

谷氨酸棒杆菌医药蛋白表达体系

联系方式	成果负责人	白仲虎	职 称	教授																												
	手 机		E-mail																													
	联系人	刘秀霞	手 机	18761520976																												
	E-mail	liuxiuxia@jiangnan.edu.cn																														
成果基本情况	所属领域	<input checked="" type="checkbox"/> 发酵技术及产品 <input type="checkbox"/> 食品加工技术及配方、产品 <input type="checkbox"/> 新材料 <input type="checkbox"/> 微生物（发酵、食品）分析检测技术 <input type="checkbox"/> 生物分离技术与材料 <input type="checkbox"/> 装备制造 <input type="checkbox"/> 其他：																														
	技术成熟度	<input checked="" type="checkbox"/> 实验室开发阶段 <input type="checkbox"/> 完成小/中试生产阶段 <input type="checkbox"/> 能实现小批量生产阶段 <input type="checkbox"/> 能实现批量生产阶段 <input type="checkbox"/> 其他																														
成果简介	<p>1、简介</p> <p>简单介绍项目/成果背景，解决的行业痛点或行业共性关键问题。</p> <p>谷氨酸棒杆菌(<i>Corynebacterium glutamicum</i>)被广泛用于食品工业生产，是一种安全性很高的工业菌株；具有包括 Sec 和 Tat 分泌途径在内完善的蛋白分泌系统；没有类似于大肠杆菌(<i>E. coli</i>)所带来的内毒素和宿主细胞蛋白污染等问题（表 1）。这些显著优点使它成为一种有吸引力的外源蛋白表达生产用的底盘细胞。目前国内生物医药领域主要依赖于 <i>E.coli</i> 表达体系生产医药蛋白，原创性外源蛋白表达体系的缺失，在知识产权方面将制约到我国生物医药产业的发展。该项成果有望为我国生物医药产业提供一个具有自主知识产权的谷氨酸棒杆菌安全高效外源蛋白表达体系。</p> <p style="text-align: center;">表 1 大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌表达系统比较</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr style="background-color: #4F81BD; color: white;"> <th>比较内容</th> <th>大肠杆菌</th> <th>谷氨酸棒杆菌</th> <th>参考文献</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>内毒素</td> <td>有</td> <td>无</td> <td>Yim, S. S., S. J. An, et al. (2013)</td> </tr> <tr> <td>可溶性表达</td> <td>易形成包涵体</td> <td>可溶性表达</td> <td>An, S. J., S. S. Yim, et al. (2013)</td> </tr> <tr> <td>分泌到胞外的内源蛋白</td> <td>较多</td> <td>较少</td> <td>Matsuda, Y., H. Itaya, et al. (2014)</td> </tr> <tr> <td>细胞外蛋白酶</td> <td>有</td> <td>检测不到</td> <td>Date, M., H. Itaya, et al. (2006)</td> </tr> <tr> <td>分泌蛋白的稳定性</td> <td>不稳定</td> <td>稳定</td> <td>An, S. J., S. S. Yim, et al. (2013)</td> </tr> <tr> <td>分泌蛋白的纯化</td> <td>较复杂</td> <td>较简单</td> <td>Matsuda, Y., H. Itaya, et al. (2014)</td> </tr> </tbody> </table>				比较内容	大肠杆菌	谷氨酸棒杆菌	参考文献	内毒素	有	无	Yim, S. S., S. J. An, et al. (2013)	可溶性表达	易形成包涵体	可溶性表达	An, S. J., S. S. Yim, et al. (2013)	分泌到胞外的内源蛋白	较多	较少	Matsuda, Y., H. Itaya, et al. (2014)	细胞外蛋白酶	有	检测不到	Date, M., H. Itaya, et al. (2006)	分泌蛋白的稳定性	不稳定	稳定	An, S. J., S. S. Yim, et al. (2013)	分泌蛋白的纯化	较复杂	较简单	Matsuda, Y., H. Itaya, et al. (2014)
比较内容	大肠杆菌	谷氨酸棒杆菌	参考文献																													
内毒素	有	无	Yim, S. S., S. J. An, et al. (2013)																													
可溶性表达	易形成包涵体	可溶性表达	An, S. J., S. S. Yim, et al. (2013)																													
分泌到胞外的内源蛋白	较多	较少	Matsuda, Y., H. Itaya, et al. (2014)																													
细胞外蛋白酶	有	检测不到	Date, M., H. Itaya, et al. (2006)																													
分泌蛋白的稳定性	不稳定	稳定	An, S. J., S. S. Yim, et al. (2013)																													
分泌蛋白的纯化	较复杂	较简单	Matsuda, Y., H. Itaya, et al. (2014)																													

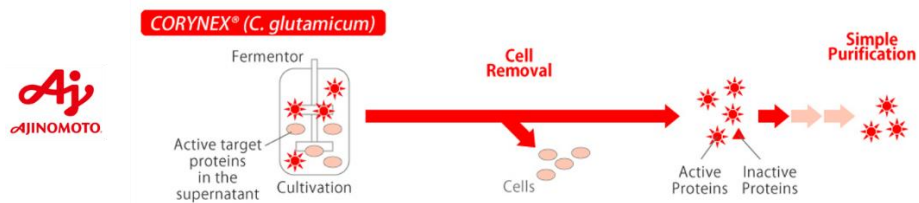


图 1 谷氨酸棒杆菌表达系统下游蛋白分离纯化过程

特别是 2020 年国家推出全面禁止在动物饲料中添加抗生素的政策，极大增加了我国畜牧业对兽用细菌疫苗的需求。兽用疫苗中，利用细菌表达系统生产的基因工程疫苗因交叉免疫效果好，在预防禽畜疫病方面具有广阔应用前景。利用 *C. glutamicum* 表达系统生产兽用疫苗蛋白，可以降低内毒素，强化可溶性表达，简化下游蛋白分离纯化过程，表现出了显著的过程集成效应。(图 1)。通过近年来团队的不断努力，我们初步开发的基于谷氨酸棒杆菌的可溶性高效蛋白表达体系已成功地解决了多家医药企业的生产过程技术与知识产权问题，比如目前利用谷氨酸棒杆菌宿主所构建的猪胸膜肺炎疫苗蛋白 Omp、脑钠肽 BNP、前胶原肽 PINP 分泌表达工程菌株均已具备工业应用潜力。

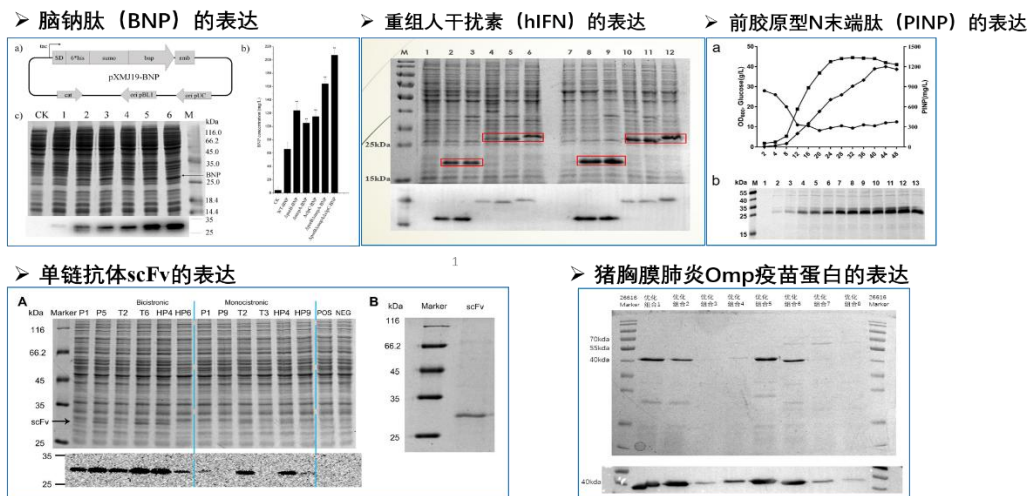


图 2 谷氨酸棒杆菌表达医药蛋白的应用

2、创新要点

介绍本项目的主要创新点，总体水平（处于国内/国际先进/领先水平等）。

该项目利用先进的合成生物学、分子生物学以及高通量培养筛选系统，创制了具有自主知识产权的谷氨酸棒杆菌安全高效外源蛋白表达体系，处于国际先进水平。

技术上创新： 本项目开发了适合谷氨酸棒杆菌重组蛋白表达的元器件、基

	<p>因编辑工具以及高效的底盘细胞。具体包括双顺反子表达结构、高效的组成型和诱导型启动子、能够正确引导重组蛋白分泌的高效信号肽以及适用于 <i>C.glutamicum</i> 的 CRIPSR-Cas9 基因编辑工具，并将其应用到宿主细胞的改造中。在底盘细胞改造方面，基于改造底盘细胞代谢流趋向于重组蛋白表达有利方向的研究思路，通过转录组、多变元分析等方法寻找改造底盘细胞的遗传位点，构建了显著提高重组蛋白表达的一系列突变体菌株。</p> <p>结果上创新：目前国内外药用蛋白的表达生产主要依赖于大肠杆菌表达体系，形成了系列化专利壁垒，而我国在原创性外源蛋白表达体系研究领域的落后和菌株知识产权的缺乏，已经呈现出制约到我国生物医药产业健康发展的态势。本项目以具有自由知识产权出发菌株为基础，基于系统的细胞工厂创制技术体系，能够从源头上规避许多已有的基于已知生物学“知识”的基因工程和代谢工程手段所形成的专利壁垒，为我国药用蛋白的生产提供了一种高效自主的微生物表达体系。</p> <p>3、关键指标</p> <p>(1) 蛋白产品无内毒；</p> <p>(2) 目标蛋白产量达到工业生产需求；</p> <p>(3) 蛋白纯化生产工艺简单；</p> <p>(4) 产品质量稳定可控、生产成本低。</p>
合作方式	<p>√技术转让（专利权转让） <input type="checkbox"/>独占实施许可 <input type="checkbox"/>普通实施许可 <input type="checkbox"/>作价入股 <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>技术开发 <input checked="" type="checkbox"/>技术服务（企业现有技术改进） <input type="checkbox"/>其它：</p>
支撑该成果的知识产权	<p>[1] 一种适用于谷氨酸棒杆菌的表达载体及其应用，中国，ZL201610626318X.</p> <p>[2] α-淀粉酶的制备，中国，ZL201610836135.0.</p> <p>[3] 一种适用于谷氨酸棒杆菌的增强型表达载体，2019-03-13，中国，CN201910187914.6.</p> <p>[4]一种谷氨酸棒状杆菌重组菌、制备方法及应用，2019-02-02，中国，CN201919197943.7.</p> <p>[5] 一种谷氨酸棒状杆菌重组菌、制备方法及应用，2019-02-02，中</p>

	<p>国, CN201919197941.8.</p> <p>[6]一种适用于谷氨酸棒杆菌分泌表达木聚糖酶的重组载体、表达系统和应用, 2019-02-02, 中国, CN2019101076369.</p> <p>[7]一种适用于谷氨酸棒杆菌重组表达载体、外源蛋白表达系统、应用和木聚糖酶的制备方法, 2018-08-31, 中国, CN2018110154413.</p> <p>[8]一种谷氨酸棒杆菌内源的诱导型启动子、载体及其应用, 2018-08-31, 国际, PCT/CN2018/110217</p> <p>[9] 操纵子、其载体及其应用, 2018-08-28, 中国, CN2018109902517.</p> <p>[10] 启动子、其载体及其应用, 2018-08-28, 中国, CN2018109901800.</p> <p>[11] 一种含有乙醇诱导启动子的质粒载体及其在提高谷氨酸棒杆菌重组蛋白表达量中的应用, 2018-05-22, 中国, CN201810494641.5.</p> <p>[12] 一种提高谷氨酸棒杆菌重组蛋白表达量的方法, 2018-05-22, 中国, CN201810494617.1.</p> <p>[13] 一种重组谷氨酸棒状杆菌、其制备方法及其应用, 2017-12-14, 中国, CN201711334447.2.</p> <p>[14]一种谷氨酸棒杆菌的基因编辑载体、制备方法、系统及其应用, 2017-07-14, 中国, CN201710576441.X.</p> <p>[15]一种谷氨酸棒状杆菌的基因编辑系统及其应用, 2016-12-12, 中国, CN201611141549.8.</p> <p>[16] 一种适用于谷氨酸棒杆菌的表达载体及其应用, 2016-07-29, 中国, CN201610619141.0.</p> <p>[17] 一种适用于谷氨酸棒杆菌的外源启动子及其应用, 2016-07-29, 中国, CN201610613983.5.</p>
项目/成果关键词	医药蛋白, 谷氨酸棒杆菌, 高效表达体系