

(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
2025 年 1 月 9 日 (09.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/007767 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 13/08* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/100975

(22) 国际申请日: 2024 年 6 月 24 日 (24.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310809270.6 2023年7月4日 (04.07.2023) CN
202310809271.0 2023年7月4日 (04.07.2023) CN
202310809274.4 2023年7月4日 (04.07.2023) CN
202310809277.8 2023年7月4日 (04.07.2023) CN
202310809281.4 2023年7月4日 (04.07.2023) CN

(71) 申请人: 黑龙江伊品生物科技有限公司 (HEILONGJIANG EPPEN BIOTECH CO., LTD.)
[CN/CN]; 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。

(72) 发明人: 魏爱英 (WEI, Aiyang); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。孟刚 (MENG, Gang); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。赵春光 (ZHAO, Chunguang); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。周晓群 (ZHOU, Xiaoqun); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。张英 (ZHANG, Ying); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。毕国东 (BI, Guodong); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德

力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。苏厚波 (SU, Houbao); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。杨立鹏 (YANG, Lipeng); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。张晓琴 (ZHANG, Xiaoqin); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。王攀 (WANG, Pan); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (CN)。王吉玮 (WANG, Jiwei); 中国黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区, Heilongjiang 166200 (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,

(54) Title: ENGINEERING BACTERIUM FOR PRODUCING L-VALINE, CONSTRUCTION METHOD, AND USE

(54) 发明名称: 产L-缬氨酸工程菌及构建方法与应用

(57) Abstract: An engineering bacterium for producing L-valine, a construction method, and a use. After an *yjiT* gene in *Escherichia coli* is knocked out and *brnF* and *brnE* are expressed, an *yjiV* gene is knocked out and *ilvE* and *ilvD* are expressed, a *trpR* gene is knocked out and *ilvH* mutant protein is expressed, *lacI* and *lacZ* genes are knocked out and DNA polymerase is expressed, and/or after an *ycgH* gene is knocked out and *ilvC* is expressed, an obtained engineering bacterium can increase the yield of L-valine. The engineering bacterium can be used for producing L-valine and has good application prospects.

(57) 摘要: 产L-缬氨酸工程菌及构建方法与应用。将大肠杆菌中的 *yjiT* 基因敲除并表达 *brnF* 与 *brnE* 后, 敲除 *yjiV* 基因与表达 *ilvE* 与 *ilvD*, 敲除 *trpR* 基因与表达 *ilvH* 突变蛋白, 敲除 *lacI* 与 *lacZ* 基因与表达 DNA 聚合酶, 和/或, 敲除 *ycgH* 基因与表达 *ilvC* 后, 所得工程菌可提高 L-缬氨酸产量。所述工程菌可用于生产 L-缬氨酸, 具有很好的应用前景。

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))。

产 L-缬氨酸工程菌及构建方法与应用

相关申请的交叉引用：本申请要求申请日为2023 年07 月04 日的五个中国专利申请(申请号分别为2023108092706、2023108092710、2023108092744、
5 2023108092778、2023108092814)的优先权，该五个专利申请的全部内容在此被援引加入本文。

技术领域

本发明涉及生物技术领域中，产L-缬氨酸工程菌及构建方法与应用。

背景技术

10 在微生物中，L-缬氨酸(支链氨基酸的一种)是从丙酮酸开始，经由乙酰乳酸、二羟基异戊酸和酮异戊酸生物合成的。通过乙酰羟酸合酶、乙酰羟酸还原异构酶、二羧酸脱水酶和转氨酶 B 催化的反应产生这些中间代谢产物。然而，这些酶还参与从丁酮酸和丙酮酸开始的 L-异亮氨酸的生物合成，而且 L-亮氨酸
15 也从酮异戊酸(一种中间代谢产物)开始，经由 2-异丙基苹果酸、3-异丙基苹果酸和酮异己酸生物合成。因此，因为支链氨基酸(即 L-缬氨酸、L-异亮氨酸和 L-亮氨酸)使用相同的酶用于其生物合成过程，所以已知工业上通过发酵生产一种类型的支链氨基酸具有难度。此外，存在的一个问题是工业的批量生产受到由 L-缬氨酸(其为终产物)或其衍生物引起的反馈抑制的限制。

大肠杆菌具有明确的遗传背景，是氨基酸生产中具有吸引力的工业化生产
20 底盘。然而，相比于谷氨酸棒杆菌，生产 L-缬氨酸的大肠杆菌菌株的相关报道较少，这可能是由于大肠杆菌对 L-缬氨酸生物合成的调节机制更为复杂。乙酰羟酸合酶(AHAS)是 L-缬氨酸生物合成的限速酶，大肠杆菌有三种 AHAS 同工酶，由 ilvBN、ilvGM 和 ilvIH 编码，具有不同的性质和调节机制。Park 等人报道了通过 Escherichia coli W3110 和 Escherichia coli W 的系统代谢工程改造 L-
25 缬氨酸生产菌株，其 L-缬氨酸终产量达到 60.7g/L，糖酸转化率为 0.22g/g。除了诱变育种和常规代谢工程修饰外，辅因子平衡也被认为是提高 L-缬氨酸产量的关键瓶颈。由于胞内辅因子影响代谢网络、信号转导和物质运输，进而影响微生物细胞的生理功能。在微生物发酵生产化学品的过程中，化学品的效价和产量往往受到辅因子不平衡的限制，这主要是由合成途径中辅因子依赖酶的不
30 平衡表达引起的。Savrasova 和 Stoyanova 等人通过用异源 NADH 依赖性亮氨酸脱氢酶替换天然 NADPH 依赖性转氨酶，构建了一株以大肠杆菌 MG1655 为出发菌株的 L-缬氨酸工程菌。在微需氧条件下，该菌株的糖酸转化率(0.23g/g)仅为最大理论产量 0.65g/g 的 35.4%。开发生物传感器高通量筛选方法，引入外源辅酶再生途径以平衡胞内辅因子，构建高效的工业底盘生产菌株，是需要解决关键
35 科学问题。

发明公开

本发明所要解决的技术问题是如何提高 L-缬氨酸产量。

为解决上述技术问题，本发明首先提供了用于生产缬氨酸的工程菌，所述工程菌为对受体菌进行改造得到的重组菌；所述改造包括 A1)、A2)、A3)、A4) 或 A5)；

A1) 包括 A11)、A12) 和 A13)；

5 A11) 敲除所述受体菌的 *yjiT* 基因，抑制所述 *yjiT* 基因的表达或抑制所述 *yjiT* 基因编码的蛋白质的活性；

A12) 增加所述受体菌中 *brnF* 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *brnF* 基因编码蛋白质的活性；

10 A13) 增加所述受体菌中 *brnE* 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *brnE* 基因编码蛋白质的活性；

A2) 包括 A21)、A22) 和 A23)；

A21) 敲除所述受体菌的 *yjiV* 基因，抑制所述 *yjiV* 基因的表达或抑制所述 *yjiV* 基因编码的蛋白质的活性；

15 A22) 增加所述受体菌中 *ilvE* 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *ilvE* 基因编码蛋白质的活性；

A23) 增加所述受体菌中 *ilvD* 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *ilvD* 基因编码蛋白质的活性；

A3) 包括 A31) 和 A32)；

20 A31) 敲除所述受体菌的 *trpR* 基因，抑制所述 *trpR* 基因的表达或抑制所述 *trpR* 基因编码的蛋白质的活性；

A32) 增加所述受体菌中 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因编码蛋白质的活性；所述 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因由将 *ilvH* 基因中第 14 位甘氨酸密码子替换为天冬氨酸密码子、第 17 位丝氨酸密码子替换为苯丙氨酸密码子得到；

25 A4) 包括 A41)、A42) 和 A43)；

A41) 敲除所述受体菌的 *lacI* 基因，抑制所述 *lacI* 基因的表达或抑制所述 *lacI* 基因编码的蛋白质的活性；

A42) 敲除所述受体菌的 *lacZ* 基因，抑制所述 *lacZ* 基因的表达或抑制所述 *lacZ* 基因编码的蛋白质的活性；

30 A43) 增加所述受体菌中 DNA 聚合酶的含量或增强所述 DNA 聚合酶的活性；

A5) 包括 A51) 和 A52)；

A51) 敲除所述受体菌的 *ycgH* 基因，抑制所述 *ycgH* 基因的表达或抑制所述 *ycgH* 基因编码的蛋白质的活性；

35 A52) 增加所述受体菌中 *ilvC* 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *ilvC* 基因编码蛋白质的活性；

所述受体菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

具体的，所述用于生产缬氨酸的工程菌具有 B1)、B2)、B3)、B4) 或 B5)

的特征；

B1) 包括 B11)、B12) 和 B13)：

B11) *yjiT* 基因不表达或弱表达，或所述 *yjiT* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；

5 B12) *brnF* 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *brnF* 基因编码蛋白质的活性增强；

B13) *brnE* 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *brnE* 基因编码蛋白质的活性增强；

B2) 包括 B21)、B22) 和 B23)：

10 B21) *yjiV* 基因不表达或弱表达，或所述 *yjiV* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；

B22) *ilvE* 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *ilvE* 基因编码蛋白质的活性增强；

15 B23) *ilvD* 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *ilvD* 基因编码蛋白质的活性增强；

B3) 包括 B31) 和 B32)：

B31) *trpR* 基因不表达或弱表达，或所述 *trpR* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；

20 B32) *ilvH*^{G14D、S17F} 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因编码蛋白质的活性增强；所述 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因由将 *ilvH* 基因中第 14 位甘氨酸密码子替换为天冬氨酸密码子、第 17 位丝氨酸密码子替换为苯丙氨酸密码子得到；

B4) 包括 B41)、B42) 和 B43)：

B41) *lacI* 基因不表达或弱表达，或抑制所述 *lacI* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；

25 B42) *lacZ* 基因不表达或弱表达，或抑制所述 *lacZ* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；

B43) DNA 聚合酶的含量增加或所述 DNA 聚合酶的活性增强；

B5) 包括 B51) 和 B52)：

30 B51) *ycgH* 基因不表达或弱表达，或所述 *ycgH* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；

B52) *ilvC* 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *ilvC* 基因编码蛋白质的活性增强；

所述工程菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

其中，所述受体菌含有 *yjiT* 基因 (GeneID:945056, 更新日期 2023-04-14)、
35 *yjiV* 基因 (GeneID:2847669, 更新日期 2023-04-14)、*trpR* 基因 (GeneID:948917, 更新日期 2023-04-14)、*lacI* 基因 (GeneID:945007, 更新日期 2023-04-14)、*lacZ*

基因 (GeneID:945006, 更新日期 2023-04-14) 和 ycgH 基因 (GeneID:2847703, 更新日期 2023-04-14)。

上述工程菌中, 所述 brnF 基因与所述 brnE 基因可来源于谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)。

5 进一步, 所述 brnF 基因可编码序列表中 SEQ ID No. 2 所示的蛋白质;
所述 brnE 基因可编码序列表中 SEQ ID No. 3 所示的蛋白质。

更进一步, 所述 brnF 基因可为序列表中 SEQ ID No. 1 的第 832-1587 位所示的 DNA 分子;

10 所述 brnE 基因可为序列表中 SEQ ID No. 1 的第 1584-1910 位所示的 DNA 分子。

上述工程菌中, 所述 ilvE 基因可来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。所述 ilvD 基因可来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

进一步, 所述 ilvE 基因可编码序列表中 SEQ ID No. 6 所示的蛋白质。所述 ilvD 基因可编码序列表中 SEQ ID No. 5 所示的蛋白质。

15 更进一步, 所述 ilvE 基因可为序列表中 SEQ ID No. 4 的第 808-1902 位所示的 DNA 分子。所述 ilvD 基因可为序列表中 SEQ ID No. 4 的第 1977-3827 位所示的 DNA 分子。

上述工程菌中, 所述 ilvH 基因可来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

进一步, 所述 ilvH^{G14D}、S17F 基因可编码序列表中 SEQ ID No. 8 所示的蛋白质。

20 更进一步, 所述 ilvH^{G14D}、S17F 基因可为序列表中 SEQ ID No. 7 的第 835-1326 位所示的 DNA 分子。

上述工程菌中, 所述 DNA 聚合酶可来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

进一步, 所述 DNA 聚合酶可为序列表中 SEQ ID No. 10 所示的蛋白质。

25 更进一步, 所述 DNA 聚合酶的编码基因可为序列表中 SEQ ID No. 9 的第 701-3352 位所示的 DNA 分子。

上述工程菌中, 所述 ilvC 基因可来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

进一步, 所述 ilvC 基因可编码序列表中 SEQ ID No. 12 所示的蛋白质。

更进一步, 所述 ilvC 基因可为序列表中 SEQ ID No. 11 的第 794-2269 位所示的 DNA 分子。

30 所述 brnF 基因、所述 brnE 基因、所述 ilvE 基因、所述 ilvD 基因、所述 ilvH^{G14D}、S17F 基因、所述 DNA 聚合酶编码基因和所述 ilvC 基因的表达由能在所述工程菌中启动相应基因表达的启动子启动, 包括但不限于强启动子, 组成型启动子。

35 在本发明的一个实施例中, 所述 brnF 基因与所述 brnE 基因的表达由 Ptrc 启动子启动, 所述 Ptrc 启动子为 SEQ ID No. 1 的第 758-831 位所示的 DNA 分子。

在本发明的一个实施例中, 所述 ilvE 基因的表达由 Ptrc 启动子启动, 所述 Ptrc 启动子为 SEQ ID No. 4 的第 1903-1976 位所示的 DNA 分子。

在本发明的另一个实施例中，所述 *ilvD* 基因的表达由 *PilvD* 启动子启动，所述 *PilvD* 启动子为 SEQ ID No. 4 的第 3828-3893 位所示的 DNA 分子。

在本发明的另一个实施例中，所述 *ilvH*^{G140}、^{S17F} 基因的表达由 *Ptrc* 启动子启动，所述 *Ptrc* 启动子为 SEQ ID No. 7 的第 761-834 位所示的 DNA 分子。

5 在本发明的另一个实施例中，所述 DNA 聚合酶编码基因的表达由 *PxylF* 启动子启动，所述 *PxylF* 启动子为 SEQ ID No. 9 的第 3353-3617 位所示的 DNA 分子。

在本发明的另一个实施例中，所述 *ilvC* 基因的表达由 *Ptrc* 启动子启动，所述 *Ptrc* 启动子为 SEQ ID No. 11 的第 2270-2343 位所示的 DNA 分子。

10 具体的，A1) 可通过 CRISPR/Cas9 系统，利用靶向 *yjiT* 基因的 sgRNA 与作为供体的 SEQ ID No. 1 所示的 DNA 片段进行基因编辑实现。

A2) 可通过 CRISPR/Cas9 系统，利用靶向 *yjiV* 基因的 sgRNA 与作为供体的 SEQ ID No. 4 所示的 DNA 片段进行基因编辑实现。

15 A3) 可通过 CRISPR/Cas9 系统，利用靶向 *trpR* 基因的 sgRNA 与作为供体的 SEQ ID No. 7 所示的 DNA 片段进行基因编辑实现。

A4) 可通过 CRISPR/Cas9 系统，利用靶向 *lacI* 和 *lacZ* 基因的 sgRNA 与作为供体的 SEQ ID No. 9 所示的 DNA 片段进行基因编辑实现。

A5) 可通过 CRISPR/Cas9 系统，利用靶向 *ycgH* 基因的 sgRNA 与作为供体的 SEQ ID No. 11 所示的 DNA 片段进行基因编辑实现。

20 本发明的受体菌包括但不限于大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)，任何含有 *yjiT* 基因、*yjiV* 基因、*trpR* 基因、*lacI* 和 *lacZ* 基因、*ycgH* 基因且可以合成 L-缬氨酸的细菌均可利用本发明的方法来制备重组菌并生产 L-赖氨酸，所述细菌可为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、乳酸发酵短杆菌、北京棒杆菌 (*Corynebacterium pekinense*)、噬氨短杆菌、钝齿棒状杆菌、泛菌 (*Pantoea*)、菠萝泛菌 (*Pantoea ananatis*)、短杆菌 (*Bacillus brevis*)、乳酸短杆菌或黄色短杆菌。所述酵母可为酿酒酵母或毕赤酵母。

在本发明的一个实施例中，所述大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) YP045 或大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110。

30 在本发明的一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-*yjiT* 和 W3110-*yjiT*，重组菌 CGMCC22721-*yjiT* 和 W3110-*yjiT* 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 *yjiT* 基因部分编码区进行敲除，同时插入了 *Ptrc* 启动子启动的 *brnF*-*brnE* 基因 (来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032)，保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

35 在本发明的一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-*yjiV* 和 W3110-*yjiV*，重组菌 CGMCC22721-*yjiV* 和 W3110-*yjiV* 分别是将 L-缬氨酸生产菌

CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiV 基因编码区进行敲除，同时插入 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组

5 菌。

在本发明的一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-trpR 和 W3110-trpR，重组菌 CGMCC22721-trpR 和 W3110-trpR 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 trpR 基因部分编码区进行敲除，同时插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 ilvH^{G14D、S17F} 基因，保持其基因组中的其它

10 核苷酸不变得到的重组菌。

在本发明的一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-lacIZ 和 W3110-lacIZ，重组菌 CGMCC22721-lacIZ 和 W3110-lacIZ 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 lacI-lacZ 基因部分编码区进行敲除，同时插入了 Pxy1F 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组

15 菌。

在本发明的一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-ycgH 和 W3110-ycgH，重组菌 CGMCC22721-ycgH 和 W3110-ycgH 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 ycgH 基因部分编码区进行敲除，同时插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvC 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

20 上述工程菌中，所述改造还可包括上述 A1）、A2）、A3）、A4）和 A5）这五种中的任两种、任三种、任四种或五种。

具体的，所述改造可为：上述 A1）与 A2），A1）与 A3），A1）与 A4），A1）与 A5），A2）与 A3），A2）与 A4），A2）与 A5），A3）与 A4），A3）与 A5），A4）与 A5），A1）、A2）与 A3），A1）、A2）与 A4），A1）、A2）与 A5），A1）、A3）与 A4），A1）、A3）与 A5），A1）、A4）与 A5），A2）、A3）与 A4），A2）、A3）与 A5），A2）、A4）与 A5），A3）、A4）与 A5），A1）、A2）、A3）与 A4），A1）、A2）、A3）与 A5），A1）、A2）、A4）与 A5），A1）、A3）、A4）与 A5），A2）、A3）、A4）与 A5），A1）、A2）、A3）、A4）与 A5）。

30 具体的，所述用于生产缬氨酸的工程菌还具有上述 B1）、B2）、B3）、B4）和 B5）中的任两种、任三种、任四种或五种特征。

在本发明的另一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV 和 W3110-yjiT-yjiV，重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV 和 W3110-yjiT-yjiV 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiT 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 brnF-brnE 基因（来自谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）ATCC13032）；同时将 yjiV 基因部

分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 *ilvE* 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 *PilvD* 启动子启动的 *ilvD* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

- 5 在本发明的另一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-*yjiV*-*trpR* 和 W3110-*yjiV*-*trpR*，重组菌 CGMCC22721-*yjiV*-*trpR* 和 W3110-*yjiV*-*trpR* 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 *yjiV* 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 *ilvE* 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 *PilvD* 启动子启动的 *ilvD* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110）；同时将 *trpR* 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因，保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

- 10 在本发明的另一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-*trpR*-*lacIZ* 和 W3110-*trpR*-*lacIZ*，重组菌 CGMCC22721-*trpR*-*lacIZ* 和 W3110-*trpR*-*lacIZ* 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 *trpR* 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因；同时将 *lacI-lacZ* 基因部分编码区进行敲除，插入了 *Pxy1F* 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

- 20 在本发明的另一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-*lacIZ*-*ycgH* 和 W3110-*lacIZ*-*ycgH*，重组菌 CGMCC22721-*lacIZ*-*ycgH* 和 W3110-*lacIZ*-*ycgH* 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 *lacI-lacZ* 基因部分编码区进行敲除，插入了 *Pxy1F* 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21）；同时将 *ycgH* 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 *ilvC* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

- 25 在本发明的另一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-*yjiT*-*yjiV*-*trpR* 和 W3110-*yjiT*-*yjiV*-*trpR*，重组菌 CGMCC22721-*yjiT*-*yjiV*-*trpR* 和 W3110-*yjiT*-*yjiV*-*trpR* 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 *yjiT* 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 *brnF-brnE* 基因（来自谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）ATCC13032）；将 *yjiV* 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 *ilvE* 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 *PilvD* 启动子启动的 *ilvD* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110）；同时将 *trpR* 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因，保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

在本发明的另一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiV-trpR-lacIZ，重组菌 CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiV-trpR-lacIZ 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiV 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110）；将 trpR 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 ilvH^{G140}、^{S17F} 基因；同时将 lacI-lacZ 基因部分编码区进行敲除，插入了 PxylF 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

在本发明的另一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-trpR-lacIZ-ycgH 和 W3110-trpR-lacIZ-ycgH 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 trpR 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 ilvH^{G140}、^{S17F} 基因；将 lacI-lacZ 基因部分编码区进行敲除，插入了 PxylF 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21）；同时将 ycgH 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvC 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

在本发明的另一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ，重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiT 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 brnF-brnE 基因（来自谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）ATCC13032）；将 yjiV 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110）；将 trpR 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 ilvH^{G140}、^{S17F} 基因；同时将 lacI-lacZ 基因部分编码区进行敲除，插入了 PxylF 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

在本发明的另一个实施例中，所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH 和 W3110-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH，重组菌 CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH 和 W3110-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiV 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因（来自枯草芽孢杆菌

Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168) 和 *PilvD* 启动子启动的 *ilvD* 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110); 将 *trpR* 基因部分编码区进行敲除, 插入了 *P_{trc}* 启动子启动的突变的 *ilvH^{G14D}、S17F* 基因; 将 *lacI-lacZ* 基因部分编码区进行敲除, 插入了 *P_{xylF}* 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21); 同时将 *ycgH* 基因部分编码区进行敲除, 插入了 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvC* 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110), 保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

在本发明的另一个实施例中, 所得重组菌为重组菌 CGMCC22721-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH* 和 W3110-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH*, 重组菌 CGMCC22721-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH* 和 W3110-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH* 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 *yjiT* 基因部分编码区进行敲除, 插入了 *P_{trc}* 启动子启动的 *brnF-brnE* 基因 (来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032); 将 *yjiV* 基因部分编码区进行敲除, 插入了 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvE* 基因 (来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*) 和 *PilvD* 启动子启动的 *ilvD* 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110); 将 *trpR* 基因部分编码区进行敲除, 插入了 *P_{trc}* 启动子启动的突变的 *ilvH^{G14D}、S17F* 基因; 将 *lacI-lacZ* 基因部分编码区进行敲除, 插入了 *P_{xylF}* 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21); 同时将 *ycgH* 基因部分编码区进行敲除, 插入了 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvC* 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110), 保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

本发明还提供了制备用于生产缬氨酸的工程菌的方法, 所述方法包括: 对受体菌进行上述 A1)、A2)、A3)、A4) 或 A5) 的改造, 得到目的工程菌; 所述受体菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

上述方法还可包括对所述受体菌进行上述 A1)、A2)、A3)、A4) 和 A5) 这五种中的任两种、任三种、任三种、任四种或五种的改造。

本发明还提供了 L-缬氨酸的制备方法, 所述方法包括: 培养所述工程菌, 得到 L-缬氨酸。

上述方法中, 培养所述工程菌可采用能使所述工程菌生长的培养基进行; 和/或, 培养所述重组工程菌采用能使所述工程菌生长的条件进行。

本发明还提供了一种用于生产 L-缬氨酸的产品, 所述产品为 P1)、P2)、P3)、P4)、P5) 中的任一种或由这五种中的任两种、任三种、任四种或五种组成的产品:

P1) 为分别或同步实现 A11)、A12) 和 A13) 的物质:

A11) 敲除受体菌的 *yjiT* 基因或抑制所述 *yjiT* 基因的表达或抑制所述 *yjiT*

基因编码的蛋白质的活性；

A12) 增加受体菌中 brnF 基因编码蛋白质的含量或增强所述 brnF 基因编码蛋白质的活性；

5 A13) 增加受体菌中 brnE 基因编码蛋白质的含量或增强所述 brnE 基因编码蛋白质的活性；

P2) 为分别或同步实现 A21)、A22) 和 A23) 的物质；

A21) 敲除受体菌的 yjiV 基因或抑制所述 yjiV 基因的表达或抑制所述 yjiV 基因编码的蛋白质的活性；

10 A22) 增加受体菌中 ilvE 基因编码蛋白质的含量或增强所述 ilvE 基因编码蛋白质的活性；

A23) 增加受体菌中 ilvD 基因编码蛋白质的含量或增强所述 ilvD 基因编码蛋白质的活性；

P3) 为分别或同步实现 A31) 和 A32) 的物质；

15 A31) 敲除受体菌的 trpR 基因或抑制所述 trpR 基因的表达或抑制所述 trpR 基因编码的蛋白质的活性；

A32) 增加受体菌中 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因编码蛋白质的含量或增强所述 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因编码蛋白质的活性；

P4) 为分别或同步实现 A41)、A42) 和 A43) 的物质；

20 A41) 敲除受体菌的 lacI 基因或抑制所述 lacI 基因的表达或抑制所述 lacI 基因编码的蛋白质的活性；

A42) 敲除受体菌的 lacZ 基因或抑制所述 lacZ 基因的表达或抑制所述 lacZ 基因编码的蛋白质的活性；

A43) 增加受体菌中 DNA 聚合酶的含量或增强所述 DNA 聚合酶的活性；

P5) 为分别或同步实现 A51) 和 A52) 的物质；

25 A51) 敲除受体菌的 ycgH 基因或抑制所述 ycgH 基因的表达或抑制所述 ycgH 基因编码的蛋白质的活性；

A52) 增加受体菌中 ilvC 基因编码蛋白质的含量或增强所述 ilvC 基因编码蛋白质的活性。

30 所述工程菌或所述产品在生产 L-缬氨酸中的应用，或在制备用于生产 L-缬氨酸产品中的应用，或在制备含有 L-缬氨酸的食品、饲料或药品中的应用，也属于本发明的保护范围。

35 本发明的工程菌及其制备方法与相关产品可以用于生产多种产物，包括但不限于实施例中的缬氨酸，所生产的产物还可为谷氨酸、苏氨酸、色氨酸、精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、组氨酸、莽草酸、原儿茶酸、丁二酸、α-酮戊二酸、柠檬酸、鸟氨酸，瓜氨酸等。

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。

保藏说明

- 5 分类命名：大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 。
菌株编号：YP045。
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。
10 保藏日期：2021 年 06 月 15 日。
保藏中心登记入册编号：CGMCC No. 22721。

附图说明

- 图 1、发酵培养基配方（其余为水）。
图 2、发酵控制工艺。
15 图 3、L-缬氨酸产量及显著性分析。

本发明的实施方式

- 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，
20 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 DNA/RNA 的 3' 末端核苷酸。

- 下述实施例中，L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) YP045，该菌株已于 2021 年 06 月 15 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC No. 22721。大肠埃希氏菌
25 (*Escherichia coli*) YP045 的保藏人宁夏伊品生物科技股份有限公司已经授权黑龙江伊品生物科技有限公司使用该菌株。

实施例 1、构建基因组上缺失 *yjiT* 基因同时过表达 *brnF-brnE* 基因的工程菌株。

- 30 依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因中的 *yjiT* 基因（经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 *yjiT* 基因（GeneID:945056，更新日期 2023-04-14）），同时插入 *P_{trc}* 启动子启动的 *brnF-brnE* 基因（branched chain amino acid exporter，支链氨基酸输出蛋白），
35 来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032，以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

一、sgRNA 的构建

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 使用 CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>) 设计 sgRNA 靶序列, 选择好合适的 sgRNA 靶序列后, 在靶序列的 5' 和 3' 最末端添加线性化 pGRB 克隆载体同源臂序列, 以便通过重组形成完整的 sgRNA 质粒。

- 5 扩增 sgRNA 片段, 无需模板, 只需进行 PCR 退火过程即可, 体系及程序如下: PCR 反应体系: sgRNA-1F 10 μ L, sgRNA-1R 10 μ L; PCR 反应程序: 95°C 变性 5min, 50°C 退火 1min。退火完成后, 采用 DNA 纯化试剂盒回收 sgRNA 目的 DNA 片段, 测定其 DNA 浓度, 并将浓度稀释至 100ng/ μ L。

- 10 将 pGRB 质粒利用 *Spe* I 酶切后再进行去磷酸化处理, 利用 Gibson Assembly 试剂盒 (New England 公司) 进行 sgRNA 和去磷酸化后的线性化质粒的重组。重组体系: NEB 组装酶 2.5 μ L, 去磷酸化后的线性化质粒 2 μ L, sgRNA 目的 DNA 片段 0.5 μ L。50°C 组装 30min 后将产物转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, 用测序引物 sgRNA-PF/sgRNA-PR 测序鉴定。将测序正确的质粒命名为 pGRB-sgRNA-1。

- 15 本实验所用引物如下 (上海 invitrogen 公司合成), 带下划线的核苷酸为 pGRB 克隆载体同源臂序列, 加粗的核苷酸为 sgRNA 序列:

sgRNA-1F: 5' - TGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATACTAGTGTACGCGTTGCCAATTCT ATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGG-3' (SEQ ID No. 14),

- 20 sgRNA-1R: 5' - CCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACATAGAATTGGCAACGCGT ACACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCA-3' (SEQ ID No. 15),

sgRNA-PF: 5' - GTCTCATGAGCGGATACATATTTG-3' (SEQ ID No. 16),

sgRNA-PR: 5' - GCGTCAGGTGCATAAACAGA-3' (SEQ ID No. 17)。

二、PCR 扩增同源重组片段

- 25 依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 设计并合成敲除 *yjiT* 基因的引物, 同时插入 *P_{trc}-brnF-brnE* 基因序列的引物, 以 CRISPR/Cas9 基因编辑的方式敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因中的 *yjiT* 基因, 同时插入 *P_{trc}* 启动子启动的 *brnF-brnE* 基因 (来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032)。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成):

- 30 P1: 5' - GAGTGATGAGCGGTTGAAG-3' (SEQ ID No. 18),

P2:

5' - CTCACAATTCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAAAAACAGGCAGCAAAGTCC-3' (SEQ ID No. 19),

- 35 P3: 5' - CGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCGTGCA AAAAAACGCAAGAG-3' (SEQ ID No. 20),

P4: 5' - CTTACAGGTAGTGCTTTTAGTTAGAAAAGATTACACAGTCCAAC-3' (SEQ ID No. 21),

P5: 5'-GTGAATCTTTTCTAACTAAAAGCACTACCTGTGAAGG-3' (SEQ ID No. 22),
P6: 5'-CTGCGGCAATAATCAACG-3' (SEQ ID No. 23)。

以大肠杆菌 W3110 基因组 DNA 为模板, 以引物 P1/P2、P5/P6 和 KAPA HiFi HotStart (上海华雅思创生物科技有限公司, KK2601) 进行 PCR 扩增, 获得大小分别为 801bp 的上同源臂和 684bp 和下同源臂片段; 以谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 基因组 DNA 为模板, 以引物 P3/P4 和 KAPA HiFi HotStart 进行 PCR 扩增, 获得大小为 1153bp 的 P_{trc}-brnF-brnE 基因片段。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。回收后的 DNA 以引物 P1/P6 进行 overlap PCR 获得同源重组 DNA 片段 $\Delta yjiT$ -P_{trc}-brnF-brnE (SEQ ID No. 1), 大小为 2579 bp。

SEQ ID No. 1 中, 第 758-831 位所示为 P_{trc} 启动子, 第 832-1910 位所示为 brnF-brnE 基因, 编码 SEQ ID No. 2 所示的 brnF 蛋白质 (编码序列为 SEQ ID No. 1 的第 832-1587 位) 与 SEQ ID No. 3 所示的 brnE 蛋白质 (编码序列为 SEQ ID No. 1 的第 1584-1910 位)。

三、感受态的制备及转化

提取 pREDCas9 质粒 (含有壮观霉素抗性基因), 分别转化到 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和大肠杆菌 W3110 感受态细胞中, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养, 挑选抗壮观霉素 (100mg/L) 的单菌落用引物 pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定, 获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒的 CGMCC22721-Cas9 和 W3110-Cas9 转化子。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成):

pRedCas9-PF: 5'-GCAGTGGCGGTTTTTCATG-3' (SEQ ID No. 24);

pRedCas9-PR: 5'-CCTTGGTGATCTCGCCTTTC-3' (SEQ ID No. 25)。

制备 CGMCC22721-Cas9 和 W3110-Cas9 感受态细胞。当菌体长至 OD₆₀₀=0.1 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ -Red 介导的同源重组。当 OD₆₀₀=0.4 时, 收集菌体制备感受态细胞, 并分别转化 pGRB-sgRNA-1 质粒和同源重组 DNA 片段 $\Delta yjiT$ -P_{trc}-brnF-brnE, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 和氨苄霉素 (100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P7/P8 进行 PCR 鉴定, PCR 扩增出大小 1720bp 片段的为阳性转化子。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成):

P7: 5'-GCTGTATTCTTATGTGGACC-3' (SEQ ID No. 26),

P8: 5'-GCAGGAATCCAAAGTCAGC-3' (SEQ ID No. 27)。

将阳性转化子接种于含壮观霉素 (100mg/L) 和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-1, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上生长而在氨苄霉素 (100mg/L) 上不生长的菌落, 再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落, 再次通过引物 P1/P6 进行 PCR 鉴定, 能扩增出大小

2579bp (SEQ ID No. 1) 片段的为阳性子, 将阳性子送测序, 测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-yjiT 和 W3110-yjiT;

重组菌 CGMCC22721-yjiT 和 W3110-yjiT 均缺失 yjiT 基因, 同时过表达 Ptrc 启动子启动的 brnF-brnE 基因 (来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032); 具体地, 重组菌 CGMCC22721-yjiT 和 W3110-yjiT 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiT 基因部分编码区进行敲除, 同时插入了 Ptrc 启动子启动的 brnF-brnE 基因 (来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032), 保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

10 实施例 2、构建基因组上缺失 yjiV 基因同时过表达 ilvE-ilvD 基因的工程菌株。

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因中的 yjiV 基因 (经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 yjiV 基因 (GeneID:2847669, 更新日期 2023-04-14), 同时插入 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因 (branched-chain amino-acid aminotransferase, 支链氨基酸转氨酶, 来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*) 和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因 (dihydroxyacid dehydratase, 二羟基酸脱水酶, 来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110), 以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

一、sgRNA 的构建

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 使用 CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>) 设计 sgRNA 靶序列, 选择好合适的 sgRNA 靶序列后, 在靶序列的 5' 和 3' 最末端添加线性化 pGRB 克隆载体同源臂序列, 以便通过重组形成完整的 sgRNA 质粒。

扩增 sgRNA 片段, 无需模板, 只需进行 PCR 退火过程即可, 体系及程序如下: PCR 反应体系: sgRNA-2F 10 μ L, sgRNA-2R 10 μ L; PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1min。退火完成后, 采用 DNA 纯化试剂盒回收 sgRNA 目的 DNA 片段, 测定其 DNA 浓度, 并将浓度稀释至 100ng/ μ L。

将 pGRB 质粒利用 *Spe* I 酶切后再进行去磷酸化处理, 利用 Gibson Assembly 试剂盒 (New England 公司) 进行 sgRNA 和去磷酸化后的线性化质粒的重组。重组体系: NEB 组装酶 2.5 μ L, 去磷酸化后的线性化质粒 2 μ L, sgRNA 目的 DNA 片段 0.5 μ L。50 $^{\circ}$ C 组装 30min 后将产物转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, 用测序引物 sgRNA-PF/sgRNA-PR 测序鉴定。将测序正确的质粒命名为 pGRB-sgRNA-2。

本实验所用引物如下 (上海 invitrogen 公司合成), 带下划线的核苷酸为 pGRB 克隆载体同源臂序列, 加粗的核苷酸为 sgRNA 序列:

sgRNA-2F: 5'-TGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATACTAGTCTATTGATATTATCAATACAGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGG-3' (SEQ ID No. 28),

sgRNA-2R: 5'-CCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACTGTATTGATAATATCAATAGACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCA-3' (SEQ ID No. 29)。

5 二、PCR 扩增同源重组片段

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 设计并合成敲除 *yjiV* 基因的引物, 同时插入 *P_{trc}-ilvE* 基因和 *PilvD-ilvD* 基因的引物, 以 CRISPR/Cas9 基因编辑的方式敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因中的 *yjiV* 基因, 同时插入 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvE* 基因 (来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*) 和 *PilvD* 启动子启动的 *ilvD* 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110)。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成):

P9: 5'-TGAATGGACTGCTATGCG-3' (SEQ ID No. 30),

P10: 5'-CACAGTGTATTAAGCAGACGTTAACAACGCAGTACTTCCTGCTG-3' (SEQ ID No. 31),

P11: 5'-GAAGTACTGCGTTGTAAACGTCTGCTTAATACACTGTG-3' (SEQ ID No. 32),

P12: 5'-GTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGGA ACTTTTTAAATATATGGAG-3' (SEQ ID No. 33),

P13: 5'-CTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAATTAACCCCCCAGT TTCGATTTAT-3' (SEQ ID No. 34),

P14: 5'-CCACCAGCACATCCGTTGAAATACAAAAAATGGGAC-3' (SEQ ID No. 35),

P15: 5'-TCCCATTTTTTGTATTTCAACGGATGTGCTGGTGG-3' (SEQ ID No. 36),

P16: 5'-TGAAGACACGCTGGCTAAC-3' (SEQ ID No. 37)。

以大肠杆菌 W3110 基因组 DNA 为模板, 以引物 P9/P10、P13/P14、P15/P16 和 KAPA HiFi HotStart 进行 PCR 扩增, 获得大小分别为 831bp 的上同源臂、1979bp 的 *PilvD-ilvD* 基因和 856bp 下同源臂片段; 以枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168* 基因组 DNA 为模板, 以引物 P11/P12 和 KAPA HiFi HotStart 进行 PCR 扩增, 获得大小为 1161bp 的 *P_{trc}-ilvE* 基因。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。回收后的 DNA 以引物 P9/P16 进行 overlap PCR 获得同源重组 DNA 片段 $\Delta yjiV$ -*P_{trc}-ilvE*-*PilvD-ilvD* (SEQ ID No. 4), 大小为 4732 bp。

SEQ ID No. 4 中, 第 3828-3893 位所示为 *PilvD* 启动子, 第 1977-3827 位所示为 *ilvD* 基因, 编码 SEQ ID No. 5 所示的 *ilvD* 蛋白质; 第 1903-1976 位所示为 *P_{trc}* 启动子, 第 808-1902 位所示为 *ilvE* 基因, 编码 SEQ ID No. 6 所示的 *ilvE* 蛋白质。

35 三、感受态的制备及转化

将实施例 1 的 CGMCC22721-Cas9 和 W3110-Cas9 制备感受态细胞。当菌体长至 $OD_{600}=0.1$ 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ -Red 介导的同源重组。当 $OD_{600}=0.4$ 时, 收集菌体制备感受态细胞, 并分别转化 pGRB-sgRNA-2 质粒和同源重组 DNA 片段 $\Delta yjiV$ -Ptrc-ilvE-PilvD-ilvD, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 和氨苄霉素 (100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P17/P18 进行 PCR 鉴定, PCR 扩增出大小 1543bp 片段的为阳性转化子。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成):

P17: 5'-AGCGAGTTTCCAATACCG-3' (SEQ ID No. 38),

P18: 5'-ATTTCTCCTGCTTTCGGC-3' (SEQ ID No. 39)。

将阳性转化子接种于含壮观霉素 (100mg/L) 和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-2, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上生长而在氨苄霉素 (100mg/L) 上不生长的菌落, 再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落, 再次通过引物 P9/P16 进行 PCR 鉴定, 能扩增出大小 4732bp (SEQ ID No. 4) 片段的为阳性子, 将阳性子送测序, 测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-yjiV 和 W3110-yjiV;

重组菌 CGMCC22721-yjiV 和 W3110-yjiV 均缺失 yjiV 基因, 同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因 (来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*) 和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110); 具体地, 重组菌 CGMCC22721-yjiV 和 W3110-yjiV 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiV 基因编码区进行敲除, 同时插入 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因 (来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*) 和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110), 保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 3、构建基因组上缺失 trpR 基因同时过表达 ilvH 基因的工程菌株。

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因中的 trpR 基因 (经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 trpR 基因 (DNA-binding transcriptional repressor, DNA 结合转录抑制因子; GeneID:948917, 更新日期 2023-04-14), 同时插入 Ptrc 启动子启动的 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因 (acetolactate synthase, 乙酰乳酸合成酶), 以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

一、sgRNA 的构建

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 使用 CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>) 设计 sgRNA 靶序

列, 选择好合适的 sgRNA 靶序列后, 在靶序列的 5' 和 3' 最末端添加线性化 pGRB 克隆载体同源臂序列, 以便通过重组形成完整的 sgRNA 质粒。

扩增 sgRNA 片段, 无需模板, 只需进行 PCR 退火过程即可, 体系及程序如下: PCR 反应体系: sgRNA-3F 10 μ L, sgRNA-3R 10 μ L; PCR 反应程序: 95°C 变性 5min, 50°C 退火 1min。退火完成后, 采用 DNA 纯化试剂盒回收 sgRNA 目的 DNA 片段, 测定其 DNA 浓度, 并将浓度稀释至 100ng/ μ L。

将 pGRB 质粒利用 *Spe* I 酶切后再进行去磷酸化处理, 利用 Gibson Assembly 试剂盒 (New England 公司) 进行 sgRNA 和去磷酸化后的线性化质粒的重组。重组体系: NEB 组装酶 2.5 μ L, 去磷酸化后的线性化质粒 2 μ L, sgRNA 目的 DNA 片段 0.5 μ L。50°C 组装 30min 后将产物转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, 用测序引物 sgRNA-PF/sgRNA-PR 测序鉴定。将测序正确的质粒命名为 pGRB-sgRNA-3。

本实验所用引物如下 (上海 invitrogen 公司合成), 带下划线的核苷酸为 pGRB 克隆载体同源臂序列, 加粗的核苷酸为 sgRNA 序列:

15 sgRNA-3F: 5'-TGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATACTAGTCGTGAGTTAAAAATGAACTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGG-3' (SEQ ID No. 40),

sgRNA-3R: 5'-CCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAGTTTCATTTTTTAACTCACGACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCA-3' (SEQ ID No. 41)。

二、PCR 扩增同源重组片段

20 依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 设计并合成敲除 *trpR* 基因的引物, 以及插入 *P_{trc}-ilvH^{G14D}、S17F* 基因序列的引物, 以 CRISPR/Cas9 基因编辑的方式敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因中的 *trpR* 基因, 同时插入 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvH^{G14D}、S17F* 基因。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成):

25 P19: 5'-CCAATCTGGTGAAGAGCAAG-3' (SEQ ID No. 42),

P20: 5'-CTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGA TGATTAATTGTCAATGCTGAATAGGGTGATTGTTG-3' (SEQ ID No. 43),

P21: 5'-CAATTTACACAGGAAACAGACCATGCGCCGGATATTATCAGTCTTACTCGAAAATG AATCAGACGCGTTATTCCGC-3' (SEQ ID No. 44),

30 P22: 5'-GTCTTATCATGCCTACCAAATCAACGCATTATTTTATCG-3' (SEQ ID No. 45),

P23: 5'-CGATAAAATAATGCGTTGATTGGTAGGCATGATAAGAC-3' (SEQ ID No. 56),

P24: 5'-GTGCGTCCTAAATCGCTAC-3' (SEQ ID No. 47)。

以大肠杆菌 W3110 基因组 DNA 为模板, 以引物 P19/P20、P21/P22、P23/P24 和 KAPA HiFi HotStart 进行 PCR 扩增, 获得大小分别为 831bp 的上同源臂、535bp 的 *P_{trc}-ilvH^{G14D}、S17F* 基因和 801bp 和下同源臂片段; 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。回收后的 DNA 以引物

P19/P24 进行 overlap PCR 获得同源重组 DNA 片段 Δ trpR-Ptrc-ilvH (SEQ ID No. 7), 大小为 2108 bp。

SEQ ID No. 7 中, 第 761-834 位所示为 Ptrc 启动子, 第 835-1326 位所示为 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因, 编码 SEQ ID No. 8 所示的 ilvH^{G14D}、^{S17F} 蛋白质。

5 三、感受态的制备及转化

将实施例 1 的 CGMCC22721-Cas9 和 W3110-Cas9 制备感受态细胞。当菌体长至 OD₆₀₀=0.1 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ -Red 介导的同源重组。当 OD₆₀₀=0.4 时, 收集菌体制备感受态细胞, 并分别转化 pGRB-sgRNA-3 质粒和同源重组 DNA 片段 Δ trpR-Ptrc-ilvH, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 和氨苄霉素 (100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P25/P26 进行 PCR 鉴定, PCR 扩增出大小 1437bp 片段的为阳性转化子。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成):

P25: 5'-CATCGGCGAAGAGTATGAG-3' (SEQ ID No. 48),

P26: 5'-AAAGTCCGACCACACCAGAG-3' (SEQ ID No. 49)。

15 将阳性转化子接种于含壮观霉素 (100mg/L) 和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-3, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上生长而在氨苄霉素 (100mg/L) 上不生长的菌落, 再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落, 再次通过引物 P19/P24 进行 PCR 鉴定, 能扩增出大小 2108bp (SEQ ID No. 7) 片段的为阳性子, 将阳性子送测序, 测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-trpR 和 W3110-trpR;

20 重组菌 CGMCC22721-trpR 和 W3110-trpR 均缺失 trpR 基因, 同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因; 具体地, 重组菌 CGMCC22721-trpR 和 W3110-trpR 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 trpR 基因部分编码区进行敲除, 同时插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因, 保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 4、构建基因组上缺失 lacI-lacZ 基因同时过表达 DNA 聚合酶基因的工程菌株。

30 依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因中的 lacI-lacZ 基因 (经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 lacI-lacZ 基因 (DNA-binding transcriptional repressor, DNA 结合转录抑制因子; beta-D-galactosidase, β -D- 半乳糖苷酶; lacI GeneID:945007, 更新日期 2023-04-14; lacZ GeneID:945006, 更新日期 2023-04-14), 同时插入 Pxy1F 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21), 以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

一、sgRNA 的构建

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 使用 CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>) 设计 sgRNA 靶序列, 选择好合适的 sgRNA 靶序列后, 在靶序列的 5' 和 3' 最末端添加线性化 pGRB 克隆载体同源臂序列, 以便通过重组形成完整的 sgRNA 质粒。

- 5 扩增 sgRNA 片段, 无需模板, 只需进行 PCR 退火过程即可, 体系及程序如下: PCR 反应体系: sgRNA-4F 10 μ L, sgRNA-4R 10 μ L; PCR 反应程序: 95°C 变性 5min, 50°C 退火 1min。退火完成后, 采用 DNA 纯化试剂盒回收 sgRNA 目的 DNA 片段, 测定其 DNA 浓度, 并将浓度稀释至 100ng/ μ L。

- 10 将 pGRB 质粒利用 *Spe* I 酶切后再进行去磷酸化处理, 利用 Gibson Assembly 试剂盒 (New England 公司) 进行 sgRNA 和去磷酸化后的线性化质粒的重组。重组体系: NEB 组装酶 2.5 μ L, 去磷酸化后的线性化质粒 2 μ L, sgRNA 目的 DNA 片段 0.5 μ L。50°C 组装 30min 后将产物转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, 用测序引物 sgRNA-PF/sgRNA-PR 测序鉴定。将测序正确的质粒命名为 pGRB-sgRNA-4。

- 15 本实验所用引物如下 (上海 invitrogen 公司合成), 带下划线的核苷酸为 pGRB 克隆载体同源臂序列, 加粗的核苷酸为 sgRNA 序列:

sgRNA-4F: 5' -TGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATACTAGTTCAGTCCCGCTTTCCAGTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGG-3' (SEQ ID No. 50),

- sgRNA-4R: 5' -CCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGACTGGAAAGCGGGCAGTGAAGTACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCA-3' (SEQ ID No. 51)。

二、PCR 扩增同源重组片段

- 依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 设计并合成敲除 *lacI-lacZ* 基因序列的引物, 以及插入 *Pxy1F-DNA* 聚合酶基因序列的引物, 以 CRISPR/Cas9 基因编辑的方式敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因中的 *lacI-lacZ* 基因, 同时插入 *Pxy1F* 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21)。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成):

- P27: 5' -CGGTAATAATCCACAGCAGG-3' (SEQ ID No. 52),
 P28: 5' -GACTTCGCGTTTCGCGTAACAGGTAGCAGAGCGGGTA-3' (SEQ ID No. 53),
 30 P29: 5' -TACCCGCTCTGCTACCTGTTACGCGAACGCGAAGTC-3' (SEQ ID No. 54),
 P30: 5' -CTAACTACAGAAGGCCCTACACCATGAACACGATTAACATCGC-3' (SEQ ID No. 55),
 P31: 5' -GCGATGTTAATCGTGTTTCATGGTGTAGGGCCTTCTGTAGTTAG-3' (SEQ ID No. 56),
 35 P32: 5' -CATTAAGTTCTGTCTCGGCGGAGATAATTCACAAGTGTGCG-3' (SEQ ID No. 57),
 P33: 5' -CGCACACTTGTGAATTATCTCCGCCGAGACAGAACTTAATG-3' (SEQ ID

No. 58) ,

P34: 5'-GGTTACGGACAGAACTACCG-3' (SEQ ID No. 59) 。

以大肠杆菌 W3110 基因组 DNA 为模板, 以引物 P27/P28、P31/P32、P33/P34 和 KAPA HiFi HotStart 进行 PCR 扩增, 获得大小分别为 718bp 的上同源臂、305bp 的 Pxy1F 启动子和 928bp 和下同源臂片段; 以大肠杆菌 BL21 基因组 DNA 为模板, 以引物 P29/P30 和 KAPA HiFi HotStart 进行 PCR 扩增, 获得大小为 2693bp 的 DNA 聚合酶基因。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。回收后的 DNA 以引物 P27/P34 进行 overlap PCR 获得同源重组 DNA 片段 Δ lacIZ-Pxy1F-DNA polymerase (SEQ ID No. 9), 大小为 4524 bp。

SEQ ID No. 9 中, 第 3353-3617 位所示为 Pxy1F 启动子, 第 701-3352 位所示为 DNA 聚合酶基因, 编码 SEQ ID No. 10 所示的 DNA 聚合酶。

三、感受态的制备及转化

将实施例 1 的 CGMCC22721-Cas9 和 W3110-Cas9 制备感受态细胞。当菌体长至 $OD_{600}=0.1$ 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ -Red 介导的同源重组。当 $OD_{600}=0.4$ 时, 收集菌体制备感受态细胞, 并分别转化 pGRB-sgRNA-4 质粒和同源重组 DNA 片段 Δ lacIZ-Pxy1F-DNA polymerase, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 和氨苄霉素 (100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32°C 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P35/P36 进行 PCR 鉴定, PCR 扩增出大小 1655bp 片段的为阳性转化子。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成):

P35: 5'-TTCGCCCATTGTCGTTAC-3' (SEQ ID No. 60) ,

P36: 5'-AGTTCCGCTTACAGCCTACC-3' (SEQ ID No. 61) 。

将阳性转化子接种于含壮观霉素 (100mg/L) 和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-4, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上生长而在氨苄霉素 (100mg/L) 上不生长的菌落, 再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42°C 培养以消除 pREDCas9 质粒, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落, 再次通过引物 P27/P34 进行 PCR 鉴定, 能扩增出大小 4524bp (SEQ ID No. 9) 片段的为阳性子, 将阳性子送测序, 测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-lacIZ 和 W3110-lacIZ;

重组菌 CGMCC22721-lacIZ 和 W3110-lacIZ 均缺失 lacI-lacZ 基因, 同时过表达 Pxy1F 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21); 具体地, 重组菌 CGMCC22721-lacIZ 和 W3110-lacIZ 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 lacI-lacZ 基因部分编码区进行敲除, 同时插入了 Pxy1F 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21), 保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 5、构建基因组上缺失 ycgH 基因同时过表达 ilvC 基因的工程菌株。

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因中的 *ycgH* 基因 (经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 *ycgH* 基因 (GeneID:2847703, 更新日期 2023-04-14)), 同时插入 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvC* 基因 (ketol-acid reductoisomerase, 酮醇酸还原异构酶, 来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110), 以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

一、sgRNA 的构建

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 使用 CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>) 设计 sgRNA 靶序列, 选择好合适的 sgRNA 靶序列后, 在靶序列的 5' 和 3' 最末端添加线性化 pGRB 克隆载体同源臂序列, 以便通过重组形成完整的 sgRNA 质粒。

扩增 sgRNA 片段, 无需模板, 只需进行 PCR 退火过程即可, 体系及程序如下: PCR 反应体系: sgRNA-5F 10 μ L, sgRNA-5R 10 μ L; PCR 反应程序: 95°C 变性 5min, 50°C 退火 1min。退火完成后, 采用 DNA 纯化试剂盒回收 sgRNA 目的 DNA 片段, 测定其 DNA 浓度, 并将浓度稀释至 100ng/ μ L。

将 pGRB 质粒利用 *Spe* I 酶切后再进行去磷酸化处理, 利用 Gibson Assembly 试剂盒 (New England 公司) 进行 sgRNA 和去磷酸化后的线性化质粒的重组。重组体系: NEB 组装酶 2.5 μ L, 去磷酸化后的线性化质粒 2 μ L, sgRNA 目的 DNA 片段 0.5 μ L。50°C 组装 30min 后将产物转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, 用测序引物 sgRNA-PF/sgRNA-PR 测序鉴定。将测序正确的质粒命名为 pGRB-sgRNA-5。

本实验所用引物如下 (上海 invitrogen 公司合成), 带下划线的核苷酸为 pGRB 克隆载体同源臂序列, 加粗的核苷酸为 sgRNA 序列:

sgRNA-5F: 5'-TGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATACTAGTCCCGTCCTGCGCCCCGAA GCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGG-3' (SEQ ID No. 62),

sgRNA-5R: 5'-CCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGCTTCGGGGCGCAGGACG GGACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCA-3' (SEQ ID No. 63)。

二、PCR 扩增同源重组片段

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 设计并合成敲除 *ycgH* 基因的引物, 以及插入 *P_{trc}-ilvC* 基因的引物, 以 CRISPR/Cas9 基因编辑的方式敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因中的 *ycgH* 基因, 同时插入 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvC* 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110)。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成):

P37: 5'-AAATGGAGGGATAACAGCC-3' (SEQ ID No. 64),

P38: 5'-GCTGTTGCGGGTTAACGCTCCATTTAGAAATAGAGTCGGACGAAAT-3' (SEQ ID

No. 65) ,

P39: 5'-CTAAATGGAGCGTTAACCCGCAACAGCAATAC-3' (SEQ ID No. 66) ,

P40:

5'-GCCATTTACGCCAAGTTTTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAG-3'

5 (SEQ ID No. 67) ,

P41: 5'-CAGTGTATTGAAGTAGTTAGCCATGGTCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
ACAATTCCACACATTATAC-3' (SEQ ID No. 68) ,

P42: 5'-TTGCCTTCGGGCTTATCTC-3' (SEQ ID No. 69) 。

10 以大肠杆菌 W3110 基因组 DNA 为模板, 以引物 P37/P38、P39/P40、P41/P42
和 KAPA HiFi HotStart 进行 PCR 扩增, 获得大小分别为 808bp 的上同源臂、1580bp
的 *P_{trc}-ilvC* 基因和 944bp 和下同源臂片段; 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。回收后的 DNA 以引物 P37/P42 进
行 overlap PCR 获得同源重组 DNA 片段 $\Delta ycgH$ -*P_{trc}-ilvC* (SEQ ID No. 11) ,
大小为 3189 bp。

15 SEQ ID No. 11 中, 第 2270-2343 位所示为 *P_{trc}* 启动子, 第 794-2269 位所
示为 *ilvC* 基因, 编码 SEQ ID No. 12 所示的 *ilvC* 蛋白质。

四、感受态的制备及转化

20 将实施例 1 的 CGMCC22721-Cas9 和 W3110-Cas9 制备感受态细胞。当菌体长
至 $OD_{600}=0.1$ 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ -Red 介导的同源重组。当
 $OD_{600}=0.4$ 时, 收集菌体制备感受态细胞, 并分别转化 pGRB-sgRNA-5 质粒和同源
重组 DNA 片段 $\Delta ycgH$ -*P_{trc}-ilvC*, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 和氨苄霉素
(100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32°C 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通
过引物 P43/P44 进行 PCR 鉴定, PCR 扩增出大小 1669bp 片段的为阳性转化子。

引物如下 (上海 invitrogen 公司合成) :

25 P43: 5'-AAGACCTCTGGAAGCGTATC-3' (SEQ ID No. 70) ,

P44: 5'-CGTTGCGGAAGTGAAATC-3' (SEQ ID No. 71) 。

30 将阳性转化子接种于含壮观霉素 (100mg/L) 和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的
2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-5, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上生长
而在氨苄霉素 (100mg/L) 上不生长的菌落, 再将这些菌落转接到 2-YT 培养基
上 42°C 培养以消除 pREDCas9 质粒, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上不生长而在
无抗的 2-YT 上生长的菌落, 再次通过引物 P37/P42 进行 PCR 鉴定, 能扩增出大
小 3189bp (SEQ ID No. 11) 片段的为阳性子, 将阳性子送测序, 测序结果正确
的菌株分别命名为 CGMCC22721-*ycgH* 和 W3110-*ycgH*;

35 重组菌 CGMCC22721-*ycgH* 和 W3110-*ycgH* 均缺失 *ycgH* 基因, 同时过表达 *P_{trc}*
P_{trc} 启动子启动的 *ilvC* 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110); 具体
地, 重组菌 CGMCC22721-*ycgH* 和 W3110-*ycgH* 分别是将 L-缬氨酸生产菌
CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 *ycgH* 基因部分编码区进行敲除,

同时插入了 P_{trc} 启动子启动的 *ilvC* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 6、构建 CGMCC22721-yjiT 和 W3110-yjiT 上缺失 *yjiV* 基因同时过表达 *ilvE-ilvD* 基因的工程菌株。

- 5 依据 NCBI 公布的大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110 基因组序列，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-yjiT 和野生型大肠杆菌 W3110-yjiT 基因组中的 *yjiV* 基因（经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 *yjiV* 基因），同时插入 P_{trc} 启动子启动的 *ilvE* 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 P_{ilvD} 启动子启动的 *ilvD* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

一、PCR 扩增同源重组片段

- 依据 NCBI 公布的大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110 基因组序列，设计并合成敲除 *yjiV* 基因的引物，同时插入 P_{trc-ilvE} 基因和 P_{ilvD-ilvD} 基因的引物，以 CRISPR/Cas9 基因编辑的方式敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-yjiT 和野生型大肠杆菌 W3110-yjiT 基因组中的 *yjiV* 基因，同时插入 P_{trc} 启动子启动的 *ilvE* 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*）和 P_{ilvD} 启动子启动的 *ilvD* 基因。

引物如下（上海 invitrogen 公司合成）：

- 20 P45: 5'-AGTTCGCCCTTTGCTCTCTC-3'（SEQ ID No. 72）。

- 以大肠杆菌 W3110-yjiT 基因组 DNA 为模板，以引物 P45/P10、P13/P14、P15/P16 和 KAPA HiFi HotStart 进行 PCR 扩增，获得大小分别为 812bp 的上同源臂、1979bp 的 P_{ilvD-ilvD} 基因和 856bp 下同源臂片段；以枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168* 基因组 DNA 为模板，以引物 P11/P12 和 KAPA HiFi HotStart 进行 PCR 扩增，获得大小为 1161bp 的 P_{trc-ilvE} 基因。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。回收后的 DNA 以引物 P45/P16 进行 overlap PCR 获得同源重组 DNA 片段 Δ*yjiV*-P_{trc-ilvE}-P_{ilvD-ilvD}-2（SEQ ID No. 13），大小为 4713 bp。

- 30 SEQ ID No. 13 中，第 3809-3874 位所示为 P_{ilvD} 启动子，第 1958-3808 位所示为 *ilvD* 基因，编码 SEQ ID No. 5 所示的 *ilvD* 蛋白质；第 1884-1957 位所示为 P_{trc} 启动子，第 789-1883 位所示为 *ilvE* 基因，编码 SEQ ID No. 6 所示的 *ilvE* 蛋白质。

二、感受态的制备及转化

- 35 提取 pREDCas9 质粒（含有壮观霉素抗性基因），分别转化到实施例 1 的 CGMCC22721-yjiT 和 W3110-yjiT 感受态细胞中，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养，挑选抗壮观霉素（100mg/L）的单菌落用引物 pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定，获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒

的 CGMCC22721-yjiT-Cas9 和 W3110-yjiT-Cas9 转化子。

制备 CGMCC22721-yjiT-Cas9 和 W3110-yjiT-Cas9 感受态细胞。当菌体长至 $OD_{600}=0.1$ 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ -Red 介导的同源重组。当 $OD_{600}=0.4$ 时，收集菌体制备感受态细胞，并分别转化实施例 2 的 pGRB-sgRNA-2 质粒和同源重组 DNA 片段 $\Delta yjiV$ -Ptrc-ilvE-PilvD-ilvD-2，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）和氨苄霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P46/P18 进行 PCR 鉴定，PCR 扩增出大小 1561bp 片段的为阳性转化子。

引物如下（上海 invitrogen 公司合成）：

10 P46: 5'-AGCGTTTCACTCCTACTGGG-3' (SEQ ID No. 73)。

将阳性转化子接种于含壮观霉素（100mg/L）和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-2，挑选在壮观霉素（100mg/L）上生长而在氨苄霉素（100mg/L）上不生长的菌落，再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒，挑选在壮观霉素（100mg/L）上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落，再次通过引物 P45/P16 进行 PCR 鉴定，能扩增出大小 4713bp (SEQ ID No. 13) 片段的为阳性子，将阳性子送测序，测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-yjiT-yjiV 和 W3110-yjiT-yjiV；

重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV 和 W3110-yjiT-yjiV 均缺失 yjiT 基因，过表达 Ptrc 启动子启动的 brnF-brnE 基因（来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032）；缺失 yjiV 基因，过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110）；具体地，重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV 和 W3110-yjiT-yjiV 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiT 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 brnF-brnE 基因（来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032）；同时将 yjiV 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 7、构建 CGMCC22721-yjiT-yjiV 和 W3110-yjiT-yjiV 上缺失 trpR 基因同时过表达 ilvH 基因的工程菌株。

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV 和野生型大肠杆菌 W3110-yjiT-yjiV 基因中的 trpR 基因（经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 trpR 基因），同时插入 Ptrc 启动子启动的 ilvH^{G140}、^{S17F} 基因，以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

提取 pREDCas9 质粒（含有壮观霉素抗性基因），分别转化到实施例 6 的 CGMCC22721-yjiT-yjiV 和 W3110-yjiT-yjiV 感受态细胞中，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养，挑选抗壮观霉素（100mg/L）的单菌落用引物 pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定，获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒的 CGMCC22721-yjiT-yjiV-Cas9 和 W3110-yjiT-yjiV-Cas9 转化子。

制备 CGMCC22721-yjiT-yjiV-Cas9 和 W3110-yjiT-yjiV-Cas9 感受态细胞。当菌体长至 OD₆₀₀=0.1 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ-Red 介导的同源重组。当 OD₆₀₀=0.4 时，收集菌体制备感受态细胞，并分别转化实施例 3 的 pGRB-sgRNA-3 质粒和同源重组 DNA 片段 Δ trpR-Ptrc-ilvH，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）和氨苄霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P25/P26 进行 PCR 鉴定，PCR 扩增出大小 1437bp 片段的为阳性转化子。

将阳性转化子接种于含壮观霉素（100mg/L）和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-3，挑选在壮观霉素（100mg/L）上生长而在氨苄霉素（100mg/L）上不生长的菌落，再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒，挑选在壮观霉素（100mg/L）上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落，再次通过引物 P19/P24 进行 PCR 鉴定，能扩增出大小 2108bp（SEQ ID No. 7）片段的为阳性子，将阳性子送测序，测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR；

重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR 均缺失 yjiT 基因，同时过表达 Ptrc 启动子启动的 brnF-brnE 基因（来自谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032）；缺失 yjiV 基因，同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因（来自大肠杆菌 *Escherichia coli* W3110）；缺失 trpR 基因，同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因。具体地，重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiT 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 brnF-brnE 基因（来自谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032）；将 yjiV 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因（来自大肠杆菌 *Escherichia coli* W3110）；同时将 trpR 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因，保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 8、构建 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR 上缺失 lacI-lacZ 基因同时过表达 DNA 聚合酶基因的工程菌株。

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR 和野生型大肠杆菌 W3110-yjiT-yjiV-trpR 基因中的 lacI-lacZ 基因 (经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 lacI-lacZ 基因), 同时插入 P_{xylF} 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21), 以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

提取 pREDCas9 质粒 (含有壮观霉素抗性基因), 分别转化到实施例 7 的 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR 感受态细胞中, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养, 挑选抗壮观霉素 (100mg/L) 的单菌落用引物 pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定, 获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒的 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-Cas9 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR-Cas9 转化子。

制备 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-Cas9 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR-Cas9 感受态细胞。当菌体长至 OD₆₀₀=0.1 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ-Red 介导的同源重组。当 OD₆₀₀=0.4 时, 收集菌体制备感受态细胞, 并分别转化实施例 4 的 pGRB-sgRNA-4 质粒和同源重组 DNA 片段 ΔlacIZ-P_{xylF}-DNA polymerase, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 和氨苄霉素 (100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P35/P36 进行 PCR 鉴定, PCR 扩增出大小 1655bp 片段的为阳性转化子。

将阳性转化子接种于含壮观霉素 (100mg/L) 和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-4, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上生长而在氨苄霉素 (100mg/L) 上不生长的菌落, 再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落, 再次通过引物 P27/P34 进行 PCR 鉴定, 能扩增出大小 4524bp (SEQ ID No. 9) 片段的为阳性子, 将阳性子送测序, 测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ;

重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ 均缺失 yjiT 基因, 同时过表达 P_{trc} 启动子启动的 brnF-brnE 基因 (来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032); 缺失 yjiV 基因, 同时过表达 P_{trc} 启动子启动的 ilvE 基因 (来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*) 和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110); 缺失 trpR 基因, 同时过表达 P_{trc} 启动子启动的 ilvH^{G14D}、S17F 基因; 缺失 lacI-lacZ 基因, 同时过表达 P_{xylF} 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21)。具体地, 重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型

大肠杆菌 W3110 基因组上 *yjiT* 基因部分编码区进行敲除，插入了 *P_{trc}* 启动子启动的 *brnF-brnE* 基因（来自谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）ATCC13032）；将 *yjiV* 基因部分编码区进行敲除，插入了 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvE* 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 *PilvD* 启动子启动的 *ilvD* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110）；将 *trpR* 基因部分编码区进行敲除，插入了 *P_{trc}* 启动子启动的突变的 *ilvH^{G14D、S17F}* 基因；同时将 *lacI-lacZ* 基因部分编码区进行敲除，插入了 *P_{xylF}* 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

10 实 施 例 9 、 构 建 CGMCC22721-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ* 和 W3110-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ* 上缺失 *ycgH* 基因同时过表达 *ilvC* 基因的工程菌株。

依据 NCBI 公布的大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110 基因组序列，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ* 和野生型大肠杆菌 W3110-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ* 基因中的 *ycgH* 基因（经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 *ycgH* 基因），同时插入 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvC* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

20 提取 pREDCas9 质粒（含有壮观霉素抗性基因），分别转化到实施例 8 的 CGMCC22721-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ* 和 W3110-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ* 感受态细胞中，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养，挑选抗壮观霉素（100mg/L）的单菌落用引物 pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定，获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒的和 CGMCC22721-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-Cas9* 和 W3110-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-Cas9* 转化子。

25 制 备 CGMCC22721-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-Cas9* 和 W3110-*yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-Cas9* 感受态细胞。当菌体长至 OD₆₀₀=0.1 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ-Red 介导的同源重组。当 OD₆₀₀=0.4 时，收集菌体制备感受态细胞，并分别转化实施例 5 的 pGRB-sgRNA-5 质粒和同源重组 DNA 片段 Δ*ycgH-P_{trc}-ilvC*，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）和氨苄霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P43/P44 进行 PCR 鉴定，PCR 扩增出大小 1669bp 片段的为阳性转化子。

30 将阳性转化子接种于含壮观霉素（100mg/L）和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-5，挑选在壮观霉素（100mg/L）上生长而在氨苄霉素（100mg/L）上不生长的菌落，再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒，挑选在壮观霉素（100mg/L）上不生长而在

无抗的 2-YT 上生长的菌落，再次通过引物 P37/P42 进行 PCR 鉴定，能扩增出大小 3189bp (SEQ ID No.11) 片段的为阳性子，将阳性子送测序，测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH；

- 5 重组菌 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH 均缺失 yjiT 基因，同时过表达 Ptrc 启动子启动的 brnF-brnE 基因（来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032）；缺失 yjiV 基因，同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110）；缺失 trpR 基因，同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因；缺失 lacI-lacZ 基因，同时过表达 PxylF 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21）；缺失 ycgH 基因，同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvC 基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110）。具体地，重组菌
- 15 CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH 和 W3110-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiT 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 brnF-brnE 基因（来自谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032）；将 yjiV 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110）；将 trpR 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因；将 lacI-lacZ 基因部分编码区进行敲除，插入了 PxylF 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21）；同时
- 20 将 ycgH 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvC 基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 10、构建 CGMCC22721-yjiV 和 W3110-yjiV 上缺失 trpR 基因同时过表达 ilvH 基因的工程菌株。

- 30 依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-yjiV 和野生型大肠杆菌 W3110-yjiV 基因中的 trpR 基因（经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 trpR 基因），同时插入 Ptrc 启动子启动的 ilvH^{G14D}、^{S17F} 基因，以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。
- 35 提取 pREDCas9 质粒（含有壮观霉素抗性基因），分别转化到实施例 2 的 CGMCC22721-yjiV 和 W3110-yjiV 感受态细胞中，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养，挑选抗壮观霉素（100mg/L）的单菌落用引物

pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定, 获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒的 CGMCC22721-yjiV-Cas9 和 W3110-yjiV-Cas9 转化子。

制备 CGMCC22721-yjiV-Cas9 和 W3110-yjiV-Cas9 感受态细胞。当菌体长至 $OD_{600}=0.1$ 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ -Red 介导的同源重组。当 $OD_{600}=0.4$ 时, 收集菌体制备感受态细胞, 并分别转化实施例 3 的 pGRB-sgRNA-3 质粒和同源重组 DNA 片段 $\Delta trpR$ -Ptrc-ilvH, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 和氨苄霉素 (100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32°C 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P25/P26 进行 PCR 鉴定, PCR 扩增出大小 1437bp 片段的为阳性转化子。

将阳性转化子接种于含壮观霉素 (100mg/L) 和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-3, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上生长而在氨苄霉素 (100mg/L) 上不生长的菌落, 再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42°C 培养以消除 pREDCas9 质粒, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落, 再次通过引物 P19/P24 进行 PCR 鉴定, 能扩增出大小 2108bp (SEQ ID No. 7) 片段的为阳性子, 将阳性子送测序, 测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-yjiV-trpR 和 W3110-yjiV-trpR;

重组菌 CGMCC22721-yjiV-trpR 和 W3110-yjiV-trpR 均缺失 yjiV 基因, 同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因 (来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168) 和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110); 缺失 trpR 基因, 同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvH^{G14D}、S17F 基因。具体地, 重组菌 CGMCC22721-yjiV-trpR 和 W3110-yjiV-trpR 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiV 基因部分编码区进行敲除, 插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因 (来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168) 和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110); 同时将 trpR 基因部分编码区进行敲除, 插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 ilvH^{G14D}、S17F 基因, 保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 11、构建 CGMCC22721-yjiV-trpR 和 W3110-yjiV-trpR 上缺失 lacI-lacZ 基因同时过表达 DNA 聚合酶基因的工程菌株。

依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-yjiV-trpR 和野生型大肠杆菌 W3110-yjiV-trpR 基因中的 lacI-lacZ 基因 (经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 lacI-lacZ 基因), 同时插入 Pxy1F 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21), 以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

提取 pREDCas9 质粒 (含有壮观霉素抗性基因), 分别转化到实施例 10 的 CGMCC22721-yjiV-trpR 和 W3110-yjiV-trpR 感受态细胞中, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32°C 培养, 挑选抗壮观霉素 (100mg/L) 的单

菌落用引物 pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定, 获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒的 CGMCC22721-yjiV-trpR-Cas9 和 W3110-yjiV-trpR-Cas9 转化子。

制备 CGMCC22721-yjiV-trpR-Cas9 和 W3110-yjiV-trpR-Cas9 感受态细胞。

- 5 当菌体长至 $OD_{600}=0.1$ 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ -Red 介导的同源重组。当 $OD_{600}=0.4$ 时, 收集菌体制备感受态细胞, 并分别转化实施例 4 的 pGRB-sgRNA-4 质粒和同源重组 DNA 片段 Δ lacIZ-PxylF-DNA polymerase, 涂布到含有壮观霉素 (100mg/L) 和氨苄霉素 (100mg/L) 的 2-YT 琼脂平板上 32°C 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P35/P36 进行 PCR 鉴定, PCR 扩增出大小
- 10 1655bp 片段的为阳性转化子。

- 将阳性转化子接种于含壮观霉素 (100mg/L) 和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-4, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上生长而在氨苄霉素 (100mg/L) 上不生长的菌落, 再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42°C 培养以消除 pREDCas9 质粒, 挑选在壮观霉素 (100mg/L) 上不生长而在
- 15 无抗的 2-YT 上生长的菌落, 再次通过引物 P27/P34 进行 PCR 鉴定, 能扩增出大小 4524bp (SEQ ID No. 9) 片段的为阳性子, 将阳性子送测序, 测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiV-trpR-lacIZ;

- 重组菌 CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiV-trpR-lacIZ 均缺失 yjiV 基因, 同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因 (来自枯草芽孢杆菌
- 20 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*) 和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110); 缺失 trpR 基因, 同时过表达 Ptrc 启动子启动的 ilvH^{G140}、^{S17F} 基因; 缺失 lacI-lacZ 基因, 同时过表达 PxylF 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21)。
- 具体地, 重组菌 CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiV-trpR-lacIZ 分别是
- 25 将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 yjiV 基因部分编码区进行敲除, 插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvE 基因 (来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*) 和 PilvD 启动子启动的 ilvD 基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110); 将 trpR 基因部分编码区进行敲除, 插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 ilvH^{G140}、^{S17F} 基因; 同时将 lacI-lacZ
- 30 基因部分编码区进行敲除, 插入了 PxylF 启动子启动的 DNA 聚合酶基因 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21), 保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 12、构建 CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ 和 W3110-yjiV-trpR-lacIZ 上缺失 ycgH 基因同时过表达 ilvC 基因的工程菌株。

- 35 依据 NCBI 公布的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 基因组序列, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ 和野生型大肠杆菌 W3110-yjiV-trpR-lacIZ 基因中的 ycgH 基因 (经测序确认这

些菌株染色体上保留有完整的 *ycgH* 基因)，同时插入 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvC* 基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110)，以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

提取 pREDCas9 质粒（含有壮观霉素抗性基因），分别转化到实施例 11 的 CGMCC22721-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ* 和野生型大肠杆菌 W3110-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ* 感受态细胞中，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养，挑选抗壮观霉素（100mg/L）的单菌落用引物 pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定，获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒的 CGMCC22721-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ*-Cas9 和 W3110-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ*-Cas9 转化子。

制备 CGMCC22721-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ*-Cas9 和 W3110-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ*-Cas9 感受态细胞。当菌体长至 $OD_{600}=0.1$ 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ -Red 介导的同源重组。当 $OD_{600}=0.4$ 时，收集菌体制备感受态细胞，并分别转化实施例 5 的 pGRB-sgRNA-5 质粒和同源重组 DNA 片段 Δ *ycgH*-*P_{trc}*-*ilvC*，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）和氨苄霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P43/P44 进行 PCR 鉴定，PCR 扩增出大小 1669bp 片段的为阳性转化子。

将阳性转化子接种于含壮观霉素（100mg/L）和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-5，挑选在壮观霉素（100mg/L）上生长而在氨苄霉素（100mg/L）上不生长的菌落，再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒，挑选在壮观霉素（100mg/L）上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落，再次通过引物 P37/P42 进行 PCR 鉴定，能扩增出大小 3189bp (SEQ ID No.11) 片段的为阳性子，将阳性子送测序，测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ*-*ycgH* 和 W3110-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ*-*ycgH*；

重组菌 CGMCC22721-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ*-*ycgH* 和 W3110-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ*-*ycgH* 均缺失 *yjiV* 基因，同时过表达 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvE* 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 *P_{ilvD}* 启动子启动的 *ilvD* 基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110）；缺失 *trpR* 基因，同时过表达 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvH^{G14D} S17F* 基因；缺失 *lacI-lacZ* 基因，同时过表达 *P_{xylF}* 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21）；缺失 *ycgH* 基因，同时过表达 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvC* 基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110）。具体地，重组菌 CGMCC22721-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ*-*ycgH* 和 W3110-*yjiV*-*trpR*-*lacIZ*-*ycgH* 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 *yjiV* 基因部分编码区进行敲除，插入了 *P_{trc}* 启动子启动的 *ilvE* 基因（来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*）和 *P_{ilvD}* 启动子启动的 *ilvD* 基因（来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110）；将 *trpR* 基因部分编码区

进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 *ilvH*^{G14D}、^{S17F} 基因；将 *lacI-lacZ* 基因部分编码区进行敲除，插入了 Pxy1F 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21）；同时将 *ycgH* 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 *ilvC* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

5 实施例 13、构建 CGMCC22721-*trpR* 和 W3110-*trpR* 上缺失 *lacI-lacZ* 基因同时过表达 DNA 聚合酶基因的工程菌株。

依据 NCBI 公布的大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110 基因组序列，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-*trpR* 和野生型大肠杆菌 W3110-*trpR* 基因中的 *lacI-lacZ* 基因（经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 *lacI-lacZ* 基因），同时插入 Pxy1F 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21），以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

提取 pREDCas9 质粒（含有壮观霉素抗性基因），分别转化到实施例 3 的 CGMCC22721-*trpR* 和 W3110-*trpR* 感受态细胞中，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养，挑选抗壮观霉素（100mg/L）的单菌落用引物 pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定，获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒的 CGMCC22721-*trpR*-Cas9 和 W3110-*trpR*-Cas9 转化子。

制备 CGMCC22721-*trpR*-Cas9 和 W3110-*trpR*-Cas9 感受态细胞。当菌体长至 OD₆₀₀=0.1 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ-Red 介导的同源重组。当 OD₆₀₀=0.4 时，收集菌体制备感受态细胞，并分别转化实施例 4 的 pGRB-sgRNA-4 质粒和同源重组 DNA 片段 Δ*lacIZ*-Pxy1F-DNA polymerase，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）和氨苄霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P35/P36 进行 PCR 鉴定，PCR 扩增出大小 1655bp 片段的为阳性转化子。

将阳性转化子接种于含壮观霉素（100mg/L）和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-4，挑选在壮观霉素（100mg/L）上生长而在氨苄霉素（100mg/L）上不生长的菌落，再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒，挑选在壮观霉素（100mg/L）上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落，再次通过引物 P27/P34 进行 PCR 鉴定，能扩增出大小 4524bp（SEQ ID No. 9）片段的为阳性子，将阳性子送测序，测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-*trpR-lacIZ* 和 W3110-*trpR-lacIZ*；

重组菌 CGMCC22721-*trpR-lacIZ* 和 W3110-*trpR-lacIZ* 均缺失 *trpR* 基因，同时过表达 Ptrc 启动子启动的 *ilvH*^{G14D}、^{S17F} 基因；缺失 *lacI-lacZ* 基因，同时过表达 Pxy1F 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21）。具体地，重组菌 CGMCC22721-*trpR-lacIZ* 和 W3110-*trpR-lacIZ* 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 *trpR* 基因部

分编码区进行敲除，插入了 P_{trc} 启动子启动的突变的 *ilvH*^{G14D}、^{S17F} 基因；同时将 *lacI-lacZ* 基因部分编码区进行敲除，插入了 P_{xylF} 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

5 实施例 14、构建 CGMCC22721-*trpR-lacIZ* 和 W3110-*trpR-lacIZ* 上缺失 *ycgH* 基因同时过表达 *ilvC* 基因的工程菌株。

依据 NCBI 公布的大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110 基因组序列，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-*trpR-lacIZ* 和野生型大肠杆菌 W3110-*trpR-lacIZ* 基因中的 *ycgH* 基因（经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 *ycgH* 基因），同时插入 P_{trc} 启动子启动的 *ilvC* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

提取 pREDCas9 质粒（含有壮观霉素抗性基因），分别转化到实施例 13 的 CGMCC22721-*trpR-lacIZ* 和野生型大肠杆菌 W3110-*trpR-lacIZ* 感受态细胞中，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养，挑选抗壮观霉素（100mg/L）的单菌落用引物 pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定，获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒的 CGMCC22721-*trpR-lacIZ*-Cas9 和 W3110-*trpR-lacIZ*-Cas9 转化子。

制备 CGMCC22721-*trpR-lacIZ*-Cas9 和 W3110-*trpR-lacIZ*-Cas9 感受态细胞。当菌体长至 OD₆₀₀=0.1 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ-Red 介导的同源重组。当 OD₆₀₀=0.4 时，收集菌体制备感受态细胞，并分别转化实施例 5 的 pGRB-sgRNA-5 质粒和同源重组 DNA 片段 Δ*ycgH*-P_{trc}-*ilvC*，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）和氨苄霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P43/P44 进行 PCR 鉴定，PCR 扩增出大小 1669bp 片段的为阳性转化子。

将阳性转化子接种于含壮观霉素（100mg/L）和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-5，挑选在壮观霉素（100mg/L）上生长而在氨苄霉素（100mg/L）上不生长的菌落，再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒，挑选在壮观霉素（100mg/L）上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落，再次通过引物 P37/P42 进行 PCR 鉴定，能扩增出大小 3189bp（SEQ ID No.11）片段的为阳性子，将阳性子送测序，测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-*trpR-lacIZ-ycgH* 和 W3110-*trpR-lacIZ-ycgH*；

重组菌 CGMCC22721-*trpR-lacIZ-ycgH* 和 W3110-*trpR-lacIZ-ycgH* 均缺失 *trpR* 基因，同时过表达 P_{trc} 启动子启动的 *ilvH*^{G14D}、^{S17F} 基因；缺失 *lacI-lacZ* 基因，同时过表达 P_{xylF} 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21）；缺失 *ycgH* 基因，同时过表达 P_{trc} 启动子启动的 *ilvC* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110）。具体地，重组菌

CGMCC22721-trpR-lacIZ-ycgH 和 W3110-trpR-lacIZ-ycgH 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 trpR 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的突变的 ilvH^{G140、S17F} 基因；将 lacI-lacZ 基因部分编码区进行敲除，插入了 Pxy1F 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21）；同时将 ycgH 基因部分编码区进行敲除，插入了 Ptrc 启动子启动的 ilvC 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 15、构建 CGMCC22721-lacIZ 和 W3110-lacIZ 上缺失 ycgH 基因同时过表达 ilvC 基因的工程菌株。

依据 NCBI 公布的大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110 基因组序列，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721-lacIZ 和野生型大肠杆菌 W3110-lacIZ 基因中的 ycgH 基因（经测序确认这些菌株染色体上保留有完整的 ycgH 基因），同时插入 Ptrc 启动子启动的 ilvC 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），以此更深入研究这些基因对合成 L-缬氨酸的影响。

提取 pREDCas9 质粒（含有壮观霉素抗性基因），分别转化到实施例 4 的 CGMCC22721-lacIZ 和野生型大肠杆菌 W3110-lacIZ 感受态细胞中，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养，挑选抗壮观霉素（100mg/L）的单菌落用引物 pRedCas9-PF/pRedCas9-PR 进行 PCR 鉴定，获得 943bp 的为含有 pREDCas9 质粒的 CGMCC22721-lacIZ-Cas9 和 W3110-lacIZ-Cas9 转化子。

制备 CGMCC22721-lacIZ-Cas9 和 W3110-lacIZ-Cas9 感受态细胞。当菌体长至 OD₆₀₀=0.1 加入终浓度 0.1mM 的 IPTG 以诱导 λ-Red 介导的同源重组。当 OD₆₀₀=0.4 时，收集菌体制备感受态细胞，并分别转化实施例 5 的 pGRB-sgRNA-5 质粒和同源重组 DNA 片段 ΔycgH-Ptrc-ilvC，涂布到含有壮观霉素（100mg/L）和氨苄霉素（100mg/L）的 2-YT 琼脂平板上 32℃ 培养 12 h。对培养产生的单菌落传代后通过引物 P43/P44 进行 PCR 鉴定，PCR 扩增出大小 1669bp 片段的为阳性转化子。

将阳性转化子接种于含壮观霉素（100mg/L）和终浓度至 0.2% 阿拉伯糖的 2-YT 培养基中以消除质粒 pGRB-sgRNA-5，挑选在壮观霉素（100mg/L）上生长而在氨苄霉素（100mg/L）上不生长的菌落，再将这些菌落转接到 2-YT 培养基上 42℃ 培养以消除 pREDCas9 质粒，挑选在壮观霉素（100mg/L）上不生长而在无抗的 2-YT 上生长的菌落，再次通过引物 P37/P42 进行 PCR 鉴定，能扩增出大小 3189bp（SEQ ID No.11）片段的为阳性子，将阳性子送测序，测序结果正确的菌株分别命名为 CGMCC22721-lacIZ-ycgH 和 W3110-lacIZ-ycgH；

重组菌 CGMCC22721-lacIZ-ycgH 和 W3110-lacIZ-ycgH 均缺失 lacI-lacZ 基因，同时过表达 Pxy1F 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21）；缺失 ycgH 基因，同时过表达 Ptrc 启动子启动

的 *ilvC* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110）。具体地，重组菌 CGMCC22721-lacIZ-ycgH 和 W3110-lacIZ-ycgH 分别是将 L-缬氨酸生产菌 CGMCC22721 和野生型大肠杆菌 W3110 基因组上 *lacI-lacZ* 基因部分编码区进行敲除，插入了 P_{xylF} 启动子启动的 DNA 聚合酶基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21）；同时将 *ycgH* 基因部分编码区进行敲除，插入了 P_{trc} 启动子启动的 *ilvC* 基因（来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）W3110），保持其基因组中的其它核苷酸不变得到的重组菌。

实施例 16、L-缬氨酸发酵实验。

将上述实施例 1-15 构建的菌株和缬氨酸生产菌 CGMCC22721 及野生型大肠杆菌 W3110 在 BLBIO-5GC-4-H 型号的发醇罐（上海百仑生物科技有限公司）中以图 1 所示的培养基和图 2 所示的控制工艺进行发酵实验。每个菌株重复三次，结果如图 3 所示。由以上发酵结果所示，无论对于产 L-缬氨酸的菌株 CGMCC22721，还是模式菌株野生型大肠杆菌 W3110，经过实施例 1-15 的改造后均有助于 L-缬氨酸产量的提高。

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。

工业实用性

实验证明，本发明改造后的工程菌可提高 L-缬氨酸产量，可用于生产 L-缬氨酸，具有很好的应用前景。

序列表自由内容

SEQ ID No.1: 同源重组 DNA 片段 $\Delta yjiT$ -P_{trc}-*brnF*-*brnE* 序列（2579bp），人工序列（Artificial sequence）

```
1      GAGTGATGAG CGGTTGAAGG ATATCGGGTT ACGCAGGGAG GATGTGGAGT GAGGGGGGAT
61     ATAGATTTAT ATATAATAAA ACGTTTTTAT GTTTTAAAT TAAGTTATAA AAATTTTCCC
121    GAGACAATTC ATCAATAGGT ATGGAGTGTA CAGGAATATC TTCTCACTA ACCTCTTTAA
30     181     ACTCATGTCG ATAACGGTCA AAAAACGCAC AGTGATTACT TGTGTTTTTT GACTGACTTT
241    ACAACTCTCA TTATTCGCTA TTGTGCAGTT TCTCTAATTG TTTTATACCC TGGAAAGTTA
301    AATGTCAGCT ACTGAATACT TTTTGATTGT TTGAGATTTA TTTTCATTTG AAATTATAAA
361    ATCAGGTGAT AAATGAGTTG TGATTAATAG ATGGTTGATA TCATTTTAT CTAAAATTGA
421    TTTATAGTAT CGACCTGAAA AAATAGTTGT TGCCGCCTGA GTAACATAC AATATTCTGA
35     481    AAGGTTTTCT TTCAAATTAG AAATGTTGTG GGGTTTTGTT TTTGTATCTT TTATCTCTAA
541    GGAGCTTGCT TTGGGTCAAT CAGAATACAT TTCATGGGTA AAATGTACTT CCTGGCTAAG
601    TAACCTTGTT AATCTTAGAG GGTGAGACA ACCGGATGGC CGTCCTCTTT ATGAATATCA
661    TGCAACCAAT GATGAATATA CCCAATTAAC GCAGCTACTC CGTGCAGTCG GTCAATCACA
721    ATCTAATATA TGTAATAGGG ACTTTGCTGC CTGTTTTTTG ACAATTAATC ATCCGGCTCG
40     781    TATAATGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTTACACACA GGAAACAGAC CGTGCAAAAA
841    ACGCAAGAGA TTCATTCAAG CCTGGAGGTG TCGCCATCCA AGGCAGCCCT GGAACCAGAT
901    GATAAAGGTT ATCGGCGCTA CGAAATCGCG CAAGGTCTAA AAACCTCCCT TGCTGCAGGT
```

961	TTGGGCATGT	ACCCGATTGG	TATTGCGTTT	GGTCTCTTGG	TTATTCAATA	CGGCTACGAA
1021	TGGTGGGCAG	CCCCACTGTT	TTCCGGCCTG	ATTTTCGCGG	GCTCCACCGA	AATGCTGGTC
1081	ATCGCCCTCG	TTGTGGGCGC	AGCGCCCCTG	GGCGCCATCG	CGCTCACCAC	ATTGCTGGTG
1141	AACTTCCGCC	ACGTATTCTA	TGCGTTTTCA	TTCCCGCTGC	ATGTGGTCAA	AAACCCCAT
5 1201	GCCCGTTTCT	ATTCGGTTTT	CGCGCTTATC	GACGAAGCCT	ACGCAGTCAC	TGCGGCCAGG
1261	CCCGCAGGCT	GGTCGGCGTG	GCGACTTATC	TCAATGCAAA	TAGCGTTTCA	CTCCTACTGG
1321	GTATTCGGCG	GTCTCACCAG	AGTGGCGATC	GCAGAGTTGA	TTCCTTTTGA	AATTAAGGGC
1381	CTCGAGTTCG	CCCTTTGCTC	TCTCTTTGTC	ACGCTGACTT	TGGATTCTCTG	CCGAACGAAA
1441	AAGCAGATCC	CTTCTCTGCT	GCTCGCAGGT	TTGAGCTTCA	CCATTGCTCT	TGTGGTAATT
10 1501	CCAGGTCAGG	CCCTATTTGC	GGCGCTGCTG	ATCTTCTTGG	GTCTGTTGAC	CATCCGGTAC
1561	TTCTTCTTGG	GAAAGGCTGC	TAAATGACAA	CTGATTTCTC	CTGTATTCTC	CTTGTGTGCG
1621	CAGTATGTGC	AGTCATTACT	TTTGCCTCC	GGGCGGTTCC	GTTCTTAATC	CTTAAGCCCC
1681	TACGTGAATC	ACAATTTGTG	GGCAAAATGG	CGATGTGGAT	GCCAGCAGGA	ATCCTTGCCA
1741	TTTTGACCGC	ATCAACGTTT	CGCAGCAATG	CGATAGATCT	GAAGACTCTA	ACCTTTGGTC
15 1801	TCATTGCCGT	TGCGATTACA	GTGGTGGCGC	ATCTTCTTGG	CGGTCGACGC	ACCTTGTTGA
1861	GCGTTGGCGC	TGGCACCATC	GTTTTTGTG	GACTGGTGAA	TCTTTTCTAA	CTAAAAGCAC
1921	TACCTGTGAA	GGGATGTCAG	GACGTTACAG	TTACAGCAAA	TGAAACTTAT	CGGATTGCGA
1981	CCGGAAGAGA	ACAAATCAGC	ATCGGAAGGT	TTGCTCTAAA	TGGAAAGCGT	GCAAGCTGGG
2041	TTTGTCTATC	AGATGAAACA	TTTATTGGTG	TACCAAAAGT	CATTTCTACA	CTACCGGATA
20 2101	TTCAAAGCAT	TGATGTAACG	CGTTACACGT	GCTGACAAAA	CAGCATTACA	GCCAGCAGGA
2161	AGTACTGCGT	TGGATCGATG	TCTGTTTCTG	GACTCAACCT	AATGCAAAGG	ATCCCGCATT
2221	TCTTAAAGTC	AGGGCGCATA	TCTTCCAGCG	TAATACCTAG	GGAATATGGG	CTTGTGTTGA
2281	TAAAGATTGC	AGATTAAAGC	ACGGTACACC	GCTCGACAAA	GGCTGGCCCT	TTGGCTATGT
2341	GTATGTGAAC	CAGCGACAAA	ATTGTGACTG	TGGAAGCCCT	GTATACGAAG	TTGCATTCTG
25 2401	TAATGATTGT	AATGAGCCTC	ATCTTCTGGC	ACGGGACAAA	AAGGGCAAAC	TAGTCCAGTG
2461	GGAAAATAAA	GGTGGCGATG	AATTCTCTTT	GCAGGATGAA	GTACCTGTTG	AACATGACGC
2521	TACAGAAGAA	AAAGTCGAAA	AAGAGAACAG	TTTTCAGCCT	CCGTTGATTA	TTGCCGCGAG
SEQ ID No. 2: brnF 蛋白质(来自谷氨酸棒状杆菌(<i>Corynebacterium glutamicum</i>)ATCC13032)						
1	VQKTQEIHSS	LEVSPSKAAL	EPDDKGYRRY	EIAQGLKTSL	AAGLGMYPYG	IAFGLLVIQY
30 61	GYEWAAPLF	SGLIFAGSTE	MLVIALVVG	APLGAIALTT	LLVNRHVIFY	AFSPLHVVK
121	NPIARFYSVF	ALIDEAYAVT	AARPAGWSAW	RLISMQIAFH	SYWVFGGLTG	VAIAELIPFE
181	IKGLEFALCS	LFVTLTLDSC	RTKKQIPSL	LAGLSFTIAL	VVIPGQALFA	ALLIFLGLLT
241	IRYFFLGKAA	K				
SEQ ID No. 3: brnE 蛋白质 (来自谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) ATCC13032)						
1	MTTDFSCILL	VVAVCAVITF	ALRAVPFLIL	KPLRESQFVG	KMAMWMPAGI	LAILTASTFR
61	SNAIDLKTLT	FGLIAVAITV	VAHLLGGRRT	LLSVGAGTIV	FVGLVNL	
SEQ ID No. 4: 同源重组 DNA 片段 $\Delta yjiV$ -P _{trc} -ilvE-PilvD-ilvD 序列 (4732bp), 人工序列 (Artificial sequence)						
40 1	TGAATGGACT	GCTATGCGCA	GCCTCTGTAG	AGGCTAAGCC	TCGACTACAA	AAAAATAAGA
61	GTACGCGTTG	CCAATTCTAT	TGGTCAGAAA	AGCATCCAGA	TGAGCTTAGG	GTGATAGTAT
121	CTCTTCCGGA	CGAAGTTTCC	TTTCCTGTAA	CAAGCGAGCC	GTCAACTACG	CGCTTTGAAC
181	TTGCCATTTG	TGAAGATGGT	GAGGAAGTCT	CTGGCCTTGG	GCCAGCCTAT	GCTTCTCTGG
241	AAAACAGACA	GGCAACAGTT	CGATTACGTA	AAAGCGAAGT	GAGATTGCGC	AGGCAAAATC
45 301	CATCGGCAGG	TTTGTCGTTA	GTGGCTCGTG	CTGGAGGGAT	GATTGTTGGG	AGCATTAAAC
361	TTGATGACAG	TGAAATTGCC	ATTGGTGAGG	TGCCGTAAAC	CTTCATCGTT	GATGCAGATC
421	AATGGCTGTT	ACAGGGACAG	GCTTCTTGCA	GTGTGCGAAG	CAGCGATGTT	CTGATTGTGC
481	TCCCTCGGGA	TAATAGCAAT	GTTGCTGGTT	TTGATGGCCA	ATCGAGGGCA	GTAAACGTAT
541	TAGGACTAAA	AGCACTACCT	GTGAAGGGAT	GTCAGGACGT	TACAGTTACA	GCAAATGAAA

601	CTTATCGGAT	TCGCACCGGA	AGAGAACAAA	TCAGCATCGG	AAGGTTTGCT	CTAAATGGAA
661	AGCGTGCAAG	CTGGGTTTGT	CATCCAGATG	AAACATTTAT	TGGTGTACCA	AAAGTCATTT
721	CTACACTACC	GGATATTCAA	AGCATTGATG	TAACGCGTTA	CACGTGCTGA	CAAAACAGCA
781	TTACAGCCAG	CAGGAAGTAC	TGCGTTGTTA	ACGTCTGCTT	AATACACTGT	GGCCGTTTTG
5 841	CAAAAACCTGG	CTTCTTGAGC	GGCGCATGCG	TTCAATCCGT	TCCTCTGCTA	AGCGGTCAGC
901	CGCTAAATAT	GCAGGAATGC	CGTCACGCTG	AGAAATCTCA	AGTACACGCT	CGATATTGCC
961	GTAAATGCCT	TCAACTTTTT	TCAATGCACG	TTCTGCATTA	TAGCCGTAAA	GCTCATCTGC
1021	CACGTTGATG	ACACCGCCCG	CGTTAATCAC	GTAATCCGGT	GCATAAACGA	TGCCCATTTT
1081	GTGAATTTGA	TCACCATGGC	GTGTCTCTTT	TAATTGGTTG	TTAGCCGCAC	CTGCGATCAC
10 1141	TTTCGCCTTC	AGCTGTTTAA	TGGTGTGCTC	GTTAATAGTC	GCACCAAGGG	CACACGGCGC
1201	ATAAATATCG	CAGTCTTGTT	AATAAATGTC	ATCAGGATCT	ACCGCACGGG	CGCCAAAATC
1261	TTCAACTGCA	CGCTGTACAG	ATTGTTTGTT	GATATCCGTA	ACGATTAAAGT	TTGCTCCTTC
1321	TTCATGCAGG	TGGCGGCAAA	GTTTATAGGC	TACGTTCCCA	ACACCTGTGA	CAGCAATGGT
1381	TTTTCTTCA	AGAGAGTCGG	TTCCGAAAGC	AGCTTTAGCT	GCTGCCTTCA	TTCCTCTGTA
15 1441	CACCCCGTAC	GCTGTGACTG	GGGACGGATT	TCCAGAAGAG	CCGAAAGCAG	GAGAAATCCC
1501	TGTGACATAG	TCTGTCTCAT	CATGAATGAT	ATCCATATCC	TCGACCGTTG	TGCCACATC
1561	TTCAGCCGTG	ATGTATCTGC	CATTCACTCC	TTGAATATAG	CGGCCAAACG	CGCGGAACAT
1621	TTCTCATTT	TTGTCTTTGC	GCGGATCGCC	GATAATGACT	GTTTTTCCGC	CGCCAAGGTT
1681	TAAGCCTGCC	GCCGCGTTCT	TATAGGTCAT	GCCTCTTGCC	AATCTGAGCG	CATCTTCAAT
20 1741	TGCCGCTTCT	TCATTTTCAT	ATGTCCACAT	TCTCGTTCCG	CCAAGCGCCG	GACCAAGCGT
1801	TGTATCATGA	ATGGCGATAA	TCGCTTTTAA	TCCAGATTGT	TCATCCTGGC	AGAATACCAA
1861	TTGTTTCGTAA	TCGTATTTCT	CCATATATTT	AAAAAGTTCC	ATGGTCTGTT	TCCTGTGTGA
1921	AATTGTTATC	CGCTCACAA	TCCACACATT	ATACGAGCCG	GATGATTAAT	TGTCAATTAA
1981	CCCCCAGTT	TCGATTTATC	GCGCACCGCG	CCTTTGTCCG	CGCTGGTTGC	CAGGCTGGCA
25 2041	TAAGCACGCA	GGGCAAAGGA	GACCTGACGT	TCACGATTTT	TCGGCGTCCA	GGCTTTGTCA
2101	CCTCGAGCGT	CCTGCGCTTC	ACGACGCGCC	GCCAGTTCGG	CATCGCTTAC	CTGTAACCTGA
2161	ATGCCACGGT	TCGGGATGTC	GATAGCGATC	AGGTCACCAT	CTTCAATCAG	GCCAATGCTG
2221	CCGCCGCTTG	CCGCTTCCGG	TGAGACGTGG	CCGATGGAAA	GACCAGAGGT	GCCACCAGAG
2281	AAACGACCGT	CGGTGATCAG	CGCACAGGCT	TTGCCGAGAC	CCATTGATTT	CAGGAAGCTG
30 2341	GTTGGGTAGA	GCATTTCTCT	CATCCCCGGA	CCGCCTTTTC	GGCCTTCATA	GCGAATTACT
2401	ACCACATCTC	CGGCGACAAC	TTTACCGCCG	AGAATCGCTT	CTACCGCATC	GTCCTGGCTT
2461	TCGTACACTT	TCGCCGGGCC	GGTGAATTTG	AGGATGCTGT	CATCGACGCC	TGCCGTTTTT
2521	ACGATGCAGC	CGTTTTCCGC	AAAGTTACCG	TAGAGCACCG	CCAGGCCGCC	GTCTTTGCTG
2581	TAGGCGTGTT	CCAGCGAGCG	GATACAGCCA	TTGGCGCGAT	CGTCGTCCAG	CGTATCCCAA
35 2641	CGGCAATCTT	GCGAGAATGC	CTGTGTGGTA	CGAATGCCTG	CAGGACCTGC	GCGGAACATA
2701	TTTTTTACCG	CGTCATCCTG	GGTCAGCATA	ACGTCTGATT	GTTCCAGCGT	TTGCGGCAAC
2761	GTCAGGCCAA	GTACGTTTTT	CACATCACGG	TTCAGTAACC	CCGCGCGATC	CAGTTCGCCG
2821	AGAATACCGA	TAACACCACC	AGCACGGTGA	ACATCTTCCA	TATGGTATTT	CTGGGTGCTC
2881	GGCGCAACTT	TACACAGCTG	TGGAACCTTG	CGGGAAAGCT	TATCGATATC	ACTCATGGTG
40 2941	AAGTCGATTT	CCGCTTCCCT	CGCCGCCGCC	AGCAGGTGAA	GTACGGTGTT	AGTCGATCCA
3001	CCCATCGCGA	TATCCAGCGT	CATGGCGTTT	TCAAACGCCG	CCTTACTGGC	GATATTACGC
3061	GGCAGTGAC	TTTCGTCTGT	TTGCTCGTAA	TAACGTTTGG	TCAATTCAAC	AATGCGTTTA
3121	CCAGCATTA	GGAACAGCTG	CTTACGGTCG	GCGTGGGTTG	CCAGCAGCGA	GCCGTTGCC
3181	GGCTGCGACA	GGCCCAGCGC	TTCCGTCAGG	CAGTTCATTG	AGTTAGCGGT	AAACATCCCG
45 3241	GAGCAGGAAC	CGCAGGTCGG	ACACGCGGAA	CGTTCAACCT	GATCGCTCTG	GGAGTCAGAT
3301	ACTTTCGGGT	CTGCGCCCTG	GATCATCGCA	TCAACCAGAT	CGAGCTTGAT	GATCTGATCG
3361	GAAAGTTTGG	TTTTCCCGGC	CTCCATCGGG	CCGCCGGAAA	CAAAGATCAC	CGGAATATTC
3421	AGGCGCAGGG	AAGCCATCAG	CATCCCCGGG	GTGATTTTGT	CGCAGTTAGA	GATGCAGACC
3481	ATGGCGTCGG	CGCAGTGGGC	GTTGACCATA	TACTCAACGG	AATCAGCGAT	CAGTTCGCGA

3541 GATGGCAGTG AATAAAGCAT CCCCCGTGG CCCATGGCAA TCCCATCATC CACCGCAATG
 3601 GTGTTGAACT CTTTGGCAAC GCCGCCAGCC GCTTCAATTT GTTCGGCGAC CAGTTTACCG
 3661 AGATCGCGCA GATGGACGTG ACCCGGTACA AATTGGGTGA ACGAGTTCAC AACCGCGATA
 3721 ATCGGCTTAC CGAAATCGGC GTCGGTCATT CCGGTGGCGC GCCACAGCGC ACGAGCACCC
 5 3781 GCCATATTAC GACCATGAGT GGTGGTGGCG GAACGGTACT TAGGCATACT TTATTTACTC
 3841 CCAGTGTCTG TCTCGTAAAT GGGACGGTGC GTGCCGTCCC ATTTTTTGTA TTTCAACGGA
 3901 TGTGCTGGTG GAGGTGATCG CCTCCTGATG ATGAGCCGCT CCCGATGTGG TGTCCGGAGC
 3961 GGTATTTTCT ATAAAACTTA CCGCTTATTT GAGATATTCA TCGAAAAATG CGAGTAATTC
 4021 TTGATGTATA CACGGCCATT CCTGACCTAA ATTGACGGTA CACAAGCCAA TATCGAAGCC
 10 4081 ATTAATTTTA TAACGATGTT TCACTGCGGT ATCTACGTGG GGATATATTA ATAACCCCCC
 4141 TATGTTTTTCG CCATTTTCAG GCTTTAACGA CCATAAGTAA TTCATCAGTT GATAAAGATT
 4201 TTGCGAATGA AATTTTTCTG TTCCCATTCTG TCGTGAAAAA ATGCTCTTAT AGTATTTGGC
 4261 GTCAACGATA AGTATTTTTT CTGATGAGCG AATGGTGATG TCAGTTTCCA TTCGAGGTAA
 4321 CAAATTAAGT GACTGATCCG ATATACTCGA TGCATCCCAT TTTAAATAAG AGCGGGTTGT
 15 4381 GTTTGCAGAC GTTAATTCAC GACGGCAAAA TTCATAAAGA AACTTTTGAT AAAGTAATGA
 4441 CATCTCTTTT TCGTTTCTTT CAAAATCATA GAAACGGTAG TGTCTTTTGT TTTGACCTGG
 4501 AATAGAATTA TTGACGATGA ATTTGCAGAC ACTGATAACG AATTTATAAT AACCGGTATT
 4561 TTTTCCGCCA TTCAGATAGC TGAAATGCTG CGGAGTTAAA TGAAGAGTGC TAATGCCCGG
 4621 TAATTTTCTA TAAAGTGAAC GAGCTTCATC TCTGATAGTT GAATTTAACT TTTCATGCTT
 20 4681 AATTAATATG GCTAATGTGC TTTTATAAT TCGGTTAGCC AGCGTGTCTT CA

SEQ ID No. 5: ilvD 蛋白质 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110)

1 MPKYRSATTT HGRNMAGARA LWRATGMTDA DFGKPIIAVV NSFTQFVPGH VHLRDLGKLV
 61 AEQIEAAGGV AKEFNTIAVD DGIAMGHGGM LYSLSPRELI ADSVEYMVNA HCADAMVCIS
 121 NCDKITPGML MASLRLNIPV IFVSGGPMEA GKTKLSQII KLDLVDAMIQ GADPKVSDSQ
 25 181 SDQVERSACP TCGSCSGMFT ANSMNCLTEA LGLSQPGNGS LLATHADRKQ LFLNAGKRIV
 241 ELTKRYEQN DESALPRNIA SKAAFENAMT LDIAMGGSTN TVLHLLAAAQ EAEIDFTMSD
 301 IDKLSRKVPQ LCKVAPSTQK YHMEDVHRAG GVIGILGELD RAGLLNRDVK NVLGLTLPQT
 361 LEQYDVMLTQ DDAVKNMFRA GPAGIRTTQA FSQDCRWDTL DDDRANGCIR SLEHAYSKDG
 421 GLAVLYGNFA ENGCIKTAG VDDSIKFTG PAKVYESQDD AVEAILGGKV VAGDVVVIRY
 30 481 EGPKGGPGMQ EMLYPTSLK SMGLGKACAL ITDGRFSGGT SGLSIGHVSP EAASGGSIGL
 541 IEDGDLIAID IPNRGIQLQV SDAELAARRE AQDARGDKAW TPKNRERQVS FALRAYASLA
 601 TSADKGAVRD KSKLGG

SEQ ID No. 6: ilvE 蛋白质 (来自枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*)

35 1 MELFKYMEKY DYEQLVFCQD EQSGLKAIIA IHD TTLGPAL GGTRMWTYEN EAAAIEDALR
 61 LARGMTYKNA AAGNLGGGK TVIIGDPRKD KNEEMFRAFG RYIQGLNGRY ITAEDVGTTV
 121 EDMDIIHDET DYVTGISPAF GSSGNPSPVT AYGVYRGMKA AKAAPGTDS LEGKTIIVQG
 181 VGNVAYNLCR HLHEEGANLI VTDINKQSVQ RAVEDFGARA VDPDDIYSQD CDIYAPCALG
 241 ATINDDTIKQ LKAKVIAGAA NNQLKETRHG DQIHEMGIVY APDYVINAGG VINVADELYG
 40 301 YNAERALKKV EGIYGNIERV LEISQRDGIP AYLAADRLAE ERIERMRRSR SQFLQNGHSV
 361 LSRR

SEQ ID No. 7: 同源重组 DNA 片段 $\Delta trpR$ -Ptrc -ilvH (2108bp), 人工序列 (Artificial sequence)

1 CCAATCTGGT GAAGAGCAAG TCAAAAACAG AGCAGGCTCA ACTGGCGCGG TATGCTTTCA
 45 61 ACAACCAATG GTGGGATCTT AGCGTTCAGG CAACGATCGC CGGGAAGCTG TGGGATCATC
 121 TGGAAGAGCG ATTCCCGCTG GCTTACAACG ATCTTTTCAA ACGCTACACC AGCGGTAAGG
 181 AGATCCCGCA AAGCTATGCG ATGGCGATTG CTCGTCAGGA GAGCGCTGG AATCCGAAAAG
 241 TGAAATCACC GGTAGGGGCC AGCGGCTTGA TGCAGATTAT GCCTGGTACA GCGACCCATA
 301 CCGTGAAGAT GTTCTCTATT CCCGGTTATA GCAGTCCTGG GCAATTGCTG GATCCGGAAA

361	CGAATATCAA	CATTGGCACC	AGTTACCTGC	AATATGTTTA	TCAGCAGTTT	GGCAATAATC
421	GTATTTTCTC	CTCAGCAGCT	TATAACGCCG	GACCAGGGCG	GGTGCGAACC	TGGCTTGGCA
481	ACAGCGCCGG	GCGTATCGAC	GCAGTGGCAT	TTGTCGAGAG	TATTCCATTC	TCCGAGACGC
541	GCGGTTATGT	GAAGAACGTG	CTGGCTTATG	ACGCTTACTA	CCGCTATTTT	ATGGGGGATA
5	601	AACCGACGTT	GATGAGCGCC	ACGGAATGGG	GACGTCGTTA	CTGATCCGCA
	661	ATGCTATCGT	ACTCTTTAGC	GAGTACAACC	GGGGGAGGCA	TTTTGCTTCC
	721	ATGGCGACAT	ATTATGGCCC	AACAATCACC	CTATTCAGCA	TTGACAATTA
	781	TCGTATAATG	TGTGGAATTG	TGAGCGGATA	ACAATTTTAC	ACAGGAAACA
	841	CGGATATTAT	CAGTCTTACT	CGAAAATGAA	TCAGACGCGT	TATTCGCGCT
10	901	TTTTCCCAGC	GTGGCTACAA	CATTGAAAGC	CTGACCGTTG	CGCCAACCGA
	961	TTATCGCGTA	TGACCATCCA	GACCGTGGGC	GATGAAAAAG	TACTTGAGCA
	1021	CAATTACACA	AACTGGTCGA	TGTCTTGCGC	GTGAGTGAGT	TGGGGCAGGG
	1081	GAGCGGGAAA	TCATGCTGGT	GAAAATTCAG	GCCAGCGGTT	ACGGGCGTGA
	1141	CGTAATACGG	AAATATTCCG	TGGGCAAATT	ATCGATGTCA	CACCCTCGCT
15	1201	CAATTAGCAG	GCACCAGCGG	TAAGCTTGAT	GCATTTTTAG	CATCGATTTC
	1261	AAAATTGTGG	AGGTTGCTCG	CTCTGGTGTG	GTCGGACTTT	CGCGCGGCGA
	1321	CGTTGATTGT	GTAGGCATGA	TAAGACGCGG	CAGCGTCGCA	TCAGGCGCTT
	1381	ATTATGAAAC	GGACTCAGCG	CCAGGATCAC	CGCCTGGTGA	TAGACGCTGG
	1441	TTTCCCGGCG	GTAACACGCG	CGATCGCCCC	TTCCTTACGA	CCAATCTCAT
20	1501	ATAACGCGAC	ATCACGGGAC	CAAGCGCCTC	ACCTTCACGC	ACTTTTTCCA
	1561	AGGCAACGGC	AAAGTAGCCG	AACGCGCCTC	GCCGCGCTGG	CTGGCGTTTT
	1621	CCAACTGAAA	GTGCTGTCAC	CATCGATGCC	AGCTTCAATC	GCCACCCAAA
	1681	TGGAAGTAAA	CGGCGGGCAT	TGGCTACCCG	ATTTCGTGCG	CCAGCGCGCG
	1741	GCCAAAGGGC	TGTTCCGGTA	CACCGCTCTC	GACGGCAACG	GATGCAATAT
25	1801	TTCCGCGAAG	ATCTCGTGAA	ATGCCTGCAG	AATGGCCTGA	ATTTTAGCGG
	1861	CGCACAGACA	ACTTGGTGCA	TAATCAGCAT	TACTCAGAAA	ATTAACGTTA
	1921	CGGAAAAAAA	GCATGTTACA	GGTATACCTA	GTCCGCCACG	GTGAAACGCA
	1981	GAGCGACGTA	TTCAGGGCCA	GTCTGACAGC	CCGCTGACCG	CCAAAGGTGA
	2041	ATGCAGGTGG	CAACCCGTGC	CAAAGAGCTT	GGCATTACGC	ATATCATCAG
30	2101	GGACGCAC				
	SEQ ID No. 8: ^{G14D} ilvH ^{S17F} 基因编码的氨基酸序列(163aa), 人工序列(Artificial sequence)					
	1	MRRILSVLLE	NESDALFRVI	GLFSQRGYNI	ESLTVAPTDD	PTLSRMTIQT
	61	EKQLHKLVDV	LRVSELGQGA	HVEREIMLVK	IQASGYGRDE	VKRNTEIFRG
	121	TVQLAGTSGK	LDAFLASIRD	VAKIVEVARV	GVVGLSRGDK	IMR
35	SEQ ID No. 9: 同源重组 DNA 片段 Δ lacIZ-PxylF-DNA polymerase 序列 (4524bp), 人工序列 (Artificial sequence)					
	1	CGGTAATAAT	CCACAGCAGG	TATTTGCGCA	GCCCGAGTTT	GTCAGAAAGC
	61	GCGGTTGGAA	TAATAGCGAG	AACAGAGAAA	TAGCGGCAAA	AATAATACCC
	121	TGCTGATATG	GTTGATGTCA	TGTAGCCAAA	TCGGGAAAAA	CGGGAAGTAG
40	181	TAAAAAAGTA	AAAGAAAAAG	AATAAAACCGA	ACATCCAAAA	GTTTGTGTTT
	241	ACATAATGGA	TTTCCTTACG	CGAAATACGG	GCAGACATGG	CCTGCCCCGT
	301	TTTGACACCA	GACCAACTGG	TAATGGTAGC	GACCGGCGCT	CAGCTGGAAT
	361	CTGACGGGCT	CCAGGAGTCG	TCGCCACCAA	TCCCCATATG	GAAACCGTCG
	421	ATGTGCCTTC	TTCCGCGTGC	AGCAGATGGC	GATGGCTGGT	TTCCATCAGT
45	481	TGTAGCGGCT	GATGTTGAAC	TGGAAGTCGC	CGCGCCACTG	GTGTGGGCCA
	541	CGCGCGTCCC	GCAGCGCAGA	CCGTTTTTCG	TCGGGAAGAC	GTACGGGGTA
	601	ACAATGGCAG	ATCCCAGCGG	TCAAAACAGG	CGGCAGTAAG	GCGGTCGGGA
	661	GCGGCCCTAA	TCCGAGCCAG	TTTACCCGCT	CTGCTACCTG	TTACGCGAAC
	721	ACTCTAAGAT	GTCACGGAGG	TTCAAGTTAC	CTTTAGCCGG	AAGTGCTGGC

	781	ATTGAGACTC	GTGCAACTGG	TCAGCGAACT	GGTCGTAGAA	ATCAGCCAGT	ACATCACAAG
	841	ACTCATATGT	GTCAACCATA	GTTTCGCGCA	CTGCTTTGAA	CAGGTTCCGA	GCGTCAGCCG
	901	GAATGGTACC	GAAGGAGTCG	TGAATCAGTG	CAAAAGATTG	GATTCCGTAC	TTCTCGTGTG
	961	CCCACACTAC	AGTCTTACGA	AGGTGGCTAC	CGTCTTGGCT	GTGTACAAAG	TTAGGAGCGA
5	1021	TACCAGACTC	CTGTTTGTGT	GCATCAATCT	CGCTATCTTT	GTTGGTGTTA	ATGGTAGGCT
	1081	GTAAGCGGAA	CTGACCGAGG	AACATCAGGT	TCAAGCGCGT	CTGAATAGGC	TTCTTGTATT
	1141	CCTGCCACAC	AGGGAAACCA	TCAGGAGTTA	CCCAATGCAC	AGCGCAACGC	TTGCGAAGAA
	1201	TCTCTCCAGT	CTTCTTATCT	TTGACCTCAG	CAGCCAGCAG	CTTAGCAGCA	GACTTAAGCC
	1261	AGTTCAATTG	TTCAACCGCA	GCTACCACCG	TCACGCTCAC	AGATTCCCAA	ATCAGCTTAG
10	1321	CCATGTATCC	AGCAGCCTGA	TTCGGCTGAG	TGAACATCAG	ACCCTTGCCG	GAATCAATAG
	1381	CTGGCTGAAT	GGTATCTTCC	AGCACTTGTT	GACGGAAGCC	GAACTCTTTG	GACCCGTAAG
	1441	CCAGCGTCAT	GACTGAACGC	TTAGTCACAC	TGCGAGTAAC	ACCGTAAGCC	AGCCATTGAC
	1501	CAGCCAGTGC	CTTAGTGCCC	AGCTTGACTT	TCTCAGAGAT	TTCACCAGTG	TTCTCATCGG
	1561	TCACGGTAAC	TACTTCGTTA	TCGGTCCCAT	TGATTGCGTC	TGCTTGTAGA	ATCTCGTTGA
15	1621	CTTTCTTAGC	AACAATCCCG	TAGATGTCTT	GAACGGTTTC	ACTAGGAAGC	AAGTTAACCG
	1681	CGCGACCACC	TACCTCATCT	CGGAGCATCG	CGGAGAAGTG	CTGGATGCCA	GAGCAAGACC
	1741	CGTCAAACGC	CAGCGGAAGG	GAGCAGTTAT	AGCTCAGGCC	GTGGTGCTGT	ACCCAGCGT
	1801	ACTCAAAGCA	GAACGCAAGG	AAGCAGAACG	GAGAATCTTG	CTCAGCCCAC	CAAGTGTCT
	1861	CCAGTGGAGA	CTTAGCGCAA	GCCATGATGT	TCTCGTGGTT	TTCTCAATG	AACTTGATGC
20	1921	GCTCAGGGAA	CGGAACCTTA	TCGACACCCG	CACAGTTTGC	ACCGTGGAAT	TTCAGCCAGT
	1981	AGTAACCTTC	CTTACCGATT	GGTTTACCTT	TCGCCAGCGT	AAGCAGTCCT	TTGGTCATAT
	2041	CGTTACCTTG	CGGGTTGAAC	ATTGACACAG	CGTAAACACG	ACCGCGCCAG	TCCATGTTGT
	2101	AAGGGAACCA	GATGGCCTTA	TGGTTAGCAA	ACTTATTGGC	TTGCTCAAGC	ATGAACCAA
	2161	GGCTGATACG	GCGAGACTTG	CGAGCCTTGT	CCTTGCGGTA	CACAGCAGCG	GCAGCACGTT
25	2221	TCCACGCGGT	GAGAGCCTCA	GGATTCATGT	CGATGTCTTC	CGGTTTCATC	GGGAGTTCTT
	2281	CACGCTCAAT	CGCAGGGATG	TCCTCGACCG	GACAATGCTT	CCACTGGTG	ATTACGTTGG
	2341	CGACCGCTAG	GACTTTCTTG	TTGATTTTCC	ATGCGGTGTT	TTGCGCAATG	TTAATCGCTT
	2401	TGTACACCTC	AGGCATGTAA	ACGTCTTCGT	AGCGCATCAG	TGCTTTCTTA	CTGTGAGTAC
	2461	GCACCAGCGC	CAGAGGACGA	CGACCGTTAG	CCCAATAGCC	ACCACCAGTA	ATGCCAGTCC
30	2521	ACGGCTTAGG	AGGAACCTAC	CAAGGTTGGA	ACATCGGAGA	GATGCCAGCC	AGCGCACCTG
	2581	CACGGGTTGC	GATAGCCTCA	GCGTATTCAG	GTGCGAGTTC	GATAGTCTCA	GAGTCTTGAC
	2641	CTACTACGCC	AGCATTTTGG	CGGTGTAAGC	TAACCATTCC	GGTTGACTCA	ATGAGCATCT
	2701	CGATGCAGCG	TACTCCTACA	TGAATAGAGT	CTTCCTTATG	CCACGAAGAC	CACGCCTCGC
	2761	CACCGAGTAG	ACCCTTAGAG	AGCATGTCAG	CCTCGACAAC	TTGCATAAAT	GCTTTCTTGT
35	2821	AGACGTGCCC	TACGCGCTTG	TTGAGTTGTT	CCTCAACGTT	TTTCTTGAAG	TGCTTAGCTT
	2881	CAAGGTCACG	GATACGACCG	AAGCGAGCCT	CGTCTCAAT	GGCCCGACCG	ATTGCGCTTG
	2941	CTACAGCCTG	AACGGTTGTA	TTGTCAGCAC	TGGTTAGGCA	AGCCAGAGTG	GTCTTAATGG
	3001	TGATGTACGC	TACGGCTTCC	GGCTTGATTT	CTTGCAGGAA	CTGGAAGGCT	GTCGGGCGCT
	3061	TGCCGCGCTT	AGCTTTCACT	TCCTCAAACC	AGTCGTTGAT	GCGTGCAATC	ATCTTAGGGA
40	3121	GTAGGGTAGT	GATGAGAGGC	TTGGCGGCAG	CGTTATCCGC	AACCTCACCA	GCTTTAAGTT
	3181	GACGCTCAAA	CATCTTGCGG	AAGCGTGCTT	CACCCATCTC	GTAAGACTCA	TGCTCAAGGG
	3241	CCAAGTGTTC	GCGAGCTAAA	CGCTCACCCT	AATGGTCAGC	CAGAGTGTTG	AACGGGATAG
	3301	CAGCCAGTTC	GATGTCAGAG	AAGTCGTTCT	TAGCGATGTT	AATCGTGTTT	ATGGTGTAGG
	3361	GCCTTCTGTA	GTTAGAGGAC	AGTTTAAATA	AGTAACAATC	ACCGCGATAA	ACGTAACCAA
45	3421	TTTTTAGCAA	CTAAACAGGG	GAACAACAATT	ACAGATTTTT	ATCTTTCGAT	TACGATTTTT
	3481	GGTTTATTTT	TTGATTTATG	ACCGAGATCT	TACTTTTGTT	GCGCAATTGT	ACTTATTGCA
	3541	TTTTTCTCTT	CGAGGAATTA	CCCAGTTTCA	TCATTCCATT	TTATTTTGCG	AGCGAGCGCA
	3601	CACTTGTGAA	TTATCTCCGC	CGAGACAGAA	CTTAATGGGC	CCGCTAACAG	CGCGATTGTC
	3661	TGGTGACCCA	ATGCGACCAG	ATGCTCCACG	CCCAGTCGCG	TACCGTCTTC	ATGGGAGAAA

	3721	ATAATACTGT	TGATGGGTGT	CTGGTCAGAG	ACATCAAGAA	ATAACGCCGG	AACATTAGTG
	3781	CAGGCAGCTT	CCACAGCAAT	GGCATCCTGG	TCATCCAGCG	GATAGTTAAT	GATCAGCCCA
	3841	CTGACGCGTT	GCGCGAGAAG	ATTGTGCACC	GCCGCTTTAC	AGGCTTCGAC	GCCGCTTCGT
	3901	TCTACCATCG	ACACCACCAC	GCTGGCACCC	AGTTGATCGG	CGCGAGATTT	AATCGCCGCG
5	3961	ACAATTTGCG	ACGGCGCGTG	CAGGGCCAGA	CTGGAGGTGG	CAACGCCAAT	CAGCAACGAC
	4021	TGTTTGCCCG	CCAGTTGTTG	TGCCACGCGG	TTGGGAATGT	AATTCAGCTC	CGCCATCGCC
	4081	GCTTCCACTT	TTTCCCGCGT	TTTCGCAGAA	ACGTGGCTGG	CCTGGTTCAC	CACGCGGGAA
	4141	ACGGTCTGAT	AAGAGACACC	GGCATACTCT	GCGACATCGT	ATAACGTTAC	TGGTTTCACA
	4201	TTCACCACCC	TGAATTGACT	CTCTTCCGGG	CGCTATCATG	CCATACCGCG	AAAGGTTTTG
10	4261	CGCCATTGCA	TGGTGTCAAC	GTAATATGCAT	GCCGCTTCGC	CTCCGGCCA	CCAGAATAGC
	4321	CTGCGATTCA	ACCCCTTCTT	CGATCTGTTT	TGCTACCGT	TGTAGCGCCG	GAAGATGCTT
	4381	TTCCGCTGCC	TGTTCAATGG	TCATTGCGCT	CGCCATATAC	ACCAGATTCA	GACAGCCAAT
	4441	CACCCGTTGT	TCACTGCGCA	GCGGTACGGC	GATAGAGGCG	ATCTTCTCCT	CCTGATCCCA
	4501	GCCGCGGTAG	TTCTGTCCGT	AACC			
15	SEQ ID No. 10: DNA 聚合酶的氨基酸序列 (来自大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) BL21)						
	1	MNTINIAKND	FSDIELAAIP	FNTLADHYGE	RLAREQLALE	HESYEMGEAR	FRKMFERQLK
	61	AGEVADNAAA	KPLITTLLPK	MIARINDWFE	EVKAKRGKRP	TAFQFLQEIK	PEAVAYITIK
	121	TTLACLTSAD	NTTVQAVASA	IGRAIEDEAR	FGRIRDLEAK	HFKNVVEEQL	NKRVGHVYKK
	181	AFMQVVEADM	LSKGLLGGEA	WSSWHKEDSI	HVGVRCEIEM	IESTGMVSLH	RQNAGVVGQD
20	241	SETIELAPEY	AEAIATRAGA	LAGISPMFQP	CVVPPKPWTG	ITGGGYWANG	RRPLALVRTH
	301	SKKALMRYED	VYMPEVYKAI	NIAQNTAWKI	NKKVLAVANV	ITKWKHCPVE	DIPAIEREEL
	361	PMKPEDIDMN	PEALTAWKRA	AAAVYRKDKA	RKSRRISLEF	MLEQANKFAN	HKAIWFPYNM
	421	DWRGRVYAVS	MFNPQGNDMT	KGLLTLAGKG	PIGKEGYWL	KIHGANCAGV	DKVPFPERIK
	481	FIEENHENIM	ACAKSPLNT	WWAEQDSPFC	FLAFCFEYAG	VQHHGLSYNC	SLPLAFDGSC
25	541	SGIQHFSAML	RDEVGGRAVN	LLPSETVQDI	YGIVAKKVNE	ILQADAINGT	DNEVVTVTDE
	601	NTGEISEKVK	LGTKALAGQW	LAYGVTRSVT	KRSVMTLAYG	SKEFGFRQQV	LEDTIQPAID
	661	SGKGLMFTQP	NQAAGYMAKL	IWESVSVTVV	AAVEAMNWLK	SAAKLLAAEV	KDKKTGEILR
	721	KRCVHWVTP	DGFPVWQEYK	KPIQTRLNLM	FLGQFRLQPT	INTNKDSEID	AHKQESGIAP
	781	NFVHSQDGS	LRKTVVWAHE	KYGIESFALI	HDSFGTIPAD	AANLFKAVRE	TMVDTYESCD
30	841	VLADFYDQFA	DQLHESQLDK	MPALPAKGNL	NLRDILESDF	AF	
	SEQ ID No. 11: 同源重组 DNA 片段 $\Delta ycgH$ -P _{trc} -ilvC 序列(3189bp), 人工序列(Artificial sequence)						
	1	AAATGGAGGG	ATAACAGCCA	GCGCAGTAGT	CAGTGAATTT	GGTGGCACCA	TCTTTATGAA
	61	TGGTGATAAT	TCAGTCGAGT	CGGGTGGGGC	ATATTCAGCG	GGACTTTTAA	GCCAGGTAA
35	121	TGATTCTGAA	AAGATGGTAA	ATAACACCCG	TCTTGAAACC	ACAGATAAAA	CGAACATTGT
	181	TACCTCTGGG	GAAAATGCAG	TAGGTGTTCT	TGCATGTTCA	AGTCCTGGAG	AGTCTCGAAC
	241	ATGTGTCGAT	GCTGTAGATG	ATGAAGTTAG	TGATTCTAAC	AGTTACGAAG	TTATTAGCCG
	301	TGCTGATTTA	AAAATGAATG	GTGGTTCCAT	AACAACATA	GGCATTAAAT	GCTATGGTGC
	361	TTATGCTAAT	GGGAAAAAAG	CATATATTAA	TTTAGATTAT	GTGGCACTTG	AAACTGTGGC
40	421	TGATGGAAGT	TATGCAGTTG	CTATTCGACA	AGGTAACATT	GATATAAAAA	ATAGTTCTAT
	481	TACAACAACA	GGCACTAAAG	CCCCCATTGC	AAAAATATAC	AATGGTGGAG	AGTTATTTTT
	541	TTCCAATGTC	ACCGCGGTAT	CAAAACAAGA	TAAAGGAATA	TCAATTGATG	CATCAAATAT
	601	CGATTCTCAA	GCCAAAATAG	CACTATTAAAG	TGTTGAACTT	TCAAGTGCTT	TGGATAGTAT
	661	TGATGTTAAC	AAAACATAAA	CGGATGTAAG	TATCCTTAAT	CGAAGTATTA	TCACACCTGG
45	721	TAATAATGTT	CTGGTTAATA	ATACTGGAGG	TGACTTAAAC	ATAATTTCTG	CCGACTCTAT
	781	TCTAAATGGA	GCGTTAACCC	GCAACAGCAA	TACGTTTCAT	ATCTGTACATA	TAGCCGCGCA
	841	GTTTCTTACC	TACCTGCTCA	ATCGCATGGC	TGCGAATCGC	TTCGTTACACA	TCACGCAGTT
	901	GCCCGTTATC	TACCGCGCCT	TCCGGAATAG	CTTACCCAG	GTCGCCCCGT	TGCAGCTCTG
	961	CCATAAACGG	TTTCAGCAAC	GGCACACAAG	CGTAAGAGAA	CAGATAGTTA	CCGTACTCAG

1021	CGGTATCAGA	GATAACCACG	TTCATTTCTG	ACAGACGCTT	ACGGGCGATG	GTGTTGGCAA
1081	TCAGCGGCAG	CTCGTGCAGT	GATTTCATAAT	ATGCAGACTC	TTCAATGATG	CCGGAATCGA
1141	CCATGGTTTC	GAACGCCAGT	TCAACGCCCC	CTTTCACCAT	CGCAATCATC	AGTACGCCTT
1201	TATCGAAGTA	CTCCTGCTCG	CCGATTTTGC	CTTCATACTG	CGGCGCGGTT	TCAAACGCGG
5 1261	TTTTGCCGGT	CTCTTCACGC	CAGGTCAGCA	GTTTCTTATC	ATCGTTGGCC	CAGTCCGCCA
1321	TCATACCGGA	AGAGAATTTC	CCGGAGATGA	TGTCGTCCAT	ATGTTTCTGG	AACAGGGGTG
1381	CCATGATCTC	TTTCAGCTGT	TCAGAAAGCG	CATAAGCACG	CAGTTTCGCC	GGGTTAGAGA
1441	GACGGTCCAT	CATCAGGGTG	ATGCCGCCCT	GTTTCAGTGC	TTCGGTGATG	GTTTCCCAAC
1501	CGAACTGAAT	CAGTTTTTCT	GCGTATGCTG	GATCGGTACC	TTCTTCCACC	AGCTTGTCGA
10 1561	AGCACAGCAG	AGAGCCAGCC	TGCAACATAC	CGCACAGGAT	GGTTTGCTCG	CCCATCAGGT
1621	CAGATTTTAC	TTCCGCAACG	AAGGACGATT	CCAGCACACC	CGCACGGTGA	CCACCGGTTG
1681	CAGCCGCCCA	GGCTTTGGCA	ATCGCCATGC	CTTCGCCTTT	CGGATCGTTT	TCCGGGTGAA
1741	CGGCAATCAG	CGTCGGTACG	CCGAACCCAC	GTTTGTAATC	TTCACGCACT	TCCGTGCTCG
1801	GGCATTTCGG	CGCAACCATC	ACTACGGTGA	TATCTTTACG	GATCTGCTCG	CCCACTTCGA
15 1861	CGATGTTGAA	ACCGTGCGAG	TAGCCCAGCG	CCGCGCCGTC	TTTCATCAGT	GGCTGTACGG
1921	TGCGCACTAC	ATCAGAGTGC	TGCTTGTCCG	GCGTCAGGTT	AATCACCAGA	TCCGCCTGTG
1981	GGATCAGTTC	TTCGTAAGTA	CCCACTTTAA	AACCATTTTC	GGTCGCTTTA	CGCCAGGACG
2041	CGCGCTTCTC	GGCAATCGCT	TCTTTACGCA	GAGCGTAGGA	GATATCGAGA	CCAGAATCAC
2101	GCATGTTTAC	GCCCTGGTTC	AGACCCTGTG	CGCCACAGCC	GACGATGACT	ACTTTTTTAC
20 2161	CCTGAAGGTA	GCTCGCGCCA	TCGGCGAATT	CATCGCGGCC	CATAAAGCGA	CATTTGCCCA
2221	GCTGTGCCAG	CTGCTGGCGC	AGATTCAGTG	TATTGAAGTA	GTTAGCCATG	GTCTGTTTCC
2281	TGTGTGAAAT	TGTTATCCGC	TCACAATTCC	ACACATTATA	CGAGCCGGAT	GATTAATTGT
2341	CAAAAACCTG	GCGTAAATGG	CAACCTGAAT	CCAGCGGCCA	GCGTCTGGGG	AATGTGGGCG
2401	TGCAGCTGGG	TGATAATGGC	TACAATGACA	CCGCAGTGAT	GGTGGGCCTG	AAATATAAGT
25 2461	TCTGATCCCG	CCGTTAGCTA	AAAAACCGCG	TCGTATTCAT	CGACGCGGTA	CATATGAAAT
2521	ATTATTTTTT	GCCGATAGCA	CGCATGGTGT	CATCAATTGC	CGTGATCAAC	AGCATTGCG
2581	GGTCTTTAGC	GCAAACCTGA	TTCAGTTTTT	CTACCACTTT	GGCGCTCAGT	TCCGGAGATT
2641	GCTCAATTTT	TAAATCACGG	CTGGCAACGC	TGGCATTACC	CATTACCGCA	ACAATTTCTG
2701	CAACCTGTGC	GCTGTCAGTT	TTTGCCATTT	CGTTGGCTTC	TGCGCAAGTA	ATATAGGTTT
30 2761	CTGACGGCAA	ACCGTTTTTA	ATATTGTAGT	CCTGCGCCCA	GGTCATTGGT	GCGAAACAA
2821	ACAGGCCCGC	CAGTAAAGCA	AATTTTTTCA	TCATCATTCC	TTATTTTCAT	TTACCCAGAA
2881	TTGCACCACC	CGTACCGCCA	ATCACGGCAC	CTTTAATCGC	CCCTTCGAGG	CCATTGCCGG
2941	TCAGAACGCC	AGTGACAGCA	CCAACGGCGG	CACCACTTTT	TGCACCTTTA	CGCGCATTTT
3001	TACCGTCGCG	GCCTTTTTCT	GTTACTGCAC	CAACACCAGC	GCCAACAGCT	GCACCTTTCA
35 3061	GTACGCCATT	AACACCATTG	CCAGTAAGTA	AACCAACGCC	TGCGCCTAGC	AATGCACCTT
3121	TCGTGGTGCG	GTTTCATATC	GCCATCGCTG	GCGTGGAGCA	GAACAATGCT	GAGATAAGCC
3181	CGAAGGCAA					

SEQ ID No. 12: i1vC 蛋白质的氨基酸序列 (来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110)

1	MANYFNTLNL	RQQLAQLGKC	RFMGRDEFAD	GASYLQGKKV	VIVGCGAQLG	NQGLNMRDSG
40 61	LDISYALRKE	AIAEKRASWR	KATENGFKVG	TYEELIPQAD	LVINLTPDKQ	HSDVVRTVQP
121	LMKDGAALGY	SHGFNIVEVG	EQIRKDITVV	MVAPKCPGTE	VREEYKRGFG	VPTLIAVHPE
181	NDPKGEGMAI	AKAWAAATGG	HRAGVLESSF	VAEVKSDLMG	EQTILCGMLQ	AGSLLCFDKL
241	VEEGTDPAYA	EKLIQFGWET	ITEALKQGGI	TLMMDRLSNP	AKLRAYALSE	QLKEIMAPLF
301	QKHMDDIISG	EFSSGMMADW	ANDDKKLLTW	REETGKTAFE	TAPQYEGKIG	EQEYFDKGVL
45 361	MIAMVKAGVE	LAFETMVDGS	IIIESAYYES	LHELPLIANT	IARKRLYEMN	VVISDTAEYG
421	NYLFSYACVP	LLKPFMAELQ	PGDLGKAIP	GAVDNGQLRD	VNEAIRSHAI	EQVGKKLRGY
481	MTDMKRIAVA	G				

SEQ ID No. 13: 同源重组 DNA 片段 $\Delta yjiV$ -Ptrc -ilvE-PilvD-ilvD-2 序列 (4713bp), 人工序列 (Artificial sequence)

1	AGTTCGCCCT	TTGCTCTCTC	TTTGTACAGC	TGACTTTGGA	TTCTGCCGA	ACGAAAAAGC
61	AGATCCCTTC	TCTGCTGCTC	GCAGGTTTGA	GCTTCACCAT	TGCTCTTG TG	GTAATTCAG
121	GTCAGGCCCT	ATTTGCGGCG	CTGCTGATCT	TCTTGGGTCT	GTTGACCATC	CGGTACTTCT
181	TCTTGGGAAA	GGCTGCTAAA	TGACAACTGA	TTTCTCCTGT	ATTCTCCTTG	TTGTCGCAGT
5	241	ATGTGCAGTC	ATTACTTTTG	CGCTCCGGGC	GGTTCCGTTT	TTAATCCTTA
	301	TGAATCACAA	TTTGTGGGCA	AAATGGCGAT	GTGGATGCCA	GCAGGAATCC
	361	GACCGCATCA	ACGTTTCGCA	GCAATGCGAT	AGATCTGAAG	ACTCTAACCT
	421	TGCCGTTGCG	ATTACAGTGG	TGGCGCATCT	TCTTGGCGGT	CGACGCACCT
	481	TGGCGCTGGC	ACCATCGTTT	TTGTTGGACT	GGTGAATCTT	TTCTAACTAA
10	541	TGTGAAGGGA	TGTCAGGACG	TTACAGTTAC	AGCAAATGAA	ACTTATCGGA
	601	AAGAGAACAA	ATCAGCATCG	GAAGGTTTGC	TCTAAATGGA	AAGCGTGCAA
	661	TCATCCAGAT	GAAACATTTA	TTGGTGTACC	AAAAGTCATT	TCTACACTAC
	721	AAGCATTGAT	GTAACGCGTT	ACACGTGCTG	ACAAAAACAGC	ATTACAGCCA
	781	CTGCGTTGTT	AACGTCTGCT	TAATACACTG	TGGCCGTTTT	GCAAAAACTG
15	841	CGGCGCATGC	GTTCAATCCG	TTCTCTGCT	AAGCGGTCAG	CCGCTAAATA
	901	CCGTACGCT	GAGAAATCTC	AAGTACACGC	TCGATATTGC	CGTAAATGCC
	961	TTCAATGCAC	GTTCTGCATT	ATAGCCGTAA	AGCTCATCTG	CCACGTTGAT
	1021	GCGTTAATCA	CGTAATCCGG	TGCATAAACG	ATGCCCATTT	CGTGAATTTG
	1081	CGTGTCTCTT	TTAATTGGTT	GTTAGCCGCA	CCTGCGATCA	CTTTCGCCTT
20	1141	ATGGTGTCTG	CGTTAATAGT	CGCACCAAGG	GCACACGGCG	CATAAATATC
	1201	GAATAAATGT	CATCAGGATC	TACCGCACGG	GCGCCAAAAT	CTTCAACTGC
	1261	GATTGTTTGT	TGATATCCGT	AACGATTAAG	TTTGCTCCTT	CTTCATGCAG
	1321	AGGTTATAGG	CTACGTTCCC	AACACCCTGT	ACAGCAATGG	TTTTTCCTTC
	1381	GTTCCGAAAG	CAGCTTTAGC	TGCTGCCTTC	ATTCTCTGT	ACACCCCGTA
25	1441	GGGACCGGAT	TTCCAGAAGA	GCCGAAAGCA	GGAGAAATCC	CTGTGACATA
	1501	TCATGAATGA	TATCCATATC	CTCGACCGTT	GTGCCACAT	CTTCAGCCGT
	1561	CCATTGATGC	CTTGAATATA	GCGGCCAAAC	GCGCGGAACA	TTTCTCTATT
	1621	CGCGGATCGC	CGATAATGAC	TGTTTTTCCG	CCGCCAAGGT	TTAAGCCTGC
	1681	TTATAGGTCA	TGCCTCTTGC	CAATCTGAGC	GCATCTTCAA	TTGCCGCTTC
30	1741	TATGTCCACA	TTCTCGTTCC	GCCAAGCGCC	GGACCAAGCG	TTGTATCATG
	1801	ATCGCTTTTA	ATCCAGATTG	TTTCATCTGG	CAGAATACCA	ATTGTTTCGT
	1861	TCCATATATT	TAAAAAGTTC	CATGGTCTGT	TTCTGTGTG	AAATTGTTAT
	1921	TTCCACACAT	TATACGAGCC	GGATGATTAA	TTGTCAATTA	ACCCCCAGT
	1981	CGCGCACCGC	GCCTTTGTGC	GCGCTGGTTG	CCAGGCTGGC	ATAAGCACGC
35	2041	AGACCTGACG	TTACGATTTT	TTGCGCTCC	AGGCTTTGTC	ACCTCGAGCG
	2101	CACGACGCGC	CGCCAGTTTC	GCATCGCTTA	CCTGTAAC TG	AATGCCACGG
	2161	CGATAGCGAT	CAGGTACCA	TCTTCAATCA	GGCCAATGCT	GCCGCCGCTT
	2221	GTGAGACGTG	GCCGATGGAA	AGACCAGAGG	TGCCACCAGA	GAAACGACCG
	2281	GCGCACAGGC	TTTGCCGAGA	CCCATTGATT	TCAGGAAGCT	GGTTGGGTAG
40	2341	GCATCCCCGG	ACCGCCTTTC	GGGCCCTTCA	AGCGAATTAC	TACCACATCT
	2401	CTTTACCGCC	GAGAATCGCT	TCTACCGCAT	CGTCTGGCT	TTCTGACACT
	2461	CGGTGAATTT	GAGGATGCTG	TCATCGACGC	CTGCCGTTTT	CACGATGCAG
	2521	CAAAGTTACC	GTAGAGCACC	GCCAGGCCGC	CGTCTTTGCT	GTAGGCGTGT
	2581	GGATACAGCC	ATTGGCGCGA	TCGTGCTCCA	GCGTATCCCA	ACGGCAATCT
45	2641	CCTGTGTGGT	ACGAATGCCT	GCAGGACCTG	CGCGGAACAT	ATTTTTTACC
	2701	GGGTCAGCAT	AACGTCGTAT	TGTTCCAGCG	TTTGCGGCAA	CGTCAGGCCA
	2761	TCACATCACG	GTTTCAGTAAC	CCCAGCGCAT	CCAGTTTCGCC	GAGAATACCG
	2821	CAGCACGGTG	AACATCTTCC	ATATGGTATT	TCTGGGTGCT	CGGCGCAACT
	2881	GTGGAACCTT	GCGGGAAAGC	TTATCGATAT	CACTCATGGT	GAAGTCGATT

	2941	GCGCCGCCGC	CAGCAGGTGA	AGTACGGTGT	TAGTCGATCC	ACCCATCGCG	ATATCCAGCG
	3001	TCATGGCGTT	TTCAAACGCC	GCCTTACTGG	CGATATTACG	CGGCAGTGCA	CTTTCGTCGT
	3061	TTTGCTCGTA	ATAACGTTTG	GTCAATTCAA	CAATGCGTTT	ACCAGCATT	AGGAACAGCT
	3121	GCTTACGGTC	GGCGTGGGTT	GCCAGCAGCG	AGCCGTTGCC	CGGCTGCGAC	AGGCCAGCG
5	3181	CTTCGGTCAG	GCAGTTCATT	GAGTTAGCGG	TAAACATCCC	GGAGCAGGAA	CCGCAGGTCTG
	3241	GACACGCGGA	ACGTTCAACC	TGATCGCTCT	GGGAGTCAGA	TACTTTCGGG	TCTGCGCCCT
	3301	GGATCATCGC	ATCAACCAGA	TCGAGCTTGA	TGATCTGATC	GGAAAGTTTG	GTTTTCCCGG
	3361	CCTCCATCGG	GCCGCCGGAA	ACAAAGATCA	CCGGAATATT	CAGGCGCAGG	GAAGCCATCA
	3421	GCATCCCCGG	GGTGATTTTG	TCGCAGTTAG	AGATGCAGAC	CATGGCGTCG	GCGCAGTGGG
10	3481	CGTTGACCAT	ATACTCAACG	GAATCAGCGA	TCAGTTCGCG	AGATGGCAGT	GAATAAAGCA
	3541	TCCCCCGTG	GCCCATGGCA	ATCCCATCAT	CCACCGCAAT	GGTGTGAAC	TCTTTGGCAA
	3601	CGCCGCCAGC	CGCTTCAATT	TGTTCCGGCA	CCAGTTTACC	GAGATCGCGC	AGATGGACGT
	3661	GACCCGGTAC	AAATTGGGTG	AACGAGTTCA	CAACCGCGAT	AATCGGCTTA	CCGAAATCGG
	3721	CGTCGGTCAT	TCCGGTGGCG	CGCCACAGCG	CACGAGCACC	CGCCATATTA	CGACCATGAG
15	3781	TGGTGGTGGC	GGAACGGTAC	TTAGGCATAC	TTTATTTACT	CCCAGTGTCT	GTCTCGTAAA
	3841	TGGGACGGTG	CGTGCCGTCC	CATTTTTTGT	ATTTCACGG	ATGTGCTGGT	GGAGGTGATC
	3901	GCCTCCTGAT	GATGAGCCGC	TCCCGATGTG	GTGTCGGGAG	CGGTATTTTC	TATAAACTT
	3961	ACCGCTTATT	TGAGATATTC	ATCGAAAATG	TCGAGTAATT	CTTGATGTAT	ACACGGCCAT
	4021	TCCTGACCTA	AATTGACGGT	ACACAAGCCA	ATATCGAAGC	CATTAATTTT	ATAACGATGT
20	4081	TTCACTGCGG	TATCTACGTG	GGGATATATT	AATAACCCCC	CTATGTTTTT	GCCATTTTCA
	4141	GGCTTTAACG	ACCATAAGTA	ATTCATCAGT	TGATAAAGAT	TTTGCGAATG	AAATTTTTCT
	4201	GTTCCCATTC	GTCGTGAAAA	AATGCTCTTA	TAGTATTTGG	CGTCAACGAT	AAGTATTTTT
	4261	TCTGATGAGC	GAATGGTGAT	GTCAGTTTCC	ATTCGAGGTA	ACAAATTAAG	TGACTGATCC
	4321	GATATACTCG	ATGCATCCCA	TTTTAAATAA	GAGCGGGTTG	TGTTTGACAG	CGTTAATTCA
25	4381	CGACGGCAAA	ATTCATAAAG	AACTTTTGA	TAAAGTAATG	ACATCTCTTT	TTCGTTTCTT
	4441	TCAAAATCAT	AGAAACGGTA	GTGTCCTTTG	TTTTGACCTG	GAATAGAATT	ATTGACGATG
	4501	AATTTGCAGA	CACTGATAAC	GAATTTATAA	TAACGCGTAT	TTTTTCCGCC	ATTCAGATAG
	4561	CTGAAATGCT	GCGGAGTTAA	ATGAAGAGTG	CTAATGCCCC	GTAATTTTCT	ATAAAGTGAA
	4621	CGAGCTTCAT	CTCTGATAGT	TGAATTTAAC	TTTTCATGCT	TAATTAATAT	GGCTAATGTG
30	4681	CTTTTTATAA	TTCGGTTAGC	CAGCGTGTCT	TCA		

权利要求

1. 用于生产缬氨酸的工程菌，其含有 B1)、B2)、B3)、B4) 或 B5) 的特征；
- 5 B1) 包括 B11)、B12) 和 B13)：
- B11) *yjiT* 基因不表达或弱表达，或所述 *yjiT* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；
- B12) *brnF* 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *brnF* 基因编码蛋白质的活性增强；
- 10 B13) *brnE* 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *brnE* 基因编码蛋白质的活性增强；
- B2) 包括 B21)、B22) 和 B23)：
- B21) *yjiV* 基因不表达或弱表达，或所述 *yjiV* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；
- 15 B22) *ilvE* 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *ilvE* 基因编码蛋白质的活性增强；
- B23) *ilvD* 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *ilvD* 基因编码蛋白质的活性增强；
- B3) 包括 B31) 和 B32)：
- 20 B31) *trpR* 基因不表达或弱表达，或所述 *trpR* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；
- B32) *ilvH*^{G14D、S17F} 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因编码蛋白质的活性增强；所述 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因由将 *ilvH* 基因中第 14 位甘氨酸密码子替换为天冬氨酸密码子、第 17 位丝氨酸密码子替换为苯丙氨酸密码子得到；
- 25 B4) 包括 B41)、B42) 和 B43)：
- B41) *lacI* 基因不表达或弱表达，或抑制所述 *lacI* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；
- B42) *lacZ* 基因不表达或弱表达，或抑制所述 *lacZ* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；
- 30 B43) DNA 聚合酶的含量增加或所述 DNA 聚合酶的活性增强；
- B5) 包括 B51) 和 B52)：
- B51) *ycgH* 基因不表达或弱表达，或所述 *ycgH* 基因编码的蛋白质的活性减弱或丧失；
- B52) *ilvC* 基因编码蛋白质的含量增加或所述 *ilvC* 基因编码蛋白质的活性增强；
- 35 所述工程菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。
2. 用于生产缬氨酸的工程菌，为对受体菌进行改造得到的重组菌；所述改

造包括 A1)、A2)、A3)、A4) 或 A5) ;

A1) 包括 A11)、A12) 和 A13) ;

A11) 敲除所述受体菌的 *yjiT* 基因, 抑制所述 *yjiT* 基因的表达或抑制所述 *yjiT* 基因编码的蛋白质的活性;

5 A12) 增加所述受体菌中 *brnF* 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *brnF* 基因编码蛋白质的活性;

A13) 增加所述受体菌中 *brnE* 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *brnE* 基因编码蛋白质的活性;

A2) 包括 A21)、A22) 和 A23) ;

10 A21) 敲除所述受体菌的 *yjiV* 基因, 抑制所述 *yjiV* 基因的表达或抑制所述 *yjiV* 基因编码的蛋白质的活性;

A22) 增加所述受体菌中 *ilvE* 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *ilvE* 基因编码蛋白质的活性;

15 A23) 增加所述受体菌中 *ilvD* 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *ilvD* 基因编码蛋白质的活性;

A3) 包括 A31) 和 A32) ;

A31) 敲除所述受体菌的 *trpR* 基因, 抑制所述 *trpR* 基因的表达或抑制所述 *trpR* 基因编码的蛋白质的活性;

20 A32) 增加所述受体菌中 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因编码蛋白质的活性; 所述 *ilvH*^{G14D、S17F} 基因由将 *ilvH* 基因中第 14 位甘氨酸密码子替换为天冬氨酸密码子、第 17 位丝氨酸密码子替换为苯丙氨酸密码子得到;

A4) 包括 A41)、A42) 和 A43) ;

25 A41) 敲除所述受体菌的 *lacI* 基因, 抑制所述 *lacI* 基因的表达或抑制所述 *lacI* 基因编码的蛋白质的活性;

A42) 敲除所述受体菌的 *lacZ* 基因, 抑制所述 *lacZ* 基因的表达或抑制所述 *lacZ* 基因编码的蛋白质的活性;

A43) 增加所述受体菌中 DNA 聚合酶的含量或增强所述 DNA 聚合酶的活性;

A5) 包括 A51) 和 A52) ;

30 A51) 敲除所述受体菌的 *ycgH* 基因, 抑制所述 *ycgH* 基因的表达或抑制所述 *ycgH* 基因编码的蛋白质的活性;

A52) 增加所述受体菌中 *ilvC* 基因编码蛋白质的含量或增强所述 *ilvC* 基因编码蛋白质的活性;

所述受体菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 。

35 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的工程菌, 其特征在于: 所述 *brnF* 基因与所述 *brnE* 基因来源于谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 。

4. 根据权利要求 3 所述的工程菌, 其特征在于: 所述 *brnF* 基因编码序列表

中 SEQ ID No. 2 所示的蛋白质；

所述 brnE 基因编码序列表中 SEQ ID No. 3 所示的蛋白质。

5 根据权利要求 4 所述的工程菌，其特征在于：所述 brnF 基因为序列表中 SEQ ID No. 1 的第 832-1587 位所示的 DNA 分子；

所述 brnE 基因为序列表中 SEQ ID No. 1 的第 1584-1910 位所示的 DNA 分子。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的工程菌，其特征在于：所述 ilvE 基因来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) ；

所述 ilvD 基因来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 。

7. 根据权利要求 6 所述的工程菌，其特征在于：所述 ilvE 基因编码序列表中 SEQ ID No. 6 所示的蛋白质；

所述 ilvD 基因编码序列表中 SEQ ID No. 5 所示的蛋白质。

8. 根据权利要求 7 所述的工程菌，其特征在于：所述 ilvE 基因为序列表中 SEQ ID No. 4 的第 808-1902 位所示的 DNA 分子；

所述 ilvD 基因为序列表中 SEQ ID No. 4 的第 1977-3827 位所示的 DNA 分子。

15 9. 根据权利要求 1-8 中任一所述的工程菌，其特征在于：所述 ilvH 基因来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 。

10. 根据权利要求 9 所述的工程菌，其特征在于：所述 ilvH^{G14D}、S17F 基因编码序列表中 SEQ ID No. 8 所示的蛋白质。

11. 根据权利要求 10 所述的工程菌，其特征在于：所述 ilvH^{G14D}、S17F 基因为序列表中 SEQ ID No. 7 的第 835-1326 位所示的 DNA 分子。

12. 根据权利要求 1-11 中任一所述的工程菌，其特征在于：所述 DNA 聚合酶来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 。

13. 根据权利要求 12 所述的工程菌，其特征在于：所述 DNA 聚合酶为序列表中 SEQ ID No. 10 所示的蛋白质。

25 14. 根据权利要求 13 所述的工程菌，其特征在于：所述 DNA 聚合酶的编码基因为序列表中 SEQ ID No. 9 的第 701-3352 位所示的 DNA 分子。

15. 根据权利要求 1-14 中任一所述的工程菌，其特征在于：所述 ilvC 基因来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 。

16. 根据权利要求 15 所述的工程菌，其特征在于：所述 ilvC 基因编码序列表中 SEQ ID No. 12 所示的蛋白质。

17. 根据权利要求 16 所述的工程菌，其特征在于：所述 ilvC 基因为序列表中 SEQ ID No. 11 的第 794-2269 位所示的 DNA 分子。

18. 根据权利要求 1、3-17 中任一所述的工程菌，其特征在于：所述工程菌还含有 B1)、B2)、B3)、B4) 和 B5) 中的任两种、任三种、任四种或五种特征。

19. 根据权利要求 2-17 中任一所述的工程菌，其特征在于：所述改造还包括 A1)、A2)、A3)、A4) 和 A5) 中的任两种、任三种、任四种或五种。

20. 制备用于生产缬氨酸的工程菌的方法，包括：对受体菌进行权利要求 2-17 中任一所述 A1)、A2)、A3)、A4) 或 A5) 的改造，得到目的工程菌，所述受体菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

5 21. 根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于：所述方法还包括对所述受体菌进行权利要求 2-17 中任一所述 A1)、A2)、A3)、A4) 和 A5) 这五种中的任两种、任三种、任四种或五种的改造。

22. L-缬氨酸的制备方法，包括：培养权利要求 1-19 中任一所述工程菌，得到 L-缬氨酸。

10 23. 权利要求 1-19 中任一所述工程菌在生产 L-缬氨酸中的应用，或在制备用于生产 L-缬氨酸产品中的应用，或在制备含有 L-缬氨酸的食品、饲料或药品中的应用。

成分	配方
硫酸铵	14 g/L
磷酸二氢钾	1 g/L
磷酸氢二钾	1 g/L
硫酸镁	0.5 g/L
酵母粉	2 g/L
硫酸亚铁	18 mg/L
硫酸锰	4.2 mg/L
生物素	0.02 mg/L
维生素B1	2 mg/L
antifoam (CB-442) 消泡剂	0.5 mL/L
70%葡萄糖 (底糖)	40 g/L

图 1

校正 DO 100%	温度37℃、风量1 L/min、转速400 rpm、罐压0.01 mpa, 5 min后标定		
接种量	3.5%	培养温度℃	33 ℃
pH	pH7.0±0.05	溶氧DO	10-20%
初始条件	温度33℃、pH 7.0、罐压0 Mpa、风量0.1 L/min、转速400 rpm		
全程控制	温度33℃、pH 7.0、罐压0 Mpa、风量0.2 L/min、转速400 rpm		
残糖控制	F12h前0.1-0.2%；F12h后结合DO要求控制残糖≤0.02%		
培养成熟标准	OD ₆₁₀ 30-35；OD ₆₁₀ >30后停止通风静止2小时（根据批次实验目的，进行菌体分离或连续催化） 实验目的，进行菌体分离或连续催化）。		
流加物料	氨水、70%浓糖、5%泡敌		
发酵周期	18-20 h左右		

图 2

菌株	L-缬氨酸浓度 (g/L)			平均值 (g/L)	显著性分析
	第一次	第二次	第三次		
W3110	0.023	0.078	0.045	0.049±0.028	
W3110-yjiT	0.478	0.384	0.563	0.475±0.089	P<0.01
W3110-yjiV	0.534	0.426	0.647	0.536±0.11	P<0.01
W3110-trpR	0.217	0.408	0.323	0.316±0.095	P<0.01
W3110-lacIZ	0.367	0.274	0.458	0.366±0.089	P<0.01
W3110-ycgH	0.437	0.346	0.533	0.439±0.093	P<0.01
W3110-yjiT-yjiV	0.876	0.784	0.969	0.876±0.092	P<0.01
W3110-yjiT-yjiV-trpR	1.223	1.33	1.418	1.32±0.097	P<0.01
W3110-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ	1.526	1.733	1.64	1.63±0.105	P<0.01
W3110-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH	1.859	1.768	1.947	1.86±0.090	P<0.01
W3110-yjiV-trpR	0.959	0.868	0.747	0.858±0.106	P<0.01
W3110-yjiV-trpR-lacIZ	1.219	1.127	1.434	1.26±0.157	P<0.01
W3110-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH	1.757	1.448	1.66	1.62±0.158	P<0.01
W3110-trpR-lacIZ	0.932	1.129	0.897	0.986±0.125	P<0.01
W3110-trpR-lacIZ-ycgH	1.335	1.148	1.229	1.24±0.094	P<0.01
W3110-lacIZ-ycgH	0.727	0.931	0.873	0.844±0.105	P<0.01
CGMCC22721	78.64	77.49	79.06	78.40±0.81	
CGMCC22721-yjiT	81.67	80.94	82.04	81.55±0.56	P<0.01
CGMCC22721-yjiV	82.15	80.83	81.48	81.49±0.66	P<0.01
CGMCC22721-trpR	81.35	80.77	79.52	80.55±0.93	P<0.05
CGMCC22721-lacIZ	80.63	81.07	79.39	80.36±0.87	P<0.05
CGMCC22721-ycgH	79.85	81.26	80.15	80.42±0.74	P<0.05
CGMCC22721-yjiT-yjiV	81.87	83.06	82.78	82.57±0.62	P<0.01
CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR	84.49	83.97	85.14	84.53±0.58	P<0.01
CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ	87.13	85.69	86.78	86.53±0.75	P<0.01
CGMCC22721-yjiT-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH	87.65	86.91	88.07	87.54±0.58	P<0.01
CGMCC22721-yjiV-trpR	82.46	81.94	83.08	82.49±0.57	P<0.01
CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ	84.72	86.03	85.29	85.35±0.66	P<0.01
CGMCC22721-yjiV-trpR-lacIZ-ycgH	87.15	86.49	85.78	86.47±0.67	P<0.01
CGMCC22721-trpR-lacIZ	82.71	81.68	83.24	82.54±0.79	P<0.01
CGMCC22721-trpR-lacIZ-ycgH	84.45	85.32	83.97	84.58±0.69	P<0.01
CGMCC22721-lacIZ-ycgH	82.51	84.27	83.76	83.51±0.91	P<0.01

图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/100975

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/21(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12P13/08(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)

IPC:C12N; C12P

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)

CJFD, CNTXT, ENTXTC, ENTXT, VENWFB, WFCCP, WFCD, WFCJ, WFCOA, WFCSTA, WFFCP, WFFD, WFFJ, WFFOA, WFS, WFSTR, PubMed, ISI, CNKI: 缬氨酸, Val, L-Val, L-缬氨酸, lacI, lacZ, yjiT, brnF, brnE, yjiV, ilvE, ilvD, trpR, ilvH, DNA聚合酶, ycgH, ilvC, 大肠杆菌, 加强, 缺失, 抑制, 增加, 增强

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 116004500 A (TIANJIN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 25 April 2023 (2023-04-25) claim 1, and embodiment 1	1-5, 22-23
Y	CN 116004500 A (TIANJIN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 25 April 2023 (2023-04-25) claim 1, and embodiment 1	6-8, 15-21
Y	CN 114717172 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 08 July 2022 (2022-07-08) description, paragraphs 6-36	6-8, 15-21
Y	HAO, Yannan et al. "High-level production of L-valine in Escherichia coli using multi-modular engineering" <i>Bioresource Technology</i> , Vol. 359, 11 June 2022 (2022-06-11), page 2, table 1, and page 6, section 3.5	9-11, 18-21
Y	CN 1310233 A (AJINOMOTO CO., INC.) 29 August 2001 (2001-08-29) description, pages 9-10 and 14, and table 1	9-11, 18-21



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

"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

03 September 2024

Date of mailing of the international search report

10 September 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/100975

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 115975957 A (NINGXIA EPPEN BIOTECH CO., LTD.) 18 April 2023 (2023-04-18) claims 1-9	1-23
A	US 2009053779 A1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 26 February 2009 (2009-02-26) claim 7	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/100975

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/CN2024/100975

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	116004500	A	25 April 2023	None			
CN	114717172	A	08 July 2022	None			
CN	1310233	A	29 August 2001	RU	2209246	C2	27 July 2003
				US	2002037562	A1	28 March 2002
				US	6737255	B2	18 May 2004
				JP	2001231584	A	28 August 2001
				FR	2804971	A1	17 August 2001
				FR	2804971	B1	23 April 2004
CN	115975957	A	18 April 2023	None			
US	2009053779	A1	26 February 2009	EP	2038403	A1	25 March 2009
				EP	2038403	A4	30 December 2009
				WO	2008088104	A1	24 July 2008
				KR	100832740	B1	27 May 2008
				US	8148137	B2	03 April 2012
				JP	2009521960	A	11 June 2009
				JP	4790025	B2	12 October 2011

A. 主题的分类

C12N1/21(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12P13/08(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)

IPC:C12N; C12P

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))

CJFD,CNXTX,ENTXTC,ENTXT,VENWFB,WFCPP,WFCJ,WFCOA,WFCSTA,WFFCP,WFFD,WFFJ,WFFOA,WFS,WFSTR,PubMed,ISI,CNKI: 缬氨酸,Val,L-Val,L-缬氨酸, lacI,lacZ, yjiT, brnF,bmE,yjiV,ilvE,ilvD, trpR,ilvH,DNA聚合酶,ycgH,ilvC,大肠杆菌,加强,缺失,抑制,增加,增强

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
X	CN 116004500 A (天津科技大学等) 2023年4月25日 (2023 - 04 - 25) 权利要求1, 实施例1	1-5、22-23
Y	CN 116004500 A (天津科技大学等) 2023年4月25日 (2023 - 04 - 25) 权利要求1, 实施例1	6-8、15-21
Y	CN 114717172 A (江南大学) 2022年7月8日 (2022 - 07 - 08) 说明书第6-36段	6-8、15-21
Y	HAO,Y.等. "High-level production of L-valine in Escherichia coli using multi-modular engineering" Bioresource Technology, 第359卷, 2022年6月11日 (2022 - 06 - 11), 第2页表1, 第6页第3.5节	9-11、18-21
Y	CN 1310233 A (味之素株式会社) 2001年8月29日 (2001 - 08 - 29) 说明书第9-10、14 页, 表1	9-11、18-21
A	CN 115975957 A (宁夏伊品生物科技股份有限公司) 2023年4月18日 (2023 - 04 - 18) 权利要求1-9	1-23

☒ 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

“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

国际检索实际完成的日期

2024年9月3日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月10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

吕小蒙

电话号码 (+86) 010-53962044

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

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	US 2009053779 A1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2009年2月26日 (2009 - 02 - 26) 权利要求7	1-23

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:
 - 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/CN2024/100975

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	116004500	A	2023年4月25日	无			
CN	114717172	A	2022年7月8日	无			
CN	1310233	A	2001年8月29日	RU	2209246	C2	2003年7月27日
				US	2002037562	A1	2002年3月28日
				US	6737255	B2	2004年5月18日
				JP	2001231584	A	2001年8月28日
				FR	2804971	A1	2001年8月17日
				FR	2804971	B1	2004年4月23日
CN	115975957	A	2023年4月18日	无			
US	2009053779	A1	2009年2月26日	EP	2038403	A1	2009年3月25日
				EP	2038403	A4	2009年12月30日
				WO	2008088104	A1	2008年7月24日
				KR	100832740	B1	2008年5月27日
				US	8148137	B2	2012年4月3日
				JP	2009521960	A	2009年6月11日
				JP	4790025	B2	2011年10月12日