



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113201552 B

(45) 授权公告日 2024.03.22

(21) 申请号 202110477080.X

US 2020239897 A1, 2020.07.30

(22) 申请日 2021.04.29

US 2021024941 A1, 2021.01.28

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 107257851 A, 2017.10.17

申请公布号 CN 113201552 A

CN 106103694 A, 2016.11.09

(43) 申请公布日 2021.08.03

CN 112004929 A, 2020.11.27

(73) 专利权人 江南大学

CN 111088202 A, 2020.05.01

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

JP 2001069979 A, 2001.03.21

(72) 发明人 刘秀霞 王亚丽 崔思楠 白仲虎  
杨艳坤 李业 刘春立

Wu S C et al.. Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones.《Journal of Bacteriology》.1998, 第180卷(第11期), 第2830-2835页.

(74) 专利代理机构 南京禹为知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 32272

Barreiro C et al.. Transcriptional analysis of the groES-groEL1, groEL2, and dnaK genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters.《Journal of bacteriology》.2004, 第186卷(第14期), 第4813-4817页.

专利代理人 王晓东

审查员 杨大鹏

(51) Int.Cl.

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

C12N 15/77(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12R 1/15(2006.01)

(56) 对比文件

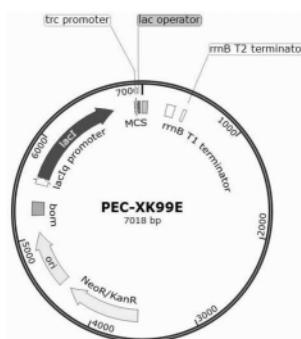
US 2011086388 A1, 2011.04.14

(54) 发明名称

一种分子伴侣质粒系统及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种分子伴侣质粒系统及其应用,其包括四种表达载体,所述四种表达载体为GSL1、GSL2、DJ1EK、DJ2EK。该分子伴侣质粒系统能有效促进谷氨酸棒杆菌外源蛋白的可溶性表达。



1. 一种分子伴侣质粒系统,其特征在于:所述质粒系统包括,质粒GSL1,含有GroES-GroEL1 (NCg10572-NCg10573) 编码基因序列;质粒GSL2,含有GroES-GroEL2 (NCg10572-NCg12621) 编码基因序列;质粒DJ1EK,含有DnaK-GrpE-DnaJ1 (NCg12702-NCg12701-NCg12700) 编码基因序列;和质粒DJ2EK,含有DnaK-GrpE-DnaJ2 (NCg12702-NCg12701-NCg12210) 编码基因序列。
2. 如权利要求 1 所述的一种分子伴侣质粒系统的应用,其特征在于:所述分子伴侣质粒系统应用于谷氨酸棒杆菌表达系统中。

## 一种分子伴侣质粒系统及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,特别是涉及一种分子伴侣质粒系统及其应用。

### 背景技术

[0002] 谷氨酸棒杆菌是工业生产氨基酸、高级醇等工业产品的常用菌株,属革兰氏阳性细菌。近年来,由于谷氨酸棒杆菌不产内毒素、无胞外水解酶活性等优势的发现,常被用于外源重组蛋白的表达。目前利用谷氨酸棒杆菌表达系统提高外源蛋白表达的方法主要有表达载体及元件的筛选、宿主改造及培养基优化等。

[0003] 分子伴侣是一类帮助其他肽链进行正确折叠,但不存在于目标蛋白中的蛋白。研究表明,分子伴侣表达水平的提高能促进外源重组蛋白的可溶性表达。目前在利用谷氨酸棒杆菌进行外源蛋白表达研究中,对于一些以包涵体存在的外源蛋白没有很好的解决办法,因此亟待开发谷氨酸棒杆菌内源分子伴侣质粒系统并将其应用于外源蛋白表达。

### 发明内容

[0004] 本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。在本部分以及本申请的说明书摘要和发明名称中可能会做些简化或省略以避免使本部分、说明书摘要和发明名称的目的模糊,而这种简化或省略不能用于限制本发明的范围。

[0005] 鉴于上述和/或现有谷氨酸棒杆菌内源分子伴侣质粒产品中存在的问题,提出了本发明。

[0006] 鉴于上述和/或现有谷氨酸棒杆菌内源分子伴侣质粒产品中存在的问题,提出了本发明。

[0007] 因此,本发明其中一个目的是,克服现有谷氨酸棒杆菌内源分子伴侣质粒产品的不足,提供一种分子伴侣质粒系统及其应用。

[0008] 为解决上述技术问题,根据本发明的一个方面,本发明提供了如下技术方案:一种分子伴侣质粒系统,其特征在于:包括四种表达载体,所述四种表达载体为GSL1、GSL2、DJ1EK、DJ2EK。

[0009] 作为本发明所述分子伴侣质粒系统的一种优选方案,其中:GSL1表达载体包括GroES-GroEL1 (NCg10572-NCg10573) 序列。

[0010] 作为本发明所述分子伴侣质粒系统的一种优选方案,其中:GSL2表达载体包括GroES-GroEL2 (NCg10572-NCg12621) 序列。

[0011] 作为本发明所述分子伴侣质粒系统的一种优选方案,其中:DJ1EK表达载体包括DnaK-GrpE-DnaJ1 (NCg12702-NCg12701-NCg12700) 序列。

[0012] 作为本发明所述分子伴侣质粒系统的一种优选方案,其中:DJ2EK表达载体包括DnaK-GrpE-DnaJ2 (NCg12702-NCg12701-NCg12210) 序列。

[0013] 作为本发明所述分子伴侣质粒系统的一种优选方案,其中:分子伴侣质粒系统包括GroES (NCg10572) 基因序列和GroEL1 (NCg10573) 基因序列。

[0014] 作为本发明所述分子伴侣质粒系统的一种优选方案,其中:分子伴侣质粒系统包括GroES (NCg10572) 基因序列和GroEL2 (NCg12621) 基因序列。

[0015] 作为本发明所述分子伴侣质粒系统的一种优选方案,其中:分子伴侣质粒系统包括DnaK (NCg12702) 基因序列、GrpE (NCg12701) 基因序列和DnaJ1 (NCg12700) 基因序列。

[0016] 作为本发明所述分子伴侣质粒系统的一种优选方案,其中:分子伴侣质粒系统包括DnaK (NCg12702) 基因序列、GrpE (NCg12701) 基因序列和DnaJ2 (NCg12210) 基因序列。

[0017] 本发明另一个目的是,提供一种分子伴侣质粒系统的制备方法。

[0018] 为解决上述技术问题,根据本发明的一个方面,本发明提供了如下技术方案:一种分子伴侣质粒系统的应用,其包括,分子伴侣质粒系统应用于谷氨酸棒杆菌表达系统中。

[0019] 本发明提供一种分子伴侣质粒系统及应用,通过较为简单的操作步骤的情况下,实现了外源蛋白的可溶性表达水平增加的效果。

## 附图说明

[0020] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。其中:

[0021] 图1为pEC-XK99E的质粒图谱。

[0022] 图2为p99E-GSL1表达载体的质粒图谱。

[0023] 图3为p99E-GSL1共表达p19-scFv蛋白可溶性表达验证的SDS-PAGE电泳图(左上)、Western Blot图(左下)及利用ImageJ软件对Western Blot蛋白条带灰度分析图(右);

[0024] 其中,泳道M:蛋白marker;W为全细胞裂解物;S为可溶性蛋白;WT为阴性对照野生型菌株;-为未诱导分子伴侣表达,scFv表达菌株;+为诱导分子伴侣表达,scFv表达菌株。

[0025] 图4为p99E-GSL2表达载体的质粒图谱。

[0026] 图5为p99E-GSL2共表达p19-scFv蛋白可溶性表达验证的SDS-PAGE电泳图(左上)、Western Blot图(左下)及利用ImageJ软件对Western Blot蛋白条带灰度分析图(右)。

[0027] 图6为p99E-DJ1EK表达载体的质粒图谱;

[0028] 图7为p99E-DJ1EK共表达p19-scFv蛋白可溶性表达验证的SDS-PAGE电泳图(左上)、Western Blot图(左下)及利用ImageJ软件对Western Blot蛋白条带灰度分析图(右)。

[0029] 图8为p99E-DJ2EK表达载体的质粒图谱;

[0030] 图9为p99E-DJ2EK共表达p19-scFv蛋白可溶性表达验证的SDS-PAGE电泳图(左上)、Western Blot图(左下)及利用ImageJ软件对Western Blot蛋白条带灰度分析图(右)。

## 具体实施方式

[0031] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合说明书实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

[0032] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明,但是本发明还可以采用其他不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似推广,因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

[0033] 其次,此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个实施例中”并非均指同一个实施例,也不是单独的或选择性的与其他实施例互相排斥的实施例。

[0034] 实施例1

[0035] 从-80℃冰箱取出表达scFv(pXMJ19-scFv)的谷氨酸棒杆菌菌株,在固体平板上划线活化后,挑菌接种至10mL LBB培养基,200r/min,30℃,培养12h。转接至EP0培养基中制备感受态细胞。向上述感受态细胞中电转p99E-GS11/GSL2/DJ1EK/DJ2EK及pEC-XK99E。涂布在含30mg/L卡那霉素和10mg/L氯霉素的LBB平板后30℃培养24h,挑单菌落至10mL LBB液体培养基中,加30mg/L氯霉素和30mg/L卡那霉素,200r/min,30℃,培养12h。按2%接种量分别将上述菌液转接至5瓶含有10mL的LBB、30mg/L氯霉素和30mg/L卡那霉素液体培养基中,4h后添加诱导剂IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷),200r/min,30℃,培养24h。

[0036] 收集上述菌体,菌体量OD值定为10,加蛋白酶抑制剂后超声破碎提取蛋白,破碎后产物为全细胞裂解物,破碎后产物经12000rpm/min离心2min为破碎上清,即可溶性蛋白。取全细胞裂解物和破碎上清分别进行SDS-PAGE电泳及Western Blot。

[0037] SDS-PAGE及Western Blot结果如图3、5、7、9所示。其中泳道M为蛋白Marker,WT为阴性对照谷氨酸棒杆菌野生型菌株,-为含分子伴侣质粒,未诱导表达分子伴侣的谷氨酸棒杆菌菌株,+为含分子伴侣质粒,并诱导表达分子伴侣的谷氨酸棒杆菌菌株;泳道1为野生型谷氨酸棒杆菌菌株全细胞裂解物,泳道2为野生型谷氨酸棒杆菌菌株破碎后上清,泳道3为含分子伴侣质粒,但未诱导分子伴侣表达的谷氨酸棒杆菌菌株的全细胞裂解物,泳道4为含分子伴侣质粒,但未诱导分子伴侣表达的谷氨酸棒杆菌菌株的破碎后上清,泳道5为含分子伴侣质粒,并诱导分子伴侣质粒表达的谷氨酸棒杆菌菌株的全细胞裂解物,泳道6为含分子伴侣质粒,并诱导分子伴侣质粒表达的谷氨酸棒杆菌菌株的破碎后上清。

[0038] 由Western Blot结果及灰度分析结果表明,分子伴侣共表达促使scFv蛋白的可溶性表达提高,说明我方发明中制备得到的分子伴侣质粒系统能有效促进谷氨酸棒杆菌外源蛋白的可溶性表达。

[0039] 我方发明中包括的四种载体均包括SD序列(AAAGGAGGA):

[0040] GSL1表达载体包括一个经典的SD序列(AAAGGAGGA)、GroES序列和GroEL1序列,SD序列连接在GroES序列的起始密码子ATG之前;GroEL1与其上游的GroES以操纵子形式存在。

[0041] GSL2表达载体包括一个经典的SD序列(AAAGGAGGA)、GroES序列和GroEL2序列,SD序列分别连接在GroES序列的起始密码子ATG之前和GroEL2序列的起始密码子ATG之前;GroEL2基因位于GroES基因下游。

[0042] DJ1EK表达载体包括一个经典的SD序列(AAAGGAGGA)、DnaK序列、GrpE序列、启动子trc序列和DnaJ1序列,GrpE基因与其下游的DnaK基因以操纵子形式存在;DnaJ1基因位于GrpE基因下游;SD序列分别连接在DnaK序列的起始密码子ATG之前和DnaJ1序列的起始密码子ATG之前;启动子trc序列连接在GrpE序列的终止密码子TAA之后,第二个SD序列AAAGGAGGA之前。

[0043] DJ2EK表达载体包括一个经典的SD序列(AAAGGAGGA)、DnaK序列、GrpE序列、启动子trc序列和DnaJ2序列;GrpE基因与其下游的DnaK基因以操纵子形式存在;DnaJ2基因位于GrpE基因下游;SD序列分别连接在DnaK序列的起始密码子ATG之前和DnaJ2序列的起始密码

子ATG之前；启动子trc序列连接在GrpE序列的终止密码子TAA之后，第二个SD序列AAAGGAGGA之前。

[0044] 表1构建分子伴侣质粒系统的引物序列

Primer	Sequence (5'-3')
[0045]	GSL1-F <b>ggaatcgagctcggtacccaaaggaggacaactatggattacaaggacgacgacgacaaggcaaacgtcaacatcaagc</b>
	GSL1-R <b>tgcacttagaggatecccccttagtggtggtgtatgggtcctgcatg</b>
	GSL2-R <b>catcaaaggcgatgatcttgccattagtgtcctcccttacttctcgacgattgcgaggatg</b>
	GL2-F <b>catactcgcaatcgagaagtagaaaaggaggacaactaatggcaaagatcatgcgccttgcgt</b>
	GL2-R <b>gtcgacttagaggatecccccttacttgcgtcgtcctgttaatcgaagccgcctatgcgt</b>
	DKE-F <b>ccg <u>gaattc</u> aaaggaggacaacta atgggacg tgcagttaggaattg</b>
	DKE-R <b>gc <u>tctaga</u> cccggg tta gctctcctctggatccccatg</b>
	DJ1-F <b>gc <u>tctaga</u> aaaggaggacaacta atgaacaacagcgaatggc</b>
	DJ1-R <b>aa ctgcag tta gtgggtgggtgtatggtg gcgggttctggcccccag</b>
	trc-F <b>ggatcccgaggagagctaaccgcacatataacgggtctggcaaatttc</b>
	trc-R <b>tgtcctctttctagaccatggctgtttccctgtgtgaaattg</b>
	DJ2-F <b>gc <u>tctaga</u> aaaggaggacaacta atgaacaacagcgaatggc</b>
	DJ2-R <b>aa ctgcag tta gcgggttctggcccccag</b>

[0046] 表1为本发明使用的构建分子伴侣质粒系统所用引物序列表，由表1可得，我方发明中使用的引物包括GroES (NCg10572) 基因序列、GroEL1 (NCg10573) 基因序列、GroES (NCg10572) 基因序列、GroEL2 (NCg12621) 基因序列、DnaK (NCg12702) 基因序列、GrpE (NCg12701) 基因序列、DnaJ1 (NCg12700) 基因序列、DnaK (NCg12702) 基因序列、GrpE (NCg12701) 基因序列和DnaJ2 (NCg12210) 基因序列。

[0047] 本发明中利用GSL1-F/GSL2-R对基因组进行PCR扩增，得到带有同源臂的GroES基因序列，利用GL2-F/R对基因组进行PCR扩增，得到带有同源臂的GroEL2基因序列，将得到的GroES基因片段和GroEL2基因片段纯化后与SmaI酶切的pEC-XK99E载体进行重组，转化大肠杆菌JM109，构建得到分子伴侣质粒p99-GSL2。

[0048] 本发明中利用引物DKE-F/R对基因组进行PCR扩增，得到5' 端带有EcoRI, 3' 端带有SmaI、XbaI接头的DnaK-GrpE基因片段（其5' 端含有一个经典的核糖体结合位点AAAGGAGGA），利用引物DJ1-F/R对基因组进行PCR扩增，得到5' 端带有XbaI、3' 端带有PstI接头的DnaJ1基因片段。将得到的DnaK-GrpE片段和DnaJ1片段分别用EcoRI、XbaI, XbaI、PstI酶切处理后，与EcoRI、PstI处理过的pEC-XK99E载体一起进行连接反应。转化大肠杆菌JM109，构建得到分子伴侣中间质粒p99E-DJEK (DnaJ无启动子)。利用引物trc-F/R对质粒pEC-XK99E进行PCR扩增，得到带有同源臂的启动子trc片段。将得到的启动子trc片段与SmaI酶切过的p99E-DJEK载体进行同源重组，转化大肠杆菌JM109，构建得到分子伴侣质粒p99E-DJ1EK。

[0049] 利用引物DJ2-F/R对基因组进行PCR扩增，得到5' 端带有XbaI、3' 端带有PstI接头的DnaJ1基因片段。将得到的DnaJ2片段用XbaI、PstI酶切处理后，与XbaI、PstI处理过的p99E-DJ1EK载体一起进行连接反应。转化大肠杆菌JM109，构建得到分子伴侣质粒p99E-DJ2EK。

[0050] 应说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术

方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

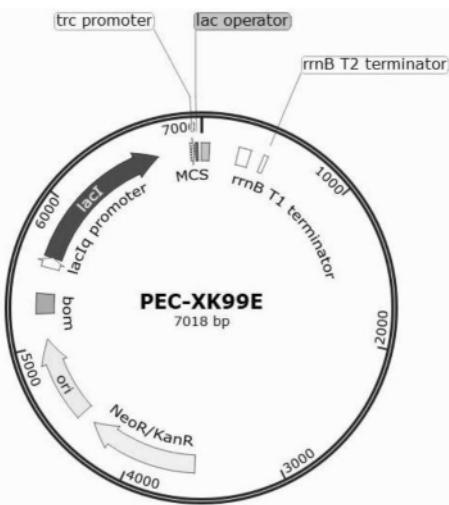


图1

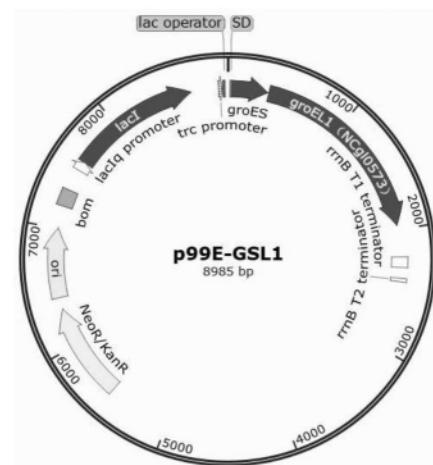


图2

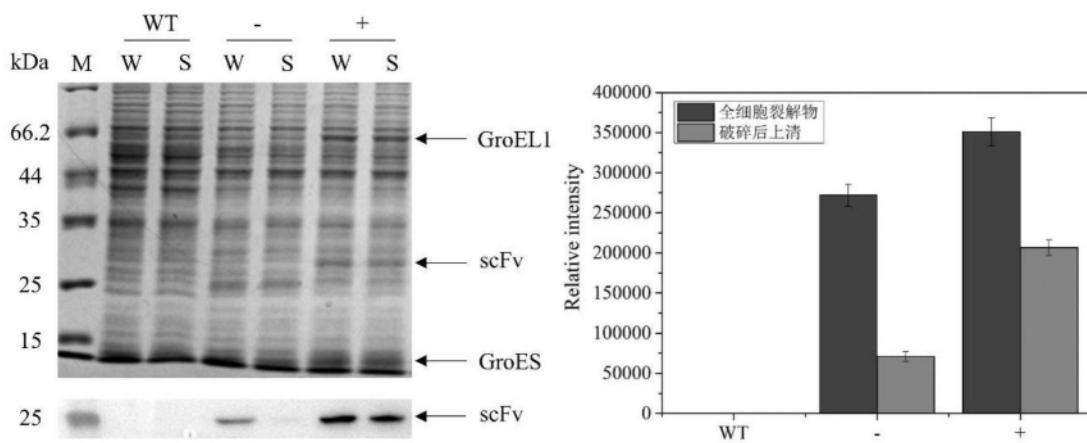


图3

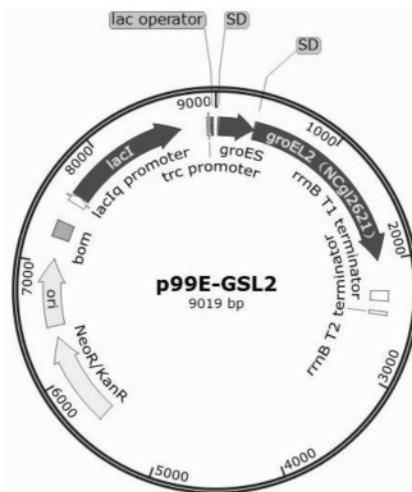


图4

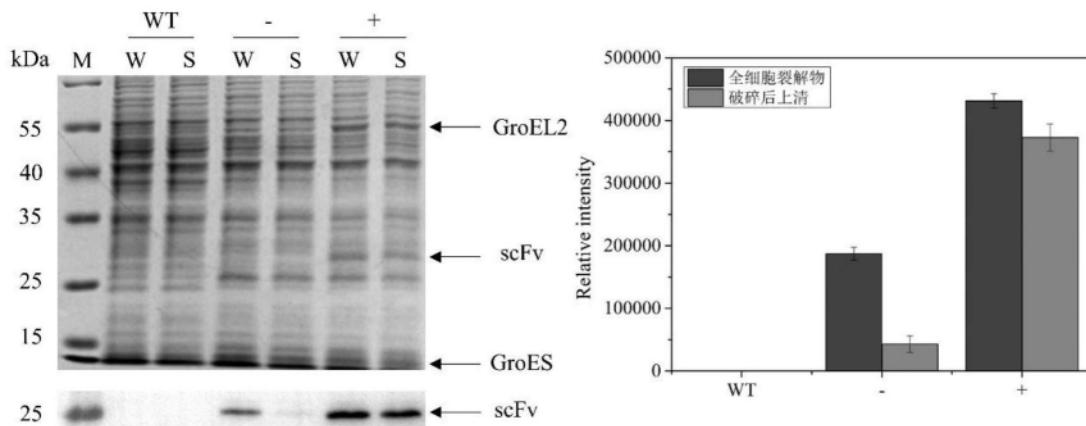


图5

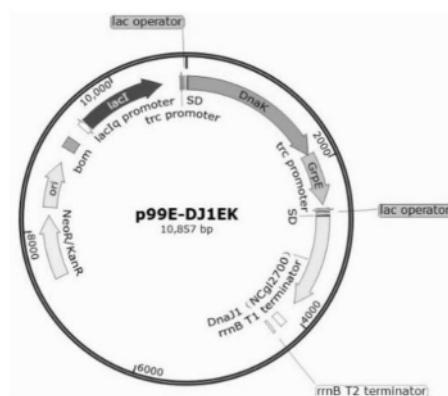


图6

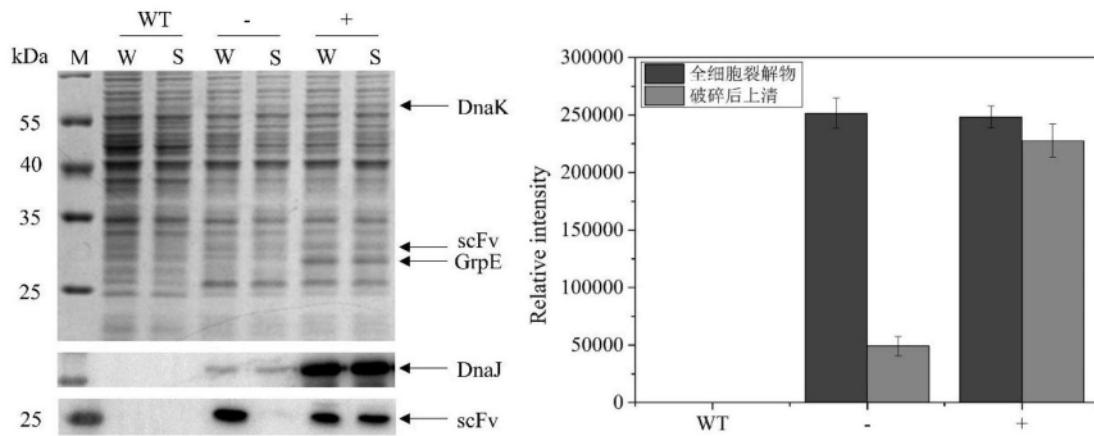


图7

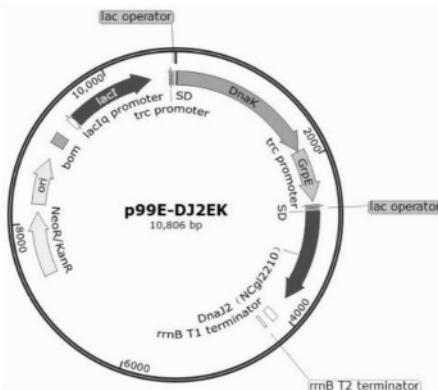


图8

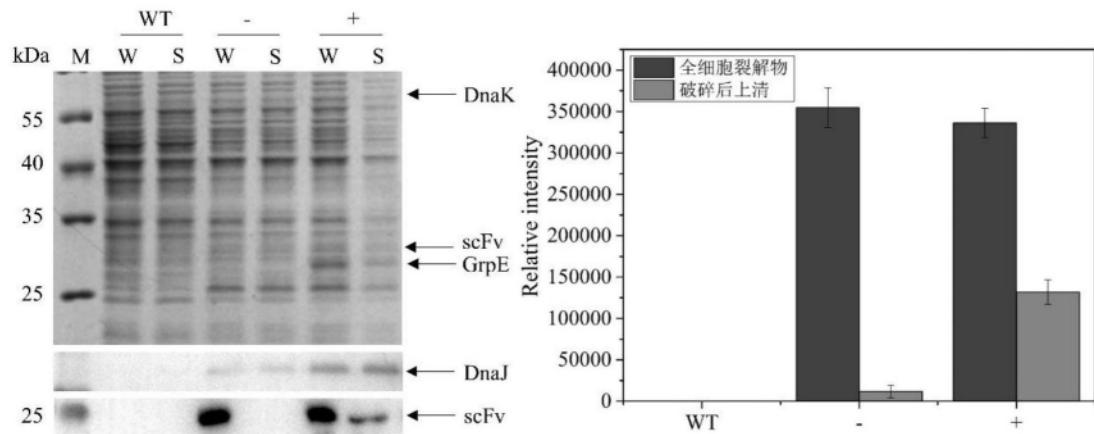


图9