



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112334580 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 10

(21) 申请号 201980041310.9	(73) 专利权人 生物领先公司
(22) 申请日 2019.06.24	地址 韩国京畿道
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 112334580 A	(72) 发明人 朴永铁 全在原 朴洪圭 姜显俊 边世恩 朴光绪 奇大殷
(43) 申请公布日 2021.02.05	(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理 有限责任公司 11290
(30) 优先权数据 10-2018-0073345 2018.06.26 KR	专利代理师 洪俊梅 张淑珍
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.12.18	(51) Int.Cl. C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/KR2019/007592 2019.06.24	(56) 对比文件 KR 20080086161 A, 2008.09.25
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/004877 KO 2020.01.02	审查员 刘波

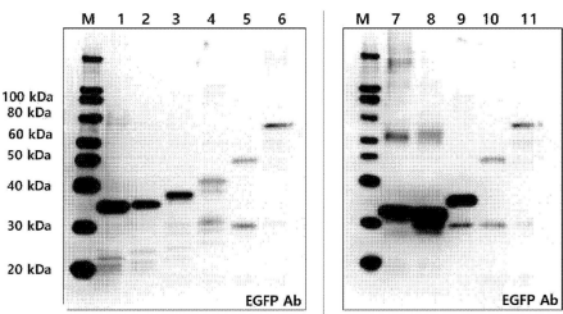
权利要求书1页 说明书17页
序列表7页 附图10页

(54) 发明名称

利用源自芽孢杆菌菌株的聚 γ -谷氨酸合成基因的 表面表达载体以及使用该载体在微生物表面表达蛋白的方法

(57) 摘要

本发明涉及具有用于编码聚 γ -谷氨酸合成酶的pgsA基因的 表面表达载体、以及通过使用该载体在微生物表面表达靶蛋白的方法。将其中添加有外源基因的载体转化微生物,并允许外源蛋白在微生物表面稳定表达。



1. 一种用于表达靶蛋白的表面表达载体,所述表面表达载体包含:编码聚 γ -谷氨酸合成酶复合物的pgsA基因;以及编码所述靶蛋白的基因,

其中,所述编码聚 γ -谷氨酸合成酶复合物的pgsA基因选自于由SEQ ID NO: 13-SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 24-SEQ ID NO: 26的核苷酸序列所组成的组。

2. 如权利要求1所述的表面表达载体,其中,在所述pgsA基因的末端插入接头,并且将编码所述靶蛋白的基因插入到所插入的接头中。

3. 如权利要求1所述的表面表达载体,其中,所述靶蛋白的氨基酸序列的一部分被移除或发生位点特异性突变,以有利于所述靶蛋白的表面表达。

4. 如权利要求1所述的表面表达载体,其中,所述核苷酸序列包含源自乳酸菌的醛缩酶启动子。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的表面表达载体,其中,将所述载体应用于革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌。

6. 一种转化有如权利要求1-5中任一项所述的表面表达载体的微生物。

7. 如权利要求6所述的微生物,其中,用于获得经转化的微生物的微生物是如下微生物:所述微生物经修饰以有利于靶蛋白的细胞表面表达,从而使所述微生物不产生参与所表达的靶蛋白的降解的细胞内或细胞外蛋白酶。

8. 如权利要求6或7所述的微生物,其中,所述微生物是乳酸菌。

9. 一种用于靶蛋白的细胞表面表达的方法,所述方法包括以下步骤:通过培养如权利要求6-8中任一项所述的经转化的微生物,使所述靶蛋白在细胞表面上表达;以及回收在其表面上表达有所述靶蛋白的细胞。

10. 如权利要求9所述的方法,其中,所述靶蛋白是选自于由如下所组成的组中的任一种:激素、激素类似物、酶、酶抑制剂、信号转导蛋白或其部分、抗体或其部分、单链抗体、结合蛋白、结合结构域、肽、抗原、黏附蛋白、结构蛋白、调节蛋白、毒素蛋白、细胞因子、转录调节因子、凝血因子和植物防御诱导蛋白。

11. 细胞在制备用于在人以外的脊椎动物中诱导体液免疫或细胞介导的免疫的药物中的用途,其中,所述细胞通过如权利要求9或10所述的方法产生,并在其表面上表达有抗原。

12. 一种在革兰氏阴性宿主细胞或革兰氏阳性宿主细胞的表面上表达靶蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 通过将编码靶蛋白的基因插入如权利要求1-5中任一项所述的表面表达载体来构建重组载体;

(b) 用所述重组载体转化所述革兰氏阴性宿主细胞或革兰氏阳性宿主细胞;以及

(c) 通过培养所述经转化的宿主细胞以在所述宿主细胞的表面上表达所述靶蛋白。

利用源自芽孢杆菌菌株的聚 γ -谷氨酸合成基因的表面表达载体以及使用该载体在微生物表面表达蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用外膜蛋白 (pgsA) 在微生物表面表达外源蛋白的新载体,所述外膜蛋白 (pgsA) 源自 *Bacillus* sp. 菌株并参与聚 γ -谷氨酸的合成。此外,本发明涉及通过利用外膜蛋白在微生物表面上表达外源蛋白来生产蛋白的方法,所述外膜蛋白源自 *Bacillus* sp. 菌株并参与聚 γ -谷氨酸的合成。

背景技术

[0002] 细胞表面展示是指将蛋白质或肽与适当的锚定基序 (anchoring motif) 融合并在革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌、真菌、酵母或动物细胞的表面上表达的技术 (Lee S.Y. 等, Trends Biotechnol., 21:4552, 2003)。根据1980年代开发的第一种细胞表面展示技术,使用具有相对简单表面的噬菌体,将肽或小蛋白与丝状噬菌体的 pIII 融合,并在噬菌体表面上表达。因此,细胞表面展示技术被称为表面表达系统。将使用噬菌体的细胞表面展示用于抗体的抗体筛选或者表位、高亲和力配体等的筛选,但是局限在于可在噬菌体表面上表达的蛋白质的大小相对有限。因此,作为其替代,已经开发出使用细菌的细胞表面表达。这是利用微生物 (例如细菌或真菌) 的表面蛋白作为表面锚定基序在微生物表面稳定表达外源蛋白的领域。

[0003] 为了利用特定有机体的外膜蛋白在细胞表面表达外源蛋白,应通过将合适的表面蛋白和外源蛋白在基因水平上彼此连接来生物合成融合蛋白,并且它们应稳定地穿过内膜,并应保持锚定在细胞表面上。为此,优选使用具有以下性质的蛋白质作为表面锚定基序:首先,该蛋白质应在其N端具有能够穿过内膜的分泌信号;第二,该蛋白质应具有可稳定地锚定至外膜表面的靶向信号;第三,该蛋白质应在不对细胞生长产生不利影响的范围内在细胞表面上大量表达,以便使该蛋白质能够表现出高活性;最后,该蛋白质无论其大小都应稳定表达,以便使其可用于各种反应 (Georgiou等, TIBTECH, 11:6, 1993)。该表面锚定基序需要进行基因工程化,以将其插入宿主细胞表面上的外膜蛋白的N端或C端或者以将其插入该蛋白的中心 (Lee等, TIBTECH, 21:45, 2003)。

[0004] 为了使蛋白质在细菌表面上表达,能够使在细胞中生物合成的蛋白质穿过细胞膜的分泌信号应位于蛋白质的一级序列上。另外,在革兰氏阴性细菌的情况下,蛋白质应穿过内膜和周质空间,并应被插入和锚定至外膜,以便从膜上突出。

[0005] 在细菌的情况下,具有这种分泌信号以及可稳定地锚定至细胞表面的靶向信号的蛋白质的实例包括表面蛋白、特殊的酶、毒素蛋白等。事实上,如果将这些蛋白质的分泌信号和靶向信号与适当的启动子一起使用,则可在细菌表面成功表达蛋白质。

[0006] 用于外源蛋白的表面表达的细菌表面蛋白可大致分为四种类型:细胞外膜蛋白、脂蛋白、分泌蛋白和细胞表面蛋白。至今,已尝试使用主要存在于革兰氏阴性细菌中的表面蛋白 (例如 LamB、PhoE、OmpA 等) 在细菌表面表达必需的外源蛋白。当使用这些蛋白质时,将外源蛋白插入到细胞表面上的突出环 (protruding loop) 中,因此从结构上来讲可插入的

蛋白质的大小受到限制。另外,由于待插入的外源蛋白的C端和N端应在空间上彼此靠近,因此存在当C端和N端之间的距离远时要通过接头肽使两个末端彼此靠近的问题。

[0007] 事实上,当利用LamB或PhoE来插入由50个-60个以上氨基酸或更多个氨基酸组成的外源多肽时,由于结构限制导致未形成稳定的膜蛋白[Charbit等,J.Immunol.,139:1658-1664(1987);Agterberg等,Vaccine,8:85-91(1990)]。尽管也存在利用OmpA将外源蛋白插入突出环中的情况,但是为了克服结构限制,仅使用含有能够锚定至外膜的最小靶向信号的OmpA片段。作为该方法,存在将 β -内酰胺酶与OmpA靶向信号的C端连接并在细胞表面表达的情况。

[0008] 另外,近年来,尝试了利用源自Pseudomonas sp.的冰核蛋白(ice-nucleation protein,INP)作为革兰氏阴性细菌的外膜蛋白进行表面表达[Jung等,Nat.Biotechnol,16:576-560(1998);Jung等,Enzyme Microb.Technol,22(5):348-354(1998);Lee等,Nat.Biotechnol,18:645-648(2000)]。Jung等将果聚糖蔗糖酶(levansucrase)融合至由N端、中间重复区域和C端组成的冰核蛋白的C端,还将羧甲基纤维素酶融合至其中中间重复区域被删除进而由N端和C端组成的冰核蛋白的C端,使每种酶进行表面表达,并分析每种酶的活性。此外, Lee等将乙型肝炎病毒表面抗原和丙型肝炎病毒核心抗原融合到冰核蛋白(所述冰核蛋白由N端或者N端和C端构成)的各个末端,在伤寒沙门氏菌Ty21a菌株的表面表达这些抗原,然后证实这些抗原可用作复杂的活疫苗。

[0009] 脂蛋白也是被用来表面表达的表面蛋白。特别地,大肠杆菌(E.coli)脂蛋白在N端具有分泌信号并且可穿过内膜,并且位于其末端的L-半胱氨酸直接共价连接至外膜脂质或内膜脂质。主要的脂蛋白Lpp在N端与外膜结合,并在C端与细胞膜(肽聚糖(PG))结合,因此当它与外膜蛋白OmpA片段连接时,外源蛋白可被分泌到外膜并在表面表达[Francisco等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,489:2713-2717(1992)]。利用脂蛋白的这种性质,将另一脂蛋白TraT用于对肽(例如脊髓灰质炎病毒的C3表位)进行表面表达[Felici等,J.Mol.Biol.,222:301-310(1991)]。另外,还将肽聚糖相关脂蛋白(peptidoglycan-associated lipoprotein,PAL,其确切功能尚不明确)用于重组抗体表面表达[Fuchs等,Bio/Technology,9:1369-1372(1991)]。在这种情况下,将PAL的C端连接至细胞壁,并将其N端连接至重组抗体,由此对融合蛋白进行表面表达。

[0010] 也可将穿过外膜的分泌蛋白用作表面蛋白。然而,在革兰氏阴性细菌的情况下,分泌蛋白并不发达,并且只有在存在参与分泌蛋白的特殊分泌机制的蛋白的情况下才有一些分泌蛋白在其帮助下穿过外膜。例如,Klebsiella sp.普鲁兰酶是一种脂蛋白,其N端通过被脂质取代而锚定至外膜,然后被完全分泌到细胞培养介质中。Kornacker等使用普鲁兰酶的N端片段将 β -内酰胺酶在细胞表面表达,但缺点是所表达的普鲁兰酶/ β -内酰胺酶融合蛋白被临时锚定至细胞表面,然后被释放到细胞培养介质中。另外,当利用普鲁兰酶的N端片段表达周质空间碱性磷酸酶时,由于至少14种蛋白质参与了碱性磷酸酶的分泌,因此不能稳定地在表面表达该酶[Kornacker等,Mol.Microb.,4:1101-1109(1990)]。

[0011] 源自具有独特分泌系统的致病微生物奈瑟氏菌(Neisseria)的IgA蛋白酶具有允许C端的片段和N端的蛋白酶锚定至外膜的信号。一旦该蛋白酶到达外膜并从细胞表面突出,就通过其水解能力分泌到细胞培养介质中。Klauser等利用该IgA蛋白酶片段使约12kDa的霍乱毒素B亚基在细胞表面稳定表达[Klauser等,EMBO J.,9:1991-1999(1990)]。然而,

在分泌过程中,融合蛋白的分泌被周质空间中发生的蛋白折叠所抑制。

[0012] 另外,在革兰氏阴性细菌的情况下,存在于细胞表面并且可用于表面表达的细胞器包括鞭毛(flagella)、菌毛(pili)和伞毛(fimbriae)。使用鞭毛蛋白(Flagellin,其为鞭毛的组成亚基)稳定地表达了源自乙型肝炎病毒的肽和霍乱毒素B亚基,并且它们与针对它们的抗体强烈反应[Newton等,Science,244:70-72(1989)]。作为尝试利用fimbriin(看起来像线的伞毛的组成蛋白)在细胞表面表达外源肽的结果,仅成功表达了小肽[Hedegaard等,Gene,85:115-124(1989)]。

[0013] 除了如上所述利用革兰氏阴性细菌的表面蛋白所尝试的表面表达之外,最近还尝试了利用革兰氏阳性细菌的表面蛋白进行表面表达[Samuelson等,J.Bacteriol.,177:1470-1476(1995)]。即使在这种情况下,仍需要能够穿过内膜的分泌信号以及锚定至细胞膜的表面锚定基序。事实上,存在如下情况:利用猪葡萄球菌(*Staphylococcus hyicus*)脂肪酶作为分泌信号以及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白A作为膜锚定基序,在革兰氏阳性细菌的表面上有效地表达了由80个氨基酸组成的疟疾血期抗原(malaria blood stage antigen)以及源自链球菌(*Streptococcus*)蛋白G的白蛋白黏附蛋白。

[0014] 通过上述关于在革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌的表面上进行表达的研究,已经开发出许多有用的蛋白表达系统,并已在美国、欧洲、日本等申请了专利保护。其中,特别地,发现了5个案件使用革兰氏阴性细菌的外膜蛋白(W09504069、W09324636、W09310214、EP603672和US5356797),一个案件使用细胞表面细胞器菌毛(W09410330),一个案件使用细胞表面脂蛋白(W09504079)。

[0015] 如上所述,为了利用细菌外膜蛋白在细胞表面表达外源蛋白,应在基因水平上将适当的外膜蛋白和外源蛋白连接在一起以诱导生物合成融合蛋白,并且它们应稳定地穿过内膜并应保持锚定在外膜上。然而,尚未开发出满足所有上述条件的表面锚定基序,并且到目前为止的水平还处于补救上述情况的缺点。

[0016] 在这种背景下,本发明人对使用源自*Bacillus* sp.菌株的聚 γ -谷氨酸合成酶基因(pgsA)作为新的表面锚定基序进行了研究,并因此开发出使用pgsA基因在微生物表面上有效表达外源蛋白的新载体,以及在微生物表面上表达大量外源蛋白的方法,从而完成了本发明。

发明内容

[0017] 技术问题

[0018] 本发明的目的是,作为能够在微生物表面上表达大量外源蛋白的表面锚定基序,选择源自*Bacillus* sp.菌株并参与聚 γ -谷氨酸的合成外膜蛋白,构建用于表达靶蛋白的表面表达载体(该载体能够利用表面锚定基序在微生物表面上表达外源蛋白或肽),并提供在转化有该表面表达载体的各种转化体的表面上高效表达外源蛋白的方法。

[0019] 技术方案

[0020] 为了实现上述目的,本发明提供了用于表达靶蛋白的表面表达载体,所述表面表达载体包含:编码聚 γ -谷氨酸合成酶复合物的pgsA基因;以及编码所述靶蛋白的基因。

[0021] 在本发明中,pgsA基因可源自产生聚 γ -谷氨酸的*Bacillus* sp.菌株。

[0022] 在本发明中,所述编码聚 γ -谷氨酸合成酶复合物的pgsA基因可具有SEQ ID NO:

13-SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:24-SEQ ID NO:26中任一项的核苷酸序列。优选地,所述编码聚 γ -谷氨酸合成酶复合物的pgsA基因可具有SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:24-SEQ ID NO:26中任一项的核苷酸序列。

[0023] 在本发明中,可在所述pgsA基因的末端插入接头,并且可将编码所述靶蛋白的基因插入到所插入的接头中。

[0024] 在本发明中,可对所述靶蛋白的氨基酸序列的一部分进行移除或位点特异性突变,以有利于所述靶蛋白的表面表达。

[0025] 在本发明中,启动子可为源自乳酸菌的醛缩酶启动子。

[0026] 本发明还提供了转化有所述表面表达载体的微生物。在本发明中,用于转化的微生物可以是如下微生物:所述微生物经修饰以有利于靶蛋白的细胞表面表达,从而使其不产生参与所表达的靶蛋白的降解的细胞内或细胞外蛋白酶。

[0027] 在本发明中,用作宿主的微生物可以是乳酸菌。乳酸菌可包括*Lactobacillus* sp.、*Streptococcus* sp.和*Bifidobacterium* sp.。通常,*Lactobacillus* sp.包括嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus*)、干酪乳杆菌(*L.casei*)、植物乳杆菌(*L.plantarum*)、发酵乳杆菌(*L.fermentum*)、德氏乳杆菌(*L.delbrueckii*)、约氏乳杆菌LJI(*L.johnsonii* LJI)、罗伊氏乳杆菌(*L.reuteri*)和保加利亚乳杆菌(*L.bulgaricus*);*Streptococcus* sp.包括嗜热链球菌(*S.thermophilus*);以及,*Bifidobacterium* sp.包括婴儿双歧杆菌(*B.infantis*)、两歧双歧杆菌(*B.bifidum*)、长双歧杆菌(*B.longum*)、*B.psuedolongum*、短双歧杆菌(*B.breve*)、乳双歧杆菌Bb-12(*B.lactis* Bb-12)和青春双歧杆菌(*B.adolescentis*)。更优选地,所述微生物是*Lactobacillus* sp.。

[0028] 本发明还提供了用于靶蛋白的细胞表面表达的方法,所述方法包括以下步骤:通过培养经转化的微生物,使所述靶蛋白在细胞表面上表达;以及回收在其表面上表达有所述靶蛋白的细胞。

[0029] 在本发明中,所述靶蛋白可以是选自于由如下所组成的组中的任一种:激素、激素类似物、酶、酶抑制剂、信号转导蛋白或其部分、抗体或其部分、单链抗体、结合蛋白、结合结构域、肽、抗原、黏附蛋白、结构蛋白、调节蛋白、毒素蛋白、细胞因子、转录调节因子、凝血因子和植物防御诱导蛋白。

[0030] 本发明还提供了通过向人以外的脊椎动物给予细胞来诱导体液免疫或细胞介导的免疫的方法,所述细胞由上述方法产生并在其表面上表达有抗原。

[0031] 本发明还提供了用于在人以外的脊椎动物中产生抗体的方法,所述方法包括:通过向所述脊椎动物给予由上述方法产生并在其表面上表达有抗原的细胞来诱导免疫应答;以及回收通过免疫应答产生的抗体。

[0032] 本发明还提供了用于表达靶蛋白的表面表达载体,其中,将所述载体应用于革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌。

[0033] 本发明还提供了在革兰氏阴性宿主细胞或革兰氏阳性宿主细胞的表面表达靶蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 通过将编码所述靶蛋白的基因插入如权利要求14所述的用于微生物表面表达的载体来构建重组载体;(b) 用所述重组载体转化所述革兰氏阴性宿主细胞或革兰氏阳性宿主细胞;以及(c) 通过对经转化的宿主细胞进行培养以在所述宿主细胞的表面上表达所述靶蛋白。

[0034] 有益效果

[0035] 根据本发明的用于靶蛋白表达的表面表达载体可稳定地表达靶蛋白。另外,根据本发明的表面表达载体可组成性地表达靶蛋白,并且同时可通过在重组微生物的表面上表达而有效地用于产生疫苗生产所必需的抗原。

附图说明

[0036] 图1示出了根据本发明的表面表达载体pKV-Pald-PgsA-EGFP的遗传图谱,其使用干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)作为宿主。

[0037] 图2示出了根据本发明的表面表达载体pKV-Pald-pgsA1 (PgsA基序第1-60位a.a-EGFP)的遗传图谱,其使用干酪乳杆菌作为宿主。

[0038] 图3示出了根据本发明的表面表达载体pKV-Pald-pgsA2 (PgsA基序第1-70位a.a-EGFP)的遗传图谱,其使用干酪乳杆菌作为宿主。

[0039] 图4示出了根据本发明的表面表达载体pKV-Pald-pgsA3 (PgsA基序第1-80位a.a-EGFP)的遗传图谱,其使用干酪乳杆菌作为宿主。

[0040] 图5示出了根据本发明的表面表达载体pKV-Pald-pgsA5 (PgsA基序第1-100位a.a-EGFP)的遗传图谱,其使用干酪乳杆菌作为宿主。

[0041] 图6示出了根据本发明的表面表达载体pKV-Pald-pgsA5 (pKV-PgsA第1-188位a.a-EGFP)的遗传图谱,其使用干酪乳杆菌作为宿主。

[0042] 图7示出了根据本发明的表面表达载体pKV-Pald-pgsA6 (PgsA基序第25-60位a.a-EGFP)的遗传图谱,其使用干酪乳杆菌作为宿主。

[0043] 图8示出了根据本发明的表面表达载体pKV-Pald-pgsA7 (PgsA基序第25-70位a.a-EGFP)的遗传图谱,其使用干酪乳杆菌作为宿主。

[0044] 图9示出了根据本发明的表面表达载体pKV-Pald-pgsA8 (PgsA基序第25-100位a.a-EGFP)的遗传图谱,其使用干酪乳杆菌作为宿主。

[0045] 图10描绘了蛋白质印迹图像,所述蛋白质印迹图像示出了转化有本发明的表面表达载体pKV-Pald-pgsA1至pKV-Pald-pgsA8中的每一种的干酪乳杆菌上的EGFP蛋白表面表达。

具体实施方式

[0046] 本发明的最佳实施方式

[0047] 对实施例1中构建的表面表达载体 (pKV-Pald-PgsA-EGFP) 进行了改进,以获得能够在乳酸菌宿主中更稳定地表现出高表达率的PgsA基因片段。

[0048] 首先,为了获得各自包含PgsA片段中的第1-60位a.a、第1-70位a.a、第1-80位a.a、第1-100位a.a和第1-188位a.a的PgsA片段,使用表面表达载体 (pKV-Pald-PgsA-EGFP) 作为模板以及引物SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:12进行PCR。

[0049] 结果,获得了包含醛缩酶启动子并包含各个PgsA基序片段的DNA片段。每个DNA片段在5'末端含有SphI限制性酶位点,并在3'末端含有BamHI限制性酶位点。将所获得的DNA片段用SphI和BamHI处理。另外,证实了PgsA1至PgsA5基序片段分别具有核苷酸序列SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:17。

[0050] 同时,为了获得包含PgsA片段中的第25-60位a.a、第25-70位a.a和第25-100位a.a的PgsA片段,使用表面表达载体(pKV-Pald-PgsA-EGFP)作为模板以及引物SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:23进行PCR。

[0051] 结果,获得了包含各个PgsA基序片段的DNA片段。每个DNA片段在5'末端含有EcoRV限制性酶位点,并在3'末端含有BamHI限制性酶位点。将所获得的DNA片段用EcoRV和BamHI处理以获得片段。另外,证实了PgsA基序片段分别具有核苷酸序列SEQ ID NO:24-SEQ ID NO:26。

[0052] 本发明的实施方式

[0053] 本发明的目的是,作为能够在微生物表面上表达大量外源蛋白的表面锚定基序,选择源自Bacillus sp.菌株并参与聚 γ -谷氨酸的合成外膜蛋白,构建用于表达靶蛋白的表面表达载体(该载体能够利用所述表面锚定基序在微生物表面上表达外源蛋白或肽),并提供在转化有所述表面表达载体的各种转化体的表面上高效表达外源蛋白的方法。

[0054] 为了实现上述目的,本发明提供了包含编码聚 γ -谷氨酸合成酶复合物的pgsA基因的微生物表面表达载体,以及转化有所述载体的菌株。

[0055] 为了上述目的,本发明还提供了使用微生物表面表达载体在经转化的菌株的表面上表达外源蛋白的方法。

[0056] 由pgsA基因编码的蛋白是Bacillus sp.中存在的外膜蛋白,并且是参与聚 γ -谷氨酸合成的蛋白,聚 γ -谷氨酸是一种具有可食用性、水溶性、阴离子型、可生物降解的聚合物,其来自枯草芽孢杆菌IF03336(Bacillus subtilis IF03336,纳豆芽孢杆菌(Bacillus natto);Biochem.Biophys.Research Comm.,263,6-12,1999)、地衣芽孢杆菌ATCC9945(Bacillus licheniformis ATCC9945;Biotech.Bioeng.57(4),430-437,1998)、炭疽杆菌(Bacillus anthracis;J.Bacteriology,171,722-730,1989)等。

[0057] 在枯草芽孢杆菌IF03336的情况下,从细菌分离的外膜蛋白是一种由总共922个氨基酸组成的蛋白,并由pgsB、pgsC和pgsA组成。此处,pgsB由393个氨基酸组成,pgsC由149个氨基酸组成,pgsA由380个氨基酸组成。Ashiuchi等克隆了源自枯草芽孢杆菌IF03336的聚 γ -谷氨酸合成酶基因,将该基因转化到大肠杆菌中,并在大肠杆菌中观测到了聚 γ -谷氨酸的合成[Ashiuchi等,Biochem.Biophys.Res.Communications,263:6-12(1999)]。

[0058] 然而,尚未阐明编码聚 γ -谷氨酸合成酶复合物的pgsA蛋白的具体作用和功能。在复合物的组成蛋白中,pgsB属于酰胺连接酶家族,pgsB的N端的特定氨基酸与细胞膜或细胞壁相互作用,pgsA在N端和C端具有特定的亲水性氨基酸序列。因此,据推测,pgsA具有分泌信号、靶向信号和锚定信号,其允许这些氨基酸序列在pgsB的帮助下穿过内膜。

[0059] 作为本发明人进行的研究的结果,已经发现,参与聚 γ -谷氨酸的合成外膜蛋白作为表面锚定基序具有许多优点,该表面锚定基序由于其一级氨基酸序列结构及特性使得外源蛋白得以在细胞表面表达。首先,参与聚 γ -谷氨酸的合成外膜蛋白可在细胞表面上大量表达,用于聚 γ -谷氨酸的合成和细胞外分泌。第二,即使在细胞周期的静止期,参与聚 γ -谷氨酸合成的所表达的外膜蛋白也保持稳定。第三,在结构上,特别是pgsA从细胞表面突出。第四,参与聚 γ -谷氨酸合成的外膜蛋白的优势在于,它来源于革兰氏阳性细菌的表面,并且可在各种革兰氏阳性细菌或革兰氏阳性细菌的表面稳定表达。

[0060] 本发明的目的是提供有用的载体,所述载体能够利用参与聚 γ -谷氨酸的合成的

外膜蛋白的特性而使外源蛋白得以在细菌表面上表达。特别是,根据本发明的用于表达靶蛋白的表面表达载体包含分泌信号和靶向信号,所述分泌信号和靶向信号源自参与聚 γ -谷氨酸的合成的外膜蛋白的一级序列。

[0061] 本发明的另一目的是提供使用基于参与聚 γ -谷氨酸合成的外膜蛋白的特性的表面表达载体在细菌表面上表达外源蛋白的方法。特别是,本发明提供了用于生产外源蛋白的方法,该方法通过利用参与聚 γ -谷氨酸合成的外膜蛋白在微生物表面上表达外源蛋白,使得外源蛋白能够被高效利用,而无需细胞裂解过程或蛋白分离/纯化过程。

[0062] 如本文所使用的,术语“靶蛋白”或“外源蛋白”是指正常情况下不会存在于表达该蛋白的经转化的宿主细胞中的蛋白。例如,当将乳酸菌人工工程化以表达病毒来源的蛋白或肿瘤来源的蛋白时,该蛋白被称为外源蛋白或靶蛋白。

[0063] 更具体地,靶蛋白的优选实例包括但不限于,源自感染性微生物的抗原、源自免疫疾病的抗原、或肿瘤来源的抗原,例如源自真菌病原体、细菌、寄生虫、肠寄生虫、病毒或变应原的抗原。更具体地,抗原的实例包括破伤风类毒素、流感病毒血凝素或核蛋白、白喉类毒素、HIV gp120或其片段、HIV gag蛋白、IgA蛋白酶、胰岛素肽B、*Spongospora subterranea*抗原、*vibriose*抗原、沙门氏菌 (*Salmonella*) 抗原、肺炎球菌抗原、RSV(呼吸道合胞病毒) 抗原、流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenza*) 外膜蛋白、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 抗原、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 脲酶、脑膜炎奈瑟氏菌菌毛蛋白 (*Neisseria meningitidis pilins*)、淋病奈瑟氏菌菌毛蛋白 (*N.gonorrhoeae pilins*)、黑素瘤相关抗原 (TRP2、MAGE-1、MAGE-3、gp100、酪氨酸酶、MART-1、HSP-70、 β -HCG)、人乳头状瘤病毒抗原(包括来自HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-35或HPV-45的E1、E2、E6和E7)、CEA肿瘤抗原、正常或突变型ras蛋白、正常或突变型p53、Muc1、pSA以及本领域众所周知的抗原,所述抗原源自霍乱、白喉、嗜血杆菌 (*Haemophilus*)、甲型肝炎、乙型肝炎、流感、麻疹、脑膜炎、腮腺炎、百日咳、天花、肺炎球菌性肺炎、小儿麻痹症、狂犬病、风疹、破伤风、结核病、艾迪生氏病 (Addison's disease)、免疫原、变应原、包括实体瘤和血源性肿瘤在内的癌症、获得性免疫缺陷综合征、以及与移植排斥(例如肾、心脏、胰、肺、骨骼和肝的移植排斥) 相关的因素、以及诱导自身免疫的抗原。

[0064] 因此,可通过本发明的表面表达方法产生的外源蛋白应用于各种应用。此类应用包括抗体和酶的有效生产,以及肽文库的生产,以用于筛选抗原、黏附蛋白或吸附蛋白以及新的生理活性物质。

[0065] 包含参与所有类型的聚 γ -谷氨酸的合成的基因(包括源自*Bacillus* sp.菌株并参与聚 γ -谷氨酸的合成的外膜蛋白)的表面表达载体均包括在本发明的范围内。

[0066] 另外,根据本发明的包含聚 γ -谷氨酸合成酶基因的表面表达载体可应用于所有菌株,以在微生物表面上表达外源蛋白。优选地,所述表面表达载体可应用于革兰氏阴性细菌,更优选大肠杆菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*)、牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*)、志贺氏菌 (*Shigella*);和革兰氏阳性细菌,优选芽孢杆菌 (*Bacillus*)、乳杆菌 (*Lactobacillus*)、乳球菌 (*Lactococcus*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 和 *Stratococcus* 菌株。使用上述菌株产生外源蛋白的所有方法均包括在本发明的范围内。

[0067] 如果需要,可将所有或一些限制性酶的多种识别位点插入聚- γ -谷氨酸合成酶基

因的N端或C端。其中插入这些限制性酶位点的表面表达载体均包括在本发明的范围内。

[0068] 具体地,本发明提供了表面表达载体pKV-Pald-pgsA1至pKV-Pald-pgsA8,所述表面表达载体包含源自*Bacillus* sp.菌株的聚 γ -谷氨酸合成酶基因pgsA,并通过将限制性酶识别位点克隆到pgsA的C端可将各种外源基因克隆到所述表面表达载体中。

[0069] 本发明提供了表面表达载体pKV-Pald-pgsA1至pKV-Pald-pgsA8,所述表面表达载体包含参与聚 γ -谷氨酸合成的外膜蛋白复合物中的外膜蛋白复合物pgsA,并且可通过将EGFP蛋白的N端与pgsA的C端连接,在革兰氏阳性细菌表面上以融合蛋白的形式表达EGFP蛋白。

[0070] 特别是,在本发明的一个实例中,参与聚 γ -谷氨酸合成的外膜蛋白基因pgsA从*Bacillus subtilis* var.*chungkookjang* (KCTC 0697BP)获得。然而,利用源自产生聚 γ -谷氨酸的任何*Bacillus* sp.菌株的pgsA基因来构建载体、或使用该载体来对外源基因进行表面表达也都将包括在本发明中。例如,利用源自其它菌株的pgsA基因(其与*Bacillus subtilis* var.*chungkookjang*中存在的pgsA基因的核苷酸序列具有80%或更高的同源性)来构建载体、或使用该载体来表面表达外源蛋白也都将包括在本发明的范围内。

[0071] 在本发明的另一实例中,为了检查蛋白是否在大肠杆菌细胞表面上有效表达,从模型蛋白中选择了增强型绿色荧光蛋白(EGFP)。“EGFP(增强型绿色荧光蛋白)基因”是通过在体内发射绿光而使得表达感兴趣的蛋白的细胞易于被观测的基因,并且有可在荧光显微镜下被观测到的优点。GFP是来源于水母(维多利亚多管发光水母,*Aequorea victoria*)的绿色荧光蛋白,并已在各个研究领域用作基因表达的重要标记物。EGFP是GFP的突变体,其中,原始GFP的第64位的氨基酸苯丙氨酸被亮氨酸取代,而第65位的氨基酸丝氨酸被苏氨酸取代。因此,EGFP具有比原始GFP发射更强的荧光信号的优点。

[0072] 本发明人通过以下过程获得蛋白:将EGFP基因插入到构建的重组载体pKV-Pald-pgsA1至pKV-Pald-pgsA8中以构建表面表达载体,用每种构建的表面表达载体转化干酪乳杆菌,通过培养以诱导表达,并收集一定量的培养介质。通过SDS-PAGE对所获得的蛋白质进行分析,并使用抗EGFP抗体对所获得的蛋白质进行蛋白质印迹。结果,证实了EGFP蛋白成功插入到构建的重组载体pKV-Pald-pgsA1至pKV-Pald-pgsA8中并在细胞表面上表达。

[0073] 另外,尽管在实例中将EGFP蛋白用作外源蛋白,也可将任何蛋白(诸如其它酶、抗原、抗体、黏附蛋白)用作外源蛋白。

[0074] 另外,在以下实施例中,构建了应用于革兰氏阳性细菌的表面表达载体,并将干酪乳杆菌用作宿主细胞;然而,对于本领域技术人员显而易见的是,除了干酪乳杆菌以外的任何革兰氏阳性细菌都可用作宿主细胞,并且除了革兰氏阳性细菌以外的任何革兰氏阴性细菌以及其它细菌都可用所述表面表达载体进行表达。

[0075] 在下文中,将参考实施例对本发明进行更详细地描述。对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施例仅是为了更详细地描述本发明,根据本发明的主题的本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0076] 实施例

[0077] 实施例1:表面表达载体pKV-Pald-pgsA-EGFP的构建

[0078] 为了构建EGFP表达载体,使用由pKV-Pald-PgsA-E7(参见韩国专利No.10-1471043)制备而来的表面表达载体将编码EGFP蛋白的基因插入PgsA的C端,从而获得可在

乳酸菌表面上表达的载体pKV-Pald-PgsA-EGFP。

[0079] 首先,从pKV-Pald-PgsA-E7载体中移除与pgsA融合的HPV16 E7基因,并将EGFP编码基因插入到该载体中。使用合成的EGFP基因片段作为模板以及引物SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2进行PCR。

[0080] SEQ ID NO 1: 5' TGGTGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG 3'

[0081] SEQ ID NO 2:

[0082] 5' TGACTCTAGAACTAGTGTGCGACGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCC 3'

[0083] 结果,获得了包含EGFP基因的755bp片段。该片段在5'末端包含BamHI限制性酶位点,并在3'末端包含XbaI限制性酶位点。将获得的DNA片段用BamHI和XbaI限制性酶处理以获得741bp片段。

[0084] 用BamHI和XbaI切割pKV-Pald-PgsA-E7,以移除HPV16 E7基因区域,从而获得载体片段。

[0085] 将用BamHI和XbaI切割的含E7基因的DNA片段与用相同限制性酶切割的载体连接,从而获得pKV-Pald-PgsA-EGFP(图1)。

[0086] 实施例2:表面表达载体PgsA基序的改进

[0087] 在该实施例中,对实施例1中构建的表面表达载体(pKV-Pald-PgsA-EGFP)进行了改进,以获得能够在乳酸菌宿主中更稳定地表现出高表达率的PgsA基因片段。

[0088] 首先,为了获得各自包含PgsA片段中的第1-60位a.a、第1-70位a.a、第1-80位a.a、第1-100位a.a和第1-188位a.a的PgsA片段,使用表面表达载体(pKV-Pald-PgsA-EGFP)作为模板以及以下引物进行PCR。

[0089] PgsA基序第1-60位a.a

[0090] SEQ ID NO 3:

[0091] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT 3'

[0092] SEQ ID NO 4:

[0093] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACC
TGAGAGTACGTCGTCAGAATACGTT 3'

[0094] PgsA基序第1-70位a.a

[0095] SEQ ID NO 5:

[0096] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT3'

[0097] SEQ ID NO 6:

[0098] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
CTCCCATCATAATATCGCCTACAAAT 3'

[0099] PgsA基序第1-80位a.a

[0100] SEQ ID NO 7:

[0101] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT3'

[0102] SEQ ID NO 8:

[0103] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
CTTTTTGCTCCGTTACTTTTTCAACA 3'

[0104] PgsA基序第1-100位a.a

[0105] SEQ ID NO 9:

[0106] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT3'

[0107] SEQ ID NO 10:

[0108] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
CTGCTACATAATCCGAGGCTCTAAAG 3'

[0109] PgsA基序第1-188位a.a

[0110] SEQ ID NO 11:

[0111] 5 TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT 3'

[0112] SEQ ID NO 12:

[0113] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
CGACTTTCTGGTACGAAATTTTCTTT 3'

[0114] 结果,获得了DNA片段,其包含醛缩酶启动子并包含各个PgsA基序片段。每个DNA片段在5'末端含有SphI限制性酶位点,并在3'末端含有BamHI限制性酶位点。将获得的DNA片段用SphI和BamHI处理。另外,证实了PgsA1至PgsA5基序片段分别具有以下核苷酸序列。

[0115] PgsA第1-60位a.a片段序列 (PgsA1)

[0116] SEQ ID NO 13:

[0117] 5'ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAA
CAGCAAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTT
TTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAG
GTCAAAACGTATTCTGACGACGTACTCTCA 3'

[0118] PgsA第1-70位a.a片段序列 (PgsA2)

[0119] SEQ ID NO 14:

[0120] 5'ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAA
CAGCAAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTT
TTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAG
GTCAAAACGTATTCTGACGACGTACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATT
ATGATGGGA 3'

[0121] PgsA第1-80位a.a片段序列 (PgsA3) SEQ ID NO 15:

5'ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAA
CAGCAAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTT
[0122] TTTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAG
GTCAAAACGTATTCTGACGACGTACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATT
ATGATGGGACGCTATGTTGAAAAAGTAACGGAGCAAAAA 3'

[0123] PgsA第1-100位a.a片段序列 (PgsA4)

[0124] SEQ ID NO 16:

5'ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAA
CAGCAAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTT
[0125] TTTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAG
GTCAAAACGTATTCTGACGACGTACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATT
ATGATGGGACGCTATGTTGAAAAAGTAACGGAGCAAAAAGGGGCAGACAG
TATTTTCAATATGTTGAACCGATCTTTAGAGCCTCGGATTATGTAGCA 3'

[0126] PgsA第1-188位a.a片段序列 (PgsA5)

[0127] SEQ ID NO 17:

5'ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAA
CAGCAAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTT
TTTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAG
GTCAAAACGTATTCTGACGACGTACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATT
ATGATGGGACGCTATGTTGAAAAAGTAACGGAGCAAAAAGGGGCAGACAG
TATTTTCAATATGTTGAACCGATCTTTAGAGCCTCGGATTATGTAGCAGGA
[0128] AACTTTGAAAACCCGGTAACCTATCAAAAGAATTATAACAAGCAGATAA
AGAGATTCATCTGCAGACGAATAAGGAATCAGTGAAAGTCTTGAAGGATA
TGAATTTACGGTTCTCAACAGCGCCAACAACCACGCAATGGATTACGGCG
TTCAGGGCATGAAAGATACGCTTGGAGAATTTGCGAAGCAAAACCTTGAT
ATCGTTGGAGCGGGATACAGCTTAAGTGATGCGAAAAAGAAAATTCGTA
CCAGAAAGTC 3'

[0129] 用SphI和BamHI切割pKV-Pald-PgsA-EGFP,从而获得去除了醛缩酶启动子和PgsA基因区域的载体片段。

[0130] 将用SphI和BamHI切割的DNA片段(含有醛缩酶启动子和各个PgsA基序片段基因)各自与经相同的限制性酶切割的载体连接,从而获得改进的载体(图2至图6)。

[0131] 同时,为了获得各自包含PgsA片段中的第25-60位a.a、第25-70位a.a和第25-100位a.a的PgsA片段,使用表面表达载体(pKV-Pald-PgsA-EGFP)作为模板以及以下引物进行PCR。

[0132] PgsA基序第25-60位a.a

[0133] SEQ ID NO 18:

[0134] 5' CGCTGGATATCTACATGCACGTATTTATTGCCATTCCG 3'

[0135] SEQ ID NO 19:

[0136] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
CTGAGAGTACGTCGTCAGAATACGTT 3'

[0137] PgsA基序第25-70位a.a

[0138] SEQ ID NO 20:

[0139] 5' CGCTGGATATCTACATGCACGTATTTATTGCCATTCCG 3'

[0140] SEQ ID NO 21:

[0141] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
CTCCCATCATAATATCGCCTACAAAT 3'

[0142] PgsA基序第25-100位a.a

[0143] SEQ ID NO 22:

[0144] 5' CGCTGGATATCTACATGCACGTATTTATTGCCATTCCG 3'

[0145] SEQ ID NO 23:

[0146] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
CTGCTACATAATCCGAGGCTCTAAAG 3'

[0147] 结果,获得了包含各个PgsA基序片段的DNA片段。每个DNA片段在5'末端含有EcoRV限制性酶位点,在3'末端含有BamHI限制性酶位点。将获得的DNA片段用EcoRV和BamHI处理以获得片段。另外,证实了PgsA基序片段具有以下核苷酸序列。

[0148] PgsA第25-60位a.a片段序列(PgsA6)

[0149] SEQ ID NO 24:

5'CACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTTTTGTCTTATGTTCGCTTTCATG
[0150] TGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGT
ACTCTCA 3'

[0151] PgsA第25-70位a.a片段序列(PgsA7)

[0152] SEQ ID NO 25:

5'CACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTTTTGTCTTATGTTCGCTTTCATG
[0153] TGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGT
ACTCTCAGCCTCATTGTAGGCGATATTATGATGGGA 3

[0154] PgsA第25-100位a.a片段序列(PgsA8)

[0155] SEQ ID NO 26:

5'CACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTTTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATG
TGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGT
[0156] ACTCTCAGCCTCATTGTAGGCGATATTATGATGGGACGCTATGTTGAAAA
AGTAACGGAGCAAAAAGGGGCAGACAGTATTTTCAATATGTTGAACCGA
TCTTTAGAGCCTCGGATTATGTAGCA 3'

[0157] 用EcoRV和BamHI切割pKV-Pald-PgsA-EGFP,从而获得去除了PgsA基因区域的载体片段。

[0158] 将用EcoRV和BamHI切割的包含有各个PgsA基序基因片段的DNA片段与经相同限制性酶切割的载体连接,从而获得改进的载体(图7至图9)。

[0159] 实施例3:在含有改进的PgsA基序表面表达载体的转化体中的表达分析

[0160] 在该实施例中,用实施例2中构建的各种改进的PgsA基序表面表达载体对干酪乳杆菌进行转化,对经转化的重组干酪乳杆菌进行培养,并分析其中的EGFP蛋白表达。检查在经转化的重组干酪乳杆菌中是否表达了与改进的pgsA1至pgsA8中的任一个融合的EGFP蛋白。

[0161] 将转化有各PgsA基序片段表面表达载体的重组干酪乳杆菌在30°C下在MRS培养介质(Lactobacillus MRS,Becton Dickinson and Company Sparks,USA)中静置培养,以诱导与聚 γ -谷氨酸合成酶基因片段pgsA1至pgsA8中任一个的C端融合的EGFP蛋白的表面表达。

[0162] 对培养的干酪乳杆菌的全细胞进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳以及使用针对EGFP的特异性抗体的蛋白质印迹,以确认融合蛋白的表达。

[0163] 具体地,在相同细胞浓度下,通过诱导经转化的干酪乳杆菌进行基因表达,并使获得的蛋白变性,来制备样品。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析样品,然后将蛋白级分转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜(Bio-Rad)。通过在封闭缓冲液(50mM Tris HCl,5%脱脂乳,pH 8.0)中摇动1小时,对其中转移有蛋白级分的PVDF膜进行封闭,然后用已在封闭缓冲液中稀释1000倍的兔源多克隆抗EGFP一抗进行孵育。孵育完成后,将膜用缓冲溶液洗涤,并用已在封闭缓冲液中稀释10000倍的HRP缀合的抗兔二抗孵育1小时。孵育完成后,将膜用缓冲溶液洗涤,通过加入底物(lumigen PS-3acridan,H₂O₂)使洗涤后的膜显色约2分钟,并用CCD照相机观测EGFP特异性抗体和融合蛋白之间的特异性结合(图10)。

[0164] 图10分别示出了:转化有重组表达载体pKV-Pald-pgsA的干酪乳杆菌中的表达模式(泳道6和泳道11),所述重组表达载体pKV-Pald-pgsA中插入有未经改进的pgsA作为对照以与本发明进行比较;以及,转化有重组表达载体pKV-Pald-pgsA1至pKV-Pald-pgsA8中每一种的干酪乳杆菌中的表达模式(泳道1至泳道5和泳道7至泳道10),所述重组表达载体pKV-Pald-pgsA1至pKV-Pald-pgsA8中插入有根据本发明的改进的pgsA1至pgsA8。

[0165] 具体地,在图10中,泳道1代表在转化有PgsA基序第1-60位a.a的重组干酪乳杆菌中的EGFP的表达;泳道2代表在转化有PgsA基序第1-70位a.a的重组干酪乳杆菌中的EGFP的表达;泳道3代表在转化有PgsA基序第1-80位a.a的重组干酪乳杆菌中的EGFP的表达;泳道4代表在转化有PgsA基序第1-100位a.a的重组干酪乳杆菌中的EGFP的表达。另外,泳道5代表在转化有PgsA基序第1-188位a.a的重组干酪乳杆菌中的EGFP的表达,泳道6代表在转化有

pKV-Pald-PgsA-EGFP的重组干酪乳杆菌中的蛋白表达。

[0166] 另外,在图10中,泳道7代表在转化有PgsA基序第25-60位a.a的重组干酪乳杆菌中的EGFP的表达;泳道8代表在转化有PgsA基序第25-70位a.a的重组干酪乳杆菌中的EGFP的表达;泳道9代表在转化有PgsA基序第25-100位a.a的重组干酪乳杆菌中的EGFP的表达。此外,泳道10代表在转化有PgsA基序第1-188位a.a的重组干酪乳杆菌中的EGFP的表达。泳道11代表在转化有pKV-Pald-PgsA-EGFP的重组干酪乳杆菌中的蛋白表达。

[0167] 证实了相比通过未改进的pKV-Pald-pgsA-EGFP表面表达载体进行的EGFP融合蛋白的表达,通过包含各种改进的PgsA基序片段的各种表面表达载体进行的EGFP融合蛋白的表达更强。

[0168] 工业实用性

[0169] 本发明涉及利用外膜蛋白 (pgsA) 在微生物表面有效表达外源蛋白的新载体,所述外膜蛋白 (pgsA) 源自Bacillus sp. 菌株并参与聚 γ -谷氨酸的合成。根据本发明的用于表达靶蛋白的表面表达载体可稳定地表达靶蛋白。另外,根据本发明的表面表达载体可组成性地表达靶蛋白,并且同时可通过在重组微生物的表面上表达,而有效地用于产生疫苗生产所必需的抗原。因此,所述表面表达载体有工业实用性。

[0170] 序列表自由文本

[0171] SEQ ID NO 1

[0172] 5' TGGTGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG 3'

[0173] SEQ ID NO 2

[0174] 5' TGACTCTAGAACTAGTGTCGACGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCC 3'

[0175] SEQ ID NO 3

[0176] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTGCT 3'

[0177] SEQ ID NO 4

[0178] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACC
TGAGAGTACGTCGTCAGAATACGTT 3'

[0179] SEQ ID NO 5

[0180] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTGCT3'

[0181] SEQ ID NO 6

[0182] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
CTCCCATCATAATATCGCCTACAAAT 3'

[0183] SEQ ID NO 7

[0184] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTGCT3'

[0185] SEQ ID NO 8

[0186] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
CTTTTGTCTCCGTTACTTTTCAACA 3'

[0187] SEQ ID NO 9

[0188] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTGCT3'

- [0189] SEQ ID NO 10
5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
[0190] CTGCTACATAATCCGAGGCTCTAAAG 3'
- [0191] SEQ ID NO 11
[0192] 5 TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT 3'
- [0193] SEQ ID NO 12
5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCAC
[0194] CGACTTTCTGGTACGAAATTTTCTTT 3'
- [0195] SEQ ID NO 13
5'ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAA
[0196] CAGCAAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTT
TTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAG
GTCAAAACGTATTCTGACGACGTACTCTCA 3'
- [0197] SEQ ID NO 14
5'ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAA
CAGCAAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTT
[0198] TTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAG
GTCAAAACGTATTCTGACGACGTACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATT
ATGATGGGA 3'
- [0199] SEQ ID NO 15
5'ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAA
CAGCAAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTT
[0200] TTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAG
GTCAAAACGTATTCTGACGACGTACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATT
ATGATGGGACGCTATGTTGAAAAAGTAACGGAGCAAAAA 3'
- [0201] SEQ ID NO 16
5'ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAA
CAGCAAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTT
[0202] TTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAG
GTCAAAACGTATTCTGACGACGTACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATT
ATGATGGGACGCTATGTTGAAAAAGTAACGGAGCAAAAAAGGGGCAGACAG
TATTTTCAATATGTTGAACCGATCTTTAGAGCCTCGGATTATGTAGCA 3'
- [0203] SEQ ID NO 17

- 5'ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAA
CAGCAAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTT
TTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAG
GTCAAAACGTATTCTGACGACGTACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATT
ATGATGGGACGCTATGTTGAAAAAGTAACGGAGCAAAAAGGGGCAGACAG
[0204] TATTTTCAATATGTTGAACCGATCTTTAGAGCCTCGGATTATGTAGCAGGA
AACTTTGAAAACCCGGTAACCTATCAAAAGAATTATAACAAGCAGATAA
AGAGATTCATCTGCAGACGAATAAGGAATCAGTGAAAGTCTTGAAGGATA
TGAATTTACGGTTCTCAACAGCGCCAACAACCACGCAATGGATTACGGCG
TTCAGGGCATGAAAGATACGCTTGGAGAATTTGCGAAGCAAAACCTTGAT
ATCGTTGGAGCGGGATACAGCTTAAGTGATGCGAAAAAGAAAATTCGT
CCAGAAAGTC 3'
- [0205] SEQ ID NO 18
- [0206] 5' CGCTGGATATCTACATGCACGTATTTATTGCCATTCCG 3'
- [0207] SEQ ID NO 19
- [0208] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCA
CTGAGAGTACGTCGTCAGAATACGTT 3'
- [0209] SEQ ID NO 20
- [0210] 5' CGCTGGATATCTACATGCACGTATTTATTGCCATTCCG 3'
- [0211] SEQ ID NO 21
- [0212] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCA
CTCCCATCATAATATCGCCTACAAAT 3'
- [0213] SEQ ID NO 22
- [0214] 5' CGCTGGATATCTACATGCACGTATTTATTGCCATTCCG 3'
- [0215] SEQ ID NO 23
- [0216] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCA
CTGCTACATAATCCGAGGCTCTAAAG 3'
- [0217] SEQ ID NO 24
- [0218] 5'CACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTTTTTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATG
TGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGT
ACTCTCA 3'
- [0219] SEQ ID NO 25
- [0220] 5'CACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTTTTTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATG
TGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGT
ACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATTATGATGGGA 3
- [0221] SEQ ID NO 26

5'CACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTTTTTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATG
TGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGT
[0222] ACTCTCAGCCTCATTGTAGGCGATATTATGATGGGACGCTATGTTGAAAA
AGTAACGGAGCAAAAAGGGGCAGACAGTATTTTTCAATATGTTGAACCGA
TCTTTAGAGCCTCGGATTATGTAGCA 3'

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	生物领先公司(Bioleaders Corporation)
[0003]	<120>	利用源自芽孢杆菌菌株的聚 γ -谷氨酸合成基因的表面表达载体以及使用该载体在微生物表面表达蛋白的方法
[0004]	<130>	PN18-0777-1-KR
[0005]	<140>	10-2018-0073394
[0006]	<141>	2018-06-26
[0007]	<160>	26
[0008]	<170>	KoPatentIn 3.0
[0009]	<210>	1
[0010]	<211>	31
[0011]	<212>	DNA
[0012]	<213>	人工序列
[0013]	<220>	
[0014]	<223>	PCR引物
[0015]	<400>	1
[0016]		tggtggatcc gtgagcaagg gcgaggagct g
		31
[0017]	<210>	2
[0018]	<211>	47
[0019]	<212>	DNA
[0020]	<213>	人工序列
[0021]	<220>	
[0022]	<223>	PCR引物
[0023]	<400>	2
[0024]		tgactctaga actagtgtcg acggtacctt acttgtagc ctcgtcc
		47
[0025]	<210>	3
[0026]	<211>	34
[0027]	<212>	DNA
[0028]	<213>	人工序列
[0029]	<220>	
[0030]	<223>	PCR引物
[0031]	<400>	3
[0032]		tcgagcatgc aatacccact tattgcgatt tgct
		34
[0033]	<210>	4
[0034]	<211>	74
[0035]	<212>	DNA
[0036]	<213>	人工序列
[0037]	<220>	

[0038]	<223>	PCR引物	
[0039]	<400>	4	
[0040]	tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gagagtacgt	60	
[0041]	cgtcagaata cggtt	74	
[0042]	<210>	5	
[0043]	<211>	34	
[0044]	<212>	DNA	
[0045]	<213>	人工序列	
[0046]	<220>		
[0047]	<223>	PCR引物	
[0048]	<400>	5	
[0049]	tcgagcatgc aatacccact tattgcgatt tgct	34	
[0050]	<210>	6	
[0051]	<211>	74	
[0052]	<212>	DNA	
[0053]	<213>	人工序列	
[0054]	<220>		
[0055]	<223>	PCR引物	
[0056]	<400>	6	
[0057]	tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct cccatcataa	60	
[0058]	tatgcctac aaat	74	
[0059]	<210>	7	
[0060]	<211>	34	
[0061]	<212>	DNA	
[0062]	<213>	人工序列	
[0063]	<220>		
[0064]	<223>	PCR引物	
[0065]	<400>	7	
[0066]	tcgagcatgc aatacccact tattgcgatt tgct	34	
[0067]	<210>	8	
[0068]	<211>	74	
[0069]	<212>	DNA	
[0070]	<213>	人工序列	
[0071]	<220>		
[0072]	<223>	PCR引物	
[0073]	<400>	8	
[0074]	tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct ttttgcctcg	60	
[0075]	ttactttttc aaca	74	
[0076]	<210>	9	

[0077]	<211>	34	
[0078]	<212>	DNA	
[0079]	<213>	人工序列	
[0080]	<220>		
[0081]	<223>	PCR引物	
[0082]	<400>	9	
[0083]	tcgagcatgc aatacccact tattgcgatt tgct		34
[0084]	<210>	10	
[0085]	<211>	74	
[0086]	<212>	DNA	
[0087]	<213>	人工序列	
[0088]	<220>		
[0089]	<223>	PCR引物	
[0090]	<400>	10	
[0091]	tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gctacataat		60
[0092]	ccgaggctct aaag		74
[0093]	<210>	11	
[0094]	<211>	34	
[0095]	<212>	DNA	
[0096]	<213>	人工序列	
[0097]	<220>		
[0098]	<223>	PCR引物	
[0099]	<400>	11	
[0100]	tcgagcatgc aatacccact tattgcgatt tgct		34
[0101]	<210>	12	
[0102]	<211>	74	
[0103]	<212>	DNA	
[0104]	<213>	人工序列	
[0105]	<220>		
[0106]	<223>	PCR引物	
[0107]	<400>	12	
[0108]	tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccaccg actttctggt		60
[0109]	acgaaatttt cttt		74
[0110]	<210>	13	
[0111]	<211>	180	
[0112]	<212>	DNA	
[0113]	<213>	人工序列	
[0114]	<220>		
[0115]	<223>	PgsA1	

[0116]	<400>	13	
[0117]	atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag	60	
[0118]	aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgacggttt ttgtccttat gttcgccttc	120	
[0119]	atgtgggcgg gaaaagcgga aacgccgaag gtcaaaacgt attctgacga cgtactctca	180	
[0120]		180	
[0121]	<210>	14	
[0122]	<211>	210	
[0123]	<212>	DNA	
[0124]	<213>	人工序列	
[0125]	<220>		
[0126]	<223>	PgsA2	
[0127]	<400>	14	
[0128]	atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag	60	
[0129]	aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgacggttt ttgtccttat gttcgccttc	120	
[0130]	atgtgggcgg gaaaagcgga aacgccgaag gtcaaaacgt attctgacga cgtactctca	180	
[0131]	gcctcatttg taggcgatat tatgatggga	210	
[0132]	<210>	15	
[0133]	<211>	240	
[0134]	<212>	DNA	
[0135]	<213>	人工序列	
[0136]	<220>		
[0137]	<223>	PgsA3	
[0138]	<400>	15	
[0139]	atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag	60	
[0140]	aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgacggttt ttgtccttat gttcgccttc	120	
[0141]	atgtgggcgg gaaaagcgga aacgccgaag gtcaaaacgt attctgacga cgtactctca	180	
[0142]	gcctcatttg taggcgatat tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa	240	
[0143]		240	
[0144]	<210>	16	
[0145]	<211>	300	
[0146]	<212>	DNA	
[0147]	<213>	人工序列	
[0148]	<220>		
[0149]	<223>	PgsA4	
[0150]	<400>	16	
[0151]	atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag	60	
[0152]	aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgacggttt ttgtccttat gttcgccttc	120	
[0153]	atgtgggcgg gaaaagcgga aacgccgaag gtcaaaacgt attctgacga cgtactctca	180	
[0154]	gcctcatttg taggcgatat tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa	240	

[0155]	ggggcagaca gtatTTTTca atatgttgaa ccgatcttta gagcctcgga ttatgtagca	300
[0156]		300
[0157]	<210>	17
[0158]	<211>	564
[0159]	<212>	DNA
[0160]	<213>	人工序列
[0161]	<220>	
[0162]	<223>	PgsA5
[0163]	<400>	17
[0164]	atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag	60
[0165]	aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcgttt ttgtccttat gttcgctttc	120
[0166]	atgtgggcgg gaaaagcgga aacgccgaag gtcaaaacgt attctgacga cgtactctca	180
[0167]	gcctcatttg taggcgatat tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa	240
[0168]	ggggcagaca gtatTTTTca atatgttgaa ccgatcttta gagcctcgga ttatgtagca	300
[0169]	ggaaactttg aaaacccggt aacctatcaa aagaattata aacaagcaga taaagagatt	360
[0170]	catctgcaga cgaataagga atcagtgaag gtcttgaagg atatgaattt cacggttctc	420
[0171]	aacagcgcca acaaccacgc aatggattac ggcgttcagg gcatgaaaga tacgcttgga	480
[0172]	gaatttgcca agcaaacct tgatatcggt ggagcgggat acagcttaag tgatgcgaaa	540
[0173]	aagaaaattt cgtaccagaa agtc	564
[0174]	<210>	18
[0175]	<211>	38
[0176]	<212>	DNA
[0177]	<213>	人工序列
[0178]	<220>	
[0179]	<223>	PCR引物
[0180]	<400>	18
[0181]	cgctggatat ctacatgcac gtatttattg ccattccg	38
[0182]	<210>	19
[0183]	<211>	74
[0184]	<212>	DNA
[0185]	<213>	人工序列
[0186]	<220>	
[0187]	<223>	PCR引物
[0188]	<400>	19
[0189]	tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gagagtacgt	60
[0190]	cgtcagaata cggt	74
[0191]	<210>	20
[0192]	<211>	38
[0193]	<212>	DNA

[0194]	<213>	人工序列	
[0195]	<220>		
[0196]	<223>	PCR引物	
[0197]	<400>	20	
[0198]		cgctggatat ctacatgcac gtattttattg ccattccg	38
[0199]	<210>	21	
[0200]	<211>	74	
[0201]	<212>	DNA	
[0202]	<213>	人工序列	
[0203]	<220>		
[0204]	<223>	PCR引物	
[0205]	<400>	21	
[0206]		tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct cccatcataa	60
[0207]		tatgcctac aaat	74
[0208]	<210>	22	
[0209]	<211>	38	
[0210]	<212>	DNA	
[0211]	<213>	人工序列	
[0212]	<220>		
[0213]	<223>	PCR引物	
[0214]	<400>	22	
[0215]		cgctggatat ctacatgcac gtattttattg ccattccg	38
[0216]	<210>	23	
[0217]	<211>	74	
[0218]	<212>	DNA	
[0219]	<213>	人工序列	
[0220]	<220>		
[0221]	<223>	PCR引物	
[0222]	<400>	23	
[0223]		tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gctacataat	60
[0224]		ccgaggctct aaag	74
[0225]	<210>	24	
[0226]	<211>	108	
[0227]	<212>	DNA	
[0228]	<213>	人工序列	
[0229]	<220>		
[0230]	<223>	PgsA6	
[0231]	<400>	24	
[0232]		cacgtattta ttgccattcc gatcgTTTT gtccttatgt tcgctttcat gtgggcggga	60

[0233]	aaagcggaaa cgccgaaggt caaaacgtat tctgacgacg tactctca	108
[0234]	<210> 25	
[0235]	<211> 138	
[0236]	<212> DNA	
[0237]	<213> 人工序列	
[0238]	<220>	
[0239]	<223> PgsA7	
[0240]	<400> 25	
[0241]	cacgtatttta ttgccattcc gatcgTTTT gtccttatgt tcgctttcat gtgggcggga	60
[0242]	aaagcggaaa cgccgaaggt caaaacgtat tctgacgacg tactctcagc ctcatttgta	120
[0243]	ggcgatatta tgatggga	138
[0244]	<210> 26	
[0245]	<211> 228	
[0246]	<212> DNA	
[0247]	<213> 人工序列	
[0248]	<220>	
[0249]	<223> PgsA8	
[0250]	<400> 26	
[0251]	cacgtatttta ttgccattcc gatcgTTTT gtccttatgt tcgctttcat gtgggcggga	60
[0252]	aaagcggaaa cgccgaaggt caaaacgtat tctgacgacg tactctcagc ctcatttgta	120
[0253]	ggcgatatta tgatgggacg ctatgttgaa aaagtaacgg agcaaaaagg ggcagacagt	180
[0254]	atTTTTcaat atgttgaacc gatctttaga gcctcggatt atgtagca	228

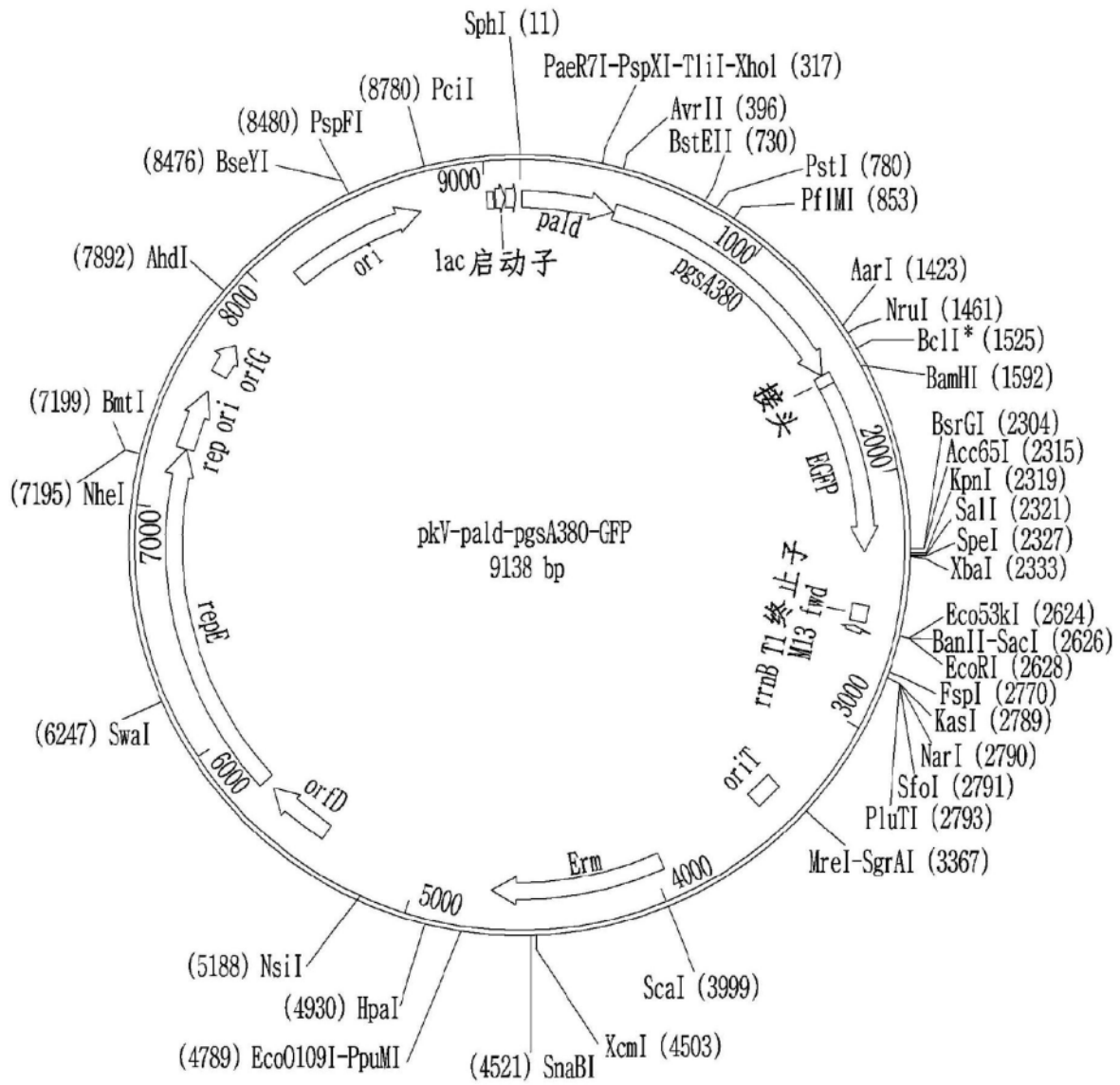


图1

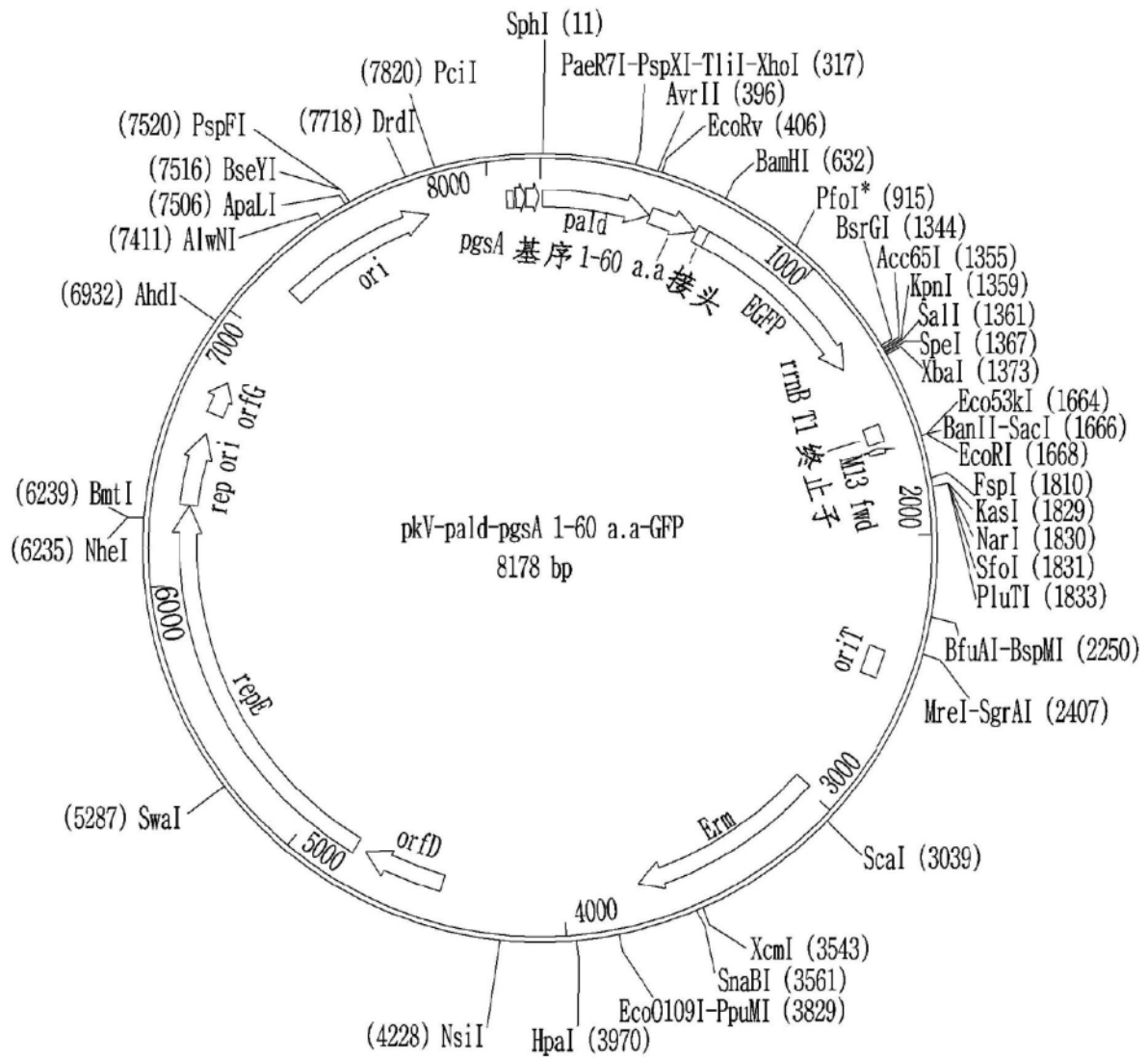


图2

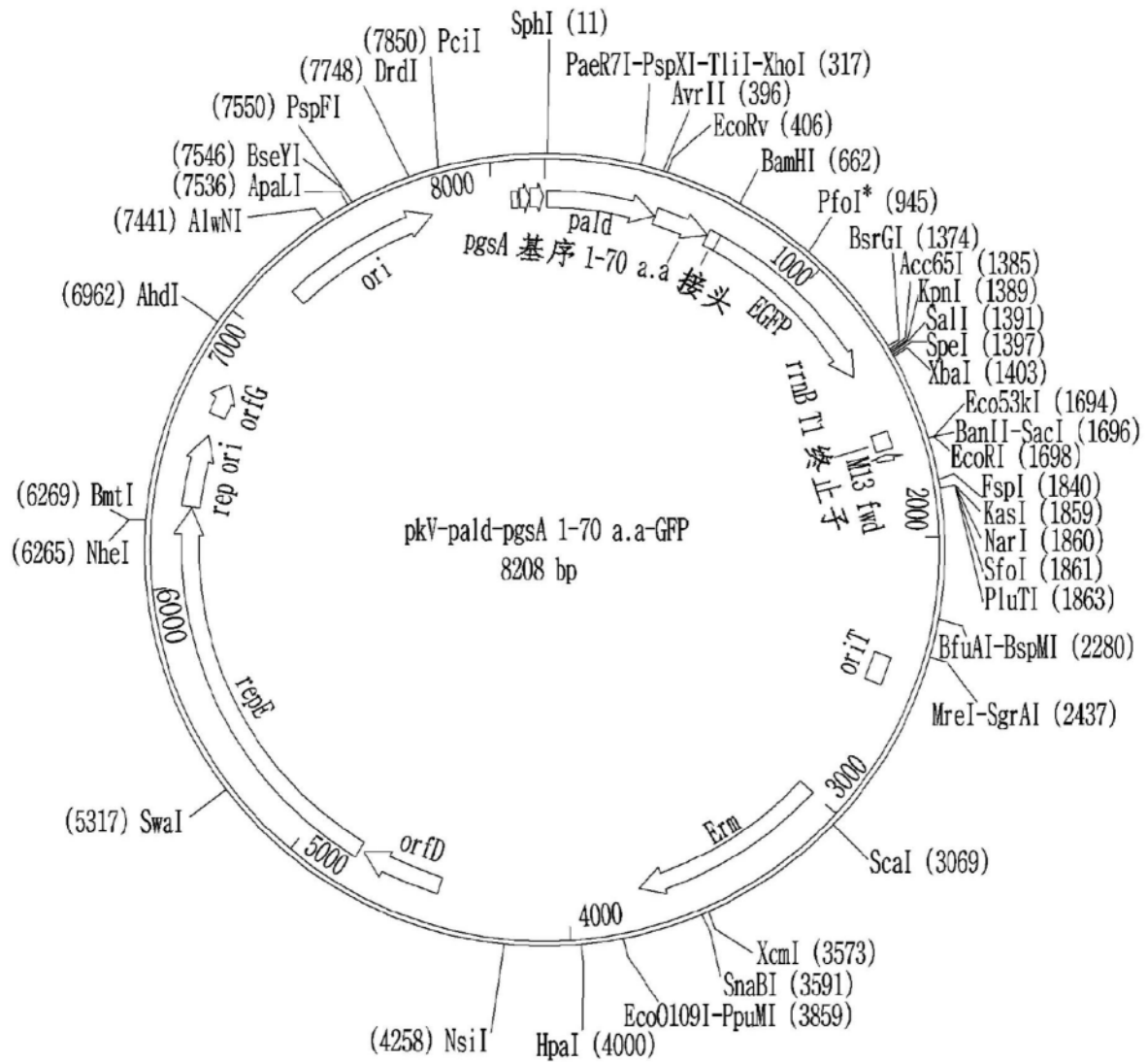


图3

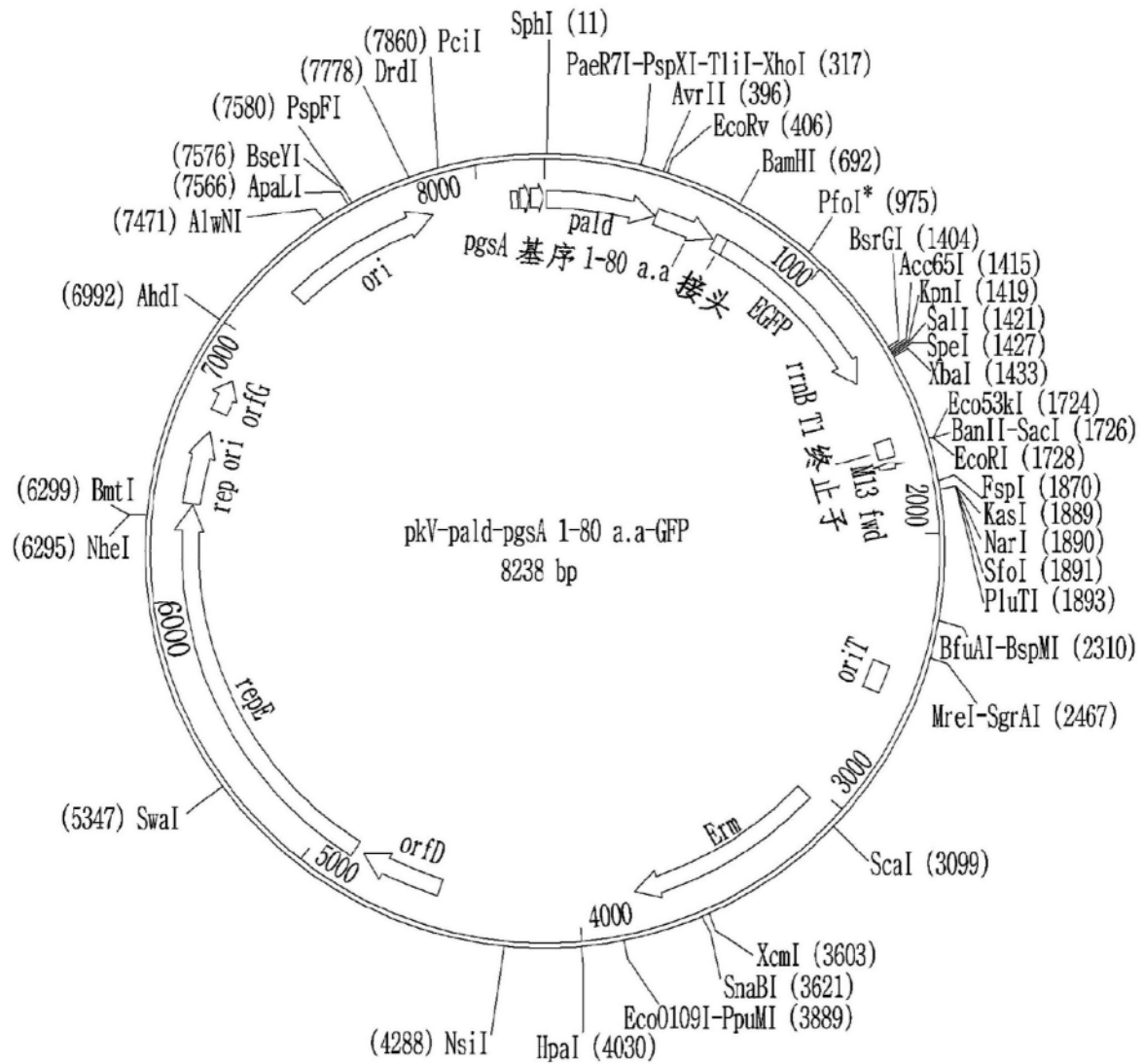


图4

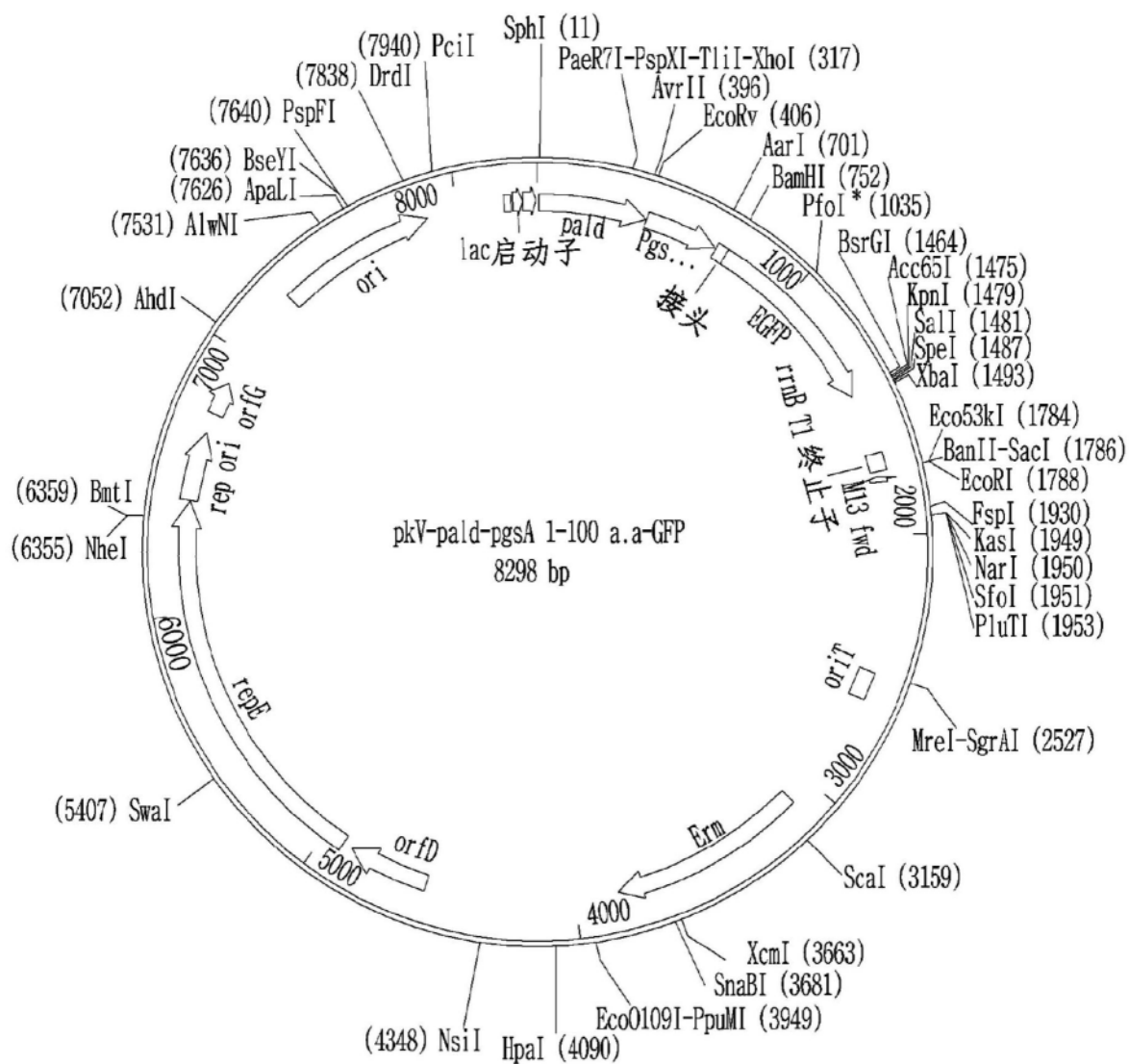


图5

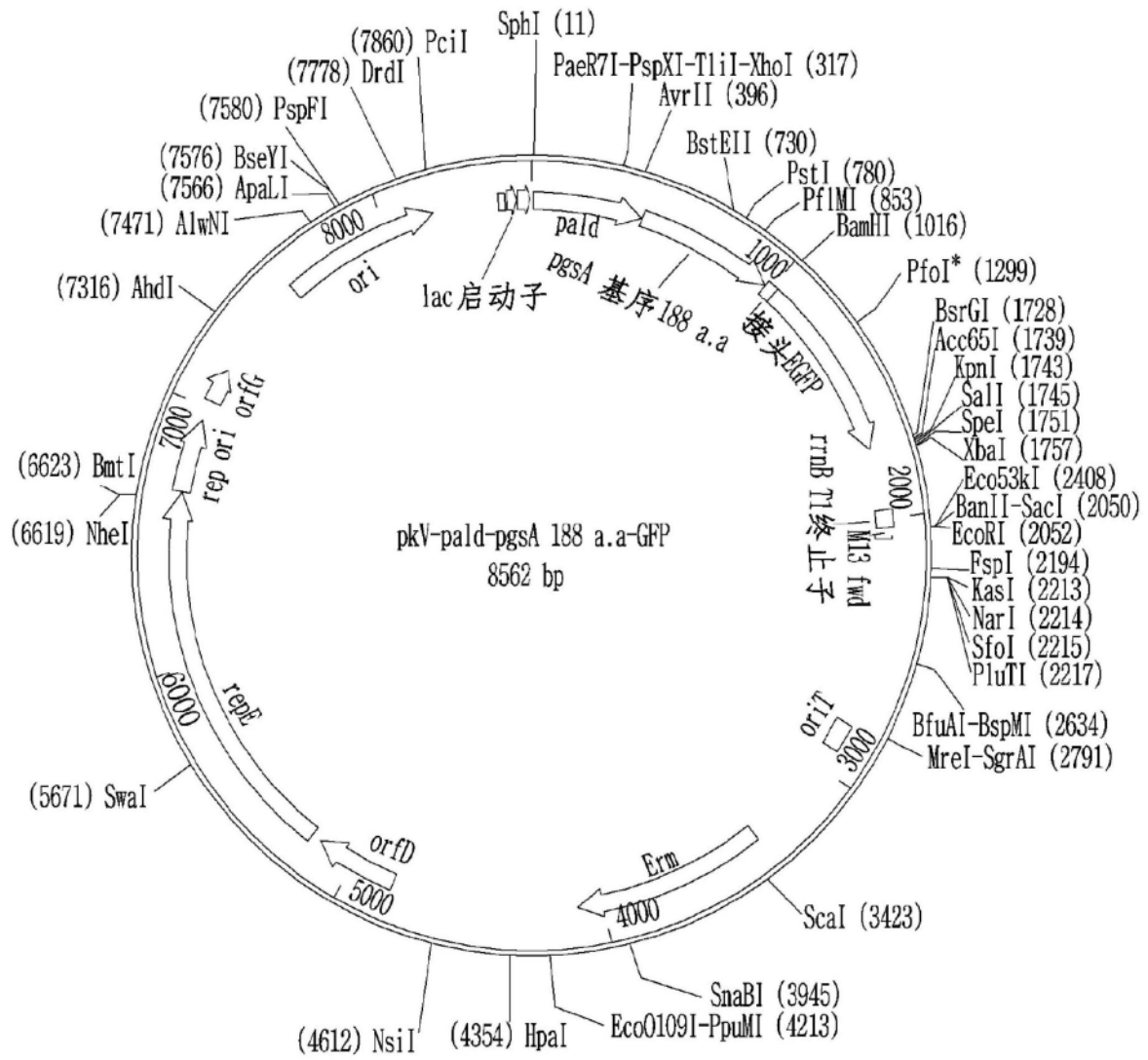


图6

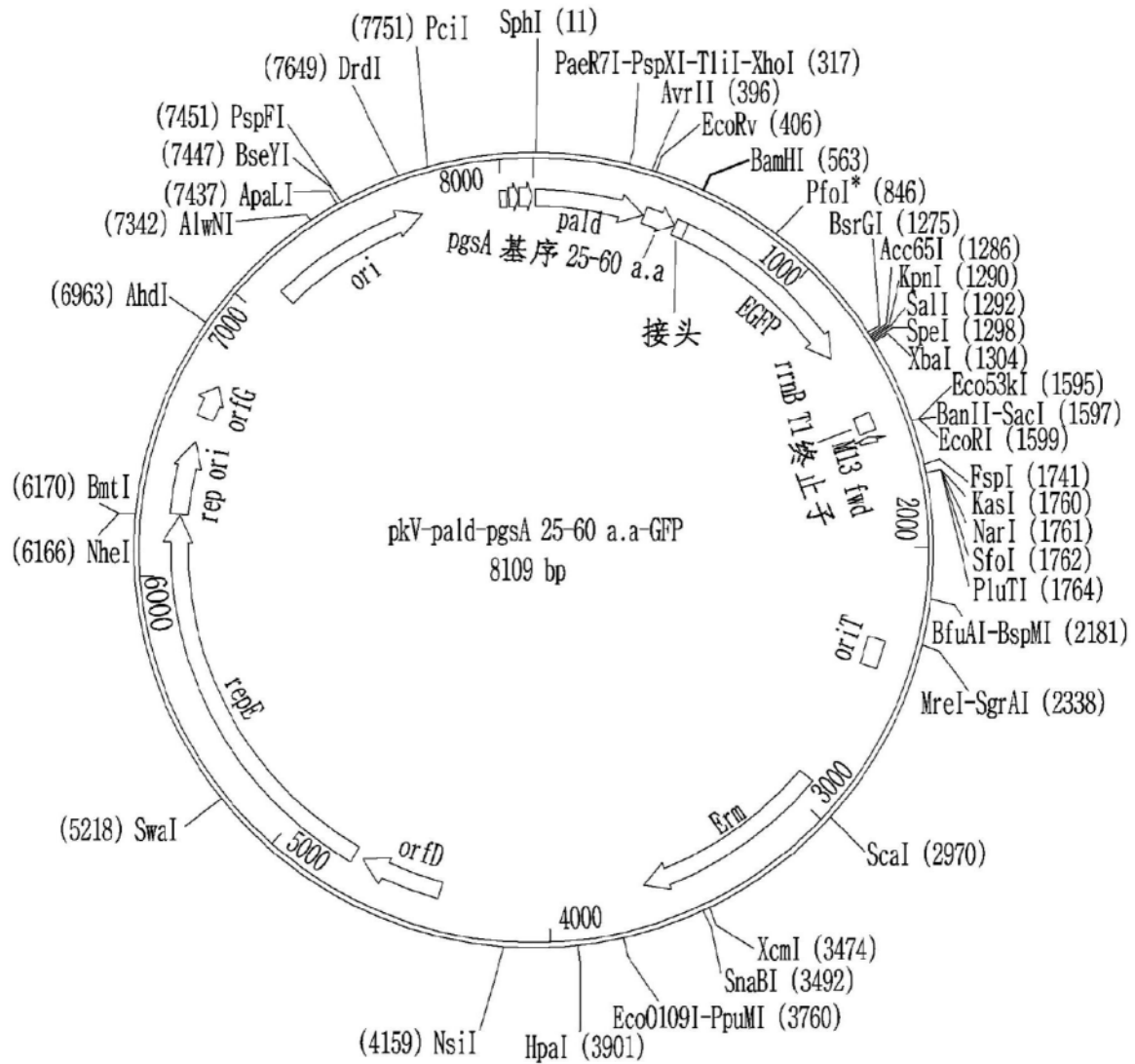


图7

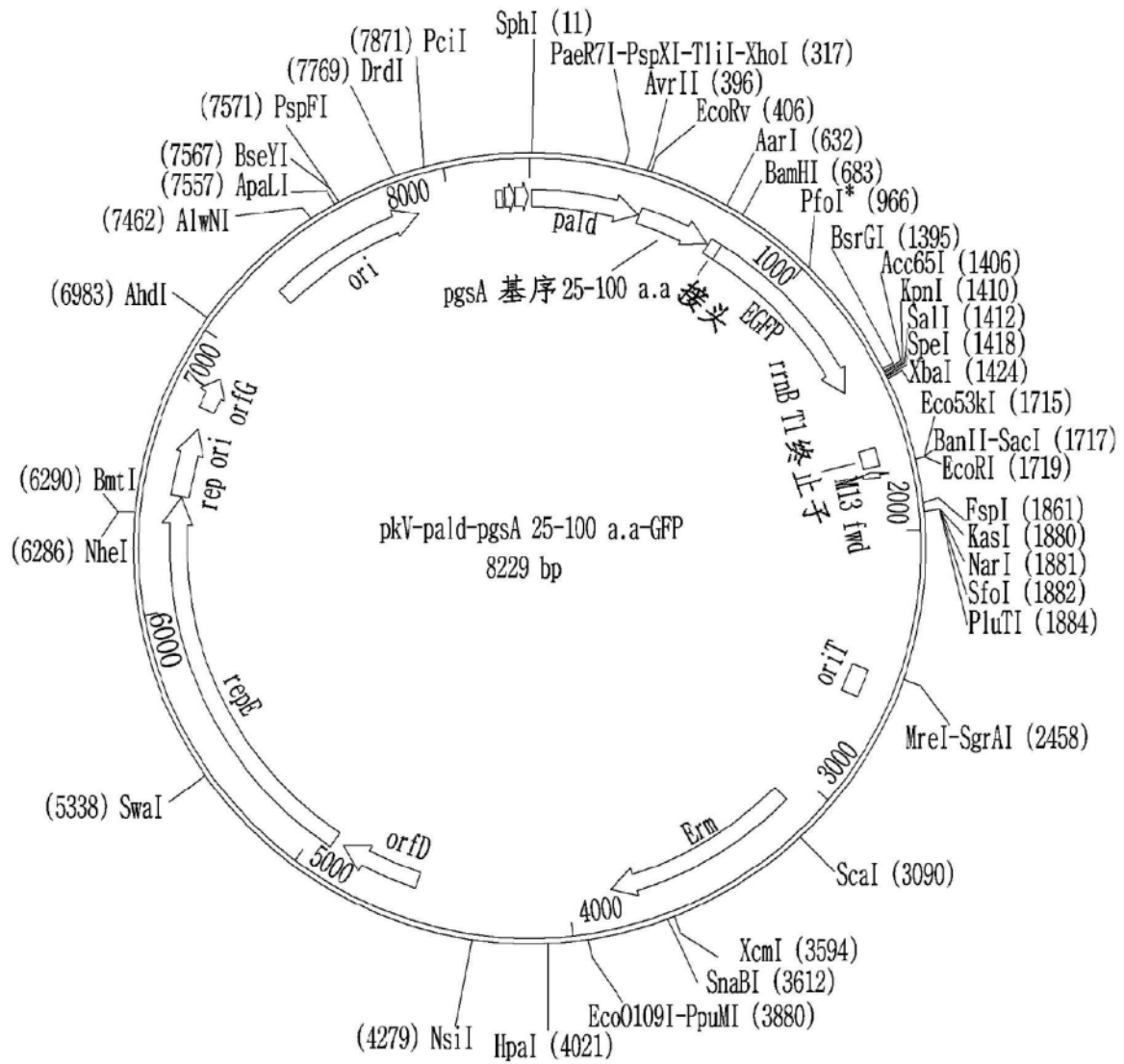


图9

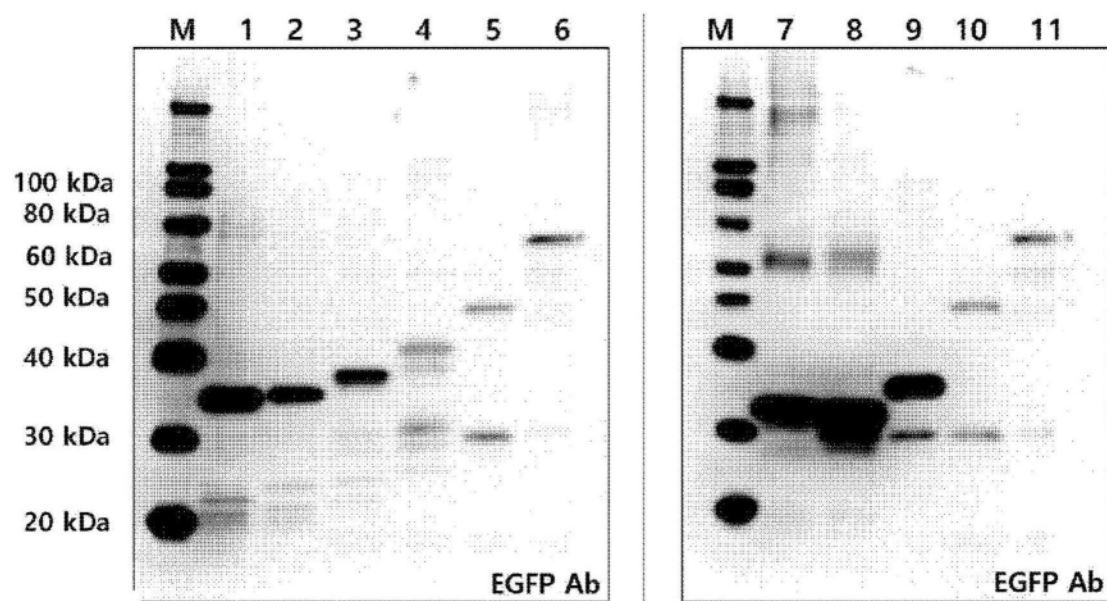


图10