(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110791468 A
(43)申请公布日 2020.02.14

(21)申请号 201910973777.9

(22)申请日 2019.10.14

(71)申请人 江南大学
地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

(72)发明人 许正宏 李会 史劲松 许柽楠 张晓梅 龚劲松

(74)专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代理事务所(普通合伙) 32257
代理人 冯瑞

(51)Int.Cl.
C12N 1/21(2006.01)
C12P 33/06(2006.01)
C12R 1/32(2006.01)

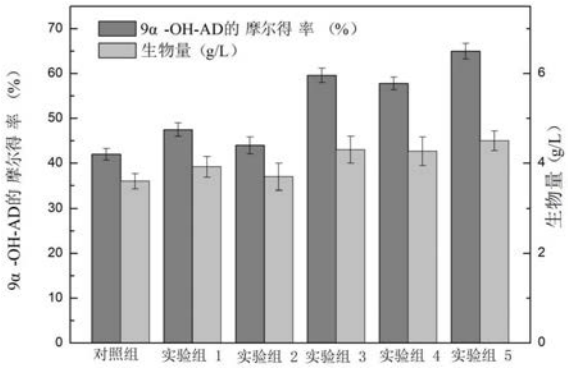
权利要求书1页 说明书6页
序列表10页 附图2页

(54)发明名称

一种分枝杆菌基因工程菌的构建方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种分枝杆菌基因工程菌的构建方法与应用,属于基因工程技术领域。本发明将重组质粒经转化进入分枝杆菌LY-1细胞后,sgRNA会识别基因组上的特定区域并引导Cas9蛋白结合到目标位点,在该蛋白的作用下,目标位点处形成一个双链断裂的缺口,绝大多数的细胞因此死亡:随重组质粒引入的同源修复序列在重组酶的作用下通过双交换整合至缺口处,基因同源修复成功的细胞就此存活下来,并形成基因失活和外源基因插入等人工设计的基因型。本发明所构建的CRISPR-Cas9系统针对同一基因的敲除效率为60%,与现有的分枝杆菌基因编辑方式相比更为便捷和高效。



CN 110791468 A

1.一种分枝杆菌基因工程菌的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)合成核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的针对分枝杆菌经过密码子优化的Cas蛋白表达框、核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示的sgRNA scaffold表达框,并以目的基因为靶点设计合成sgRNA片段;

(2)将步骤(1)中的Cas9蛋白表达框克隆到出发载体中;

(3)提取分枝杆菌基因组DNA,使用DNA聚合酶及引物扩增获得目的基因上下游基因片段作为基因编辑修复序列;

(4)将以目的基因为靶位点设计合成的sgRNA片段连接至步骤(2)得到的载体中,再连接步骤(3)制备的基因编辑修复序列,获得所述的分枝杆菌基因组编辑载体;

(5)将步骤(4)得到的基因编辑载体转化至分枝杆菌中,培养筛选得到所述的分枝枝杆菌基因工程菌。

2.根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,在步骤(2)中,所述的出发载体为pMV261。

3.根据权利要求2所述的构建方法,其特征在于,在步骤(2)中,Cas9蛋白表达框与出发载体pMV261之间通过如SEQ ID NO.16所示的核苷酸序列进行连接。

4.一种权利要求1所述的构建方法构建得到的分枝杆菌基因工程菌。

5.根据权利要求4所述的分枝杆菌基因工程菌,其特征在于,所述的基因工程菌敲除了3-甾酮-$\triangle^1$-脱氢酶和17β-羟基类固醇脱氢酶的编码基因,并过表达了3-甾酮-9α-羟基化酶。

6.根据权利要求5所述的分枝杆菌基因工程菌,其特征在于,所述的3-甾酮-$\triangle^1$-脱氢酶的编码基因的核苷酸序列如SEQ-ID-NO.8所示。

7.根据权利要求5所述的分枝杆菌基因工程菌,其特征在于,所述的17β-羟基类固醇脱氢酶的编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示。

8.根据权利要求5所述的分枝杆菌基因工程菌,其特征在于,所述的3-甾酮-9α-羟基化酶的编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示。

9.根据权利要求5所述的分枝杆菌基因工程菌,其特征在于,所述的分枝杆菌基因工程菌的宿主菌为分枝杆菌Mycobacterium sp.LY-1。

10.权利要求4-9任一项所述的分枝杆菌基因工程菌在生产9α-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮(9α-OH-AD)中的应用。

一种分枝杆菌基因工程菌的构建方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种分枝杆菌基因工程菌的构建方法与应用，属于基因工程技术领域。

背景技术

[0002] 甾体类药物具有重要的生理活性，在临床上被广泛用于治疗风湿病、心血管、胶原性病症、淋巴白血病、人体器官移植、抗肿瘤、细菌性脑炎、皮肤病、内分泌失调、老年性疾病等，是仅次于抗生素的第二大类药物，目前全球范围内甾体药物的年销售额超过1000亿美元。9α-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮(9α-OH-AD)作为甾体激素类药物的重要前体，其结构中特殊的α-构型羟基，是获得卤代皮质类激素的重要前体，如地塞米松、倍他米松、及糠酸莫米松等，具有重要的商业价值和广泛的市场需求。

[0003] 微生物发酵生产甾醇类物质，能够简化工艺路线，减少生产成本，而分枝杆菌是工业中降解甾醇类物质生产9α-OH-AD的重要微生物，其中包含复杂的催化酶系，9α-OH-AD是由雄烯二酮(AD)的第九位羟化所得，而同时AD与9α-OH-AD均可被3-甾酮-Δ^1-脱氢酶(3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase)与17β-羟基类固醇脱氢酶(17β-hydroxysteroid dehydrogenase)分别降解为雄二烯二酮(ADD)、9α-羟基-雄二烯二酮(9α-OH-ADD)、睾酮(T)、9α-羟基睾酮(9α-OH-T)，正是由于其复杂的酶催化体系，一方面甾醇代谢过程中不仅生成9α-OH-AD，还有许多副产物；另一方面也降低了目的产物9α-OH-AD的摩尔得率。

[0004] CRISPR/Cas技术是继锌指核酸酶(ZFN)、ES细胞打靶和TALEN等技术后可用于定点构建基因的第四种方法，且有效率高、速度快及简单经济的特点，在模型构建等方面的应用前景将非常广阔，CRISPR/Cas介导的基因组编辑技术以其操作简单、特异性高、可同时编辑多个基因的特点成为研究热点。对于分枝杆菌而言，传统的同源重组技术，仍具有效率低、步骤复杂等缺点，故本发明拟在野生菌株分枝杆菌中构建CRISPR/Cas技术。

发明内容

[0005] 为解决上述问题，本发明提供一种分枝杆菌基因工程菌的构建方法，首次在野生菌株分枝杆菌Mycobacterium sp.LY-1，该菌株保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号为CGMCC No.13031中构建稳定且高效的CRISPR/Cas9基因编辑体系，并应用在该菌的代谢改造中，获得多个基因工程菌株，能够获得巨大的甾体类药物的经济效益。

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种分枝杆菌基因工程菌的构建方法，包括如下步骤：

[0007] (1)合成核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的针对分枝杆菌经过密码子优化Cas蛋白表达框、核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示的sgRNAscaffold表达框，并以目的基因为靶点设计合成sgRNA片段；

[0008] (2)将步骤(1)中的Cas9蛋白表达框克隆到出发载体中；

[0009] (3)提取分枝杆菌基因组DNA,使用DNA聚合酶及引物扩增获得目的基因上下游基因片段作为基因编辑修复序列;

[0010] (4)将以目的基因为靶位点设计合成的sgRNA片段连接至步骤(2)得到的载体中,再连接步骤(3)制备的基因编辑修复序列,获得所述的分枝杆菌基因组编辑载体;

[0011] (5)将步骤(4)得到的基因编辑载体转化至分枝杆菌中,培养筛选得到所述的分枝杆菌基因工程菌。

[0012] 进一步地,在步骤(2)中,所述的出发载体为pMV261。

[0013] 进一步地,在步骤(2)中,Cas9蛋白表达框与出发载体pMV261之间通过如SEQ ID NO.16所示的核苷酸序列进行连接。

[0014] 本发明的第二个目的是提供所述构建方法构建得到的分枝杆菌基因工程菌。

[0015] 进一步地,所述的基因工程菌敲除了3-甾酮-Δ^1-脱氢酶和17β-羟基类固醇脱氢酶的编码基因,并过表达了3-甾酮-9α-羟基化酶。

[0016] 进一步地,所述的3-甾酮-Δ^1-脱氢酶的编码基因的核苷酸序列如SEQ-ID-NO.8所示。

[0017] 进一步地,所述的17β-羟基类固醇脱氢酶的编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示。

[0018] 进一步地,所述的3-甾酮-9α-羟基化酶的编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示。

[0019] 进一步地,所述的分枝杆菌基因工程菌的宿主菌为分枝杆菌Mycobacterium sp.LY-1。

[0020] 本发明的第三个目的是提供所述的分枝杆菌基因工程菌在生产9α-OH-AD中的应用。

[0021] 本发明的有益效果是:

[0022] 本发明系统,重组质粒经转化进入分枝杆菌LY-1细胞后,sgRNA会识别基因组上的特定区域并引导Cas9蛋白结合到目标位点,在该蛋白的作用下,目标位点处形成一个双链断裂的缺口,绝大多数的细胞因此死亡:随重组质粒引入的同源修复序列在重组酶的作用下通过双交换整合至缺口处,基因同源修复成功的细胞就此存活下来,并形成基因失活和外源基因插入等人工设计的基因型。

[0023] 本发明所构建的CRISPR-Cas9系统针对同一基因的敲除效率为60%,与现有的分枝杆菌基因编辑方式相比更为便捷和高效。

附图说明

[0024] 图1为出发载体pMV261的示意图;

[0025] 图2为载体pMVC的示意图;

[0026] 图3为工程菌的9α-OH-AD的摩尔得率与生物量结果图。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

[0028] 实施例1：

[0029] 一种基于CRISPR-Cas9系统的分枝杆菌LY-1基因组编辑载体的制备方法；

[0030] 合成针对分枝杆菌经过密码子优化的Cas9蛋白表达框(SEQ ID No.1)、sgRNA表达框(SEQ ID No.2)、kstd3-sgRNA片段(SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、SEQ ID No.5、SEQ ID No.6、SEQ ID No.7)；

[0031] (1)将合成的Cas蛋白表达框T-A克隆自pMD19-T-simple载体，获得质粒T-Cas9。再使用引物P1(5'-gaaacagaattaattaagcttTGGAAATCTAGAGGTGACCACAAC-3'，SEQ ID NO.17)和引物P2(5'-caaaacagccaagctgaattcTTAGTCGCCACCCAGCTGG-3'，SEQ ID NO.18)扩增片段，胶回收后通过5'-cggaggaatcacttcgca-3'(SEQ ID NO.16)无缝拼接到BamH I和EcoR I酶切的pMV261，得到质粒pMV261-Cas9；

[0032] (2)用引物P3(5'-CCCAAGCTTTCGCGGTGAAAGACATGTTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCC-3'，SEQ ID NO.19)和引物P4(5'-CCCAAGCTTAAAAAACAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTT-3'，SEQ ID NO.20)扩增以kstd3为靶点设计的sgRNA，用Primer star DNA聚合酶扩增获得带有靶点N20的sgRNAscaffold表达框；

[0033] 反应条件：95℃预变性3min后进入下一个循环：95℃变性30s，68℃退火30s，72℃延伸15s，34个循环；72℃延伸5min，12℃保温；

[0034] 扩增产物纯化后进行HindIII酶切后连接入质粒pMV261-Cas9的HindIII位点；

[0035] (3)提取分枝杆菌LY-1基因组DNA，使用Primer Star DNA聚合酶及引物P5(5'-tggccgcggtgatcagctagcGGCTGGTACTGGACGGGTG-3'，SEQ ID NO.21)、引物P6(5'-aagcgctcatTAGGTAACGCTGCCTCCCG-3'，SEQ ID NO.22)、引物P7(5'-gcgttacctaATGAGCGCTTGCGCGAAG-3'，SEQ ID NO.23)和引物P8(5'-aacgtcgctttgttggctagcAGGATCGAATTCCATTGCCA-3'，SEQ ID NO.24)分别扩增kstd3上下游各500bp作为同源修复序；

[0036] 所述3-甾酮-Δ^1-脱氢酶的基因序列如SEQ-ID-NO.8所示。

[0037] 反应条件：95℃预变性3min后进入下一个循环：95℃变性30s，55.9℃/56.6℃退火30s，72℃延伸30s，34个循环；72℃延伸5min，12℃保温。

[0038] 扩增产物纯化连接入上述制备的带有sgRNA的质粒pMV261-Cas9的NheI位点。获得所述的分枝杆菌LY-1基因组编辑载体pMVC1；

[0039] 一种含有所述基于CRISPR-Cas9系统的分枝杆菌LY-1基因组编辑载体的基于CRISPR-Cas9系统的分枝杆菌LY-1基因组编辑系统，所述分枝杆菌LY-1基因组编辑系统的制备方法为：将基于CRISPR-Cas9系统的分枝杆菌LY-1基因组编辑载体pMVC1电转化至电转化感应态分枝杆菌LY-1细胞中，然后进行培养得到所述的分枝杆菌LY-1基因组编辑系统；

[0040] (1)在制备的分枝杆菌LY-1感受态细胞内接入质粒DNA；冰上放置30min，将细胞转至2mm电转化杯中，用eppendorf电转化仪2.5kV连续电击2次，电击后迅速加入800μl分枝杆菌新鲜种子液，于30℃下120rpm恢复培养3-4h后，涂含有10μg/ml的卡那霉素抗性平板，30℃培养5-7d后验证长出的转化子；

[0041] (2)将获得的携带了pMVC1质粒的重组分枝杆菌LY-1阳性转化子，用针对基因组上同源臂上游/下游区域的特异性引物P9(5'-AAGCGAAGGCGGAGGGGCCGTGGTGCT-3'，SEQ ID NO.25)和引物P10(5'-CGCGAGGTCGTTGTGCAACCAGTTGATC-3'，SEQ ID NO.26)进行菌落PCR检

测,对PCR检测kstd3片段大小发生了变化的转化子,回收其扩增片段并送至南京金维智生物科技公司进行测序,将测序结果和原基因进行比对,检测kstd3基因是否敲除成功;

[0042] (3)将敲除成功的单菌落挑取到无抗性的种子培养基中培养传代以消除pMVC1质粒,获得无3-甾酮-Δ^1-脱氢酶活性菌株,保藏并用于下一轮基因编辑。

[0043] 对验证编辑成功的分枝杆菌LY-1进行甾醇转化实验,培养条件为30℃,120rpm,168h,利用乙酸乙酯萃取后,真空干燥并复溶并通过HPLC确定甾醇转化反应的结果,9α-OH-AD的摩尔得率达到47%,较野生分枝杆菌LY-1提高12%,如附图3,实验组1所示。

[0044] 实施例2:

[0045] 利用所构建的基于CRISPR/Cas9的基因编辑体系,在敲除基因kstd3的基础上,再同时对17β-羟基类固醇脱氢酶(17β-hsd)进行敲除编辑与对3-甾酮-9α-羟基化酶(kshA)的基因进行插入编辑;

[0046] 所述17β-羟基类固醇脱氢酶的基因序列如SEQ-ID-NO.9所示。

[0047] 合成针对分枝杆菌经过密码子优化的Cas9蛋白表达框(SEQ ID No.1)、sgRNA表达框(SEQ ID No.2)、17β-hsd-sgRNA片段(SEQ ID No.10、SEQ ID No.11、SEQ ID No.12、SEQ ID No.13、SEQ ID No.14);

[0048] (1)将合成的Cas蛋白表达框T-A克隆自pMD19-T-simple载体,获得质粒T-Cas9。再使用引物P1(5'-gaaacagaattaattaagcttTGGAAATCTAGAGGTGACCACAAC-3')和引物P2(5'-caaaacagccaagctgaattcTTAGTCGCCACCCAGCTGG-3')扩增片段,胶回收后无缝拼接到BamH I和EcoR I酶切的pMV261,得到质粒pMVC261-Cas9;

[0049] (2)用引物P11(5'-CCCAAGCTTCTTGGGGGCGAACCGCTGACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCC-3',SEQ ID NO.27)和引物P12(5'-CCGACGCGTAAAAAACAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTT-3',SEQ ID NO.28)扩增以17β-hsd为靶点设计的sgRNA,用Primer star DNA聚合酶扩增获得带有靶点N20的sgRNAscaffold表达框;

[0050] 反应条件:95℃预变性3min后进入下一个循环:95℃变性30s,68℃退火30s,72℃延伸15s,34个循环;72℃延伸5min,12℃保温;

[0051] (3)扩增产物纯化后进行HindIII酶切后连接入质粒pMV261-Cas9的HindIII位点;

[0052] 提取分枝杆菌LY-1基因组DNA,使用Primer Star DNA聚合酶及引物P13(5'-tggccgcggtgatcagctagcGCGCATCGGTGAGCAGCT-3',SEQ ID NO.29)、引物P14(5'-ggtagtcacTCTAGCTTCCTTTCCAAAAATGACC-3',SEQ ID NO.30)、引物P15(5'-gtcaagctgaGAGTGAGTTCCGGCGTGATC-3',SEQ ID NO.31)和引物P16(5'-aacgtcgctttgttggctagcCGCCATCTCGAGGATGCG-3',SEQ ID NO.32)、引物P17(5'-aggaagctagaGTGACTACCGAACATGCCGG-3',SEQ ID NO.33)和引物P18(5'-gaactcactcTCAGCTTGACTGCGCGGT-3',SEQ ID NO.34)分别扩增17β-hsd上下游各500bp及kshA作为同源修复序;

[0053] 所述3-甾酮-9α-羟基化酶的基因序列如SEQ-ID-NO.15所示。

[0054] 反应条件分别为:95℃预变性3min,95℃变性30s,57.7℃退火30s,72℃延伸15s,34个循环;72℃延伸5min,12℃保温;95℃预变性3min,95℃变性30s,55.8℃退火30s,72℃延伸1min,34个循环;72℃延伸5min,12℃保温;95℃预变性3min,95℃变性30s,56.5℃退火30s,72℃延伸15s,34个循环;72℃延伸5min,12℃保温;

[0055] (4)将步骤(3)扩增产物纯化连接入上述制备的带有sgRNA的质粒pMV261-Cas9的Nhe I位点。获得所述的分枝杆菌LY-1基因组编辑载体pMVC2;

[0056] 一种含有所述基于CRISPR-Cas9系统的分枝杆菌LY-1基因组编辑载体的基于CRISPR-Cas9系统的分枝杆菌LY-1基因组编辑系统,所述分枝杆菌LY-1基因组编辑系统的制备方法为:将基于CRISPR-Cas9系统的分枝杆菌LY-1基因组编辑载体pMVC2电转化至电转化感应态分枝杆菌LY-1细胞中,然后进行培养得到所述的分枝杆菌LY-1基因组编辑系统;

[0057] (1)在制备的分枝杆菌LY-1感受态细胞内接入质粒DNA;冰上放置30min,将细胞转至2mm电转化杯中,用eppendorf电转化仪2.5kV连续电击2次,电击后迅速加入800μl分枝杆菌新鲜种子液,于30℃下120rpm恢复培养3-4h后,涂含有10μg/ml的卡那霉素抗性平板,30℃培养5-7d后验证长出的转化子;

[0058] (2)将获得的携带了pMVC2质粒的重组分枝杆菌LY-1阳性转化子,用针对基因组上同源臂上游/下游区域的特异性引物P19(5'-GCGCATCGGTGAGCAGCTGAGTC-3',SEQ ID NO.35)和引物P20(5'-CGCCATCTCGAGGATGCGC-3',SEQ ID NO.36)进行菌落PCR检测,对PCR检测17β-hsd片段位置大小发生了变化的转化子,回收其扩增片段并送至南京金维智生物科技公司进行测序,将测序结果和原基因进行比对,检测17β-hsd基因是否编辑成功;

[0059] (3)将敲除成功的单菌落挑取到无抗性的种子培养基中培养传代以消除pMVC2质粒,获得无3-甾酮-Δ1-脱氢酶与17β-羟基类固醇脱氢酶活性、高3-甾酮-9α-羟基化酶活性的菌株,保藏并用于下一轮基因编辑。

[0060] 对验证编辑成功的分枝杆菌LY-1进行甾醇转化实验,培养条件为30℃,120rpm,168h,利用乙酸乙酯萃取后,真空干燥并复溶并通过HPLC确定甾醇转化反应的结果,9α-OH-AD的摩尔得率达到65%,较野生分枝杆菌LY-1提高55%,如附图3,实验组5所示。

[0061] 实施例3:

[0062] 利用所构建的基于CRISPR/Cas9的基因编辑体系,同时对3-甾酮-Δ^1-脱氢酶(kstd3)与17β-羟基类固醇脱氢酶(17β-hsd)进行敲除编辑。

[0063] 所述3-甾酮-Δ^1-脱氢酶的基因序列如SEQ-ID-NO.8所示。

[0064] 所述17β-羟基类固醇脱氢酶的基因序列如SEQ-ID-NO.9所示。

[0065] 具体实验方法参照实施例2,验证编辑成功的分枝杆菌LY-1进行甾醇转化实验,培养条件为30℃,120rpm,168h,利用乙酸乙酯萃取后,真空干燥并复溶并通过HPLC确定甾醇转化反应的结果,9α-OH-AD的摩尔得率达到47%,较野生分枝杆菌LY-1提高12%,如附图3,实验组2所示。

[0066] 实施例4:

[0067] 利用所构建的基于CRISPR/Cas9的基因编辑体系,同时对3-甾酮-Δ^1-脱氢酶(kstd3)进行敲除编辑与对3-甾酮-9α-羟基化酶(kshA)的基因进行插入编辑。

[0068] 所述3-甾酮-Δ1-脱氢酶的基因序列如SEQ-ID-NO.8所示。

[0069] 所述3-甾酮-9α-羟基化酶的基因序列如SEQ-ID-NO.15所示。

[0070] 具体实验方法参照实施例2,验证编辑成功的分枝杆菌LY-1进行甾醇转化实验,培养条件为30℃,120rpm,168h,利用乙酸乙酯萃取后,真空干燥并复溶并通过HPLC确定甾醇转化反应的结果,9α-OH-AD的摩尔得率达到58%,较野生分枝杆菌LY-1提高38%,如附图3,实验组3所示。

[0071] 实施例5：

[0072] 利用所构建的基于CRISPR/Cas9的，基因编辑体系同时对17β-羟基类固醇脱氢酶(17β-hsd)进行敲除编辑与对3-甾酮-9α-羟基化酶(kshA)的基因进行插入编辑。

[0073] 所述17β-羟基类固醇脱氢酶的基因序列如SEQ-ID-NO.9所示。

[0074] 所述3-甾酮-9α-羟基化酶的基因序列如SEQ-ID-NO.15所示。

[0075] 具体实验方法参照实施例2，验证编辑成功的分枝杆菌LY-1进行甾醇转化实验，培养条件为30℃，120rpm，168h，利用乙酸乙酯萃取后，真空干燥并复溶并通过HPLC确定甾醇转化反应的结果，9α-OH-AD的摩尔得率达到56％，较野生分枝杆菌LY-1提高33％，如附图3，实验组4所示。

[0076] 以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例，本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换，均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

序列表

<110> 江南大学

<120> 一种分枝杆菌基因工程菌的构建方法与应用

<160> 36

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 4104

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 1

atggacaaga agtactcgat cggcctggac atcggcacca actcggtggg ttgggccgtg 60
atcaccgatg attacaaggt gccgtcgaag aagttcaagg tcctgggcaa caccgaccgc 120
cattcgatca agaagaacct gatcggcgcc ctgctgttcg actcgggtga gatcgccgaa 180
gccacccgtc tgaagcgtac cgcccgtcgt cgttataccc gtcgtaagaa ccgcatctgc 240
tacctgcaag agatttttc gaacgagatg gcgaaggtcg atgactcgtt cttccaccgc 300
ctggaggagt cgttcctggt ggaggaggat aagaagcacg agcgccaccc gatcttcggt 360
aacatcgtcg atgaggtggc gtaccacgag aagtacccga ccatctacca cctgcgcaag 420
aagctggtgg actcgaccga taaggcggac ttgcgtctga tctacctggc gttggcccac 480
atgatcaagt tccggggtca cttcctgatc gagggcgatt tgaacccgga caactcggac 540
gtggacaagc tgttcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggagaacccg 600
atcaacgcga gcggtgtgga tgccaaggcc atcctgtcgg cccgtctgtc gaagtcgcgt 660
cgtctggaga acctgatcgc ccagttgccg ggtgaaaaga agaacggcct gttcggcaac 720
ctgatcgcgt tgtcgctggg tttgaccccg aacttcaagt cgaacttcga cctggccgag 780
gacgccaagt tgcagctgtc gaaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc 840
cagatcggtg atcagtacgc cgatctgttc ctggcggcca agaacttgtc ggacgccatc 900
ttgctgtcgg acatcctgcg tctgaactcg gagatcacca aggcgccgtt gtcggcctcg 960
atgatcaagc gttacgacga gcaccaccag gacctgacct tgttgaaggc cctggtccgt 1020
cagcagctgc cggagaagta taaggagatt tttttcgacc agtcgaagaa cggctacgcg 1080
ggttacatcg acggcggtgc ctcgcaggag gagttctaca agttcatcaa gccgatcctg 1140
gagaagatgg acggcaccga agagctgctg gccaagctga atcgcaagga cctgctgcgt 1200
aagcagcgca ccttcgataa cggctcgatc ccgcatcaga tccacctggg tgagctgcac 1260
gctatcctgc gtcgtcagga agacttctac ccgttcctga aggacaaccg cgagaagatc 1320
gagaagatcc tgaccttccg catcccgtac tacgtcggtc cgttggcccg tggtaactcg 1380
cgtttcgcct ggatgacccg taagtcggag gagacgatca ccccgtggaa cttcgaggag 1440
gtcgtggata agggcgcgtc ggcccagtcg ttcatcgagc gtatgaccaa cttcgacaag 1500
aacctgccga acgagaaggt cctgccgaag cattcgctgc tgtacgagta cttcaccgtg 1560
tataatgagc tgaccaaggt gaagtacgtg accgagggca tgaggaagcc ggccttcctg 1620
tcgggtgaac agaagaaggc gatcgtcgat ctgctgttca agaccaaccg caaggtgacc 1680

gtcaagcagc tgaaggagga ctacttcaag aagatcgagt gcttcgactc ggtggagatc 1740
agcggtgtcg aggatcgttt caacgcgagc ctgggtacgt accacgactt gttgaagatc 1800
atcaaggaca aggacttcct ggacaacgag gagaacgagg acatcctgga ggacatcgtg 1860
ctgaccctga ccttgttcga ggaccgtgag atgatcgagg agcgcttgaa gacctacgcg 1920
cacttgttcg acgacaaggt gatgaagcag ctgaagcgcc gccgttacac cggatggggt 1980
cgtctgtcgc gtaagttgat caacggcatc cgcgacaagc agtcgggtaa gaccatcctg 2040
gacttcctga agtcggacgg cttcgccaac cgtaacttca tgcagctgat ccacgacgac 2100
tcgctgacct tcaaggagga catccagaag gcccaggtgt cgggtcaggg tgactcgctg 2160
cacgagcaca tcgccaatct ggccggttcg ccggccatca agaagggtat cctgcaaacc 2220
gtcaaggtcg tcgatgagct ggtcaaggtg atgggccgtc acaagccgga aaacatcgtg 2280
atcgagatgg cgcgcgagaa ccagaccacc cagaagggtc agaagaactc gcgcgagcgt 2340
atgaagcgca tcgaggaagg tatcaaggag ctgggctcgc agatcctgaa ggagcatccg 2400
gtggagaaca cccagctgca aaacgagaag ctgtacctgt actacctgca aaacggccgc 2460
gacatgtacg tggaccagga attggacatc aaccgcctgt cggactacga cgtggaccat 2520
atcgtcccgc agtcgttcat caaggacgac tcgatcgaca acaaggtgct gacccgctcg 2580
gacaagaacc gtggtaagtc ggacaacgtc ccgtcggaag aggtggtgaa gaagatgaag 2640
aactactggc gccagctgct gaacgccaag ttgatcaccc agcgcaagtt cgacaacctg 2700
accaaggccg agcgcggtgg tctgtcggag ctggacaagg ccggtttcat caagcgccag 2760
ctggtcgaaa cccgccagat caccaagcac gtcgcccaga tcctggactc gcgtatgaac 2820
accaagtacg acgagaacga caagctgatc cgcgaggtca aggtcatcac cctgaagtcg 2880
aagctggtca gcgattttcg caaggacttc cagttctaca aggtgcgcga gatcaacaac 2940
taccaccacg cgcacgacgc ctacttgaac gccgtggtgg gtacggcctt gatcaagaag 3000
tacccgaagc tggagtcgga gttcgtgtac ggtgactaca aggtgtacga cgtccgcaag 3060
atgctggcca agtcggaaca ggagatcggc aaggccaccg ccaagtattt cttctactcg 3120
aacatcatga acttcttcaa gaccgagatc accctggcca acggcgaaat ccgtaagcgt 3180
ccgttgatcg agacgaacgg cgagacgggt gagatcgtgt gggataaggg ccgtgacttc 3240
gccactgtgc gtaaggtgct gtcgatgccg caggtgaaca tcgtcaagaa gaccgaggtc 3300
cagaccggcg gtttctcgaa ggaatcgatc ctgccgaagc gcaactcgga caagctgatc 3360
gcccgtaaga aggactggga cccgaagaag tacggcggtt tcgactcgcc gaccgtggcc 3420
tactcggtgc tggtggtggc caaggtggaa aagggtaagt cgaagaagct gaagtcggtc 3480
aaggagctgc tgggcatcac catcatggag cgttcgtcgt tcgagaagaa cccgatcgac 3540
ttcctggagg ccaagggtta caaggaggtg cgtaaggacc tgatcatcaa gctgccgaag 3600
tactcgctgt tcgagctgga gaacggccgt aagcgtatgc tggcctcggc cggtgagctg 3660
caaaagggta atgagctggc gctgccgtcg aagtacgtca atttcctgta cctggcctcg 3720
cactacgaga agctgaaggg ttcgccggag gacaacgagc agaagcagtt gttcgtcgag 3780
cagcacaagc actacctgga cgagatcatc gagcagatca gcgagttctc gaagcgcgtg 3840
atcctggccg atgccaatct ggataaggtg ctgagcgcgt acaacaagca ccgcgataag 3900
ccgatccgcg agcaggccga gaatatcatc cacctgttca ccctgaccaa cctgggcgcc 3960
ccgaccgcct tcaagtactt cgacaccacc atcgaccgca agcgctacac ctcgaccaag 4020

gaagtcctgg acgccacctt catccaccag tcgatcaccg gactgtacga gacgcgcatc 4080
gacttgtcgc agctgggtgg tgat 4104
<210> 2
<211> 118
<212> DNA
<213> (人工序列)
<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(28)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 2
cggaattcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngt tttagagcta gaaatagcaa gttaaaataa 60
ggctagtccg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg gtgctttttt ggatcccg 118
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 3
tcgcggtgaa agacatgtta 20
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 4
ggtgaaagac atgttaggga 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 5
cacctgcggg agttggtacg 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 6
tttccgatct gggcacaaag 20
<210> 7
<211> 20

<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 7
gaattcgttg aaacgctcca 20
<210> 8
<211> 1545
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 8
atgaagtggg ccgacgaatg tgatgtcctg gtcgcggggt ccggcggtgg tggcgtcacc 60
ggcgcataca ccgccgcccg cgaagggctg tcggtgatcc tggtcgaggc cagcgacaaa 120
ttcgggggca ccacagcgta ttccggtggt ggcggggtgt ggttcccgtg caacccggtg 180
ctcacccgcg ccggcaccga cgacaccatc gaggatgcgc tggagtacta ccacgccgtc 240
gtcggggacc ggacccctcg ggagctgcag gagacctacg tccgtggcgg cgccgggctg 300
atcgagtacc tggaagctga cgcctttctg aagttcgccc cgatgccgtg gcccgactac 360
ttcggcaagg cgcccaaggc ccgcaccgac ggtcaacgtc atatcgcggc gcgtccgctc 420
agggtcgaga aggccccgca cctgcgggag ttggtacgcg gcccgctcga cgccgaccgg 480
ctcggcgccg aacagcccga cgactatttc atcggcggcc gggcgttgat cgcccggttc 540
ctcaaagcca tcgagcagta ccagaatgcc tcgcttcggc tcaacacccc gttggtcgag 600
ttggtcgtcg aggacggcat cgtgacgggc gcgatcgtcg aaaccgacgg tgagcgcaag 660
gccatccggg cccggcgcgg tgtgctgctc gccgcgggcg gcttcgaggg caacgacgac 720
ctgcgccgcg aatacggtgt gccgggcgtc gcacgcgaca ccatggggcc gccggccaac 780
ctcgggcatg cgcaccaggc agcgatcgcc gtcggcgccg acgtcgacct gatggagcag 840
gcctggtggt cacctggaat gacccacccc gacgggcgct cggcgttcgc gctgtggttc 900
accggcggca tcttcgtcga ccagaacgga cggcgtttcg tcaacgagtc ggcggcttat 960
gaccggatcg gccgtgcgat cctgccgcgg ttggccgacg ggtcgatgac gttgccgtac 1020
tggatgatct acgacgaccg ggaggggggaa atccctcccg tcaaggccac caacgtatcg 1080
atggtcgaca cacagcaata cgtcgacgcc ggcttgtggc acacggccga caccctcgaa 1140
gagctggccg cgaagatcgg tgtccccgcc gagaacctgg tcgccaccgt ggagcgtttc 1200
aacgaattcg tcgtcgccgg caccgacgag gatttcgggc gtggcgacga ggcctacgac 1260
cgggccttct cgggcggtgc gtccccgctc gtcgcgatcg agaagggccc tttccacgcc 1320
gctgcgttcg gcatttccga tctgggcaca aaggggggat tgcgtaccga caccgcagcc 1380
cgggtactcg acaccgacgg tcaggtgatc gcaggactgt acgcggcggg aaacacgatg 1440
gccgccccca gcggcaccgc ctacccgggc ggcggaaatc cgatcggaac cagcatgctg 1500
ttcagccacc tcgcggtgaa agacatgtta gggatggact tgtga 1545
<210> 9
<211> 767
<212> DNA
<213> (人工序列)

<400> 9

atggagatcg aaggcaagaa ggcgatcgtc gtcggcggcg cgtccggctt tggccgcgcg 60
accgccgagg cgttggccaa gcggggcgcc agcgtggctg tgctggaccg gccgcaatcc 120
aagggccagg aagtggccga cgcgatcggc ggctcgttct tcgccgtcga cgtcacggac 180
ttcgacggta ccgaaaaggt gctggaagag gccgtcgcgg cgctgggtgg tctgcacatc 240
atcgtgacca ccgcaggtgg cggcatcggc gagcgcacca tcaagaagga cggcccgcac 300
agcctggatt cgttccgttc caccatcgac ctcaacctca tcggcacgtt caacatcagc 360
cggctggcgg cgtggcacat gagcaagaac gagccggtcg acgccgaggc cgaggagcgc 420
ggcgtcatca tcaacaccgc ctcgatcgcc gcgttcgagg gccagatcgg tcaggtcgcc 480
tacaccgcgt ccaaggccgc gatcgccggc atgtgcctga ccatggcgcg cgacctggga 540
gtctgggaat ccgcgtgctg gccatcgcgc cgagcctgtt cgccaccggt ctgaccgagg 600
gcattcccga cgagttcgcc gcggtgctga ccaaggacgc cgcgttcccc aagcgtctgg 660
gcaagcccga ggagtacgcc aagctcgccg tggcgatcgc cgagaacgcg atgctcaacg 720
gccagtgtct gcgtttggac gccggtcagc ggttcgcccc caagtag 767

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 10
cttgggggcg aaccgctgac 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 11
ggcaagaagg cgatcgtcgt 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 12
ggcggtcgcg cggccaaagc 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 13
tgcgtttgga cgccggtcag 20

<210> 14

<211> 20
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 14
cagtgtctgc gtttggacgc 20
<210> 15
<211> 1164
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 15
gtgactaccg aacatgccgg catcagagag atcgacaccg gcgccctgcc agaccgctat 60
gcgcggggtt ggcactgcct gggaccggtc aagaacttcc ttgacggtca gccgcactct 120
gtcgagatct tcggcaccaa gttggtcgtg ttcgccgaca ccaagggcga gttgaagatt 180
ctcgacggct actgccggca catgggcggt gacctgtcgc agggcaccat caagggtgac 240
gaggtggcct gcccgttcca cgactggcgc tggggcggcg acggcaagtg caagctggtg 300
ccctacgcca agcgcacccc acgcctggcc cgcacccggg cctggcacac cgatgtccgc 360
ggtggcctgc tgttcgtatg gcacgaccac gagggcaacg acccgcagcc cgaggtccgg 420
attcccgaga tccccgaggc cgccagcgac gagtggaccg agtggcagtg gaactcgatg 480
ctgatcgagg gcagcaactg ccgcgagatc atcgacaacg tcaccgacat ggcgcacttc 540
ttctacatcc acttcggtct gccgacgtac ttcaagaacg tcttcgaggg gcacatcgcc 600
tcgcagtacc tgcacaacgt cgggcgtcag gacatcggcg gcatggggac gcagtacggc 660
gagtcgcacc tggactccga agcctcctac ttcggcccgt ccttcatgat caactggctg 720
cacaacaact acagcggcta caaggcagag tcgatcctga tcaactgcca ctacccggtg 780
acgcaggact cgttcatgct gcagtggggc gtcatcgtcg aaaagcccaa gggtatggac 840
gagaagacca cgcagaagct ggccaacgcg atgaccgacg gcgtcagcca gggcttcctg 900
caggacgtgg agatctggaa gcacaagacc cgcatcgaca acccgctgct ggtcgaggag 960
gacggcgccg tctaccagat gcgccgctgg taccagcagt tctacgtcga cgtcgccgac 1020
atcacgccgg acatgaccga ccggttcgag atggagatcg acaccaccgc ggccaacgag 1080
aagtggcacg tggaggtcga ggagaacctg aagatccagg ccgagcagaa agcggccgag 1140
aaagaaaccg cgcagtcaag ctga 1164
<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 16
cggaggaatc acttcgca 18
<210> 17
<211> 45
<212> DNA

<213>(人工序列)
<400> 17
gaaacagaat taattaagct ttggaaatct agaggtgacc acaac 45
<210> 18
<211> 40
<212> DNA
<213>(人工序列)
<400> 18
caaaacagcc aagctgaatt cttagtcgcc acccagctgg 40
<210> 19
<211> 70
<212> DNA
<213>(人工序列)
<400> 19
cccaagcttt cgcggtgaaa gacatgttag ttttagagct agaaatagca agttaaaata 60
aggctagtcc 70
<210> 20
<211> 42
<212> DNA
<213>(人工序列)
<400> 20
cccaagctta aaaaacaagt tgataacgga ctagccttat tt 42
<210> 21
<211> 40
<212> DNA
<213>(人工序列)
<400> 21
tggccgcggt gatcagctag cggctggtac tggacgggtg 40
<210> 22
<211> 29
<212> DNA
<213>(人工序列)
<400> 22
aagcgctcat taggtaacgc tgcctcccg 29
<210> 23
<211> 28
<212> DNA
<213>(人工序列)
<400> 23

gcgttaccta atgagcgctt gcgcgaag 28

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 24

aacgtcgctt tgttggctag caggatcgaa ttccattgcc a 41

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 25

aagcgaaggc ggaggggccg tggtgct 27

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 26

cgcgaggtcg ttgtgcaacc agttgatc 28

<210> 27

<211> 70

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 27

cccaagcttc ttgggggcga accgctgacg ttttagagct agaaatagca agttaaaata 60

aggctagtcc 70

<210> 28

<211> 42

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 28

ccgacgcgta aaaaacaagt tgataacgga ctagccttat tt 42

<210> 29

<211> 39

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 29

tggccgcggt gatcagctag cgcgcatcgg tgagcagct 39

<210> 30

<211> 34
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 30
ggtagtcact ctagcttcct ttccaaaaat gacc 34
<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 31
gtcaagctga gagtgagttc cggcgtgatc 30
<210> 32
<211> 39
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 32
aacgtcgctt tgttggctag ccgccatctc gaggatgcg 39
<210> 33
<211> 31
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 33
aggaagctag agtgactacc gaacatgccg g 31
<210> 34
<211> 28
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 34
gaactcactc tcagcttgac tgcgcggt 28
<210> 35
<211> 23
<212> DNA
<213> (人工序列)
<400> 35
gcgcatcggt gagcagctga gtc 23
<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> (人工序列)

<400> 36

cgccatctcg aggatgcgc 19

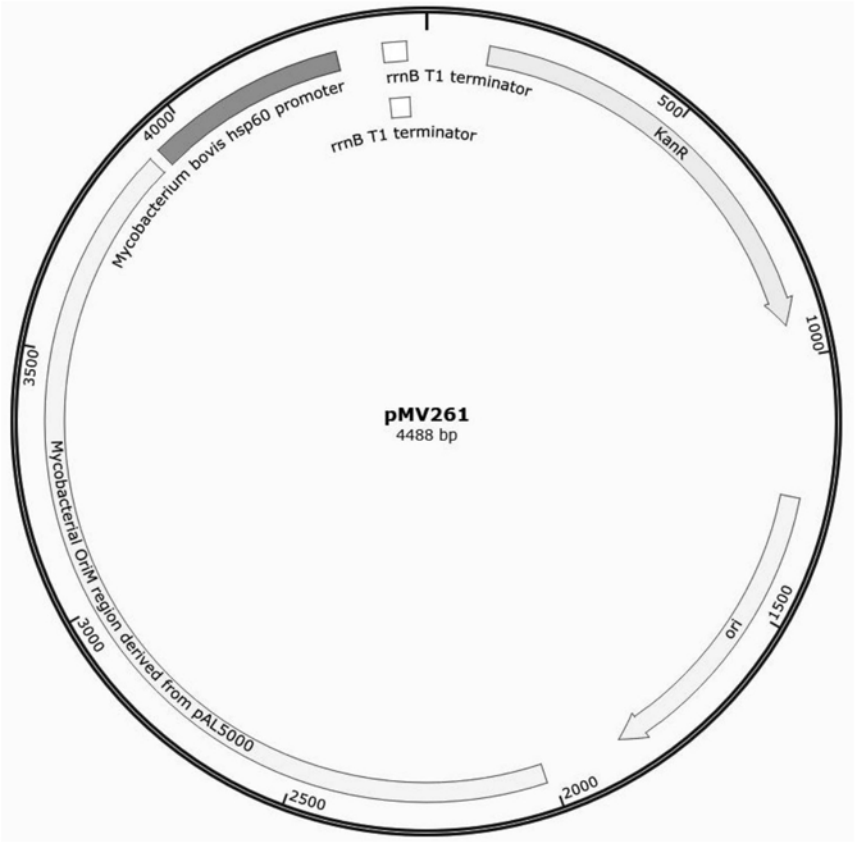

rrnB T1 terminator
rrnB T1 terminator
Mycobacterium bovis hsp60 promoter
KanR
pMV261
4488 bp
Mycobacterial OriM region derived from pAL5000
oriE
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000

图1

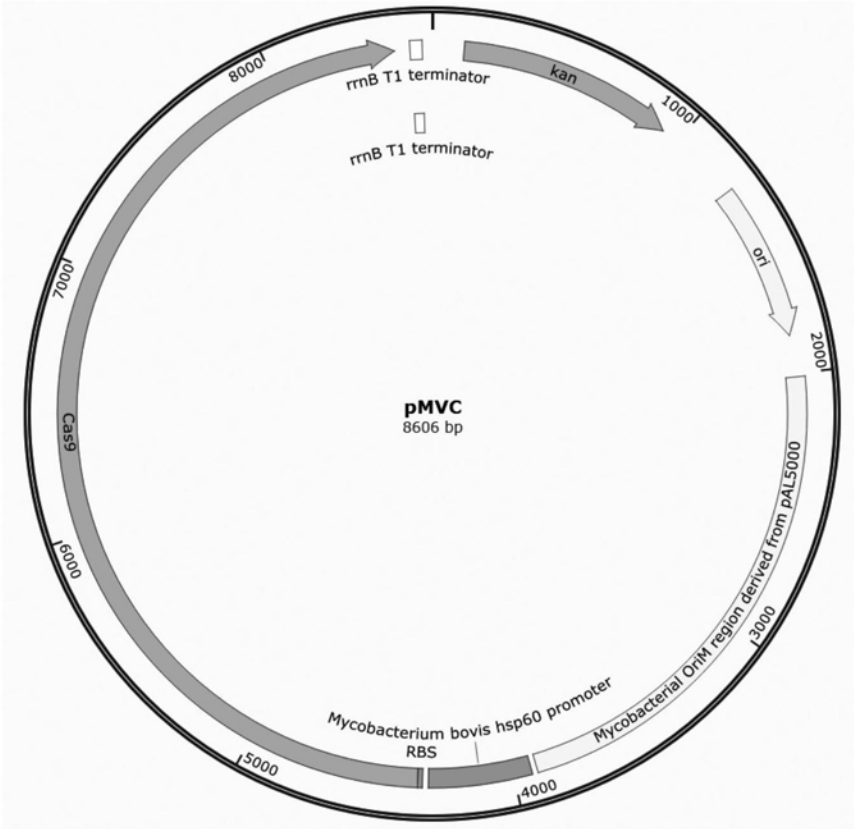

rrnB T1 terminator
kan
rrnB T1 terminator
ori
pMVC
8606 bp
Cas9
Mycobacterium bovis hsp60 promoter
RBS
Mycobacterial OriM region derived from pAL5000
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000

图2

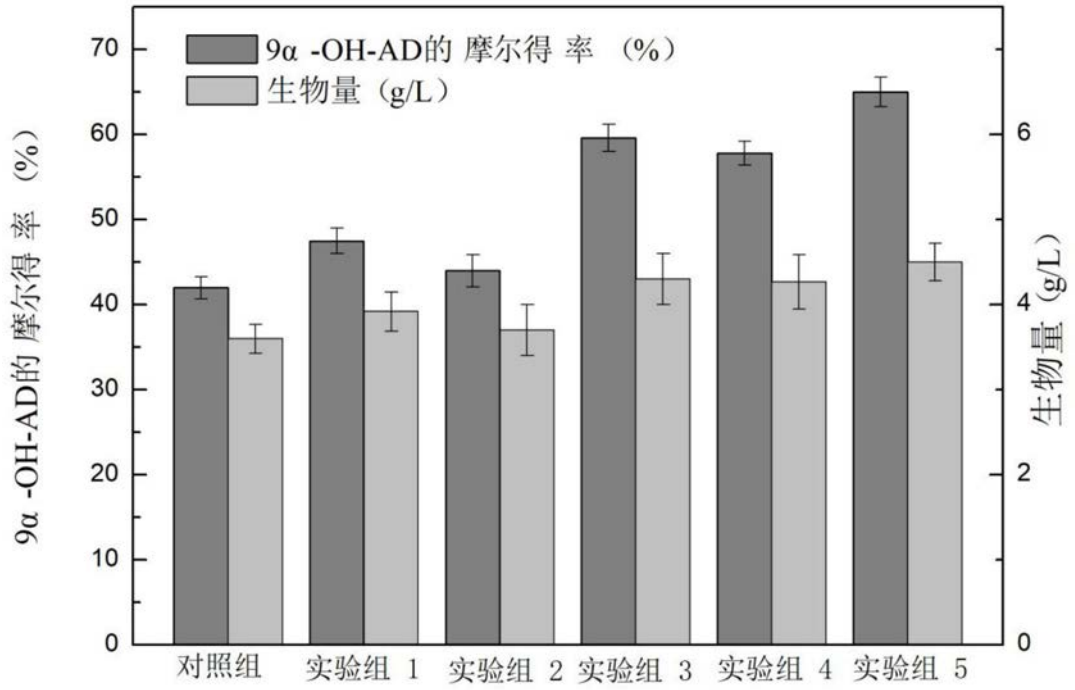

9α -OH-AD的 摩尔得 率 （%）
生物量（g/L）
9α -OH-AD的 摩尔得 率 （%）
生物量（g/L）
0
10
20
30
40
50
60
70
0
2
4
6
对照组
实验组 1
实验组 2
实验组 3
实验组 4
实验组 5

图3