



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103882014 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201210559843. 6

(22) 申请日 2012. 12. 21

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 5435 2011. 11. 03

(71) 申请人 中国科学院青岛生物能源与过程研究所

地址 266101 山东省青岛市青岛市崂山区松岭路 189 号

(72) 发明人 吕雪峰 杨柳 高政绪 谈晓明

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

权利要求书5页 说明书20页
序列表7页 附图5页

(54) 发明名称

用于固定二氧化碳的构建体、菌株及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及用于在异养微生物（例如异养发酵菌株，例如大肠杆菌）中实现二氧化碳固定和/或减少二氧化碳排放的构建体，包含所述构建体的载体，包含所述构建体或用所述载体转化的异养微生物（例如异养发酵菌株，例如大肠杆菌），以及在异养微生物（例如异养发酵菌株，例如大肠杆菌）中固定二氧化碳和/或减少二氧化碳排放的方法。

1. 一种构建体,其包含第一基因和第二基因,其中所述第一基因选自:

1) 磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因 (EC2. 7. 1. 19);

2)其核苷酸序列与 1)中的基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性,优选地至少 85% 同一性,更优选地至少 90% 同一性,更优选地至少 95% 同一性,例如至少 96% 同一性,至少 97% 同一性,至少 98% 同一性,或至少 99% 同一性,并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因;和

3)其核苷酸序列在严紧杂交条件,优选高严紧杂交条件下能够与 1)中的基因的核苷酸序列杂交,并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因;

并且其中,所述第二基因选自:

4) 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因 (EC4. 1. 1. 39);

5)其核苷酸序列与 4)中的基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性,优选地至少 85% 同一性,更优选地至少 90% 同一性,更优选地至少 95% 同一性,例如至少 96% 同一性,至少 97% 同一性,至少 98% 同一性,或至少 99% 同一性,并且编码具有 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶活性的蛋白质的基因;和

6)其核苷酸序列在严紧杂交条件,优选高严紧杂交条件下能够与 4)中的基因的核苷酸序列杂交,并且编码具有 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶活性的蛋白质的基因。

2. 权利要求 1 的构建体,其还包含与第一基因和 / 或第二基因可操作地连接的表达调控序列,例如启动子,终止子,和 / 或增强子。

3. 权利要求 2 的构建体,其中所述启动子是组成型启动子或诱导型启动子,优选地所述启动子选自:T7 启动子,CMV 启动子,pBAD 启动子,Trc 启动子,Tac 启动子,lacUV5 启动子,更优选地所述启动子是 T7 启动子。

4. 权利要求 1-3 任一项的构建体,其中所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因是来源于蓝细菌(例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻)或绿藻(例如原绿球藻)的磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因;例如所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因编码 SEQ ID NO:7 所示的蛋白;例如所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因具有如 SEQ I D NO :1 所示的序列。

5. 权利要求 1-4 任一项的构建体,其中所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因是来源于蓝细菌(例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻)或绿藻(例如原绿球藻)或植物(例如拟南芥)的 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因;例如所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因编码 SEQ ID NO:8-10 所示的三个亚基;例如所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因具有如 SEQ ID NO :2 所示的序列。

6. 权利要求 1-5 中任一项的构建体,其中所述构建体还可以包含用于筛选转化体的标记基因;优选地,所述标记基因是卡那霉素抗性基因,红霉素抗性基因或壮观霉素抗性基因。

7. 一种载体,其包含权利要求 1-6 中任一项的构建体。

8. 包含权利要求 1-6 中任一项的构建体和 / 或权利要求 7 的载体的宿主。

9. 权利要求 8 的宿主,其是异养微生物,例如异养细菌、真菌和酵母,例如,酿酒酵母、毕氏酵母、黑曲霉、大肠杆菌、醋酸杆菌、假单胞菌、短杆菌、棒杆菌、枯草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、丙酮丁醇芽孢梭菌、丁酸梭状芽孢杆菌、巴氏芽孢梭菌,优选大肠杆菌。

10. 权利要求 8 的宿主, 其是保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心且保藏号为 CGMCC No. 5435 的大肠杆菌。

11. 一种组合, 其包含含有第一基因的第一构建体和含有第二基因的第二构建体, 其中所述第一基因选自:

1) 磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因 (EC2. 7. 1. 19) ;

2) 其核苷酸序列与 1) 中的基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性, 优选地至少 85% 同一性, 更优选地至少 90% 同一性, 更优选地至少 95% 同一性, 例如至少 96% 同一性, 至少 97% 同一性, 至少 98% 同一性, 或至少 99% 同一性, 并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因; 和

3) 其核苷酸序列在严紧杂交条件, 优选高严紧杂交条件下能够与 1) 中的基因的核苷酸序列杂交, 并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因;

并且其中, 所述第二基因选自:

4) 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因 (EC4. 1. 1. 39) ;

5) 其核苷酸序列与 4) 中的基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性, 优选地至少 85% 同一性, 更优选地至少 90% 同一性, 更优选地至少 95% 同一性, 例如至少 96% 同一性, 至少 97% 同一性, 至少 98% 同一性, 或至少 99% 同一性, 并且编码具有 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶活性的蛋白质的基因; 和

6) 其核苷酸序列在严紧杂交条件, 优选高严紧杂交条件下能够与 4) 中的基因的核苷酸序列杂交, 并且编码具有 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶活性的蛋白质的基因。

12. 权利要求 11 的组合, 其中第一构建体与第二构建体分别作为分离的组分存在, 或作为二者的混合物存在。

13. 权利要求 11 或 12 的组合, 其中第一构建体还包含与第一基因可操作地连接的表达调控序列, 和 / 或第二构建体还包含与第二基因可操作地连接的表达调控序列, 所述表达调控序列例如选自启动子, 终止子, 和 / 或增强子。

14. 权利要求 13 的组合, 其中所述启动子是组成型启动子或诱导型启动子, 优选地所述启动子选自: T7 启动子, CMV 启动子, pBAD 启动子, Trc 启动子, Tac 启动子, lacUV5 启动子, 更优选地所述启动子是 T7 启动子。

15. 权利要求 11-14 任一项的组合, 其中所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因是来源于蓝细菌 (例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻) 或绿藻 (例如原绿球藻) 的磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因; 例如所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因编码 SEQ ID NO:7 所示的蛋白; 例如所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因具有如 SEQ ID NO:1 所示的序列。

16. 权利要求 11-15 任一项的组合, 其中所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因是来源于蓝细菌 (例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻) 或绿藻 (例如原绿球藻) 或植物 (例如拟南芥) 的 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因; 例如所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因编码 SEQ ID NO:8-10 所示的三个亚基; 例如所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因具有如 SEQ ID NO:2 所示的序列。

17. 权利要求 11-16 中任一项的组合, 其中所述第一构建体和 / 或第二构建体还包含用于筛选转化体的标记基因; 优选地, 所述标记基因是卡那霉素抗性基因, 红霉素抗性基因或

壮观霉素抗性基因。

18. 一种组合,其包含第一载体和第二载体,其中所述第一载体包含权利要求 11-17 中任一项所定义的第一构建体,并且第二载体包含权利要求 11-17 中任一项所定义的第二构建体。

19. 一种宿主,其包含权利要求 11-17 中任一项所定义的第一构建体和 / 或权利要求 18 所定义的第一载体,并且包含权利要求 11-17 中任一项所定义的第二构建体和 / 或权利要求 18 所定义的第二载体。

20. 权利要求 19 的宿主,其是异养微生物,例如异养细菌、真菌和酵母,例如,酿酒酵母、毕氏酵母、黑曲霉、大肠杆菌、醋酸杆菌、假单胞菌、短杆菌、棒杆菌、枯草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、丙酮丁醇芽孢梭菌、丁酸梭状芽孢杆菌、巴氏芽孢梭菌,优选大肠杆菌。

21. 一种试剂盒,其包含,

- 1) 权利要求 1-6 任一项的构建体,或权利要求 7 的载体 ;或者
- 2) 权利要求 11-18 任一项的组合。

22. 权利要求 21 的试剂盒,其还包含用于将构建体或载体引入宿主(例如异养微生物,例如异养细菌、真菌和酵母,例如,酿酒酵母、毕氏酵母、黑曲霉、大肠杆菌、醋酸杆菌、假单胞菌、短杆菌、棒杆菌、枯草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、丙酮丁醇芽孢梭菌、丁酸梭状芽孢杆菌、巴氏芽孢梭菌,优选大肠杆菌)的试剂,例如转染试剂。

23. 在异养微生物中固定二氧化碳或者减少异养微生物的二氧化碳排放的方法,其包括,

将权利要求 1-6 任一项的构建体,或权利要求 7 的载体导入所述异养微生物中 ;或者,将权利要求 11-17 中任一项所定义的第一构建体和 / 或权利要求 18 所定义的第一载体,以及权利要求 11-17 中任一项所定义的第二构建体和 / 或权利要求 18 所定义的第二载体导入所述异养微生物中,

从而使所述异养微生物能够表达第一基因和第二基因。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述第一基因和第二基因被整合入所述异养微生物的基因组内。

25. 权利要求 23 的方法,其中所述第一基因和第二基因作为游离体存在于异养微生物中。

26. 权利要求 23-25 中任一项的方法,其中所述异养微生物选自异养细菌、真菌和酵母,例如,酿酒酵母、毕氏酵母、黑曲霉、大肠杆菌、醋酸杆菌、假单胞菌、短杆菌、棒杆菌、枯草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、丙酮丁醇芽孢梭菌、丁酸梭状芽孢杆菌、巴氏芽孢梭菌,优选大肠杆菌。

27. 权利要求 1-6 任一项的构建体或权利要求 7 的载体或权利要求 11-18 任一项的组合或者权利要求 21 或 22 的试剂盒用于在异养微生物中固定二氧化碳或者减少异养微生物的二氧化碳排放的用途。

28. 权利要求 27 的用途,其中所述异养微生物选自异养细菌、真菌和酵母,例如,酿酒酵母、毕氏酵母、黑曲霉、大肠杆菌、醋酸杆菌、假单胞菌、短杆菌、棒杆菌、枯草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、丙酮丁醇芽孢梭菌、丁酸梭状芽孢杆菌、巴氏芽孢梭菌,优选大肠杆菌。

29. 在异养微生物中固定二氧化碳或者减少异养微生物的二氧化碳排放的方法,其包

括将第一基因和第二基因导入所述异养微生物中 ;其中所述第一基因选自 :

1) 磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因 (EC2. 7. 1. 19) ;

2) 其核苷酸序列与 1) 中的基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性, 优选地至少 85% 同一性, 更优选地至少 90% 同一性, 更优选地至少 95% 同一性, 例如至少 96% 同一性, 至少 97% 同一性, 至少 98% 同一性, 或至少 99% 同一性, 并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因 ;和

3) 其核苷酸序列在严紧杂交条件, 优选高严紧杂交条件下能够与 1) 中的基因的核苷酸序列杂交, 并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因 ;

并且其中, 所述第二基因选自 :

4) 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因 (EC4. 1. 1. 39) ;

5) 其核苷酸序列与 4) 中的基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性, 优选地至少 85% 同一性, 更优选地至少 90% 同一性, 更优选地至少 95% 同一性, 例如至少 96% 同一性, 至少 97% 同一性, 至少 98% 同一性, 或至少 99% 同一性, 并且编码具有 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶活性的蛋白质的基因 ;和

6) 其核苷酸序列在严紧杂交条件, 优选高严紧杂交条件下能够与 4) 中的基因的核苷酸序列杂交, 并且编码具有 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶活性的蛋白质的基因,

从而使所述异养微生物能够表达第一基因和第二基因。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因是来源于蓝细菌 (例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻) 或绿藻 (例如原绿球藻) 的磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因 ;例如所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因编码 SEQ ID NO:7 所示的蛋白 ;例如所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因具有如 SEQ ID NO:1 所示的序列。

31. 权利要求 29 或 30 的方法, 其中所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因是来源于蓝细菌 (例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻) 或绿藻 (例如原绿球藻) 或植物 (例如拟南芥) 的 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因 ;例如所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因编码 SEQ ID NO:8-10 所示的三个亚基 ;例如所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因具有如 SEQ ID NO:2 所示的序列。

32. 权利要求 29 的方法, 其中通过一种或多种载体将第二基因导入所述异养微生物。

33. 权利要求 32 的方法, 其中通过同时编码 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的亚基 rbcL 和 rbcS 或者亚基 rbcL, rbcS 和 rbcX 的 1 种载体将第二基因导入所述异养微生物, 或者通过分别编码 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的亚基 rbcL 和 rbcS 的 2 种载体将第二基因导入所述异养微生物, 或者通过分别编码 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的 rbcL, rbcS 和 rbcX 亚基的 3 种载体将第二基因导入所述异养微生物。

34. 权利要求 29-33 任一项的方法, 其中所述第一基因和第二基因被整合入所述异养微生物的基因组内。

35. 权利要求 29-33 任一项的方法, 其中所述第一基因和第二基因作为游离体存在于异养微生物中。

36. 权利要求 29-35 中任一项的方法, 其中所述异养微生物选自异养细菌、真菌和酵母, 例如, 酿酒酵母、毕氏酵母、黑曲霉、大肠杆菌、醋酸杆菌、假单胞菌、短杆菌、棒杆菌、枯

草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、丙酮丁醇芽孢梭菌、丁酸梭状芽孢杆菌、巴氏芽孢梭菌,优选大肠杆菌。

37. 一种试剂盒,其包含第一组分和第二组分,其中

第一组分包含编码磷酸核酮糖激酶 (Prk) 的载体,并且

第二组分包含编码 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的一种或多种载体,其中,第一组分和第二组分分别作为分离的组分存在,或作为二者的混合物存在。

38. 权利要求 37 的试剂盒,其中第二组分包含 1 种载体,其编码 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的亚基 *rbcL* 和 *rbcS* 或者亚基 *rbcL*, *rbcS* 和 *rbcX*。

39. 权利要求 37 的试剂盒,其中第二组分包含 2 种载体,其分别编码 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的亚基 *rbcL* 和 *rbcS*。

40. 权利要求 37 的试剂盒,其中第二组分包含 3 种载体,其分别编码 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的亚基 *rbcL*, *rbcS* 和 *rbcX*。

41. 权利要求 37-40 任一项的试剂盒,其还包含用于将载体引入宿主(例如异养微生物,例如异养细菌、真菌和酵母,例如,酿酒酵母、毕氏酵母、黑曲霉、大肠杆菌、醋酸杆菌、假单胞菌、短杆菌、棒杆菌、枯草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、丙酮丁醇芽孢梭菌、丁酸梭状芽孢杆菌、巴氏芽孢梭菌,优选大肠杆菌)的试剂,例如转染试剂。

42. 权利要求 37-41 任一项的试剂盒用于在异养微生物中固定二氧化碳或者减少异养微生物的二氧化碳排放的用途。

用于固定二氧化碳的构建体、菌株及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物质能源领域、生物化学领域和基因工程领域。具体而言,本发明涉及用于在异养微生物(例如异养发酵菌株,例如大肠杆菌)中实现二氧化碳固定和/或减少二氧化碳排放的构建体,包含所述构建体的载体,包含所述构建体或用所述载体转化的异养微生物(例如异养发酵菌株,例如大肠杆菌),以及在异养微生物(例如异养发酵菌株,例如大肠杆菌)中固定二氧化碳和/或减少二氧化碳排放的方法。

背景技术

[0002] 能源需求的持续快速增长与能源价格的不断攀升,石化能源供给的不足以及大量使用石化能源所导致的环境污染与气候变化等问题使得发展可再生替代能源迫在眉睫。针对减少对石油资源的依赖、降低二氧化碳排放等问题,以生物质资源利用为基础的、生产生物燃料和生化产品的技术是一个有吸引力和有效的手段。然而,生物燃料和生化产品的生产过程中的二氧化碳排放,使得生物制品的环境友好及“零碳排放”变得有争议。在生物质发酵过程中,由于微生物的代谢性质,二氧化碳排放在本质上是不可避免的。大多数具有活性和功能的生物大分子例如碳水化合物,脂肪和蛋白质在被降解和氧化的过程中,均伴有二氧化碳的产生/释放。例如,在以葡萄糖为底物、厌氧发酵生物质以生产生物制品及衍生糖类时,每产生一分子乙醇都伴有一分子二氧化碳的排放: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$ 。因此,无论从科学研究的角度,还是从优化工业生产及环境保护的角度来看,解决微生物发酵过程中的二氧化碳排放问题都非常必要。

[0003] 在植物和自养微生物中,二氧化碳可以被固定并转化为有机生物质。目前已鉴定了六种不同的二氧化碳固定途径,包括例如卡尔文循环、核酮糖-单磷酸途径(Ribulose-Monophosphate Pathway)和丝氨酸途径(Serine Pathway)等(参见,例如图1B)。这些代谢途径存在于不同的生物体系中,并且由光、硫化物、氢等各种能量在厌氧或好氧的环境下提供还原力。

[0004] 在本申请中,发明人创造性地将原核生物的 CO_2 固定途径引入了异养微生物,从本质上减少了微生物发酵过程中的二氧化碳排放/释放(参见,例如图1C),从而为解决微生物发酵过程中的二氧化碳排放问题提供了新的思路和手段。

发明内容

[0005] 相关术语

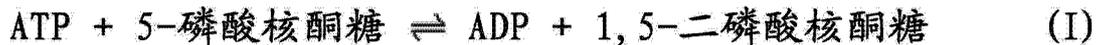
[0006] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学、分析化学等实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0007] 如本发明中所使用的,术语“异养”是相对于“自养”而言的,其具有本领域技术人员所通常理解的含义。通常,“自养微生物”是指,不依赖于任何有机营养物即可正常生活

的微生物，“异养微生物”是指，必须依赖于至少一种有机营养物才可正常生活的微生物。自养微生物的一个典型代表是蓝细菌 (Cyanobacterium)，例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻（例如集胞藻 PCC6803 (Synechocystis sp. PCC6803)）。蓝细菌也称为蓝藻，其是能够利用太阳能来固定二氧化碳的光合自养型原核微生物。异养微生物的一个典型代表是大肠杆菌 (E. coli)，例如大肠杆菌菌株 BL21 (DE3)。大肠杆菌因容易培养、遗传学清晰、生长周期短等优点，已成为最广泛使用且最具有代表性的原核异养微生物。

[0008] 如本发明中所使用的，磷酸核酮糖激酶 (phosphoribulokinase, prk) 是指，能够催化将 5-磷酸核酮糖转化为 1,5-二磷酸核酮糖的下述反应的酶 (EC2.7.1.19)：

[0009]



[0010] 编码野生型磷酸核酮糖激酶 (EC2.7.1.19) 的基因是本领域公知的，并且可获得自各种公共数据库（例如 GENBANK, EXPASY 等）。此外，编码磷酸核酮糖激酶 (EC2.7.1.19) 的基因可获自各种来源，例如其可以来源于蓝细菌（例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻）或绿藻（例如原绿球藻）。

[0011] 本领域技术人员理解，在野生型磷酸核酮糖激酶基因或其编码的多肽中，可天然产生或人工引入突变或变异（包括但不限于，置换，缺失和 / 或添加），而不影响其生物学功能或者活性（即，催化式 I 的反应）。因此，在本发明中，还可以使用野生型磷酸核酮糖激酶基因的功能性变体。如本发明中所使用的，“基因的功能性变体”是指这样的变体，其与野生型基因在序列上存在差异，但所编码的多肽 / 蛋白质仍然保留野生型蛋白质的功能或者活性。因此，野生型磷酸核酮糖激酶基因的功能性变体可以是这样的变体，其核苷酸序列与野生型磷酸核酮糖激酶基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性，优选地至少 85% 同一性，更优选地至少 90% 同一性，更优选地至少 95% 同一性，例如至少 96% 同一性，至少 97% 同一性，至少 98% 同一性，或至少 99% 同一性，并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质；或者，可以是这样的变体，其核苷酸序列在严紧杂交条件，优选高严紧杂交条件下能够与野生型磷酸核酮糖激酶基因的核苷酸序列杂交，并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质。

[0012] 如本发明中所使用的，1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco) 是指，能够催化将 1,5-二磷酸核酮糖和一分子二氧化碳转化为两分子 3-磷酸甘油酸的下述反应的酶 (EC4.1.1.39)：

[0013]



[0014] 编码野生型 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (EC4.1.1.39) 的基因是本领域公知的，并且可获得自各种公共数据库（例如 GENBANK, EXPASY 等）。此外，编码 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (EC4.1.1.39) 的基因可获自各种来源，例如其可以来源于蓝细菌（例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻）或绿藻（例如原绿球藻）或植物（例如拟南芥）。

[0015] 通常，1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶包含 2 种亚基（即，大亚基 rbcL 和小亚基 rbcS）。然而在一些生物（例如某些藻类，例如集胞藻）中，1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶可包含 3 种亚基 (rbcL, rbcS 和 rbcX)。

[0016] 此外，本领域技术人员理解，在野生型 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因或

其编码的多肽中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于,置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能或者活性(即,催化式 II 的反应)。因此,在本发明中,还可以使用野生型 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶基因的功能性变体。例如,野生型 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶基因的功能性变体可以是这样的变体,其核苷酸序列与野生型 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性,优选地至少 85% 同一性,更优选地至少 90% 同一性,更优选地至少 95% 同一性,例如至少 96% 同一性,至少 97% 同一性,至少 98% 同一性,或至少 99% 同一性,并且编码具有 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶活性的蛋白质;或者,可以是这样的变体,其核苷酸序列在严紧杂交条件,优选高严紧杂交条件下能够与野生型 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶基因的核苷酸序列杂交,并且编码具有 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶活性的蛋白质。

[0017] 如本发明中所使用的,载体(vector)是指能够将 DNA 片段(例如,目的基因)插入其中从而允许将 DNA 片段(例如,目的基因)转移到受者细胞中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的 DNA 片段所编码的蛋白获得表达时,载体也称为表达载体。载体可以通过转化,转导或者转染导入宿主细胞,使其携带的 DNA 片段在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的,包括但不限于:质粒;噬菌体;柯斯质粒等等。

[0018] 如本发明中所使用的,通常将 DNA 片段(例如,目的基因)与表达调控序列可操作地连接,以实现 DNA 片段(例如,目的基因)的组成型或诱导型表达。如本发明中所使用的,“可操作地连接”是指所连接的分子的连接方式使得能够实现预期的功能。例如,表达调控序列与基因编码序列的可操作的连接可实现表达调控序列对基因编码序列的表达的控制作用。如本发明中所使用的,“表达调控序列”是实现基因表达所需要的控制序列,其是本领域熟知的。表达调控序列通常包括启动子,常常也包括转录终止序列(即,终止子),并且还可以包含其他序列,如增强子序列。

[0019] 如本发明中所使用的,“杂交”表示这样一个过程:在该过程中,于合适的条件下,两条核酸序列以稳定且特异的氢键相互结合以致形成双链。这些氢键在互补碱基腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)(或尿嘧啶(U))之间(则这称为 A-T 键)或在互补碱基鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)之间(则这称为 G-C 键)形成。两条核酸序列的杂交可以是全部的(则称为互补序列),即在该杂交过程中获得的双链仅包含 A-T 键和 C-G 键。这种杂交也可以是部分的(则称为足够互补的序列),即获得的双链包含允许形成双链的 A-T 键和 C-G 键,且还包含未与互补碱基结合的碱基。两条互补序列或足够互补的序列之间的杂交取决于所使用的操作条件,并且特别是严紧性。严紧性特别是根据两条核酸序列的碱基组成来定义,以及通过这两条核酸序列之间的错配程度来定义。严紧性还可以取决于反应参数,例如存在于杂交溶液中的离子种类的浓度和类型,变性剂的性质和浓度,和/或杂交温度。所有这些数据是所熟知的,并且合适的条件可以由本领域技术人员来确定。

[0020] 如本领域已知的,核酸序列彼此杂交的条件可以被描述为从低到高严紧性的范围。术语“严紧杂交条件”是指这样的条件,其中在该条件下彼此杂交的两条核酸序列的同一性为至少 70%,更优选至少 80%,更优选至少 90%,也即,这样的条件,其中,仅在杂交所获得的双链包含至少 70%,更优选至少 80%,更优选至少 90% 的 A-T 键和 C-G 键时,能够发生杂交。

[0021] “严紧杂交条件”是本领域熟知的,并且取决于多个因素,例如所使用的缓冲液的

成分、pH 和离子强度,所使用的温度等等。特别地,在此处提及低严紧杂交条件时,包括至少大约 0% 到至少大约 15%v/v 甲酰胺,以及用于杂交的至少大约 1M 到至少大约 2M 的盐,和用于洗涤条件的至少大约 1M 到至少大约 2M 的盐。一般地,低严紧杂交条件的温度为大约 25-30°C 到大约 42°C。在此处提及中等严紧杂交条件时,包括至少大约 16%v/v 到至少大约 30%v/v 的甲酰胺,以及用于杂交的至少大约 0.5M 到至少大约 0.9M 的盐,和用于洗涤条件的至少大约 0.5M 到至少大约 0.9M 的盐。在此处提及高严紧杂交条件时,包括至少大约 31%v/v 到至少大约 50%v/v 的甲酰胺,以及用于杂交的至少大约 0.01M 到至少大约 0.15M 的盐,和用于洗涤条件的至少大约 0.01M 到至少大约 0.15M 的盐。一般地,洗涤在下列条件下进行: $T_m=69.3+0.41(G+C)\%$ (Marmur and Doty, 1962)。但是,每增加 1% 的错配碱基对数目,双链体 DNA 的 T_m 下降 1°C (Bonner, 1983)。在这些杂交条件中甲酰胺是可选的。因此,特别优选的严紧杂交条件如下确定:低严紧杂交条件是 6x SSC 缓冲液,1.0%w/v SDS,在 25-42°C 下;中等严紧杂交条件是 2x SSC 缓冲液,1.0%w/v SDS,在 20°C 至 65°C 的温度下;高严紧杂交条件是 0.1x SSC 缓冲液,0.1%w/v SDS,在至少 65°C 的温度下。关于核酸的杂交的详尽指导可见于 Tijssen, (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, 第 1 部分, 第 2 章 (Elsevier, New York); 和 Ausubel 等人, 编辑 (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 2 章 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York)。还可参见 Sambrook 等人, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)。确定和选择合适的严紧杂交条件完全在本领域技术人员的能力范围之内。

[0022] 如本发明中所使用的,术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如,两个 DNA 分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据,或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据),那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如,如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配,那么这两个序列具有 60% 的同一性。例如, DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 共有 50% 的同一性(总共 6 个位置中有 3 个位置匹配)。通常,在将两个序列比对以产生最大同一性(最佳比对)时进行比较。序列的最佳比对可以通过下述来进行:例如, Smith 和 Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2 :482, 1970) 的局部同源性算法; Needleman 和 Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48 :443, 1970) 的同源性比对算法; Pearson 和 Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :2444, 1988) 的相似性搜索方法; 这些算法的计算机化实施(例如, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. 中的 GAP、BESTFIT、FASTA、BLASTP、BLASTN 和 TFASTA); 或手工比对和目测检查(参见,例如 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 增刊))。例如,最佳比对可通过使用,可通过计算机程序例如 Align 程序(DNAstar, Inc.) 方便地进行的 Needleman 等人(1970) *J. Mol. Biol.* 48 :443-453 的方法来实现。还可使用已整合入 ALIGN 程序(版本 2.0)的 E. Meyers 和 W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) 的算法,使用 PAM120 权重残基表(weight residue table)、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外,可使用已整合

入 GCG 软件包（可在 www.gcg.com 上获得）的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch (J MoI Biol. 48:444-453(1970)) 算法, 使用 Blossum62 矩阵或 PAM250 矩阵以及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重 (gapweight) 和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

[0023] 本发明的实施方案所涉及的一性百分数包括至少大约 60%, 或至少大约 65%, 或至少大约 70%, 或至少大约 75%, 或至少大约 80%, 或至少大约 85%, 或至少大约 90%, 或更高, 例如大约 95%, 或大约 96%, 或大约 97%, 或大约 98%, 或大约 99%, 例如至少大约 60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%。

[0024] 本发明的详细描述

[0025] 本发明至少部分基于发明人的出人意料的发现: 通过在异养微生物（例如异养发酵菌株, 例如大肠杆菌）中引入二氧化碳固定途径（例如磷酸核酮糖激酶和 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶）, 可以减少异养微生物发酵过程中的二氧化碳排放 / 释放。

[0026] 不希望受任何理论束缚, 发明人现认为, 通过在异养微生物（例如异养发酵菌株, 例如大肠杆菌）中引入二氧化碳固定途径（例如磷酸核酮糖激酶和 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶）, 异养微生物能够将二氧化碳转化为有机物, 从而实现二氧化碳的固定和 / 或减少二氧化碳的排放。例如, 在异养微生物中引入磷酸核酮糖激酶和 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶后, 所述异养微生物将可以利用磷酸核酮糖激酶, 以 5-磷酸核酮糖为底物产生 1, 5-二磷酸核酮糖; 并可以进一步利用 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶, 以 1, 5-二磷酸核酮糖和二氧化碳为底物产生 3-磷酸甘油酸（参见, 例如图 1C）, 从而将二氧化碳转化为有机物（例如, 3-磷酸甘油酸）以参与微生物体内代谢, 并最终实现二氧化碳的固定和 / 或该微生物发酵过程中的更低的二氧化碳排放。

[0027] 因此, 在第一方面, 本发明提供了一种构建体, 其包含第一基因和第二基因, 其中所述第一基因选自:

[0028] 1) 磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因 (EC2. 7. 1. 19);

[0029] 2) 其核苷酸序列与 1) 中的基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性, 优选地至少 85% 同一性, 更优选地至少 90% 同一性, 更优选地至少 95% 同一性, 例如至少 96% 同一性, 至少 97% 同一性, 至少 98% 同一性, 或至少 99% 同一性, 并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因; 和

[0030] 3) 其核苷酸序列在严紧杂交条件, 优选高严紧杂交条件下能够与 1) 中的基因的核苷酸序列杂交, 并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因;

[0031] 并且其中, 所述第二基因选自:

[0032] 4) 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因 (EC4. 1. 1. 39);

[0033] 5) 其核苷酸序列与 4) 中的基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性, 优选地至少 85% 同一性, 更优选地至少 90% 同一性, 更优选地至少 95% 同一性, 例如至少 96% 同一性, 至少 97% 同一性, 至少 98% 同一性, 或至少 99% 同一性, 并且编码具有 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶活性的蛋白质的基因; 和

[0034] 6) 其核苷酸序列在严紧杂交条件, 优选高严紧杂交条件下能够与 4) 中的基因的核

苷酸序列杂交,并且编码具有 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶活性的蛋白质的基因。

[0035] 所述构建体可用于在异养微生物(例如异养发酵菌株,例如大肠杆菌)中引入二氧化碳固定途径。

[0036] 在一个优选的实施方案中,本发明的构建体还包含与第一基因和/或第二基因可操作地连接的表达调控序列,例如启动子,终止子,和/或增强子。例如,本发明的构建体还包含与第一基因可操作地连接的表达调控序列,以及与第二基因可操作地连接的表达调控序列。

[0037] 此类表达调控序列是本领域技术人员公知的。在一个优选的实施方案中,所述启动子是组成型启动子或诱导型启动子。在另一个优选的实施方案中,所述启动子包括但不限于,例如 T7 启动子,CMV 启动子,pBAD 启动子,Trc 启动子,Tac 启动子,lacUV5 启动子。在一个进一步优选的实施方案中,所述启动子是 T7 启动子。

[0038] 在一个优选的实施方案中,在将构建体转化入宿主细胞后,构建体中的第一基因和第二基因分别进行表达,产生具有磷酸核酮糖激酶活性的第一蛋白和具有 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶活性的第二蛋白。在另一个优选的实施方案中,第一基因和第二基因在宿主细胞中表达为融合蛋白,其具有磷酸核酮糖激酶活性和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶活性。

[0039] 在一个优选的实施方案中,所述磷酸核酮糖激酶(Prk)基因是来源于蓝细菌(例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻)或绿藻(例如原绿球藻)的磷酸核酮糖激酶(Prk)基因。在一个进一步优选的实施方案中,所述磷酸核酮糖激酶(Prk)基因编码 SEQ ID NO:7 所示的蛋白;例如所述磷酸核酮糖激酶(Prk)基因具有如 SEQ ID NO:1 所示的序列。

[0040] 在一个优选的实施方案中,所述 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)基因是来源于蓝细菌(例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻)或绿藻(例如原绿球藻)或植物(例如拟南芥)的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)基因。在一个进一步优选的实施方案中,所述 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)基因编码 SEQ ID NO:8-10 所示的三个亚基;例如所述 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)基因具有如 SEQ ID NO:2 所示的序列。

[0041] 在一个优选的实施方案中,所述构建体还可以包含用于筛选转化体的标记基因。所述标记基因包括但不限于,例如卡那霉素抗性基因(NCBI ID:NC_003239.1),红霉素抗性基因(NCBI ID:NC_015291.1)和壮观霉素抗性基因(参见例如,中国发明专利申请 201010213758.5)。此类标记基因是本领域技术人员熟知的,并且其选择在本领域技术人员的能力范围之内。在一个优选的实施方案中,所述标记基因是卡那霉素抗性基因。在另一个优选的实施方案中,所述标记基因为壮观霉素抗性基因 Omega 片段,其序列例如参见中国发明专利申请 201010213758.5。在另一个优选的实施方案中,所述标记基因可以位于与第一基因和/或第二基因可操作地连接的启动子的上游或下游。

[0042] 在第二方面,本发明提供了一种载体,其包含上文第一方面中所定义的构建体。

[0043] 可用于插入目的基因或构建体的载体是本领域公知的,包括但不限于克隆载体和表达载体。在一个优选的实施方案中,载体是例如质粒,粘粒,噬菌体,柯斯质粒等等。

[0044] 在第三方面,本发明提供了一种宿主,其包含上面所定义的构建体和/或载体,或者已用上面所定义的载体进行了转化。

[0045] 在一个优选的实施方案中,所述宿主是异养微生物。例如,所述宿主可以是异养细菌、真菌和酵母,其包括但不限于,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕氏酵母(*Pichia*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、醋酸杆菌(*Bacillus aceticus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、短杆菌(*Bacillus brevis*)、棒杆菌(*Corynebacterium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、丙酮丁醇芽孢梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、丁酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*)、巴氏芽孢梭菌(*Clostridium pasteurianum*)。优选地,所述宿主是大肠杆菌。

[0046] 在一个优选的实施方案中,所述宿主是保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)且保藏号为CGMCC No. 5435的大肠杆菌E2。

[0047] 在第四方面,本发明提供了一种组合,其包含含有第一基因的第一构建体和含有第二基因的第二构建体,其中所述第一基因选自:

[0048] 1) 磷酸核酮糖激酶(Prk)基因(EC2.7.1.19);

[0049] 2) 其核苷酸序列与1)中的基因的核苷酸序列具有至少80%同一性,优选地至少85%同一性,更优选地至少90%同一性,更优选地至少95%同一性,例如至少96%同一性,至少97%同一性,至少98%同一性,或至少99%同一性,并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因;和

[0050] 3) 其核苷酸序列在严紧杂交条件,优选高严紧杂交条件下能够与1)中的基因的核苷酸序列杂交,并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因;

[0051] 并且其中,所述第二基因选自:

[0052] 4) 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)基因(EC4.1.1.39);

[0053] 5) 其核苷酸序列与4)中的基因的核苷酸序列具有至少80%同一性,优选地至少85%同一性,更优选地至少90%同一性,更优选地至少95%同一性,例如至少96%同一性,至少97%同一性,至少98%同一性,或至少99%同一性,并且编码具有1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶活性的蛋白质的基因;和

[0054] 6) 其核苷酸序列在严紧杂交条件,优选高严紧杂交条件下能够与4)中的基因的核苷酸序列杂交,并且编码具有1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶活性的蛋白质的基因。

[0055] 在一个优选的实施方案中,所述第一构建体与第二构建体分别作为分离的组分存在,或作为二者的混合物存在。

[0056] 在一个优选的实施方案中,所述第一构建体还包含与第一基因可操作地连接的表达调控序列,和/或所述第二构建体还包含与第二基因可操作地连接的表达调控序列,例如启动子,终止子,和/或增强子。

[0057] 此类表达调控序列是本领域技术人员公知的。在一个优选的实施方案中,所述启动子是组成型启动子或诱导型启动子。在另一个优选的实施方案中,所述启动子包括但不限于,例如T7启动子,CMV启动子,pBAD启动子,Trc启动子,Tac启动子,lacUV5启动子。在一个进一步优选的实施方案中,所述启动子是T7启动子。

[0058] 在一个优选的实施方案中,所述磷酸核酮糖激酶(Prk)基因是来源于蓝细菌(例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻)或绿藻(例如原绿球藻)的磷酸核酮糖激酶(Prk)基因。在一个进一步优选的实施方案中,所述磷酸核酮糖激酶(Prk)基因编码SEQ ID NO:7所示的

蛋白；例如所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因具有如 SEQ ID NO:1 所示的序列。

[0059] 在一个优选的实施方案中,所述 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 基因是来源于蓝细菌(例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻)或绿藻(例如原绿球藻)或植物(例如拟南芥)的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 基因。在一个进一步优选的实施方案中,所述 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 基因编码 SEQ ID NO:8-10 所示的三个亚基；例如所述 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 基因具有如 SEQ ID NO:2 所示的序列。

[0060] 在一个优选的实施方案中,所述第一构建体和/或第二构建体还可以包含用于筛选转化体的标记基因。所述标记基因包括但不限于,例如卡那霉素抗性基因 (NCBI ID: NC_003239.1),红霉素抗性基因 (NCBI ID: NC_015291.1) 和壮观霉素抗性基因(参见例如,中国发明专利申请 201010213758.5)。此类标记基因是本领域技术人员熟知的,并且其选择在本领域技术人员的能力范围之内。在一个优选的实施方案中,所述标记基因是卡那霉素抗性基因。在另一个优选的实施方案中,所述标记基因为壮观霉素抗性基因 Omega 片段,其序列例如参见中国发明专利申请 201010213758.5。在另一个优选的实施方案中,所述第一构建体和第二构建体都包含标记基因。在一个进一步优选的实施方案中,第一构建体中的标记基因与第二构建体中的标记基因可以是相同的或者不同的标记基因。

[0061] 在第五方面,本发明提供了一种组合,其包含第一载体和第二载体,其中所述第一载体包含上文第四方面中所定义的第一构建体,并且第二载体包含上文第四方面中所定义的第二构建体。

[0062] 可用于插入目的基因或构建体的载体是本领域公知的,包括但不限于克隆载体和表达载体。在一个优选的实施方案中,所述第一载体和/或第二载体各自独立地是例如质粒,粘粒,噬菌体,柯斯质粒等等。

[0063] 在另一个方面,本发明提供了一种宿主,其包含上面所定义的第一构建体和/或第一载体,并且包含上面所定义的第二构建体和/或第二载体,或者其已用上面所定义的第一载体和第二载体进行了转化。

[0064] 在一个优选的实施方案中,所述宿主是异养微生物。例如,所述宿主可以是异养细菌、真菌和酵母,其包括但不限于,酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、毕氏酵母 (*Pichia*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、醋酸杆菌 (*Bacillus aceticus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、短杆菌 (*Bacillus brevis*)、棒杆菌 (*Corynebacterium*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、丙酮丁醇芽孢梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)、丁酸梭状芽孢杆菌 (*Clostridium butyricum*)、巴氏芽孢梭菌 (*Clostridium pasteurianum*)。优选地,所述宿主是大肠杆菌。

[0065] 在第六方面,本发明提供了一种试剂盒,其包含,1) 上文第一方面中所定义的构建体,或上文第二方面中所定义的载体;和/或 2) 上文第四或第五方面中所定义的组合。

[0066] 在一个优选的实施方案中,所述试剂盒还包含另外的试剂,例如用于将构建体或载体引入宿主(例如异养微生物,例如异养细菌、真菌和酵母,例如,酿酒酵母、毕氏酵母、黑曲霉、大肠杆菌、醋酸杆菌、假单胞菌、短杆菌、棒杆菌、枯草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、丙酮丁醇芽孢梭菌、丁酸梭状芽孢杆菌、巴氏芽孢梭菌,优选大肠杆菌)的试剂。在一个

优选的实施方案中,所述另外的试剂例如是转染试剂。

[0067] 在第七方面,本发明提供了在异养微生物中固定二氧化碳或者减少异养微生物的二氧化碳排放的方法,其包括,

[0068] 1) 将上文第一方面中所定义的构建体,或上文第二方面中所定义的载体导入所述异养微生物中;或者,

[0069] 2) 将上文第四方面中任一项所定义的第一构建体和/或上文第五方面中所定义的第一载体,以及上文第四方面中所定义的第二构建体和/或上文第五方面中所定义的第二载体导入所述异养微生物中,

[0070] 从而使所述异养微生物能够表达第一基因和第二基因。

[0071] 在一个优选的实施方案中,所述第一基因和第二基因被整合入所述异养微生物的基因组内。在另一个优选的实施方案中,所述第一基因和第二基因在所述宿主中作为游离体存在。

[0072] 在一个优选的实施方案中,所述宿主是异养微生物。例如,所述宿主可以是异养细菌、真菌和酵母,其包括但不限于,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕氏酵母(*Pichia*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、醋酸杆菌(*Bacillus aceticus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、短杆菌(*Bacillus brevis*)、棒杆菌(*Corynebacterium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、丙酮丁醇芽孢梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、丁酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*)、巴氏芽孢梭菌(*Clostridium pasteurianum*)。优选地,所述宿主是大肠杆菌。

[0073] 用于将构建体或载体引入宿主的方法是本领域技术人员公知的,其包括但不限于,转染、转化和转导。例如,此类方法包括但不限于,脂质体转染,磷酸钙沉积,电穿孔、颗粒轰击等等。

[0074] 在第八方面,本发明的实施方案涉及上文第一方面中所定义的构建体或上文第二方面中所定义的载体或上文第四或第五方面中所定义的组合或者上文第六方面中所定义的试剂盒用于在异养微生物中固定二氧化碳或者减少异养微生物的二氧化碳排放的用途。

[0075] 在一个优选的实施方案中,所述宿主是异养微生物。例如,所述宿主可以是异养细菌、真菌和酵母,其包括但不限于,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕氏酵母(*Pichia*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、醋酸杆菌(*Bacillus aceticus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、短杆菌(*Bacillus brevis*)、棒杆菌(*Corynebacterium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、丙酮丁醇芽孢梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、丁酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*)、巴氏芽孢梭菌(*Clostridium pasteurianum*)。优选地,所述宿主是大肠杆菌。

[0076] 在第九方面,本发明提供了能够固定二氧化碳的大肠杆菌 E2,其保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),保藏号为 CGMCC No. 5435。

[0077] 在第十方面,本发明提供了在异养微生物中固定二氧化碳或者减少异养微生物的二氧化碳排放的方法,其包括,将第一基因和第二基因导入所述异养微生物中;其中所述第

一基因选自：

[0078] 1) 磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因 (EC2. 7. 1. 19) ；

[0079] 2) 其核苷酸序列与 1) 中的基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性, 优选地至少 85% 同一性, 更优选地至少 90% 同一性, 更优选地至少 95% 同一性, 例如至少 96% 同一性, 至少 97% 同一性, 至少 98% 同一性, 或至少 99% 同一性, 并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因 ; 和

[0080] 3) 其核苷酸序列在严紧杂交条件, 优选高严紧杂交条件下能够与 1) 中的基因的核苷酸序列杂交, 并且编码具有磷酸核酮糖激酶活性的蛋白质的基因 ；

[0081] 并且其中, 所述第二基因选自：

[0082] 4) 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因 (EC4. 1. 1. 39) ；

[0083] 5) 其核苷酸序列与 4) 中的基因的核苷酸序列具有至少 80% 同一性, 优选地至少 85% 同一性, 更优选地至少 90% 同一性, 更优选地至少 95% 同一性, 例如至少 96% 同一性, 至少 97% 同一性, 至少 98% 同一性, 或至少 99% 同一性, 并且编码具有 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶活性的蛋白质的基因 ; 和

[0084] 6) 其核苷酸序列在严紧杂交条件, 优选高严紧杂交条件下能够与 4) 中的基因的核苷酸序列杂交, 并且编码具有 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶活性的蛋白质的基因,

[0085] 从而使所述异养微生物能够表达第一基因和第二基因。

[0086] 在一个优选的实施方案中, 所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因是来源于蓝细菌 (例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻) 或绿藻 (例如原绿球藻) 的磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因。在一个进一步优选的实施方案中, 所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因编码 SEQ ID NO:7 所示的蛋白 ; 例如所述磷酸核酮糖激酶 (Prk) 基因具有如 SEQ ID NO:1 所示的序列。

[0087] 在一个优选的实施方案中, 所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因是来源于蓝细菌 (例如鱼腥藻、聚球藻或集胞藻) 或绿藻 (例如原绿球藻) 或植物 (例如拟南芥) 的 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因。在一个进一步优选的实施方案中, 所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因编码 SEQ ID NO:8-10 所示的三个亚基 ; 例如所述 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 基因具有如 SEQ ID NO:2 所示的序列。

[0088] 可使用本领域技术人员已知的任何方法将所述第一基因和第二基因导入所述异养微生物中。此类方法包括但不限于, 转化, 转导, 转染, 例如脂质体转染, 磷酸钙沉积, 电穿孔、颗粒轰击等等。

[0089] 此外, 由于 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 可包含 2 种亚基 (大亚基 rbcL 和小亚基 rbcS) 或 3 种亚基 (rbcL, rbcS 和 rbcX), 因此, 可通过一种或多种载体将第二基因导入所述异养微生物。例如, 可以通过同时编码 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的亚基 rbcL 和 rbcS (或者亚基 rbcL, rbcS 和 rbcX) 的 1 种载体将第二基因导入所述异养微生物。或者, 可通过分别编码 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的大亚基 rbcL 和小亚基 rbcS 的 2 种载体将第二基因导入所述异养微生物。或者, 可通过分别编码 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的 rbcL, rbcS 和 rbcX 亚基的 3 种载体将第二基因导入所述异养微生物。

[0090] 在一个优选的实施方案中, 所述第一基因和第二基因被整合入所述异养微生物的

基因组内。在另一个优选的实施方案中,所述第一基因和第二基因在所述宿主中作为游离体存在。

[0091] 在一个优选的实施方案中,所述宿主是异养微生物。例如,所述宿主可以是异养细菌、真菌和酵母,其包括但不限于,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕氏酵母(*Pichia*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、醋酸杆菌(*Bacillus aceticus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、短杆菌(*Bacillus brevis*)、棒杆菌(*Corynebacterium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、丙酮丁醇芽孢梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、丁酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*)、巴氏芽孢梭菌(*Clostridium pasteurianum*)。优选地,所述宿主是大肠杆菌。

[0092] 在第十一方面,本发明提供了一种试剂盒,其包含第一组分和第二组分,其中

[0093] 第一组分包含编码磷酸核酮糖激酶 (Prk) 的载体,并且

[0094] 第二组分包含编码 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的一种或多种载体,

[0095] 其中,第一组分和第二组分分别作为分离的组分存在,或作为二者的混合物存在。

[0096] 在一个优选的实施方案中,所述第二组分包含 1 种载体,其编码 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的亚基 *rbcL* 和 *rbcS* (或者亚基 *rbcL*, *rbcS* 和 *rbcX*)。

[0097] 在另一个优选的实施方案中,所述第二组分包含 2 种载体,其分别编码 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的亚基 *rbcL* 和 *rbcS*。

[0098] 在另一个优选的实施方案中,所述第二组分包含 3 种载体,其分别编码 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 的亚基 *rbcL*, *rbcS* 和 *rbcX*。

[0099] 在一个优选的实施方案中,所述试剂盒还包含另外的试剂,例如用于将构建体或载体引入宿主 (例如异养微生物,例如异养细菌、真菌和酵母,例如,酿酒酵母、毕氏酵母、黑曲霉、大肠杆菌、醋酸杆菌、假单胞菌、短杆菌、棒杆菌、枯草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、丙酮丁醇芽孢梭菌、丁酸梭状芽孢杆菌、巴氏芽孢梭菌,优选大肠杆菌) 的试剂。在一个优选的实施方案中,所述另外的试剂例如是转染试剂。

[0100] 本发明还提供了上述试剂盒用于在异养微生物中固定二氧化碳或者减少异养微生物的二氧化碳排放的用途。

[0101] 发明的有益效果

[0102] 在本申请中,发明人通过在异养微生物 (例如异养发酵菌株,例如大肠杆菌) 中引入了编码磷酸核酮糖激酶和 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶的基因,在该异养微生物中建立起了二氧化碳固定途径,进而使得该异养微生物能够将二氧化碳转化为有机物,最终在异养微生物发酵过程中实现了二氧化碳的固定,减少了二氧化碳的排放。因此,本发明的实施方案的一个优点是,在微生物发酵过程中减少了二氧化碳的排放,使得利用微生物来生产生物制品和生化产品的过程更为低碳。此外,本发明为解决微生物发酵过程中的二氧化碳排放问题提供了新的思路 and 手段,对优化工业生产及环境保护具有重要的意义。特别地,可以将本发明的实施方案与各种可以进行遗传改造的工业应用微生物相结合,以进一步优化工业生产和提高环境友好度。

[0103] 下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人

员将理解,下列附图和实施例仅用于说明本发明,而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述,本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

附图说明

[0104] 图 1 示意性地说明了, (A) 微生物中产生二氧化碳的主要代谢途径; (B) 六种二氧化碳固定途径; (C) 通过在异养微生物中表达磷酸核酮糖激酶和 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因而建立的固定二氧化碳的代谢途径。

[0105] 图 2 示意性地说明了质粒 pYL25 的基本结构, 其中 P_{T7} 是指 T7 启动子, *prk* 是指磷酸核酮糖激酶基因, Kan^r 是指卡那霉素抗性基因。质粒 pYL25 是通过利用 NdeI 和 XhoI 两个限制性酶切位点, 将源于集胞藻 PCC6803 的 *prk* 基因 (SEQ ID NO:1) 克隆到质粒 pET28a (Novagen) 中而获得的。

[0106] 图 3 示意性地说明了质粒 pYL33 的基本结构, 其中 P_{T7} 是指 T7 启动子, Rubisco 是指 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因, Kan^r 是指卡那霉素抗性基因。质粒 pYL33 是通过利用 NdeI 和 XhoI 两个限制性酶切位点, 将源于集胞藻 PCC6803 的 *rubisco* 基因 (SEQ ID NO:2) 克隆到质粒 pET28a (Novagen) 中而获得的。

[0107] 图 4 示意性地说明了质粒 pYL35 的基本结构, 其中 P_{T7} 是指 T7 启动子, *prk* 是指磷酸核酮糖激酶基因, Rubisco 是指 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因, Kan^r 是指卡那霉素抗性基因。

[0108] 图 5 展示了, 磷酸核酮糖激酶和 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶的蛋白质印迹分析, 其中, *prk* 是指磷酸核酮糖激酶; Rubisco 是指 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶; 泳道 (P+R)₁ 和 (P+R)₂ 分别显示, 用质粒 pYL35 转化的大肠杆菌细胞经破碎和离心后得到的沉淀和上清中的 Prk 及 Rubisco 酶的表达情况; 泳道 Marker 表示, 蛋白质分子量标记。结果显示, Prk 和 Rubisco 酶均能够在大肠杆菌细胞中表达。

[0109] 图 6 展示了照片, 其证实, 经转化的大肠杆菌中所表达的磷酸核酮糖激酶和 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶均具有活性, 其中, Prk 表示用磷酸核酮糖激酶基因 (质粒 pYL25) 转化的大肠杆菌, Rubisco 表示用 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因 (质粒 pYL33) 转化的大肠杆菌, Prk + Rubisco 表示用磷酸核酮糖激酶和 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因 (质粒 pYL35) 转化的大肠杆菌, CT 表示用质粒 pET28a 转化的大肠杆菌。图 6A 显示, 经转化的大肠杆菌在不存在 IPTG 的情况下的生长情况; 图 6B 显示, 经转化的大肠杆菌在存在 0.5mM IPTG (用于诱导外源基因的表达) 的情况下的生长情况。结果显示, 在不存在 IPTG 的情况下, 所有的经转化的大肠杆菌均正常生长; 而在存在 0.5mM IPTG 的情况下, (1) 用磷酸核酮糖激酶基因 (质粒 pYL25) 转化的大肠杆菌不能正常生长, 这表明在该大肠杆菌菌株中, 5- 磷酸核酮糖在磷酸核酮糖激酶的催化下被转化为不能被代谢的终产物 1, 5- 二磷酸核酮糖, 导致菌株不能正常生长并出现致死现象, 从而证实了, 该大肠杆菌菌株能够表达具有活性的磷酸核酮糖激酶; (2) 用磷酸核酮糖激酶和 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因 (质粒 pYL35) 转化的大肠杆菌能够正常生长, 这表明该大肠杆菌菌株能够表达具有活性的 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶, 其将不能被代谢的 1, 5- 二磷酸核酮糖进一步转化为能够被代谢的 3- 磷酸甘油酸, 从而拯救了用磷酸核酮糖激酶基因 (质

粒 pYL25) 转化的大肠杆菌的致死现象。

[0110] 序列表信息

[0111] SEQ ID NO:1 ;GenBank:AP012278.1, 来源于集胞藻 PCC6803 (Synechocystis sp. PCC6803) 的 *prk* 基因的核苷酸序列

[0112] ATGACCACACAGCTAGACCGCGTGGTTCTTATTGGTGTGCCGGGATTCCGGTTGCGGTAAGTCTACTTCTTACGTCGTTTAAACGGATTTATTCGGCGAAGAGTTCATGACGGTAATTTGTTTGGACGATTACCATAGTTTGGATCGCCAGGGTAGAAAAGCCGCTGGGGTCACCGCCCTGGATCCCAGAGCCAACAATTTTGACCTCATGTATGAGCAGATTAAAACGCTCAAAAAGTGGTCAATCCATTATGAAAACCCATTTACAACCACGAAACGGGGCTGCTGGATCCGCCGGAAAAGTTGAACCCAAACAAAGTGGTGGTTATTGAGGGTTTGCATCCCCTCTACGATGAACGGGTGCGGGAAGTGGTGGATTTTCGGGGTCTACCTGGACATCAGCGAAGAAGTAAAAATTAACCTGGAAAATTC AACGGGACATGGCCGAACGGGGCCACACCTATGAAGATATTTTGGCTTCCATCAACGCCGTAAGCCTGACTTCACTGCCTATATCGAGCCCCAAAAGCAATATGCGGACGTGGTGATCCAGGTGTGCCACCCGCTTGATTGAGGACAAGGAAAGTAACTCCTGCGGGTTCGTCTGTGCAAAAAGAAGGGGTAAATTTCTTCGAGCCAGCTACCTGTTTACGAAAGTTCCACCATTGATTGGCGTCCCTGTGGTCGGAAGCTGACCTGTACCTATCCTGGCATCAAGATGTA CTACGGCCCCGATAATTTTATGGGCAACGAAGTATCTTTGCTGGAAGTGACGCGCAGGTTTAAAAACCTAGAGGAAATGGTTTATGTGGAAAACCACCTCAGCAAGACTGGTACTAAGTACTACGGTGAATGACCGAGTTGTTGCTCAAGCATAAGGATTACCCAGGCACTGACAATGGTACTGGCCGTGTTCCAGGTGTTAGTGGGTCTGAAAATGCGGGAAGTTTACGAACAGTTAACGGCGGAAGCTAAGGTCCCGGCCTCTGTGTA

[0113] SEQ ID NO:2 ;GenBank:AP012278.1, 来源于集胞藻 PCC6803 的 *Rubisco* 基因的核苷酸序列

[0114] ATGGTACAAGCCAAAAGCAGGGTTTAAAGCGGGCGTACAAGATTATCGCCTGACCTACTATAACCCCGACTACACCCCAAGGATACCGACCTGCTCGCCTGCTTCCGTATGACCCCAACCGGGTGTACCTGCTGAAGAAGCCGTGCTGCGGTGGCCGCTGAGTCTTCCACCGGTACCTGGACCACCGTTTGGACTGACAACCTAACTGACTTGGACCGCTACAAAGGTCGTTGCTATGACCTGGAAGCTGTTCCCAACGAAGATAACCAATATTTTGTCTTTATTGCCTATCCTCTAGATTTATTTGAAGAAGGTTCCGTCACCAACGTTTAACTCTTTGGTTCGGTAACGTATTTGGTTTAAAGGCTCTGCGGCCCTCCGTTTAGAAGATATTCGTTTTCCGTTGCTTTAATTAAAACCTTCCAAGGCCCTCCACCGGTATTACGTTGAGCGGGACAAATTAACAAAATACGGTCGTCTCTGCTTGGTTGTACCATCAAACCCAACTTGGTCTGTCCGCCAAGAACTACGGTCGGGCTGTTACGAATGTCTCCGGGTGGTTTGGACTTCACCAAAGACGACGAAAACATCAACTCCAGCCCTTCATGCGTTGGCGGATCGTTTCCCTCTTCGTTCAAGAGGCGATCGAAAAAGCCCAGGCTGAGACCAACGAAATGAAAGGTCACTACCTGAACGTACCGCTGGCACCTGCGAAGAAATGATGAAACGGGCCGAGTTTGCCAAGGAAATTGGCACCCCATCATCATGCATGACTTCTTACCGGCGGTTTCACTGCCAACACCACCCTCGCTCGTTGGTGTCCGGACAACGGCATTTTGTCCATATTCACCGGGCAATGCACGCCGTAGTTGACCGTCAGAAAAACCACGGGATCCACTCCGGGTTTTGGCCAAGTGTCTGCGTCTGTCGGCGGTGACCACCTCCACTCCGGTACCGTGGTTGGTAAATTGGAAAGGGAAACGGGGTATCACCATGGGCTTCGTTGACCTCATGCGGAAGATTACGTTGAGGAAGATCGCTCCCGGGGTATTTCTTACCCAAGACTATGCCTCCATGCCTGGCACCATGCCCCTAGCTTCCGGTGGTATCCACGTATGGCACATGCCCGCTTGGTGGAAATCTTCGGTGATGATTCTGCTTACAGTTTGGTGGTGGTACTTTGGGTCACCCCTGGGGTAATGCTCCCGGTGCAACCGCTAACCGTGTGCTTTGGAAGCTTGTGTTCAAGCTCGGAACGAAGGTGTAACCTGGCTCGGAAGGTAATGACGTTATCCGGGAAGCCTGTCGTTGGTCCCCTGAGTTGGCCGCCCTGCGAACTCTGGAAGAGATCAAGTTTGGTTCGAGGCCATGGATAACCTCTAAACCGGTGTTTGGATTGTTCGGAGTTGTACTCGTCCGTTAAGGA

TGAACAGTTCTTCGGGGTTGAGTCTGCTAACTAATTAGCCATTAACAGCGGCTTAACTAACAGTTAGTCATTGGCAA
 TTGTCAAAAAATTGTTAATCAGCCAAAAACCCACTGCTTACTGATGTTCAACTTCGACAGCAATTTACCAATTACCGG
 GTAGAGTGTTTCATGCAAACTAAGCACATAGCTCAGGCAACAGTGAAAGTACTGCAAAGTTACCTCACCTACCAAGCC
 GTTCTCAGGATCCAGAGTGAACCTCGGGGAAAACCAACCCTCCCCAGGCCATTTGGTTAAACCAGTATTTAGCCAGTCA
 CAGTATTCAAAATGGAGAAAACGTTTTTTCGACGGAACCTCTGGATGAAAATAAAGAACTGGTACTCAGGATCCTGGCGG
 TAAGGGAAGACATTGCCGAATCAGTGTTAGATTTTTTTCGCCGGTATGACCCGGAATAGCTTAGCGGAATCTAACATC
 GCCCACC GCCCATTTGCTTGAACGTCTGACCCGTACCGTAGCCGAAGTCGATAATTTCCCTTCGAAAACCTCCAA
 CGGAGAATCAAACAACAACGATTCTCCCCGTCCTAACGTAGTCATCAGCAAGGAAAACCTTTTAAATCGATGAAAAC
 TTTACCCAAAGAGCGCCGCTACGAAAACCTTTCTTACCTGCCCCCTTTAACCGATCAACAGATTGCTAAACAGGTTG
 AGTTTCTGTTAGACCAGGGCTTTATTCCC GGCGTGGAATTTGAAGAAGACCCCAACCCGAAACCCACTTCTGGACC
 ATGTGGAAACTGCCCTTCTTTGGTGGTGCCTACTGCCAACGAAGTTCTAGCCGAAGTACGGGAATGTCGTTCTGAGAA
 TCCCAACTGCTACATTCGGGTGATTGGTTTCGACAATATCAAACAGTGCCAGACTGTAAGCTTTATTGTCCACAAAC
 CCAACCAAAAACCAAGGCCGTTACTAA

[0115] SEQ ID NO:3 :引物 PrkF 的序列

[0116] GGCATATGACCACACAGCTAGACCG

[0117] SEQ ID NO:4 :引物 PrkR 的序列

[0118] AGCTCGAGTTACACAGAGGCCGGGAC

[0119] SEQ ID NO:5 :引物 RubiscoF 的序列

[0120] GTTGTGACGAAGGAGATATACATATGGTACAAGCCAAAAGCAG

[0121] SEQ ID NO:6 :引物 RubiscoR 的序列

[0122] GACTCGAGACTGTAACCTGGGTAACGGCCTTGGT

[0123] SEQ ID NO:7 :GenBank :NP_441778.1, 来源于集胞藻 PCC6803 (*Synechocystis* sp. PCC6803) 的 prk 基因编码的氨基酸序列

[0124] MTTQLDRVVLIGVAGDSGCGKSTFLRRLTDLFGEEFMTVICLDDYHSLDRQGRKAAGVTALDPRANNFD
 LMYEQIKTLKSGQSIMKPIYNHETGLLDPPEKVEPNKVVVIEGLHPLYDERVRELVDFGVYLDISEEVKINWKIQRD
 MAERGHTYEDILASINARKPDFTAYIEPQKQYADVVIQVLPTRLIEDKESKLLRVRLVQKEGVKFFEPAYLFDEGST
 IDWRPCGRKLTCTYPGIKMYYPDNFMGNEVSLLEVDGRFENLEEMVYVENHLSKTGTKYGEMTELLLKHKDYPGT
 DNGTGLFQVLVGLKMRVYEQLTAEAKVPASV

[0125] SEQ ID NO:8 :GenBank :NP_442120.1, 来源于集胞藻 PCC6803 的 Rubisco 基因所编码的 rbcL 亚基的氨基酸序列

[0126] MVQAKAGFKAGVQDYRLTYTPDYTPKDTDLLACFRMTPQPGVPAEAAAAVAESSTGTWTTVWTDN
 LTDLDTRYKGRCYDLEAVPNEDNQYFAFIAYPLDLFEESVTNVLTSLVGNVFGFKALRALRLEDIRFPVALIKTFQ
 GPPHGITVERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVYECLRGGLDFTKDDENINSQPFMRWRDRFLVQEA
 IEKAQAETNEMKGHYLNVTAGTCEEMMKRAEFAKEIGTPIIMHDFFTGGFTANTTLARWCRDNGILLHIHRAMHA
 VVDRQKNHGIHFRVLAKCLRLSGGDHLHSGTVVVGKLEGERGITMGFVDLMREDYVEEDRSRGIFFQTQDYASMPGT
 MPVASGGIHWHPALVEIFGDDSCQLQFGGGTLGHPWGNAPGATANRVALEACVQARNEGRNLAREGNDVIREAC
 RWSPELAAACELWKEIKFEFEAMDTL

[0127] SEQ ID NO:9 :GenBank :NP_442121.1, 来源于集胞藻 PCC6803 的 Rubisco 基因所编码的 rbcX 亚基的氨基酸序列

[0128] VFMQTKHIAQATVKVLQSYLTYQAVLRIQSELGETNPPQAIWLNQYLASHSIQNGETFLTELLDENKEL
VLRILAVREDIAESVLDLFLPGMTRNSLAESNIAHRRHLLERLRTVAEVDNFPSETSNNGESNNNDSPPS

[0129] SEQ ID NO:10 ;GenBank :NP_442122.1, 来源于集胞藻 PCC6803 的 Rubisco 基因所
编码的 rbcS 亚基的氨基酸序列

[0130] MKTLPKERRYETLSYLPPLTDQQIAKQVEFLDQGFIPGVEFEEDPQPETHFWTMWKLPPFFGGATANEV
LAEVRECRSENPNCYIRVIGFDNIKQCQTVSFIVHKPNQNQGRY

[0131] 生物材料样品保藏信息

[0132] 本发明所提及的大肠杆菌菌株 E2 由中国科学院青岛生物能源与过程研究所(山
东省青岛市崂山区松岭路 189 号)保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
(China General Microbiological Culture Collection Center,CGMCC)(地址:北京市朝阳区
北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所),并且其保藏时间为 2011 年 11 月 3
日,保藏号为 CGMCC No. 5435。

具体实施方式

[0133] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理
解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。

[0134] 除非特别指明,本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法,基本上
参照 J. Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册,第 2 版,冷泉港实验室出版社,1989,以及
F. M. Ausubel 等人,精编分子生物学实验指南,第 3 版,John Wiley&Sons, Inc.,1995 中所述
的方法进行;限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件。所用试剂或仪器未注明生
产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。本领域技术人员知晓,实施例以举例方式描
述本发明,且不意欲限制本发明所要求保护的范围。

[0135] 实施例 1. 用于表达磷酸核酮糖激酶和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶的载体
及菌株的构建

[0136] 在本实施例中,构建了用于表达磷酸核酮糖激酶和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加
氧酶的载体及菌株。

[0137] 1、载体 pYL25 的构建

[0138] 以集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 为模板,以 Prk-F(5'-GGC ATA TGACCA CAC AGC TAG
ACC G-3')和 Prk-R(5'-AGC TCG AGT TAC ACA GAGGCC GGG AC-3')为引物进行 PCR 扩增。然
后,根据生产商的说明书,将所获得的 PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体(Takara, Catalog
No.:D101A)中,从而得到载体 pYL22。载体 pYL22 经测序验证后,用 NdeI(Takara, Catalog
No.:D1161A)和 XhoI(Takara, CatalogNo.:D1073A)进行双酶切,并回收 1.7kb 的片段。另
外,使用 NdeI(Takara, Catalog No.:D1161A)和 XhoI(Takara, CatalogNo.:D1073A)酶切质
粒 pET28a(Novagen, Catalog NO.:69864-3),并回收 5.3kb 的片段(该片段含有抗性基因)。
然后,使用连接酶,将所获得的 1.7kb 的片段和 5.3kb 的片段相连接,从而得到质粒 pYL25。
质粒 pYL25 的基本结构示意图地描述图 2 中,其中 P_{T7} 是指 T7 启动子,prk 是指磷酸核酮糖
激酶基因,Kan^r 是指卡那霉素抗性基因。

[0139] 2、载体 pYL33 的构建

[0140] 以集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 为模板,以 Rubisco-F(5'-AAC TCG AGG AAG GAG

ATA ATG GTA CAA GCC AAA GCA G-3') 和 Rubisco-R(5'-TGACTC GAG ACT GTA CCT TAG TAA CGG CC-3') 为引物进行 PCR 扩增。然后,根据生产商的说明书,将所获得的 PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体 (Takara, Catalog No. :D101A) 中,从而得到质粒 pYL30。质粒 pYL30 经测序正确后,用 NdeI (Takara, Catalog No. :D1161A) 和 XhoI (Takara, CatalogNo. :D1073A) 进行双酶切,并回收 2.4kb 的片段。另外,使用 NdeI (Takara, Catalog No. :D1161A) 和 XhoI (Takara, CatalogNo. :D1073A) 酶切质粒 pET28a (Novagen), 并回收 5.3kb 的片段 (该片段含有抗性基因)。然后使用连接酶,将所获得的 2.4kb 的片段和 5.3kb 的片段相连接,从而得到质粒 pYL33。质粒 pYL33 的基本结构示意图性地描述图 3 中,其中 P_{T7} 是指 T7 启动子, Rubisco 是指 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因, Kan^r 是指卡那霉素抗性基因。

[0141] 3、载体 pYL35 的构建

[0142] 使用 SalI (Takara, CatalogNo. :D1080A) 和 XhoI (Takara, CatalogNo. :D1073A) 酶切质粒 pYL33, 并回收 2.4kb 的 Rubisco 基因片段。另外,使用 XhoI (Takara, CatalogNo. :D1073A) 单酶切质粒 pYL25, 并回收 7kb 的片段 (该片段含有启动子、Prk 基因、抗性基因、His 标签)。然后使用连接酶,将所获得的 2.4kb 的片段和 7kb 的片段相连接,从而得到质粒 pYL35。质粒 pYL35 的基本结构示意图性地描述图 4 中,其中 P_{T7} 是指 T7 启动子, prk 是指磷酸核酮糖激酶基因, Rubisco 是指 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因, Kan^r 是指卡那霉素抗性基因。所使用的载体 pET28a 本身携带 2 个 His 标签。经过上述构建程序后,在所获得的质粒 pYL35 中,一个 His 标签融合于 Prk 基因的编码序列的 N 端,而另一个 His 标签融合于 Rubisco 基因的编码序列的 C 端。因此,在将质粒 pYL35 导入宿主细胞后,宿主细胞将表达其 N 端融合了 His 标签的 Prk 蛋白以及其 C 端融合了 His 标签的 Rubisco 蛋白。可利用这些 His 标签来对宿主细胞表达的 Prk 蛋白以及 Rubisco 蛋白进行检测和纯化。

[0143] 4、基因工程菌株 E1 和 E2 的构建

[0144] 使用化学转化法,将 pET28a (Novagen) 和 pYL35 分别转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中,从而得到基因工程菌株 E1 (阴性对照) 和 E2。菌株构建过程简要概述如下。

[0145] 1) 从甘油保存菌种中接种一环大肠杆菌至 LB 固体培养基平板上,37°C 倒置培养过夜。然后挑取 2-3mm 直径的单菌落接种至装有 50ml LB 液体培养基的三角瓶中,在 37°C 下震荡培养 2 小时 (摇床转速 250r/min)。当 OD500 达到 0.4 左右时,吸取 1.4ml 菌液至 EP 管,并以 7000g 离心 2min,弃去上清。再次以 7000g 离心 2min,并弃去上清。然后将细菌沉淀悬浮于 1ml 预冷的 0.1mol/L $CaCl_2$ 溶液中,并冰浴 10min。冰浴后,以 7000g 离心 2min,弃去上清,收集细菌沉淀。

[0146] 2) 将细菌沉淀重悬于 200 μ l 预冷的 0.1mol/L $CaCl_2$ 溶液中,并冰浴 30min。然后向细菌悬液中加入质粒 DNA (50ng/10 μ l), 轻轻混匀,并冰浴 20min。冰浴后,将细菌悬液于 42°C 水浴中温育 2min (不要摇动), 然后迅速转移至冰浴中并静置 2min。冰浴后,添加 800 μ l LB 液体培养基,并于 37°C 下培养 45min, 以便经转化的大肠杆菌菌株表达抗性。

[0147] 3) 将步骤 2) 获得的大肠杆菌菌株接种到含有 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 固体培养基平板上,并于 37°C 恒温培养箱中培养过夜。挑取平板上的单菌落,并通过质粒提取或 PCR 鉴定来验证外源基因的存在,从而获得目的转化子。

[0148] 实施例 2. 磷酸核酮糖激酶和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶在基因工程菌株

中的表达的验证

[0149] 在本实施例中,通过蛋白质印迹分析(Western blot)验证了磷酸核酮糖激酶和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶在基因工程菌株中的表达。

[0150] 1、总蛋白的提取

[0151] 通过实施例 1 中描述的方法,将质粒 pYL35 转化入大肠杆菌菌株 BL21(DE3) 中,并在 16℃、200ml LB 培养基(含有 0.5mM IPTG,以诱导外源基因表达)中震荡培养过夜(摇床转速 200r/min)。然后,以 8000rpm 离心菌体 5min,收集菌体并倒掉培养液。向菌体细胞中加入 3ml 4℃ 预冷的 PBS(0.01M, pH7.2-7.3),轻轻摇动 1min 以洗涤细胞,然后弃去洗液。重复以上洗涤操作两次(共洗涤细胞三次),以洗去残留的培养液。然后,向菌体细胞中加入 3ml PBS,并进行超声破碎,然后取 1ml 转移到离心管中。然后,于 4℃ 下以 12000rpm 对经破碎的细胞离心 5min。将离心后得到的上清 (P+R)₂ 和下层沉淀 (P+R)₁ 分离,并分别转移到新的离心管中。向下层沉淀 (P+R)₁ 加入 1ml 的 1X 上样缓冲液 (Loading buffer) (BioChip, CatalogNo.:370009-S2),充分混合,并在 100℃ 下煮沸 5min 以完成样品的制备,然后取 6μl 用于上样。另外,取上清 (P+R)₂ 6μl,添加 3μl 15X 上样缓冲液 (BioChip, CatalogNo.:370009-S2),并添加水至 15μl (上样缓冲液的终浓度为 1X),然后在 100℃ 下煮沸 5min 以完成样品的制备,用于上样。

[0152] 2、SDS-PAGE 电泳和转膜

[0153] 使用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳(电泳时间为 4-5h,电压为 40V 或 60V),并在电泳结束后,将在凝胶中分离的蛋白质样品转移到硝酸纤维素膜上。

[0154] 3、膜的染色

[0155] 在转膜结束后,在摇床上将膜用 1× 丽春红染液染 5min,然后用水冲洗,以除去残留的染液。在染色后,可在膜上观察到蛋白条带。将膜晾干备用。

[0156] 4、免疫检测

[0157] 1) 将膜用 TBS(8.8g NaCl,1M Tris(PH8.0),定容至 1L) 浸湿后,转移至含有封闭液(5% 脱脂奶粉,于 TBST(8.8g NaCl,1M Tris(PH8.0),0.5ml Tween20,定容至 1L) 中)的平皿中,并在室温下、在摇床上封闭 1h。

[0158] 2) 封闭后,使用鼠抗 His 标签抗体 (Invitrogen,Catalog No.:37-2900,其用 TBST 以 1:10000 进行稀释),在室温下孵育膜 1-2h;然后,用 TBST 在室温下、在摇床上洗涤膜两次,每次 10min;然后再用 TBS 洗涤膜一次,10min。

[0159] 3) 用山羊抗鼠 IgG-碱性磷酸酶 (Invitrogen,Catalog No.:G-21060,其用 TBST 以 1:3000 进行稀释) 在室温下孵育膜 1-2h;然后,用 TBST 在室温下、在摇床上洗涤膜两次,每次 10min;然后再用 TBS 洗涤膜一次,10min。

[0160] 4) 根据制造商的说明书,使用 NBT-BCIP 显色试剂盒 (Roche,Catalog No.:11681451001) 对膜进行显影。Western Blot 的检测结果如图 5 所示。结果显示,在用质粒 pYL35 转化的菌株中,磷酸核酮糖激酶和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶均能够在大肠杆菌细胞中表达。

[0161] 实施例 3. 基因工程菌株中表达的磷酸核酮糖激酶和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶的活性的验证

[0162] 在本实施例中,验证了基因工程菌株 E2 中表达的磷酸核酮糖激酶和 1,5-二磷酸

核酮糖羧化酶 / 加氧酶的活性。

[0163] 为了证实本发明所构建的质粒能够在大肠杆菌菌株中表达有活性的磷酸核酮糖激酶和 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶, 进行如下实验。将质粒 pYL25、质粒 pYL33、质粒 pYL35 和 pET28a 分别转化入大肠杆菌菌株中。然后, 将经转化的大肠杆菌菌株分别涂布于含有 0mM IPTG 和 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 固体培养基平板 (图 6A) 以及含有 0.5mM IPTG 和 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 固体培养基平板 (图 6B) 上, 并在 37°C 下培养过夜。观察大肠杆菌菌株的生长情况, 并将观察结果示于图 6 中。

[0164] 1、磷酸核酮糖激酶的活性的验证

[0165] 磷酸核酮糖激酶催化将 5- 磷酸核酮糖转化为 1, 5- 二磷酸核酮糖的反应。在异养微生物大肠杆菌中, 5- 磷酸核酮糖为 PPP 途径 (戊糖磷酸途径) 的重要反应底物, 而 1, 5- 二磷酸核酮糖为不能被代谢的终产物。因此, 当磷酸核酮糖激酶在大肠杆菌中大量表达时, 其将与 PPP 途径竞争重要反应底物 5- 磷酸核酮糖, 并大量积累不能被代谢的终产物 1, 5- 二磷酸核酮糖, 使得过表达磷酸核酮糖激酶的大肠杆菌菌株不能正常生长, 出现致死现象。

[0166] 图 6A 的结果显示, 在不存在 IPTG (即, 不诱导外源基因表达) 的情况下, 所有经转化的大肠杆菌菌株均能够在含有卡那霉素的 LB 固体培养基平板上正常生长。这表明, 目的质粒均已被转化入大肠杆菌中, 并且表达了卡那霉素抗性基因。同时, 由于不存在 IPTG, 大肠杆菌菌株未表达质粒中所包含的 Prk 基因和 / 或 Rubisco 基因, 从而菌株正常生长, 没有出现致死现象。

[0167] 进一步, 图 6B 的结果显示, 在存在 0.5mM IPTG (即, 诱导外源基因表达) 的情况下, 用质粒 pET28a 转化的大肠杆菌菌株能够在含有卡那霉素的 LB 固体培养基平板上正常生长, 而用质粒 pYL25 转化的大肠杆菌菌株不能够生长。这与预期的结果相符合, 即, 磷酸核酮糖激酶在大肠杆菌菌株中的大量表达将导致大肠杆菌菌株不能正常生长, 出现致死现象。因此, 该结果 (特别地, 比较图 6A 和图 6B 中由 Prk 标示的区域) 表明, 用质粒 pYL25 转化的大肠杆菌菌株在 P_{17} 启动子的驱动下, 在 IPTG 的诱导下能够表达具有活性的磷酸核酮糖激酶。

[0168] 2、1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶的活性的验证

[0169] 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶能够催化将 1, 5- 二磷酸核酮糖转化为 3- 磷酸甘油酸的反应。因此, 当 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶正确表达时, 其将与磷酸核酮糖激酶构成代谢通路, 将原本在大肠杆菌中不能代谢的 1, 5- 二磷酸核酮糖转化为能够被进一步代谢的 3- 磷酸甘油酸, 从而缓解 1, 5- 二磷酸核酮糖的过量产生对细胞的致死作用 (参见图 1C)。

[0170] 图 6B 的结果显示, 在存在 0.5mM IPTG (即, 诱导外源基因表达) 的情况下, 用质粒 pYL33 转化的大肠杆菌菌株能够在含有卡那霉素的 LB 固体培养基平板上正常生长。该结果 (特别地, 比较图 6A 和图 6B 中由 Rubisco 标示的区域) 表明, Rubisco 的单独表达不会对大肠杆菌菌株的生长造成显著不利的影

[0171] 进一步, 图 6B 的结果还显示, 在存在 0.5mM IPTG (即, 诱导外源基因表达) 的情况下, 用质粒 pYL35 转化的大肠杆菌菌株能够在含有卡那霉素的 LB 固体培养基平板上正常生长。该结果 (特别地, 比较图 6B 中由 Prk 标示的区域和由 Prk + Rubisco 标示的区域) 表明, 用质粒 pYL35 (包含磷酸核酮糖激酶基因和 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因) 转

化的大肠杆菌菌株能够表达具有活性的 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶, 其与磷酸核酮糖激酶一起构成了二氧化碳固定途径, 将原本不能代谢的终产物 1, 5- 二磷酸核酮糖进一步转化为能够被代谢的 3- 磷酸甘油酸, 拯救了用单独的磷酸核酮糖激酶基因 (质粒 pYL25) 转化的大肠杆菌的致死现象。

[0172] 实施例 4. 经基因工程改造的大肠杆菌的二氧化碳排放的检测

[0173] 1、实验步骤

[0174] (1) 培养方式为摇瓶培养。使用普通 250ml 三角烧瓶, 其中装有 100ml 液体 M9 培养基 (参见 J. Sambrook 等人, 分子克隆 : 实验室手册, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 1989)。在该培养基中, 以 4g/L 葡萄糖为唯一碳源, 并且加入 50ug mL⁻¹ 卡那霉素。向培养基中分别接种实施例 1 所构建的基因工程菌株 E1 (阴性对照) 或 E2, 初始接种浓度为 OD₆₀₀0.05。在 37°C, 200rpm 下培养大肠杆菌菌株, 直至 OD₆₀₀ 达到 0.4-0.6。然后加入 0.5mM IPTG, 继续培养 25 小时。

[0175] (2) 取 50mL 培养液, 以 8000rpm 离心 5min, 分别收集菌体和上清。将菌体沉淀悬浮于 3ml 无糖 M9 培养基中, 吹洗 1min, 然后以 8000rpm 离心 5min, 并弃去洗液。重复以上洗涤操作两次 (共洗涤细胞三次) 以洗去残留的葡萄糖, 并收集最后一次离心后的菌体沉淀。另外, 将之前收集的上清以 12000rpm 离心 10min, 再次收集上清并进行过滤, 然后收集约 10ml 的过滤后的上清 (即, 发酵残液)。

[0176] (3) 烘干菌体沉淀, 测量其干重。根据制造商的说明书, 利用总碳总氮分析仪 Elementar liquid TOCII (德国 Elementar 公司), 检测发酵残液中的碳含量 (无机碳和有机碳的含量), 洗涤后的菌体沉淀中的碳含量, 以及初始培养基中的碳含量。

[0177] (4) 利用初始培养基中的碳含量, 菌体沉淀中的碳含量和发酵残液中的碳含量, 如下计算总的二氧化碳排放量 (以碳的含量表示), 及每 OD₆₀₀ 的二氧化碳排放量 :

[0178] 总的二氧化碳排放量 = 初始培养基中的碳含量 - 菌体沉淀的碳含量 - 发酵残液中的碳含量 ;

[0179] 每 OD₆₀₀ 的二氧化碳排放量 = 总的二氧化碳排放量 / 发酵液的 OD₆₀₀。

[0180] 2、实验结果

[0181] 所测量的初始培养基中的碳含量、菌体沉淀中的碳含量和发酵残液中的碳含量, 以及经计算得出的总的二氧化碳排放量和每 OD₆₀₀ 的二氧化碳排放量示于表 1 中。

[0182] 表 1. E1 和 E2 的碳代谢分布。

菌株	初始培养基碳含量 (mg/L)	OD _{600nm}	菌体干重 (mg/L)	菌体沉淀的碳含量 (mg/L)	发酵残液无机碳含量 (mg/L)	发酵残液有机碳含量 (mg/L)	二氧化碳排放	
							(mg/L)	(mg/L/OD)
[0183] E1	1577	2.38 ± 0.03	581 ± 39	246 ± 15	13 ± 2	284 ± 6	1034 ± 23	434 ± 4
E2	1577	2.94 ± 0.08	735 ± 36	333 ± 19	17 ± 3	408 ± 7	819 ± 21	279 ± 7

[0184] 表 1 的结果显示,与菌株 E1 相比较,菌株 E2 以更小的碳消耗(发酵残液中剩余更多的有机碳),产生了更多的生物质(即,获得了更多的菌体),显著降低了发酵过程中的二氧化碳排放量(每升培养液每 OD₆₀₀ 菌体的碳排放量减少 33%)。该结果表明,通过在异养微生物(大肠杆菌)中表达磷酸核酮糖激酶和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶,发明人已成功地在异养微生物(大肠杆菌)中构建了二氧化碳固定途径,并且所构建的二氧化碳固定途径能够对二氧化碳进行有效固定,从而显著地减少了微生物发酵过程中的二氧化碳排放量,提高了碳源/能源的利用率。

[0185] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,但本领域技术人员将理解:根据已经公开的所有教导,可以对细节进行各种修改和变动,并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院青岛生物能源与过程研究所
 <120> 用于固定二氧化碳的构建体、菌株及其制备方法
 <130> IIC122139
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 999
 <212> DNA
 <213> 集胞藻PCC6803

<400> 1
 atgaccacac agctagaccg cgtggttctt attggigtig ceggggattc eggttgcggt 60
 aagtctactt tcttactgtg tttaacggat ttattcggcg aagagttcat gacggtaatt 120
 tgtttgacg attaceatag tttggatcgc cagggtagaa aagecgtctg ggtcaccgce 180
 ctggatccca gagccaacaa ttttgacctc atgtatgagc agattaaac gctcaaaagt 240
 ggtaacatca ttatgaaac cattacaac caccgaaagg ggctgctgga tccgccggaa 300
 aaagttagac ccaacaaagt ggtggttatt gagggtttgc atcccctcta cgatgaacgg 360
 gtgcgggaac tggtagattt cgggggtctc ctggacatca gegaagaagt gaaaattaac 420
 tggaaaatte aacgggacat ggcggaacgg ggccacacct atgaagatat tttggettcc 480
 atcaacgccc gtaagcctga cttactgcc tatatcgagc cccaaaagca atatgcggac 540
 gtggtgaccc aggtgttggc caccogcttg attgaggaca aggaaagtaa actcctgcgg 600
 gtctgtcttg tgcaaaaaga aggggttaaa ttcttcgagc cagcctacct gtttgacgaa 660
 ggttccacca ttgattggcg tccctgtggt eggaagctga cctgfacctc tccctggcatc 720
 aagatgtact acggccccga taattttatg ggcaacgaag tatctttgct ggaagtggac 780
 ggcaggtttg aaaacctaga ggaaatggtt tatgtgaaa accacctcag caagactggt 840
 actaagtact acggtgaaat gaccgagttg ttgctcaagc ataaggatta cccagggact 900
 gacaatggta ctggcctggt ccagggtgta gtgggtctga aatgcggga agtttacgaa 960
 cagttaacgg cggaagctaa ggtcccggcc tclgtglaa 999

<210> 2
 <211> 2405
 <212> DNA
 <213> 集胞藻PCC6803

<400> 2
 atggtacaag ccaaagcagg gtttaaggcg ggcgtacaag attatcgctt gacctactat 60
 acccccgaat acacccecaa ggataccgac ctgctcgctt gcttccgtat gaccceceaa 120
 ccgggtgtac ctgctgaaga agccctgctt gagggtggcg ctgagtcttc caccggtaac 180
 tggaccaccg ttggactga caacctaaat gacttggacc gctacaaaagg tegtgtctat 240
 gacctggaag ctgttcccaa cgaagataac caatattttg ettttattgc ctatctctca 300
 gatatttttg aagaaggctc cgtcaccaac gttttaacct ettttgctgg taacgtattt 360
 ggttttaagg ctctcgggc cctccgttta gaagatattc gttttccctg tgetttaatt 420
 aaaaccttcc aaggccctcc ccacggatatt accgttgagc gggacaaaat aaacaaatac 480
 ggtcgtcttc tgettgttg taccatcaaa cccaaacttg gctctgctcc caagaactac 540

[0002]

ggfegggctg tttacgaatg tctccggggt ggtttggact tcacaaaaga cgacgaaaac	600
atcaactecc agccctteat gegtltggeg gatcgittcc tettegttca agaggcgatc	660
gaaaaagccc aggctgagac caacgaaatg aaaggtaact acctgaacgt caccgctggc	720
acctgcgaag aatgatgaa acgggecgag ttgccaagg aatttggcac ccccatcacc	780
atgcataact tcttcaecgg cggtttcaact gccaacacca cctctctctg ttgggtgctg	840
gacaaaggca ttttgcctca ttttcaecgg gcaatgcacg ccgtagltga ccgtaagaaa	900
aaccacggga tcaacttccg ggttttggcc aagtgtctgc gtctgtccgg cggtgaccac	960
ctccactccg gtaecgtggt tggtaaattg gaagggaac ggggtatcac catggcttc	1020
gttgacctca tgcgcgaaga ttaactggag gaagatcctt cccgggttat ttttccacc	1080
caagactatg cctccatgcc tggcaccatg ccctagctt ccggtggtat ccacgatgg	1140
cacatgcccg cgttgggtga aatcttgggt gatgattcct gtttacagt ttggtgggt	1200
actllggglt acccttggg taatgctcc ggtgcaccc ctaacctgt tgcctggaa	1260
gcttgtgttc aagctcgaa cgaaggctgt aacctggct cgaaggtaa tgactttac	1320
cggaagcct gtcgttggtc cctgagttg gccgcgcct cgaacctctg gaaagagac	1380
aagtttgagt togagccat ggatacctc taaaccgtg ttggattgt cggagttgta	1440
ctgtccgtt aaggatgaac agttcttccg gttttagctt gctaactaat tagccattaa	1500
cagcgctta actaacagtt agtcattggc aattgtcaaa aattgttaa tcagcaaaa	1560
cccactgctt actgatgttc aacttcgaca gcaatttacc aattaccggg tagagtgttc	1620
atgcaaaact agcacatagc tcaggcaaca gtgaaagtac tgcaaaagta cctcacctac	1680
caagecgttc tcaggatcca gagtgaactc ggggaaacca accctcccca ggcatttgg	1740
ttaaaccagt atttagccag tcacagtatt caaatggag aaacttttt gacggaactc	1800
ctggatgaaa ataagaact ggtactcagg atcctggcgg taagggaaga cattgccgaa	1860
tcagtgttag atttttgc cggatgacc cggaaatagc tagcggaaac taacatgcc	1920
caccgcgcc atttgcctga acgtctgacc cgtaccgtag ccgaagtcca taatttccct	1980
tggaaacct ccaacggaga atcaaaacac aacgattctc cccctccta acgtagtcac	2040
cagcaaggaa aactttttaa tgatgaaaa ctttaccaca agagcgcgcg tacgaaacce	2100
tttcttacct gccccctta accgatcaac agattgetaa acaggtttag tttctgttag	2160
accagggctt tattccggc gtggaatttg aagaagacc ccaaccgaa accacttct	2220
ggaccatgt gaaactgcc ttctttggtg gtgccactgc caacgaagt ctagecgaag	2280
tacgggaatg tegtctgag aatcccaact gtacattcg ggtgattggt itcgacaata	2340
tcaaacagtg ccagactgta agctttattg tcacaaaac caacaaaac caagccgctt	2400
actaa	2405
<210> 3	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 3	
ggcatatgac cacacagcta gaccg	25

[0003]

<210> 4	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 4	
agctcgagtt acacagagge cgggac	26
<210> 5	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 5	
gtgtcgacg aaggagatat acataiggtta caagccaaag cag	43
<210> 6	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 6	
gactcgagae tgtaacttgg gtaacggcct tggc	34
<210> 7	
<211> 332	
<212> PRT	
<213> 集胞藻PCC6803	
<400> 7	
Met Thr Thr Gln Leu Asp Arg Val Val Leu Ile Gly Val Ala Gly Asp	
1 5 10 15	
Ser Gly Cys Gly Lys Ser Thr Phe Leu Arg Arg Leu Thr Asp Leu Phe	
20 25 30	
Gly Glu Glu Phe Met Thr Val Ile Cys Leu Asp Asp Tyr His Ser Leu	
35 40 45	
Asp Arg Gln Gly Arg Lys Ala Ala Gly Val Thr Ala Leu Asp Pro Arg	
50 55 60	
Ala Asn Asn Phe Asp Leu Met Tyr Glu Gln Ile Lys Thr Leu Lys Ser	
65 70 75 80	
Gly Gln Ser Ile Met Lys Pro Ile Tyr Asn His Glu Thr Gly Leu Leu	
85 90 95	
Asp Pro Pro Glu Lys Val Glu Pro Asn Lys Val Val Val Ile Glu Gly	
100 105 110	
Leu His Pro Leu Tyr Asp Glu Arg Val Arg Glu Leu Val Asp Phe Gly	
115 120 125	

[0004]

Val Tyr Leu Asp Ile Ser Glu Glu Val Lys Ile Asn Trp Lys Ile Gln
 130 135 140
 Arg Asp Met Ala Glu Arg Gly His Thr Tyr Glu Asp Ile Leu Ala Ser
 145 150 155 160
 Ile Asn Ala Arg Lys Pro Asp Phe Thr Ala Tyr Ile Glu Pro Gln Lys
 165 170 175
 Gln Tyr Ala Asp Val Val Ile Gln Val Leu Pro Thr Arg Leu Ile Glu
 180 185 190
 Asp Lys Glu Ser Lys Leu Leu Arg Val Arg Leu Val Gln Lys Glu Gly
 195 200 205
 Val Lys Phe Phe Glu Pro Ala Tyr Leu Phe Asp Glu Gly Ser Thr Ile
 210 215 220
 Asp Trp Arg Pro Cys Gly Arg Lys Leu Thr Cys Thr Tyr Pro Gly Ile
 225 230 235 240
 Lys Met Tyr Tyr Gly Pro Asp Asn Phe Met Gly Asn Glu Val Ser Leu
 245 250 255
 Leu Glu Val Asp Gly Arg Phe Glu Asn Leu Glu Glu Met Val Tyr Val
 260 265 270
 Glu Asn His Leu Ser Lys Thr Gly Thr Lys Tyr Tyr Gly Glu Met Thr
 275 280 285
 Glu Leu Leu Leu Lys His Lys Asp Tyr Pro Gly Thr Asp Asn Gly Thr
 290 295 300
 Gly Leu Phe Gln Val Leu Val Gly Leu Lys Met Arg Glu Val Tyr Glu
 305 310 315 320
 Gln Leu Thr Ala Glu Ala Lys Val Pro Ala Ser Val
 325 330
 <210> 8
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> 集胞藻PCC6803
 <400> 8
 Met Val Gln Ala Lys Ala Gly Phe Lys Ala Gly Val Gln Asp Tyr Arg
 1 5 10 15
 Leu Thr Tyr Tyr Thr Pro Asp Tyr Thr Pro Lys Asp Thr Asp Leu Leu
 20 25 30
 Ala Cys Phe Arg Met Thr Pro Gln Pro Gly Val Pro Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Ala Ala Ala Val Ala Ala Glu Ser Ser Thr Gly Thr Trp Thr Thr Val
 50 55 60

[0005]

Trp Thr Asp Asn Leu Thr Asp Leu Asp Arg Tyr Lys Gly Arg Cys Tyr
 65 70 75 80
 Asp Leu Glu Ala Val Pro Asn Glu Asp Asn Gln Tyr Phe Ala Phe Ile
 85 90 95
 Ala Tyr Pro Leu Asp Leu Phe Glu Glu Gly Ser Val Thr Asn Val Leu
 100 105 110
 Thr Ser Leu Val Gly Asn Val Phe Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ala Leu
 115 120 125
 Arg Leu Glu Asp Ile Arg Phe Pro Val Ala Leu Ile Lys Thr Phe Gln
 130 135 140
 Gly Pro Pro His Gly Ile Thr Val Glu Arg Asp Lys Leu Asn Lys Tyr
 145 150 155 160
 Gly Arg Pro Leu Leu Gly Cys Thr Ile Lys Pro Lys Leu Gly Leu Ser
 165 170 175
 Ala Lys Asn Tyr Gly Arg Ala Val Tyr Glu Cys Leu Arg Gly Gly Leu
 180 185 190
 Asp Phe Thr Lys Asp Asp Glu Asn Ile Asn Ser Gln Pro Phe Met Arg
 195 200 205
 Trp Arg Asp Arg Phe Leu Phe Val Gln Glu Ala Ile Glu Lys Ala Gln
 210 215 220
 Ala Glu Thr Asn Gln Met Lys Gly His Tyr Leu Asn Val Thr Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Cys Glu Glu Met Met Lys Arg Ala Glu Phe Ala Lys Glu Ile Gly
 245 250 255
 Thr Pro Ile Ile Met His Asp Phe Phe Thr Gly Gly Phe Thr Ala Asn
 260 265 270
 Thr Thr Leu Ala Arg Trp Cys Arg Asp Asn Gly Ile Leu Leu His Ile
 275 280 285
 His Arg Ala Met His Ala Val Val Asp Arg Gln Lys Asn His Gly Ile
 290 295 300
 His Phe Arg Val Leu Ala Lys Cys Leu Arg Leu Ser Gly Gly Asp His
 305 310 315 320
 Leu His Ser Gly Thr Val Val Gly Lys Leu Glu Gly Glu Arg Gly Ile
 325 330 335
 Thr Met Gly Phe Val Asp Leu Met Arg Glu Asp Tyr Val Glu Gln Asp
 340 345 350
 Arg Ser Arg Gly Ile Phe Phe Thr Gln Asp Tyr Ala Ser Met Pro Gly
 355 360 365

[0006]

Thr Met Pro Val Ala Ser Gly Gly Ile His Val Trp His Met Pro Ala
370 375 380

Leu Val Glu Ile Phe Gly Asp Asp Ser Cys Leu Gln Phe Gly Gly Gly
385 390 395 400

Thr Leu Gly His Pro Trp Gly Asn Ala Pro Gly Ala Thr Ala Asn Arg
405 410 415

Val Ala Leu Glu Ala Cys Val Gln Ala Arg Asn Glu Gly Arg Asn Leu
420 425 430

Ala Arg Glu Gly Asn Asp Val Ile Arg Glu Ala Cys Arg Trp Ser Pro
435 440 445

Glu Leu Ala Ala Ala Cys Glu Leu Trp Lys Glu Ile Lys Phe Glu Phe
450 455 460

Glu Ala Met Asp Thr Leu
465 470

<210> 9
<211> 138
<212> PRT
<213> 集胞藻PCC6803

<400> 9

Val Phe Met Gln Thr Lys His Ile Ala Gln Ala Thr Val Lys Val Leu
1 5 10 15

Gln Ser Tyr Leu Thr Tyr Gln Ala Val Leu Arg Ile Gln Ser Glu Leu
20 25 30

Gly Glu Thr Asn Pro Pro Gln Ala Ile Trp Leu Asn Gln Tyr Leu Ala
35 40 45

Ser His Ser Ile Gln Asn Gly Glu Thr Phe Leu Thr Glu Leu Leu Asp
50 55 60

Glu Asn Lys Glu Leu Val Leu Arg Ile Leu Ala Val Arg Glu Asp Ile
65 70 75 80

Ala Glu Ser Val Leu Asp Phe Leu Pro Gly Met Thr Arg Asn Ser Leu
85 90 95

Ala Glu Ser Asn Ile Ala His Arg Arg His Leu Leu Glu Arg Leu Thr
100 105 110

Arg Thr Val Ala Glu Val Asp Asn Phe Pro Ser Glu Thr Ser Asn Gly
115 120 125

Glu Ser Asn Asn Asn Asp Ser Pro Pro Ser
130 135

<210> 10
<211> 113
<212> PRT
<213> 集胞藻PCC6803

[0007]

<400> 10

Met Lys Thr Leu Pro Lys Glu Arg Arg Tyr Glu Thr Leu Ser Tyr Leu
1 5 10 15

Pro Pro Leu Thr Asp Gln Gln Ile Ala Lys Gln Val Glu Phe Leu Leu
20 25 30

Asp Gln Gly Phe Ile Pro Gly Val Glu Phe Glu Glu Asp Pro Gln Pro
35 40 45

Glu Thr His Phe Trp Thr Met Trp Lys Leu Pro Phe Phe Gly Gly Ala
50 55 60

Thr Ala Asn Glu Val Leu Ala Glu Val Arg Glu Cys Arg Ser Glu Asn
65 70 75 80

Pro Asn Cys Tyr Ile Arg Val Ile Gly Phe Asp Asn Ile Lys Gln Cys
85 90 95

Gln Thr Val Ser Phe Ile Val His Lys Pro Asn Gln Asn Gln Gly Arg
100 105 110

Tyr

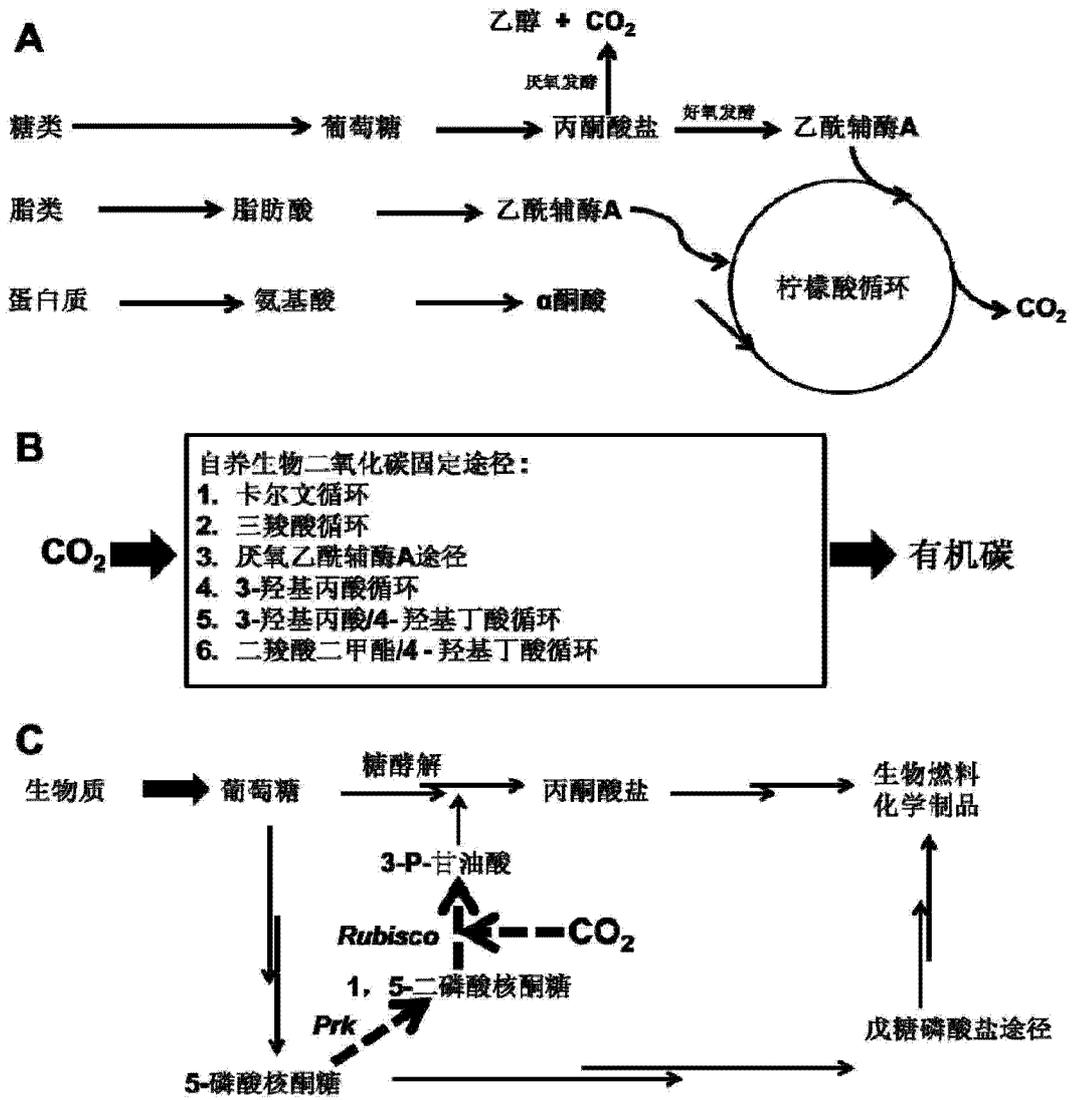


图 1

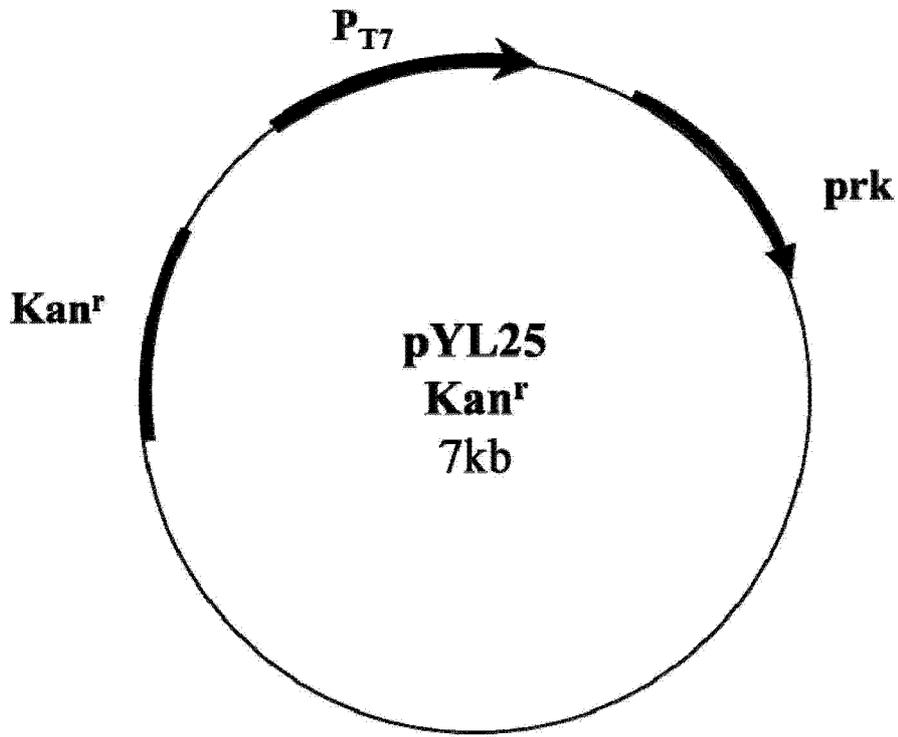


图 2

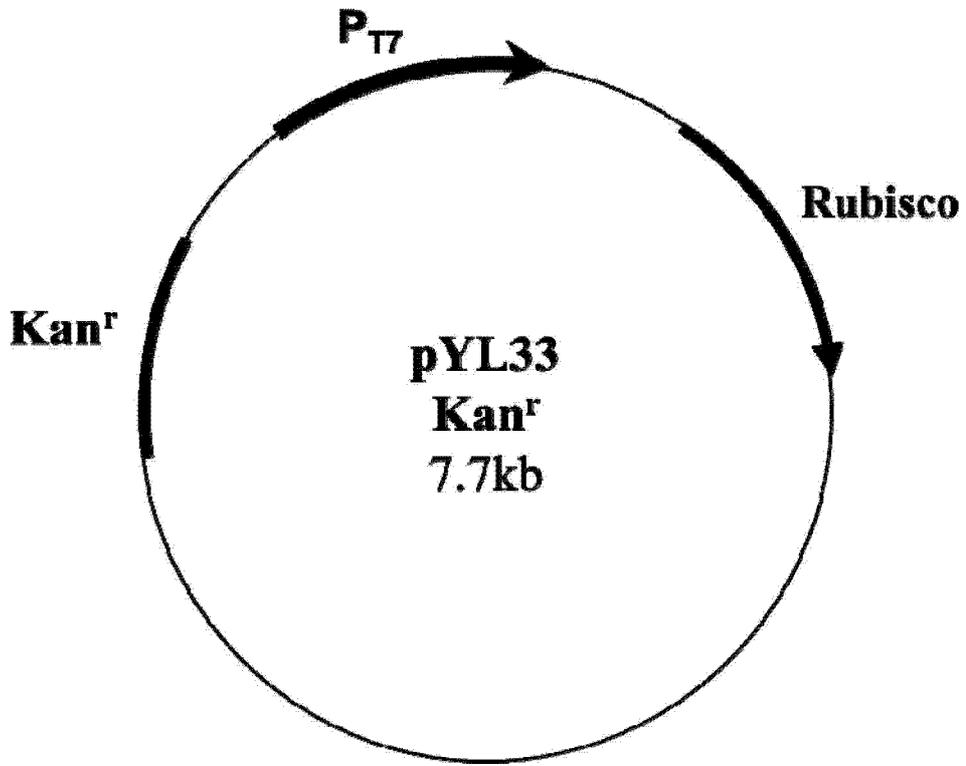


图 3

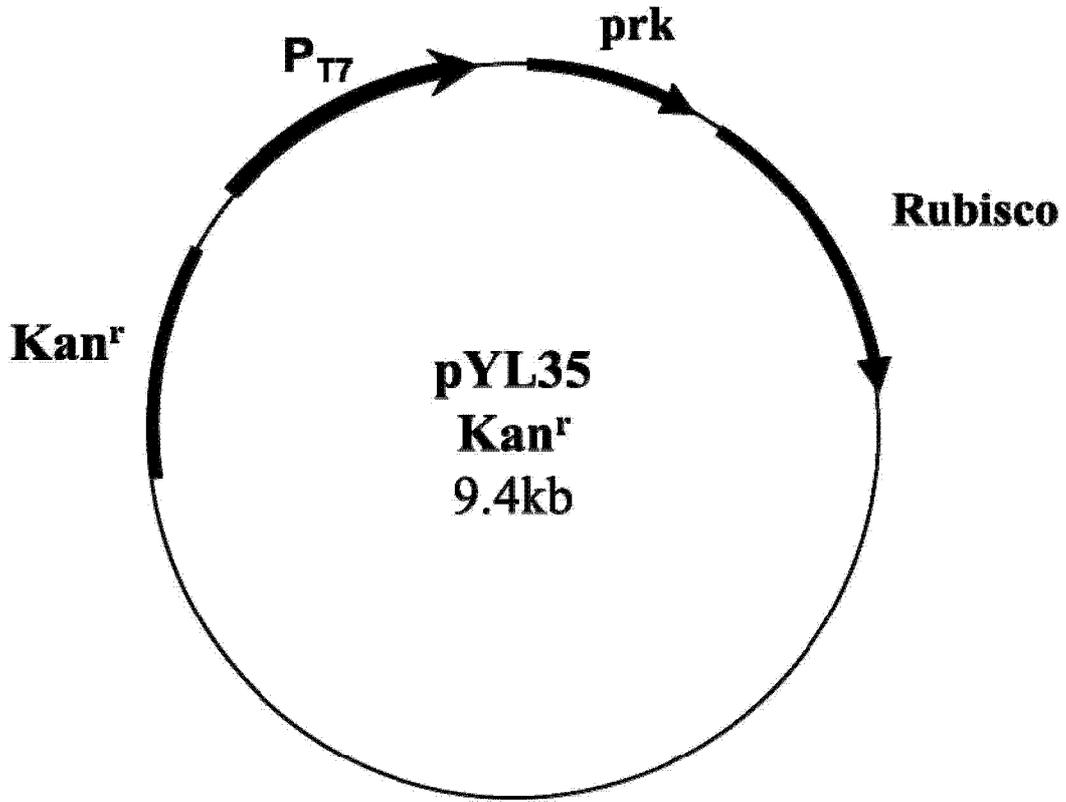


图 4

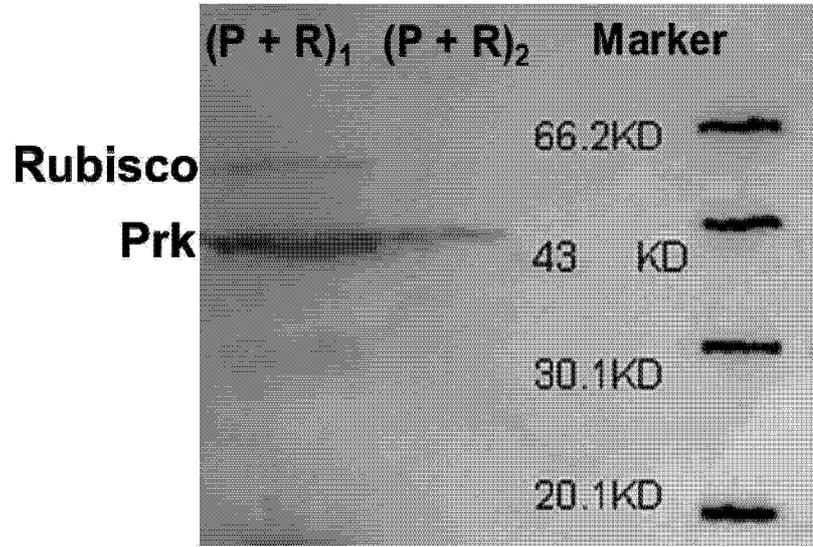


图 5

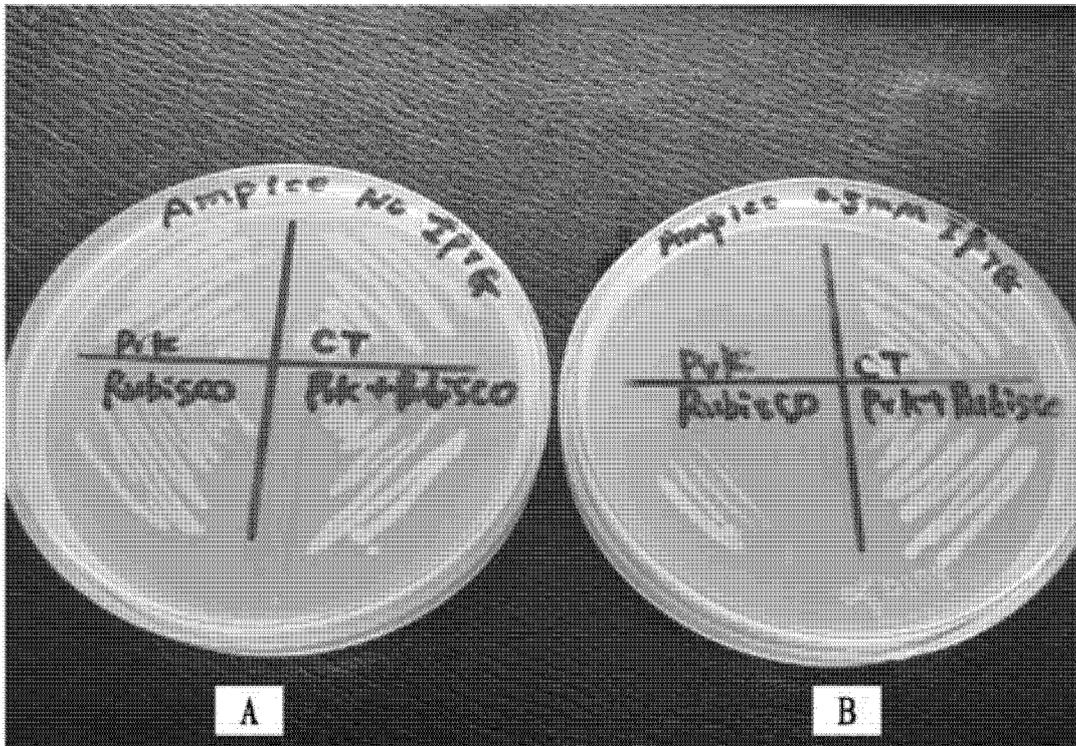


图 6