

(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
2017年8月3日 (03.08.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/128509 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/70 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/077246
- (22) 国际申请日: 2016年3月24日 (24.03.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610053310.9 2016年1月27日 (27.01.2016) CN
- (71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (72) 发明人: 徐志南 (XU, Zhinan); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。 濮悦 (PU, Yue); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。 黄磊 (HUANG, Lei); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。 董昌 (DONG, Chang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。 卢建刚 (LU, Jiangang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 浙江杭州金通专利事务所有限公司 (ZHEJIANG HANGZHOU JINTONG PATENT AGENCY CO.,LTD.); 中国浙江省杭州市下城区武林广场 8 号省科协大楼 19 层, Zhejiang 310003 (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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

[见续页]

(54) Title: METHOD FOR IN SITU TARGET PROTEIN EVOLUTION WITHIN ESCHERICHIA COLI CELL

(54) 发明名称: 大肠杆菌细胞内原位进化目标蛋白质的新方法

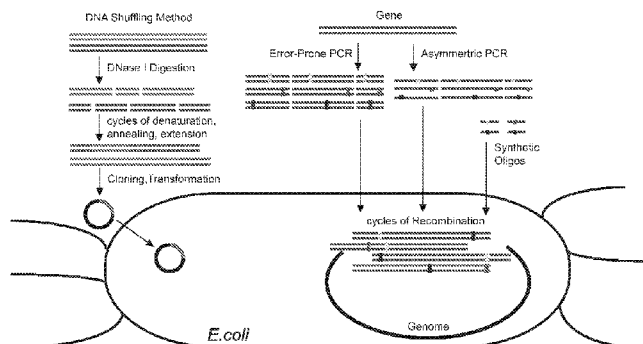


图 1

(57) Abstract: Provided is a method for in situ protein evolution within an escherichia coli cell. The method may be used for microbial single gene in situ evolution or multiple target gene simultaneous in situ evolution, and is used to increase enzyme catalytic activity and microbial metabolite yield.

(57) 摘要: 提供了一种在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的方法, 所述方法可用于微生物单个基因的原位进化或多个目标基因的同时原位进化, 用以提高酶的催化活性, 并提高微生物代谢产物的产率。



WO 2017/128509 A1



-
- 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))。

说明书

大肠杆菌细胞内原位进化目标蛋白质的新方法

发明领域

本发明涉及一种在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法，属于生物技术领域。

背景技术

定向进化技术是一种在实验室中模拟达尔文进化，进化出在自然界并不存在的或是具有更优性质的蛋白质，并可以通过改变酶的催化效率改变代谢流，扩展或构建新的代谢途径，弱化或消除不必要或有害的代谢途径，从而达到提高某种代谢产物产率或降解有害物质的目的。定向进化技术主要有两个步骤：首先利用现代分子生物学方法构建基因的突变文库，然后耦合筛选方法对文库进行筛选。突变文库的构建可以提供足够的多样性以供筛选，是定向进化的关键步骤。按照 DNA 突变发生的场所，构建突变文库的技术可以分为体外突变和体内突变。

体外突变技术主要有易错 PCR (error prone PCR)，DNA 改组 (DNA shuffling)，交错延伸过程 (Staggered extension process, StEP)，定点饱和突变技术 (Site directed saturation mutagenesis, SDSM)，迭代饱和突变 (Iterative saturation mutagenesis, ISM) 等。易错 PCR (error prone PCR) 是通过改变聚合酶链式反应条件而随机引入点突变的；DNA 改组 (DNA shuffling) 是一种 DNA 分子的体外重组技术，通过将一组序列相关的 DNA 序列用 DNase I 随机切割成小片段，随后进行 PCR 重聚实现基因重排得到突变文库，再筛选出有预期性状的基因，这种方法可以实现与亲本序列有 70% 同源性序列的重组；而交错延伸过程 (Staggered extension process, StEP) 是一种简化了的 DNA 改组技术。定点饱和突变技术 (Site directed saturation mutagenesis, SDSM) 是将目的蛋白靶位点的氨基酸用分别其他 19 种氨基酸替代，分析靶位点改造后蛋白的活性；迭代饱和突变 (Iterative saturation mutagenesis, ISM) 是一种反复的饱和突变方法，通过选择结构已知蛋白的几个重要区域的 1-2 个或 3 个位点同时进行反复饱和突变后获得突变体文库，并进行筛选以获得功能提高的突变体。以上这些体外突变技术虽然突变的效率比较高，但是必须将突变的基因通过酶切连接到相应的载体上转化到生

物体体内，突变基因被转录翻译为对应的蛋白表现出一定表型，才可以耦合相应的筛选技术对突变文库进行筛选。酶切连接转化的步骤操作繁琐、过程复杂，不能、连续进化，不能自发进化，需要人工干预。

体内突变技术有物理化学诱变，PACE（噬菌体辅助持续进化，MAGE（多位点自动化基因组编辑）。物理、化学诱变是利用物理、化学等因素处理生物体，以诱发遗传物质的突变，从而引起形态特征的变异。这一传统的诱变方法的突变效率低而且没有目标性。最近，哈佛大学 David R Liu 实验室开发了一种基于噬菌体生长的连续进化系统，通过在大肠杆菌体内表达易突变的 DNA 聚合酶产生突变，并结合 M13 噬菌体建立了筛选体系实现了定向进化的自动化。但是 PACE 技术的突变效率比较低只有 10^{-5} ，对一个 1kb 的基因随机的 3 个位点实现饱和突变几乎不可能，另外 PACE 技术只可以对一个基因进行进化。

George Church 实验室发明了 MAGE（多重自动基因组改造技术）。它同时针对基因组的不同区域设计一系列的单链寡核苷酸简并引物，利用 λ -Red 同源重组系统将这些简并引物整合到基因组上，实现单个细胞基因组多个位点的改造或细胞群体间基因组改造的多样性。他们针对该技术的周期性和可扩展性设计了可以实现该过程的自动化操作装置。利用该技术定向改造大肠杆菌中番茄红素合成过程中的 20 个基因的 RBS 区，设计不同的简并引物，使他们定向进化到认为可以提高表达量的经典的 SD 序列（TAAGGAGGT）模式，最终筛选得到高产菌株，并对这些高产菌株的基因序列分析得出参与番茄红素合成起始以及末端的基因的 RBS 序列趋于相似。MAGE 技术虽然在体内实现了对代谢通路中多基因 RBS 序列的突变文库的构建，但是并没有实现对代谢途径中单个或多个目标蛋白质的结构基因进行原位定向进化。但在大肠杆菌细胞内，一个目标基因所编码的酶蛋白在微生物代谢网络中所起到的代谢调控作用，往往取决于该基因的体内表达水平和编码蛋白质的酶活性。已报道，有很多方法被发明如何调控目标基因的表达，但还没有出现在大肠杆菌细胞内进行原位同源重组进化酶蛋白基因的方法。

发明内容

本发明涉及一种在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法，并应用于一种或多种酶催化性能的提高，从而提高微生物特定目标代谢产物的产率。

在本发明中，包括构建一个包含一个或多个突变位点的核酸库，包括体外合成的寡核苷酸单链库或制备的单链 DNA 库或双链 DNA 库，通过 λ -Red 同源重组技术，利用所述核酸库对大肠杆菌胞内载体上或基因组上的结构基因进行原位重组，达到进化酶分子结构提高酶催化效率的目的。寡核苷酸可以以化学合成的方式获取；单链核苷酸的获取方式包括但不限于 T7 逆转录法，核酸外切酶法，变性高效液相色谱法，磁珠捕获法，不对称 PCR，两步 PCR 法等；双链核苷酸可以通过 PCR 法合成获得。

寡核苷酸和单链核苷酸可以在其 5' 端的 1 至 4 位碱基处进行修饰；双链核苷酸在其中一条链的 5' 端的 1 至 4 位碱基处进行修饰，以避免在转化入细胞后被核酸酶所降解。修饰的方式包括但不限于 5' 端溴尿嘧啶修饰，5' 端氯尿嘧啶修饰，5' 端碘代尿嘧啶修饰，磷酸酯修饰，硫代磷酸修饰等。

寡核苷酸、单链核苷酸和双链核苷酸可以通过转化或者转染的方式进入细胞内。这里提到的转化和转染指的是一些成熟地把外源核苷酸导入目标细胞的技术，包括但不限于磷酸钙法，氯化钙法，脂质体转染，电穿孔法，光穿孔法等。转染介质包括但不限于水，氯化钙，脂质体等。

在转化或转染之前，大肠杆菌细胞在 30℃ 培养至一定浓度，并于 42℃ 进行诱导。在细胞基因组上的 λ -Red 同源重组系统在 pL 启动子控制下，并受到 cI857 阻遏蛋白的调控。在 30℃ 时 pL 启动子受阻遏不表达，42℃ 时诱导表达 λ -Red 同源重组所需的三个蛋白。经过 15min 诱导之后的细胞放于 4℃ 保存，防止诱导的蛋白降解。

培养基需要置换成转染介质，去除其中的离子。此过程可以采用的方式包括但不限于离心法，膜过滤法等。

在转化或转染过程中，加入核酸库的同时，引入抗性回复核苷酸片段，可以在抗性平板上进行筛选，并提高抗性基因附近位置的重组效率。合适的抗性基因包括但不限于氨苄抗性基因，四环素抗性基因，卡那霉素抗性基因，新霉素抗性基因，氯霉素抗性基因等。

合适的筛选标记可以被应运于平板筛选，流式细胞仪筛选，微流控等。筛选标记包括但不限于各种酶，辅助基团，荧光标记，发光标记，生物发光基团等。荧光标记包括但不限于黄色荧光蛋白，绿色荧光蛋白，青色荧光蛋白，罗丹明等。

生物发光基团包括但不限于萤光素酶，发光蛋白质等。一些能产生视觉信号的酶包括但不限于半乳糖苷酶，磷酸酶，过氧化物酶，胆碱酯酶等。

本发明为了在体内实现较高的突变率并对基因组上的一个或多个基因进行突变，提供了一种体内突变方法，通过反复 λ -Red 同源重组的策略对大肠杆菌的整个基因组进行突变，尤其是对结构基因的修饰，达到对功能蛋白所对应基因的原位进化目的。此方法可以对基因组上单一基因进行进化，也可以同时对多个基因进行修饰，并耦合筛选，寻找出多个突变蛋白协同作用所达到的最佳效果。

本发明所提供的在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法是一种有效获得所需生物分子或生物物质的方法，比以往的方法更加简便、高效。

本发明所提供的在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法，可以通过大肠杆菌胞内目标基因关键氨基酸的原位饱和突变，提高吡咯喹啉依赖型葡萄糖脱氢酶的热稳定性和催化特异性。

本发明所提供的在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法，所述方法可应用于体内原位重组突变番茄红素合成关键酶 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶基因，提高其表达蛋白的可溶性水平和催化效率。通过筛选得到的 5 个 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶（DXS）突变体。其中，突变体 DXSa（S217P，L226H），DXSb（K214E，K227E，G512H），DXSc（E230G）和 DXSd（Y115H，E182A，L226R，F435S）的可溶表达相对于野生型 DXS 蛋白都提高了 2 倍以上。DXS 突变体（DXSa，DXSb，DXSd 和 DXSe（I170T K213E，N249S））的比酶活都得到了明显提高，从而提高了含相应突变基因的大肠杆菌生物合成番茄红素水平 2-5 倍。

本发明所提供的在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法，所述方法可采用同时突变多个番茄红素关键酶基因从而提高大肠杆菌合成番茄红素的生产水平。

本发明还提供了大肠杆菌菌株 EcLYCb，保存编号为 CCTCC M 2015691 的大肠杆菌菌株，该菌株的可溶性表达水平和酶催化效率都得到明显提高。

本发明还提供了大肠杆菌菌株 EcLYC246，保存编号为 CCTCC M 2015692，提高了大肠杆菌合成番茄红素的生产水平。

附图说明

图 1: 本发明流程与传统 DNA 重排技术对比示意图。其中, DNA Shuffling Method: DNA 重排技术; DNase I Digestion: DNase I 酶切; cycles of denaturation, annealing, extension: 多次变性, 连接, 延伸; Cloning, Transformation: 克隆, 转化; Gene: 基因; Error-Prone PCR: 易错 PCR; Asymmetric PCR: 不对称 PCR; Synthetic Oligos: 合成寡聚核苷酸; cycles of Recombination: 多次重组; Genome: 基因组; *E.coli*: 大肠杆菌。

图 2: 野生型及 GDH 突变体在 55℃ 的热稳定性分析图。

图 3: 野生型及 DXS 突变蛋白的可溶表达情况对比图。其中, Comparison of Soluble DXS Expression: 可溶 DXS 蛋白表达情况对比; Marker: 蛋白分子量标准大小。

图 4: 野生型及 DXS 突变蛋白的比酶活对比图。其中, Retention time: 保留时间; Specific enzyme activity: 比酶活。

图 5: 野生型及含 *dxs* 突变体的大肠杆菌菌株产番茄红素能力对比图; 其中, Lycopene Production: 番茄红素产量。

图 6: 野生型及含 *dxs* 突变体的大肠杆菌菌株产番茄红素能力对比图; 其中, Lycopene Production: 番茄红素产量。

图 7: 野生型及含多个基因突变的大肠杆菌菌株产番茄红素能力对比图; 其中, Lycopene Production: 番茄红素产量。

图 8: 野生型及含多个基因突变的大肠杆菌菌株产番茄红素能力对比图; 其中, Lycopene Production: 番茄红素产量。

具体实施方式

本发明的操作流程如图 1 所示, 并通过以下五个例子更好得阐述, 分别为提高吡咯喹啉依赖型葡萄糖脱氢酶热稳定性和催化特异性, 提高 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶的可溶表达和催化活性, 以及提高大肠杆菌中番茄红素合成途径的多个关键酶的催化活性。

实施例 1, 大肠杆菌体内原位进化吡咯喹啉依赖型葡萄糖脱氢酶

大肠杆菌 EcNR2 (Harris H. Wang 等. 2009 Nature.460:894-890) 在温度条件诱导下可以表达 λ -Red 重组所需蛋白, 表现出对 80-100nt 寡核苷酸的高重组效率。

把吡咯喹啉依赖型葡萄糖脱氢酶基因 (*gdh*) 通过 λ -Red 同源重组插入到上

述菌株基因组上，命名为 EcGDH。设计两条 90nt 含兼并碱基的寡核苷酸分别对应 *gdh* 基因的两个活性位点：热稳定性（S231，SEQ ID NO.1）和催化特异性（N452，SEQ ID NO.2），构成一个寡核苷酸突变库，并用该突变库在基因组上进行点饱和突变。同时合成一条用于恢复原本基因组上被沉默的氯霉素抗性基因的 90nt 寡核苷酸（SEQ ID NO.3）。

在 50 mL LB 培养基的摇瓶中接入从平板上挑取的大肠杆菌 EcGDH 单菌落，并加入 25 μ L 卡那霉素，30℃下摇床过夜培养；

转接 1%的菌液至 2 mL LB 培养基的试管中，置于 30℃下摇床培养 2.5-3 h 至 OD 达到 0.7 左右；

将试管置于 42℃水浴中振荡培养 15 min，诱导 λ -Red 重组蛋白充分表达；

将试管置于冰上 5 min；

取 1 mL 菌液移入 1.5 mL 预冷离心管中，4℃下以 13000 r/min 离心 30s，弃去上清液，加入预冷的无菌水 1 ml 重悬洗涤，弃去上清液，并用预冷的无菌水 1 ml 重悬洗涤 2 次；

去除上清液，并用 100 μ L 预冷无菌水重悬菌体，加入寡核苷酸突变库和抗性回复寡核苷酸；

将上述混合物转移到 2mm 电转杯中，在电容 25 μ F，电压 2.5 kV，电阻 200 Ω 条件下进行电击；

迅速将准备好的 1 ml SOC 培养基加入到电击杯中，轻轻吹打使细胞悬浮。将电击杯中的混合液转移到装有 1 ml 培养基的试管中，放入 30℃摇床培养，使细胞复苏；

当细胞复苏到 OD 达到 0.7 左右时，重复上述步骤，进行第二轮转化。该转化过程一共进行 3-5 轮；

最后一轮电转后，复苏 12h。在氯霉素抗生素平板上进行筛选，通过与一系列底物的显色反应来筛选热稳定性提高或催化特异性提高的突变子。野生型 EcGDH 及 GDH 突变体（EcGDHa, EcGDHb, EcGDHc, EcGDHd, EcGDHe, EcGDHf）的催化特异性对比如表 1 所示，其在 55℃的热稳定性分析如图 2 所示。

表 1：各种 GDH 突变体的氨基酸突变及催化特性总结

Wild type	EcGDHa	EcGDHb	EcGDHc	EcGDHd	EcGDHe	EcGDHf
-----------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

amino acid		Ser231Cys	Ser231Lys	Asn452His	Asn452Thr	Ser231Leu	Ser231Lys
substitution		Asn452Thr	Asn452Thr				
Glucose	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
Lactose	61±1	36±3	38±3	35±1	42±2	75±2	55±3
Maltose	60±2	32±2	30±2	40±4	28±1	73±2	65±1

从表中可以看出，大肠杆菌菌株 EcGDHa, EcGDHb, EcGDHc, EcGDHd 中的 GDH 突变体的底物特异性得到了提高。相对于野生型大肠杆菌中的 GDH，其对于乳糖和麦芽糖的相对活性降低了 28%至 42%。大肠杆菌菌株 EcGDHb 和 EcGDHf 中的 GDH 突变体的热稳定相对于野生型 GDH 分别提高了 1.69 和 1.6 倍。

实施例 2 用双链核苷酸在大肠杆菌体内原位进化 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶

双链核苷酸在大肠杆菌中通过 λ -Red 同源重组的效率比较低，只有 0.01%。研究发现，大肠杆菌 EcNR2 (Harris H. Wang 等. (2009) Nature.460:894-890)在温度条件诱导下可以表达 λ -Red 重组所需蛋白，通过与抗性回复片段共同转化可以显著提高重组效率。

1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 (*dxs*) 是大肠杆菌中异戊二烯合成途径中一个关键酶，以 3-磷酸-甘油醛和丙酮酸为底物合成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸。在大肠杆菌 EcNR2 中引入外源基因 *crtE*, *crtB*, *crtI*，使得该大肠杆菌可以产番茄红素，命名为 EcLYC。由于番茄红素具有可见的红色，可以根据菌落红色的深浅，高通量的筛选番茄红素产量提高的菌株。

体外制备带突变的双链 *dxs* 基因：
根据 NCBI 上的 CCD 工具分析结果发现，DXS 蛋白有三个保守区域，所以制备了 3 条带突变的双链核苷酸；

分别用 5'端 4 个碱基硫代修饰的上引物 *dxs*-1-for (SEQ ID NO.4), *dxs*-2-for (SEQ ID NO.5), *dxs*-3-for (SEQ ID NO.6)和下引物 *dxs*-1-rev (SEQ ID NO.7), *dxs*-2-rev (SEQ ID NO.8), *dxs*-3-rev (SEQ ID NO.9)，在添加 Mn^{2+} 的条件下，94℃ 45 s, 54℃ 50 s, 72℃ 1 min 循环 30 次做易错 PCR，割胶纯化回收得到的含有突变的双链突变库。

在 50 mL LB 培养基的摇瓶中接入从平板上挑取的大肠杆菌 EcLYC 单菌落，并加入 25 μ L 卡那霉素，30℃下摇床过夜培养；

转接 1%的菌液至 2 mL LB 培养基的试管中，置于 30℃下摇床培养 2.5-3 h 至 OD 达到 0.7 左右；

将试管置于 42℃水浴中振荡培养 15 min，诱导 λ -Red 重组蛋白充分表达；

将试管置于冰上 5 min；

取 1 mL 菌液移入 1.5 mL 预冷离心管中，4 ℃下以 13000 r/min 离心 30 s，弃去上清液，加入预冷的无菌水 1 ml 重悬洗涤，弃去上清液，并用预冷的无菌水 1 ml 重悬洗涤 2 次；

去除上清液，并用 100 μ L 预冷无菌水重悬菌体，加入带突变的双链突变库和抗性回复寡核苷酸；

将上述混合物转移到 2 mm 电转杯中，在电容 25 μ F，电压 2.5 kV，电阻 200 Ω 条件下进行电击；

迅速将准备好的 1 ml SOC 培养基加入到电击杯中，轻轻吹打使细胞悬浮。将电击杯中的混合液转移到装有 1 ml 培养基的试管中，放入 30℃摇床培养，使细胞复苏；

当细胞复苏到 OD 达到 0.7 左右时，重复上述步骤，进行第二轮转化。该转化过程一共进行 8 轮；

最后一轮电转后，复苏 12 h。在平板上筛选出红色较深的菌落。DXS 蛋白的氨基酸突变情况如表 2 所示，其可溶性表达情况如图 3 所示，其比酶活情况如图 4 所示，以及影响产番茄红素能力对比如图 5 所示（其中 EcLYCb 已申请专利菌种保存，菌种保藏号为 CCTCC M 2015691）。

表 2 DXS 突变蛋白的氨基酸突变情况

DXS mutants	DXSa	DXSb	DXSc	DXSd	DXSe
Amino acid	S217P	K214E	E230G	Y115H E182A	I170T K213E
substitution	L226H	K227E		L226R F435S	N249S
		G512H			

从图 3 中可以看出，DXS 突变体 DXSa (SEQ ID NO.10)，DXSb (SEQ ID NO.11)，DXSc(SEQ ID NO.12)和 DXSd (SEQ ID NO.13)的可溶表达相对于野

生型 DXS 蛋白 (SEQ ID NO.14) 都提高了 2 倍以上。可溶表达的提高使得其在胞内的有效蛋白量得到提高。通过体外酶反应可知, DXS 突变体 DXSa, DXSb, DXSd 和 DXSe (SEQ ID NO.15) 的比酶活都提到了提高, 并最终使得各株大肠杆菌的番茄红素积累量相对于野生型菌株提高了 4 倍以上。其中, EcLYCb 已申请专利菌种保存, 菌种保藏号为 CCTCC M 2015691, 此株大肠杆菌中的 DXS 蛋白突变体可溶表达量高, 比酶活高, 且番茄红素的积累量是野生型大肠杆菌菌株的 5 倍以上。

实施例 3 用单链核苷酸在大肠杆菌体内原位进化 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶

大肠杆菌 EcNR2 (Harris H. Wang 等. (2009) Nature.460:894-890) 在温度条件诱导下可以表达 λ -Red 重组所需蛋白, 对 5' 端 4 个碱基硫代修饰的长单链也有较高的重组效率, 因为在重组过程中少了把双链变单链的步骤。

1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 (*dxs*) 是大肠杆菌中异戊二烯合成途径中一个关键酶, 以 3-磷酸-甘油醛和丙酮酸为底物合成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸。在大肠杆菌 EcNR2 中引入外源基因 *crtE*, *crtB*, *crtI*, 使得该大肠杆菌可以产番茄红素, 作为一种筛选标志物, 命名为 EcLYC。

体外制备带突变的 5' 端 4 个碱基硫代修饰的 *dxs* 基因长单链:

用 5' 端 4 个碱基硫代修饰的上引物 *dxs*-for (SEQ ID NO.16) 和 5' 端磷酸化的下引物 *dxs*-rev (SEQ ID NO.17) 两个引物以 *dxs* 基因为模板, 在添加 Mn^{2+} 的条件下, 94°C 45s, 54°C 50s, 72°C 2min 循环 30 次做易错 PCR, 割胶纯化回收得到的双链;

以上述含有突变的双链为模板, 在 PCR 体系中只添加 5' 端 4 个碱基硫代修饰的上引物 *dxs*-for (SEQ ID NO.16), 94°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 4 min 循环 15 次, 制备得到 *dxs* 单链;

用 Lambda EXO 外切酶处理上述得到的 PCR 产物, 把其中的 *dxs* 双链酶切成单链;

乙醇沉淀得到 5' 端 4 个碱基硫代修饰的 *dxs* 单链突变库。

在 50 mL LB 培养基的摇瓶中接入从平板上挑取的大肠杆菌 EcLYC 单菌落, 并加入 25 μ L 卡那霉素, 30°C 下摇床过夜培养;

转接 1% 的菌液至 2 mL LB 培养基的试管中，置于 30℃ 下摇床培养 2.5-3 h 至 OD 达到 0.7 左右；

将试管置于 42℃ 水浴中振荡培养 15 min，诱导 λ -Red 重组蛋白充分表达；

将试管置于冰上 5 min；

取 1 mL 菌液移入 1.5 mL 预冷离心管中，4 °C 下以 13000 r/min 离心 30 s，弃去上清液，加入预冷的无菌水 1 ml 重悬洗涤，弃去上清液，并用预冷的无菌水 1 ml 重悬洗涤 2 次；

去除上清液，并用 100 μ L 预冷无菌水重悬菌体，加入 5'端 4 个碱基硫代修饰的 *dxs* 单链突变库和抗性回复寡核苷酸；

将上述混合物转移到 2 mm 电转杯中，在电容 25 μ F，电压 2.5 kV，电阻 200 Ω 条件下进行电击；

迅速将准备好的 1 ml SOC 培养基加入到电击杯中，轻轻吹打使细胞悬浮。将电击杯中的混合液转移到装有 1 ml 培养基的试管中，放入 30℃ 摇床培养，使细胞复苏；

当细胞复苏到 OD 达到 0.7 左右时，重复上述步骤，进行第二轮转化。该转化过程一共进行 4-6 轮；

最后一轮电转后，复苏 12 h。在平板上筛选出红色较深的菌落。野生型 EcLYC 及含 DXS 突变体的大肠杆菌菌株（EcLYC-a，EcLYC-b，EcLYC-c，EcLYC-d，EcLYC-e）产番茄红素能力对比如图 6 所示。

从图中可以看出，各株含有 DXS 突变体的大肠杆菌菌株的番茄红素积累量相对于野生型菌株都得到了提高，其中 EcLYC-d 提高了 1 倍以上。

实施例 4 大肠杆菌胞内原位同时进化多个番茄红素合成关键基因

引入外源基因 *crtE*，*crtB*，*crtI* 的大肠杆菌 EcNR2 能够合成番茄红素（EcLYC），该合成过程主要依赖大肠杆菌中的异戊二烯合成途径，同时对 ATP 和 NADPH 都有需求。在此过程中，存在多个关键酶可以提升异戊二烯代谢流，并提高 NADPH 的供应量，如 *dxs*，*dxr*，*idi*，*ispA*，*talB* 等。

采用两步 PCR 和易错 PCR 获得上述基因同源带突变的单链核苷酸，以 *dxs* 基因为例，说明体外制备带突变的 5'端 4 个碱基硫代修饰的 *dxs* 基因长单链的过程。

用 5'端 4 个碱基硫代修饰的上引物 *dxs*-for (SEQ ID NO.16) 和 5'端磷酸化的下引物 *dxs*-rev (SEQ ID NO.17) 两个引物以 *dxs* 基因为模板, 在添加 Mn^{2+} 的条件下, 94°C 45s, 54°C 50s, 72°C 2min 循环 30 次做易错 PCR, 割胶纯化回收得到的双链;

以上述易错双链为模板, 在 PCR 体系中只添加 5'端 4 个碱基硫代修饰的上引物 *dxs*-for (SEQ ID NO.16), 94°C 30s, 53°C 30s, 72°C 4min 循环 15 次, 制备得到 *dxs* 单链;

用 Lambda EXO 外切酶处理上述得到的 PCR 产物, 把其中的 *dxs* 双链酶切成单链;

乙醇沉淀得到带突变的 5'端 4 个碱基硫代修饰的 *dxs* 单链。

重复上述方法, 获得 *dxs*, *dxr*, *idi*, *ispA*, *talB* 和 *rpos* 带突变的 5'端 4 个碱基硫代修饰的单链。

这些单链混合在一起成为一个单链 DNA 突变库。

在 50 mL LB 培养基的摇瓶中接入从平板上挑取的大肠杆菌 EcLYC 单菌落, 并加入 25 μ L 卡那霉素, 30°C 下摇床过夜培养;

转接 1%的菌液至 2 mL LB 培养基的试管中, 置于 30°C 下摇床培养 2.5-3 h 至 OD 达到 0.7 左右;

将试管置于 42°C 水浴中振荡培养 15 min, 诱导 λ -Red 重组蛋白充分表达;

将试管置于冰上 5 min;

取 1 mL 菌液移入 1.5 mL 预冷离心管中, 4 °C 下以 13000 r/min 离心 30s, 弃去上清液, 加入预冷的无菌水 1 ml 重悬洗涤, 弃去上清液, 并用预冷的无菌水 1 ml 重悬洗涤 2 次;

去除上清液, 并用 100 μ L 预冷无菌水重悬菌体, 加入单链 DNA 突变库和抗性回复寡核苷酸;

将上述混合物转移到 2 mm 电转杯中, 在电容 25 μ F, 电压 2.5 kV, 电阻 200 Ω 条件下进行电击;

迅速将准备好的 1 ml SOC 培养基加入到电击杯中, 轻轻吹打使细胞悬浮。将电击杯中的混合液转移到装有 1 ml 培养基的试管中, 放入 30°C 摇床培养, 使细胞复苏;

当细胞复苏到 OD 达到 0.7 左右时, 重复上述步骤, 进行第二轮转化。该转化过程一共进行 10-15 轮;

最后一轮电转后, 复苏 12h。在平板上筛选红色较红的菌落。野生型(EcLYC)及含多个基因突变的大肠杆菌菌株(EcLYC-1, EcLYC-2, EcLYC-3, EcLYC-4, EcLYC-5)产番茄红素能力对比如图 7 所示。

从图中可以看出, 各株含有 DXS 突变体的大肠杆菌菌株的番茄红素积累量相对于野生型菌株都得到了提高, 其中 EcLYC-5 是原来的 1.5 倍以上。

实施例 5 基因组多位点进化大肠杆菌番茄红素代谢相关基因

引入外源基因 *crtE*, *crtB*, *crtI* 的大肠杆菌 EcNR2 能够合成番茄红素(EcLYC), 其积累量受到多方面的影响: 1、大肠杆菌中番茄红素的积累依赖前体物质 IPP 的积累, 其通过异戊二烯途径合成。过量表达该途径上的多个基因(*dxs*, *dxr*, *ispD*, *ispE*, *ispG*, *ispH*, *idi*, *ispA*)都会提高前体物质 IPP 的积累; 2、鸟枪法研究发现多个功能未明确的基因也会影响番茄红素的积累(*appY*, *rpoS*, *crl*, *elbA*, *elbB*, *yjiD*, *purH*, *rnlA*, *yggT*, *ycgZ*, *ymgA*, *ariR*); 3、敲除异戊二烯的一些旁路代谢途径基因(*ytjC*, *fdhF*, *aceE*, *gdhA*)可以提高番茄红素的产量; 4、大肠杆菌体内的能量供应也会影响番茄红素的积累(*sucAB*, *talB*, *sdhABCD*)。

对从上述基因中挑选的二十个基因(*dxs*, *dxr*, *idi*, *ispA*, *appY*, *rpoS*, *crl*, *elbA*, *elbB*, *yjiD*, *purH*, *rnlA*, *yggT*, *sucA*, *sucB*, *talB*, *sdhA*, *sdhB*, *sdhC*, *sdhD*)在基因组上进行原位进化, 并同时用合成的含两个无义突变的寡核苷酸对四个基因(*ytjC*, *fdhF*, *aceE*, *gdhA*)进行沉默。

采用两步 PCR 和易错 PCR 获得上述基因同源带突变的单链核苷酸, 以 *dxs* 基因为例, 说明体外制备带突变的 5'端 4 个碱基硫代修饰的 *dxs* 基因长单链的过程。

用 5'端 4 个碱基硫代修饰的上引物 *dxs*-for (SEQ ID NO.16) 和 5'端磷酸化的下引物 *dxs*-rev (SEQ ID NO.17) 两个引物以 *dxs* 基因为模板, 在添加 Mn^{2+} 的条件下, 94°C 45s, 54°C 50s, 72°C 2min 循环 30 次做易错 PCR, 割胶纯化回收得到的双链;

以上述易错双链为模板, 在 PCR 体系中只添加 5'端 4 个碱基硫代修饰的上

引物 *dxs*-for (SEQ ID NO.10), 94°C 30s, 53°C 30s, 72°C 4min 循环 15 次, 制备得到 *dxs* 单链;

用 Lambda EXO 外切酶处理上述得到的 PCR 产物, 把其中的 *dxs* 双链酶切成单链;

乙醇沉淀得到带突变的 5'端 4 个碱基硫代修饰的 *dxs* 单链。

重复上述方法, 获得 *dxs*, *dxr*, *idi*, *ispA*, *appY*, *rpoS*, *crl*, *elbA*, *elbB*, *yjiD*, *purH*, *rnlA*, *yggT*, *sucA*, *sucB*, *talB*, *sdhA*, *sdhB*, *sdhC* 和 *sdhD* 带突变的 5'端 4 个碱基硫代修饰的单链。

这些单链混合在一起成为一个单链 DNA 突变库。

把上述单链核苷酸库与合成的带无义突变的寡核苷酸混合在一起, 用于对基因的重组。

在 50 mL LB 培养基的摇瓶中接入从平板上挑取的大肠杆菌 EcLYC 单菌落, 并加入 25 μ L 卡那霉素, 30°C 下摇床过夜培养;

转接 1%的菌液至 2 mL LB 培养基的试管中, 置于 30°C 下摇床培养 2.5-3 h 至 OD 达到 0.7 左右;

将试管置于 42°C 水浴中振荡培养 15 min, 诱导 λ -Red 重组蛋白充分表达;

将试管置于冰上 5 min;

取 1 mL 菌液移入 1.5 mL 预冷离心管中, 4 °C 下以 13000 r/min 离心 30s, 弃去上清液, 加入预冷的无菌水 1 ml 重悬洗涤, 弃去上清液, 并用预冷的无菌水 1 ml 重悬洗涤 2 次;

去除上清液, 并用 100 μ L 预冷无菌水重悬菌体, 加入单链 NDA 突变库和抗性回复寡核苷酸;

将上述混合物转移到 2 mm 电转杯中, 在电容 25 μ F, 电压 2.5 kV, 电阻 200 Ω 条件下进行电击;

迅速将准备好的 1 ml SOC 培养基加入到电击杯中, 轻轻吹打使细胞悬浮。将电击杯中的混合液转移到装有 1 ml 培养基的试管中, 放入 30°C 摇床培养, 使细胞复苏;

当细胞复苏到 OD 达到 0.7 左右时, 重复上述步骤, 进行第二轮转化。该转化过程一共进行 10-15 轮;

最后一轮电转后,复苏 12h。在平板上筛选红色较红的菌落。野生型(EcLYC)及含多个基因突变的大肠杆菌菌株(EcLYC20, EcLYC45, EcLYC60, EcLYC139, EcLYC246)产番茄红素能力对比如图 8 所示(其中 EcLYC246 已申请专利菌种保存,菌种保藏号为 CCTCC M 2015692)。

从图中可以看出,各株含有 DXS 突变体的大肠杆菌菌株的番茄红素积累量相对于野生型菌株都得到了提高。其中, EcLYC246 已申请专利菌种保存,菌种保藏号为 CCTCC M 2015692,此株大肠杆菌中产番茄红素相关基因经过突变使其番茄红素的积累量是野生型大肠杆菌菌株的 4 倍以上。

文中序列

SEQ ID NO.1 热稳定性饱和突变寡核苷酸

5'-*T*C*A*CACCTATATGGGTAAAGTACTACGCTTAAATCTTGATGGANNNA
TTCCAAAGGATAATCCAAGTTTAAACGGGGTGGTTAGCCATA-3' (*为硫代修
饰,下同)

SEQ ID NO.2 催化特异性饱和突变寡核苷酸

5'-
TCCAGATGGGAATGTCTTATATGTATTAAGTACTGCGGANNNGTCCAA
AAAGATGATGGCTCAGTAACAAATACATTAGAAAACC -3'

SEQ ID NO.3 氯霉素抗性基因的 90nt 寡核苷酸

5'-*G*C*A*TCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTCAGTCAGT-3'

SEQ ID NO.4 5' 端 4 个碱基硫代修饰的上引物 dxs-1-for

5'-*G*A*G*TTTGATATTGCCAAATACCCGACCCTGGC-3'

SEQ ID NO.5 5' 端 4 个碱基硫代修饰的上引物 dxs-2-for

5'-*T*T*G*CCGAGCTATTCAAAAATCTTTGGCGAC-3'

SEQ ID NO.6 5' 端 4 个碱基硫代修饰的上引物 dxs-3-for

5'-*G*G*C*AAAGGCATTGTGAAGCGTCGTG-3'

SEQ ID NO.7 下引物 dxs-1-rev

5'-GGTCATGATATGCAGGAAGTGCAGG-3'

SEQ ID NO.8 下引物 dxs-2-rev

5'-CAGTTCCACGCCGACCGCGTTGCCACGCGGGTA-3'

SEQ ID NO.9 下引物 dxs-3-rev

5'-TATGCCAGCCAGGCCTTGATTTTGGC-3'

SEQ ID NO.10 DXSa 氨基酸序列

MSFDIAKYPTLALVDSTQELRLLPKESLPKLCDELRRYLLDSVSRSSGHFASGL
GTVELTVALHYVYNTFPDQLIWDVGHQAYPHKILTGRSDKIGTIRQKGGLHPF
PWRGESEYDVL SVGHSSTSISAGIGIAVA AEKEGKNRRTVCVIGDGAITAGMAF
EAMNHAGDIRPDMLVILNDNEMSISENVGALNNHLAQLLSGKLYSSLREGGK
KVFPGVPPIKELHKRTEEHKGMVVP GTLFEELGFNYIGPVDGHDVLGLITTLK
NMRDLKGPQFLHIMTKKGRGYEPAEKDPITFHAVPKFDPSSGCLPKSSGGLPS
YSKIFGDWLCETA AKDNKLMAITPAMREGSGMVEFSRKFPDRYFDVAIAEQH
AVTFAAGLAIGGYKPIVAIYSTFLQRAYDQVLHDVAIQKLPVLFAIDRAGIVGA
DGQTHQGAFDLSYLRCIPEMVIMTPSDENECRQMLYTG YHYNDGPSAVRYPR
GNAVGVELTPLEKLP IKGIVKRRGEKLAILNFGTLMPEAAKVAESLNATLVD
MRFVKPLDEALILEMAASHEALVTVEENAIMGGAGSGVNEVLM AHRKPVPV
LNIGLPDFFIPQGTQEEMRAELGLDAAGMEAKIKAWLA*

SEQ ID NO.11 DXSb 氨基酸序列

MSFDIAKYPTLALVDSTQELRLLPKESLPKLCDELRRYLLDSVSRSSGHFASGL
GTVELTVALHYVYNTFPDQLIWDVGHQAYPHKILTGRSDKIGTIRQKGGLHPF
PWRGESEYDVL SVGHSSTSISAGIGIAVA AEKEGKNRRTVCVIGDGAITAGMAF
EAMNHAGDIRPDMLVILNDNEMSISENVGALNNHLAQLLSGKLYSSLREGGK
EVFSGVPPIKELLERTEEHKGMVVP GTLFEELGFNYIGPVDGHDVLGLITTLK
NMRDLKGPQFLHIMTKKGRGYEPAEKDPITFHAVPKFDPSSGCLPKSSGGLPS
YSKIFGDWLCETA AKDNKLMAITPAMREGSGMVEFSRKFPDRYFDVAIAEQH
AVTFAAGLAIGGYKPIVAIYSTFLQRAYDQVLHDVAIQKLPVLFAIDRAGIVGA
DGQTHQGAFDLSYLRCIPEMVIMTPSDENECRQMLYTG YHYNDGPSAVRYPR
GNAVGVELTPLEKLP IKGIVKRRGEKLAILNFHTLMPEAAKVAESLNATLVD
MRFVKPLDEALILEMAASHEALVTVEENAIMGGAGSGVNEVLM AHRKPVPV
LNIGLPDFFIPQGTQEEMRAELGLDAAGMEAKIKAWLA*

SEQ ID NO.12 DXSc 氨基酸序列

MSFDIAKYPTLALVDSTQELRLLPKESLPKLCDELRRYLLDSVSRSSGHFASGL

GTVELTVALHYVYNTFPDQLIWDVGHQAYPHKILTGRRDKIGTIRQKGGLHPF
PWRGESEYDVLSVGHSSTSISAGIGIAVAEKEGKNRRTVCVIGDGAITAGMAF
EAMNHAGDIRPDMLVILNDNEMSISENVGALNNHLAQLLSGKLYSSLREGGK
KVFSGVPPIKELLKRTGEHIKGMVVPGLFEELGFNYIGPVDGHDVLGLITTLK
NMRDLKGPQFLHIMTKKGRGYEPAEKDPITFHAVPKFDPSSGCLPKSSGGLPS
YSKIFGDWLCETAADKNKLMAITPAMREGSGMVEFSRKFPDRYFDVAIAEQH
AVTFAAGLAIGGYKPIVAIYSTFLQRAYDQVLHDVAIQKLPVLFAIDRAGIVGA
DGQTHQGAFDLSYLRCIPEMVIMTPSDENECRQMLYTGYYHYNDGPSAVRYPR
GNAVGVELTPLEKLPKIGKIVKRRGEKLAILNFGTLMPEAAKVAESLNATLVD
MRFVKPLDEALILEMAASHEALVTVEENAIMGGAGSGVNEVLMHRKPPVPV
LNIGLPDFFIPQGTQEEMRAELGLDAAGMEAKIKAWLA*

SEQ ID NO.13 DXSd 氨基酸序列

MSFDIAKYPTLALVDSTQELRLLPKESLPKLCDELRRYLLDSVSRSSGHFASGL
GTVELTVALHYVYNTFPDQLIWDVGHQAYPHKILTGRRDKIGTIRQKGGLHPF
PWRGESEYDVLSVGHSSTSISAGIGIAVAEKEGKNRRTVCVIGDGAITAGMAF
EAMNHAGDIRPDMLVILNDNAMSISENVGALNNHLAQLLSGKLYSSLREGGK
KVFSGVPPIKELRKRTTEHHIKGMVVPGLFEELGFNYIGPVDGHDVLGLITTLK
NMRDLKGPQFLHIMTKKGRGYEPAEKDPITFHAVPKFDPSSGCLPKSSGGLPS
YSKIFGDWLCETAADKNKLMAITPAMREGSGMVEFSRKFPDRYFDVAIAEQH
AVTFAAGLAIGGYKPIVAIYSTFLQRAYDQVLHDVAIQKLPVLFAIDRAGIVGA
DGQTHQGASDLSYLRCIPEMVIMTPSDENECRQMLYTGYYHYNDGPSAVRYPR
GNAVGVELTPLEKLPKIGKIVKRRGEKLAILNFGTLMPEAAKVAESLNATLVD
MRFVKPLDEALILEMAASHEALVTVEENAIMGGAGSGVNEVLMHRKPPVPV
LNIGLPDFFIPQGTQEEMRAELGLDAAGMEAKIKAWLA*

SEQ ID NO.14 野生型 DXS 氨基酸序列

MSFDIAKYPTLALVDSTQELRLLPKESLPKLCDELRRYLLDSVSRSSGHFASGL
GTVELTVALHYVYNTFPDQLIWDVGHQAYPHKILTGRRDKIGTIRQKGGLHPF
PWRGESEYDVLSVGHSSTSISAGIGIAVAEKEGKNRRTVCVIGDGAITAGMAF
EAMNHAGDIRPDMLVILNDNEMSISENVGALNNHLAQLLSGKLYSSLREGGK
KVFSGVPPIKELLKRTEHHIKGMVVPGLFEELGFNYIGPVDGHDVLGLITTLK

NMRDLKGPQFLHIMTKKGRGYEPAEKDPITFHAVPKFDPSSGCLPKSSGGLPS
YSKIFGDWLCETAAKDNKLMAITPAMREGSGMVEFSRKFPDRYFDVAIAEQH
AVTFAAGLAIGGYKPIVAIYSTFLQRAYDQVLHDVAIQKLPVLFAIDRAGIVGA
DGQTHQGAFDLSYLRCIPEMVIMTPSDENECRQMLYTGYYHYNDGPSAVRYPR
GNAVGVELTPLEKLPKIGKIVKRRGEKLAILNFGTLMPEAAKVAESLNATLVD
MRFVKPLDEALILEMAASHEALVTVEENAIMGGAGSGVNEVLMHRKPVPV
LNIGLPDFFIPQGTQEEMRAELGLDAAGMEAKIKAWLA*

SEQ ID NO.15 DXSe 氨基酸序列

MSFDIAKYPTLALVDSTQELRLLPKESLPKLCDELRRYLLDSVSRSSGHFASGL
GTVELTVALHYVYNTFPDQLIWDVGHQAYPHKILTGRDKIGTIRQKGGLHPF
PWRGESEYDVL SVGHSSTSISAGIGIAVAEKEGKNRRTVCVIGDGAITAGMAF
EAMNHAGDTRPDMLVILNDNEMSISENVGALNNHLAQLLSGKLYSSLREGGE
KVFSGVPPPIKELLKRTEEHIKGMVVP GTLFEELGFSYIGPVDGHDV LGLITTLK
NMRDLKGPQFLHIMTKKGRGYEPAEKDPITFHAVPKFDPSSGCLPKSSGGLPS
YSKIFGDWLCETAAKDNKLMAITPAMREGSGMVEFSRKFPDRYFDVAIAEQH
AVTFAAGLAIGGYKPIVAIYSTFLQRAYDQVLHDVAIQKLPVLFAIDRAGIVGA
DGQTHQGAFDLSYLRCIPEMVIMTPSDENECRQMLYTGYYHYNDGPSAVRYPR
GNAVGVELTPLEKLPKIGKIVKRRGEKLAILNFGTLMPEAAKVAESLNATLVD
MRFVKPLDEALILEMAASHEALVTVEENAIMGGAGSGVNEVLMHRKPVPV
LNIGLPDFFIPQGTQEEMRAELGLDAAGMEAKIKAWLA*

SEQ ID NO.16 5'端 4 个碱基硫代修饰的上引物 dxs-for

5'- *G*A*G*TTTGTATTTGCCAAATACCCGACCCTGGC -3'

SEQ ID NO.17 5'端磷酸化的下引物 dxs-rev

5'- TTATGCCAGCCAGGCCTTGATTTTG -3'(5'端磷酸化)

PCT

打印件(原件为电子形式)

0-1	PCT/RO/134表 有关保藏的微生物或其他生物材料的说明 (PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	
0-2	国际申请号	PCT/CN2016/077246
0-3	申请人或代理人的档案号	JT160011

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的 保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	4
1-2	行号:	27
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	CCTCC 中国典型培养物保藏中心
1-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。
1-3-3	保藏日期	2015年 11月 23日 (23. 11. 2015)
1-3-4	保藏号	CCTCC M2015692
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
2	下面的说明与本申请说明书中此处提到的 保藏的微生物或其他生物材料相关:	
2-1	页码	4
2-2	行号:	25
2-3	保藏事项	
2-3-1	保藏单位名称	CCTCC 中国典型培养物保藏中心
2-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。
2-3-3	保藏日期	2015年 11月 23日 (23. 11. 2015)
2-3-4	保藏号	CCTCC M2015691
2-5	本说明是对下列指定国	所有指定国

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	授权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	授权官员	

权利要求书

1、一种在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法，其特征在于所述方法包括构建包含一个或多个突变位点的核酸库，包括体外合成的寡核苷酸单链库或制备的单链 DNA 库或双链 DNA 库，通过 λ -Red 同源重组技术，利用所述核酸库对大肠杆菌胞内载体上或基因组上的一个或多个结构基因进行原位重组，以较高的突变率达到进化酶分子结构提高酶催化效率的目的。

2、如权利要求 1 所述的一种在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法，其特征在于所述方法对大肠杆菌基因组上多个基因同时进行重组突变，应用于代谢途径中多个关键酶的进化，从而达到优化代谢途径提高目标产物合成产率的目的。

3、如权利要求 1 所述的一种在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法，其特征在于所述方法通过大肠杆菌胞内目标基因关键氨基酸的原位饱和突变，提高吡咯喹啉依赖型葡萄糖脱氢酶的热稳定性和催化特异性。

4、如权利要求 1 所述的一种在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法，其特征在于所述方法应用于体内原位重组突变番茄红素合成关键酶 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶基因，提高其表达蛋白的可溶性水平和催化效率。

5、如权利要求 1 所述的一种在大肠杆菌细胞内原位进化蛋白质的新方法，其特征在于所述方法同时突变多个番茄红素关键酶基因从而提高大肠杆菌合成番茄红素的生产水平。

6、大肠杆菌菌株 EcLYCb，保存编号为 CCTCC M 2015691。

7、大肠杆菌菌株 EcLYC246，保存编号为 CCTCC M 2015692。

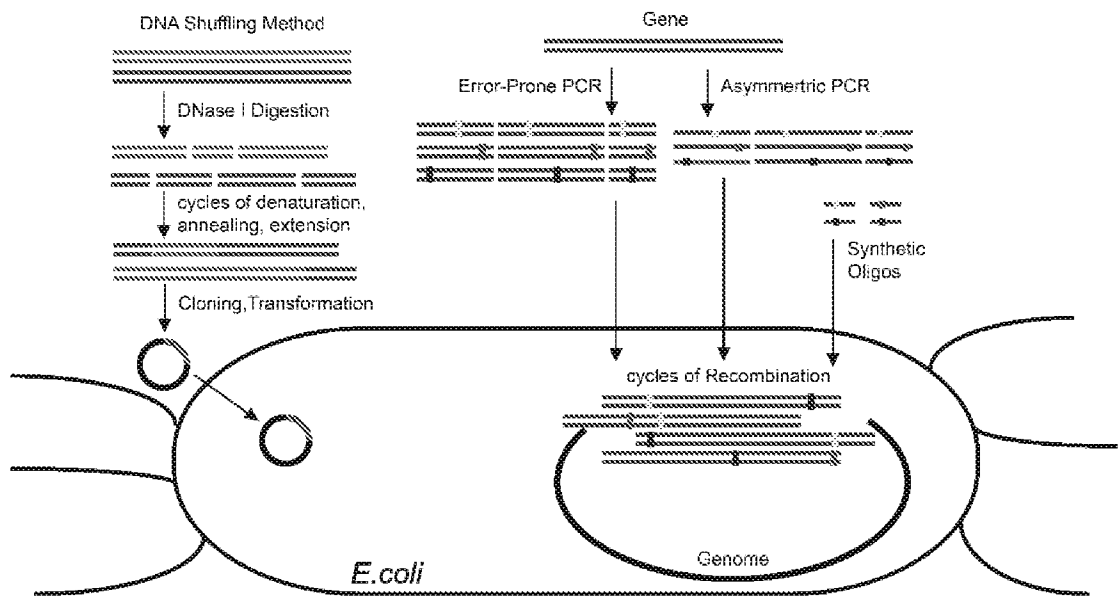


图 1

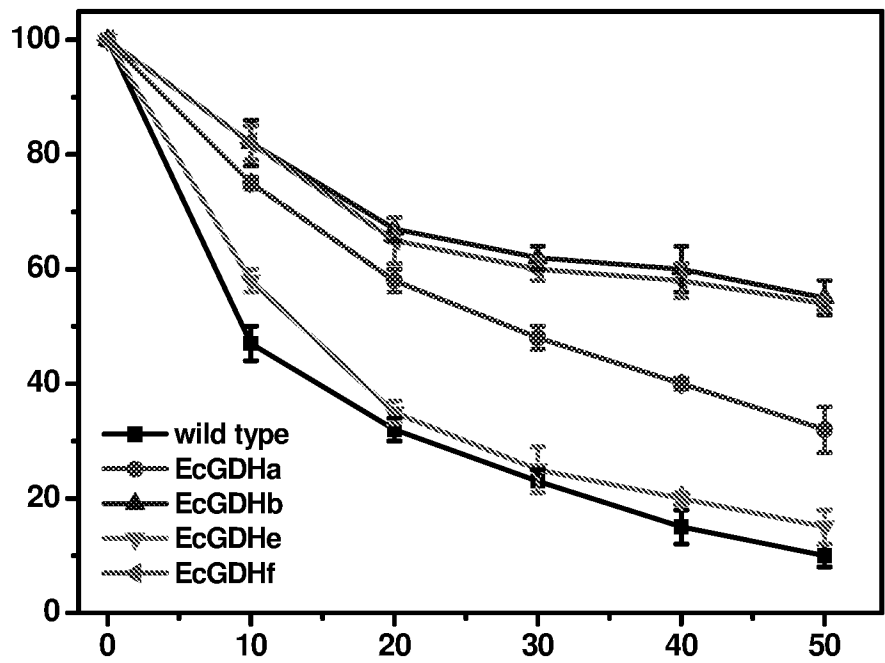


图 2

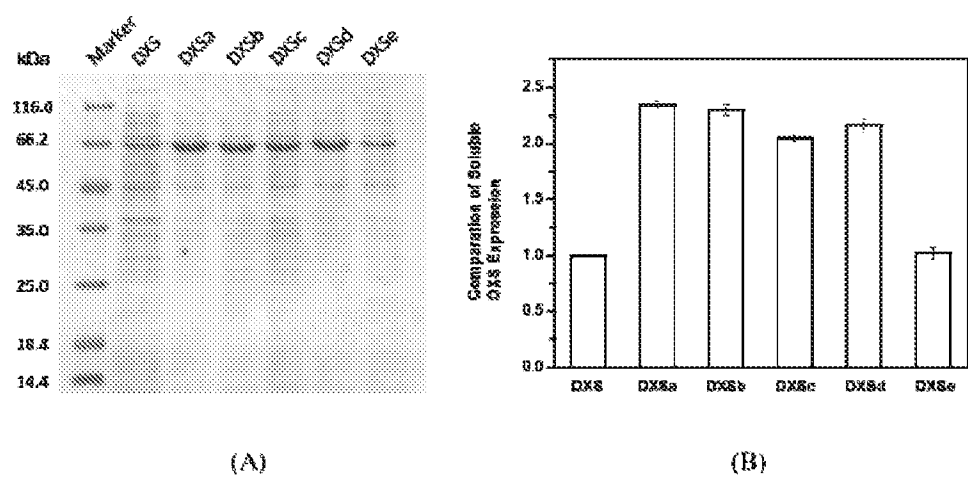


图 3

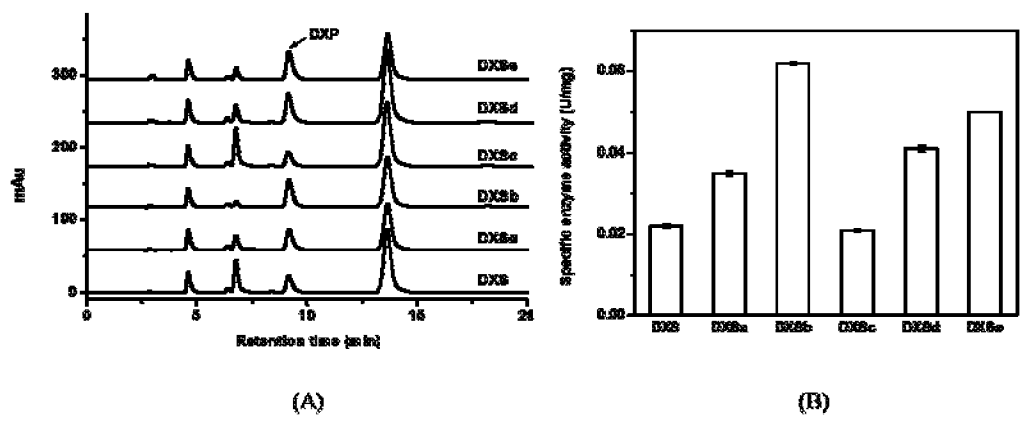


图 4

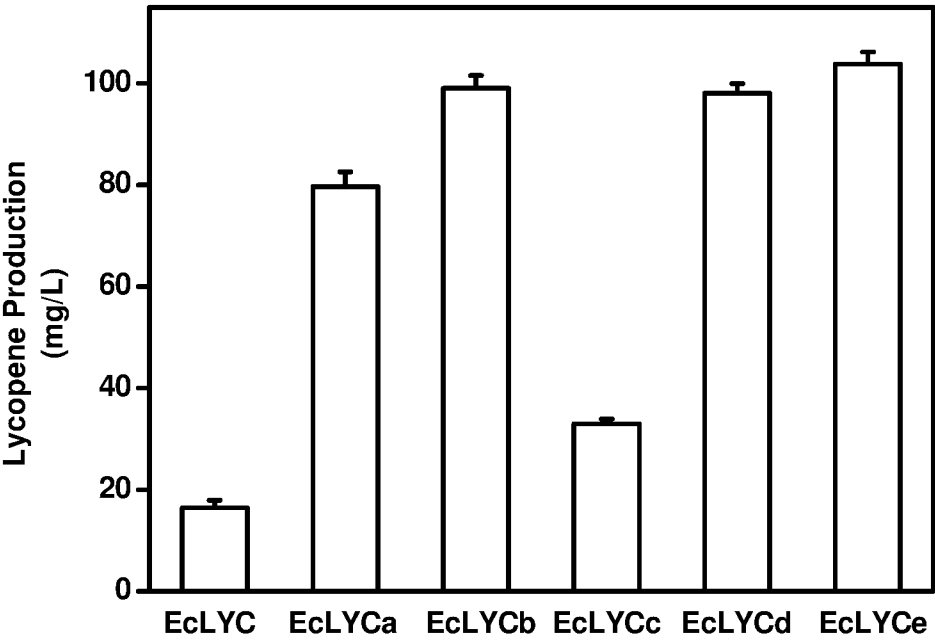


图 5

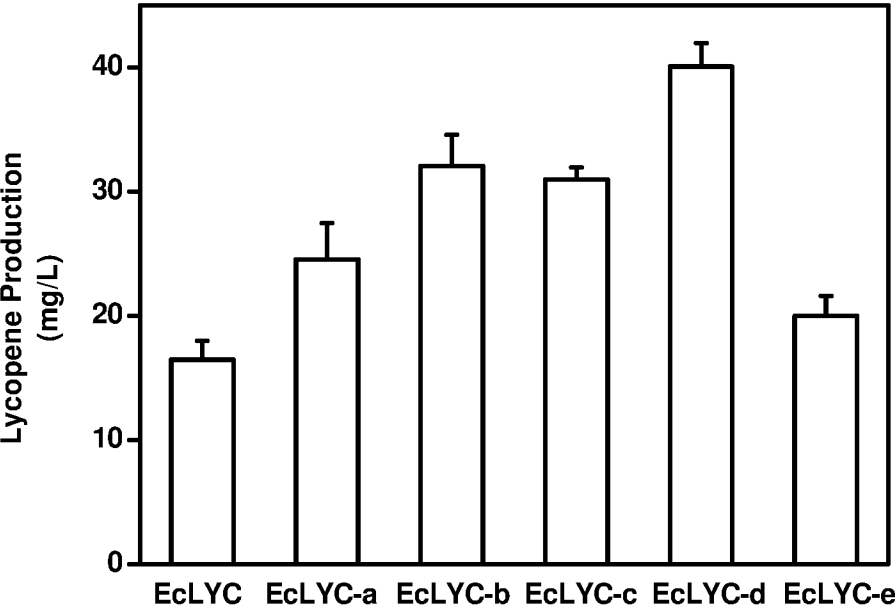


图 6

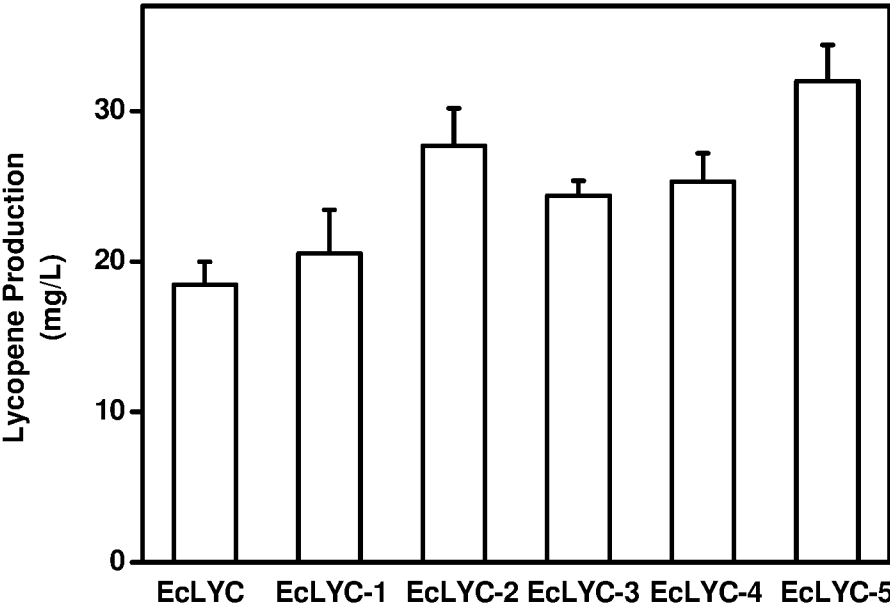


图 7

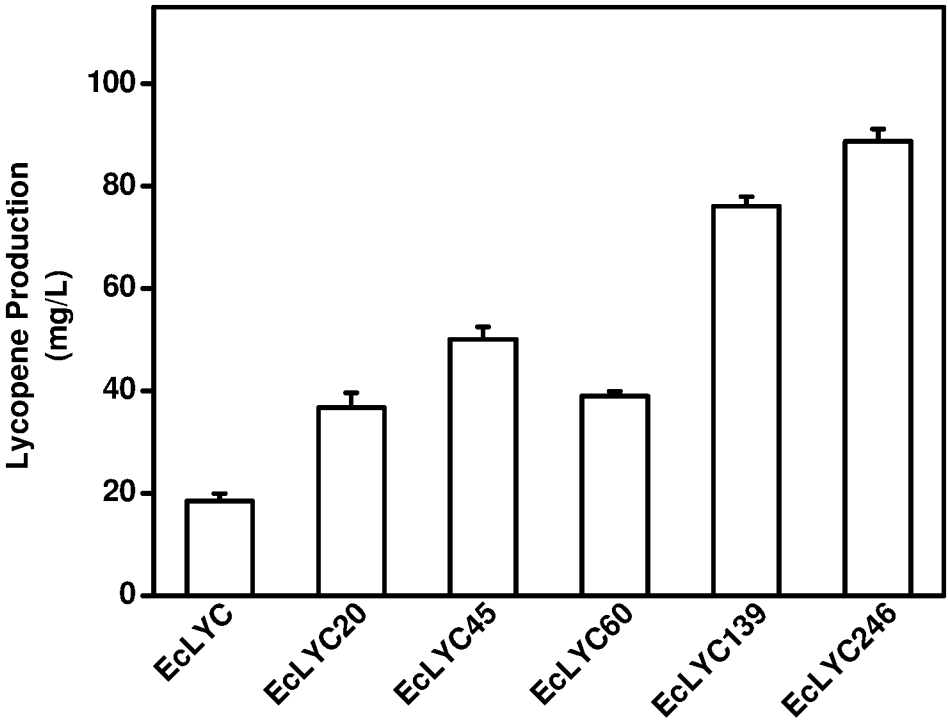


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/077246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/70 (2006.01) i; C12N 1/21 (2006.01) i; C12R 1/19 (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)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, CNMED, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI Web of Knowledge, CNKI, BAIDU and search terms: λ -Red homologous recombination, escherichia coli, error-prone PCR, mutant library, phage lambda Red-mediated homologous recombination, E.coli, in situ evolution etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101550605 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 07 October 2009 (07.10.2009), see abstract, claim 1, description, page 1, and figures 1a and 1b	1-5
A	CN 101550605 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 07 October 2009 (07.10.2009), see the whole document	6, 7
X	WANG, Rui et al., "Construction of high-quality gene mutant pool in pichia pastoris by a PCR dependent method", CHINESE JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 27, no. 9, 25 September 2011 (25.09.2011), see abstract, and page 1327, left column, method 1.2	1-5
A	WANG, Rui et al., "Construction of high-quality gene mutant pool in pichia pastoris by a PCR dependent method", CHINESE JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 27, no. 9, 25 September 2011 (25.09.2011), see pages 1326-1336	6, 7
A	WO 2008006028 A2 (SCRIPPS RESEARCH INST et al.), 10 January 2008 (10.01.2008), see the whole document	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 13 September 2016 (13.09.2016)	Date of mailing of the international search report 09 October 2016 (09.10.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer MA, Zhenlian Telephone No.: (86-10) 62412131

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/085606

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NICHOLAS, R.D.L. and CRONAN, J.E. "Gene-Specific Random Mutagenesis of Escherichia coli In Vivo: Isolation of Temperature-Sensitive Mutations in the Acyl Carrier Protein of Fatty Acid Synthesis", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 188, no. 1, 31 January 2006 (31.01.2006), see pages 287-296	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/086406

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101550605 A	07 October 2009	CN 101550605 B	18 April 2012
WO 2008006028 A2	10 January 2008	US 8685687 B2	01 April 2014
		JP 2009542228 A	03 December 2009
		WO 2008006028 A3	24 December 2008
		CN 101484462 A	15 July 2009
		EP 2046806 A2	15 April 2009
		AU 2007269048 A1	10 January 2008
		KR 20090031938 A	30 March 2009
		EP 2046806 A4	21 October 2009
		US 2010086532 A1	08 April 2010
		CA 2667974 A1	10 January 2008

A. 主题的分类 C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12R 1/19(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) C12N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CPRSABS, CNMED, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI Web of Knowledge, CNKI, BAIDU和检索词: 易错PCR, 突变文库, λ -Red同源重组, 大肠杆菌, 原位进化, error-prone PCR, mutant library, phage lambda Red-mediated homologous recombination, E.coli, in situ evolution等。		
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 101550605 A (江南大学) 2009年 10月 7日 (2009 - 10 - 07) 参见摘要, 权利要求1, 说明书第1页, 图1a、1b	1-5
A	CN 101550605 A (江南大学) 2009年 10月 7日 (2009 - 10 - 07) 参见全文	6、7
X	王睿等. "PCR依赖型方法构建高质量酵母基因突变文库" 《生物工程学报》, 第27卷, 第9期, 2011年 9月 25日 (2011 - 09 - 25), 参见摘要, 第1327页左栏, 1.2方法	1-5
A	王睿等. "PCR依赖型方法构建高质量酵母基因突变文库" 《生物工程学报》, 第27卷, 第9期, 2011年 9月 25日 (2011 - 09 - 25), 参见第1326-1336页	6、7
A	WO 2008006028 A2 (SCRIPPS RESEARCH INST等) 2008年 1月 10日 (2008 - 01 - 10) 参见全文	1-7
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2016年 9月 13日		2016年 10月 9日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		马振莲 电话号码 (86-10)62412131

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	Nicholas R. De Lay and John E. Cronan. "Gene-Specific Random Mutagenesis of Escherichia coli In Vivo: Isolation of Temperature-Sensitive Mutations in the Acyl Carrier Protein of Fatty Acid Synthesis" 《JOURNAL OF BACTERIOLOGY》，第188卷，第1期，2006年 1月 31日 (2006 - 01 - 31)， 参见第287-296页	1-7

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/077246

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	101550605	A	2009年 10月 7日	CN	101550605	B	2012年 4月 18日
WO	2008006028	A2	2008年 1月 10日	US	8685687	B2	2014年 4月 1日
				JP	2009542228	A	2009年 12月 3日
				WO	2008006028	A3	2008年 12月 24日
				CN	101484462	A	2009年 7月 15日
				EP	2046806	A2	2009年 4月 15日
				AU	2007269048	A1	2008年 1月 10日
				KR	20090031938	A	2009年 3月 30日
				EP	2046806	A4	2009年 10月 21日
				US	2010086532	A1	2010年 4月 8日
				CA	2667974	A1	2008年 1月 10日