(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
2023 年 12 月 21 日 (21.12.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/240607 A1

(51) 国际专利分类号:
*C12N 15/74* (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
*C12N 15/63* (2006.01) *C12R 1/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/099492

(22) 国际申请日: 2022 年 6 月 17 日 (17.06.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 中 国 科 学 院 深 圳 先 进 技 术 研 究 院 **(SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES)** [CN/CN]; 中 国 广 东 省 深 圳 市 南 山 区 深 圳 大 学 城 学 苑 大 道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人:高艳梅**(GAO, Yanmei)**; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 李 飞 旋 **(LI, Feixuan)**; 中 国 广 东 省 深 圳 市 南 山 区 深 圳 大 学 城 学 苑 大 道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 金帆 **(JIN, Fan)**; 中 国 广 东 省 深 圳 市 南 山 区 深 圳 大 学 城 学 苑 大 道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北 京 市 诚 辉 律 师 事 务 所 **(BEIJING CHENGHUI LAW FIRM)**; 中国北京市朝阳区朝阳北路99号楼2单元905, Beijing 100123 (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, 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,

WO 2023/240607 A1

(54) **Title:** METHOD FOR EDITING GENOME OF BACTERIA CAPABLE OF PRODUCING BACTERIAL CELLULOSE

(54) 发明名称: 一种用于编辑可生成细菌纤维素细菌基因组的方法

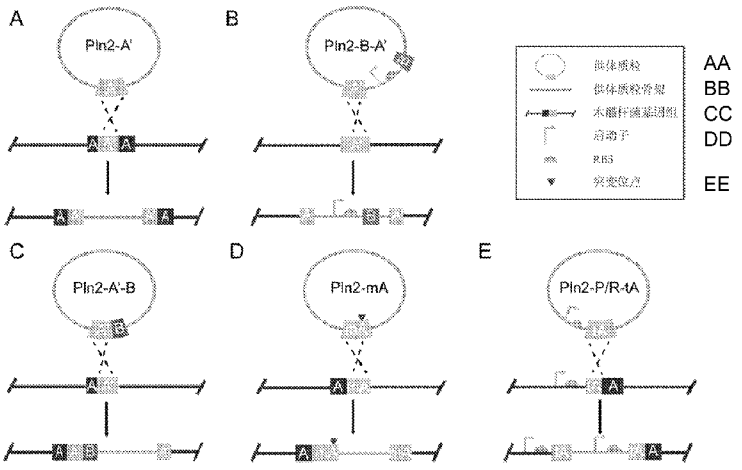



图 1

AA Donor plasmid
BB Donor plasmid skeleton
CC Genome of Acetobacter xylinum
DD Promoter
EE Mutation site

(57) **Abstract:** Provided is a gene editing method for the genome of bacteria capable of producing bacterial cellulose. The method comprises the following steps: S1) determining a target gene or site to be modified in bacteria capable of producing cellulose membranes, and determining a first homologous arm sequence according to the target gene or site to be modified; S2) preparing a donor plasmid, wherein the donor plasmid comprises a replication initiation site, a screening gene and a second homologous arm sequence for allelic exchange with a genome; and S3) transferring the prepared donor plasmid into the bacteria capable of producing cellulose

[见续页]

IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

**(84)** 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

membranes, performing culturing, and performing screening by means of a screening method corresponding to the screening gene to obtain gene-edited recombinant bacteria of the bacteria capable of producing cellulose membranes, wherein the sequence of the donor plasmid, which is linearized, is inserted into a target gene or site to be modified in the genome of the recombinant bacteria. By means of the present invention, rapid and simple genetic modification is performed on the genome of bacteria capable of producing cellulose membranes by using a single recombination method.

**(57)** 摘要: 提供一种用于可生成细菌纤维素细菌基因组的基因编辑方法，所述方法包括以下步骤:S1)确定可生成纤维素膜细菌中的目标修改的基因或位点，并根据目标修改的基因或位点确定第一同源臂序列；S2)制备供体质粒，所述供体质粒包含复制起始位点、筛选基因以及用于和基因组等位交换的第二同源臂序列；S3)将制备获得的供体质粒转入可生成纤维素膜细菌中，进行培养，并通过与所述筛选基因对应的筛选方法进行筛选，进而得到基因编辑的可生成纤维素膜细菌的重组菌；所述重组菌基因组中的目标修改的基因或位点插入了线性化的供体质粒序列。本发明利用单重组的方法，对可生成纤维素膜的细菌基因组快速、简便的基因修改。

# 一种用于编辑可生成细菌纤维素细菌基因组的方法

## 技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种用于可生成细菌纤维素细菌基因组的快速修改的方法。

## 背景技术

基因修改是研究细菌基因功能、调控基因回路、筛选特定表型等方面一种常见而成熟的技术。然而，对于可生成天然细菌纤维素细菌，例如木醋杆菌等微生物来说，其生长速度较慢、培养方式和分子生物学操作与常用的大肠杆菌等细菌相差较大、可用于编辑其基因组的技术目前只有 Red 重组技术被报道。

目前虽然有研究者利用Red重组技术实现了对木醋杆菌基因组的敲除，但这一敲除首先需要将辅助质粒（helper plasimde）电转入野生型木醋杆菌中，同时还需要通过重叠聚合酶链式反应（overlap PCR）将靶标基因上下游同源臂和抗性基因共三个片段构建成一个重组片段；其次需要再一次电转将得到的重组片段电转入含有辅助质粒的木醋杆菌中；最后若需要获得纯净敲除，需要经历一次额外电转、一次抗生素培养基筛选。这种策略虽然很经典但操作步骤多，流程复杂，尤其是对于生长周期较慢的木醋杆菌等微生物，每多经历一次电转无疑是要多花4-5天的时间。

因此，在大肠杆菌等细菌中已经较为成熟的 Red 重组技术虽然可以在可生成细菌纤维素细菌，例如木醋杆菌中操作，但是却存在操作方法复杂，耗时太长的问题。这些因素均很大程度的限制了研究者对它们基因组基因和表型的研究以及工程化这类细菌。

## 发明内容

因此，为了缩短对可生成纤维素膜且生长速度较慢的木醋杆菌等细菌基因重组（敲除，插入，修改，蛋白融合等操作）时间，本发明提供了一种单次重组的方法，实现仅利用一次等位基因交换就可以将携带同源片段的质粒线性化插入特定的基因组位点。这种方法不需要辅助质粒，比上述 Red 重组方法少一次电转，并且用于重组的质粒只需要目标位置一段同源臂即可。换言之本发明的方法操作简单且耗时较短，尤其对于批量的基因型与表型研究工作来说。

本发明一个方面提供了一种可生成纤维素膜细菌基因编辑方法，所述方法包括以下步骤：

S1)确定可生成纤维素膜细菌中的目标修改的基因或位点，并根据目标修改的基因或位点

确定用于和供体质粒进行等位交换的第一同源臂序列；

S2)制备供体质粒，所述供体质粒包含复制起始位点、筛选基因以及用于和可生成纤维素膜细菌基因组中第一同源臂序列进行等位交换的第二同源臂序列；

S3)将制备获得的供体质粒转入可生成纤维素膜细菌中，进行培养，并通过与所述筛选基因对应的筛选方法进行筛选，进而得到基因编辑的可生成纤维素膜细菌的重组菌；所述重组菌基因组的目标修改的基因或位点插入了线性化的供体质粒序列；

在供体质粒中的复制起始位点为在所述可生成纤维素膜细菌中无法自主复制的复制起始位点；

所述第一同源臂片段和第二同源臂序列分别为可生成纤维素膜细菌基因组以及供体质粒中能够进行等位交换的片段，除同于目标基因突变外，第二同源臂序列应与第一同源臂 DNA 序列完全一致。

进一步地，所述基因编辑方法为目标基因失活、目标基因特定位点突变、目标基因末尾基因融合表达、基因组特定位置外源基因的插入、单独或同时修改可生成纤维素膜细菌基因组中目标基因启动子和 RBS。

进一步地，所述基因编辑方法为目标基因失活，在步骤 S1)中，第一同源臂序列为待失活目标基因的一部分，优选第一同源臂序列为位于待失活目标基因中间。

进一步地，所述基因编辑方法为目标基因特定位点突变，在步骤 S1)中，第一同源臂序列为目标基因部分序列或者目标基因部分序列和其连续的下游序列；其中所述目标基因部分序列为包含待突变位置碱基序列和终止密码子的连续 DNA 序列，优选地，待突变位置位于第一同源臂中间或者末端，同时除待突变位置碱基外，第二同源臂序列中其它碱基序列与第一同源臂 100%同源。

进一步地，所述基因编辑方法为目标基因末尾基因融合表达；在步骤 S1)中，第一同源臂序列为目标基因且不包含目标基因终止密码子，但包含编码终止密码子前一个氨基酸序列的连续片段。优选的第一同源臂序列从不包含目标基因完整起始密码子序列的任意位置起始到编码其终止密码子前一个氨基酸的碱基终止；在步骤 S2）中，供体质粒还包含待插入的外源基因；待插入基因的外源基因起始密码子上游不包含启动子和 RBS，转录方向与目标基因转录方向一致，任选地，包含连接用的氨基酸链的编码序列。

进一步地，所述基因编辑方法为基因组特定位置外源基因的插入，在步骤 S1)中，第一同源臂序列为待插入位点及其连续的上游序列；在步骤 S2）中，供体质粒还包含待插入的外源基因，所述外源基因起始密码子前包含启动子和 RBS 序列。更进一步地，第一同源臂序列为

待失活的目标基因中的部分序列。

进一步地，所述基因编辑方法为单独或同时修改可生成纤维素膜细菌基因组中目标基因启动子和 RBS，在步骤 S1)中，第一同源臂为目标基因自起始密码子开始的部分序列；在步骤 S2)中，供体质粒还包含替换的启动子和或 RBS 序列，替换的启动子和或 RBS 必须在同源臂的 5'端，且转录方向与目标基因转录方向一致。

进一步地，所述第二同源臂片段包含了目标修改的基因中的至少一部分，或者与目标修改的基因中的至少一部分同源，或者所述第二同源臂片段中至少一部分选自与目标修改的基因及其下游部分序列同源，与特定编辑位点及其上游部分序列同源。

进一步地，所述第二同源臂片段中至少一部分选自与目标修改的基因及其下游部分序列同源，与特定编辑位点及其上游部分序列同源，所述基本同源为至少 90%以上的序列同源，或至少 95%以上的序列同源，或至少 96%以上的序列同源，或至少 97%以上的序列同源，或至少 98%以上的序列同源，或至少 99%以上的序列同源；或者所述基本同源为除 1 个碱基以外其他碱基同源，除 2 个碱基以外其他碱基同源，除 3 个碱基以外其他碱基同源除 4 个碱基以外同源，其他碱基同源除 5 个碱基以外其他碱基同源。

进一步地，第一和或第二同源臂片段的长度为至少 10 个碱基，优选为 50-1000 个碱基，例如 50、60、70、80、90、100、200、300、500、600、700、800、900、1000 个碱基。

进一步地，在步骤 S3）后还包含通过聚合酶链式反应（PCR）以及二代测序进行检测的步骤，已确定得到的可生成纤维素膜细菌的基因编辑结果是否准确。更进一步地，所述聚合酶链式反应（PCR）以及测序的方法为通过基因编辑位点上下游引物扩增基因编辑位点序列，并通过测序方法，例如二代测序方法获得基因编辑位点序列。

进一步地，所述重组菌基因组中插入了线性化的供体质粒序列。

进一步地，步骤 S2)中制备供体质粒的方法为：

S2-1)获得编辑包含目标的基因或位点的 DNA 序列的同源片段；

S2-2)将用于编辑目标的基因或位点的 DNA 序列的同源片段与表达载体质粒连接获得供体质粒，所述供体质粒包含在可生成纤维素膜细菌中不可复制的复制起始位点和筛选基因；

进一步地，所述供体质粒还含有待插入细菌基因组的新基因及其启动子和核糖体结合位点（RBS）；

进一步地，所述筛选基因为抗生素抗性基因、荧光蛋白基因、标记蛋白基因，营养缺陷型筛选标记。

进一步地，所述的抗生素抗性基因选自 blatem、blashv、blarob、blaoxa、blaZ、aadB、aacC1、

aacC2、aacC3、aac6’－IIa、aacA4、aad(6’)、vanA、vanB、vanC、msrA、satA、aac(6’)－aph(2”)、vat、vga、ermA、ermB、ermC、mecA、int 和 sul。

进一步地，所述在可生成纤维素膜细菌中不可复制的复制起始位点选自在除可生成纤维素膜细菌外任意一种细菌中可以复制的复制起点。例如，除可生成纤维素膜细菌外任意一种细菌可以为大肠杆菌。

进一步地，所述在可生成纤维素膜细菌中不可复制的复制起始位点 pMB1、R6K、RK2、Pro1600、ColE1、pBR322。

进一步地，基因编辑的序列为待失活的编码区或者非编码区的部分序列。

进一步地，步骤 S3）中转入可生成纤维素膜细菌的方法为电转导或化学转导。

进一步地，所述可生成细菌纤维素细菌选自木醋杆菌、巴氏醋杆菌、木葡糖酸醋杆菌、汉氏葡糖醋杆菌、醋化醋杆菌、产醋醋杆菌、气杆菌、根瘤杆菌、无色杆菌、土壤杆菌、假单胞杆菌、产碱杆菌、八叠球菌、动胶菌中的至少一种。

本发明发现，利用等位交换的原理，当供体质粒和细菌基因组有一定长度同源臂就可以将供体质粒整合到其基因组中，进而对细菌基因组进行编辑。因此供体质粒的同源序列中必须包含目标基因或基因组特定位点同源的 DNA 序列。当用于特定基因修改时，同源臂必须且可以包含目标基因的部分 DNA 序列；当同于编辑基因组特定位点时，此同源序列由特定位点 DNA 序列和其连续的上游任意长度 DNA 序列组成。此外，若对基因组某一特定基因进行突变时，供体质粒与其对应的基因组中同源臂 DNA 序列不完全一致，供体质粒中的同源臂序列中对应位置单个或多个碱基要由原始碱基突变成设计的碱基。

有益效果

本发明利用单重组的方法，实现对可生成纤维素膜的细菌基因组快速，简便的基因修改。操作简单，用时短。

## 附图说明

图 1：实施例 1 中单重组方法用于木醋杆菌基因组特定基因修改和特定位点基因插入的原理图。

其中，A 为可生成纤维素膜细菌基因组中特定基因失活的原理图，B 为向可生成纤维素膜细菌基因组中特定位点或失活特定基因的同时插入新基因的原理图，C 为可生成纤维素膜细菌基因组中特定基因 3′ 端融合外源蛋白的原理图，D 为可生成纤维素膜细菌中目标基因

点或小段突变的原理图，E 为通过单独或同时修改可生成纤维素膜细菌基因组中目标基因启动子和 RBS 进而调整其表达量的原理图。

图 2：实施例 1 供体质粒图谱。其中 A 为 pln2-acsC1'的供体质粒图谱，B 为 pln2-ccpAX'的供体质粒图谱,C 为 pln2-dgc2' 的供体质粒图谱。

图 3：实施例 1 PCR 鉴定胶图以及 DNA 测序结果。其中 A 为 acsC1 组的结果，B 为 ccpAX'的结果，C 为 dgc2' 的结果。

## 具体实施方式

为了使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂，下面对本发明的具体实施方式做详细的说明，但不能理解为对本发明的可实施范围的限定。

结合图 1 的 A 说明可生成纤维素膜细菌基因组中特定基因失活的原理。图 1A 为本发明用于失活基因组中特定基因原理的示意图。

S1) 根据实验目标，确定可生成纤维素膜细菌基因组中的目标失活基因（X）。随后根据目标基因序列确定同源臂序列（A'），A'为目标失活基因 X 的部分序列，优选为位于目标失活基因 X 中间，A'的长度为至少 10 个碱基。为了方便理解，将基因组 X 基因中用作同源臂的序列也标为 A'，因此目标修改基因 X 可表示为 AA'A；

S2)制备供体质粒 Pln2-A'，所述供体质粒包含复制起始位点、筛选基因以及同源臂序列（A'）；其中同源臂序列只能由目标基因 A 的部分序列组成。在质粒骨架上的复制起始位点无法在具有在可生成纤维素膜细菌中自主复制。筛选基因是为了对重组菌进行筛选。

S3)将制备获得的供体质粒转入可生成纤维素膜细菌中，进行培养，由于供体质粒中的复制起始位点无法在可生成纤维素膜细菌中自主复制，只能通过同源序列 A' 与基因组进行等位交换将质粒中的基因全部整合到可生成纤维素膜细菌的基因组中才能被复制。同时由于质粒中包含了筛选基因，通过与所述筛选基因对应的筛选方法进行筛选，就可得到特定基因失活的可生成纤维素膜细菌的重组菌。例如当选择的筛选基因为抗生素抗性基因时，采用含有抗生素的培养基培养时未整合成功的细菌则无法存活，整合成功得到重组菌基因组中具有抗性基因表达，因此可以存活。同时重组菌由于等位交换后进行了整合，因此将原编码目标蛋白 X 的序列 AA'A 分成了两段，无法再表达原蛋白，实现了目标基因的失活。

结合图 1 的 B 说明向可生成纤维素膜细菌基因组中特定位点或失活特定基因的同时插入新基因的原理。图 1B 为本发明向可生成纤维素膜细菌基因组中特定位点或失活特定基因的同时插入新基因的原理示意图。

S1) 根据实验目标，确定可生成纤维素膜细菌基因组中的目标插入位点或者基因。随后根据目标插入位点或者基因序列，确定同源臂序列（A’）。

S2)制备供体质粒 pln2-B-A’，所述供体质粒包含复制起始位点、筛选基因、待插入的新基因(B)和同源序列（A’）。其中待插入基因组的新基因 B 起始密码子前需要包含启动子和 RBS 序列，启动子和 RBS 根据实验中计划外源基因表达方式和强度决定，待插入的新基因在载体质粒上位置和转录方向不做要求；若将新基因插入基因组特定位点，同源臂 A’必须由特定位点及其上游 DNA 序列组成；若插入新基因同时失活特定基因，其中同源臂序列只能由目标基因的部分序列组成。在质粒骨架上的复制起始位点无法在具有在可生成纤维素膜细菌中自主复制。筛选基因是为了对重组菌进行筛选。

S3)将制备获得的供体质粒转入可生成纤维素膜细菌中，进行培养，由于供体质粒中的起始位点无法在可生成纤维素膜细菌中进行自主复制，只能通过同源的序列 A’进行等位交换将质粒中的基因全部整合到可生成纤维素膜细菌的基因组中才能复制，由于质粒中包含了筛选基因，通过与所述筛选基因对应的筛选方法进行筛选，就可得到在特定基因组位点或者基因中插入新基因的可生成纤维素膜细菌的重组菌。例如当选择的筛选基因为抗生素抗性基因时，采用含有抗生素的培养基培养时未整合成功的细菌则无法存活，整合成功得到重组菌基因组中具有抗性基因表达，因此可以存活。该重组菌通过等位交换后，即可将新的外源基因插入宿主菌基因组中特定位点或者在失活特定基因的同时插入新的基因到宿主基因组中。

结合图 1 的 C 说明可生成纤维素膜细菌基因组中特定基因 3′ 端融合外源蛋白的原理。图 1C 为本发明可生成纤维素膜细菌基因组中特定基因 3′ 端融合外源蛋白的原理示意图。

S1)根据实验目标，确定可生成纤维素膜细菌基因组中的目标融合基因 X。随后根据目标融合基因序列，确定同源臂序列（A’）。为了方便理解，我们将基因组中用在同源臂的序列标为 A’，因此目标融合基因 X 可表示为 AA’.

S2)制备供体质粒 pln2-A’-B，所述供体质粒包含复制起始位点、筛选基因、待插入基因(B)和同源序列（A’）。其中待插入基因的外源基因起始密码子前不需要包含任何启动子和 RBS，可包含小段连接用的氨基酸链（linker）的编码序列，待插入基因的转录方向必须与目标融合基因相同。供体质粒中同源臂序列只能由目标融合基因终止密码子上游 10 个以上碱基长度的部分 DNA 序列组成，且不包含其终止密码子。在质粒骨架上的复制起始位点无法在具有在可生成纤维素膜细菌中自主复制。筛选基因是为了对重组菌进行筛选。

S3)将制备获得的供体质粒转入可生成纤维素膜细菌中，进行培养，由于供体质粒中的起始位点无法在可生成纤维素膜细菌中进行自主复制，只能通过同源的序列 A’进行等位交换

将质粒中的基因全部整合到可生成纤维素膜细菌的基因组中才能复制，由于质粒中包含了筛选基因，通过与所述筛选基因对应的筛选方法进行筛选，进而得到基因组中特定基因融合表达的重组菌。例如当选择的筛选基因为抗生素抗性基因时，采用含有抗生素的培养基培养时未整合成功的细菌则无法存活，整合成功得到重组菌基因组中具有抗性基因表达，因此可以存活。该重组菌通过等为交换后，即可将新的外源基因与宿主菌基因组中特定基因进行融合。

结合图 1D 说明可生成纤维素膜细菌中目标基因点或小段突变的原理。图 1D 为本发明目标基因点或小段突变原理示意图。

S1) 根据实验目标，确定可生成纤维素膜细菌基因组中的目标突变基因。随后根据目标突变基因序列以及计划突变位置，确定同源臂序列（mA）。为了方便理解，目标突变基因为 X，同源臂的序列标为 mA，因此目标突变基因 X 表示为 AmA；

S2)制备供体质粒 pln-mA，所述供体质粒包含复制起始位点、筛选基因，以及同源臂(mA)。其中同源臂 mA 为目标基因部分 DNA 序列或者目标修改基因部分 DNA 序列和其连续的下游 DNA 序列。其中目标基因的部分 DNA 序列必须是包含突变位置碱基序列和终止密码子的连续 DNA 序列，优选地突变位置位于同源臂中间或者末端，同时除突变位置碱基外，其它碱基序列与目标基因及其下游序列 100%同源。在质粒骨架上的复制起始位点无法在具有在可生成纤维素膜细菌中自主复制。筛选基因是为了对重组菌进行筛选。

S3)将制备获得的供体质粒转入可生成纤维素膜细菌中，进行培养，由于供体质粒中的起始位点无法在可生成纤维素膜细菌中进行起始复制表达，只能通过同源的序列进行等位交换将质粒中的基因全部整合到可生成纤维素膜细菌的基因组中，由于质粒中包含了筛选基因，通过与所述筛选基因对应的筛选方法进行筛选，进而得到基因编辑的可生成纤维素膜细菌重组菌。例如当选择的筛选基因为抗生素抗性基因时，采用含有抗生素的培养基培养时未整合成功的细菌则无法存活，整合成功得到重组菌基因组中具有抗性基因表达，因此可以存活。该细菌由于等位交换后进行了整合，即可将基因组中的目标基因的进行突变。

结合图 1E 说明通过单独或同时修改可生成纤维素膜细菌基因组中目标基因启动子和 RBS 进而调整其表达量的原理。图 1E 为本发明通过单独或同时修改可生成纤维素膜细菌基因组中目标基因启动子和 RBS 进而调整其表达量的原理示意图。

S1)根据实验目标，确定可生成纤维素膜细菌基因组中的目标突变基因 X。随后根据目标基因，确定同源臂序列（tA）。为了方便区分和理解将基因组中 X 基因中用作同源臂的序列标为 tA，即图中目标突变基因 X 以 tAA 行式展现；

S2)制备供体质粒 pln2-P/R -A，所述供体质粒包含复制起始位点、筛选基因、替换的启动

子(P)或 RBS(R)和同源臂序列（tA）。其中同源臂序列必须且只能由 X 基因从起始密码子开始的部分 DNA 序列组成。替换的启动子或 RBS 必须在同源臂的 5’端，且方向与 X 基因转录方向一致；在质粒骨架上具有在可生成纤维素膜细菌中无法起始复制的复制起始位点，还包含筛选基因，筛选基因可以用于基因编辑后工程菌的筛选。

S3)将制备获得的供体质粒转入可生成纤维素膜细菌中，进行培养，由于供体质粒中的起始位点无法在可生成纤维素膜细菌中进行自主复制，只能通过同源臂进行等位交换将质粒中的基因全部整合到可生成纤维素膜细菌的基因组中才能复制，由于质粒中包含了筛选基因，通过与所述筛选基因对应的筛选方法进行筛选，进而得到基因编辑的可生成纤维素膜细菌重组菌。例如当选择的筛选基因为抗生素抗性基因时，采用含有抗生素的培养基培养时未整合成功的细菌则无法存活，整合成功得到重组菌基因组中具有抗性基因表达，因此可以存活。该重组菌通过等为交换后，目标基因的启动子或 RBS 就可被更改，随即其表达量进行改变。

实施例 1 单重组方法使木醋杆菌基因失活实验

选用木醋杆菌 ATCC53582 菌株为目标菌株，以分别失活其基因组中 ccpAX、dgc2、acsC1 基因为例。

在进行基因重组实验时，使用的载体质粒 pln2 只包含筛选标记的抗性基因 aacC1 和复制起始位点 pMB1。pMB1 复制起始位点在大肠杆菌中可复制，但在木醋杆菌中不可复制。因此，木醋杆菌只能通过与供体质粒中的同源臂发生等位交换，进而将整个载体质粒骨架整合到其基因组中才能在含有对应抗性的 HS 抗性板中生存下来（图 1）。

如图 2 所示，实验中使用的含有 ccpAX、dgc2、acsC1 基因自身一部分片段（ccpAX’、dgc2’、acsC1’）的供体质粒，通过将供体质粒分别电转到木醋杆菌 ATCC53582 中，随后细菌借助单次等位基因交换将目的基因破坏为两段，从而实现基因失活。通过 PCR 鉴定以及对对应位置基因序列测序分析也证实本发明方法通过单重组的方法成功灭活 ccpAX、dgc2、acsC1 基因（图 3），同时也证实了单次重组技术用于可生成纤维素膜的细菌基因组修改的可行性。

菌种和生长条件：大肠杆菌 TOP10 菌株用于质粒构建、增殖以及目标质粒的初步筛选。木醋杆菌 ATCC58532 为宿主菌株。在所有实验中，大肠杆菌均使用 LB 肉汤用作生长培养基，木醋杆菌 ATCC58532 均使用 Hestrin-Schramm（HS）培养基用作生长培养基。如需要添加抗生素，对大肠杆菌和木醋杆菌，庆大霉素使用浓度分别为 15 μg/ mL 和 300 μg/ mL。所有的实验中，如非特别说明大肠杆菌和木醋杆菌培养温度分别为 37℃和 30℃。

重组质粒构建：1）首先利用 PCR 方法克隆目标片段（ccpAX’、dgc2’、acsC1’）基因，同时 PCR 克隆制备线性化的表达载体 pln2；2）通过吉布森（Gibson assembly）无缝连接技术，分别将目标片段（ccpAX’、dgc2’、acsC1’）基因连接到载体上，构建出供体质粒。

单重组基因组重组操作步骤：1）测序验证后的质粒电转入木醋杆菌 ATCC53582 中，在含有 300μg/mL 庆大霉素的 HS 固体培养基培养；2）挑选单克隆点，用对应的引物鉴定基因组插入情况；3）将鉴定插入成功的片段切胶送测序。

# 权 利 要 求 书

1、一种可生成纤维素膜细菌的基因编辑方法，其特征在于，所述基因编辑方法包括以下步骤：

S1)确定可生成纤维素膜细菌中的目标修改的基因或位点，并根据目标修改的基因或位点确定用于和供体质粒进行等位交换的第一同源臂序列；

S2)制备供体质粒，所述供体质粒包含复制起始位点、筛选基因以及用于和可生成纤维素膜细菌基因组中第一同源臂序列进行等位交换的第二同源臂序列；

S3)将制备获得的供体质粒转入可生成纤维素膜细菌中，进行培养，并通过与所述筛选基因对应的筛选方法进行筛选，进而得到基因编辑的可生成纤维素膜细菌的重组菌；所述重组菌基因组的目标修改的基因或位点插入了线性化的供体质粒序列；

在供体质粒中的复制起始位点为在所述可生成纤维素膜细菌中无法自主复制的复制起始位点；

所述第一同源臂片段和第二同源臂序列分别为可生成纤维素膜细菌基因组以及供体质粒中能够进行等位交换的片段，除同于目标基因突变外，第二同源臂序列应与第一同源臂 DNA 序列完全一致；

优选地，基因编辑的序列为待失活的编码区或者非编码区的部分序列；

优选地，所述可生成细菌纤维素细菌选自木醋杆菌、巴氏醋杆菌、木葡糖酸醋杆菌、汉氏葡糖醋杆菌、醋化醋杆菌、产醋醋杆菌、气杆菌、根瘤杆菌、无色杆菌、土壤杆菌、假单胞杆菌、产碱杆菌、八叠球菌、动胶菌中的至少一种。

2、根据权利要求 1 所述的基因编辑方法，其特征在于，所述基因编辑方法为目标基因失活、目标基因特定位点突变、目标基因末尾基因融合表达、基因组特定位置外源基因的插入、单独或同时修改可生成纤维素膜细菌基因组中目标基因启动子和 RBS。

3、根据权利要求 2 所述的基因编辑方法，其特征在于，所述基因编辑方法为目标基因失活，在步骤 S1)中，第一同源臂序列为待失活目标基因的一部分，优选第一同源臂序列为位于待失活目标基因中间；或者

所述基因编辑方法为目标基因特定位点突变，在步骤 S1)中，第一同源臂序列为目标基因部分序列或者目标基因部分序列和其连续的下游序列；其中所述目标基因部分序列为包含待突变位置碱基序列和终止密码子的连续 DNA 序列，优选地，待突变位置位于第一同源臂中间或者末端，同时除待突变位置碱基外，第二同源臂序列中其它碱基序列与第一同源臂 100%

同源；或者

所述基因编辑方法为目标基因末尾基因融合表达；在步骤 S1)中，第一同源臂序列为目标基因且不包含目标基因终止密码子，但包含编码终止密码子前一个氨基酸序列的连续片段。优选的第一同源臂序列从不包含目标基因完整起始密码子序列的任意位置起始到编码其终止密码子前一个氨基酸的碱基终止；在步骤 S2）中，供体质粒还包含待插入的外源基因；待插入基因的外源基因起始密码子上游不包含启动子和 RBS，转录方向与目标基因转录方向一致，任选地，包含连接用的氨基酸链的编码序列；或者

所述基因编辑方法为基因组特定位置外源基因的插入，在步骤 S1)中，在步骤 S1)中，第一同源臂序列为待插入位点及其连续的上游序列；在步骤 S2）中，供体质粒还包含待插入的外源基因，所述外源基因起始密码子前包含启动子和 RBS 序列。更进一步地，第一同源臂序列为待失活的目标基因中的部分序列；或者

所述基因编辑方法为单独或同时修改可生成纤维素膜细菌基因组中目标基因启动子和 RBS，在步骤 S1)中，第一同源臂为目标基因自起始密码子开始的部分序列；在步骤 S2)中，供体质粒还包含替换的启动子和或 RBS 序列，替换的启动子和或 RBS 必须在同源臂的 5’端，且转录方向与目标基因转录方向一致。

4、根据权利要求 1 所述的基因编辑方法，其特征在于，所述第二同源臂片段包含了目标修改的基因中的至少一部分，或者与目标修改的基因中的至少一部分同源，或者所述第二同源臂片段中至少一部分选自与目标修改的基因及其下游部分序列同源，与特定编辑位点及其上游部分序列同源。

5、根据权利要求 1 所述的基因编辑方法，其特征在于，所述第二同源臂片段中至少一部分选自与目标修改的基因及其下游部分序列同源或基本同源，与特定编辑位点及其上游部分序列同源或基本同源，所述基本同源为至少 90%以上的序列同源，或至少 95%以上的序列同源，或至少 96%以上的序列同源，或至少 97%以上的序列同源，或至少 98%以上的序列同源，或至少 99%以上的序列同源；或者所述基本同源为除 1 个碱基以外其他碱基同源，除 2 个碱基以外其他碱基同源，除 3 个碱基以外其他碱基同源除 4 个碱基以外同源，其他碱基同源除 5 个碱基以外其他碱基同源。

6、根据权利要求 1 所述的基因编辑方法，其特征在于，第一和或第二同源臂片段的长度为至少 10 个碱基，优选为 15-1000 个碱基。

7、根据权利要求 1 所述的基因编辑方法，其特征在于，步骤 S2)中制备供体质粒的方法为：

S2-1)获得编辑包含目标的基因或位点的 DNA 序列的同源片段；

S2-2)将用于编辑目标的基因或位点的 DNA 序列的同源片段与表达载体质粒连接获得供体质粒，所述供体质粒包含在可生成纤维素膜细菌中不可复制的复制起始位点和筛选基因；

优选地，所述供体质粒还含有待插入细菌基因组的新基因及其启动子和核糖体结合位点（RBS）。

8、根据权利要求 1 所述的基因编辑方法，其特征在于，进一步地，所述筛选基因为抗生素抗性基因、荧光蛋白基因、标记蛋白基因，营养缺陷型筛选标记；

优选地，所述的抗生素抗性基因选自 blatem、blashv、blarob、blaoxa、blaZ、aadB、aacC1、aacC2、aacC3、aac6'－IIa、aacA4、aad(6')、vanA、vanB、vanC、msrA、satA、aac(6')－aph(2")、vat、vga、ermA、ermB、ermC、mecA、int 和 sul。

9、根据权利要求 1 所述的基因编辑方法，其特征在于，所述在可生成纤维素膜细菌中不可复制的复制起始位点选自在除可生成纤维素膜细菌外任意一种细菌中可以复制的复制起点；

优选地，所述在可生成纤维素膜细菌中不可复制的复制起始位点 pMB1、R6K、RK2、Pro1600、ColE1、pBR322。

10、根据权利要求 1 所述的可生成纤维素膜细菌基因编辑方法，其特征在于，在步骤 S3）后还包含通过聚合酶链式反应以及二代测序进行检测的步骤，以确定得到的可生成纤维素膜细菌的基因编辑结果是否准确；

优选地，所述聚合酶链式反应以及测序的方法为通过基因编辑位点上下游引物扩增基因编辑位点序列，并通过测序方法获得基因编辑位点序列；

优选地，步骤 S3）中转入可生成纤维素膜细菌的方法为电转导或化学转导。

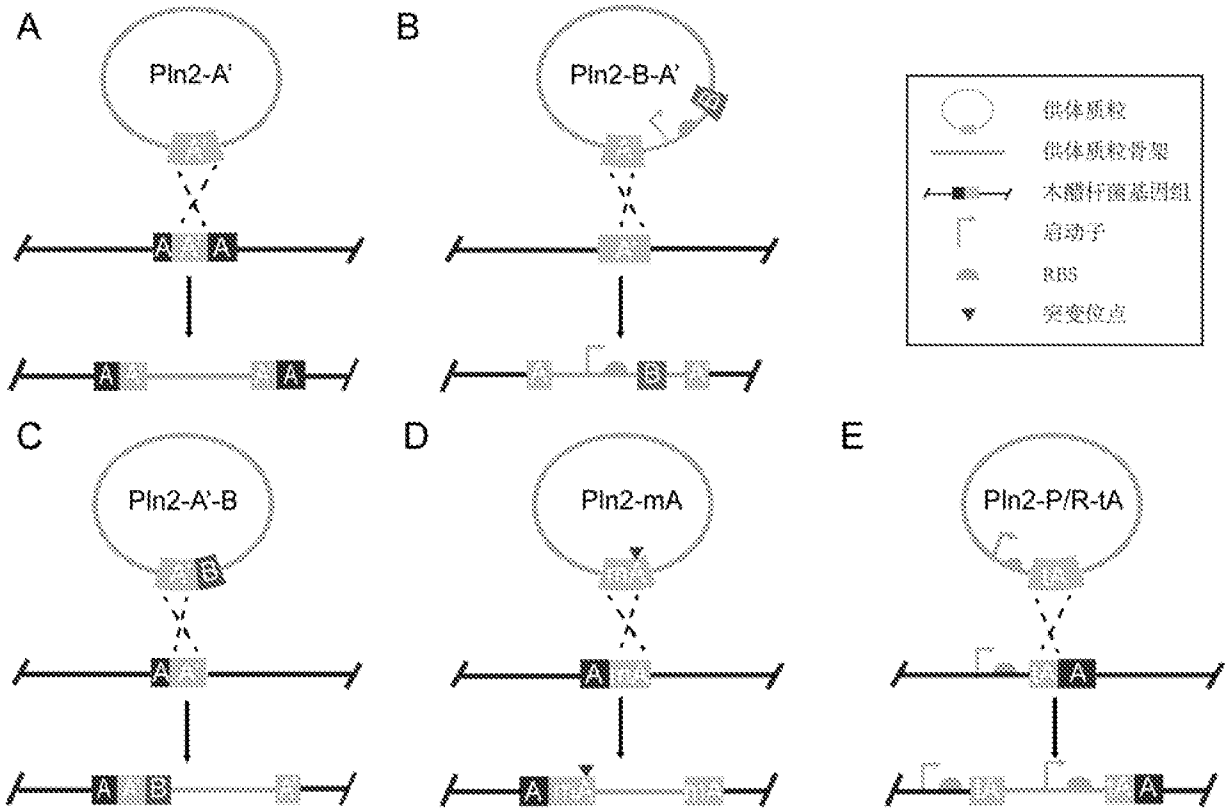
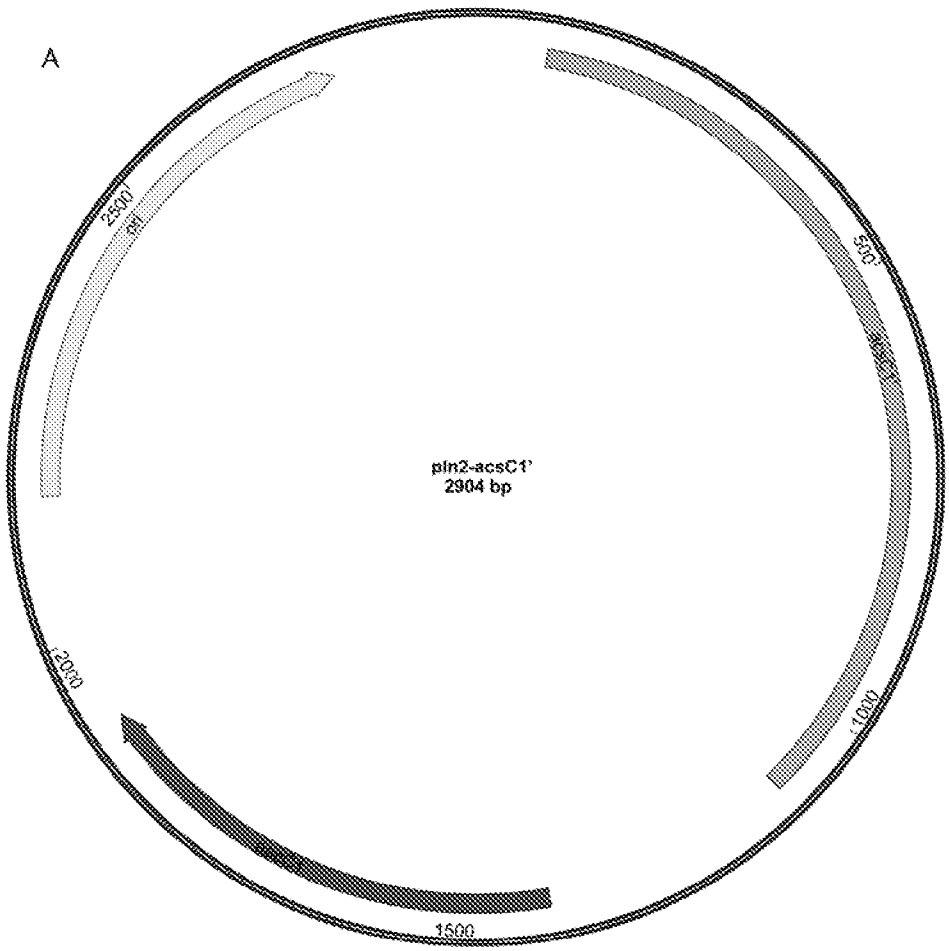

A
Pln2-A'
B
Pln2-B-A'
C
Pln2-A'-B
D
Pln2-mA
E
Pln2-P/R-tA
供体质粒
供体质粒骨架
木糖操作基因组
启动子
RBS
突变位点

图 1


A
pln2-acsC1'
2904 bp
500
1000
1500
2000
2500

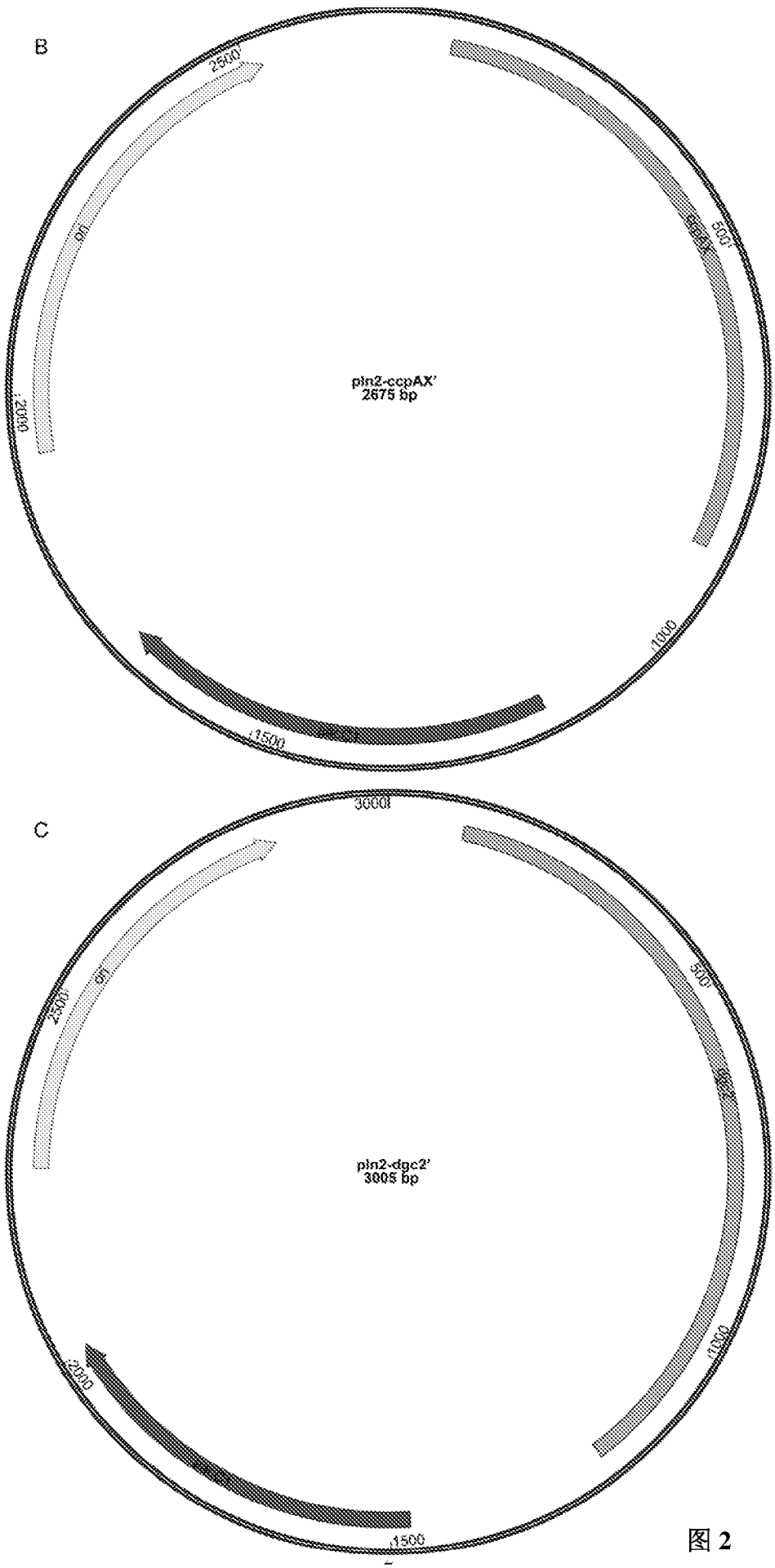

B
2500
500
1000
1500
2000
pln2-ccpAX'
2675 bp
C
3000
500
1000
1500
2000
2500
pln2-dgc2'
3005 bp

图 2

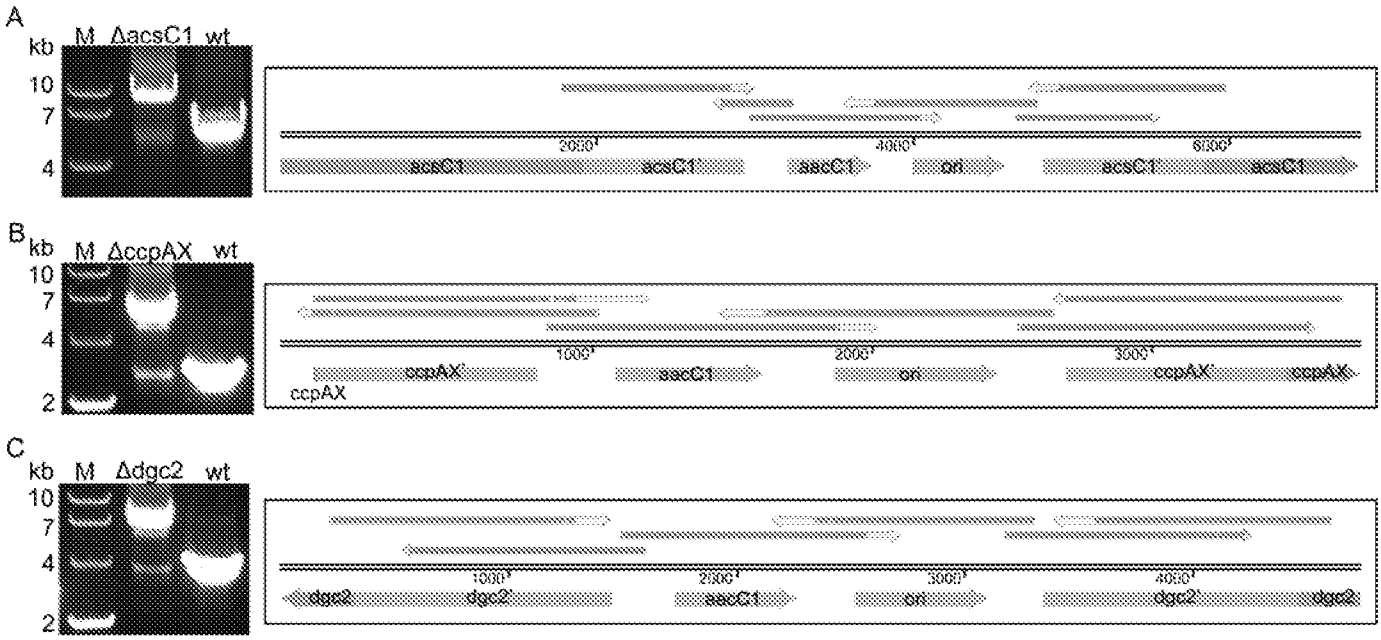

A
kb
M ΔacsC1 wt
10
7
4
2000
4000
6000
acsC1
acsC1
sacC1
ori
acsC1
acsC1
B
kb
M ΔccpAX wt
10
7
4
2
1000
2000
3000
ccpAX
sacC1
ori
ccpAX
ccpAX
ccpAX
C
kb
M Δdgc2 wt
10
7
4
2
1000
2000
3000
4000
dgc2
dgc2
sacC1
ori
dgc2
dgc2

图 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2022/099492**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/74(2006.01)i;C12N15/63(2006.01)i;C12N1/20(2006.01)i;C12R1/02(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N,C12R

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

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

CNABS, CNTXT, DWPI, ENTXT, ENTXTC, OETXT, VEN, WPABS, WPABSC, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 万方数据库, WANFANG: 八叠球菌, 产碱杆菌, 醋杆菌, 大肠杆菌, 电转, 动胶菌, 复制起始位点, 根瘤杆菌, 根瘤菌, 基因编辑, 基因修饰, 假单胞杆菌, 木醋杆菌, 气杆菌, 敲除, 同源, 同源臂, 同源重组, 土壤杆菌, 无色杆菌, 纤维素, 质粒, 重组, 抗性, acebobacter, acetobacter, acetobactor, aerobacter, homology arm, KNOCKOFF, KNOCKOUT, KO, komagataeibacter, Komagataeibacter, pbr322, plasmid, pln2, pMb1, pro1600, r6k, rhizobium, rk2, sarcina, xylium, plasmid?, pln2-acsC1, recombinat +, resistance.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | US 2022081692 A1 (LUCKOW VERNE A.) 17 March 2022 (2022-03-17)<br>see abstract, and claims 1-20 | 1-10 |
| A | CN 107299073 A (NANJING TECH UNIVERSITY) 27 October 2017 (2017-10-27)<br>see abstract, and claims 1-7 | 1-10 |
| Y | US 2005273869 A1 (THE GOV. OF THE USA OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SEC. OF THE DEPT. OF HEALTH & HUMAN SERVICES) 08 December 2005 (2005-12-08)<br>see abstract, claims 1-34, and figure 1 | 1-10 |
| Y | LIU, Lingpu et al. "A Lambda Red and FLP/FRT-Mediated Site-Specific Recombination System in Komagataeibacter xylinus and Its Application to Enhance the Productivity of Bacterial Cellulose"<br>*ACS Synthetic Biology*, Vol. 9, No. 11, 20 November 2020 (2020-11-20),<br>pages 3171-3180, and see abstract, pages 3177-3179 "Materials and Methods" | 1-10 |

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| **09 March 2023** | **15 March 2023** |

| Name and mailing address of the ISA/CN | Authorized officer |
|---|---|
| **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)**<br>**China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** | |
| Facsimile No. **(86-10)62019451** | Telephone No. |

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | 张雯等 (ZHANG, Wen et al.). "醋酸杆菌 Acetobacter xylinum pde基因敲除研究 (Studying on the Pde-gene's Disruption of the Acetobacter Xylinum)" *陕西科技大学学报 (Journal of Shaanxi University of Science & Technology),* Vol. 31, No. 5, 31 October 2013 (2013-10-31), pages 121-125, and see abstract, page 122, right-hand column-page 123, left-hand column | 1-10 |
| A | HALL P. E. et al. "Transformation of Acetobacter xylinum with Plasmid DNA by Electroporation" *PLASMID,* Vol. 28, 31 December 1992 (1992-12-31), pages 194-200, and see abstract | 1-10 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
**Information on patent family members**

International application No.
**PCT/CN2022/099492**

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|---|---|---|---|
| US 2022081692 A1 | 17 March 2022 | None | |
| CN 107299073 A | 27 October 2017 | None | |
| US 2005273869 A1 | 08 December 2005 | US 2010136692 A1 | 03 June 2010 |
| | | US 8541229 B2 | 24 September 2013 |
| | | US 7674621 B2 | 09 March 2010 |
| | | US 2014377809 A1 | 25 December 2014 |
| | | US 9371532 B2 | 21 June 2016 |
| | | US 2013280811 A1 | 24 October 2013 |
| | | US 8859277 B2 | 14 October 2014 |

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/099492

A. 主题的分类

C12N15/74(2006.01)i;C12N15/63(2006.01)i;C12N1/20(2006.01)i;C12R1/02(2006.01)n

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,C12R

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,CNTXT,DWPI,ENTXT,ENTXTC,OETXT,VEN,WPABS,WPABSC, CNKI,WEB OF SCIENCE,PUBMED,万方数据库:八叠球菌,产碱杆菌,醋杆菌,大肠杆菌,电转,动胶菌,复制起始位点,根瘤杆菌,根瘤菌,基因编辑,基因修饰,假单胞杆菌,木醋杆菌,气杆菌,敲除,同源,同源臂,同源重组,土壤杆菌,无色杆菌,纤维素,质粒,重组,抗性，acebobacter,acetobacter,acetobactor,aerobacter,homology arm,KNOCKOFF,KNOCKOUT,KO,komagataeibacter,Komagataeibacter,pbr322,plasmid,pln2,pMb1,pro1600,r6k,rhizobium,rk2,sarcina,xylium,plasmid?,pln2-acsC1,recombinat+,resistance.

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 2022081692 A1 (LUCKOW VERNE A) 2022年3月17日 (2022-03-17)<br>参见摘要，权利要求1-20 | 1-10 |
| A | CN 107299073 A (南京工业大学) 2017年10月27日 (2017-10-27)<br>参见摘要，权利要求1-7 | 1-10 |
| Y | US 2005273869 A1 (GOV OF THE USA OF AMERICA AS R) 2005年12月8日 (2005-12-08)<br>参见摘要，权利要求1-34，说明书附图图1 | 1-10 |
| Y | LIU L.P.等. "A Lambda Red and FLP/FRT-Mediated Site-Specific Recombination System in Komagataeibacter xylinus and Its Application to Enhance the Productivity of Bacterial Cellulose"<br>ACS Synthetic Biology, 第9卷，第11期，2020年11月20日 (2020-11-20)，<br>第3171-3180页，参见摘要，第3177-3179页“材料和方法”部分 | 1-10 |

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“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 | 国际检索报告邮寄日期 |
|---|---|
| 2023年3月9日 | 2023年3月15日 |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451 | 受权官员<br>李肖蕖<br>电话号码 (+86) 010-62411615 |

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/099492

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 |
|---|---|---|
| Y | 张雯等. "醋酸杆菌 Acetobacter xylinum pde基因敲除研究"<br>陕西科技大学学报, 第31卷, 第5期, 2013年10月31日 (2013-10-31),<br>第121-125页，参见摘要，第122页右栏-123页左栏 | 1-10 |
| A | HALL P.E.等. "Transformation of Acetobacter xylinum with Plasmid DNA by Electroporation"<br>PLASMID, 第28卷, 1992年12月31日 (1992-12-31),<br>第194-200页，参见摘要 | 1-10 |

# 国际检索报告
## 关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/099492

| 检索报告引用的专利文件 | | | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | | | 公布日<br>(年/月/日) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| US | 2022081692 | A1 | 2022年3月17日 | 无 | | | |
| CN | 107299073 | A | 2017年10月27日 | 无 | | | |
| US | 2005273869 | A1 | 2005年12月8日 | US | 2010136692 | A1 | 2010年6月3日 |
| | | | | US | 8541229 | B2 | 2013年9月24日 |
| | | | | US | 7674621 | B2 | 2010年3月9日 |
| | | | | US | 2014377809 | A1 | 2014年12月25日 |
| | | | | US | 9371532 | B2 | 2016年6月21日 |
| | | | | US | 2013280811 | A1 | 2013年10月24日 |
| | | | | US | 8859277 | B2 | 2014年10月14日 |