

(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 8 月 11 日 (11.08.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/166648 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 33/02 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) *C12N 15/61* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/073487
- (22) 国际申请日: 2022 年 1 月 24 日 (24.01.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202110160871.X 2021年2月5日 (05.02.2021) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800
号, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 刘龙(LIU, Long); 中国江苏省无锡市蠡湖
大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 陈坚(CHEN,

Jian); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu
214122 (CN)。 吕雪芹(LV, Xueqin); 中国江苏省
无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。
堵国成(DU, Guocheng); 中国江苏省无锡市蠡湖
大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 李江华(LI,
Jianghua); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号,
Jiangsu 214122 (CN)。 刘延峰(LIU, Yanfeng); 中
国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122
(CN)。 修翔(XIU, Xiang); 中国江苏省无锡市蠡
湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

- (74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理
事务所(普通合伙)(CENTRAL SOUTH WELL
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江
苏省苏州市吴中区石湖西路 188 号吴
中万达广场 A 座苏州大学国家科技园
2303, Jiangsu 215000 (CN)。

(54) **Title:** METHOD FOR USING COMPARTMENTALIZATION TO INCREASE YIELD OF 7-DEHYDROCHOLESTEROL IN YEAST

(54) 发明名称: 利用区室化提高酵母菌中 7-脱氢胆固醇产量的方法

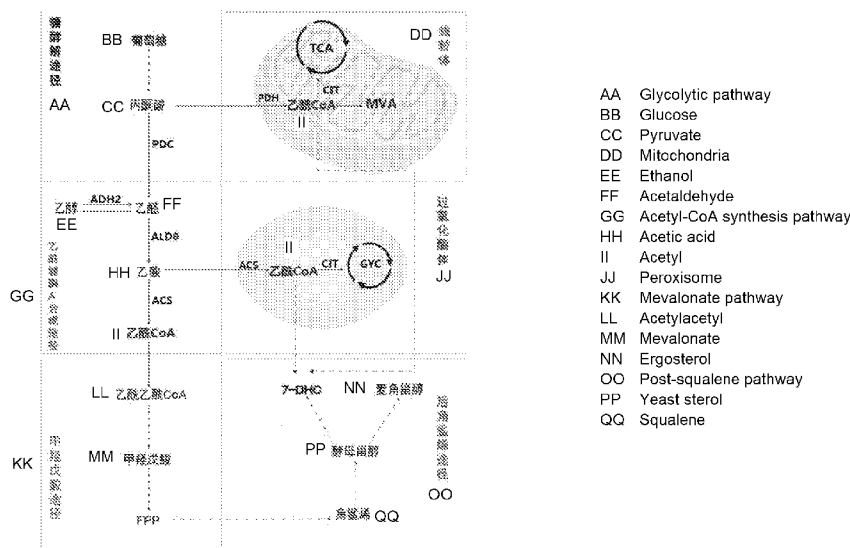


图 1

(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for using compartmentalization to increase the yield of 7-dehydrocholesterol in yeast. In the present invention, yeast is used as a starting strain, and heterologous sterol Δ 24-reductase and Δ -cholestanolase are expressed. The yield of 7-DHC in *Saccharomyces cerevisiae* S288C is 10.15mg/L. By means of our invention, some enzymes in the 7-DHC synthesis pathway are, by using oxidosomal and mitochondrial positioning tags, positioned in various compartments in *Saccharomyces cerevisiae* to form a relatively independent 7-DHC synthesis pathway. At the same time, the storage space of precursor substances required for the synthesis of 7-DHC is increased, and the feedback effect is reduced. In the same compartment, the efficiency of conversion between enzymes is increased, the loss of substrates is reduced, and finally, the yield of 7-DHC is increased by four times, reaching 53.31 mg/L.

(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, 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))。

(57) 摘要: 本发明涉及一种利用区室化提高酵母菌中7-脱氢胆固醇产量的方法, 本发明以酵母菌为出发菌株, 表达异源的甾醇 Δ^{24} -还原酶和 Δ -胆甾烯醇酶, 在酿酒酵母S288C中经过检测7-DHC的产量为10.15mg/L, 通过我们的发明, 将7-DHC合成路径中的部分酶使用氧化酶体和线粒体定位标签定位在酿酒酵母中各区室化中, 形成相对独立的7-DHC合成途径, 同时也增加了7-DHC合成所需前体物质的储存空间, 也减少了反馈作用, 在同一区室中, 酶与酶之间的转化效率提高, 减少作用底物的损失, 最终实现7-DHC产量提升4倍, 达到53.31mg/L。

利用区室化提高酵母菌中 7-脱氢胆固醇产量的方法

技术领域

本发明属于代谢工程技术领域，尤其涉及一种利用区室化提高酵母菌中 7-脱氢胆固醇产量的方法。

背景技术

7-脱氢胆固醇是一种具有高附加值的甾醇，人体中合成的 7-脱氢胆固醇（7-DHC）在皮肤组织中被阳光照射后直接转化为维生素 D3。而维生素 D3 不仅是人体骨骼肌肉生长发育所必须脂溶性维生素，还能降低免疫系统紊乱和多种癌症的风险，对心血管疾病也有预防作用，维生素 D 的缺乏已经被公认为是一个全球性的健康问题，这也增加每年全球对维生素 D3 或其直接前体 7-DHC 的需求量。7-DHC 是雄甾烯二酮和 9 α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮等甾醇药物合成的重要前体物质。7-DHC 不光在医药和临床有重要应用，它也是制备胆甾相液晶材料的重要原料，在显示制造等方面也有广发应用。

传统的 7-DHC 制备方法采用化学合成法，主流的化学合成法主要有两种，第一种是以胆固醇醋酸酯为原料，经过 7-位的溴化，消除和水解反应合成 7-DHC。第二种是以胆固醇醋酸酯为原料，经过氧化，脞化、消除和水解反应合成 7-DHC。化学合成的方法中存在反应底物的选择性问题的，能耗高，反应条件苛刻且污染严重，不利于可持续发展。微生物发酵生产 7-DHC 的方法绿色环保可持续。

7-DHC 的微生物发酵方法主要集中于菌株的筛选和分子改造方面，菌株筛选费时费力，需要进行大规模的筛选，即使筛选到生产 7-DHC 的菌株，其初始产物浓度也是极低的，并且不利于后期的改造和工业化生产。分子改造方面主要集中于分支路径的消除，前体物质的供应，但极易造成有毒中间产物的积累，不利于菌株的生长和生产。如中国专利 CN107075551B、美国专利 US2007/0204059A1、中国专利 CN109154015A；其中中国专利 CN109154015A 在酵母中生产甾醇混合物，为了达到优先生产 7-DHC 的效果，需要将 ERG5 和 ERG6 失活，降低或者消除 ARE2 和 ARE1 的活性，表达甾醇 Δ 24-还原酶活性的异源酶，但是失活麦角固醇合成路径中的关键基因，必定会影响菌体生长，并造成酵母细胞中胞质中的中间产物积累及代谢失衡。

现有生产 7-DHC 的技术主要集中在增强胞质的甲羟戊酸途径，敲除麦角甾醇合成路径中的 ERG5 和 ERG6，实现酿酒酵母中 7-DHC 的积累，但酿酒酵母中 7-DHC 合成路径长，

途径中关键的酶分布在不同的细胞器中，在整个合成过程中会造成酶到酶的转化效率低，底物在反应之前扩散损失，中间产物的积累对前期合成路径反馈抑制等突出性问题，使在酿酒酵母菌中生产 7-DHC 的产量一直难以实现大的提升。

发明内容

为了解决目前酵母菌胞质中合成 7-DHC 存在的乙酰辅酶 A 不足的问题，本发明通过利用过氧化酶体和线粒体中的乙酰辅酶 A，将 7-DHC 合成路径中的酶通过过氧化酶体和线粒体定位蛋白标签分别定位于线粒体和过氧化酶体中，这样使酵母菌不光能在胞质能合成重要的 7-DHC，还能在过氧化酶体和线粒体中合成，达到了提高代谢途径中底物的转化效率，增加最终产物的储存空间，减少代谢途径中的反馈抑制，最终通过这种方法实现了在酵母菌中 7-DHC 的产量为 52.31mg/L。

本发明的第一个目的是提供一种利用区室化提高酵母菌中 7-脱氢胆固醇产量的方法，包括分别在酵母菌宿主的过氧化酶体和线粒体中，表达异源甾醇 Δ 24-还原酶和 Δ -胆甾烯醇酶，并分别使用过氧化酶体定位标签和线粒体定位标签将 7-脱氢胆固醇合成路径中的酶定位在过氧化酶体和线粒体中表达。

进一步地，所述的甾醇 Δ 24-还原酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

进一步地，所述的 Δ -胆甾烯醇酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

进一步地，7-脱氢胆固醇合成路径中的酶为羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 ERG13、甲羟戊酸激酶 ERG12、羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 HMG1、磷酸甲羟戊酸激酶 ERG8、二磷酸甲羟戊酸酯脱羧酶 MVD1、异戊烯基二磷酸 δ -异构酶 IDI1、二磷酸法尼基转移酶 ERG9、角鲨烯单加氧酶 ERG1、羊毛甾醇合酶 ERG7、固醇 14 α -脱甲基酶 ERG11、 Δ 14-固醇还原酶 ERG24、甲基固醇单加氧酶 ERG25、固醇 4 α -羧酸酯 3-脱氢酶 ERG26、3-酮类固醇还原酶 ERG27、 Δ 7-甾醇 5-去饱和酶 ERG3、甾醇 Δ 24-还原酶 DHCR24 和 Δ -胆甾烯醇酶 EBP。

进一步地，羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 ERG13 的 NCBI 编号为 XM_033912304.1、甲羟戊酸激酶 ERG12 的 NCBI 编号为 XM_033912620.1、羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 HMG1 的 NCBI 编号为 XM_033912352.1、磷酸甲羟戊酸激酶 ERG8 的 NCBI 编号为 NM_001182727.1、二磷酸甲羟戊酸酯脱羧酶 MVD1 的 NCBI 编号为 NM_001183220.1、异戊烯基二磷酸 δ -异构酶 IDI1 的 NCBI 编号为 NM_001183931.1、二磷酸法尼基转移酶 ERG9 的 NCBI 编号为 NM_001179321.1、角鲨烯单加氧酶 ERG1 的 NCBI 编号为 NM_001181304.1、羊毛甾醇合酶 ERG7 的 NCBI 编号为 NM_001179202.2、固醇 14 α -脱甲基酶 ERG11 的 NCBI 编号为 NM_001179137.1、 Δ 14-固醇还原酶 ERG24 的 NCBI 编号为 NM_001183118.1、甲基固醇单

加氧酶 ERG25 的 NCBI 编号为 NM_001181189.3、固醇 4 α -羧酸酯 3-脱氢酶 ERG26 的 NCBI 编号为 NM_001180866.1、3-酮类固醇还原酶 ERG27 的 NCBI 编号为 NM_001181987.1、 Δ 7-甾醇 5-去饱和酶 ERG3 的 NCBI 编号为 NM_001181943.1、甾醇 Δ 24-还原酶 DHCR24 的 NCBI 编号为 NM_001031288.1 和 Δ -胆甾烯醇酶 EBP 的 NCBI 编号为 KR709569.1。

进一步地，所述的过氧化酶体定位标签为过氧化酶体定位信号肽 PTS1，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

进一步地，所述的线粒体定位标签为线粒体定位信号肽 MMF1，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

进一步地，所述的酵母菌宿主为酿酒酵母、毕赤酵母或热带假丝酵母。

进一步地，所述的酵母菌宿主为酿酒酵母 S288C。

本发明的第二个目的是提供一种酵母工程菌，所述的酵母工程菌分别在酵母菌宿主的过氧化酶体和线粒体中，表达异源甾醇 Δ 24-还原酶和 Δ -胆甾烯醇酶，并分别使用过氧化酶体定位标签和线粒体定位标签在过氧化酶体和线粒体中表达 7-脱氢胆固醇合成路径中的酶。

借由上述方案，本发明至少具有以下优点：

本发明以酵母菌为出发菌株，分别在过氧化酶体和线粒体中同时表达异源的甾醇 Δ 24-还原酶和 Δ -胆甾烯醇酶，在酿酒酵母中经过检测 7-DHC 的产量为 10.15mg/L，通过我们的发明，将 7-DHC 合成路径中的部分酶使用氧化酶体和线粒体定位标签定位在酿酒酵母中各区室化中，形成相对独立的 7-DHC 合成途径，同时也增加了 7-DHC 合成所需前体物质的储存空间，也减少了反馈作用，在同一区室中，酶与酶之间的转化效率提高，减少作用底物的损失，最终实现 7-DHC 产量提升 4 倍，达到 53.31mg/L。

上述说明仅是本发明技术方案的概述，为了能够更清楚了解本发明的技术手段，并可依照说明书的内容予以实施，以下以本发明的较佳实施例并配合详细说明如后。

附图说明

图 1 为酵母区室化生产 7-DHC 概论图；

图 2 为 7-DHC 标品液相图；

图 3 为酿酒酵母菌株 CDHC-17 发酵液相结果图。

具体实施方式

涉及的检测方法：

通过高效液相色谱对酿酒酵母中的 7-DHC 进行检测，将发酵 60h 的酿酒酵母菌液离心，使用 10ml 无菌水重悬，加入 0.5mm 的玻璃珠，使用高速匀浆破碎仪破碎 10min，取出破碎

后的混合液,加入 1g 抗坏血酸和 0.5gHBT,混匀,依次加入 20ml 的无水乙醇,10ml 的 1.5mol/L 的氢氧化钾甲醇溶液,在 80℃的水域中皂化 2 小时,皂化结束后使用萃取液(异丙醇:正己烷=1:3)进行超声震荡 30 分钟,使用分液漏斗出去下层杂质后,将萃取混合液进行冷冻干燥处理,处理结束后使用甲醇或乙腈或甲醇和乙腈的混合物复溶,0.55 μ m 过滤后进行高效液相色谱分析。流动相使用甲醇和水,检测器使用紫外检测器,检测波长为 265nm。

实施例 1: 构建酿酒酵母菌 CDHC-2

(a) 人工合成基因片段 P_{TEF1} -DHCR24- T_{cyc1} - P_{GAP} -DIC- T_{ADH1} , 以酿酒酵母 S228C 基因组为模板,使用引物 208F-F、208F-R 扩增得到基因片段 208-F,使用引物 208R-F、208R-R 扩增得到基因片段 208-R,以 pMHylp-trp 质粒为模板,使用引物 loxT-F、loxT-R 扩增得到基因片段 loxT 片段。

(b) 将步骤(a)中获得的四个片段 P_{TEF1} -DHCR24- T_{cyc1} - P_{GAP} -DIC- T_{ADH1} 、208F-F、208-R 和 loxT 基因片段进行重叠延伸 PCR,1%的琼脂糖凝胶电泳验证正确后,切胶回收片段,得到融合基因片段 208-F-loxT- P_{TEF1} -DHCR24- T_{cyc1} - P_{GAP} -DIC- T_{ADH1} - 208-R 基因片段。

(c) 将步骤(b)得到的基因片段,转化进入酿酒酵母 S288C 菌株的感受态中,涂布在 SD Trp 平板上,30℃培养 3 天,使用引物 YZ-24-DIC-F、YZ-24-DIC-R 进行菌落 PCR 验证得到菌株 CDHC-1

(d) 将步骤(c)得到的菌株 CDHC-1 制成感受态,并将 PY26-Cre 这个质粒转化进入酿酒酵母中,待 SD Ura 筛选固体平板上长出单菌落后,接入 YPD 培养基中培养 12h,于含有 5-FOA 的 YPD 固体平板上,30℃培养 3 d,之后将长出的单菌落分别转板于 YPD 固体平板与 SD Ura 筛选固体平板上对比验证,YPD 平板上正常生长但 SD Ura 筛选平板无法生长的单菌落即为正确的基因工程菌,并命名为 CDHC-2。

引物序列:

208F-F: ccaggttaatgtgttctctgaaattcgc

208F-R: gtaatcatggcatagctgtttcctgtgttttagcggacgtgtgtatggt

208R-F: cagcttttgtcccttttagtgtttgacgatgtcagtgaatccgg

208R-R: cttgtagtccaccattgccattttca

loxT-F: ccatacacacgtccgctaacaacaggaaacagctatgaccatgattacg

loxT-R: accttttagtacgggtaattaacgataaaacgacggccagtccaaggtcg

YZ-24-DIC-F: atggatttcgccaatcaaaccat

YZ-24-DIC-R: caatgaaacagctggtccattcgaaactaagtctggtgttttaaactaa。

实施例 2: 构建酿酒酵母线粒体区室化

(a) 以酿酒酵母工程菌 S228C 基因组为模板, 选取线粒体定位信号肽 MMF1。采用引物 ERG12-F, ERG12-MMF1-R 扩增得到基因片段 ERG12-MMF1, 采用引物 ERG13-F1, ERG13-MMF1-R1 扩增得到基因片段 ERG13-MMF1, 采用引物 GAL-F1、GAL-R1 扩增得到 GAL1 启动子和 GAL10 启动子基因片段 GAL1-10, 采用引物 loxT-GAL-F、LoxT-GAL-R 扩增得到基因片段 Lox-Trp, 采用引物 GAL80F1-F、GAL80F1-R 扩增得到基因片段 GAL80F1, 采用引物 GAL80R1-F、GAL80R1-R 扩增基因片段得到 GAL80R1, 采用 CYC1-S-F、CYC1-S-R 扩增基因片段得到 CYC1, 采用引物 ADH1-S-F、ADH1-S-R 扩增基因片段得到 ADH1, 采用 MMF1-F、MMF1-R、MMF2-F、MMF2-R 为引物扩增片段得到 MMF1-1、MMF2-2。

(b) 将实例 1 中得到的 CDHC-2 菌株制成酵母感受态细胞, 将步骤 (a) 中得到的 10 个基因片段转化进入 CDHC-2 中, 使用引物 YZS-12-13-F、YZS-12-13-R 进行菌落 PCR 验证。

(c) 将步骤 (d) 中菌落 PCR 验证正确的单菌落接入 SD trp 液体培养基内培养 16 h, 之后划线于含有 5-FOA 的 YPD 固体平板上, 30 °C 培养 3 d, 之后将长出的单菌落分别转板于 YPD 固体平板与 SD his 筛选固体平板上对比验证, YPD 平板上正常生长但 SD his 筛选平板无法生长的单菌落即为正确的基因工程菌, 并命名为 CDHC-3。

(d) 按照上述步骤将 HMG1、ERG8、MVD1、IDI1、ERG9、ERG1、ERG7、ERG11、ERG24、ERG25、ERG26、ERG27、ERG3、DHCR24、EBP 基因固定于线粒体中, 最终得到菌株的 CDHC-10

引物序列:

ERG12-F1: tcaaggagaaaaactataatgtctcagaacgtttacattgtat

ERG12-MMF1-R: aacggaatttcttaaaaacattatcttttcaatgacaatagaggaa

ERG13-F1: tcttaaaaacattttttaacatcgtaagatcttctaaat

ERG13-MMF1-R: ttttgaaaattcaatataaatgaaactctcaactaaactttgttg

GAL-F1: agttgagagtttcatttatattgaatttcaaaaattcttacttttttttg

GAL-R1: taaacgttctgagacattatagtttttctccttgacgttaaagt

loxT-M-F: cttattgaccacacctctaccggcaggaaacagctatgaccatgattacg

LoxT-M-R: aatatcagagcatccataaaacgacggccagtccaaggtcga

GAL80F2-F: acaagttcgtactttccaggataaatgc

GAL80F2-R: ggctttaatttgccggccaccttgacattacaaattgtgagg

CYC1-M-F: tgtaatgcaagtgccgcaaattaaagccttcgagcgtc

CYC1-M-R: atctctgagaaggccgaataatcatgtaattagttatgtcac

ADH1-M-F: ctctgagaaggccgaagcgaatttcttatgatttatgttttatt

ADH1-M-R: tcatggtcatagctgtttcctgccggtagaggtgtggtcaataag

GAL80R2-F: cactggccgtcgttttatggatgctctgatattacacaggtaat

GAL80R2-R: accgggtgataggtttgctcaacat

YZM-10-13-F: ggaaaagctgcataaccactttaact

YZM-10-13-R: ctgagaaagcaacctgacctacagg

MMF1-F: tacatgattattcggccttctcagagatagaaccttgaac

MMF1-R: atcttacgatgttaaaaaatgttttaagaaattccgtt

MMF2-F: attgtcattgaaaagataatgttttaagaaattccgtttgagaacag

MMF2-R: aaatcataagaaattcgcttcggccttctcagagatagaa。

实施例 3：构建酿酒酵母过氧化酶体区室化

(a) 以酿酒酵母工程菌 S228C 基因组为模板，选取过氧化酶体定位信号肽 PTS1。采用引物 ERG12-F，ERG12-PTS1-R 扩增得到基因片段 ERG12-PTS1，采用引物 ERG13-F，ERG13-PTS1-R 扩增得到基因片段 ERG13-PTS1，采用引物 GAL-F、GAL-R 扩增得到 GAL1 启动子和 GAL10 启动子基因片段 GAL1-10，采用引物 loxT-GAL-F、LoxT-GAL-R 扩增得到基因片段 Lox-Trp，采用引物 GAL80F3-F、GAL80F3-R 扩增得到基因片段 GAL80F3，采用引物 GAL80R3-F、GAL80R3-R 扩增基因片段得到 GAL80R3，采用引物 CYC1-F、CYC1-13-R 扩增基因片段得到 CYC1，采用引物 ADH1-10-F、ADH1-R 扩增基因片段得到 ADH1。

(b) 将实例 2 中得到的 CDHC-10 菌株制成酵母感受态细胞，将步骤 (a) 中得到的 8 个基因片段转化进入 CDHC-6 中，使用引物 YZ-10-13-F、YZ-10-13-R 进行菌落 PCR 验证。

(c) 将步骤 (d) 中菌落 PCR 验证正确的单菌落接入 SD trp 液体培养基内培养 16 h，之后划线于含有 5-FOA 的 YPD 固体平板上，30 °C 培养 3 d，之后将长出的单菌落分别转板于 YPD 固体平板与 SD his 筛选固体平板上对比验证，YPD 平板上正常生长但 SD his 筛选平板无法生长的单菌落即为正确的基因工程菌，并命名为 CDHC-7。

(d) 按照上述步骤将 HMG1、ERG8、MVD1、IDI1、ERG9、ERG1、ERG7、ERG11、ERG24、ERG25、ERG26、ERG27、ERG3、DHCR24、EBP 基因固定于线粒体中，最终得到菌株的 CDHC-17。

引物序列：

ERG12-F: tcaaggagaaaaactataatgtctcagaacgtttacattgtat

ERG12-PTS1-R: ttgggaagaggtagaagatccaaattgtatcttttcaatgacaatagaggaagca

ERG13-F: acaatttggatcttctaccttcccaatttttaacatcgtaag

ERG13-PTS1-R: tttgaaaattcaatataaatgaaactctcaactaaactttgttg

GAL-F: agttgagagtttcatttatattgaattttcaaaaattcttacttttttttgg
GAL-R: taaacgttctgagacattatagtttttctccttgacgttaaagt
loxT-pts-F: cttattgaccacacctctaccggcaggaaacagctatgacatgattacg
LoxT-pts-R: gcattactcaattttagactaaaacgacggccagtccaaggctcg
GAL80F3-F: ccaatgctaaccggctcactgccactgc
GAL80F3-R: aggctttaatttgccgctggcaatagaagtctcaatttt
CYC1-F: gagacttctattgccaggccgcaaattaaagccttcgagc
CYC1-13-R: gtagaagatccaaattgtaatcatgtaattagttatgtcacgctt
ADH1-10-F: aatttgatcttctacctcttcccaagcgaatttcttatgattta
ADH1-R: tcatggctcatagctgttctcgcggtagaggtgtggtaataag
GAL80R3-F: gccgctgttttagtctaaaattgagtaatgccactgcttttcca
GAL80R3-R: atgtattgtaaaatatcgattgtgt
YZ-10-13-F: ggaaaagctgcataaccactttaact
YZ-10-13-R: ctgagaaagcaacctgacctacagg。

实施例 4：构建成功的酿酒酵母菌进行发酵培养

在 2 ml YPD 培养基中接种固体 YPD 平板上的酿酒酵母菌 CDHC-10 单菌落和 CDHC-17 单菌落，30℃，220rpm 培养 16-20 h 后，分别按接种量 1%接入含有 25 mL YPD 液体培养基的 250 mL 圆底摇瓶内，30℃，220rpm 培养 60 h。发酵至 16h 时，加入乙醇进行碳源的补充。发酵结束 108h 后，离心取沉淀，除去上清，使用 10ml 无菌水重悬，加入 0.5mm 的玻璃珠，使用高速匀浆破碎仪破碎 10min，取出破碎后的混合液，加入 1g 抗坏血酸和 0.5gHBT，混匀，依次加入 20ml 的无水乙醇，10ml 的 1.5mol/L 的氢氧化钾甲醇溶液，在 80℃的水域中皂化 2 小时，皂化结束后使用萃取液（异丙醇：正己烷=1:3）进行超声震荡 30 分钟，使用分液漏斗出去下层杂质后，将萃取混合液进行冷冻干燥处理，处理结束后使用甲醇或乙腈或甲醇和乙腈的混合物复溶，0.55 μm 过滤后进行高效液相色谱分析。流动相使用甲醇和水，检测器使用紫外检测器，检测波长为 265nm。

经过液相分析，构建成功的线粒体区室化菌株 CDHC-10 的 7-DHC 产量为 29.35mg/L，以 CDHC-10 基础上，构建成功的过氧化酶体区室化菌株 CDHC-17 的 7-DHC 产量为 53.31mg/L。

以上仅是本发明的优选实施方式，并不用于限制本发明，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明技术原理的前提下，还可以做出若干改进和变型，这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。

序列表

<110> 江南大学

<120> 利用区室化提高酵母菌中 7-脱氢胆固醇产量的方法

<160> 4

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 2

<211> 516

<212> PRT

<213> (人工序列)

<400> 2

Met Ser Ala Val Trp Ser Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Trp Val Arg His Arg Gly Leu Glu Ala Val Leu Val His His Arg Trp
20 25 30
Ile Phe Val Cys Phe Phe Leu Met Pro Leu Ser Ile Leu Phe Asp Val
35 40 45
Tyr Tyr Gln Leu Arg Ala Trp Ala Val Arg Arg Met His Ser Ala Pro
50 55 60
Arg Leu His Gly Gln Arg Val Arg His Ile Gln Glu Gln Val Arg Glu
65 70 75 80
Trp Lys Glu Glu Gly Gly Arg Arg Tyr Met Cys Thr Gly Arg Pro Gly
85 90 95
Trp Leu Thr Val Ser Leu Arg Val Gly Lys Tyr Lys Lys Thr His Lys
100 105 110
Asn Ile Met Ile Asn Leu Met Asp Val Leu Glu Val Asp Ser Glu Arg
115 120 125
Gln Val Val Arg Val Glu Pro Leu Val Thr Met Gly Gln Leu Thr Ala
130 135 140

Tyr Leu Asn Pro Met Gly Trp Thr Ile Pro Val Val Pro Glu Leu Asp
 145 150 155 160
 Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Ile Met Gly Thr Gly Ile Glu Ser Ser
 165 170 175
 Ser His Ile Tyr Gly Leu Phe Gln His Thr Cys Met Ala Tyr Glu Leu
 180 185 190
 Val Leu Ala Asp Gly Ser Leu Val Arg Cys Ser Pro Thr Glu Asn Ser
 195 200 205
 Asp Leu Phe Tyr Ala Val Pro Trp Ser Cys Gly Thr Leu Gly Phe Leu
 210 215 220
 Val Ala Ala Glu Ile Lys Met Ile Pro Ala Lys Lys Tyr Ile Arg Leu
 225 230 235 240
 His Tyr Glu Pro Val Arg Gly Leu Arg Ser Ile Cys Glu Lys Phe Thr
 245 250 255
 Glu Glu Ser Lys Asn Lys Glu Asn Ser Phe Val Glu Gly Leu Val Tyr
 260 265 270
 Ser Leu Glu Glu Ala Val Ile Met Thr Gly Val Leu Thr Asp Glu Ala
 275 280 285
 Glu Pro Ser Lys Ile Asn Arg Ile Gly Asn Tyr Tyr Lys Pro Trp Phe
 290 295 300
 Phe Lys His Val Glu Lys Tyr Leu Lys Ala Asn Lys Thr Gly Ile Glu
 305 310 315 320
 Tyr Ile Pro Ser Arg His Tyr Tyr His Arg His Thr Arg Ser Ile Phe
 325 330 335
 Trp Glu Leu Gln Asp Ile Ile Pro Phe Gly Asn Asn Pro Val Phe Arg
 340 345 350
 Tyr Leu Phe Gly Trp Met Val Pro Pro Lys Ile Ser Leu Leu Lys Leu
 355 360 365
 Thr Gln Gly Glu Ala Ile Arg Lys Leu Tyr Glu Gln His His Val Val
 370 375 380
 Gln Asp Met Leu Val Pro Met Lys Ser Leu Glu Lys Ser Ile Gln Thr

385 390 395 400
Phe His Val Asp Leu Asn Val Tyr Pro Leu Trp Leu Cys Pro Phe Leu
 405 410 415
Leu Pro Asn Asn Pro Gly Met Val His Pro Lys Gly Asp Glu Thr Glu
 420 425 430
Leu Tyr Val Asp Ile Gly Ala Tyr Gly Glu Pro Lys Thr Lys Gln Phe
 435 440 445
Glu Ala Arg Ala Ser Met Arg Gln Met Glu Lys Phe Val Arg Ser Val
 450 455 460
His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Thr Arg Glu Glu
465 470 475 480
Phe Trp Asp Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Ser Leu Arg Glu Gln
 485 490 495
Met Asn Cys Lys Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile Cys Lys
 500 505 510
Ala Ala Arg His
 515

<210> 2

<211> 228

<212> PRT

<213> (人工序列)

<400> 2

Met Gly Ser Asp Ser Ile Leu Lys His Pro Tyr Phe Pro Arg Asp Leu
1 5 10 15
Ser Ile Pro His Tyr Lys Pro Asn Lys Val Ser Ile Gln Glu Leu Leu
 20 25 30
Gly Ile Phe Phe Ser Leu Val Leu Ile Val Phe Ile Ile Thr Trp Ile
 35 40 45
Tyr Ser Thr Lys Lys Lys Phe Ser Val Gly Tyr Arg Leu Leu Leu Cys

50 55 60
 Trp Phe Thr Ile Cys Gly Phe Ile His Thr Ile Leu Glu Gly Tyr Phe
 65 70 75 80
 Ala Phe Asn His Ser Thr Leu Ala Gly Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Glu
 85 90 95
 Met Trp Lys Glu Tyr Gly Lys Gly Asp Ser Arg Tyr Ile Thr Ser Asp
 100 105 110
 Thr Phe Thr Val Cys Met Glu Gly Ile Thr Ala Val Ile Asp Gly Pro
 115 120 125
 Leu Cys Phe Leu Thr Val Ala Ala Tyr Leu Thr Asn Ser Pro Tyr Arg
 130 135 140
 Tyr Val Leu Gln Leu Ile Val Ser Leu Cys Gln Leu Tyr Gly Asp Thr
 145 150 155 160
 Leu Tyr Leu Leu Ser Glu Val Lys Asp Asn Phe Ile His Ser Glu Leu
 165 170 175
 Tyr His Pro Leu His Phe Trp Phe Tyr Phe Leu Phe Leu Asn Ser Phe
 180 185 190
 Trp Ile Ile Val Pro Leu Ile Met Ile Cys His Ala Val Ser Lys Ile
 195 200 205
 Val Thr Ser Gln Gly Thr Ser Asp Phe Arg Phe Asn Asn Arg Asn Gln
 210 215 220
 Lys Lys Ser Arg
 225

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 3

caatttggat cttctacctc ttcccaa

<210> 4

<211> 210

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 4

ttcggccttc tcagagatag aaccttgaac aggccttgta tctggagtat aagggatttg	60
accagacacg tacacaaaat tgttggcctt catagcttgg gagtaagagg cggcagcggg	120
tggggccaac ttggtgctga ccgggggtcaa tgttgttata cccctcctca agactggagc	180
tgttctcaaa acggaatttc ttaaaaacat	210

权利要求书

1、一种利用区室化提高酵母菌中 7-脱氢胆固醇产量的方法，其特征在于，包括分别在酵母菌宿主的过氧化酶体和线粒体中，表达异源甾醇 Δ 24-还原酶和 Δ -胆甾烯醇酶，并分别使用过氧化酶体定位标签和线粒体定位标签将 7-脱氢胆固醇合成路径中的酶定位在过氧化酶体和线粒体中表达。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的甾醇 Δ 24-还原酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的 Δ -胆甾烯醇酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，7-脱氢胆固醇合成路径中的酶为羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 ERG13、甲羟戊酸激酶 ERG12、羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 HMG1、磷酸甲羟戊酸激酶 ERG8、二磷酸甲戊二酸酯脱羧酶 MVD1、异戊烯基二磷酸 δ -异构酶 IDI1、二磷酸法尼基转移酶 ERG9、角鲨烯单加氧酶 ERG1、羊毛甾醇合酶 ERG7、固醇 14 α -脱甲基酶 ERG11、 Δ 14-固醇还原酶 ERG24、甲基固醇单加氧酶 ERG25、固醇 4 α -羧酸酯 3-脱氢酶 ERG26、3-酮类固醇还原酶 ERG27、 Δ 7-甾醇 5-去饱和酶 ERG3、甾醇 Δ 24-还原酶 DHCR24 和 Δ -胆甾烯醇酶 EBP。

5、根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于，羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 ERG13 的 NCBI 编号为 XM_033912304.1、甲羟戊酸激酶 ERG12 的 NCBI 编号为 XM_033912620.1、羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 HMG1 的 NCBI 编号为 XM_033912352.1、磷酸甲羟戊酸激酶 ERG8 的 NCBI 编号为 NM_001182727.1、二磷酸甲戊二酸酯脱羧酶 MVD1 的 NCBI 编号为 NM_001183220.1、异戊烯基二磷酸 δ -异构酶 IDI1 的 NCBI 编号为 NM_001183931.1、二磷酸法尼基转移酶 ERG9 的 NCBI 编号为 NM_001179321.1、角鲨烯单加氧酶 ERG1 的 NCBI 编号为 NM_001181304.1、羊毛甾醇合酶 ERG7 的 NCBI 编号为 NM_001179202.2、固醇 14 α -脱甲基酶 ERG11 的 NCBI 编号为 NM_001179137.1、 Δ 14-固醇还原酶 ERG24 的 NCBI 编号为 NM_001183118.1、甲基固醇单加氧酶 ERG25 的 NCBI 编号为 NM_001181189.3、固醇 4 α -羧酸酯 3-脱氢酶 ERG26 的 NCBI 编号为 NM_001180866.1、3-酮类固醇还原酶 ERG27 的 NCBI 编号为 NM_001181987.1、 Δ 7-甾醇 5-去饱和酶 ERG3 的 NCBI 编号为 NM_001181943.1、甾醇 Δ 24-还原酶 DHCR24 的 NCBI 编号为 NM_001031288.1 和 Δ -胆甾烯醇酶 EBP 的 NCBI 编号为 KR709569.1。

6、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的过氧化酶体定位标签为过氧化酶体定位信号肽 PTS1，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

7、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的线粒体定位标签为线粒体定位信

号肽 MMF1，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

8、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的酵母菌宿主为酿酒酵母、毕赤酵母或热带假丝酵母。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述的酵母菌宿主为酿酒酵母 S288C。

10、一种酵母工程菌，其特征在于，所述的酵母工程菌分别在酵母菌宿主的过氧化酶体和线粒体中，表达异源甾醇 Δ 24-还原酶和 Δ -胆甾烯醇酶，并分别使用过氧化酶体定位标签和线粒体定位标签在过氧化酶体和线粒体中表达 7-脱氢胆固醇合成路径中的酶。

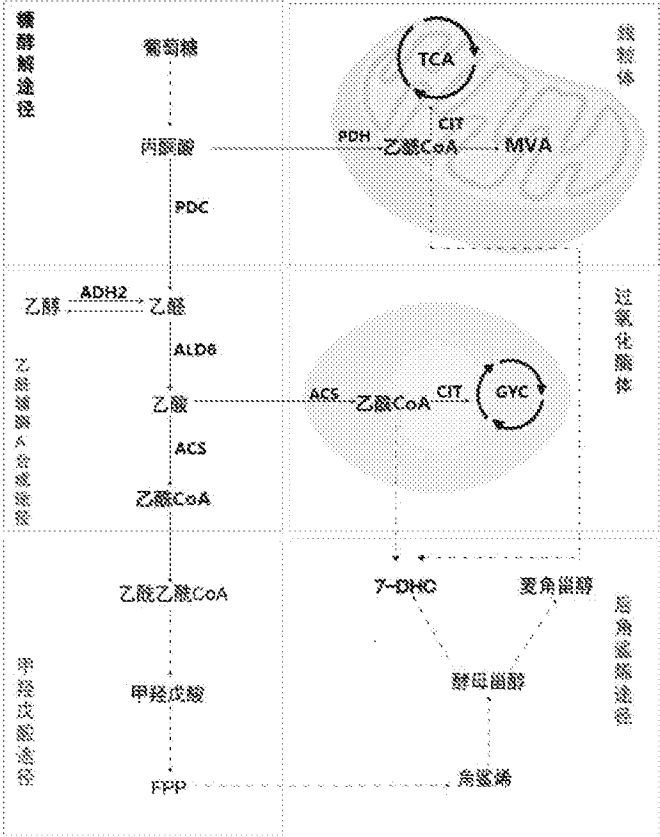


图 1

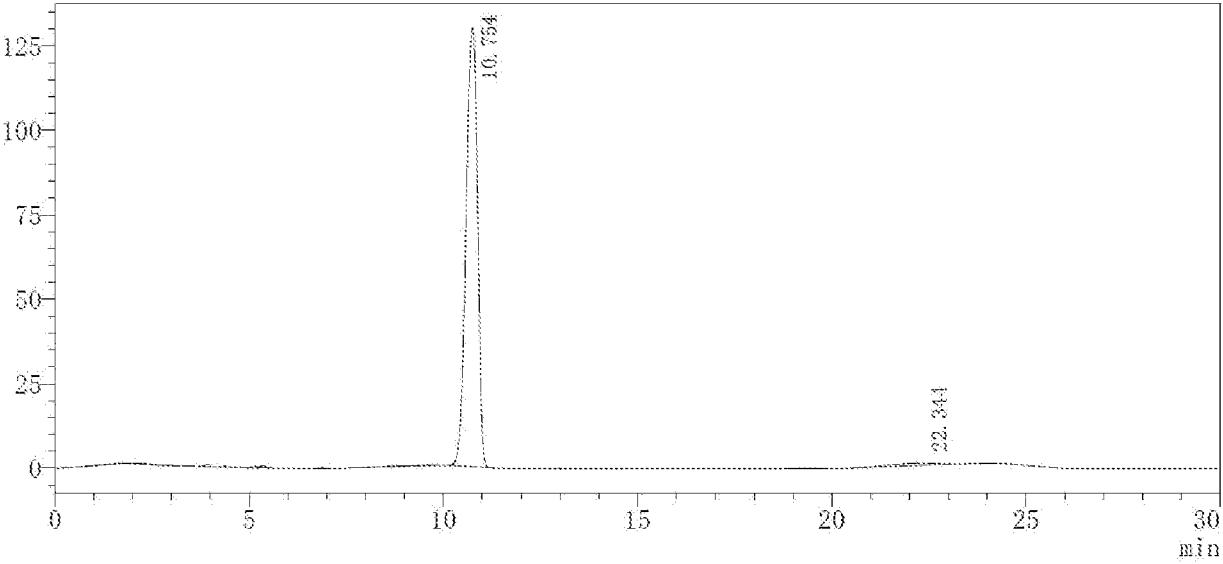


图 2

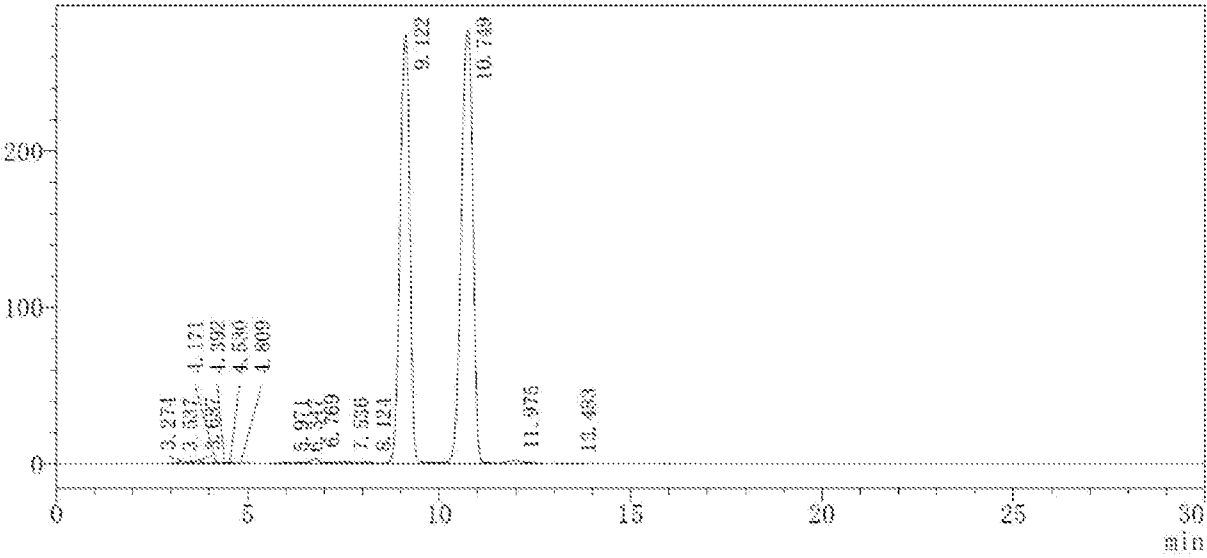


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/073487

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 33/02(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 15/61(2006.01)i

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)

C12P,C12N

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, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方, ISI Web of Science, BAIDU和检索词: 7-脱氢胆固醇, 7-DHC, 7-dehydrocholesterol, 细胞器, 酿酒酵母重组菌株, yeast, microzyme host, C22甾醇脱氢酶, ERG5, 甾醇C24甲基转移酶, ERG6, 甾醇C24位还原酶, 24-甾醇还原酶, delta(24)-sterol reductase, DHCR24, delta-24-reductas, 胆甾烯醇酶, delta-cholestenolase, cholestenol Delta-isomerase, 区室化, compartmentalization, 模块, 表达盒, 定位, 过氧化酶体, peroxisome, 线粒体, mitochondria等; GenBank, EMBL, China Patents Biological Sequence Search System and sequence searched: SEQ ID NOs: 1-4.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112813129 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 18 May 2021 (2021-05-18) entire document	1-10
A	BR 112020023316 A2 (DSM IP ASSETS BV) 02 February 2021 (2021-02-02) entire document	1-10
A	CN 106754993 A (TIANJIN UNIVERSITY) 31 May 2017 (2017-05-31) entire document	1-10
A	Caldwell RB et al. "NP_001026459.1" GENBANK, 25 June 2020 (2020-06-25), entire document	1-10
A	Alioto, T et al. "VDI01731.1" GENBANK, 10 October 2020 (2020-10-10), entire document	1-10



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

30 March 2022

Date of mailing of the international search report

18 April 2022

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/CN2022/073487

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/CN2022/073487

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112813129	A	18 May 2021	None			
BR	112020023316	A2	02 February 2021	EP	3797168	A1	31 March 2021
				JP	2021523691	A	09 September 2021
				WO	2019224189	A1	28 November 2019
				CN	112154213	A	29 December 2020
				EA	202092781	A1	12 February 2021
				US	2021222222	A1	22 July 2021
CN	106754993	A	31 May 2017	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/073487

A. 主题的分类

C12P 33/02(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 15/61(2006.01)i

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)

C12P, C12N

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, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方, ISI Web of Science, BAIDU和检索词: 7-脱氢胆固醇, 7-DHC, 7-dehydrocholesterol, 细胞器, 酿酒酵母重组菌株, yeast, microzyme host, C22甾醇脱氢酶, ERG5, 甾醇C24甲基转移酶, ERG6, 甾醇C24位还原酶, 24-甾醇还原酶, delta(24)-sterol reductase, DHCR24, delta-24-reductase, 胆甾醇酶, delta-cholesterolase, cholesterol Delta-isomerase, 区室化, compartmentalization, 模块, 表达盒, 定位, 过氧化酶体, peroxisome, 线粒体, mitochondria等; GenBank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NOs:1-4。

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	CN 112813129 A (江南大学) 2021年5月18日 (2021 - 05 - 18) 全文	1-10
A	BR 112020023316 A2 (DSM IP ASSETS BV) 2021年2月2日 (2021 - 02 - 02) 全文	1-10
A	CN 106754993 A (天津大学) 2017年5月31日 (2017 - 05 - 31) 全文	1-10
A	Caldwell RB等. "NP_001026459.1" GENBANK, 2020年6月25日 (2020 - 06 - 25), 全文	1-10
A	Alioto, T等. "VDI01731.1" GENBANK, 2020年10月10日 (2020 - 10 - 10), 全文	1-10

☐ 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

2022年3月30日

国际检索报告邮寄日期

2022年4月18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

王宗岳

电话号码 010-62411568

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/CN2022/073487

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	112813129	A	2021年5月18日	无	
BR	112020023316	A2	2021年2月2日	EP	3797168 A1 2021年3月31日
				JP	2021523691 A 2021年9月9日
				WO	2019224189 A1 2019年11月28日
				CN	112154213 A 2020年12月29日
				EA	202092781 A1 2021年2月12日
				US	2021222222 A1 2021年7月22日
CN	106754993	A	2017年5月31日	无	