

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 1 月 13 日 (13.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/007205 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/90* (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) *C12P 17/18* (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/118317

(22) 国际申请日: 2020 年 9 月 28 日 (28.09.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010651132.6 2020年7月8日 (08.07.2020) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 唐蕾(TANG, Lei); 中国江苏省无锡市
滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。
潘梅(PAN, Mei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡
湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 刘爽欣

(LIU, Shuangxin); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡
湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代
理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省
哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区501
张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,

(54) Title: METHOD FOR INCREASING CONTENT OF INTRACELLULAR HEME IN ESCHERICHIA COLI

(54) 发明名称: 一种提高大肠杆菌胞内血红素含量的方法

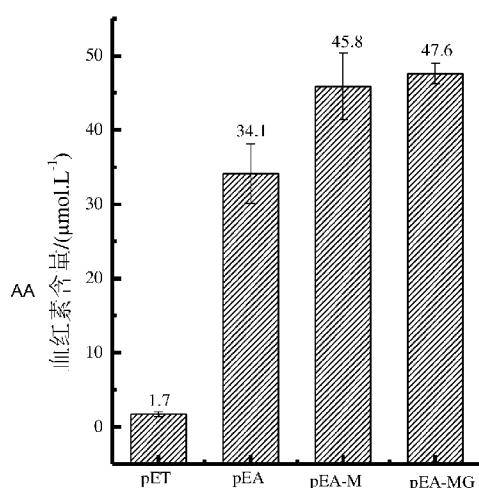


图 3

AA Content of heme (μmol·L⁻¹)
BB Strain

(57) Abstract: A method for increasing the content of intracellular heme in escherichia coli, comprising: knocking out a gene *mscS* for encoding a small-conductivity mechanosensitive ion channel protein, knocking out a gene *aroG* for encoding 3-deoxy-arabinoheptulose-7 phosphate synthase, or overexpressing a gene *hemA* for encoding glutamyl-tRNA reductase in escherichia coli. The recombinant bacteria obtained by construction are cultured in an LB culture medium, and the content of the heme can reach 47.6 μmol·L⁻¹.

(57) 摘要: 一种提高大肠杆菌胞内血红素含量的方法, 在大肠杆菌中敲除编码小电导类机械敏感型离子通道蛋白的基因 $mscS$ 、敲除编码3-脱氧-阿拉伯庚酮糖-7磷酸合成酶的基因 $aroG$, 或过表达了编码谷氨酰-tRNA还原酶的基因 $hemA$ 。构建得到的重组菌在LB培养基中进行培养, 血红素含量可达47.6 μmol·L⁻¹。

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种提高大肠杆菌胞内血红素含量的方法

技术领域

本发明涉及一种提高大肠杆菌胞内血红素含量的方法，具体地，利用基因敲除和过表达相结合的技术，属于代谢工程技术领域。

背景技术

血红素是一类重要的含铁卟啉类化合物，参与电子转移、活性氧分解、底物的催化氧化、基因表达的控制等。在实际应用中，血红素在化学方面可作为天然色素用于食品添加，在医疗保健方面可用作补铁剂或抗贫血药，在治疗疾病方面可用于卟啉症治疗等。血红素是大多数原核和真核生物细胞呼吸的重要辅助因子，以血红素为辅基的蛋白对各种生物学过程至关重要。在以血红素为辅基的重组酶生物合成中，血红素的不足是导致酶活性不高的重要因素，因此血红素辅因子的充足供应对于可溶性和功能性血红蛋白生产至关重要。在异源表达以血红素为辅基的重组蛋白时，胞内血红素含量的增加有利于提高活性蛋白的比例。

大肠杆菌 (*E.coli*) 作为重要的基因工程宿主菌，主要以谷氨酸为前体物经 C5 途径合成血红素 (图 1)。谷氨酸在谷氨酰-tRNA 合成酶 (gltX 编码) 和还原酶 (hemA 编码) 的催化下合成 5-氨基乙酰丙酸 (ALA)，进而合成血红素。虽然外源添加 ALA 可以提高血红素含量，但会导致操作不便、成本增加等问题。所以如果能够通过对大肠杆菌的代谢工程改造，加大谷氨酸合成通量，进而提高 ALA 和血红素的含量，简便经济，具有应用价值。

发明内容

本发明通过大肠杆菌的代谢工程改造，使胞内的碳代谢流更多地流向谷氨酸，结合过表达 ALA 合成关键酶 hemA，以提高血红素的含量，减少因外源添加 ALA 或血红素带来的成本增加及操作不便等问题。

本发明提供了一种重组大肠杆菌，敲除或沉默编码小电导类机械敏感型离子通道蛋白的基因 *mscS*、敲除或沉默编码 3-脱氧-阿拉伯庚酮糖-7 磷酸合成酶的基因 *aroG*，或过表达编码谷氨酰-tRNA 还原酶的基因 *hemA*。

在本发明的一种实施方式中，在大肠杆菌中敲除或沉默基因 *mscS* 和基因 *aroG*。

在本发明的一种实施方式中，在大肠杆菌中敲除或沉默基因 *mscS* 并过表达基因 *hemA*。

在本发明的一种实施方式中，在大肠杆菌中敲除或沉默基因 *mscS* 和基因 *aroG*，并过表达基因 *hemA*。

在本发明的一种实施方式中，所述 MscS 蛋白 NCBI 登录号为 2OAU_A，所述 AroG 蛋白

GenBank 号为 EFE3302334.1；所述谷氨酰-tRNA 还原酶 HemA 在 NCBI 上的登录号为 WP_021545525。

在本发明的一种实施方式中，所述 *mscS* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述 *aroG* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述 *hemA* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

在本发明的一种实施方式中，以大肠杆菌 BL21 为出发菌株。

本发明提供一种构建所述重组菌大肠杆菌的方法，所述方法是通过 Red 同源重组的方法将大肠杆菌基因组的基因 *mscS* 或基因 *aroG* 敲除。

在本发明的一种实施方式中，设计如 SEQ ID NO.1 核苷酸序列所示的基因的同源臂，同源臂为基因上下游各 400~600bp，再通过 Red 同源重组的方法将大肠杆菌基因组的基因 *mscS* 敲除。

在本发明的一种实施方式中，设计如 SEQ ID NO.2 核苷酸序列所示的基因的同源臂，同源臂为基因上下游各 40~60bp，再通过 Red 同源重组的方法将大肠杆菌基因组的基因 *aroG* 敲除。

在本发明的一种实施方式中，将基因 *hemA* 连接至 pET 载体上，构建得到表达载体，再将表达载体转入宿主细胞。

本发明提供一种提高血红素产量的方法，在大肠杆菌中敲除编码小电导类机械敏感型离子通道蛋白的基因 *mscS*、敲除编码 3-脱氧-阿拉伯庚酮糖-7 磷酸合成酶的基因 *aroG*，或过表达编码谷氨酰-tRNA 还原酶的基因 *hemA*。

在本发明的一种实施方式中，在大肠杆菌中敲除基因 *mscS* 和基因 *aroG*。

在本发明的一种实施方式中，在大肠杆菌中敲除基因 *mscS* 并过表达基因 *hemA*。

在本发明的一种实施方式中，在大肠杆菌中敲除或沉默基因 *mscS* 和基因 *aroG*，并过表达基因 *hemA*。

本发明提供一种生产血红素的方法，以所述重组菌为发酵菌株生产血红素。

在本发明的一种实施方式中，将所述重组菌过夜培养后以 1mL/100mL 的量加入培养体系。

在本发明的一种实施方式中，所述培养体系中含有胰蛋白胨和酵母粉。

在本发明的一种实施方式中，在 30~37°C 条件下培养 6~8 h。

本发明还保护所述重组大肠杆菌，或所述方法在生产血红素中的应用。

本发明的有益效果：

本发明构建的基因工程菌与出发菌株相比生长状况没有显著改变，但胞内血红素含量大

幅提升，在敲除了基因 *aroG* 和 *mscS*，并过表达基因 *hemA* 后，得到的重组菌 pEA-MG 在 LB 培养基中培养 7h 后，血红素含量为 $47.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，较出发菌株显著提升，是出发菌株的 23 倍。

附图说明

图 1 为大肠杆菌血红素合成途径图。

图 2 为各菌株生长曲线图。

图 3 为各菌株中血红素含量图。

具体实施方式

1、LB 培养基 (g/L)：胰蛋白胨 10，酵母粉 5，NaCl 10，pH7.0。

2、血红素浓度测定：

采用荧光法检测血红素浓度，具体为：取培养后的适量菌体，使得 $\text{OD}_{600} \times \text{菌液体积 (mL)} = 8$ （例如：若菌体的 OD_{600} 值为 0.4，则取 20 mL 菌液），于 4 °C，12000 r/min 离心 5 min 后得到菌体沉淀，水洗后加入 1.5 mL 琥珀色离心管；向 1.5 mL 离心管加入 500 μL 20 mmol/L 的草酸，于 4 °C 暗室过夜静置 16 h；在各离心管中加入 500 μL 2 mol/L 的草酸，取一半样品（用于卟啉浓度检测）于常温下反应作为实验对照组，另一半样品（用于卟啉和血红素总浓度检测）于 95 °C 中加热 30 min；自然冷却后 12000 r/min 离心 5 min，取 200 μL 于黑色 96 孔板，进行荧光值检测（激发波长为 400 nm，发射波长为 620 nm），两组差值即为待测血红素浓度。

3、大肠杆菌感受态的制备：参见 Takara 感受态制备试剂盒说明书（Competent Cell Preparation Kit）。

实施例 1

根据 SEQ ID NO.1，设计其上下游各 500bp 同源臂，通过 Red 同源重组的方法（具体步骤参见 Datsenko KA. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645）敲除大肠杆菌 BL21 中的 *mscS* 基因，经测序验证，得到敲除 *mscS* 基因的基因工程菌，并将其命名为 WT-M。

将基因工程菌 WT-M 接种至 LB 培养基中，在 37°C，200r/min 过夜活化，次日取一定浓度的菌液 500 μL 转接于 50mL 的 LB 培养基中，在 37°C，200r/min 下培养，实时测定菌浓，并制作生长曲线，如图 2 所示。

将菌株 WT 接种至 LB 培养基中，在 37°C，200r/min 过夜活化，次日取少量相同的菌液

500 μ L 转接于 50mL 的 LB 培养基中, 在 37°C, 200r/min 下培养, 实时测定菌浓, 并制作生长曲线, 如图 2 所示。

由图 2 可知, 基因工程菌 WT-M 与 WT 在生长上无显著差异。

培养 7h 后, 检测血红素含量, WT 与 WT-M 的血红素含量分别为 2.11 μ mol/L 和 2.35 μ mol/L。

实施例 2

根据 SEQ ID NO.2, 设计其上下游各 50 bp 同源臂, 通过 Red 同源重组的方法, 在 WT-M 的基础上, 敲除 *aroG* 基因, 经测序验证, 得到敲除了 *aroG* 基因的基因工程菌, 并将其命名为 WT-MG, 得到基因工程菌。

将基因工程菌 WT-MG 接种至 LB 培养基中, 在 37°C, 200r/min 过夜活化, 次日取活化后的菌液 500 μ L 转接于 50mL 的 LB 培养基中, 在 37°C, 200r/min 下培养, 实时测定菌浓, 并制作生长曲线, 如图 2 所示, 基因工程菌 WT-MG 与 WT 在生长上无显著差异。

培养 7 h 后, 检测血红素含量, WT-MG 血红素含量为 2.86 μ mol/L。

实施例 3

将谷氨酰-tRNA 还原酶 *hemA* 基因 (核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示) 通过 *Hind* III 和 *EcoR* I, 连接至 pET28a 载体上得到重组质粒 pET28a-*hemA*, 再将重组质粒转入 JM109 中, 将菌液涂布于 LB 平板上, 在 37°C 下培养至长出单克隆, 挑取单克隆并进行测序验证, 验证正确的即为阳性转化子。将阳性转化子接种至 LB 液体培养基中, 培养 8~12 h, 从菌液中提取重组质粒 pET28a-*hemA*, 将重组质粒导入实施例 1 得到的菌株 WT-M 中, 得到工程菌 pEA-M, 采用荧光法检测血红素浓度, 结果表明 pEA-M 的血红素含量达到 45.8 μ mol $\cdot$ L⁻¹。

将 pET28a 质粒空载转化至 BL21 中, 得到工程菌 pET, 利用上述培养方法, 将工程菌 pET 进行培养, 培养结束后采用荧光法检测血红素浓度, 结果表明 pET 的血红素含量达到 1.7 μ mol $\cdot$ L⁻¹。

实施例 4

具体实施方式同实施例 3, 区别在于, 将实施例 3 构建得到的重组质粒 pET28a-*hemA* 转化至实施例 2 得到的菌株 WT-MG 中, 得到工程菌 pEA-MG, 采用荧光法检测血红素浓度, 结果表明 pEA-MG 的血红素含量达到 47.6 μ mol $\cdot$ L⁻¹, 是出发菌株 WT 的 23 倍。

实施例 5

具体实施方式同实施例 3, 区别在于, 将实施例 3 构建得到的重组质粒 pET28a-*hemA* 转化至 BL21 中, 得到工程菌 pEA, 采用荧光法检测血红素浓度, 结果表明 pEA 的血红素含量

达到 $34.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

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。

权 利 要 求 书

1. 一种重组大肠杆菌，其特征在于，敲除或沉默了编码小电导类机械敏感型离子通道蛋白的基因 *mscS*、敲除或沉默了编码 3-脱氧-阿拉伯庚酮糖-7 磷酸合成酶的基因 *aroG*，并过表达编码谷氨酰-tRNA 还原酶的基因 *hemA*；所述基因 *mscS* 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述基因 *aroG* 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述基因 *hemA* 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

2. 一种重组大肠杆菌，其特征在于，敲除或沉默了编码小电导类机械敏感型离子通道蛋白的基因 *mscS*、敲除或沉默了编码 3-脱氧-阿拉伯庚酮糖-7 磷酸合成酶的基因 *aroG*，或过表达编码谷氨酰-tRNA 还原酶的基因 *hemA*。

3. 根据权利要求 2 所述的重组菌，其特征在于，所述基因 *mscS* 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述基因 *aroG* 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；所述基因 *hemA* 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

4. 根据权利要求 2 所述的重组菌，其特征在于，在大肠杆菌中敲除或沉默基因 *mscS* 和基因 *aroG*。

5. 根据权利要求 2 所述的重组菌，其特征在于，在大肠杆菌中敲除或沉默基因 *mscS* 并过表达基因 *hemA*。

6. 根据权利要求 2 所述的重组菌，其特征在于，在大肠杆菌中敲除或沉默基因 *mscS* 和基因 *aroG*，并过表达基因 *hemA*。

7. 根据权利要求 2 所述的重组菌，其特征在于，以大肠杆菌 BL21 为出发菌株。

8. 构建权利要求 1~7 任一所述重组大肠杆菌的方法，其特征在于，通过 Red 同源重组的方法将大肠杆菌基因组的基因 *mscS* 或基因 *aroG* 敲除。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，

设计如 SEQ ID NO.1 核苷酸序列所示的基因的同源臂，同源臂为基因上下游各 400~600bp，再通过 Red 同源重组的方法将大肠杆菌基因组的基因 *mscS* 敲除；或

设计如 SEQ ID NO.2 核苷酸序列所示的基因的同源臂，同源臂为基因上下游各 40~60bp，再通过 Red 同源重组的方法将大肠杆菌基因组的基因 *aroG* 敲除。

10. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，将基因 *hemA* 连接至 pET 载体上，构建得到表达载体，再将表达载体转入宿主细胞。

11. 一种提高血红素产量的方法，其特征在于，在大肠杆菌中敲除编码小电导类机械敏感型离子通道蛋白的基因 *mscS*、敲除编码 3-脱氧-阿拉伯庚酮糖-7 磷酸合成酶的基因 *aroG*，或过表达编码谷氨酰-tRNA 还原酶的基因 *hemA*。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，在大肠杆菌中敲除或沉默基因 *mscS* 和

基因 *aroG*。

13. 根据权利要求 11 所述的重组菌，其特征在于，在大肠杆菌中敲除或沉默基因 *mscS* 并过表达基因 *hemA*。

14. 根据权利要求 11 所述的重组菌，其特征在于，在大肠杆菌中敲除或沉默基因 *mscS* 和基因 *aroG*，并过表达基因 *hemA*。

15. 一种生产血红素的方法，其特征在于，将权利要求 1~7 任一所述重组菌加入培养体系中生产血红素。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于，培养体系中含有胰蛋白胨和酵母粉；在 30~37°C 条件下培养 6~8 h。

17. 权利要求 1~7 任一所述重组大肠杆菌，或权利要求 8~16 任一所述方法在生产血红素中的应用。

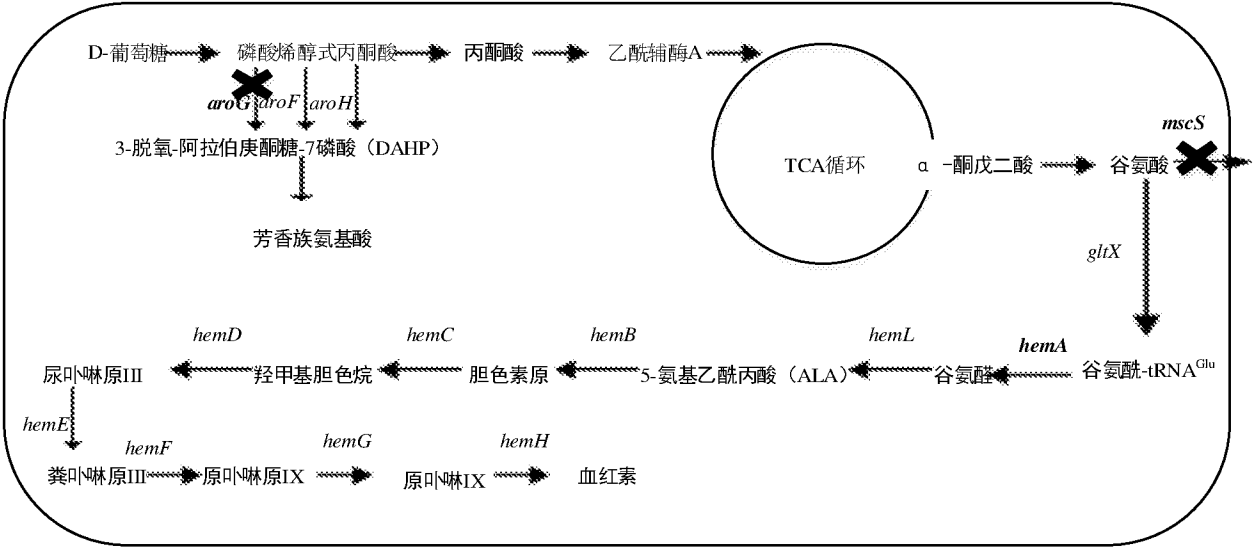


图 1

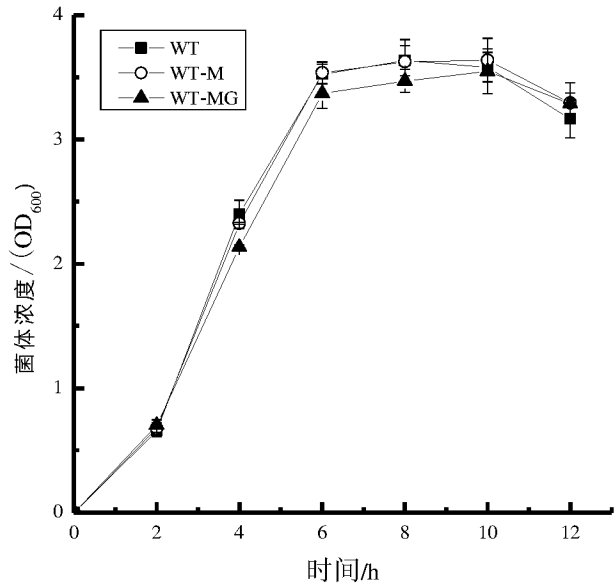


图 2

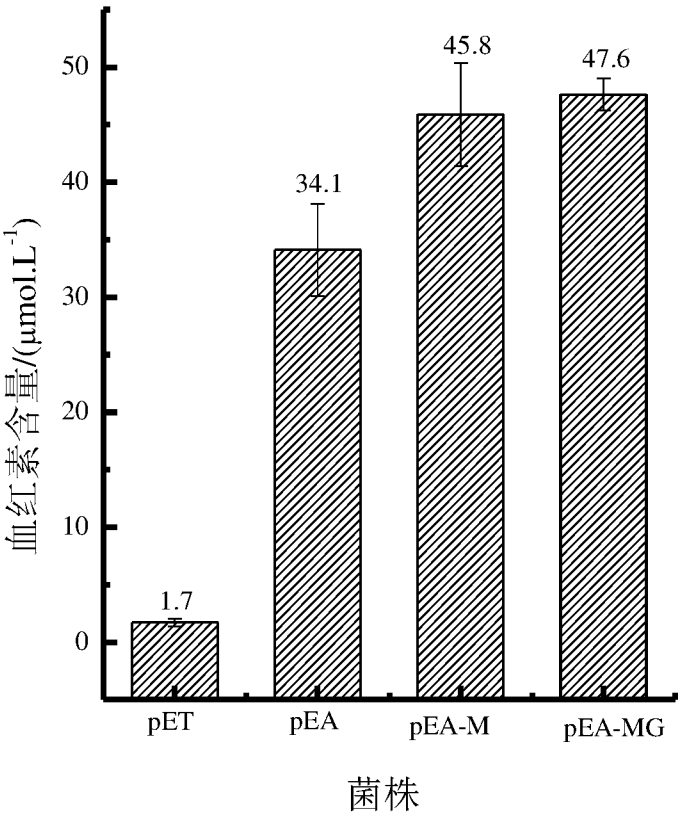


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/118317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/90(2006.01)i;
C12N 15/70(2006.01)i; C12P 17/18(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12P; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, TWABS, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 万方数据库: 血红素, 小电导类机械敏感型离子通道蛋白, 机械敏感通道蛋白, 离子通道蛋白, MscS, yggB, MscCG, NCg11221, 3-脱氧-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶, aroG, 谷氨酰-tRNA还原酶, hemA, GluTR, Red同源重组, phspho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, heme, hemoglobin, mechanosensitive channel of small conductance, 3-deoxy- α -arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP, glutamyl-tRNA reductase.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	潘梅等 (PAN, Mei et al.). "谷氨酸代谢调控及hemA 过表达促进大肠杆菌血红素合成 (Enhancing Heme Synthesis in Escherichia coli by Regulating Glutamic Acid Metabolism and Over-Expressing hemA)" <i>微生物学通报 (Microbiology China)</i> , 23 July 2020 (2020-07-23), ISSN: 0253-2654, pages 1-11, see abstract, and Materials and Methods	1-17
A	CN 106434509 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 22 February 2017 (2017-02-22) see entire document	1-17
A	CN 110591989 A (TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 20 December 2019 (2019-12-20) see entire document	1-17
A	WO 2011/133056 A1 (INSTYTUT BIOLOGII DOSWIADCZALNEJ IM. M. NENCKIEGOPAN et al.) 27 October 2011 (2011-10-27) see entire document	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 2021

Date of mailing of the international search report

16 April 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/118317

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	傅维琦 (FU, Weiqi). "产5-氨基乙酰丙酸重组菌的优化和发酵过程调控研究 (Studies on 5-Aminolevulinate Production via Recombinants Optimization and Process Design)" 中国博士学位论文全文数据库 基础科学辑 (Chinese Doctoral Dissertations Full-Text Database (Basic Sciences)), No. 12, 15 December 2010 (2010-12-15), pages A006-53, see the whole document	1-17
A	Dassler T et al. "Identification of a major facilitator protein from Escherichia coli involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway" <i>Molecular Microbiology</i> , Vol. 36, No. 5, 31 December 2000 (2000-12-31), ISSN: 0950-382X, pp. 1101-1112, see entire document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/118317

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/118317

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106434509	A	22 February 2017	CN	106434509	B	25 October 2019
CN	110591989	A	20 December 2019	None			
WO	2011/133056	A1	27 October 2011	AU	2011243310	A1	15 November 2012
				CA	2796861	A1	27 October 2011
				PL	391045	A1	24 October 2011
				US	2013040336	A1	14 February 2013
				EP	2561105	A1	27 February 2013
				EP	2561105	B1	19 November 2014
				US	9309575	B2	12 April 2016
				AU	2011243310	B2	02 July 2015
				PL	213159	B1	31 January 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/118317

A. 主题的分类

C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/90(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12P 17/18(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C12P; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, TWABS, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 万方数据库: 血红素, 小电导类机械敏感型离子通道蛋白, 机械敏感通道蛋白, 离子通道蛋白, MscS, yggB, MscCG, NCg11221, 3-脱氧-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶, aroG, 谷氨酰-tRNA还原酶, hemA, GluTR, Red同源重组, phspho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, heme, hemoglobin, mechanosensitive channel of small conductance, 3-deoxy-α-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP, glutamyl-tRNA reductase.

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	潘梅等. “谷氨酸代谢调控及hemA 过表达促进大肠杆菌血红素合成” 微生物学通报, 2020年 7月 23日 (2020 - 07 - 23), ISSN: 0253-2654, 第1-11页, 参见摘要、材料与方法	1-17
A	CN 106434509 A (江南大学) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 参见全文	1-17
A	CN 110591989 A (中国科学院天津工业生物技术研究所) 2019年 12月 20日 (2019 - 12 - 20) 参见全文	1-17
A	WO 2011/133056 A1 (INST BIOLOG DOSWIADCZALNEJ IM NENCKIEGO等) 2011年 10月 27日 (2011 - 10 - 27) 参见全文	1-17

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
---	---

国际检索实际完成的日期

2021年 3月 22日

国际检索报告邮寄日期

2021年 4月 16日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

于娜

电话号码 86-10-62089160

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	傅维琦. “产5-氨基乙酰丙酸重组菌的优化和发酵过程调控研究” 中国博士学位论文全文数据库 基础科学辑, 第12期, 2010年 12月 15日 (2010 - 12 - 15), 第A006-53页, 参见全文	1-17
A	Dassler T等. “Identification of a major facilitator protein from Escherichia coli involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway” Molecular Microbiology, 第36卷, 第5期, 2000年 12月 31日 (2000 - 12 - 31), ISSN: 0950-382X, 第1101-1112页, 参见全文	1-17

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/118317

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106434509	A	2017年 2月 22日	CN	106434509	B	2019年 10月 25日
CN	110591989	A	2019年 12月 20日	无			
WO	2011/133056	A1	2011年 10月 27日	AU	2011243310	A1	2012年 11月 15日
				CA	2796861	A1	2011年 10月 27日
				PL	391045	A1	2011年 10月 24日
				US	2013040336	A1	2013年 2月 14日
				EP	2561105	A1	2013年 2月 27日
				EP	2561105	B1	2014年 11月 19日
				US	9309575	B2	2016年 4月 12日
				AU	2011243310	B2	2015年 7月 2日
				PL	213159	B1	2013年 1月 31日