



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104053780 A

(43) 申请公布日 2014.09.17

(21) 申请号 201280059922.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012.12.06

C12N 15/75(2006.01)

(30) 优先权数据

61/569, 202 2011. 12. 09 US

61/577, 491 2011. 12. 19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/068285 2012. 12. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/086219 EN 2013. 06. 13

(71) 申请人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 C·邦焦尔尼 B·P·福克斯

A·范齐蒙耐德

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 凌立 黃革生

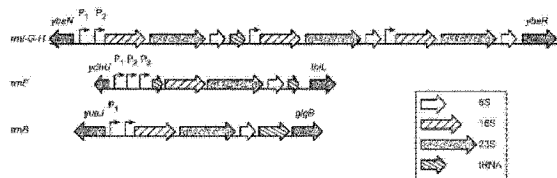
权利要求书6页 说明书27页 附图13页

(54) 发明名称

用于在微生物中生产蛋白质的来自枯草芽孢杆菌的核糖体启动子

(57) 摘要

本发明提供了微生物中改善的表达系统的方法和组合物。所述方法和组合物包含来源于芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 菌种微生物的核糖体启动子, 例如核糖体 RNA 启动子或核糖体蛋白启动子。



1. 一种分离的核酸,所述核酸包含有效连接至编码目的蛋白的核酸的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)核糖体启动子。

2. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述核酸是核糖体RNA启动子或核糖体蛋白启动子。

3. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述核酸是rrn核糖体RNA启动子。

4. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述核酸是rrnB、rrnI或rrnE核糖体RNA启动子。

5. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述核酸是rrnI核糖体RNA启动子。

6. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述核酸是rpsD或rpsJ核糖体蛋白启动子。

7. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述核酸包含SEQ ID NO:1-6中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:1-6中保留启动子活性的任一者的子序列、与SEQ ID NO:1-6中任一者具有至少60%同源性的核酸、或在中等严格性条件下与SEQ ID NO:1-6中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸,或以上任一者的组合。

8. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述核酸包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列或其保留启动子活性的子序列。

9. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述核酸包含SEQ ID NO:13-14中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:13-14中保留启动子活性的任一者的子序列、与SEQ ID NO:13-14中任一者具有至少60%同源性的核酸、或在中等严格性条件下与SEQ ID NO:13-14中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸,或以上任一者的组合。

10. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述核酸包含与SEQ ID NO:13-14中任一者具有至少60%、70%、80%、90%、93%、95%、97%或99%同源性的核酸。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的核酸,其中所述目的蛋白选自激素、酶、生长因子、报告基因和细胞因子。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的核酸,其中所述目的蛋白为酶。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的核酸,其中所述目的蛋白选自蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、木聚糖酶、植酸酶、甘露聚糖酶、半纤维素酶、糖酶、水解酶、酯酶、氧化酶、透性酶、支链淀粉酶、漆酶、脂肪酶、还原酶、异构酶、表异构酶、互变异构酶、转移酶、激酶和磷酸酶。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的核酸,其中所述目的蛋白为蛋白酶。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的核酸,其中所述蛋白酶为枯草杆菌蛋白酶。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的核酸,其中所述蛋白酶由SEQ ID NO:9、11、18或20编码。

17. 一种包含核酸的表达载体,所述核酸包含枯草芽孢杆菌核糖体启动子。

18. 根据权利要求17所述的表达载体,其中所述表达载体包含核糖体RNA启动子或核糖体蛋白启动子。

19. 根据权利要求17所述的表达载体,其中所述核糖体启动子是rrnB、rrnI或rrnE核糖体RNA启动子。

20. 根据权利要求 17 所述的表达载体,其中所述核糖体启动子是 rrnI 核糖体 RNA 启动子。

21. 根据权利要求 17 所述的表达载体,其中所述核糖体启动子是 rpsD 或 rpsJ 核糖体蛋白启动子。

22. 根据权利要求 17 所述的表达载体,其中所述核糖体启动子包含 SEQ ID NO:1-6 中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:1-6 中保留启动子活性的任一者的子序列、与 SEQ ID NO:1-6 中任一者具有至少 60%同源性的核酸、或在中等严格性条件下与 SEQ ID NO:1-6 中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸,或以上任一者的组合。

23. 根据权利要求 17 所述的表达载体,其中所述核糖体启动子包含 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列或其保留启动子活性的子序列。

24. 根据权利要求 17 所述的表达载体,其中所述核糖体启动子包含 SEQ ID NO:13-14 中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:13-14 中保留启动子活性的任一者的子序列、与 SEQ ID NO:13-14 中任一者具有至少 60%同源性的核酸、或在中等严格性条件下与 SEQ ID NO:13-14 中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸,或以上任一者的组合。

25. 根据权利要求 17 所述的表达载体,其中所述核酸包含与 SEQ ID NO:13-14 中任一者具有至少 60%、70%、80%、90%、93%、95%、97%或 99%同源性的核酸。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的表达载体,还包含编码目的蛋白的核酸,其中所述核酸有效连接至所述核糖体 RNA 启动子或蛋白启动子。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的表达载体,其中所述目的蛋白是异源的。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的表达载体,其中所述目的蛋白选自激素、酶、生长因子、报告基因和细胞因子。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的表达载体,其中所述目的蛋白是酶。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的表达载体,其中所述目的蛋白选自蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、木聚糖酶、植酸酶、甘露聚糖酶、半纤维素酶、糖酶、水解酶、酯酶、氧化酶、透性酶、支链淀粉酶、漆酶、脂肪酶、还原酶、异构酶、表异构酶、互变异构酶、转移酶、激酶和磷酸酶。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的表达载体,其中所述目的蛋白是蛋白酶。

32. 根据前述权利要求中任一项所述的表达载体,其中所述蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶。

33. 根据前述权利要求中任一项所述的表达载体,其中所述的蛋白酶由 SEQ ID NO:9、11、18 或 20 编码。

34. 一种包含核酸的微生物,所述核酸包含枯草芽孢杆菌核糖体启动子。

35. 根据权利要求 34 所述的微生物,其中所述核糖体启动子是核糖体 RNA 启动子或核糖体蛋白启动子。

36. 根据权利要求 34 所述的微生物,其中所述核糖体启动子是 rrnB、rrnI 或 rrnE 核糖体 RNA 启动子。

37. 根据权利要求 34 所述的微生物,其中所述核糖体启动子是 rrnI 核糖体 RNA 启动子。

38. 根据权利要求 34 所述的微生物,其中所述核糖体启动子包含 SEQ ID NO:1-6 中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:1-6 中保留启动子活性的任一者的子序列、与 SEQ ID NO:1-6

中任一者具有至少 60%同源性的核酸、或在中等严格性条件下与 SEQ ID NO:1-6 中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸,或以上任一者的组合。

39. 根据权利要求 34 所述的微生物,其中所述核糖体 RNA 启动子包含 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列或其保留启动子活性的子序列。

40. 根据权利要求 34 所述的微生物,其中所述核糖体启动子是 rpsD 或 rpsJ 核糖体蛋白启动子。

41. 根据权利要求 34 所述的微生物,其中所述核糖体启动子包含 SEQ ID NO:13-14 中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:13-14 中保留启动子活性的任一者的子序列、与 SEQ ID NO:13-14 中任一者具有至少 60%同源性的核酸、或在中等严格性条件下与 SEQ ID NO:13-14 中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸,或以上任一者的组合。

42. 根据权利要求 34 所述的微生物,其中所述核糖体启动子包含与 SEQ ID NO:13-14 中任一者具有至少 60%、70%、80%、90%、93%、95%、97%或 99%同源性的核酸。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,还包含编码目的蛋白的核酸,其中所述核酸有效连接至所述核糖体启动子。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,其中所述目的蛋白对于所述微生物是异源的。

45. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,其中所述目的蛋白选自激素、酶、生长因子、报告基因和细胞因子。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,其中所述目的蛋白是酶。

47. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,其中所述目的蛋白选自蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、木聚糖酶、植酸酶、甘露聚糖酶、半纤维素酶、糖酶、水解酶、酯酶、氧化酶、透性酶、支链淀粉酶、漆酶、脂肪酶、还原酶、异构酶、表异构酶、互变异构酶、转移酶、激酶和磷酸酶。

48. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,其中所述目的蛋白是蛋白酶。

49. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,其中所述蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶。

50. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,其中所述蛋白酶由 SEQ ID NO:9、11、18 或 20 编码。

51. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,其中所述微生物是芽孢杆菌(Bacillus) 属的成员。

52. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,其中所述微生物选自:枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。

53. 根据前述权利要求中任一项所述的微生物,其中所述核酸整合到所述宿主细胞的所述染色体中。

54. 一种用于生产目的蛋白的方法,包括在适合所述微生物生产所述蛋白的条件下培养根据前述权利要求中任一项所述的微生物。

55. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括回收所述目的蛋白。

56. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核糖体启动子是 rrnB、rrnI 或 rrnE 核糖体 RNA 启动子。

57. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核糖体启动子是 *rrnI* 核糖体 RNA 启动子。

58. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核糖体启动子包含 SEQ ID NO:1-6 中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:1-6 中保留启动子活性的任一者的子序列、与 SEQ ID NO:1-6 中任一者具有至少 60% 同源性的核酸、或在中等严格性条件下与 SEQ ID NO:1-6 中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸,或以上任一者的组合。

59. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核糖体 RNA 启动子包含 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列或其保留启动子活性的子序列。

60. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核糖体启动子是 *rpsD* 或 *rpsJ* 核糖体蛋白启动子。

61. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核糖体启动子包含 SEQ ID NO:13-14 中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:13-14 中保留启动子活性的任一者的子序列、与 SEQ ID NO:13-14 中任一者具有至少 60% 同源性的核酸、或在中等严格性条件下与 SEQ ID NO:13-14 中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸,或以上任一者的组合。

62. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核糖体启动子包含与 SEQ ID NO:13-14 中任一者具有至少 60%、70%、80%、90%、93%、95%、97% 或 99% 同源性的核酸。

63. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目的蛋白对于所述微生物是异源的。

64. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物是芽孢杆菌属的成员。

65. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物选自:枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。

66. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核酸整合到所述宿主细胞的所述染色体中。

67. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目的蛋白选自激素、酶、生长因子、报告基因和细胞因子。

68. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目的蛋白是酶。

69. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目的蛋白选自蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、木聚糖酶、植酸酶、甘露聚糖酶、半纤维素酶、糖酶、水解酶、酯酶、氧化酶、透性酶、支链淀粉酶、漆酶、脂肪酶、还原酶、异构酶、表异构酶、互变异构酶、转移酶、激酶和磷酸酶。

70. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目的蛋白是蛋白酶。

71. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶。

72. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白酶由 SEQ ID NO:9、11、18 或 20 编码。

73. 一种无需扩增表达构建体即可生产目的蛋白的方法,包括使用根据前述权利要求中任一项所述的核酸或载体来转化微生物,其中所述核酸或载体作为单个整合体整合到所述宿主细胞中,以及在适合所述微生物生产所述蛋白的条件下培养所述微生物。

74. 根据权利要求 73 所述的方法,还包括回收所述目的蛋白。

75. 根据权利要求 73 或 74 所述的方法,其中所述核糖体启动子是 *rrnB*、*rrnI* 或 *rrnE* 核糖体 RNA 启动子。

76. 根据权利要求 73 或 74 所述的方法,其中所述核糖体启动子是 *rrnI* 核糖体 RNA 启动子。

77. 根据权利要求 73 或 74 所述的方法,其中所述核糖体启动子包含 SEQ ID NO:1-6 中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:1-6 中保留启动子活性的任一者的子序列、与 SEQ ID NO:1-6 中任一者具有至少 60%同源性的核酸、或在中等严格性条件下与 SEQ ID NO:1-6 中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸,或以上任一者的组合。

78. 根据权利要求 73 或 74 所述的方法,其中所述核糖体启动子包含 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列或其保留启动子活性的子序列。

79. 根据权利要求 73 或 74 所述的方法,其中所述核糖体启动子是 *rpsD* 或 *rpsJ* 核糖体蛋白启动子。

80. 根据权利要求 73 或 74 所述的方法,其中所述核糖体启动子包含 SEQ ID NO:13-14 中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:13-14 中保留启动子活性的任一者的子序列、与 SEQ ID NO:13-14 中任一者具有至少 60%同源性的核酸、或在中等严格性条件下与 SEQ ID NO:13-14 中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸,或以上任一者的组合。

81. 根据权利要求 73 或 74 所述的方法,其中所述核糖体蛋白启动子包含与 SEQ ID NO:13-14 中任一者具有至少 60%、70%、80%、90%、93%、95%、97%或 99%同源性的核酸。

82. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目的蛋白对于所述微生物是异源的。

83. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物是芽孢杆菌属的一员。

84. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物选自:枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。

85. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核酸整合到所述宿主细胞的所述染色体中。

86. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目的蛋白选自激素、酶、生长因子、报告基因和细胞因子。

87. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目的蛋白是酶。

88. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目的蛋白选自蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、木聚糖酶、植酸酶、甘露聚糖酶、半纤维素酶、糖酶、水解酶、酯酶、氧化酶、透性酶、支链淀粉酶、漆酶、脂肪酶、还原酶、异构酶、表异构酶、互变异构酶、转移酶、激酶和磷酸酶。

89. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目的蛋白是蛋白酶。

90. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶。

91. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白酶由 SEQ ID NO:9、11、18 或 20 编码。

92. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物不包含抗生素标记。

用于在微生物中生产蛋白质的来自枯草芽孢杆菌的核糖体 启动子

[0001] 优先权

[0002] 本专利申请要求于 2011 年 12 月 9 日提交的美国临时申请序列号 61/569, 202 和于 2011 年 12 月 19 日提交的美国临时申请序列号 61/577, 491 的优先权, 特此将这两个临时专利申请以引用的方式全文并入。

技术领域

[0003] 本发明涉及蛋白质在微生物内的生产。具体来讲, 本发明提供了微生物中改善的表达系统的方法和组合物。在某些实施例中, 所述方法和组合物包含来源于芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 菌种微生物的核糖体启动子。

[0004] 发明背景

[0005] 基因工程使得用作工业生物反应器或细胞工厂的微生物得以改善。例如, 芽孢杆菌属菌种产生并且分泌大量可用的蛋白质和代谢物。工业中使用的最常见芽孢杆菌属菌种是地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)。由于它们属于 GRAS (一般认为安全) 情形, 因此这些芽孢杆菌属菌种的菌株成为食品和制药工业中用于生产蛋白质的天然候选物。重要的生产酶包括 α -淀粉酶、中性蛋白酶和碱性 (或丝氨酸) 蛋白酶。然而, 尽管已在理解芽孢杆菌属宿主细胞生产蛋白质方面已取得进展, 但仍然需要采取一些方法来改善微生物对这些蛋白质的表达和生产。

[0006] 基因编码的产物的重组生产通过以下方式完成: 构建适合在宿主细胞中使用的表达载体, 其中编码所需产物的核酸被置于启动子的表达控制之下。采用各种技术将表达载体引入到宿主细胞中, 例如转化, 然后将转化后的宿主细胞在表达载体中所包括的启动子发挥作用所需的合适条件下进行培养, 从而实现所需产物的生产。虽然本领域已知有很多启动子, 但需要采用新的启动子来改善异源基因和编码序列的表达。

发明内容

[0007] 本发明提供了新型的启动子、表达载体、微生物, 以及用于生产编码目的蛋白的核酸的方法。具体来说, 本发明提供了新型的启动子、表达载体、微生物, 以及用于生产编码目的蛋白的核酸的方法, 所述核酸包含来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的核糖体启动子。核糖体启动子包括 (例如) 核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子。

[0008] 在一个实施例中, 本发明提供了核酸, 该核酸包含有效连接至编码目的蛋白的核酸的枯草芽孢杆菌核糖体启动子。在具体实施例中, 本发明提供了核酸, 该核酸包含有效连接至编码目的蛋白的核酸的枯草芽孢杆菌核糖体 RNA 启动子。在另一个实施例中, 本发明提供了核酸, 该核酸包含有效连接至编码目的蛋白的核酸的枯草芽孢杆菌核糖体蛋白启动子。

[0009] 在另一个实施例中, 本发明提供了包含核酸的表达载体, 该核酸包含有效连接至

编码目的蛋白的核酸的枯草芽孢杆菌核糖体启动子。在一个实施例中,该表达载体包含核酸,该核酸包含有效连接至编码目的蛋白的核酸的枯草芽孢杆菌核糖体 RNA 启动子。在另一个实施例中,该表达载体包含核酸,该核酸包含有效连接至编码目的蛋白的核酸的枯草芽孢杆菌核糖体蛋白启动子。

[0010] 在另一个实施例中,本发明提供了包含核酸的微生物,该核酸包含枯草芽孢杆菌核糖体启动子。在一个实施例中,本发明提供了包含核酸的革兰氏阳性微生物,该核酸包含枯草芽孢杆菌核糖体启动子。在一个实施例中,该核糖体启动子是核糖体 RNA 启动子。在另一个实施例中,该核糖体启动子是核糖体蛋白启动子。

[0011] 在另一个实施例中,本发明提供了用于生产目的蛋白的方法,该方法包括在适合微生物生产蛋白的条件下培养微生物,该微生物包含核酸,该核酸包含枯草芽孢杆菌核糖体启动子。在一个实施例中,该核糖体启动子是核糖体 RNA 启动子。在另一个实施例中,该核糖体启动子是核糖体蛋白启动子。

[0012] 在另一个实施例中,本发明提供了用于在无需扩增表达构建体的情况下生产目的蛋白的方法。在某些实施例中,该方法包括使用包含核糖体启动子的核酸或载体来转化微生物,其中所述核酸或载体作为单个整合体整合到宿主细胞中,以及在适合微生物生产蛋白的条件下培养该微生物。在一个实施例中,该核糖体启动子是核糖体 RNA 启动子。在另一个实施例中,该核糖体启动子是核糖体蛋白启动子。

[0013] 在某些实施例中,本发明提供了通过如下方式生产目的蛋白的方法:将本文所述的核酸或载体引入到宿主细胞中,使得其整合到该宿主细胞中,但不需要使用抗生素标记。

[0014] 在本文所述的某些实施例中,核糖体 RNA 启动子是来源于枯草芽孢杆菌的 *rrn* 启动子。在某些实施例中,*rrn* 启动子是来源于枯草芽孢杆菌的 *rrnB*、*rrnI* 或 *rrnE* 核糖体 RNA 启动子。在具体的实施例中,核糖体 RNA 启动子是来源于枯草芽孢杆菌的 *P2rrnI* 核糖体 RNA 启动子。

[0015] 在其他的实施例中,核糖体 RNA 启动子包含 SEQ ID NO:1-6 中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:1-6 中保留启动子活性的任一者的子序列、与 SEQ ID NO:1-6 中任一者具有至少 60%同源性的核酸、或在中等严格性条件下与 SEQ ID NO:1-6 中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸。在具体的实施例中,核糖体 RNA 启动子包含 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列或其保留启动子活性的子序列。在其他实施例中,可使用任意上述启动子的组合。例如,*rrnI*、*rrnB* 和 *rrnE* 启动子的一种或多种 *P1*、*P2* 或 *P3* 启动子可一起使用。

[0016] 在本文所述的其他实施例中,核糖体蛋白启动子来源于枯草芽孢杆菌。在一些实施例中,核糖体蛋白启动子是来源于枯草芽孢杆菌的 *rpsD* 或 *rpsJ* 核糖体蛋白启动子。

[0017] 在另一个实施例中,核糖体蛋白启动子包含 SEQ ID NO:13-14 中任一者的核苷酸序列、SEQ ID NO:13-14 中保留启动子活性的任一者的子序列、与 SEQ ID NO:13-14 中任一者具有至少 60%同源性的核酸、或在中等严格性条件下与 SEQ ID NO:13-14 中任一者或其保留启动子活性的子序列杂交的核酸。在其他实施例中,可使用任意上述启动子的组合。例如,*rpsD* 或 *rpsJ* 启动子的一种或多种启动子可一起使用。在其他实施例中,核糖体蛋白启动子包含与 SEQ ID NO:13-14 中任一者或其保留启动子活性的子序列具有至少 70%、80%、90%、93%、95%、97%或 99%同源性的核酸。

[0018] 本文所述的核糖体启动子有效连接至编码目的蛋白的核酸。在一个实施例中,目

的蛋白选自激素、酶、生长因子、报告基因（如绿荧光蛋白）和细胞因子。在另一个实施例中，目的蛋白为酶。本发明所使用的酶可为，例如，蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、木聚糖酶、植酸酶、甘露聚糖酶、半纤维素酶、糖酶、水解酶、酯酶、氧化酶、透性酶、支链淀粉酶、漆酶、脂肪酶、还原酶、异构酶、表异构酶、互变异构酶、转移酶、激酶和磷酸酶。在具体实施例中，目的蛋白为蛋白酶。在另一个具体的实施例中，目的蛋白为枯草杆菌蛋白酶。在具体的实施例中，目的蛋白由 SEQ ID NO:9、11、18 或 20 编码。

[0019] 目的蛋白可能对于表达该蛋白的微生物而言是异源或同源的。在某些实施例中，将核酸、载体或用于表达编码目的蛋白的核酸的表达构建体整合到宿主细胞中。在某些实施例中，并不将核酸、载体或用于表达编码目的蛋白的核酸的表达构建体整合到宿主细胞中。核酸、载体或用于表达编码目的蛋白的核酸的表达构建体可在宿主细胞内扩增或可保持单拷贝形式。

[0020] 能够通过核糖体启动子表达的任何细菌或真菌微生物在本文可用作宿主细胞。在某些实施例中，所述微生物是革兰氏阳性微生物。在一些实施例中，所述微生物是芽孢杆菌属的一员。可用于本发明的芽孢杆菌细胞的例子包括（例如）枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌 (*B. lentus*)、短芽孢杆菌 (*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、灿烂芽孢杆菌 (*B. lautus*) 和苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)。在其他实施例中，所述微生物为大肠杆菌 (*E. coli*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp.)（如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 和产碱假单胞菌 (*P. alcaligenes*)）或链霉菌属 (*Streptomyces* spp.)（如变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*)）。

附图说明

[0021] 图 1 示出了本研究所用的枯草芽孢杆菌 *rrn* 操纵子的组织结构。表 1-2 列出了由启动子融合到靶基因而构建的不同菌株。

[0022] 图 2 示出了 *rrnE* P2 与来自 *rrnA*、*rrnB*、*rrnI*、*rrnD*、*rrnE*、*rrnJ* 和 *rrnO* 的 P1 启动子的比对结果。图 2 还示出了每个启动子的 -35 和 -10 区，以及位于每个启动子的 -35 序列上游的每个启动子的上游“UP”元件。

[0023] 图 3 示出了 *rrnE* P3 启动子与来自 *rrnA*、*rrnB*、*rrnI*、*rrnW*、*rrnH*、*rrnG*、*rrnD*、*rrnJ* 和 *rrnO* 的 P2 启动子的比对结果。图 3 还示出每个启动子的 -35 和 -10 区，以及位于每个启动子的 -35 序列上游的每个启动子的上游“UP”元件。

[0024] 图 4 是显示通过不同 *Papre*、*PrrnI*、*PrrnE* 或 *PrrnB* 启动子表达 GFP 的菌株的细胞密度测量的曲线图。

[0025] 图 5 是显示在菌株 BG8000 内通过 *Papre*、*PrrnI* 启动子表达 FNA 的菌株的细胞密度测量的曲线图。

[0026] 图 6 是显示在菌株 BG8010 内通过 *Papre*、*PrrnI*、*PrrnE* 和 *PrrnB* 启动子表达 FNA 的菌株的细胞密度测量的曲线图。

[0027] 图 7A 和 7B 是显示在菌株 BG8000 和 BG8010 内通过 *Papre* 和 *PrrnI* 启动子表达 ER11 的菌株的细胞密度测量的曲线图。

[0028] 图 8 是显示通过 *Papre*、*PrrnI*、*PrrnE* 和 *PrrnB* 启动子表达 GFP 的曲线图。

- [0029] 图 9 是显示通过 PaprE 和 PrnrI 启动子表达 FNA 的曲线图。
- [0030] 图 10 是显示通过 PaprE、PrnrI、PrnrE 和 PrnrB 启动子表达 FNA 的曲线图。
- [0031] 图 11 是显示通过 PaprE 和 PrnrI 启动子表达 ER11 的曲线图。
- [0032] 图 12 是显示通过 PaprE 和 PrnrI 启动子表达 FNA 的菌株的细胞密度测量的曲线图。
- [0033] 图 13 是显示菌株通过 PaprE 和 PrnrI 启动子表达 FNA 的曲线图。
- [0034] 图 14 是显示通过 PaprE 和 PrnrI 启动子构建体的单拷贝整合体表达 FNA 的细胞密度测量的曲线图。
- [0035] 图 15 是显示通过 PaprE 和 PrnrI 启动子构建体的单拷贝整合体表达 FNA 所获得的 FNA 表达曲线图。
- [0036] 图 16 是显示通过不同 Papre、PrpsJ 和 PrpsD 启动子表达 GFP 的菌株的细胞密度测量的曲线图。
- [0037] 图 17 是显示在菌株 BG8010 内通过 Papre、PrpsD 和 PrpsJ 启动子表达 FNA 的菌株的细胞密度测量的曲线图。
- [0038] 图 18 是显示通过 Papre、PrpsD 和 PrpsJ 启动子表达 GFP 的曲线图。
- [0039] 图 19 是显示通过 Papre、PrpsD 和 PrpsJ 启动子表达 FNA 的曲线图。
- [0040] 图 20 是显示通过 PaprE 和 PrpoD 启动子表达 FNA 的菌株的细胞密度测量的曲线图。
- [0041] 图 21 是显示菌株通过 PaprE 和 PrpoD 启动子表达 FNA 的曲线图。

具体实施方式

[0042] 本发明提供了用于微生物中的表达系统的改善的方法和组合物。在某些实施例中,所述方法和组合物包含来源于芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 菌种微生物的核糖体启动子。核糖体启动子包括(例如)核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子。在一些实施例中,提供了生产目的蛋白的新型生产微生物和方法。

[0043] 本文提及的所有专利和出版物,包括在这些专利和出版物中公开的所有序列,明确地以引用方式并入。

[0044] A. 定义

[0045] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义(参见,例如, Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2D ED., John Wiley and Sons, New York[1994] (Singleton 等人,《微生物学与分子生物学词典》,第 2 版,约翰威立父子出版公司,纽约,1994 年)以及 Hale&Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY[1991] (Hale 和 Marham,《哈珀柯林斯生物学词典》,纽约哈珀永久出版社,1991 年))。虽然任何与本文所述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料均可用于实施或测试本发明,但描述的是优选的方法和材料。

[0046] 数值范围包括限定该范围的数值。除非另外指明,否则分别地,核酸从左至右以 5' 至 3' 取向写出;氨基酸序列从左至右以氨基至羧基取向写出。

[0047] 本文提供的标题并不对本发明的各个方面或实施例构成限制。因此,通过整体参

考本说明书可更完全地限定下文定义的术语。

[0048] 如本文所用,术语“核酸序列”涵盖单链或双链的 DNA、RNA 及其修饰物。术语“核酸序列”与“多核苷酸”可在本文中互换使用。

[0049] 如本文所用,“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,并且包括指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。该术语也适用于包含保守氨基酸置换而使得多肽仍保持功能的聚合物。

[0050] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指能够充当输入序列(即,被引入到该细胞中的序列)的宿主和表达载体的细胞,如本文所述。在一个实施例中,该宿主细胞是微生物。在优选的实施例中,该宿主细胞为芽孢杆菌属菌种。

[0051] 如本文所用,“芽孢杆菌属”是指芽孢杆菌属内的所有种、亚种、菌株和其他分类群,包括但不限于枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。

[0052] 如本文所用,术语“DNA 构建体”或“表达构建体”是指包含至少两个 DNA 多核苷酸片段的核酸序列。DNA 或表达构建体可用于将核酸序列引入宿主细胞或生物体中。该 DNA 可在体外产生(如通过 PCR)或采用任何其他合适的技术产生。在一些优选的实施例中,该 DNA 构建体包含目的序列。目的序列的核酸有效连接至启动子。在一些实施例中,该 DNA 构建体还包含至少一个选择性标记。在另外的实施例中,该 DNA 构建体包含与宿主细胞染色体同源的序列。在其他实施例中,该 DNA 构建体包含非同源序列。

[0053] 如本文所用,术语“编码目的蛋白的核酸”或“目的的编码序列”可互换使用,是指当翻译为蛋白质时编码目的蛋白的核酸序列。在一些实施例中,该编码区以 cDNA 形式存在,而在其他的实施例中,则以基因组 DNA 或 RNA 形式存在。当以 DNA 形式存在时,寡核苷酸可为单链(即有义链)或双链。在一些实施例中,如果需要使转录正确引发和/或初级 RNA 转录本正确加工,则将合适的控制元件(如增强子、启动子、剪接点、多腺苷酸化信号等)置于紧密靠近基因编码区的位置。或者,在一些实施例中,本发明的表达载体所使用的编码区含有内源增强子、剪接点、间插序列、多腺苷酸化信号、或内源和外源控制元件的组合。

[0054] 如本文所用,术语“启动子”、“启动子元件”和“启动子序列”是指启动子位于寡核苷酸序列的 5' 端(即之前)时能够控制寡核苷酸序列转录为 mRNA 的 DNA 序列。因此,启动子通常位于寡核苷酸序列的 5' 端(即上游),其控制该寡核苷酸序列转录为 mRNA,并且提供与 RNA 聚合酶特异性结合和引发转录的部位。如本文所用,核糖体启动子包括(例如)核糖体 RNA 启动子或核糖体蛋白启动子。

[0055] 术语“有效连接”是指毗邻关系,其中各元件处于能让它们在功能上相关的布置关系。例如,如果某启动子控制目的的某编码序列的转录,则它与该序列有效连接。

[0056] 如本文所用,当提及核酸序列时,术语“启动子活性”是指该核酸序列引发寡核苷酸序列转录为 mRNA 的能力。

[0057] 术语“载体”在本文被定义为这样的多核苷酸,所述多核苷酸被设计成携带核酸序列进入一种或多种细胞类型中。载体包括克隆载体、表达载体、穿梭载体、质粒、噬菌体或病毒颗粒、DNA 构建体、表达盒等等。典型的表达载体也包括质粒,所述典型表达载体包括调

控序列,例如启动子、信号序列、目的基因和转录终止子。

[0058] 如本文所定义,术语“分离的”是指从至少一种其他化合物、蛋白质、细胞、核酸序列、氨基酸或与其天然来源通常相关联的其他生物物质中分离的化合物、蛋白质、细胞、核酸序列或氨基酸。

[0059] 如本文所用,术语“编码区”在本文中被定义为当置于包括启动子在内的适当控制序列的控制下时转录为 mRNA 并且该 mRNA 又翻译为多肽的核酸序列。编码序列可包括 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA 和重组 DNA。

[0060] 如本文所用,术语“野生型”基因、基因产物或细胞是指具有天然存在的来源中所发现的基因、基因产物或细胞的特征的基因、基因产物或细胞。野生型基因、基因产物或细胞是指群体中最常见的并因此被指定为“正常”或“野生型”形式的基因、基因产物或细胞。如本文所用,术语“野生型序列”和“野生型基因”可互换使用,是指天然的或天然存在于宿主细胞内的序列。

[0061] 相反,术语“修饰的”、“突变型”或“变体”基因、基因产物或细胞是指与野生型形式相比,其显示序列和 / 或功能性质的修饰(即改变的特征)的基因、基因产物或细胞。序列修饰可通过以下方式发生,例如置换、插入、缺失或任何其他会导致序列或特征发生改变的修饰。值得注意的是,可分离天然存在的突变体;这些突变体通过如下事实鉴别:与野生型基因或基因产物相比时,它们具有改变的特征。

[0062] 如本文所用,术语“经修饰的序列”和“经修饰的基因”可互换使用,是指天然存在的核酸序列的置换、插入、缺失、中断或任何其他修饰。在一些实施例中,经修饰的序列的表达产物是截短的蛋白质(例如,如果该修饰为序列的缺失或中断的话)。在一些实施例中,截短的蛋白质保留生物活性。在其他实施例中,经修饰的序列的表达产物是延长的蛋白质(例如,如果修饰是向核酸序列中的插入的话)。在其他实施例中,插入导致产生截短的蛋白质作为表达产物(例如,如果插入导致形成终止密码子的话)。

[0063] 如本文所用,“输入序列”是指引入宿主细胞染色体或基因组的 DNA 序列。该序列可编码一种或多种目的蛋白。该输入序列可包含有效连接至编码目的蛋白的序列的启动子。在一些实施例中,输入序列包含已存在于待转化细胞的基因组中的序列,而在其他实施例中,该序列尚未存在于待转化细胞的基因组中(即,在一些实施例中,它是同源序列,而在其他实施例中,它是异源序列)。

[0064] 在一些实施例中,该输入序列编码至少一种同源或异源蛋白,包括但不限于激素、酶、生长因子、或细胞因子。在一些优选实施例中,该输入序列编码至少一种酶,包括但不限于蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、木聚糖酶、植酸酶、甘露聚糖酶、半纤维素酶、糖酶、水解酶、酯酶、氧化酶(例如酚氧化酶)、透性酶、支链淀粉酶、漆酶、脂肪酶、还原酶、异构酶、表异构酶、互变异构酶、转移酶、激酶或磷酸酶。

[0065] 在一些实施例中,该输入序列编码功能性野生型基因或操纵子、功能性突变基因或操纵子,或非功能性基因或操纵子。

[0066] 如本文所用,术语“报告基因”是指能够在细胞中表达的核苷酸序列,并且在所述细胞中该报告基因的表达使得含有所表达基因的细胞能够很容易被检测和测量。

[0067] 如本文所用,术语“侧翼序列”是指处于正讨论的序列的上游或下游的任何序列(如,对于序列 A B C,序列 B 侧接 A 和 C 序列)。在一些实施例中,该输入序列的每侧均侧

接同源盒。

[0068] 如本文所用,术语“同源盒”是指与另一种核酸序列同源的序列。例如,同源盒可与基因组 DNA 中的核酸序列同源。在这种情况下,该同源盒可用于引导新构建体整合到基因组 DNA 的位置。

[0069] 如本文所用,术语“同源重组”是指两个 DNA 分子或成对染色体(即交换期间)之间的 DNA 片段在相同的核苷酸序列位点处的交换。在一个实施例中,染色体整合通过同源重组来完成。

[0070] 如本文所用,术语“异源”通常是指并非天然存在于宿主细胞中的多核苷酸或多肽,或是指来源于与该宿主细胞相同的遗传来源或物种的多核苷酸或多肽,但其所处位置不是异源序列原本的位置。在一些实施例中,异源序列是非宿主序列,而在其他实施例中,它是经修饰的序列、来自不同宿主细胞株的序列,或来自该宿主细胞的不同染色体位置的同源序列。

[0071] 如本文所用,术语“转染”或“转化”均指将 DNA 引入细胞的方法。

[0072] 如本文所用,术语“互补的”或“互补性”用来指与碱基配对原则相关的“多核苷酸”或“寡核苷酸”(它们是可互换的术语,均是指核苷酸序列)。例如,序列“5'-CAGT-3'”与序列“5'-ACTG-3'”互补。互补性可以是“部分的”或“全部的”。“部分的”互补性是指一个或多个核酸碱基没有按照碱基配对原则进行配对的情况。核酸之间的“全部的”或“完整的”互补性是指各个和每个核酸碱基按照碱基配对原则与另一个碱基配对的情况。

[0073] 如本文所用,术语“染色体整合”是指将输入序列引入宿主细胞的染色体(即基因组)的过程。

[0074] 如本文所用,术语“选择性标记”是指所使用的任何“标记”(即指示物),其指示目的蛋白或基因的存在或不存在。在一些实施例中,该术语涵盖了编码酶活性的基因,该酶活性使细胞能够在缺乏本来必需的物质培养基内生长。在其他实施例中,选择性标记使表达该选择性标记的细胞具有对抗生素或药物的抗性。

[0075] 如本文所用,术语“信号序列”或“信号肽”是指在蛋白质的 N 端部分的氨基酸序列,其促进成熟形式的蛋白质分泌到细胞外部。细胞外蛋白质的成熟形式没有信号序列,其在分泌过程期间被切除。

[0076] “扩增”在本文被定义为产生核酸序列的额外拷贝。核酸扩增可通过例如聚合酶链反应或本领域熟知的其他技术进行。如本文所用,术语“聚合酶链反应”(PCR)是指美国专利 No. 4,683,195、No. 4,683,202 和 No. 4,965,188 的方法(所有这些专利据此以引用方式并入),其描述在不进行克隆或纯化的情况下增加靶序列的某个片段在 DNA 样品(例如基因组 DNA)中的浓度的方法。

[0077] 采用 PCR,可以将基因组 DNA 中的单拷贝的特异性靶序列扩增至一定水平,所述水平可通过若干不同的方法(例如,与标记探针杂交;整合生物素酰化引物后进行亲和素-酶缀合物检测;或将 . sup. 32P 标记的三磷酸脱氧核苷酸,例如 dCTP 或 DATP,整合到扩增的片段中)来检测。除了基因组 DNA 外,任何寡核苷酸序列也可以使用一组合适的引物分子进行扩增。具体地讲,通过自身 PCR 过程产生的扩增片段本身就是有效的后续 PCR 扩增模板。

[0078] 如本文所用,术语“引物”指这样的寡核苷酸,无论是如在纯化的限制酶切消化物(restriction digest)中天然存在的还是以合成方式产生的,其当被置于与某核酸链互补

的引物延伸产物的合成得以诱导的条件下时能够充当合成起始点。为了使扩增效率最高，引物优选为单链的，但作为另一种选择其也可以是双链的。

[0079] 如本文所用，术语“探针”指这样的寡核苷酸，无论是如在纯化的限制酶切消化物中的天然存在的还是以合成方式产生的，其能够与目的的另一寡核苷酸杂交。探针可以是单链的或双链的。探针可用于特定基因序列的检测、鉴别和分离。设想到，本发明中所用的任何探针将用任何“报告分子”进行标记，从而其可在任何检测系统中检测，所述检测系统包括但不限于酶系统（如 ELISA，以及基于酶的组织化学测定法）、荧光系统、放射性系统和发光系统。无意于将本发明限于任何具体的检测系统或标记。

[0080] 如本文所用，术语“限制性核酸内切酶”和“限制性酶”是指这样的细菌酶，其中各个酶都能够在特异性核苷酸序列处或附近切割双链或单链 DNA。

[0081] B. 核糖体启动子

[0082] 核糖体 RNA 合成是大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和枯草芽孢杆菌的核糖体合成中的限速步骤。通过核糖体 RNA 启动子调控核糖体 RNA 转录在之前有过研究 (Samarrai et al., 2011, *J Bacteriology*, 193:723-733 (Samarrai 等人, 2011 年,《细菌学杂志》, 第 193 卷, 第 723-733 页); Natori et al., 2009, *J Bacteriology*, 191:4555-4561 (Natori 等人, 2009 年,《细菌学杂志》, 第 191 卷, 第 4555-4561 页); Turnbough, 2008, *Molecular Microbiology* 69:10-14 (Turnbough, 2008 年,《分子微生物学》, 第 69 卷, 第 10-14 页); Krasny et al., 2008, *Mol Microbiology* 69:42-54 (Krasny 等人, 2008 年,《分子微生物学》, 第 69 卷, 第 42-54 页); Krasny and Gourse, 2004, *EMB023*:4473-4483 (Krasny 和 Gourse, 2004 年,《欧洲分子生物学组织杂志》, 第 23 卷, 第 4473-4483 页))。通过营养条件严格调控 rRNA 启动子, 从而在翻译需求较低时核糖体 RNA 和核糖体不会过度生产。大肠杆菌中存在七种 rRNA (rrn) 操纵子, 每种操纵子都包含指定为 P1 和 P2 的两种启动子。大肠杆菌 rrn P1 启动子的核心 -10/-35 区的前面是上游 (UP) 元件, 该元件通过结合 RNA 聚合酶使启动子活性增加最多至 20-50 倍。枯草芽孢杆菌含有 10 种 rrn 操纵子 (Krasny 和 Gourse, 出处同上), 这些操纵子的前面也有能够帮助提高启动子活性的上游 (UP) 元件。参见图 2 和 3。

[0083] 虽然目前已针对天然核糖体 RNA 的生产对核糖体 RNA 启动子的调控进行了研究, 但仍未研究使用核糖体 RNA 启动子时编码目的的异源蛋白的核酸序列的表达水平。

[0084] 之前已在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中研究过编码核糖体蛋白的基因的调控 (Grundy and Henkin, 1991, *J. Bacteriology*, 173:4595-4602 (Grundy 和 Henkin, 1991 年,《细菌学杂志》, 第 173 卷, 第 4595-4602 页))。在许多情况下, 已发现核糖体蛋白充当自体阻遏蛋白, 控制编码它们的操纵子的表达。

[0085] 本发明证实了核糖体启动子, 例如核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子, 在生产目的的异源蛋白方面具有意想不到的效果。在与其他常用的启动子相比以及以每单位时间生产的 mRNA 分子数量来衡量时, 这两种情况下得出的通过核糖体启动子所转录的 mRNA 量都高得惊人。参见例如实例 3-5 和 9-10, 其比较了核糖体启动子与高表达的 *apre* 启动子的表达。在一个实施例中, 本发明的核糖体启动子提供增强的转录效率, 如以每单位时间生产的 mRNA 分子数量来衡量。

[0086] 使用核糖体启动子时, 编码目的的异源蛋白的核酸序列获得意想不到的高水平表达, 这具有若干有益效果。在一个实施例中, 在与通过自身天然的启动子来表达目的的编

码序列相比时,使用核糖体启动子来表达目的的编码序列使得目的的编码序列的表达量增加。增加的表达量尤其可用于不稳定的转录本。

[0087] 在另一个实施例中,使用核糖体启动子表达目的的编码序列使得目的的编码序列的表达量增加,无需扩增包含核糖体启动子的表达构建体。当使用本领域的其他表达构建体时,为了使目的的编码序列获得高表达水平,通常需要扩增表达构建体。然而,使用本文所述的核糖体启动子所获得的表达水平足够高,以至于没有必要扩增表达构建体。相反,使用包含核糖体启动子的表达构建体的单个整合体获得高表达水平。参见实例 4 和 5。这提供若干有益效果。首先,宿主菌株更为稳定,因为它们不会发生已扩增的表达构建体的丢失。另外,如果不需要扩增表达构建体,则菌株的构建将更有效。由此节约了时间、金钱和材料。

[0088] 在一些实施例中,该核糖体启动子为核糖体 RNA 启动子。本发明所用的核糖体 RNA 启动子是来自芽孢杆菌属 *rrnI*、*rrnE* 或 *rrnB* 核糖体 RNA 启动子的 P1、P2 或 P3 启动子中的任意一种。在一个实施例中,本发明使用的 RNA 启动子为来自芽孢杆菌属 *rrnI* 核糖体 RNA 启动子的 P2 启动子。在一些实施例中,可使用来自芽孢杆菌属 *rrnI*、*rrnE* 或 *rrnB* 核糖体 RNA 启动子的 P1、P2 或 P3 启动子的组合。参见例如实例 2-4 和图 4、8、6 和 10。

[0089] 在具体的实施例中,位于本文所述的核糖体启动子(如核糖体 RNA 启动子或核糖体蛋白启动子)的 +1 转录起始位点的核苷酸由鸟嘌呤修饰为腺嘌呤。例如,本文所述的核糖体 RNA 启动子的转录起始位点在图 2 和图 3 中示出。+1 转录起始位点的修饰允许通过本文所述的启动子恒定生产,因此通过该启动子获得更好的总体生产力。

[0090] 在一个实施例中,启动子具有 SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者的核酸序列或其子序列。该子序列将保留启动子活性并且包含至少约 10 个核苷酸、至少约 20 个核苷酸、至少约 30 个核苷酸、至少约 40 个核苷酸、至少约 50 个核苷酸、至少约 60 个核苷酸、至少约 70 个核苷酸、至少约 80 个核苷酸、至少约 90 个核苷酸或至少约 100 个核苷酸。SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者的子序列应最少包含亲本启动子的 -35 和 -10 区。例如,SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者的子序列应最少包含亲本启动子的 -35 和 -10 区,如图 2 和 3 或表 1-1 和 2-1 所示。在某些实施例中,SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者的子序列包含亲本启动子的 -35 和 -10 区,并且还包含亲本启动子的上游 UP 元件,如图 2 和 3 所示。

[0091] 在具体的实施例中,该启动子具有 SEQ ID NO:3 的核酸序列或其子序列。该子序列将保留启动子活性并且包含至少约 10 个核苷酸、至少约 20 个核苷酸、至少约 30 个核苷酸、至少约 40 个核苷酸、至少约 50 个核苷酸、至少约 60 个核苷酸、至少约 70 个核苷酸、至少约 80 个核苷酸、至少约 90 个核苷酸和至少约 100 个核苷酸。

[0092] 该启动子也可以是包含本发明的一种或多种启动子的一部分或本发明的启动子的一部分和另一种启动子的一部分的杂合启动子。在一些实施例中,该杂合启动子将包含 SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者的子序列,该子序列具有 SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者的至少约 10 个核苷酸、至少约 20 个核苷酸、至少约 30 个核苷酸、至少约 40 个核苷酸、至少约 50 个核苷酸、至少约 60 个核苷酸、至少约 70 个核苷酸、至少约 80 个核苷酸、至少约 90 个核苷酸或至少约 100 个核苷酸。

[0093] 该杂合启动子的另一启动子可以是在宿主细胞中显示启动子活性的任何启动子,并且包括可能是或可能不是宿主细胞中天然存在的突变型启动子、截短的启动子等。可用

于本发明的杂合启动子的其他启动子的例子包括真菌和细菌启动子。一些具体的非限制性例子包括: *aprE* 启动子或突变型 *aprE* 启动子 (W001/51643)、弗氏链霉菌 (*Streptomyces fradiae*) 氨基糖苷 3'-磷酸转移酶基因的 *aph* 启动子、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 葡糖淀粉酶 (*glaA*) 启动子、密苏里游动放线菌 (*Actinoplanes missouriensis*) 的葡糖异构酶 (GI) 启动子以及衍生的 GI (GIT) 启动子 (美国专利 No. 6, 562, 612 和 EPA351029)、来自变铅青链霉菌的葡糖异构酶 (GI) 启动子、短的野生型 GI 启动子、1.5GI 启动子、1.20GI 启动子或 W003/089621 中所公开的任一种变体 GI 启动子、来自丝状真菌的 *cbh1*、*cbh2*、*egl1* 和 *egl2* 启动子,特别是里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 纤维二糖水解酶启动子 (GenBank 登录号 D86235)、*lacZ* 和 *tac* 启动子 (Bagdasarion et al., 1983, Gene26:273-282 (Bagdasarion 等人, 1983 年,《基因》,第 26 卷,第 273-282 页))、*ermE* 启动子 (Ward et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 203:468-478 (Ward 等人, 1986 年,《分子遗传学与普通遗传学》,第 203 卷,第 468-478 页) 和 Schmitt-John et al., 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:493-498 (Schmitt-John 等人, 1992 年,《应用微生物学和生物技术》,第 36 卷,第 493-498 页)),以及枯草芽孢杆菌噬菌体 ϕ 29 启动子 (Pulido et al., 1986, Gene49:377-382 (Pulido 等人, 1986 年,《基因》,第 49 卷,第 377-382 页))。链霉菌中有效的启动子列于 Hopwood 等人的文献中 (Hopwood et al., Regulation of Gene Expression in Antibiotic-producing *Streptomyces*. In Booth, I. and Higgins, C. (Eds) SYMPOSIUM OF THE SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, REGULATION OF GENE EXPRESSION, Cambridge University Press, 1986 pgs. 251-276 (Hopwood 等人,《产抗生素的链霉菌的基因表达调控》,载于: Booth, I. 和 Higgins, C. 编辑,《普通微生物学学会关于基因表达调控的专题研讨会》,剑桥大学出版社,1986 年,第 251-276 页))。链霉菌噬菌体启动子也公开于 Labes et al., 1997, Microbiol. 143:1503-1512 (Labes 等人, 1997 年,《微生物学》,第 143 卷,第 1503-1512 页)。可有效用于本文所述杂合启动子的其他启动子是列于如下文献中的启动子: Deuschle et al., 1986 EMBO J. 5:2987-2994 (Deuschle 等人, 1986 年,《欧洲分子生物学组织杂志》,第 5 卷,第 2987-2994 页) 和 W096/00787。

[0094] 该启动子也可以是包含两个或更多个启动子的串联启动子。在一些实施例中,该串联启动子将包括 SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者的启动子或其子序列,以及一种或多种其他启动子,例如以上针对杂合启动子所讨论的启动子。

[0095] 杂合启动子、串联启动子、为 SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者的子序列的启动子或与 SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者杂交的核酸序列将具有其相应亲本启动子至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 80% 和至少约 100% 的启动子活性。在一些实施例中,该启动子活性将更大,例如大于约 100%、大于约 150%、大于约 200% 和大于约 250%。

[0096] 在一些实施例中,该启动子将包括在中等严格性条件、高严格性条件或极高严格性条件下与 SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者或其子序列杂交的核酸序列。在具体的实施例中,该启动子将包括在中等严格性条件、高严格性条件或极高严格性条件下与 SEQ ID NO:3 或其子序列杂交的核酸序列。

[0097] 在具体的实施例中,利用杂交来分析给定的 DNA 片段是否对应本文所述的启动子 DNA 序列从而是否落在本发明的范围内。Sambrook et al., MOLECULAR CLONING:A

LABORATORY MANUAL (2. sup. nd Ed. , 1989 Cold Spring Harbor, N. Y.) (Sambrook 等人,《分子克隆 :实验室手册》,第二版,1989 年,冷泉港实验室出版社,纽约)描述了一般的杂交方法。

[0098] “杂交条件”是指测量杂交的条件的“严格性”程度。杂交条件可基于核酸结合复合物的解链温度 (T_m),如 Berger 和 Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol152, Academic Press, San Diego Calif. (1987 年,“分子克隆技术指南”,《酶学方法》,第 152 卷,学术出版社,加利福尼亚州圣地亚哥)) 中提出。杂交条件也可基于本领域已知的杂交后采用的洗涤条件。

[0099] 仅出于说明目的,“低严格性”条件可指在 20℃ 下使用 0.2x SSC/0.1% SDS 溶液洗涤 15 分钟。“中等严格性”条件可指在 37℃ 下使用 0.2x SSC/0.1% SDS 溶液洗涤 30 分钟。“高严格性”条件可指在 37℃ 下使用 0.2x SSC/0.1% SDS 溶液洗涤 45 分钟。“极高严格性”条件可指在 37℃ 下使用 0.2x SSC/0.1% SDS 溶液洗涤 60 分钟。然而,与具体溶液成分、温度和洗涤时间有关的严格性可能会根据具体的核酸和其他相关条件而改变。技术人员将能够确定与所需的严格性程度相关的杂交条件。

[0100] 本发明的另一个方面是根据核酸结合复合物的解链温度 (T_m) 来使用杂交条件,如 Berger 和 Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol152, Academic Press, San Diego Calif. (1987 年,“分子克隆技术指南”,《酶学方法》,第 152 卷,学术出版社,加利福尼亚州圣地亚哥)) 中提出。仅出于说明目的,“极高严格性”通常发生在约 $T_m - 5^\circ\text{C}$ (比探针 T_m 低 5°C);“高严格性”通常发生在 T_m 以下约 5°C 至 10°C ;“中等严格性”发生在 T_m 以下约 10°C 至 20°C ;以及“低严格性”发生在 T_m 以下约 20°C 至 25°C 。

[0101] 可按下列所述执行杂交分析的一个例子:根据制造商的说明使用适当的限制性酶,例如 EcoR I、Hind III、Bam HI、Cla I、Kpn I、Mlu I、Spe I、Bgl II、Nco I、Xba I、Xho I 和 Xma I (由马萨诸塞州贝弗利新英格兰生物实验室 (New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.) 和宝灵曼公司 (Boehringer Mannheim) 提供),进行消化以使特定目标来源的基因组 DNA 片段化。然后通过琼脂糖凝胶 (例如,0.8% 琼脂糖) 电泳分析样品,从而可以根据大小观察 DNA 片段的分离。一般是通过溴化乙锭染色来观察 DNA 片段。该凝胶可以先在蒸馏水中短暂冲洗,随后在适当溶液 (例如 0.25M HCl) 中轻轻振荡以进行脱嘌呤,接着轻轻振荡变性 30 分钟 (在例如 0.4M NaOH 中)。可包括复性步骤,在该步骤中,将凝胶放入到 1.5M NaCl, 1M Tris, pH7.0 下轻轻摇荡 30 分钟。然后应使用转移溶液 (例如 6x SSC (900mM NaCl、90mM 柠檬酸三钠)) 将 DNA 转移到适当的带正电的膜上,例如最大强度的 Nytran Plus 膜 (Maximum Strength Nytran Plus membrane) (新罕布什尔州基恩的施莱歇许尔公司 (Schleicher&Schuell, Keene, N. H.))。一旦完成转移,通常约 2 个小时后,将该膜在例如 $2\times\text{SSC}$ ($2\times\text{SSC} = 300\text{mM NaCl}, 30\text{mM 柠檬酸三钠}$) 中冲洗,然后在室温下风干。随后,应当将该膜在合适的预杂交溶液 (例如,每 100mL 的水溶液含:20–50mL 甲酰胺、25mL 的 $20\times\text{SSPE}$ ($1\times\text{SSPE} = 0.18\text{M NaCl}, 1\text{mM EDTA}, 10\text{mM NaH}_2\text{PO}_4, \text{pH}7.7$)、2.5mL 的 20% SDS 和 1mL 的 10mg/mL 剪切的鲑鱼精 DNA) 中预杂交 (大约 2 个小时或更长时间)。正如本领域技术人员所知道的,预杂交溶液中甲酰胺的量可能因根据常规方法所获得的反应的性质的不同而不同。因此,在识别杂交分子方面,较低量的甲酰胺可比使用较高量的甲酰胺的相同工序获得更完全的杂交。另一方面,使用较多的甲酰胺可更容易通过视觉识别强的杂交带。

[0102] 通常长度在 50 和 500 个碱基之间的 DNA 探针应采用琼脂糖凝胶电泳进行分离,从凝胶上切下该片段,然后从已切下的琼脂糖中进行回收。如需了解更详细的工序,请参见 Sambrook, 出处同上。然后对该已纯化的 DNA 片段进行标记(根据制造商的说明书,使用例如 Megaprime 标记系统)以将 P^{32} 掺入 DNA 中。将标记探针加热至 95℃ 持续 5 分钟进行变性,然后立刻加入到膜以及预杂交溶液中。杂交反应应在合适的条件下进行合适的时间,例如,在 37℃ 下 18 个小时,同时轻轻振荡或旋转。先冲洗膜(例如,在 2×SSC/0.3% SDS 中),随后在合适的洗涤溶液中洗涤,同时轻轻搅拌。所需的严格性将是膜(滤膜)被冲洗的条件的反映。

[0103] 在一个实施例中,该核酸序列将是 SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者的序列,并且杂交严格性条件将为高严格性条件。在另一个实施例中,该核酸序列将是 SEQ ID NO:3 的序列,并且杂交严格性条件将为高严格性条件。

[0104] 在其他实施例中,根据本发明的启动子将是与 SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%,以及至少 99% 序列同一性的子序列。在另一个实施例中,根据本发明的启动子将是与 SEQ ID NO:3 具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%,以及至少 99% 序列同一性的子序列。SEQ ID NO:1-6 或 13-14 中任一者的子序列应最少包含亲本启动子的 -35 和 -10 区,如图 2 和 3 或表 1-1 和 2-1 所示。在某些实施例中,SEQ ID NO:1-6 中任一者的子序列包含亲本启动子的 -35 和 -10 区,并且还包含亲本启动子的上游 UP 元件,如图 2 和 3 所示。

[0105] 在两条核酸序列或多肽的语境中,术语“同一性”是指当比对以达到最大匹配程度时两条序列中相同的核苷酸或氨基酸残基,如使用如下“序列比较算法”中的一种所测定的。用于比较的序列的最佳比对可通过以下方式进行,例如,通过 Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981) (Smith 和 Waterman,《应用数学进展》,第 2 卷,第 482 页,1981 年)的局部同源算法、通过 Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970) (Needleman 和 Wunsch,《分子生物学杂志》,第 48 卷,第 443 页,1970 年)的同源比对算法、通过 Pearson&Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA85:2444(1988) (Pearson 和 Lipman,《美国国家科学院院刊》,第 85 卷,第 2444 页,1988 年)的寻找相似性方法、通过这些算法(威斯康星遗传学软件包,遗传学计算机组(Wisconsin Genetics Software, Package Genetics Computer Group), 575 Science Dr., Madison, Wis. 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA)的计算机实现或通过目测来进行。

[0106] 适用于确定序列相似性的算法的例子是 BLAST 算法,其描述于 Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410(1990) (Altschul 等人,《分子生物学杂志》,第 215 卷,第 403-410 页,1990 年)。用于执行 BLAST 分析的软件是通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)可公开获得的,可登录万维网(www.ncbi.nlm.nih.gov)获取。BLAST 算法对两条序列之间的相似性进行统计分析(参见例如 Karlin&Altschul, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA90:5873-5787(1993) (Karlin 和 Altschul,《美国国家科学院院刊》,第 90 卷,第 5873-5787 页,1993 年))。

[0107] B. 目的的编码序列

[0108] 本发明涵盖的启动子有效连接至编码目的蛋白的核酸(即,目的的编码序列)。

由编码序列编码的多肽可以是酶、激素、生长因子、细胞因子、抗生素或其部分、受体或其部分、报告基因（如绿荧光蛋白）或其他次生代谢物。

[0109] 在一些实施例中，该酶是来源于细菌或真菌的蛋白酶、纤维素酶、半纤维素酶、木聚糖酶、淀粉酶、葡糖淀粉酶、角质酶、植酸酶、漆酶、脂肪酶、异构酶、酯酶、甘露聚糖酶、糖酶、水解酶、氧化酶、透性酶、支链淀粉酶、还原酶、表异构酶、互变异构酶、转移酶、激酶、磷酸酶，或等等。

[0110] 在一些实施例中，该酶是纤维素酶。纤维素酶是水解纤维素中 β -D- 葡萄糖苷键的酶。传统上将纤维素分解酶分为三大类：内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶或纤维二糖水解酶以及 β - 葡萄糖苷酶 (Knowles, J. et al., TIBTECH5:255-261 (1987) (Knowles, J. 等人, TIBTECH, 第 5 卷, 第 255-261 页, 1987 年))。许多纤维素酶在科学文献中有所描述, 其例子包括: 来自里氏木霉的纤维素酶: Shoemaker, S. et al., Bio/Technology, 1:691-696, 1983 (Shoemaker, S. 等人, 《生物技术》, 第 1 卷, 第 691-696 页, 1983 年), 该文献公开了 CBHI; Teeri, T. et al., Gene, 51:43-52, 1987 (Teeri, T. 等人, 《基因》, 第 51 卷, 第 43-52 页, 1987 年), 该文献公开了 CBHII; Penttila, M. et al., Gene, 45:253-263, 1986 (Penttila, M. 等人, 《基因》, 第 45 卷, 第 253-263 页, 1986 年), 该文献公开了 EGI; Saloheimo, M. et al., Gene, 63:11-22, 1988 (Saloheimo, M. 等人, 《基因》, 第 63 卷, 第 11-22 页, 1988 年), 该文献公开了 EGII; Okada, M. et al., Appl. Environ. Microbiol., 64:555-563, 1988 (Okada, M. 等人, 《应用环境微生物学》, 第 64 卷, 第 555-563 页, 1988 年), 该文献公开了 EGIII; Saloheimo, M. et al., Eur. J. Biochem., 249:584-591, 1997 (Saloheimo, M. 等人, 《欧洲生物化学杂志》, 第 249 卷, 第 584-591 页, 1997 年), 该文献公开了 EGIV; 以及 Saloheimo, A. et al., Molecular Microbiology, 13:219-228, 1994 (Saloheimo, A. 等人, 《分子微生物学》, 第 13 卷, 第 219-228 页, 1994 年), 该文献公开了 EGV 外切纤维二糖水解酶, 并且来自木霉属之外的菌种的内切葡聚糖酶也有描述, 例如 Ooi 等人, 1990, 该文献公开了编码由棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 产生的内切葡聚糖酶 F1-CMC 的 cDNA 序列; Kawaguchi T 等人, 1996, 该文献公开了编码由棘孢曲霉产生的 β - 葡萄糖苷酶 1 的 cDNA 的克隆和测序; Sakamoto 等人, 1995, 该文献公开了编码来自白曲霉 (*Aspergillus kawachii*) IF04308 的内切葡聚糖酶 CMCCase-1 的 cDNA 序列; 以及 Saarilahti 等人, 1990, 该文献公开了来自欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*) 的内切葡聚糖酶。

[0111] 在具体的实施例中，待由本发明的启动子表达的纤维素酶是美国专利 No. 6, 2, 87, 839 和美国专利 No. 6, 562, 612 中公开的纤维素酶。在某些实施例中，待表达的纤维素酶是包含美国专利 No. 6, 562, 612 的 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列、其具有纤维素分解活性并且与美国专利 No. 6, 562, 612 的 SEQ ID NO:1 的活性部分具有大于 70% 序列同一性的片段或衍生物的纤维素酶。

[0112] 在其他实施例中，该酶是蛋白酶，例如丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、巯基蛋白酶或酸性蛋白酶。在一些实施例中，该蛋白酶将是丝氨酸蛋白酶（如枯草杆菌蛋白酶）。丝氨酸蛋白酶描述于 Markland, et al. (1983) Honne-Seyler's Z Physiol. Chem 364:1537-1540 (Markland 等人, 1983 年, Honne-Seyler's Z Physiol. Chem, 第 364 卷, 第 1537-1540 页); Drenth, J. et al. (1972) Eur. J. Biochem. 26:177-181 (Drenth, J. 等人, 1972 年, 《欧洲生物化学杂志》, 第 26 卷, 第 177-181 页); 美国专利

No. 4, 760, 025 (RE34, 606)、5, 182, 204 和 6, 312, 936 和 EP0323, 299。本发明可用的蛋白酶也描述于,例如,美国专利公布 No. 2010/0152088 和国际公布 No. W02010/056635。测量蛋白分解活性的方法公开于 K. M. Kalisz, “Microbial Proteinases” ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, A. Fiecht Ed. 1988 (K. M. Kalisz, “微生物蛋白酶”, 《生物化学工程与生物技术进展》, A. Fiecht 编辑, 1988 年)。

[0113] 在另一个实施例中,待由本发明的启动子表达的蛋白酶是包含 SEQ ID NO:10、12、19 或 21 的氨基酸序列、其具有蛋白分解活性并且与 SEQ ID NO:10、12、19 或 21 的活性部分具有大于 70% 序列同一性的片段或衍生物的蛋白酶。编码 SEQ ID NO:10、12、19 或 21 的核酸序列分别是 SEQ ID NO:9、11、18 和 20。

[0114] 在其他实施例中,该酶是淀粉酶,例如来源于木霉属(例如里氏木霉)的淀粉酶、木霉属葡糖淀粉酶,来源于芽孢杆菌属(例如枯草芽孢杆菌)的淀粉酶、或来源于地芽孢杆菌属(*Geobacillus*) (例如嗜热脂肪地芽孢杆菌(*G. stearothermophilus*))的淀粉酶。细菌和真菌淀粉酶描述于,例如,美国专利 No. 8, 058, 033、美国专利公布 No. 2010/0015686、美国专利公布 No. 2009/0314286、英国申请 No. 1011513.7, 以及国际申请 No. PCT/IB2011/053018。这些参考文献的每一个的说明书据此全文以引用方式并入。

[0115] 在其他实施例中,该酶是木聚糖酶。在某些实施例中,木聚糖酶来源于木霉属(例如里氏木霉)。细菌和真菌木聚糖酶描述于,例如,国际公布 No. W02001/027252 和美国专利 No. 7, 718, 411。这些参考文献的每一个的说明书据此全文以引用方式并入。

[0116] 在其他实施例中,该酶是植酸酶。在某些实施例中,植酸酶来源于柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*) (例如弗氏柠檬酸杆菌(*C. freundii*)) 或大肠杆菌。在其他实施例中,植酸酶可以是布丘氏菌(*Buttiauxella*) 植酸酶,例如乡间布丘氏菌(*Buttiauxella agrestis*) 植酸酶。植酸酶描述于,例如,国际公布 No. W02006/043178、W02006/038062、W02008/097619、W02009/129489、W02006/038128、W02008/092901、W02009/129489 和 W02010/122532。这些参考文献的每一个的说明书据此全文以引用方式并入。

[0117] 在一些实施例中,激素是促卵泡激素、促黄体生成激素、促肾上腺皮质激素释放因子、生长激素释放抑制因子、促性腺激素、加压素、催产素、促红细胞生成素、胰岛素等等。

[0118] 在一些实施例中,该生长因子是结合到细胞表面上的受体的蛋白质,主要结果是激活细胞增殖和/或分化,该生长因子包括血小板衍生生长因子、表皮生长因子、神经生长因子、成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、转化生长因子等等。

[0119] 在一些实施例中,该生长因子是细胞因子。细胞因子包括但不限于集落刺激因子、白介素(IL-1(α 和 β))、IL-2 至 IL-13) 和干扰素(α 、 β 和 γ)。

[0120] 在一些实施例中,该抗体包括但不限于希望能从中大量生产的任何物种的免疫球蛋白,特别优选的是该抗体为人类抗体。免疫球蛋白可来自任何一类,即 G、A、M、E 或 D。

[0121] 该编码序列可以是宿主细胞天然存在的或异源的。此外,该编码序列可以编码全长蛋白或全长蛋白的截短形式。本发明不限于具体的编码序列,但涵盖许多编码序列,这些序列有效连接至本发明的启动子。

[0122] C. 信号序列

[0123] 在一些实施例中,尤其是当目的的编码序列编码胞外酶时,例如纤维素酶、蛋白酶或淀粉降解酶,信号序列可连接至该编码序列的 N 端部分。该信号可用于促进 DNA 序

列的分泌。该信号序列可能对于宿主生物体是内源或外源的。该信号序列可为与编码的多肽通常相关的序列。在一些实施例中,该信号序列可发生改变或修饰,如国际专利公布 No. W02011/014278 和 W02010/123754 中所描述,这些文献的说明书据此全文以引用方式并入。在一些实施例中,该信号序列包含来自链霉菌纤维素酶基因的信号序列。在一个实施例中,优选的信号序列是变铅青链霉菌纤维素酶 celA(Bentley et al., (2002) Nature 417:141-147 (Bentley 等人, 2002 年,《自然》,第 417 卷,第 141-147 页))。然而,本领域的技术人员知道许多可根据宿主生物体内待表达和分泌的蛋白进行使用的信号肽。

[0124] D. DNA 构建体和载体

[0125] 本发明中包含目的编码区的核酸构建体可采用已建立的标准方法通过合成的方式进行制备,例如 Beaucage and Caruthers, (1981) Tetrahedron Letters 22:1859-1869 (Beaucage 和 Caruthers, 1981 年,《四面体通讯》,第 22 卷,第 1859-1869 页)描述的亚磷酰胺方法或 Matthes et al., (1984) EMBO Journal 3:801-805 (Matthes 等人, 1984 年,《欧洲分子生物学组织杂志》,第 3 期,第 801-805 页)描述的方法。该核酸构建体可以是混合的合成和基因组来源,并且可以通过连接合成或基因组 DNA 的片段来制备。该核酸构建体还可以使用特异性引物通过聚合酶链反应进行制备,例如美国专利 No. 4,683,202 或 Saiki et al., Science 239 (1988), 487-491 (Saiki 等人,《科学》,1988 年,第 239 卷,第 487-491 页)中所述。

[0126] 本发明的 DNA 构建体可插入到载体中,例如表达载体。适用于在真菌、酵母和细菌中克隆、转化和表达多肽的各种载体是本领域技术人员已知的。通常,该载体或表达盒将包含本发明的启动子,任选地信号序列、目的编码区和终止子序列。在优选的实施例中,该载体将包括位于该信号序列和终止子序列之间的一个或多个克隆位点。

[0127] E. 转化

[0128] 本发明的载体将转化到宿主细胞中。通用转化技术是本领域已知的 (Ausubel et al., 1994, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel 等人, 1994 年,《分子生物学实验室指南》) 和 Campbell et al., 1989 Curr. Genet 16:53-56 (Campbell 等人, 1989 年,《当代遗传学》,第 16 卷,第 53-56 页))。这些通用技术的一些包括但不限于使用粒子或基因枪(生物弹道技术)、在转化过程之前使丝状真菌细胞壁透化(例如,通过使用高浓度碱,例如,0.05M 至 0.4M CaCl_2 或乙酸锂)、原生质体融合、电穿孔或农杆菌介导转化(美国专利 No. 6,255,115),以及使用聚乙二醇和 CaCl_2 对原生质体或原生质球的处理描述于 Campbell, et al., (1989) Curr. Genet. 16:53-56, 1989 (Campbell 等人, 1989 年,《当代遗传学》,第 16 卷,第 53-56 页) 和 Penttila, M. et al., (1988) Gene, 63:11-22 (Penttila, M. 等人, 1988 年,《基因》,第 63 卷,第 11-22 页)。

[0129] 细菌的转化和表达方法公开于 Brigidi, DeRossi, Bertarini, Riccardi and Matteuzzi, (1990), FEMS Microbiol. Lett. 55:135-138 (Brigidi, DeRossi, Bertarini, Riccardi 和 Matteuzzi, 1990 年,《欧洲微生物学会联合会微生物学通讯》,第 55 卷,第 135-138 页)。蛋白酶缺失的芽孢杆菌菌株的优选通用转化和表达方案在 Ferrari 等人的美国专利 No. 5,264,366 中提供。

[0130] 链霉菌的转化和表达可见于 Hopwood et al., GENETIC MANIPULATION OF STREPTOMYCES: A LABORATORY MANUAL, (1985) John Innis Foundation, Norwich UK (Hopwood

等人,《链霉菌的遗传操作:实验室指南》,1985年,英国诺里奇约翰英纳斯基金)。

[0131] 在其他实施例中,曲霉和木霉的转化和表达描述于例如美国专利 No. 5,364,770、美国专利 No. 6,022,725,以及 Nevalainen et al.,1992, The Molecular Biology of Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes, in MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY, Eds. Leon and Berka, Marcel Dekker, Inc. pp. 129-148 (Nevalainen 等人,1992年,“木霉属的分子生物学及其在表达同源和异源基因中的应用”,载于《分子工业真菌学》,Leon 和 Berka 编辑,马塞尔德克尔有限公司,第 129-148 页)。

[0132] F. 宿主细胞

[0133] 可根据本发明使用的宿主细胞包括细菌和真菌细胞。优选的真菌宿主细胞包括丝状真菌细胞,例如曲霉和木霉细胞。优选的细菌宿主细胞包括革兰氏阳性细胞和革兰氏阴性细胞,包括芽孢杆菌细胞、分支杆菌 (Mycobacterium) 细胞、放线菌 (Actinomyces) 细胞和链霉菌细胞。宿主细胞还包括但不限于大肠杆菌、假单胞菌(如铜绿假单胞菌和产碱假单胞菌)、链霉菌(如变铅青链霉菌)、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。

[0134] G. 细胞培养

[0135] 宿主细胞和已转化的细胞可以在常规的营养培养基中培养。可视需要改良用于已转化的宿主细胞的培养基以激活启动子和选择转化株。具体培养条件(例如温度、pH等)可以是用于使所选宿主细胞表达的那些条件,并且对于本领域的技术人员将显而易见。此外,优选的培养条件可见于科学文献中,例如 Sambrook,1982,出处同上;Kieser, T, M J. Bibb, M J. Buttner, K F Chater, and D. A. Hopwood (2000) PRACTICAL STREPTOMYCES GENETICS. John Innes Foundation, Norwich UK (Kieser, T, M J. Bibb, M J. Buttner, K F Chater 和 D. A. Hopwood, 2000 年,《实用链霉菌遗传学》,英国诺里奇约翰英纳斯基金);Harwood, et al., (1990) MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS FOR BACILLUS, John Wiley and/or from the American Type Culture Collection (ATCC; “<http://www.atcc.org/>”) (Harwood 等人, 1990 年,《芽孢杆菌的分子生物学方法》,约翰威立出版和/或得自美国典型培养物保藏中心 (ATCC; “<http://www.atcc.org/>”))。真菌宿主细胞(例如木霉细胞)的稳定转化株一般可以此方式与不稳定的转化株加以区别:其生长速率较快,或者在固体培养基上形成具有光滑而不是锯齿状轮廓的圆形菌落。

[0136] H. 已表达的多肽的回收

[0137] 通过常规工序可从培养基回收由已转化的宿主细胞产生的多肽,所述常规程序包括通过离心或过滤从培养基分离出该宿主细胞,或如有必要,破坏该细胞并从细胞组分或细胞碎片中取出上清液。通常在净化后,上清液或滤液的蛋白质组分可使用盐,如硫酸铵沉淀。然后将沉淀的蛋白溶解,并且可通过多种色谱分离工序,例如离子交换层析、凝胶过滤层析、亲和层析和本领域公认的其他工序进行纯化。

[0138] I. 构建体组装

[0139] 在一个一般的实施例中,本发明涉及体外组装 DNA 构建体,然后将直接将这种构建体克隆到感受态宿主细胞(例如芽孢杆菌宿主细胞)中,使得该构建体整合到宿主基因组

中。例如,在一些实施例中,采用 PCR 融合和 / 或连接来体外组装 DNA 构建体。在优选的实施例中,该 DNA 构建体是非质粒 DNA 构建体。在另一个实施例中,该 DNA 构建体包含已引入突变的 DNA。然后使用此构建体来转化宿主细胞。就这一点而言,优选地采用宿主细胞(例如芽孢杆菌)的高感受态突变体来促进该构建体直接克隆到该细胞中。例如,携带受控于木糖诱导型启动子的 comK 基因(Pxy1-comK)的芽孢杆菌可以非常高的效率进行可靠转化,如本文所述。本领域已知的任何合适的方法可用于转化该细胞。可在转化前将该 DNA 构建体插入到载体(即,质粒)中。在一些优选的实施例中,使用适当的限制性酶(即,不会破坏该 DNA 构建体的限制性酶)切断该环状质粒。因此,在一些实施例中,环状质粒可用于本发明。然而,在可供选择的实施例中,使用了线性质粒。在一些实施例中,在不存在质粒 DNA 的情况下使用该 DNA 构建体(即,PCR 产物)。

[0140] 为进一步说明本发明及其优点,给出了下列具体的实例,应当理解,提供这些实例是为了说明本发明,而不应解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0141] 实例

[0142] 实例 1:通过核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子表达蛋白的枯草芽孢杆菌菌株的构建

[0143] 绿荧光蛋白(GFP)以及两种枯草杆菌蛋白酶即 FNA(解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 BPN'-Y217L)和 ER11(描述于 WO2010/056635A1)的编码序列被融合到枯草芽孢杆菌核糖体 RNA 启动子或核糖体蛋白启动子,以测试枯草芽孢杆菌菌株 BG8000(Δ nprE、degU(Hy)32、 Δ aprE、spoIIIE312amyE::Pxy1RA-comK-eryR)和 BG8010(Δ nprE、degU(Hy)32、 Δ aprE、spoIIIE312amyE::Pxy1RA-comK-eryR oppA:phleoR)中的蛋白表达。将通过核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子的蛋白表达与用枯草杆菌蛋白酶启动子 aprE(Transcription of *Bacillus subtilis subtilisin* and expression of subtilisin in sporulation mutants. E Ferrari, D J Henner, M Perego, and J A Hoch, J Bacteriol. 1988 January; 170(1):289-295(“枯草芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的转录与孢子形成突变体中枯草杆菌蛋白酶的表达”, E Ferrari, D J Henner, M Perego 和 J A Hoch,《细菌学杂志》,1988 年 1 月,第 170 卷第 1 期,第 289-295 页))表达所获得的量进行比较。

[0144] 通过 PCR 从枯草芽孢杆菌 168 染色体 DNA 扩增表 1-1 所示的启动子并且通过转录作用融合至靶分子(ER11、FNA 或 GFP)的基因中。BG8010 或 BG8000 菌株利用包含启动子、目的基因和抗生素标记的表达盒进行转化,然后在包含 5 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上选择转化株。BG8010 或 BG8000 菌株还利用包含已融合至靶分子基因的 aprE 启动子的构建体进行转化,然后在包含 5 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上选择转化株。将携带具有枯草杆菌蛋白酶启动子的构建体的菌株在包含 25 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上进行扩增,以增加该表达盒的拷贝数,而携带核糖体启动子的菌株则在包含 5 μ g/ml 氯霉素的平板上重新分离。

[0145]

表 1-1: 启动子列表 (-35 和 -10 共有序列以黑体显示并带有下划线)		
核糖体 RNA 启动子		
名称	序列	SEQ ID NO
P1 <i>rrnB</i>	ATAGATTTTTTTTAAAAAACTATTGCAATAAATAA ATACAGGTGTTATATTATTAAACG TCGCTG	1
P1 <i>rrnI</i>	CACATACAGCCTAAATTGGGTGTTGACCTTTTGAT AATATCCGTGATATATTATTATTCG TCGCTG	2
P2 <i>rrnI</i>	TTAAATACTTTGAAAAAAGTTGTTGACTTAAAAGA AGCTAAATGTTATAGTAATAAAG CTGCTT	3
P1 <i>rrnE</i>	ATAAAAAAATACAGGAAAAGTGTGACCAAATAA AACAGGCATGGTATATTATTAAACG TCGCTG	4
P2 <i>rrnE</i>	AACAAAAAAGTTTTCTTAAGGTGTTTACAAGATTT TAAAAATGTGTATAATAAGAAAAG TCGAAT	5
P3 <i>rrnE</i>	TCGAAAAACATTAAAAAACTTCTTGACTCAACAT CAAATGATAGTATGATAGTTAAG TCGCTC	6

[0146] 靶分子的核苷酸和氨基酸序列如下所示：

[0147] 已融合至核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子的 GFP 基因的核苷酸序列

[0148] ACAGAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAATAGAAA
TGTTCTTAAAAATACTGGTCTGAAGGAGATCATGTCAGCGAAAGCGTCTGTGGAAGGTATTGTGAACAATCACGTAT
TCTCAATGGAGGGGTTTGGAAAGGAAAATGTTTTGTTTGGTAACCAGTTAATGCAAATTCGAGTTACCAAAGGCGGC
CCACTTCCATTTGCCTTCGACATCGTAAGCATCGCCTCCAGTACGGCAATCGCACCTTTACGAAATATCCTGATGA
TATCGCCGACTATTTCTGTCAATCGTTTCCAGCGGGCTTTTCTATGAAAGAAATCTGCGGTTTGAAGATGGCGCAA
TCGTTGATATACGTTTCAGACATCAGTCTGGAGGATGACAAGTTTCACTATAAAGTGGAGTATCGAGGAAACGATTT
CCGTCTAACGGGCCTGTCATGCAAAAAGCTATTTTGGGCATGGAGCCGTCTTTTGAAGTGGTTTATATGAATAGCGG
CGTCCTTGTAGGGGAAGTGGATTTAGTTTATAAGCTGAAAAGCGGAAATTATTATTCATGCCATATGAAAACCTTCT
ATAGATCAAAGGGCGGAGTGAAAGAATTTCCAGAATATCACTTTATTCATCATAGACTGGAGAAAACGTATGTTGAA
GAAGGTTCTTTCTGTCGAACAGCATGAGACAGCGATCGCTCAGCTTACCACAATAGGCAAACCGCTGGGTTCGCTCCA
TGAATGGGTTTAA (SEQ ID NO:7)

[0149] 通过核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子表达的 GFP 的氨基酸序列

[0150] VNERNVLKNTGLKEIMSAKASVEGIVNNHVFSMEGFGKGNVLFQNLQMQIRVTKGGPLPFAFDIVSIAFQ
YGNRTFTKYPDDIADYFVQSFPAFFYERNLRFEDGAIVDIRSDISLEDDKFHYKVEYRNGFPSPNGPVMQKAILGM
EPSFEVVMNSGVVLVEVDLVYKLESGNYYSCHMKTFYRSKGGVKEFPEYHFIIHRLEKTYVEEGSFVEQHETAIQ
LTTIGKPLGSLHEWV (SEQ ID NO:8)

[0151] 已融合至核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子的 FNA 枯草杆菌蛋白酶基因的核苷酸序列

[0152] ACAGAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAGAAGCAA
AAAATTGTGGATCAGTTTGCTGTTTGTCTTAGCGTTAATCTTTACGATGGCGTTCGGCAGCACATCCTCTGCCAGG
CGGCAGGGAAATCAAACGGGGAAAAAGAAATATATTGTGCGGTTTAAACAGACAATGAGCACGATGAGCGCCGCTAAG
AAGAAAGATGTCATTTCTGAAAAAGGCGGGAAAAGTGCAAAAAGCAATTCAAATATGTAGACGCAGCTTCAGCTACATT
AAACGAAAAAGCTGTAAAAAGATTGAAAAAGACCCGAGCGTCGCTTACGTTGAAGAAGATCACGTAGCACATGCGT
ACGCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAAT

GTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGATTCTTCTCATCCTGATTTAAAGGTAGCAGGCGGAGCCAGCATGGT
TCCTTCTGAAACAAATCCTTTCCAAGACAACACTCTCACGGAACCTCACGTTGCCGGCACAGTTGCGGCTCTTAATA
ACTCAATCGGTGTATTAGGCGTTGCGCCAAGCGCATCACTTTACGCTGTAAAAGTTCTCGGTGCTGACGGTTCGGGC
CAATACAGCTGGATCATTAACGGAATCGAGTGGGCGATCGAAACAATATGGACGTTATTAACATGAGCCTCGGCGG
ACCTTCTGGTTCTGCTGCTTTAAAAGCGGCAGTTGATAAAGCCGTTGCATCCGGCGTCGTAGTCGTTGCGGCAGCCG
GTAACGAAGGCACTTCCGGCAGCTCAAGCACAGTGGGCTACCTGGTAAATACCCTTCTGTCAATTGCAGTAGGCGCT
GTTGACAGCAGCAACCAAGAGCATCTTTCTCAAGCGTAGGACCTGAGCTTGATGTCATGGCACCTGGCGTATCTAT
CCAAAGCACGCTTCTTGAAACAAATACGGCGCGTTGAACGGTACATCAATGGCATCTCCGCACGTTGCCGGAGCGG
CTGCTTTGATTCTTTCTAAGCACCCGAACCTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAA
CTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAGGGCTGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID NO: 9)

[0153] 通过核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子表达的 FNA 枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列

[0154] VRSKKLWISLLFALALIFTMAFGSTSSAQAAAGKSNGEKYIVGFKQTMSTMSAAKKKDVISEKGGKVQK
QFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSVAYVEEDHVAHAYAQSVYPYVSVQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSH
PDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIA
NNMDVINMSLGGPSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGA VDSSNQ RASFSSVG
PELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGALNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKGLIN
QAAAQ (SEQ ID NO: 10)

[0155] 已融合至核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子的 ER11 枯草杆菌蛋白酶基因的核苷酸序列

[0156] GAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAGAAGCAAAAA
ATTGTGGATCAGCTTGTTGTTGCGTTAACGTTAATCTTTACGATGGCGTTCAGCAACATGTCTGCGCAGGCTGCTG
AAGAAGCAAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAATGAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTGTAGAACAAGTAGAGGCA
AATGACGGCGTCGCCATTCTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCTGT
TTTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACCTCGATCCAGCGATTTCTTATATTGAAGAGGATG
CAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCGGTACCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGA
TTGACAGGTTCTGGTGTAAGAGTTGCTGTCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCTGTTGG
CGTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGATTGCTG
CTTTAAACAATTGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACCTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGC
GGTATGGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGTTATGCACGTTGCTAATTTGAG
TTTAGGACTGCAGGCACCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAG
CGGCATCTGGCAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACT
GACCAAAAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTGCGACCAGGTGTAAACGTGCA
GAGCACATAACCGAGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTCCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTA
GGAAGCACGAACCTTGATGGAAGCGGACTTGTCATGCAGAAGCGGCAACACGTTAA (SEQ ID NO: 11)

[0157] 通过核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子表达的 ER11 枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列

[0158] VRSKKLWISLLFALTIFTMAFSNMSAQAAEEAKEKYLIGFNEQEAVSEFVEQVEANDGVAILSEEEV

EIELLHEFETIPVLSVELSPEDVDALELDPALSYIEEDA EVTTMAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDT
GISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHVAGTIAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGASGMGSVSSIAQGLE
WAGNNVMHVANLSLGLQAPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYG
AGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNA
EAATR (SEQ ID NO: 12)

[0159] 下表 1-2 列出了通过融合启动子到靶基因而构建的不同菌株。1/2/3 表示三种启动子串联克隆以促进靶分子的表达。标记“+G”表示使用鸟嘌呤核苷酸作为转录起始位点，而不是腺嘌呤。

[0160]

表 1-2 :所构建的菌株的列表
BG8000Pap _r E-FNA
BG8000Pap _r E-FNA
BG8000PrnI ₂ -FNA
BG8000PrnI ₂ -FNA
BG8010Pap _r E-FNA
BG8010Pap _r E-FNA
BG8010PrnI ₂ -FNA
BG8010PrnI ₂ -FNA
BG8000PrnI ₂ -ER11
BG8000PrnI ₂ -ER11
BG8010PrnI ₂ -ER11
BG8010PrnI ₂ -ER11
BG8000Pap _r E-ER11
BG8000Pap _r E-ER11
BG8010Pap _r E-ER11
BG8010Pap _r E-ER11
BG8010PrnI _{1/2} -FNA

表 1-2 :所构建的菌株的列表
BG8010PrnI2-FNA
BG8010PrnI1/2+G-FNA
BG8010PrnE2-FNA
BG8010PrnB1-FNA
BG8010PrnE1/2/3-FNA
BG8010PrnI1/2-GFP
BG8010PrnI2-GFP
BG8010PrnI1/2+G-GFP
BG8010PrnE1/2/3-GFP
BG8010PrnE2/3-GFP
BG8010PrnB1-GFP
BG8010PapE-GFP

[0161] 实例 2 :表达 GFP、FNA 和 ER11 的菌株的细胞密度测量

[0162] 为了测试细胞生长,将每个已构建的菌株的一个菌落接种到含有 5 μ g/ml 氯霉素 (适用于通过核糖体 RNA 启动子表达的菌株) 或 25 μ g/ml 氯霉素 (适用于通过 aprE 启动子表达的菌株) 的 Luria 肉汤中,并在 30℃ 下生长过夜。使用 1ml 的每种预培养物,接种于 32ml 的 2xSNB 培养基 (参见下列组成) 中,并在 37℃ 下以 280rpm、70% 湿度在摇瓶中生长。在生长 4 小时到 8 小时的小时间隔,使用 SpectraMax 读板机在 600nm 下测量每种培养物的光密度。表达 GFP、FNA 和 ER11 的菌株的细胞密度测量值在图 4(GFP)、图 5 和图 6(FNA) 以及图 7A 和图 7B(ER11) 中示出。包含不同构建体的菌株的生长情况相当。

[0163] 2xSNB 培养基 :

[0164] 储备溶液 (已过滤灭菌): 25x SNB 盐 -CaCl₂*2H₂O (3.7g/L)、FeSO₄*7H₂O (9.6mg/L)、MnCl₂*4H₂O (6mg/L)、KCl (25g/L)、MgSO₄*7H₂O (3.26g/L)、玛尔特灵 15010 %。制备 500mL16g/L 的 Difco 营养肉汤溶液,高压灭菌,加入 20mL25xSNB 盐和 25mL10% 玛尔特灵 (Maltrin) 150。

[0165] 实例 3 :通过核糖体启动子的 GFP、FNA 和 ER11 的蛋白表达

[0166] 在 BG8000 和 BG8010 菌株中测试由所选的启动子驱动的 ER11、FNA 的细胞外生产或 GFP 的细胞内表达。如实例 2 的细胞密度测量所述那样进行细胞生长。在生长 4 小时到 8 小时的小时间隔,分析培养物上清液的 AAPF 活性 (枯草杆菌蛋白酶表达)。以细胞中表达的相对荧光单位 (RFU) 来衡量 GFP 表达。

[0167] 以 N-琥珀酰-L-丙氨酸-L-丙氨酸-L-脯氨酸-L-苯基-对硝基苯胺 (suc-AAPF-pNA) 的水解速率来衡量样品的 AAPF 活性。使用的试剂溶液是:100mM Tris/HCl, pH8.6, 包含 0.005% **TWEEN**[®]-80 (Tris 稀释缓冲液) 以及 160mM suc-AAPF-pNA 的 DMSO 溶液 (suc-AAPF-pNA 储备溶液) (西格玛公司 (Sigma):S-7388)。为制备 suc-AAPF-pNA 工作溶液, 将 1ml suc-AAPF-pNA 储备溶液添加至 100ml Tris/HCl 缓冲液并充分混合至少 10 秒。通过将样品稀释在测定缓冲液中 (5ml 稀释在 195ml 中) 来实施该测定法。然后将含有 AAPF 底物的 180ml 测定缓冲液加入到点样于微量滴定板上的 20ml 已稀释的样品中。将溶液混合 5 秒, 25°C 下在 SpectraMax 读板机中在 405nm 处读取动力学模式的吸光度变化 (5 分钟内 20 个读数)。

[0168] 为了测量以 RFU 表示的 GFP 表达, 将 150ml 的各培养样品加载到微量滴定板中, 并使用 SpectraMax 读板机以 485nm 的激发波长、508nm 的发射波长进行荧光测量, 截断值为 495nm。

[0169] 通过不同启动子进行的 GFP、FNA 和 ER11 的表达在图 8 (GFP)、图 9 和图 10 (FNA) 以及图 11A 和 11B (ER11) 中示出。通过非扩增的核糖体 RNA 启动子和核糖体蛋白启动子的蛋白表达高于通过扩增的 aprE 启动子所见的蛋白表达。

[0170] 实例 4:通过 SigmaA 依赖性启动子的蛋白表达

[0171] 由于从不同启动子观察到蛋白表达的不同水平, 因此本实验比较了扩增的 aprE 启动子的 FNA 表达和未扩增的 rrnI P2 启动子的 FNA 表达。通过 aprE 表达 FNA 的 BG8010 菌株采用 25 μ g/mL 氯霉素进行扩增, 而通过 rrnI P2 表达 FNA 的菌株则在 5 μ g/mL 氯霉素上进行重新分离, 如实例 1 中所述。如分别在实例 2 和实例 3 中所述的那样, 研究了细胞密度测量和 FNA 表达。结果在图 12 和图 13 中示出。所有菌株的细胞生长相当, 但通过未扩增的 rrnI P2 启动子的 FNA 表达高于通过扩增的 aprE 启动子的 FNA 表达。

[0172] 实例 5:包含单拷贝整合体的 BG8010 菌株的 FNA 表达

[0173] 为了测试 rrnI P2 启动子能否在不使用抗生素标记的情况下用于蛋白表达, 将包含 PrrnI P2-FNA SpcR 或 PaprE-FNA CatR 表达盒的单拷贝整合体通过双交换整合方式整合到 BG8010 菌株中。随后使用 cre-lox 重组酶去除侧接有 lox 序列的抗生素标记基因。已构建的菌株的转化株如实例 2 所述的那样进行生长, 并且分别如实例 2 和实例 3 所述的那样研究细胞密度测量和 FNA 表达。图 14 所示的结果表明包含 rrnI P2 或 aprE 启动子的菌株的生长相当, 但通过 PrrnI-P2 的 FNA 表达高于通过 aprE 的 FNA 表达 (图 15)。这些研究证实, PrrnI-P2 是强启动子, 可以提供较高量的靶分子的 mRNA。使用该启动子的优点在于不需要扩增构建体以及不使用抗生素标记即可提供较高量的转录本。

[0174] 实例 6:通过核糖体蛋白启动子表达蛋白的枯草芽孢杆菌菌株的构建

[0175] 绿荧光蛋白 (GPF) 以及两种枯草杆菌蛋白酶即 FNA (解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 BPN' -Y217L) 和 ER11 (描述于 W02010/056635A1) 的编码序列被融合到枯草芽孢杆菌核糖体蛋白启动子中, 以测试枯草芽孢杆菌菌株 BG8000 (Δ nprE、degU (Hy) 32、 Δ aprE、spoIIE312amyE::PxylRA-comK-eryR) 和 BG8010 (Δ nprE、degU (Hy) 32、 Δ aprE、spoIIE312amyE::PxylRA-comK-eryR oppA:phleoR) 中的蛋白表达。将通过核糖体蛋白启动子的蛋白表达与用枯草杆菌蛋白酶启动子 aprE (Transcription of *Bacillus subtilis* subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants. E Ferrari, D J

Henner, M Perego, and J A Hoch, J Bacteriol. 1988 January ;170 (1):289-295 (“枯草芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的转录与孢子形成突变体中枯草杆菌蛋白酶的表达”, E Ferrari、D J Henner、M Perego 和 J A Hoch,《细菌学杂志》,1988 年 1 月,第 170 卷第 1 期,第 289-295 页)) 表达所获得的量进行比较。

[0176] 通过 PCR 从枯草芽孢杆菌 168 染色体 DNA 扩增表 2-1 所示的启动子并且通过转录作用融合至靶分子 (FNA 或 GFP) 的基因中。BG8010 或 BG8000 菌株利用包含启动子、目的基因和抗生素标记的表达盒进行转化,然后在包含 5 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上选择转化株。BG8010 或 BG8000 菌株还利用包含已融合至靶分子基因的 *aprE* 启动子的构建体进行转化,然后在包含 5 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上选择转化株。将携带具有枯草杆菌蛋白酶 (*aprE*) 启动子的构建体的菌株在包含 25 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上进行扩增,以增加该表达盒的拷贝数,而携带核糖体启动子的菌株则在包含 5 μ g/ml 氯霉素的平板上重新分离。

[0177]

表 2-1: 启动子列表 (-35 和 -10 共有序列以黑体显示并带有下划线)		
名称	序列	SEQ ID NO
核糖体蛋白启动子		
<i>rpsD</i>	GTTTTTATCACCTAAAAGTTTACCACTAATTTTTGTTTA TTATATCATAAACGGTGAAGCAATAATGGAGGAATGG <u>TTGACTTCAAAACAAATAAATTATATAATGACCTTT</u>	13
<i>rpsJ</i>	GTACCGTGTGTTTTTCATTTTCAGGGAAACATGACTTAAT TGTTCTGCAGAAATATCGAAACAGTATTATCAAGAA CTTGAGGCACCTGAAAAGCGCTGGTTTCAATTTGAGA ATTCAGCTCACACCCCGCATATTGAGGAGCCATCATT TTCGCGAACACATTAAGTCGGCATGCACGCAACCATT TATGATAGATCCTTGATAAATAAGAAAAACCCCTGTA <u>TAATAAAAAAAGTGTGCAAATGATGCATATTTTAAAT</u> <u>AAGTCTTGCAACATGCGCCTATTTTCTGTATAATGGTG</u> TATA	14
σ 因子启动子		
<i>rpoD</i> (P1)	AACATATAACTCAGGACGCTCTATCCTGGGTTTTTGGC <u>TGTGCCAAAAGGGAATAATGAAAAACAATAGCATCTT</u> <u>TGTGAAGTTTGTATTATAATAAAAAATT</u>	15

[0178] 表 2-1 :示出了 *rpsD*、*rpsJ* 和 *rpoD*(P1) 的启动子序列。每个启动子的 -35 和 -10 序列以黑体显示并带有下划线。对于 *rpsJ*,有两个启动子可用 (P1 和 P2)。 *rpsJ* P1 的 -35 和 -10 序列位于 *rpsJ* P2 序列的 -35 和 -10 序列的上游 (即 5')。

[0179] 已融合至核糖体蛋白启动子的 GFP 基因的核苷酸序列

[0180] ACAGAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAATAGAAA
 TGTTCTTAAAAATACTGGTCTGAAGGAGATCATGTCAGCGAAAGCGTCTGTGGAAGGTATTGTGAACAATCACGTAT
 TCTCAATGGAGGGGTTTGGAAAGGGAAATGTTTTGTTTGGTAACCAGTTAATGCAAATTCGAGTTACCAAAGGCGGC
 CCACTTCCATTTGCCTTCGACATCGTAAGCATCGCCTCCAGTACGGCAATCGCACCTTTACGAAATATCCTGATGA
 TATCGCCGACTATTTTCGTGCAATCGTTTCCAGCGGGCTTTTCTATGAAAGAAATCTGCGGTTTGAAGATGGCGCAA
 TCGTTGATATACGTTTCAGACATCAGTCTGGAGGATGACAAGTTTCACTATAAAGTGGAGTATCGAGGAAACGGATTT

CCGTCTAACGGGCCTGTCATGCAAAAAGCTATTTTGGGCATGGAGCCGTCTTTTGAAGTGGTTTATATGAATAGCGG
CGTCCTTGTAGGGGAAGTGGATTTAGTTTATAAGCTGAAAAGCGGAAATTATTATTCATGCCATATGAAAACCTTCT
ATAGATCAAAGGGCGGAGTGAAGAATTTCCAGAATATCACTTTATTCATCATAGACTGGAGAAAACGTATGTTGAA
GAAGGTTCTTTTCGTCGAACAGCATGAGACAGCGATCGCTCAGCTTACCACAATAGGCAAACCGCTGGGTTGCTCCA
TGAATGGGTTTAA (SEQ ID NO: 16)

[0181] 通过核糖体蛋白启动子表达的 GFP 的氨基酸序列

[0182] VNARNVLKNTGLKEIMSAKASVEGIVNNHVSMEGFGKGNVLFNGQLMQIRVTKGGPLPFAFDIVSIAFQ
YGNRTFTKYPDDIADYFVQSPFAGFFYERNLRFEDGAI VDIRSDISLEDDKFHYKVEYRNGFPSPNGPVMQKAILGM
EPSFEVVMNSGVLVGEVDLVYKLESGNYYSCHMKTFYRSKGGVKEFPEYHFIIHRLEKTYVEEGSFVEQHETAIAQ
LTTIGKPLGSLHEWV (SEQ ID NO: 17)

[0183] 已融合至核糖体蛋白启动子的 FNA 枯草杆菌蛋白酶基因的核苷酸序列

[0184] ACAGAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAGAAGCAA
AAAATTGTGGATCAGTTTGCTGTTTGTCTTAGCGTTAATCTTTACGATGGCGTTCGGCAGCACATCCTCTGCCCAGG
CGGCAGGGAAATCAAACGGGGAAAAAGAAATATATTGTCGGGTTTAAACAGACAATGAGCACGATGAGCGCCGCTAAG
AAGAAAGATGTCATTTCTGAAAAAGGCGGAAAGTGCAAAAGCAATTCAAATATGTAGACGCAGCTTCAGCTACATT
AAACGAAAAAGCTGTAAAGAATTGAAAAAGACCCGAGCGTCGCTTACGTTGAAGAAGATCACGTAGCACATGCGT
ACGCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAAT
GTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGATTCTTCTCATCCTGATTTAAAGGTAGCAGGCGGAGCCAGCATGGT
TCCTTCTGAAACAAATCCTTTCCAAGACAACAACCTCTCACGGAACTCACGTTGCCGGCACAGTTGCGGCTCTTAATA
ACTCAATCGGTGTATTAGGCGTTGCGCCAAGCGCATCACTTTACGCTGTAAAAGTTCTCGGTGCTGACGGTTCCGGC
CAATACAGCTGGATCATTAACGGAATCGAGTGGGCGATCGCAAACAATATGGACGTTATTAACATGAGCCTCGGCGG
ACCTTCTGGTTCTGCTGCTTTAAAGCGGCAGTTGATAAAGCCGTTGCATCCGGCGTCGTAGTCGTTGCGGCAGCCG
GTAACGAAGGCACTTCCGGCAGCTCAAGCACAGTGGGCTACCTGGTAAATACCCTTCTGTCAATTGCAGTAGGCGCT
GTTGACAGCAGCAACCAAAGAGCATCTTTCTCAAGCGTAGGACCTGAGCTTGATGTCATGGCACCTGGCGTATCTAT
CCAAAGCACGCTTCTTGAAAAAAATACGGCGCGTTGAACGGTACATCAATGGCATCTCCGCAGCTTGCCGGAGCGG
CTGCTTTGATTCTTTCTAAGCACCCGAACCTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAA
CTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAGGGGTGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID NO: 18)

[0185] 通过核糖体蛋白启动子表达的 FNA 枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列

[0186] VRSKLLWISLLFALALIFTMAFGSTSSAQAAAGKSNGEKKYIVGFKQTMSTMSAAKKKDVISEKGGKVQK
QFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSVAYVEEDHVAHAAYAQSVPYGVSIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSH
PDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIA
NNMDVINMSLGGPSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGA VDSSNQ RASFSSVG
PELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGALNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKGLINV
QAAAQ (SEQ ID NO: 19)

[0187] 已融合至核糖体蛋白启动子的 ER11 枯草杆菌蛋白酶基因的核苷酸序列

[0188] GAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAGAAGCAAAAA
ATTGTGGATCAGCTTGTTGTTTTCGTTAACGTTAATCTTTACGATGGCGTTCAGCAACATGTCTGCGCAGGCTGCTG
AAGAAGCAAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAATGAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCA
AATGACGGCGTCGCCATTCTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCTCTGT

TTTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACCTCGATCCAGCGATTTCTTATATTGAAGAGGATG
CAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCGGTACCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGA
TTGACAGGTTCTGGTGTAAGGTTGCTGTCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGG
CGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGATTGCTG
CTTTAAACAATTTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGC
GGTATGGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGTTATGCACGTTGCTAATTTGAG
TTTAGGACTGCAGGCACCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTGTAG
CGGCATCTGGCAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACT
GACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTGCGACCAGGTGTAAACGTGCA
GAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTCCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTA
GGAAGCACGAACCTTGATGGAAGCGGACTTGTCATGCAGAAGCGGCAACACGTTAA (SEQ ID NO: 20)

[0189] 通过核糖体蛋白启动子表达的 ER11 枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列

[0190] VRSKKLWISLLFALTILFTMAFSNMSAQAAEEAKEKYLIGFNEQEAVSEFVEQVEANDGVAILSEEEV
EIELLHEFETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA EVTTMAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDT
GISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQDGNHGHVHAGTIAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGASGMGSVSSIAQGLE
WAGNNVMHVANLSLGLQAPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYG
AGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQ

[0191] KNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO: 21)

[0192] 下表 2-2 列出了通过融合启动子到靶基因而构建的不同菌株。

[0193]

表 2-2 :所构建的菌株的列表
BG8000Pap _r E-FNA
BG8000Pap _r E-FNA
BG8010Pap _r E-FNA
BG8010Pap _r E-FNA
BG8000Pap _r E-ER11
BG8000Pap _r E-ER11
BG8010Pap _r E-ER11
BG8010Pap _r E-ER11
BG8010PrpsD-FNA
BG8010PrpsJ-FNA

BG8010PrpsJ-GFP
BG8010PrpsD-GFP
BG8010PapreE-GFP

[0194] 实例 7 :表达 GFP 和 FNA 的菌株的细胞密度测量

[0195] 为了测试细胞生长,将每个已构建的菌株的一个菌落接种到含有 25mg/ml 氯霉素的 Luria 肉汤中以便菌株通过 aprE 或 rpoD 启动子进行表达,并在 30℃ 下生长过夜。使用 1ml 的每种预培养物,接种于 32ml 的 2xSNB 培养基(参见下列组成)中,并在 37℃ 下以 280rpm、70%湿度在摇瓶中生长。在生长 4 小时到 8 小时的小时间隔,使用 SpectraMax 读板机在 600nm 下测量每种培养物的光密度。表达 GFP 和 FNA 的菌株的细胞密度测量在图 16(GFP) 和图 17(FNA) 中示出。包含不同构建体的菌株的生长情况相当。

[0196] 2xSNB 培养基:

[0197] 储备溶液(已过滤灭菌):25x SNB 盐-CaCl₂*2H₂O(3.7g/L)、FeSO₄*7H₂O(9.6mg/L)、MnCl₂*4H₂O(6mg/L)、KCl(25g/L)、MgSO₄*7H₂O(3.26g/L)、玛尔特灵 15010%。制备 500mL16g/L 的 Difco 营养肉汤溶液,高压灭菌,加入 20mL25xSNB 盐和 25mL10%玛尔特灵 150。

[0198] 实例 8 :通过核糖体启动子的 GFP 和 FNA 的蛋白表达

[0199] 在 BG8000 和 BG8010 菌株中测试由所选的启动子驱动的 FNA 的生产或 GFP 的细胞内表达。如实例 7 的细胞密度测量所述那样进行细胞生长。在生长 4 小时到 8 小时的小时间隔,分析培养物上清液的 AAPF 活性(枯草杆菌蛋白酶表达)。以细胞中表达的相对荧光单位(RFU)来衡量 GFP 表达。

[0200] 以 N-琥珀酰-L-丙氨酸-L-丙氨酸-L-脯氨酸-L-苯基-对硝基苯胺(suc-AAPF-pNA)的水解速率来衡量样品的 AAPF 活性。使用的试剂溶液是:100mM Tris/HCl, pH8.6, 包含 0.005% TWEEN[®]-80(Tris 稀释缓冲液)以及 160mM suc-AAPF-pNA 的 DMSO 溶液(suc-AAPF-pNA 储备溶液)(西格玛公司(Sigma):S-7388)。为制备 suc-AAPF-pNA 工作溶液,将 1ml suc-AAPF-pNA 储备溶液添加至 100ml Tris/HCl 缓冲液并充分混合至少 10 秒。通过将样品稀释在测定缓冲液中(5μl 稀释在 195μl 中)来实施该测定法。然后将含有 AAPF 底物的 180μl 测定缓冲液加入到点样于微量滴定板上的 20μl 已稀释的样品中。将溶液混合 5 秒,25℃ 下在 SpectraMax 读板机中在 405nm 处读取动力学模式的吸光度变化(5 分钟内 20 个读数)。

[0201] 为了测量以 RFU 表示的 GFP 表达,将 150μl 的各培养样品加载到微量滴定板中,并使用 SpectraMax 读板机以 485nm 的激发波长、508nm 的发射波长进行荧光测量,截断值为 495nm。

[0202] 通过不同启动子进行的 GFP 和 FNA 表达在图 18(GFP) 和图 19(FNA) 中示出。通过非扩增的核糖体蛋白启动子的蛋白表达高于通过扩增的 aprE 启动子所见的蛋白表达。

[0203] 实例 9 :通过 SigmaA 依赖性启动子的蛋白表达

[0204] 从不同启动子观察到蛋白表达的不同水平,因此本实验比较了通过扩增的 rpoD 启动子(枯草芽孢杆菌的 sigmaA 管家 σ 因子的启动子)的 FNA 表达和通过扩增的 aprE 启动子的 FNA 表达。通过 rpoD 和 aprE 表达 FNA 的 BG8010 菌株采用 25μg/mL 氯霉素进行

扩增。如分别在实例 7 和实例 8 中所述的那样,研究了细胞密度测量和 FNA 表达。结果在图 20 和图 21 中示出。所有菌株的细胞生长情况相当。

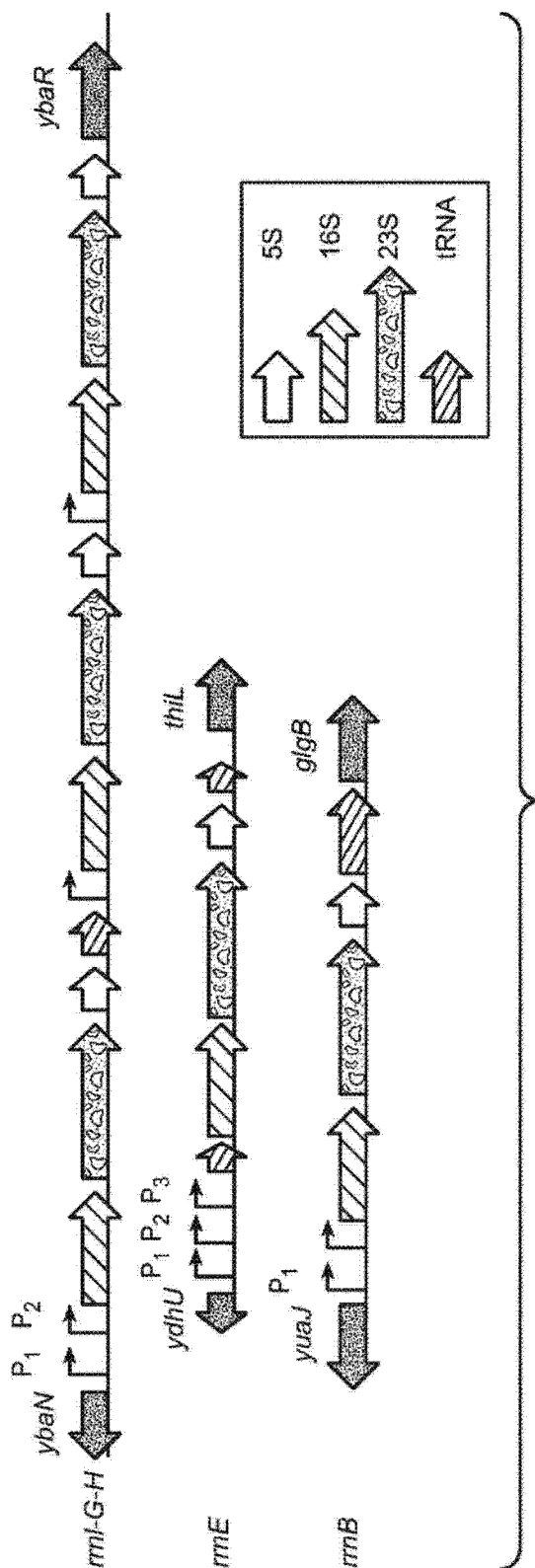


图 1

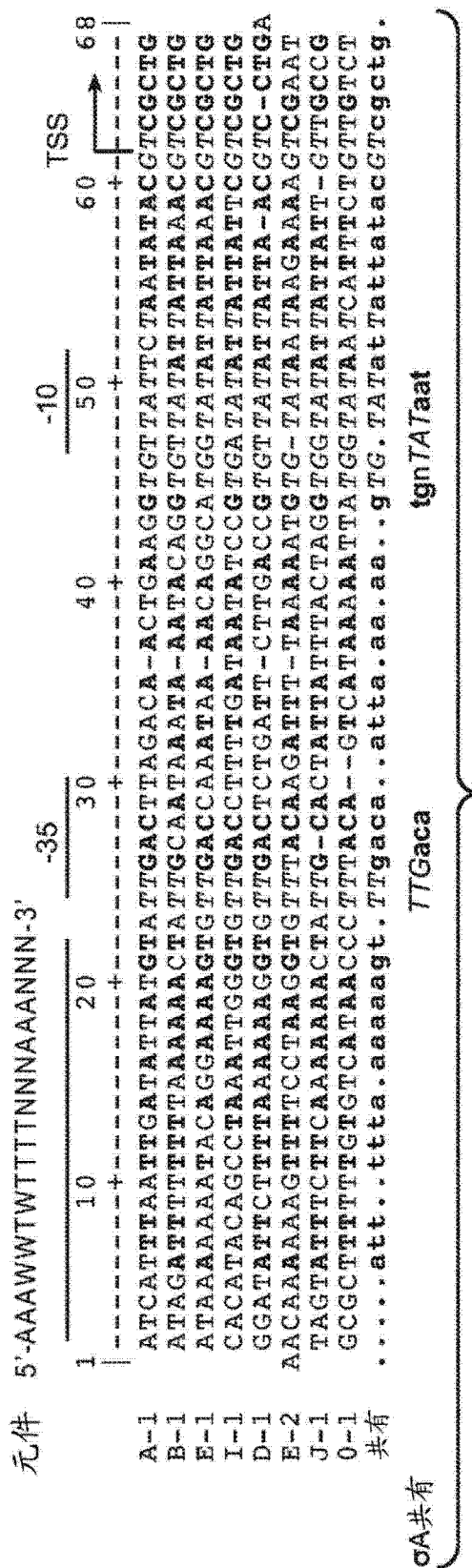


图 2

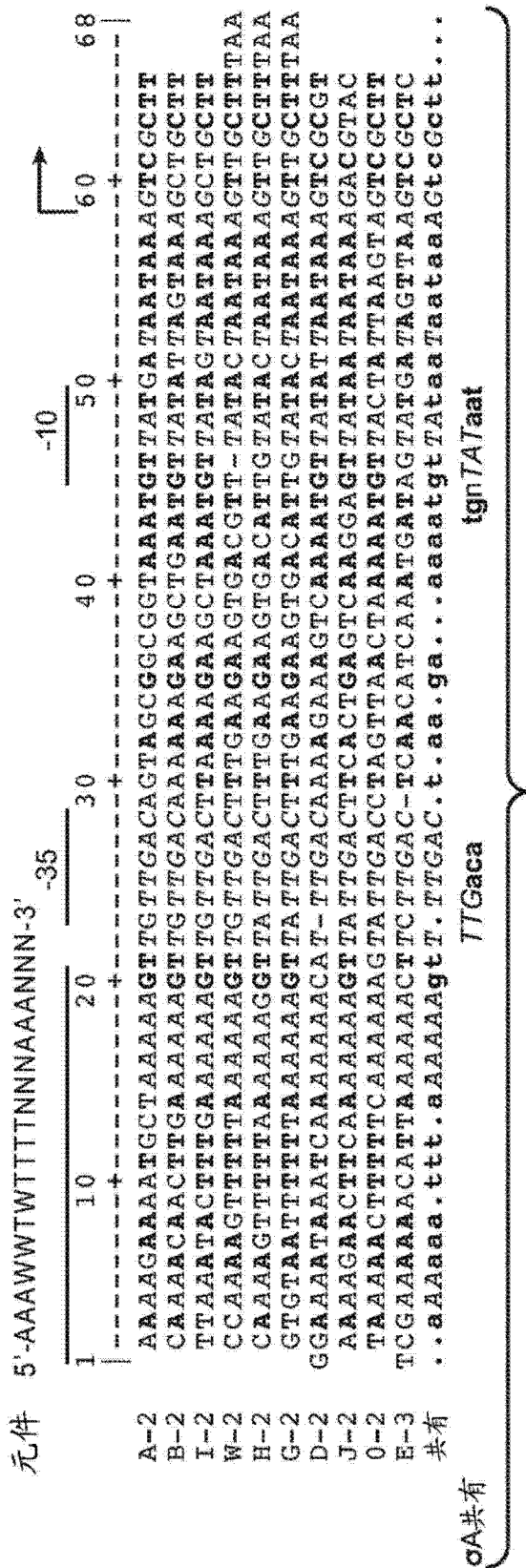


图 3

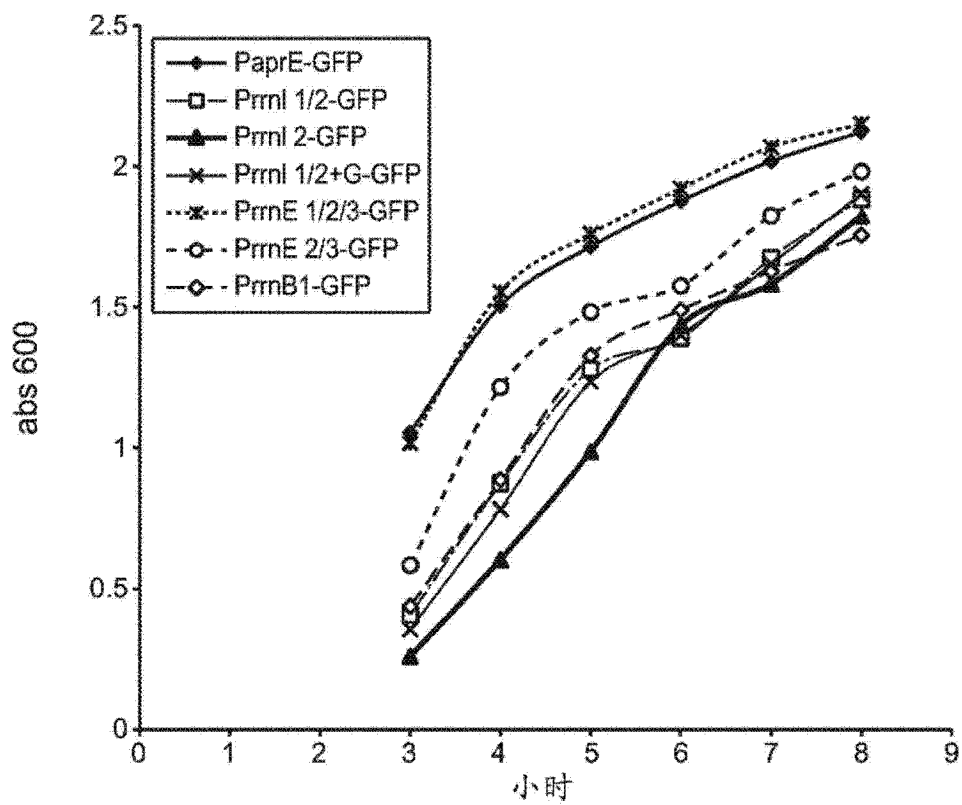


图 4

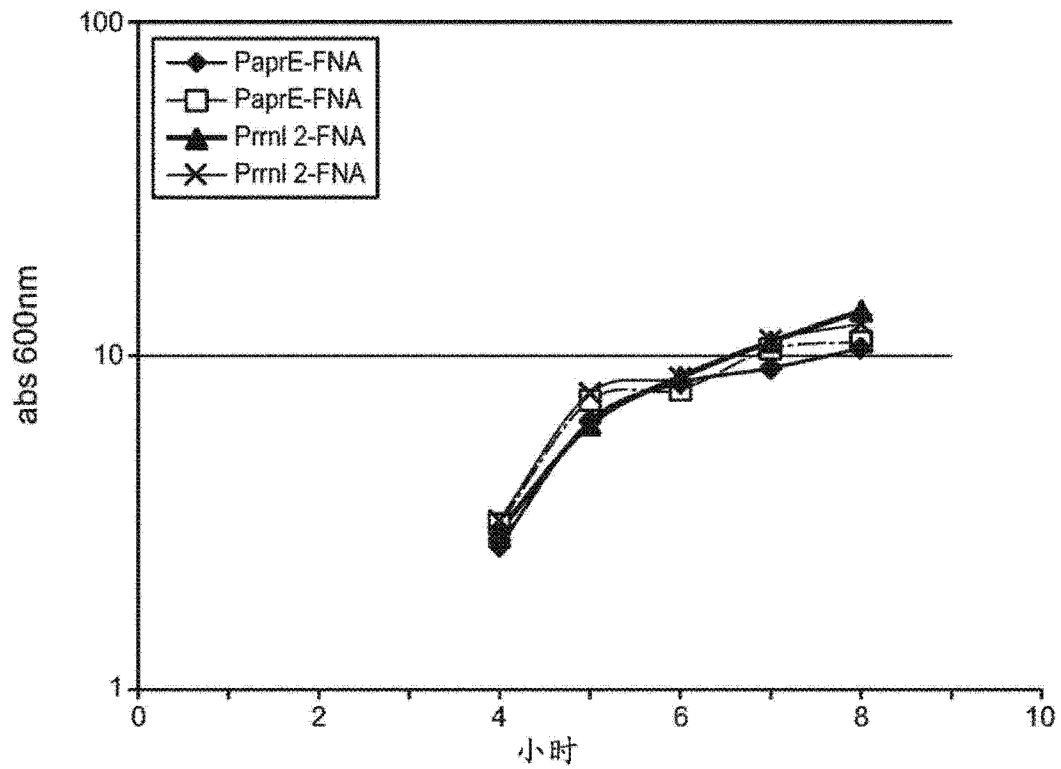


图 5

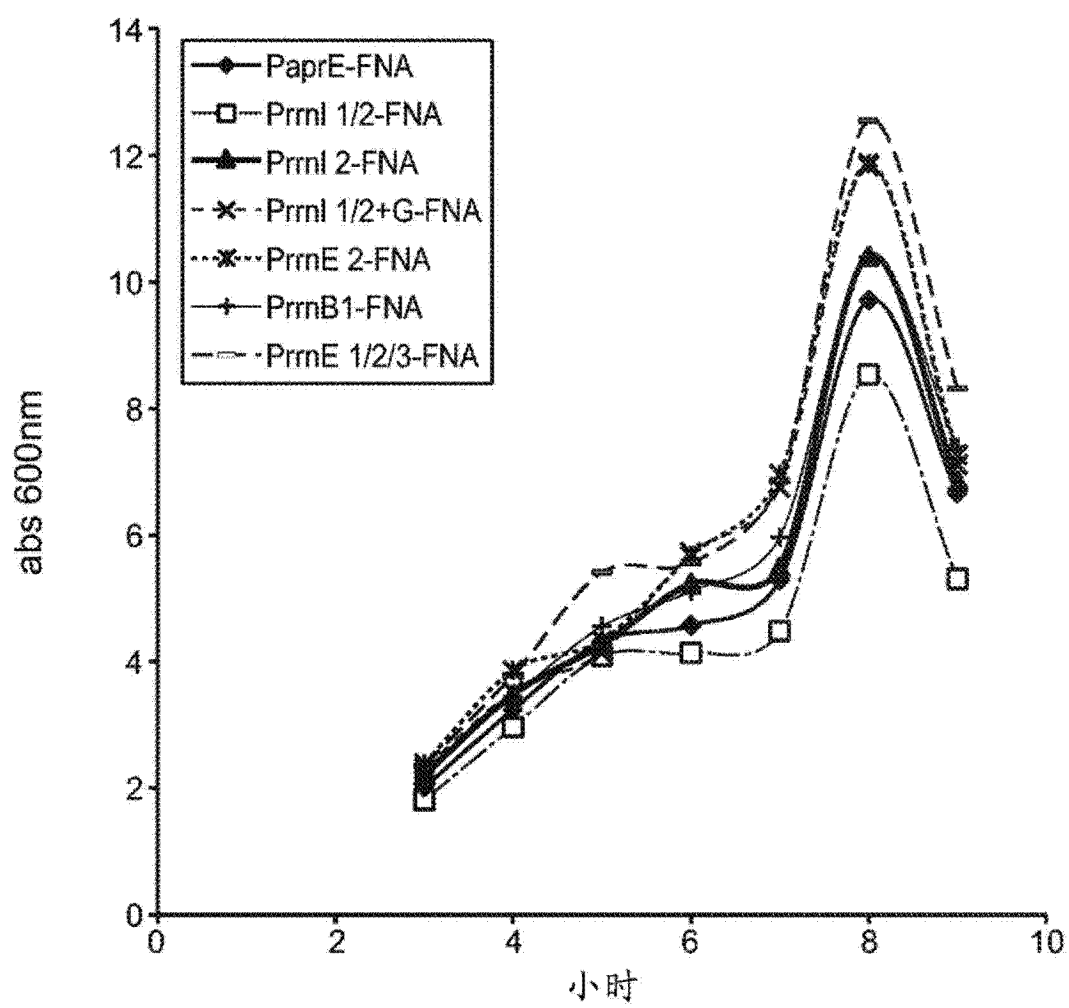


图 6

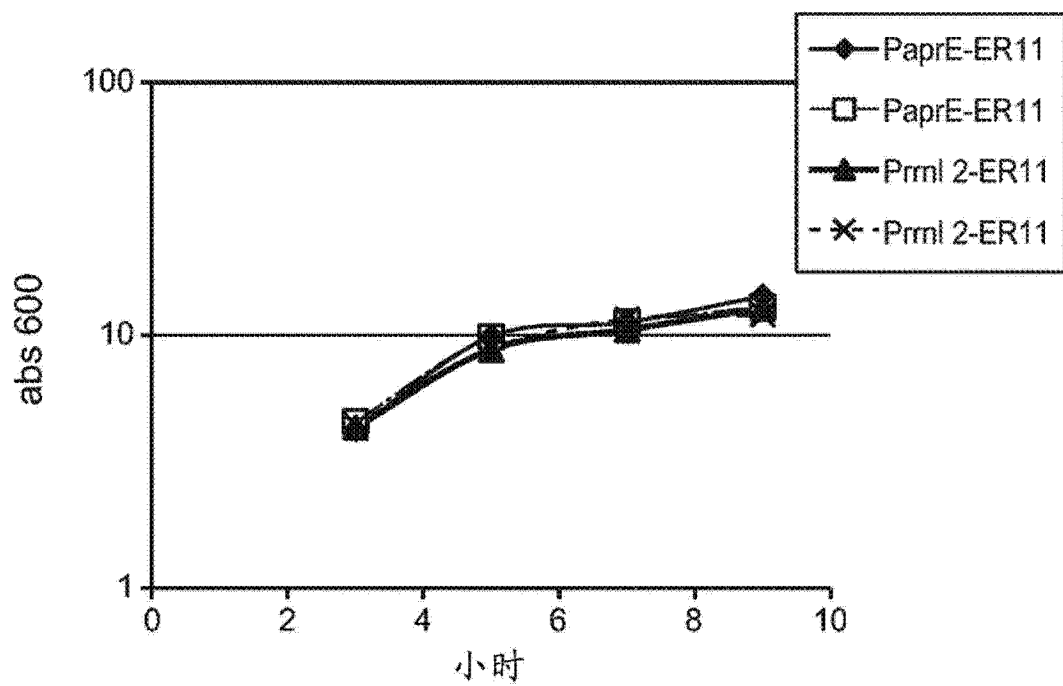


图 7A

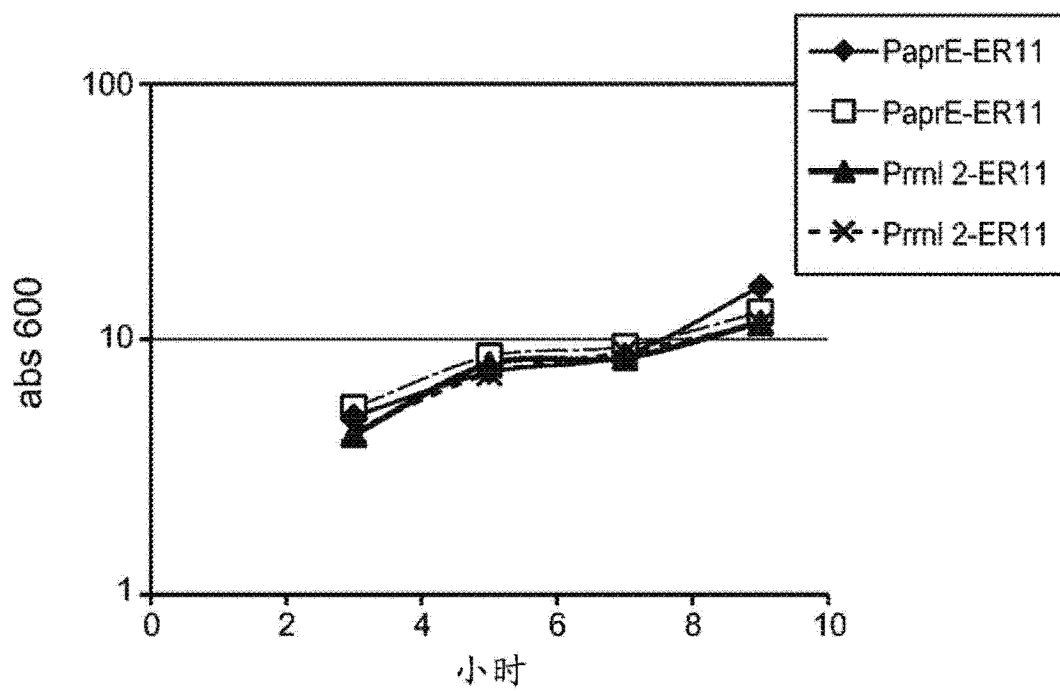


图 7B

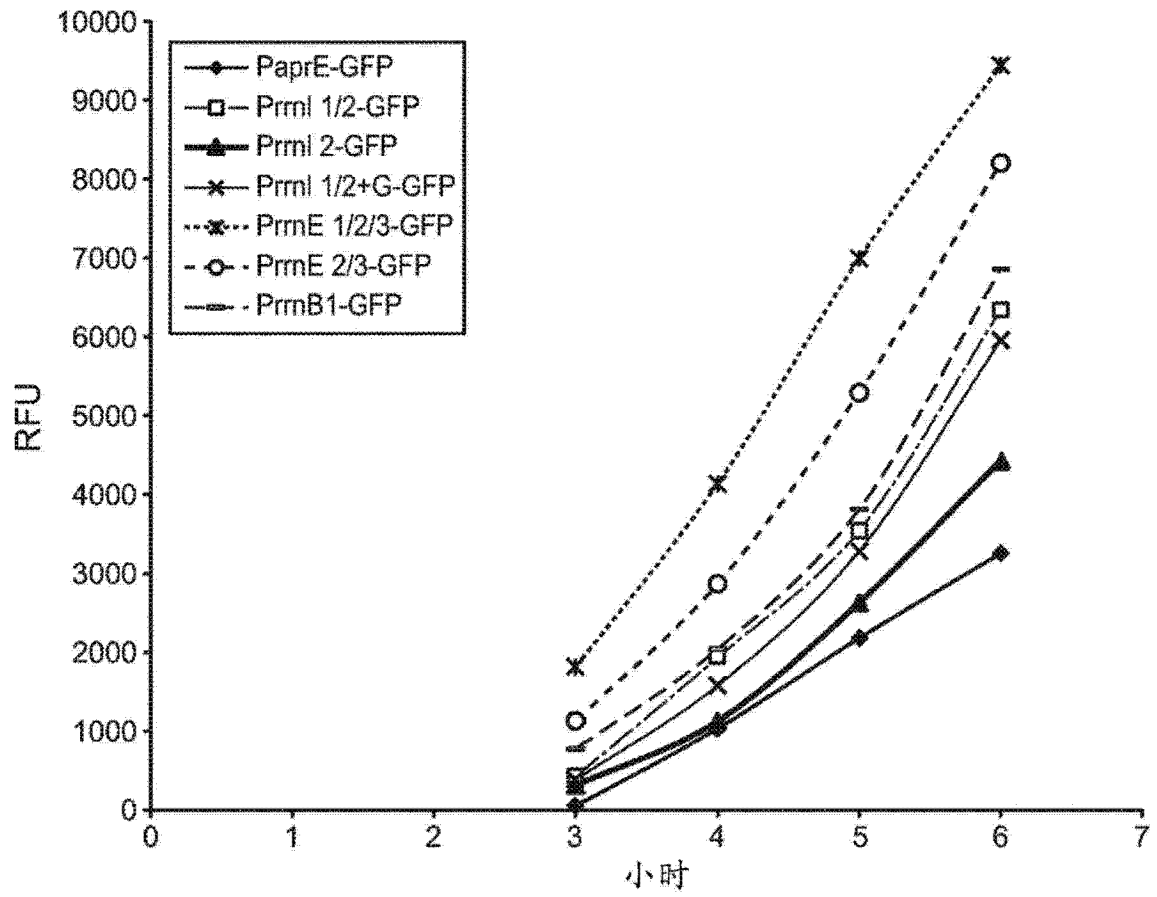


图 8

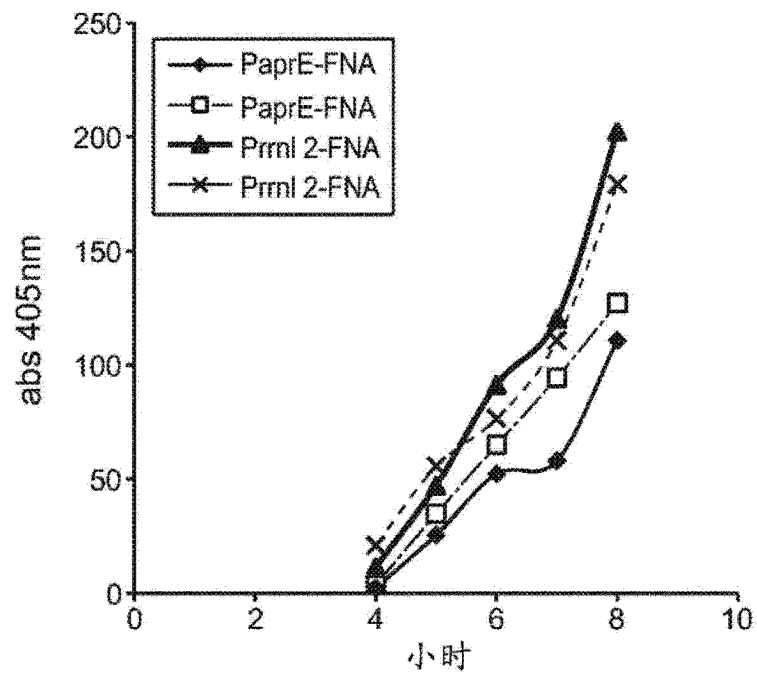


图 9

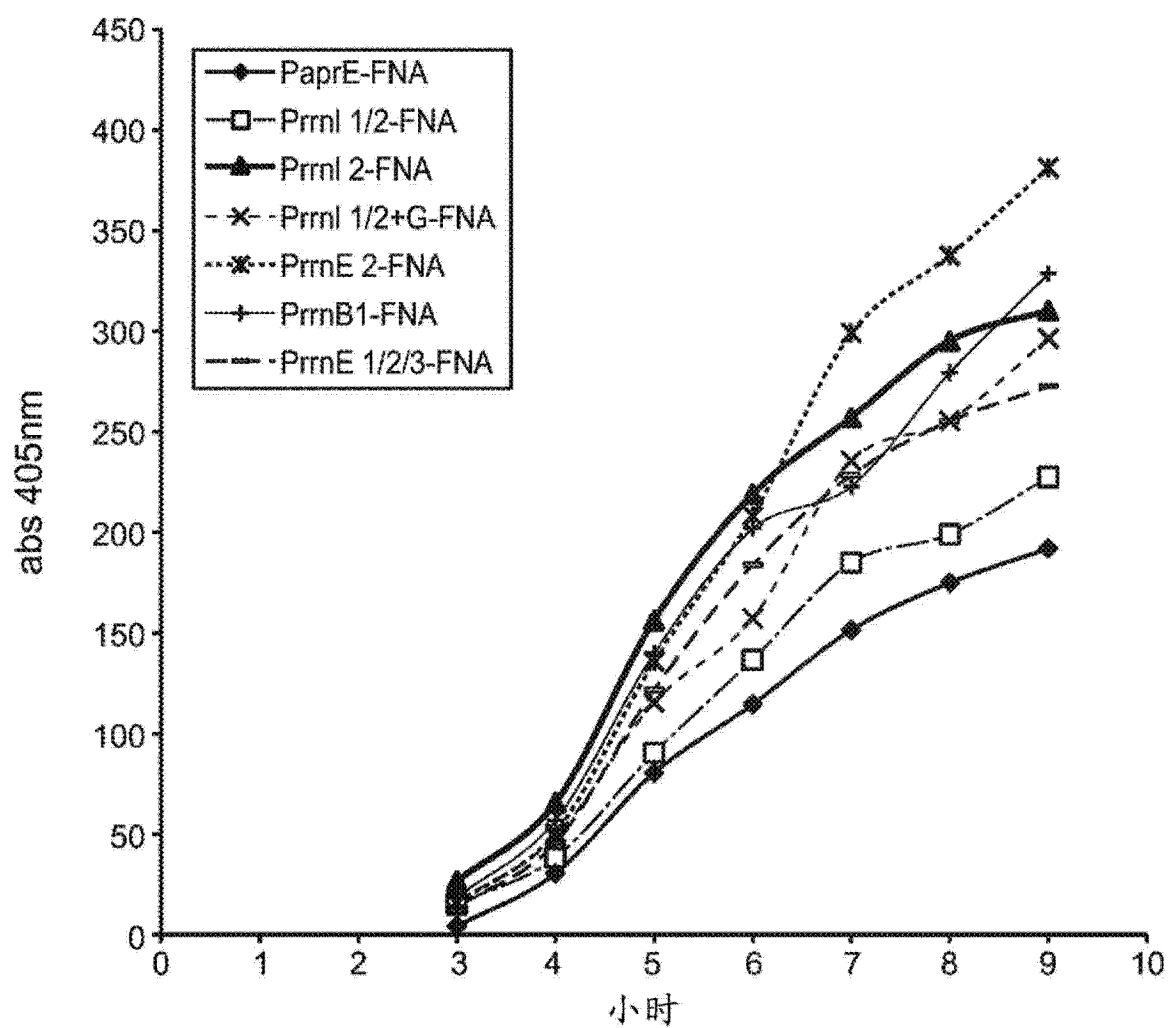


图 10

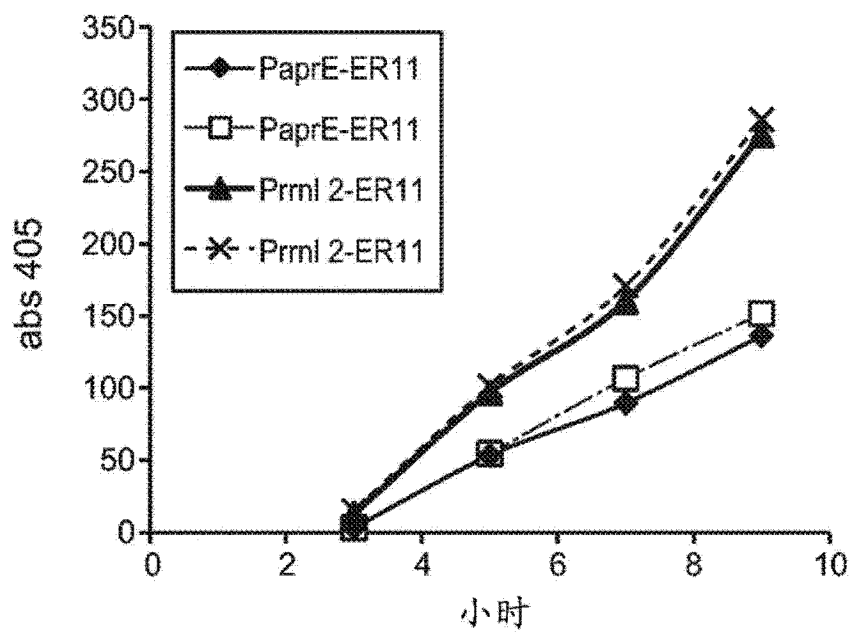


图 11A

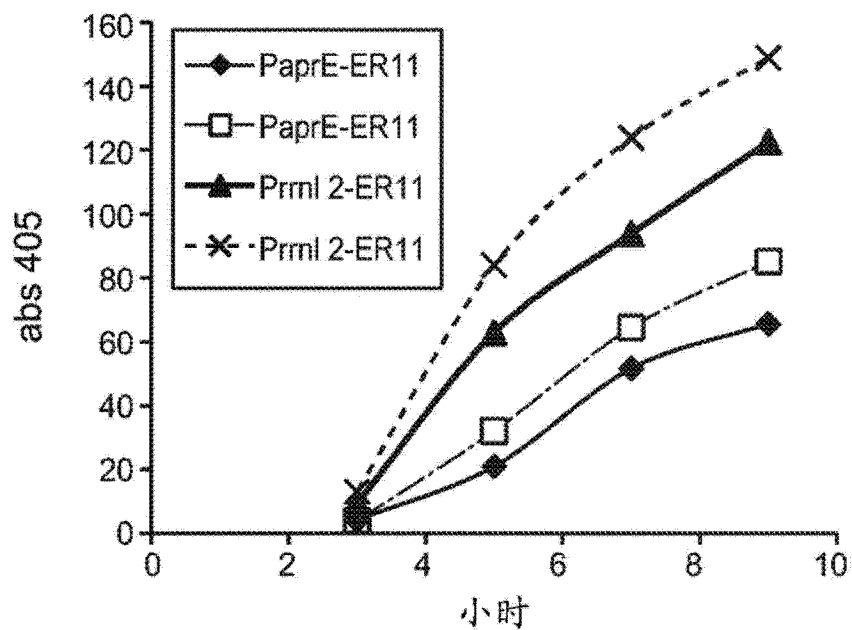


图 11B

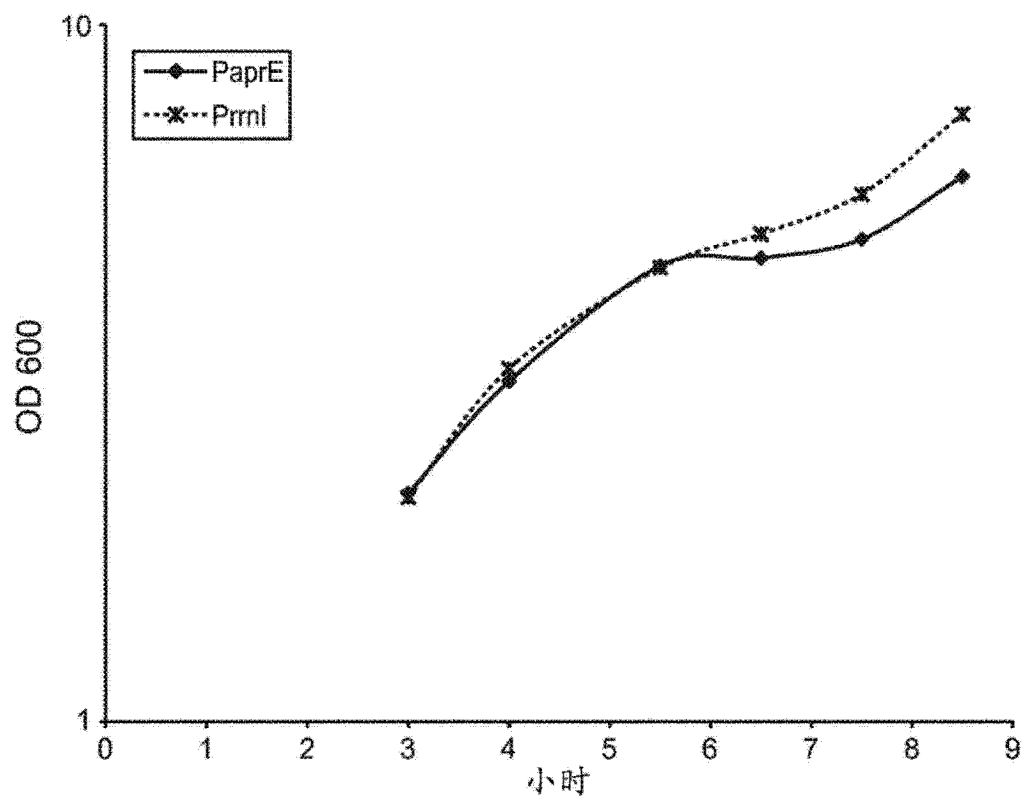


图 12

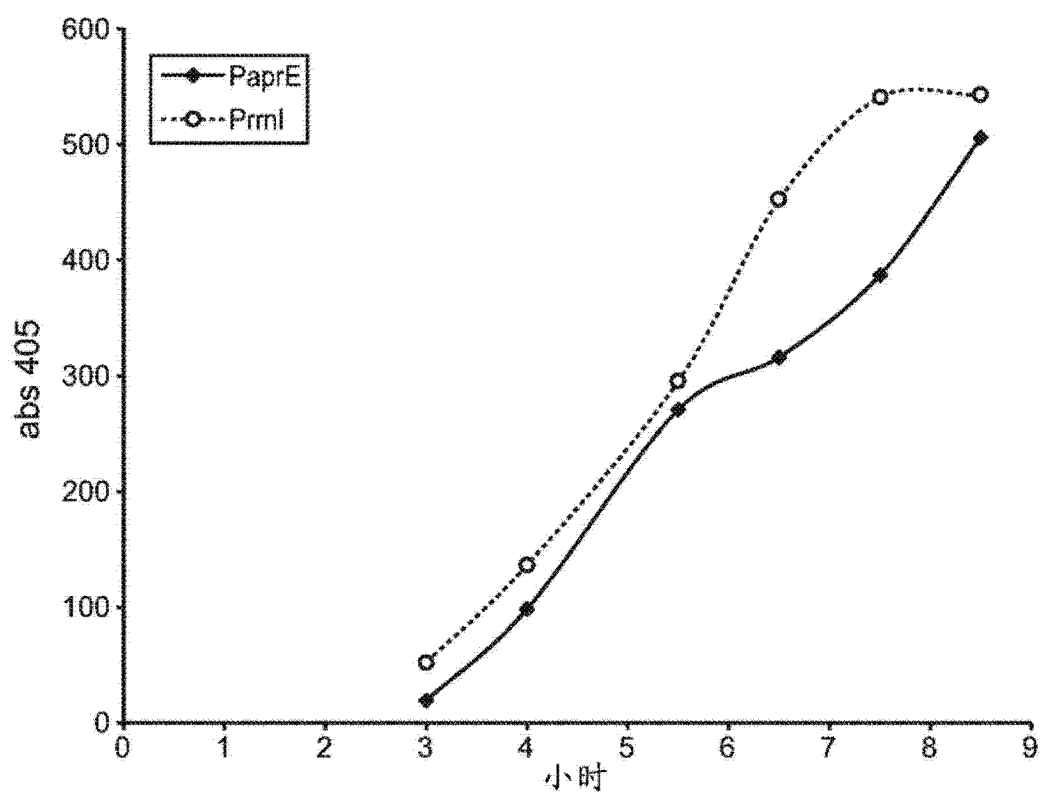


图 13

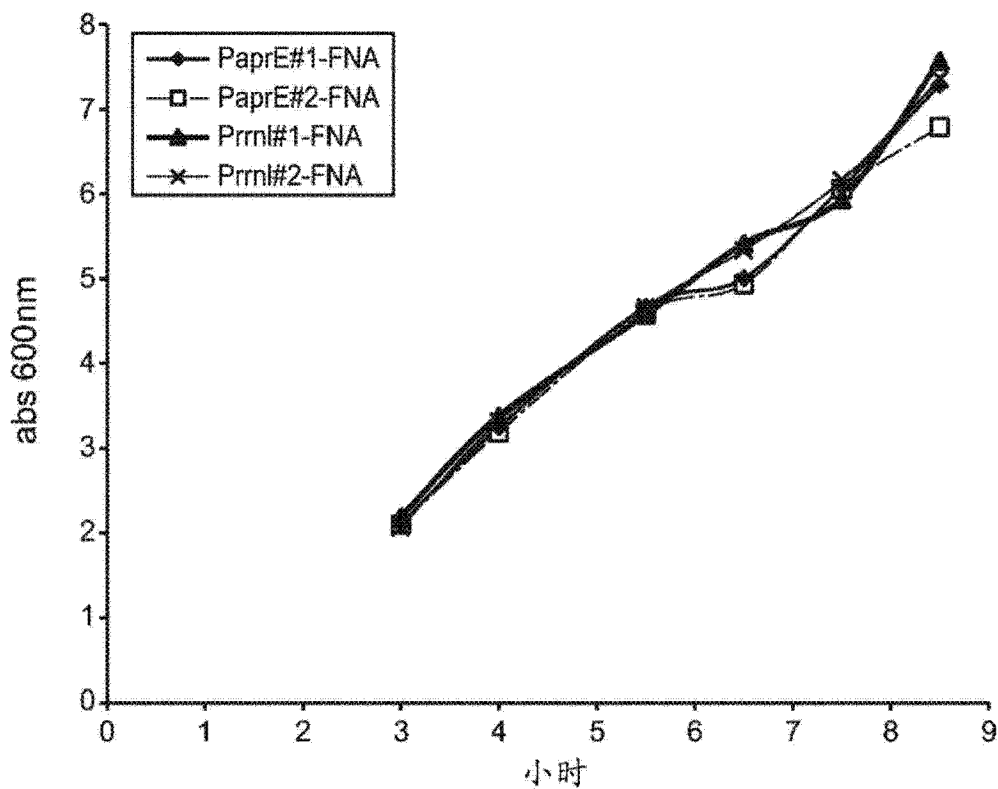


图 14

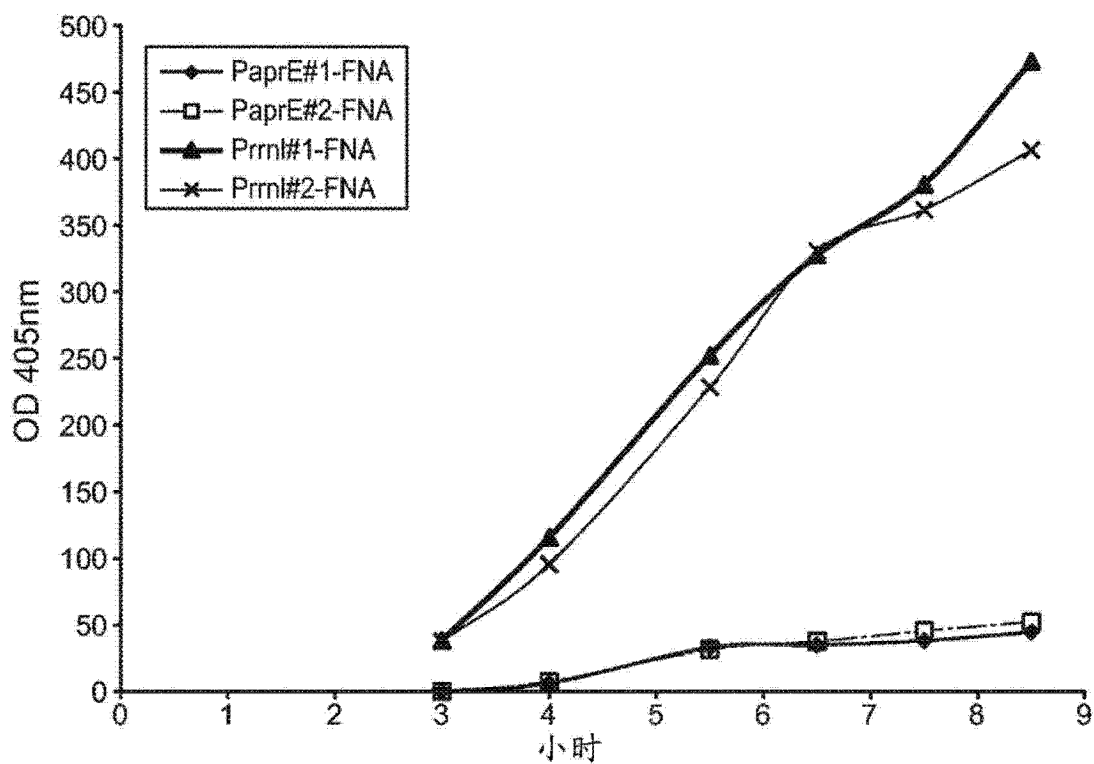


图 15

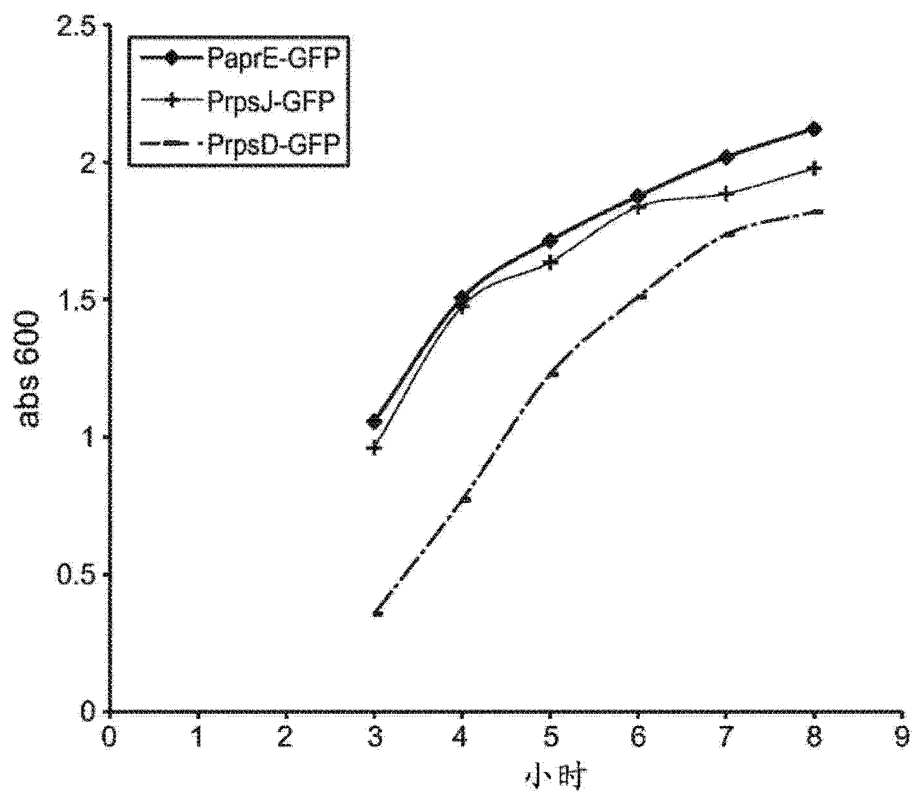


图 16

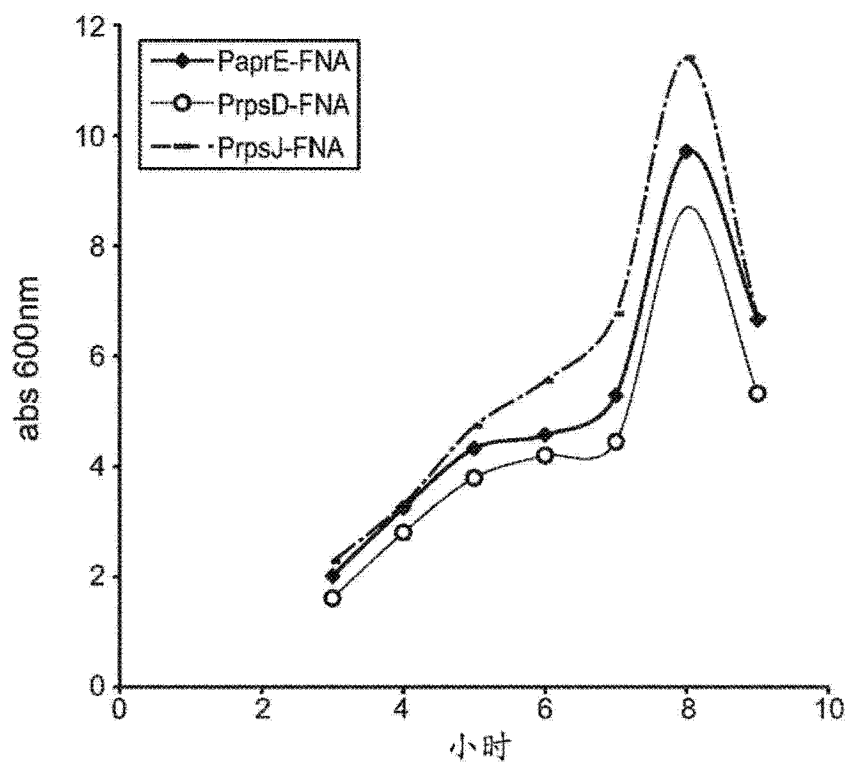


图 17

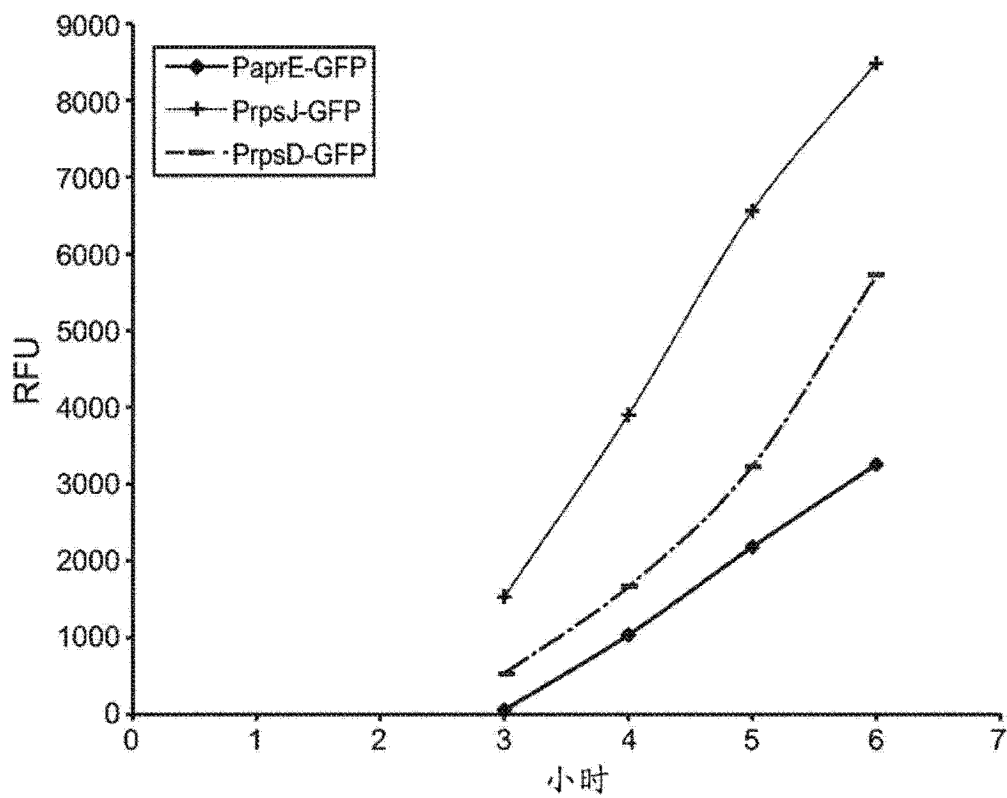


图 18

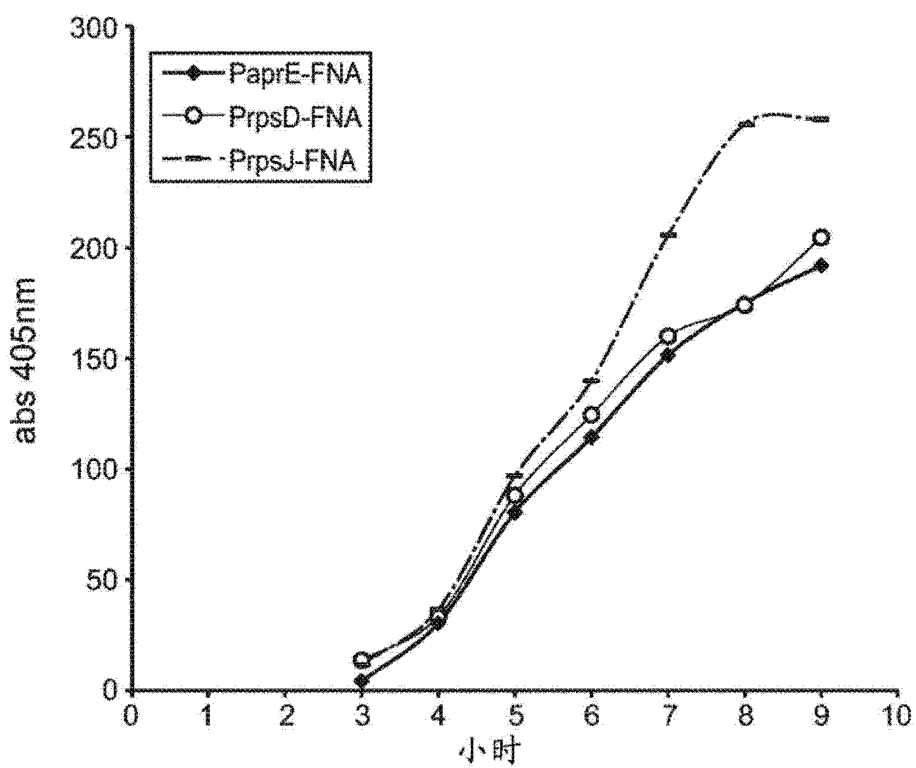


图 19

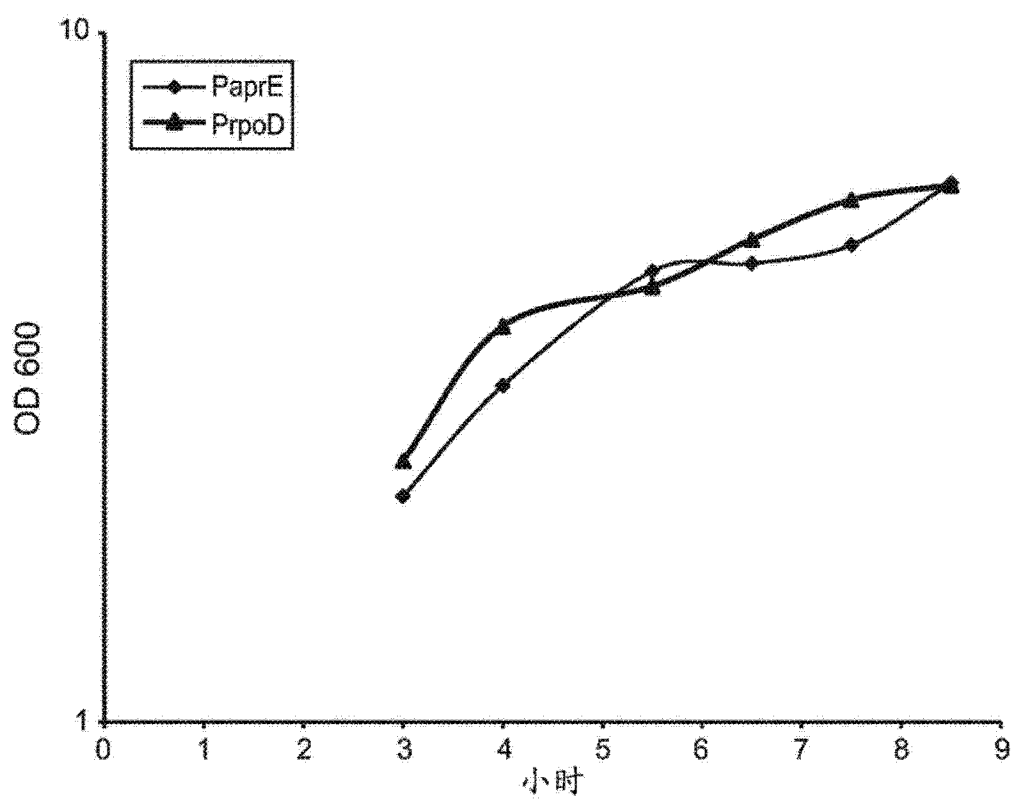


图 20

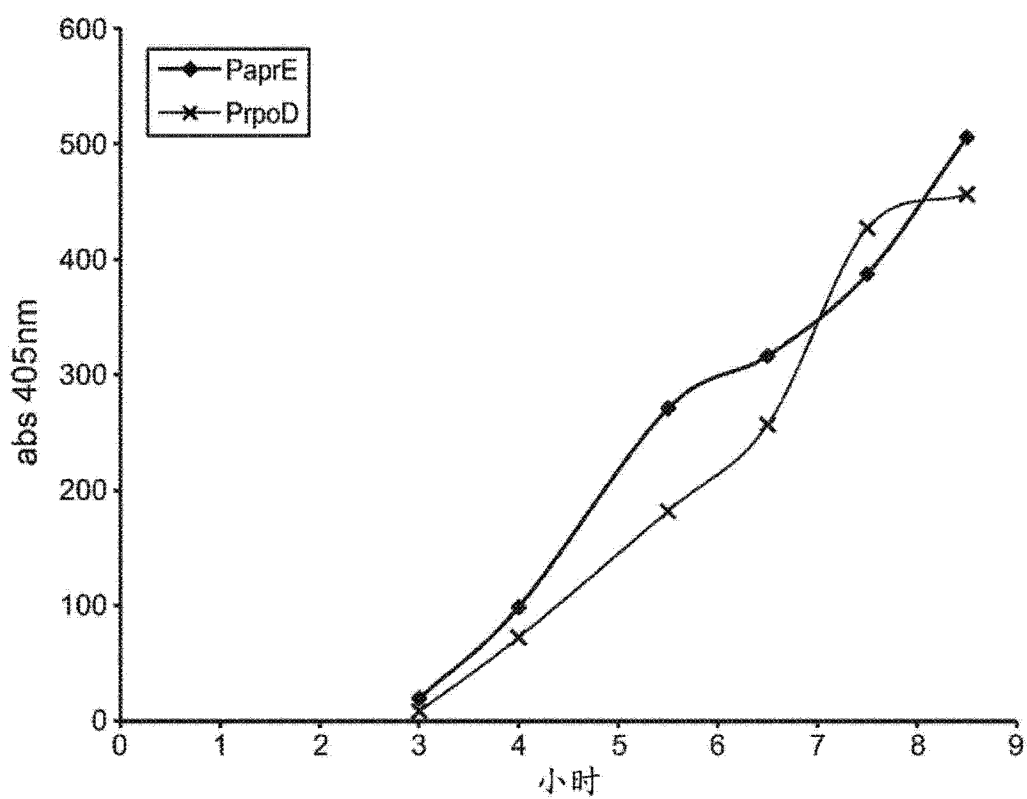


图 21