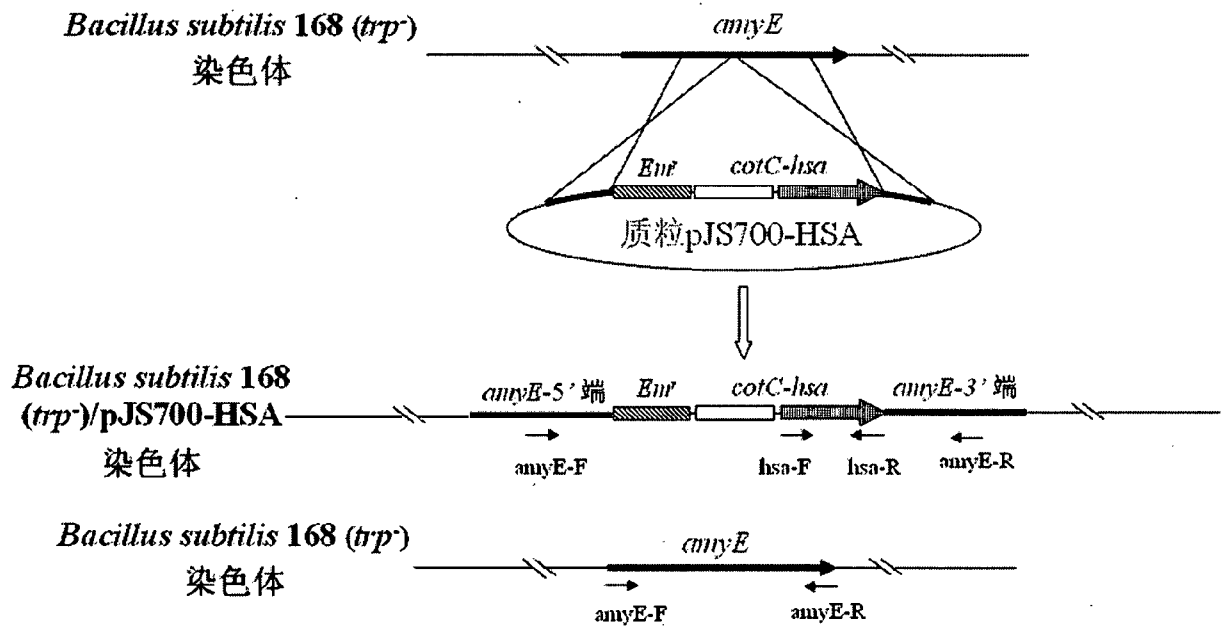


图4

3/4

说明书附图

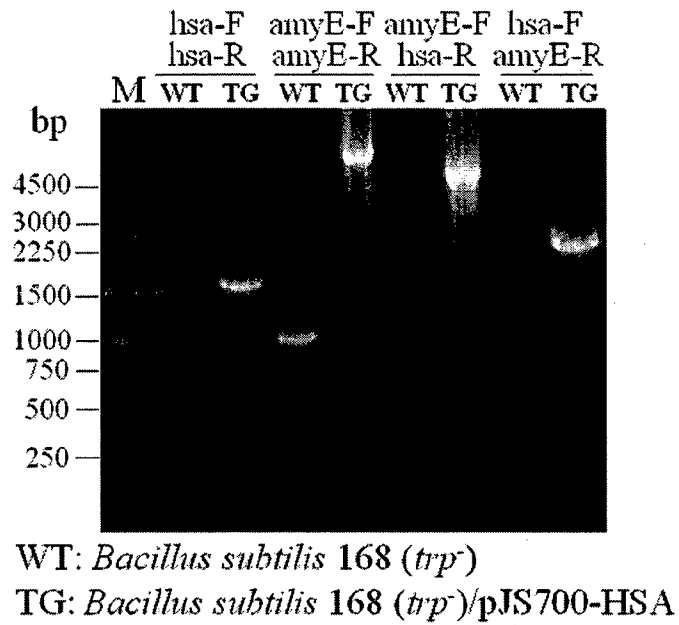


图5

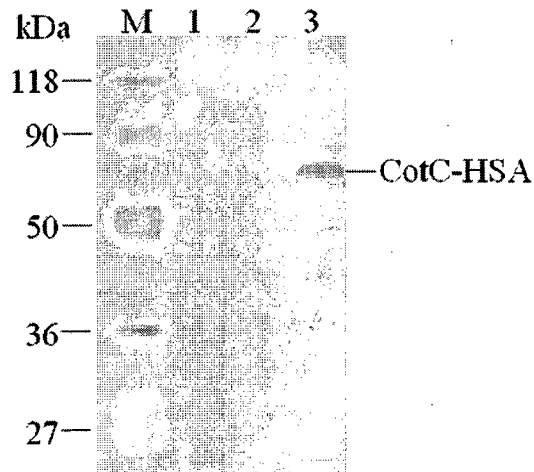


图6

替换页(细则第26条)

4/4

说明书附图

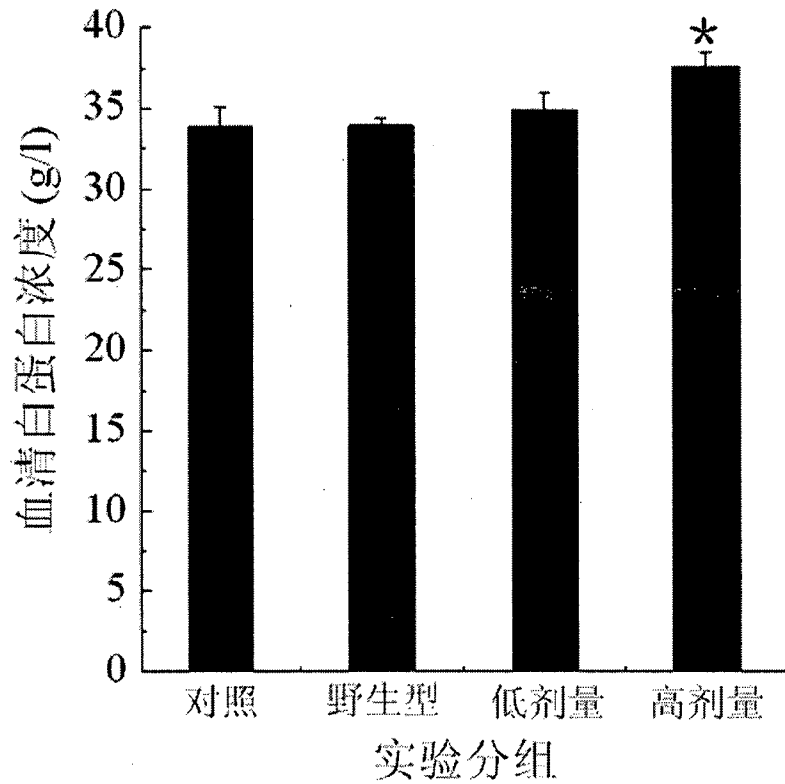


图7

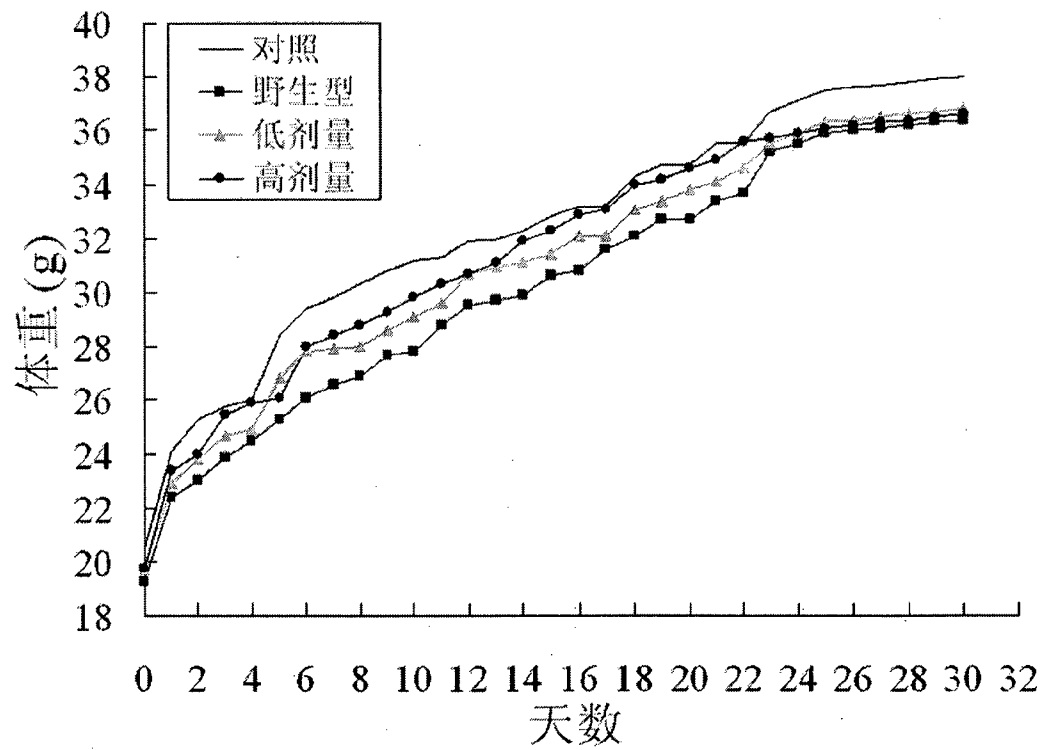


图8

替换页(细则第26条)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/084333**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See the extra sheet

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, A61K, A61P, 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)

Data bases: CPDABS, CNABS, CJFD, CSCI, SIPONPL, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED

Search terms: Bacillus subtilis, capsid protein, cotC, HAS, capsid, serum albumin, human, surface display

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 102181469 A (JIANGSU UNIVERSITY), 14 September 2011 (14.09.2011), see the whole document	1-7
PY	CN 102174557 A (JIANGSU UNIVERSITY), 07 September 2011 (07.09.2011), see claims 1-5	1-7
Y	CN 101475954 A (JIANGSU UNIVERSITY), 08 July 2009 (08.07.2009), see claims 1-4, and embodiment 1	1-7
Y	WO 0246388 A1 (CHOI, S. et al.), 13 June 2002 (13.06.2002), see abstract, and claims 1-42	1-7
Y	KIM, Junehyung et al., "Display of proteins on Bacillus subtilis endospores", CELL.MOL.LIFE SCI., 25 June 2009 (25.06.2009), vol. 66, no. 19, pages 3127-3136, ISSN: 1420-682X, see abstract	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 14 March 2012 (14.03.2012)	Date of mailing of the international search report 29 March 2012 (29.03.2012)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer YU, Na Telephone No.: (86-10) 62411084

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/084333

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHOU, Zhenwen et al., "Immunogenicity of recombinant Bacillus subtilis spores expressing Clonorchis sinensis tegumental protein", PARASITOLOGY RESEARCH, 09 October 2007 (09.10.2007), vol. 102, no. 2, pages 293-297, ISSN: 0932-0113, see Abstract, and Materials and methods	1-7
Y	SAUNDERS, C.W. et al., "Secretion of Human Serum Albumin from Bacillus subtilis", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 30 July 1987 (30.07.1987), vol. 169, no. 7, pages 2917-2925, ISSN: 0021-9193, see abstract	1-7
A	EP 0143836 A1 (PUBLIC HEALTH RES), 12 June 1985 (12.06.1985), see the whole document	1-7
A	XU, Xiaoman et al., Recent progress of the research on spore surface display, CHINESE JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 25 October 2010 (25.10.2010), vol. 26, no. 10, pages 1404-1409, ISSN: 1000-3061, see the whole document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2011/084333

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102181469 A	14.09.2011	None	
CN 102174557 A	07.09.2011	None	
CN 101475954 A	08.07.2009	CN 101475954 B	18.01.2012
WO 0246388 A1	13.06.2002	KR 20020045400 A	19.06.2002
		US 2004171065 A1	02.09.2004
		AU 1643102 A	18.06.2002
		US 7582426 B2	01.09.2009
		KR 20030065534 A	06.08.2003
		KR 522398 B	18.10.2005
EP 0143836 A1	12.06.1985	JP 60501340 T	22.08.1985
		AU 301168 A	04.12.1984
		US 4663280 A	05.05.1987
		WO 8404541 A1	22.11.1984

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/084333

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/75 (2006.01) i

C12N 1/21 (2006.01) i

A61K 38/38 (2006.01) i

A61P 32/00 (2006.01) i

C12R 1/125 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2011/084333

A. 主题的分类

参见附加页

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, A61K, A61P, 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))

数据库: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED,

检索词: 枯草芽孢杆菌, Bacillus subtilis, 衣壳蛋白, cotC, 血清白蛋白, 人, 表面展示, HAS, capsid, serum albumin, human, surface display

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
PX	CN102181469A (江苏大学), 14.9 月 2011(14.09.2011), 参见全文	1—7
PY	CN102174557A (江苏大学), 7.9 月 2011(07.09.2011), 参见权利要求 1-5	1—7
Y	CN101475954A (江苏大学), 8.7 月 2009(08.07.2009), 参见权利要求 1-4 和实施例 1	1—7
Y	WO0246388A1 (CHOI S 等), 13.6 月 2002(13.06.2002), 参见摘要和权利要求 1-42	1—7
Y	Junehyung Kim 等, “Display of proteins on Bacillus subtilis endospores”, Cell.Mol.Life Sci., 25.6 月 2009(25.06.2009), 第 66 卷, 第 19 期, 第 3127-3136 页, ISSN: 1420-682X, 参见摘要	1—7

☒ 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

“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

14.3 月 2012 (14.03.2012)

国际检索报告邮寄日期

29.3 月 2012 (29.03.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

于娜

电话号码: (86-10) **62411084**

C(续). 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	Zhenwen Zhou 等, “Immunogenicity of recombinant Bacillus subtilis spores expressing Clonorchis sinensis tegumental protein”, PARASITOLOGY RESEARCH, 9.10 月 2007(09.10.2007), 第 102 卷, 第 2 期, 第 293-297 页, ISSN: 0932-0113, 参见 Abstract 和 Materials and methods	1—7
Y	Charles W.Saunders 等, “Secretion of Human Serum Albumin from Bacillus subtilis”, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 30.7 月 1987(30.07.1987), 第 169 卷, 第 7 期, 第 2917-2925 页, ISSN: 0021-9193, 参见摘要	1—7
A	EP0143836A1 (PUBLIC HEALTH RES), 12.6 月 1985(12.06.1985), 参见全文	1—7
A	徐小曼等, 芽胞表面展示技术研究进展, 生物工程学报, 25.10 月 2010(25.10.2010), 第 26 卷, 第 10 期, 第 1404-1409 页, ISSN: 1000-3061, 参见全文	1—7

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/084333

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102181469A	14.09.2011	无	
CN102174557A	07.09.2011	无	
CN101475954A	08.07.2009	CN101475954B	18.01.2012
WO0246388A1	13.06.2002	KR20020045400A	19.06.2002
		US2004171065A1	02.09.2004
		AU1643102A	18.06.2002
		US7582426B2	01.09.2009
		KR20030065534A	06.08.2003
		KR522398B	18.10.2005
EP0143836A1	12.06.1985	JP60501340T	22.08.1985
		AU301168A	04.12.1984
		US4663280A	05.05.1987
		WO8404541A1	22.11.1984

A. 主题的分类

C12N 15/75 (2006.01) i

C12N 1/21 (2006.01) i

A61K 38/38 (2006.01) i

A61P 32/00 (2006.01) i

C12R 1/125 (2006.01) n