[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510057455.8

[51] Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 17/02 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 7 月 12 日

[11] 公开号 CN 1800363A

[22] 申请日 2005.12.21

[21] 申请号 200510057455.8

[71] 申请人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路 1 号

[72] 发明人 谢建平 胡昌华 廖国建 余 艳
刘雪梅

[74] 专利代理机构 重庆华科专利事务所

代理人 康海燕

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

产紫杉醇微生物饱和突变体库的构建和高产紫杉醇菌株的选育方法

[57] 摘要

本发明涉及一种利用包括转座子突变方法构建产紫杉醇微生物的饱和突变体库和利用紫杉醇抗体酶联免疫筛选高产紫杉醇突变菌株的方法。

1. 一种构建产紫杉醇微生物饱和突变体库的方法，其特征是利用带有颜色标记、抗性基因或营养缺陷型标记的基因的转座子体内或体外转座产紫杉醇的微生物。

2. 权利要求1所述的构建产紫杉醇微生物饱和突变体库的方法，其特征在于：产紫杉醇的微生物包括细菌、真菌和放线菌。

3.权利要求 2 所述的构建产紫杉醇微生物饱和突变体库的方法，其特征在于：真菌包括青霉属、曲霉属。

4. 权利要求2所述的构建产紫杉醇微生物饱和突变体库的方法，其特征在于：细菌包括欧文氏菌。

5.一种从突变体库筛选紫杉醇产量变异菌株的方法，其特征是利用紫杉醇抗体进行酶联免疫检测。

产紫杉醇微生物饱和突变体库的构建和高产紫杉醇菌株的选育方法

技术领域

本发明属于工业微生物和药用微生物领域，涉及一种利用包括转座子突变方法构建产紫杉醇微生物饱和突变体库和利用紫杉醇抗体酶联免疫筛选高产紫杉醇突变菌株的方法。

背景技术

紫杉醇（taxol）是在20世纪60年代早期从太平洋紫杉中分离出来的一种二帖类生物碱，经对其化学、药理方面的研究，表明其具有广泛的抗癌活性，如对乳腺癌、子宫癌等多种癌症都具有较好的疗效。1992年美国FDA正式批准其上市，从此，紫杉醇成为抗癌新药的热点。过去这种药靠从红豆杉树中提取，但由于该树种十分稀少，生长缓慢，濒临灭绝，这种药化学结构复杂，分子量大，难以用化学合成法合成，细胞培养也未产业化，因此该药价格十分昂贵，国际市场上其针剂纯品价格高达600万美元/kg。1993年，美国科学家发现红豆杉内生真菌也能产紫杉醇。这为解决紫杉醇药源危机提供了理想的途径。1996年，加拿大Novopharm制药公司应用*Alternaria alternta*菌种发酵生产紫杉醇技术取得历史性进展，并达到工业化要求，使得加拿大成为世界上第一个成熟应用真菌发酵生产紫杉醇的国家。真菌发酵生产紫杉醇是最理想但也异常艰难的科研开发之路。国内华菌公司于97年粗筛到3株紫杉醇的内生真菌；后经诱变、育种终于在98年获得了高产菌Phargen AA-013，菌种表达率高达120～227mg/L。周东坡教授采用从红豆杉树中分离得到的真菌，通过发酵法产生紫杉醇，摇瓶水平可高达400μg/L，比国际最高水平高出2倍多，发酵液中紫杉醇产率达到448.52ug/L。

为了产业化，除了优化产紫杉醇微生物的培养基和条件、还需要进一步提高产紫杉醇微生物的产量，利用各种育种方法可能获得紫杉醇高产菌株。突变体库就是由某种方法产生的、包含各种不同基因突变的群体。饱和突变体库是指理论上该基因组的每个基因都发生了突变的突变体库。根据公式 P=1-(1-(L／C)cf 可以预测构建饱和突变体库所需的克隆数，P是发现任意一个基因插入突变的概率，L代表基因的平均长度，C是单倍体基因组的大小，n是插入突变的克隆数，f是每个克隆平均插入位点数。

转座系统在当代遗传学和分子生物学研究中有很大的应用价值. 它不仅能作为反向遗传学的工具，将外源基因转入受体基因组而使受体产生表型的变化，同时，其又因为能通过随机的插入突变使内源基因失活而成为正向遗传学研究中的新宠。转座子是美国遗传学家McClintock在20世纪40年代首先在玉米中发现的可从染色体的一个位置跳到另一位置，乃至从一条染色体跳到另一染色体上的特殊基因，广泛存在于几乎所有原核和真核生物中。在结构上,转座子具有共同特征，即两端是重复序列，有转座酶的识别

位点，中间是结构基因，编码转座酶和另外一些蛋白质。根据转座机制，转座子分为两大类：一类是 DNA 介导转座的转座子，以复制或直接切除两种方式获得可移动片段，重新插入基因组 DNA 中，有人形象地称它们的转座为剪切和粘贴模式（cut-and-paste mode）。这类转座子一般包括两种结构形式，如玉米的 Ac/Ds。Ac 编码转座酶，能自行转座，称为自主转座元件；Ds 多是 Ac 的缺失体，完全或部分失去了编码转座酶的基因，不能编码转座酶，但仍保留有两侧的重复序列，能被转座酶识别，因此能在 Ac 编码的转座酶的作用下转座，称为非自主转座元件，类似的还有玉米的 En/Spm 和 Mu 等。另一类是 RNA 介导转座的逆转座子，通过转录合成 mRNA，再逆转录合成新的转座元件整合到基因组中完成转座，每转座一次拷贝数增加一份，被称为复制和粘贴模式（cut-and-paste mode）。它们在基因组中拷贝数高，是构成基因组的主要成分（通常超过总 DNA 的一半）。

转座子标签法 利用转座子能整合进入昆虫或微生物基因组中，常常能破坏一个正常基因的功能，导致一种或几种突变表型标记，形成所谓转座子标签（transposon tag）。通过这种转座子标签，可跟踪杂交后代，并以转座子作探针，从基因组文库中定位基因，对基因进行突变和标记，最终达到分离和克隆基因的目的。这种方法被称为“转座子标签法”（transposon tagging）。转座子标签的设计基本原则是只保留转座子上，完成转座过程的必需片段,同时加入筛选标记与报道基因。报道基因不含有启动子,只有在转座标签插入 ORF (open reading frames) ,在其启动子控制下报道基因得以表达,因而用于检测直接插入基因内部的标签。筛选标记和常规质粒一样有抗性标记和营养缺陷型标记两种。通过分离转座子和突变基因的侧翼区可鉴定该基因。转座子基因标签法已用于克隆丝状真菌基因。转座子标签法已经用于克隆丝状真菌基因。常用的有 2 种途径：1、将构建的带有转座子的载体，转化入异源寄主，从而克隆目标基因。2、利用寄主的内生同源转座子克隆基因，不必构建载体。转座子标签法已被用于果蝇分离出了十几个基因，在哺乳动物中利用反转录转座子载体也分离定位了一些基因，在植物中利用玉米 Ac/Ds 系统，不仅在玉米而且在异源植物中也得到了广泛应用。作为生物标签的一种，除了不需要知道基因的产物，也无须了解基因的表达特点以外，转座子的优点表现在：（1）插入是完整的元件，便于分子分析；（2）可从插入位点切除，产生回复突变，我们不仅可据此确认真正由转座子引起的突变，还可进一步验证突变基因的功能；（3）通过不断跳动产生新的突变，相对较少的起始转化系就可获得整个基因组的饱和突变，大大减少了工作量；（4）还可以应用于转化效率不高的微生物，通过杂交或繁殖获得新的插入突变。

标记系统 转座子捕捉插入突变载体如果左右边界内只包含一个选择标记基因的载体。在用这类载体建立的突变体库中，能得到部分基因功能缺失的突变体(1oss-of-function mutant)，但不能得到有功能冗余及致死效应的基因的突变体，也很难研究具有高度多效

性的基因。插入突变只有产生了明显表型变化时才能被发现利用，然而在真核生物中，多数基因在被插入或破坏时，并没有明显的表型变化，其中包括功能冗余基因、多发育阶段表达基因和受环境条件诱导的基因。转座子捕捉就是为了标记和克隆这些基因设计的，在非自主转座元件上融合进一个表达受外界转录信号调节的报告基因，在适当的时候，报告基因表达，不仅能反应转座子的位置，而且它的表达模式还能反应标记基因的表达活性及调节。为了弥补这方面的不足，开发出了转座子捕捉系统如增强子捕捉（enhancer trap)、启动子捕捉（promoter trap）和基因捕捉（gene trap）三种模式。这三种载体通过插入的报告基因的表达来研究被插入基因的表达模式，而且对致死基因也可以在杂合状态下进行研究。Enhancer trap 中的报告基因与一个微小的启动子相连，单独靠它无法启动报告基因的表达，或者表达效率很低。只有插入到基因组的合适位置，利用被插入基因的增强子才能使报告基因表达。所以，报告基因的表达与否，一方面反映了转座子插入的位置，另一方面反映了被插入基因的表达特性。例如，报告基因呈现时空特异性表达，则可以推断被插入的基因是时空特异性表达的。Promoter trap 和 enhancer trap 类似，不同在于 promoter trap 中没有启动子部分。Gene trap 与 promoter trap 类似，不过在 gene trap 中报告基因前多了个剪切接受位点(splice acceptor)，当其插入到一个基因的内含子时，能与被插入基因外显子同时转录，被插入基因表达时，报告基因也能表达。激活标签则是在靠近转座子边界处有四个串联的 CaMV35S 增强子，当其插入到一个基因的附近引起该基因的过量表达，可以产生获得功能性(gain-of-function)的突变体。mariner 转座子在许多昆虫中大量存在，不易分清到底是哪一个拷贝引起的基因突变（外源转座子和内源转座子），从而不能将突变表型与突变基因快速联系起来，而且寻找整合的后代也需要大量的工作。因此，寻找一种较易识别定位转座子的插入位置，鉴定转座子整合后代的标记基因非常重要。水母的绿色荧光蛋白基因（GFP）是一个很好的选择标记。通过将 GFP 基因插入到 mariner 转座子中间，随着 mariner 转座子一起整合到基因组中，可在荧光显微镜下观察到绿色荧光的有无，以此来寻找整合后代和分析转座子整合插入的初步位置。

激活标签 对于那些插入突变不能导致明显表型变化的基因，还可以用激活标签进行标记，做法就是使 DNA 或转座子带上强启动子，增强靶位点附近基因的转录，使它们过表达或异位表达。除了增强基因表达，激活标签还和一般标签一样，插入一个基因内部时，会造成基因断裂，引起插入突变。如果激活标签反向插入到基因上游，有时会通过反义表达造成基因沉默。多种功能合而为一，大大提高了激活标签标记基因的效率，再加上转座子不断跳跃的特点，可以预计，带有激活标签的转座子必将成为功能基因组研究的最有效工具之一。与转座子结合的睡美人转座酶可以将特殊基因转移进目标生物体内。通过扩增旁侧序列就能很快的找到引起突变体的遗传基础。对于旁侧序列的分析，

目前反向PCR(inverse PCR)或TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)等方法使用得比较普遍。

在功能基因组时代，研究大量基因需要系统进行，因此建立涵盖广泛的突变体库非常必要。目前PCR检测是反向遗传学最有效的途径，通过建立插入突变侧翼序列库就变得尤为重要，在整个微生物功能基因组序列已知的基础上，只需把插入突变侧翼序列与基因组序列加以比较就能很容易地找出突变的基因，并在染色体上绘出插入位点的位置。这样任何一个基因的插入突变都可以通过计算机确认，因此侧翼序列库将是反向遗传学研究的最有效的工具，不仅能确认突变，而且能发现新的基因。

发明内容

本发明的目的在于提供，1. 一种构建产紫杉醇微生物饱和突变体库的方法；2.一种从突变体库筛选紫杉醇产量变异菌株的方法，其特征是利用紫杉醇抗体进行酶联免疫检测。

实现上述目的的基本技术路线为：

总体技术方案是利用转座子、化学物质如NTG、EMS、羟胺等和物理因素如UV、辐射等、生物因素如mu噬菌体、质粒、转座子和插入序列等构建产紫杉醇微生物在基因组规模的饱和突变体库，尤其是利用转座子突变系统构建。

1.菌株及其培养：本技术方案采用的菌株包括但不限于下列产紫杉醇微生物，*Taxomyces andreanae*(紫杉霉属)、*Monochaetia sp*(盘单毛孢属)、*Fusarium lateritium*(镰刀霉属)、*Alternaria sp*(交链孢属)、*Pestalotiopsis microspora*(盘多拉毛霉属)、*Pestalotiopsis microspora*(盘多拉毛霉属)、*Sumatrana Pithomyces sp*(髓霉属)、*Pestalotiopsis microspora*(盘多拉毛霉属)、*Pestalotiopsis microspora*(盘多拉毛霉属)、*Pestalotiopsis guepinii*(盘多拉毛霉属)、*conia sp*(黑团孢霉属)、*Cephalosporium spp*(头孢霉属)、*Martensiomyces spp*(轮柄梳霉属)、*Mycelia sterlia*(无孢类群)、*Tubercularia sp* (瘤座孢属)、*Nodulisporium sylviforme*(多节孢属)、*Pleurocytospora taxi*(侧孢座腔菌属)、*Alternaria Taxi*(链格孢属)、*Rhizoctonia sp*(丝核菌属)、*penicillium*(青霉属)、*Trichoderma*(木霉属)、*Mucor*(毛霉属)、*Chaetomium*(毛壳孢属)等。

2.培养基和生长条件　为常规的PDA固体培养基和PDB液体培养基。

3.转座子和转座子标签法构建产紫杉醇微生物的饱和突变体库 本技术方案采用的转座子包括但不限于：restless转座子，impala/fot1转座子，MAGGY转座子、基于细菌中的Tn3 转座子、Mu 噬菌体和酵母的Ty 成分等改造的用于转座子标签法元件。该技术具有快速、准确、规模化寻找与某一表型相关的基因的操作特点,技术简单。Tn3 成分是TnA家族成员,长度为4957bp ,其转座必需片段为内部解离位点(res 位点) 、重组酶作用位点(lox 位点) 及38bp 的末端倒转重复序列。同时含有编码转座酶的tnpA 基因和编码解旋

酶的tnpR 基因等。本技术方案采用的mTn3 转座子标签之一是mTn-sacB/gfp ,它保留了Tn3 转座子的38bp 的末端重复序列、res 位点与lox 位点,并加入了Amp 抗性标记、sacB反选择标记和没有启动子的报道基因GFP。也可以根据特定菌株的性质，更换筛选标记或报道基因。mTn3 转座子标签结构简单，属于随机性的转座子标签，可能是真菌基因功能研究中应用最广泛的一种标签，适用于大规模构建突变体、探寻功能基因。

Mu噬菌体和miniMu噬菌体标签 Mu噬菌体是一种以大肠杆菌为宿主的温和噬菌体。它的DNA为线性分子,能随机地插入寄主染色体中,与其他转座子不同的是,它不含有末端倒转重复序列。miniMu 噬菌体标签自身长度较小,却可以融合较大的DNA片段(最大到39kb),因而可以与各种目的载体进行连接。除了存在个别插入热点(hot spot)外,miniMu 噬菌体标签对染色体的插入基本上是完全随机的。该标签体系的应用程序与mTn3转座子标签大体相同。

4.基因组DNA的制备 采用常规方法制备菌体基因组DNA。

5.发酵实验 250 ml 三角瓶装入 50 ml 培养基，灭菌，冷却后接入 0.5cm^2 的菌丝块，于30°摇床培养，6.生物量测定 取一定体积培养液于 4000r min、离心 5－15min，倾去上清液，用蒸馏水洗涤 2－3 次，收集菌体，烘至恒重，再称重。50－98h 不等。苯丙氨酸在培养基灭菌后冷加入。

7.酶联免疫方法筛选紫杉醇产量变异的突变体 按本技术领域一般技术人员熟悉的方法，将紫杉醇与适当的分子，如牛血清白蛋白、生物素等结合，免疫兔子或大鼠，制备抗血清，检测血清的效价，利用抗血清和酶标仪、96 孔或 384 孔，甚至更多孔的酶标板，检测突变菌株的紫杉醇产量。

发明效果：利用本技术方案涉及的转座子，包括 Tn3 等，对产紫杉醇的出发菌株，构建了饱和的突变体库，利用紫杉醇抗体酶联免疫方法快速、相对低成本地筛选到了紫杉醇产量提高的菌株。

具体实施方式

实施例

1.菌株及其培养： *Penicillium*(青霉属)真菌在常规的PDA固体培养基和PDB液体培养基生长，产紫杉醇的欧文氏菌属细菌等在LB肉汤培养基中培养。

2. 转座子和转座子标签法构建产紫杉醇微生物的饱和突变体库 转座子标签中真菌分别采用restless转座子、impala160和基于细菌中的Tn3 转座子、细菌采用Tn3 转座子。转座子标签的筛选标记为sacB反选择标记、URA和没有启动子的报道基因GFP。按照本领域技术人员熟悉的分子生物学技术，扩增转座子标签，采用适当的限制性内切酶切割含有筛选标记和转座酶的片段，分别转化青霉或欧文氏菌。

Mu噬菌体和miniMu噬菌 体 标 签 Mu噬菌体是一种以大肠杆菌为宿主的温和噬菌

体。它的DNA为线性分子,能随机地插入寄主染色体中,与其他转座子不同的是,它不含有末端倒转重复序列。miniMu 噬菌体标签自身长度较小,却可以融合较大的DNA片段(最大到39kb),因而可以与各种目的载体进行连接。除了存在个别插入热点(hot spot)外,miniMu 噬菌体标签对染色体的插入基本上是完全随机的。该标签体系的应用程序与mTn3转座子标签大体相同。根据公式P=1-(1-(L／C)cf 可以预测构建饱和突变体库所需的克隆数，P是发现任意一个基因插入突变的概率，L代表基因的平均长度，C是单倍体基因组的大小，n是插入突变的克隆数，f是每个克隆平均插入位点数。计算预测的克隆数和实际克隆数，利用转座子标签方法获得了预期的克隆数。

也可以采用带有5－FU抗性基因的片段插入impala160的NheI 限制性内切酶位点，获得pNIpyr。电转化完整的孢子，将NdeI-酶切的pNIpyr导入孢子。即0.5微克线性化的质粒和500万个孢子放在0.2-cm 电转化槽(Bio-Rad)，1-kV脉冲(Bio-Rad 电转化仪400, 25 μF)。或者采用本领域一般技术员熟悉的化学方法进行转化。

根据特定的表型分离转化子。Southern分析基因组的分子特征。

4.基因组DNA的制备 采用常规方法制备菌体基因组DNA。

5.发酵实验 250 ml 三角瓶装入 50 ml 培养基，灭菌，冷却后接入 $0.5cm^2$ 的菌丝块（真菌）或菌落（细菌），于 30°（真菌）或 37°（细菌）摇床培养适宜的时间。

6.生物量测定 取一定体积培养液于 4000r min、离心 5－15min，倾去上清液，用蒸馏水洗涤 2－3 次，收集菌体，烘至恒重，再称重。50－98h 不等。苯丙氨酸在培养基灭菌后冷却加入。

7.酶联免疫方法筛选紫杉醇产量变异的突变体 按本技术领域一般技术人员熟悉的方法，将紫杉醇与适当的分子，如牛血清白蛋白、生物素等结合，免疫兔子或大鼠，制备抗血清，检测血清的效价，利用抗血清和酶标仪、96 孔或 384 孔，甚至更多孔的酶标板，检测突变菌株的紫杉醇产量变异的菌株。

patsnap

专利名称(译)	产紫杉醇微生物饱和突变体库的构建和高产紫杉醇菌株的选育方法		
公开(公告)号	CN1800363A	公开(公告)日	2006-07-12
申请号	CN200510057455.8	申请日	2005-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	西南大学		
申请(专利权)人(译)	西南大学		
当前申请(专利权)人(译)	西南大学		
[标]发明人	谢建平 胡昌华 廖国建 余艳 刘雪梅		
发明人	谢建平 胡昌华 廖国建 余艳 刘雪梅		
IPC分类号	C12N1/21 C12P17/02 G01N33/535		
代理人(译)	康海燕		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种利用包括转座子突变方法构建产紫杉醇微生物的饱和突变体库和利用紫杉醇抗体酶联免疫筛选高产紫杉醇突变菌株的方法。