

(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 6 月 25 日 (25.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/124831 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/113 (2010.01) *C12P 21/00* (2006.01)

C12N 15/75 (2006.01) *C12R 1/125* (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/078816

(22) 国际申请日: 2019 年 3 月 20 日 (20.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201811542085.0 2018 年 12 月 17 日 (17.12.2018) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 周哲敏(ZHOU, Zhemin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

崔文璟(CUI, Wenjing); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。韩来闯(HAN, Laichuang); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。刘中美(LIU, Zhongmei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。周丽(ZHOU, Li); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。郭军玲(GUO, Junling); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。燕宇(YAN, Yu); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E501 张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(54) Title: METHOD FOR CONSTRUCTING HIGH-EFFICIENCY BACILLUS SUBTILIS PROMOTERS

(54) 发明名称: 一种构建高效枯草芽孢杆菌启动子的方法

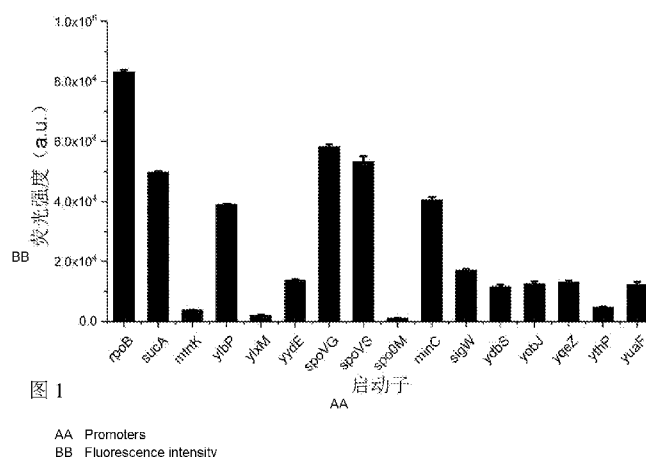


图 1

(57) Abstract: Provided are a method for artificially constructing Bacillus subtilis promoters and constructed gene expression regulation elements. The method comprises: connecting natural promoters identified by different sigma subunits in series to obtain some double tandem and triple tandem promoters, optimizing the length of spacer sequences between core regions of the promoters on the basis of the tandem connection of the promoters to further improve the activity of the promoters, and finally designing different RBS of the promoters. The method can improve the compatibility between promoters and other gene expression regulation elements, and can also controllably regulate the expression of exogenous genes.

(57) 摘要: 提供了一种人工构建枯草芽孢杆菌启动子的方法以及构建获得的基因表达调控元件。该方法将不同sigma亚基识别的天然启动子串联得到一些双串联、三串联启动子,并在启动子串联的基础之上优化了启动子核心区之间的间隔序列长度进一步提升了启动子的活性,最后将启动子进行不同的RBS设计。该方法可以提升启动子和其他基因表达调控元件之间的兼容性,也对外源基因的表达进行了可控的调节。

(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, 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))。

一种构建高效枯草芽孢杆菌启动子的方法

技术领域

本发明涉及一种构建高效枯草芽孢杆菌启动子的方法，属于基因工程技术领域。

背景技术

枯草芽孢杆菌是广泛应用于表达外源蛋白的革兰氏阳性模式菌株，其因能够高效表达外源蛋白在工业酶制剂生产方面有广泛应用。但是，目前应用的枯草芽孢杆菌启动子，尤其是天然的内源枯草芽孢杆菌启动子（如 P43 启动子）活性较低、表达外源基因的稳定性较差，这一缺陷严重制约了枯草芽孢杆菌在高效表达外源蛋白领域的应用。为了克服这一缺陷，近些年人们一方面利用定向进化的思路对天然启动子进一步筛选和改造，另一方面利用基因工程方法和合成生物学思路构建人工合成启动子。其中改造天然启动子虽然能大幅度提升启动子活性，但仍无法规避天然启动子自身的一些缺陷，如表达不稳定、与其他表达调控元件兼容性不强等。因此，构建高效稳定的人工启动子对于突破天然启动子活性瓶颈、提升启动子元件稳定性和兼容性方面有巨大的应用前景。

目前，构建人工启动子主要有两种策略，一种是利用天然启动子为基本骨架，筛选高活性天然启动子并进行精简、改造、重排、组合，进而构建出新的包含天然启动子骨架的高效人工启动子。另外一种策略是全人工合成随机的一定长度的 DNA 序列，克隆到启动子筛选载体上，借助高通量筛选设备和高通量筛选方法，筛选出众多随机序列中具有启动子功能的全人工合成序列作为启动子元件使用。这两种策略各有明显劣势，前者依赖高活性的天然启动子，也需要人们对启动子的工作原理有较为深入的认识，并且对于串联启动子来讲，新启动子如果包含多个重复的序列片段，将会对启动子和表达载体的稳定性带来不利影响；后者虽然不需要深入理解启动子的工作机制，但是从全随机序列中筛选到目标启动子需要昂贵的高通量筛选仪器设备，筛选效率低。因此，提供一种构建高效稳定启动子的方法，对于高效表达外源蛋白具有重要意义。

发明内容

本发明的第一个目的是提供一种调控基因表达的元件，包括人工串联启动子及其下游的 RBS，所述人工串联启动子是将启动子 P_{ipoB}、P_{spoVG} 和 P_{sigW} 中的至少两个进行串联，所述启动子 P_{ipoB}、P_{spoVG} 和 P_{sigW} 的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.11 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述人工串联启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO.17-SEQ ID NO.27 任一所示。

在本发明的一种实施方式中，所述人工串联启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO.29-SEQ ID NO.59 任一所示。

在本发明的一种实施方式中，当在 P_{ipoB} 和 P_{spoVG} 启动子的核心区之间分别插入了 60 bp、75 bp 的间隔序列，分别获得如 SEQ ID NO.32、SEQ ID NO.33 所示的新启动子 P_{AW-D60}、P_{AH-D75}。

在本发明的一种实施方式中，当在 P_{sigW}、P_{ipoB} 和 P_{spoVG} 的前两个启动子的核心区之间分别插入了 45 bp、75 bp 的间隔序列，分别获得如 SEQ ID NO.43、SEQ ID NO.45 所示的新启动子 P_{WAH-D45}、P_{WAH-D75}。

在本发明的一种实施方式中，当在 P_{ipoB}、P_{sigW} 和 P_{spoVG} 的前两个启动子的核心区之间分别插入了 30 bp、90 bp 的间隔序列，分别获得如 SEQ ID NO.54、SEQ ID NO.58 所示的新启动子 P_{AWH-D30}、P_{WAH-D90}。

在本发明的一种实施方式中，所述 RBS 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.60-72 任一所示。

在本发明的一种实施方式，目的基因的表达宿主包括枯草芽孢杆菌。

在本发明的一种实施方式，目的基因的表达宿主包括 *Bacillus subtilis* 168、*Bacillus subtilis* WB400、*Bacillus subtilis* WB600 或 *Bacillus subtilis* WB800。

在本发明的一种实施方式，目的基因包括外源基因或内源基因。

在本发明的一种实施方式，目的基因包括酶基因或非酶基因。

本发明的第二个目的是提供含有上述元件的载体。

本发明的第三个目的是提供表达上述载体的基因工程菌。

本发明的第四个目的是提供一种调控枯草芽孢杆菌中目的基因表达的方法，将上述的调控元件与目的

基因共表达。

在本发明的一种实施方式中，所述目的蛋白包括酶。

在本发明的一种实施方式中，所述枯草芽孢杆菌包括 *Bacillus subtilis* 168、*Bacillus subtilis* WB400、*Bacillus subtilis* WB600 或 *Bacillus subtilis* WB800。

本发明的第五个目的是提供上述的调控元件或基因工程菌在制备目的蛋白中的应用。

本发明的第六个目的是提供上述的调控元件或基因工程菌在食品、制药或化工领域的应用。

本发明的有益效果：本发明首先筛选和表征了不同 sigma 亚基识别启动子，从中选择被 sigA、sigH 和 sigW 亚基识别的活性最高（将含不同调控元件的重组质粒转化至枯草芽孢杆菌中，以重组菌培养后培养液的荧光强度表征目的基因表达量和调控元件的活性）的启动子，通过核心区的双串联和三串联、核心区间隔序列优化、RBS 重设计等方式，获得了活性进一步提高的调控元件。

P_{AW-D60}、P_{AH-D75} 荧光强度比改造前的 P_{AW}（荧光强度为 20262 a.u./OD₆₀₀）分别提高了 0.94 倍、1.03 倍；P_{WAH-D45}、P_{WAH-D75} 荧光强度（18245 a.u./OD₆₀₀）比改造前的 P_{WAH}（荧光强度为 10261 a.u./OD₆₀₀）分别提高了 0.87 倍、0.96 倍；P_{AWH-D30}、P_{AWH-D90} 荧光强度比改造前的 P_{AWH}（荧光强度为 16879 a.u./OD₆₀₀）分别提高了 0.78 倍、0.78 倍。

将 P_{AH-D75} 与 RBS11（SEQ ID NO.70）组合时，荧光强度可达 76216 a.u./OD₆₀₀，比 P_{AH-D75} 提高了 0.85 倍；将 P_{WAH-D75} 与 RBS13（SEQ ID NO.72）组合时，荧光强度可达 77751 a.u./OD₆₀₀，比 P_{WAH-D75} 提高了 1.17 倍；将 P_{AWH-D30} 与 RBS13（SEQ ID NO.72）组合时，荧光强度可达 73781 a.u./OD₆₀₀，比 P_{AWH-D30} 提高了 1.45 倍。

通过本发明提供的方法，我们可以用简便的启动子设计和改造方法获得活性更高、设计性和兼容性更强的启动子。该方法简单、易于实现，在构建外源蛋白高效表达系统和合成生物学研究中具有广阔的应用前景。

附图说明

图 1：不同 sigma 亚基识别的天然内源启动子核心区筛选和表征。

图 2：串联启动子构建和活性表征。

图 3：串联启动子核心区间隔序列优化 a：间隔序列优化示意图；b：P_{AH} 间隔序列优化；c：P_{WAH} 间隔序列优化；d：P_{AWH} 间隔序列优化。

图 4：启动子与 RBS 兼容性检测，a：P_{ipoB} 启动子 RBS 设计；b：P_{spoVG} 启动子 RBS 设计；c：P_{sigW} 启动子 RBS 设计；d：P_{AH-D75} 启动子 RBS 设计；e：P_{WAH-D75} 启动子 RBS 设计；f：P_{AWH-D30} 启动子 RBS 设计。

具体实施方式

1、启动子克隆方法：设计包含启动子序列的引物，以带有 sfGFP 报告基因（Genbank ID: A_VR55189.1）的大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pB-sfGFP（即 pBSG03，构建方法见 Guan C, Cui W, Cheng J, et al. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1):150）为模板，用 PrimeSTAR MAX DNA 聚合酶（购自 Takara，货号：R045Q）进行全质粒 PCR，PCR 程序为：预变性 98℃ 1 min，循环为变性 98℃ 30 s，退火 50℃ 30 s，延伸 72℃ 1 min，共 30 个循环，最后 72℃ 延伸 10 min。之后用限制性内切酶 *DpnI* 消化去除质粒模板，将 PCR 产物纯化。之后用 Infusion 重组方法将片段环化，转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。

2、sfGFP 荧光强度的检测方法：样品 12000 ×g 离心 2 min，收集菌体，PBS 缓冲液洗 3 次，用 PBS 稀释到一定浓度的菌体悬液，取 200 μL 至 96 孔酶标板，放入 SynergyTM H4 荧光酶标仪检测荧光。激发光 485 nm，吸收光 528 nm，检测荧光。

3、培养基：LB 培养基（g·L⁻¹）：胰蛋白胨 10，NaCl 10，酵母提取物 5，pH 7.0，配制固体培养基时添加琼脂粉 20。

4、枯草芽孢杆菌 168 转化方法：挑单菌落枯草芽孢杆菌 168 接种至 2 mL 的 SPI 培养基中，37℃ 摇床培养 12-14 h；从培养物中取 100 μL，接种至 5 mL SPI 培养基中，37℃ 摇床培养 4-5 h 后开始测 OD₆₀₀。当 OD₆₀₀ 约为 1.0 时，移取 200 μL 菌液转接至 2 mL 的 SPII 培养基中，于 37℃、100 r·min⁻¹ 摇床孵育 1.5 h；向管中加入 20 μL 100×EGTA 溶液，于 37℃、100 r·min⁻¹ 摇床中培养 10 min 后，每 1.5 mL 离心管分装 500 μL；向管中加入经过测序验证正确的适量质粒，吹吸混匀放置于 37℃、100 r·min⁻¹ 的摇床中培养 2 h；培养结束，吸取菌液约 200 μL 均匀涂相应的选择性平板，37℃ 培养 12-14 h。

实施例 1：不同 sigma 亚基识别单启动子的克隆和表征

选择 P_{ipoB}、P_{sucA}、P_{mtnK}、P_{ylbP}、P_{ylxM} 和 P_{yydE} 六个 SigA 亚基识别的启动子（核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.1- SEQ ID NO.6 所示），P_{spoVG}、P_{spoVS}、P_{spo0M} 和 P_{minC} 四个 SigH 亚基识别的启动子（核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.7- SEQ ID NO.10 所示）和 P_{sigW}、P_{ydbS}、P_{yobJ}、P_{yqeZ}、P_{ythP} 和 P_{yuaF} 六个 SigW 识别的启动子（核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.11- SEQ ID NO.16 所示）进行试验。克隆的启动子核心区包括以上启动子的 -10 区、-35 区和转录起始位点（TSS）共 70bp。待筛选和鉴定的启动子序列被设计在引物上（见表 2），通过全质粒 PCR 的方法将启动子序列引入载体骨架 pB-sfGFP，之后通过 *DpnI* 消化、纯化和组装、转化构建出克隆的带有含单启动子 sfGFP 表达质粒。将表达单启动子的质粒转化至枯草芽孢杆菌 168 菌株中，获得的重组枯草芽孢杆菌在 LB 培养基中，37℃，200 rpm 下培养 24 h 以检测 sfGFP 的表达水平，通过 sfGFP 的荧光信号高低判断启动子活性的高低。结果如图 1 和表 3 所示，在 SigA 识别的启动子中，P_{ipoB} 启动子活性最高，SigH 识别的启动子中，P_{spoVG} 活性最高；SigW 识别的启动子中，P_{sigW} 活性最高（图 1）。

表 2 单启动子克隆引物

引物	序列(5'-3') ^a
P _{ipoB} -1	CGGTATTTTAACTATGTTAATATTGTAATAATGCCAATGTATTTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{ipoB} -2	ACAATATTAACATAGTTAAATACCGAGTCAAACTTTTTTGGCTTACCTGCCCTCTGCCACC
P _{sucA} -1	ACAATCAAGGTAGAATCAAATTGCAAACAGTGGTAAATATTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{sucA} -2	TTGCAATTTGATTCTACCTTGATTGTTACAAAATAGTAAAAACACCTGCCCTCTGCCACC
P _{ylbP} -1	TTTTTTAAATAAAGCGTTTACAATATATGTAGAAACAACAATCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{ylbP} -2	ATATTGTAAACGCTTTATTTAAAAAATCCAAATATTAAACTTTAACCTGCCCTCTGCCACC
P _{ylxM} -1	GTGTCATTAAAAACCGTGTAACCTAAGTTATCGTAAAGGGATTTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{ylxM} -2	CTTAGTTTACACGGTTTTAATGACACTGTCAAGTTTTATCTTGTACCTGCCCTCTGCCACC
P _{yydE} -1	AAAGCAGTTATGCGGTACTATCATATAAAGGTCCAATGTTTTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{yydE} -2	ATATGATAGTACCGCATAACTGCTTTTAGAGACAATTAACACGAGACCTGCCCTCTGCCACC
P _{mtnK} -1	CTAACTAAATTACCTGTTACCATTGTTTCATCACTGATAAATTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{mtnK} -2	AACATGGTAACAGGTAATTTAGTTAGTTGTCAATATATTTTTTAAACCTGCCCTCTGCCACC
P _{minC} -1	GATTTTATCTTTTTTTGACGAAATGAGTATGTTGTTGAGGTTTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{minC} -2	TCATTTTCGTCAAAAAAAGATAAAATCCTTTTTACTCATCTCTCAAACCTGCCCTCTGCCACC
P _{spoVG} -1	TTTCAGAAAAAATCGTGGAATTGATACACTAATGCTTTTATTTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{spoVG} -2	TATCAATTCCACGATTTTTTCTGAAATCCTGCTCGTTTTTAAATACCTGCCCTCTGCCACC
P _{spoVS} -1	GAATATAGCAACTCCTTAGTGAATATAGTAAAAATGGAAGGTTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{spoVS} -2	ATATTCACCTAAGGAGTTGCTATATTCCTGCTTTTTCTTTTTAATATACCTGCCCTCTGCCACC
P _{spo0M} -1	GAAAAAAGTATGAATCAAACGAATCTTTTTTCTCCTCTCTTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{spo0M} -2	AGATTTCGTTTGATTACATCTTTTTTCTTATTTCGTCGCGCTACCTGCCCTCTGCCACC
P _{sigW} -1	ACCTTTTGAACGAAGCTCGTATACATACAGACCGGTGAAGTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{sigW} -2	TGTATACGAGCTTCGTTTCAAAAAGGTTTCAATTTTTTATAAAATACCTGCCCTCTGCCACC
P _{ydbS} -1	ACCTTTCTGTAAAAAGAGACGTATAAATAACGACGAAAAAATTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{ydbS} -2	TTTATACGCTCTCTTTTACAGAAAGGTTTCATTCTTAAGCATAACAGACCTGCCCTCTGCCACC
P _{yobJ} -1	ACCTTTTTTATTTTAGCCCGTATTAAGTAAATTCAGAGATCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{yobJ} -2	TTAATACGGGCTAAAATAAAAAAGGTTTCATATAAACGGGACTAACCTGCCCTCTGCCACC
P _{yqeZ} -1	AACCTTTGATACATTTGTTACGTATGAAGAGAAGGCACTTATCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{yqeZ} -2	CATACGTAACAAATGTATCAAAAGGTTTCATTTTTTTATGTATAAAACCTGCCCTCTGCCACC
P _{ythP} -1	AACTTTTTTTTATCTATTTTCGTAGTAAATTTTGAGGTTGATCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{ythP} -2	ACTACGAAATAGAATAAAAAAAGTTTCTTTAACCATAATAATTACCTGCCCTCTGCCACC
P _{yuaF} -1	ACTTTTCCCAGAGTGTCTCGTATAAATGGTAACGGCAGCCGTCGAACATCATATTTAAAGTACGAGGAG
P _{yuaF} -2	TTTATACGAGACACCTCGGGAAAAGTTTCAAAATTTTAAGACAAAACCTGCCCTCTGCCACC

表 3 带有含单启动子 sfGFP 表达质粒的重组菌培养 24 h 后的总荧光强度

启动子	P _{ipoB}	P _{sucA}	P _{mtnK}	P _{ylbP}	P _{ylxM}	P _{yydE}	P _{spoVG}	P _{spoVS}	P _{spo0M}	P _{minC}	P _{sigW}	P _{ydbS}	P _{yobJ}	P _{yqeZ}	P _{ythP}	P _{yuaF}
荧光强度 (a.u.)	83184	49832	3840	39028	2090	13844	58281	53313	1188	40567	17181	11706	12667	13120	4734	12260

实施例 2：串联启动子的构建和表征

将 P_{ipoB}、P_{spoVG} 和 P_{sigW} 进行串联设计，用表 5 中的引物以实施例 1 中构建的带有启动子 P_{ipoB}、P_{spoVG} 和 P_{sigW} 的三种质粒作为模板做全质粒 PCR 构建含串联启动子并表达 sfGFP 的质粒，将串联启动子按照串联核心区的类型和顺序命名，得到双串联启动子 P_{AH}、P_{AW}、P_{HA}、P_{HW}、P_{AW}、P_{WA} 和 P_{WH}（核苷酸序列分

别如 SEQ ID NO.17- SEQ ID NO.22 所示), 三串联启动子 P_{AHW} 、 P_{AWH} 、 P_{HAW} 、 P_{HWA} 、 P_{WAH} 和 P_{WHA} (核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.23- SEQ ID NO.28 所示), 构建引物见表 5。将构建好的重组质粒转化枯草芽孢杆菌 168, 获得的重组枯草芽孢杆菌在 LB 培养基中, 37°C, 200 rpm 下培养, 6 h、12 h、24 h 后检测荧光信号, 通过 sfGFP 的荧光信号高低判断启动子活性的高低。

表 5 串联启动子构建引物

引物	序列(5'-3') ^a
$P_{\text{rpoB-spoVG-1}}$	CGGTATTTTAACTATGTTAATATTGTAAAATGCCAATGTATATTTTAAAAACGAGCAGGATTTTCAG
$P_{\text{rpoB-sigW-1}}$	CGGTATTTTAACTATGTTAATATTGTAAAATGCCAATGTATATTTTATAAAAAAATTGAAACCTTTTGAAAC
$P_{\text{spoVG-rpoB-1}}$	TTTCAGAAAAAATCGTGGAATTGATACACTAATGCTTTTATAAGCAAAAAAAGTTTGACTCG
$P_{\text{spoVG-sigW-1}}$	TTTCAGAAAAAATCGTGGAATTGATACACTAATGCTTTTATAATTTTATAAAAAAATTGAAACCTTTTGAAACG
$P_{\text{sigW-rpoB-1}}$	ACCTTTTGAAACGAAGCTCGTATACATACAGACCGGTGAAGAAGCAAAAAAAGTTTGACTCG
$P_{\text{sigW-spoVG-1}}$	ACCTTTTGAAACGAAGCTCGTATACATACAGACCGGTGAAGATTTTAAAAACGAGCAGGATTTTCAG

表 6 带有含双串联和三串联启动子 sfGFP 表达质粒的重组菌培养后的总荧光强度

启动子	P_{rpoB}	P_{spoVG}	P_{sigW}	P_{AH}	P_{AW}	P_{HA}	P_{HW}	P_{WA}	P_{WH}	P_{AHW}	P_{AWH}	P_{HAW}	P_{HWA}	P_{WAH}
荧光强度 (a.u.)-6h	12262	11581	3421	20062	25264	21630	16424	5999	15518	28506	26367	9267	9830	10261
荧光强度 (a.u.)-12h	42849	36157	9383	71167	53255	53088	36954	43618	60354	61632	76719	44867	49937	71036
荧光强度 (a.u.)-24h	83184	58281	17181	110576	72453	76553	65127	91459	102747	80954	109470	74699	85714	101361

带有含双串联和三串联启动子 sfGFP 表达质粒的重组菌培养 6、12、24 h 后的荧光强度见图 2 和表 6, 双串联启动子和三串联启动子的活性较单启动子大部分都体现出了不同程度的提高, 并且三串联启动子大部分活性高于双串联启动子, 其中 P_{WHA} 启动子质粒转化枯草芽孢杆菌不成功。选择双串联启动子中活性较高的 P_{AH} 、三串联启动子中活性较高的 P_{WAH} 和 P_{AWH} 作为下一步改造材料。

实施例 3: 串联启动子间隔序列优化

在启动子核心区之间插入不同长度的间隔序列 (图 3a), 将间隔序列长度设定为 15 bp、30 bp、45 bp、60 bp、75 bp 和 90 bp, 得到 AH-D15、AH-D30、AH-D45、AH-D60、AH-D75、AH-D90、WAH-U15、WAH-U30、WAH-U45、WAH-U60、WAH-U75、WAH-U90、WAH-D15、WAH-D30、WAH-D45、WAH-D60、WAH-D75、WAH-D90、AWH-U15、AWH-U30、AWH-U45、AWH-U60、AWH-U75、AWH-U90、AWH-D15、AWH-D30、AWH-D45、AWH-D60、AWH-D75、AWH-D90、AWH-DU30 (核苷酸分别序列如 SEQ ID NO. 29-SEQ ID NO.59 所示)。将 SEQ ID NO.29-SEQ ID NO.59 所示的启动子序列分别克隆在 pB-sfGFP 载体上, 之后将重组质粒转化枯草芽孢杆菌 168 进行检测, 获得的重组枯草芽孢杆菌在 LB 培养基中, 37°C, 200 rpm 下培养 24 h 后检测荧光信号, 通过 sfGFP 的荧光信号高低判断启动子活性的高低。

结果显示, 如 $P_{\text{AW-D60}}$ 、 $P_{\text{AH-D75}}$ 荧光强度比改造前的 P_{AW} (荧光强度为 20262 a.u./OD₆₀₀) 分别提高了 0.94 倍、1.03 倍; $P_{\text{WAH-D45}}$ 、 $P_{\text{WAH-D75}}$ 荧光强度 (18245 a.u./OD₆₀₀) 比改造前的 P_{WAH} (荧光强度为 10261 a.u./OD₆₀₀) 分别提高了 0.87 倍、0.96 倍; $P_{\text{AWH-D30}}$ 、 $P_{\text{AWH-D90}}$ 荧光强度比改造前的 P_{AWH} (荧光强度为 16879 a.u./OD₆₀₀) 分别提高了 0.78 倍、0.78 倍。

(图 3b、3c 和 3d; 表 8)。结果说明, 在串联的核心区之间插入合适长度的间隔序列可以有效进一步提升串联启动子的活性。

表 8 含插入间隔序列的双串联和三串联启动子的重组质粒的重组菌培养 24 h 后的荧光强度

启动子	荧光强度(a.u. /OD ₆₀₀)
-----	--------------------------------

P _{AH}	20262
P _{AH-D15}	32865
P _{AH-D30}	33033
P _{AH-D45}	34869
P _{AH-D60}	39476
P _{AH-D75}	41154
P _{AH-D90}	28592
P _{WAH}	18245
P _{WAH-U15}	18278
P _{WAH-U30}	18553
P _{WAH-U45}	17198
P _{WAH-U60}	18161
P _{WAH-U75}	19295
P _{WAH-U90}	18419
P _{WAH-D15}	24711
P _{WAH-D30}	25307
P _{WAH-D45}	34100
P _{WAH-D60}	32029
P _{WAH-D75}	35819
P _{WAH-D90}	24355
P _{AWH}	16879
P _{AWH-U15}	16707
P _{AWH-U30}	15762
P _{AWH-U45}	16157
P _{AWH-U60}	15852
P _{AWH-U75}	16770
P _{AWH-U90}	18045
P _{AWH-D15}	27627
P _{AWH-D30}	30084
P _{AWH-D45}	28409
P _{AWH-D60}	25195
P _{AWH-D75}	26580
P _{AWH-D90}	29999
P _{AWH-DU30}	24562

实施例 4：启动子和 RBS 兼容性研究

将实施例 1 和实施例 3 中的启动子 P_{ropB}、P_{spoVG}、P_{sigW}、P_{AH-D75}、P_{WAH-D75} 和 P_{AWH-D30} 与 13 个 RBS 分别进行组合。将 RBS1-13 序列（核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.60-SEQ ID NO.72 所示）分别克隆在含有串联启动子的载体上，之后将重组质粒转化至枯草芽孢杆菌 168，获得的重组枯草芽孢杆菌在 LB 培养基中，37℃，200 rpm 下培养 24 h 后检测荧光信号，通过 sfGFP 的荧光信号高低判断调控元件活性的高低。之后对不同组合的 RBS 理论强度和实际测定的荧光值进行相关性分析，以 r 值评价相关性。结果如图 4 所示，单启动子 P_{ropB} 和 RBS 组合设计的相关性不高，而串联启动子和 RBS 组合之后的相关性均高于单启动子 P_{propB} 和 RBS 的组合。说明串联启动子设计 RBS 可以提高启动子和 RBS 元件组合使用的兼容性，即增强了表达外源蛋白时的可设计性和可预测性。

如表 10 所示，将 P_{AH-D75} 与 RBS11（SEQ ID NO.70）组合时，荧光强度可达 76216 a.u./OD₆₀₀，比 P_{AH-D75} 提高了 0.85 倍；将 P_{WAH-D75} 与 RBS13（SEQ ID NO.72）组合时，荧光强度可达 77751 a.u./OD₆₀₀，比 P_{WAH-D75} 提高了 1.17 倍；将 P_{AWH-D30} 与 RBS13（SEQ ID NO.72）组合时，荧光强度可达 73781 a.u./OD₆₀₀，比 P_{AWH-D30} 提高了 1.45 倍。说明串联启动子设计 RBS 还可以增强目的基因的表达。

表 10 启动子分别组合 RBS1-13 后的翻译起始效率和荧光强度

启动子	RBS	翻译起始效率(a.u.)	荧光强度(a.u./OD ₆₀₀)
P _{propB}	RBS1	993	506
	RBS2	5675	490
	RBS3	8164	744
	RBS4	30770	1224
	RBS5	56900	8983
	RBS6	77621	3665
	RBS7	109196	48675
	RBS8	280412	47717
	RBS9	507918	50055
	RBS10	818340	65439

	RBS11	1011200	892
	RBS12	1489100	27493
	RBS13	2031360	41641
P _{spoVG-}	RBS1	993	258
	RBS2	5675	279
	RBS3	8164	390
	RBS4	30770	434
	RBS5	56900	6024
	RBS6	77621	3272
	RBS7	109196	5417
	RBS8	280412	43386
	RBS9	507918	19364
	RBS10	818340	53879
	RBS11	1011200	56203
	RBS12	1489100	51777
	RBS13	2031360	70532
P _{sigW-}	RBS1	993	270
	RBS2	5675	317
	RBS3	8164	312
	RBS4	30770	312
	RBS5	56900	2213
	RBS6	77621	1385
	RBS7	109196	2142
	RBS8	280412	25573
	RBS9	507918	6991
	RBS10	818340	48885
	RBS11	1011200	32878
	RBS12	1489100	32409
	RBS13	2031360	37704
P _{AH-D75-}	RBS1	993	373
	RBS2	5675	700
	RBS3	8164	1078
	RBS4	30770	1822
	RBS5	56900	31182
	RBS6	77621	506
	RBS7	109196	484
	RBS8	280412	73457
	RBS9	507918	58264
	RBS10	818340	3976
	RBS11	1011200	76216
	RBS12	1489100	75723
	RBS13	2031360	73351
P _{WAH-D75-}	RBS1	993	447
	RBS2	5675	704
	RBS3	8164	1229
	RBS4	30770	2416
	RBS5	56900	38253
	RBS6	77621	28222
	RBS7	109196	34329
	RBS8	280412	2539
	RBS9	507918	60937
	RBS10	818340	6350
	RBS11	1011200	76533
	RBS12	1489100	79375
	RBS13	2031360	77751
P _{AWH-D30-}	RBS1	993	310
	RBS2	5675	590
	RBS3	8164	960
	RBS4	30770	1465
	RBS5	56900	31627
	RBS6	77621	18187
	RBS7	109196	27310
	RBS8	280412	73026
	RBS9	507918	59282

	RBS10	818340	73459
	RBS11	1011200	74559
	RBS12	1489100	61201
	RBS13	2031360	73781

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1、一种调控目的基因表达的方法，其特征在于，将调控元件与目的基因共表达，所述调控元件包括人工串联启动子及其下游的 RBS，所述人工串联启动子是将启动子 P_{rpoB}、P_{spoVG} 和 P_{sigW} 中的至少两个进行串联，所述启动子 P_{rpoB}、P_{spoVG} 和 P_{sigW} 的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.11 所示。

2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述人工串联启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO.17-SEQ ID NO.27 任一所示。

3、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述人工串联启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO.29-SEQ ID NO.59 任一所示。

4、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 RBS 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.60-72 任一所示。

5、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，目的基因的表达宿主包括枯草芽孢杆菌。

6、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，目的基因的表达宿主包括 *Bacillus subtilis* 168、*Bacillus subtilis* WB400、*Bacillus subtilis* WB600 或 *Bacillus subtilis* WB800。

7、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，目的基因包括外源基因。

8、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，目的基因包括内源基因。

9、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，目的基因包括酶基因或非酶基因。

10、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，应用于食品领域。

11、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，应用于保健品领域。

12、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，应用于制药领域。

13、一种调控基因表达的元件，其特征在于，包括人工串联启动子及其下游的 RBS，所述人工串联启动子是将启动子 P_{rpoB}、P_{spoVG} 和 P_{sigW} 中的至少两个进行串联，所述启动子 P_{rpoB}、P_{spoVG} 和 P_{sigW} 的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.11 所示。

14、表达权利要求 13 所述元件的基因工程菌。

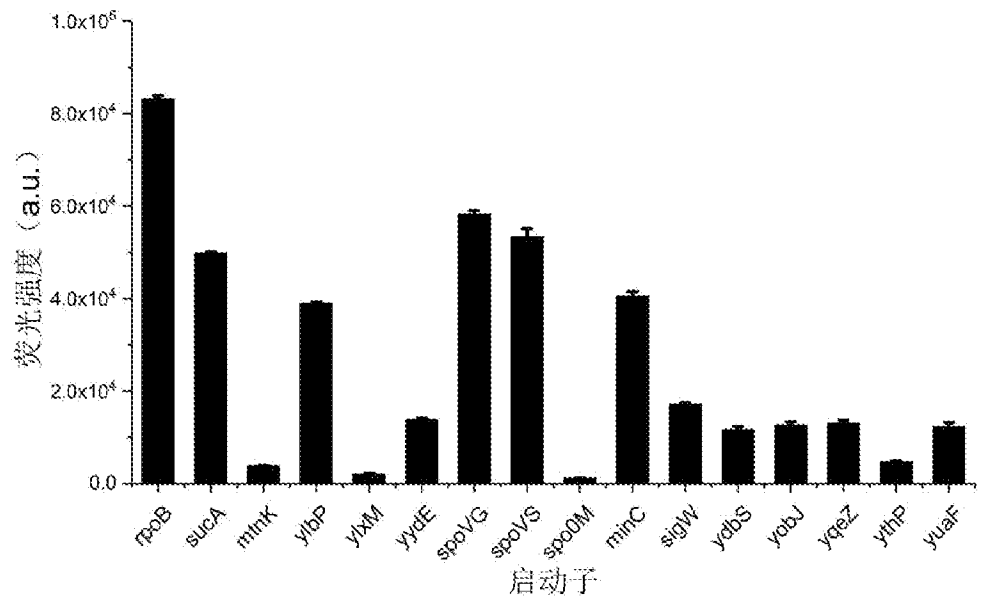


图 1

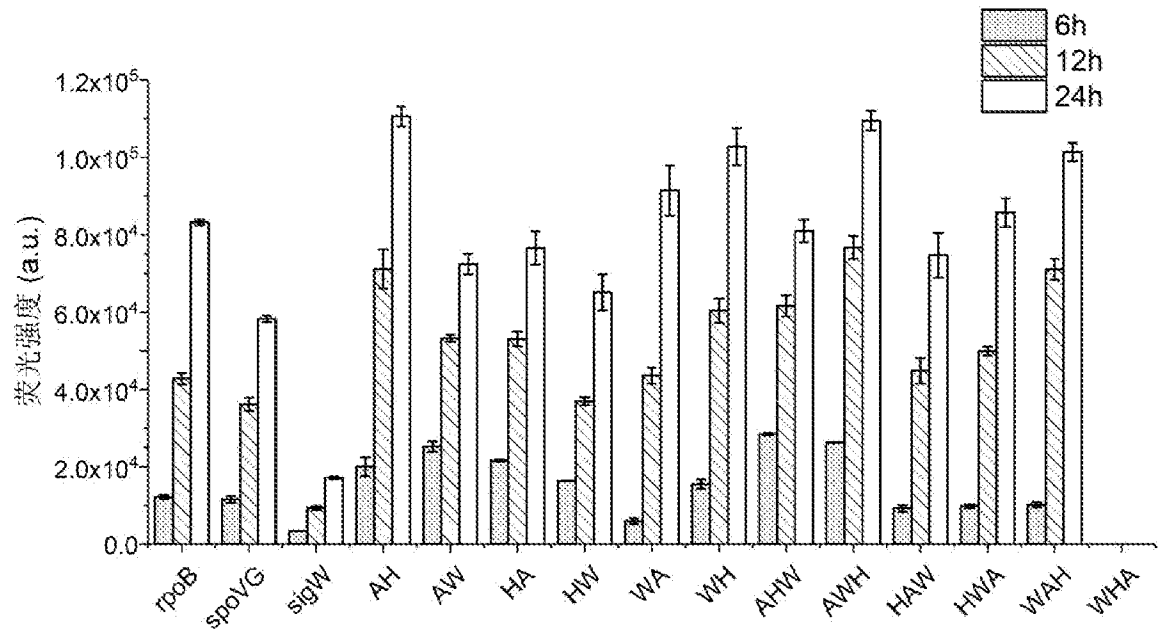
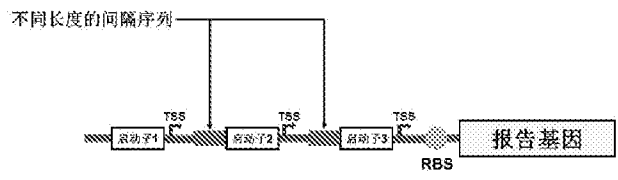
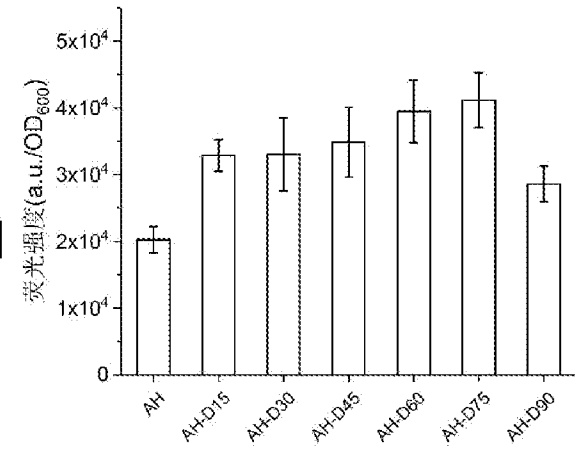


图 2

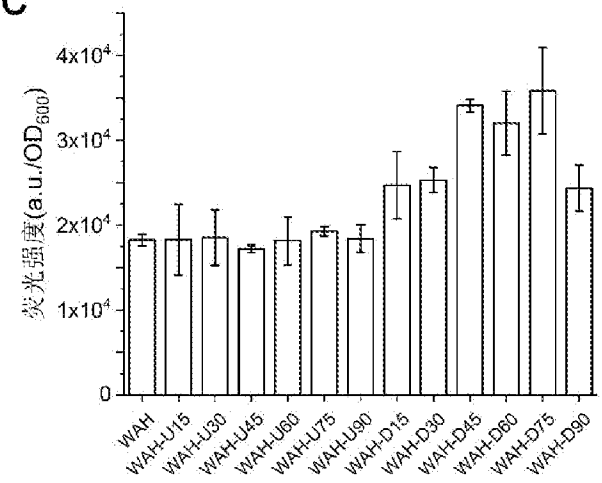
a



b



c



d

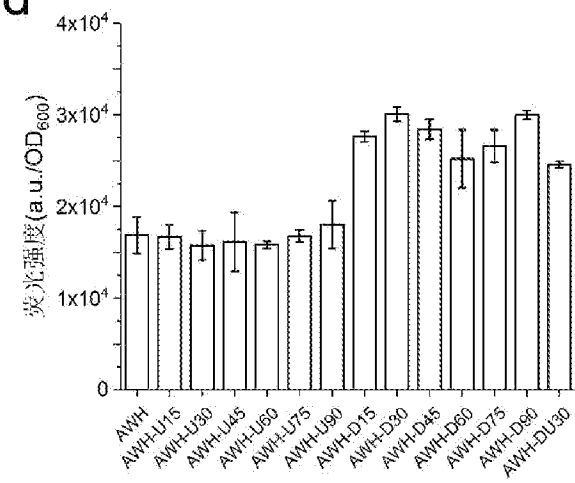
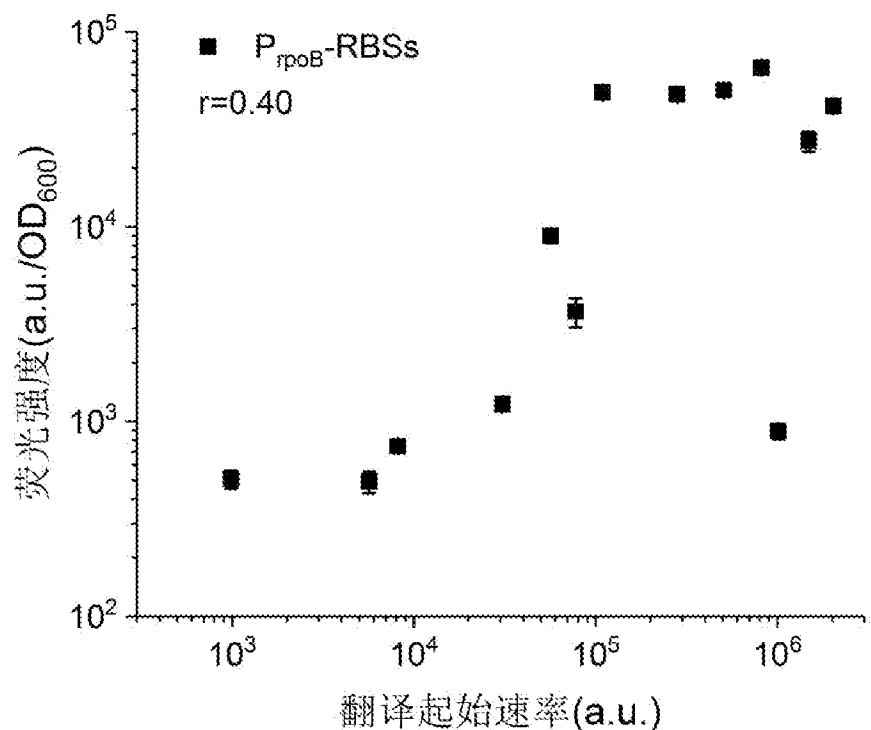
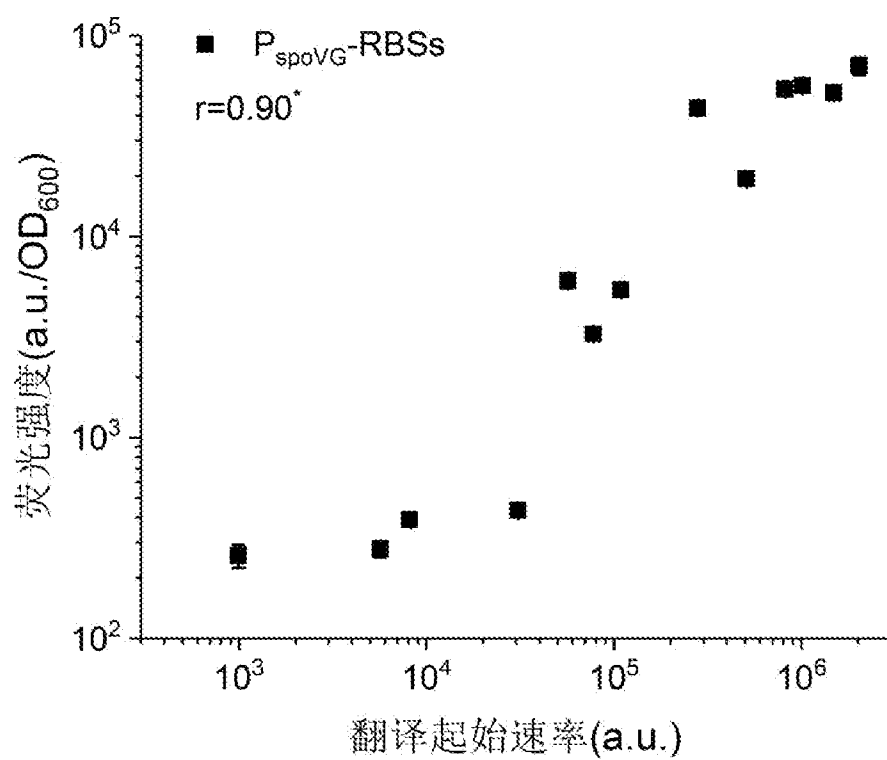


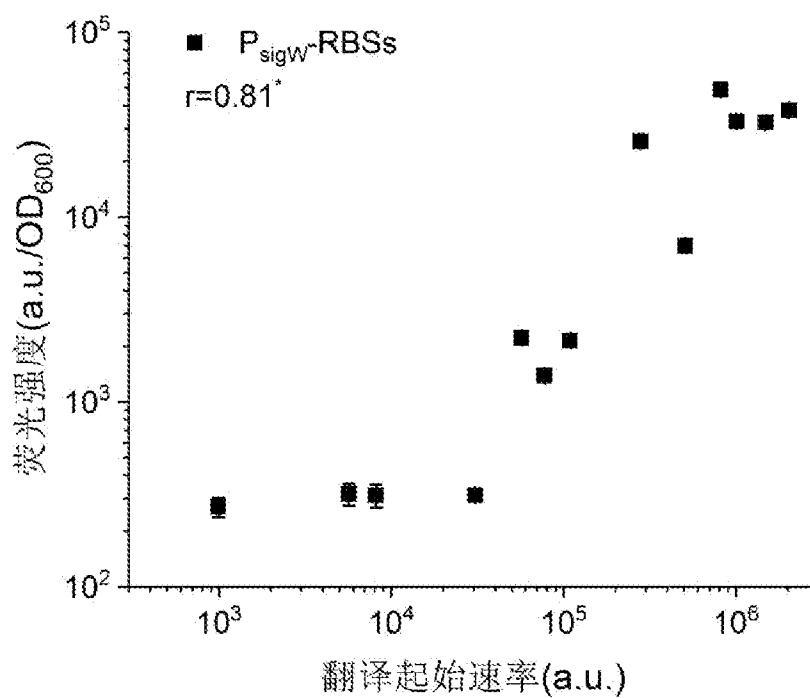
图 3



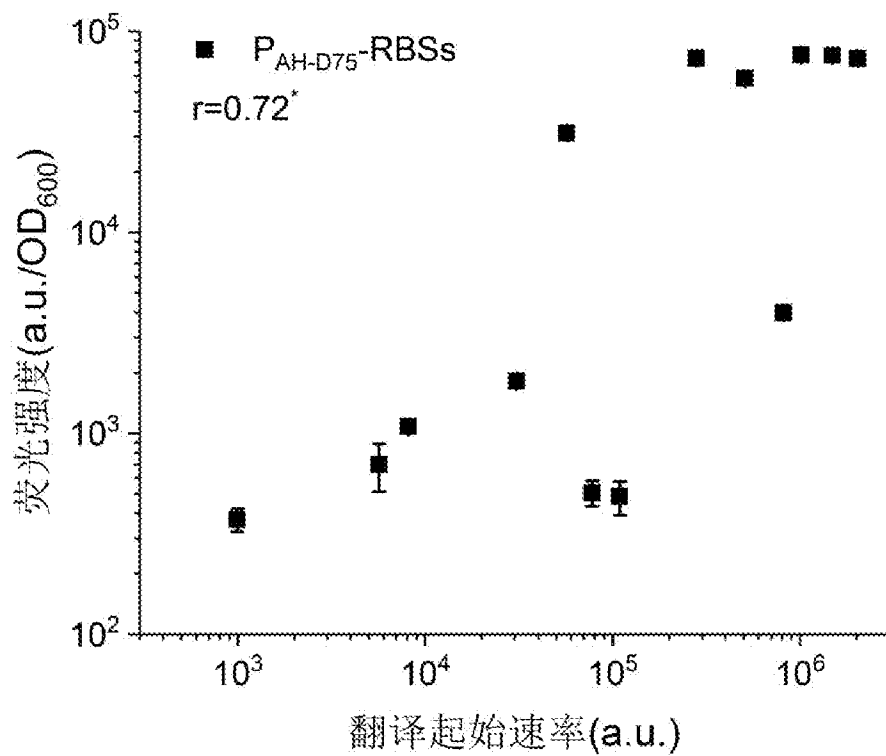
(a)



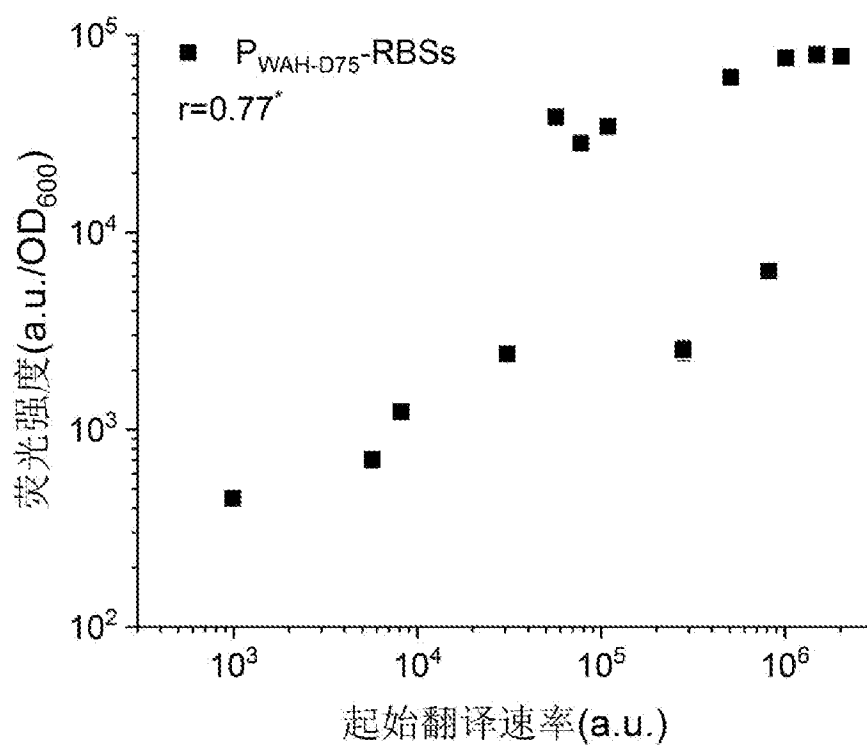
(b)



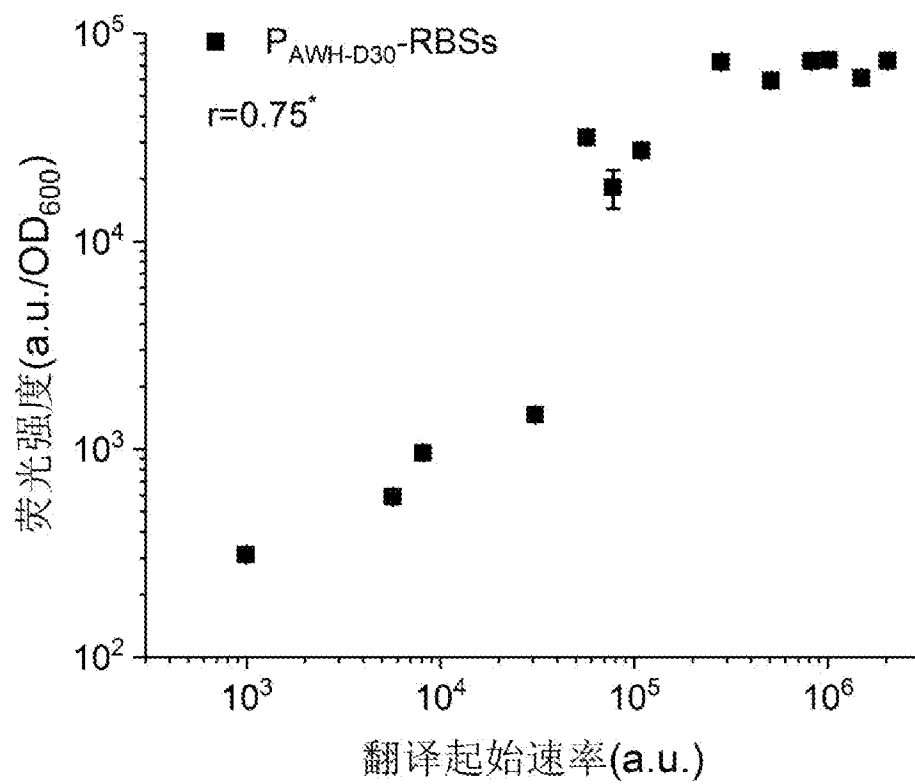
(c)



(d)



(e)



(f)

图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/078816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/75(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i; C12R 1/125(2006.01)n

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)

C12N; C12P; 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)

DWPI; CPRSABS; SIPOABS; CNABS; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; 万方数据库; WANFANG, WEB OF SCIENCE; PUBMED; 启动子, 串联, 枯草芽孢杆菌, 核糖体结合位点, promoter, tandem, Pspovg, Prpob, Psigw, rpoB, spoVG, sigW, rbs; GENBANK+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ IS NOs:1, 7, 11, 17-27, 29-59, 60-72的序列检索; GENBANK+EMBL+China Patents Biological Sequence Search System: sequence search on SEQ IS NOs:1, 7, 11, 17-27, 29-59, 60-72.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105779444 A (QINGDAO VLAND BIOTECH GROUP CO., LTD.) 20 July 2016 (2016-07-20) see entire document	1-14
A	US 5593860 A (BIO TECHNOLOGY GENERAL CORP) 14 January 1997 (1997-01-14) see entire document	1-14
A	葛春蕾等 (GE, Chunlei et al.). "通过串联启动子实现纳豆激酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达 (Efficient Overexpression of Recombinant Nattokinase in <i>Bacillus subtilis</i> by Tandem Promoters)" <i>现代食品科技 (Modern Food Science and Technology)</i> , Vol. 32, No. 11, 30 November 2016 (2016-11-30), ISSN: 1673-9078, pp. 72-77, see entire document	1-14
A	CN 105505931 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 20 April 2016 (2016-04-20) see entire document	1-14



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

10 September 2019

Date of mailing of the international search report

23 September 2019

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/CN2019/078816

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAGNO-PEREZ-BRYAN M.C. et al. "Comparative Genomics within the Bacillus Genus Reveal the Singularities of Two Robust Bacillus amyloliquefaciens Biocontrol Strains" <i>Mol Plant Microbe Interact</i> , Vol. 28, No. 10, 31 October 2015 (2015-10-31), ISSN: 0894-0282, pp. 1102-1116, see entire document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/078816

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/078816

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105779444	A	20 July 2016	CN	105779444	B	30 November 2018
US	5593860	A	14 January 1997	US	6010875	A	04 January 2000
CN	105505931	A	20 April 2016	CN	105505931	B	09 November 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/078816

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/75(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i; C12R 1/125(2006.01)n

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)

C12N; C12P; 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))

DWPI; CPRSABS; SIPOABS; CNABS; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; 万方数据库; WEB OF SCIENCE; PUBMED; 启动子, 串联, 枯草芽孢杆菌, 核糖体结合位点, promoter, tandem, Pspovg, Prpob, Psigw, rpoB, spoVG, sigW, rbs; GENBANK+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ IS N0s:1, 7, 11, 17-27, 29-59, 60-72的序列检索。

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	CN 105779444 A (青岛蔚蓝生物集团有限公司) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 参见全文	1-14
A	US 5593860 A (BIO TECHNOLOGY GENERAL CORP) 1997年 1月 14日 (1997 - 01 - 14) 参见全文	1-14
A	葛春蕾等. “通过串联启动子实现纳豆激酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达” 现代食品科技, 第32卷, 第11期, 2016年 11月 30日 (2016 - 11 - 30), ISSN: 1673-9078, 第72-77页, 参见全文	1-14
A	CN 105505931 A (江南大学) 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20) 参见全文	1-14

☒ 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 9月 10日

国际检索报告邮寄日期

2019年 9月 23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

李肖菓

电话号码 62411615

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	MAGNO-PEREZ-BRYAN M. C. 等. "Comparative Genomics within the Bacillus Genus Reveal the Singularities of Two Robust Bacillus amyloliquefaciens Biocontrol Strains" Mol Plant Microbe Interact, 第28卷, 第10期, 2015年 10月 31日 (2015 - 10 - 31), ISSN: 0894-0282, 第1102-1116页, 参见全文	1-14

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/078816

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	105779444	A	2016年 7月 20日	CN	105779444	B	2018年 11月 30日
US	5593860	A	1997年 1月 14日	US	6010875	A	2000年 1月 4日
CN	105505931	A	2016年 4月 20日	CN	105505931	B	2018年 11月 9日