

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 4 月 23 日 (23.04.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/078321 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/111040

(22) 国际申请日: 2019 年 10 月 14 日 (14.10.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201811213835.X 2018 年 10 月 18 日 (18.10.2018) CN

(71) 申请人: 先正达参股股份有限公司 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) [CH/CH]; 瑞士巴塞尔市希沃兹沃德里 215 号, Basel CH-4058 (CH)。

(71) 申请人 (仅对 CN): 先正达生物科技 (中国) 有限公司 (SYNGENTA BIOTECHNOLOGY CHINA

CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命园路 25 号, Beijing 102206 (CN)。

(72) 发明人: 郑茜 (ZHENG, Qian); 中国北京市昌平区生命园路 25 号, Beijing 102206 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区阜成门外大街 2 号万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) Title: EFFICIENT PROTEIN EXPRESSION SYSTEM FOR EXPRESSING BT INSECTICIDAL PROTEIN

(54) 发明名称: 一种用于表达 Bt 杀虫蛋白的高效蛋白质表达系统

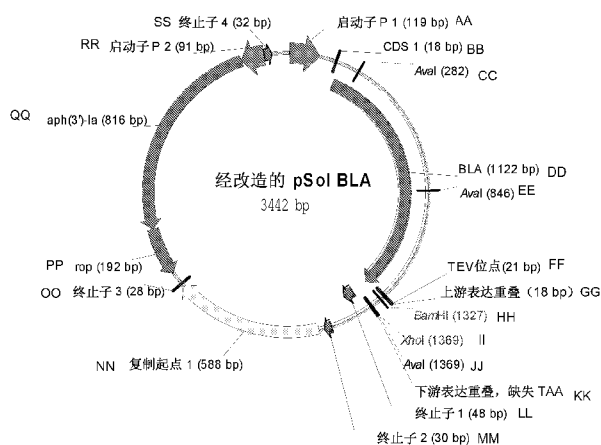


图 1

AA	Promoter P1 (119 bp)	KK	downlink expression overlap, absence of TAA
BB	CDS 1 (18 bp)	LL	Terminator 1 (48 bp)
CC	Aval (282)	MM	Terminator 2 (30 bp)
DD	BLA (1122 bp)	NN	Origin of replication 1 (588 bp)
EE	Aval (846)	OO	Terminator 3 (28 bp)
FF	TEV locus (21 bp)	PP	rop (192 bp)
GG	Upstream expression overlap (18 bp)	QQ	aph(3')-Ia (816 bp)
HH	BamHI (1327)	RR	Promoter P2 (91 bp)
II	XhoI (1369)	SS	Terminator 4 (32 bp)
JJ	Aval (1369)		

(57) Abstract: An efficient protein expression system for expressing a Bt insecticidal protein. Said protein expression system uses B la (beta-lactamase) as a fusion label, so that Bt genes unable to be expressed into soluble proteins are expressed as soluble proteins.

(57) 摘要: 一种用于表达 Bt 杀虫蛋白的蛋白质表达系统。所述蛋白质表达系统采用 B la (β-内酰胺酶) 作为融合标签, 从而将不能表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因表达为可溶性蛋白质。

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种用于表达 Bt 杀虫蛋白的 高效蛋白质表达系统

技术领域

本发明涉及蛋白质（特别地，Bt 蛋白）表达的领域。本发明提供了一种用于表达 Bt 杀虫蛋白的高效蛋白质表达系统。所述蛋白质表达系统采用 Bla（ β -内酰胺酶）作为融合标签，从而高效地将不能表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因表达为可溶性蛋白质。

背景技术

蛋白质的体外表达技术是基因工程技术中的一个重要部分。大肠杆菌相比其他蛋白质表达系统来说是一种高效、经济的途径，重组蛋白表达量可达到大肠杆菌总蛋白质量的 50%。具有正常生化活性的重组蛋白通常为可溶性形式，因而为了得到有活性的蛋白质，通常采用可溶性表达途径。

Bt 蛋白是苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）在芽孢形成时期在菌体内形成的伴孢晶体蛋白质。Bt 蛋白是一种广泛应用的生物农药，安全且具有高效、广谱的杀虫活性，且对人畜及非靶标害虫无害。发掘新的 Bt 蛋白具有很高的商业应用价值。

Lucigen 公司的 Espresso® Solubility & Expression Screening System 是一个含有 7 种融合标签的蛋白质表达标签筛选试剂盒。基因片段通过同源重组反应，可以很方便地连接到 8 个不同的载体上。通过 7 种不同融合标签的快速筛选，从而得到最适合目的蛋白质表达的标签（见下面的表 1）。

表 1

#	融合标签	AA 长度	kDa*	pI	描述
1	6xHis-AFV	113	13.5	5.0	假设的来自酸菌 (<i>Acidianus</i>) 丝状病毒 1 的蛋白质
2	6xHis-SlyD	210	22.7	5.2	FKBP-型肽基脯氨酸顺反异构酶
3	6xHis-Tsf	297	32.2	5.7	大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) 延伸因子
4	6xHis-SUMO	115	13.3	5.2	小泛素样调节物
5	6xHis-Bla	381	41.3	4.4	β -内酰胺酶
6	6xHis-MBP	382	42.1	5.5	麦芽糖结合蛋白
7	6xHis-GST	233	27.4	6.6	谷胱甘肽 S-转移酶
8	6xHis 对照	14	1.8	7.0	亲和标签

新发掘的 Bt 基因需要表达成为可溶性的蛋白质才能测试其杀虫活性。但是依靠目前的大肠杆菌表达技术，只有约 50~60% 的 Bt 基因能够被顺利表达。因此，将 Bt 基因成功表达为可溶性的蛋白质具有重要的研究和商业价值。

发明内容

本发明建立了一种高效的蛋白质表达系统。使用现有的大肠杆菌表达技术，约有 50~60% 的 Bt 基因能够被成功表达为可溶性的蛋白质。使用本发明的方法可以将剩下不能表达成可溶性蛋白质的 40~50% 的 Bt 基因实现 80% 的成功表达（表达为可溶性蛋白质），使总的 Bt 基因表达成功率达到 80% 以上。

本发明最初以 16 个不能表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因做为测试样本，采用 Lucigen 公司的 Espresso® Solubility & Expression Screening System 中的 8 个载体对这 16 个基因进行融合标签的筛选，结果显示 pSol-Bla 载体能够对 16 个测试样品实现 100% 的表达。为了方便克隆，我们对 Lucigen 的 pSol-Bla 载体进行了一些改造，并用改造后的载体

对另外的 237 个不能表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因在大肠杆菌中进行了表达；结果有 193 个基因成功表达成为可溶性蛋白质，表达成功率为 81.4%。因此，对于总共 253（16 + 237）个之前不能表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因，结果有 209（16 + 193）个基因成功表达成为可溶性蛋白质，表达成功率为 82.6%。

在一个方面，本发明涉及 Bla 即 β -内酰胺酶作为融合标签用于表达 Bt 蛋白的用途。

在另一个方面，本发明涉及如图 1 所示的经改造的 pSol-Bla 载体用于表达 Bt 蛋白的用途。

优选地，在上述用途中，在大肠杆菌中表达 Bt 蛋白。更优选地，所述大肠杆菌为大肠杆菌 10G 或者 BL21(DE3)。优选地，在上述用途中，所述 Bt 蛋白为不能表达的 Bt 蛋白。

在另一个方面，本发明涉及一种融合蛋白，其包含 Bt 蛋白和作为融合标签的 β -内酰胺酶。优选地，所述 Bt 蛋白为不能表达的 Bt 蛋白。

在另一个方面，本发明涉及一种核酸分子，其编码上述的融合蛋白。

在另一个方面，本发明涉及一种载体，其包含上述的核酸分子。优选地，所述载体为插入有待表达的 Bt 基因的 pSol-Bla 载体，或者插入有待表达的 Bt 基因的如图 1 所示的经改造的 pSol-Bla 载体。

在另一个方面，本发明涉及一种细胞，其包含上述的载体。优选地，所述细胞为大肠杆菌细胞。更优选地，所述大肠杆菌细胞为大肠杆菌 10G 或者 BL21(DE3)细胞。

在另一个方面，本发明涉及用于表达 Bt 蛋白的方法，其包括：(1) 在适合于表达出所需的蛋白质的条件下培养上述的细胞；和(2) 任选地，切除 Bla 标签，从而获得不含标签的 Bt 蛋白。

在另一个方面，本发明涉及如图 1 所示的经改造的 pSol-Bla 载体。

附图说明

图 1 为本发明的经改造的 pSol-Bla 载体的图谱。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1. 为 16 个不能表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因筛选融合标签以实现可溶性表达

我们选择了 16 个用常规方法（例如，pET 系列载体在不同温度和 IPTG 诱导浓度下的表达，使用 SUMO，GST 等融合标签，使用不同种类的感受态细胞，无细胞培养，用 Bt 细胞表达，等等）无法表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因，它们的编号和分子量大小以及表达的问题如下面的表 2 所示：

表 2

蛋白质编号	基因家族	SEQ ID NO	分子量	表达的问题
BT-0025	Cry1If	1	80 KD	不可溶
BT-0027		2	79 KD	无表达
BT-0275	Cry22Aa	3	96 KD	无表达
BT-0362		4	73 KD	无表达
BT-0425	Cry36Aa	5	56 KD	无表达
BT-0435	Cry42Aa	6	75 KD	无表达
BT-0445	Vip1Aa	7	138 KD	不可溶
BT-0452	Cry19Ca	8	59 KD	无表达
BT-0560	Cry20Aa	9	26 KD	无表达
BT-0587	Cry49Ab	10	60 KD	无表达
BT-0669	Cry2Ae	11	30 KD	不可溶
BT-0685	Cry49Ab	12	51 KD	不可溶

BT-0827	Cry48Ab2	13	86 KD	无表达
BT-0830	Cry48Ab2	14	87 KD	无表达
BT-0831	Cry54Ba1	15	80 KD	无表达
HO4	Cry1Ab.1Ca	16	130 KD	不可溶

使用 Lucigen 公司的 Espresso® Solubility and Expression Screening System 试剂盒,按照其说明书设计两端的引物序列分别合成这 16 个基因的 PCR 引物。通过 PCR 扩增的方法分别获得带有同源重组末端的 16 个基因的目的片段。然后,在将 PCR 产物与试剂盒中的 8 个线性载体混合后对化学感受态细胞进行质粒的转化。在将获得的单克隆质粒通过 PCR 鉴定出阳性克隆后送公司进行测序鉴定。对测序结果分析之后,我们分别获得了这 16 个基因在 8 个载体上的质粒,一共 128 个质粒。

在将 30 μ l 的带有这 16 个基因的大肠杆菌 10G 或者 BL21(DE3)甘油菌在 3 ml LB 培养基中于 37°C 培养至 OD600 约为 0.5 后,加入 20%的鼠李糖于 18°C 诱导培养过夜。收集菌体,超声波破碎后分别收集全菌和上清液,煮沸 10 分钟后上 SDS-PAGE 分析表达情况。这 128 个质粒在大肠杆菌 10G 和 BL21(DE3)细胞中的表达情况如下面的表 3 所示(其中表 3 中的前 6 个基因在成功表达之后进行了纯化并且把 Bla 标签切除,得到了纯的可溶性目的蛋白)。

表 3

蛋白质	通过常规方法进行表达时的问题	有效的标签	
		10G	BL21(DE3)
BT-0025 (80KD)	不可溶	6 个标签 (<u>Bla</u> , GST, His, MBP, SUMO, Tsf)	6 个标签 (<u>Bla</u> , GST, His, MBP, SUMO, Tsf)
BT-0827 (86KD)	无表达	4 个标签 (AFV, <u>Bla</u> , GST, Tsf)	未测试
BT-0830 (87KD)	无表达	5 个标签 (<u>Bla</u> , GST, MBP, Tsf, SlyD)	未测试

BT-0831 (80KD)	无表达	6 个标签 (AFV, <u>Bla</u> , GST, MBP, SlyD, Tsf)	未测试
HO4 (130KD)	不可溶	4 个标签 (AFV, <u>Bla</u> , MBP, Tsf)	未测试
BT-0027 (79KD)	无表达	3 个标签 (<u>Bla</u> , MBP, SlyD)	未测试
BT-0685 (51KD)	不可溶	<u>所有</u> 8 个标签	5 个标签 (AFV, <u>Bla</u> , GST, MBP, His)
BT-0669 (30KD)	不可溶	7 个标签 (<u>所有</u> , 除了 GST)	7 个标签 (<u>所有</u> , 除了 GST)
BT-0587 (60KD)	无表达	6 个标签 (AFV, <u>Bla</u> , GST, His, MBP, SUMO)	<u>所有</u> 8 个标签
BT-0560 (26KD)	无表达	3 个标签 (<u>Bla</u> , MBT, Tsf)	4 个标签 (AFV, GST, MBP, SUMO)
BT-0362 (73KD)	无表达	4 个标签 (<u>Bla</u> , MBP, SlyD, Tsf)	未测试
BT-0425 (56KD)	无表达	5 个标签 (AFV, <u>Bla</u> , MBP, SUMO, Tsf)	未测试
BT-0452 (59KD)	无表达	5 个标签 (AFV, <u>Bla</u> , GST, MBP, SlyD)	未测试
BT-0435 (75KD)	无表达	2 个标签 (AFV, <u>Bla</u>)	未测试
BT-0445 (138KD)	不可溶	4 个标签 (AFV, <u>Bla</u> , MBP, Tsf)	4 个标签 (AFV, <u>Bla</u> , MBP, Tsf)
BT-0275 (96KD)	无表达	2 个标签 (AFV, <u>Bla</u>)	未测试

结果显示，所述试剂盒中的 8 个带有不同标签的载体大多数能表达这 16 个 Bt 基因中的个别基因，只有 pSol-Bla 载体对这 16 个基因全部有效（即能够所述基因表达成可溶性蛋白质），这暗示着 Bla 标签对于 Bt 基因的表达有特异性提高的效果。

实施例 2. 改造 Lucigen 公司的 pSol-Bla 载体并用在 237 个不能表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因上

为了方便克隆，我们将 Lucigen 公司的 pSol-Bla 载体做了少许改造：去掉了原载体中位置 1326-1328 处的终止密码子 TAA，并且在原载体的位置 1326 处添加了序列“ggatccggctcaggctcaggctcaggctcaggctcaggctcactcgag”，其中包含一个

BamHI 酶切位点和一个 XhoI 酶切位点。改造后的 pSol-Bla 载体如图 1 所示。我们选择了 237 个不能表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因（采用 pET28a 载体，在 18℃ 下用 0.2-0.5 mM IPTG 诱导过夜的情况下无法在细胞裂解液的上清中获得可溶性形式的蛋白质），用酶切连接方法将他们克隆到改造后的 pSol-Bla 载体上。转化至大肠杆菌 10G 细胞之后，我们使用同样的方法表达了这 237 个质粒：在将 30 μ l 甘油菌加至 3 ml LB 培养基中于 37℃ 培养至 OD600 约为 0.5 后，加入 20% 的鼠李糖于 18℃ 诱导培养过夜。收集菌体，超声波破碎后分别收集全菌和上清液，煮沸 10 分钟后上 SDS-PAGE 分析表达情况。

结果显示，237 个不能表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因中有 193 个通过这种方式获得了可溶性的融合蛋白，成功率高达 81.4%。这个结果表明，融合有 Bla 的载体可以特异性地提升 Bt 基因的成功表达成功率。

所述 237 个不能表达成可溶性蛋白质的 Bt 基因的信息如下：

表 4

蛋白质编号	基因家族	SEQ ID NO	分子量 (KD)	在本实验中是否表达
BT-0269	Cry41Ab	17	93	是
BT-0290	Cry19Ca	18	136	否
BT-0397	Cry59Aa	19	77	是
BT-0398	Cry4Ca	20	75	是
BT-0411	Vip2Ad	21	22.5	是
BT-0426	Cry59Aa	22	73	是
BT-0434	Cry21Ba	23	120	是
BT-0439	Cry36Aa	24	57	是
BT-0441	Cry68Aa	25	82	是
BT-0455	Cry41Ba	26	94	是
BT-0456	Cry22Ab	27	79	是
BT-0464	Cry44Aa	28	59	是
BT-0474	Cry41Ba	29	92	是
BT-0481	Cry24Ca	30	45	是
BT-0482	Cry4Cc	31	49	是
BT-0483	Cry4Ca	32	131	是

BT-0526	Cry2Aa	33	39	是
BT-0532	Vip2Af	34	50	是
BT-0552	Cry15Aa	35	34	是
BT-0555	Cry52Aa	36	77	是
BT-0557	Cry53Ab	37	74	否
BT-0567	Cry70Bb	38	106	是
BT-0579	Cry40Da	39	74	是
BT-0581	Cry40Da	40	72	是
BT-0585	Cry36Aa	41	52	是
BT-0586	Cry49Aa	42	56	是
BT-0591	Cry4Cc	43	78	否
BT-0596	Cry4Ca	44	61	是
BT-0597	Cry69Aa	45	135	否
BT-0599	Cry54Aa	46	72	是
BT-0600	Cry56Aa	47	70	是
BT-0603	Cry53Ab	48	76	是
BT-0609	Cry4-like	49	26	是
BT-0610	Cry68Aa	50	89	是
BT-0612	Cry15Aa	51	40	否
BT-0613	Cry51Aa	52	37	是
BT-0624	Cry22Ab	53	64	是
BT-0626	Cry49Aa	54	23	是
BT-0663	Cry68Aa	55	82	是
BT-0666	Cry68Aa	56	90	是
BT-0667	Cry68Aa	57	91	是
BT-0671	Cry14Ab	58	90	是
BT-0681	Cry42Aa	59	88	是
BT-0683	Cry19Ca	60	76	是
BT-0713	Cry41Aa1	61	56	是
BT-0735	Cry4Cb1	62	79	是
BT-0744	Cry60Aa	63	35	是
BT-0760	Cry64Aa1	64	37	否
BT-0762	Cry64Aa1	65	36	否
BT-0764	Cry15Aa1	66	34	是
BT-0766	Cry54Aa2	67	78	是
BT-0767	Cry20Ba1	68	83	是
BT-0768	Cry51Aa1	69	35	否
BT-0770	Cry51Aa1	70	40	是
BT-0772	Cry70Bb1	71	110	否

BT-0776	Cry32Mb1	72	138	否
BT-0777	Cry32Ra1	73	126	是
BT-0778	Cry32Cb1	74	96	是
BT-0781	cry69Aa1	75	81	是
BT-0783	Cry40Da1	76	74	是
BT-0784	Cry4Ca1	77	65	否
BT-0785	Cry55Aa1	78	35	是
BT-0787	Cry55Aa1	79	35	否
BT-0788	Cry60Aa1	80	36	是
BT-0795	Cry41Aa1	81	66	是
BT-0878	Cry4Ca1		66	是
BT-0879	Cry40Da1		74	是
BT-0895	Cry49Ab1		43	是
BT-0903	Vip2Ba2		44	是
BT-0905	Vip2Ac1		58	是
BT-0911	Cry14Aa1	82	91	是
BT-0912	Cry32Ta1	83	147	是
BT-0914	Cry73Aa1	84	89	是
BT-0915	Cry32Sa1	85	139	是
BT-0916	Cry41Ba2	86	86	是
BT-0920	Cry21Ca1	87	146	是
BT-0922	Cry4Aa4	88	137	是
BT-0927	Cry8Ga3	89	37	是
BT-0934	Cyt2Ca1	90	25	是
BT-0936	Cry49Ab1	91	31	是
BT-0938	Cry49Ab1	92	42	是
BT-0939	Cry13Aa1	93	68	是
BT-0941	Cry32Ra1	94	155	否
BT-0942	Cry60Aa3	95	36	是
BT-0943	Cry8La1	96	115	是
BT-0944	Cry30Db1	97	78	是
BT-0946	Cry51Aa2	98	32	是
BT-0948	Cry32Da1	99	138	是
BT-0949	Cry8Ca1	100	132	是
BT-0950	Cry60Ba3	101	36	是
BT-0951	Cry32Ra1	102	147	是
BT-0952	Cry73Aa1	103	59	是
BT-0953	Cry73Aa1	104	57	是
BT-0954	Cry45Aa	105	31	是

BT-0955	Cry32Qa1	106	150	是
BT-0956	Cry20Aa1	107	81	是
BT-0957	Cry54Aa2	108	77	是
BT-0958	Cry60Aa3	109	36	是
BT-0961	Cry41Ba2	110	63	否
BT-0962	Cry19Ca1	111	86	是
BT-0964	Cry28Aa2	112	125	是
BT-0965	Cry60Ba3	113	35	是
BT-0968	Cry43Ca1	114	145	是
BT-0970	Cry4Ca1	115	139	是
BT-0976	Cry8Ib1	116	137	否
BT-0977	Cry22Ba1	117	53	是
BT-0979	Cry42Aa1	118	57	是
BT-0980	Cry30Aa1	119	78	是
BT-0981	Cry4Ca1	120	136	是
BT-0983	Cry54Aa2	121	80	是
BT-0984	Cry4Cb2	122	129	是
BT-0985	Cyt2Ca1	123	29	是
BT-0987	Cry36Aa1	124	54	是
BT-0989	Cry4Ca1	125	64	是
BT-0991	Cry40Da1	126	76	是
BT-0993	Cry70Bb1	127	113	是
BT-0997	Cry8Ia1	128	139	否
BT-0998	Cry45Aa	129	29	是
BT-0999	Cry45Aa	130	30	是
BT-1000	Cry32Ra1	131	151	是
BT-1002	Cry11Bb1	132	33	是
BT-1003	Cry56Aa2	133	78	是
BT-1004	Cry53Ab1	134	76	是
BT-1006	Cry60Ba3	135	35	是
BT-1008	Cry60Ba3	136	35	是
BT-1009	Cry10Aa4	137	82	否
BT-1010	Cry9Ga1	138	84	是
BT-1013	Cry32Ca1	139	145	是
BT-1015	Cry32Qa1	140	143	否
BT-1018	Vip1Ba2	141	88	是
BT-1019	Cry60Ba3	142	32	是
BT-1020	Cry2Ah1	143	57	是
BT-1021	Cry70Bb1	144	109	是

BT-1022	Cry30Ga2	145	81	否
BT-1023	Cry39Aa1	146	78	是
BT-1026	Cry56Aa2	147	73	是
BT-1027	Cry72Aa1	148	79	是
BT-1028	Cry30Fa1	149	79	是
BT-1029	Cyt2Aa4		29	否
BT-1031	Cry40Da1	150	86	是
BT-1032	Cry4Ca1	151	64	是
BT-1033	Cry73Aa1	152	64	是
BT-1034	Vip2Ae2	153	84	是
BT-1036	Cry32Qa1	154	143	是
BT-1037	Cry54Ba1	155	34	是
BT-1042	Cry4Ba5	156	134	是
BT-1045	Cry67Aa2	157	125	是
BT-1048	Cry32Cb1	158	144	是
BT-1050	Vip3Ad1	159	104	是
BT-1051	Cry73Aa1	160	54	是
BT-1054	Cry2Aa3	161	36	是
BT-1055	Cry73Aa1	162	58	是
BT-1057	Cry15Aa1	163	38	是
BT-1060	Cry4Ba5	164	140	否
BT-1062	Cry8Aa1	165	77	是
BT-1064	Cry8Ga3	166	129	是
BT-1065	Cry29Aa1	167	78	是
BT-1068	Cry51Aa2	168	32	是
BT-1069	Cry70Bb1	169	93	是
BT-1070	Cry4Aa4	170	134	否
BT-1073	Cry32La1	171	137	否
BT-1076	Cry60Aa3	172	40	否
BT-1078	Cry22Aa3	173	33	是
BT-1084	Cry33Aa1	174	30	是
BT-1085	Cry32La1	175	128	是
BT-1087	Cry32La1	176	75	是
BT-1088	Cry73Aa1	177	91	是
BT-1090	Cyt2Aa4	178	31	是
BT-1091	Cry32Ra1	179	151	否
BT-1092	Cry51Aa1	180	35	是
BT-1093	Vip1Aa2	181	88	是
BT-1094	Cry73Aa1	182	94	是

BT-1095	Cry32Ra1	183	147	是
BT-1102	Vip3Ca2	184	105	是
BT-1106	Cry42Aa1	185	55	是
BT-1110	Cry6Aa3	186	42	否
BT-1113	Cry32Ra1	187	150	是
BT-1114	Cry41Aa1	188	96	是
BT-1116	Cry15Aa1	189	37	是
BT-1120	Cry41Ba2	190	109	是
BT-1121	Cry43Ca1	191	137	是
BT-1122	Cry64Aa1	192	33	是
BT-1124	CryL (BT-0174)	193	119	是
BT-1125	Cry73Aa1	194	55	是
BT-1126	Cry16Aa1	195	50	是
BT-1127	Cry29Aa1	196	61	是
BT-1272	Cry66Aa2	197	159	是
BT-1274	Vip1Ba1	198	97	是
BT-1275	Cry55Aa1	199	44	是
BT-1276	Cry55Aa1	200	40	是
BT-1277	Cry1Fb4	201	53	是
BT-1280	Cry1Ia11	202	83	是
BT-1283	Cry12Aa1	203	96	是
BT-1284	Cry15Aa1	204	40	是
BT-1285	Cry60Ba3	205	35	否
BT-1287	Cry60Aa1	206	35	否
BT-1292	Cry71Aa1	207	71	是
BT-1296	Cry22Ab2	208	93	是
BT-1297	Cry22Ba1	209	99	否
BT-1300	Cry32Ra1	210	149	否
BT-1305	Cry37Aa1	211	16	是
BT-1306	Cry4Ca1	212	60	是
BT-1308	Cry59Aa1	213	75	否
BT-1312	Cry45Aa	214	31	是
BT-1314	Cry36Aa1	215	57	是
BT-1316	Cry49Ab1	216	43	否
BT-1317	Cry36Aa1	217	55	是
BT-1318	Cry49Ab1	218	44	否
BT-1319	Cry49Ab1	219	43	是
BT-1322	Cry49Aa4	220	29	是
BT-1323	Cry4Aa1	221	80	否

BT-1324	Cry4Ba5	222	79	是
BT-1331	Cyt2Aa3	223	27	是
BT-1333	Cry73Aa1	224	57	是
BT-1334	Cry73Aa1	225	57	是
BT-1336	Cry64Aa1	226	40	是
BT-1337	Cry45Aa	227	41	是
BT-1338	Cry45Aa	228	48	是
BT-1339	Cry60Aa1	229	38	是
BT-1340	Vip1Bb1	230	108	是
BT-1342	Vip2Ba1	231	29	否
BT-1343	Vip2Ba2	232	29	否
BT-1344	Vip2Ac1	233	28	否
BT-1345	Vip2Ba2	234	30	是
BT-1346	Vip2Aa1	235	33	否
BT-1347	Vip2Ba1	236	30	是
BT-1353	Vip2Ba2	237	29	否
BT-1354	Vip2Ac1	238	26	否
BT-1356	Vip2Aa2	239	25	否
BT-1357	Vip2Ba2	240	29	否
BT-1358	Vip2Aa2	241	26	否
BT-1359	Vip2Aa1	242	28	是
BT-1360	Vip2Ad1	243	57	否
BT-1362	Vip1Bb1	244	118	是
BT-1366	Cry22Aa3	245	75	是
BT-1369	Cry3Ca1	246	67	是
BT-1371	Cry22Aa3	247	122	是

参考文献

1. Tokunaga Hi 等人, (2010) Appl Microbiol Biotechnol. 88, 1223
2. Bruce E. Tabashnik 等人, Sci Rep. 2015; 5: 15107

权 利 要 求 书

1. Bla 即 β -内酰胺酶作为融合标签用于表达 Bt 蛋白的用途。
2. 如图 1 所示的经改造的 pSol-Bla 载体用于表达 Bt 蛋白的用途。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途，其中在大肠杆菌中表达 Bt 蛋白。
4. 根据权利要求 3 所述的用途，其中所述大肠杆菌为大肠杆菌 10G 或者 BL21(DE3)。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的用途，其中所述 Bt 蛋白为不能表达的 Bt 蛋白。
6. 融合蛋白，其包含 Bt 蛋白和作为融合标签的 β -内酰胺酶。
7. 根据权利要求 6 所述的融合蛋白，其中所述 Bt 蛋白为不能表达的 Bt 蛋白。
8. 核酸分子，其编码根据权利要求 6 或 7 所述的融合蛋白。
9. 载体，其包含根据权利要求 8 所述的核酸分子。
10. 根据权利要求 9 所述的载体，其中所述载体为插入有待表达的 Bt 基因的 pSol-Bla 载体，或者插入有待表达的 Bt 基因的如图 1 所示的经改造的 pSol-Bla 载体。
11. 细胞，其包含根据权利要求 9 或 10 所述的载体。
12. 根据权利要求 11 所述的细胞，其中所述细胞为大肠杆菌细胞。
13. 根据权利要求 12 所述的细胞，其中所述大肠杆菌细胞为大肠杆菌 10G 或者 BL21(DE3)细胞。
14. 用于表达 Bt 蛋白的方法，其包括：
 - (1) 在适合于表达出所需的蛋白质的条件下培养根据权利要求 11-13 中任一项所述的细胞；和
 - (2) 任选地，切除 Bla 标签，从而获得不含标签的 Bt 蛋白。
15. 如图 1 所示的经改造的 pSol-Bla 载体。

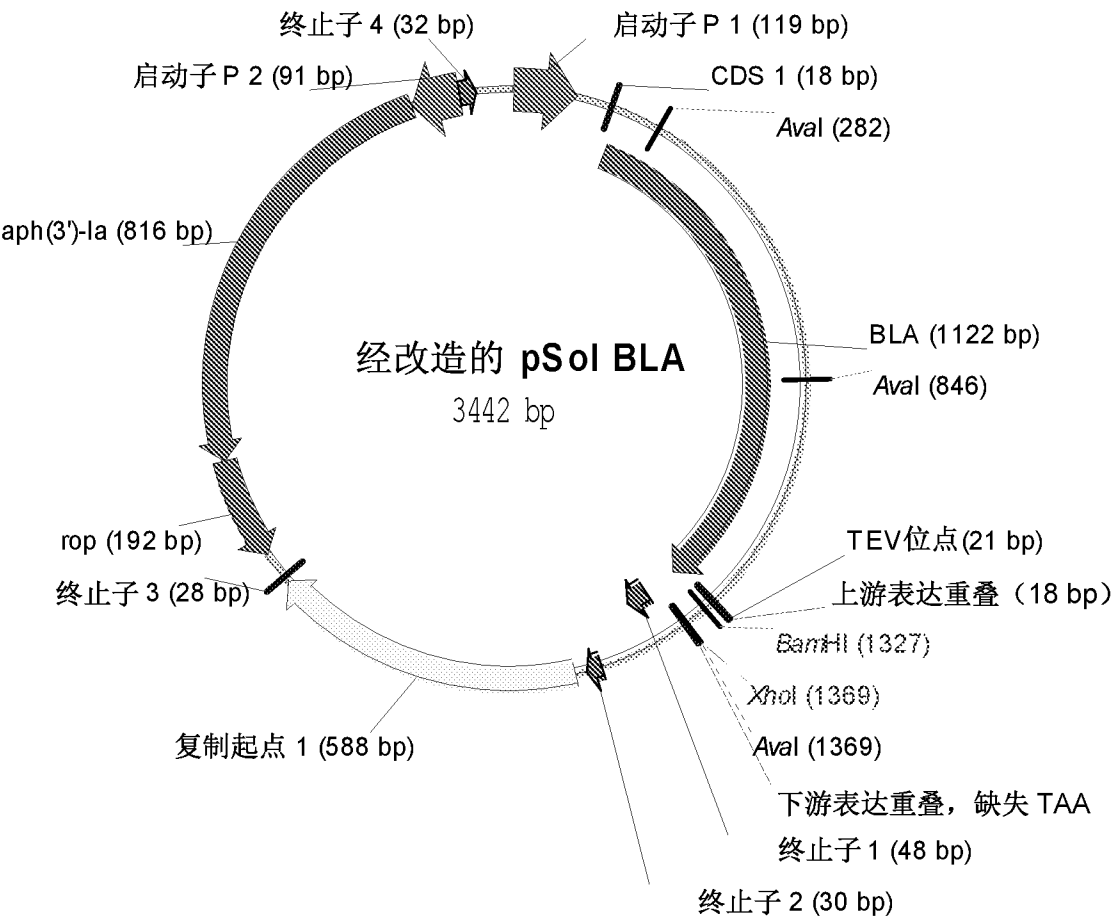


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/111040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, GenBank, 万方, WANFANG, PubMed, ISI web of knowledge, googlescholar: tag, marker, BLA, lactamase, fusion, Bt, Cry, 可溶性, 标签, 内酰胺酶, 苏云金杆菌, 融合, 蛋白

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109517069 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG et al.) 26 March 2019 (2019-03-26) claims 1-15	1-15
Y	STEINMETZ, E. J. et al. "Screening Fusion Tags for Improved Recombinant Protein Expression in E. Coli with the Espresso® Solubility and Expression Screening System" <i>Current Protocols in Protein Science</i> , 30 November 2017 (2017-11-30), pp. 5.27.1-5.27.20	1-15
Y	邵恩斯等 (SHAO, Ensi et al.). "苏云金杆菌Cry2Ab可溶蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备 (Prokaryotic Expression of the Soluble Cry2Ab Protein from Bacillus Thuringiensis and Preparation of the Polyclonal Antibody against Cry2Ab)" <i>农业生物技术学报 (Journal of Agricultural Biotechnology)</i> , Vol. 21, No. 1, 31 December 2013 (2013-12-31), pp. 106-111	1-15
Y	TOKUNAGA, H. et al. "Novel Soluble Expression Technologies Derived from Unique Properties of Halophilic Proteins" <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , Vol. 88, 14 September 2010 (2010-09-14), pp. 1223-1231	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 December 2019

Date of mailing of the international search report

16 January 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/111040**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LUCIGEN. "Expresso Solubility and Expression Screening System" <i>Lucigen Simplifying Genomics</i> , 19 January 2016 (2016-01-19), pp. 1-29	1-15
A	WO 02061097 A1 (LUCIGEN CORP.) 08 August 2002 (2002-08-08) entire document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/111040

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	109517069	A	26 March 2019	None	
WO	02061097	A1	08 August 2002	WO 02061097 A8	16 January 2003
				US 2004038401 A1	26 February 2004
				US 2004244065 A1	02 December 2004
				US 6709861 B2	23 March 2004
				AU 2002248136 A1	12 August 2002
				US 2004229359 A1	18 November 2004

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/111040

A. 主题的分类

C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N, C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, GenBank, 万方, PubMed, ISI web of knowledge, googlescholar: tag, marker, BLA, lactamase, fusion, Bt, Cry, 可溶性, 标签, 内酰胺酶, 苏云金杆菌, 融合, 蛋白

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 109517069 A (先正达参股股份有限公司 等) 2019年 3月 26日 (2019 - 03 - 26) 权利要求1-15	1-15
Y	STEINMETZ, E.J.等. "Screening Fusion Tags for Improved Recombinant Protein Expression in E. coli with the Espresso® Solubility and Expression Screening System" Current Protocols in Protein Science, 2017年 11月 30日 (2017 - 11 - 30), 第5.27.1-5.27.20页	1-15
Y	邵恩斯.等. "苏云金杆菌Cry2Ab可溶蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备" 农业生物技术学报, 第21卷, 第1期, 2013年 12月 31日 (2013 - 12 - 31), 第106-111页	1-15
Y	TOKUNAGA, H.等. "Novel soluble expression technologies derived from unique properties of halophilic proteins" Appl. Microbiol. Biotechnol., 第88卷, 2010年 9月 14日 (2010 - 09 - 14), 第1223-1231页	1-15
Y	LUCIGEN. "Espresso Solubility and Expression Screening System" Lucigen Simplifying Genomics, 2016年 1月 19日 (2016 - 01 - 19), 第1-29页	1-15

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 12月 5日

国际检索报告邮寄日期

2020年 1月 16日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

王慧

电话号码 86-(10)-53962103

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/111040

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	W0 02061097 A1 (LUCIGEN CORP.) 2002年 8月 8日 (2002 - 08 - 08) 全文	1-15

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/111040

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	109517069	A	2019年 3月 26日	无	
WO	02061097	A1	2002年 8月 8日	WO	02061097 A8 2003年 1月 16日
				US	2004038401 A1 2004年 2月 26日
				US	2004244065 A1 2004年 12月 2日
				US	6709861 B2 2004年 3月 23日
				AU	2002248136 A1 2002年 8月 12日
				US	2004229359 A1 2004年 11月 18日