

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 3 月 6 日 (06.03.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/044707 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/11 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/110346

(22) 国际申请日: 2024 年 8 月 7 日 (07.08.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202311100979.5 2023年8月30日 (30.08.2023) CN

(71) 申请人:清华大学(TSINGHUA UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing 100084 (CN)。北京微构工场生物技术有限公司(BEIJING PHABUILDER BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市顺义区赵全营镇兆丰一街21号, Beijing 101300 (CN)。

(72) 发明人:陈国强(CHEN, Guoqiang); 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing 100084 (CN)。郑爽(ZHENG, Shuang); 中国北京市海淀区清华园1号, Beijing

100084 (CN)。刘絮(LIU, Xu); 中国北京市顺义区赵全营镇兆丰一街21号, Beijing 101300 (CN)。

(74) 代理人:北京知联天下知识产权代理事务所(普通合伙)(BEIJING IPLING INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 中国北京市海淀区知春路56号天利大厦5层, Beijing 100098 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,

(54) Title: RECOMBINANT STRAIN WITH ELONGATED CELL MORPHOLOGY, CONSTRUCTION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种细胞形态纤长化的重组菌株及其构建方法 and 应用

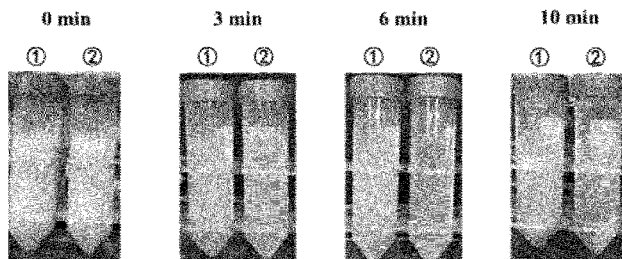


图 3

(57) Abstract: The present invention relates to the technical field of strain modification, and specifically relates to a recombinant strain with elongated cell morphology, a construction method therefor, and use thereof. The recombinant strain is constructed by means of subjecting a chassis cell to auto-induced expression of a cell morphology change gene minCD, so that the cell length of the recombinant strain is significantly increased; furthermore, the dry weight and the PHA yield of the cell are increased, and strain collection of the recombinant strain can be implemented at a lower centrifugal force, thus greatly simplifying the downstream processing process and reducing downstream processing costs.

(57) 摘要: 涉及菌种改造技术领域, 具体涉及一种细胞形态纤长化的重组菌株及其构建方法 and 应用。对底盘细胞进行细胞形变基因 *rmnCD* 自诱导表达构建重组菌株, 使得重组菌株的细胞长度显著增长, 同时可以提高细胞干重及 PHA 产量, 所述的重组菌株在较低离心力时即可实现菌体收集, 大大简化下游处理流程, 降低下游处理成本。

[见续页]



WO 2025/044707 A1

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))。

一种细胞形态纤长化的重组菌株及其构建方法和应用

技术领域

本发明涉及菌种改造技术领域，具体涉及一种细胞形态纤长化的重组菌株及其构建方法和应用。

背景技术

聚羟基脂肪酸酯 PHA 是一种可由多种细菌天然产生的胞内聚酯，是细菌在营养或代谢不平衡时用于储存碳和能量的一种自然方式，在菌体中以不溶于水的包涵体形式存在 (Shang, L., et al. Poly(3-Hydroxybutyrate) Synthesis in Fed-Batch Culture of *Ralstonia eutropha* with Phosphate Limitation under Different Glucose Concentrations. *Biotechnol. Lett.* 2003, 25 (17), 1415-1419.)。PHA 具有与传统石油基塑料相当的材料性能，其已被用于包装、食品、医疗、化妆品、农业、生物能源等领域。PHA 的市场需求存在巨大潜力，而 PHA 产量和生产成本是制约 PHA 走向市场应用的最大障碍。

由于 PHA 以胞内包涵体形式存在，当其含量超过 50wt% 时，尤其是工业化生产中 PHA% 超过 80wt% 时，细胞体积的大小成为 PHA 产量的重要影响因素，其也是 PHA 含量上限的决定性因素。提高 PHA 产量和降低生产成本的措施之一为增大细胞体积。通过改造细胞形态可以实现增加产量和降低成本的目标，增大细胞体积以容纳更多的 PHA，既有助于 PHA 含量的提高，又助于减轻发酵结束后的细胞收集难度，降低产物分离成本。

虽然在现有技术 (Tan D, Wu Q, Chen J C, et al. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates [J]. *Metab Eng*, 2014, 26: 34-47.) 中公开过表达 *minCD* 使细胞纤长化，在降低了下游分离成本的同时增高了 PHA 产量，但是此过程需要添加诱导剂 IPTG，IPTG 的使用使得生产成本提高。PHA 的市场需求存在巨大潜力，而 PHA 产量和生产成本是制约 PHA 走向市场应用的最大障碍。现有技术 (CN113999869A) 中公开了使用 *PhaP* 系列启动子过表达 *MinCD* 可以自诱导细胞纤长化，但原本的表达强度过高，对细胞的生长不利。

发明内容

本发明通过在底盘细胞中引入受 PHA 合成调控的形变基因 *minCD* 表达模

块，搭配不同强度的核糖体接合位点序列（Ribosome Binding Site, RBS），使得底盘细胞的细胞长度显著增长，长度增长的细胞可以在低离心力的条件下分离收集，并提高 PHA 的产量。具体为：

本发明的第一方面，提供了一种重组菌，所述的重组菌中包含表达载体，所述的表达载体中包含 *minCD* 基因和启动子；

所述的启动子中包含 PhaR 的结合位点；

所述的重组菌为表达 PhaR 蛋白的重组菌。

优选的，所述的 *minCD* 基因的核苷酸序列包含 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，或包含与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列具有 80% 以上同源性的。

优选的，所述的 *minCD* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

优选的，所述的 *minCD* 基因在表达载体上表达和/或在染色体上表达。

优选的，所述的启动子包括组成型启动子和/或诱导型启动子。

优选的，所述的 *minCD* 基因由所述的启动子调控表达。

优选的，所述的启动子可以是现有技术中常规的启动子。

优选的，所述的组成型启动子选自但不限于 *Sp6* 启动子或其变体或 *porin* 启动子或其突变体。

其中，*porin* 启动子的突变体选自 *porin-203*、*porin-221*、*porin-194*、*porin-278*、*porin-68*、*porin-58* 或 *porin-42* 中的任一种（Ye et.al. Stimulus response-based fine-tuning of polyhydroxyalkanoate pathway in *Halomonas*. Metabolic Engineering. 57 (2020) 85-95.）。

优选的，所述的诱导型启动子选自但不限于 *luc* 启动子或其变体、*lac* 启动子或其变体、*trp* 启动子或其变体、*tac* 启动子或其变体、噬菌体启动子或其变体、*araBAD* 启动子或其变体或 *phaP* 启动子或其变体。

其中，所述的噬菌体启动子包括但不限于 λ 噬菌体启动子或 T7 噬菌体启动子。

优选的，所述的 *phaP* 启动子包括但不限于 *phaP1* 启动子、*phaP2* 启动子或 *phaP3* 启动子。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的启动子为 *phaP1*，*phaP1* 启动子在 *phaP1* 基因开放阅读框上游 109 位碱基处。

优选的，*phaP1* 启动子包括 SEQ ID NO: 2 所示核苷酸序列或与其具有 80% 以上同源性且具有相同或相似的活性的核苷酸序列。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的 *phaP1* 启动子如 SEQ ID NO: 2 所示。

GGTTGTTGTTGTCGGTGGCTAGTCGCAATGTTATGAAAAATCATGTTG
CGCTGCACAAAAAGCACTGCTAGCTTTGTTGTTAGTAAAGGCAACCGCCTG
ATCATCGACCGCTCATCGAT (SEQ ID NO: 2)

优选的，所述的重组菌可以为本身可以表达 PhaR 蛋白的重组菌，或者，所述的重组菌可以经过改造后表达 PhaR 蛋白（例如向重组菌中导入包含 PhaR 蛋白的编码基因的表达载体）。

优选的，当重组菌表达的 PhaR 蛋白与启动子上的 PhaR 的结合位点结合时，会抑制启动子的表达，而当体系中合成的 PHA 与 PhaR 结合，使 PhaR 从启动子上脱离，启动子的表达恢复，启动子的表达受 PHA 合成的调控。

优选的，所述的启动子为本身包含 PhaR 的结合位点的启动子，或者，所述的启动子还可以经过改造，例如在启动子上加入 PhaR 的结合位点，加上 PhaR 的结合位点后的启动子仍具有启动子的功能，并使启动子的表达可以受 PHA 合成的调控。

优选的，所述的表达载体中还包含 RBS 序列。针对 *phaP1* 启动子的调控利用，为了适应不同强度的表达需求，针对原本的 *phaP1* 的 RBS 的核心区域进行了突变，获得了 1024 个具有不同强度的 RBS 库。

优选的，该 RBS 库的序列如 SEQ ID NO: 3 所示（其中，N 为突变位点，可以为 A、T、C、G 或 U 中任一种）。

GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTANNNNNATTATGTG (SEQ ID NO: 3)

优选的，所述的 RBS 的核苷酸序列为 RBS 库中选取获得，所述的 RBS 的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 4-13 或包括与 SEQ ID NO: 4-13 具有 90% 以上同源性的核苷酸序列，或如 SEQ ID NO: 4-13 所示核苷酸序列。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的 RBS 的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 7-13 或与 SEQ ID NO: 7-13 具有 90% 以上同源性的核苷酸序列，或如 SEQ ID NO: 7-13 所示核苷酸序列。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的表达载体中包含的启动子、*minCD* 基因和 RBS 序列在表达载体中的顺序为启动子、RBS 序列、*minCD* 基因。

优选的，在所述的表达载体中，所述的 RBS 紧邻 *minCD* 基因的起始密码子。

优选的，所述的表达载体能够在宿主细胞中复制、转录和翻译，因此，其还可以包含表达载体中常规的其他表达原件，例如终止子、酶切位点等等。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的表达载体中包含启动子、*minCD* 基因、RBS 序列和终止子，各表达元件和基因在表达载体中的顺序为启动子、RBS 序列、*minCD* 基因、终止子。

优选的，所述的表达载体可以为原核表达载体或真核表达载体。进一步优选为原核表达载体。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的表达载体为质粒载体。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的质粒载体为大肠杆菌表达载体。

优选的，所述的表达载体将 *minCD* 基因整合至重组菌的基因组中，或者，所述表达载体游离在重组菌中。

优选的，所述的表达载体还将启动子、RBS 序列和/或终止子也整合至重组菌的基因组中。

优选的，所述的重组菌为合成 PHA 或组成 PHA 的单体的重组菌。

优选的，所述的重组菌可以为天然合成 PHA 或组成 PHA 的单体的重组菌，或经过改造（例如向重组菌中导入 PHA 合成相关基因）后可以合成 PHA 或组成 PHA 的单体的重组菌。

优选的，所述的表达载体中还可以包含编码产物合成途径相关的基因。

优选的，所述的产物包含组成 PHA 的单体或 PHA。

优选的，所述的组成 PHA 的单体包含但不限于 2-羟基丙酸、3-羟基丙酸、3-羟基丁酸、4-羟基丁酸、3-羟基戊酸、5-羟基戊酸、3-羟基己酸、3-羟基庚酸、3-羟基辛酸、3-羟基壬酸、3-羟基癸酸、3-羟基十二酸中的一种或两种以上；

优选的，所述 PHA 包含但不限于 P(HB-LA)、P3HP、PHB、P4HB、PHV、PHO、PHN、PHD、PHBV、P34HB、PHBHHp、PHBHHx、P3HB4HB3HV、P3HB4HB5HV 或其他中长链羟基脂肪酸中的一种或两种以上。

优选的,所述的重组菌选自埃希氏菌属(*Escherichia*)、罗氏菌属(*Ralstonia*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、气生单胞菌属(*Aeromonas*)或盐单胞菌属(*Halomonas*)。

优选的,所述的埃希氏菌属(*Escherichia*)包括但不限于大肠杆菌(*Escherichia coli*)或其衍生菌。

优选的,所述的罗氏菌属(*Ralstonia*)包括但不限于罗氏真养杆菌(*Ralstonia eutropha*, 也叫 *Alcaligenes eutrophus*, *Cupriavidus necator*)或其衍生菌。

优选的,所述的产碱杆菌属(*Alcaligenes*)包括但不限于巨大产碱杆菌(*Alcaligenes latus*)或其衍生菌。

优选的,所述的假单胞菌属(*Pseudomonas*)包括但不限于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)或其衍生菌。

优选的,所述的气生单胞菌属(*Aeromonas*)包括但不限于嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)或其衍生菌。

优选的,所述的盐单胞菌属(*Halomonas*.)包括但不限于 *Halomonas bluephagenesis* 或其衍生菌、*Halomonas campaniensis* 或其衍生菌或 *Halomonas aydingkolgenesis* 或其衍生菌。

在本发明的一个具体实施方式中,所述的重组菌为盐单胞菌属,所述的重组菌包括但不限于 *Halomonas bluephagenesis* TD01 CGMCC. No. 4353, *Halomonas campaniensis* LS21 CGMCC No.6593、*Halomonas aydingkolgenesis* M1 CGMCC NO.19880、*Halomonas bluephagenesis* WZY254 或 *Halomonas bluephagenesis* WZY278。

本发明的第二方面,提供了一种上述第一方面所述的重组菌的制备方法,其特征在于,所述的制备方法包括将表达载体导入重组菌中。

优选的,所述的表达载体将 *minCD* 基因整合至重组菌的基因组中,或者,所述表达载体游离在重组菌中。

优选的,所述的表达载体还将启动子、RBS 序列和/或终止子也整合至重组菌的基因组中。

优选的,对表达载体、启动子、RBS 序列、重组菌的相关限定,同本发明的第一方面。

本发明的第三方面,提供了一种上述第二方面所述制备方式获得的重组菌。

本发明的第四方面，提供了一种表达载体。

对表达载体的相关限定，同本发明的第一方面。

本发明的第五方面，提供了一种发酵方法。

所述的发酵方法包括发酵培养上述第一方面所述的重组菌。

本发明的第六方面，提供了一种生产 PHA 的方法。

所述的方法包括发酵培养上述第一方面所述的重组菌。

本发明的第七方面，提供了一种促进细胞纤长化的方法。

所述的方法包括将表达载体向导入重组菌中，所述的表达载体中包含 *minCD* 基因和启动子；所述的启动子中包含 *PhaR* 的结合位点；所述的重组菌为表达 *PhaR* 蛋白的重组菌。

优选的，所述的 *minCD* 基因的核苷酸序列包含 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，或包含与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列具有 80% 以上同源性。

优选的，所述的 *minCD* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

优选的，对表达载体、重组菌的相关限定，同本发明的第一方面。

本发明的第八方面，提供了一种重组菌的分离方法，所述的分离方法包括离心分离上述的重组菌。

优选的，所述的离心可以为在任意离心力下离心。

优选的，所述的离心力大于 300g。

优选的，所述的离心的离心力为 300-15000g 中任一数值，例如 300、500、800、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、11000、12000、13000、14000 或 15000g。

优选的，所述分离的时间为 3 分钟以上，例如 3、4、5、6、7、8、9、10，或更长时间。

由于本申请所述的重组菌的细胞纤长化，在低离心力下就可以在短时间内，例如在 10 分钟内完成菌体收集，简化下游处理流程，降低下游处理成本。

有益效果：

在 PHA 的生产菌株中，*PhaP* 蛋白作为 PHA 颗粒结合蛋白，其表达量与 PHA 的百分含量具有正相关关系。将细胞形变相关基因 *minCD* 置于 *PhaP* 启动子下游，由 *phaP* 启动子调控表达 *minCD*，实现 *MinCD* 在 PHA 生产中实现不需诱导

剂的自诱导表达，在发酵过程中，实现细胞长度增加至原本细胞长度的近十倍，同时增加干重和 PHA 百分含量的效果，且长度增长的细胞可以在低离心力的条件下分离收集，从而降低 PHA 的下游处理成本，有助于 PHA 走向更广泛的应用，可用于分子生物学、基因工程、代谢工程、合成生物学、发酵工程领域及下游分离纯化领域。

附图说明

图 1: 重组质粒 pSEVA321- P_{phl} -RBS-*minCD* 的结构图，*minCD* 基因受 *phaPI* 启动子调控表达，其中，*oriT* 表示细菌接合质粒的转移原点， Cm^R 表示氯霉素抗性，T 表示终止子，图中半圆为核糖体结合位点 RBS。

图 2: 菌株 WZY278(pSEVA321- P_{phl})和 WZY278(pSEVA321- P_{phl} -RBS3-*minCD*)摇瓶发酵实验终点时的细胞形态。

图 3: 菌株 WZY278(pSEVA321- P_{phl})和 WZY278(pSEVA321- P_{phl} -RBS3-*minCD*)的摇瓶发酵菌液在 500g 离心力条件下分别离心 3min、6min、10min 时的状态；其中，①为对照菌株 WZY278(pSEVA321- P_{phl})，②为形变菌株 WZY278(pSEVA321- P_{phl} -RBS3-*minCD*)。

具体实施方式

下面结合实施例、序列表和说明书附图对本发明作进一步说明，但并不仅限于此。实施例中所使用的实验方法未作具体说明的，均为常规方法、常规操作或说明书条件进行；未作具体说明的试剂或药品，均为普通市售产品，均可从商业途径获得。

大肠杆菌生长在 LB 培养基上，培养基成分组成：10g/L 的氯化钠，10g/L 的蛋白胨，5g/L 的酵母提取物。

盐单胞菌 *H. bluephagenesis* WZY278 及其衍生菌株在 LB50 或 MM30 的培养基上培养。LB50 培养基，其成分除氯化钠的浓度变成 50g/L 外，其它成分同 LB 一样。MM30 培养基的组分如下：30g/L 的氯化钠，1g/L 的酵母提取物，30g/L 浓度葡萄糖，0.5g/L 的尿素及其它微量元素组成。

大肠杆菌和盐单胞菌 *H. bluephagenesis* 及其衍生菌株的摇床生长条件均为 37°C，200rpm。

实施例：细胞形态纤长化的重组菌株的构建

首先，针对 *phaP1* 启动子的调控利用，为了适应不同强度的表达需求，针对原本的 *phaP1* 的 RBS 的核心区域进行了饱和突变，获得了 1024 个具有不同强度的 RBS 库。该 RBS 库的序列如 SEQ ID NO: 3 所示（其中，N 为饱和突变位点）。

SEQ ID NO: 3

GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTANNNNNATTATGTG

筛选其中 10 个不同强度 RBS（见表 1，其中 RBS0 为天然 RBS，RBS1-RBS9 为改造后的 RBS，RBS0 的表达强度过高，对细胞的生长不利）用于构建 *minCD* 重组表达质粒，将 *minCD* 基因置于 *phaP1* 启动子的下游，RBS 位于 *minCD* 上游，紧邻 *minCD* 的起始密码子。其中，RBS1-RBS9 来源于由 Salis Lab 的 RBS library calculator 构建的 P_{phaP1} RBS_x 库（https://salislab.net/software/design_rbs_library_calculator）。该库以 RBS0（即 P_{phaP1} 天然 RBS）同源序列 CTCACTTAXXXXXATTATGTG（其中 X 为 A、T、C、G 或 U 中任一碱基）为模板，*minCD* 为表达基因，将五个 X 位点随机突变而得，每个 RBS 对应其各自的相对强度。然后，以菌株 *H. bluephagenesis* WZY278（*H. bluephagenesis* WZY278 菌株：将 4HB-CoA 转移酶编码基因整合进重组 *H. bluephagenesis* TD1.0 基因组， $\Delta phaP1$ ， $\Delta lpxL$ ， $\Delta lpxM$ ，将表达 *phaCAB* 的 P_{MmpI} 启动子替换为 P_{porin} 启动子，再过表达与必需基因 *ompW* 相关联的额外的 *phaCAB*，具体详见文章 Ji, M., et al. PHB production from food waste hydrolysates by *Halomonas bluephagenesis* Harboring PHB operon linked with an essential gene. *Metabolic Engineering*, 2023, 77, 12-20.）为宿主，将重组表达质粒结合到宿主中，得到相应工程菌株。将各菌株进行摇瓶发酵实验，分析细胞形态、干重和 PHB% 的变化，发现各菌株细胞长度显著增长，并且其中一株的 PHB 产量和 CDW 同时提升。

表 1：RBS0-RBS9 的核酸序列及相对强度

编号	核酸序列	相对强度	序列编号
RBS0	GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTAAGGAGATTATGTG	1128	SEQ ID NO: 4

RBS1	GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTAAGGGGATTATGTG	703	SEQ ID NO: 5
RBS2	GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTAGTAGGATTATGTG	472	SEQ ID NO: 6
RBS3	GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTATCGGGATTATGTG	322	SEQ ID NO:7
RBS4	GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTAGAGGTATTATGTG	222	SEQ ID NO:8
RBS5	GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTAATGAGATTATGTG	143	SEQ ID NO:9
RBS6	GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTATCAAGATTATGTG	100	SEQ ID NO:10
RBS7	GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTAGGTCAATTATGTG	63	SEQ ID NO:11
RBS8	GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTAGACGTATTATGTG	42	SEQ ID NO:12
RBS9	GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTAGCGAGATTATGTG	31	SEQ ID NO:13

1. 自诱导 *minCD* 重组表达质粒的构建

首先, 选取 *H. bluephagenesis* TD01 基因组为模板, PCR 得到 *minCD*。然后, 以 pSEVA321 质粒为载体, 以 *phaPI* 启动子 (P_{PI}) 为基因表达的启动子, 将表 1 中的 10 个不同强度的 RBS, 构建不同 *minCD* 表达强度的重组表达质粒, 分别为 pSEVA321- P_{PI} -RBS0-*minCD*、pSEVA321- P_{PI} -RBS1-*minCD*、pSEVA321- P_{PI} -RBS2-*minCD*、pSEVA321- P_{PI} -RBS3-*minCD*、pSEVA321- P_{PI} -RBS4-*minCD*、pSEVA321- P_{PI} -RBS5-*minCD*、pSEVA321- P_{PI} -RBS6-*minCD*、pSEVA321- P_{PI} -RBS7-*minCD*、pSEVA321- P_{PI} -RBS8-*minCD*、pSEVA321- P_{PI} -RBS9-*minCD*。其中, 以不含 *minCD* 的质粒 pSEVA321- P_{PI} 为对照。将各质粒转化至大肠杆菌 S17-1 感受态细胞。挑取单克隆并进行 PCR 鉴定和测序, 选择测序正确的单克隆, 即得到 10 个不同 *minCD* 表达强度的自诱导重组表达质粒 (质粒结构如图 1 所示) 及对照质粒。

2. 细胞形态纤长化菌株的构建

以 *H. bluephagenesis* WZY278 为宿主细胞，将其分别与上述得到的 10 个自诱导重组表达质粒和对照质粒转至 *H. bluephagenesis* WZY278 中（具体方法见 Zhao, H., et al. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas*. Metabolic Engineering, 2017, 39, 128-140.），即得 WZY278 (pSEVA321-P_{pl}-RBS0-*minCD*)、WZY278 (pSEVA321-P_{pl}-RBS1-*minCD*)、WZY278 (pSEVA321-P_{pl}-RBS2-*minCD*)、WZY278 (pSEVA321-P_{pl}-RBS3-*minCD*)、WZY278 (pSEVA321-P_{pl}-RBS4-*minCD*)、WZY278 (pSEVA321-P_{pl}-RBS5-*minCD*)、WZY278 (pSEVA321-P_{pl}-RBS6-*minCD*)、WZY278 (pSEVA321-P_{pl}-RBS7-*minCD*)、WZY278 (pSEVA321-P_{pl}-RBS8-*minCD*)、WZY278 (pSEVA321-P_{pl}-RBS9-*minCD*)以及对照菌株 WZY278 (pSEVA321-P_{pl})。

3. 菌株 CDW 和 PHB%的测定

首先要进行摇瓶发酵。将上述得到的 11 株工程菌株分别接种到 20mL 含 34mg/L 氯霉素的 LB50 培养基中培养 12-16h，然后按 1%的体积比转接到新的 20mL 含 34mg/L 氯霉素的 LB50 培养基中继续培养 8-10h，得摇瓶种子液。将 2.5mL 的种子菌液接种到含有 50mL 含 34mg/L 氯霉素的 MM30 培养基的 500mL 锥形瓶中（接种比例 1: 20），于 37°C、200rpm 的条件下，发酵培养 48h。发酵结束后，收集样品，对样品进行 CDW 和 PHB%分析（具体的实验方法见 Ye, J., et al. Stimulus response-based fine-tuning of polyhydroxyalkanoate pathway in *Halomonas*. Metabolic Engineering, 2020, 57, 85-95），结果如表 2。由表 2 可以看出，与对照相比，含有自诱导 *minCD* 重组表达质粒的部分菌株的干重和 PHB%均有所提高，且因其 RBS 强度不同而不同，其中，RBS7 的效果最好，WZY278(pSEVA321-P_{pl}-RBS7-*minCD*)的干重提高约 15.5%，同时 PHB%提高约 6.7%。

表 2: *phaPI* 启动子驱动 PHB 合成基因提高菌株 PHB 产量

宿主	所含质粒	干重(g/L)	PHB(%)
WZY278	pSEVA321-P _{pl}	10.3	76.7
	pSEVA321-P _{pl} -RBS0- <i>minCD</i>	8.9	68.2
	pSEVA321-P _{pl} -RBS1- <i>minCD</i>	9.5	74.7
	pSEVA321-P _{pl} -RBS2- <i>minCD</i>	9.1	72.3

	pSEVA321- <i>P_{pl}</i> -RBS3- <i>minCD</i>	10.4	77.1
	pSEVA321- <i>P_{pl}</i> -RBS4- <i>minCD</i>	10.6	78.2
	pSEVA321- <i>P_{pl}</i> -RBS5- <i>minCD</i>	11.4	82.2
	pSEVA321- <i>P_{pl}</i> -RBS6- <i>minCD</i>	11.1	81.6
	pSEVA321- <i>P_{pl}</i> -RBS7- <i>minCD</i>	11.9	83.4
	pSEVA321- <i>P_{pl}</i> -RBS8- <i>minCD</i>	11.7	82.9
	pSEVA321- <i>P_{pl}</i> -RBS9- <i>minCD</i>	11.0	78.2

4. 细菌形态及菌液离心情况分析

取上述摇瓶发酵实验结束时 WZY278(pSEVA321-*P_{pl}*)、WZY278(pSEVA321- *P_{pl}*-RBS7-*minCD*)的菌液，分别进行显微镜细胞形态观察和菌液离心情况分析。两种菌株的细胞形态如图 2 所示。由图 2 可以看出，WZY278(pSEVA321-*P_{pl}*-RBS7-*minCD*)的细胞长度显著增长，长度达 10μm，约为对照菌株细胞长度的 10 倍。

关于菌液离心情况的分析，首先各取 35ml 菌液于 50ml EP 管中，500g 离心力下分别离心 3min、6min 和 10min，每次离心结束后观察两管菌液的不透明程度，结果如图 3 所示，其中①为对照菌株 WZY278(pSEVA321-*P_{pl}*)，②为形变菌株 WZY 278(pSEVA321- *P_{pl}*-RBS7-*minCD*)。由图 3 可见，在 500g 的离心力下，对照菌株 WZY278(pSEVA321-*P_{pl}*)分离 10min 后，上清液中仍然比较浑浊，而形变菌株 WZY278(pSEVA321-*P_{pl}*-RBS7- *minCD*)分离 10min 后，上清液明显较对照菌株组清澈，即形变菌株可以实现更快速地离心分离，有助于提高下游分离处理的效率。

权 利 要 求 书

1. 一种重组菌，其特征在于，所述的重组菌中包含表达载体，所述的表达载体中包含 *minCD* 基因和启动子；

所述的启动子中包含 *PhaR* 的结合位点；

所述的重组菌为表达 *PhaR* 蛋白的重组菌。

2. 根据权利要求 1 所述的重组菌，其特征在于，所述的 *minCD* 基因的核苷酸序列包含 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，或包含与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列具有 80%以上同源性。

3. 根据权利要求 1 所述的重组菌，其特征在于，所述的 *minCD* 基因在表达载体上表达和/或在染色体上表达。

4. 根据权利要求 1-3 任一所述的重组菌，其特征在于，所述的启动子包括组成型启动子和/或诱导型启动子，

优选的，所述的组成型启动子选自 *Sp6* 启动子或其变体或 *porin* 启动子或其变体；

优选的，所述的诱导型启动子选自 *luc* 启动子或其变体、*lac* 启动子或其变体、*trp* 启动子或其变体、*tac* 启动子或其变体、噬菌体启动子或其变体、*araBAD* 启动子或其变体或 *phaP* 启动子或其变体。

5. 根据权利要求 1-4 任一所述的重组菌，其特征在于，所述的 *phaP* 启动子包括 *phaP1* 启动子、*phaP2* 启动子或 *phaP3* 启动子。

6. 根据权利要求 5 所述的重组菌，其特征在于，所述的 *phaP1* 启动子包括 SEQ ID NO: 2 或包括与 SEQ ID NO: 2 所示核苷酸序列具有 80%以上同源性的核苷酸序列。

7. 根据权利要求 1-6 任一所述的重组菌，其特征在于，所述的表达载体中还包含 RBS 序列；

优选的，所述的表达载体中包含的启动子、*minCD* 基因和 RBS 序列在表达载体中的顺序为启动子、RBS 序列、*minCD* 基因。

8. 根据权利要求 7 所述的重组菌，其特征在于，在所述的表达载体中，所述的 RBS 紧邻 *minCD* 基因的起始密码子。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的重组菌，其特征在于，所述的 RBS 序列如

GCGTGTCGAATCGCTAGCTCACTTANNNNNATTATGTG (SEQ ID NO:

3) 所示,

其中, N 选自 A、T、C、G 或 U 中任一种。

10. 根据权利要求 7-9 任一所述的重组菌, 其特征在于, 所述的 RBS 序列包括 SEQ ID NO: 4-13 或包括与 SEQ ID NO: 4-13 具有 90%以上同源性的核苷酸序列。

11. 根据权利要求 10 所述的重组菌, 其特征在于, 所述的 RBS 序列包括 SEQ ID NO: 7-13 或包括与 SEQ ID NO: 7-13 具有 90%以上同源性的核苷酸序列。

12. 根据权利要求 1-11 任一所述的重组菌, 其特征在于, 所述的重组菌为合成 PHA 或组成 PHA 的单体的重组菌。

13. 根据权利要求 1-12 任一所述的重组菌, 其特征在于, 所述的重组菌选自埃希氏菌属 (*Escherichia*) 或其衍生菌、罗氏菌属 (*Ralstonia*) 或其衍生菌、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*) 或其衍生菌、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 或其衍生菌、气生单胞菌属 (*Aeromonas*) 或其衍生菌或盐单胞菌属 (*Halomonas*) 或其衍生菌;

所述的盐单胞菌属 (*Halomonas*) 优选包括 *Halomonas bluephagenesis* 或其衍生菌, *Halomonas campaniensis* 或其衍生菌或 *Halomonas aydingkolgenesis* 或其衍生菌。

14. 一种权利要求 1-13 任一所述的重组菌的制备方法, 其特征在于, 所述的制备方法包括将表达载体导入重组菌中。

15. 一种促进细胞纤长化的方法, 其特征在于, 所述的方法包括将表达载体导入重组菌中; 所述的表达载体中包含 *minCD* 基因和启动子;

所述的启动子中包含 PhaR 的结合位点;

所述的重组菌为表达 PhaR 蛋白的重组菌。

16. 根据权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述的 *minCD* 基因的核苷酸序列包含 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列, 或包含与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列具有 80%以上同源性。

17. 一种重组菌的分离方法, 其特征在于, 所述的分离方法包括离心分离权利要求 1-13 任一所述的重组菌;

优选的，所述离心的离心力大于 300g。

18. 一种发酵方法，其特征在于，所述的发酵方法包括发酵培养权利要求 1-13 任一所述的重组菌。

19. 一种生产 PHA 的方法，其特征在于，所述的方法包括发酵培养权利要求 1-13 任一所述的重组菌。

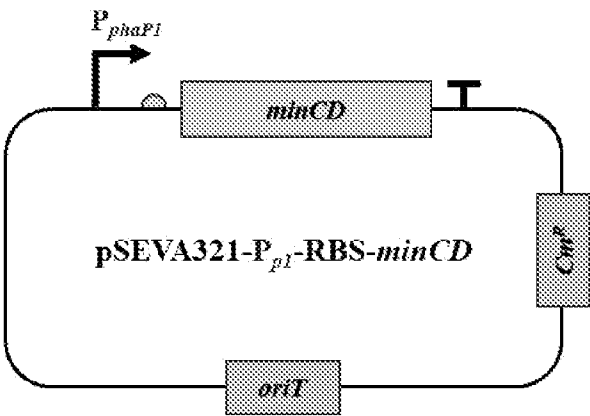


图 1

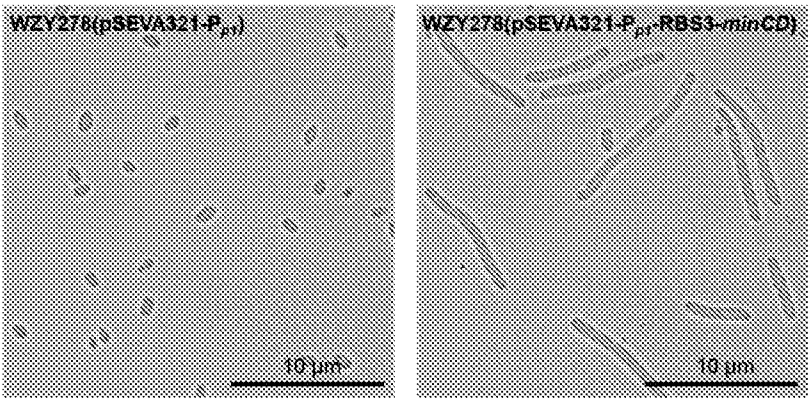


图 2

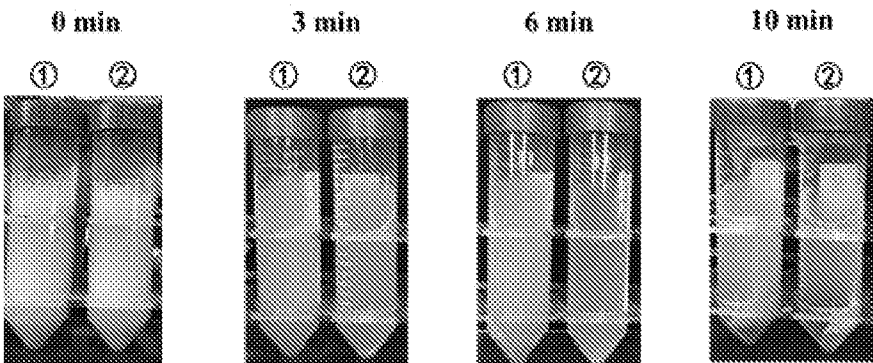


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/110346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTERC12N15/11(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12N15/74(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; C12R1/19(2006.01)i;
C12R1/01(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N, 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)

CNTXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, 万方数据, WANFANG DATA, Web of Science, BING, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, incoPat, 中国生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System, NCBI, EBI, STNext: 申请人, 发明人, ENTXT, MinCD, PHA, RBS, phaP, phaR, 序列1-13

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 113999869 A (TSINGHUA UNIVERSITY et al.) 01 February 2022 (2022-02-01) claims 1-14, abstract, and description, paragraphs 8-68, and embodiment 5	1, 3-5, 12-15, 18-19
Y	CN 113999869 A (TSINGHUA UNIVERSITY et al.) 01 February 2022 (2022-02-01) claims 1-14, abstract, and description, paragraphs 8-68, and embodiment 5	2-19
Y	CN 105331568 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 17 February 2016 (2016-02-17) description, paragraphs 3, 9, and 147	2-19
Y	CN 105779488 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 20 July 2016 (2016-07-20) description, paragraphs 99-100	2-19
Y	CN 109486845 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 19 March 2019 (2019-03-19) description, paragraphs 12 and 17	9-14, 17-19
Y	CN 110004182 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 12 July 2019 (2019-07-12) description, paragraphs 53, 56, 68-83, and 124, and embodiment 2	2-19



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

09 November 2024

Date of mailing of the international search report

14 November 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI, Teng et al. "Semirational Approach for Ultrahigh Poly(3-hydroxybutyrate) Accumulation in Escherichia coli by Combining One-Step Library Construction and High-Throughput Screening" <i>ACS Synthetic Biology Journal</i> , Vol. 5, 02 May 2016 (2016-05-02), pages 1308-1317 abstract, page 1309, left-hand column, last paragraph to right-hand column, last paragraph, page 1310, right-hand column, paragraph 2 to page 1312, left-hand column, paragraph 1, table 2, and figure 3	9-14, 17-19
Y	TAN, Dan et al. "Engineering Halomonas TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates" <i>METABOLIC ENGINEERING</i> , Vol. 26, 16 September 2014 (2014-09-16), pages 34-37 page 37, section 2.4, and page 38, table 2	9-14, 17-19
PX	CN 116814615 A (TSINGHUA UNIVERSITY et al.) 29 September 2023 (2023-09-29) claims 1-10	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/110346

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/110346

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	113999869	A	01 February 2022	None	
CN	105331568	A	17 February 2016	None	
CN	105779488	A	20 July 2016	None	
CN	109486845	A	19 March 2019	None	
CN	110004182	A	12 July 2019	None	
CN	116814615	A	29 September 2023	None	

A. 主题的分类		
C12N15/11(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12N15/74(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; C12R1/19(2006.01)i; C12R1/01(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C12N, 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))		
CNTXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, 万方数据, Web of Science, BING, 百度学术, incoPat, 中国生物序列检索系统, NCBI, EBI, STNext: 申请人, 发明人, ENTXT, MinCD, PHA, RBS, phaP, phaR, 序列1-13		
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 113999869 A (清华大学等) 2022年2月1日 (2022 - 02 - 01) 权利要求1-14, 摘要, 说明书第8-68段, 实施例5	1、3-5、12-15、18-19
Y	CN 113999869 A (清华大学等) 2022年2月1日 (2022 - 02 - 01) 权利要求1-14, 摘要, 说明书第8-68段, 实施例5	2-19
Y	CN 105331568 A (清华大学) 2016年2月17日 (2016 - 02 - 17) 说明书第3、9、147段	2-19
Y	CN 105779488 A (清华大学) 2016年7月20日 (2016 - 07 - 20) 说明书第99-100段	2-19
Y	CN 109486845 A (江南大学) 2019年3月19日 (2019 - 03 - 19) 说明书第12、17段	9-14、17-19
Y	CN 110004182 A (清华大学) 2019年7月12日 (2019 - 07 - 12) 说明书第53、56、68-83、124段, 实施例2	2-19
☒ 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
2024年11月9日		2024年11月14日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		冯晓亮
		电话号码 (+86) 010-53961927

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

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

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	Li, T.等. "Semirational Approach for Ultrahigh Poly(3-hydroxybutyrate) Accumulation in Escherichia coli by Combining One-Step Library Construction and High-Throughput Screening" ACS SYNTH. BIOL., 第5卷, 2016年5月2日 (2016 - 05 - 02), 第1308-1317页 摘要, 第1309页左栏末段至右栏末段, 第1310页右栏第2段至第1312页左栏第1段, 表2, 图3	9-14、17-19
Y	TAN, D.等. "Engineering Halomonas TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates" METABOLIC ENGINEERING, 第26卷, 2014年9月16日 (2014 - 09 - 16), 第34-37页 第37页2.4节, 第38页表2	9-14、17-19
PX	CN 116814615 A (清华大学等) 2023年9月29日 (2023 - 09 - 29) 权利要求1-10	1-19

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/110346

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	113999869	A	2022年2月1日	无	
CN	105331568	A	2016年2月17日	无	
CN	105779488	A	2016年7月20日	无	
CN	109486845	A	2019年3月19日	无	
CN	110004182	A	2019年7月12日	无	
CN	116814615	A	2023年9月29日	无	