

(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
2012 年 9 月 20 日 (20.09.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/122765 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/75 (2006.01) *C12R 1/125* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/076941
- (22) 国际申请日: 2011 年 7 月 7 日 (07.07.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201110063273.7 2011 年 3 月 16 日 (16.03.2011) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): **陈克平 (CHEN, Keping)** [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 江苏大学生命科学研究院 407 室, Jiangsu 212013 (CN)。 **王楠 (WANG, Nan)** [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号江苏大学生命科学研究院, Jiangsu 212013 (CN)。 **宁德刚 (NING, Degang)**

[CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号江苏大学生命科学研究院, Jiangsu 212013 (CN)。 **李国辉 (LI, Guohui)** [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号江苏大学生命科学研究院, Jiangsu 212013 (CN)。

- (74) 代理人: **南京经纬专利商标代理有限公司 (NANJING JINGWEI PATENT & TRADEMARK AGENCY CO.)**; 中国江苏省南京市鼓楼区中山路 179 号 12 楼 B 座, Jiangsu 210005 (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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,

[见续页]

(54) Title: RECOMBINANT SPORE WITH BOMBYXMORI ALCOHOL DEHYDROGENASE DISPLAYED ON ITS SURFACE AND PREPARING METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 一种表面展示家蚕乙醇脱氢酶重组芽孢及其制备方法

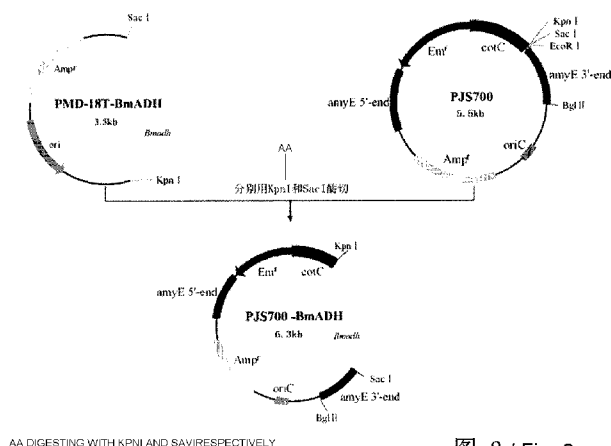


图 2 / Fig. 2

(57) Abstract: Bombyxmorialcoholdehydrogenase is displayed as exogenous protein on the Bacillus subtilis surface. Recombinant integrative plasmid for fusion expression of Bombyxmorialcohol dehydrogenase BmADH is constructed by using cotC, the gene of Bacillus subtilis spore coat protein, as molecule carrier, and being the latter recombined with Bombyxmori alcohol dehydrogenase gene BmADH. Bacillus subtilis is transformed with the plasmid, and the exogenous gene is integrated into the amylase gene amyE at the specific site on chromosome by homologous recombination, thus the amylase gene is destroyed and amylase activity of the recombinant strain is absent, therefore the recombinant Bacillus subtilis strain comprising fusion expression of CotC-BamADH is selected. The spore with Bombyxmori alcohol dehydrogenase fusion protein displayed on its surface is obtained by inducible expression of recombinant strain. The alcohol dehydrogenase unstable at certain temperature and pH originally is constructed into alcohol dehydrogenase fusion protein with relatively higher stability at different environment conditions, and the recombinant spore can be orally administered to animals directly.

[见续页]



WO 2012/122765 A1



SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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))。

(57) 摘要:

将家蚕乙醇脱氢酶作为外源蛋白展示在枯草芽孢杆菌表面。以枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因 *cotC* 为分子载体, 与家蚕乙醇脱氢酶基因 *Bmadh* 重组, 构建出融合表达家蚕乙醇脱氢酶 *BmADH* 的整合型重组质粒。以之转化枯草芽孢杆菌, 通过同源重组使外源基因整合于染色体上特定定位点的淀粉酶基因 *amyE* 中, 使淀粉酶基因被破坏而导致重组菌株无淀粉酶活性, 以此筛选出含有融合表达 *CotC-BmADH* 的重组枯草芽孢杆菌菌株。通过诱导表达该重组菌株得到表面展示有家蚕乙醇脱氢酶融合蛋白的芽孢。使原本对温度和 PH 不稳定的乙醇脱氢酶成为可在不同环境条件下具有相对稳定活性的乙醇脱氢酶融合蛋白, 所产生的重组芽孢可用于动物直接口服。

一种表面展示家蚕乙醇脱氢酶重组芽孢及其制备方法

技术领域

本发明属于重组融合蛋白技术领域。具体涉及将乙醇脱氢酶作为外源活性蛋白展示在枯草芽孢杆菌表面的方法和重组芽孢。而言是指：利用枯草芽孢杆菌在极端的温度、干燥以及暴露于有机溶剂和其他毒性化学物质等不利条件下能长期存活的性质，通过分子生物学方法将有活性的乙醇脱氢酶基因与芽孢衣壳蛋白基因重组后进行表达，使原先对温度和 PH 不稳定的乙醇脱氢酶成为可在不同环境条件下具有相对稳定活性的乙醇脱氢酶融合蛋白。

背景技术

乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)属于氧化还原酶家族,能够以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)为辅酶,催化伯醇和醛之间的可逆反应。ADHs 在很多生理过程中都起着重要作用,参与例如类固醇、类维生素A、脂质过氧化产物、脂肪酸、乙醇等代谢过程。在人和哺乳动物体内,ADH 与乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)构成了乙醇脱氢酶系,参与体内乙醇代谢,是人和动物体内重要的代谢酶。

目前,ADH 的应用研究主要体现在以下几个方面:①ADH 生物电极和乙醇生物传感器,可用于工业分析乙醇浓度;②ADH 的催化特性,在化学工业中应用于许多原材料及中间反应物的生产;③ADH 作为人和动物重要的生理指标用于各项研究;④伴随生物技术和酶工业的发展,ADH 被作为新的实验材料,用于开展各种新的研究。其中,利用乙醇脱氢酶开发有效的解酒产品已受到广泛关注。在肝脏中,ADH 与 ALDH 总活力的高低决定了乙醇代谢的速度。因此,在众多的解酒药物研究方面,ADH 活性已被作为一项重要的检测指标,用于观察解酒药物对 ADH 是否具有诱导作用,以便了解药物能否加快乙醇分解代谢,从而减少乙醇对人体的损害。同时开发高活性的 ADH 与 ALDH 已经成为解酒药研究的重要方向之一。

然而,ADH 对乙醇的催化活力对环境条件敏感,如温度和 PH 值不适则易失活,这一缺点极大地影响了 ADH 的应用前景。随着生物工业生产对酶催化功能需求的日益增加,寻求一种新方法生产催化活性更稳定的酶蛋白是十分必要的。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是好氧型的革兰氏阳性菌, 它在营养缺乏或其他胁迫条件下, 能形成具有抗逆性的休眠体——芽孢, 在适宜条件下芽孢又能萌发成具有繁殖能力的营养细胞。芽孢易培养易分离, 可以免去复杂的分离纯化操作。芽孢是生命世界中抗逆性最强的一种结构, 其稳定性好, 能耐氧化, 耐高温, 并且在抗化学药物和抗辐射等方面也十分突出, 可在恶劣环境中存活几年至几十年。芽孢在酸性胃环境中能保持活性, 可以耐唾液和胆汁的攻击, 从而顺利通过动物消化道。研究证明, 枯草芽孢杆菌对生物体无致病性, 能作为抑制有害细菌(大肠杆菌、沙门氏杆菌)的益生素被人或动物口服(Mazza, P. 1994. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. Boll. Chim. Farm. 133:3-18.) 目前市面上已有口服枯草芽孢杆菌活菌胶囊产品, 北京紫竹药业有限公司, 国药准字 S20030018 (<http://www.777aaa.com/html/yao/200791823402711963569029.htm>), 表明枯草芽孢杆菌芽孢可以通过人口服使用而产生药效性。由于以上理化及生理特性, 再加上其基因组的破译和可操作的遗传系统的建立, 枯草芽孢杆菌芽孢成为备受关注的新型蛋白或酶类药物载体。芽孢衣壳上的三种蛋白 CotB、CotC 和 CotG 由于暴露在芽孢表面而成为外源蛋白的新型表达系统, 目前已有报道利用这种新型表达系统成功表达了一些外源蛋白, 如对虾白斑综合征病毒蛋白 Vp28 等, 但是由于生物的特异性、基因表达受多种因素影响等原因, 利用该表达系统是否能成功表达其他特定的活性蛋白仍有待研究。

本发明以从模式生物家蚕 *Bombyx mori* 体内克隆得到的乙醇脱氢酶作为外源分子, 以枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白 CotC 为载体, 通过芽孢表面展示技术将家蚕乙醇脱氢酶 (BmADH, GeneBank 登录号: NP_001037610.1) 展示在芽孢表面, 使 BmADH 获得大量表达的同时具有良好的抗逆性, 提供了快速大量制备具有稳定活性的重组乙醇脱氢酶产品的方法。本发明的产品在保持了枯草芽孢杆菌芽孢生理特性的基础上, 对乙醇的催化稳定性较之原家蚕乙醇脱氢酶蛋白有明显提高, 迄今尚未见类似的报道和发明专利。

发明内容

为了解决乙醇脱氢酶因在极端条件下的不稳定性而在工业应用上存在的困难, 本发明以家蚕乙醇脱氢酶 BmADH 为例, 提供了一种表面展示乙醇脱氢酶 ADH 的重组芽孢的制备方法和产品。本发明以枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白 CotC 为载

体,通过芽孢表面展示技术将 BmADH 展示在枯草芽孢杆菌的芽孢表面,得到在不同温度、PH 条件下具有较稳定活性的融合蛋白,可用于动物直接口服,成为一种新型的乙醇脱氢酶药物营养品。相对于其他乙醇脱氢酶蛋白产品,本发明表面展示乙醇脱氢酶蛋白的制备方法和分离过程简单快速,产生的融合蛋白生物活性更稳定,具有更广泛的应用价值。

本发明所采用的技术方案为:

一种表面展示家蚕乙醇脱氢酶 BmADH 重组芽孢的制备方法,利用枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因为分子载体,与家蚕乙醇脱氢酶基因重组,构建融合表达的整合型重组质粒,并转化枯草芽孢杆菌获得枯草芽孢杆菌重组菌株,诱导重组菌株产生芽孢,在芽孢表面展示具有乙醇脱氢酶活性的融合蛋白。

本发明的具体操作是:通过反转录 PCR 的方法从家蚕 cDNA 文库中扩增获得家蚕乙醇脱氢酶 BmADH 的 cDNA,将获得的基因连接到克隆载体中测序正确之后,再将家蚕乙醇脱氢酶基因 *Bmadh* 连接到融合表达质粒 pJS700(本实验室保存),构建出整合型重组质粒 pJS700-BmADH。用该质粒转化枯草芽孢杆菌,采用耗竭法诱导宿主菌产生芽孢,在芽孢表面展示有融合蛋白 CotC-BmADH。

本发明选择具有良好的转化能力并且可以产生芽孢的枯草芽孢杆菌菌株为重组质粒的转化菌株,例如 *Bacillus subtilis* 168 及其衍生的一系列菌株 (Bacillus Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, The Ohio State University, West 12th Avenue, Columbus, Ohio, 43210, USA);选择芽孢衣壳蛋白基因 *cotC* (GenBank 序列号: NP_389653) 作为表面展示蛋白的分子载体,选择家蚕乙醇脱氢酶基因 *Bmadh* 为重组基因。枯草芽孢杆菌为环境友好型细菌,其在营养缺乏时会分化形成休眠体芽孢,芽孢具有极强的抗逆性,可耐酸碱、耐高温,存活能力较强;并因其比重大,容易进行分离纯化。枯草芽孢杆菌的培养方法简单方便,生长迅速,营养要求简单,容易进行工业放大培养。在枯草芽孢杆菌的芽孢表面展示家蚕乙醇脱氢酶,使其在获得快速大量表达的同时具有良好的抗逆性和稳定性,并且分离纯化简便快捷。

本发明涉及发明所选择的芽孢衣壳蛋白基因 *cotC* 与 *Bmadh* 基因编码序列重组后构建的重组质粒,在此重组质粒中含有芽孢衣壳蛋白基因的启动子、不含终止密码子的编码序列与 *Bmadh* 基因的编码序列重组后的基因,可在枯草芽孢杆菌

分化形成芽孢时融合表达 CotC-BmADH。通过构建整合型重组质粒，使得融合基因 *cotC-Bmadh* 整合于枯草芽孢杆菌染色体上的特定位点并稳定地进行遗传繁殖，避免了质粒在枯草芽孢杆菌细胞中容易丢失的缺点。

带有 *Bmadh* 的表达载体可以通过热击法或电穿孔法转化宿主细胞。使用本领域熟知的方法鉴定经过成功转化带有本发明构建的融合基因的细胞。如细胞的收集、裂解、淀粉板鉴定、提取染色体和 PCR 鉴定等，也可以在诱导表达后用 BmADH 特异抗体进行 Western blotting 鉴定。

本发明还涉及所构建的重组整合型质粒转化枯草芽孢杆菌筛选所得到的重组菌株，这些重组菌株诱导形成的芽孢表面展示有重组家蚕乙醇脱氢酶，可通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测其芽孢表面展示的重组蛋白，并检测其对乙醇的催化活力。

本发明涉及基因 *Bmadh* 编码序列片段克隆的引物序列：

Bmadh-F：5' -GGGGTACCATGGCACCGGATTTCGTGAAGCGTT-3'，下划线表示 KpnI 限制性酶切位点；

Bmadh-R：5' -CGAGCTCCTATGTCTTGGAGAGTATTTGGA-3'，下划线表示 SacI 限制性酶切位点。

本发明涉及枯草芽孢杆菌淀粉酶基因 *amyE* (GenBank 序列号：NP_388186) 片段扩增的引物序列：

amyE-F：ATTGCTCGGGCTGTATGACTGG

amyE-R：GTTACACCATCACTGTTCGTTCTT

本发明的突出优点表现为：将家蚕乙醇脱氢酶 BmADH 展示在枯草芽孢杆菌表面，利用芽孢所具有的独特抗逆性，使得原本对温度、PH 值不稳定的酶蛋白成为具有相对稳定的乙醇催化活力的融合蛋白，克服了乙醇脱氢酶普遍具有的不稳定性缺点。本发明构建的表面展示家蚕乙醇脱氢酶 BmADH 的枯草芽孢杆菌重组芽孢可通过动物消化道屏障直接用于口服，成为一种新型的乙醇脱氢酶营养品或动物营养品。本发明产品表达量大、制备方法和分离过程相对于其他乙醇脱氢酶样品更为简单快速，具有更好的稳定性和更广泛的应用价值，在一定程度上拓展了其工业应用前景，也为提高其他酶蛋白的稳定性提供了参考。

附图说明

图 1 是发明人克隆的家蚕乙醇脱氢酶 BmADH 在 GenBank 中检索到的核苷酸序列和氨基酸序列，登录号 NP_001037610.1。小写字母为核苷酸序列，起始密码子和终止密码子用方框标出；大写字母为氨基酸序列，TATA-box 用斜体带下划线标出，Poly-A 信号用下划线标出，方框中的为保守氨基酸序列。

图 2 是融合表达 CotC-BmADH 整合型重组质粒 pJS700-BmADH 的构建方法及其结构图谱。*amyE* 5' -end 和 *amyE* 3' -end 分别表示淀粉酶基因编码序列的 5' 端和 3' 端，*Amp^r*，*Em^r* 分别表示氨苄青霉素抗性基因和红霉素抗性基因。*cotC-Bmadh* 为在 *Bacillus subtilis* 168 (*trp⁻*) 的芽孢中融合表达 CotC-BmADH 重组蛋白的基因片段。*oriC* 为大肠杆菌复制子片段。

图 3 是 *Em^r-cotC-Bmadh* 基因片段在 *Bacillus subtilis* 168 (*trp⁻*) 染色体中的整合示意图。

图 4 是重组菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp⁻*)/pJS700-BmADH 的淀粉酶活性分析。A：在淀粉平板上培养野生型菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp⁻*) 和重组菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp⁻*)/pJS700-BmADH；B：在淀粉平板上被碘液染色后的野生型菌株和重组菌株。

图 5 是 PCR 检测重组菌株中的 *Em^r-cotC-Bmadh* 片段。Marker： λ -EcoT14 I digest Marker；分别以 *Bacillus subtilis* 168 (*trp⁻*) (Wild-type, W) 和 *Bacillus subtilis* 168 (*trp⁻*)/pJS700-BmADH (Mutant, M) 的染色体为模板，用 *amyE*-F/*amyE*-R、*BmADH*-F/*BmADH*-R、*BmADH*-F/*amyE*-R 和 *amyE*-F/*BmADH*-R 四对引物（引物对的在染色体中的位置见附图 3）进行 PCR 鉴定重组基因。

图 6 是转基因重组芽孢表面展示的 CotC-BmADH 融合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。M 为 Marker，泳道 1 为野生型菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp⁻*) 对照，泳道 2 为重组菌株融合蛋白。

图 7 是转基因重组芽孢表面展示的 CotC-BmADH 融合蛋白与原 BmADH 蛋白在不同 PH 值和温度条件下的乙醇脱氢酶活力比较。实线所示 PJS700-BmADH 表示本发明所得融合蛋白，虚线所示 BmADH 表示原 BmADH 蛋白。

具体实施方式

实验材料：

各种限制性内切酶、T₄ DNA ligase、*LA Taq*、*Taq*酶，pMD18-T载体均购至宝生物工程（大连）有限公司，PCR引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成，测序由百奥迈科(Biomics)生物技术有限公司完成，用于本发明的所有DNA片段的回收均采用Omega Bio-Tek Gel Extraction Kit分离纯化，大肠杆菌菌株DH5 α （中国普通微生物保藏管理中心CGMCC，北京市朝阳区北辰西路1号院，中科院微生物研究所，100101）为本实验室保存，其它试剂均为国产分析纯。

在本发明中所使用的术语，非特别说明的情况下，一般为本领域普通技术人员所理解的含义。以下实施例中未作具体说明的实验操作方法均参照《分子克隆实验指南》(Sambrook等编著，科学出版社，1992年版)、试剂盒说明书、及产品说明书进行。以下的实施例只是为了举例说明本发明，并非以任何方式限制本发明的范围。在以下实施例中，未详细描述的一些过程和方法都为技术领域技术人员熟悉和了解的常规方法。所用试剂的来源、商品名，均在首次出现时标明，其后所用相同试剂如无特殊说明，均与首次标明的相同。本发明实施例中涉及的由发明人保存的生物材料，均可向公众提供20年。

实施例 1：家蚕乙醇脱氢酶 *Bmadh* 基因的克隆、测序及鉴定

本发明所用家蚕品种由江苏大学生命科学院饲养提供。取家蚕中肠组织，放入用液氮预冷的研钵中，加入液氮进行研磨，用 RNA 提取试剂盒分离 mRNA，通过反转录 PCR 技术获得家蚕乙醇脱氢酶基因的 cDNA 序列。

家蚕乙醇脱氢酶*Bmadh*基因片段的PCR扩增引物为：

Bmadh-F: 5' -GGGGTACCATGGCACCGATTTCGTGAAGCGTT-3' (SEQ ID NO.1),
下划线表示 KpnI 限制性酶切位点；

Bmadh-R: 5' -CGAGCTCCTATGTCTTGAGAGTATTTGGA-3' (SEQ ID NO.2),
下划线表示 SacI 限制性酶切位点。

PCR反应体系按 *TaKaRa LA Taq* 使用说明书严格进行，25 μ L 反应体系中含 *TaKaRa LA Taq* 0.2 μ L，10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg²⁺ Plus) 2.5 μ L，dNTP Mixture（各2.5 mM）2.5 μ L，模板DNA 1 μ L，上下游引物(20 μ M)各0.5 μ L，加灭菌超纯水补齐。PCR条件为：94 $^{\circ}$ C 变性5min，94 $^{\circ}$ C 1min，61 $^{\circ}$ C 40 s，72 $^{\circ}$ C 2min，30个循环。将大小为825bp的PCR产物克隆于pMD18-T载体中，转化大肠杆菌DH5 α ，筛选克隆菌株，提取质粒，通过PCR及 *KpnI* 和 *SacI* 双酶切及琼脂糖凝胶电泳鉴定

阳性克隆后，对重组质粒进行测序。克隆的重组质粒命名为pMD18-T-BmADH，重组子菌株命名为DH5 α /pMD18-T-BmADH。阳性重组菌株保存在含有15%甘油的LB培养基中，冻存于-80℃。

经测序重组质粒中乙醇脱氢酶Bmadh基因序列为SEQ ID NO. 3所示

```
gctgcaggaa ttcgaattcg gcaacagtag agtgcactgc gtcgctatct acggacacca
gtaacatata aatatgatgt aattgttgggt ttccaaatgg caccggattt cgtgaagcgt
tttgtggatg tcgacgataa agtgttcttg gtgaccgggtg gtgcggccgg cgctggcgct
ggcttggatc aggcgttgct gttcgaaaat gcacggcacg tcgcgtttct agatgtcgct
gaccgagaag gggccgccct ggaggcccaa cttataatca agttcggtgc cttgagagtg
aagttcataa agtgcgacgt aggagacgaa cgtcaactcg cttctgcata caaacaagtg
ttggacaaat acaaaaggct tgacggcgctc ataaacagcg ctgcagtact tagcgctgat
gataactctt tcaacagaat gattgatata aattttacgg gcacagtga tagtactctg
aaagcgctcg atattatggg ggcagataaa ggcggttctg gcggtgttat agtgaatata
tcgtccctac ttgctcttaa tctcaccagc catttacctg tttacgccgc tactaaagca
gcggtattac agttcagcat tagaatgggc acgcaggaa aatttaccgc gactaaagta
cgggtattgt ccgtatgcct cgggcccact gacactgcta tcctttacaa gaacaactta
accaagtttg atacagagta cgctccgtgt ttgtcttcgc gtgcccccg gagacaaaga
gtcgagtcag ccgttaaggg tattttggag gtgatcaaca aagcgagcac cggagatacg
tgatcggtg aaagcgacaa accggcatac gattttactc aaaatatata cgaagccttc
caaatactct ccaagacata gatttacgag ttattataaa tcggctatac ggcgaaatcg
attctgaggc ttcctgcgca aagctaatat tttccttgat gctatatatt ctcataatgt
aagatattcg aataggtaaa tattgtgaat cgtattgtta ttggattttg tattacacgt
ctattttcat atcaaaaaaa aaaa
```

下划线处分别为起始密码子和终止密码子。测序结果与 GenBank 中

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)的核苷酸序列一致，见图 1。

实施例2：以CotC为载体展示BmADH的枯草芽孢杆菌重组芽孢的制备

1. 重组整合型质粒pJS700-BmADH的构建

质粒 pJS700(李倩.以 CotX 为分子载体表面展示 WSSV 囊膜蛋白 Vp19 和 Vp28 的枯草芽孢杆菌重组芽孢的研究[D]. 江苏镇江：江苏大学，2010:36-38) 由江苏大学环境学院宁德刚副教授惠赠，该质粒大小约为 5.5kb。在 pJS700 质粒中，*amyE* 5' -end 和 *amyE* 3' -end 分别表示淀粉酶基因 *amyE* (GenBank 登录号：NP_388186)编码序列的 5' 端和 3' 端，通过同源重组整合在 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*)染色体的淀粉酶基因中。

淀粉酶基因 *amyE* 的 PCR 扩增引物为：

amyE-F: ATTGCTCGGGCTGTATGACTGG (SEQ ID NO. 4)

amyE-R: GTTACACCATCACTGTTTCGTTCCCTT (SEQ ID NO. 5)

Amp^r, *Em^r* 分别表示氨苄青霉素抗性基因和红霉素抗性基因, 在大肠杆菌和 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*) 中作为筛选标记。*cotC* 为枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白 CotC 基因, 该基因片段含有 *cotC* 基因 (GenBank 序列号: NP_389653) 的启动子序列、不含有 *cotC* 终止密码子的 CotC 编码序列。*oriC* 为大肠杆菌复制子片段。

分别用 *KpnI* 和 *SacI* 酶切质粒 pMD18-T-BmADH 和 pJS700, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 *Bmadh* 片段和 pJS700, 用 T₄ DNA ligase 连接两双酶切后纯化好的片段, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 转化物涂布于含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板中 37℃ 培养过夜, 次日挑选阳性单克隆菌株于含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 培养 12 至 16h, 提取质粒, 通过 PCR 及 *KpnI* 和 *SacI* 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆, 鉴定正确后将重组整合型质粒命名为 pJS700-BmADH, 阳性重组菌株命名为 DH5 α /pJS700-BmADH。该重组整合型质粒 pJS700-BmADH 中含有重组基因 *cotC-Bmadh*, 该质粒的构建过程及其图谱见图 2。

2. 融合表达重组芽孢的枯草芽孢杆菌菌株的筛选与鉴定

将整合型重组质粒 pJS700-BmADH 转化 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*) (Bacillus Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, The Ohio State University, West 12th Avenue, Columbus, Ohio, 43210, USA), 两者的同源区域发生重组, 且重组基因插入淀粉酶基因 *amyE*, 破坏了其淀粉水解酶活性, 见图3。用含有 0.4 μ g/mL 红霉素 (Sigma) 的 LB 平板筛选重组子, 从平板上挑选单菌落接种于含 1% 淀粉的 LB 平板中, 37℃ 过夜培养, 次日用碘-碘化钾溶液对淀粉平板染色来鉴定重组菌株。1% 淀粉平板的制备方法: 100mL LB 固体培养基中加可溶性淀粉 0.1g, 高压蒸汽灭菌后倒制平板。碘-碘化钾溶液的配制: 碘化钾 2g, 碘 1g, 蒸馏水 300mL, 先将碘化钾溶于少量去离子水中, 待全部溶解后再加入碘, 振荡溶解后稀释至 300mL, 避光保存在棕色玻璃瓶中, 用时可稀释 2~10 倍。取适量碘-碘化钾溶液滴于淀粉平板上, 菌落周围产生透明水解圈表明重组基因没有插入淀粉水解酶基因 *amyE* 中, 菌落及其周围颜色变蓝表明重组基因成功的插入到了 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*) 染色体上的淀粉酶基因 *amyE* 中, 因而导致淀粉水解酶失去活性, 见图4。

为了进一步鉴定重组菌株中正确插入了 *Em^r-cotC-Bmadh* 基因, 发明人以枯草芽孢杆菌的染色体为模板, 分别以 *amyE*-F/*amyE*-R、*BmADH*-F/*BmADH*-R、*BmADH*-F/*amyE*-R 和 *amyE*-F/*BmADH*-R 四对引物进行PCR扩增。PCR反应体系按 *TaKaRa LA Taq* 使用说明严格进行, 25 μ L 反应体系中含 *TaKaRa LA Taq* 0.2 μ L, 10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg²⁺ Plus) 2.5 μ L, dNTP Mixture (各2.5 mM) 2.5 μ L, 模板DNA 1 μ L, 上下游引物 (20 μ M) 各0.5 μ L, 最后加灭菌超纯水补齐。PCR反应条件根据各个引物对的特征分别设置。在重组菌株中分别检测到大小约为4200bp、825bp、700bp 和2650bp的扩增片段, 而野生型菌株中只检测到约1100bp的淀粉酶基因, 见图5。这表明重组菌株染色体上含有 *Em^r-cotC-Bmadh* 重组基因, 并且 *Em^r-cotC-Bmadh* 重组片段成功的插入到了淀粉水解酶基因 *amyE* 中。将鉴定后的重组菌株命名为 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)/pJS700-BmADH。

枯草芽孢杆菌染色体的提取方法为: 挑单菌落接于LB培养基中, 在37 $^{\circ}$ C摇床中培养至OD₆₀₀值为1.0左右。取1.5mL菌液于Eppendorf管中, 8000rpm离心10min, 弃上清, 加100 μ L pH8.0的TE缓冲液 (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 洗沉淀, 离心去上清, 再加100 μ L TE悬浮沉淀; 向悬浮液中加30 μ L 100mg/ml溶菌酶溶液, 不要摇晃, 在37 $^{\circ}$ C培养箱中放1h, 加50 μ L 10%SDS和20 μ L 20mg/mL蛋白酶K, 37 $^{\circ}$ C继续培养1h; 补TE至300 μ L, 分别加150 μ L苯酚和氯仿抽提, 12000rpm离心10min, 取上清; 再加300 μ L氯仿, 12000rpm离心5min, 取上清, 加1/4体积5M的NaCl, 2倍体积的无水乙醇, 室温下沉淀DNA 2h, 12000rpm离心10min, 收集沉淀, 用500 μ L 70%的乙醇洗沉淀, 待挥发干后, 加10 μ L TE缓冲液溶解沉淀, 取1 μ L用琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度, 剩余的可放于-20 $^{\circ}$ C中保存备用。

3. 表面展示家蚕乙醇脱氢酶重组芽孢的诱导及鉴定

用DSM培养基诱导重组菌株 *Bacillus subtilis* 168 (*trp*⁻)/pJS700-BmADH 形成芽孢。DSM培养基的配方为: 0.8% nutrient broth (营养肉汤Difo), 0.1% KCl, 0.025% MgSO₄ · 7H₂O, 1.0mM Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 10 μ M MnCl₂, 1.0 μ M FeSO₄。将和重组菌株分别接种于DSM培养基中, 采用耗竭法培养48小时诱导宿主菌产生芽孢, 取培养物进行处理。芽孢蛋白的处理方法: 12000rpm $\times$ 10min离心收集菌体, 重悬于相同体积的GTE Buffer (50mM葡萄糖, 20mM pH7.5 Tris-HCl, 10mM EDTA, 2mg/mL溶菌酶) 中, 37 $^{\circ}$ C处理30分钟用以破坏营养细胞, 12000rpm $\times$ 10min沉淀芽孢, 用pH7.4的PBS洗3次后重悬于相同体积的SDS-DTT缓冲液 (0.1mM pH 7.4

PBS, 50mM DTT, 1.5%SDS) 中, 65℃水浴处理10min, 进行SDS-PAGE后用考马斯亮蓝染色得到大小约为41kD的条带。为了鉴定该条带是否为目标融合蛋白, 以免抗BmADH血清为一抗做Western blotting检测重组菌株和野生型菌株的芽孢蛋白。杂交结果显示: 野生型菌株48h的培养物中没有检测到蛋白条带, 而重组菌株泳道出现大小约为41kD的条带, 表示在芽孢形成的过程中, BmADH随着芽孢衣壳蛋白CotC一同得到表达, 因而能作为融合蛋白被BmADH特异抗体检测到, 见图6。这表明重组芽孢中家蚕乙醇脱氢酶通过衣壳蛋白载体CotC被展示在了重组芽孢的表面。并且从PAGE胶上可以看出, 孢子上的其他蛋白相对目标融合蛋白表达量十分小, 即杂蛋白量少, 体现了本发明纯化步骤简单的优点。

4. 融合蛋白的乙醇脱氢酶活力测定

由于乙醇脱氢酶在催化乙醇的过程中消耗辅酶 NAD^+ 产生NADH, 其酶活力可通过用紫外分光光度计在340nm处检测 NAD^+/NADH 的含量测得。反应液成分及体积比为: 2 M 乙醇: 0.5M NAD^+ : 缓冲液=1: 3: 2。将本反应体系在一定温度下孵育10分钟后, 按30: 1的体积比加入重组孢子蛋白。在第1、4、6、8、10分钟分别取混合液离心后记录上清液在340nm处吸光值, 读数差值记为 ΔA_{340} 。以野生型菌株*Bacillus subtilis* 168 (*trp*) 的孢子蛋白作为负对照。每分钟消耗 $1\mu\text{mol}$ NAD^+ 被定义为1个单位 (unit) 的乙醇脱氢酶活力。计算公式: $(\Delta A_{340} \times V) / (6.22 \times b \times W \times \Delta t)$, V为反应液总体积, b为比色皿厚度, W为样本蛋白含量, 用BCA蛋白定量试剂盒 (Pierce) 测得, Δt 为吸光值改变的前后时间差 (分钟)。

为了测得融合蛋白酶活力在不同PH值下的稳定性, 发明人选取了0.1M醋酸钠缓冲液, pH 4.0; 0.1M磷酸盐缓冲液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 7.0; 0.1M NaOH/甘氨酸缓冲液, pH8.0、9.0、10.0, 分别作为缓冲液加入反应液体系, 测定25℃时不同PH值条件下的酶活力。为了测得融合蛋白酶活力在不同温度下的稳定性, 发明人以pH9.0的0.1M NaOH/甘氨酸为缓冲液, 分别测定融合蛋白在16℃、20℃、25℃、30℃、37℃下的酶活力。将结果与原来的BmADH蛋白酶活力做比较 (Nan Wang, et al. 2011. *Genetics and Molecular Biology*, accepted), 结果显示本发明所的产品酶活力稳定性大大增加, 见图7。

权利要求书

1. 一种表面展示家蚕乙醇脱氢酶重组芽孢的制备方法，其特征在于：利用枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因为分子载体，与家蚕乙醇脱氢酶基因重组，构建融合表达的整合型重组质粒，并转化枯草芽孢杆菌得到枯草芽孢杆菌重组菌株，诱导重组菌株产生的芽孢表面展示家蚕乙醇脱氢酶的重组芽孢。
2. 按照权利要求 1 所述的表面展示家蚕乙醇脱氢酶重组芽孢的制备方法，其特征在于：所述的枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因为 *cotC*。
3. 按照权利要求 2 所述的表面展示家蚕乙醇脱氢酶的重组芽孢的制备方法，其特征在于：所述的融合表达的整合型重组质粒是将枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因 *cotC* 与家蚕乙醇脱氢酶基因重组构建的质粒。
4. 按照权利要求 3 所述的表面展示家蚕乙醇脱氢酶的重组芽孢的制备方法，其特征在于：所述的枯草芽孢杆菌重组菌株是整合型重组质粒转化枯草芽孢杆菌所得到的菌株，该菌株染色体上含有适用于枯草芽孢杆菌的选择标记基因、以及芽孢衣壳蛋白基因与家蚕乙醇脱氢酶基因的编码序列重组后的基因，这些基因插入淀粉酶基因中导致重组菌株的淀粉酶基因失活。
5. 按照权利要求 4 所述的表面展示家蚕乙醇脱氢酶的重组芽孢，其特征在于，重组芽孢是枯草芽孢杆菌重组菌株诱导形成的枯草芽孢杆菌的芽孢，芽孢表面展示有家蚕乙醇脱氢酶 BmADH。
6. 一种表面展示家蚕乙醇脱氢酶重组芽孢，其特征在于：是通过以下方法制备：利用枯草芽孢杆菌芽孢衣壳蛋白基因为分子载体，与家蚕乙醇脱氢酶的基因重组，构建融合表达的整合型重组质粒，并转化枯草芽孢杆菌得到枯草芽孢杆菌重组菌株，诱导重组菌株产生的芽孢表面展示家蚕乙醇脱氢酶的重组芽孢。

```

-96          GCTGCAGGAATTGGAATTCGGCAACAGTACAGTGCA
CTGGTCGCTATCTACGGACACAGTAACA/ATAAAATGATGTAATGTTGGTTTCCAA
1  ATGACACCGGATTTCTGTGAAGCGTTTGTGGATGTCGACGATAAAGTGTTCGTGACC
M A P D F V K R F V D V D D K V F L V T
61  GGTGGTCCGGCCGCTCGGCGCTGGCTTGGTCAAGCGTTGCTTTCGAAAATGCACGG
G G A A G V G A G L V K A L L F E N A R
121 cagctcgctttctagatgtcgtgaccgagaaggccgcccctggaggcccaacttata
H V A F L D V A D R E G A A L E A Q L I
181 atcaagttcgggtccttgagagtgaaagttcataaagtcgacgtaggagacgaacgtcaa
I K F G A L R V K F I K C D V G D E R Q
241 ctgcttctgcatacaacaaggtgttgacaaatacaaaaggcttgacggcgctcataaac
L A S A Y K Q V L D K Y K R L D G V I N
301 agcgtgcagctacttagcgtcgatgataactctttcaacagaatgattgatatcaatttt
S A A V L S V D D N S F N R M I D I N F
361 acgggcacagtgaaatagctctgaaagcgctcgatattatggggcagataaaggcgg
T G T V N S T L K A L D I M G A D K G G
421 tctggcggtattatagtgaaatatactgctccacttgcctttaaactcaccagccattta
S G G V I V N I S S L L A L N L T S H L
481 cctgtttacggcgctactaaagcgggtattacagttcagcattagaatgggcacgag
P V Y A A T K A A V L Q F S I R M G T Q
541 gaacaatttaccggactaaagtcaggtattgtccgtatgcctcgggccactgacact
E Q F T R T K V R V L S V C L G P T D T
601 gctatcctttacaagaacaacttaaccaagtttgatacagagtcagctccgtgtttgtct
A I L Y K N N L T K F D T E Y A P C L S
661 tgcgtgcccccgtagacaaagagtcagtcagccgttaagggtattttggagggtatc
S R A P V R Q R V E S A V K G I L E V I
721 aacaaagcagcaccggagatcagtggtatcggtgaaagcgacaaaccggcatacgtttt
N K A S T G D T W I V E S D K P A Y D F
781 actcaaaatataatcgaagccttccaaatactctccaagacaTGGATTACGAGTTATTA
T Q N I S E A F Q I L S K T *
TAAATCGGCTATACGGCGAAATCGATTCTGAGGCTTCCTGCGCAAAGCTAATATTTTCTT
TGATGCTATATTTTCTCATAATGTAAGATATTCGAATAGGTAATATTTGTAATCGTATT
GTTATTGGATTTTGTATTACAGCTATTTTCATATCAAAAAAAAAA

```

图 1

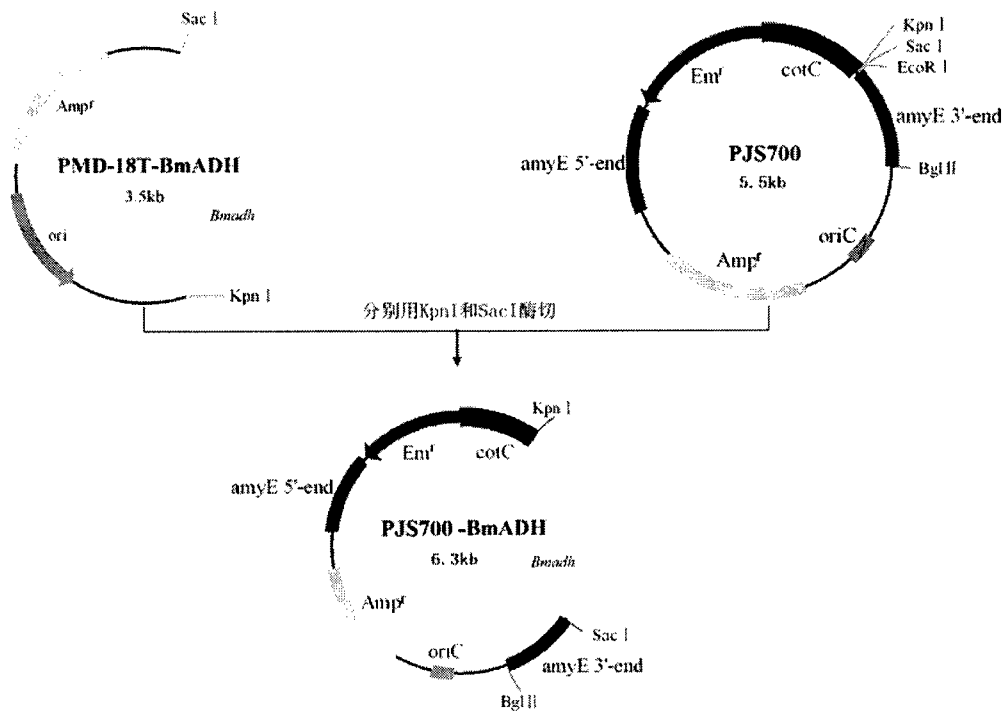


图 2

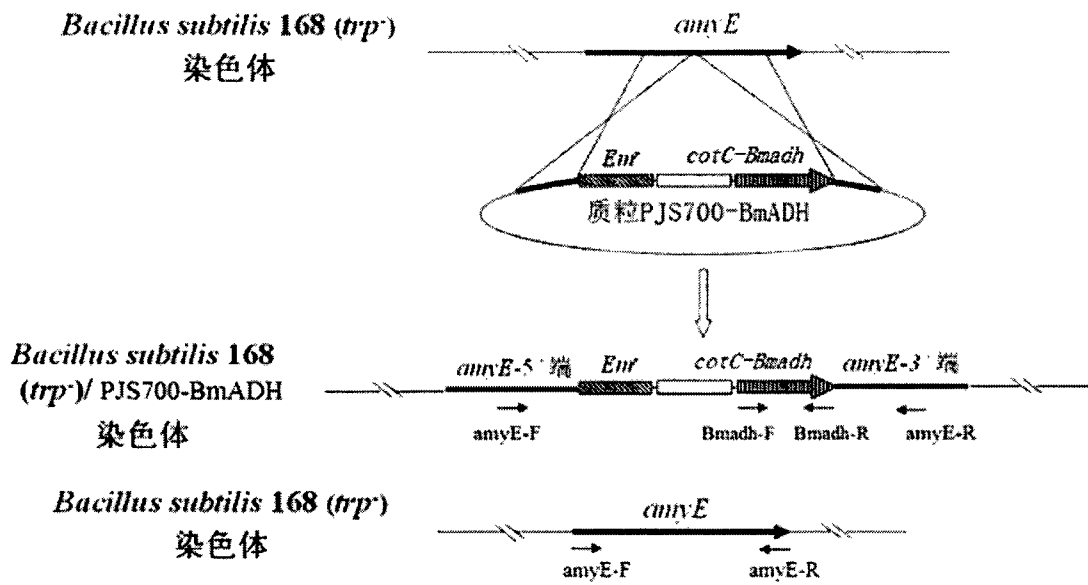


图 3

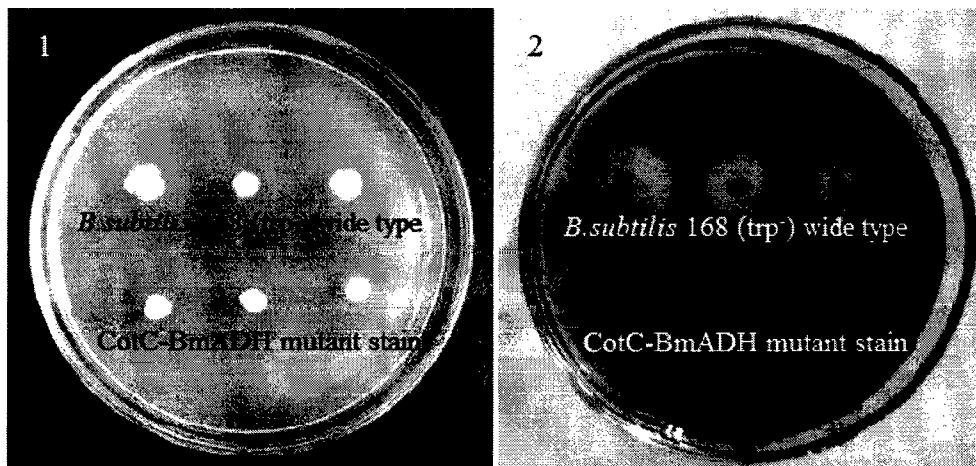
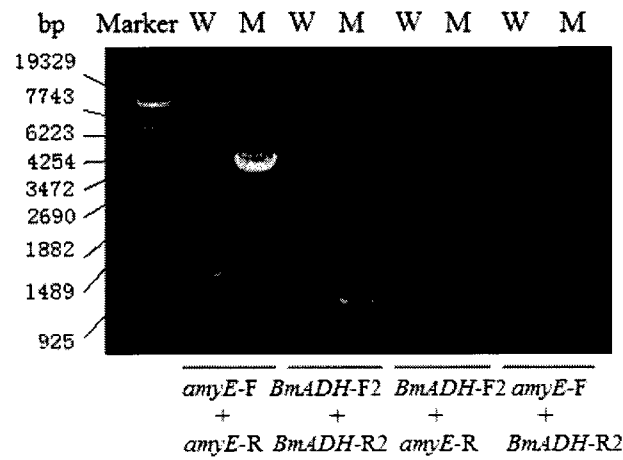


图 4



W : *Bacillus subtilis* 168 (*trp*-) wild type
M : *Bacillus subtilis* 168 (*trp*-)/ PJS700-BmADH mutant

图 5

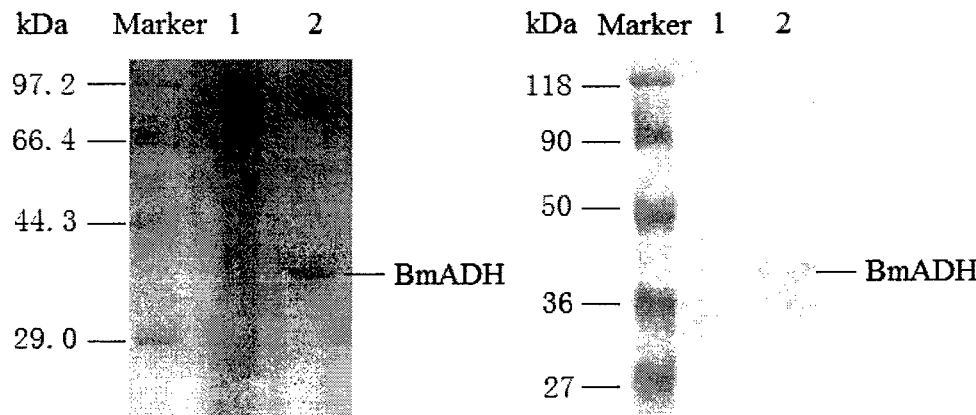


图 6

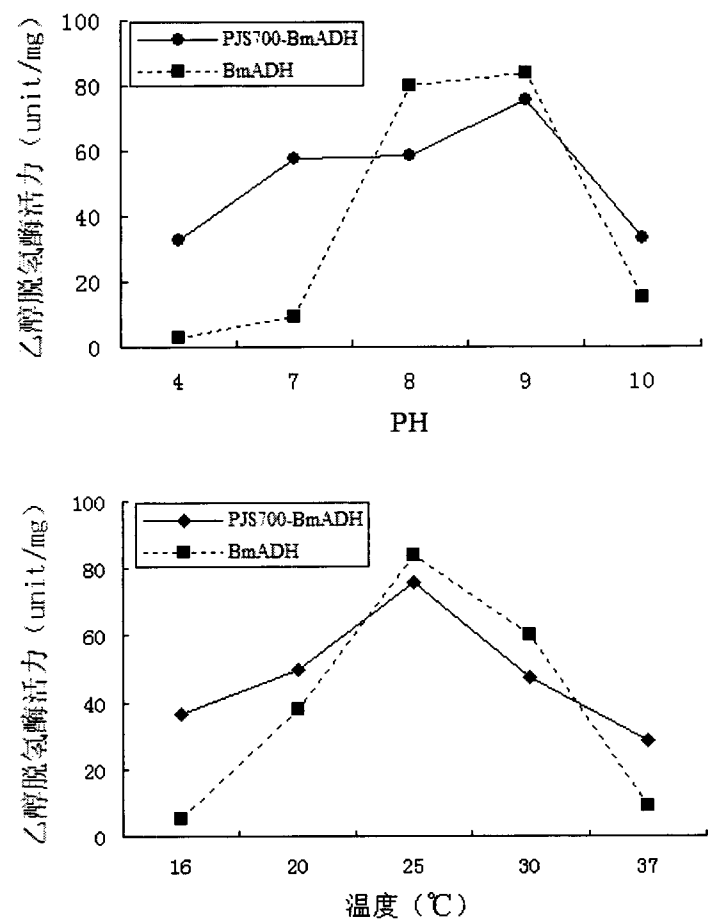


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/076941

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

Databases: CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL
USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, cnki, isi web of knowledge;

Search terms: spore surface, Bombyx mori, Alcohol Dehydrogenases, adh, bmadh, capsid, spore surface, silkworm, bacillus, bacillus subtilis, plasmid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Nan Wang et al., "Display of Bombyx mori Alcohol Dehydrogenases on the Bacillus subtilis Spore Surface to Enhance Enzymatic Bacillus subtilis Spore Surface to Enhance Enzymatic Activity under Adverse Conditions", PLoS ONE, Vol.6, No.6, pages1-6, 30Jun.2011(30.06.2011), see page 1, figure 1	1-6
PA	Nan Wang et al., "Cloning, expression and characterization of alcohol dehydrogenases in the silkworm Bombyx mori", Genetics and Molecular Biology, Vol.34,No.2,pages 240-243, published on line: 1Apr.2011(01.04.2011), see the whole document	1-6

☒ 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 31Oct.2011(31.10.2011)	Date of mailing of the international search report 10Nov.2011(10.11.2011)
Name and mailing address of the ISA 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 WANG, Qiyang Telephone No. (86-10)62411091

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/076941

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO2010031772A3(DSM IP ASSETS BV), 10Jun.2010(10.06.2010) , see claims 1 and 5,description, page 6	1-6
A	CN101451109 A(UNIV HEILONGJIAN),10Jun.2009(10.06.2009), see the whole document	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2011/076941

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO2010031772A3	10.06.2010	WO2010031772A2	25.03.2010
CN101451109 A	10.06.2009	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/076941

Continuation of Box A:

C12N 15/75(2006.01)i

C12N 1/21(2006.01)i

C12R 1/125(2006.01)i

A. 主题的分类

见附加页

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))

数据库: CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL

USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, cnki, isi web of knowledge;

检索词:乙醇脱氢酶, 醇脱氢酶, 芽孢, 芽孢杆菌, 蚕, 衣壳蛋白, 质粒, Bombyx mori, Alcohol Dehydrogenases, adh, bmadh, capsid, spore surface, silkworm, bacillus, bacillus subtilis, plasmid

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	Nan Wang 等人, "Display of Bombyx mori Alcohol Dehydrogenases on the Bacillus subtilis Spore Surface to Enhance Enzymatic Bacillus subtilis Spore Surface to Enhance Enzymatic Activity under Adverse Conditions", PLoS ONE, 第 6 卷, 第 6 期, p1-6, 30.6 月 2011(30.06.2011), 参见第 1 页, 图 1	1-6
PA	Nan Wang 等人, "Cloning, expression and characterization of alcohol dehydrogenases in the silkworm Bombyx mori", Genetics and Molecular Biology, 第 34 卷, 第 2 期, p 240-243, 在线公布日期 1.4 月 2011(01.04.2011), 参见全文	1-6
A	WO2010031772A3(DSM IP ASSETS BV), 10.6 月 2010(10.06.2010), 参见权利要求 1, 说明书第 6 页, 权利要求 5	1-6
A	CN101451109 A(黑龙江大学), 10.6 月 2009(10.06.2009), 参见全文	1-6



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

31.10 月 2011(31.10.2011)

国际检索报告邮寄日期

10.11 月 2011 (10.11.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

王启扬

电话号码: (86-10) 62411091

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/076941

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO2010031772A3	10.06.2010	WO2010031772A2	25.03.2010
CN101451109 A	10.06.2009	无	

A 栏续页:

C12N 15/75(2006.01)i

C12N 1/21(2006.01)i

C12R 1/125(2006.01)i