



(51) МПК
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/09 (2020.02); *C12N 15/113* (2020.02); *C12N 15/75* (2020.02); *C12N 2510/02* (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019123608, 26.07.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.07.2019

Дата регистрации:
17.06.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.07.2019

(45) Опубликовано: 17.06.2020 Бюл. № 17

Адрес для переписки:
105215, Москва, а/я 26, Н.А. Рыбиной

(72) Автор(ы):

МИРОНОВ Александр Сергеевич (RU),
 ЭРРАИС Лопес Любовь (RU),
 БАЕВА Ольга Викторовна (RU),
 БАТТАЛОВА Ирина Юносовна (RU),
 БРОВКИН Алексей Николаевич (RU),
 СМИРНОВ Петр Владимирович (RU),
 РЫКОВ Сергей Викторович (RU),
 ЮРЧЕНКО Юлия Валерьевна (RU),
 БЕБУРОВ Михаил Юрьевич (RU),
 КАЛУЖСКИЙ Василий Евгеньевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
 "ЦЕНТР ТРАНСФЕРА
 БИОТЕХНОЛОГИЙ ОКА-Биотех" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: EP 2340306 B1, 14.12.2016. RU
 2542387 C1, 20.02.2015. US 20070259004 A1,
 08.11.2007. WO 2012032154 A1, 15.03.2012. US
 20070292913 A1, 20.12.2007. RU 2346049 C2,
 10.02.2009. EA 32045 B1, 29.03.2019.

(54) ТАНДЕМНЫЙ ПРОМОТОР, ФУНКЦИОНИРУЮЩИЙ В БАКТЕРИИ РОДА *Bacillus*, ТРАНСФОРМИРОВАННАЯ БАКТЕРИЯ РОДА *Bacillus* - ПРОДУЦЕНТ ЦЕЛЕВОГО ПРОДУКТА, СОДЕРЖАЩАЯ УКАЗАННЫЙ ПРОМОТОР, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕЛЕВОГО ПРОДУКТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УКАЗАННОЙ БАКТЕРИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен тандемный промотор $P_{\text{гпсF-gsiB}}$, функционирующий в бактерии рода *Bacillus*. Также предложена клетка-хозяин – продуцент целевого продукта, относящаяся к бактерии рода *Bacillus*, содержащая указанный промотор. Кроме того, изобретение относится к способу получения целевого продукта с

использованием указанной клетки-хозяина. Использование указанного промотора позволяет получать оптимальный профиль экспрессии целевого гена в ходе культивирования клетки-хозяина и осуществлять эффективную продукцию целевых продуктов с использованием указанной клетки-хозяина. 3 н. и 5 з.п. ф-лы, 5 ил., 1 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/09 (2020.02); C12N 15/113 (2020.02); C12N 15/75 (2020.02); C12N 2510/02 (2020.02)

(21)(22) Application: **2019123608, 26.07.2019**

(24) Effective date for property rights:
26.07.2019

Registration date:
17.06.2020

Priority:

(22) Date of filing: **26.07.2019**

(45) Date of publication: **17.06.2020** Bull. № 17

Mail address:
105215, Moskva, a/ya 26, N.A. Rybinoj

(72) Inventor(s):

**MIRONOV Aleksandr Sergeevich (RU),
ERRAIS Lopes Lyubov (RU),
BAEVA Olga Viktorovna (RU),
BATTALOVA Irina Yunosovna (RU),
BROVKIN Aleksej Nikolaevich (RU),
SMIRNOV Petr Vladimirovich (RU),
RYKOV Sergej Viktorovich (RU),
YURCHENKO Yuliya Valerevna (RU),
BEBUROV Mikhail Yurevich (RU),
KALUZHSKIJ Vasilij Evgenevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"TSENTR TRANSFERA BIOTEKHNOLOGIJ
OKA-Biotekh" (RU)**

(54) **TANDEM PROMOTER FUNCTIONING IN BACTERIA OF BACILLUS GENUS, TRANSFORMED BACILLUS BACTERIUM - TARGET PRODUCT PRODUCER CONTAINING SAID PROMOTER, AND METHOD FOR PRODUCING DESIRED PRODUCT USING SAID BACTERIUM**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. Disclosed is a tandem promoter P_{rpsF-gsiB}, which functions in bacteria of the genus Bacillus. Also disclosed is a host cell - producer of an end product related to bacteria of genus Bacillus, containing said

promoter. Invention also relates to a method of producing an end product using said host cell.

EFFECT: use of said promoter enables to obtain an optimal expression profile of the target gene during cultivation of the host cell and to efficiently produce desired products using said host cell.

8 cl, 5 dwg, 1 tbl, 4 ex

C 1
2 7 2 3 7 2 2
R U

R U
2 7 2 3 7 2 2
C 1

Область техники

Настоящее изобретение относится к биотехнологии, в частности к тандемному промотору, функционирующему в бактерии рода *Bacillus* и позволяющему осуществлять указанной бактерии экспрессию целевых генов, используемых для продукции целевых 5 продуктов. Также настоящее изобретение относится к бактерии рода *Bacillus* - продуценту целевого продукта, содержащей указанный промотор, осуществляющий контроль экспрессии целевых генов, и к способу получения целевого продукта с использованием указанной бактерии.

Предшествующий уровень техники

10 Бактерии рода *Bacillus* хорошо известны в качестве клеток-хозяев для производства различных целевых продуктов.

Обычно обеспечение максимальной экспрессии целевых генов, содержащихся в клетке *Bacillus* и необходимых для получения целевых продуктов, осуществляют путем амплификации в хромосоме экспрессионной кассеты, содержащей один промотор, 15 функционально связанный с представляющим интерес целевым геном и амплифицируемым селективируемым маркерным геном, например, маркером устойчивости к антибиотикам. Указанная амплификация приводит к получению нескольких копий экспрессионной кассеты и селективного маркерного гена в хромосоме.

Однако такие клетки-хозяева бактерий рода *Bacillus* не всегда обладают 20 характеристиками, необходимыми для их коммерческого использования, и имеют некоторые недостатки, связанные с этим подходом. Например, не всегда возможно достичь насыщающих уровней мРНК путем амплификации генов, приводимых в действие одиночными промоторами. Кроме того удаление селективируемых маркерных генов без потери кассет экспрессии может оказаться технически невыполнимым.

25 Также обеспечение максимальной экспрессии целевых генов, необходимых для получения целевых продуктов, осуществляют путем использования сильных промоторов, индуцируемых промоторов, нескольких промоторов или тандемных промоторов, а также путем стабилизации мРНК.

В патенте US 5,955,310 описано использование в бактериях *B. subtilis* экспрессионной 30 кассеты, содержащей тандемный промотор $P_{amyQ-cryIII A}$, функционально связанный с одной копией нуклеиновой кислоты, кодирующей целевой ген, и последовательность, расположенную после указанного промотора перед целевым геном и стабилизирующую мРНК. Однако указанный документ не содержит информации о профиле активности заявленного промотора в процессе культивирования бактерии.

35 В патентной заявке WO 201004625 A1 описано использование тандемного промотора $P_{GpsB-subC}$ в бактериях *B. licheniformis* и *B. pumilus*, и показано, что его использование позволяет увеличить продукцию протеаз 1 и 2 на 24% и 38%, соответственно, по сравнению с использованием одиночного промотора P_{subC} . Однако указанный документ 40 не содержит информации о профиле активности заявленного промотора в процессе культивирования бактерии.

В патентной заявке CN 105779444 (A) описано использование тандемных промоторов $P_{43-NraII-SPO-I}$ и $P_{43-NraII-SPO-I-cryIII A}$ в бактериях рода *Bacillus*. Показано, что использование первого промотора позволяет увеличить продукцию щелочной протеазы 45 на 70% по сравнению с суммарной продукцией в бактериях, содержащих одиночные промоторы, а использование второго промотора позволяет увеличить продукцию щелочной протеазы на 50% по сравнению с суммарной продукцией в бактериях, содержащих одиночные промоторы. Однако указанный документ не содержит

информации о профиле активности заявленных промоторов в процессе культивирования бактерии.

Раскрытие изобретения

5 Технической задачей настоящего изобретения являлась разработка более продуктивного способа микробиологического синтеза целевых продуктов с помощью бактерий рода *Bacillus*, а также расширение арсенала искусственных промоторов, функционирующих в бактериях рода *Bacillus* и обладающих улучшенными свойствами, необходимыми для продукции целевых продуктов.

10 Указанная задача была решена путем создания тандемного промотора $P_{\text{rpsF-gsiB}}$, обладающего улучшенными свойствами, необходимыми для продукции целевых продуктов. Экспрессия целевого гена, находящегося под контролем указанного тандемного промотора $P_{\text{rpsF-gsi}}$, в процессе культивирования бактерии рода *Bacillus* - продуцента целевого продукта нарастает и достигает максимума на поздних стадиях стационарного роста, что обеспечивает наиболее эффективный профиль экспрессии 15 целевого гена и наиболее эффективную продукцию целевого продукта. Способ получения целевых продуктов с использованием указанной бактерии является более простым и технологичным, поскольку при использовании тандемного промотора $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ не требуется добавления индуктора экспрессии в процессе культивирования бактерии, как, например, при использовании индуцируемого промотора. 20

Одним из аспектов настоящего изобретения является тандемный промотор, функционирующий в бактерии рода *Bacillus*, содержащий последовательности нуклеотидов промотора гена *rpsF* и промотора гена *gsiB*, причем промотор *rpsF* расположен выше по ходу транскрипции относительно промотора *gsiB*. Промотор P_{rpsF} 25 относится к наиболее сильным промоторам в геноме *B. subtilis* и обеспечивает максимально высокий уровень транскрипции на логарифмической стадии роста бактерий. Инициация транскрипции гена *gsiB* иницируется с участием альтернативной сигма-субъединицы σ^B и достигает максимума на стационарной фазе роста бактерий. Еще одним из аспектов настоящего изобретения является описанный выше тандемный 30 промотор, который содержит последовательности нуклеотидов промотора гена *rpsF* и промотора гена *gsiB* из *Bacillus subtilis*.

Следующим аспектом настоящего изобретения является описанный выше тандемный промотор, содержащий последовательность нуклеотидов, представленную в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1. 35

Еще одним из аспектов настоящего изобретения является бактерия рода *Bacillus* - продуцент целевого продукта, содержащая описанный выше тандемный промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, являющийся целевым продуктом, или полипептид, необходимый для 40 продукции целевого продукта.

Еще одним из аспектов настоящего изобретения является описанная выше бактерия, выбранная из группы, включающей *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*. 45

Также одним из аспектов настоящего изобретения является описанная выше бактерия *Bacillus subtilis*.

Следующим аспектом настоящего изобретения является описанная выше бактерия, в которой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид,

являющийся целевым продуктом, или полипептид, необходимый для продукции целевого продукта, является гетерологичной.

Еще одним из аспектов настоящего изобретения является описанная выше бактерия, продуцирующая целевой продукт, выбранный из группы, включающей аминокислоты, полипептиды, углеводы, полисахариды, нуклеиновые кислоты и их производные.

Следующим аспектом настоящего изобретения является способ получения целевого продукта, включающий культивирование описанной выше бактерии рода *Bacillus* в питательной среде, пригодной для продукции целевого продукта, и выделение целевого продукта из культуральной жидкости.

Еще одним из аспектов настоящего изобретения является способ получения целевого продукта, в котором указанный целевой продукт выбран из группы, включающей аминокислоты, полипептиды, углеводы, полисахариды, нуклеиновые кислоты и их производные.

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1 показана нуклеотидная последовательность промотора P_{gpsF} . Заглавными буквами обозначены -35 и -10 участки промотора, подчеркнут сайт связывания рибосомы. Последовательность праймеров выделена жирным шрифтом.

На Фиг. 2 показана нуклеотидная последовательность промотора P_{gsiB} . Заглавными буквами обозначены -35 и -10 участки промотора, подчеркнут сайт связывания рибосомы. Последовательность праймеров выделена жирным шрифтом.

На Фиг. 3 показана структура плазмиды pDG268.

На Фиг. 4 показана нуклеотидная последовательность гибридного промотора $P_{\text{gpsF-gsiB}}$. Заглавными жирными буквами обозначены -35 и -10 участки промоторов, подчеркнут сайт связывания рибосомы. Старты транскрипции обозначены как +1. Место стыка промоторов P_{gpsF} и P_{gsiB} обозначено стрелкой.

На Фиг. 5 приведены данные сравнения эффективности функционирования гибридного промотора $P_{\text{gpsF-gsiB}}$ и одиночного промотора P_{gpsF} в процессе ферментации штаммов *B. subtilis*.

Осуществление изобретения

Тандемный промотор $P_{\text{gpsF-gsiB}}$ согласно настоящему изобретению представляет собой слияние промотора гена *gpsF*, кодирующего синтез рибосомного белка S6, и промотора гена *gsiB*, ответственного за белок общего клеточного стресса (P_{gsiB}), причем промотор *gpsF* расположен выше по ходу транскрипции относительно промотора *gsiB*. Промотор P_{gpsF} содержит близкую к консенсусной последовательности область -35 (TTGТАА) и консенсусную последовательность области -10 (ТАТААТ). Промотор P_{gpsF} относится к наиболее сильным промоторам в геноме бактерий рода *Bacillus*, в частности *B. subtilis* и обеспечивает максимально высокий уровень транскрипции на логарифмической стадии роста бактерий. Инициация транскрипции этого промотора осуществляется с участием вегетативной сигма-субъединицы РНК-полимеразы (σ^A). Нуклеотидная последовательность гена *gpsF* *B. subtilis* представлена в базе данных «GenBank» под номером GeneID: 937919 (нуклеотиды с 4199445 по 4199732 в последовательности NC_000964.3). Нуклеотидная последовательность промотора P_{gpsF} *B. subtilis* показана на Фиг. 1. Инициация транскрипции гена *gsiB* иницируется с участием альтернативной сигма-субъединицы σ^B и достигает максимума на стационарной фазе роста бактерий. Нуклеотидная последовательность гена *gsiB* *B. subtilis* представлена в

базе данных «GenBank» под номером GeneID: 938235 (нуклеотиды с 494506 по 494877 в последовательности NC_000964.3). Нуклеотидная последовательность промотора P_{rpsF} *B. subtilis* показана на Фиг. 2.

5 Нуклеотидная последовательность тандемного промотора $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ согласно настоящему изобретению показана на Фиг. 4 и приведена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1.

10 Термины «тандемный промотор $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ функционально связан» с целевым геном или «ген находится под контролем гибридного тандемного промотора $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ » означают, что природные промоторы указанных генов заменены на промотор $P_{\text{rpsF-gsiB}}$.

15 В настоящем описании в одном из воплощений заявленного изобретения для целей иллюстрации тандемный промотор $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ функционально связан с репортерным геном *lacZ*, кодирующим β -галактозидазу. В другом иллюстративном воплощении заявленного изобретения, исключительно в качестве примера и для изучения профиля экспрессии генов, находящихся под контролем тандемного промотора $P_{\text{rpsF-gsiB}}$, в процессе культивирования бактерии, содержащей тандемный промотор, функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей отношение к продукции 20 целевого продукта. Однако специалисту в данной области техники понятно, что указанный тандемный промотор $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ может быть функционально связан с любым геном, слиянием генов или опероном, имеющим отношение к продукции целевого продукта, и будет обеспечивать практически такой же профиль экспрессии указанного гена, слияния генов или оперона, как и профиль экспрессии репортерного гена *lacZ*, продемонстрированный в настоящем описании.

25 Термин «бактерия рода *Bacillus*» означает бактерию, которую относят к роду *Bacillus* в соответствии с классификацией, известной для специалиста в области микробиологии.

30 К бактериям рода *Bacillus* относятся, например, бактерии *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*, но список видов рода *Bacillus* не ограничивается ими. Предпочтительными является использование бактерии *Bacillus subtilis*.

35 Известно, что род *Bacillus* включает в себя больше 200 видов бактерий, наиболее практически важные из которых, кроме общих морфологических, физиологических культуральных свойств, отличаются определенным сходством в организации генома и механизмах экспрессии генов. В прямых экспериментах показано, что, например, промотор гена внеклеточной протеиназы *aprE* *B. subtilis* способен инициировать синтез репортерного белка в клетках бацилл различного вида, иногда 40 даже в большей степени, чем в клетках *B. subtilis* (*Genome Biology*, 5, 77, 2004).

Термин «гетерологичный ген» означает, что указанный ген выделен из хромосомы организма, отличного от используемой клетки-хозяина, например, бактерии рода *Bacillus*, в частности *B. subtilis*.

45 Термин «целевой продукт» означает любое представляющее интерес химическое соединение, продуцируемое бактерией и накапливающееся внутри клетки в растворимом или ином (например, в виде телец включения) виде, или питательной среде, в которой культивируют указанную бактерию. Целевой продукт представляет собой соединение, выбранное из группы, включающей аминокислоты, полипептиды, углеводы,

полисахариды, нуклеиновые кислоты и их производные, но не ограничивается ими.

К способам согласно настоящему изобретению относится способ получения целевого продукта, включающий стадии выращивания бактерии согласно настоящему изобретению в питательной среде с целью продукции и накопления целевого продукта, и последующего выделения указанного целевого продукта.

Согласно настоящему изобретению выращивание, сбор и очистка полезного метаболита из культуральной или подобной ей жидкости может быть осуществлена способом, подобным традиционным способам культивирования, в которых целевой продукт продуцируется с использованием микроорганизма. Питательная среда, используемая для выращивания, может быть как синтетической, так и натуральной при условии, что указанная среда содержит источники углерода, азота, минеральные добавки и, если необходимо, соответствующее количество питательных добавок, которые требуются микроорганизму для роста. К источникам углерода относятся различные углеводы, такие как глюкоза и сахароза, и различные органические кислоты. В качестве источника азота могут использоваться различные соли аммония, такие как сульфат аммония, другие соединения азота, такие как аммиак, амины, природные источники азота, такие как пептон, гидролизат соевых бобов и ферментализат микроорганизмов. В качестве минеральных добавок могут использоваться монофосфат калия, сульфат магния, хлорид натрия, сульфат железа, сульфат марганца, хлорид кальция и подобные соединения (Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirement for transformation in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1961. V. 81.P. 7411. In); C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.) *Molecular biological methods for Bacillus*// Wiley, Chichester, United Kingdom, 1990

Выращивание осуществляют предпочтительно в аэробных условиях, таких как перемешивание, ферментация с аэрацией, при температуре от 20 до 40°C, предпочтительно от 30 до 38°C. pH питательной среды находится в пределах от 5 до 9, предпочтительно от 6,5 до 7,2. pH среды может регулироваться аммиаком, карбонатом кальция, различными кислотами, основаниями и буферами. Обычно выращивание в течение от 1 до 5 дней приводит к накоплению целевого продукта в культуральной жидкости.

После выращивания твердые остатки, такие как клетки, могут быть удалены из культуральной жидкости методом центрифугирования или фильтрацией через мембрану, а затем целевой продукт может быть собран и очищен методами хроматографии, концентрирования и/или кристаллизации, фракционного осаждения солями, осаждения органическими растворителями и т.д., а также любыми сочетаниями указанных методов.

Настоящее изобретение более детально описано со ссылкой на примеры.

Примеры

Последующие примеры приведены для целей разъяснения сущности настоящего изобретения и не ограничивают каким-либо образом объем правовой охраны, определяемый формулой настоящего изобретения.

Пример 1. Конструирование гибридного промотора P_{гpsF-gsiB}.

Конструирование гибридного промотора P_{гpsF-gsiB} проводили в несколько этапов. Сначала с хромосомной ДНК *B. subtilis* провели ПЦР-амплификацию фрагмента промотора P_{гpsF} размером 193 п.н. с использованием праймера 1 (SEQ ID NO: 2), содержащего сайт узнавания рестриктазы EcoRI, и праймера 2 (SEQ ID NO: 3), содержащего на 5'-конце последовательность, комплементарную участку промотора gsiB. Нуклеотидная последовательность промотора P_{гpsF} с указанием расположения и

последовательности праймеров приведена на Фиг. 1.

ПЦР-амплификацию проводили в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 5 нг хромосомной ДНК *B. subtilis* в качестве матрицы, по 20 пмоль праймеров 1 и 2, 1х буфер для ПЦР, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) (каждый в концентрации 0.5 мМ) и 2 ед. акт. термостабильной Taq-полимеразы. Реакции проводили в термоциклере My Cycler BioRad, запрограммированном на 1 цикл при 95°C в течение 5 мин; 30 циклов, каждый при 95°C в течение 30 сек, при 56°C в течение 30 сек, при 72°C в течение 30 сек, и 1 цикл при 72°C в течение 5 мин. Продукты анализировали гель-электрофорезом в 1.2% агарозе в 1х ТАЕ (Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1989). Ожидаемый фрагмент составлял примерно 190 п.н.

На следующем этапе амплифицировали фрагмент промотора *gsiB* размером 184 п.н. с использованием праймера 3 (SEQ ID NO: 4), содержащего на 5'-конце последовательность, комплементарную участку промотора P_{tpsF} и праймера 4 (SEQ ID NO: 5). Нуклеотидная последовательность промотора P_{gsiB} с указанием расположения и последовательности праймеров приведена на Фиг. 2.

ПЦР-амплификацию проводили в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 5 нг хромосомной ДНК *B. subtilis* в качестве матрицы, по 20 пмоль праймеров 1 и 2, 1х буфер для ПЦР, смесь dNTP (каждый в концентрации 0.5 мМ) и 2 ед. акт. термостабильной Taq-полимеразы. Реакции проводили в термоциклере My Cycler BioRad, запрограммированном на 1 цикл при 95°C в течение 5 мин; 30 циклов, каждый при 95°C в течение 30 сек, при 56°C в течение 30 сек, при 72°C в течение 30 сек, и 1 цикл при 72°C в течение 5 мин. Продукты анализировали гель-электрофорезом в 1.2% агарозе в 1х ТАЕ. Ожидаемый фрагмент составлял примерно 200 п.н.

Затем с помощью ПЦР проводили состыковку двух полученных фрагментов путем их отжига друг на друга с использованием следующего режима ПЦР: ПЦР-амплификацию проводили в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей по 5 нг ДНК каждого из фрагментов, 1х буфер для ПЦР, смесь dNTP (каждый в концентрации 0,5 мМ) и 2 ед. акт. термостабильной Taq-полимеразы. Реакции проводили в термоциклере My Cycler BioRad, запрограммированном на 1 цикл при 95°C в течение 5 мин; 10 циклов, каждый при 95°C в течение 30 сек, при 52°C в течение 30 сек, при 72°C в течение 2 мин, и 1 цикл при 72°C в течение 5 мин. После этого в реакционную смесь добавляли праймер 1 (SEQ ID NO: 2), содержащий сайт узнавания рестриктазы *EcoRI*, и праймер 5 (SEQ ID NO: 6), содержащий сайт узнавания рестриктазы *BamHI*, и проводили ПЦР в следующем режиме: 25 циклов, каждый при 95°C в течение 30 сек, при 56°C в течение 30 сек, при 72°C в течение 30 сек, и 1 цикл при 72°C в течение 5 мин. Продукты анализировали гель-электрофорезом в 1,2% агарозе в 1х ТАЕ. Ожидаемый фрагмент составлял примерно 255 п.н.

Полученный объединенный ПЦР фрагмент размером 255 п.н. обрабатывали рестриктазами *EcoRI* и *BamHI* и клонировали в соответствующие сайты плазмиды *pDG268* (Cell 111: 747-756, 2002), которая содержит кассету, включающую полилинкер для клонирования, репортерный ген *lacZ* без собственного промотора и ген устойчивости к хлорамфениколу (Cm^R) (Фиг. 3). Кассета фланкирована фрагментами гена *amyE*, что позволяет проводить интеграцию вектора с клонированным фрагментом в локус *amyE* на хромосоме *B. subtilis*. Полученную плазмиду, получившую наименование *pDG268-*

Р, трансформировали в компетентные клетки штамма *E. coli* TG1. Трансформанты отбирали на LB-среде, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Плазмидную ДНК очищали в агарозном геле и элюировали с помощью колонок (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit фирмы Illustra) или шариков DNA Gel Extractionkit (компания «Fermentas»).
 5 Последовательность ДНК вставки подтверждали путем секвенирования ДНК с использованием праймера 6 (SEQ ID NO: 7) (прямой) и праймера 7 (SEQ ID NO: 8) (обратный).

На заключительном этапе проводили интеграцию полученной плазмиды, получившей наименование pDG268-P, содержащей гибридный промотор $P_{\text{rpsF-gsiB}}$, в хромосомный
 10 локус *amyE* *B. subtilis*. С этой целью перед трансформацией в клетки *B. subtilis* плазмидную ДНК pDG268-P линейаризовали с помощью рестриктазы XbaI для обеспечения интеграции в хромосому путем двойного кроссинговера вместо простого кроссинговера. Компетентные клетки штамма *B. subtilis* 168 трансформировали обработанной рестриктазой XbaI ДНК плазмиды pDG268-P и проводили отбор
 15 трансформантов на среде LB, содержащей 10 мкг/мл хлорамфеникола. Для подтверждения интеграции плазмиды в хромосомный локус *amyE* использовали индикаторную среду, содержащую амилопектиназу в концентрации 0,2 %.

Таким образом, в результате проведенных манипуляций была сконструирована плаزمида pDG268-P, содержащая гибридный промотор $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ и примыкающий к
 20 нему репортерный ген *lacZ*, что позволяет провести тестирование активности этого гибридного промотора в условиях ферментации. Нуклеотидная последовательность гибридного промотора $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ представлена на Фиг. 4.

Как видно из Фиг. 4, гибридный промотор содержит по два -35 и -10 участка и два
 25 старта транскрипции, которые, как полагают изобретатели без намерения быть ограниченными какой-либо теорией, могут попеременно использоваться на различных стадиях роста культуры и обеспечивать оптимальную экспрессию генов, находящихся под контролем этого промотора.

Пример 2. Определение эффективности функционирования гибридного тандемного
 30 промотора $P_{\text{rpsF-gsiB}}$

Для определения эффективности функционирования гибридного тандемного промотора $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ полученную на предыдущем этапе плазмиду pDG268-P, содержащую транскрипционное слияние промотора $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ с репортерным геном *lacZ*,
 35 трансформировали в клетки штамма *B. subtilis* 168, и у полученных трансформантов проводили измерение активности β -галактозидазы в условиях ферментации на полноценной среде LB. В качестве контроля использовали сконструированный параллельно вариант транскрипционного слияния гена *lacZ* с одиночным промотором P_{rpsF} . Пробы для измерения активности β -галактозидазы отбирали через 2, 5, 6, 16, 40,
 40 60 и 70 часов с начала ферментации. Результаты определения активности β -галактозидазы у исследуемых штаммов представлены на Фиг. 5.

Как следует из данных, представленных на Фиг. 5, эффективность функционирования исследуемых промоторов примерно одинакова до ранней стационарной стадии роста культуры, однако, начиная с 16 часов культивирования активность одиночного
 45 промотора P_{rpsF} начинает снижаться, а к 60-ти часам ферментации падает почти на порядок. В то же время, активность гибридного промотора $P_{\text{rpsF-gsiB}}$ в процессе ферментации продолжает нарастать и достигает максимума на поздних стадиях стационарного роста. Таким образом, сконструированный нами гибридный промотор

$P_{\text{gpsF-gsiB}}$ позволяет получать оптимальный профиль экспрессии целевого гена в ходе культивирования бактерии и представляется весьма перспективным для усиления экспрессии целевых генов, используемых для продукции полезных метаболитов.

Пример 3. Получение генетической конструкции AM2640 путем введения в хромосому штамма-реципиента *Bacillus subtilis* 168 слияния гена *hasA S. equisimilis* с геном *tuaD B. subtilis* под контролем гибридного tandemного промотора $P_{\text{gpsF-gsiB}}$.

Известно, что гены, участвующие в биосинтезе предшественников сахара для получения гиалуроновой кислоты, включают, в частности, ген *tuaD B. subtilis*, кодирующий UDP-глюкозо-6-дегидрогеназу (КФ1.1.1.22). В *Streptococcus pyogenes* оперон гиалуронатсинтазы состоит из трех генов *hasA*, *hasB* и *hasC*, кодирующих гиалуронатсинтазу, UDP-глюкозодегидрогеназу и UDP-глюкозопирофосфорилазу, соответственно (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 4658-4663, 2001). В международной публикации WO 99/51265 описан сегмент нуклеиновой кислоты, содержащий кодирующую область гиалуронатсинтазы *Streptococcus equisimilis*.

Конструирование слияния гена *hasA S. equisimilis* с геном *tuaD B. subtilis* под контролем гибридного tandemного промотора $P_{\text{gpsF-gsiB}}$ проводили в несколько этапов. Сначала ген *hasA* синтезировали химически, взяв за основу нуклеотидную последовательность гена *hasA S. equisimilis*, и клонировали в вектор pUC57. С полученной плазмидной ДНК провели ПЦР-амплификацию гена *hasA* 1250 п.н. с использованием праймера 8 (SEQ ID NO: 9), содержащего сайт узнавания рестриктазы *Bam*HI, и праймера 9 (SEQ ID NO: 10), содержащего на 5'-конце последовательность, комплементарную участку N-конца гена *tuaD* из *B. subtilis*.

ПЦР-амплификацию проводили в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 3 нг плазмидной ДНК pUC57 в качестве матрицы, по 20 пмоль праймеров 8 (SEQ ID NO: 9) и 9 (SEQ ID NO: 10), 1x буфер для ПЦР, смесь dNTP (каждый в концентрации 0.5 мМ) и 2 ед. акт. термостабильной Taq-полимеразы. Реакции проводили в термоциклере My Cycler BioRad, запрограммированном на 1 цикл при 95°C в течение 5 мин; 30 циклов, каждый при 95°C в течение 30 сек, при 58°C в течение 30 сек, при 72°C в течение 2 мин, и 1 цикл при 72°C в течение 5 мин. Продукты анализировали гель-электрофорезом в 1.2% агарозе в 1x TAE. Ожидаемый фрагмент составлял примерно 1270 п.н.

На следующем этапе с хромосомной ДНК *B. subtilis* провели ПЦР-амплификацию гена *tuaD* с использованием праймера 10 (SEQ ID NO: 11), содержащего на 5'-конце последовательность, комплементарную C-концу гена *hasA S. equisimilis*, и праймера 11 (SEQ ID NO: 12), содержащего сайт узнавания рестриктазы *Not*I.

ПЦР-амплификацию проводили в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 5 нг хромосомной ДНК *B. subtilis* в качестве матрицы, по 20 пмоль праймеров 10 (SEQ ID NO: 11) и 11 (SEQ ID NO: 12), 1x буфер для ПЦР, смесь dNTP (каждый в концентрации 0.5 мМ) и 2 ед. акт. термостабильной Taq-полимеразы. Реакции проводили в термоциклере My Cycler BioRad, запрограммированном на 1 цикл при 95°C в течение 5 мин; 30 циклов, каждый при 95°C в течение 30 сек, при 58°C в течение 30 сек, при 72°C в течение 2 мин, и 1 цикл при 72°C в течение 5 мин. Продукты анализировали гель-электрофорезом в 1.2% агарозе в 1x TAE. Ожидаемый фрагмент составлял примерно 1450 п.н.

Затем с помощью ПЦР проводили состыковку фрагментов, полученных с использованием пар праймеров 8-9 и 10-11, путем их отжига друг на друга с использованием следующего режима ПЦР: ПЦР-амплификацию проводили в 50 мкл

инкубационной смеси, содержащей по 5 нг ДНК фрагментов, полученных с использованием пар праймеров 8-9 и 10-11, 1х буфер для ПЦР, смесь dNTP (каждый в концентрации 0.5 мМ) и 2 ед. акт. термостабильной Taq-полимеразы. Реакции проводили в термоциклере My Cycler BioRad, запрограммированном на 1 цикл при 95°C в течение 5 мин; 10 циклов, каждый при 95°C в течение 30 сек, при 52°C в течение 30 сек, при 72°C в течение 2 мин, и 1 цикл при 72°C в течение 5 мин. После этого в реакционную смесь добавляли праймер 8 (SEQ ID NO: 9), содержащий сайт узнавания рестриктазы BamHI, и праймер 11 (SEQ ID NO: 12), содержащий сайт узнавания рестриктазы NotI, и проводили ПЦР в режиме: 25 циклов, каждый при 95°C в течение 30 сек, при 56°C в течение 30 сек, при 72°C в течение 2.5 мин, и 1 цикл при 72°C в течение 5 мин. Продукты анализировали гель-электрофорезом в 1.2% агарозе в 1х ТАЕ. Ожидаемый фрагмент составлял примерно 2700 п.н.

Полученный ПЦР фрагмент размером 2700 п.н. обрабатывали рестриктазами BamHI и NotI, и клонировали в соответствующие сайты полученной ранее плазмиды pDG268-P, содержащей гибридный тандемный промотор P_{gpsF-gsiB}. Полученную плазмиду, получившую наименование pDG268-PHT, трансформировали в компетентные клетки штамма E. coli TG1. Трансформанты отбирали на LB-среде, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Плазмидную ДНК очищали в агарозном геле и элюировали с помощью колонок (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit фирмы Illustra) или шариков DNA Gel Extractionkit (компания «Fermentas»). Нуклеотидную последовательность ДНК вставки подтверждали путем секвенирования ДНК с использованием праймеров 12 (SEQ ID NO: 13) (прямой) и 13 (SEQ ID NO: 14) (обратный).

На заключительном этапе проводили интеграцию полученной плазмиды pDG268-PHT в хромосомный локус amyE B. subtilis. С этой целью перед трансформацией в клетки B. subtilis плазмидную ДНК pDG268-PHT линейаризовали с помощью рестриктазы XbaI для обеспечения интеграции в хромосому путем двойного кроссинговера вместо простого кроссинговера. Компетентные клетки штамма B. subtilis 168 трансформировали обработанной рестриктазой XbaI ДНК плазмиды pDG268-P и проводили отбор трансформантов на среде LB, содержащей 10 мкг/мл хлорамфеникола. Для подтверждения интеграции плазмиды в хромосомный локус amyE использовали индикаторную среду, содержащую амилопектин в концентрации 0,2 %.

Таким образом, в результате проведенных манипуляций была получена генетическая конструкция на основе B. subtilis, содержащей в хромосоме слияние гена hasA S. equisimilis с геном tuaD B. subtilis под контролем гибридного тандемного промотора P_{gpsF-gsiB}.

Пример 4. Синтез гиалуроновой кислоты генетической конструкцией AM2640 при культивировании.

Полученную, как описано в Примере 3, генетическую конструкцию AM2640, содержащую в составе хромосомы слияние гетерологичного гена hasA S. equisimilis с геном tuaD B. subtilis под контролем гибридного тандемного промотора P_{gpsF-gsiB}, проверяли на способность синтезировать гиалуроновую кислоту при культивировании в лабораторном ферментере объемом 3 л с использованием ферментационной среды. Результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Динамика накопления гиалуроновой кислоты в культуральной жидкости полученной генетической конструкции AM2640.

Генетическая конструкция	Генотип	Время ферментации (часы)	
		24	48
		Накопление гиалуроновой кислоты (г/л)	
<i>B. subtilis</i> 168 (исходный штамм)	Дикий тип	<0.01	<0.01
AM2640	amyE:: P _{rpsF-gsiB} -hasA-tuaD	1.5	1.8

Как следует из данных Таблицы 1, полученная генетическая конструкция продемонстрировала значительно более высокий уровень накопления гиалуроновой кислоты по сравнению с исходным штаммом *B. subtilis* 168.

Хотя настоящее изобретение подробно описано выше со ссылкой на предпочтительные варианты его осуществления, для специалиста в данной области техники ясно, что могут быть сделаны различные замены и применены эквиваленты, которые не выходят за рамки настоящего изобретения. Все процитированные здесь документы являются частью настоящей заявки и включены в нее посредством отсылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ООО "ЦЕНТР ТРАНСФЕРА БИОТЕХНОЛОГИЙ ОКА-БИОТЕХ"

<120> ТАНДЕМНЫЙ ПРОМОТОР, ФУНКЦИОНИРУЮЩИЙ В БАКТЕРИИ РОДА *Bacillus*, ТРАНСФОРМИРОВАННАЯ БАКТЕРИЯ РОДА *Bacillus* - ПРОДУЦЕНТ ЦЕЛЕВОГО ПРОДУКТА, СОДЕРЖАЩАЯ УКАЗАННЫЙ ПРОМОТОР, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕЛЕВОГО ПРОДУКТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УКАЗАННОЙ БАКТЕРИИ

<130> Промотор

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 210

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Тандемный промотор PrpsF-gsiB

<400> 1

cttgaagggg aagaatatgt ggtccaagac ggagatgta ttcatttccg atttaaatgta 60

taggatgcag ttgtaaaggg acaagagctt tggataata taaaattgtg agtaatagaa 120

ttattgctcc ttgccatta tggggtttgt ttaaaagaat tgtgagcggg aatacaacaa 180

caacaccaat taaaggagga attcaaaatg 210

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Праймер 1

<400> 2

cgcgaaattct tgcgggaggc ggtat 25

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Праймер 2
 <400> 3
 5 cacaaattcctt ttaaaccsca taatgggcaa ggagcaata 39
 <210> 4
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Праймер 3
 <400> 4
 ttgccatta tggggtttgt taaaagaat tgtgagcgg 39
 <210> 5
 15 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Праймер 4
 20 <400> 5
 ttgctagtgg cttctccgcc t 21
 <210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Праймер 5
 <400> 6
 cgcggatcca ttttaaattc ctcctttaat t 31
 30 <210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Праймер 6
 <400> 7
 taagggtaac tattgccg 18
 <210> 8
 <211> 20
 40 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Праймер 7
 <400> 8
 45 taagttgggt aacgccaggg 20
 <210> 9
 <211> 37
 <212> DNA

	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Праймер 8	
	<400> 9	
5	cgcggatcct aaatgagaac attaaaaaac ctcataa	37
	<210> 10	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Праймер 9	
	<400> 10	
	ttcattttga attcctcctt tttataataa ttttttacgt gttccc	46
	<210> 11	
15	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Праймер 10	
20	<400> 11	
	tataaaaagg aggaattcaa aatgaaaaaa atagctgtca ttggaa	46
	<210> 12	
	<211> 27	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Праймер 11	
	<400> 12	
	cccgcgcccg ccgagcctag cagccgg	27
30	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
35	<223> Праймер 12	
	<400> 13	
	taagggtaac tattgccg	18
	<210> 14	
	<211> 20	
40	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Праймер 13	
	<400> 14	
45	taagttgggt aacgscagg	20

(57) Формула изобретения

1. Тандемный промотор, способный к функционированию в клетке-хозяине рода

Bacillus, содержащий последовательности нуклеотидов промотора гена *gpfF* и промотора гена *gsiB*, происходящие из *Bacillus subtilis*, причем промотор *gpfF* расположен выше по ходу транскрипции относительно промотора *gsiB*, причем указанный tandemный промотор содержит последовательность нуклеотидов, представленную в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1.

2. Клетка-хозяин – продуцент целевого продукта, относящаяся к бактерии рода *Bacillus*, содержащая tandemный промотор по п.1, функционально связанный по меньшей мере с одной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, являющийся целевым продуктом, или полипептид, необходимый для продукции целевого продукта, причем указанный tandemный промотор и указанная по меньшей мере одна функционально связанная последовательность нуклеиновой кислоты интегрированы в состав хромосомы указанной клетки-хозяина.

3. Клетка-хозяин по п.2, характеризующаяся тем, что указанная клетка-хозяин выбрана из группы, включающей клетки *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*.

4. Клетка-хозяин по п.3, характеризующаяся тем, что указанной клеткой-хозяином является клетка *Bacillus subtilis*.

5. Клетка-хозяин по п.2, характеризующаяся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, являющийся целевым продуктом, или полипептид, необходимый для продукции целевого продукта, является гетерологичной.

6. Клетка-хозяин по п.2, характеризующаяся тем, что указанный целевой продукт выбран из группы, включающей аминокислоты, полипептиды, углеводы, полисахариды, нуклеиновые кислоты и их производные.

7. Способ получения целевого продукта, включающий:

а) культивирование клетки-хозяина по любому из пп.2-6 в питательной среде, пригодной для продукции целевого продукта, и

б) выделение целевого продукта из культуральной жидкости.

8. Способ по п.7, характеризующийся тем, что указанный целевой продукт выбран из группы, включающей аминокислоты, полипептиды, углеводы, полисахариды, нуклеиновые кислоты и их производные.

сгсгаа праймер 1

tatgaggatc**ttcttgcgggcggcggtat**ggcaggagctaagaggcaggaaaagtccgc
atactcctagaagaacgcccgcgcataccgtcctcgatttctccgtccttttcaggcg

cttgaagggaaagaatatgtggtccaagacggagatgttattcatttccgatttaatgta
gaacttccctttcttatacaccagggtctgcctctacaataagtaaaggctaataacat
-35 -10

taggatgcag**TTGTAA**agggacaagagcctttgg**TATAAT**tataaaattgtgagtaatagaa
atcctacgtcaacatttccctgttctcgaaacatattatatttaacactcattatcct

RpsF M R 2

ttattgctccttgcccattatgggcccgttagtccaaa**aggagg**gcaaacagatgagaa
aataacgaggaacgggtaataccggcgaatcaggttttcctccacgtttgtctactctt
праймер 2 сааатттцтаасас

Фиг. 1

ttgcccattatggg праймер 3

atacccaatgtgtttt**gtttGTTAA**aagaatt**gtgagcGG**GAATacaacaaccaacacc
tatgggttacacaaaacaacaattttcttaacactcgccttatgttggttggtggtg

GSIB M A D N N K M S R E E A G R 14

aatt**aaaggagga**attcaaaaatggcagacaataacaaaatgagcagagaagaagcaggta
ttaatttccctccttaaAtttaccgtctgttattgttttaactcgtctcttctcgtccat

праймер 5 taggcgc

GSIB K G G E T T S K N H D K E F Y Q E I G Q 34

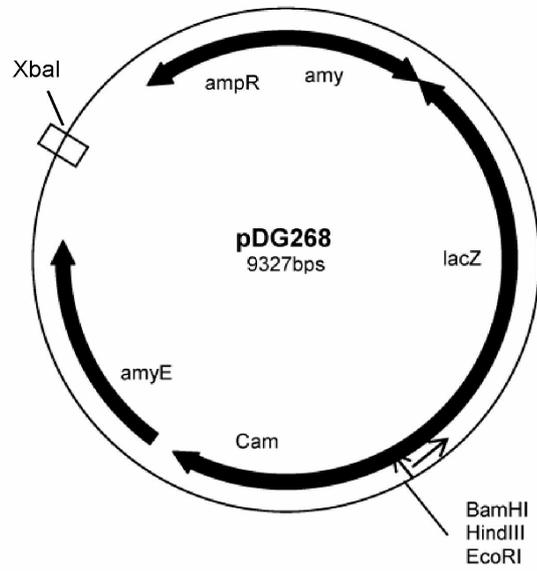
gaaaaggcggagaaacaacaagcaagaaccatgacaagaattctatcaagagattggtc
cttttccgctccttgttggctcttggactgtttcttaagatagttctctaaccag

GSIB K G G E A T S K N H D K E F Y Q E I G E 54

aaaaaggcggagaagccactagcaaaaaccatgacaagaattctatcaggaaatcggcg
tttttccgctcctcgtgatcgtttttggactgtttcttaagatagtcctttagccgc

праймер 4

Фиг. 2

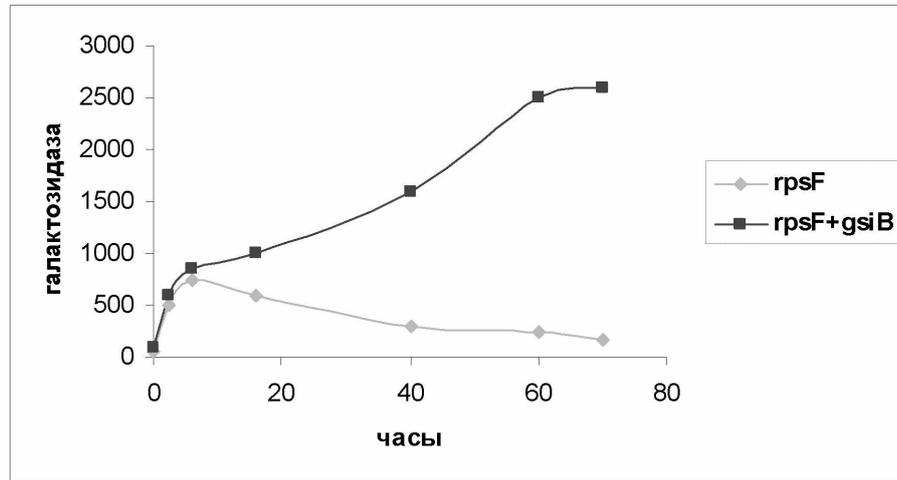


Фиг. 3

```

cttgaagggaagaatatgtggtccaagacggagatggttattcatttccgatttaatgta
                                     +1
taggatgcagTTGTAAgggacaagagctttggTATAATataaaattgtgagtaatagaa
                                     +1
ttattgctccttgcccattatggggtttGTTAAaagaattgtgagcGGGAATacaaca
                                     Met
cсаacaccaattaaaggaggaattcaaaaatg
    
```

Фиг. 4



Фиг. 5