



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111565733 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 11

(21) 申请号 201880073972.X

(22) 申请日 2018.09.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111565733 A

(43) 申请公布日 2020.08.21

(30) 优先权数据
62/558,346 2017.09.13 US
16/048,147 2018.07.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.13

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/050957 2018.09.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/055707 EN 2019.03.21

(73) 专利权人 Z生命科学公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 扎卡里·阿伯特

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.
C12N 1/21 (2006.01)
A61K 35/741 (2015.01)
A61K 35/742 (2015.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 39/02 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101649323 A, 2010.02.17
CN 101985625 A, 2011.03.16

审查员 张思源

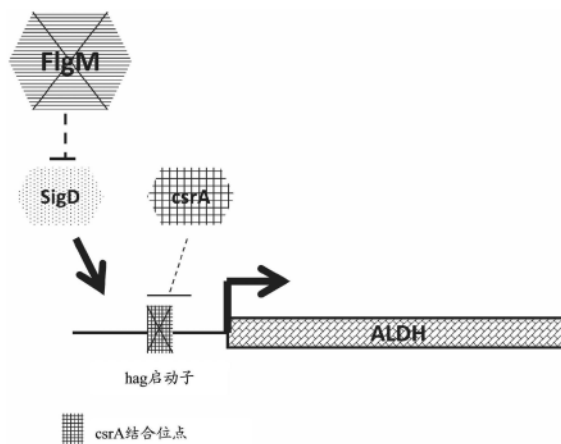
权利要求书5页 说明书31页
序列表12页 附图6页

(54) 发明名称

用于益生微生物的基因表达系统

(57) 摘要

本文提供了表达主题多肽的重组微生物。微生物可以包含表达构建体,该表达构建体包含与编码主题多肽的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白启动子。鞭毛蛋白启动子序列可以包含降低CsrA对翻译的抑制的遗传修饰。微生物还可以包含降低FlgM对SigD转录起始的抑制的遗传修饰。靶多肽可以是醛脱氢酶。这样的微生物可用于治疗酒精宿醉。



1. 重组细菌用于制备用于治疗或预防酒精宿醉的组合物的用途,其中当所述组合物被使用时,所述重组细菌被施用到有相应需要的受试者,

其中所述重组细菌是枯草芽孢菌(*B. subtilis*)物种,并且包含编码表达产物的异源核酸序列,

其中所述编码表达产物的异源核酸序列与鞭毛蛋白基因启动子可操作地连接,其中所述鞭毛蛋白基因启动子是枯草芽孢杆菌hag启动子,

其中所述表达产物是将乙醛氧化成乙酸的乙醛脱氢酶(ALDH),

其中所述编码蛋白基因启动子包含SEQ ID NO:1 (taagggcacaagg acgtgcctta)的CsrA结合位点中的突变并需要SigD用于表达,所述CsrA结合位点中的突变消除参与形成茎环的互补性的一个或更多个氢键,并且

其中所述重组细菌包含内源f1gM基因的突变,所述内源f1gM基因的突变减少FlgM对SigD的抑制,使得SigD在重组细菌中表达并作用于鞭毛蛋白基因启动子,使得异源核酸序列被组成型表达并且表达产物被组成型产生,

其中所述内源性f1gM基因的突变包括所述内源性f1gM基因的全部或部分缺失。

2. 重组细菌用于制备用于治疗或预防由饮用酒精导致的病症的组合物的用途,所述病症选自自由以下组成的组:恶心、不适、对光和声音敏感、眩晕和易怒,其中当所述组合物被使用时,所述重组细菌被施用到有相应需要的受试者,

其中所述重组细菌是枯草芽孢菌(*B. subtilis*)物种,并且包含编码表达产物的异源核酸序列,

其中所述编码表达产物的异源核酸序列与鞭毛蛋白基因启动子可操作地连接,其中所述鞭毛蛋白基因启动子是枯草芽孢杆菌hag启动子,

其中所述表达产物是将乙醛氧化成乙酸的乙醛脱氢酶(ALDH),

其中所述编码蛋白基因启动子包含SEQ ID NO:1 (taagggcacaagg acgtgcctta)的CsrA结合位点中的突变并需要SigD用于表达,所述CsrA结合位点中的突变消除参与形成茎环的互补性的一个或更多个氢键,并且

其中所述重组细菌包含内源f1gM基因的突变,所述内源f1gM基因的突变减少FlgM对SigD的抑制,使得SigD在重组细菌中表达并作用于鞭毛蛋白基因启动子,使得异源核酸序列被组成型表达并且表达产物被组成型产生,

其中所述内源性f1gM基因的突变包括所述内源性f1gM基因的全部或部分缺失。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的用途,其中当所述组合物被使用时,所述重组细菌被施用到先前一段时间内已经饮用酒精的受试者,其中所述先前一段时间是24小时、12小时、6小时、3小时或1小时的时间段。

4. 如权利要求1或权利要求2所述的用途,其中当所述组合物被使用时,所述重组细菌被施用到患有酒精宿醉的一种或更多种症状的受试者。

5. 如权利要求1或权利要求2所述的用途,其中当所述组合物被使用时,所述重组细菌被施用到尚未饮用酒精的受试者。

6. 如权利要求1或权利要求2所述的用途,其中当所述组合物被使用时,所述重组细菌被施用到先前一段时间内尚未饮用酒精的受试者,其中所述先前一段时间是24小时、12小时、6小时、3小时或1小时的时间段。

7. 如权利要求1或权利要2所述的用途,其中所述受试者在施用所述重组细菌之后的一段时间期间饮用酒精,其中所述之后的一段时间是24小时、12小时、6小时、3小时或1小时的时间段。

8. 如权利要求1或权利要2所述的用途,其中当所述组合物被使用时,所述受试者中的酒精宿醉的一种或更多种症状被预防。

9. 如权利要求1或权利要2所述的用途,其中由所述重组细菌包含的所述异源核酸序列编码的酶由所述ALDH酶组成。

10. 如权利要求1或权利要2所述的用途,其中施用所述重组细菌不影响所述受试者的血液酒精含量。

11. 如权利要求1或权利要2所述的用途,其中所述施用包括口服施用包含所述重组细菌的组合物。

12. 如权利要求1或权利要2所述的用途,其中所述施用包括施用 10^4 个至 10^{12} 个菌落形成单位的所述重组细菌。

13. 如权利要求1或权利要2所述的用途,其中当所述组合物被使用时,所述人类的肠中的乙醛浓度被降低。

14. 重组细菌用于制备用于将由异源核酸序列编码的表达产物递送至受试者的肠的组合物的用途,其中所述重组细菌是枯草芽孢杆菌物种,当所述组合物被使用时,所述重组细菌被施用到有相应需要的受试者,

其中所述重组细菌包含编码所述表达产物的所述异源核酸序列,所述异源核酸序列与鞭毛蛋白基因启动子可操作地连接,所述鞭毛蛋白基因启动子是枯草芽孢杆菌hag启动子,

其中所述鞭毛蛋白基因启动子包含SEQ ID NO:1 (taagggcacaagg acgtgcctta)的CsrA结合位点中的突变并需要SigD用于表达,所述CsrA结合位点中的突变消除参与形成茎环的互补性的一个或更多个氢键,并且

其中所述重组细菌包含f1gM基因的突变,所述f1gM基因的突变减少F1gM对SigD的抑制,使得SigD在重组细菌中表达并作用于鞭毛蛋白基因启动子使得异源核酸序列被组成型表达并且表达产物被组成型产生,

其中所述内源性f1gM基因的突变包括所述内源性f1gM基因的全部或部分缺失。

15. 如权利要求1、2或14中任一项所述的用途,其中所述重组细菌是形成孢子的细菌和/或处于孢子形式。

16. 如权利要求14所述的用途,其中所述CsrA结合位点中的突变不破坏所述枯草芽孢杆菌hag启动子的Shine-Dalgarno序列。

17. 如权利要求1、2或14中任一项所述的用途,其中所述内源性f1gM基因的突变包括编码f1gM的活性位点的序列中的突变。

18. 如权利要求1、2或14中任一项所述的用途,其中所述内源性f1gM基因的突变包括编码参与F1gM与SigD结合的氨基酸的序列中的突变。

19. 如权利要求1、2或14中任一项所述的用途,其中所述内源性f1gM基因的突变改变编码F1gM蛋白的C末端处的F1gM的第三螺旋或第四螺旋中的氨基酸的序列。

20. 如权利要求1、2或14中任一项所述的用途,其中所述重组细菌是枯草芽孢杆菌物种并且所述内源性f1gM基因的突变改变编码选自SEQ ID NO:11的I-58、K-62、I-65、G-68、D-

73和A-78的氨基酸的序列。

21. 如权利要求1、2或14中任一项所述的用途,其中所述重组细菌是枯草芽孢杆菌物种并且所述内源性f1gM基因的突变改变编码选自SEQ ID NO:11的I-3、G-7、S-10、V-11、A-40、K-41、M43、I-58、L-61、K-62、I-65、Y-70、K-71、V-72、D-73、A-74、H-76、I-77、A-78、N-80、M-81、I-82、N-83、F-84、Y-85和K-86的氨基酸的序列。

22. 如权利要求1、2或14中任一项所述的用途,其中所述内源性f1gM基因的突变降低或消除F1gM生物学活性。

23. 如权利要求1、2或14中任一项所述的用途,其中所述重组细菌组成性地表达所述表达产物。

24. 如权利要求1、2或14中任一项所述的用途,其中所述重组细菌的制备物的特征在于所述表达产物以以下水平表达于所述制备物中,所述水平被确定为比当所述表达产物在pHyspank启动子的控制下被表达时的可比较条件下所观察到的水平大至少4倍。

25. 一种重组枯草芽孢杆菌,其中所述重组细菌包含编码表达产物的异源核酸序列,其中所述编码表达产物的异源核酸序列与鞭毛蛋白基因启动子可操作地连接,其中所述鞭毛蛋白基因启动子是枯草芽孢杆菌hag启动子,

其中所述表达产物是将乙醛氧化成乙酸的乙醛脱氢酶(ALDH),

其中所述编码蛋白基因启动子包含SEQ ID NO:1(taagggcacaagg acgtgcctta)的CsrA结合位点中的突变并需要SigD用于表达,所述CsrA结合位点中的突变消除参与形成茎环的互补性的一个或更多个氢键,并且

其中所述重组细菌包含f1gM基因的突变,所述f1gM基因的突变减少F1gM对SigD的抑制,使得SigD在重组细菌中表达并作用于鞭毛蛋白基因启动子,使得异源核酸序列被组成型表达并且表达产物被组成型产生,

其中所述内源性f1gM基因的突变包括所述内源性f1gM基因的全部或部分缺失。

26. 一种重组枯草芽孢菌,其中所述重组枯草芽孢菌组成性地表达由异源核酸序列编码的表达产物,

其中所述编码表达产物的异源核酸序列与鞭毛蛋白基因启动子可操作地连接,其中所述鞭毛蛋白基因启动子是枯草芽孢杆菌hag启动子,

其中所述表达产物是将乙醛氧化成乙酸的乙醛脱氢酶(ALDH),

其中所述编码蛋白基因启动子包含SEQ ID NO:1(taagggcacaagg acgtgcctta)的CsrA结合位点中的突变并需要SigD用于表达,所述CsrA结合位点中的突变消除参与形成茎环的互补性的一个或更多个氢键,并且

其中所述重组细菌包含内源f1gM基因的突变,所述内源f1gM基因的突变减少F1gM对SigD的抑制,使得SigD在重组细菌中表达并作用于鞭毛蛋白基因启动子,使得异源核酸序列被组成型表达并且表达产物被组成型产生,

其中所述内源性f1gM基因的突变包括所述内源性f1gM基因的全部或部分缺失。

27. 如权利要求25或26所述的重组细菌,其中由所述重组细菌包含的所述异源核酸序列编码的酶由所述ALDH酶组成。

28. 一种重组枯草芽孢菌,

其中所述重组枯草芽孢菌包含编码表达产物的异源核酸序列,所述异源核酸序列与鞭

毛蛋白基因启动子可操作地连接,其中所述鞭毛蛋白基因启动子是枯草芽孢杆菌hag启动子,

其中所述编码蛋白基因启动子包含SEQ ID NO:1(taagggcacaagg acgtgcctta)的CsrA结合位点中的突变并需要SigD用于表达,所述CsrA结合位点中的突变消除参与形成茎环的互补性的一个或更多个氢键,并且

其中所述重组细菌包含内源f1gM基因的突变,所述内源f1gM基因的突变减少F1gM对SigD的抑制,使得SigD在重组细菌中表达并作用于鞭毛蛋白基因启动子,使得异源核酸序列被组成型表达并且表达产物被组成型产生,

其中所述内源性f1gM基因的突变包括所述内源性f1gM基因的全部或部分缺失。

29. 如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌,其中所述重组细菌是形成孢子的细菌和/或处于孢子形式。

30. 如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌,其中所述CsrA结合位点中的突变不破坏所述枯草芽孢杆菌hag启动子的Shine-Dalgarno序列。

31. 如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌,其中所述内源性f1gM基因的突变包括编码f1gM的活性位点的序列中的突变。

32. 如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌,其中所述内源性f1gM基因的突变包括编码参与F1gM与SigD结合的氨基酸的序列中的突变。

33. 如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌,其中所述内源性f1gM基因的突变改变编码F1gM蛋白的C末端处的F1gM的第三螺旋或第四螺旋中的氨基酸的序列。

34. 如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌,其中所述重组细菌是枯草芽孢杆菌物种并且所述内源性f1gM基因的突变改变编码选自SEQ ID NO:11的I-58、K-62、I-65、G-68、D-73和A-78的氨基酸的序列。

35. 如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌,其中所述重组细菌是枯草芽孢杆菌物种并且所述内源性f1gM基因的突变改变编码选自SEQ ID NO:11的I-3、G-7、S-10、V-11、A-40、K-41、M43、I-58、L-61、K-62、I-65、Y-70、K-71、V-72、D-73、A-74、H-76、I-77、A-78、N-80、M-81、I-82、N-83、F-84、Y-85和K-86的氨基酸的序列。

36. 如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌,其中所述内源性f1gM基因的突变降低或消除F1gM生物学活性。

37. 如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌,其中所述重组细菌组成性地表达所述表达产物。

38. 如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌的制备物,所述重组细菌的制备物的特征在于所述表达产物以以下水平表达于所述制备物中,所述水平被确定为比当所述表达产物在pHyspank启动子的控制下被表达时的可比较条件下所观察到的水平大至少4倍。

39. 一种组合物,所述组合物包含如权利要求25-28中任一项所述的重组细菌。

40. 如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物被配置用于口服施用。

41. 如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物包含 10^4 至 10^{12} 个菌落形成单位的所述重组细菌。

42. 如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物包含生理学上可接受的载体。

43. 如权利要求42所述的组合物,其中所述生理学上可接受的载体选自抗性淀粉、膳食

纤维、碳水化合物、蛋白质、糖基化蛋白质、水、胶囊填充剂和胶状物质。

44. 一种细菌细胞培养物,所述细菌细胞培养物包含如权利要求25、26或28中任一项所述的重组细菌。

用于益生微生物的基因表达系统

[0001] 关于联邦资助研究的声明

[0002] 无。

[0003] 相关申请的引用

[0004] 本申请要求2017年9月13日提交的美国临时申请62/558,346和2018年7月27日提交的美国申请16/048,147的优先权日的权益,其全部内容通过引用以其整体并入本文。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交并且在此通过引用以其整体并入的序列表。创建于2018年6月21日的所述ASCII副本命名为1642-001-US_SL.TXT,并且大小为29,323字节。

[0007] 背景

[0008] 当一个人饮用酒精时,从血流去除酒精的主要途径是经由醇脱氢酶在肝脏中氧化成乙醛。乙醛随后经由乙醛脱氢酶在肝脏中氧化成乙酸。当大量和/或快速消耗酒精时,高度毒性的中间乙醛能够积累并且随后释放回血流中,血流中的乙醛由于其高溶解性可以在全身起作用。乙醛不仅是一种已知的致癌物,它的毒性作用也是酒精宿醉的许多影响被充分研究和记载的原因。事实上,去除乙醛已经被证明降低宿醉症状。PMID: 16554376 (PubMed ID)。相反,当身体将乙醛氧化成乙酸 (acetate) 的能力受化学 (例如用双硫仑 (disulfiram)) 或遗传 (例如东亚群体中常见的乙醛脱氢酶基因中的单核苷酸多态性) 抑制时,则经历极度放大的宿醉症状。

[0009] 先前已经存在若干降低、消除或预防宿醉的影响的尝试。一些已经试图通过酶的方式或以其他方式降低吸收的乙醇的量或增加乙醇从身体去除的速率 (专利公布US2009-0060894A1)。然而,这些方法具有至少两个潜在缺陷: (1) 它们的作用方法影响饮用者的血液酒精含量本身,其可能是不期望的;和 (2) 乙醇加速代谢成乙醛可以增加身体对乙醛的暴露,并且使症状加剧和/或仅仅是更早地诱导宿醉症状而不是预防它们。简而言之,以乙醇为中心的策略不直接解决乙醛毒性的问题。

[0010] 更直接地,其他组已经试图解决乙醛本身。美国专利公布2013-0089535A1在口腔中使用酶制备物。尽管存在关于酒精饮用确实增加唾液中的乙醛浓度的证据,但从口腔去除的乙醛将不可能具有对导致酒精宿醉的全身乙醛毒性的任何显著影响。

[0011] Sprince, H., 等 (Protective action of ascorbic acid and sulfur compounds against acetaldehyde toxicity: implications in alcoholism and smoking. Agents Actions, 1975.5 (2) :p.164-73) 涉及使用小分子以结合并且去除乙醛 [1]。

[0012] 美国专利公布2015-0087702A1涉及使用小分子增加人类酶的速率或表达以去除乙醛。

[0013] 其他组已经开发了基于芽孢杆菌属 (Bacillus) 或其他细菌鞭毛调控区 (美国专利7888064B2、欧洲专利EP2235045B1) 或通过特别操纵f1gM和CsrA (日本专利JP5881352B2) 的表达系统。

[0014] Liu, Y. 等 ("Heterologous Expression of Aldehyde Dehydrogenase in

Lactococcus lactis for Acetaldehyde Detoxification at Low pH”, Appl Biochem Biotechnol. 8 August 2017) 涉及应用具有乳链菌肽控制表达 (NICE) 系统的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 来表达醛脱氢酶基因 (*istALDH*), 以在低pH催化乙醛的氧化。

[0015] 附图简述

[0016] 并入本文并且构成说明书一部分的附图图示了示例性实施方案, 并且与说明书一起进一步用于使所属领域的技术人员能够制造和使用这些实施方案以及对本领域技术人员而言将明显的其他实施方案。将结合以下附图更具体地描述本发明, 其中:

[0017] 图1示出了醛脱氢酶AldB或AcoD的诱导引起乙醛的快速去除。将样品与200mM乙醛在37°C孵育30分钟。然后将样品过滤, 1:10稀释, 并且冷冻。然后解冻的样品在HPLC上运行, 并且与标准曲线进行比较, 以计算剩余的乙醛浓度, 并且将这些值展示于此。“乙醛10mM”是指10mM乙醛标准物, 其在HPLC运行开始时运行并且然后在HPLC运行结束时再次运行以确保在机器上时没有乙醛的随机损失。

[0018] 图2A和2B示出了在修饰的hag启动子的控制下GFP的表达比在pHyspank启动子的控制下强5-10倍。(A) 将枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株PY79的冷冻储备物 (Frozen stocks) (阴性对照; “左侧板2点钟”位置处)、在去除了lacI阻遏的pHyspank启动子下表达GFP的枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) (右侧板“11点钟”位置处)、以及在修饰的hag启动子下表达GFP的枯草芽孢杆菌 (左侧板“11点钟”位置处和右侧板“2点钟”位置) 在LB上斑块接种 (patched) 并且生长过夜。用蓝色LED闪光灯和橙色滤光片使绿色荧光可视化。(B) 将在去除了lacI阻遏的pHyspank启动子下表达GFP的枯草芽孢杆菌的培养物 (图中的下方深灰色线; (A) 中右侧板“11点钟”位置处), 以及在修饰的hag启动子下表达GFP的枯草芽孢杆菌 (图中的上方浅灰色线; (A) 中左侧板“11点钟”位置处) 从LB肉汤中的个体菌落生长7小时, 并且从2.5小时开始每90分钟获取荧光和OD₆₀₀ 读数。

[0019] 图3示出了以蛋白质的存在表示的在来自培养物的经沉淀的细胞中的GFP、AcoD和AldB的表达, 所述细胞在LB中生长4.5小时、裂解并且通过在8% SDS-PAGE凝胶上进行考马斯染色来评估总蛋白质。泳道1是Bio-Rad Kaleidoscope蛋白质标准梯状物 (ladder)。泳道2和3 (分别) 是在pHyspank启动子下表达AldB的枯草芽孢杆菌的未诱导的培养物和诱导的培养物。泳道4和5 (分别) 是在pHyspank启动子下表达AcoD的枯草芽孢杆菌的未诱导的培养物和诱导的培养物。泳道6是缺失了f1gM但hag仍然完整的枯草芽孢杆菌的培养物 (异源蛋白质表达的阴性对照)。泳道7是在修饰的hag启动子下表达GFP (感兴趣的蛋白质条带由箭头指示) 的枯草芽孢杆菌的培养物。泳道8、9和10是在修饰的hag启动子下表达n末端6×组氨酸标记的AcoD (“6×-组氨酸”公开为SEQ ID NO:22)、未标记的AcoD和n-末端6×-组氨酸标记的AldB (“6×-组氨酸”公开为SEQ ID NO:22) (分别地; 感兴趣的蛋白质条带由箭头指示) 的枯草芽孢杆菌的培养物。

[0020] 图4示出了用于hag基因的启动子结构 [SEQ ID NO:7]。图中经鉴定的是: 启动子起始位置 (由箭头和“-182”指示)、SigD RNA聚合酶结合位点 (加下划线并标记“-10”和“-35”)、转录起始位点 (由箭头和“+1”指示)、CsrA结合位点1和2 (加括号并标记“CsrA BS1/2”)、如方法中讨论的被靶向进行G-至-A点突变以防止CsrA结合的残基 (加圆圈的“g”) 和 Shine-Dalgarno序列 (加框的)。ATG (序列大写) 是用于hag蛋白或任何异源多肽的起始密码子。

[0021] 图5示出了包括5'-UTR的hag mRNA[SEQ ID No:21]的预测的二级结构(由University of Vienna的RNA折叠软件生成的折叠预测;引用:Gruber AR、Lorenz R、Bernhart SH、Neuböck R、Hofacker IL.The Vienna RNA Websuite.Nucleic Acids Res.2008)。(A)折叠结构。(B)包含两个CsrA结合位点的mRNA区域的放大视图。由CsrA识别的两个结合位点的茎-环二级结构环中的“AGGA”基序用粗黑线标出。二级结构至关重要,因为可以清楚地观察到两个结合位点是相邻的。因此,以将阻止这两个位点接近的方式影响二级结构的修饰可以具有对CsrA结合的有害作用,这可能等同于对结合位点或“AGGA”识别序列本身的修饰。

[0022] 图6示出了用于使来自hag启动子的表达去阻遏的策略。FlgM基因的敲除(“X”)防止FlgM抑制SigD活性。SigD活化(粗箭头) hag启动子和可操作地连接的ALDH基因的转录。hag启动子上的csrA结合位点的突变(“X”)降低了对核糖体结合和ALDH基因的翻译的抑制。这引起ALDH蛋白的稳健表达(粗箭头)。

[0023] 概述

[0024] 在一方面,本文公开了一种重组微生物,该重组微生物包含:a)包含表达构建体的多核苷酸,所述表达构建体包含与编码主题多肽的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因启动子,其中鞭毛蛋白基因启动子包含一个或更多个遗传修饰,所述一个或更多个遗传修饰降低CsrA对从鞭毛蛋白基因启动子转录的mRNA的翻译的阻遏;和b)flgM基因的遗传修饰,所述flgM基因的遗传修饰降低对SigD转录起始的抑制。在一种实施方案中,重组微生物组成性地表达多肽。在另一种实施方案中,微生物是益生的。在另一种实施方案中,微生物属于选自以下的属:芽孢杆菌属(Bacillus)、双歧杆菌属(Bifidobacterium)、肠球菌属(Enterococcus)、埃希氏菌属(Escherichia)、乳杆菌属(Lactobacillus)、明串珠菌属(Leuconostoc)、片球菌属(Pediococcus)和链球菌属(Streptococcus)。在另一种实施方案中,微生物属于芽孢杆菌属。在另一种实施方案中,微生物是枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis, B. subtilis)。在另一种实施方案中,鞭毛蛋白基因启动子是hag启动子。在另一种实施方案中,hag启动子包含一种或更多种遗传修饰,所述一种或更多种遗传修饰降低CsrA对从鞭毛蛋白基因启动子转录的mRNA的翻译的阻遏,其中遗传修饰包括对CsrA BS1结合位点和/或CsrA BS2结合位点的修饰(例如,核苷酸取代、插入或缺失)。在另一种实施方案中,一种或更多种遗传修饰包括对CsrA BS1识别序列AGGA的一种或多种(例如两种、三种或四种)遗传修饰,例如修饰为序列AGAA。在另一种实施方案中,一种或更多种遗传修饰包括在12碱基对BS1结合位点中或在该结合位点的任一侧上的形成BS1的茎-环二级结构的茎的周围碱基中的一种或更多种遗传修饰。在另一种实施方案中,一种或更多种遗传修饰包括BS1结合位点gcacaaggacgt(SEQ ID NO:8)中的一种或多种(例如,至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种)遗传修饰。在另一种实施方案中,一种或更多种遗传修饰通过消除允许氢键合的互补性来破坏BS1的茎环结构。在另一种实施方案中,一种或更多种遗传修饰包括参与氢键合的序列taagggcacaaggacgtgcctta(SEQ ID NO:1)中的一种或多种遗传修饰,例如以消除一个、两个、三个、四个或更多个氢键对。在另一种实施方案中,修饰的BS1具有核苷酸序列GCACAAGAACGT(SEQ ID NO:2)。在另一种实施方案中,一种或更多种遗传修饰包括对CsrA BS2结合位点的一个或更多个点突变。在另一种实施方案中,一种或更多种遗传修饰包括在

13碱基对BS2结合位点中或在该结合位点的任一侧上的形成BS2 ATTCAGGGAGGAA (SEQ ID NO:9)的茎-环二级结构的茎的周围碱基中的一种或多于一种(例如,至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种)遗传修饰。在另一种实施方案中,一种或更多种遗传修饰通过消除允许氢键合的互补性来破坏BS2的茎环结构。在另一种实施方案中,修饰的BS2具有核苷酸序列ATTTAGGGAGGAA (SEQ ID NO:3)。在另一种实施方案中,对BS2结合位点的一种或更多种遗传修饰不包括Shine-Dalgarno序列agggagga中核苷酸的改变。在另一种实施方案中,其中鞭毛蛋白基因启动子位于细菌染色体中或质粒中。在另一种实施方案中,主题多肽是醛脱氢酶。在另一种实施方案中,醛脱氢酶是来自钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)的AcoD,并且包含与以下相同或基本上相同的氨基酸序列:

MNMAEIAQLGVSNPYKQYENYIGGAWVPPAGGEYFESTTTPITGKPFTRVPRSGQQDVDA
ALDAAHAAKAAWARTSTTERANILNRIADRIEANLKLVAESIDNGKPVRETTAADLPLAVD
HFRYFAGCIRAQEGGISEIDADTIAYHFHEPLGVVQIIPWNFPLLMATWKLAPALAAAGNCVV
LKPAEQTPASILVMEVIGDLLPPGWNVINGFGLGKPLASSPRISKVAFTGETTTGRLIM
[0025] QYASQNLIPVTLLEGGKSPNIFEDVLAADDAFFDKALEGFAMFALNQGEVCTCPSRALIQE
SIYDRFMERALKRVAIRQGHPLDTGTMIGAQASAEQLEKILSYIDLGRKEGAQCLTGGERN
VLDGDLAGGYVVKPTVFAGHNKMRIFQEEIFGPVVSVTTFKDEEEALAIANDTLYGLGAGV
WTRDGARAFRMGRGIQAGRVTNCRYHAYPAHAFAFGGYKQSGIGRENHRMMLDHYQQTK
NLLVSYSPNALGFF [SEQ ID NO: 4]。

[0026] 在另一种实施方案中,醛脱氢酶是人类醛脱氢酶,例如具有与以下相同或基本上相同的氨基酸序列的人类醛脱氢酶:

MLRAARFGPRLGRRLLSAAATQAVPAPNQPEVFCNQIFINNEWHDAVSRKTFPTVNPS
TGEVICQVAEGDKEDVDKAVKAARAAFQLGSPWRRMDASHRGRLLNRLADLIERDRTYLA
ALETLDNKGPYVISYLVLDLDMVLKCLRYAGWADKYHGKTIPIDGDFFSYTRHEPVGVCG
QIIPWNFPLLMQAWKLGALATGNVVMKVAEQTPLTALYVANLIKEAGFPPGVNIVPG
[0027] FGPTAGAAIASHEDVDKVAFTGSTEIGRVIQVAAGSSNLKRVTLLEGGKSPNIIMSDADM
DWAVEQAHFALFFNQGCCAGSRTFVQEDIYDEFVRSVARAKSRVWGNPFDSKTEQG
P
QVDETQFKKILGYINTGKQEGAKLLCGGGIAADRGYFIQPTVFGDVQDGMTIAKEEIFGP
VMQILKFKTIEEVGRANNSTYGLAAAVFTKDLDKANYLSQALQAGTVWVNCYDVFGAQS
PFGGYKMSGSGRELGEYGLQAYTEVKTVTVKVPQKNS [SEQ ID NO: 5]。

[0028] 在另一种实施方案中,f1gM基因中的遗传修饰包括f1gM基因的全部或部分缺失。在另一种实施方案中,f1gM基因中的遗传修饰包括编码f1gM的活性位点的序列中的单个突变或系列突变。在另一种实施方案中,f1gM基因中的遗传修饰破坏二级结构或三级结构,诸如在定义F1gM二级结构的螺旋之一中。在另一种实施方案中,f1gM基因中的遗传修饰包括改变F1gM蛋白的C末端处的第三螺旋或第四螺旋中的氨基酸,例如选自枯草芽孢杆菌F1gM的I-58、K-62、I-65、G-68、D-73、A-78。在另一种实施方案中,f1gM基因中的遗传修饰包括改变预测参与F1gM与SigD结合的一个或更多氨基酸,例如选自枯草芽孢杆菌F1gM的I-3、G-7、S-10、V-11、A-40、K-41、M43、I-58、L-61、K-62、I-65、Y-70、K-71、V-72、D-73、A-74、H-76、

I-77、A-78、N-80、M-81、I-82、N-83、F-84、Y-85和K-86。

[0029] 在另一方面,本文公开了一种组成性地表达醛脱氢酶的重组益生微生物。在一种实施方案中,微生物包含:a)包含表达构建体的多核苷酸,所述表达构建体包含与编码主题多肽的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因启动子;和b)F1gM基因中的遗传修饰,所述f1gM基因中的遗传修饰降低对SigD表达的抑制。在另一种实施方案中,鞭毛蛋白基因启动子包含一种或更多种遗传修饰,所述一种或更多种遗传修饰降低CsrA对从启动子转录的mRNA的翻译的阻遏。

[0030] 在另一方面,本文公开了一种多核苷酸,所述多核苷酸包含表达构建体,所述表达构建体包含与编码主题多肽的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因启动子,其中鞭毛蛋白基因启动子包含一种或更多种遗传修饰,所述一种或更多种遗传修饰降低CsrA对从鞭毛蛋白基因启动子转录的mRNA的翻译的阻遏。

[0031] 在另一方面,本文公开了一种制备多肽的方法,该方法包括培养如本文公开的重组微生物。在一种实施方案中,该方法还包括分离多肽。

[0032] 在另一方面,本文公开了一种组合物,所述组合物包含生理学上可接受的载体和重组益生微生物,其中重组益生微生物包含:a)包含表达构建体的多核苷酸,所述表达构建体包含与编码主题多肽的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因启动子;和b)F1gM基因的遗传修饰,所述F1gM基因的遗传修饰降低对SigD转录起始的抑制。在一种实施方案中,鞭毛蛋白基因启动子包含一种或更多种遗传修饰,所述一种或更多种遗传修饰降低CsrA对从鞭毛蛋白基因启动子转录的mRNA的翻译的阻遏。在另一种实施方案中,主题多肽是醛脱氢酶。在另一种实施方案中,生理学上可接受的载体选自抗性淀粉、膳食纤维、碳水化合物、蛋白质和糖基化蛋白质、水、胶囊填充剂和胶状物质(gummy material)。

[0033] 在另一方面,本文公开了如本文公开的组合物的单位剂量,所述单位剂量包含约 10^4 个至约 10^{12} 个菌落形成单位的重组益生微生物。

[0034] 在另一方面,本文公开了一种用于预防或治疗酒精宿醉的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用有效量的包含组成性地表达醛脱氢酶的微生物的组合物。在另一种实施方案中,在受试者已经饮用酒精之前、期间或之后施用组合物。

[0035] 在另一方面,本文公开了一种在受试者中的肠中或循环中使分析物代谢的方法,该方法包括向受试者施用有效量的包含组成性地表达使分析物代谢的酶的微生物的组合物。

[0036] 在另一方面,本文公开了一种产生靶化合物的方法,该方法包括:a)将包含如本文公开的表达主题多肽的重组微生物的培养物与分析物接触,其中主题多肽是以分析物为底物的酶,和b)培养微生物,其中酶催化分析物转化成靶化合物。在一种实施方案中,酶选自淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶。

[0037] 详细描述

[0038] I. 引言

[0039] 本文公开了一种已经被遗传工程化以组成性地表达乙醛脱氢酶的微生物,例如细菌。乙醛脱氢酶(ALDH)在细菌细胞中内在地表达,并且不是通过酶的分泌,而是通过乙醛扩散到细菌中来接近(access)其底物乙醛。乙醛是一种高度可溶性分子,并且可以跨越细胞膜被动扩散。酶的这种内在定位提供了优于分泌的功能优势,因为细菌细胞的内部被保护

免受肠腔中的严苛和可变环境,该环境特征为:低pH、出于防御或营养的目的而寻求降解游离漂浮的蛋白质的不友好的细菌和真核细胞、对酶的辅因子诸如NAD的高度竞争和细胞外蛋白酶。

[0040] 枯草芽孢杆菌的鞭毛调控机制适于完成ALDH的组成性和稳健表达。枯草芽孢杆菌通过一个包括若干正调控物和负调控物的复杂系统来调控运动性[2]。该系统的基本策略是去除高度表达的鞭毛蛋白基因(被称为hag)的负调控物。

[0041] 编码枯草芽孢杆菌鞭毛蛋白的鞭毛亚基的基因是hag,并且因此在正确的条件下,使用均为稳健的转录启动子和核糖体结合位点二者在单个细菌中产生数十万个拷贝[3, 4]。

[0042] 转录由被F1gM蛋白阻遏的 σ 因子SigD介导[5]。f1gM的缺失大大增强了SigD的组成性表达和活性,并且因此引起鞭毛操纵子并且特别是hag基因的更高和更组成性的转录。

[0043] hag基因的翻译通过高度稳健的核糖体结合位点实现,该核糖体结合位点与称为CsrA的蛋白质结合并且受转录后阻遏[6]。然而,CsrA结合位点中的单个点突变取消了其结合并且引起Hag蛋白的组成性翻译[7]。

[0044] 使用使f1gM基因缺失和在CsrA结合位点中进行单个点突变的组合,可以在枯草芽孢杆菌的生命周期中组成性地达到极高水平的Hag蛋白。类似地,如果hag基因被编码感兴趣的蛋白质的异源基因替换,该基因可以以高水平组成性地转录和翻译。因此,通过用编码ALDH的基因替换hag基因,并且然后使f1gM基因缺失并且在hag启动子的CsrA结合位点处产生单个点突变,在枯草芽孢杆菌中达到了我们的ALDH的稳健和组成型表达。

[0045] 因此,在某些实施方案中,本文提供的微生物包括CsrA的结合位点中的点突变和f1gM缺失的组合。通过进行这两种突变,任何基于SigD的或鞭毛蛋白启动子系统的效用通过去除阻遏并且使表达为组成性的而大大增加。不希望受理论的限制,据信这不同于简单的CsrA缺失,因为CsrA在许多细菌物种中是多能调控物(pluripotent regulator)[8],并且其缺失可以具有对细胞的许多其他潜在不期望表型作用。通过仅在结合位点中进行点突变,突变特异性地且独特地排除了CsrA对hag启动子的阻遏,而不从CsrA可能具有的任何其他靶去除CsrA阻遏。

[0046] 该策略可用于任何期望的多肽的组成性表达。这包括在个体的肠中使靶分析物代谢或在工业过程中产生靶分子的其他酶。

[0047] II. 定义

[0048] 如本文使用的,术语“益生菌”或“益生菌”是指当以有效量施用赋予宿主健康或健康益处的微生物或细菌。

[0049] 如本文使用的,术语“重组微生物”或“重组细菌”是指包含以下多核苷酸的微生物或细菌,所述多核苷酸含有自然界中通常不相互附接的附接的核苷酸序列。

[0050] 用于描述两个或更多个核苷酸序列或氨基酸序列之间的序列关系的术语包括“参考序列”、“选自”、“比较窗口”、“相同的”、“序列同一性百分比”、“基本上相同的”、“互补”和“基本上互补”。

[0051] “参考序列”是用作序列比较的基础的定义序列,并且可以是较大序列的子集,例如完整的cDNA、蛋白质或基因序列的子集。

[0052] 因为两个多核苷酸或多肽可以各自包含(1)在两个多核苷酸之间相似的序列(即,

仅完整多核苷酸或多肽序列的一部分),和(2)在两个多核苷酸之间不同的序列,两个(或更多)多核苷酸或多肽之间的序列比较通常通过在“比较窗口”上比较两个多核苷酸的序列来进行,以鉴定和比较序列相似性的局部区域。

[0053] “比较窗口”是指与参考序列相比的、通常至少12个连续核苷酸或4个连续氨基酸残基的概念区段(segment)。比较窗口经常具有至少15个核苷酸或至少25个核苷酸或至少5个氨基酸或至少8个氨基酸的长度。为了两个序列的最佳比对,比较窗口可以包含与参考序列(其不包含添加或缺失)相比约20%或更少的添加或缺失(即,空位)。用于对齐比较窗口的序列的最佳比对可以通过算法的计算机化实现(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group, 575Science Dr.,Madison,WI)或通过检查来进行,并且选择由多种方法中的任一种产生的最佳比对(即,得到比较窗口上的最高同源性百分比)。

[0054] 如果为了最大的对应性在核苷酸或氨基酸序列的长度上进行比对时主题核苷酸序列或氨基酸序列与参考序列是相同的,则这两个序列是“相同的”。

[0055] 因此,两个序列之间的“序列同一性百分比”通过如下计算:在比较窗口上比较两个最佳比对的序列,确定两个序列中出现相同的核苷酸或氨基酸的位置的数目以得到匹配的位置的数目,将匹配的位置的数目除以比较窗口中的位置的总数目(即,窗口尺寸),并且将结果乘以100以得到序列同一性百分比。

[0056] 除非另有指明,用于比较两个序列的比较窗口是较短序列的长度。

[0057] 方法还在以下中描述: Natl. Acad. Sci. USA 85:2444; Higgins&Sharp(1988) Gene 73:237-244; Higgins&Sharp, CABIOS 5:151-153(1989); Corpet等(1988) Nucleic Acids Research 16:10881-90; Huang等(1992) Computer Applications in the Biosciences 8:155-65; 和 Pearson等(1994) Methods in Molecular Biology 24:307-31。通常还通过检查和手动比对来进行比对。

[0058] 如果主题氨基酸序列或核苷酸序列在比较窗口上具有至少70%序列同一性,主题核苷酸序列或氨基酸序列是与参考序列“基本上相同的”。因此,具有与参考序列至少80%序列同一性、至少85%序列同一性、至少90%序列同一性、至少95%序列同一性、至少98%序列同一性或至少99%序列同一性的序列也是“基本上相同的”。当然,两个彼此相同的序列也是“基本上相同的”。

[0059] 在某些实施方案中,主题多核苷酸与参考多核苷酸特异性杂交。“与...特异性杂交”或“特异性杂交”或“与...选择性杂交”是指当核酸分子存在于复杂混合物(例如,总细胞)DNA或RNA中时,该序列优先与特定核苷酸序列在严格的条件下的结合、双链体化或杂交。

[0060] 术语“严格的条件”是指在该条件下探针将优先与其靶子序列杂交,并且在较小程度上与其他序列杂交或根本不与其他序列杂交的条件。在核酸杂交实验诸如DNA杂交和RNA杂交的背景中,“严格的杂交”和“严格的杂交洗涤条件”是序列依赖性的,并且在不同的环境参数下是不同的。核酸杂交的广泛指南见于Tijssen(1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes第I部分第2章“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier, New York。

[0061] 通常,高度严格的杂交和洗涤条件被选择为比在定义的离子强度和pH时特定序列的热解链温度(T_m)低约 5°C 。 T_m 是50%的靶序列与完全匹配的探针杂交的温度(在定义的离子强度和pH下)。非常严格的条件被选择为等于特定探针的 T_m 。

[0062] 对于在DNA印迹或RNA印迹中具有多于100个互补残基的互补核酸在过滤器上的杂交,严格的杂交条件的实例为在 42°C ,50%福尔马林与1mg的肝素,将杂交进行过夜。高度严格的洗涤条件的实例为在 72°C ,0.15M NaCl,持续约15分钟。严格的洗涤条件的实例为在 65°C , $0.2\times\text{SSC}$ 洗涤,持续15分钟(参见,Sambrook等关于SSC缓冲液描述)。通常,高严格洗涤之前进行低严格洗涤以去除背景探针信号。对于例如多于100个核苷酸的双链体,示例性中度严格洗涤为在 45°C , $1\times\text{SSC}$,持续15分钟。对于例如多于100个核苷酸的双链体,示例性低严格洗涤为在 40°C , $4-6\times\text{SSC}$,持续15分钟。通常,在特定杂交测定中比起针对不相关探针观察到的 $2\times$ (或更高)的信噪比指示检测到特异性杂交。

[0063] 如本文使用的,术语“转录调控序列”是指调控与其可操作地连接的第二核苷酸序列的转录的第一核苷酸序列。

[0064] “启动子”是至少足以启动(promote)DNA中的核苷酸序列转录成RNA转录物的转录调控序列。从启动子转录的转录物通常包括从启动子开始在转录起始位点下游的序列,以及在mRNA的情况下编码氨基酸序列的下游序列。启动子是最完全表征的转录调控序列,因为它们紧邻于转录起始位点上游且位置可预测。启动子包括调节RNA聚合酶的识别、结合和转录起始活性的序列。这些序列可以是顺式作用的,或可以对反式作用因子应答。根据调控的性质,启动子可以是组成性的或受调控的。启动子通常被描述为具有两个分离的区段:核心区 and 延伸启动子区。

[0065] 核心启动子包括足够用于RNA聚合酶识别、结合和转录起始的序列。核心启动子包括转录起始位点、RNA聚合酶结合位点和其他通用转录结合位点,并且是前起始复合物形成和通用转录机制组装的地方。前起始复合物通常在转录起始位点(TSS)的50个核苷酸(nt)内。

[0066] 核心启动子还包括对于将mRNA翻译成多肽所必需的核糖体结合位点的序列。

[0067] 延伸启动子区包括所谓的近侧启动子,其延伸至转录起始位点上游约250个核苷酸(即,-250nt)。它包括主要的调控元件,诸如特异性转录因子结合位点。已经发现许多基因具有位于更上游的转录调控元件。特别地,包括基因的大多数转录调控元件的片段可以延伸到转录起始位点上游高达700nt或更多。(参见,例如,U.S.2007-0161031。)在某些基因中,转录调控序列已经被发现在转录起始位点上游数千个核苷酸处。

[0068] 如本文使用的,当转录调控序列在细胞中起作用以调控核苷酸序列的转录时,核苷酸序列与转录调控序列“可操作地连接”。这包括通过聚合酶和启动子之间的相互作用来启动核苷酸序列的转录。

[0069] 如本文使用的,如果第一核苷酸序列在自然界中未与第二核苷酸序列可操作地连接,则第一核苷酸序列与第二核苷酸序列是“异源的”。延伸而言,如果多肽由与启动子异源的核苷酸序列编码,则多肽与表达控制序列是“异源的”。

[0070] 如本文使用的,术语“同源物”是指来自与所定义的属或物种不同的另一种属或物种的任何天然存在的基因,或同一株系或物种中编码具有几乎相同折叠和功能的蛋白质的不同基因。研究已经显示出,在微生物之间,与所讨论的基因或蛋白质具有至少30%氨基酸

同一性的蛋白质具有这样的性质(引用:PMID 23352839)。此外,术语“同源物”延伸至编码与所讨论的基因或蛋白质具有小于30%的同一性的蛋白质,但已经在同行评审的科学杂志中被鉴定为所述基因或蛋白质的同源物的基因。

[0071] 如本文使用的,术语“直系同源物”是指出现在与所讨论的属或物种不同的另一个属或物种中的任何同源物。

[0072] 如本文使用的,术语“种内同源物(paralog)”是指出现在与所讨论的株系或物种相同的株系或物种中的任何同源物,通常是基因复制的结果。

[0073] 如本文使用的,术语“等位基因变体”是指基因的天然存在的变异。

[0074] 如本文使用的,术语“人工变体”是指包含对天然存在的基因或蛋白质的一种或更多种遗传修饰同时保持天然功能的基因或蛋白质。

[0075] 如本文使用的,术语“突变”是指核苷酸序列或氨基酸序列的改变。突变可以包括一个或多个核苷酸的取代(单个核苷酸取代被称为“SNV”或“点突变”)、一个或多个核苷酸添加或一个或多个核苷酸缺失,以及如果存在的话,由这些核苷酸改变引起的氨基酸序列的改变。

[0076] 如本文使用的,细菌菌株的“衍生物”是该菌株的任何遗传上不同的形式。

[0077] 如本文使用的,术语“受试者”在用于指个体时是指个体动物,例如人类。

[0078] 如本文使用的,术语“疗法”、“治疗”、“治疗干预”和“改善”是指引起症状的严重程度降低的任何活动。术语“治疗”和“预防”不意图为绝对的术语。治疗和预防可以指任何的发作延迟、症状改善、症状严重程度减轻、患者生存改善、生存时间或生存率增加等。治疗的效果可以与未接受治疗的个体或个体池(pool of individuals)比较,或与治疗之前或治疗期间不同时间的同一患者比较。在一些方面,与例如施用前的个体或与未进行治疗的对照个体相比,疾病的严重程度降低至少10%。在一些方面,状况的严重程度降低了至少25%、50%、75%、80%或90%,或在一些情况下,使用标准诊断技术不再可检测到。

[0079] 如本文使用的,术语“益生组合物”是指包含益生微生物和生理上可接受的载体的组合物。通常地,益生组合物赋予它被施用至的宿主受试者健康或健康益处。

[0080] 如本文使用的,术语“生理学上可接受的”是指与组合物的其他成分相容并且可以安全地施用至受试者的载体。益生组合物和用于其制备和使用的技术是本领域技术人员根据本公开内容已知的。关于合适的药物组合物和用于其施用的技术的详细清单,可以参考以下教科书,诸如Remington's Pharmaceutical Sciences,17th ed.1985;Brunton等,“Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,”McGraw-Hill,2005;University of the Sciences in Philadelphia(eds.),“Remington:The Science and Practice of Pharmacy,”Lippincott Williams&Wilkins,2005;和University of the Sciences in Philadelphia(eds.),“Remington:The Principles of Pharmacy Practice,”Lippincott Williams&Wilkins,2008。

[0081] 益生组合物可以是液体制剂或固体制剂。当益生组合物是固体制剂时,它可以被配制成片剂、吸吮片剂、咀嚼片剂、胶囊、小袋、粉末、颗粒、包衣颗粒、包衣片剂、肠溶片、肠溶胶囊、融化条(melting strip)或薄膜。当益生组合物是液体制剂时,它可以被配制成口服溶液、悬浮液、乳液或糖浆剂。所述组合物还可以包含独立选自但不限于由以下组成的组的载体材料:抗性淀粉、膳食纤维、碳水化合物、蛋白质和糖基化蛋白质。

[0082] 术语“有效量”和“有效剂量”是指有效改善紊乱或状况的剂的量。例如,对于给定参数,有效量将显示出增加或减少至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%中任一项或至少100%的治疗效果。效力也可以表示为“倍”增加或降低。例如,有效量可以具有超过对照至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更多倍中的任一项的效果。

[0083] 剂的有效量基于预期的目标确定。术语“单位剂量”是指适于在受试者中使用的物理上分散的单位,每个单位包含预先确定的量的组合物,所述预先确定的量经计算产生与其施用即合适的途径和治疗方案相关的期望的应答。根据治疗的次数和单位剂量二者,待施用的量取决于待治疗的受试者、受试者的状态和期望的保护。组合物的精确量还取决于从业者的判断,并且是每个个体所特有的。

[0084] 术语“剂量(dose)”和“剂量(dosage)”在本文中可互换地使用。剂量是指每次施用给予个体的活性成分的量。对于本发明,剂量可以指细菌的数目,例如菌落形成单位(CFU)的量。剂量将根据许多因素,包括施用频率;个体的大小和耐受性;状况的严重程度;副作用的风险;施用途径而变化。本领域技术人员将认识到,剂量可以根据上文的因素或基于治疗进展进行修改。术语“剂型”是指药物的特定形式,并且取决于施用途径。例如,剂型可以呈液体,例如用于口服饮用的饮料。

[0085] III. 表达构建体

[0086] 此处预期的是降低对从鞭毛蛋白启动子转录的抑制和对由鞭毛蛋白启动子起始的mRNA转录物的翻译的抑制中的一种或两种的方法。

[0087] 本文公开的某些多核苷酸包含表达构建体,所述表达构建体包含与编码主题多肽即待表达的多肽的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因转录调控序列,例如启动子。在某些实施方案中,hag启动子包含遗传改变,使得在从hag启动子转录mRNA后,阻遏CsrA对mRNA翻译的抑制。

[0088] A. 鞭毛蛋白基因转录调控序列

[0089] 许多细菌具有鞭毛蛋白基因同源物。该基因有许多名称,其一些实例为:枯草芽孢杆菌中的hag;大肠杆菌(*Escherichia coli*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)和若干乳杆菌属种类中的fliC;和军团菌属(*Legionella*)物种、弧菌属(*Vibrio*)物种和弯曲杆菌属(*Campylobacter*)物种中的flaA或flaB/C/D/E/F等。

[0090] 在一种实施方案中,鞭毛蛋白基因启动子是hag基因启动子。鞭毛蛋白同源物是芽孢杆菌属例如枯草芽孢杆菌中的hag。在另一种实施方案中,鞭毛蛋白基因启动子对其中待表达主题蛋白质的微生物而言是天然的。例如,这可以是当表达构建体位于细菌染色体中时的情况。

[0091] 如本文使用的,术语“Hag”(或“hag”或“hag”)是指在枯草芽孢杆菌中被注释为“Hag”的蛋白质(或编码这样的蛋白质的基因)或相同或其它属、物种或菌株中的任何同源物,其是用于组装鞭毛的更一般地称为“鞭毛蛋白”的结构亚基。在其他属、物种和菌株中,它有若干其他名称。它在枯草芽孢杆菌中根据以下序列被定义:

atgagaattaaccacaatattgcagcgccttaacacactgaaccgttgtcttcaacaacagtgcgagcca
 aaagaacatggagaaactttcttcaggtcttcgcatcaaccgtgaggagatgacgcagcaggtcttgca
 tctctgaaaaaatgagaggacaaatcagaggtcttgaaatggcttctaaaaactctcaagacggaatctct
 cttatccaaacagctgagggtgcattaactgaaactcatgcatccttcaacgtgttcgtgagctagttgtca
 agctggaaacactggaactcaggacaaagcaactgattgcaatctattcaagatgaaatttcagctttaa
 agatgaaatcgatggtatttcaaatcgtacagaattcaatggtaagaaattgctcgatggcacttacaagtt
 [0092] gacacagctactcctgcaaatcaaaagaacttggtattccaaatcggagcaaatgctacacagcaaatctc
 tgtaaatattgaggatattgggtgctgacgctcttgaattaaagaagctgatggttcaattgcagctcttcattc
 agttaatgatcttgacgtaacaaaattcgagataatgcagcagatactgctgatatcggtttcgatgctcaa
 ttgaaagttggtgatgaagcgatcaaccaagtttcttcaacgtgctaagcttgggtgcggtacaaaatcgct
 agagcacacaattaacaacttaagcgttctgggtgaaaacttgacagctgctgagctcgtatccgtgacgtt
 gacatggctaaagagatgagcgaattcacaagaacaacattcttctcaggcttctcaagctatgcttgctc
 aagcaaacacagccgcaaacgtacttcaattattacgttaa [SEQ ID NO: 6]。

[0093] 如本文使用的,术语“hag启动子”是指与芽孢杆菌属同源的天然存在的鞭毛蛋白基因启动子和具有与其基本上相同的序列或与其特异性杂交的启动子。在枯草芽孢杆菌中,hag启动子包含在hag基因的起始密码子的5'的273个碱基对序列中。它具有以下核苷酸序列:

ggaattgacgccccaaagcatattgatattcacaggaaagaaatttacttgaccattcaggaagaaaataa
 ccgtgcagcagcgttatccagcgtatgatctccgcattatcctcacaataaaagtgaggattttttattttg
 [0094] **tattaacaaaatcagagacaatccgatattaatgatgtagccgggaggaggcgcaaaagactcagc**
cagttacaaaataagggcacaaggacgtgccttaacaacatattcagggaggaacaaaacaATG

[0095] [SEQ ID NO: 7] (其中“ATG”代表hag的起始密码子)。预期从TTAA (加下划线的)开始到起始密码子ATG的粗体序列足以启动基因表达。

[0096] 特别地,hag启动子包含由“ttaa”序列(加下划线的)和“tccgatat”序列(加下划线的)定义的SigD识别序列,“ttaa”序列是-35SigD RNA聚合酶结合位点,并且“tccgatat”序列是-10SigD RNA聚合酶结合位点。此外,hag具有由序列“gcacaaggacgt”[SEQ ID NO: 8] (高亲和力结合位点1,或“BS1”) (加下划线的)和“attcagggaggaa”[SEQ ID NO: 9] (低亲和力结合位点2,或“BS2”) (加下划线的)定义的两个CsrA结合位点。hag启动子还由Shine-Dalgarno序列“agggagga”定义。hag启动子的整体结构在图4中图示。

[0097] 如本文使用的,术语“CsrA”(“Carbon storage regulator A,碳储存调控物A”)是指在枯草芽孢杆菌中被注释为“CsrA”的蛋白质(或编码这样的蛋白质的基因),——或在另一个属或物种中的任何同源物或种间同源物(ortholog),或在同一物种中的种内同源物。CsrA在一些物种中被同源地称为RsmA。CsrA蛋白与在环中具有共有序列AGGA的茎-环RNA基序结合,从而抑制包含共有序列的mRNA中掺入的核苷酸序列翻译成多肽。CsrA可以通过与RNA结合并且阻止翻译来直接抑制或通过与其他方式调控鞭毛表达的蛋白质的另一种RNA结合来间接抑制从hag启动子转录的mRNA的表达。CsrA在枯草芽孢杆菌中根据以下序列被定义:

[0098] atgctagttttatcgcgaaaataaacgaagcgattcaaataggtgctgatattgaagtaaaagtgattgcg
gttgaaggggatcaagtgaaagcttggattgacgccccaaagcatattgatattcacaggaaagaaattta
cttgaccattcaggaagaaaataaccgtgcagcagcgttatccagcgatgtgatctccgcattatcctcaca
aaaaaagtga [SEQ ID NO: 10]。

[0099] 在某些实施方案中,本公开内容的表达构建体包含鞭毛蛋白基因启动子中的遗传修饰,其在从启动子转录成转录物诸如mRNA后,阻遏CsrA对mRNA翻译的抑制。本公开内容预期了对鞭毛蛋白基因启动子并且特别是对hag启动子的若干遗传修饰,以达到该结果。在一些实施方案中,对hag进行遗传修饰以抑制CsrA对翻译的阻遏可以包括改变BS1或BS2中的一个或两个的茎环结构。在一些实施方案中,遗传修饰是一个或多个核苷酸的插入或缺失。

[0100] 遗传修饰可以是与CsrA BS1结合位点结合的一个或多个点突变。BS1可以通过改变CsrA识别序列AGGA中的一个或多个(例如,两个、三个或四个)核苷酸来修饰。例如,BS1的AGGA结合基序可以被修饰为AGAA。可选地,遗传修饰可以包括在12碱基对BS1结合位点中或在结合位点的任一侧上的形成BS1的茎-环二级结构的茎的周围碱基中的一个或多个突变。这包括,例如,对BS1结合位点gcacaaggacgt (SEQ ID NO:8) 中的一个或多个(例如,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个)核苷酸的修饰。可选地,遗传改变可以通过消除允许氢键合的互补性来破坏BS1的茎环结构。这样的改变可以作为参与氢键合的序列taagggcacaaggacgtgcctta[SEQ ID NO:1]中的一个或多个突变进行,例如,以消除一个、两个、三个、四个或多个氢键对。在一种实施方案中,修饰的BS1具有核苷酸序列GCACAAGAACGT[SEQ ID NO:2]。

[0101] 遗传修饰可以是与CsrABS2结合位点结合的一个或多个点突变。这包括在13碱基对BS2结合位点或在结合位点的任一侧上的形成BS2的茎-环二级结构的茎的周围碱基中的一个或多个(例如,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个)突变。这还包括通过消除允许氢键合的互补性来破坏BS2的茎环结构的遗传改变。例如,修饰的BS2可以具有核苷酸序列ATTTAGGGAGGAA[SEQ ID NO:3]。在某些实施方案中,修饰不包括Shine-Dalgarno序列agggagga中核苷酸的变化。

[0102] 将认识到,遗传修饰被选择为在抑制CsrA结合的同时允许mRNA保持核糖体结合活性并且允许翻译。

[0103] 异源核苷酸序列与鞭毛蛋白启动子是异源的。即,异源核苷酸序列是一种在自然界中通常不在hag启动子的控制下的序列,并且通常编码其表达不在鞭毛蛋白启动子的控制下的多肽。主题多肽可以是任何期望表达的多肽。在某些实施方案中,多肽是醛脱氢酶。

[0104] B. 主题多肽

[0105] 可以通过本领域已知的任何方法将异源核苷酸序列放置于与鞭毛蛋白启动子的可操作连接下。例如,异源核苷酸序列可以被整合到细菌染色体中。可选地,异源核苷酸序列可以被附接至引入到微生物中的质粒中的鞭毛蛋白启动子。异源核苷酸序列可以通过例如同源重组靶向hag启动子,如例如PMID: 4994568中描述的。另一种有用的方法包括转座子技术。转座子可以靶向染色体中的特定序列,并且在那里插入和附接核苷酸序列。用于转座

子整合的材料从例如将EZ-Tn5转座酶商业化的Lucigen (Middleton, WI) 可得。

[0106] 作为表达对象的多肽(“主题多肽”)可以是任何期望的多肽。这样的多肽可以是出于获得大量多肽的目的而期望组成性表达的那些多肽。多肽可以是生物药物、食物蛋白质诸如清蛋白或生物化学途径中的酶诸如 α -半乳糖苷酶A。在某些实施方案中,多肽是使可能见于动物的肠中的分析物代谢的酶。这样的分析物可以通过摄入、通过由微生物群产生、通过由受试者产生、或通过跨越肠膜的扩散或主动转运而见于其中。这样的多肽包括例如:肽酶,如二肽基肽酶IV;和脂肪酶,如人类胰腺脂肪酶。

[0107] 在一种实施方案中,多肽是醛脱氢酶。如本文使用的,术语“醛脱氢酶”或“ALDH”是指已知或预测使用乙醛作为底物并且将其催化成不同产物的任何酶。这最常见的是一种已知或预测其功能为催化醛的氧化的酶。一般地,这是指分类EC 1.2.1.-的酶,其使用NAD(P)作为辅因子催化醛氧化成羧酸。它包括将乙醛氧化为乙酸酯/乙酸的酶(例如EC 1.2.1.3、1.2.1.4和1.2.1.5),以及将辅酶A转化为乙酰辅酶A的乙酰化酶(例如EC 1.2.1.10)。它还指使用其他定义的受体的酶,包括(但不限于):使用醌的酶(例如,分类EC 1.2.5.-),或使用其他未知受体的酶(例如,分类EC 1.2.99.-)。

[0108] 在某些实施方案中,醛脱氢酶是人类醛脱氢酶(例如,ALDH2)或非人类醛脱氢酶(例如,AcoD或AldB)。醛脱氢酶可以是细菌醛脱氢酶,并且表达醛脱氢酶的微生物是细菌。醛脱氢酶可以是对将在其中表达基因的微生物而言天然的。

[0109] 主题多肽通过将编码多肽的核苷酸序列放置在本文描述的鞭毛蛋白启动子的转录调控控制下来表达。编码许多基因的核苷酸序列可以见于公开可得的数据库诸如NCBI、uniprot、KEGG、BRENDA等。编码这些多肽的氨基酸序列的多核苷酸可以通过分子生物学领域中熟知的方法连接至启动子。在一种实施方案中,主题多肽不是lacZ。

[0110] IV. σ 因子的阻遏物的破坏

[0111] σ 因子,诸如SigD及其同源物,起始鞭毛蛋白合成。FlgM及其同源物作为 σ 因子活性的阻遏物起作用。本公开内容提供了通过破坏 σ 因子阻遏物诸如FlgM将 σ 因子活性去阻遏。

[0112] 如本文使用的,术语“FlgM”是指在枯草芽孢杆菌中被注释为“FlgM”的蛋白质(或编码这样的蛋白质的基因),或在另一个属或物种中的任何同源物,其抑制负责将RNA聚合酶募集到晚期鞭毛基因用于转录的 σ 因子。这种被抑制的 σ 因子在枯草芽孢杆菌中被称为SigD,在大肠杆菌中被称为FliA,或在其中所述 σ 因子具有同源物的其他属和物种中被潜在地称为其他名称诸如 σ 28。在枯草芽孢杆菌中,FlgM根据以下序列被定义:

[0113] **atgaaaatcaatcaatttggaaacacaatccgtaatccatatcaaaaaaattatgataagcaagcgggtgca
aaaaactgttgcaaacctcaagataaaattgaaatttcacacaggctaaagaaatgcaacatgcatccg
acgcagtcactggttcacgacaggaaaaaattgcgagcttaaagcgcaaattgaaaacgggtcataca
aagtagacgcaaataatgcgaaaaatgattaattttataaaaagcaataa [SEQ ID NO: 11]。**

[0114] 如本文使用的,术语“SigD”是指枯草芽孢杆菌中尤其负责将RNA聚合酶募集到晚期鞭毛基因用于转录的 σ 因子(或编码它的基因)。“SigD”还指其他物种中的同源物,诸如大肠杆菌中的FliA,或若干物种中的 σ -28的更宽的外延。SigD在枯草芽孢杆菌中根据以下序列被定义:

atgcaatccttgaattatgaagatcaggtgctttggacgcgctggaaagagtggaaagatcctaaagccgg
 tgacgacttaatgcccgttacatgccgcttgatcacatatcatgtaggcagaatttctgtcggactgccgaaat
 cagtgcataaagacgatcctatgagccttggtatgcttggtttatgatgcccttgaaaaattgaccccagc
 cgggacttaaaattgatacctacgcctcgcttagaattcgcggcgcaatcatagacgggcttcgtaaagaa
 gattggctgcccagaacctcgcgcgaaaaaacaaggttgaagcagcaattgaaaagcttgaaca
 [0115] gcggtatcttcggaatgtatgcccgcggaaattgcagaggaactcggaaatgacggtacaggatgctcgtgt
 caacaatgaatgaaggtttttgcaaactcgtgtcaattgatgaaaagctccatgatcaagatgacgggg
 aaaacattcaagtcgatcagagatgacaaaaatggtccgcctgaagaaaagattatgaaggatgaact
 gattgcacagcttgcggaaaaaattcacgaaactctgaaaaagaacagctggtgtcagttgttctacaa
 agaggagttgacactgacagaaatcggacaagtattaaatctttctacgtcccgcataatctcagatccattca
 aaggcattatttaaattaagaatctgctggaaaaagtgatacaataa [SEQ ID NO: 12]。

[0116] FlgM经由若干残基与SigD结合,这些残基大部分位于FlgM蛋白的C末端处的第4螺旋。用于失活的靶将是枯草芽孢杆菌FlgM的第3和第4螺旋中对应于I-58、K-62、I-65、G-68、D-73、A-78的高度保守的残基的突变。更广泛地,直接参与与SigD结合的26个残基中的任何一个或组合(如PMID:15068809中鉴定的)可以被突变以潜在地产生具有降低的活性或无活性的蛋白质。可选地,破坏二级结构或三级结构——特别是定义二级结构的4个螺旋——的任何突变或突变组合可以潜在成功地降低或减弱FlgM抑制SigD的能力。

[0117] 在一些实施方案中,重组微生物包含降低FlgM抑制SigD活性的能力的遗传修饰。特别是,一种这样的遗传修饰是部分或完全缺失FlgM基因以降低或消除其生物活性。部分缺失可以包括编码至少25%的蛋白质C末端的基因部分的缺失。

[0118] 其他遗传修饰包括,例如,产生无活性FlgM蛋白的移码突变,或FlgM启动子的破坏。可选地,FlgM可以通过点突变变得无活性,所述点突变使FlgM无功能活性或以其他方式抑制FlgM与SigD结合的能力或以其他方式阻遏SigD。间接地,可以通过使FlgM对活化物诸如ComK或DegU不敏感,或通过使FlgM对阻遏物诸如ScoC或蛋白酶Epr和Wpr过度敏感来破坏FlgM。

[0119] V. 重组微生物

[0120] 预期用于本文使用的重组微生物包含表达系统,该表达系统包括至少一种表达构建体,该表达构建体包含与编码用于表达的主题多核苷酸的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因启动子,该鞭毛蛋白基因启动子被遗传修饰以降低CsrA对翻译的抑制;并且任选地,FlgM基因被遗传修饰以降低对SigD表达的阻遏。

[0121] 重组微生物通常是对动物例如人类的摄入安全的益生微生物。益生微生物包括但不限于芽孢杆菌属、双歧杆菌属、肠球菌属、大肠杆菌、乳杆菌属、明串珠菌属、片球菌属和链球菌属。具体地,本公开内容预期使用芽孢杆菌属的细菌,并且更具体是枯草芽孢杆菌。微生物可以从任何经典来源获得,包括例如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection) (ATCC) 或芽孢杆菌遗传保藏中心(Bacillus Genetic Stock Center) (BGSC)。

[0122] 在某些实施方案中,微生物不是真核生物。例如,微生物不是用于酒精饮料发酵的真核生物,诸如酵母属(Saccharomyces)。

[0123] VI. 益生组合物

[0124] 本文还提供了包含益生微生物的组合物。组合物包含在生理学上可接受的载体中的如本文提供的重组微生物。

[0125] 在某些实施方案中,益生组合物以单位剂量提供。单位剂量将通常在合适的载体中具有 10^4 个至 10^{12} 个之间的菌落形成单位的微生物。这包括如本文描述的任何有效剂量。剂量的总体积可以在约0.05mL和500mL之间,例如在约0.5mL和约50mL之间或在约2.5mL和15mL之间。

[0126] VII. 使用方法

[0127] 本文还提供了使用重组微生物和益生组合物使靶分析物代谢和/或为宿主提供健康或健康益处的方法。

[0128] 宿主可以是任何动物。这包括例如哺乳动物,例如灵长类动物,例如人类。哺乳动物可以属于任何类,诸如偶蹄目(artiodactyla)、食肉目(carnivora)、鲸目(cetacean)、翼手目(chiroptera)、皮翼目(dermoptera)、贫齿目(edentata)、蹄兔类(hyracoidae)、蹄兔类、食虫类(insectivore)、兔形目(lagomorpha)、有袋目(marsupialia)、单孔目(monotremata)、奇蹄目(perissodactyla)、有蹄类(ungulate)、鳞甲目(pholidata)和鳍足目(pinnipedia)。

[0129] 宿主可以以有效产生预期的结果的量摄入本公开内容的益生组合物。预期的结果可以是宿主的肠中的靶分析物的代谢。在这种情况下,主题多肽可以是处理分析物的酶。具体地,本公开内容预期了乙醛的代谢,乙醛是乙醇代谢的产物,其是酒精宿醉的原因。

[0130] 如本文使用的,术语“酒精宿醉”是指由饮用酒精引起的状况,并且特征为以下一种或更多种:脱水、睡眠不佳、体虚(grogginess)、恶心、呕吐、头痛、不适、口干、对光和声音敏感、出汗、肌肉疼痛、腹泻、胃痛、胃肠不适、眩晕、焦虑、抑郁、易怒和身体中乙醛浓度升高。

[0131] 酒精宿醉的预防或治疗,例如缓解,可以包括在饮用酒精之前、期间或之后向受试者施用本公开内容的益生组合物。组合物可以在开始饮用酒精前最多24小时、18小时、12小时、11小时、10小时、9小时、8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、2小时或1小时中的任何一项被摄入。益生组合物可以在饮用酒精期间被施用。益生组合物可以在饮用酒精后最多12小时、11小时、10小时、9小时、8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、2小时或1小时中的任何一项被施用,或在受试者出现酒精宿醉的症状的任何时间施用。

[0132] 组合物可以通过口服饮用或通过肛门施用至个体的肠(例如,胃或肠)。可以向个体施用活的微生物而不是死的微生物。微生物可以以不同于酒精饮料的成分提供,即,可以与酒精饮料分开服用。例如,这可以是在饮用酒精之前施用组合物的情况。

[0133] 益生菌的有效剂量可以取决于酒精宿醉的症状的程度。一般地,重组细菌的剂量将根据诸如受试者的年龄、体重、身高、性别、一般医疗状况和先前的病史的因素而变化。在具体实施方案中,施用约 10^4 CFU至约 10^{12} CFU、 10^5 CFU至 10^{11} CFU、 10^6 CFU至 10^{10} CFU、 10^8 CFU至 10^{10} CFU或 10^8 CFU至 10^{12} CFU(“菌落形成单位”)的微生物的范围内的细菌可能是期望的。

[0134] 在另一种实施方案中,本文公开的微生物被用于产生期望的组合物。产生这样的组合物的方法可以包括培养重组微生物,该重组微生物组成性表达将靶分析物转化成期望的组合物或产生期望的组合物中的中间物的酶。在这种情况下,将靶分析物添加到微生物培养物并且孵育足够的时间以产生酶促产物。

实施例

[0135] 实施例1

[0136] 方法:

[0137] 菌株、质粒和培养基

[0138] 使用来自芽孢杆菌遗传保藏中心的枯草芽孢杆菌菌株PY79 (菌株1A747) 用于所有操作。此处使用的所有枯草芽孢杆菌菌株是PY79的衍生菌株。

[0139] 除非另有说明,否则细菌生长于LB培养基(1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、0.5%氯化钠、[1.5%琼脂,如果是固体培养基])中。对于MLS耐受性选择,使用1 μ g/mL红霉素和25 μ g/mL林可霉素。对于转化实验,细菌生长于改良的感受态(MC)培养基(100mM磷酸盐缓冲液、2%葡萄糖、3mM柠檬酸三钠、22mg/L柠檬酸铁铵、0.1%酪蛋白水解物、0.16%谷氨酸、3mM硫酸镁)中。

[0140] 用于进行遗传修饰的质粒是pMiniMAD[9]。

[0141] 用于在pHyspank启动子下IPTG诱导的表达的质粒是pDR111[10]。1mM IPTG被用于所有诱导。

[0142] f1gM缺失

[0143] 构建了体外转录的双链DNA分子,其含有来自枯草芽孢杆菌PY79的f1gM基因的5'和3'的约800个碱基对,连同由PstI限制性内切酶识别序列隔开的f1gM的编码序列的前15个碱基对和最后15个碱基对(参见表1中的全序列)。然后使用引物ZP24和ZP25(表1)将pMiniMAD线性化。然后使用Gibson组装[11]将所得的PCR产物和 Δ f1gM序列连接在一起以产生pMiniMAD Δ f1gM。经由热转化将所得的质粒转化到大肠杆菌中。使用商购可得试剂盒对质粒进行微制备(miniprep),并且将该微制备的质粒用作进行如下缺失的DNA来源:

[0144] i. PY79的单菌落接种于15mL试管中的2mL的MC培养基中

[0145] ii. 使培养物在37 $^{\circ}$ C生长,以275rpm振荡4.5小时或在退出指数生长后约1小时

[0146] iii. 将400 μ L的培养物转移到新的15mL试管中,并且添加1 μ g微制备的质粒(上文描述的)

[0147] iv. 将培养物与DNA放回37 $^{\circ}$ C的摇床中1.5小时

[0148] v. 在具有1 μ g/mL红霉素和25 μ g/mL林可霉素的LB琼脂上板培养

[0149] vi. 在37 $^{\circ}$ C孵育过夜

[0150] vii. 经由PCR使用引物ZP77和ZP78筛选突变等位基因的分离的菌落,并且将阳性菌落接种在3mL不具有抗生素的LB肉汤中

[0151] viii. 在室温以275rpm振荡生长过夜

[0152] ix. 将10 μ L的在不具有抗生素的LB上的过夜培养物划线分离(isolation streak),并且在37 $^{\circ}$ C生长过夜。由于缺乏抗生素选择,质粒可以在过夜复制期间丢失。观察到的该质粒的稳定性为约90%,在此阶段10个菌落中约有1个菌落失去质粒。

[0153] x. 在具有和不具有抗生素(1 μ g/mL红霉素和25 μ g/mL林可霉素)的LB上一式两份划线分离的菌落,并且在37 $^{\circ}$ C生长过夜

[0154] xi. 用引物ZP77和ZP78进行抗生素敏感菌落PCR筛选以鉴定具有突变等位基因的菌株

[0155] 表1:引物和构建的基因/等位基因

引物	描述	序列
ZP24	用于 gibson的Fwd pMiniMAD	CTGGCGTTACCCAACCTTAATC [SEQ ID NO: 13]
ZP25	用于 gibson的Rev pMiniMAD	CTTGGCGTAATCATGGTCATAG [SEQ ID NO: 14]
ZP77	flgM fwd	GAGGAAACAGGTGTGGAAGAAG [SEQ ID NO: 15]
ZP78	flgM rev	GGTCATCTTCTGTCTGCGTG [SEQ ID NO: 16]
[0156]	Δ flgM 等位基因	CTATGACCATGATTACGCCAAGTGAATAATGAGAAACAGTCAAA GAAAAAGAAAACAGAACGCCTGCTGTCAGAGTGCATTTTTGATA CAAAAATAATTCAGCAGAAGGTATGAATATCATTTTTAATAGAC GATCTTTATACAACAGGCCGCCACCTTGCACTTCGCAGCCCGCT GCTTATTAGAAAAAGGAAAAGCCGCTTCAGTGCATCTTTTACC TTGATCAGAAGCTAAATGATTCTGTTTTTATGCCGATATAATCAC TAGAAATTGACACAGGCATATTATCTAATAAGGAGAAAAAAGA TGGGAGAAGTGGCTAATTGTCCGAAATGCAATGCTTTATTTTTA AAAACAAAGCTGCAAACCGTATGTCAGGCGTGATTAAGGAAG AAGAAAAATCATTTGAGACTGTCTATAAATTTTTAAGAAAACAGG AAAACCGGCAATCAACTTTGAGCCGGATAACTGAGGAAACAGG TGTGGAAGAAGAGCTGATATTGAAATTCATCAGGCAGAAGCGA ATTCAGATCACTCATCTTCCTAATTTGGCATACCCTTGTGAAAG GTGCGGGACATCGATTAGAGAAGGCAAGTTCTGCAAGGCTTGC CAGTCTGATATTAAGGATCAAATGGATCATTTGAACCACGAGGA TGCTCTGAAAATCGAGAAAGAAAATAGTAAAAAAGACACATACT ATGCCTATAATACCAAAAACAGCTGATCCCTAACTAACTGAA AACGCAGTCGATAAAAGGGTTAAGATTGTTTAAAGACTGCAACG GAAAGCGAGAGGAATCCTATGAAAATCAATCAACTGCAGTTTTA

[0157]

		<p>TAAAAGCAATAAAAAGGAGAAAGCCCATGTCAGCGAAGGCA ATTATTGAACAATTGAAGCGACTTTGCGTTCTGCATGAGCACCT GCTCACGCTGTCTGAAGAAAAGACGGAAGCGCTCAAAGCCGG CAAAACAAAAGAGCTTTCTAACATTTTGACAAAAGAGCAAAAT ATATTCAAGCAATCACGCAGACAGAAGATGACCCGGATCAAAC AACTTCGGCCTTTCTCGGATATAGCGAAAATAACTATTTCCG CATGTATCGCCAAAACCTCAGGCAGTGAAGGAAGAGCTGGA ACAACTATACGAATCTCTTTCTCAAGTTCTCGGACGTCTGAAA AAGTAAATGAGATGAATAGGCAGCTGACAAGAGACGCGCTGCA ATTCATCTCTATTTCTGACGATATGCTGGTTCCTAAGGAAAATA CTTCAATTACAGCAAATCAATTAAGCTGAGCTGCCGAAAAGTA GCAAAATGAACTGTTTGATTCAAAGCTTAGCAGAAAGGAATT CAGAAAATGACATCTACCTTTATGGGGCTTGAACTGCAAGGC GGGCGTTAAGCGCTCAGCAGGCAGCGTTAAGCACTACTGCAAA TAACGTGGCAAATGCCAATACTGATGGTTATACAAGACAGCGG GTCTCATTGGAGGCAACTGACTATTTCCCTGCTGTATCTAAAA TGCAGAAAAACAGCGGGACAAATGGGTACGGGGCGTTCAAGG AAAATCAGTTGAGAGAATAAGAGATATCTTTCTTGACTACCAAT ACCGTCTTCAAACCTGGCGTTACCAACTTAATC [SEQ ID NO: 17]</p>
	phag + GFP	<p>CTATGACCATGATTACGCCAAGTGAACAATGATCATTACATCGA AGTACCATGGCCAAATGAACATAAAAGAAGAACAATCATTCTT TTTGAAGCGGGATTCCAGGCTTTTTAGAAGAAAACAGTTCGT CATACTTCCGCTTTCAGAAGACTCTCCATTCGTGGCACTGCAGT CCGTCACTTCAGAAAATCTTGCGTTTATCGTCGTAAGTCCGTTT ATCTTTTTTAAGAATTATGAATTTGATCTTGATGAATCAACTGCT GAACTTTTGGATATCGATAATATTCAAGACGTAGAAGTCATGAC AATATTGACTATGGCAGAGCCATTTGAAAAGTCTACTGCGAATT TATTGGCTCCCATTATTGTGAATCGCAAGAACATGATGGCTAAG CAAGTCGTTTTACACGACTCCTCATATACGACAAAGCATCCGAT TGGAGGAGAATCATGCTAGTTTTATCGCGAAAATAAACGAAG CGATTCAAATAGGTGCTGATATTGAAGTAAAAGTGATTGCGGTT GAAGGGGATCAAGTGAAGCTTGGAATTGACGCCCCAAAGCATA TTGATATTCACAGGAAAGAAATTTACTTGACCATTACAGGAAGAA AATAACCGTGCAGCAGCGTTATCCAGCGATGTGATCTCCGCAT TATCCTCACAAAAAAGTGAGGATTTTTTTATTTTTGTATTAACA AAATCAGAGACAATCCGATATTAATGATGTAGCCGGGAGGAGG CGCAAAGACTCAGCCAGTTACAAAATAAGGGCACAAGAACGT GCCTTAACAACATATTCAGGGAGGAACAAAACAATGCGTAAAG GAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTA GATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCACTGGAGAGG GTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAAATTTATT TGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAAACTTGTACAC TACTTTCCGTTATGGTGTTCATGCTTTGCGAGATACCCAGATC ATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGG TTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAGATGACGGGAACT ACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTGT</p>

[0158]

		<p>AATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAA CATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACATAACTCACACAATG TATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAAC TTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGC AGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCC TTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCG AAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGT TTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATAC AAATAATTTTAAAAAGACCTTGGCGTTGCCAGGGTCTTTTAATT TAAATTTCTATCTCCTAATCATTCCCTCATCTGTCACTAACTCAT GATATAATAACCGGATTCTCCACTAACTTTTTATAAATGTATTTT CATACAAGAAATCTAAAACAGAAGATTTTTTCCAAAAATATGTG TAATCTTATCTCGACTTAGTCGATATAAACGATAGATTGGGGCA TAGGGGATGATCAATTGAACATTGAAAGGCTCACTACGTTACAA CCTGTTTGGGATCGTTATGATACTCAAATACATAATCAGAAAGA TAATGATAACGAGGTTCCCTGTTTCATCAAGTTTCATATACCAATCT TGCTGAAATGGTGGGGGAAATGAACAAGCTTTTGGAACCTTCG CAAGTTCATCTGAAGTTCGAGCTTCATGACAAGTTAAATGAATA CTATGTAAAGGTAATAGAGGACTCTACAAATGAAGTGATCCGC GAAATTCACCAAAAACGGTGGCTTGATTTTTATGCGGCTATGAC TGAATTTCTTGGGTTATTTGTAGATGAAAAAAGTAGAATAGGA GTGGTTGAGATGGTCACAAGAATAACAGGTCTGGCGTCAGGA ATGGATATAGATGATATCGTATCAAAGCTGATGCAGACAGAAAG AGCGCCGCTTGATAAGCTGACACAAAAAAGCAGACTCTTGAA TGGCAGCGTGACAGCTATCGTGAAGTAAACTCAAAAATAAAG AATTGCAAGATTATATGTCTAAAATACGTTGACATATCCGAGC ACGTATCAGAGCAACTGGCGTTACCCAACCTTAATC [SEQ ID NO: 18]</p>
	phag + AcoD	<p>CTATGACCATGATTACGCCAAGTGAACAATGATCATTCATACGA AGTACCATGGCCAAATGAACATAAAAGAAGAACAATCATTCTT TTTGAAAGCGGGATTCCAGGCTTTTTAGAAGAAAAACAGTTCGT CATACTTCCGCTTTCAGAAGACTCTCCATTCGTGGCACTGCAGT CCGTCACCTCAGAAAATCTTGCGTTTATCGTCGTAAGTCCGTTT ATCTTTTTTAAGAATTATGAATTTGATCTTGATGAATCAACTGCT GAACTTTTGGATATCGATAATATTCAAGACGTAGAAGTCATGAC AATATTGACTATGGCAGAGCCATTTGAAAAGTCTACTGCGAATT TATTGGCTCCCATTATTGTGAATCGCAAGAACATGATGGCTAAG CAAGTCGTTTTACACGACTCCTCATATACGACAAAGCATCCGAT TGGAGGAGAATCATGCTAGTTTTATCGCGGAAAATAAACGAAG CGATTCAAATAGGTGCTGATATTGAAGTAAAAGTGATTGCGGTT GAAGGGGATCAAGTGAAGCTTGAATTGACGCCCCAAAGCATA TTGATATTCACAGGAAAGAAATTTACTTGACCATTACAGGAAGAA AATAACCGTGACAGCAGCGTTATCCAGCGATGTGATCTCCGCAT TATCCTCACAAAAAAGTGAGGATTTTTTTATTTTTGTATTAACA AAATCAGAGACAATCCGATATTAATGATGTAGCCGGGAGGAGG CGCAAAGACTCAGCCAGTTACAAAATAAGGGCACAAGAACGT GCCTTAACAACATATTCAGGGAGGAACAAAACAATGAATATGGC</p>

[0159]

TGAAATCGCCAGCTTGGAGTCTCAAACCCGTACAAACAACAG
TACGAAAACCTATATTGGCGGAGCTTGGGTTCCGCCGGCCGGTG
GCGAATACTTTGAATCTACAACGCCGATTACGGGAAAACCTTTT
ACAAGAGTTCCGCGCTCCGGCCAACAGGATGTGGACGCAGCG
TTAGATGCTGCCCATGCAGCGAAAGCTGCCTGGGCTAGAACAT
CAACAACGGAACGCGCCAATATTTTAAACCGCATCGCAGATCG
TATTGAAGCGAATTTGAAACTGCTTGCTGTGCGCCGAAAGCATTG
ACAACGAAAACCTGTAAGAGAAACAACGGCAGCGGATCTGCC
GCTTGCAGTGGACCATTTTCGTTATTTTGCAGTTGCATCAGAG
CACAAGAAGGCGGCATTAGCGAAATCGATGCAGACACAATTGC
GTACCATTTTCATGAACCTCTGGGTGTTGTGGGCCAGATTATCC
CGTGAATTTTCCTTTATTGATGGCGACGTGAAACTGGCACC
GGCGCTTGCTGCCGAAACTGTGTCGTACTTAAACCTGCAGAA
CAAACACCGGCGTCTATCTTAGTTTTGATGGAAGTGATTGGCG
ATCTGCTGCCGCGGGCGTTGTGAATGTCATCAACGGTTTTGG
CTTAGAAGCTGGCAAACCTTTGGCCTCAAGCCC GCGTATTTCC
AAAGTAGCTTTTACGGGTGAAACAACGACAGGCCGGTTAATCA
TGCAATATGCATCACAGAATTTGATTCTGTTACACTGGAACCTT
GGCGGAAAAAGCCCGAACATTTTCTTTGAAGATGTGTTAGCAG
CGGATGACGCATTTTTTCGACAAAGCGCTGGAAGGATTTGCAAT
GTTTGCCTTAATCAAGGCGAAGTTTGCACATGTCCTTCACGTG
CTCTGATCCAGGAAAGCATTATGATCGGTTTATGAAAGAGCC
CTGAAACGCGTGGCTGCCATCAGACAAGGACATCCGCTTGACA
CGGGAACAATGATTGGTGTCAAGCCTCTGCAGAACAGTTAGA
AAAAATCTTGTCTACATTGATCTGGGCAGAAAAGAAGGAGCA
CAGTGCCTTACGGGTGGCGAACGCAATGTCTGGATGGCGAC
CTTGCAGGCGGCTATTACGTCAAACCTACGATTTTGCGGGAC
ATAACAAAATGCGCATCTTTCAAGAAGAAATTTTTGGCCGGTC
GTAAGCGTTACGACATTTAAAGATGAAGAAGAAGCACTGGCTAT
CGCCAACGACACGTTATATGGATTGGGTGCGGGCGTTTTGGACA
AGAGATGGAGCACGTGCGTTTTCGGATGGGAAGAGGTATTCAAG
CTGGCCGCGTGTGGACGAATTGTTATCATGCTTACCCGGCCCA
TGCAGCGTTTGGCGGATATAAACAGTCTGGCATCGGACGTGAA
AACCATCGGATGATGTTGGATCATTACCAACAGACAAAAAATTT
ATTGGTTTCTTACTCCCCGAACGCGTTGGGCTTTTTCTAATTTTA
AAAAAGACCTTGGCGTTGCCAGGGTCTTTTAAATTTAAATTTCTAT
CTCCTAATCATTCTCATCCTGTCACCTAATCATGATATAATAAC
CGGATTCTCCACTAACTTTTTATAAATGATTTCCATACAAGAAA
TCTAAAACAGAAGATTTTTTTCCAAAAATATGTGTAATCTTATCT
CGACTTAGTCGATATAAACGATAGATTGGGGCATAGGGGATGA
TCAATTGAACATTGAAAGGCTCACTACGTTACAACCTGTTTGGG
ATCGTTATGATACTCAAATACATAATCAGAAAGATAATGATAACG
AGGTTCTGTTTCATCAAGTTTTCATATAACCAATCTTGCTGAAATG
GTGGGGGAAATGAACAAGCTTTTGGAACCTTCGCAAGTTTCATC
TGAAGTTCGAGCTTCATGACAAGTTAAATGAATACTATGTAAG
GTAATAGAGGACTCTACAAATGAAGTGATCCGCGAAATTCAC
CAAAACGGTGGCTTGATTTTTATGCGGCTATGACTGAATTTCTT

[0160]

		<p>GGGTTATTTGTAGATGAAAAAAGTAGAATAGGAGTGGTTTGAG ATGGTCACAAGAATAACAGGTCTGGCGTCAGGAATGGATATAG ATGATATCGTATCAAAGCTGATGCAGACAGAAAGAGCGCCGCT TGATAAGCTGACACAAAAAAGCAGACTCTTGAATGGCAGCGT GACAGCTATCGTGAAGTAAACTCAAAAATAAAAGAATTGCAAGA TTATATGTCTAAAAATACGTTGACATATCCGAGCACGTATCAGA GCAACTGGCGTTACCCAACCTAATC [SEQ ID NO: 19]</p>
	phag + AldB	<p>CTATGACCATGATTACGCCAAGTGAACAATGATCATTACATCGA AGTACCATGGCCAAATGAACATAAAAGAAGAACAATCATTCTT TTTGAAAGCGGGATTCCAGGCTTTTTAGAAAGAAAAACAGTTCGT CATACTTCCGCTTTCAGAAGACTCTCCATTCGTGGCACTGCAGT CCGTCACCTCAGAAAATCTTGCGTTTATCGTCGTAAGTCCGTTT ATCTTTTTTAAGAATTATGAATTTGATCTTGATGAATCAACTGCT GAACTTTTGGATATCGATAATATTCAAGACGTAGAAGTCATGAC AATATTGACTATGGCAGAGCCATTTGAAAAGTCTACTGCGAATT TATTGGCTCCCATTTATTGTGAATCGCAAGAACATGATGGCTAAG CAAGTCGTTTTACACGACTCCTCATATACGACAAAGCATCCGAT TGGAGGAGAATCATGCTAGTTTTATCGCGGAAAATAAACGAAG CGATTCAAATAGGTGCTGATATTGAAGTAAAAGTGATTGCGGTT GAAGGGGATCAAGTGAAGCTTGAATTGACGCCCAAAGCATA TTGATATTCACAGGAAAGAAATTTACTTGACCATTACAGGAAGAA AATAACCGTGCAGCAGCGTTATCCAGCGATGTGATCTCCGCAT TATCCTCACAAAAAAGTGAGGATTTTTTTATTTTTGTATTAACA AAATCAGAGACAATCCGATATTAATGATGTAGCCGGGAGGAGG CGCAAAAGACTCAGCCAGTTACAAAATAAGGGCACAAAGAACGT GCCTTAACAACATATTCAGGGAGGAACAAAACAATGACCAATAA TCCCCCTTCAGCACAGATTAAGCCCGGCGAGTATGGTTTCCC CTCAAGTTAAAAGCCCGCTATGACAACCTTATTGGCGGCGAAT GGGTAGCCCCTGCCGACGGCGAGTATTACCAGAATCTGACGC CGGTGACCGGGCAGCTGCTGTGCGAAGTGGCGTCTTCGGGCA AACGAGACATCGATCTGGCGCTGGATGCTGCGCACAAAGTGAA AGATAAATGGGCGCACACCTCGGTGCAGGATCGTGCGGCGAT TCTGTTTAAGATTGCCGATCGAATGGAACAAAACCTCGAGCTGT TAGCGACAGCTGAAACCTGGGATAACGGCAAACCCATTGCGGA AACCAGTGCTGCGGATGTACCGCTGGCGATTGACCATTTCCGC TATTTGCTCGTGTATTTCGGGCGCAGGAAGGTGGGATCAGTG AAGTTGATAGCGAAACCGTGGCCTATCATTCCATGAACCGTTA GGCGTGGTGGGGCAGATTATCCCCTGGAACCTCCCGCTGCTG ATGGCGAGCTGGAATAATGGCTCCCAGCGCTGGCGGCGGGCAAC TGTGTGGTGTGAAACCCGCACGTCTTACCCCGCTTTCTGTAC TGCTGCTAATGGAATTGTCGGTGATTTACTGCCGCCGGGCGT GGTGAACGTGGTCAATGGCGCAGGTGGGGTAATTGGCGAATA TCTGGCGACCTCGAAACGCATCGCCAAAGTGGCGTTTACCGGC TCAACGGAAGTGGGCCAACAAATTATGCAATACGCAACGCAAA ACATTATTCCGGTGACGCTGGAGTTGGGCGGTAAGTCGCCAAA TATCTTCTTTGCTGATGTGATGGATGAAGAAGATGCCTTTTTCG ATAAAGCGCTGGAAGGCTTGCCTTTGACTGTTGCTTTAACCGGG</p>

[0161]

```

CGAAGTTTGCACCTGTCCGAGTCGTGCTTTAGTGCAGGAATCT
ATCTACGAACGCTTTATGGAACGCGCCATCCGCCGTGTCGAAA
GCATTCGTAGCGGTAACCCGCTCGACAGCGTGACGCAAATGG
GCGCGCAGGTTTCTCACGGGCAACTGGAACCATCCTCAACTA
CATTGATATCGGTAAAAAAGAGGGCGCTGACGTGCTCACAGGC
GGCGGCGCAAGCTGCTGGAAGGTGAACTGAAAGACGGCTAC
TACCTCGAACCGACGATTCTGTTTGGTCAGAACAATATGCGGG
TGTTCCAGGAGGAGATTTTTGGCCCGGTGCTGGCGGTGACCA
CCTTCAAACGATGGAAGAAGCGCTGGAGCTGGCGAACGATAC
GCAATATGGCCTGGGCGCGGGCGTCTGGAGCCGCAACGGTAA
TCTGGCCTATAAGATGGGGCGCGCATAACAGGCTGGGCGCGT
GTGGACCAACTGTTATCACGCTTACCCGGCACATGCGGCGTTT
GGTGGCTACAAACAATCAGGTATCGGTCGCGAAACCCACAAGA
TGATGCTGGAGCATTACCAGCAAACCAAGTGCCTGCTGGTGAG
CTACTCGGATAAACCGTTGGGGCTGTTCTAATTTAAAAAAGAC
CTTGGCGTTGCCAGGGTCTTTTAATTTAATTTCTATCTCCTAAT
CATTCCATCCTGTCACTAACTCATGATATAATAACCGGATTCT
CCACTAACTTTTTATAAATGTATTTCCATACAAGAAATCTAAAC
AGAAGATTTTTTCCAAAAATATGTGTAATCTTATCTCGACTTAG
TCGATATAAACGATAGATTGGGGCATAGGGGATGATCAATTGA
ACATTGAAAGGCTCACTACGTTACAACCTGTTGGGATCGTTAT
GATACTCAAATACATAATCAGAAAGATAATGATAACGAGTTCC
TGTTTCATCAAGTTTCATATACCAATCTTGCTGAAATGGTGGGG
AAATGAACAAGCTTTTGAACCTTCGCAAGTTCATCTGAAGTTC
GAGCTTCATGACAAGTTAAATGAATACTATGTAAAGGTAATAGA
GGACTCTACAAATGAAGTGATCCGCGAAATCCACCAAACCGG
TGGCTTGATTTTTATGCGGCTATGACTGAATTTCTTGGGTTATTT
GTAGATGAAAAAAGTAGAATAGGAGTGGTTTGAGATGGTCAC
AAGAATAACAGGTCTGGCGTCAGGAATGGATATAGATGATATC
GTATCAAAGCTGATGCAGACAGAAAGAGCGCCGCTTGATAAGC
TGACACAAAAAAGCAGACTCTTGAATGGCAGCGTGACAGCTA
TCGTGAAGTAACTCAAAAATAAAGAATTGCAAGATTATATGT
CTAAAAATACGTTGACATATCCGAGCACGTATCAGAGCAACTG
CGTTACCCAACCTAATC [SEQ ID NO: 20]

```

[0162] 用acoD、aldB或GFP基因替换hag

[0163] 构建了侧翼为在hag基因的5'和3'的800个碱基对的编码GFP或醛脱氢酶AcoD(来自钩虫贪铜菌)和AldB(来自大肠杆菌)的双链DNA(序列参见表1)。此外,通过指定每种构建体在GFP/AcoD/AldB编码序列的5'正好38个碱基对处的5'侧翼hag同源物中具有单个点突变,将天然存在的“G”变为“A”(“A”突变在表2的这些序列中突出显示),来破坏CsrA结合位点。经由Gibson组装将这些连接到用ZP24和ZP25线性化的pMiniMAD质粒中。经由热转化将所得的质粒转化到大肠杆菌中。使用商购可得的试剂盒对质粒进行微制备,并且将该微制备的质粒用作DNA来源以遵循与f1gM缺失相同的方案进行染色体修饰。

[0164] GFP测定来定量启动子强度

[0165] 在LB板上涂布(struck out)待测试的菌株,并且在37°C生长过夜。将来自过夜生长的单个菌落接种到3mL的LB中,并且添加1mM IPTG以诱导具有在IPTG可诱导的pHyspank启动子下的GFP的枯草芽孢杆菌的菌株。菌株在37°C,以275rpm振荡生长7小时。在2.5小时、4小时、5.5小时和7小时获取时间点。通过从每支管取出200μL的培养物并且在13,000×g旋降(spin down)2分钟,并且然后将沉淀重悬于200μL的PBS中,获取时间点。然后将这些重悬

物等分到costar黑色96孔板的孔中,并且在荧光计上读取(激发485nm;发射535nm)。在荧光读取后,取每个孔的100 μ L,并且在分光光度计上读取600nm处的吸光度,以将荧光针对培养物的光密度归一化。

[0166] 对于板观察,冷冻的储备物在LB板上在斑块(patch)中划线,并且在37 $^{\circ}$ C生长过夜。用蓝色LED闪光灯(480nm波长)和橙色滤光片观察荧光。

[0167] HPLC测定以定量ALDH活性

[0168] 样品制备:将来自在37 $^{\circ}$ C在LB板上过夜生长的单个菌落接种到4mL的LB培养基中,并且在37 $^{\circ}$ C以275rpm振荡生长1.75小时至OD₆₀₀为约0.2,并且然后分成两支各2mL的管。对于每个菌株,一支管用1mM IPTG诱导,并且另一支管保留不诱导作为对照。诱导后5小时(总生长6.75小时),评估OD₆₀₀(所有菌株OD₆₀₀为约4),并且将1.5mL培养物在6000 \times G旋降5分钟,然后将沉淀重悬于200 μ L的PBS中。将22 μ L的2M乙醛添加到每支管的细胞,以给出最终浓度为200mM的乙醛。然后将管在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。然后将细胞在20,000 \times G于4 $^{\circ}$ C旋降10分钟,并且将150 μ L的所得上清液添加到1350 μ L的PBS中(因此,如果无乙醛损失,最终浓度现在应该是20mM)。然后将这些稀释的上清液在-20 $^{\circ}$ C冷冻于1.5mL微量离心管中。

[0169] 标准物制备:将168 μ L的乙醛添加到1332 μ L的PBS以制成2M储液,并且在-20 $^{\circ}$ C冷冻。在实验当天新鲜制备用于制备HPLC的标准曲线的样品,通过将该2M储液稀释到PBS中,获得最终浓度为1mM、2.5mM、5mM、10mM和20mM的标准物。每种标准物以一式两份制备,一套在样品前运行,并且一套在样品后运行。然后,将所有标准物和样品装载到HPLC小瓶中,HPLC小瓶填充至颈部以限制顶部空间。样品,但不是标准物,通过0.2 μ m过滤器过滤,以在装载到HPLC小瓶中时去除任何残留细菌。

[0170] 样品在具有Aminex HPX-87H柱的Shimadzu系统上运行。样品以0.6mL/min的流速运行,并且用0.005M硫酸流动相在50 $^{\circ}$ C(柱温)等度洗脱。经由折射率检测样品。

[0171] AcoD表达的定性分析(考马斯染色)

[0172] 将来自在37 $^{\circ}$ C在LB平板上过夜生长的单个菌落接种到2.5mL的LB培养基中(对于具有pHyspank启动子的菌株,+1mM IPTG),并且在37 $^{\circ}$ C以275rpm振荡生长4.5小时。将1.5mL的每种培养物在13,000 \times G旋降2分钟,并且将沉淀重悬于50 μ L的裂解缓冲液(20mM TRIS、10mM EDTA、0.1%溶菌酶、0.01%RNA酶A、0.002%DNA酶I和Roche无EDTAc0mplete蛋白酶抑制剂混合片剂,按照制造商说明稀释)中。然后将样品在裂解缓冲液中在37 $^{\circ}$ C水浴中孵育30分钟。然后将50 μ L的2 \times laemmli缓冲液添加至样品,并且将样品在100 $^{\circ}$ C在热循环仪上孵育5分钟。然后将样品在13,000 \times G旋降2分钟,并且将10 μ L装载到8% SDS-PAGE凝胶上,并且在140V运行1小时。然后用ddH₂O振荡漂洗凝胶6次,每次5分钟。然后在考马斯亮蓝染料中在室温振荡孵育过夜。

[0173] 结果:

[0174] ALDH基因在枯草芽孢杆菌中的异源表达引起生理学相关速率(physiologically relevant rates)的乙醛分解。

[0175] 为了评估枯草芽孢杆菌异源表达功能性乙醛脱氢酶的能力,构建了编码在IPTG可诱导的pHyspank启动子的控制下的乙醛脱氢酶基因的菌株。在查阅文献后,选择了两种不同的乙醛脱氢酶。选择的标准是:经表征的酶动力学和对乙醛的高特异性;细菌起源;来自非致病细菌;可溶性蛋白质产物(即不与膜结合);和氨基酸序列已知。在进行了这样的搜索

之后,鉴定了若干候选物,并且两种被选为最符合这些标准。第一种是AcoD,由来自钩虫贪铜菌的acoD基因编码[12],其具有通过实验确定的约4 μ M的对乙醛的Km,并且使用NAD作为其将乙醛氧化成乙酸的辅因子。第二个是A1dB,由大肠杆菌的aldB基因编码[13],其具有通过实验确定的约2.5 μ M的Km,并且V_{max}为2U/mg,并且使用NADP作为其辅因子。

[0176] 具有在pHyspank启动子控制下的acoD的枯草芽孢杆菌和具有在pHyspank启动子的控制下的aldB的枯草芽孢杆菌在具有和不具有IPTG诱导的情况下生长,并且然后用200mM IPTG在室温孵育30分钟。然后过滤样品以去除所有细菌,并且在-20°C冷冻。

[0177] 将样品解冻并且以1:10稀释在PBS中,并且标准物在HPLC测定当天新鲜制备。然后在HPLC上运行所有样品,以定量乙醛的量。除了运行两套标准物(一套在运行开始时,一套在运行结束时),在运行开始和结束时运行乙醛的10mM标准物的单一制备物(即同一管运行两次),以控制在HPLC运行期间乙醛的任何潜在蒸发或其他随机损失,因为管将在机器上运行若干小时,并且期望确保按顺序较晚运行的样品将不错误地表现得更低。基于曲线下面积为每个标准样品生成标准曲线,并且最佳拟合线具有>0.99的R²。这条线的方程然后被用于产生每个样品的浓度。该测定的结果展示在图1中。乙醛标准物运行两次基本不存在差异,指示出运行期间乙醛没有从样品显著随机损失。此外,具有未诱导的细菌的样品具有与20mM标准物良好对应的乙醛水平,证明未诱导的细菌无法通过天然存在的机制有效去除乙醛。

[0178] 然而,当A1dB或AcoD被诱导时,样品显示出乙醛浓度(分别)降低约4mM和约8mM,指示出蛋白质的诱导引起乙醛的去除。

[0179] f1gM缺失和CSrA结合位点点突变的组合引起经由hag启动子的稳健和组成性异源蛋白质表达。

[0180] 由枯草芽孢杆菌中的hag基因编码的鞭毛蛋白在细胞确定运动性有益时以极高水平表达。然而,因为鞭毛的制造对细胞来说非常耗费营养和能量,在生命周期中当运动性将是不适当的时候它具有若干机制来阻遏Hag的产生。

[0181] 已知F1gM与活化hag的转录的 σ 因子SigD因子结合并且阻遏SigD因子。因此,f1gM的缺失应当去除转录阻遏,并且引起高水平的组成性表达。hag翻译成蛋白质在转录后被CsrA进一步阻遏,CsrA在核糖体结合位点与hag转录物结合,因此竞争性抑制核糖体翻译。该结合位点中的单个点突变排除了CsrA结合,但不排除核糖体结合,因此允许hag转录物的组成性翻译。

[0182] 为了测试去除这两种关键的阻遏机制将引起异源蛋白质的稳定和组成性表达的假设,使f1gM缺失,在CsrA结合位点进行单个点突变,并且将hag基因替换为表达报告物GFP。将该菌株在板上的荧光与经由去阻遏的pHyspank启动子表达GFP的菌株(使lacI从该构建体缺失以确保组成性表达,并且 Δ lacI菌株显示出具有与具有完整lacI并且用1mM IPTG诱导的菌株相似的GFP表达水平[数据未示出])的荧光进行比较。当被同时涂布时,修饰的hag表达系统的两种不同分离株在定量上比pHyspank表达系统亮得多(图2a)。

[0183] 然而,为了观察表达是否确实是组成性的并且定量这两种表达系统之间的差异,获取了肉汤生长和荧光时间过程。菌株生长于LB中,并且在生长的2.5小时并且然后其后每90分钟直到7小时评估OD₆₀₀和荧光(图2b)。事实上,在2.5小时后,在修饰的hag表达系统中,归一化到OD₆₀₀的荧光比在pHyspank表达系统中高约4倍。这在4小时内增加到约10倍高,并

且在评估的7小时内保持约10倍高。

[0184] 使用去阻遏的hag启动子,产生了比由pHyspank产生的更高水平的AcoD。

[0185] 为了确保经由我们修饰的hag启动子的稳健和组成性表达不是对GFP特异性的,而是可以用于其它异源蛋白质包括醛脱氢酶表达,将两种不同的醛脱氢酶基因插入到两种不同菌株的hag基因座中:来自钩虫贪铜菌的acoD和来自大肠杆菌的aldB。然后将这些菌株与经由pHyspank启动子表达acoD和aldB的菌株以及作为阳性对照的经由修饰的hag启动子表达GFP的菌株一起在肉汤培养基中培养。将细菌沉淀并且裂解,并且裂解物在SDS-PAGE凝胶上运行,并且使用考马斯染色总蛋白。如预期的,存在GFP的明显条带(图3)。此外,加his标签的AcoD、未加标签的AcoD和加his标签的AldB在经由修饰的hag启动子表达时存在同样亮的条带(图3)。然而,在诱导的pHyspank控制下AcoD和AldB仅存在预期的大小的微弱条带。尽管这种明显低水平的表达,但从HPLC实验已知,该水平足以以生理学相关速率去除乙醛。因此,因为考马斯染色证明存在定量上明显更多的经由修饰的hag启动子产生的蛋白质,合理预期该表达系统将产生如果不是更多的话至少同样稳健的乙醛去除速率。

[0186] 讨论:

[0187] 酶方法正在快速取代小分子并且成为制药界的标准,这在很大程度上是由于其卓越的效力、多功能性和特异性。这可以在以下事实中观察到证据:在2017年,生物药品市场价值超过2000亿美元,并且将在接下来7年内翻一番。此外,2016年中最畅销的10种药物中有8种是生物制品。

[0188] 然而,目前制造生物药物的过程漫长、昂贵,并且通常以类似于制造小分子药物的思维方式进行。为了使这种强大的药物类别可用于更广泛的用途,有必要逐步改变方法。本发明的目的是提供用于酒精宿醉的经济有效、可口服递送的酶疗法。

[0189] 如图1中证明的,两种不同的异源蛋白质的细胞内表达引起乙醛的显著去除。事实上,如果假设一晚上大量饮酒引起结肠乙醛水平为约 $150\mu\text{M}$ [14]并且在72kg人类身体中存在约15L的细胞外液,那么相同量的细菌可以在大致3小时中从15L去除 $150\mu\text{M}$ 的乙醛。虽然这当然是一个“粗略(back-of-the-envelope)”的计算,但至少可以合理地假设这些可以相对代表生理学相关速率。

[0190] 此外,无细菌对照证明,下降不是由于简单的蒸发或一些其他去除方法,并且未诱导的对照证明,去除是对ALDH的表达特异性的而不是细菌的某些固有功能。此外,在运行开始和结束时对相同的20mM标准管的重新读取证明,任何下降不是由于HPLC运行期间的蒸发。此外,乙醛的去除取决于醛脱氢酶的诱导,指示出细菌本身不天然去除乙醛,而是需要异源表达的乙醛脱氢酶。

[0191] 通过去除FlgM和CsrA阻遏,在我们菌株的整个生长周期中,达到了GFP的快速且稳健的组成性表达。这些水平比使用在枯草芽孢杆菌中表达的学术性金标准pHyspank启动子的表达水平高5-10倍的事实证明了表达系统的实用性。此外,还重要的是注意到,荧光/ OD_{600} 比率在整个生长曲线中持续增加,指示出荧光比OD增加快,意味着每个细胞持续产生更多GFP。这与flgM缺失和CsrA结合位点突变引起组成性和稳健表达的假设一致。如果表达在整个生长曲线中不是组成性的,那么荧光与 OD_{600} 的比率最终将稳定或下降,即使绝对荧光继续上升。

[0192] 此外,使用pHyspank启动子完成了乙醛去除的生理学相关速率的证明,指示出我

们的系统使用经编辑的pHag启动子产生更多蛋白质,并且甚至应更充分地超过必需的乙醛去除速率。事实上,考马斯凝胶中AcoD的条带密度的定性比较(图2b)证明了稳健得多的蛋白质条带,指示出优越得多的蛋白质表达。

[0193] 综上所述,已经开发了一种从身体去除乙醛的新型系统,该系统不同于目前描述或执行的任何其他策略。它包括出于直接通过酶的方式去除乙醛的目的被工程化以组成性地表达异源蛋白质的可食用细菌。它使用了一种利用通过去除鞭毛蛋白启动子的阻遏物来增强的稳健的鞭毛蛋白启动子的异源蛋白质表达策略。

[0194] 实施例2

[0195] 受试者摄入1E9 CFU的具有以下修饰的枯草芽孢杆菌的孢子制备物的水悬浮液: FlgM缺失、如本文描述的BS1中的突变,以及hag基因被替换为如本文描述的AcoD。紧接着,这个人在接下来三个小时摄入了六罐酒精饮料(12盎司的5%乙醇),然后睡觉。通常,这种量的酒精引起此人具有酒精宿醉,其特征为:体虚、严重头痛、恶心、不适、对光和声音敏感、眩晕和易怒。这些症状通常在此人睡觉的8小时内出现,并且其后持续12小时。然而,此人8小时后醒来,由于前一天晚上饮用的乙醇的代谢,他或她的身体没有形成任何过量的乙醛。因此,当他或她由于脱水具有轻度的体虚和轻微头痛时,这个人已经大大降低了或者没有与宿醉相关的其他症状。

[0196] 示例性实施方案

[0197] 1.一种用于预防或治疗酒精宿醉的方法,所述方法包括向有相应需要的受试者的肠施用有效量的包含重组细菌的组合物,所述重组细菌经重组工程化以组成性地表达醛脱氢酶。

[0198] 2.如实施方案1所述的方法,其中所述重组细菌包含:

[0199] a) 包含表达构建体的多核苷酸,所述表达构建体包含与编码醛脱氢酶的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因启动子,其中所述鞭毛蛋白基因启动子包含一种或更多种遗传修饰,所述一种或更多种遗传修饰降低CsrA对从所述鞭毛蛋白基因启动子转录的mRNA的翻译的阻遏;和b) σ 因子阻遏物的遗传修饰,其中所述修饰降低对从所述鞭毛蛋白基因启动子的 σ 因子转录起始的抑制。

[0200] 3.如实施方案2所述的方法,其中所述细菌属于选自以下的属:芽孢杆菌属、双歧杆菌属、肠球菌属、埃希氏菌属、乳杆菌属、明串珠菌属、片球菌属和链球菌属。

[0201] 4.如实施方案2所述的方法,其中(1)所述细菌属于芽孢杆菌属,(2)所述鞭毛蛋白基因启动子是经修饰的芽孢杆菌属hag启动子,所述hag启动子包含CsrA BS1结合位点和/或CsrA BS2结合位点的一种或更多种遗传修饰,(3)所述 σ 因子是SigD,并且(4)SigD阻遏物是FlgM。

[0202] 5.如实施方案4所述的方法,其中所述hag启动子包含在12碱基对BS1结合位点中或在所述结合位点的任一侧上的形成BS1的茎-环二级结构的茎的周围碱基中的一种或更多种遗传修饰。

[0203] 6.如实施方案4所述的方法,其中所述hag启动子包含CsrA BS1识别序列AGGA的修饰。

[0204] 7.如实施方案4所述的方法,其中所述hag启动子包含核苷酸序列GCACAAGAACGT [SEQ ID NO:2]。

- [0205] 8. 如实施方案4所述的方法,其中所述一种或更多种遗传修饰包括对所述CsrA BS2结合位点的一个或更多个点突变。
- [0206] 9. 如实施方案4所述的方法,其中所述hag启动子包含通过消除允许氢键合的互补性来破坏BS2的茎环结构的一种或更多种遗传修饰。
- [0207] 10. 如实施方案4所述的方法,其中所述hag启动子包含所述BS2结合位点的修饰,其中所述修饰包括核苷酸序列ATTTAGGGAGGAA[SEQ ID NO:3]。
- [0208] 11. 如实施方案1所述的方法,其中所述醛脱氢酶是细菌醛脱氢酶。
- [0209] 12. 如实施方案4所述的方法,其中所述醛脱氢酶选自(1)来自钩虫贪铜菌的AcoD和(2)来自大肠杆菌的AldB。
- [0210] 13. 如实施方案4所述的方法,其中f1gM基因中的遗传修饰包括所述f1gM基因的全部或部分缺失。
- [0211] 14. 如实施方案4的方法,其中f1gM基因中的遗传修饰破坏二级结构或三级结构。
- [0212] 15. 如实施方案4所述的方法,其中所述表达构建体位于细菌染色体中。
- [0213] 16. 如实施方案1所述的方法,所述方法包括在饮用酒精期间向所述受试者施用所述组合物。
- [0214] 17. 如实施方案1所述的方法,所述方法包括在开始饮用酒精前最多24小时向所述受试者施用所述组合物。
- [0215] 18. 如实施方案1所述的方法,其中所述组合物经口服施用。
- [0216] 19. 如实施方案1所述的方法,其中所述组合物还包含选自以下的生理学上可接受的载体:抗性淀粉、膳食纤维、碳水化合物、蛋白质和糖基化蛋白质、水、胶囊填充剂和胶状物质。
- [0217] 20. 如实施方案1所述的方法,其中所述组合物包含约 10^4 个至约 10^{12} 个菌落形成单位的所述重组细菌。
- [0218] 21. 一种重组微生物,所述重组微生物包含:a)包含表达构建体的多核苷酸,所述表达构建体包含与编码主题多肽的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因启动子,其中所述鞭毛蛋白基因启动子包含一种或更多种遗传修饰,所述一种或更多种遗传修饰降低CsrA对从所述鞭毛蛋白基因启动子转录的mRNA的翻译的阻遏;和b) f1gM基因的遗传修饰,所述f1gM基因的遗传修饰降低对SigD转录起始的抑制。
- [0219] 22. 如实施方案21的重组微生物,所述重组微生物组成性地表达所述多肽。
- [0220] 23. 如实施方案21所述的重组微生物,其中所述微生物是益生的。
- [0221] 24. 如实施方案21所述的重组微生物,其中所述微生物属于选自以下的属:芽孢杆菌属、双歧杆菌属、肠球菌属、埃希氏菌属、乳杆菌属、明串珠菌属、片球菌属和链球菌属。
- [0222] 25. 如实施方案21所述的重组微生物,其中所述微生物属于芽孢杆菌属。
- [0223] 26. 如实施方案21所述的重组微生物,其中所述微生物是枯草芽孢杆菌。
- [0224] 27. 如前述实施方案中任一项所述的重组微生物,其中所述鞭毛蛋白基因启动子是hag启动子。
- [0225] 28. 如实施方案27所述的重组微生物,其中所述hag启动子包含一种或更多种遗传修饰,所述一种或更多种遗传修饰降低CsrA对从所述鞭毛蛋白基因启动子转录的mRNA的翻译的阻遏,其中所述遗传修饰包括CsrA BS1结合位点和/或CsrA BS2结合位点的修饰(例

如,核苷酸取代、插入或缺失)。

[0226] 29. 如实施方案28所述的重组微生物,其中所述一种或更多种遗传修饰包括对CsrA BS1识别序列AGGA的一种或多于一种(例如两种、三种或四种)遗传修饰,例如修饰为序列AGAA。

[0227] 30. 如实施方案28所述的重组微生物,其中所述一种或更多种遗传修饰包括在12碱基对BS1结合位点中或在所述结合位点的任一侧上的形成BS1的茎-环二级结构的茎的周围碱基中的一种或更多种遗传修饰。

[0228] 31. 如实施方案28所述的重组微生物,其中所述一种或更多种遗传修饰包括所述BS1结合位点gcacaaggacgt中的一种或多于一种(例如,至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种)遗传修饰。

[0229] 32. 如实施方案28所述的重组微生物,其中所述一种或更多种遗传修饰通过消除允许氢键合的互补性来破坏BS1的茎环结构。

[0230] 33. 如实施方案28所述的重组微生物,其中所述一种或更多种遗传修饰包括序列taagggcacaaggacgtgcctta[SEQ ID NO:1]中参与氢键合的一种或多于一种遗传修饰,例如以消除一个、两个、三个、四个或更多个氢键对。

[0231] 34. 如实施方案28所述的重组微生物,其中经修饰的BS1具有核苷酸序列GCACAAGAACGT[SEQ ID NO:2]。

[0232] 35. 如实施方案28所述的重组微生物,其中所述一种或更多种遗传修饰包括对所述CsrA BS2结合位点的一个或更多个点突变。

[0233] 36. 如实施方案28所述的重组微生物,其中所述一种或更多种遗传修饰包括在13碱基对BS2结合位点中或在所述结合位点的任一侧上形成BS2的茎-环二级结构的茎的周围碱基中的一种或多于一种(例如,至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种)遗传修饰。

[0234] 37. 如实施方案28所述的重组微生物,其中所述一种或更多种遗传修饰通过消除允许氢键合的互补性来破坏BS2的茎环结构。

[0235] 38. 如实施方案28所述的重组微生物,其中经修饰的BS2具有核苷酸序列ATTAGGGAGGAA[SEQ ID NO:3]。

[0236] 39. 如实施方案28所述的重组微生物,其中对所述BS2结合位点的一种或更多种遗传修饰不包括Shine-Dalgarno序列agggagga中核苷酸的变化。

[0237] 40. 如前述实施方案中任一项所述的重组微生物,其中所述鞭毛蛋白基因启动子位于细菌染色体中或质粒中。

[0238] 41. 如前述实施方案中任一项所述的重组微生物,其中所述主题多肽是醛脱氢酶。

[0239] 42. 如实施方案41所述的重组微生物,其中所述醛脱氢酶是来自钩虫贪铜菌的AcoD,并且包含与以下相同或基本上相同的氨基酸序列:

MNMAEIAQLGVSNPYKQQYENYIGGAWVPPAGGEYFESTTTPITGKPFTRVPRSGQQDVA
ALDAAHAAKAAWARTSTTERANILNRIADRIEANLKLVAESIDNGKPVRETTAADLPLAVD
HFRYFAGCIRAQEGGISEIDADTIAYHFHEPLGVVQIIPWNFPLLMATWKLAPALAAGNCVV
LKPAEQTPASILVMEVIGDLLPPGVVNVINGFGLAEGKPLASSPRISKVAFTGETTTGRLIM
[0240] QYASQNLIPVTLELGGKSPNIFEDVLAADDAFFDKALEGFAMFALNQGEVCTCPSRALIQE
SIYDRFMERALKRVAAIRQGHPLDTGTMIGAQASAEQLEKILSYIDLGRKEGAQCLTGGERN
VLDGDLAGGYVVKPTVFAGHNKMRIFQEEIFGPVWSVTTTFKDEEEALAIANDTLYGLGAGV
WTRDGARAFRMGRGIQAGRVTNICYHAYPAHAAFGGYKQSGIGRENHRMMLDHYQQTK
NLLVSYSPNALGFF [SEQ ID NO: 4]。

[0241] 43. 如实施方案41所述的重组微生物,其中所述醛脱氢酶是人类醛脱氢酶,例如具有与以下相同或基本上相同的氨基酸序列的人类醛脱氢酶:

MLRAAARFGPRLGRRLLSAAATQAVPAPNQQPEVFCNQIFINNEWHDVSRKTFPTVNPS
TGEVICQVAEGDKEDVDKAVKAARAAFQLGSPWRRMDASHRGRLLNRLADLIERDRTYLA
ALETLDNPKPYVISYLVLDLDMVLKCLRYAGWADKYHGKTIPIDGDFFSYTRHEPVGVCG
QIIPWNFPLLMQAWKLGALATGNVVMKVAEQTPLTALYVANLIKEAGFPVGVNIVPG
[0242] FGPTAGAAIASHEDVDKVAFTGSTEIGRVIQVAAGSSNLKRVTLLELGGKSPNIIMSDADM
DWAVEQAHFALFFNQGCCAGSRTFVQEDIYDEFVRSVARAKSRVGNPFDKTEQG
P
QVDETQFKKILGYINTGKQEGAKLLCGGGIAADRGYFIQPTVFGDVQDGMTIAKEEIFGP
VMQILKFKTIEEVGRANNSTYGLAAVFTKDLKANYLSQALQAGTVWVNCYDVFGAQS
PFGGYKMSGSGRELGEYGLQAYTEVKTVTVKVPQKNS [SEQ ID NO: 5]。

[0243] 44. 如实施方案21所述的重组微生物,其中f1gM基因中的遗传修饰包括所述f1gM基因的全部或部分缺失。

[0244] 45. 如实施方案21所述的重组微生物,其中f1gM基因中的遗传修饰包括编码f1gM的活性位点的序列中的单个突变或系列突变。

[0245] 46. 如实施方案21所述的重组微生物,其中f1gM基因中的遗传修饰破坏二级结构或三级结构,诸如在定义F1gM二级结构的螺旋之一中的。

[0246] 47. 如实施方案21所述的重组微生物,其中f1gM基因中的遗传修饰包括改变F1gM蛋白的C末端处的第三螺旋或第四螺旋中的氨基酸,所述氨基酸例如选自枯草芽孢杆菌F1gM的I-58、K-62、I-65、G-68、D-73、A-78。

[0247] 48. 如实施方案21所述的重组微生物,其中f1gM基因中的遗传修饰包括改变预测参与F1gM与SigD结合的一个或更多氨基酸,所述氨基酸例如选自枯草芽孢杆菌F1gM的I-3、G-7、S-10、V-11、A-40、K-41、M43、I-58、L-61、K-62、I-65、Y-70、K-71、V-72、D-73、A-74、H-76、I-77、A-78、N-80、M-81、I-82、N-83、F-84、Y-85和K-86。

[0248] 49. 一种重组益生微生物,所述重组益生微生物组成性地表达醛脱氢酶。

[0249] 50. 如实施方案49所述的重组益生微生物,其中所述微生物包含:a) 包含表达构建体的多核苷酸,所述表达构建体包含与编码主题多肽的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因启动子;和b) F1gM基因中的遗传修饰,所述F1gM基因中的遗传修饰降低对SigD表达的抑制。

[0250] 51.如实施方案50所述的重组益生微生物,其中所述鞭毛蛋白基因启动子包含一种或更多种遗传修饰,所述一种或更多种遗传修饰降低CsrA对从所述启动子转录的mRNA的翻译的阻遏。

[0251] 52.一种多核苷酸,所述多核苷酸包含表达构建体,所述表达构建体包含与编码主题多肽的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因启动子,其中所述鞭毛蛋白基因启动子包含一种或更多种遗传修饰,所述一种或更多种遗传修饰降低CsrA对从所述鞭毛蛋白基因启动子转录的mRNA的翻译的阻遏。

[0252] 53.一种制备多肽的方法,所述方法包括培养如实施方案21或实施方案49所述的重组微生物。

[0253] 54.如实施方案53所述的方法,所述方法还包括分离所述多肽。

[0254] 55.一种组合物,所述组合物包含生理学上可接受的载体和重组益生微生物,其中所述重组益生微生物包含:a)包含表达构建体的多核苷酸,所述表达构建体包含与编码主题多肽的异源核苷酸序列可操作地连接的鞭毛蛋白基因启动子;和b)FlgM基因的遗传修饰,所述FlgM基因的遗传修饰降低对SigD转录起始的抑制。

[0255] 56.如实施方案55所述的组合物,其中所述鞭毛蛋白基因启动子包含一种或更多种遗传修饰,所述一种或更多种遗传修饰降低CsrA对从所述鞭毛蛋白基因启动子转录的mRNA的翻译的阻遏。

[0256] 57.如实施方案55所述的组合物,其中所述主题多肽是醛脱氢酶。

[0257] 58.如实施方案55所述的组合物,其中所述生理学上可接受的载体选自抗性淀粉、膳食纤维、碳水化合物、蛋白质和糖基化蛋白质、水、胶囊填充剂和胶状物质。

[0258] 59.如实施方案55所述的组合物的单位剂量,包含约 10^4 个至约 10^{12} 个菌落形成单位的所述重组益生微生物。

[0259] 60.一种在受试者中的肠中或循环中使分析物代谢的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含组成性地表达使所述分析物代谢的酶的微生物的组合物。

[0260] 61.一种产生靶化合物的方法,所述方法包括:a)使包含如实施方案1所述的重组微生物的培养物与分析物接触,其中所述主题多肽是以所述分析物为底物的酶,并且b)培养所述微生物,其中所述酶催化所述分析物转化成所述靶化合物。

[0261] 62.如实施方案61所述的方法,其中所述酶选自淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶。

[0262] 参考文献目录

[0263] 1.Sprince,H.,et al.,Protective action of ascorbic acid and sulfur compounds

[0264] against acetaldehyde toxicity:implications in alcoholism and smoking.Agents Actions.1975.5(2):p.164-73.

[0265] 2.Mukherjee,S.and D.B.Kearns,The structure and regulation of flagellin Bacillus subtilis.Annu Rev Genet,2014.48:p.319-40.

[0266] 3.Guttenplan,S.B.,S.Shaw,and D.B.Kearns,The cell biology of peritrichous flagellin Bacillus subtilis.Mol Microbiol,2013.87(1):p.211-29.

[0267] 4.Macnab,R.M.,Genetics and biogenesis of bacterial flagella.Annu Rev Genet,1992.26:p.131-58.

- [0268] 5. Caramori, T., et al., Role of FlgM in sigma D-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1996. 178(11): p. 3113-8.
- [0269] 6. Yakhnin, H., et al., CsrA of *Bacillus subtilis* regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (hag) by blocking ribosome binding. *Mol Microbiol*, 2007. 64(6): p. 1605-20.
- [0270] 7. Mukherjee, S., et al., CsrA-FliW interaction governs flagellin homeostasis and a checkpoint on flagellar morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 2011. 82(2): p. 447-61.
- [0271] 8. Vakulskas, C.A., et al., Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2015. 79(2): p. 193-224.
- [0272] 9. Chen, R., et al., Role of the sigmaD-dependent autolysins in *Bacillus subtilis* population heterogeneity. *J Bacteriol*, 2009. 191(18): p. 5775-84.
- [0273] 10. Ben-Yehuda, S., D.Z. Rudner, and R. Losick, RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science*, 2003. 299(5606): p. 532-6.
- [0274] 11. Gibson, D.G., et al., Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 2009. 6(5): p. 343-5.
- [0275] 12. Jendrossek, D., A. Steinbuchel, and H.G. Schlegel, Three different proteins exhibiting NAD-dependent acetaldehyde dehydrogenase activity from *Alcaligenes eutrophus*. *Eur J Biochem*, 1987. 167(3): p. 541-8.
- [0276] 13. Ho, K.K. and H. We Jner, Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the aldB gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2005. 187(3): p. 1067-73.
- [0277] 14. Salaspuro, M., Microbial metabolism of ethanol and acetaldehyde and clinical consequences. *Addict Biol*, 1997. 2(1): p. 35-46.
- [0278] 如贯穿本申请使用的,措辞“可以/可能”以允许的意义(即,意指具有潜力去),而不是强制的意义(即,意指必须)使用。措辞“包括(include)”、“包括(including)”和“包括(includes)”等意指包括但不限于。如贯穿本申请使用的,除非上下文另外清楚指示,否则单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代物。因此,例如,对“一个要素”的引用包括两个或更多个要素的组合,尽管对一个或更多个要素使用了其他术语和短语,诸如“一个或更多个”。除非另有指示,术语“或”是非排他性的,即包括“和”以及“或”二者。
- [0279] 虽然已经在此示出和描述了本公开内容的实施方案,对于本领域技术人员将明显的是,这样的实施方案仅以示例的方式提供。并不意图将本公开内容限制于本说明书中提供的具体实例。虽然已经参考以上提及的说明书描述了本公开内容,但本文的实施方案的描述和说明不意味着以限制性的意义来理解。在不偏离本公开内容的情况下,本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替换。此外,应当理解,本公开内容的所有方面并不限于本文阐述的取决于多种条件和变量的具体描绘、配置或相对比例。应当理解,在实践本公开内容时可以采用本文描述的本公开内容的实施方案的多种替代选择。因此可以预期,本公开内容还应涵盖任何这样的替代选择、修改、变化或等同物。意图以下权利要求界定本公开内容的范围,并且从而涵盖在这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同物。

序列表

	<110> Z 生命科学公司	
	<120> 用于益生微生物的基因表达系统	
	<130> 1642-001-US	
	<140>	
	<141>	
	<150> 62/558, 346	
	<151> 2017-09-13	
	<160> 22	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)	
	<400> 1	
	taagggcaca aggacgtgcc tta	23
	<210> 2	
[0001]	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<400> 2	
	gcacaagaac gt	12
	<210> 3	
	<211> 13	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<400> 3	
	atttagggag gaa	13
	<210> 4	
	<211> 506	
	<212> PRT	
	<213> 钩虫贪铜菌(Cupriavidus necator)	
	<400> 4	
	Met Asn Met Ala Glu Ile Ala Gln Leu Gly Val Ser Asn Pro Tyr Lys	


```

355          360          365
Gly Gly Glu Arg Asn Val Leu Asp Gly Asp Leu Ala Gly Gly Tyr Tyr
370          375          380
Val Lys Pro Thr Val Phe Ala Gly His Asn Lys Met Arg Ile Phe Gln
385          390          395          400
Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Ser Val Thr Thr Phe Lys Asp Glu
405          410          415
Glu Glu Ala Leu Ala Ile Ala Asn Asp Thr Leu Tyr Gly Leu Gly Ala
420          425          430
Gly Val Trp Thr Arg Asp Gly Ala Arg Ala Phe Arg Met Gly Arg Gly
435          440          445
Ile Gln Ala Gly Arg Val Trp Thr Asn Cys Tyr His Ala Tyr Pro Ala
450          455          460
His Ala Ala Phe Gly Gly Tyr Lys Gln Ser Gly Ile Gly Arg Glu Asn
465          470          475          480
His Arg Met Met Leu Asp His Tyr Gln Gln Thr Lys Asn Leu Leu Val
485          490          495
Ser Tyr Ser Pro Asn Ala Leu Gly Phe Phe
500          505

```

[0003]

```

<210> 5
<211> 517
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 5
Met Leu Arg Ala Ala Ala Arg Phe Gly Pro Arg Leu Gly Arg Arg Leu
1          5          10          15
Leu Ser Ala Ala Ala Thr Gln Ala Val Pro Ala Pro Asn Gln Gln Pro
20          25          30
Glu Val Phe Cys Asn Gln Ile Phe Ile Asn Asn Glu Trp His Asp Ala
35          40          45
Val Ser Arg Lys Thr Phe Pro Thr Val Asn Pro Ser Thr Gly Glu Val
50          55          60
Ile Cys Gln Val Ala Glu Gly Asp Lys Glu Asp Val Asp Lys Ala Val
65          70          75          80
Lys Ala Ala Arg Ala Ala Phe Gln Leu Gly Ser Pro Trp Arg Arg Met
85          90          95
Asp Ala Ser His Arg Gly Arg Leu Leu Asn Arg Leu Ala Asp Leu Ile
100         105         110
Glu Arg Asp Arg Thr Tyr Leu Ala Ala Leu Glu Thr Leu Asp Asn Gly
115         120         125
Lys Pro Tyr Val Ile Ser Tyr Leu Val Asp Leu Asp Met Val Leu Lys
130         135         140
Cys Leu Arg Tyr Tyr Ala Gly Trp Ala Asp Lys Tyr His Gly Lys Thr

```


	500	505	510	
	Pro Gln Lys Asn Ser			
	515			
	<210> 6			
	<211> 915			
	<212> DNA			
	<213> 枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)			
	<400> 6			
	atgagaatta accacaatat tgcagcgctt aacacactga accgtttgtc ttcaaacaac			60
	agtgcgagcc aaaagaacat ggagaaactt tcttcaggtc ttcgcatcaa cegtgcggga			120
	gatgacgcag caggtcttgc gatctctgaa aaaatgagag gacaaatcag aggtcttgaa			180
	atggcttcta aaaactctca agacggaatc tctcttatcc aaacagctga gggatgcatta			240
	actgaaactc atgcgatcct tcaacgtgtt cgtgagctag ttgttcaagc tggaaacact			300
	ggaactcagg acaaagcaac tgatttgcaa tctattcaag atgaaatitc agctttaaca			360
	gatgaaatcg atggtatttc aaatcgtaca gaattcaatg gtaagaaatt gctcgatggc			420
	acttacaag ttgacacagc tactcctgca aatcaaaaaga acttgggtatt ccaaategga			480
	gcaaatgcta cacagcaaat ctctgtaaatt attgaggata tgggtgctga cgctcttgga			540
	attaaagaag ctgatggttc aattgcagct cttcattcag ttaatgatct tgacgtaaca			600
	aaattcgcag ataatgcagc agatactgct gatatcggtt tcgatgetca attgaaagt			660
	gttgatgaag cgatcaacca agtttcttct caacgtgcta agcttgggtc ggtacaaaat			720
[0005]	cgtctagagc acacaattaa caacttaagc gcttctgggtg aaaacttgac agctgctgag			780
	tctcgtatcc gtgacgttga catggctaaa gagatgagcg aattcacaaa gaacaacatt			840
	ctttctcagg cttctcaage tatgettget caagcaaacc aacagccgca aaacgtactt			900
	caattattac gttaa			915
	<210> 7			
	<211> 276			
	<212> DNA			
	<213> 枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)			
	<400> 7			
	ggaattgacg ccccaaagca tattgatatt cacagaaag aaatttactt gaccattcag			60
	gaagaaaata accgtgcagc agcgttatcc agcgatgtga tctccgcatc atcctcacia			120
	aaaaagtgag gattttttta tttttgtatt aacaaaatca gagacaatcc gatattaatg			180
	atgtagccgg gaggaggcgc aaaagactca gccagttaca aaataagggc acaaggacgt			240
	gccttaacaa catattcagg gaggaacaaa acaatg			276
	<210> 8			
	<211> 12			
	<212> DNA			
	<213> 枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)			
	<400> 8			
	gcacaaggac gt			12

	<210> 9	
	<211> 13	
	<212> DNA	
	<213> 枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	
	<400> 9	
	attcaggag gaa	13
	<210> 10	
	<211> 225	
	<212> DNA	
	<213> 枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	
	<400> 10	
	atgctagttt tatcgcgaa aataaacgaa gcgattcaaa taggtgctga tattgaagta	60
	aaagtgattg cggttgaagg ggatcaagtg aagcttggaa ttgacgcccc aaagcatatt	120
	gatattcaca ggaaagaaat ttacttgacc attcaggaag aaaataaccg tgcagcagcg	180
	ttatccagcg atgtgatctc cgcattatcc tcacaaaaaa agtga	225
	<210> 11	
	<211> 267	
	<212> DNA	
	<213> 枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	
[0006]	<400> 11	
	atgaaaatca atcaatttgg aacacaatcc gttaatccat atcaaaaaaa ttatgataag	60
	caagcgggtgc aaaaaactgt tgcacaacct caagataaaa ttgaaatttc atcacagct	120
	aaagaaatgc aacatgcac cgcgcagtc actggttcac gacagaaaa aattgvcag	180
	cttaaagcgc aaattgaaaa cgggtcatal aaagtagacg caaatcatat tgcgaaaaat	240
	atgattaatt tttataaaaa gcaataa	267
	<210> 12	
	<211> 765	
	<212> DNA	
	<213> 枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	
	<400> 12	
	atgcaatcct tgaattatga agatcaggtg ctttggacgc gctggaaaga gtggaaagat	60
	cctaaagccg gtgacgactt aatgcgccgt tacatgccgc ttgtcacata tcatgtaggc	120
	agaatttctg tcggactgcc gaaatcagtg cataaagacg atcttatgag ctttggatg	180
	cttggtttat atgatgccct tgaaaaattt gacccagcc gggacttaaa atttgatacc	240
	tacgcctcgt ttagaattcg cggcgcaatc atagacgggc ttcgtaaaga agattggctg	300
	cccagaacct cgcgcgaaaa aacaaaaaag gttgaagcag caattgaaaa gcttgaacag	360
	cggatcttc ggaatgtatc gcccgcgaa attcagagg aactcggaaat gacggtacag	420
	gatgtcgtgt caacaatgaa tgaaggtttt tttgcaaatc tgctgtcaat tgatgaaaag	480
	ctccatgatc aagatgacgg gaaaaacatt caagtcatga tcagagatga caaaaatgtt	540
	ccgcctgaag aaaagattat gaaggatgaa ctgattgcac agcttgcgga aaaaattcac	600
	gaactctctg aaaaagaaca getggttgc agtttgttct acaaagagga gttgacactg	660

	acagaaatcg gacaagtatt aaatctttct acgtcccgca tatctcagat ccattcaaag	720
	gcattattta aattaaagaa tctgctggaa aaagtgatac aataa	765
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 13	
	ctggcgttac ccaacttaat c	21
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 14	
	cttggcgtaa tcatgtcat ag	22
[0007]	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 15	
	gaggaaacag gtgtggaaga ag	22
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 16	
	ggtcattctt tgtctgcgtg	20
	<210> 17	
	<211> 1650	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 17

ctatgacat	gattacgcca	agtgaataat	gagaacacgt	caaagaaaa	gaaaacagaa	60
cgctgctgt	cagagtgcac	ttttgataca	aaaaataatt	cagcagaagg	tatgaatatac	120
atthtaataag	acgatcttta	tacaacaggc	gccaccttgc	acttcgcagc	cgctgctta	180
ttagaaaaag	gaaaageccg	ttcagtgca	tcttttacct	tgatcagaag	ctaaatgatt	240
ctgtttttat	gccgatataa	tcactagaaa	ttgacacagc	catattatct	aataaggaga	300
aaaaaagatg	ggagaactgg	ctaattgtcc	gaaatgcaat	gctttatctt	taaaaacaaa	360
gctgcaaac	gtatgtcagg	cgtgtattaa	ggaagaagaa	aatcatttg	agactgtcta	420
taaattttta	agaaaacagg	aaaaccggca	atcaactttg	agccggataa	ctgaggaaac	480
aggtgtggaa	gaagagctga	tattgaaatt	catcaggcag	aagcgaattc	agatcactca	540
tcttctaat	ttggcatacc	cttgtgaaag	gtgcgggaca	tcgattagag	aaggcaagtt	600
ctgcaaggct	tgccagtctg	atattaagga	tcaaatggat	catttgaacc	acgaggatgc	660
tctgaaaatc	gagaaagaaa	atagtaaaaa	agacacatac	tatgcctata	ataccaaaaa	720
cagctgattc	cctaaactaa	ctgaaaacgc	agtcgataaa	agggttaaga	ttgtttaaag	780
actgcaacgg	aaagcgagag	gaatcctatg	aaaatcaatc	aactgcagtt	ttataaaaag	840
caataaaaaa	ggagaaagcc	catgtcagcg	aaggcaatta	ttgaacaatt	gaagcgactt	900
tgcgttctgc	atgagcacct	gctcacgctg	tctgaagaaa	agacggaagc	gctcaaagcc	960
ggcaaaacaa	aagagctttc	taacatcttg	acaaaagagc	aaaaatata	tcaagcaatc	1020
acgcagacag	aagatgaccg	gatcaaaaac	acttcggcct	ttctcggata	tagcgaat	1080
aatactatct	ccgatgtat	cgccaaaacc	tcaggcagtg	aaaaggaaga	gctggaacaa	1140
ctatacgaat	ctctttctca	agtctctcga	cgtctgaaaa	aagtaaatga	gatgaatagg	1200
cagctgacaa	gagacgcgct	gcaattcctc	tctatttctg	acgatatgct	ggttctctaa	1260
gaaaataact	tcaattacag	caaatcaatt	aaagctgagc	tgccgaaaag	tagcaaaatg	1320
aaactgtttg	attcaaaaagc	ttagcagaaa	ggaattcaga	aaatgacatc	tacctttatg	1380
ggccttga	ctgcaaggcg	ggcgttaagc	gctcagcagc	cagcgttaag	cactactgca	1440
aataacgtgg	caaatgcca	tactgatggt	tatacaagac	agcgggtctc	attggaggca	1500
actgactatt	tccctgctgt	atctaaaaat	gcagaaaaaa	cagcgggaca	aatgggtacg	1560
ggcgttcaag	gaaaatcagt	tgagagaata	agagatatct	ttcttgacta	ccaataccgt	1620
cttcaaac	tgccgttacc	caacttaac				1650

[0008]

<210> 18

<211> 2360

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 18

ctatgacat	gattacgcca	agtgaacaat	gatcattcat	acgaagtacc	atggccaaat	60
gaacataaaa	gaagaacaaa	tcattctttt	tgaagcggg	attccaggct	ttttagaaga	120
aaaacagttc	gtcatacttc	cgctttcaga	agactctcca	ttcgtggcac	tcagctcctg	180
cacttcagaa	aatcttgcgt	ttatcgtcgt	aagtcctgtt	atctttttta	agaattatga	240
atthgatctt	gatgaatcaa	ctgctgaact	tttgatatac	gataatattc	aagacgtaga	300
agtcagtaga	atattgacta	tgccagagcc	atthgaaaag	tctactgcga	atthattggc	360

tcccattatt	gtgaatcgca	agaacatgat	ggctaagcaa	gtcgttttac	acgactcctc	420
atatacgaca	aagcatccga	ttggaggaga	atcatgctag	ttttatcgcg	gaaaataaac	480
gaagcgattc	aaataggtgc	tgatattgaa	gtaaagtga	ttgcggttga	aggggatcaa	540
gtgaagcttg	gaattgacgc	cccaaagcat	attgatattc	acaggaaaga	aatttacttg	600
accattcagg	aagaaaataa	ccgtgcagca	gcgttatcca	gcgatgtgat	ctccgcatta	660
tcctcacaaa	aaaagtgagg	atTTTTTTat	TTTTgtatta	acaaaatcag	agacaatccg	720
atattaatga	tgtagccggg	aggaggcgca	aaagactcag	ccagttacaa	aataagggca	780
caagaacgtg	ccttaacaac	atattcaggg	aggaacaaaa	caatgcgtaa	aggagaagaa	840
cttttcactg	gagttgtccc	aattcttgtt	gaattagatg	gtgatgttaa	tgggcacaaa	900
ttttctgtca	gtggagaggg	tgaaggtgat	gcaacatacg	gaaaacttac	ccttaaattt	960
atTgcacta	ctggaaaact	acctgttcca	tggccaacac	ttgtcactac	tttcggttat	1020
ggtgttcaat	gctttgcgag	atacccgat	catatgaaac	ggcatgactt	tttcaagagt	1080
gccatgcccg	aaggttatgt	acaggaaaga	actatatttt	tcaaagatga	cgggaaactac	1140
aagacacgtg	ctgaagtcaa	gtttgaaggt	gatacccttg	ttaatagaat	cgagttaaaa	1200
ggtattgatt	ttaaagaaga	tggaaacatt	cttggacaca	aattggaata	caactataac	1260
tcacacaatg	tatacatcat	ggcagacaaa	caaaagaatg	gaatcaaagt	taacttcaaa	1320
attagacaca	acattgaaga	tggaagcgtt	caactagcag	accattatca	acaaaatact	1380
ccaattggcg	atggccctgt	ccttttacca	gacaaccatt	acctgtccac	acaatctgcc	1440
ctttcgaaag	atcccaacga	aaagagagac	cacatggtec	ttcttgagtt	tgtaacagct	1500
gctgggatta	cacatggcat	ggatgaacta	tacaataat	tttaaaaaag	accttggcgt	1560
tgccagggtc	ttttaattta	aatttctatc	tectaateat	tcctcatcct	gtcactaact	1620
catgatataa	taaccggatt	ctccactaac	TTTTtataaa	tgtatttcca	tacaagaat	1680
ctaaaaacaga	agattTTTTT	ccaaaaatat	gtgtaatect	atctcgactt	agtcgatata	1740
aacgatagat	tggggcatag	gggatgatca	attgaacatt	gaaaggctca	ctacgttaca	1800
acctgtttgg	gatcgttatg	atactcaaat	acataatcag	aaagataatg	ataacgaggt	1860
tcctgttcat	caagtttcat	ataccaatct	tgctgaaatg	gtgggggaaa	tgaacaagct	1920
tttgaacct	tcgcaagttc	atctgaagtt	cgagcttcat	gacaagttaa	atgaatacta	1980
tgtaaaggta	atagaggact	ctacaaatga	agtgatccgc	gaaattccac	caaaacggtg	2040
gcttgatttt	tatgcggcta	tgactgaatt	tcttgggtta	tttgtagatg	aaaaaaagta	2100
gaataggagt	ggtttgagat	ggtcacaga	ataacaggtc	tggcgtcagg	aatggatata	2160
gatgatatcg	tatcaaagct	gatgcagaca	gaaagagcgc	cgcttgataa	gctgacacaa	2220
aaaaagcaga	ctcttgaatg	gcagcgtgac	agctatcgtg	aagtaaactc	aaaaataaaa	2280
gaattgcaag	atttatatgtc	taaaaatag	ttgacatate	cgagcacgta	tcagagcaac	2340
tggcgttacc	caacttaate					2360

[0009]

<210> 19

<211> 3164

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸

<400> 19

ctatgacat	gattacgcca	agtgaacaat	gatcattcat	acgaagtacc	atggccaaat	60
gaacataaaa	gaagaacaaa	tcattctttt	tgaaaagcggg	attccaggtt	ttttagaaga	120

aaaacagttc gtcatacttc cgctttcaga agactctcca ttcgtggcac tgcagtcctg	180
cacttcagaa aatcttgctg ttatcgtcgt aagtcggttt atctttttta agaattatga	240
atthgatctt gatgaatcaa ctgctgaact tttggatata gataatattc aagacgtaga	300
agtcgatgaca atattgacta tggcagagcc atthgaaaag tctactgcca atthattggc	360
tcccattatt gtgaatcgca agaacatgat ggctaagcaa gtcgttttac acgactcctc	420
atatacgaca aagcatccga ttggaggaga atcatgctag ttttatcgcg gaaaataaac	480
gaagcgattc aaataggtgc tgatattgaa gtaaaagtga ttgcggttga aggggatcaa	540
gtgaagcttg gaattgacgc cccaaagcat atthgatattc acaggaaaga aatttacttg	600
accattcagg aagaaaataa ccgtgcagca gcgttatcca gcgatgtgat ctccgcatta	660
tcctcacaaa aaaagtgagg atthttttat ttttgatta acaaaatcag agacaatccg	720
atattaatga thtagccggg aggagcgca aaagactcag ccagttaca aataagggca	780
caagaacgtg ccttaacaac atattcaggg aggaacaaaa caatgaatat ggctgaaatc	840
gcccagcttg gagtctcaaa ccgtacaaa caacagtacg aaaactatat tggcggagct	900
tgggttccgc cgcccggtgg cgaatacttt gaactacaa cgccgattac gggaaaacct	960
tttacaagag ttccgcgctc cgccaacag gatgtggacg cagcgttaga tgctgccc	1020
gcagcgaaag ctgcctgggc tagaacatca acaacggaac gcgccaatat tttaaaccgc	1080
atcgcagatc gtattgaagc gaatttgaaa ctgcttctg tgcggaaag cattgacaac	1140
ggaaaacctg taagagaaac aacggcagcg gatctgccgc ttgcagtgga ccattttcgt	1200
tatthtgag gttgcatcag agcacaagaa ggccgcatca gcgaaatcga tgcagacaca	1260
atthcgtacc atthtcatga acctctgggt gtttgggcc agattatccc gtggaattht	1320
ctthtattga tggcgacgtg gaaactggca ccggcgcttg ctgccgaaa ctgtgtcgt	1380
cttaaacctg cagaacaac accggcgtct atcttagtht tgatggaagt gattggcgat	1440
ctgctgccgc cgggcgtht gaatgtcctc aacggthttg gcttagaagc tggcaacct	1500
ttggcctcaa gcccgcgtat ttccaaagta gctthtacgg gtgaaacaac gacaggccgg	1560
ttaatcatgc aatatgcctc acagaattht atthctgtta cactggaact tggcggaaaa	1620
agcccgaaca tthtctthga agatgtgtha gcagcgatg acgcattht cgacaaagcg	1680
ctggaaggat ttgcaatgth tgcgcttaat caaggcgaag tthgcacatg tccttcacgt	1740
gctctgatcc aggaagcat ttatgatcgg tthattgaaa gagccctgaa acgcgtggct	1800
gccatcagac aaggacatcc gcttgacag ggaacaatga ttggtgctca agcctctgca	1860
gaacagthtag aaaaaatctt gtcctacatt gatctgggca gaaaagaagg agcacagtgc	1920
cttacgggtg gcgaacgcaa tgcctggat ggcgacctg caggcggcta ttactcaaa	1980
cctacagtat ttgcgggaca taacaaaatg cgcacttht aagaagaaat tthtggcccg	2040
gtcgtaaagc ttacgacatt taaagatgaa gaagaagcac tggctatcgc caacgacagc	2100
ttatatgga tgggtgcggg cgtthtgaca agagatggag cacgtgcgth tccggtggga	2160
agaggtattc aagctggccg cgtgtggacg aatthtctc atgcttacc ggcccatgca	2220
gcgthtggcg gatataaaca gcttgcatc ggacgtgaaa accatcgat gatgthggat	2280
cattaccaac agacaaaaa tthattgtht tcttactccc cgaacgcgth gggctthtct	2340
taatthtaaa aaagacctg gcgthtccag gthctthta tthaaattht tatctcctaa	2400
tcattcctca tcctgtcact aactcatgat ataataaccg gattctccac taactthtta	2460
taaatgtatt tccatacaag aatctaaaa cagaagatth tthtcaaaa atatgtgtaa	2520
tcttatctcg acttagtga tataaacgat agatthgggc ataggggatg atcaattgaa	2580
cattgaaagg ctactacgt tacaacctg ttgggatcgt tatgatactc aaatacataa	2640
tcagaaagat aatgataacg agthtctgt tcatcaagth tcatatacca atcttctgta	2700
aatgthgggg gaaatgaaac agctthtggg accttcgcaa gthcatctga agthcagct	2760

[0010]

tcattgacaag ttaaataaat actatgtaaa ggtaatagag gactctacaa atgaagtgat	2820
ccgcgaaatt ccaccaaaac ggtggccttga tttttatgcg gctatgactg aatttcttgg	2880
gttattttgta gatgaaaaa agtagaatag gagtggtttg agatggtcac aagaataaca	2940
ggtctggcgt caggaatgga tatagatgat atcgtatcaa agctgatgca gacagaaaga	3000
gcgccgcttg ataagctgac acaaaaaaag cagactcttg aatggcagcg tgacagctat	3060
cgtgaagtaa actcaaaaat aaaagaattg caagattata tgtctaaaaa tacgttgaca	3120
tatccgagca cgtatcagag caactggcgt tacccaactt aatc	3164

<210> 20

<211> 3182

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸

<400> 20

[0011]

ctatgacat gattacgcca agtgaacaat gatcattcat acgaagtacc atggccaaat	60
gaacataaaa gaagaacaaa tcattctttt tgaaagcggg attccaggct ttttagaaga	120
aaaacagttc gtcatacttc cgctttcaga agactctcca ttcgtggcac tgcagtccgt	180
cacttcagaa aatcttgcgt ttatcgtcgt aagtcgcttt atctttttta agaattatga	240
atgtgatctt gatgaatcaa ctgctgaact tttggatc gataatattc aagacgtaga	300
agtcattgaca atattgacta tggcagagcc atttgaaaag tctactgca atttattggc	360
tcccattatt gtgaatcgca agaactgat ggctaagcaa gtcgttttac acgactctc	420
atatacgaca aagcatccga ttggaggaga atcatgctag ttttatcgcg gaaaataaac	480
gaagcgattc aataggtgc tgatattgaa gtaaaagtga ttgcggttga aggggatcaa	540
gtgaagcttg gaattgacgc cccaaagcat attgatattc acaggaaaga aatttacttg	600
accattcagg aagaaaataa ccgtgcagca gcgttatcca gcgatgtgat ctccgcatta	660
tcctcacaaa aaaagtgagg atttttttat ttttgatta acaaaatcag agacaatccg	720
atattaatga tgtagccggg aggaggcgca aaagactcag ccagttacaa aataaggcca	780
caagaacgtg ccttaacaac atattcaggg aggaacaaaa caatgaccaa taatcccct	840
tcagcacaga ttaagccgg cgagtatggt ttccccctca agttaaaagc ccgctatgac	900
aaactttattg gcggcgaatg ggtagcccct gccgacggcg agtattacca gaatctgacg	960
ccggtgaccg ggcagctgct gtgcgaagtg gcgctctcgg gcaaacgaga catcgatctg	1020
gcgctggatg ctgcgcacaa agtgaagat aaatgggcgc acacctcggg gcaggatcgt	1080
gcggcgattc tgtttaagat tgccgatcga atggaacaaa acctcgagct gttagcgaca	1140
gctgaaacct gggataacgg caaacccatt cgcgaaacca gtgctgcgga tgtaccgctg	1200
gcgattgacc atttccgcta tttcgcctcg tgtattcggg cgcaggaagg tgggatcagt	1260
gaagttgata gcgaaaccgt ggcctatcat ttccatgaac cgttaggcgt ggtggggcag	1320
attatcccgt ggaacttccc gctgctgatg gcgagctgga aaatggctcc cgcgctggcg	1380
gcgggcaact gtgtggtgct gaaaccgca cgtcttacc cgtttctgt actgctgcta	1440
atggaattg tcggtgattt actgccgccc ggctgggtga acgtggtaaa tggcgcaggt	1500
ggggttaattg gcgaatatct ggcgacctcg aaacgcatcg ccaaagtggc gttaccggc	1560
tcaacggaag tggccaaca aattatgcaa tacgcaacgc aaaacattat tccggtgacg	1620
ctggagttgg gcggtaatgc gccaaatc ttctttgctg atgtgatgga tgaagaagat	1680
gcctttttcg ataaagcgt ggaaggcttt gcaactgttt ccttaacca gggcgaagtt	1740

	tgcacctgtc cgagtcgtgc tttagtcag gaatctatct acgaacgctt tatggaacgc	1800
	gccatccgcc gtgtcgaaag cttcgtagc ggtaacccgc tcgacagcgt gacgcaaatg	1860
	ggcgcgcagg tttctcacgg gcaactggaa accatcctca actacattga tctcggtaaa	1920
	aaagagggcg ctgacgtgct cacaggcggg cggcgcaagc tgctggaagg tgaactgaaa	1980
	gacggctact acctcgaacc gacgattctg tttggtcaga acaatatgcg ggtgttcag	2040
	gaggagattt ttggcccggg gctggcggg accaccttca aaacgatgga agaagcgcgt	2100
	gagctggcga acgatacga atatggcctg ggcgcgggcg tctggagccg caacggtaat	2160
	ctggcctata agatggggcg cggcatacag gctgggcgcg tgtggaccaa ctgttatcac	2220
	gcttaccggg cacatgcggc gtttgggtgc tacaacaat caggtatcgg tcgcgaaacc	2280
	cacaagatga tgctggagca ttaccagcaa accaagtgc tgctggtgag ctactcggat	2340
	aaaccgttg ggtgttcta attttaaaa agacctggc gttgccaggg tcttttaatt	2400
	taaatttcta tctcctaate attcctcctc ctgtcactaa ctcatgatata aataaccgga	2460
	ttctccacta actttttata aatgtatttc catacaagaa atctaaaaca gaagattttt	2520
	ttcaaaaat atgtgtaate ttatctcgac ttagtcgata taaacgatag attggggcat	2580
	aggggatgat caattgaaca ttgaaaggct cactacgtta caacctgtt gggatcgtta	2640
	tgatactcaa atacataate agaaagataa tgataacgag gttcctgttc atcaagtttc	2700
	atataccaat cttgctgaaa tgggtggggg aatgaacaag cttttggaac cttcgcaagt	2760
	tcactgaag ttcgagcttc atgacaagtt aaatgaatac tatgtaaagg taatagagga	2820
	ctctacaaat gaagtgatcc gcgaaattcc accaaaacgg tggcttgatt tttatgcggc	2880
	tatgactgaa tttcttgggt tattttaga tgaaaaaag tagaatagga gtggtttgag	2940
	atggtcacaa gaataacagg tctggcgtca ggaatggata tagatgatata cgtatcaaag	3000
[0012]	ctgatgcaga cagaaagagc gccgcttgat aagctgacac aaaaaagca gactctttaa	3060
	tggcagcgtg acagctatcg tgaagtaaac tcaaaaataa aagaattgca agattatatg	3120
	tctaaaaata cgttgacata tccgagcagc tatcagagca actggcgtta cccaacttaa	3180
	tc	3182

<210> 21

<211> 76

<212> RNA

<213> 枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)

<400> 21

uauaacacca auuaagagua acaaaacaag gagggacuua uacaacaauu ccgugcagga 60

acacgggaau aaaaca 76

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 6×His 标签

<400> 22

His His His His His His

1

5

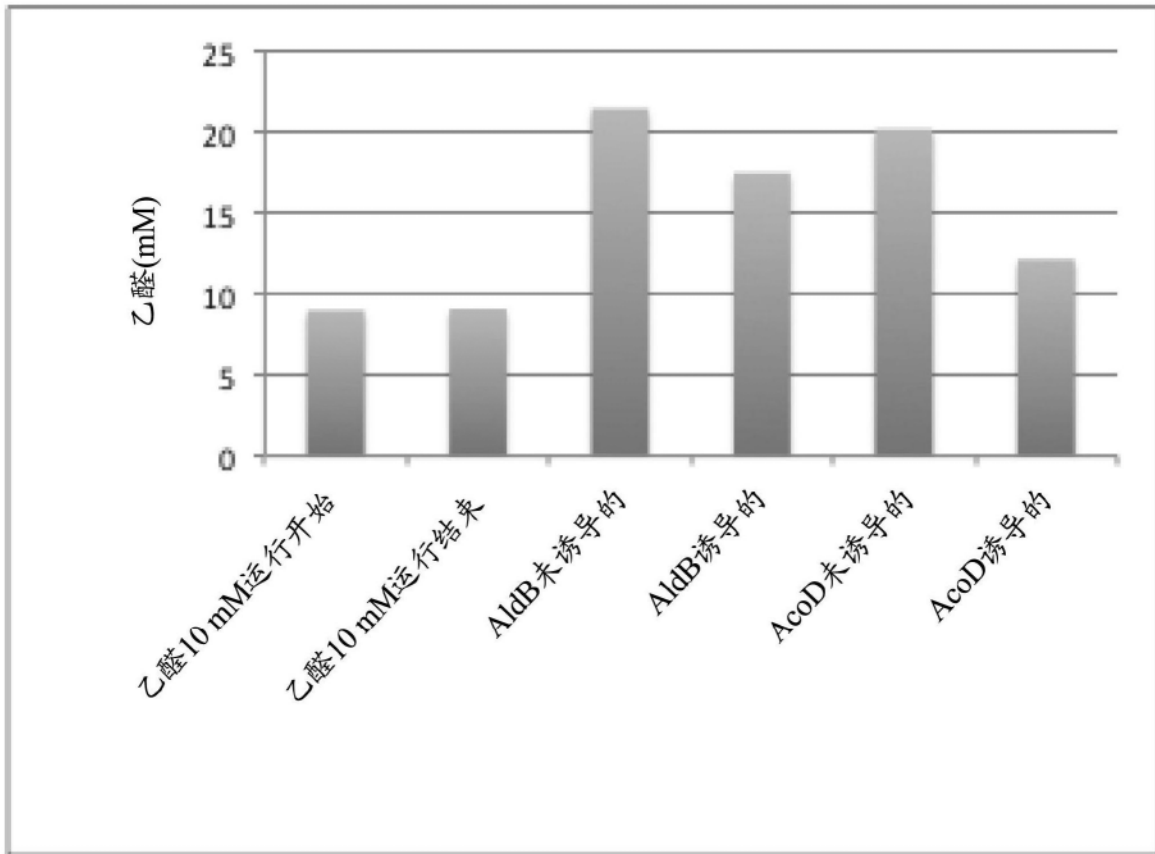
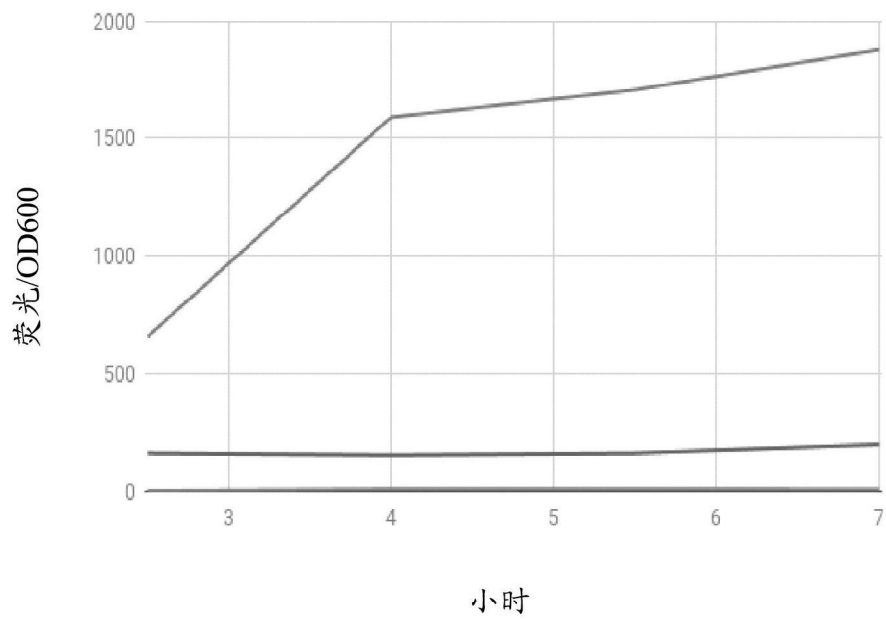


图1



2A



2B

图2

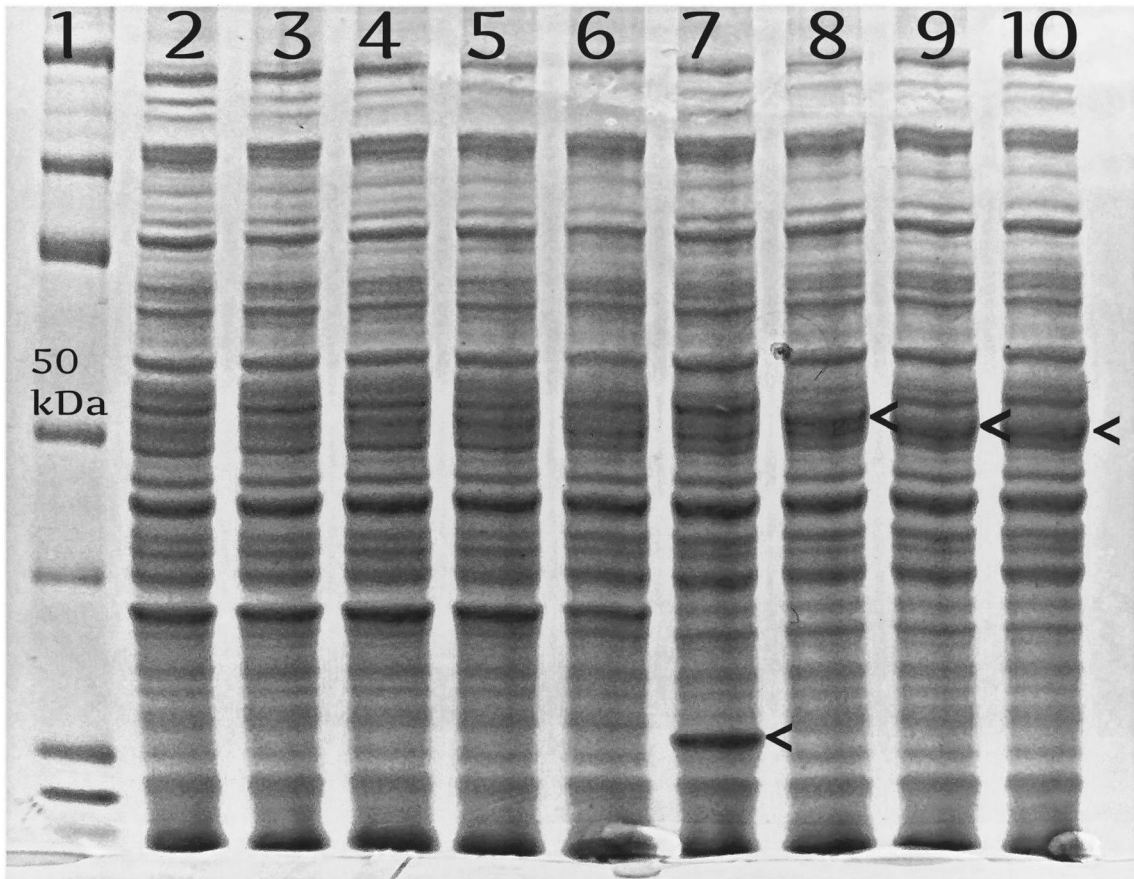


图3

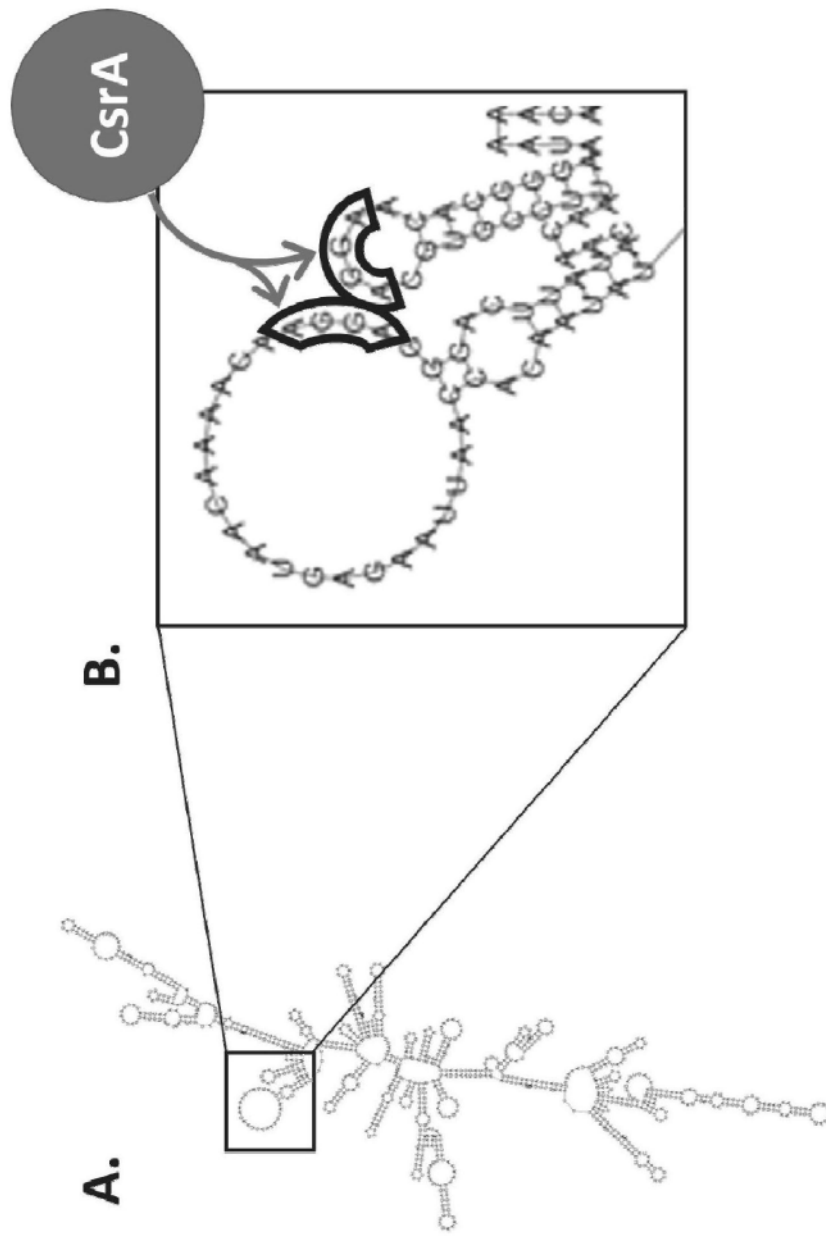


图5

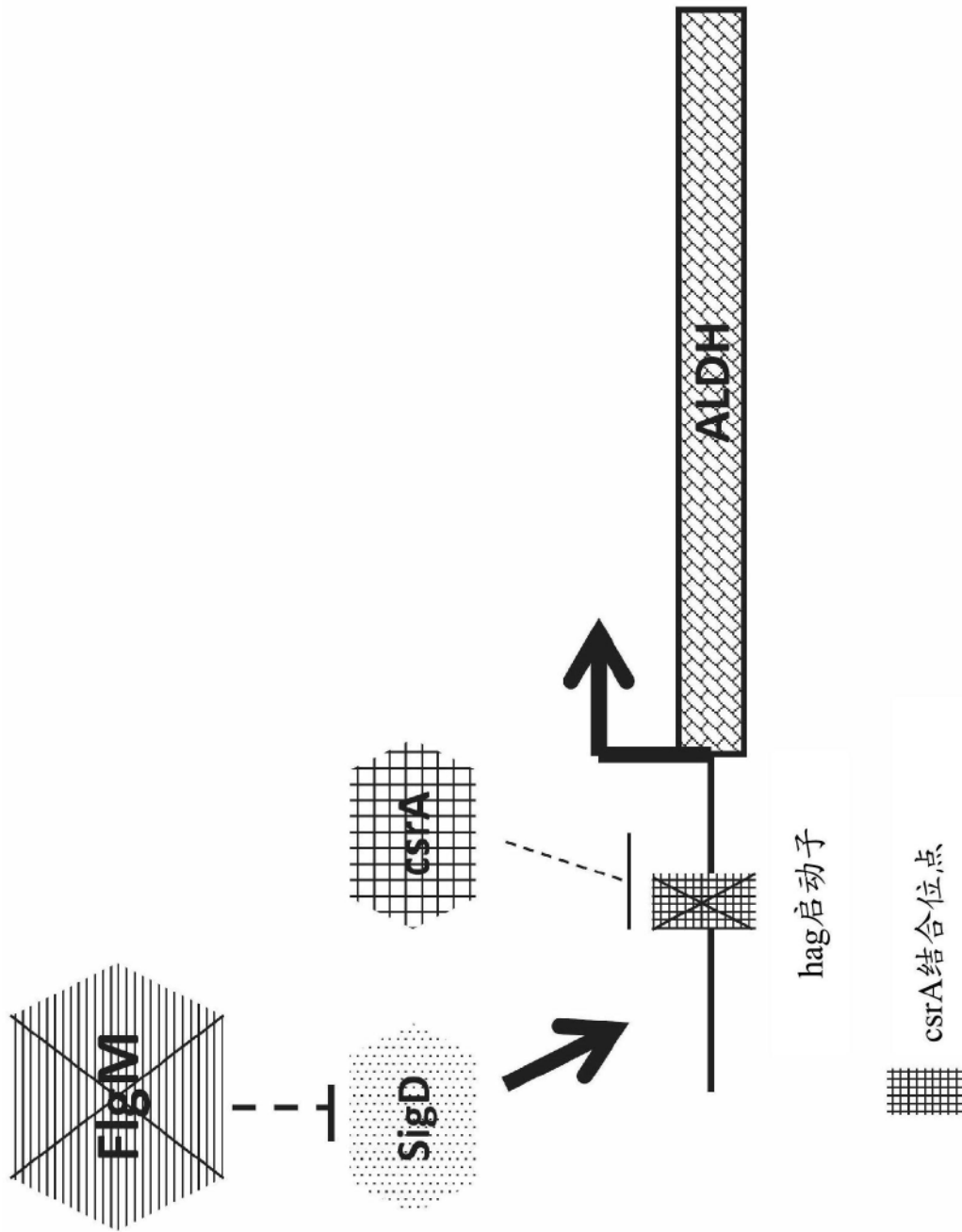


图6