



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103154263 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(21) 申请号 201180050357.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.08.18

C12Q 1/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

10173360.8 2010.08.19 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013.04.18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/064200 2011.08.18

(87) PCT申请的公布数据

W02012/022777 EN 2012.02.23

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 M. 比乔尔恩瓦德 P. E. 佩德森

M. 马尔滕

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 史悦

权利要求书2页 说明书21页

序列表6页 附图1页

(54) 发明名称

诱导的孢子形成筛选方法

(57) 摘要

本发明涉及一种筛选改善的酶变体的方法，所述方法包括下列步骤：(i) 提供能够形成孢子的重组宿主细胞，其包含与诱导型启动子可操作连接的编码孢子形成因子的多核苷酸和编码酶变体的多核苷酸；(ii) 在适合于诱导孢子形成的条件下培养所述宿主细胞；(iii) 在含有所述酶变体的底物的培养基中培养步骤 (ii) 中获得的孢子；并 (iv) 测定酶变体的活性。

1. 一种筛选改善的酶变体的方法,所述方法包括下列步骤:
 - (i) 提供能够形成孢子的重组宿主细胞,其包含与诱导型启动子可操作连接的编码孢子形成因子的多核苷酸和编码酶变体的多核苷酸;
 - (ii) 在适合于诱导孢子形成的条件下培养所述宿主细胞;
 - (iii) 在含有所述酶变体的底物的培养基中培养步骤 (ii) 中获得的孢子;并
 - (iv) 测定所述酶变体的活性。
2. 权利要求 1 的方法,其中在应激条件下完成所述孢子的培养,优选地,所述应激条件包括酸性 pH、高温、缺乏营养物、存在一种或多种毒素和 / 或存在一种或多种洗涤剂。
3. 权利要求 2 的方法,其中在至多 6.0, 优选至多 5.8、5.6、5.4、5.2、5.0、4.8、4.6、4.4、4.2、4.0、3.8、3.6、3.4、3.2 或最优选至多 3.0 的 pH 值实施所述培养。
4. 权利要求 2 的方法,其中在至少 70°C、75°C、80°C、85°C、或 90°C 的温度完成所述培养。
5. 权利要求 1-4 中任一项的方法,其中通过在孢子形成培养基,优选 Schaeffer 氏孢子形成培养基中培养所述宿主细胞来诱导孢子的形成。
6. 权利要求 1-5 中任一项的方法,其中通过琼脂覆盖测定法确定所述酶变体的活性。
7. 权利要求 1-6 中任一项的方法,其中所述酶是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、或连接酶。
8. 权利要求 1-7 中任一项的方法,其中所述酶是氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、转化酶、漆酶、另一种脂肪酶、甘露糖苷酶、变聚糖酶 (mutanase)、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述酶是淀粉酶或蛋白酶。
10. 权利要求 1-9 中任一项的方法,其中通过磷饥饿诱导所述诱导型启动子,优选所述诱导型启动子是 *pstS*。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述诱导型启动子是来自地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) DSM13 的 *pstS*。
12. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中所述孢子形成因子是参与孢子形成的 II-III 阶段的孢子形成因子;更优选所述孢子形成因子是 *SpoIIAC*、*SpoIIE*、*SpoIIGB*、或 *SpoIISB*;最优选所述孢子形成因子是 *SpoIIAC*。
13. 权利要求 1-12 中任一项的方法,其中所述重组宿主细胞选自下组:细菌、真菌、和植物细胞;更优选所述重组宿主细胞是细菌,甚至更优选其为革兰氏阳性细菌,更优选其为原核细胞,且最优选其为芽孢杆菌属细胞。
14. 权利要求 13 的方法,其中所述重组宿主细胞是选自下组的芽孢杆菌属细胞:嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、耐盐芽孢杆菌 (*Bacillus halodurans*)、灿烂芽孢杆菌 (*Bacillus lautus*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、嗜

热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)。

15. 一种核酸构建体,其包含与磷饥饿诱导型启动子可操作连接的编码孢子形成因子的多核苷酸和编码酶变体的多核苷酸。

16. 权利要求 15 的核酸构建体,其中所述酶是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、或连接酶。

17. 权利要求 16 的核酸构建体,其中所述酶是氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、转化酶、漆酶、另一种脂肪酶、甘露糖苷酶、变聚糖酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。

18. 权利要求 17 的核酸构建体,其中所述酶是淀粉酶或蛋白酶。

19. 权利要求 15-18 中任一项的核酸构建体,其中所述磷饥饿诱导型启动子是 *pstS*。

20. 权利要求 19 的核酸构建体,其中所述 *pstS* 来自地衣芽孢杆菌 DSM13。

21. 权利要求 15-20 中任一项的核酸构建体,其中所述孢子形成因子是参与孢子形成的 II-III 阶段的孢子形成因子;更优选其为 *SpoIIAC*、*SpoIIIE*、*SpoIIIGB*、或 *SpoIISB*;最优选 *SpoIIAC*。

22. 权利要求 15-21 中任一项的核酸构建体,其进一步包含编码抗生素抗性选择标志的多核苷酸。

23. 权利要求 22 的核酸构建体,其中所述选择标志提供针对氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素、新霉素或大观霉素的抗性。

24. 一种重组表达载体,其包含权利要求 15-23 中任一项的核酸构建体。

25. 一种重组细胞,其包含权利要求 15-23 中任一项的核酸构建体或权利要求 24 的重组表达载体。

26. 权利要求 25 的重组细胞,其为细菌、真菌或植物细胞,更优选其为细菌细胞,甚至更优选其为革兰氏阳性细胞,更优选其为原核细胞,且最优选其为芽孢杆菌属细胞。

27. 权利要求 26 的重组细胞,其为选自下组的芽孢杆菌属细胞:嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和苏芸金芽孢杆菌。

诱导的孢子形成筛选方法

[0001] 序列表

[0002] 本发明包含序列表。

发明领域

[0003] 本发明涉及一种用于筛选酶的方法,其使用例如通过磷饥饿可诱导孢子形成的重组细胞进行。本发明还涉及用于实施所述方法的工具,其包含重组细胞和多核苷酸构建体。

[0004] 发明背景

[0005] 能经受极端条件的酶对于在工业应用中使用是高度期望的。在许多蛋白质筛选项目中,实际的酶筛选条件不容许宿主菌株的生长。还有,在筛选期间将宿主细胞从一种培养基到另一种的多次转移可以导致污染和自动化困难。如此,有效容许在抑制生长的条件下选择改善的酶的正筛选系统是非常期望的。

[0006] 孢子是一种适合于在不利条件中分散并存活延长的时段的生殖结构。一旦条件是有利的,孢子可以形成新的生物体。孢子形成许多生物体,如细菌、植物、藻类和真菌生活史的一部分。形成孢子的细菌,尤其是芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 是一种不仅对于调查基因表达的独特调节,而且对于选择性表达多肽理想的系统。

[0007] 一般地,在孢子形成期间有六个阶段,即,0-VI 阶段。鉴定出数百种基因参与孢子形成,并且在每个阶段期间,存在着不同调节基因 (EP1391502)。例如, sigF, 又称作 spoIIAC, 是一种编码孢子形成的 II 阶段期间必需的孢子形成因子的基因。传统上,将孢子形成关联基因突变或缺失,使得孢子形成过程得到抑制或失活以实现多肽表达的改善 (EP1391502)。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了一种能够在极端条件,如高温、低营养物、存在毒素或洗涤剂等有有效筛选酶的筛选系统。

[0010] 我们描述了将与编码孢子形成因子的基因可操作连接的应激诱导型启动子导入宿主细胞中。可以方便地使用重组细胞来通过在含有酶底物的选择性培养基中选择透明区在极端条件下筛选酶。本发明在实验室筛选和工业应用 (如洗涤剂) 中都是可适用的。

[0011] 在第一方面,本发明涉及一种筛选改善的酶变体的方法,所述方法包括下列步骤:

[0012] (i) 提供能够形成孢子的重组宿主细胞,其包含与诱导型启动子可操作连接的编码孢子形成因子的多核苷酸和编码酶变体的多核苷酸;

[0013] (ii) 在适合于诱导孢子形成的条件下培养所述宿主细胞;

[0014] (iii) 在含有所述酶变体的底物的培养基中培养步骤 (ii) 中获得的孢子;并

[0015] (iv) 测定所述酶变体的活性。

[0016] 在第二方面,本发明涉及核酸构建体,其包含与诱导型启动子可操作连接的编码孢子形成因子的多核苷酸和编码酶变体的多核苷酸。

[0017] 在第三方面,本发明涉及包含第二方面的核酸构建体的重组表达载体。

[0018] 本发明的最后一方面涉及重组细胞,其包含第二方面的核酸构建体或第三方面的重组表达载体。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 显示了实施例 1 中获得的示意性 amyE::specR Ppst sigF PCR 片段。

[0021] 定义

[0022] 在讨论本发明的详细实施方案前,提供涉及本发明主要方面的特定术语的定义。

[0023] 依照本发明,可以采用本领域技术内的常规分子生物学、微生物学、和重组 DNA 技术。此类技术在文献中全面解释。参见例如 Sambrook, Fritsch&Maniatis, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 第二版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: DNA Cloning:A Practical Approach, 卷 I 和 II/D. N. Glover 编 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait 编 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames 和 S. J. Higgins 编 (1985)); Transcription And Translation (B. D. Hames 和 S. J. Higgins 编 (1984)); Animal Cell Culture (R. I. Freshney 编 (1986)); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)。

[0024] “多核苷酸”是从 5' 至 3' 端阅读的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基的单链或双链聚合物。多核苷酸包括 RNA 和 DNA, 并且可以自天然来源分离, 体外合成, 或者自天然的和合成的分子的组合制备。

[0025] “核酸”指单链形式, 或双链螺旋的核糖核苷 (腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷; “RNA 分子”) 或脱氧核糖核苷 (脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷、或脱氧胞苷; “DNA 分子”) 的磷酸酯聚合形式。双链 DNA-DNA、DNA-RNA 和 RNA-RNA 螺旋是有可能的。术语核酸分子, 且特别是 DNA 或 RNA 分子仅指分子的一级和二级结构, 而并不将其限于任何特定的三级或四级形式。如此, 此术语包括存在于线性或环形 DNA 分子 (例如, 限制性片段)、质粒、和染色体等中的双链 DNA。在讨论特定双链 DNA 分子的结构中, 本文中依照正常的惯例描述序列, 即仅沿着 DNA 的非转录链 (即, 与 mRNA 具有同源序列的链) 以 5' 至 3' 方向给出序列。

[0026] “基因”指编码肽、多肽或蛋白质的核酸序列。在一个具体的实施方案中, 术语“报告基因”指编码报告蛋白的核酸序列。

[0027] “核酸构建体”是自天然存在的基因分离或者已经修饰为含有以否则不会存在于自然界中的方式组合和并置的核酸段的核酸分子 (单链或双链)。在核酸构建体含有表达本发明的编码序列需要的所有控制序列时, 术语“核酸构建体”与术语“表达盒”是同义的。术语“编码序列”在本文中定义为直接规定其蛋白质产物的氨基酸序列的核酸序列。编码序列的边界一般以核糖体结合位点 (原核生物) 或以 mRNA 5' 端的刚好位于可读框上游的 ATG 起始密码子 (真核生物) 和 mRNA 3' 端的刚好位于可读框下游的转录终止子序列确定。编码序列可以包括但不限于 DNA、cDNA、和重组核酸序列。

[0028] “表达载体”是包含编码感兴趣多肽的区段可操作连接于提供其转录的其它区段的 DNA 分子 (线性或环形)。所述其它区段可以包括启动子和终止子序列, 以及任选地, 一种或多种复制起点、一种或多种选择标志、增强子、多腺苷酸化信号, 等等。一般地, 表达载体源自质粒或病毒 DNA, 或者可以含有这两者的元件。

[0029] 转录和翻译控制序列是在宿主细胞中提供编码序列表达的 DNA 调节序列, 如启动

子、增强子、终止子,等等。在真核细胞中,多腺苷酸化信号是控制序列。

[0030] 术语“启动子”在本文中用于其本领域公认的意义,意指在基因侧翼且含有提供 RNA 聚合酶结合及转录起始的 DNA 序列的序列,而且此外,它含有负责基因转录调节的 DNA 序列。启动子序列通常但不总是存在于基因的 5' 非编码区中。在本发明的一个具体的实施方案中,启动子是诱导型启动子,例如,应激诱导的启动子,且特别地,低磷酸盐诱导型启动子(又称作磷饥饿诱导型启动子,如 Ppst)。

[0031] 术语“诱导型启动子”在本文中用作其活性受到生物或非生物因子的存在或缺乏诱导的启动子。诱导型启动子是一种在遗传工程中非常有力的工具,这是因为与其可操作连接的基因的表达可以在生物体的某些发育阶段或在特定组织中开启或关闭。合适的诱导型启动子的例子包括但不限于低磷酸盐或磷饥饿诱导型启动子 pstS;四环素诱导型启动子(Geissendörfer M, Hillen W, 1990, Regulated expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis* using the Tn10 encoded tet regulatory elements. *Appl Microbiol Biotechnol* 33:657-663);木糖诱导型启动子,如 Pxy1A,其中 XylR 为阻抑物(Kim L, Mogk A, Schumann W, 1996, A xylose-inducible *Bacillus subtilis* interation vector and its application. *Gene* 181:71-76);或 IPTG 诱导型 Spac 启动子。

[0032] “可操作连接”在提及 DNA 段时指该区段排列为使得它们出于其意图目的一致发挥功能,例如,转录在启动子中起始,并且贯穿编码区段进行到终止子。

[0033] 在 RNA 聚合酶将编码序列转录成 mRNA,然后,该 mRNA 受到反式 -RNA 剪接并翻译成由编码序列编码的蛋白质时,编码序列在细胞中在转录和翻译控制序列的“控制下”。

[0034] “异源”DNA 指非天然位于细胞中,或细胞的染色体位点中的 DNA。优选地,异源 DNA 包含对于细胞而言外来的基因。

[0035] 在已经将此类 DNA 导入细胞内部时,细胞已经受到外源或异源 DNA “转染”。在转染的 DNA 实现表型变化时,细胞已经受到外源或异源 DNA “转化”。

[0036] “同源重组”指在染色体中插入载体的外来 DNA 序列。优选地,载体靶向特定染色体位点以实现同源重组。对于特异性同源重组,载体会含有足够长的、与染色体序列的同源性区以容许互补结合和载体对染色体中的掺入。同源性区越长,且序列相似性程度越大,可以增加同源重组的效率。

[0037] “聚合酶链式反应(PCR)”是一种用于在几个数量级间扩增单一或几个拷贝的一段 DNA,生成数千至数百万拷贝的特定 DNA 序列的技术。该方法依赖于热循环,其由 DNA 熔解和 DNA 酶促复制反应的重复加热和冷却的循环组成。随着 PCR 进行,生成的 DNA 自身用作复制模板,发动链式反应,其中 DNA 模板得到指数扩增。PCR 可以广泛修改以实施一大批遗传操作。

[0038] “引物”是充当 DNA 复制起始点的核酸链。含有与靶区互补序列的引物以及 DNA 聚合酶是实现选择性和重复性扩增的关键组分。在本发明中,通过 PCR 扩增构建核酸构建体,并且经由重叠 DNA 引物连接在一起。

[0039] 在一个优选的实施方案中,第二个方面的核酸构建体还包含编码抗生素抗性选择标志的多核苷酸。

[0040] “抗生素”是由真菌或细菌生成的抑制其它微生物生长的物质。抗生素的例子包括氨基青霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素、新霉素和大观霉素。

[0041] 术语“低磷酸盐”意指培养基中的磷酸盐水平显著低于生长需要的正常水平。“低磷酸盐”水平取决于各个生物体。在本发明的一个具体的实施方案中,所述水平低于正常水平的一半,例如,在工作例中,在超过 2 倍稀释的,优选地,超过 5 倍稀释的 Schaeffer 氏琼脂板上培养细胞。

[0042] 发明详述

[0043] 在其第一个方面,本发明涉及一种筛选改善的酶变体的方法,所述方法包括下列步骤:

[0044] (i) 提供能够形成孢子的重组宿主细胞,其包含与诱导型启动子可操作连接的编码孢子形成因子的多核苷酸和编码酶变体的多核苷酸;

[0045] (ii) 在适合于诱导孢子形成的条件下培养所述宿主细胞;

[0046] (iii) 在含有所述酶变体的底物的培养基中培养步骤 (ii) 中获得的孢子;并

[0047] (iv) 测定所述酶变体的活性。

[0048] 在一个具体的实施方案中,通过将来自步骤 (ii) 的孢子分开转移到步骤 (iii) 中的培养基来选择步骤 (iii) 中获得的酶。在一个优选的具体实施方案中,通过琼脂覆盖测定法 (agar overlay assay) 测定酶活性,更具体地,用步骤 (iii) 的培养基覆盖步骤 (ii) 中的孢子,如下文详细描述。

[0049] 在一个优选的方面,所述酶是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、或连接酶。在一个更优选的方面,所述酶是氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、转化酶、漆酶、另一种脂肪酶、甘露糖苷酶、变聚糖酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。在一个甚至更优选的方面,所述酶是淀粉酶。在另一个甚至更优选的方面,所述酶是蛋白酶。

[0050] 细胞的培养

[0051] 在本发明中,使用本领域中公知的方法在适合于孢子形成的营养培养基中培养细胞。例如,可以通过摇瓶培养培养细胞,并在合适培养基中且在容许细胞形成孢子的条件下实施实验室或工业发酵罐中的小规模或大规模发酵(包括连续、分批、补料-分批、或固态发酵)。合适的培养基可购自商业供应商或者可以依照发表的组成制备(例如,在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) 的产品目录中)。步骤 (ii) 中的第一种培养基可以是诱导孢子形成的任何培养基,具体地,培养基可以是用于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的单一化学规定孢子形成培养基 (J. H. Hageman 等, 1984)、用于枯草芽孢杆菌的化学规定孢子形成培养基 (Leitch 和 Collier, 1996)、或 Schaeffer 氏孢子形成培养基 (SSM)。在本发明的一个优选的实施方案中,培养基是 SSM。SSM 是一种对枯草芽孢杆菌及相关物种通常使用的通用孢子形成培养基。

[0052] 在本发明的一个优选的实施方案中,诱导型启动子是低磷酸盐或磷饥饿诱导型启动子 *pstS*。为了通过培养基中的低磷酸盐诱导孢子形成,将培养基至少 2 倍稀释,优选地,至少 5 倍稀释。

[0053] 在又一个优选的实施方案中,诱导型启动子是四环素诱导型启动子 (Geissendörfer M, Hillen W, 1990, Regulated expression of heterologous genes in

Bacillus subtilis using the Tn10 encoded tet regulatory elements. Appl Microbiol Biotechnol 33:657-663); 木糖诱导型 Pxy1A 启动子, 其中 XylR 为阻抑物 (Kim L, Mogk A, Schumann W, 1996, A xylose-inducible Bacillus subtilis interation vector and its application. Gene 181:71-76) 或异丙基- β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷 (IPTG) 诱导型 Spac 启动子。

[0054] 可以在应激条件, 如高温、酸性 pH、缺乏营养物、存在一种或多种毒素和 / 或存在一种或多种洗涤剂下实施筛选方法中的酶筛选或宿主细胞孢子培养。

[0055] 在一个优选的方面, 可以在至少 70°C、75°C、80°C、85°C、90°C 的温度下, 和 / 或于至多 6.0、5.8、5.6、5.4、5.2、5.0、4.8、4.6、4.4、4.2、4.0、3.8、3.6、3.4、3.2 或 3.0 的 pH 值进行培养或筛选。另外, 可以在存在一种或多种洗涤剂下实施培养或筛选。

[0056] 可以通过本领域中已知的多种方法纯化本发明的酶, 所述方法包括但不限于层析 (例如, 离子交换、亲和、疏水性、色谱聚焦、和大小排阻)、电泳方法 (例如, 制备用等电聚焦)、差别溶解度 (例如, 硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE、或提取 (参见例如 Protein Purification, J.-C. Janson 和 Lars Ryden 编, VCH Publishers, New York, 1989)。

[0057] 琼脂覆盖测定法

[0058] 在本发明中, 首先在具有固体生长培养基的平板上培养细胞。在生长期, 细胞生成应当测试的酶, 而且还有一些细胞形成孢子。然后, 制备顶层培养基, 其含有凝固剂和可以用于检测琼脂层中酶活性的酶底物。顶部琼脂还可以含有控制 pH 的缓冲系统、抑制剂、调节离子强度的盐、抑制污染的抗生素。

[0059] 为了凝固, 在本发明中使用琼脂, 其在高于 85°C 时溶解, 而在 32-40°C 左右凝固。对其高压灭菌, 保持于 60°C, 并与顶层的其它 60°C 温成分混合。然后, 将限量倒入具有固体生长培养基和培养细胞的平板上。然后, 可以将这些平板在期望的条件温育, 其中可以通过降解酶物质通过形成晕环 (hallow)、颜色或荧光转变、释放的荧光团或生色团或其它可检测变化看到酶反应。在酶促活性容许选择改善的变体时, 可以从酶促透明区下挑出菌落。由于孢子形成, 细胞幸免于筛选条件。可以将这些孢子添加至容许特定变体萌发和生长的新生长培养基。

[0060] 可以使用其它类型的聚合物或胶状物质来凝固。这可以是于较高温度溶解并且于希望的温育条件为固体的物质, 例如琼脂糖、其它凝固碳水化合物、凝固蛋白如明胶、凝固脂肪、凝固无机物如硅酸盐和硅胶。也可以通过聚合化学品, 例如聚丙烯酰胺获得凝固。

[0061] 本发明涉及核酸构建体, 其包含与诱导型启动子可操作连接的编码孢子形成因子的多核苷酸。

[0062] 诱导型启动子

[0063] 在本发明的上下文中, 应激诱导型启动子、诱导型启动子和诱导型启动子基因作为同义词使用。

[0064] 在本发明的优选实施方案中, 诱导型启动子是低磷酸盐或磷酸盐饥饿诱导型启动子。磷是许多生物体 (如植物、细菌) 的生长和代谢过程的一种重要元素。中国专利 ZL200610075838.2 报告了一种在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中的磷酸盐饥饿诱导的启动子。还有关注芽孢杆菌属中磷酸盐饥饿调节的研究 (例如 Le Thi Hoi 等, The phosphate-starvation response of Bacillus licheniformis. Proteomics, 2006, 卷

(6), 第 3582-3601 页; Ying Qi 等, The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon. *Journal of Bacteriology*. 1997 年 4 月, 第 2534-2539 页)。特别地, Le Thi Hoi 等 (2006, 见上文) 在转录和翻译水平上探索地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的磷酸盐饥饿刺激子。

[0065] 地衣芽孢杆菌已经在工业发酵工艺中使用多年。地衣芽孢杆菌 DSM13 的基因组序列发表于“The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential” (Veith B., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 7(4), 第 204-211 页)。通过 Le Thi Hoi 等的研究, 发现 *pstS* 基因在磷酸盐饥饿过程中得到最强烈诱导, 甚至超过 80 倍。此外, 鉴定出 *pstS* 基因序列 (Veith B., 2004, 见上文)。因此, 在本发明的一个优选的实施方案中, 本文中使用的低磷酸盐诱导型启动子是来自地衣芽孢杆菌 DSM13 的 *pstS*。

[0066] 多核苷酸 (核酸) 序列

[0067] 在本发明的方法中, 感兴趣的多核苷酸序列可以以本领域中已知的多种方式获得。非限制性例子是: 分离野生型基因、生成蛋白质工程化变体、定点诱变、文库筛选。

[0068] 如本文中所使用的, 术语“核酸序列”意图指 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA 或 RNA 起源的任何核酸分子。术语“序列”意图指可以是单链或双链, 且可以基于完整或部分的编码多肽的核苷酸序列的核酸区段。

[0069] 适当地, 感兴趣的核酸序列可以是基因组或 cDNA 起源的, 例如依照标准技术 (参考 Sambrook 等, 1989) 通过制备基因组或 cDNA 文库, 并使用合成的寡核苷酸探针通过杂交筛选编码整个或部分多肽的 DNA 序列来获得。

[0070] 核酸序列也可以通过建立的标准方法, 例如由 Beaucage 和 Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859 - 1869 描述的亚磷酰胺方法, 或由 Matthes 等, *EMBO Journal* 3 (1984), 801 - 805 描述的方法合成制备。依照亚磷酰胺方法, 将寡核苷酸例如在自动 DNA 合成仪中合成, 纯化, 退火, 连接, 并在合适的载体中克隆。

[0071] 此外, 核酸序列可以是非普遍类型 (non cult type)、混合的合成和基因组、混合的合成和 cDNA 或混合的基因组和 cDNA 起源的, 其依照标准的技术通过连接合成、基因组或 cDNA 起源 (在适当时) 的片段, 即与整个核酸构建体的各部分对应的片段制备。

[0072] 核酸序列也可以使用特异性引物通过聚合酶链式反应制备, 例如如记载于 US4, 683, 202 或 Saiki 等, *Science* 239 (1988), 487 - 491 的。

[0073] 用于分离或克隆编码多肽的核酸序列的技术是本领域中已知的, 并且包括自基因组 DNA 分离、自 cDNA 制备、或其组合。可以例如通过使用公知的聚合酶链式反应 (PCR) 或表达文库的抗体筛选以检测具有共享的结构特征的克隆 DNA 片段来实现自此类基因组 DNA 克隆本发明的核酸序列。参见例如 Innis 等, 1990, *A Guide to Methods and Application*, Academic Press, New York。可以使用其它核酸扩增方法如连接酶链式反应 (LCR)、连接的活化转录 (LAT) 和基于核酸序列的扩增 (NASBA)。核酸序列可以自生成多肽的菌株或者自另一相关生物体克隆, 并且如此例如可以是核酸序列的多肽编码区的等位或物种变体。

[0074] 克隆方法可以牵涉切割并分离包含编码多肽的核酸序列的期望的核酸片段, 将该

片段插入载体分子中,并将重组载体掺入宿主细胞中,其中核酸序列的多个拷贝或克隆会得到复制。核酸序列可以是基因组、cDNA、RNA、半合成、合成起源、或其任何组合的。

[0075] 编码孢子形成因子的多核苷酸

[0076] 一般地,孢子形成期间存在着六个阶段,即 0-VI 阶段。鉴定出数百种基因参与孢子形成,并且在每个阶段期间,存在着不同调节基因 (EP1391502)。例如, sigF, 又称作 spoIIAC, 是一种编码孢子形成的 II 阶段期间必需的孢子形成因子的基因。

[0077] 在一个实施方案中,孢子形成因子是参与孢子形成的 II-III 阶段的孢子形成因子;更优选地, SpoIIAC、SpoIIE、SpoIIGB、和 SpoIISB;最优选地, SpoIIAC。

[0078] 核酸序列文库

[0079] 可以通过使用已知的方法来实现核酸序列文库的制备。

[0080] 用于自细胞核苷酸来源提取基因和制备基因文库的方法记载于例如 Pitcher 等, “Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate”, Lett. Appl. Microbiol., 8, 第 151-156 页, 1989, Dretzen, G. 等, “A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels”, Anal. Biochem., 112, 第 295-298 页, 1981, W094/19454 及 Diderichsen 等, “Cloning of aldB, which encodes α -acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*”, J. Bacteriol., 172, 第 4315-4321 页, 1990。

[0081] 用于自体外生成的合成核苷酸来源制备基因文库的方法可参见文献 (例如由 Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 第 10747-10751 页, 1994 或 W095/17413 描述)。

[0082] 文库也可以作为自主复制质粒文库筛选。

[0083] 操作文库的核酸序列

[0084] 在一个具体的实施方案中,可以通过遗传工程在启动筛选之前、期间或之后对基因文库的基因进行改变和或突变。可以以多种方式完成编码酶变体的基因文库的生成:

[0085] (1) 易错 PCR 采用低保真性复制步骤在每轮复制引入随机点突变 (Caldwell 和 Joyce (1992), PCR Methods and Applications 第 2 卷 (1), 第 28-33 卷)。使用编码野生型 (即 wt) 感兴趣基因的质粒作为模板以在 PCR 条件下用侧翼引物扩增此基因来实施易错 PCR 诱变,其中增加的错误率导致随机点突变的引入。利用的 PCR 条件通常是:每 100 μ L 反应为 10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 4mM MgCl₂, 0.3mM MnCl₂, 0.1mM dGTP/dATP, 0.5mM dTTP/dCTP, 和 2.5u Taq 聚合酶。使用标准分子生物学技术将所得的 PCR 片段在凝胶上纯化并克隆。

[0086] (2) 单个密码子位置中寡核苷酸指导的诱变 (包括缺失或插入) (例如通过 SOE-PCR 进行) 由 Kirchoff 和 Desrosiers, PCR Methods and Applications, 1993, 2, 301-304 描述。如下实施此方法:用 2 种内部重叠引物 (其中一条或这两条含有突变体序列) 和 2 种外部引物 (其可以编码限制性位点) 实施两个独立的 PCR 反应,由此创建 2 种重叠的 PCR 片段。将这些 PCR 片段纯化,稀释,并以摩尔比 1:1 混合。随后,通过用外部引物 PCR 扩增获得全长 PCR 产物。使用标准分子生物学技术将所得的 PCR 片段在凝胶上纯化并克隆。

[0087] (3) 可以例如通过如上文所描述的 SOE-PCR,但是使用具有随机化核苷酸的引物来完成单个密码子位置中寡核苷酸指导的随机化,如饱和诱变。例如 NN(G/T) (其中 N 是 4

种碱基 G、A、T 或 C 之任一种) 会产生编码所有可能的氨基酸的密码子的混合物。

[0088] (4) 可以采用组合定点诱变文库, 其中可以同时使用上述 (2) 和 (3) 突变几个密码子。对于多个位点, 在 SOE-PCR 设置中同时装配几个重叠的 PCR 片段。

[0089] (5) 另一种方案采用合成基因文库制备。可以自多个重叠的寡核苷酸 (长度通常为 40-100 个核苷酸) 装配野生型 (即 wt) 基因; (Stemmer 等, (1995), Gene164, 49-53)。通过在基因中的多个位置处纳入相同寡聚物的 wt 和突变体变体的混合物, 所得的装配基因会以与 wt 与突变体引物比率对应的诱变率在多个位置处含有突变。

[0090] (6) 还有另一种方法采用多种诱变引物来生成具有多个突变位置的文库。首先, 生成编码感兴趣多肽的含有尿嘧啶的核苷酸模板, 并合成与核苷酸模板中的至少一个同一性区对应的 2-50 种诱变引物, 使得每种诱变引物包含模板序列的至少一处取代 (或碱基插入/缺失), 导致由含有尿嘧啶的核苷酸模板编码的氨基酸序列的至少一处氨基酸取代 (或插入/缺失)。然后, 使诱变引物在诱变引物与模板序列退火的条件下与含有尿嘧啶的核苷酸模板接触。这继之以通过聚合酶催化的引物延伸以生成诱变的多核苷酸和含有尿嘧啶的模板的混合物。最后, 用多核苷酸和模板混合物转化宿主细胞, 其中模板得到降解, 并且诱变的多核苷酸复制, 生成感兴趣基因的多核苷酸变体的文库。

[0091] (7) 可以通过改组来创建文库, 例如通过 DNA 改组通过重组两种以上 wt 基因或编码通过方法 (1)-(6) (上述) 的任何组合创建的变体蛋白质的基因来进行。

[0092] 在本发明中, 可以将核酸序列以核酸构建体形式导入宿主细胞中。

[0093] 表达载体

[0094] 本发明还涉及包含本发明的核酸构建体的重组表达载体。可以将上文所描述的各种核苷酸和控制序列连接在一起以生成重组表达载体, 其可以包含一个以上方便的限制性位点, 以容许所述位点处编码多肽的核苷酸序列的插入或取代。或者, 可以通过将核苷酸序列或包含该序列的核酸构建体插入适合于表达的载体中来表达本发明的核苷酸序列。在创建表达载体中, 编码序列位于载体中, 使得编码序列与适合于表达的控制序列可操作连接。

[0095] 重组表达载体可以是任何载体 (例如, 质粒或病毒), 其可以方便地进行重组 DNA 方法, 而且可以引起核苷酸序列的表达。载体的选择通常会取决于载体与要接受载体导入的宿主细胞的相容性。载体可以是线性或闭合环形质粒。

[0096] 载体可以是自主复制型载体, 即一种以染色体外实体存在的载体, 其复制不依赖于染色体复制, 例如质粒, 染色体外元件、微型染色体、或人工染色体。

[0097] 载体可以含有用于保证自身复制的任何手段。或者, 载体可以是在导入宿主细胞中时整合入基因组中, 并且与已经接受其整合的染色体一起复制的载体。此外, 可以使用单一载体或质粒或共同含有要引入宿主细胞基因组中的总 DNA 的两个以上载体或质粒, 或转座子。

[0098] 优选地, 本发明的载体含有一种以上选择标志, 其容许容易地选择经转化的细胞。选择标志是一种如下的基因, 其产物提供杀生物剂或病毒抗性、对重金属的抗性、原养型至营养缺陷型, 等等。

[0099] 细菌选择标志的例子是来自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 或地衣芽孢杆菌的 *dal* 基因, 或赋予抗生素抗性如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性的标志物。

[0100] 优选地, 本发明的载体含有容许载体稳定整合入宿主细胞基因组中或载体在细胞

中不依赖于基因组的自主复制的元件。

[0101] 对于整合入宿主细胞基因组中,载体可以依赖于编码多肽的核苷酸序列或载体中通过同源或非同源重组将载体稳定整合入基因组中的任何其它元件。或者,载体可以含有用于指导通过同源重组整合入宿主细胞基因组中的其它核苷酸序列。其它核苷酸序列使载体能够在染色体中的精确位置处整合入宿主细胞基因组中。为了增加在精确位置处整合的可能性,优选地,整合元件应当含有足够数目的核苷酸,如 100 至 1,500 个碱基对,优选地 400 至 1,500 个碱基对,且最优选地 800 至 1,500 个碱基对,其与相应的靶序列是高度同源的,以增强同源重组的可能性。整合元件可以是与宿主细胞基因组中的靶序列同源的任何序列。此外,整合元件可以是非编码或编码核苷酸序列。另一方面,可以通过非同源重组将载体整合入宿主细胞基因组中。

[0102] 为了自主复制,载体可以进一步包含复制起点,其使载体能够在所讨论的宿主细胞中自主复制。细菌复制起点的例子是质粒 pBR322、pUC19、pACYC177、和 pACYC184(容许在大肠杆菌中复制),和 pUB110、pE194、pTA1060、和 pAM β 1(容许在芽孢杆菌属中复制)的复制起点。用于酵母宿主细胞的复制起点的例子是 2 微米复制起点、ARS1、ARS4、ARS1 和 CEN3 的组合、以及 ARS4 和 CEN6 的组合。复制起点可以是具有使其在宿主细胞中温度敏感性发挥功能的突变的复制起点(见例如 Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA75:1433)。

[0103] 可以将超过一个拷贝的本发明核苷酸序列插入宿主细胞中以提高基因产物的生成。可以如下获得核苷酸序列的拷贝数目增加,即将至少一个额外拷贝的序列整合入宿主细胞基因组中或者与核苷酸序列一起纳入可扩增选择标志基因,其中可以通过在存在合适的选择剂的情况下培养细胞来选择含有选择标志基因的扩增拷贝,及由此额外拷贝的核苷酸序列的细胞。

[0104] 用于连接上文所描述的元件以构建本发明的重组表达载体的方法是本领域技术人员公知的(见例如 Sambrook 等, 1989, 见上文)。

[0105] 宿主细胞

[0106] 本发明进一步涉及包含核酸构建体或重组表达载体的重组宿主细胞。

[0107] 在一个优选的实施方案中,重组宿主细胞选自下组:细菌、真菌、和植物细胞;更优选重组宿主细胞是细菌,甚至更优选其为革兰氏阳性细菌,更优选其为原核细胞,且最优选其为芽孢杆菌属细胞。

[0108] 能够形成孢子的细胞在本发明中都是可适用的。有用的细胞是细菌细胞,优选芽孢杆菌属细胞。优选地,芽孢杆菌属菌种选自下组:嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、耐盐芽孢杆菌 (*Bacillus halodurans*)、灿烂芽孢杆菌 (*Bacillus lautus*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌和苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)。更优选地,芽孢杆菌属菌种是克劳氏芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、或枯草芽孢杆菌。最优选地,芽孢杆菌属菌种是枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌。

[0109] 这些物种的菌株在许多培养物保藏中心,如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSM)、Centraalbureau Voor Schimmelcultures(CBS)、和农业研究服务专利培养物保藏中心(Agricultural Research Service Patent Culture Collection), 北方地区研究中心(Northern Regional Research Center, NRRL) 中对于公众容易得到。

[0110] 转化

[0111] 可以例如通过原生质体转化(见例如 Chang 和 Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168:111-115)、使用感受态细胞(见例如 Young 和 Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81:823-829, 或 Dubnau 和 Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56:209-221)、电穿孔(见例如 Shigekawa 和 Dower, 1988, Biotechniques 6:742-751)、或接合(见例如 Koehler 和 Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169:5771-5278) 实现载体对细菌宿主细胞的导入。

[0112] 酶

[0113] 在本发明的一个优选的实施方案中,重组宿主细胞进一步含有编码酶的基因。可以从任何原核、真核、或其它来源获得基因。酶对于宿主细胞而言可以是同源或异源的。

[0114] 在一个更优选的方面,酶是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、或连接酶。在一个甚至更优选的方面,酶是氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、转化酶、漆酶、另一种脂肪酶、甘露糖苷酶、变聚糖酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。

[0115] 更具体地,酶可以是下列各项。

[0116] 亲本蛋白酶

[0117] 亲本蛋白酶(即依照国际生物化学与分子生物学联盟(International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB)) 推荐(1992) 在酶分类号 E. C. 3. 4 下分类的酶) 包括此组内的蛋白酶。

[0118] 例子包括选自在下列酶分类(E. C.) 号下分类的那些酶的蛋白酶:

[0119] 3. 4. 11(即所谓的氨肽酶), 包括 3. 4. 11. 5(脯氨酰氨肽酶)、3. 4. 11. 9(X-pro 氨肽酶)、3. 4. 11. 10(细菌亮氨酰氨肽酶)、3. 4. 11. 12(嗜热性氨肽酶)、3. 4. 11. 15(赖氨酰氨肽酶)、3. 4. 11. 17(色氨酰基氨肽酶)、3. 4. 11. 18(甲硫氨酰基氨肽酶)。

[0120] 3. 4. 21(即所谓的丝氨酸内肽酶), 包括 3. 4. 21. 1(胰凝乳蛋白酶)、3. 4. 21. 4(胰蛋白酶)、3. 4. 21. 25(黄瓜素(Cucumisin))、3. 4. 21. 32(Brachyurin)、3. 4. 21. 48(Cerevisin) 和 3. 4. 21. 62(枯草蛋白酶); 3. 4. 22(即所谓的半胱氨酸内肽酶), 包括 3. 4. 22. 2(木瓜蛋白酶), 3. 4. 22. 3(无花果蛋白酶)。

[0121] 3. 4. 22. 6(木瓜凝乳蛋白酶)、3. 4. 22. 7(萝藦蛋白酶)、3. 4. 22. 14(猕猴桃蛋白酶(Actinidain))、3. 4. 22. 30(番木瓜蛋白酶(Caricain)) 和 3. 4. 22. 31(凤梨蛋白酶(Ananain));

[0122] 3. 4. 23(即所谓的天冬氨酸内肽酶), 包括 3. 4. 23. 1(胃蛋白酶 A)、3. 4. 23. 18(曲霉胃蛋白酶(Aspergillopepsin) I)、3. 4. 23. 20(青霉胃蛋白酶) 和 3. 4. 23. 25(糖胃蛋白

酶 (Saccharopepsin) ;和

[0123] 3.4.24(即所谓的金属内肽酶),包括3.4.24.28(芽孢杆菌溶素(Bacillolysin))。

[0124] 相关枯草杆菌蛋白酶的例子包括枯草杆菌蛋白酶 BPN'、淀粉糖化枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin amylosacchariticus)、枯草杆菌蛋白酶 168、枯草杆菌蛋白酶肠系膜肽酶 (mesentericopeptidase)、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶 DY、枯草杆菌蛋白酶 309、枯草杆菌蛋白酶 147、热酶 (thermitase)、aqualysin、芽孢杆菌属 PB92 蛋白酶、蛋白酶 K、蛋白酶 TW7、和蛋白酶 TW3。

[0125] 此类容易地可得到的商业蛋白酶的具体例子包括 **Esperase®**、**Alcalase®**、**Neutrase®**、**Dyrazym®**、**Savinase®**、**Pyrase®**、胰的胰蛋白酶 NOVO(PTN)、**Bio-Feed® Pro**、**Clear-Lens Pro®** (所有酶可获自 Novozymes A/S)。

[0126] 其它商业蛋白酶的例子包括由 Gist-Brocades N.V. 销售的 **Maxtase®**、**Maxacal®**、**Maxapem®**、由 Solvay et Cie. 销售的 **Opticlean®** 和由 Genencor International 销售的 **Purafect®**。

[0127] 应当理解,也涵盖蛋白酶变体作为亲本蛋白酶。此类蛋白酶变体的例子披露于 EP130.756 (Genentech), EP214.435 (Henkel), W087/04461 (Amgen), W087/05050 (Genex), EP251.446 (Genencor), EP260.105 (Genencor), Thomas 等, (1985), Nature. 318, 第 375-376 页, Thomas 等, (1987), J. Mol. Biol., 193, 第 803-813 页, Russel 等, (1987), Nature, 328, 第 496-500 页, W088/08028 (Genex), W088/08033 (Amgen), W089/06279 (Novo Nordisk A/S), W091/00345 (Novo Nordisk A/S), EP525610 (Solvay) 及 W094/02618 (Gist-Brocades N.V.)。

[0128] 亲本脂肪酶

[0129] 亲本脂肪酶(即依照国际生物化学与分子生物学联盟(IUBMB)推荐(1992)在酶分类号 E.C.3.1.1(羧酸酯水解酶)下分类的酶)包括此组内的脂肪酶。

[0130] 例子包括选自那些在下列酶分类(E.C.)号下分类的酶的脂肪酶:

[0131] 3.1.1(即所谓的羧酸脂水解酶),包括(3.1.1.3)三酰甘油脂肪酶、(3.1.1.4)磷脂酶 A2。

[0132] 脂肪酶的例子包括源自下列微生物的脂肪酶:

[0133] 腐质霉属(Humicola),例如 H. Brevispora、柔毛腐质霉(H. lanuginosa)、H. brevis var. Thermoidea 和特异腐质霉(H. insolens)(US4,810,414)。假单胞菌属(Pseudomonas),例如莓实假单胞菌(Ps. Fragi)、施氏假单胞菌(Ps. stutzeri)、洋葱假单胞菌(Ps. cepacia)和荧光假单胞菌(Ps. fluorescens)(W089/04361)、或植物假单胞菌(Ps. plantarii)或唐菖蒲假单胞菌(Ps. gladioli)(美国专利 No. 4,950,417(Solvay 酶))或产碱假单胞菌(Ps. alcaligenes)和类产碱假单胞菌(Ps. Pseudoalcaligenes)(EP218272)或门多萨假单胞菌(Ps. mendocina)(W088/09367;US5,389,536)。镰孢菌属(Fusarium),例如尖孢镰孢菌(F. oxysporum)(EP130,064)或豌豆腐皮镰孢(F. solani pisi)(W090/09446)。毛霉属(Mucor)(又称作根毛霉属(Rhizomucor)),例如米赫毛霉(M. miehei)(EP238023)。色素杆菌属(Chromobacterium)(尤其是粘稠色素杆

菌 (*C. viscosum*)。曲霉属 (*Aspergillus*) (尤其是黑曲霉 (*A. niger*))。假丝酵母属 (*Candida*), 例如柱状丝酵母属 (*C. cylindracea*) (又称作皱褶假丝酵母 (*C. rugosa*)) 或南极假丝酵母 (*C. antarctica*) (W088/02775) 或南极假丝酵母 (*C. antarctica*) 脂肪酶 A 或 B (W094/01541 和 W089/02916)。地霉属 (*Geotricum*), 例如念球地霉 (*G. candidum*) (Schimada 等, (1989), *J. Biochem.*, 106, 383-388)。青霉菌属 (*Penicillium*), 例如卡门柏青霉 (*P. camembertii*) (Yamaguchi 等, (1991), *Gene*103, 61-67)。根霉属 (*Rhizopus*), 例如德氏根霉 (*R. delemar*) (Hass 等, (1991), *Gene*109, 107-113) 或雪白根霉 (*R. niveus*) (Kugimiya 等, (1992) *Biosci. Biotech. Biochem*56, 716-719) 或稻根霉 (*R. oryzae*)。芽孢杆菌属, 例如枯草芽孢杆菌 (Dartois 等, (1993) *Biochemica et Biophysica acta*1131, 253-260) 或嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*) (JP64/7744992) 或短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) (W091/16422)。

[0134] 容易地可获得的商业脂肪酶的具体例子包括 **Lipolase®**, **Lipolase® Ultra**, **Lipozyme®**, **Palatase®**, **Novozym® 435**, **Lecitase®** (均可获自 Novozymes A/S)。其它脂肪酶的例子是 **Lumafast®**, 即来自 Genencor Int. Inc. 的门多萨假单胞菌脂肪酶; **Lipomax®**, 即来自 Gist Brocades/Genencor Int. Inc. 的类产碱假单胞菌 (*Ps. pseudoalcaligenes*) 脂肪酶; 来自 Unilever 的腐皮镰孢 (*Fusarium solani*) 脂肪酶 (角质酶); 来自 Solvay 酶的芽孢杆菌属菌种脂肪酶。其它脂肪酶可获自其它公司。

[0135] 应当理解, 还涵盖脂肪酶变体作为亲本酶。此类的例子记载于例如 W093/01285 和 W095/22615。

[0136] 亲本氧化还原酶

[0137] 亲本氧化还原酶 (即依照国际生物化学与分子生物学联盟 (IUBMB) 推荐 (1992) 在酶分类号 E. C. 1 (氧化还原酶) 下分类的酶) 包括此组内的氧化还原酶。

[0138] 例子包括选自那些在下列酶分类 (E. C.) 号下分类的酶的氧化还原酶:

[0139] 甘油 -3- 磷酸脱氢酶 NAD^+ (1. 1. 1. 8)、甘油 -3- 磷酸脱氢酶 NAD(P)^+ (1. 1. 1. 94)、甘油 -3- 磷酸 1- 脱氢酶 NADP (1. 1. 1. 94)、葡萄糖氧化酶 (1. 1. 3. 4)、己糖氧化酶 (1. 1. 3. 5)、儿茶酚氧化酶 (1. 1. 3. 14)、胆红素氧化酶 (1. 3. 3. 5)、丙氨酸脱氢酶 (1. 4. 1. 1)、谷氨酸脱氢酶 (1. 4. 1. 2)、谷氨酸脱氢酶 NAD(P)^+ (1. 4. 1. 3)、谷氨酸脱氢酶 NADP^+ (1. 4. 1. 4)、L- 氨基酸脱氢酶 (1. 4. 1. 5)、丝氨酸脱氢酶 (1. 4. 1. 7)、缬氨酸脱氢酶 NADP^+ (1. 4. 1. 8)、亮氨酸脱氢酶 (1. 4. 1. 9)、甘氨酸脱氢酶 (1. 4. 1. 10)、L- 氨基酸氧化酶 (1. 4. 3. 2.)、D- 氨基酸氧化酶 (1. 4. 3. 3)、L- 谷氨酸氧化酶 (1. 4. 3. 11)、蛋白质 - 赖氨酸 6- 氧化酶 (1. 4. 3. 13)、L- 赖氨酸氧化酶 (1. 4. 3. 14)、L- 天冬氨酸氧化酶 (1. 4. 3. 16)、D- 氨基酸脱氢酶 (1. 4. 99. 1)、蛋白质二硫化物还原酶 (1. 6. 4. 4)、硫氧还蛋白还原酶 (1. 6. 4. 5)、蛋白质二硫化物还原酶 (谷胱甘肽) (1. 8. 4. 2)、漆酶 (1. 10. 3. 2)、过氧化氢酶 (1. 11. 1. 6)、过氧化物酶 (1. 11. 1. 7)、脂加氧酶 (1. 13. 11. 12)、超氧化物歧化酶 (1. 15. 1. 1)。

[0140] 所述葡萄糖氧化酶可以源自黑曲霉。所述漆酶可以源自 *Polyporus pinsitus*、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*)、灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、草原丝核菌 (*Rhizoctonia praticola*)、嗜热柱顶孢 (*Scytalidium*

thermophilum) 和漆树 (*Rhus vernicifera*)。胆红素氧化酶可以源自 *Myrothecium verrucaria*。过氧化物酶可以源自例如大豆、辣根或灰盖鬼伞。蛋白质二硫化物还原酶牛起源的蛋白质二硫化物还原酶、源自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 或黑曲霉的蛋白质二硫化物还原酶、和源自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 DsbA 或 DsbC。

[0141] 容易地可获得的商业氧化还原酶的具体例子包括 Gluzyme (可获自 Novozymes A/S 的酶)。然而,其它氧化还原酶可获自其它。

[0142] 应当理解,还涵盖氧化还原酶变体作为亲本酶。

[0143] 亲本糖酶

[0144] 亲本糖酶可以定义为能够分解尤其是 5 和 6 元环结构的碳水化合物链(例如淀粉)的所有酶(即依照国际生物化学和分子生物学联盟(IUBMB)的推荐(1992)在酶分类号 E.C.3.2(糖苷酶)下分类的酶)。

[0145] 例子包括选自那些在下列酶分类(E.C.)号下分类的酶的糖酶:

[0146] α -淀粉酶(3.2.1.1)、 α -淀粉酶(3.2.1.2)、葡聚糖 1,4- α -葡糖苷酶(3.2.1.3)、纤维素酶(3.2.1.4)、内切-1,3(4)- β -葡聚糖酶(3.2.1.6)、内切-1,4- β -木聚糖酶(3.2.1.8)、葡聚糖酶(3.2.1.11)、几丁质酶(3.2.1.14)、多聚半乳糖醛酸酶(3.2.1.15)、溶菌酶(3.2.1.17)、 β -葡糖苷酶(3.2.1.21)、 α -半乳糖苷酶(3.2.1.22)、 β -半乳糖苷酶(3.2.1.23)、淀粉-1,6-葡糖苷酶(3.2.1.33)、木聚糖 1,4- β -木糖苷酶(3.2.1.37)、葡聚糖内切-1,3- β -D-葡糖苷酶(3.2.1.39)、 α -糊精内切-1,6-葡糖苷酶(3.2.1.41)、蔗糖 α -葡糖苷酶(3.2.1.48)、葡聚糖内切-1,3- α -葡糖苷酶(3.2.1.59)、葡聚糖 1,4- β -葡糖苷酶(3.2.1.74)、葡聚糖内切-1,6- β -葡糖苷酶(3.2.1.75)、阿拉伯聚糖内切-1,5- α -阿拉伯糖苷酶(3.2.1.99)、乳糖酶(3.2.1.108)、和 chitonanase(3.2.1.132)。

[0147] 容易地可得到的商业糖酶的具体例子包括 A-Gal®, Bio-Feed® A, Bio-Feed® B, Bio-Feed® Plus, Bio-Feed® Plus, Novozyme® 188, Carezyme®,

Celluclast®, Cellusoft®, Ceremyl®, Citrozym®, Denimax®, Dezyme®, Dextrozyme®, Finizym®, Fungamyl®, Gamanase®, Glucanex®, Lactozym®, Maltogenase®, Pentopan®, Pectinex®, Promozyme®, Pulpzyme®, Novamyl®, Termamyl®, AMG(淀粉葡糖苷酶 Novo), Maltogenase®, Aquazym®, Natalase® (所有酶可获自 Novozymes A/S)。其它糖酶可获自其它公司。

[0148] 应当理解,还涵盖糖酶变体作为亲本酶。

[0149] 可以测定上述酶的活性,如记载于“Methods of Enzymatic Analysis”, 第三版, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, 第 3 卷的。

实施例

[0150] 实施例 1:重组宿主及磷酸盐饥饿控制下的孢子形成

[0151] 细菌菌株和培养基

[0152] 在此研究中使用称作 MIBG601 的枯草芽孢杆菌 168 衍生物 (F. Kunst, 等 The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390(6657):249-256(1997))。

[0153] Schaeffer 孢子形成培养基 (SSM 或 SM) 是一种通常用于枯草芽孢杆菌及相关物种的一般目的孢子形成培养基。本文中使用的 Schaeffer 氏培养基 (SSM) 的组成如下：

成分	供应商和编号	量
细菌用蛋白胨	Difco 211820或211677	5 g
牛肉膏	Merck 105886	0.25 g
KCl	Merck 104936	1 g
MnSO ₄ 1%	MSA-SUB-RE-5022	0.15 ml
[0154] FeSO ₄ 1%	MSA-SUB-RE-5023	0.03 ml
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Merck 102121	0.24 g
琼脂	Difco/Oxoid 102-3799	20 g
水		补足至1000ml
pH 7.0-7.4		

[0155] DNA 操作

[0156] 如先前所描述的, 实施枯草芽孢杆菌转化 (Anagnostopolous, C. 和 J. Spizizen. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 81:741-746)。依照由 Sambrook 等 (1989) 描述的方案实施所有常规分子生物学方法。

[0157] 表达构建体

[0158] 在质粒中或在线性整合载体中生成表达构建体。在这两种方式中, 通过同源重组将最终的基因构建体在芽孢杆菌属染色体上整合入 AmyE 基因座中。依照由 Sambrook 等 (1989) 描述的方案完成质粒中的克隆。线性整合载体是通过与低磷酸盐诱导型启动子和大观霉素抗性标志物一起在两个枯草芽孢杆菌同源染色体区间融合感兴趣基因生成的 PCR 融合产物。通过 SOE PCR (Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes, gene splicing by overlap extension Gene 77:61-68) 进行融合。

[0159] 首先, PCR 扩增 8 个片段：

[0160] A) 通过引物 p3 (SEQ ID NO:3) + p4 (SEQ ID NO:4) 自金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) (EMBL:AP009324, 在 10-SEP-2007 发布) 扩增大观霉素基因 *spec^R*, 生成 1.2kb 片段；

[0161] B) 通过引物 p5 (SEQ ID NO:5) 和 p6 (SEQ ID NO:6) 扩增 pAM-β 质粒区段 (EMBL:GU128949), 生成 0.2kb 片段；

[0162] C) 通过引物 p7 (SEQ ID NO:7) 和 p8 (SEQ ID NO:8) 自地衣芽孢杆菌 (EMBL:AE017333, 发布于:21-SEP-2004) 扩增 Ppst 启动子区, 生成 0.4kb 片段；

[0163] D) 通过延长 p8 和 p9 引物将克劳氏芽孢杆菌 (EMBL:A22550, 发布于:01-JUN-1995) 核糖体结合位点安装至 sigF 序列；

[0164] E) 通过引物 p9 (SEQ ID NO:9) 和 p10 (SEQ ID NO:10) 扩增枯草芽孢杆菌 168 的

sigF 基因,生成 0.8kb 片段;

[0165] F) 通过引物 p11(SEQ ID NO:11) 和 p12(SEQ ID NO:12) 扩增来自克劳氏芽孢杆菌 (EMBL:A22550, 发布于:01-JUN-1995) 的终止子区 aprH, 生成 0.2kb 片段;

[0166] G) 通过引物 p1(SEQ ID NO:1) 和 p2(SEQ ID NO:2) 扩增枯草芽孢杆菌 168 的来自 amyE 区的上游侧翼区, 生成 2.2kb 片段;

[0167] H) 通过引物 p13(SEQ ID NO:13) 和 p14 扩增枯草芽孢杆菌 168 的来自 amyE 区的下游侧翼区, 生成 2.7kb 片段。

[0168] 然后, 通过 SOE PCR 将所得的片段融合在一起;

[0169] I) 通过引物 p3(SEQ ID NO:3) 和 p8(SEQ ID NO:8) 装配 A)、B) 和 C) 中的 PCR 片段, 生成 1.8kb 片段;

[0170] J) 通过引物 p9(SEQ ID NO:9) 和 p12(SEQ ID NO:12) 装配 D)、E) 和 F) 中的 PCR 片段, 生成 1.0kb 片段;

[0171] K) 通过引物 p3(SEQ ID NO:3) 和 p12(SEQ ID NO:12) 装配 I) 和 J) 中的片段, 生成 2.8kb 片段; 并

[0172] L) 最终, 通过引物 p1(SEQ ID NO:1) 和 p14(SEQ ID NO:14) 装配 G) 和 H) 中的侧翼区及 K) 中的片段, 生成 5.7kb 片段 (SEQ ID NO:15)。图 1 中显示了获得的 amyE::spec^R Ppst sigF 片段。

[0173] 菌株构建

[0174] 将上述 amyE::spec^R Ppst sigF PCR 片段转化至感受态枯草芽孢杆菌 168, 并选择针对大观霉素的抗性。在选择后, 获得经转化的菌株枯草芽孢杆菌 168 amyE::spec^R Ppst sigF (本文中称为 PP2941)。通过 DNA 测序确认染色体插入物 amyE::spec^R Ppst sigF。

[0175] 实施例 2: 磷酸盐饥饿 - 孢子形成导致于 pH4 和 80°C 的存活

[0176] 此实施例显示可以在正确的培养基上诱导孢子形成, 并且孢子可以在 pH4 和于高温温育的情况下在琼脂层下存活。使用枯草芽孢杆菌 A168 衍生物作为克隆和筛选宿主, BE158 是相同的, 只是它携带额外的 α -淀粉酶基因, PP510 是枯草芽孢杆菌 A164 野生型菌株, PP2941 是具有磷酸盐饥饿可诱导的孢子形成的 BE158。

[0177] 材料和方法

[0178] 使用未稀释的或用 20g/1 琼脂稀释 2、5 和 10 倍的 Schaeffer 氏培养基。使用未稀释的或用 20g/1 琼脂稀释 2、5 和 10 倍的 Luria Bertani (LB) 培养基。

[0179] 自用培养基稀释至 600nm 处为 0.002OD 的过夜培养物制备甘油储液。将下列菌株 BE158、PP510、和 PP2941 的 60 μ l 200 倍稀释甘油储液铺板至含有 15ml 制备的琼脂混合物之一的 9cm 培养板上。将板于 32°C 温育 18 小时。首先, 通过显微术检查孢子形成。然后, 在上面浇注 16ml 含 100mM 乙酸盐缓冲液 (pH4) 的琼脂覆盖物, 并将板于 80°C 在水浴中或于 80°C 在培养箱中温育 30 分钟。将 10 个菌落挑出, 在新板上刺入, 并过夜温育以检查存活。

[0180] 结果

[0181] 在未稀释的 LB 和稀释的 LB 琼脂上, 天然孢子形成菌株 PP510 和磷酸盐饥饿诱导的孢子形成菌株 PP2941 不形成孢子, 因为即使在温育 4 天后通过显微术仍没有看到孢子。

[0182] 在 Schaeffers 和稀释的 Schaeffers 琼脂上, 于 32°C 在 19.5 小时后没有观察到孢子。于 37°C 再温育一天后, 产生下列观察结果:

[0183] PP510 :

[0184] 菌落在 5x 和 10x 稀释的 Schaeffer 氏培养基上比在未稀释的 Schaeffer 氏培养基上小。

[0185] 1x 稀释的 Schaeffer 氏培养基 :存在孢子,约 1/3 的芽孢杆菌属长度

[0186] 5x 稀释的 Schaeffer 氏培养基 :存在孢子,也在细胞中

[0187] 10x 稀释的 Schaeffer 氏培养基 :许多孢子,主要在细胞中

[0188] PP2941 :

[0189] 菌落在较高稀释的 Schaeffers 琼脂的情况下不太密集

[0190] 1x 稀释的 Schaeffers 培养基 :无孢子

[0191] 5x 稀释的 Schaeffers 培养基 :50 个细胞有约一个孢子

[0192] 10x 稀释的 Schaeffers 培养基 :50 个细胞有约一个孢子

[0193] 于 37°C 在生长两天后自这些板挑出几个菌落 ;表 1 显示了挑出的总菌落中于 37°C 过夜培养的菌落数目。

[0194] 表 1.

[0195]

菌株	10x稀释的Schaeffer氏培养基	5x稀释的Schaeffer氏培养基	结果
MIBG601	10中的0	10中的0	无孢子形成 - 无存活
PP510	10中的10	4中的3	经显微术检查所述培养的菌落是芽孢杆菌属
PP2941	8中的8	10中的10	经显微术检查所述培养的菌落是芽孢杆菌属

[0196] 结论

[0197] 仅在 5 和 10x 稀释的 Schaeffer 氏培养基上对磷酸盐饥饿诱导的孢子形成菌株发现在 pH4 和在水浴中于 80°C 温育 30 分钟下覆盖后的孢子形成和存活。常见的孢子形成菌株在未稀释的 Schaeffer 氏培养基上也形成孢子。这显示了通过磷酸盐饥饿的诱导起作用。挑出后的再生长接近 100%。

[0198] 实施例 3 :用于菌株 PP2941 孢子形成和存活的最佳条件

[0199] 材料和方法

[0200] 将 2mOD 甘油储液的 80u1200x 稀释液在不同板 (表 2) 上铺板 :

[0201] 表 2

[0202]

	BE158	PP2941
LB		X
LB Kan10+Spec10		X

未稀释的 Schaeffer 氏	x	X
5x 稀释的 Schaeffer 氏	x	X
10x 稀释的 Schaeffer 氏	x	X
20x 稀释的 Schaeffer 氏	x	X
50x 稀释的 Schaeffer 氏	x	X

[0203] 于 37°C 温育过夜。

[0204] 在孢子在显微镜下存在时, 浇注具有 15g/l 琼脂和 1g/l 红色淀粉 (Megazyme, Ireland) 的覆盖物。在具有 BE158 的 MIBG601 的情况中, 100mM pH5.8 的乙酸盐缓冲液存在于覆盖物中。在 PP2941 的情况中, 100mM pH4 的乙酸盐缓冲液存在于覆盖物中。此后, 于室温温育 BE158 以检查淀粉酶表达。将 PP2941 在水浴中于 80°C 处理 30 分钟, 并通过将菌落挑到新鲜的板上检查存活。

[0205] 结果:

[0206] 在于 37°C 温育 18 和 24 小时后, 在 LB-Kan10-Spec10、50x、20x、10x 和 5x 稀释的 Schaeffer 氏琼脂上培养的 PP2941 的显微术显示没有孢子存在。于 37°C 继续温育。

[0207] 于 37°C 生长 41 小时后, 重复显微术, 具有下列结果:

<u>培养基</u>	<u>观察结果</u>
LB	无孢子, 粗杆菌
SM 50x	无孢子, 经常较短的细胞
SM 20x	孢子
SM 10x	孢子
SM 5x	许多孢子
未稀释的 SM	无孢子

[0208]

[0209] 将具有 pH4 的红色淀粉的覆盖物浇注到 PP2941 上, 并将板于 80°C 在水浴中温育 30 分钟。然后, 将菌落挑到新板上, 并培养过夜。培养的菌落在低 pH 和热处理后显示存活。自孢子生成菌株挑出覆盖的菌落产生 (表 3):

[0210] 表 3: PP2941 在不同稀释度的培养基上的生长。

[0211]

菌株	培养基	培养 / 挑出	存活 (%)
PP2941	未稀释的 Schaeffer 氏	0/6	0
PP2941	5x 稀释的 Schaeffer 氏	6/6	100
PP2941	10x 稀释的 Schaeffer 氏	7/7	100
PP2941	20x 稀释的 Schaeffer 氏	6/7	86

PP2941	50x 稀释的 Schaeffer 氏	7/8	88
PP2941	LB	0/6	0
PP2941	LB-KAN10-Spec10	0/6	0
菌落采集者用金属针挑出	5x 稀释的 Schaeffer 氏	6/6	100
菌落采集者用金属针挑出	10x 稀释的 Schaeffer 氏	5/5	100

[0212] 孢子挑出通过菌落采集者用金属针也较好地工作。PP2941 在稀释的 Schaeffer 氏培养基的情况下最好地存活。生长在 5x 至 10x 稀释后最佳。将具有 BE158 的板在 pH5.8 的红色淀粉覆盖物的情况下于 37℃ 生长 41 小时后接种,并于室温温育过夜;次日,所有菌落具有大的透明区。结果(表 4)清楚显示淀粉酶在培养基上生成,这也支持孢子形成。

[0213] 表 4

[0214]

培养基	透明区半径(mm)	透明强度
50x 稀释的 Schaeffer 氏	5	清楚
5x 稀释的 Schaeffer 氏	10	清楚
未稀释的 Schaeffer 氏	10	由于 Schaeffer 氏培养基呈褐色颜色而对照困难

[0215] 其它实验显示非孢子形成菌株 MIBG601 于 RT 在 pH5.8 覆盖物下存活,但是于 pH4 和 3.8 被杀死。凭借 pH5.8 的覆盖物,它于 80℃ 在水浴中 30 分钟后也被杀死。具有磷酸盐饥饿诱导的孢子形成的菌株 PP2941 在 5 倍稀释的 Schaeffer 氏培养基上于 37℃ 生长 2 天后幸免于所有这些条件。在 2 倍稀释的 Schaeffer 氏培养基上,存活率仍然是 75% 的菌落。

[0216] 结论

[0217] 5x 稀释的 Schaeffer 氏培养基是用于支持孢子形成和淀粉酶表达的最佳选择。于 37℃ 生长 1 天后,菌落具有约 1mm 的直径。在 2 天后,孢子是可见的,并且幸免于 pH4 的红色淀粉覆盖层和于 80℃ 在水浴中温育 30 分钟。也可以用钢针将这些菌落挑出。显示淀粉酶在具有含有 BE158 的亲本菌株 MIBG601 的 pH5.8 红色淀粉覆盖层情况中在过夜 RT 温育后给出 10mm 透明区。

[0218] 实施例 4:使用重组菌株来筛选蛋白酶

[0219] 自枯草芽孢杆菌菌株生成基因组 DNA,所述枯草芽孢杆菌菌株含有在强启动子控制下的拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) S2A 蛋白酶,即所谓的“10R 蛋白酶”,其与 Savinase 信号肽(如显示于例如 W005/123914)融合并与氯霉素抗性基因一起整合入芽孢杆菌属菌株 *pe1* 基因座中。转化染色体 DNA 以整合入枯草芽孢杆菌 MIBg601(作为非孢子形成菌株)中,并用 SOL000 基因组 DNA 转化 PP2941(孢子形成菌株),经由氯霉素抗性选择阳性转化体。选择具有透明区的菌落,并使用来自 MIBG601 及来自 PP2941 的一个单菌落进行下列测试。

[0220] 将菌株接种入 Schaeffer 氏肉汤(与 Schaeffer 氏培养基相同,没有添加琼脂)

中,该 Schaeffer 氏肉汤以 1x、2x、3x、5x、和 10x 稀释,并添加 CaCl_2 到终浓度 2.8mM。培养物于 30°C 220rpm 生长几天,并在显微镜下检查孢子形成。在 2 天后,在 PP2941-SOL000 中看到孢子形成,并且孢子浓度在第 3 天和第 4 天增加。各稀释之间没有差异,使得未稀释的 Schaeffer 氏肉汤中的磷酸盐水平在生长期间已经变得有限。这是由于比在固体培养基上获得的更高的细胞浓度。MiBg601-SOL000 在任何这些条件下没有形成孢子。

[0221] 每天采集上清液样品,并分析蛋白酶活性以测定生成多少蛋白酶。使用具有红色荧光的 EnzChek 蛋白酶测定试剂盒,并用 0.1M NaHCO_3 pH=8.0 将底物 (Invitrogen) 稀释到终浓度 1mg/ml。将获得的荧光与 10R 蛋白酶的标准曲线比较。在未稀释的 Schaeffer 氏肉汤中,这两种菌株获得相似的蛋白酶浓度,在 2 天后为 35ppm,在 3 天后为 25ppm,而在 4 天后为 30ppm。通过在 TB-甘油培养基中培养获得相似的蛋白酶浓度。

[0222] 对温育 4 天后 MIBG601-SOL000 和 PP2941-SOL000 的培养物样品测试孢子存活。因此,对于对照,用 Schaeffer 氏培养基稀释培养物:3x、10x、50x、100x 和 200x,将 60 μ l 在 LB cam+ 脱脂乳上铺板,并于 RT 温育 4 天。为了测定孢子数目,应用 500ul 培养物肉汤的热处理,这通过将其于 70°C 温育 30 分钟进行。将这些以与对对照所完成相同的方式稀释并铺板。为了测定洗涤剂中的孢子存活,将 885ul 具有 8×10^8 个细胞/ml 的培养物肉汤和 100ul 12.3g/l 洗涤剂及 13ul 具有 1000° dH 的水混合。对于第二种设置,使用 44g/l 的较高洗涤剂浓度。将这些于室温温育 6 小时,并以 5、10、50、和 100 倍稀释。将 50 μ l 在 LB cam+ 脱脂乳上铺板,并于 RT 温育 4 天。表 5 和 6 中分别显示了上述热处理和洗涤剂处理后的结果。

[0223] 表 5:热处理

稀释	MiBg601-10R		PP2941-10R-4	
	-热	+热	-热	+热
1x	TMTC	0	TMTC	TMTC
3x	TMTC	0	TMTC	TMTC
10x	0 *	0	TMTC	TMTC
50x	0 *	1	TMTC	6-8000
100x	0 *	0	约8000	约4000
200x	0 *	0	约6000	约2000

[0225] TMTC= 太多以致不能计数 = 超过 8,000 个菌落。

[0226] *= 通过自前面的稀释取出产生稀释。

[0227] 表 6. 洗涤剂处理

稀释	1.23 g/l		4.4 g/l	
	MiBg601-10R	PP2941-10R-4	MiBg601-10R	PP2941-10R-4

[0229]	5x	17	TMTC	2	TMTC
	10x	2	TMTC	6	TMTC
	50x	3	TMTC	2	TMTC
	100x	1	约3000	1	约3000

[0230] 这些结果显示了 PP2941 是形成孢子的,孢子可以经受住热和洗涤剂,而且生长条件容许对于筛选目的足够的蛋白酶生成。

[0231] 实施例 5 :在高温和低 pH 下筛选淀粉酶

[0232] 在显示 PP2941 在严格条件下存活后,建立筛选设置以于高温和低 pH 筛选淀粉酶。采用 BE158 作为野生型淀粉酶。在此类条件下较早发现 BE1093 为改善的变体。这里,在板上直接发现相关条件区别较好的变体与野生型。

[0233] 材料和方法

[0234] 将与淀粉酶基因可操作连接的启动子(每件事物侧翼有与宿主基因组果胶酸盐裂合酶基因(PEL)相同的 DNA 区)转化入枯草芽孢杆菌 PP2941 中以实现通过同源重组来整合入 PEL 中。使用三种不同淀粉酶基因,其中 BE158 是野生型,而 BE1093 是改善的变体。用生长培养基将过夜培养的培养物稀释至 600nm 处为 0.0020D,并制备甘油储液。

[0235] 给 9cm 培养皿充满稀释的 Schaeffer 氏培养基。用去离子水中的 20g/L 琼脂稀释含有 Schaeffer 氏培养基的琼脂。添加 2.8mM CaCl₂ 以将钙调节至 16 度水硬度。添加 6ug/ml 氯霉素。将 Schaeffer 氏培养基以 3.3 和 5 倍稀释。

[0236] 将 60ul 具有 BE158 或 BE1093 淀粉酶的枯草芽孢杆菌 PP2941 的甘油储液铺板到培养皿上。还制备混合物,并铺开,其中 90% 来自 BE158,而 10% 来自 BE1093 甘油储液。将这些板于 37°C 培养 40 小时。遵循此方案以 pH3.8、3.9 和 4.0 制备覆盖琼脂:例如对于 150ml:将 75ml 60°C 温、高压灭菌的、具有 15g/l 琼脂和 3g/l 红色淀粉(Megazyme)的未缓冲红色淀粉琼脂与 60°C 温成分如 60ml 无菌纯化水和 15ml 1M 乙酸钠缓冲液在 pH3.8、3.9 或 4.0 混合。添加 6ug/ml 氯霉素和 200ug/ml 氨基青霉素作为抗生素以确保无菌度和对淀粉酶基因的选择性。

[0237] 通过将 16ml 添加到培养的菌落上,确保琼脂层的平坦铺展来浇注覆盖层。板在流动台上需要 10 分钟来固化,然后将其在预加热的培养箱中于 75°C 温育。较早地,测量到琼脂中的温度调节至最后约 70°C。将板温育 22.5 小时,之后分析透明区,并从混合板挑出具有较大透明区的菌落。对挑出并再培养的菌落测序以查看是否已经挑出改善的变体。

[0238] 结果:

[0239] 于 75°C 在 22.5 小时后,对板分析(见表 7)。数字是以 mm 计的透明区半径的测量,而字母以四种程度非常清楚(vc)、清楚(c)、弱(w)和非常弱(vw)编码透明区的强度:

[0240] 表 7

[0241]

	3.3倍稀释的Schaeffer氏培养基			5倍稀释的Schaeffer氏培养基		
pH	BE158	BE1093	90/10	BE158	BE1093	90/10
3.8	1 c	2 vc	差异可见, 38个总菌落中 11个阳性	1 c	4 vc	差异可见, 141个总菌落中9个 阳性
3.9	1.5 c	2 c	小差异	0.5 vc	1.5 vc	小差异
4.0	4 c	4 c	无差异	2 c	5 c	无明显差异

[0242] 将在5倍稀释的Schaeffer氏培养基上来自pH3.8的阳性物挑出,并在新板上培养。DNA测序显示了7个阳性物中的5个具有相同的改善淀粉酶变体,其具有以下氨基酸取代:E129V、K177L和R179E。

[0001]

序列表

<110> 诺维信公司(Novozymes A/S)
 <120> 诱导的孢子形成筛选方法
 <130> NZ 11674-WO-PCT
 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物 P1
 <400> 1
 gccctttact ctaaagttgc gg 22
 <210> 2
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物 P2
 <400> 2
 gtctacagac atggatgagc gatgatgata tc 32
 <210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物 P3
 <400> 3
 catcgctcat ccatgtctgt agacaaattg tgaaggatg 40
 <210> 4
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物 P4
 <400> 4
 cttcgtctctc actgagctcc actaatatfa ataaactatc gaag 44
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物 P5
 <400> 5
 ggagctcagt gagagcgaag cgaacacitg 30
 <210> 6

[0002]

<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P6	
<400> 6	
gcggtaacctg atctagatct cgggttcttc aaatatttct cc	42
<210> 7	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P7	
<400> 7	
cccagatct agatcaggta cegcaacgaa ttcggccgaa aagtgc	46
<210> 8	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P8	
<400> 8	
cacttccctc ctcatcttta acgctagct gctgcgaaga caactaaaac	50
<210> 9	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P9	
<400> 9	
cgcgttaaaa atgaggagg aagtgttatg gatgtggagg ttaagaaaa c	51
<210> 10	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P10	
<400> 10	
cccttttagtg tcaattcaet agccatccgt atgatec	37
<210> 11	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P11	
<400> 11	
ggctagtga ttagactaa aggatccag	30
<210> 12	
<211> 31	

[0003]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P12	
<400> 12	
cgcggcgcg gatcagccct ttacgctega t	31
<210> 13	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P13	
<400> 13	
agggtgate cgcggccgcg cgtcaacaat gacctttatg cc	42
<210> 14	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P14	
<400> 14	
cagaggggat ggatcgaaat atg	23
<210> 15	
<211> 5776	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> amyE::specR Ppst sigF 插入物的 DNA 序列	
<400> 15	
ctcaggtctg gaaaagaaaa gaggegtact gcctgaacga gaagetatca ccgccagacc	60
taaaeggata tcatcatege tcatccatgt ctgtagacaa gagtccagac cttttctttt	120
ctccgcata cggacttgc tctcgatagt ggccggctcg atttcctat agtagtagcg	180
agtaggtaca gacatctgtt attgtgaaag gatgtactta aacgctaacg gtcagcttta	240
ttgaacagta atttaagtat atgtccaatc tagggtaagt aaattgagta tcaatataaa	300
taacaetttc ctacatgaat ttggatttgc cagtcgaaat aacttgcct taaattcata	360
tacaggttag atcccattca tttaactcat agttatattt ctttatatga acataatcaa	420
cgaggtgaaa tcatgagcaa ttgattaac ggaaaaatac caaatcaagc gattcaacaa	480
ttaaaaatcg taaaagattt gaaatatact tgtattagtt gcctccactt agtactcgtt	540
aaactaattg ctttttatg gtttagttcg ctaagtttgt aatttttagc attttctaaa	600
tcaatagttg gagtatatct atttggttca gcagtaaatg gtggtttaag catfaacagc	660
gatgtagatg ttctagtcgt cgtgaatcat taaaccttca agttatcaac ctcatataga	720
taaaccaagt cgtcatttac caccaaatgc gtaattgtcg ctacatctac aagatcagca	780
gcacttagta agtttacctc aattaactcg aaaaaaacta acagaaagac taatgactat	840
atcaggaaa agttgaaata ggattctgtt agaccacttg aagttacggt caaatggagt	900

[0004]

taattgagct ttttttgatt gtctttctga ttaactgatat agtcctttct aacctttatg	960
cctaagacaa tctgggtgac tccaatgacct tataaatagg agtgaagttg tcccttggca	1020
atatactcca aaaagagaat ttatatacgg tgagtggetc aggggtgaat tgagaatgga	1080
caaatccaaa lalitalceel cacttcaaca gggaaccgtt alaggaggtt ttctctctaa	1140
atatatgcca ctcaccgagt cccacttaa actcttacct gtttaagtgg aaccaageta	1200
tgatctgat ttggctattg ttttagcaca agcaagaag aafagtattt ctctatttgg	1260
tcctgatitt caagtatact tctctccct tggctcgata ctaggactaa accgataaca	1320
aaatcgtgtt cgttctttct taccataaag agataaacca ggactaagaa gttcatatga	1380
acagagggta cctttgacag atattcgaag agcaattaag gattctttgc cagaactaat	1440
tgaggggata aaaggtagt agcgtaatgt aattttacc cagctccatg gaaactgtct	1500
ataagcttct cgttaatcc taagaaaegg tcttgattaa ctcctctatt tccaactact	1560
cgcattacat taaaattggg atcgaggaat gtgcaaacca gtgactactg gtgaaattac	1620
ctcgaaaagt gtcgctcag aatgggctat acctctttta cctaaagacc atgtaattta	1680
ctggaactac accgtttgtc actgatgacc actttaatgg agctttctac agcgaactct	1740
taccgatat ggagaaaatg gatttctctt acattgaaat gaccttatag ctgaaaaagg	1800
ctatcgggga gagtgtgatg ataatggga aggaactat tcaaaagtga aagcactcgt	1860
taagtatafg aaaaattcta tagaaatct gatctttcc gatagccct ctcacactac	1920
tattccctt cctgatata agtttccact ttcttgagca attcatatac ttttaagat	1980
acttacttc tctcaattag gctaatttta ttgcaatac aggtgcctac ttttaaaact	2040
actgatttat tgataaata tgaacaatt ttgggaagaa taaagtgaag agagttaact	2100
cgattaaaa acggtattg tccacgaatg aaaaatttga tgaactaaata actatttata	2160
acttctttaa aaccttctt atttccgtcc tcttctgaaa tttagaacg ctttattact	2220
ttaatatagt gaacaattt gtaactattg aaaatagaaa gaaattgttc cttctagtt	2280
tattgcagga gaacacttta atctcttgg aaataatgaa attaaatcac tttgttaaac	2340
attgataact tttatcttcc tttacaagg aagctatcaa ataaaatatt agtggagctc	2400
agtgagagcg aagcgaacac ttgatttttt aattttctat cttttatagg tcatttagat	2460
atacttattt gtccataaac tatttataat cactctagat cactctcct tgccttctga	2520
actaaaaaat taaaagatag aaaaalcca glaalcctat atgaataaac aggatatttg	2580
atattagcag cataatagat ttattgaata ggtcatttaa gttgagcata tttagaggag	2640
aaaatcttgg agaaatatt gaagaacccg agactagatc agaactctcg tattatctaa	2700
ataacttate cagtaaatte aactctgata atctctctct tttagaacct ctttataaac	2760
ttcttggct ctgatctag tcttaccgca acgaattcgg ccgaaaagt cttgataagt	2820
atittgaact gaaatcaaaa caatcaaaag aaaatctgt cgaaaaaaat aagacaaaat	2880
ccatggcgtt gcttaagecg gcttttcacg aactattcat aaaacttgac ttttagtttg	2940
ttagttttct tttatgacag ctttttttat tctgtttta ggeaaaaaa getacagaat	3000
aggacttttt caataaaaca cctgeattga accatgcagg tgtttttttg tgccecggt	3060
ctttctgtc gattctatac cttttcttc gatgtcttat cctgaaaag taattttgtg	3120

[0005]

gacgtaactt ggtacgtcca caaaaaaca cgcgggcaag aaaagcacgc gtaagatatg	3180
aaagttcaag ctttaatttac aaaacottaa taattcattt aaacaagatt aatactgaaa	3240
agttacgcta taccgtagg acaaattaca catttacgcg ttccaagttc gaattaaatg	3300
ttttggaatt attaagtaaa ttgtttetaa ttatgacttt tcaatgcat atgggcatcc	3360
tgtttaatgt gtaaatgcgc ggaggattaa gaagtgaaac catttaaaaa aatcacactg	3420
atgttcatca tgtecgtttt agttgtcttc gcagcagcta cgcgttaaaa atgaggaggg	3480
cctectaatt ctteactttg gtaaattttt ttagtgtgac tacaagiagt acaggcaaaa	3540
tcaacagaag cgtegtcgat gcgcaatttt tactcctccc aagtgttatg gatgtggagg	3600
ttaagaaaaa cgcaaaaaac gctcagctga aggatcatga agtaaaggaa ttaatcaaac	3660
aagccaaaat ggcgaccagt tcacaatacc tacacctcca attctttttg ccgtttttgc	3720
gagtegaactt cctagtactt catttcccta attagtttgt ttcggtttta ccgctggtec	3780
aggcaagaga cctectcata gaaaaaaca tgcgtcttgt ttggtctgtc gtacagcggt	3840
ttttaaacag aggatatgag cctgacgac tottccagag tccgttctct ggaggagtat	3900
ctttttttgt acgcagaaca aaccagacag catgtcgcca aaaattttgc tctatactc	3960
ggactgctag agaaggcttt cggetgcac ggctgtttaa aatctgttga caaatttgat	4020
ttaacctatg atgtgcgttt ttcaacgtat gcagtgccga tgattatcgg agaaatccaa	4080
gccgacgtag cccgacaatt ttagacaact gtttaaacfa aattggatcc tacacgcaaa	4140
aagttgcata cgteacggct actaatagcc tctttaggtt cgatttatcc gtgatgacgg	4200
aaccgtaaag gtatcacggt cattaaaaga gcttggaaac aaaatccggc gcgcaagga	4260
tgagcttttc aaaacactgt gctaaatagg cactactgcc ttggoatttc catagtgcga	4320
gtaattttct cgaacctttg ttttaggcgc cgcgcttctt actcgaagc tttfgtgacg	4380
gcagagtgcc gacgggtcag gagatcgctg accatttggg gattgaagct gaggatgttg	4440
tactggccca agaggcggta agggctccat cttegattcc cgtctcacgg ctgcccactc	4500
ctctagcgac tggtaaacct ctaacttga ctcctacaac atgaccgggt tctccgcat	4560
tcccagggtg gaagctaaga cgaaacctgt tatgaaaatg acggagatec gattaccctg	4620
cttgatcaaa tegtgcaca ctcagaagaa aaatggtttg acaaaattgc gctgaaagat	4680
gctttggcaa atacttttac tgctcttagg ctaatgggac gaactagttt agcgaactgtt	4740
gagttctctt ttaccaaaac tgttttaacg cgacttteta gcgacagcg atttggagga	4800
aagggaaaaa ctaactgtct atctcagata ttataaagac cagacacagt ccgaggtggt	4860
gagcggtcgc ggatctcttc gctagtcgct aaacctcctt tccctttttg attagcagat	4920
agagtctata atatttctgg tctgtgtcag gctccaccga ctcgcogage cctagagaca	4980
ggtgcaggtt tccaggettg aaaagaaaat attaaaacag atcaagtttc aaatggatca	5040
tacggatggc tagtgaattg aactaaagg gatccagagt ccacgtccaa agtccgnaac	5100
ttttctttta taattttgtc tagttccaag tttaacctagt atgctaccg atcaactaac	5160
tgtgatttcc ctaggtctag cggcaacacg ctaatcaata aaaaaacgct gtgcggttaa	5220
agggcacagc gttttttgt gtatgaatcg aaaaagagac agatcgcagg tctcaaatcg	5280

[0006]

ccgttgtcgc attagttatt tttttgcgac acgccaattt cccgtgtcgc aaaaaaacac	5340
atacttagct ttttctcttg tctagcgtcc agagttaaag cgagcgtaaa gggctgatcc	5400
gcggcgcgcg gtaacaatg acctttatgc catattcttc agcggtgca cacatttttt	5460
aaattcttgt tcagtattag ctgcatttc ccgactagc gcggcgcgcg agttgttact	5520
ggaaatacgg tataagaagt cgccgacgtg igtaaagaaa ttaagaaca agtcaceta	5580
agtaacggtt gccaattga tacgatgtcg gctgatacag ccagtaccag ttcgacatgc	5640
ttttatctcc ttgattccct tcttttactt ggtaaggat tcattgcca cggttaact	5700
atgctacagc cgactatgtc ggatcatggtc aagctgtacg aaaatagagg aactaaggga	5760
aggaaatgaa ccaatt	5776

