

(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
2024年7月4日 (04.07.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/138928 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/77 (2006.01) *C12P 13/08* (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *C12R 1/15* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/084971

(22) 国际申请日: 2023年3月30日 (30.03.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202211706015.0 2022年12月29日 (29.12.2022) CN

(71) 申请人: 宁夏伊品生物科技股份有限公司
(NINGXIA EPPEN BIOTECH CO., LTD) [CN/CN]; 中国宁夏回族自治区银川市永宁县杨和工业园区, Ningxia 750199 (CN).

(72) 发明人: 周晓群 (ZHOU, Xiaoqun); 中国宁夏回族自治区银川市永宁县杨和工业园区, Ningxia 750199 (CN)。孟刚 (MENG, Gang); 中国宁夏回族自治区银川市永宁县杨和工业园区, Ningxia 750199 (CN)。魏爱英 (WEI, Aiyang); 中国宁夏回族自治区银川市永宁县杨和工业园区, Ningxia 750199 (CN)。赵春光 (ZHAO, Chunguang); 中国宁夏回族自治区银川市永宁县杨和工业园区, Ningxia 750199 (CN)。马凤勇 (MA, Fengyong); 中国宁夏回族自治区银川市永宁县杨和工业园区, Ningxia 750199 (CN)。张英 (ZHANG, Ying); 中国宁夏回族自治区银川市永宁县杨和工业园区, Ningxia 750199 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路9号国投财富广场5号楼15A, Beijing 100055 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: GALACTOSE-1-PHOSPHATE URIDYLTRANSFERASE MUTANT AND USE THEREOF IN PREPARATION OF L-LYSINE

(54) 发明名称: 半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶突变体及其在制备L-赖氨酸中的应用

(57) Abstract: Provided are a galactose-1-phosphate uridylyltransferase mutant and the use thereof in the preparation of L-lysine. The galactose-1-phosphate uridylyltransferase is A1) or A2): A1) a protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID No. 2; and A2) a fusion protein obtained by linking a tag to the N-terminal or/and the C-terminal of A1). Terminating or knocking out encoding genes of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase in advance can improve the yield of L-lysine in cells.

(57) 摘要: 提供了一种半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶突变体及其在制备L-赖氨酸中的应用。该半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶为如下A1)或A2): A1)如SEQ ID No.2所示氨基酸序列的蛋白质; A2)在A1)的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质。将该半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶的编码基因提前终止或敲除后可以提高细胞中的L-赖氨酸产量。



WO 2024/138928 A1

半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶突变体及其在制备 L-赖氨酸中的应用

技术领域

5 本发明涉及生物技术领域中，半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶突变体及其在制备 L-赖氨酸中的应用。

背景技术

10 L-赖氨酸具有促进发育、增强免疫力和提高中枢神经组织功能等生理功效，是人体和动物不能自身合成且生长必需的 8 种基本氨基酸之一。目前，L-赖氨酸是世界上的第二大氨基酸品种，主要生产方法是发酵法，其中谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 等是赖氨酸的重要生产菌株。L-赖氨酸工业产量的约 90% 用作饲料工业中的营养强化剂，10% 用作食品工业中的鲜味剂和甜味剂，以及医药行业中的药物中间体。

15 目前 L-赖氨酸主要采用直接发酵法生产，直接发酵法利用具备完整 L-赖氨酸生物合成途径的菌株，以废糖蜜、淀粉水解液等为底物，通过好氧发酵生产。目前国内外 L-赖氨酸发酵菌株主要是谷氨酸棒杆菌突变菌株，影响其产量的主要因素在于生产菌，提高 L-赖氨酸生产菌株的生产能力是当前研究的重点。

发明公开

本发明所要解决的技术问题是如何制备 L-赖氨酸。

20 为解决上述技术问题，本发明首先提供了敲除蛋白质编码基因或抑制所述蛋白质含量或活性的物质在制备 L-赖氨酸中的应用；

所述蛋白质为如下 A1) 或 A2)：

A1) 氨基酸序列是 SEQ ID No. 2 的蛋白质；

A2) 在 A1) 的 N 端或/和 C 端连接标签得到的融合蛋白质。

上述应用中，所述编码基因可为如下 b1) 或 b2) 或 b3)：

25 b1) 序列表中 SEQ ID No. 1 所示的 DNA 分子；

b2) 与 b1) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性，且编码所述蛋白质的 DNA 分子；

b3) 在严格条件下与 b1) 或 b2) 限定的核苷酸序列杂交，且编码所述蛋白质的 DNA 分子。

30 这里使用的术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”包括与本发明的编码 SEQ ID No. 1 所示的氨基酸序列组成的蛋白质的核苷酸序列具有 75% 或更高，或 85% 或更高，或 90% 或更高，或 95% 或更高同一性的核苷酸序列。同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件，两个或多个序列之间的同一性可以用百分比 (%) 表示，其可以用来评价相关序列之间的同一性。

35 所述严格条件可为如下：50℃，在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄ 和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交，在 50℃，2×SSC，0.1% SDS 中漂洗；还可为：

50°C, 在 7% SDS、0.5M NaPO₄和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交, 在 50°C, 1×SSC, 0.1% SDS 中漂洗; 还可为: 50°C, 在 7% SDS、0.5M NaPO₄和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交, 在 50°C, 0.5 ×SSC, 0.1% SDS 中漂洗; 还可为: 50°C, 在 7% SDS、0.5M NaPO₄和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交, 在 50°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS 中漂洗; 还可为: 50°C, 在 7% SDS、0.5M NaPO₄和 1mM EDTA 的混合溶液中杂交, 在 65°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS 中漂洗; 也可为: 在 6×SSC, 0.5% SDS 的溶液中, 在 65°C 下杂交, 然后用 2×SSC, 0.1% SDS 和 1×SSC, 0.1% SDS 各洗膜一次; 也可为: 2×SSC, 0.1% SDS 的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜 2 次, 每次 5min, 又于 0.5×SSC, 0.1% SDS 的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜 2 次, 每次 15min; 也可为: 0.1×SSPE (或 0.1×SSC)、0.1% SDS 的溶液中, 65°C 条件下杂交并洗膜。

上述 75%或 75%以上同一性, 可为 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性。

15 上述应用中, 所述物质可为 B1) 或 B2) :

B1) 降低所述蛋白质表达量的核酸分子;

B2) 含有 B1) 所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组微生物或转基因细胞系。

20 B1) 所述核酸分子可以是 DNA, 如 cDNA、基因组 DNA 或重组 DNA; 所述核酸分子也可以是 RNA, 如 gRNA、mRNA、siRNA、shRNA、sgRNA、miRNA 或反义 RNA。

B2) 所述的表达盒是指能够在宿主细胞中表达所述基因的 DNA, 该 DNA 不但可包括启动基因转录的启动子, 还可包括终止基因转录的终止子。进一步, 所述表达盒还可包括增强子序列。

可用植物表达载体构建含有所述基因表达盒的重组载体。

25 上述应用中, 所述物质可为将 SEQ ID No. 2 的第 414 位谷氨酸残基密码子突变为终止子的物质;

或, 所述物质可为将 SEQ ID No. 1 第 1240 位鸟嘌呤核苷酸突变为胸腺嘧啶核苷酸的物质。

30 本发明还提供了一种制备 L-赖氨酸的方法, 所述方法包括: 降低受体生物细胞中所述蛋白质的含量或活性, 或敲除受体生物细胞中所述蛋白质的编码基因, 得到重组生物细胞; 培养所述重组生物细胞, 得到 L-赖氨酸。

所述生物细胞含有所述蛋白质的编码基因。

上文中, 所述敲除受体生物细胞中所述蛋白质的编码基因可通过基因敲除或基因沉默等方法实现。

35 上文中, 所述基因敲除基因是指: 敲除 (knockout) 是用含有一定已知序列的 DNA 片段与受体细胞基因组中序列相同或相近的基因发生同源重组, 整合至受体细胞基因组中并得到表达的一种外源 DNA 导入技术, 它可改变生物的遗

传基因，令特定的基因功能丧失作用，从而使部分功能被屏蔽。

上文中，基因沉默是指：基因沉默(Gene Silencing), 又称为基因沉寂，是真核生物细胞基因表达调节过程中的一种特殊生理现象，是指细胞基因在表达过程中受到各种因素的综合作用而导致基因部分区段发生“沉寂”现象，从而失去转录活性并不予表达或表达减少。

上述方法中，所述生物细胞可为能合成 L-赖氨酸的酵母、细菌、藻、真菌、植物细胞或动物细胞。

上述方法中，所述细菌可为谷氨酸棒杆菌，如谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) YP097158。

本发明的细菌包括但不限于谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)，任何含有序列表中 SEQ ID No. 1 所示基因均可对其突变或敲除来生产 L-赖氨酸，如细菌可为谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)，大肠杆菌 (*Escherichia coli*)，菠萝泛菌 (*Pantoea ananatis*)，短杆菌 (*Bacillus brevis*) 或乳酸短杆菌 (*Brevis lactobacillus*)。

上述方法可通过将所述受体生物细胞中 SEQ ID No. 2 的第 414 位谷氨酸残基密码子突变为终止子，或将 SEQ ID No. 1 第 1240 位鸟嘌呤核苷酸突变为胸腺嘧啶核苷酸，或敲除 SEQ ID No. 1 所示的基因实现。

上述方法中，培养所述重组生物细胞可采用能使所述重组生物细胞生长的培养基进行；

和/或，培养所述重组生物细胞采用能使所述重组生物细胞生长的条件进行。

所述重组生物细胞可以用于生产多种产物，包括但不限于实施例中的赖氨酸，所生产的产物还可为谷氨酸，缬氨酸，甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、精氨酸、组氨酸、莽草酸、原儿茶酸、丁二酸、a 酮戊二酸、柠檬酸、鸟氨酸，瓜氨酸等。

本发明还提供了一种生物材料，其为如下 b1) 或 b2) 或 b3) 或 b4) 或 b5)：

b1) 编码氨基酸序列是 SEQ ID No. 6 所示蛋白质的 DNA 分子；

b2) 与 b1) 限定的 DNA 分子序列具有 75% 或 75% 以上同一性，且编码 SEQ ID No. 6 所示蛋白质的 DNA 分子；

b3) 在严格条件下与 b1) 或 b2) 限定的核苷酸序列杂交，且编码 SEQ ID No. 6 所示蛋白质的 DNA 分子；

b4) 含有 b1) 或 b2) 或 b3) 所述 DNA 分子的表达盒、重组载体、重组微生物或转基因细胞系；

b5) 所述重组生物细胞。

所述细胞系可包括繁殖材料，也可不包括繁殖材料。

本发明还提供了一种用于制备 L-赖氨酸的产品，所述产品含有（或其活性

成分) 含有所述物质或所述生物材料。

生物材料保藏说明

分类命名: 谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)

菌株编号: YP097158

5 保藏单位名称: 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

保藏单位简称: CGMCC

保藏单位地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 邮政编码: 100101

保藏日期: 2016 年 8 月 16 日

保藏中心登记入册编号: CGMCC No. 12856

10 实施发明的最佳方式

下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述, 给出的实施例仅为了阐明本发明, 而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南, 并不以任何方式构成对本发明的限制。

15 下述实施例中的实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法, 按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中所用的材料、试剂、仪器等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。以下实施例中的定量试验, 均设置三次重复实验, 结果取平均值。下述实施例中, 如无特殊说明, 序列表中各核苷酸序列的第 1 位均为相应 DNA/RNA 的 5' 末端核苷酸, 末位均为相应
20 DNA/RNA 的 3' 末端核苷酸。

下述实施例采用 SPSS11.5 统计软件对数据进行处理, 采用 One-way ANOVA 检验。

实施例 1、构建并筛选半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶 NCg12002 基因对 L-赖氨酸合成有利的突变型

25 一、半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶 NCg12002 突变型质粒的构建

首先将野生型 NCg12002 基因 (序列如 SEQ ID No. 1) 及其启动子序列克隆到表达载体 pXMJ19 中。以 NCBI 公布的谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 基因组序列为模板, 分别以引物 pXMJ19-PF、pXMJ19-PR 进行 PCR 扩增, 获得野生型 NCg12002 基因及其启动子序列 (序列如 SEQ ID
30 No. 3)。回收后经 *Bam*HI/*Eco*RI 酶切回收的表达载体 pXMJ19 (TaKaRa 公司, 含有氯霉素抗性) 用 NEBuilder 酶 (NEB 公司) 50°C 连接 30 min, 连接产物转化 DH5 α , 涂布到含有氯霉素 (34mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 37°C 培养, 获得含 NCg12002 基因及其启动子序列的 pXMJ19 转化子 pXMJ19-NCg12002 (序列如 SEQ ID
No. 3)。对培养长出的单克隆用引物 M13R (-48) /P1 和 r Taq PCR 鉴定, PCR
35 扩增出含有大小 1465bp (序列如 SEQ ID No. 4) 片段的为含 NCg12002 基因及其启动子序列的 pXMJ19 阳性转化子 pXMJ19-NCg12002。

SEQ ID No. 3 中, 第 42-113 位为其启动子序列。

为了获得编码半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶基因 NCg12002 的突变体，使用随机诱变试剂盒 (Agilent Technologies, USA) 制备了 NCg12002 突变型基因质粒。以质粒 pXMJ19-NCg12002 为模板，分别以引物 pXMJ19-PF/pXMJ19-PR 进行 PCR 扩增，获得了包含随机点突变的 NCg12002 基因片段 1441bp，含 NCg12002 基因的 pXMJ19 阳性转化子即 pXMJ19-NCg12002-MT (序列如 SEQ ID No. 3, 但 NCg12002 编码区存在随机点突变)。

回收的 DNA 片段与经 *BamH* I/*EcoRI* 酶切回收的表达载体 pXMJ19 (TaKaRa 公司, 含有氯霉素抗性) 用 NEBuilder 酶 (NEB 公司) 50°C 连接 30 min, 连接产物转化 DH5 α , 涂布到含有氯霉素 (34mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 37°C 培养。对培养长出的单克隆用引物 M13R (-48) /P1 和 r Taq PCR 鉴定, PCR 扩增出含有大小 1465bp (序列如 SEQ ID No. 4, 但 NCg12002 编码区存在随机点突变) 片段的为含 NCg12002 随机突变的 pXMJ19 阳性转化子。

引物设计如下 (上海 invitrogen 公司合成):

pXMJ19-PF:

15 5' -AATTAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCaacaccacagtagacaatagccttg-3' (带下划线的核苷酸序列为 pXMJ19 同源臂序列) (SEQ ID No. 9),

pXMJ19-PR:

5' -GAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGAATTCttataggaggggattgtattttaagg-3' (带下划线的核苷酸序列为 pXMJ19 同源臂序列) (SEQ ID No. 10)。

20 M13R (-48): 5' -AGCGGATAACAATTTACACAGGA -3' (SEQ ID No. 11);

P1: 5' -CTCTCATCCGCCAAAACAG -3' (SEQ ID No. 12)。

二、半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶 NCg12002 基因对 L-赖氨酸合成有利的突变型筛选

为了鉴定步骤一中构建的突变载体 L-赖氨酸生产性能, 具体地, 将步骤一中构建的 NCg12002 随机突变质粒分别电转化到谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) YP097158 (保藏编号: CGMCC No. 12856, 保藏日期: 2016 年 8 月 16 日, 保藏单位: 中国科学院微生物研究所, 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 电话: 010-64807355) 中, 在含氯霉素 (34mg/L) 的培养基中进行培养, 培养基成分和培养条件参见表 1, 对培养长出的单克隆用引物 M13R (-48) /P1 和 r Taq PCR 鉴定, PCR 扩增出含有大小 1465bp (序列如 SEQ ID No. 4, 但 NCg12002 编码区存在随机点突变) 片段的为含 NCg12002 随机突变的 pXMJ19 阳性转化子。

将阳性转化子在含氯霉素 (34mg/L) 的培养基中进行培养, 培养基成分和培养条件参见表 1, 并连续传代三次后, 接种到装有丰富培养基 30mL 的 500mL 三角瓶中 37°C 摇瓶发酵 24h, 发酵培养菌体长至 OD₆₀₀=0.1 时加入终浓度 0.1 mM 的 IPTG 以诱导 NCg12002 蛋白过表达。

发酵培养结束后采用高效液相色谱法 (HPLC) 分析 L-氨基酸的浓度, 如表 2 所示。挑选具有比谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) YP097158 对照的各 L-氨基酸生产能力优越的菌株, 即为 YP097158- pXMJ19-NCg12002 突变株。

- 5 丰富培养基: 溶剂是水, 溶质及其浓度为葡萄糖 30g/L, (NH₄)₂SO₄ 2g/L, H₃PO₄ 0.5g/L, KCl 0.8g/L, MgSO₄·7H₂O 0.8g/L, FeSO₄·7H₂O 0.05g/L, MnSO₄·H₂O 0.05g/L, FM902 酵母粉 1.5g/L, 玉米浆 5g/L, 糖蜜 17g/L, 甜菜碱 0.5g/L, 柠檬酸 2g/L, VH 20mg/L, VB₁ 1.5mg/L, VB₃ 1.5mg/L VB₁₂ 1.5g/L, 氢氧化钠调节 pH7.0。

10

表 1、培养基的组成和培养条件

	成分	含量
培养基	蔗糖	10 g/L
	多聚蛋白胨	10 g/L
	牛肉膏	10 g/L
	酵母粉	5 g/L
	尿素	2 g/L
	氯化钠	2.5 g/L
	琼脂粉	20 g/L
	水	
	pH7.0	
培养条件	培养温度: 32 °C	
	培养时间: 40h	

表 2、YP097158- NCg12002 突变株的高效液相色谱法 L-氨基酸分析结果

L-氨基酸名称	L-氨基酸含量 (g/100mL)					
	YP097158	YP097158- NCg12002 突变株 1	YP097158- NCg12002 突变株 2	YP097158- NCg12002 突变株 3	YP097158- NCg12002 突变株 4	YP097158- NCg12002 突变株 5
L-天门冬氨酸	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
L-谷氨酸	0.015	0.027	0.017	0.023	0.013	0.031
L-丝氨酸	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
L-精氨酸	0.004	0.001	0.001	0.007	0.014	0.021
L-甘氨酸	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
L-苏氨酸	0.004	未检出	0.001	未检出	0.001	未检出

L-赖氨酸	19.3	18.2	18.5	19.2	18.1	18.3
L-脯氨酸	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
L-丙氨酸	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
L-缬氨酸	0.002	0.005	未检出	0.002	未检出	未检出
L-蛋氨酸	0.001	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
L-半胱氨酸	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
L-异亮氨酸	0.001	未检出	0.001	未检出	未检出	未检出
L-亮氨酸	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
L-苯丙氨酸	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
L-酪氨酸	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

如表 2 中所示，谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）YP097158-NCg12002 突变株中，YP097158-NCg12002 突变株 3 能够维持 L-赖氨酸的生产能力，其余均会使 L-赖氨酸的生产能力降低。表明该基因起到抑制 L-赖氨酸生产的作用，NCg12002 突变株 3 可能使该基因失活，从而维持了合成 L-赖氨酸的能力。

通过从谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）YP097158 突变株 3 提取质粒对 NCg12002 基因进行测序的结果，确认了 NCg12002 突变位点为该基因编码区第 1240 位鸟嘌呤（G）突变为胸腺嘧啶（T）（将含有该突变的基因记为 NCg12002^{G1240T} 基因），其突变型蛋白质 NCg12002 氨基酸序列中的第 414 位谷氨酸（E）突变为终止子（*）（将含有该突变的蛋白质记为 NCg12002^{G1240T} 蛋白质），此质粒即为 pXMJ19-E414*（序列如 SEQ ID No. 3 所示，该序列中第 1353 位突变为 T。）其中，SEQ ID No. 1 所示的 DNA 序列为野生型 NCg12002 基因，编码蛋白质氨基酸序列为 SEQ ID No. 2（所述蛋白质名称为野生型 NCg12002 蛋白质）；SEQ ID No. 5 所示的 DNA 序列为突变型 NCg12002^{G1240T} 基因，所述突变型 NCg12002^{G1240T} 基因序列（SEQ ID No. 5）中第 1240 位胸腺嘧啶（T）由鸟嘌呤（G）突变而来，编码蛋白质氨基酸序列为 SEQ ID No. 6（所述突变蛋白质名称为突变型 NCg12002^{E414*} 蛋白质），所述突变型蛋白质 NCg12002^{E414*} 氨基酸序列（SEQ ID No. 6）中的第 414 位终止子（*）由谷氨酸（E）突变而来。

20

实施例 2、构建基因组中包含 NCg12002 基因突变型工程菌株

依据谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）YP097158 或野生型

谷氨酸棒状杆菌菌株 ATCC13032 基因组序列，以等位基因置换的方式在高产菌株中更深入研究 NCg12002 基因及突变型 NCg12002^{E414*} 基因对 L-赖氨酸产量的影响。

在 NCg12002 基因编码区 (SEQ ID No. 1) 中引入点突变，所述点突变为将
5 NCg12002 基因的核苷酸序列 (SEQ ID No. 1) 中的第 1240 位鸟嘌呤 (G) 突变为胸腺嘧啶 (T) 得到 SEQ ID No. 5 所示的 DNA 分子 (突变型 NCg12002 基因，名称为突变型 NCg12002^{E414*} 基因)。

其中，SEQ ID No. 1 所示的 DNA 分子编码蛋白质氨基酸序列为 SEQ ID No. 2 (所述蛋白质名称为野生型 NCg12002 蛋白质)。SEQ ID No. 5 所示的 DNA 分子
10 编码蛋白质氨基酸序列为 SEQ ID No. 6 (所述突变蛋白质名称为突变型 NCg12002^{E414*} 蛋白质)，所述突变型蛋白质 NCg12002^{E414*} 氨基酸序列 (SEQ ID No. 6) 中的第 414 位谷氨酸 (E) 突变为终止子 (*)。

一、构建基因突变型 NCg12002^{E414*} 基因编码区的重组载体

以谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) YP097158 或野生型谷
15 氨酸棒状杆菌菌株 ATCC13032 基因组 DNA 为模板，分别以引物 P2/P3, P4/P5 和 KAPA HiFi HotStart 进行 PCR 扩增，获得两条分别带有突变碱基大小分别为 525bp 和 533bp 的 NCg12002^{E414*} DNA 片段 (NCg12002^{E414*}Up 和 NCg12002^{E414*}Down)。PCR 反应结束后，采用柱式 DNA 凝胶回收试剂盒分别进行琼脂糖凝胶电泳回收 NCg12002^{E414*}Up 和 NCg12002^{E414*}Down。回收后的 DNA 以引物 P2/P5overlap PCR 获
20 得点突变整合同源臂 DNA 片段 Up-NCg12002^{E414*}-Down (SEQ ID No. 7) 1022bp。

引物设计如下 (上海 invitrogen 公司合成)：

P2:

5' -CAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG GAACTGCATCATCTACGTGG-3'，(带
下划线的核苷酸序列为 pK18 上的序列) (SEQ ID No. 13)，

25 P3: 5' -GCGTTCAACG GAGCATTACA TGGCGATGCG-3' (SEQ ID No. 14)，

P4: 5' -GATCTGCGCATCGCCATGTAATGCTCCGTTG-3' (SEQ ID No. 15)，

P5:

5' -CAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCC GCACCAAGCAGCGCGGTGAC-3'，(带
下划线的核苷酸序列为 pK18 上的序列) (SEQ ID No. 16)。

30 将上述经 overlap PCR 获得的点突变整合同源臂 DNA 片段 (Up-NCg12002^{E414*}-Down) 经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后，与经过酶切 (*Xba*I 与 *Bam*H I) 后纯化的 pK18mobsacB 质粒 (Addgene 公司) 用 NEBuilder 酶 (NEB 公司) 50 °C 连接 30 min，连接产物转化大肠杆菌 DH5a 后长出的单克隆用引物 M13F/M13R (M13F: 5' -TGTAACGACGGCCAGT-3' (SEQ ID No. 17)，M13R:
35 5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3' (SEQ ID No. 18)) 经 PCR 鉴定后，提取质粒获得序列正确的阳性重组载体记为 pK18-NCg12002^{E414*}，该重组载体上含有卡那霉素抗性标记。

此重组载体 pK18-NCg12002^{G1240T} 中 NCg12002^{G1240T}Up-Down DNA 大小 1022bp (SEQ ID No. 7)，含有突变位点 (G-T)，将导致菌株谷氨酸棒状杆菌 YP097158 和野生型谷氨酸棒状杆菌菌株 ATCC13032 中 NCg12002 基因编码区的第 1240 位鸟嘌呤 (G) 突变为胸腺嘧啶 (T)，最终导致编码蛋白的第 414 位谷氨酸 (E) 变为终止子 (*)。

重组载体 pK18-NCg12002^{G1240T} 是将 pK18mobsacB 载体的 *Xba*I 和 *Bam*H I 识别位点间的片段 (小片段) 替换为序列表中 SEQ ID No. 7 所示的 DNA 片段，保持 pK18mobsacB 载体的其他序列不变得到的重组载体。重组载体 pK18-NCg12002^{G1240T} 含有 SEQ ID No. 5 所示的突变基因 NCg12002^{G1240T} 的突变位点 (G-T)。

二、构建基因组中包含 NCg12002^{G1240T} 的工程菌株

将上述等位替换质粒 (pK18-NCg12002^{G1240T}) 通过电击转化入 L-赖氨酸生产菌谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) YP097158 和野生型谷氨酸棒状杆菌菌株 ATCC13032 (转化方法同上) 中，在含卡那霉素的固体培养平板上进行培养 (培养基成分和培养条件参见表 1)。对培养产生的单菌落分别通过上述引物 P2 和通用引物 M13R 进行鉴定，能扩增出 1070bp 大小条带的菌株为阳性菌株。将阳性菌株在含 15% 蔗糖的培养基 (该培养基是将表 1 中的培养基中蔗糖的浓度提高至 15 g/L 得到的培养基) 上培养，对培养产生的单菌落分别在含有卡那霉素和不含卡那霉素的培养基上培养，选择在不含卡那霉素的培养基上生长，而在含卡那霉素的培养基上不生长的菌株进一步采用如下引物 (上海 invitrogen 公司合成) 进行 PCR 扩增：

P6: 5' -CTACCCTGGCAGGTTTTGAAG-3' (SEQ ID No. 19)；

P7: 5' - GAAGTTCTGA AATGCGGCTC-3' (SEQ ID No. 20)。

将得到的 DNA 片段 (256 bp) 处理 (95 °C 高温变性 10 min、迅速冰浴 5 min) 后进行 SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphis) 电泳 (以质粒 pK18-NCg12002^{G1240T} 扩增片段为阳性对照，谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 扩增片段为阴性对照，水作为空白对照)，SSCP 电泳的 PAGE 的制备及电泳条件参见表 3。由于片段结构不同，电泳位置不同，因此片段电泳位置与阴性对照片段位置不一致且与阳性对照片段位置一致的菌株为等位替换成功的菌株。再次通过引物 P6/P7 PCR 扩增阳性菌株 NCg12002^{G1240T} 基因片段，并连接到 PMD19-T 载体上进行测序，通过序列比对，碱基序列发生突变 (G-T) 的菌株为等位替换成功的阳性菌株，将由谷氨酸棒状杆菌 YP097158 及野生型谷氨酸棒状杆菌菌株 ATCC13032 得到的阳性菌株命名为 YPL-NCg12002-1，L2002-1。

重组菌 YPL-NCg12002-1 和 L2002-1 均含有 SEQ ID No. 5 所示的突变的基因 NCg12002^{G1240T}，并能表达 SEQ ID No. 6 所示的蛋白质。重组菌 YPL-NCg12002-1 与谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) YP097158 的区别仅在于：YPL-NCg12002-1 为将谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) YP097158

的 NCg12002 基因替换为 NCg12002^{G1240T} 基因，并保持其他序列不变得到的菌株，重组菌 L2002-1 与 ATCC13032 的区别仅在于：L2002-1 为将 ATCC13032 的 NCg12002 基因替换为 NCg12002^{G1240T} 基因，并保持其他序列不变得到的菌株。

表 3、SSCP 电泳的 PAGE 的制备及电泳条件

	成分	用量（丙烯酰胺终浓度为8%）
PAGE	40%丙烯酰胺	8 mL
	ddH ₂ O	26 mL
	甘油	4 mL
	10×TBE	2 mL
	TEMED	40 μL
	10%APS	600 μL
电泳条件	将电泳槽置入冰中，使用1×TBE缓冲液，电压120 V，电泳时间10 h	

5

实施例 3、构建基因组上缺失 NCg12002 基因的工程菌株

根据 NCBI 公布的谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 的基因组序列，合成两对扩增 NCg12002 基因编码区两端片段的引物，作为上下游同源臂片段。引物设计如下（上海 invitrogen 公司合成）：

10

P8

:

5' - CAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGCGTGATGCAGGCCGAAGGATC-3' （带下划线的核苷酸序列为pK18上的序列）（SEQ ID No. 21），

P9：5' - GCGACACTAAAACCTTTGGCGGTGCGAATGGGGGTGACAG-3' （SEQ ID No. 22），

15

P10：5' - CTGTCACCCCATTCGCACCGCCAAGAGTTTTAGTGTCGC-3' （SEQ ID No. 23），

P11

:

5' - CAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGAGTTTTCTCCGATGGCTG-3' （带下划线的核苷酸序列为pK18上的序列）（SEQ ID No. 24）。

20

构建方法：以谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 为模板，分别以引物 P8/P9 和 P10/P11 进行 PCR 扩增，获得敲除 NCg12002 的上游同源臂片段 571 bp 及下游同源臂片段 566 bp。对扩增的产物进行电泳并采用柱式 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化，回收的 DNA 片段与经过 *Xba*I/*Bam*H I 酶切后纯化的 pK18mobsacB 质粒（Addgene 公司）用 NEBuilder 酶（NEB 公司）50 °C 连接 30 min，连接产物转化后长出的单克隆用 M13 引物经 PCR 鉴定获得阳性敲除载体 pK18-ΔNCg12002，该质粒含有整个敲除 NCg12002 同源臂片段 1097bp（序列如 SEQ ID No. 8 所示）和卡那霉素抗性作为筛选标记，将该质粒送测序。

25

将测序正确的敲除质粒 pK18-ΔNCg12002 电转化入谷氨酸棒状杆菌

YP097158 和野生型谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中，在培养基中进行培养，培养基成分和培养条件参见表 1，对培养产生的单菌落通过引物 P8/P11 进行 PCR 鉴定：同时扩增出大小 1097 bp 及 2384bp 的条带的菌株为阳性菌株，只扩增出 2384bp 条带的菌株为原菌。将阳性菌株在 15%蔗糖固体培养基上筛选后分别在含有卡那霉素和不含卡那霉素的培养基上培养，选择在不含卡那霉素的培养基上生长，而在含卡那霉素的培养基上不生长的菌株进一步采用引物 P8/P11 进行 PCR 鉴定，扩增出大小为 1097 bp 条带的菌株为 NCg12002 基因编码区被敲除的阳性菌株。再次通过 P8/P11 引物 PCR 扩增阳性菌株 NCg12002 片段，并连接到 pMD19-T 载体进行测序，将测序正确的菌株命名为 YPL-NCg12002-2（谷氨酸棒状杆菌 YP097158 基因组上的 NCg12002 基因被敲除）和 L2002-2（野生型谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 基因组上的 NCg12002 基因被敲除）。

实施例 4、L-赖氨酸发酵实验

将实施例 2、3 构建的菌株和谷氨酸棒状杆菌原始菌株 YP097158 和 ATCC13032 在 BLBIO-5GC-4-H 型号的发醇罐（上海百仑生物科技有限公司）中以表 4 所示的培养基和表 5 所示的控制工艺进行发酵实验，发酵结束采用茚三酮比色法检测 L-赖氨酸产量。每个菌株重复三次，结果如表 6 所示。

表 4、发酵培养基配方

成分	配方
淀粉水解糖	30g/L
硫酸铵	12g/L
硫酸镁	0.87g/L
糖蜜	20g/L
酸化玉米浆	3mL/L
磷酸	0.4mL/L
氯化钾	0.53g/L
消泡剂(2%泡敌)	4mL/L
硫酸亚铁	120mg/L
硫酸锰	120mg/L
烟酰胺	42mg/L
泛酸钙	6.3mg/L
维生素B1	6.3mg/L
铜、锌盐溶液	0.6g/L
生物素	0.88mg/L

表 5、发酵控制工艺

校正D0100%	温度37℃、风量4L/min、转速1000rpm、罐压0mpa, 5min后标定		
接种量	10%	培养温度℃	37℃
pH	pH6.9±0.0 5	溶氧D0	10-30%
初始条件	温度37℃、pH6.9、罐压0Mpa、风量3L/min、转速550rpm		
全程控制	全程控制 1、溶氧<30%时, 依次提转速750rpm→800rpm→风量4L/min→850rpm→950rpm; 2、发酵6h提罐压0.01Mpa; 12h提罐压0.02Mpa→0.03Mpa→0.04Mpa→0.05Mpa		
残糖控制	F12h前0.1-0.2%; F12h后结合D0要求控制残糖0.1-0.05%		
氨氮控制	F12h前0.1-0.15; F12-F32h0.15-0.25; F32h后0.1-0.15		
流加物料	25%氨水、70%浓糖、50%硫酸、10%泡敌		
发酵周期	48h左右		

表6、NCg12002工程菌株的L-赖氨酸产量

菌株	L-赖氨酸浓度 (g/100ml)			平均值	P 值
YP097158	19.2	18.9	19.3	19.133	
YPL-NCg12002-1	19.8	19.5	19.6	19.633	P<0.05
YPL-NCg12002-2	19.7	19.9	19.6	19.733	P<0.05
ATCC13032	0.3	0.5	0.2	0.333	
L2002-1	0.6	0.8	0.7	0.700	P<0.05
L2002-2	0.8	1.1	0.7	0.867	P<0.05

结果如表 6 所示, 在谷氨酸棒状杆菌中对 NCg12002 基因编码区进行点突变
5 NCg12002^{G1240T} 及敲除, 有助于 L-赖氨酸产量及生长速率的提高。

以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说, 在不脱离本发明的宗旨和范围, 以及无需进行不必要的实验情况下, 可在等同参数、浓度和条件下, 在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例, 应该理解为, 可以
10 对本发明作进一步的改进。总之, 按本发明的原理, 本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进, 包括脱离了本申请中已公开范围, 而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围, 可以进行一些基本特征的应用。

以上实施例涉及的序列 1-8 如下:

SEQ ID No. 1: NCg12002 基因野生型 ORF (CDS) 序列 (核苷酸序列 1287 bp)
15 ATGGCTGACGGCACGATCAAACAGATTCACCCCTTTCACAGGCACCGAAGTGTGGACGGTCCCTGGGCG
TGGAAATCGACCTCTGTACATCCCGCTTCTACGATCGTCAACTATCTGCACACGATCACACCTCTT
ACTGTGCATTTTGTTCGACAATATGCTCTCCACTCCGCCTGAGAAATCGCGCATCATATTGATAGC
TCCGGCGACTTTGACATCCTTCCCGGAGCATTGCCTGGTGAGCTTTCAGAAACCACTCCGGAATTTTCG

ACGAGTCCCCAATCTGTTTGAGATTGTCTCTTTTGACTACTGGCACCAGAATTTTGGTTTCGATATGG
 ATTCAGAAACCGCCATGCGCATGGCGCAATACTTGGCGATTCCAGAAGGTCGCGAACATGTTTTAGCC
 ATTGTGCGCACCCGACTTTCTGCCGCTGGTGAAGATCCCGCGCACATGACCGATGGCGAGTTGTTAGA
 AAAAGCTCCCAGCTACTTTGCTGGTGGTCATGACGTCATCATCGGACGCCGACACTTTGTCGATGACG
 5 CAACCACCAGTGATCAATTGGCCTCATCTGGAACACTGACCGTTAAAGAGCATGAGGCGTTCATCCGC
 CTGACTGTGCGATGGCATCAGGGATTTGTACCACCGCAACCGTTACGCACCGTATGTAGTGGCGTTTTCA
 AACTGGTTGAAACCCGCCGGCGCTCTTTGACCATCTTCATAAACAGCTCGTCGCCATTGATGAAC
 GCGGCCGACTTATTGCCGATGAACTGCATCATCTACGTGGCAATCCCAATATGTACAACGAACCTTGCT
 GTTGATTACGCCGATACCACAACCTGATCATCGCGAAAACGATCACGCCGTGGCCTTCGCAGGTTT
 10 CGGTCACCGCTACCCACCATTGAGATTTACTCTAAGTCCGCTATTCCTGAACCCCTGGCTTCAAAGCG
 ACGAGGAAATCCAAGCGATGAGCAACCTCATCCATGCATGCCATGCTGCAACCGGCGCAGATGTACCC
 TGCAATGAGGAATGGGTACACAAACCAATCGATGTTGATATGCCAATGCCCTGGCATGTGATGATCAA
 ATGGCGTGTTTCTACCCTGGCAGGTTTTGAAGGTGGCACCAAGGTGTATCTCAATACGCTGTCTCCAC
 ACAAGGTCCGAGACCGTGTGGTGAAGAAATGTACCGACTACGCGATGAAGAACTCATCGCATCTGAT
 15 CTGCGCATCGCCATGGAATGCTCCGTTGAACGCAACAGCCTTAAATACAATCCCTCCTATAA
SEQ ID No. 2: NCg12002 蛋白序列 (即序列 1 编码的氨基酸序列 428aa)
 MADGTIKQIHPFTGTEVWTVPGRGNRPLSHPASTIVELSAHDHTSYCAFCSNMLSTPPEKSRI IIDS
 SGDFDILPGALPGELSETTPEFRRVPLFEIVSFDYWHQNFQDMDSETAMRMAQYLAIPEGREHVLA
 IVRTRLSAAGEDPAHMTDGELLEKAPSYFAGGHDVIIGRRHFVDDATTSQQLASSGTLTVKEHEAFIR
 20 LTVDGIRDLYHRNRYAPYVVAFQNLKPAGASFDHLHKQLVAIDERGRLIADELHHLRGNPNNMYNELA
 VDYAGYHNLI I AENDHAVAFAFGHRYPTIEIYSKSAIPEPWLQSDEEIQAMSNLIHACHAATGADVP
 CNEEWVHKPIDVDMPMPWHVMIKWRVSTLAGFEGGTKVYLNLSLPHKVRDRVVKEMYRLRDEELIASD
 LRIAMECSVERNSLKYNPLL

**SEQ ID No. 3: pXMJ19 整合 NCg12002 基因及其启动子的 pXMJ19- NCg12002 序列
 (核苷酸序列 1441 bp)**

AATTAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCAACACCACAGTAGACAATAGCCTTGGT
 GTTATGACTAGCCCCATTCTTTTTCTGTCACCCCATTCGCACCATGGCTGACGGCACGATCAAACA
 GATTCACCCTTTACAGGCACCGAAGTGTGGACGGTCCCTGGGCGTGGAAATCGACCTCTGTACATC
 CCGCTTCTACGATCGTCGAACTATCTGCACACGATCACACCTTTACTGTGCATTTTGTCCGACAAT
 30 ATGCTCTCCACTCCGCCTGAGAAATCGCGCATCATCATTGATAGCTCCGGCGACTTTGACATCCTTCC
 CGGAGCATTGCCTGGTGAGCTTTCAGAAACCACTCCGGAATTCGACGAGTCCCAATCTGTTTGAGA
 TTGTCTCTTTTGACTACTGGCACCAGAATTTTGGTTTCGATATGGATTAGAAAACCGCCATGCGCATG
 GCGCAATACTTGGCGATTCCAGAAGGTCGCGAACATGTTTTAGCCATTGTGCGCACCCGACTTTCTGC
 CGCTGGTGAAGATCCCGCGCACATGACCGATGGCGAGTTGTTAGAAAAAGCTCCCAGCTACTTTGCTG
 35 GTGGTCATGACGTCATCATCGGACGCCGACACTTTGTCGATGACGCAACACCAGTGATCAATTGGCC
 TCATCTGGAACACTGACCGTTAAAGAGCATGAGGCGTTCATCCGCCTGACTGTCGATGGCATCAGGGA
 TTTGTACCACCGCAACCGTTACGCACCGTATGTAGTGGCGTTTCAAACTGGTTGAAACCCGCCGGCG
 CGTCTTTTGACCATCTTCATAAACAGCTCGTCGCCATTGATGAACGCGGCCGACTTATTGCCGATGAA
 CTGCATCATCTACGTGGCAATCCCAATATGTACAACGAACCTTGCTGTTGATTACGCCGATACCACAA
 40 CCTGATCATCGCGAAAACGATCACGCCGTGGCCTTCGCAGGTTTCGGTCAACCGTACCCACCATTG
 AGATTTACTCTAAGTCCGCTATTCCTGAACCCCTGGCTTCAAAGCGACGAGGAAATCCAAGCGATGAGC
 AACCTCATCCATGCATGCCATGCTGCAACCGGCGCAGATGTACCCTGCAATGAGGAATGGGTACACAA
 ACCAATCGATGTTGATATGCCAATGCCCTGGCATGTGATGATCAAATGGCGTGTCTACCCTGGCAG

GTTTTGAAGGTGGCACCAAGGTGTATCTCAATACGCTGTCTCCACACAAGGTCCGAGACCGTGTGGTG
 AAAGAAATGTACCGACTACGCGATGAAGAACTCATCGCATCTGATCTGCGCATCGCCATGGAATGCTC
 CGTTGAACGCAACAGCCTTAAATACAATCCCCTCCTATAAGAATTCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATG
AGAGAAGATTTTC

5 SEQ ID No. 4: 鉴定引物 M13R (-48) /P1 扩增片段 (核苷酸序列 1465 bp)
 AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGAATTAATTAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGACTCTAGAG
 GATCCCAACACCACAGTAGACAATAGCCTTGGTGTATGACTAGCCCCATTCTTTTTCTGTCACCCC
 CATTTCGACCATGGCTGACGGCAGATCAAACAGATTCACCCTTTCACAGGCACCGAAGTGTGGACGG
 TCCCTGGGCGTGGAAATCGACCTCTGTACATCCCGCTTCTACGATCGTCGAACTATCTGCACACGAT
 10 CACACCTCTTACTGTGCATTTTGTCCGACAATATGCTCTCCACTCCGCCTGAGAAAATCGCGCATCAT
 CATTGATAGCTCCGGCGACTTTGACATCCTTCCCGGAGCATTGCCTGGTGAAGCTTTCAGAAACCACTC
 CGGAATTTTCGACGAGTCCCAATCTGTTTGAGATTGTCTCTTTTGACTACTGGCACCAGAATTTTGGT
 TTCGATATGGATTCAGAAACCGCCATGCGCATGGCGCAATACTTGGCGATTCCAGAAGTTCGCGAACA
 TGTTTTAGCCATTGTGCGCACCCGACTTTCTGCCGCTGGTGAAGATCCCGCGCACATGACCGATGGCG
 15 AGTTGTTAGAAAAAGCTCCAGCTACTTTGCTGGTGGTCAATGACGTCATCATCGGACGCCGACACTTT
 GTCGATGACGCAACCACCAGTGATCAATTGGCCTCATCTGGAACACTGACCGTTAAAGAGCATGAGGC
 GTTCATCCGCCTGACTGTCGATGGCATCAGGGATTTGTACCACCGCAACCGTTACGCACCGTATGTAG
 TGGCGTTTCAAAAAGCTTGAACCCGCGCGCGTCTTTTGACCATCTTCATAAACAGCTCGTCGCC
 ATTGATGAACGCGCGGACTTATTGCCGATGAACTGCATCATCTACGTGGCAATCCCAATATGTACAA
 20 CGAACTTGCTGTTGATTACGCCGATAACCACAACCTGATCATCGCGGAAAACGATCACGCCGTGGCCT
 TCGCAGGTTTCGGTCACCGTACCCACCATTGAGATTTACTCTAAGTCCGCTATTCCTGAACCCTGG
 CTTCAAAGCGACGAGGAAATCCAAGCGATGAGCAACCTCATCCATGCATGCCATGCTGCAACCGGCGC
 AGATGTACCCTGCAATGAGGAATGGGTACACAAACCAATCGATGTTGATATGCCAATGCCCTGGCATG
 TGATGATCAAATGGCGTGTCTTACCCTGGCAGGTTTGAAGGTGGCACCAAGGTGTATCTCAATACG
 25 CTGTCTCCACACAAGGTCCGAGACCGTGTGGTGAAGAAATGTACCGACTACGCGATGAAGAACTCAT
 CGCATCTGATCTGCGCATCGCCATGGAATGCTCCGTTGAACGCAACAGCCTTAAATACAATCCCCTCC
 TATAAGAATTCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAG

SEQ ID No. 5: 基因突变型 NCg12002^{G1240T} ORF (CDS) 序列 (核苷酸序列 1287 bp)
 ATGGCTGACGGCAGATCAAACAGATTCACCCTTTCACAGGCACCGAAGTGTGGACGGTCCCTGGGCG
 30 TGGAAATCGACCTCTGTACATCCCGCTTCTACGATCGTCGAACTATCTGCACACGATCACACCTCTT
 ACTGTGCATTTTGTCCGACAATATGCTCTCCACTCCGCCTGAGAAAATCGCGCATCATCATTGATAGC
 TCCGGCGACTTTGACATCCTTCCCGGAGCATTGCCTGGTGAAGCTTTCAGAAACCACTCCGGAATTTTCG
 ACGAGTCCCAATCTGTTTGAGATTGTCTCTTTTGACTACTGGCACCAGAATTTTGGTTTCGATATGG
 ATTCAGAAACCGCCATGCGCATGGCGCAATACTTGGCGATTCCAGAAGGTTCGCGAACATGTTTTAGCC
 35 ATTGTCGACCCGACTTTCTGCCGCTGGTGAAGATCCCGCGCACATGACCGATGGCGAGTTGTTAGA
 AAAAGCTCCCAGCTACTTTGCTGGTGGTCAATGACGTCATCATCGGACGCCGACACTTTGTGATGACG
 CAACCACCAGTGATCAATTGGCCTCATCTGGAACACTGACCGTTAAAGAGCATGAGGCGTTCATCCGC
 CTGACTGTGATGGCATCAGGGATTTGTACCACCGCAACCGTTACGCACCGTATGTAGTGGCGTTTCA
 40 AAAGTGGTTGAAACCCGCGCGCGTCTTTTGACCATCTTCATAAACAGCTCGTCGCCATTGATGAAC
 GCGGCCGACTTATTGCCGATGAACTGCATCATCTACGTGGCAATCCCAATATGTACAACGAACCTTGGT
 GTTGATTACGCCGATACCACAACCTGATCATCGCGGAAAACGATCACGCCGTGGCCTTCGCAGGTTT
 CGGTACCCGCTACCCACCATTGAGATTTACTCTAAGTCCGCTATTCCTGAACCCTGGCTTCAAAGCG
 ACGAGGAAATCCAAGCGATGAGCAACCTCATCCATGCATGCCATGCTGCAACCGGCGCAGATGTACCC

TGCAATGAGGAATGGGTACACAAACCAATCGATGTTGATATGCCAATGCCCTGGCATGTGATGATCAA
ATGGCGTGTCTTCTACCCCTGGCAGGTTTTGAAGGTGGCACCAAGGTGTATCTCAATACGCTGTCTCCAC
ACAAGGTCCGAGACCGTGTGGTAAAAGAAATGTACCGACTACGCGATGAAGAACTCATCGCATCTGAT
CTGCGCATCGCCATGTAATGCTCCGTTGAACGCAACAGCCTTAAATACAATCCCCTCCTATAA

5 SEQ ID No. 6: 基因突变型 NCg12002^{B414*}蛋白序列 (即序列 5 编码的氨基酸序列 428aa)

MADGTIKQIHPFTGTEVWTVPGRGNRPLSHPASTIVELSAHDHTSYCAFCSNMLSTPPEKSRI IIDS
SGDFDILPGALPGELSETTPEFRRVPLFEIVSFDYWHQNFQFDMSETAMRMAQYLA IPEGREHVLA
IVRTRLSAAGEDPAHMTDGELLEKAPSYFAGGHVDV IGRRHVDDATTSQQLASSGTLTVKEHEAFIR
10 LTVDGIRDLYHRNRYAPYVVAFQNLKPAGASFDHLHKQLVA IDERGRLIADELHHLRGNPNMYNELA
VDYAGYHNLI I AENDHAVAFAFGHRYPTIEIYSKSAIPEPWLSDEEI QAMSNLIHACHAATGADVP
CNEEWVHKPIDVDMPPWHVMIKWRVSTLAGFEGGTKVYLNLSPHKVRDRVVKEMYRLRDEELIASD
LRIAM*CSVERNLSLKNPLL

15 SEQ ID No. 7: P2/P5 overlap PCR 获得点突变整合同源臂 Up-NCg12002^{B414*}-Down
序列 (核苷酸序列 1022 bp)

CAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGGAACTGCATCATCTACGTGGCAATCCCAATAT
GTACAACGAACTTGCTGTTGATTACGCCGATAACCACAACCTGATCATCGCGGAAAACGATCACGCCG
TGGCCTTCGCAGGTTTCGGTCACCGCTACCCACCAATTGAGATTTACTCTAAGTCCGCTATTCCTGAA
CCCTGGCTTCAAAGCGACGAGGAAATCCAAGCGATGAGCAACCTCATCCATGCATGCCATGCTGCAAC
20 CGGCGCAGATGTACCCTGCAATGAGGAATGGGTACACAAACCAATCGATGTTGATATGCCAATGCCCT
GGCATGTGATGATCAAAATGGCGTGTCTTCTACCCCTGGCAGGTTTTGAAGGTGGCACCAAGGTGTATCTC
AATACGCTGTCTCCACACAAGGTCCGAGACCGTGTGGTAAAAGAAATGTACCGACTACGCGATGAAGA
ACTCATCGCATCTGATCTGCGCATCGCCATGTAATGCTCCGTTGAACGCAACAGCCTTAAATACAATC
CCCTCCTATAAGCCAAGAGTTTTAGTGTGCTGCGCAGGTA CTCTACTATCTAATCCATGAGCCGCAT
25 TTCAGAACTTCTAAACAATCATGGTGTGATCTGTGCTGGCAAGAGGCCGCATATCAGGATTTCCACG
AACATCCTGAGCTCTCCGGCTTCGAATCAGAGACCGCAGATCGCATT CAGAAATACCTCGAGCGTTTT
GATTGTGAGGTGATTCCAAATGTTGGCGTTACGGCATTCTGGCCGTGTTCCGAAATGGGTGACAGA
TCCTGGTGCCCCTGTTGCGTTAATGCGCGCAGATTTGATGGCCTTCCCGTCAAGGAAATCACCGGAG
TTCCGTTTGCTTCCACTCGTATGCGTCCGCATGATGGGGCAAATGTCCATGTCATGCACGCATGCGGC
30 CACGATGTCCACGTCACCGCGCTGCTTGGTGCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCATAGC
TG

SEQ ID No. 8: P8/P11 获得敲除 NCg12002 的同源臂 DNA 序列 (核苷酸序列 1097 bp)

CAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGCGTGATGCAGGCCGAAGGATCGCTCAAGAATA
35 CGTAGCTCAAAACTAGCGAAGGATCTCCACAGTCCATGGGTAGACTGCAGGAACTTCATAGGCAAGTT
CCTGCTCCAGGAGGAAAAGCGTCTTTGGCAACTCTGCTGGCGGGGTGAGCAAACGGGCAAAAATCATG
GTCACTTGGTTAACGGAGCCTTAACTCCATCAACTTCAATGAGGTAACGGTTGACCGAGGATTCTTC
CAAGTCTGCATCTTCATGCTCGTCGCGGTAAGTCTGGCGAAGCTGCTCTTCCACAGCTTCTGCGATTT
TCGCTGCTGGATCATGGACAACAACGCCATGATCCATGAGGCCTTTTTTCGATCAAAAAGTTGGCGACT
40 ACGGTA AACGTC CCGCTAGT GCGATGGAATCTGTGTCGGGGACTAAAACATCAA ACTGAATCTTCGG
CATAACACCACAGTAGACAATAGCCTTGGTGTATGACTAGCCCCATTCTTTTTCTGTACCCCCAT
TCGACCCGCAAGAGTTTTAGTGTGCTGCGCAGGTA CTCTACTATCTAATCCATGAGCCGCATTTCA
GAACTTCTAAACAATCATGGTGTGATCTGTGCTGGCAAGAGGCCGCATATCAGGATTTCCACGAACA

TCCTGAGCTCTCCGGCTTCGAATCAGAGACCGCAGATCGCATTTCAGAAATACCTCGAGCGTTTTGATT
GTGAGGTGATTCCAAATGTTGGCGGTTACGGCATTCTGGCCGTGTTCCGAAATGGGTCGACAGATCCT
GGTGCCCTGTTGCGTTAATGCGCGCAGATTTTCGATGGCCTTCCCGTCAAGGAAATCACCGGAGTTCC
GTTTGCTTCCACTCGTATGCGTCCGCATGATGGGGCAAATGTCCATGTCATGCACGCATGCGGCCACG
5 ATGTCCACGTCACCGCGCTGCTTGGTGCCTGTGCCATTTTAGATGAGCGTCGCGATGCATGGGAAGGC
ACGTTTCATCGCGTTGTTCCAGCCATCGGAGGAAAACTCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGG
TCATAGCTG

工业应用

10 实验证明，将 SEQ ID No. 2 所示蛋白质的编码基因突变或敲除后可以提高
细胞中的 L-赖氨酸产量，可通过突变或敲除细胞中 SEQ ID No. 2 所示蛋白质的
编码基因来制备 L-赖氨酸，本发明具有很好的应用前景。

权利要求

1. 敲除蛋白质编码基因或抑制所述蛋白质含量或活性的物质在制备 L-赖氨酸中的应用；
5 所述蛋白质为如下 A1) 或 A2))：
A1) 氨基酸序列是 SEQ ID No. 2 的蛋白质；
A2) 在 A1) 的 N 端或/和 C 端连接标签得到的融合蛋白质。
2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述编码基因为如下 b1) 或 b2) 或 b3))：
10 b1) 序列表中 SEQ ID No. 1 所示的 DNA 分子；
b2) 与 b1) 限定的核苷酸序列具有 75%或 75%以上同一性，且编码所述蛋白质的 DNA 分子；
b3) 在严格条件下与 b1) 或 b2) 限定的核苷酸序列杂交，且编码所述蛋白质的 DNA 分子。
- 15 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于：所述物质为 B1) 或 B2))：
B1) 降低权利要求 1 中所述蛋白质表达量的核酸分子；
B2) 含有 B1) 所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组微生物或转基因细胞系。
4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的应用，其特征在于：所述物质为将 SEQ ID
20 No. 2 的第 414 位谷氨酸残基密码子突变为终止子的物质；
或，所述物质为将 SEQ ID No. 1 第 1240 位鸟嘌呤核苷酸突变为胸腺嘧啶核苷酸的物质。
5. 一种制备 L-赖氨酸的方法，包括：降低受体生物细胞中权利要求 1 所述蛋白质的含量或活性，或敲除受体生物细胞中权利要求 1 所述蛋白质的编码基
25 因，得到重组生物细胞；培养所述重组生物细胞，得到 L-赖氨酸。
6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于：所述生物细胞为能合成 L-赖氨酸的酵母、细菌、藻、真菌、植物细胞或动物细胞。
7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述细菌为谷氨酸棒杆菌。
8. 根据权利要求 5-7 中任一所述的方法，其特征在于：培养所述重组生物
30 细胞采用能使所述重组生物细胞生长的培养基进行；
和/或，培养所述重组生物细胞采用能使所述重组生物细胞生长的条件进行。
9. 根据权利要求 5-7 中任一所述的方法，其特征在于：所述方法通过将所述受体生物细胞中 SEQ ID No. 2 的第 414 位谷氨酸残基密码子突变为终止子，
35 或将 SEQ ID No. 1 第 1240 位鸟嘌呤核苷酸突变为胸腺嘧啶核苷酸，或敲除 SEQ ID No. 1 所示的基因实现。
10. 根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：培养所述重组生物细胞采用

能使所述重组生物细胞生长的培养基进行；

和/或，培养所述重组生物细胞采用能使所述重组生物细胞生长的条件进行。

11. 生物材料，为如下 b1) 或 b2) 或 b3) 或 b4) 或 b5)：

5 b1) 编码氨基酸序列是 SEQ ID No. 6 所示蛋白质的 DNA 分子；

b2) 与 b1) 限定的 DNA 分子序列具有 75% 或 75% 以上同一性，且编码 SEQ ID No. 6 所示蛋白质的 DNA 分子；

b3) 在严格条件下与 b1) 或 b2) 限定的核苷酸序列杂交，且编码 SEQ ID No. 6 所示蛋白质的 DNA 分子；

10 b4) 含有 b1) 或 b2) 或 b3) 所述 DNA 分子的表达盒、重组载体、重组微生物或转基因细胞系；

b5) 权利要求 5-9 中任一所述重组生物细胞。

12. 一种用于制备 L-赖氨酸的产品，含有权利要求 1-4 中任一所述物质或权利要求 11 所述生物材料。

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/084971

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 15/77(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; C12P 13/08(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12R 1/15(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C12N,C12P,C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS, WPABSC, VEN, CNTXT, ENTXT, CNKI, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, PubMed, ISI-WEB OF SCIENCE, Genbank+EMBL, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: 赖氨酸, 生产, 制备, 磷酸尿苷酰基转移酶, 磷酸尿苷酰转移酶, 磷酸转尿苷酰酶, ncgl, 敲除, 突变, 对序列SEQ ID NOS: 1-6的检索, search for sequences SEQ ID NOS: 1-6		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 115820706 A (NINGXIA EPPEN BIOTECH CO., LTD.) 21 March 2023 (2023-03-21) see description, paragraphs [0004]-[0043]	1-12
A	CN 105950524 A (QILU UNIVERSITY OF TECHNOLOGY; ZHUCHENG DONGXIAO BIOTECHNOLOGY CO., LTD.; SHANGDONG PROVINCIAL FEED QUALITY INSPECTION INSTITUTE) 21 September 2016 (2016-09-21) see description, paragraphs [0004]-[0055], and SEQ ID NO: 1	1-12
A	US 2007122890 A1 (CJ CORP.) 31 May 2007 (2007-05-31) see description, paragraphs [0013]-[0028]	1-12
A	US 2010015673 A1 (CJ CHEILJEDANG CORP.) 21 January 2010 (2010-01-21) see description, paragraphs [0007]-[0031]	1-12
A	US 2010028957 A1 (CJ CHEILJEDANG CORP.) 04 February 2010 (2010-02-04) see description, paragraphs [0007]-[0033]	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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		Date of mailing of the international search report
24 August 2023		03 September 2023
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	董迅衍 等人 (DONG, Xunyan et al.). "乳糖发酵短杆菌lysC突变对L-赖氨酸积累的影响 (The Effect of LysC on L-Lysine Accumulation in Brevibacterium lactofermentum)" <i>食品与生物技术学报 (Journal of Food Science and Biotechnology)</i> , Vol. 30, No. 4, 15 July 2011 (2011-07-15), 592-596 ISSN: 1673-1689, see pages 592-596	1-12
A	YANASE, M. et al. "Pyruvate kinase deletion as an effective phenotype to enhance lysine production in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032: Redirecting the carbon flow to a precursor metabolite" <i>Journal of bioscience and bioengineering</i> , Vol. 122, No. 2, 13 March 2016 (2016-03-13), 160-167 ISSN: 1389-1723, see pages 160-167	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/084971

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.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/084971

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	115820706	A	21 March 2023	None	
CN	105950524	A	21 September 2016	EP	3401390 A1 14 November 2018
				EP	3401390 A4 02 January 2019
				EP	3401390 B1 19 August 2020
				WO	2017186026 A1 02 November 2017
US	2007122890	A1	31 May 2007	JP	2007167064 A 05 July 2007
				JP	4541347 B2 08 September 2010
				PL	1792976 T3 30 December 2011
				KR	20070056807 A 04 June 2007
				KR	100789271 B1 02 January 2008
				BRPI	0604949 A 09 October 2007
				AT	515562 T 15 July 2011
				US	7794990 B2 14 September 2010
				EP	1792976 A1 06 June 2007
				EP	1792976 B1 06 July 2011
				DK	1792976 T3 10 October 2011
US	2010015673	A1	21 January 2010	EP	2115135 A1 11 November 2009
				EP	2115135 A4 27 January 2010
				EP	2115135 B1 05 December 2012
				WO	2008082180 A1 10 July 2008
				US	8058036 B2 15 November 2011
				KR	100838035 B1 12 June 2008
US	2010028957	A1	04 February 2010	EP	2102337 A1 23 September 2009
				EP	2102337 A4 24 March 2010
				EP	2102337 B1 03 August 2011
				ES	2369022 T3 24 November 2011
				AT	518951 T 15 August 2011
				KR	100838038 B1 12 June 2008
				WO	2008082181 A1 10 July 2008
				US	8048650 B2 01 November 2011
				DK	2102337 T3 14 November 2011
				PL	2102337 T3 29 June 2012

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/77(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; C12P 13/08(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12R 1/15(2006.01)n</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: C12N, C12P, C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>数据库: CNABS, WPABSC, VEN, CNTXT, ENTXT, CNKI, 百度学术, PubMed, ISI-WEB OF SCIENCE, Genbank+EMBL, 中国专利生物序列检索系统; 检索词: 赖氨酸, 生产, 制备, 磷酸尿苷酰基转移酶, 磷酸尿苷酰转移酶, 磷酸转尿苷酰酶, ncgl, 敲除, 突变, 对序列SEQ ID N0s:1-6的检索</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 115820706 A (宁夏伊品生物科技股份有限公司) 2023年3月21日 (2023 - 03 - 21) 参见说明书第[0004]-[0043]段</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105950524 A (齐鲁工业大学、诸城东晓生物科技有限公司、山东省饲料质量检验所) 2016年9月21日 (2016 - 09 - 21) 参见说明书第[0004]-[0055]段、SEQ ID NO:1</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2007122890 A1 (CJ CORP) 2007年5月31日 (2007 - 05 - 31) 参见说明书第[0013]-[0028]段</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010015673 A1 (CJ CHEILJEDANG CORP) 2010年1月21日 (2010 - 01 - 21) 参见说明书第[0007]-[0031]段</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010028957 A1 (CJ CHEILJEDANG CORP) 2010年2月4日 (2010 - 02 - 04) 参见说明书第[0007]-[0033]段</td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 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 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 115820706 A (宁夏伊品生物科技股份有限公司) 2023年3月21日 (2023 - 03 - 21) 参见说明书第[0004]-[0043]段	1-12	A	CN 105950524 A (齐鲁工业大学、诸城东晓生物科技有限公司、山东省饲料质量检验所) 2016年9月21日 (2016 - 09 - 21) 参见说明书第[0004]-[0055]段、SEQ ID NO:1	1-12	A	US 2007122890 A1 (CJ CORP) 2007年5月31日 (2007 - 05 - 31) 参见说明书第[0013]-[0028]段	1-12	A	US 2010015673 A1 (CJ CHEILJEDANG CORP) 2010年1月21日 (2010 - 01 - 21) 参见说明书第[0007]-[0031]段	1-12	A	US 2010028957 A1 (CJ CHEILJEDANG CORP) 2010年2月4日 (2010 - 02 - 04) 参见说明书第[0007]-[0033]段	1-12
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 115820706 A (宁夏伊品生物科技股份有限公司) 2023年3月21日 (2023 - 03 - 21) 参见说明书第[0004]-[0043]段	1-12																		
A	CN 105950524 A (齐鲁工业大学、诸城东晓生物科技有限公司、山东省饲料质量检验所) 2016年9月21日 (2016 - 09 - 21) 参见说明书第[0004]-[0055]段、SEQ ID NO:1	1-12																		
A	US 2007122890 A1 (CJ CORP) 2007年5月31日 (2007 - 05 - 31) 参见说明书第[0013]-[0028]段	1-12																		
A	US 2010015673 A1 (CJ CHEILJEDANG CORP) 2010年1月21日 (2010 - 01 - 21) 参见说明书第[0007]-[0031]段	1-12																		
A	US 2010028957 A1 (CJ CHEILJEDANG CORP) 2010年2月4日 (2010 - 02 - 04) 参见说明书第[0007]-[0033]段	1-12																		
国际检索实际完成的日期	2023年8月24日	国际检索报告邮寄日期	2023年9月3日																	
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员	徐益君 电话号码 (+86) 010-62411083																	

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	董迅衍 等人. "乳糖发酵短杆菌lysC突变对L-赖氨酸积累的影响" 食品与生物技术学报, 第30卷, 第4期, 2011年7月15日 (2011 - 07 - 15), 592-596 ISSN: 1673-1689, 参见第592-596页	1-12
A	Masaki Yanase 等人. "Pyruvate kinase deletion as an effective phenotype to enhance lysine production in Corynebacterium glutamicum ATCC13032: Redirecting the carbon flow to a precursor metabolite" Journal of bioscience and bioengineering, 第122卷, 第2期, 2016年3月13日 (2016 - 03 - 13), 160-167 ISSN: 1389-1723, 参见第160-167页	1-12

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列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的;
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
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/CN2023/084971

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	115820706	A	2023年3月21日	无			
CN	105950524	A	2016年9月21日	EP	3401390	A1	2018年11月14日
				EP	3401390	A4	2019年1月2日
				EP	3401390	B1	2020年8月19日
				WO	2017186026	A1	2017年11月2日
US	2007122890	A1	2007年5月31日	JP	2007167064	A	2007年7月5日
				JP	4541347	B2	2010年9月8日
				PL	1792976	T3	2011年12月30日
				KR	20070056807	A	2007年6月4日
				KR	100789271	B1	2008年1月2日
				BR- PI	0604949	A	2007年10月9日
				AT	515562	T	2011年7月15日
				US	7794990	B2	2010年9月14日
				EP	1792976	A1	2007年6月6日
				EP	1792976	B1	2011年7月6日
				DK	1792976	T3	2011年10月10日
US	2010015673	A1	2010年1月21日	EP	2115135	A1	2009年11月11日
				EP	2115135	A4	2010年1月27日
				EP	2115135	B1	2012年12月5日
				WO	2008082180	A1	2008年7月10日
				US	8058036	B2	2011年11月15日
				KR	100838035	B1	2008年6月12日
US	2010028957	A1	2010年2月4日	EP	2102337	A1	2009年9月23日
				EP	2102337	A4	2010年3月24日
				EP	2102337	B1	2011年8月3日
				ES	2369022	T3	2011年11月24日
				AT	518951	T	2011年8月15日
				KR	100838038	B1	2008年6月12日
				WO	2008082181	A1	2008年7月10日
				US	8048650	B2	2011年11月1日
				DK	2102337	T3	2011年11月14日
				PL	2102337	T3	2012年6月29日