



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109486847 B

(45) 授权公告日 2021.03.02

(21) 申请号 201811542046.0

C12N 1/21 (2006.01)

(22) 申请日 2018.12.17

C12R 1/125 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 张丹丹

申请公布号 CN 109486847 A

(43) 申请公布日 2019.03.19

(73) 专利权人 江南大学

地址 214000 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

(72) 发明人 周哲敏 崔文璟 郝文亮 韩来闯
周丽 刘中美 燕宇

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 张勇

(51) Int. Cl.

C12N 15/75 (2006.01)

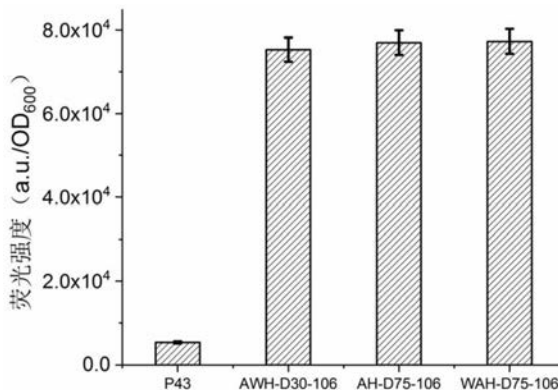
权利要求书1页 说明书5页
序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

基于人工串联启动子的枯草芽孢杆菌高效诱导表达系统

(57) 摘要

本发明公开了基于人工串联启动子的枯草芽孢杆菌高效诱导表达系统,属于基因工程技术领域。本发明利用一种高效的人工串联组成型启动子,通过将该启动子与操纵子相关元件(阻遏蛋白及其结合位点)组合设计,进而使该组成型启动子的活性受到诱导剂的调控,最终构建出受诱导剂诱导的枯草芽孢杆菌高效诱导型表达系统。结果表明,与P43强组成型启动子相比,本系统中的人工串联启动子活性高出15倍左右。并且可以通过添加不同浓度的诱导剂精准控制启动子活性。因此本高效表达系统结构简单、活性高、调控严谨,在异源蛋白高效表达和合成生物学研究中有广阔的应用前景。



1. 一种调控基因表达的元件,其由如下方法构建得到:

(1) 将核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的人工串联启动子P_{AWH-D30-106}与目的蛋白基因表达框克隆至pHT01载体上,替换原载体上的P_{spac}启动子序列;

(2) 阻遏蛋白为LacI,位于启动子转录起始位点下游的与阻遏蛋白结合的DNA片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示,将阻遏蛋白LacI的结合片段设计在引物GGAATTGTGAGCGGATACAATTCCATGCTTTTATTCGAACATCATATTTAAAG/GGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCTAGTGTATCAAT TCCACGATTTTTTC上,利用全质粒PCR方法将核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示的LacI蛋白结合位点克隆至启动子P_{AWH-D30-106}转录起始位点的下游;

或(2)阻遏蛋白为Xy1R,位于启动子转录起始位点下游的与阻遏蛋白结合的DNA片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,利用引物AGTTAGTTTATTGGATAAAACAACTA ACTATGCTTTTATT CGAACATCATATTTAAAG/AGTTAGTTTGTGTTATCCAATAAACTA ACTTAGTGTATCAATTCCACGATTTTTTC将核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示的阻遏蛋白Xy1R结合位点克隆至启动子P_{AWH-D30-106}转录起始位点的下游,同时将pHT01载体骨架上的*lacI*基因替换为*xy1R*基因。

2. 包含权利要求1所述元件的基因工程菌。

3. 一种调控目的基因表达的方法,其特征在于,将权利要求1所述的元件导入宿主中,在含有诱导剂的环境下培养,通过诱导剂调控目的基因表达。

4. 权利要求1所述的元件在制备目的蛋白中的应用,其特征在于,将所述元件导入宿主细胞中,进行培养,并使用诱导剂进行诱导表达。

5. 权利要求1所述的元件在食品、化工或制药领域的应用,其特征在于,所述应用为将所述元件导入宿主细胞中,进行培养,并使用诱导剂进行诱导表达。

基于人工串联启动子的枯草芽孢杆菌高效诱导表达系统

技术领域

[0001] 本发明涉及基于人工串联启动子的枯草芽孢杆菌高效诱导表达系统,属于基因工程技术领域。

背景技术

[0002] 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。启动子是构建高效表达系统的最基本的元件,启动子的活性直接决定了表达系统的效率。启动子从功能上主要分为组成型启动子和诱导型启动子两类。组成型启动子在菌体的生长各个阶段都可以表达外源基因,而诱导型启动子在没有被诱导时表现无活性或者低活性,在加入诱导剂之后启动子的活性大幅提高进而高效表达外源基因。诱导型启动子由于其活性可控而被广泛应用,人们可以通过调控加入诱导剂的试剂和浓度控制外源基因的表达时间和强度。目前在枯草芽孢杆菌当中应用较为广泛的主要有IPTG诱导系统和木糖诱导系统,其中,IPTG诱导系统主要基于pHT系列载体构建而成,使用的是非天然的杂合启动子和大肠杆菌的LacI阻遏蛋白和结合位点;而木糖诱导系统通常使用天然的P_{xy1A}启动子和Xy1R阻遏蛋白。

[0003] 虽然IPTG、木糖等诱导系统已经广泛使用,但是由于启动子活性受限,外源蛋白的表达量低始终是限制系统应用的一个关键问题。人们通常采用改造天然启动子和重新设计人工启动子两种策略来提高启动子的活性和稳定性。但是高活性启动子往往无法用于构建高效诱导型外源基因表达系统,主要是由于启动子和基因表达调控系统的其他元件往往不兼容,高活性的启动子往往不能被阻遏蛋白有效地抑制活性。因此如何基于高效启动子构建严谨调控的诱导型外源基因表达系统是目前新型表达系统的开发热点。

发明内容

[0004] 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:(1)载体;(2)人工串联启动子;(3)阻遏蛋白基因;(4)位于启动子转录起始位点下游的能与阻遏蛋白结合的DNA片段;所述人工串联启动子包括P_{A_{WH}-D30-106}、P_{A_H-D75-106}或P_{A_H-D75-106},核苷酸序列分别如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3所示。

[0005] 在本发明的一种实施方式,所述阻遏蛋白包括LacI、Xy1R、AraC或TetR。

[0006] 在本发明的一种实施方式,所述阻遏蛋白为LacI时,基因表达受到IPTG的诱导作用。

[0007] 在本发明的一种实施方式,所述阻遏蛋白为Xy1R时,基因表达受到木糖的诱导作用。

[0008] 在本发明的一种实施方式,所述阻遏蛋白为AraC时,基因表达受到阿拉伯糖的诱导作用。

[0009] 在本发明的一种实施方式,所述阻遏蛋白为TetR时,基因表达受到四环素的诱导作用。

- [0010] 在本发明的一种实施方式,所述载体包括pHT-01。
- [0011] 本发明的第二个目的是提供一种重组质粒,表达上述调节基因表达的元件
- [0012] 本发明的第三个目的是提供一种基因工程菌,表达上述重组质粒。
- [0013] 本发明的第四个目的是提供一种调控目的基因表达的方法,将上述调节基因表达的元件与目的基因共表达。
- [0014] 本发明的第五个目的是提供上述调控基因表达的元件在制备目的蛋白中的应用。
- [0015] 本发明的第六个目的是提供上述调控基因表达的元件在食品、化工或制药领域的应用。
- [0016] 本发明的第七个目的是提供上述基因工程菌在制备目的蛋白中的应用。
- [0017] 本发明的第八个目的是提供上述基因工程菌在食品、化工或制药领域的应用。
- [0018] 本发明利用一种高效的人工串联组成型启动子,通过将启动子与操纵子相关元件(阻遏蛋白及其结合位点)组合设计,进而使该组成型启动子的活性受到诱导剂的调控,最终构建出受诱导剂诱导的枯草芽孢杆菌高效诱导型表达系统。结果表明,与P43强组成型启动子相比,本系统中的人工串联启动子活性高出15倍左右。并且可以通过添加不同浓度的诱导剂精准控制启动子活性。因此本高效表达系统结构简单、活性高、调控严谨,在异源蛋白高效表达和合成生物学研究中有广阔的应用前景。

附图说明

- [0019] 图1:PAWH-D30-106、PAH-D75-106和PAH-D75-106与P43启动子活性比较。
- [0020] 图2:IPTG诱导表达系统构建和表征,a:IPTG诱导系统原理;b:IPTG诱导系统表征;c:SDS-PAGE验证sfGFP表达。
- [0021] 图3:xylose诱导表达系统构建和表征,a:xylose诱导系统原理;b:xylose诱导系统表征;c:SDS-PAGE验证sfGFP表达。

具体实施方式

- [0022] 1、质粒构建方法:设计包含启动子序列的引物,以pHT01质粒作为骨架模板,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°C1min,循环为变性98°C30s,退火50°C30s,延伸72°C1min,共30个循环,最后72°C延伸10min。之后用限制性内切酶DpnI消化去除质粒模板,将PCR产物纯化。同样方法扩增需要克隆的片段,之后用Infusion重组方法将多个片段进行组装,转化大肠杆菌JM109感受态细胞。
- [0023] 2、sfGFP荧光强度的检测方法:样品12000×g离心2min,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200μL至96孔酶标板,放入Synergy™ H4荧光酶标仪检测荧光。激发光485nm,吸收光528nm,检测荧光。
- [0024] 3、培养基:LB培养基(L⁻¹):胰蛋白胨10g,NaCl 10g,酵母提取物5g,pH 7.0,配制固体培养基时添加琼脂粉20g。
- [0025] 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2mL的SPI培养基中,37°C摇床培养12h-14h;从培养物中取100μL,接种至5mL SPI培养基中,37°C摇床培养4-5h后开始测OD₆₀₀。当OD₆₀₀约为1.0时,移取200μL菌液转接至2mL的SPII培养基中,于37°C、

100r · min⁻¹摇床孵育1.5h;向管中加入20μL 100×EGTA(乙二醇双(α-氨基乙基醚)四乙酸)溶液,于37℃、100r · min⁻¹摇床中培养10min后分装500μL每1.5mL离心管;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℃、100r · min⁻¹的摇床中培养2h;培养结束,吸取菌液约200μL均匀涂相应的选择性平板,37℃培养12h-14h。

[0026] 5、SDS-PAGE检测:取200μL菌液,12000×g离心2min,收集菌体。用200μL含有20μg/mL浓度溶菌酶的20mM Tris-HCl (pH8.0)缓冲液重悬浮,37℃孵育30min以裂解细胞壁。之后加入50μL 10×Loading Buffer,沸水煮10min后12000×g离心5min。取30μL上清样品电泳检测,经考马斯亮蓝R250染色与脱色液脱色后分析电泳结果。

[0027] 实施例1:人工串联启动子活性鉴定

[0028] P_{AWH-D30-106}、P_{AH-D75-106}和P_{AH-D75-106}启动子均为人工构建的核心区串联杂合启动子。

[0029] P_{AWH-D30-106}、P_{AH-D75-106}、P_{AH-D75-106}启动子的序列分别如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3所示。

[0030] 将启动子P_{AWH-D30-106}与sfGFP (Genbank ID:AVR55189.1)表达框用表1中的引物克隆至pHT01载体上,替换原载体上的P_{spac}启动子序列。将该表达载体转化至枯草芽孢杆菌168中,培养重组菌20h,检测sfGFP的表达水平。以相同的方式分别检测含P_{AH-D75-106}和含P_{WAH-D75-106}重组质粒的重组菌培养液的sfGFP的表达水平。

[0031] 经过与常用的强组成型启动子P43表达sfGFP的情况作比较,结果显示,P_{AWH-D30-106}、P_{AH-D75-106}、P_{WAH-D75-106}启动子表达sfGFP的水平远比P43启动子高,达到P43的15倍左右(图1和表2)。说明启动子P_{AWH-D30-106}、P_{AH-D75-106}、P_{WAH-D75-106}是活性非常高的强组成型启动子。

[0032] 表1表达载体构建引物

引物	序列(5' -3') ^a
PpHT-AWH-i1	CTAACGGAAAAGGGATTTTTGAGTGATCTTCTCAAAAATAC
PpHT-AWH-i2	CCTCGTATGTTTCAAAGAGTGCACCATATGCGG
PpHT-AWH-v1	CATATGGTGCACCTTTTGAACATACGAGGCTAATATCGG
PpHT-AWH-v2	AAGATCACTCAAAAATCCCTTTTCCGTTAGCTTTTTTC

[0034] 表2人工串联启动子活性

启动子	荧光强度(a.u./OD ₆₀₀)
P43	5370
P _{AWH-D30-106}	75340
P _{AH-D75-106}	77014
P _{WAH-D75-106}	77334

[0036] 实施例2:IPTG诱导型表达系统的构建和表征

[0037] lacI的结合位点序列为GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC (SEQ ID NO.4),将其设计在表3中的引物P_{AWH-lac0-1}/P_{AWH-lac0-2}上,利用全质粒PCR方法将LacI蛋白结合位点克隆至启动子P_{AWH-D30-106}转录起始位点的下游,同时利用pHT01载体骨架上本身有的lacI模块表达阻遏蛋白LacI,这样就构建出IPTG诱导型的表达系统(图2a)。

[0038] 以sfGFP作为目的蛋白表征表达量高低,构建得到质粒pHT-AWH-lac-sfGFP。将该重组质粒转化至枯草芽孢杆菌168中,在LB培养基中37℃,200rpm下培养重组菌,24h后检测sfGFP的表达水平。

[0039] 在没有IPTG诱导剂时,阻遏蛋白LacI能有效结合在启动子转录起始位点下游,阻止RNA聚合酶对下游基因的转录,从而抑制下游基因的表达。当加入IPTG时,启动子的活性被释放。加入IPTG浓度越高(不超过1mM),启动子活性越强。因此,可以通过调节IPTG的用量获得不同强度的下游基因表达强度(图2b和表4)。SDS-PAGE检测也证明了不同浓度诱导剂IPTG的添加获得了不同强度的sfGFP表达(图2c)。

[0040] 表3 IPTG诱导表达载体构建引物

引物	序列(5' -3') ^a
PAWH-lac0-1	GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCATGCTTTTATTCGAACATCATATTTAAAG
PAWH-lac0-2	GGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCTAGTGATCAATTCCACGATTTTTTC

[0042] 表4不同浓度的IPTG诱导下,sfGFP表达情况

条件	荧光强度(a.u./OD600)
pHT-01	179
pHT-AWH(未组合操纵子)	6635
0mM IPTG	516
0.01mM IPTG	929
0.05mM IPTG	1993
0.1mM IPTG	2665
0.5mM IPTG	4132
1mM IPTG	4163

[0044] 实施例3:xylose诱导型表达系统的构建和表征

[0045] 利用表3中的引物将阻遏蛋白Xy1R结合位点克隆至启动子P_{AWH-D30-106}转录起始位点的下游,同时将pHT01载体骨架上的lacI基因替换为xy1R基因,构建Xy1R表达模块,这样就构建出xylose诱导型的表达系统。

[0046] 以质粒pHT-AWH-lac-sfGFP为模板,用引物PAWH-xy1R-v1/PAWH-xy1R-v2(表5)扩增载体骨架,用引物PAWH-xy1R-i1/PAWH-xy1R-i2扩增xy1R基因,将扩增的两片段重组,获得lacI被xy1R替换的质粒,再利用引物PAWH-xy10-1/PAWH-xy10-2,通过全质粒PCR的方法将lacI的结合位点替换为xy1R的结合位点AGTTAGTTTATTGGATAAACTAACT(SEQ ID NO.5),最终构建得到质粒pHT-AWH-xy1-sfGFP。

[0047] 将该重组质粒转化至枯草芽孢杆菌168中,在LB培养基中37℃,200rpm下培养重组菌,24h后检测sfGFP的表达水平。

[0048] 在没有诱导剂xylose时,阻遏蛋白xy1R能有效结合在启动子转录起始位点下游,阻止RNA聚合酶对启动子的转录,从而抑制下游基因的表达(图3a)。当加入不同浓度的xylose时,启动子的活性逐渐被释放,因此可以通过调节xylose浓度获得不同强度的下游基因表达强度。随着xylose的浓度的逐步提升,sfGFP表达产生的荧光信号随之增强,当xylose浓度达到或超过1%(W/V)时,sfGFP的表达水平甚至高于组成型表达sfGFP的对照pHT-AWH(图3b和表6)。进一步的SDS-PAGE检测进一步证明了不同浓度诱导剂xylose的添加获得了不同强度的sfGFP表达(图3c)。

[0049] 表5 xylose诱导表达载体构建引物

[0050]

引物	序列(5'-3') ^a
PAWH-xyIO-1	AGTTAGTTTATTGGATAAACAACTAACTATGCTTTTATTTCGAACATCATATT TAAAG
PAWH-xyIO-2	AGTTAGTTTGTTTATCCAATAAACTAACTTAGTGTATCAATTCCACGATTTTT TC
PAWH-xyIR-i1	TTAATTGCGTTGCGCCTAACTTATAGGGGTAACACTTAAAAAAG
PAWH-xyIR-i2	AGGGAGACGATTTTGATGGTTATTATTCAAATTGCAGATC
PAWH-xyIR-v1	TTGAATAATAACCATCAAATCGTCTCCCTCC
PAWH-xyIR-v2	ACCCCTATAAGTTAGGCGCAACGCAATTAATG

[0051] 表4不同木糖浓度下,sfGFP表达情况

[0052]

条件	荧光强度 (a. u. /OD ₆₀₀)
pHT-01	179
pHT-AWH (未组合操纵子)	6635
0% 木糖	393
0.01% 木糖	2263
0.05% 木糖	3808
0.1% 木糖	4322
0.5% 木糖	5480
1% 木糖	7326
2% 木糖	9556

[0053] 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。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 江南大学
- [0003] <120> 基于人工串联启动子的枯草芽孢杆菌高效诱导表达系统
- [0004] <160> 17
- [0005] <170> PatentIn version 3.3
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 245
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工合成
- [0010] <400> 1
- [0011] aagcaaaaaa agtttgactc ggtatnttaa ctatgttaat attgtaaaat gccaatgtat 60
- [0012] attttataaa aaaattgaaa ctttttgaaa cgaagctcgt atacatacag accggtgaag 120
- [0013] gtgtaactat atcctatntt ttcaaaaaat atnttataaaa cgagcaggat ttcagaaaaa 180
- [0014] atcgtggaat tgatacacta atgctnttat tcgaacatca tntttaaagt acaggaggtc 240
- [0015] cacat 245
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 230
- [0018] <212> DNA
- [0019] <213> 人工合成
- [0020] <400> 2
- [0021] aagcaaaaaa agtttgactc ggtatnttaa ctatgttaat attgtaaaat gccaatgtat 60
- [0022] tntttatntta ctttatgccc gaaatgaaag ctttatgacc taattgtgta actatntcct 120
- [0023] atnttttcaa aaaatnttnt aaaaacgagc aggatntcag aaaaaatcgt ggaattgata 180
- [0024] cactaatgct tnttatcgaa catcatntt aaagtacagg aggtccacat 230
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 290
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工合成
- [0029] <400> 3
- [0030] attttataaa aaaattgaaa ctttttgaaa cgaagctcgt atacatacag accggtgaag 60
- [0031] aagcaaaaaa agtttgactc ggtatnttaa ctatgttaat attgtaaaat gccaatgtat 120
- [0032] tntttatntta ctttatgccc gaaatgaaag ctttatgacc taattgtgta actatntcct 180
- [0033] atnttttcaa aaaatnttnt aaaaacgagc aggatntcag aaaaaatcgt ggaattgata 240
- [0034] cactaatgct tnttatcgaa catcatntt aaagtacagg aggtccacat 290
- [0035] <210> 4
- [0036] <211> 25
- [0037] <212> DNA
- [0038] <213> 人工合成

- [0039] <400> 4
[0040] ggaattgtga gcggataaca attcc 25
[0041] <210> 5
[0042] <211> 29
[0043] <212> DNA
[0044] <213> 人工合成
[0045] <400> 5
[0046] agttagttta ttggataaac aaactaact 29
[0047] <210> 6
[0048] <211> 42
[0049] <212> DNA
[0050] <213> 人工合成
[0051] <400> 6
[0052] ctaacggaaa agggatTTTT gagtgatcct ctcaaaaaat ac 42
[0053] <210> 7
[0054] <211> 33
[0055] <212> DNA
[0056] <213> 人工合成
[0057] <400> 7
[0058] cctcgtatgt ttcaaagagt gcaccatag cgg 33
[0059] <210> 8
[0060] <211> 40
[0061] <212> DNA
[0062] <213> 人工合成
[0063] <400> 8
[0064] catatggtgc actctttgaa acatacgagg ctaatatcgg 40
[0065] <210> 9
[0066] <211> 37
[0067] <212> DNA
[0068] <213> 人工合成
[0069] <400> 9
[0070] aagatcactc aaaaatccct tttccgtag ctttttc 37
[0071] <210> 10
[0072] <211> 54
[0073] <212> DNA
[0074] <213> 人工合成
[0075] <400> 10
[0076] ggaattgtga gcggataaca attccatgct tttattcgaa catcatatTT aaag 54
[0077] <210> 11

- [0078] <211> 51
[0079] <212> DNA
[0080] <213> 人工合成
[0081] <400> 11
[0082] ggaattgtta tccgctcaca attcctagtg tatcaattcc acgatttttt c 51
[0083] <210> 12
[0084] <211> 58
[0085] <212> DNA
[0086] <213> 人工合成
[0087] <400> 12
[0088] agttagttaa ttggataaac aaactaacta tgcttttatt cgaacatcat atttaaag 58
[0089] <210> 13
[0090] <211> 55
[0091] <212> DNA
[0092] <213> 人工合成
[0093] <400> 13
[0094] agttagtttg tttatccaat aaactaactt agtgtatcaa ttccacgatt ttttc 55
[0095] <210> 14
[0096] <211> 44
[0097] <212> DNA
[0098] <213> 人工合成
[0099] <400> 14
[0100] ttaattgcgt tgcgcctaac ttataggggt aacacttaa aaag 44
[0101] <210> 15
[0102] <211> 40
[0103] <212> DNA
[0104] <213> 人工合成
[0105] <400> 15
[0106] agggagacga ttttgatggt tattattcaa attgcagatc 40
[0107] <210> 16
[0108] <211> 32
[0109] <212> DNA
[0110] <213> 人工合成
[0111] <400> 16
[0112] ttgaataata accatcaaaa tcgtctcct cc 32
[0113] <210> 17
[0114] <211> 32
[0115] <212> DNA
[0116] <213> 人工合成

[0117] <400> 17

[0118] acccctataa gttaggcgca acgcaattaa tg 32

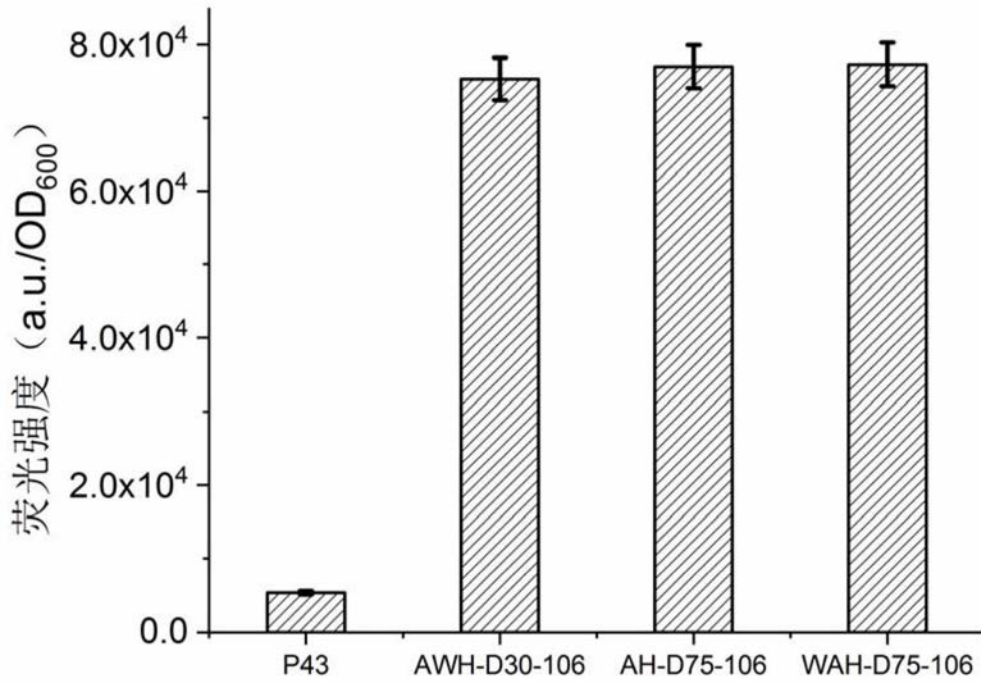
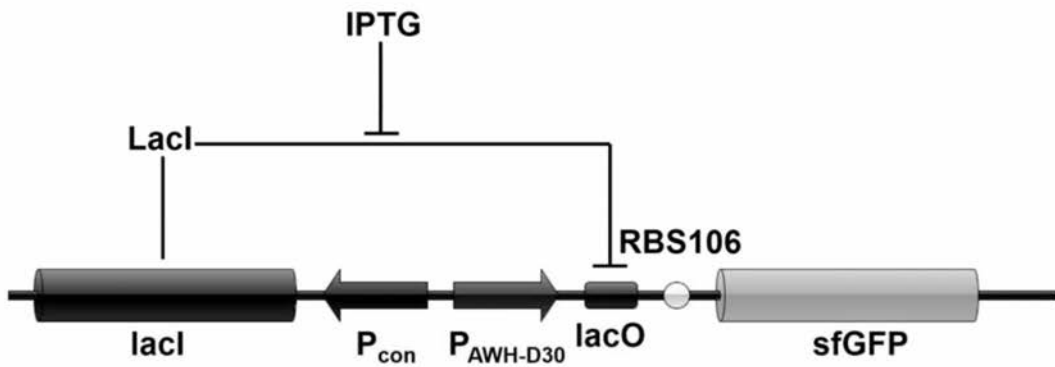
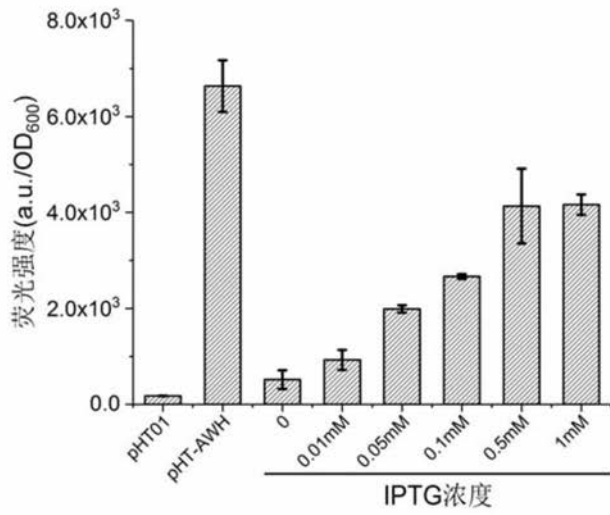


图1

a



b



c

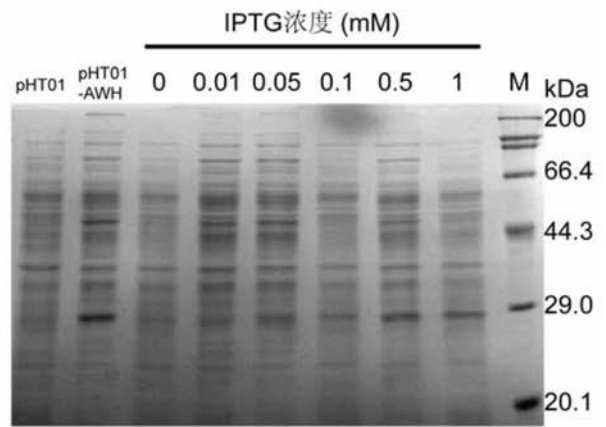
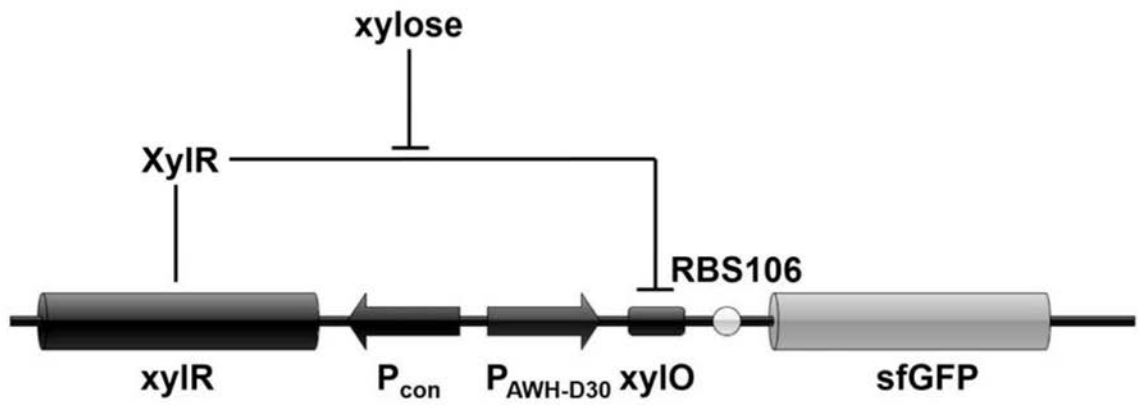
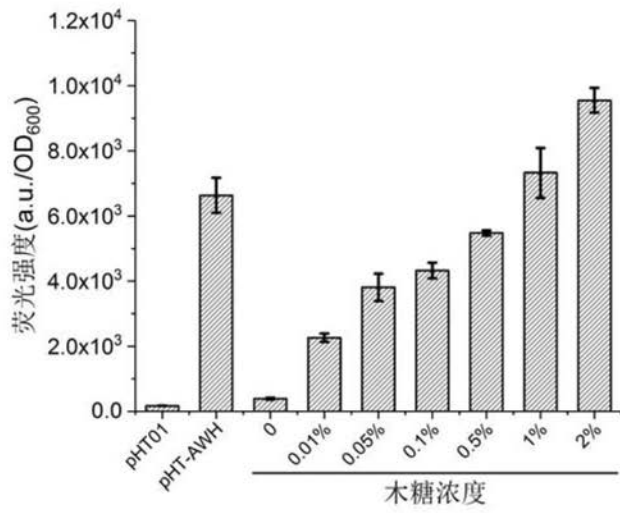


图2

a



b



c



图3