

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年9月29日 (29.09.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/199460 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/113 (2010.01) *C12P 13/06* (2006.01)
C12N 15/77 (2006.01) *C12P 13/12* (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01) *C12P 13/00* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/44* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *C12R 1/15* (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/081527

(22) 国际申请日: 2022年3月17日 (17.03.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110305010.6 2021年3月23日 (23.03.2021) CN

(71) 申请人: 中国科学院天津工业生物技术研究所 (TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。

(72) 发明人: 孙际宾 (SUN, Jibin); 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。刘娇 (LIU, Jiao); 中国天津市空港经济区西七道

32号, Tianjin 300308 (CN)。郑平 (ZHENG, Ping); 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。石拓 (SHI, Tuo); 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。周文娟 (ZHOU, Wenjuan); 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。马延和 (MA, Yanhe); 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。

(74) 代理人: 北京知元同创知识产权代理事务所 (普通合伙) (BEIJING ORIGINTELLIGENCE IP LAW FIRM); 中国北京市海淀区上地三街9号嘉华大厦E座1004室彭劲松, Beijing 100085 (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, IR, IS, 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。

(54) Title: ASPARTATE KINASE GENE EXPRESSION REGULATORY SEQUENCE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种天冬氨酸激酶基因表达调控序列及其应用

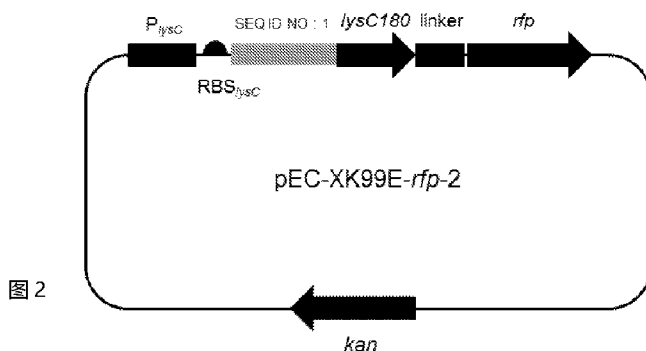


图2

(57) Abstract: Disclosed are an aspartate kinase gene expression regulatory sequence and the use thereof. By modifying positions 366-373 of a sequence represented by SEQ ID NO: 1, a polynucleotide formed by linking the sequence with a start codon GTG or TTG has transcriptional expression regulation activity, and these polynucleotides can improve expression of the aspartate kinase encoding gene *lysC*, such that a large amount of L-lysine is accumulated.

(57) 摘要: 本发明公开了一种天冬氨酸激酶基因的表达调控序列及其应用。通过对SEQ ID NO: 1所示序列的第366位至373位进行改造, 将该序列与起始密码子GTG或TTG连接后形成的多核苷酸, 具有转录表达调控活性, 这些多核苷酸能够增加天冬氨酸激酶编码基因 $lysC$ 的表达, 从而实现L-赖氨酸的大量积累。



WO 2022/199460 A1

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

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

一种天冬氨酸激酶基因表达调控序列及其应用

本发明要求 2021 年 03 月 23 日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为 202110305010.6，发明名称为“一种天冬氨酸激酶基因表达调控序列及其应用”的在先申请的优先权。该件在先申请的全文通过引用的方式结合于本发明中。

技术领域

本发明属于分子生物学和生物工程领域，具体涉及用于调控天冬氨酸激酶基因转录表达的多核苷酸序列，以及利用该多核苷酸序列转录表达天冬氨酸激酶进而生产 L-赖氨酸的方法。

背景技术

L-赖氨酸，简称赖氨酸，为碱性氨基酸，是人类和动物营养中最重要的必需氨基酸，由于谷物食品中的赖氨酸含量甚低，且在加工过程中易被破坏而缺乏，故称为第一限制性氨基酸，被广泛应用于医药、健康、食品、动物饲料等行业中。赖氨酸主要采用微生物发酵法来生产，目前，主要的生产菌株包括大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌等的微生物。

L-赖氨酸的合成途径在许多微生物中都是从天冬氨酸起始的，包括两步和甲硫氨酸和苏氨酸共用的步骤，经过九步的酶催化过程，最终产生 L-赖氨酸。其中，天冬氨酸激酶(Aspartate Kinase，ASK 或 AK，编码基因 *lysC*)是 L-赖氨酸合成途径中天冬氨酸起始的第一个酶，它的活力决定着代谢流流向 L-赖氨酸合成途径的比例，是赖氨酸生产的限速步骤。天冬氨酸激酶的活力在微生物体内受复杂的调控。在许多 L-赖氨酸的生产菌

中,天冬氨酸激酶活力受到终产物 L-赖氨酸的负反馈抑制。目前已报道了大量的解除反馈抑制的天冬氨酸激酶突变体,如 EP2374873A1。而如何进一步提高解除了反馈抑制的天冬氨酸激酶的表达,是微生物高产赖氨酸的必需途径。

发明内容

为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的之一在于提供增强 *lysC* 基因表达调控的多核苷酸序列。本发明的发明人经过大量的工作发现,通过对人工合成的表达调控序列(其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示)的核糖体结合位点(ribosome binding site,以下简称 RBS)和起始密码子之间的间隔区部分序列 TTACTCTA(即 SEQ ID NO: 1 所示多核苷酸序列的第 366 位至 373 位)进行改造,将该序列与起始密码子 GTG 或 TTG 连接后形成的多核苷酸序列具有转录表达调控活性,这些具有转录表达调控活性的多核苷酸序列能够增加天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 的表达,从而实现 L-赖氨酸的大量积累,在此基础上完成了本发明。

本发明的目的之二是提供含有多核苷酸序列的载体,该多核苷酸序列显示改进的启动子活性。

本发明的目的之三是提供含有 *lysC* 基因表达调控序列的宿主细胞。

本发明的目的之四是提供通过发酵宿主细胞产生 L-赖氨酸的方法。

为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

在第一方面,本发明提供一种用于基因表达调控的多核苷酸,所述多核苷酸为:

(1) 在 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 366 位至 373 位进行一个或多个位置的核苷酸的取代和/或缺失,将所示经核苷酸取代和/或缺失后所得的序列与起始密码子 GTG 连接后形成的多核苷酸序列;

或者,

(2) 在 SEQ ID NO : 1 所示序列的第 366 位至 373 位进行一个或多个位置的核苷酸的取代和/或缺失, 将所示经核苷酸取代和/或缺失后所得的序列与起始密码子 TTG 连接形成的多核苷酸序列;

与未改造的 SEQ ID NO : 1 相比, 所述多核苷酸具有增强 *lysC* 基因表达的活性。

优选地, 所述多核苷酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 4 所示。

在第二方面, 本发明提供一种包含上述多核苷酸的载体。

优选地, 所述载体是以 pK18mobsacB 为骨架, 所述 pK18mobsacB 的 GenBank 登记号为 FJ437239.1。

在第三方面, 本发明提供一种用于 *lysC* 基因表达调控的表达盒, 所述表达盒为将上述多核苷酸与无起始密码子的 *lysC* 基因可操作地连接形成的多核苷酸。

优选地, 所述多核苷酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 4 所示。

在第四方面, 本发明提供一种包含上述多核苷酸, 或上述表达盒的宿主细胞。

优选地, 所述多核苷酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 4 所示。

任选地, 所述宿主细胞来源于棒状杆菌属、短杆菌属、节杆菌属、微杆菌属或埃希氏菌属; 优选地, 所述宿主细胞为谷氨酸棒杆菌或大肠杆菌; 更优选地, 所述宿主细胞为谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032、谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 或谷氨酸棒杆菌 ATCC 14067 及其衍生菌株。

在第五方面, 本发明提供一种增强天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 表达的方法, 所述方法为将上述多核苷酸与无起始密码子的 *lysC* 基因可操作地连接。

优选地，所述多核苷酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 4 所示。

优选地，所述可操作地连接为将含有上述多核苷酸的载体导入宿主细胞中，通过同源重组整合到宿主细胞的基因组中。

进一步优选地，所述宿主细胞来源于棒状杆菌属、短杆菌属、节杆菌属、微杆菌属或埃希氏菌属；优选地，所述宿主细胞为谷氨酸棒杆菌或大肠杆菌；更优选地，所述宿主细胞为谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032、谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 或谷氨酸棒杆菌 ATCC 14067。

更进一步优选地，所述宿主细胞是经过如下改良的谷氨酸棒杆菌：1) 谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中的天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 引入了 T311I 突变编码序列；2) 谷氨酸棒杆菌中丙酮酸羧化酶基因 *pyc* 启动子的第 279 位至第 317 位的核心区为 CGGGCCTTGATTGTAAGATAAGACATTTAGTATAATTAG；3) 谷氨酸棒杆菌中二氨基庚二酸脱氢酶基因 *ddh* 启动子的第 279 位至第 317 位的核苷酸由野生型 ATGCATCTC 突变为 CCTTGTTAT。

第六方面，本发明提供第一方面的多核苷酸、第二方面的载体、第三方面的表达盒、第四方面的宿主细胞在制备 L-赖氨酸中的应用。

第七方面，本发明提供了一种生产 L-赖氨酸的方法，所述方法包括培养第四方面的宿主细胞，使之生产 L-赖氨酸的步骤。

任选地，包括从发酵液中分离 L-赖氨酸的步骤。

第八方面，本发明提供第一方面的多核苷酸、第二方面的载体、第三方面的表达盒、第四方面的宿主细胞在制备天冬氨酸家族氨基酸及其衍生物中的应用，所述天冬氨酸家族氨基酸及其衍生物包括 L-苏氨酸、L-异亮氨酸、L-高丝氨酸、L-甲硫氨酸和 L-赖氨酸

下游产物如戊二胺、5-氨基戊酸、戊二酸。

本发明的有益效果

本发明提供了具有增强 *lysC* 基因表达活性的多核苷酸，将其与目标基因 *lysC* 可操作地连接，可以显著提高 *lysC* 的表达强度，进而稳定、高效的生产下游产物。

本发明提供了生产 L-赖氨酸的方法，利用上述具有基因转录表达调控活性的多核苷酸，能够提高天冬氨酸激酶的表达，进而稳定、高效的生产 L-赖氨酸，L-赖氨酸产量可达到起始菌株的 1.9 倍。

附图说明

图 1 示出了 pEC-XK99E-*rfp-1* 质粒图谱；

图 2 示出了 pEC-XK99E-*rfp-2* 质粒图谱。

具体实施方式

下文将结合具体实施例对本发明的技术方案做更进一步的详细说明。应当理解，下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明，而不应被解释为对本发明保护范围的限制。凡基于本发明上述内容所实现的技术均涵盖在本发明旨在保护的范围内。

除非另有说明，以下实施例中使用的原料和试剂均为市售商品，或者可以通过已知方法制备。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

定义与说明：

本发明所用的术语“包含”、“具有”、“包括”或“含有”是指包括在内的或开

放式的，并不排除额外的、未引述的元件或方法步骤。

本发明所用的“约”表示：一个值包括测定该值所使用的装置或方法的误差的标准偏差。

本发明所用的“或”的定义仅为替代物以及“和/或”，但除非明确表示仅为替代物或替代物之间相互排斥外，权利要求中的术语“或”是指“和/或”。

本发明所用的选择/可选/优选的“数值范围”既包括范围两端的数值端点，也包括相对于前述数值端点而言，所述数值端点中间所覆盖的所有自然数。

本发明中的术语“多核苷酸”指由核苷酸组成的聚合物。多核苷酸可以是单独片段的形式，也可以是更大的核苷酸序列结构的一个组成部分，其是从至少在数量或浓度上分离一次的核苷酸序列衍生而来的，能够通过标准分子生物学方法（例如，使用克隆载体）识别、操纵以及恢复序列及其组分核苷酸序列。当一个核苷酸序列通过一个 DNA 序列（即 A、T、G、C）表示时，这也包括一个 RNA 序列（即 A、U、G、C），其中“U”取代“T”。换句话说，“多核苷酸”指从其他核苷酸（单独的片段或整个片段）中去除的核苷酸聚合物，或者可以是一个较大核苷酸结构的组成部分或成分，如表达载体或多顺反子序列。多核苷酸包括 DNA、RNA 和 cDNA 序列。

本发明中的术语“突变”是指在多核苷酸的一个或多个（例如，若干个）位置处包含突变的核苷酸，并且保持多核苷酸的启动子活性。其中，本发明中的突变（包含，取代、插入和/或缺失）特指其中的取代和缺失，取代是指用不同的核苷酸置换占用一个位置的核苷酸。缺失是指去除占据某一位置的核苷酸。

在一些具体的实施方案中，本发明的“突变”包含在 SEQ ID NO：1 所示序列的 RBS 间隔区的部分序列 TTACTCTA（即 SEQ ID NO：1 所示序列的第 366 位至 373 位）进行一个或多个位置的核苷酸的取代和/或缺失 将该序列与起始密码子 GTG 或 TTG 连

接后形成的多核苷酸序列，与未改造的 SEQ ID NO : 1 相比，具有增强 *lysC* 表达的活性。

示例性地，本发明的“突变”包含在 SEQ ID NO : 1 所示序列的第 366 位至 373 位进行 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个位置的取代和/或缺失。本发明的“突变”包含在 SEQ ID NO : 1 所示序列的第 363 位至 373 位进行 6 个核苷酸的缺失，和/或对缺失后的序列进行 0-2 个核苷酸的取代，并与起始密码子 GTG 或 TTG 连接。上述突变后形成的 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 4，与未被取代的 SEQ ID NO : 1 相比，具有更高的基因转录表达调控活性。

本发明中的术语“启动子”是指一种核酸分子，通常位于目的基因编码序列的上游，为 RNA 聚合酶提供识别位点，并位于 mRNA 转录起始位点的 5' 方向的上游。它是不被翻译的核酸序列，RNA 聚合酶与这一核酸序列结合后启动目的基因的转录。在核糖核酸（RNA）的合成中，启动子可以和调控基因转录的转录因子产生相互作用，控制基因表达（转录）的起始时间和表达的程度，包含核心启动子区域和调控区域，就像“开关”，决定基因的活动，继而控制细胞开始生产哪一种蛋白质。

本发明中的术语“RBS 间隔区”是指位于原核生物启动子区的一段核酸序列，是 RBS 与起始密码子之间的一段核苷酸序列。

本发明中的术语“起始密码子”具有本领域技术人员公知的定义，是指蛋白质合成起始位点的密码子，通常包括 ATG、GTG、TTG 和 ATA。示例性的，本发明 SEQ ID NO : 2 和 SEQ ID NO : 3 中包含的起始密码子为 GTG，SEQ ID NO : 4 包含的起始密码子为 TTG。

本发明中的术语“表达”包括涉及 RNA 产生及蛋白产生的任何步骤，包括但不限于：转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

本发明中的术语“转录表达盒”指的包含转录调控元件与目标基因，利用转录调控元件对目标基因的表达进行调控的一类表达元件。在本发明中，转录调控元件包含启动子，在此基础上，还可以包含增强子、沉默子、绝缘子等元件。在本发明中，目标基因具体为蛋白编码基因。

目标基因与多核苷酸“可操作地连接”，是指将具有启动子活性的多核苷酸与目标基因功能性连接，以启动和介导目标基因的转录，所述可操作地连接的方式可以采用本领域技术人员所述的任何方式。示例性的，本发明的目标基因与多核苷酸可操作地连接为将 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 4 与 *lysC* 基因可操作连接后的多核苷酸序列。

本发明中的“*lysC* 基因”指的是谷氨酸棒杆菌来源的天冬氨酸激酶（EC:2.7.2.4）的编码基因，包括但不限于天然存在的谷氨酸棒杆菌来源的 *lysC* 基因、解除了赖氨酸反馈抑制的 *lysC* 基因突变体（如 T311I、D274A、Q298G、N299L、N374A、E382A、R384L 等），以及谷氨酸棒杆菌来源的经过人工改造的仍然具有天冬氨酸激酶活性的 *lysC* 基因突变体。示例性的，本发明的 *lysC* 基因是谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的天冬氨酸激酶编码基因，基因编号为 NCgl0247 或 Cgl0251，NCBI 数据库 Gene ID: 1021294，所编码的蛋白 Protein ID: NP_599504 或 WP_003855724.1。

本发明的“无起始密码子的 *lysC* 基因”是指缺失了起始密码子 GTG 的天冬氨酸激酶（EC:2.7.2.4）的编码基因。

本发明中的术语“载体”指的是 DNA 构建体，其含有与合适的控制序列可操作地连接的 DNA 序列，从而在合适的宿主中表达目的基因。“重组表达载体”指用于表达例如编码所需多肽的多核苷酸的 DNA 结构。重组表达载体可包括，例如包含 i) 对基因表达具有调控作用的遗传元素的集合，例如启动子和增强子；ii) 转录成 mRNA 并翻

译成蛋白质的结构或编码序列；以及 iii) 适当的转录和翻译起始和终止序列的转录亚单位。重组表达载体以任何合适的方式构建。载体的性质并不重要，并可以使用任何载体，包括质粒、病毒、噬菌体和转座子。用于本发明的可能载体包括但不限于染色体、非染色体和合成 DNA 序列，例如细菌质粒、噬菌体 DNA、酵母质粒以及从质粒和噬菌体 DNA 的组合中衍生的载体，来自如牛痘、腺病毒、鸡痘、杆状病毒、SV40 和伪狂犬病等病毒的 DNA。

示例性的，本发明涉及的载体为基于 pEC-XK99E-*rfp* 质粒构建的具有表达调控序列的表征质粒 pEC-XK99E-*rfp*-1 和 pEC-XK99E-*rfp*-2，pEC-XK99E-*rfp*-1 和 pEC-XK99E-*rfp*-2 质粒图谱分别如图 1 和 2 所示。图 1 中 P_{lysC} 表示为 *lysC* 基因的野生型启动子；*lysC*180 表示野生型天冬氨酸激酶 LysC 编码基因 N 端的 180 bp 编码区；linker 表示为位于 *lysC* 基因与 *rfp* 蛋白之间的连接肽；*rfp* 表示为红色荧光蛋白 (Red Fluorescent Protein, RFP)；Kan 表示为卡那霉素抗性 (Kanamycin resistant)。图 2 中 SEQ ID NO:1 表示为 SEQ ID NO:1 所示的启动子；*lysC*180 表示野生型天冬氨酸激酶 LysC 编码基因 N 端的 180 bp 编码区；linker 表示为位于 *lysC* 基因与 *rfp* 蛋白之间的连接肽；*rfp* 表示为红色荧光蛋白 (Red Fluorescent Protein, RFP)；Kan 表示为卡那霉素抗性 (Kanamycin resistant)。pEC-XK99E-*rfp*-1 和 pEC-XK99E-*rfp*-2 转化入合适的宿主之后，可以复制并独立于宿主基因组发挥功能，或者在某些情况下整合入基因组本身。

本发明中的术语“宿主细胞”意指易于用包含本发明的多核苷酸的转录起始元件或表达载体转化、转染、转导等的任何细胞类型。术语“重组宿主细胞”涵盖导入转录起始元件或重组表达载体后不同于亲本细胞的宿主细胞，重组宿主细胞具体通过转化来实现。

本发明中的术语“转化”具有本领域技术人员普遍理解的意思，即将外源性的DNA导入宿主的过程。所述转化的方法包括任何将核酸导入细胞的方法，这些方法包括但不限于电穿孔法、磷酸钙(CaPO₄)沉淀法、氯化钙(CaCl₂)沉淀法、微注射法、聚乙二醇(PEG)法、DEAE-葡聚糖法、阳离子脂质体法以及乙酸锂-DMSO法。

本发明的宿主细胞是原核细胞，只要是能够导入本发明的具有转录表达调控活性的多核苷酸的细胞即可。在一个实施方案中，宿主细胞指来源于适合发酵生产氨基酸的微生物，例如棒状杆菌属、短杆菌属、节杆菌属、微杆菌属或埃希氏菌属。作为优选地，宿主细胞是来源于棒状杆菌属的谷氨酸棒杆菌。其中，谷氨酸棒杆菌可以是谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032、谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 或谷氨酸棒杆菌 ATCC 14067 等及其衍生菌株等。示例地，所述衍生菌株可以是任何菌株，只要该菌株具有生产L-氨基酸的能力。

示例地，宿主细胞为生产赖氨酸的宿主细胞。在一些实施方式中，对于生产赖氨酸的宿主细胞，可以是在谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 基础上表达解除反馈抑制的天冬氨酸激酶的衍生菌株。此外，生产赖氨酸的宿主细胞也可以是具有赖氨酸生产能力的其他种类的菌株。

一些实施方式中，所述生产赖氨酸的宿主细胞中还可以包括但不限于选自以下的一个或多个基因被弱化或表达降低：

- a. 编码乙醇脱氢酶的 adhE 基因；
- b. 编码乙酸激酶的 ackA 基因；
- c. 编码磷酸乙酰转移酶的 pta 基因；
- d. 编码乳酸脱氢酶的 ldhA 基因；
- e. 编码甲酸转运蛋白的 focA 基因；

- f. 编码丙酮酸甲酸裂解酶的 pflB 基因；
- g. 编码丙酮酸氧化酶的 poxB 基因；
- h. 编码天冬氨酸激酶 I/高丝氨酸脱氢酶 I 双功能酶的 thrA 基因；
- i. 编码高丝氨酸激酶的 thrB 基因；
- j. 编码赖氨酸脱羧酶的 ldcC 基因；和
- h. 编码赖氨酸脱羧酶的 cadA 基因。

在一些实施方式中，所述生产赖氨酸宿主细胞中还可以包括但不限于选自以下的一个或多个基因被增强或过表达：

- a. 编码解除赖氨酸反馈抑制的二氢二吡啶合成酶的 dapA 基因；
- b. 编码二氢二吡啶二羧酸还原酶的 dapB 基因；
- c. 编码二氨基庚二酸脱氢酶的 ddh 基因；
- d. 编码四氢吡啶二羧酸琥珀酰酶的 dapD 和编码琥珀酰二氨基庚二酸脱酰酶的 dapE；
- e. 编码天冬氨酸-半醛脱氢酶的 asd 基因；
- f. 编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的 ppc 基因；
- g. 编码烟酰胺腺嘌呤二核苷酸转氢酶的 pntAB 基因；
- i. 编码赖氨酸的运输蛋白 lysE 基因。

示例地，宿主细胞为生产苏氨酸的宿主细胞。在一些实施方式中，生产苏氨酸的宿主细胞为在谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 基础上表达解除反馈抑制的天冬氨酸激酶 LysC 的菌株。在另外一些实施方式中，生产苏氨酸的宿主细胞也可以是具有苏氨酸生产能力的其他种类的菌株。

在一些实施方式中，所述生产苏氨酸的宿主细胞中选自以下的一个或多个基因被增

强或过表达：

- a.编码苏氨酸操纵子的 thrABC 基因；
- b.编码解除反馈抑制的高丝氨酸脱氢酶的 hom 基因；
- c.编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的 gap 基因；
- d.编码丙酮酸羧化酶的 pyc 基因；
- e.编码苹果酸：醌氧化还原酶的 mqo 基因；
- f.编码转酮酶的 tkt 基因；
- g.编码 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的 gnd 基因；
- h.编码苏氨酸输出的 thrE 基因；
- i.编码烯醇酶的 eno 基因。

示例地，宿主细胞为生产异亮氨酸的宿主细胞。在一些实施方式中，生产异亮氨酸的宿主细胞是通过用丙氨酸取代 L-苏氨酸脱水酶 ilvA 基因第 323 位的氨基酸而产生 L-异亮氨酸的菌株。在另外一些实施方式中，生产异亮氨酸的宿主细胞也可以是具有异亮氨酸生产能力的其他种类的菌株。

示例地，宿主细胞为生产 O-乙酰高丝氨酸的宿主细胞。在一些实施方式中，生产 O-乙酰高丝氨酸的宿主细胞是通过使 O-乙酰高丝氨酸(硫醇)-裂解酶失活而产生 O-乙酰高丝氨酸的菌株。在另外一些实施方式中，生产 O-乙酰高丝氨酸的宿主细胞也可以是具有 O-乙酰高丝氨酸生产能力的其他种类的菌株。

示例地，宿主细胞为生产蛋氨酸的宿主细胞。在一些实施方式中，生产蛋氨酸的宿主细胞是通过使甲硫氨酸和半胱氨酸的转录调节因子失活而产生蛋氨酸的菌株。在另外一些实施方式中，生产蛋氨酸的宿主细胞也可以是具有蛋氨酸生产能力的其他种类的菌株。

本发明的宿主细胞的培养可以根据本领域的常规方法进行，包括但不限于孔板培养、摇瓶培养、批次培养、连续培养和分批补料培养等，并可以根据实际情况适当地调整各种培养条件如温度、时间和培养基的 pH 值等。

除非另外定义或由背景清楚指示，否则在本发明中的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

具有增强 *lysC* 基因的表达活性的多核苷酸

本发明通过对 pEC-XK99E-rfp-2 质粒中的 TTACTCTAGTG (下划线为 SEQ ID NO : 1 的第 366 位至 373 位序列，是 RBS 间隔区的部分序列；粗体为 *lysC* 基因的起始密码子) 进行改造，改造为序列 “AGGTG”、“TCGTG”、“TTTTG”，并将含有以上突变的序列与 pEC-XK99E 质粒骨架片段通过诺唯赞的一步重组试剂盒克隆连接，分别获得 pEC-XK99E-rfp-3、pEC-XK99E-rfp-4 和 pEC-XK99E-rfp-5 表征载体。将以上质粒转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 获得 ATCC13032 (pEC-XK99E-rfp-3)、ATCC13032 (pEC-XK99E-rfp-4) 和 ATCC13032 (pEC-XK99E-rfp-5) 菌株。与对照菌株 ATCC13032 (pEC-XK99E-rfp-2) 相比，具有更高的 *lysC* 基因转录表达调控活性。

赖氨酸的生产过程

(1) 本发明中将具有增强 *lysC* 基因表达活性的多核苷酸，与参与合成氨基酸的酶的编码基因可操作的连接，得到能够合成参与合成氨基酸的酶的重组表达载体，利用重组表达载体转化宿主细胞，获得重组宿主细胞。

(2) 对重组宿主细胞进行发酵培养，从重组宿主细胞或重组宿主细胞的培养液中收集赖氨酸，完成赖氨酸的生产过程。

在一些实施方案中，宿主细胞为谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)。在一些具体的实施方案中，重组宿主细胞是经过如下改良的谷氨酸棒杆菌：1) 谷氨酸

棒杆菌 ATCC13032 中的天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 引入了 T311I 突变编码序列；2) 谷氨酸棒杆菌中丙酮酸羧化酶基因 *pyc* 启动子的第 279 位至第 317 位的核心区为 CGGGCCTTGATTGTAAGATAAGACATTTAGTATAATTAG；3) 谷氨酸棒杆菌中二氨基庚二酸脱氢酶基因 *ddh* 启动子的第 279 位至第 317 位的核苷酸由野生型 ATGCATCTC 突变为 CCTTGTTAT；4) 将含有具有转录表达调控活性的多核苷酸 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 4 的重组载体 pK18-1、pK18-2、pK18-3 或 pK18-4 转化上述谷氨酸棒杆菌，获得重组的谷氨酸棒杆菌。以上述方法改造的谷氨酸棒杆菌，是 L-赖氨酸的高产菌株。

与野生型相比，根据本发明所述的宿主细胞在天冬氨酸激酶基因表达上有所改良。因为天冬氨酸激酶是赖氨酸生物合成途径中最重要的酶，所以宿主细胞的发酵引起赖氨酸较高产率的产生。在本发明中，可利用公知方法进行转化体的发酵，并可适当地控制发酵条件，包括温度、时间、pH 等。以下文件提供了发酵的详细描述[Chmiel ; Bioprozesstechnik 1.Einführung in die Bioverfahrenstechnik(Gustav Fischer Verlag , Stuttgart , 1991) , 以及 Storhas ; Bioreaktoren undperiphere Einrichtungen(Vieweg Verlag , Braunschweig /Wiesbaden , 1994)]。发酵可通过分批培养、连续培养或补料分批培养实现。

用于发酵，培养基必须满足所用菌株的需要。适用于培养各种微生物的培养基是本领域公知的(如，来自 American Society forBacteriology(Washington D.C. , USA , 1981) 的 “Manual of Methods forGeneral Bacteriology”)。培养基可包含如碳源糖

(saccharides) 和碳水化合物(carbohydrates)(如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉和纤维素)，脂质和脂肪(如豆油、葵花籽油、花生油和椰子油)，脂肪酸(如

棕榈酸、硬脂酸、蓖麻酸(rinoleic acid), 醇(如甘油和乙醇) 和有机酸(如醋酸)。这些物质可分别使用或组合使用。作为氮源, 含氮有机化合物(如蛋白胨、酵母提取物、肉汤、麦芽汁、玉米浆、豆粕和尿素) 或含氮无机化合物(如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵)可分别使用或组合使用。用于培养基的磷源的实例包括磷酸氢二钾、磷酸二氢钾和相应的钠盐。

另外, 培养基可包含细胞生长必需的金属盐(如硫酸镁或硫酸铁), 并可补充必需营养物质如氨基酸和维生素以刺激生长。此外, 可向培养基添加适当的前体。可一次一起或在发酵过程中分别添加营养物和添加剂。

培养基的 pH 可用碱性化合物(如氢氧化钠、氢氧化钾或氨水) 或酸性化合物(如磷酸或硫酸) 调节。培养基中泡沫的生成可用消泡剂如聚乙二醇脂肪酸酯抑制。可通过在其中引入氧气或含氧气体混合物将培养基保持在有氧条件下。对于培养温度, 通常在 20°C到 45°C之间, 优选地在 25°C到 40°C之间。发酵连续进行直到产生 L-赖氨酸的最大量。在这方面, 可在 10 到 160 小时内完成。L-赖氨酸产生后, L-赖氨酸可输出至培养基或可保持在细胞内。

在一些具体的实施方案中, 重组宿主细胞的培养条件为: 首先将菌株接种到 TSB 液体培养基中培养 8 h, 培养物作为种子接种到每孔含有 800 μ l 发酵培养基的 24 孔板中, 初始 OD₆₀₀ 控制约为 0.1, 30°C培养 19 h, 孔板摇床转速为 800 rpm。

对于 TSB 液体培养基, 成分为: 葡萄糖, 5 g/L; 酵母粉, 5 g/L; 大豆蛋白胨, 9 g/L; 尿素, 3 g/L; 丁二酸, 0.5 g/L; K₂HPO₄•3H₂O, 1 g/L; MgSO₄•7H₂O, 0.1 g/L; 生物素, 0.01 mg/L; 维生素 B1, 0.1 mg/L; MOPS, 20 g/L。

对于发酵培养基, 成份为: 葡萄糖, 80 g/L; 酵母粉, 1 g/L; 大豆蛋白胨, 1 g/L; NaCl, 1 g/L; 硫酸铵, 1 g/L; 尿素, 8 g/L; K₂HPO₄•3H₂O, 1 g/L; MgSO₄•7H₂O,

0.45 g/L ; FeSO₄·7H₂O , 0.05 g/L ; 生物素 , 0.4 mg/L ; 维生素 B1 , 0.1 mg/L ; MOPS , 40 g/L ; 初始 pH7.2。

在一些具体的实施方案中,对于重组宿主细胞或重组细胞的培养液回收氨基酸,可通过本领域常用方法,包括但不限于:过滤、阴离子交换色谱、结晶和 HPLC。

实施例 1. 人工合成表达调控序列增强谷氨酸棒杆菌 *lysC* 基因的表达

在细菌中,基因的表达调控序列及 N 端编码区是影响基因表达的关键区域。本发明采用基因的表达调控区、基因 N 端的 180 bp 编码区、一个柔性 linker 和一个红色荧光蛋白基因 *rfp* 顺序连接的方法,基于荧光强度对 *lysC* 基因的表达调控序列进行表达强度表征。

本实施例首先构建 1 个表征谷氨酸棒杆菌 *lysC* 基因自身表达调控序列表达的表达式强度的载体。具体构建如下:在 pEC-XK99E 质粒骨架基础上,由 *lysC* 基因自身启动子和 RBS 表达 *lysC* 基因 N 端 60 个氨基酸、一个连接肽和红色荧光蛋白基因。根据已公开的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组序列 (Gene ID: 2830649) 及 *lysC* 基因注释信息,设计引物 *lysC*-F/R,以 ATCC13032 基因组为模板,通过 PCR 扩增获得 *lysC* 基因启动子、RBS 和 N 端 180 bp 的 DNA 片段。以文献报道的 pEC-XK99E-*rfp* (王迎春等,基于时间序列转录组筛选谷氨酸棒杆菌内源高效组成型启动子[J]. 生物工程学报, 2018, 34(11):1760~1771) 质粒为模板,以 pEC-1/2 引物,扩增 pEC-XK99E 质粒骨架、连接肽(DNA 序列为 :GGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGGTCCGGCGGTGGCTCT) 和红色荧光蛋白基因的 DNA 片段。以上两个片段通过诺唯赞的一步重组试剂盒克隆连接,获得 pEC-XK99E-*rfp*-1 表征载体,质粒图谱如图 1 所示。

为了增强 *lysC* 基因的表达强度,本实施例人工合成了 SEQ ID NO : 1 所示的表达

调控序列，并将其插入 *lysC* 基因上游。为表征插入人工合成表达调控序列增强表达强度的效果，在 pEC-XK99E-*rfp*-1 表征载体基础上进一步构建表征载体。具体构建如下：以 DNA 合成公司合成的核苷酸序列如 SEQ ID NO : 1 所示的表达调控序列为模板，以 *pyc*-F/R 为引物扩增带有 20 bp 同源臂的人工序列。以 pEC-XK99E-*rfp*-1 质粒为模板，以 pEC-3/4 引物，扩增质粒骨架。以上两个片段通过诺唯赞的一步重组试剂盒克隆连接，获得 pEC-XK99E-*rfp*-2 表征载体，质粒图谱如图 2 所示。本实施例所用引物序列如表 1 所示。

表 1

引物	核苷酸序列	SEQ ID NO.
<i>lysC</i> -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCGATTCAGGGTAGTTGA CTAAAGAGTTG	SEQ ID NO : 5
<i>lysC</i> -R	AACGGGATTCACTGCCGCTG	SEQ ID NO : 6
pEC-1	CAGCGGCAGTGAATCCCGTTGGCGGTGGCTCTGG AGGTGGTGGGTCCGGCGGTGGCTCTGCTTCCTCCG AAGACGTTATCAAAG	SEQ ID NO : 7
pEC-2	GGAGAAAATACCGCATCAGGC	SEQ ID NO : 8
<i>pyc</i> -F	GATCGAAAGGTGCACAAAGGGAAAACCCAGGATT GCTTTGTG	SEQ ID NO : 9
<i>pyc</i> -R	TTCTGTACGACCAGGGCCACTAGAGTAATTATTCCT TTCAACAAGAG	SEQ ID NO :10
pEC-3	GTGGCCCTGGTCGTACAGAAATATG	SEQ ID NO :11
pEC-4	CCTTTGTGCACCTTTCGATCTAG	SEQ ID NO :12

为表征插入人工合成表达调控序列 (SEQ ID NO : 1) 增强表达的强度, 将构建的 pEC-XK99E-*rfp-1* 和 pEC-XK99E-*rfp-2* 分别转化至谷氨酸棒杆菌 ATCC13032, 获得 ATCC13032 (pEC-XK99E-*rfp-1*) 和 ATCC13032 (pEC-XK99E-*rfp-2*) 菌株。采用 96 孔板培养表征人工合成表达调控序列 (SEQ ID NO : 1) 表达 *lysC* 的强度。TSB 液体培养基成份为(g/L): 葡萄糖, 5 g/L; 酵母粉, 5 g/L; 大豆蛋白胨, 9 g/L; 尿素, 3 g/L; 丁二酸, 0.5 g/L; K₂HPO₄·3H₂O, 1 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/L; 生物素, 0.01 mg/L; 维生素 B1, 0.1 mg/L; MOPS, 20 g/L。TSB 固体培养基再补充 15 g/L 琼脂粉。将 TSB 平板获得的菌株用牙签接种至每孔含有 200 μl TSB 液体培养基的 96 孔板中, 每个菌株 3 个平行, 孔板摇床转速为 800 rpm, 30°C 培养 24 h 后采用酶标仪检测菌株的荧光强度(激发波长: 560 nm, 发射波长: 607 nm)。测定结果如表 2 所示, 插入人工合成表达调控序列 (SEQ ID NO : 1) 荧光强度提高了 4.8 倍, 说明插入以上人工表达调控序列可以增强 *lysC* 基因的表达强度。

表 2

菌株	荧光强度 (RFU/OD ₆₀₀)
ATCC13032 (pEC-XK99E- <i>rfp-1</i>)	277±3
ATCC13032 (pEC-XK99E- <i>rfp-2</i>)	1613±38

实施例 2. 人工合成表达调控序列及 *lysC* 基因起始密码子改造进一步增强 *lysC* 基因的表达强度

RBS 间隔区碱基序列和起始密码子的改造可用于进一步增强表达强度, 本实施例对 pEC-XK99E-*rfp-2* 质粒中的 TTACTCTAGTG (下划线为 SEQ ID NO : 1 的第 366 位至

373 位序列，是 RBS 间隔区的部分序列；粗体为 *lysC* 基因的起始密码子）进行改造，改造为序列 “AG**GTG**”、“TC**GTG**”、“TT**TTG**”，改造后获得的具有表达调控活性的多核苷酸序列分别如序列 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3、和 SEQ ID NO : 4 所示。具体构建如下：以 pEC-XK99E-*rfp*-2 质粒为模板，以 RBS1/ pEC-5、RBS2/ pEC-5、RBS3/ pEC-5 为引物，分别扩增包括 3 种改造区的 3 个片段。以 pEC-XK99E-*rfp*-2 质粒为模板，以 pEC-6/7 为引物，扩增质粒骨架。以上 3 个包括改造区的片段分别与质粒骨架片段通过诺唯赞的一步重组试剂盒克隆连接，分别获得 pEC-XK99E-*rfp*-3、pEC-XK99E-*rfp*-4 和 pEC-XK99E-*rfp*-5 表征载体。本实施例所用引物序列如表 3 所示。

表 3

引物	核苷酸序列	SEQ ID NO.
RBS-1	CGGTCTCTTGTTGAAAGGAATAAAG GTG GCCCTG GTCGTACAGAAATATG	SEQ ID NO : 13
RBS-2	CGGTCTCTTGTTGAAAGGAATAATC GTG GCCCTG GTCGTACAGAAATATG	SEQ ID NO : 14
RBS-3	CGGTCTCTTGTTGAAAGGAATAAT TTT GCCCTGG TCGTACAGAAATATG	SEQ ID NO : 15
pEC-5	AACCTTCCATACGAACTTTGAAACG	SEQ ID NO : 16
pEC-6	CAAAGTTCGTATGGAAGGTTCCG	SEQ ID NO : 17
pEC-7	TTCCTTTCAACAAGAGACCGCC	SEQ ID NO : 18

为表征 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3、和 SEQ ID NO : 4 增强表达的强度，将 pEC-XK99E-*rfp*-3、pEC-XK99E-*rfp*-4 和 pEC-XK99E-*rfp*-5 质粒分别转化至谷氨酸棒杆菌 ATCC13032，获得 ATCC13032 (pEC-XK99E-*rfp*-3)、ATCC13032

(pEC-XK99E-*rfp-4*) 和 ATCC13032 (pEC-XK99E-*rfp-5*) 菌株。以上菌株及对照菌株 ATCC13032 (pEC-XK99E-*rfp-2*) 再次采用实施例 1 相同策略测定荧光强度。结果如表 4 所示 , ATCC13032 (pEC-XK99E-*rfp-3*) 、 ATCC13032 (pEC-XK99E-*rfp-4*) 和 ATCC13032 (pEC-XK99E-*rfp-5*) 菌株的荧光强度分别比对照提高了 1.3 倍、2.7 倍、5.0 倍 , 表明起始密码子及上游 RBS 间隔区序列改造可以进一步增强 *lysC* 基因的表达。

表 4

菌株	荧光强度 (RFU/OD ₆₀₀)
ATCC13032 (pEC-XK99E- <i>rfp-2</i>)	1711±66
ATCC13032 (pEC-XK99E- <i>rfp-3</i>)	3928±963
ATCC13032 (pEC-XK99E- <i>rfp-4</i>)	6280±1324
ATCC13032 (pEC-XK99E- <i>rfp-5</i>)	8509±144

实施例 3. 改造后的表达调控序列应用于 L-赖氨酸生产

(1) 谷氨酸棒杆菌 *lysC* 基因表达调控序列改造的重组载体构建

根据实施例 1 和 2 表征的表达强度 , 分别将 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3、和 SEQ ID NO : 4 按照前面相同方式插入谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组上 *lysC* 基因上游 , 以增强 *lysC* 基因的表达。根据已报道的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组序列 , 分别以 ATCC13032 基因组为模板 , 以 *lysC*-UF / *lysC*-UR 为引物 , PCR 扩增部分上游同源臂 ; 分别以 pEC-XK99E-*rfp-3*、pEC-XK99E-*rfp-4* 和 pEC-XK99E-*rfp-5* 质粒为模板 , 以 *Pyc*-RBS1/*Pyc*-RBS2 为引物 , 分别扩增对应的表达调控序列和部分上下游同源臂 ; 以 *lysC*-DF / *lysC*-DR 为引物 , PCR 扩增另一部分下游同源臂 ; 以 pK18-1F/2R

引物扩增 pK18mobsacB(GenBank: FJ437239.1)的骨架。上述 4 种 PCR 片段回收后，通过诺唯赞的一步重组试剂盒克隆连接，分别获得 *lysC* 基因表达调控序列改造的重组载体 pK18-2、pK18-3 和 pK18-4。以上所用引物序列如表 5 所示。

表 5

引物	核苷酸序列	SEQ ID NO.
<i>lysC</i> -UF	CAGGAAACAGCTATGACATGCGTCACAA GACCAAGGATG	SEQ ID NO : 19
<i>lysC</i> -UR	AAGTGCAAAGCAATCTGCTC	SEQ ID NO : 20
<i>Pyc</i> -RBS1	GAGCAGATTGCTTTGCACTTGATTCAGGG TAGTTGACTAAAGAG	SEQ ID NO : 21
<i>Pyc</i> -RBS2	AACGGGATTCCTGCGC	SEQ ID NO : 22
<i>lysC</i> -DF	GCGGCAGTGAATCCCGTTCCGCCAGCTCG TGAAAT	SEQ ID NO : 23
<i>lysC</i> -DR	GTAAAACGACGGCCAGTGCGGAGCCAAC AGCAGCAAG	SEQ ID NO : 24
pK18-1F	GCACTGGCCGTCGTTTTAC	SEQ ID NO : 25
pK18-2R	CATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG	SEQ ID NO : 26

(2) 将 *lysC* 基因表达调控序列改造的重组载体引入谷氨酸棒杆菌赖氨酸生产菌

为了验证 *lysC* 基因表达序列改造对 L-赖氨酸生产的影响，本发明首先构建一个可以生产 L-赖氨酸的基础菌株 SCgL40。谷氨酸棒杆菌 L-赖氨酸生产菌 SCgL40 的遗传改造包括：将谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 天冬氨酸激酶基因 *lysC* 引入了 T3111(碱基由 AC

C 突变为 ATC)氨基酸突变,丙酮酸羧化酶基因 *pyc* 启动子的第 279 位至第 317 位的核苷酸由野生型 CGATGTTTGATTGGGGGAATCGGGGGTTACGATACTAGG 突变为 CGG GCCTTGATTGTAAGATAAGACATTTAGTATAATTAG,二氨基庚二酸脱氢酶基因 *ddh* 启动子的第 279 位至第 317 位的核苷酸由野生型 ATGCATCTC 突变为 CCTTGTTAT。为了进一步引入 *lysC* 基因表达调控序列改造,将上述(1)构建的重组载体 pK18-2、pK18-3 和 pK18-4 分别转化谷氨酸棒杆菌赖氨酸生产菌 SCgL40,涂布含有 5 g/L 葡萄糖和 25 μg/mL 卡那霉素的 LBHIS 固体培养基上,30°C 培养获得第一次重组的转化子。正确的一次重组转化子分别接种含有 5 g/L 葡萄糖的 LB 培养基,过夜培养,分别稀释涂布添加 100 g/L 蔗糖的 LB 固体培养基平板,通过抗性平板和无抗性平板同时点板培养对获得的克隆进行卡那霉素敏感性筛选。对卡那霉素敏感的克隆分别采用引物 *lysC*-C1(序列:CCCAGTTCAAGATGAGTCCC)和 *lysC*-C2(序列:CCGGGATCATTACTATAAGACG)进行 PCR 扩增及测序,测序正确的克隆即为获得的 *lysC* 基因表达序列改造后的菌株 SCgL42、SCgL43 和 SCgL44。

(3) 谷氨酸棒杆菌赖氨酸生产菌 *lysC* 基因表达元件改造突变体的 L-赖氨酸生产能力评价

为了测试谷氨酸棒杆菌中 *lysC* 基因表达元件改造对菌株产 L-赖氨酸的影响,分别对 SCgL40、SCgL42、SCgL43 和 SCgL44 菌株进行发酵测试,发酵培养基成份为:葡萄糖,80 g/L;酵母粉,1 g/L;大豆蛋白胨,1 g/L;NaCl,1 g/L;硫酸铵,1 g/L;尿素,8 g/L;K₂HPO₄·3H₂O,1 g/L;MgSO₄·7H₂O,0.45 g/L;FeSO₄·7H₂O,0.05 g/L;生物素,0.4 mg/L;维生素 B1,0.1 mg/L;MOPS,40 g/L;初始 pH7.2。首先将菌株接种到 TSB 液体培养基中培养 8 h,培养物作为种子接种到每孔含有 800 μl 发酵培养基的 24 孔板中,初始 OD₆₀₀ 控制约为 0.1,30°C 培养 19 h,孔板摇床转速为

800 rpm，每个菌株 3 个平行，发酵结束后检测 L-赖氨酸产量和葡萄糖消耗量，并计算从葡萄糖到 L-赖氨酸的糖酸转化率。结果如表 6 所示，*lysC* 基因表达元件改造后菌株的赖氨酸产量和糖酸转化率均有提高，SCgL42 菌株产量提高达 89%。以上结果表明增强 *lysC* 基因表达强度的表达序列可应用于 L-赖氨酸生产。

表 6

菌株	OD ₆₀₀	L-赖氨酸产量 (g/L)	转化率 (%)
SCgL40	15.7±0.4	3.7±0.3	6.9±0.5
SCgL42	15.9±0.7	7.0±1.0	14.0±2.0
SCgL43	17.3±0.3	5.0±0.0	8.9±0.2
SCgL44	10.9±0.3	4.7±0.6	14.1±1.0

由于天冬氨酸下游产物的合成均依赖于天冬氨酸激酶 LysC 催化的反应步骤，通过本发明公开的 *lysC* 基因表达增强的方法也可以用于提高依赖 LysC 催化反应的下游产物的产量。因此，本发明提供的技术方案也可用于 L-苏氨酸、L-异亮氨酸、L-高丝氨酸、L-甲硫氨酸和 L-赖氨酸下游产物如戊二胺、5-氨基戊酸、戊二酸等的生产。

以上，对本发明的实施方式进行了说明。但是，本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求

1. 一种用于天冬氨酸激酶基因 *lysC* 表达调控的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸的多核苷酸序列为：

(1) 在 SEQ ID NO : 1 所示序列的第 366 位至 373 位进行一个或多个位置的核苷酸的取代和/或缺失，将所示经核苷酸取代和/或缺失后所得的序列与起始密码子 GTG 连接形成的多核苷酸序列。

或者，

(2) 在 SEQ ID NO : 1 所示序列的第 366 位至 373 位进行一个或多个位置的核苷酸的取代和/或缺失，将所示经核苷酸取代和/或缺失后所得的序列与起始密码子 TTG 连接形成的多核苷酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的多核苷酸序列，其特征在于，所述多核苷酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 4 所示。

3. 一种包含权利要求 1 或 2 所述多核苷酸的载体。

4. 根据权利要求 3 所述的载体，其特征在于，所述载体是以 pK18mobsacB 为骨架，所述 pK18mobsacB 的 GenBank 登记号为 FJ437239.1。

5. 一种用于天冬氨酸激酶基因 *lysC* 表达调控的表达盒，其特征在于，所述表达盒为将权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸与无起始密码子的天冬氨酸激酶基因 *lysC* 可操作地连接形成的多核苷酸。

6. 一种包含权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸或权利要求 5 所述的表达盒的宿主细胞。

7. 根据权利要求 6 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞来源于棒状杆菌

属、短杆菌属、节杆菌属、微杆菌属或埃希氏菌属任一种。

8. 根据权利要求 7 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞为谷氨酸棒杆菌或大肠杆菌。

9. 根据权利要求 8 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞为谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032、谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 或谷氨酸棒杆菌 ATCC 14067 及其衍生菌株。

10. 根据权利要求 9 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞是经过如下改良的谷氨酸棒杆菌：1) 谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 中的天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 引入了 T311I 突变编码序列；2) 谷氨酸棒杆菌中丙酮酸羧化酶基因 *pyc* 启动子的第 279 位至第 317 位的核心区由野生型 CGATGTTTGATTGGGGGAATCGGGGGTTACGATACTAGG 突变为 CGGGCCTTGATTGTAAGATAAGACATTTAGTATAATTAG；3) 谷氨酸棒杆菌中二氨基庚二酸脱氢酶基因 *ddh* 启动子的第 279 位至第 317 位的核苷酸序列由野生型 ATGCATCTC 突变为 CCTTGTTAT。

11. 一种增强天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 表达的方法，其特征在于，所述方法为将权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸与无起始密码子的 *lysC* 基因可操作地连接。

12. 根据权利要求 11 所述的增强天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 表达的方法，其特征在于，所述可操作地连接为将含有上述多核苷酸的载体导入宿主细胞中，通过同源重组整合到宿主细胞的基因组中。

13. 根据权利要求 12 所述的增强天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 表达的方法，其特征在于，所述宿主细胞来源于棒状杆菌属、短杆菌属、节杆菌属、微杆菌属或埃希氏菌属。

14. 根据权利要求 13 所述的增强天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 表达的方法，其特征在于，所述宿主细胞为谷氨酸棒杆菌或大肠杆菌。

15. 根据权利要求 14 所述的增强天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 表达的方法,其特征
在于,所述宿主细胞为谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032、谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 或谷氨
酸棒杆菌 ATCC 14067 及其衍生菌株。

16. 根据权利要求 15 所述的增强天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 表达的方法,其特征
在于,所述宿主细胞是经过如下改良的谷氨酸棒杆菌:1) 谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032
中的天冬氨酸激酶编码基因 *lysC* 引入了 T311I 突变编码序列;2) 谷氨酸棒杆菌中丙酮
酸羧化酶基因 *pyc* 启动子的第 279 位至第 317 位的核心区由野生型 CGATGTTTGATT
GGGGGAATCGGGGGTTACGATACTAGG 突变为 CGGGCCTTGATTGTAAGATAAGAC
ATTTAGTATAATTAG;3) 谷氨酸棒杆菌中二氨基庚二酸脱氢酶基因 *ddh* 启动子的第 2
79 位至第 317 位的核苷酸序列由野生型 ATGCATCTC 突变为 CCTTGTTAT。

17. 权利要求 1-2 所述的多核苷酸序列、权利要求 3 或 4 所述的载体、权利要求 5
所述的表达盒、权利要求 6-10 任一项所述的宿主细胞在制备 L-赖氨酸中的应用。

18. 一种生产 L-赖氨酸的方法,所述方法包括培养权利要求 6-10 任一项所述的宿
主细胞,使之生产 L-赖氨酸,从发酵液中分离 L-赖氨酸。

19. 权利要求 1-2 所述的多核苷酸、权利要求 3 或 4 所述的载体、权利要求 5 所述
的表达盒、权利要求 6-10 任一项所述的宿主细胞在制备天冬氨酸家族氨基酸及其衍生
物中的应用。

20. 根据权利要求 19 所述的应用,其特征在于,所述天冬氨酸家族氨基酸及其衍
生物为 L-苏氨酸、L-异亮氨酸、L-高丝氨酸、L-甲硫氨酸和 L-赖氨酸下游产物,所述
L-赖氨酸下游产物为戊二胺、5-氨基戊酸、戊二酸。

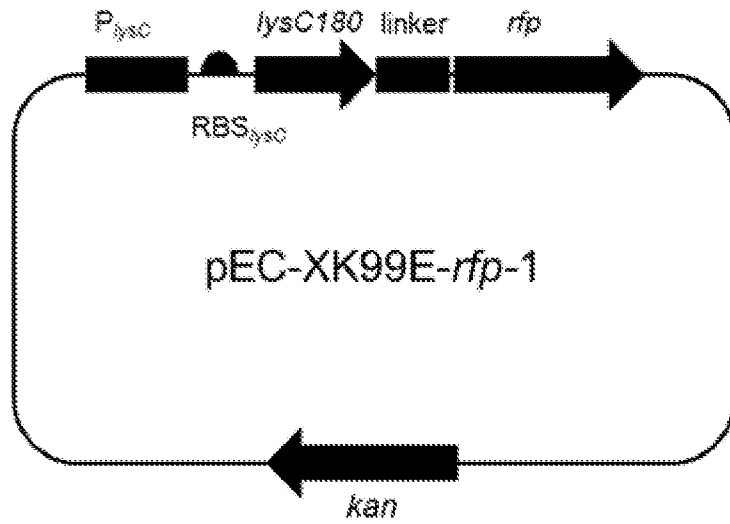


图 1

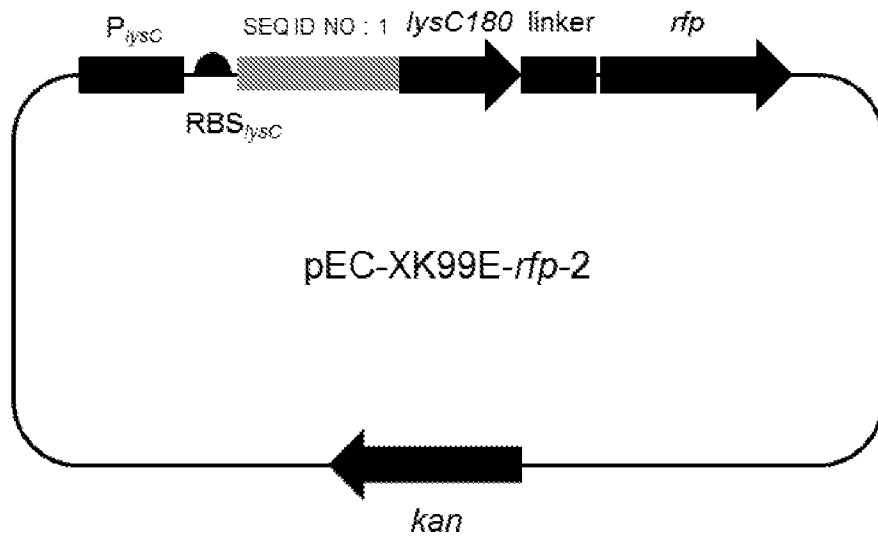


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/081527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/77(2006.01)i; C12N 15/67(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; C12P 13/08(2006.01)i; C12P 13/06(2006.01)i; C12P 13/12(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i; C12P 7/44(2006.01)i; C12R 1/15(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, C12P, C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方, WANFANG 百度学术, BAIDU SCHOLAR, ISI Web of Science, PubMed, Elsevier Science, GenBank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, STN: 谷氨酸棒杆菌, <i>Corynebacterium glutamicum</i> , ATCC 13032, 天冬氨酸激酶, aspartokinase, aspartate kinase, aspartic acid kinase, ASK, AK, lysC, 启动子, promoter, 366-373, RBS, 修饰, 突变, modified, mutant, 起始密码子, initiation codon, starting codon, GTG, TTG, 赖氨酸, lysine, 对SEQ ID NOs: 1-4进行序列检索, sequence search for SEQ ID NOs: 1-4.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112695036 A (TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 23 April 2021 (2021-04-23) see claims 1-19	1-20
A	CN 110951662 A (XINJIANG MEIHUA AMINO ACID CO., LTD.) 03 April 2020 (2020-04-03) see claims 1-10	1-20
A	Becker, J. et al. "From zero to hero—Design-based systems metabolic engineering of <i>Corynebacterium glutamicum</i> for L-lysine production" <i>Metabolic Engineering</i> , Vol. 13, No. 2, 15 January 2011 (2011-01-15), ISSN: 1096-7176, see the abstract, and table 1	1-20
A	CN 105849249 A (CJ CHEILJEDANG CORP.) 10 August 2016 (2016-08-10) see description, paragraph 14	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 01 June 2022		Date of mailing of the international search report 23 June 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/081527

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017100376 A3 (ZYMERGEN INC.) 03 August 2017 (2017-08-03) see claims 1-19	1-20
A	CN 1289368 A (AJINOMOTO CO., INC.) 28 March 2001 (2001-03-28) see claims 1-17	1-20
A	王迎春 等 (WANG, Yingchun et al.). "基于时间序列转录组筛选谷氨酸棒杆菌内源高效组成型启动子 (Screening Efficient Constitutive Promoters in <i>Corynebacterium Glutamicum</i> based on Time-Series Transcriptome Analysis)" <i>生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)</i> , Vol. 34, No. 11, 25 November 2018 (2018-11-25), see abstract	1-20

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/081527

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112695036	A	23 April 2021	None			
CN	110951662	A	03 April 2020	None			
CN	105849249	A	10 August 2016	US	2016251687	A1	01 September 2016
				RU	2016114418	A	06 December 2017
				MY	181203	A	21 December 2020
				KR	101498630	B1	04 March 2015
				WO	2015064917	A1	07 May 2015
				EP	3064569	A1	07 September 2016
				JP	2016533771	A	04 November 2016
WO	2017100376	A3	03 August 2017	WO	2017100376	A2	15 June 2017
				KR	20180084756	A	25 July 2018
				CA	3007635	A1	15 June 2017
				US	2018362991	A1	20 December 2018
				JP	2018530991	A	25 October 2018
				BR	112018011503	A2	04 December 2018
CN	1289368	A	28 March 2001	KR	20010032426	A	16 April 2001
				RU	2214456	C2	20 October 2003
				BR	9909409	A	21 November 2000
				HU	225541	B1	28 March 2007
				BR	9917880	B1	18 February 2014
				MY	130756	A	31 July 2007
				DE	69941594	D1	10 December 2009
				WO	0018935	A1	06 April 2000
				US	2004002143	A1	01 January 2004
				HU	0100045	A2	28 May 2001
				SK	7702000	A3	09 October 2000
				AT	447039	T	15 November 2009
				TW	200504213	A	01 February 2005
				JP	0018935	A1	18 December 2001
				ID	25513	A	05 October 2000
				ES	2335828	T3	05 April 2010
				US	2006003424	A1	05 January 2006
				EP	1033407	A1	06 September 2000
				TW	I247805	B	21 January 2006
				PE	20001111	A1	31 October 2000
				TW	200504215	A	01 February 2005
				TW	200504214	A	01 February 2005

A. 主题的分类 C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/77(2006.01)i; C12N 15/67(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; C12P 13/08(2006.01)i; C12P 13/06(2006.01)i; C12P 13/12(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i; C12P 7/44(2006.01)i; C12R 1/15(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, C12P, 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)) 数据库: CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方, 百度学术, ISI Web of Science, PubMed, Elsevier Science, GenBank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统, STN; 检索词: 谷氨酸棒杆菌, <i>Corynebacterium glutamicum</i> , ATCC 13032, 天冬氨酸激酶, aspartokinase, aspartate kinase, aspartic acid kinase, ASK, AK, lysC, 启动子, promoter, 366-373, RBS, 修饰, 突变, modified, mutant, 起始密码子, initiation condon, starting condon, GTG, TTG, 赖氨酸, lysine, 对SEQ ID N0s:1-4进行序列检索。		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 112695036 A (中国科学院天津工业生物技术研究所) 2021年4月23日 (2021 - 04 - 23) 参见权利要求1-19	1-20
A	CN 110951662 A (新疆梅花氨基酸有限责任公司) 2020年4月3日 (2020 - 04 - 03) 参见权利要求1-10	1-20
A	J Becker等. "From zero to hero—Design-based systems metabolic engineering of <i>Corynebacterium glutamicum</i> for L-lysine production" <i>Metabolic Engineering</i> , 第13卷, 第2期, 2011年1月15日 (2011 - 01 - 15), ISSN: 1096-7176, 参见摘要、表1	1-20
A	CN 105849249 A (CJ第一制糖株式会社) 2016年8月10日 (2016 - 08 - 10) 参见说明书第14段	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		
<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2022年6月1日		国际检索报告邮寄日期 2022年6月23日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 杜润超 电话号码 62411068

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	WO 2017100376 A3 (ZYMERGEN INC) 2017年8月3日 (2017 - 08 - 03) 参见权利要求1-19	1-20
A	CN 1289368 A (味之素株式会社) 2001年3月28日 (2001 - 03 - 28) 参见权利要求1-17	1-20
A	王迎春等. “基于时间序列转录组筛选谷氨酸棒杆菌内源高效组成型启动子” 生物工程学报, 第34卷, 第11期, 2018年11月25日 (2018 - 11 - 25), 参见摘要	1-20

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/081527

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	112695036	A	2021年4月23日	无			
CN	110951662	A	2020年4月3日	无			
CN	105849249	A	2016年8月10日	US	2016251687	A1	2016年9月1日
				RU	2016114418	A	2017年12月6日
				MY	181203	A	2020年12月21日
				KR	101498630	B1	2015年3月4日
				WO	2015064917	A1	2015年5月7日
				EP	3064569	A1	2016年9月7日
				JP	2016533771	A	2016年11月4日
WO	2017100376	A3	2017年8月3日	WO	2017100376	A2	2017年6月15日
				KR	20180084756	A	2018年7月25日
				CA	3007635	A1	2017年6月15日
				US	2018362991	A1	2018年12月20日
				JP	2018530991	A	2018年10月25日
				BR	112018011503	A2	2018年12月4日
CN	1289368	A	2001年3月28日	KR	20010032426	A	2001年4月16日
				RU	2214456	C2	2003年10月20日
				BR	9909409	A	2000年11月21日
				HU	225541	B1	2007年3月28日
				BR	9917880	B1	2014年2月18日
				MY	130756	A	2007年7月31日
				DE	69941594	D1	2009年12月10日
				WO	0018935	A1	2000年4月6日
				US	2004002143	A1	2004年1月1日
				HU	0100045	A2	2001年5月28日
				SK	7702000	A3	2000年10月9日
				AT	447039	T	2009年11月15日
				TW	200504213	A	2005年2月1日
				JP	0018935	A1	2001年12月18日
				ID	25513	A	2000年10月5日
				ES	2335828	T3	2010年4月5日
				US	2006003424	A1	2006年1月5日
				EP	1033407	A1	2000年9月6日
				TW	1247805	B	2006年1月21日
				PE	20001111	A1	2000年10月31日
				TW	200504215	A	2005年2月1日
				TW	200504214	A	2005年2月1日