

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2017 年 11 月 30 日 (30.11.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/201815 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/16 (2006.01) *C12N 9/50* (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01) *C12R 1/84* (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/088057

(22) 国际申请日: 2016 年 7 月 1 日 (01.07.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

2016103563746 2016年5月26日 (26.05.2016) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 喻晓蔚(YU, Xiaowei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。徐岩(XU, Yan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E501 耿晓岳, Heilongjiang 150028 (CN)。

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

(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))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二. 4(d) (i) 和 48. 2(a) (viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则5. 2(a))。

(54) Title: HIGH SECRETION HEAT RESISTANT YEAST GENETICALLY ENGINEERED FUNGUS AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种高分泌型耐热酵母基因工程菌及其应用

(57) Abstract: Provided are a high secretion heat resistant yeast genetically engineered fungus and use thereof. The yeast genetically engineered fungus is deposited in the China Center for Type Culture Collection (CCTCC), and is assigned with the accession number of CCTCC NO: M 2016278. A knock-out strain constructed by knocking out a lipase gene in a homologous double-crossover manner can be used as a host for expressing other foreign proteins, can be applied for enhancing the expression level of other foreign genes, and can be fermented under a high-temperature fermentation condition.

(57) 摘要: 提供一种高分泌型耐热酵母基因工程菌及其应用, 该酵母基因工程菌保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)、保藏编号为CCTCC NO: M 2016278。通过同源双交换的方式将脂肪酶基因敲除, 构建的敲除菌株能够作为其他外源蛋白的表达宿主, 可用于提高其他外源基因的表达水平, 且可以在高温发酵条件进行发酵。



WO 2017/201815 A1

一种高分泌型耐热酵母基因工程菌及其应用

技术领域

本发明涉及一种高分泌型耐热酵母基因工程菌及其应用，属于生物技术领域。

背景技术

酵母菌是酒精和食品行业的重要生产菌株，随着人类能源危机和环保意识的不断加强，以燃料酒精代替汽油逐渐成为发展趋势。耐高温酵母菌能减少酒精生产中由于降温所带来的麻烦和费用，保证工业发酵能在高温下正常进行，因此，围绕耐高温酵母菌的筛选成为研究热点。近年来，已有多株人工选育的耐高温酵母菌投入到生产中，并取得了良好的经济效益。

早在 20 世纪中期，我国微生物学家就从事驯化育种以糖蜜原料发酵的耐高温酵母研究。目前已有多株人工选育的耐热酵母菌株用于生产，获得了良好的经济效益。据报道，通过对生产用菌株的驯化与筛选，得到了适合于玉米醪发酵的耐高温酒精酵母。长期以来，高温菌株的选育主要集中在自然界筛选和高温驯化。研究人员通过化学诱变和遗传重组使得酿酒酵母的最高生长温度提高 3℃；通过高温驯化紫外诱变和热冲击相结合使得酒精生产酵母发酵温度提高 6℃；利用原生质体融合技术使得酿酒酵母与呼吸缺陷型耐高温克鲁维酵母在 45℃ 条件下产酒率可达 7.4%；通过高温驯化使得酿酒酵母能够在 40℃ 生长；自然筛选和紫外诱变使得酿酒酵母在 42℃ 条件下产酒精量提高；通过常压室温等离子体诱变技术获得高产产油酵母。

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*，以下简称毕赤酵母) 是一种广泛使用的真核表达系统，具有外源蛋白表达量高、营养成分简单、易于诱导等显著优势，但是存在诱导温度低导致能耗大的缺点，并且存在在高温条件下发酵外源蛋白表达受到显著抑制的问题。目前，未有利用毕赤酵母在高温下发酵并不影响外源蛋白表达的研究报道。

毕赤酵母菌体生长最适温度为 28-30℃，而且已有研究表明降低诱导温度能够促进外源蛋白的表达，低温下可以提高醇氧化酶 AOX 的活性和转录水平、减少菌体的凋亡 [Sue Macauley-Patrick, Mariana L. Fazenda, Brian McNeil and Linda M. Harvey, Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 2005, 22: 249–270; 闵兆升, 郭会明, 颜旭, 洪厚胜. 巴斯德毕赤酵母 (*P. pastoris*) 高密度发酵研究进展. 生物技术通报, 2014, 3: 42-49.]。Li 等人 [Li Z, Xiong F, Lin Q, *et al.* 2001. Low temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression Purification*, 21(3): 438–445.] 研究发现当把诱导温度从 30℃ 降低到 23℃ 后，鲱鱼抗冻蛋白的表

达量从 5.3 mg/L 提高到 18.0 mg/L，而且细胞活性显著提高。本课题组前期研究比较 7L 发酵罐中不同诱导温度对华根霉前导肽脂肪酶在毕赤酵母中表达水平的影响。通过实验表明在 28℃ 条件下，最大酶活可以达到 1412.5 U/mL，是 30℃ 条件下的 2.3 倍，25℃ 条件下的 1.3 倍；发现诱导温度越低菌体死亡率越低，但是在 25℃ 条件下，菌体生长速率较慢，影响了酶活表达[王同春，喻晓蔚，徐岩，诱导温度调控华根霉(*Rhizopus chinensis*)前导肽脂肪酶的表达及稳定性研究，工业微生物, 2010,4:34-39]。已有的研究报道均表明利用毕赤酵母表达外源蛋白的诱导温度控制在 30℃ 以下，以获得较高的外源蛋白表达量。但是较低的诱导温度导致在工业生产中耗费大量的能源来降低温度，因此，亟待开发能够在高温条件下高效诱导表达外源蛋白的毕赤酵母表达菌株。

发明内容

为了解决上述问题，本发明筛选获得了能够高效表达外源蛋白的耐高温毕赤酵母菌株，提高了毕赤酵母的应用性能，并解析了其耐高温机理。本发明的耐高温毕赤酵母菌株，能够在较高温度下发酵，带来了以下优势：1.降低了发酵中的冷却费用、降低了生产成本；2.降低污染，发酵的温度提高抑制了许多杂菌的污染。

本发明的第一个目的是提供一种高分泌型耐热毕赤酵母菌，所述毕赤酵母菌已于 2016 年 5 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏地址为中国武汉武汉大学，保藏编号为 CCTCC NO: M 2016278。

本发明第二个目的是提供一种所述毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 的应用方法，是用于生产蛋白或者其他生物制品（比如说经过代谢改造后生产酒精等一些代谢产物）。

在本发明的一种实施方式中，所述生产是在 40° C 以下进行生产。

在本发明的一种实施方式中，所述应用方法，是利用毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 发酵生产脂肪酶；所述方法是在不高于 40℃ 温度下诱导毕赤酵母菌发酵生产脂肪酶。

在于，所述应用是将毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 中的脂肪酶基因敲除后获得敲除菌株，然后以敲除菌株作为宿主构建表达外源蛋白基因的重组菌，再利用重组菌生产蛋白。

在本发明的一种实施方式中，所述不高于 40℃，是指 28℃-40℃。

在本发明的一种实施方式中，所述应用方法，是将毕赤酵母菌种子液接种于甘油生长培养基中，当培养基中的底物甘油基本耗尽后进行甘油间歇补料阶段；当诱导菌体浓度(细胞干重 g/L)36 g/L 时，停止补加甘油，维持此状态至甘油彻底耗尽，然后流加甲醇诱导液；起初慢慢增加甲醇补料速率，当菌体逐渐适应了甲醇之后，提高流加速率维持甲醇浓度在 0.1±0.02% (V/V)左右，同时在 5h 内逐步将诱导温度从 35℃ 提高至 40℃，维持溶氧值在 10%-20%之间，诱导脂肪酶的表达。

在本发明的一种实施方式中,所述应用方法是将毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 中的脂肪酶基因敲除后获得敲除菌株,然后以敲除菌株作为宿主构建表达外源蛋白基因的重组菌,再利用重组菌生产蛋白。

在本发明的一种实施方式中,所述敲除是通过同源双交换敲除。

在本发明的一种实施方式中,所述外源基因为磷脂酶基因、米根霉脂肪酶基因或者脯氨酸蛋白酶基因。

本发明的第三个目的是提供一种在毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 的基础上进行任何改造得到的菌株。

在本发明的一种实施方式中,所述改造,是指是毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 进行诱变、驯化或者基因改造。

在本发明的一种实施方式中,所述基因改造,是指将毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 中的脂肪酶基因通过同源双交换敲除。

在本发明的一种实施方式中,所述基因改造,是将毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 中的脂肪酶基因敲除得到敲除菌株,然后以敲除菌株作为外源基因表达的宿主。

在本发明的一种实施方式中,所述外源基因为磷脂酶基因、米根霉脂肪酶基因或者脯氨酸蛋白酶基因。

本发明的第四个目的是提供一种所述改造得到的菌株的应用,是用于发酵产酶或者其他生物制品(比如说经过代谢改造后生产酒精等一些代谢产物)。

本发明的有益效果:

(1) 本发明的高分泌型耐热毕赤酵母菌,海藻糖含量高,能够耐受 50℃ 水浴 45min,能够在 40℃ 及其以下温度诱导培养产酶。

(2) 利用本发明的高分泌型耐热毕赤酵母菌发酵生产脂肪酶,发酵 84h 后胞外脂肪酶活力达到 17750 U/mL、胞外蛋白浓度在 78h 达到 11.7g/L。

(3) 本发明菌株中的脂肪酶基因及其启动子序列均未发生突变,说明本发明的高分泌型耐热毕赤酵母菌能够高分泌量表达脂肪酶基因是由于基因组中其他基因序列发生了突变导致的。本发明提供了一种毕赤酵母宿主菌,是通过同源双交换的方式将毕赤酵母菌 CCTCC M 2016278 中的脂肪酶基因敲除,从而应用于提高其他外源基因的表达水平。以敲除菌株作为宿主菌表达磷脂酶基因、米根霉脂肪酶基因、脯氨酸蛋白酶基因,在 40℃ 培养条件下能够使酶活水平分别提高了 3 倍、9.1 倍和 2.5 倍。

生物材料保藏:

一株高分泌型耐热毕赤酵母菌，分类学命名为巴斯德毕赤酵母 RCLN *Pichia pastoris* RCLN，于 2016 年 5 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏地址为中国武汉武汉大学，保藏编号为 CCTCC NO: M 2016278。

附图说明

图 1: 诱变菌株的耐温表型检验平板生长图;

图 2: 酵母胞内海藻糖含量的测定;

图 3: 诱变菌株 N 号发酵上清中脂肪酶活力时程曲线;

图 4: 诱变菌株 N 号发酵上清中蛋白浓度时程曲线;

图 5: 同源双交换敲除毕赤酵母基因组中目的基因（脂肪酶基因）的原理示意图；其中 *HIS4* 代表野生型组氨酸脱氢酶基因；*his4*, *his4**代表不同突变类型的组氨酸脱氢酶基因；*His⁻*代表组氨酸营养缺陷型；*His⁺*代表非组氨酸营养缺陷型；5'*AOX1* (5'*P_{AOX1}*) 代表乙醇氧化酶基因 *AOX1* 启动子；3'*AOX1* 代表乙醇氧化酶基因 *AOX1* 的 3'端侧翼序列；TT 代表乙醇氧化酶基因 *AOX1* 终止子；A、B 代表同源重组两侧臂序列；*ZeoR* 代表 Zeocin 抗性基因序列；*Kan* 代表 G418 抗性基因序列；Gene of interest 代表外源基因序列，本申请中为脂肪酶基因序列 proRCL。

具体实施方式

试剂和菌株

出发菌株：表达脂肪酶基因的毕赤酵母基因工程菌[Yu, X. W., L. L. Wang, and Y. Xu (2009) *Rhizopus chinensis* lipase: Gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties. J. Mol. Catal. B-Enzym. 57: 304-311; Dan Wu, Xiao-Wei Yu, Tong Chun Wang, Rui Wang, and Yan Xu. High Yield *Rhizopus chinensis* prolipase Production in *Pichia Pastoris*: Impact of Methanol Concentration. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011,16: 305-311]。

YPD 液态培养基：酵母膏 10 g/L，蛋白胨 20 g/L，葡萄糖 20 g/L。

筛选培养基：酵母膏 10 g/L，蛋白胨 20 g/L，葡萄糖 20 g/L，琼脂 2%，G418 0.25 g/L，罗丹明 B $1 \times 10^{-3}\%$ ，1%橄榄油 PVA 乳化液。

YPD-G418 固态培养基：酵母膏 10 g/L，蛋白胨 20 g/L，葡萄糖 20 g/L，琼脂 2%，G418 0.25 g/L。

YPD-Zeo 固态培养基：酵母膏 10 g/L，蛋白胨 20 g/L，葡萄糖 20 g/L，琼脂 2%，Zeocin 100 $\mu\text{g/ml}$ 。

MD 固体培养基：葡萄糖 20 g/L，YNB 1.34%，生物素 $4 \times 10^{-5}\%$ ，琼脂粉 2%。

MD-G418 固体培养基：葡萄糖 20 g/L，YNB 1.34%，生物素 $4 \times 10^{-5}\%$ ，琼脂粉 2%，G418

0.25 g/L。

BMGY 培养基：酵母膏 10 g/L，蛋白胨 20 g/L，甘油 10 g/L，磷酸缓冲液 100 mmol/L，pH 6.0，YNB 1.34%，生物素 $4 \times 10^{-5}\%$ 。

BMMY 培养基：酵母膏 10 g/L，蛋白胨 20 g/L，甲醇 0.5 g/L，磷酸缓冲液 100 mmol/L，pH 6.0，YNB 1.34%，生物素 $4 \times 10^{-5}\%$ 。

乙酸钠生孢培养基：无水乙酸钠 8.2 g/L，氯化钾 1.8 g/L，葡萄糖 1 g/L，酵母膏 2.5 g/L，琼脂粉 2%。

甘油生长相培养基（基础盐培养基）：CaSO₄ 0.93 g/L，85% H₃PO₄ 28.70 mL/L，MgSO₄·7H₂O 14.90 g/L，K₂SO₄ 18.20 g/L，KOH 4.13 g/L。用此培养基配制成含 4% (W/V) 的甘油和 4 mL/L PTM₁ 的发酵培养基。

甘油过渡相补料培养基：50% (W/V) 甘油，其中 PTM₁ 含量为 12 mL/L。

甲醇诱导相培养液：纯甲醇诱导液，其中 PTM₁ 含量为 24 mL/L。

微量元素 PTM₁ 溶液：CuSO₄·5H₂O 6.0 g/L，KI 0.08 g/L，MnSO₄·H₂O 3.0 g/L，Na₂MoO₄·2H₂O 0.2 g/L，H₃BO₃ 0.02 g/L，ZnSO₄·7H₂O 42.2 g/L，FeSO₄·7H₂O 65.0 g/L，CoCl₂·6H₂O 0.5 g/L，Biotin 0.2 g/L，H₂SO₄ 5.0 mL/L。

实施例 1：菌株诱变方法

采用紫外诱变、化学试剂诱变、常压室温等离子体诱变等诱变方法。

紫外线、硫酸二乙酯、亚硝基胍诱变方法参考文献 [不同诱变方法对透明质酸产生菌株 Sz560 的诱变效应, 丁勇, 石孝勇, 张新明, 食品研究与开发, 2012, 12: 50-53]。常压室温等离子体诱变方法参考文献 [低嘌呤酿酒酵母的 ARTP 法诱变育种, 康富帅, 颜兵, 吕南拳, 周世水, 现代食品科技, 2014, 2: 188-191]。研究过程中通过以上方法及以上方法的不同组合对菌株进行诱变处理。

实施例 2：菌株的驯化

将不同诱变方法获得的菌株混合（混合菌）进行高温驯化。将混合菌接种至新鲜的 YPD 培养基进行 32°C、34°C、36°C、38°C、40°C 温度梯度升温驯化培养。混合菌接种至 100 mL 新鲜的 YPD 培养基中 32°C 培养，原始出发菌同时接种至 100 mL 新鲜的 YPD 培养基中 30°C 培养，接种量为起始 OD 0.1。培养 72 h 为一代驯化。一代结束后测定 OD，若高温条件下的 OD 值与原始出发菌 30°C 条件下的 OD 值之比大于 1 则进入下一个温度梯度的驯化，反之则继续转接至新鲜的培养基在进行该温度的第二次驯化直至比值大于 1。最终 32°C 进行 1 个循环即驯化完成，34°C 进行 3 个循环，36°C 进行 10 个循环，38°C 进行 28 个循环，40°C 进行 45 个循环。

实施例 3：耐温及高分泌型驯化菌株的单克隆分离

- 1) 将诱变驯化后的菌株均匀涂布于筛选培养基，并且置于 40°C 培养箱培养 3d。
- 2) 挑取菌落最大且红色透明圈最明显的 28 个单克隆于 5mL 新鲜 YPD 培养基中过夜培养。菌落越大代表在高温下活力更好，红色透明圈越明显代表分泌表达的脂肪酶活力越高。
- 3) 分别接种 28 个单克隆于 100mL 新鲜的 YPD 培养基中，40°C、200rpm 恒温培养 3 天，筛选得到 5 株生长情况最好的菌株进行后续实验，5 株菌株分别命名为 6、D、N、J、H。

实施例 4：耐温单克隆的单倍体制备

为了提高菌株的遗传稳定性，本实施例制备耐高温单克隆的单倍体菌株。

- 1) 用 YPD-G418 液体培养基 40°C 进行培养 72h，连续 2 次传代后将菌涂布于乙酸钠生孢培养基上，25°C 培养，3-7 天取样镜检。

- 2) 镜检染色：采用 5%孔雀绿与 0.5%蕃红染液进行染色。

方法：制备菌悬液，加 1-2 滴水浴小试管中，用接种环挑取 2-3 环菌苔与试管中，搅拌均匀，制成浓的菌悬液。

孔雀绿染液染色：加 2-3 滴孔雀绿染液与试管中，并使其与菌液混合均匀，然后将试管置于沸水浴的烧杯中，加热染色 20min。

涂片固定：用接种环去试管底部菌液数环于干净载玻片上，涂成薄膜，然后将涂片通过火焰 3 次温热固定。

脱色：用水冲洗，直至流出的液体无绿色为止。

复染：用蕃红染液染色 1-2min，倾去染液，水洗并用滤纸吸干。

镜检：干燥后用油镜观察，子囊孢子呈绿色，营养细胞为红色。

- 3) 蜗牛酶处理释放子囊孢子方法：生孢培养基上取适量已形成子囊孢子的酵母，用 0.9% 生理盐水制成子囊孢子的悬液，取 200 μ L 的悬液离心弃上清，加入浓度 3% 蜗牛酶液 200 μ L 于 30°C 水浴酶解 2h。

- 4) 单倍体的分离：将用蜗牛酶处理的子囊孢子单倍体和二倍体混合菌液进一步于 58°C 水浴分别处理 12min，再加入石英砂，30°C 震荡 30min，将子囊孢子打散，迅速稀释 10^{-2} ~ 10^{-3} ，涂布于 YPD+G418 培养基上，35°C 培养 2d~3d。生长出的克隆即为单倍体克隆。

实施例 5：诱变菌株的耐温表型检验

从平板上挑取原始出发菌株和 5 株耐温菌株于 5mL YPD 培养基中，过夜培养，收集菌体用生理盐水洗涤两次，悬浮菌体使得菌悬液 OD 为 1。在 50°C 亚致死温度水浴 45min 后，迅速冷却，并 1 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 梯度稀释后，吸取 4 μ L 点滴于 YPD-G-418 固态培养基上，置于 30°C 恒温培养箱培养 3d。

结果显示(图 1),对照组的原始菌 100%致死,而 N 号菌株(即本发明的毕赤酵母 CCTCC NO: M 2016278)最耐温。

实施例 6: 诱变菌株的胞内海藻糖含量测定

已有报道表明通常耐高温菌株胞内含有较高含量的海藻糖,海藻糖可以作为酵母细胞的保护性物质,在极端环境下,生物体可以通过调节海藻糖的合成来抵御外界的不良伤害,所以海藻糖含量被认为是酵母耐受性的重要指标。

1) 标准曲线制作

取干试管 6 支,依次加入 0.1mg/mL 标准糖溶液 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mL,并依次用蒸馏水补足到 1mL,各管均加入蒽酮试剂(取 0.2g 蒽酮溶于 100mL80%硫酸中)4mL,震荡均匀。沸水浴准确煮沸 10min,室温放置 10min,用 1 号试管溶液调零,比色测定 A₆₂₀(同时测定样品)。用标准糖溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,制作标准曲线, $A_{620}=9.62C-0.0033$ $R^2=0.99$,C 代表海藻糖浓度(mg/mL)。

2) 提取胞内海藻糖

取 20ml 培养至 OD₆₀₀ 达到 6 的菌液入 50mL 离心管中,4000rpm 离心 5min,去上清液,其中的菌体用冰冻的蒸馏水在 4000rpm,5min 的条件下离心洗涤 3 次,加入 4ml 0.5mol/L 的三氯乙酸(TCA),混匀后再冰浴中放置 20min,期间每 5min 振荡混匀一次,混合液在 4000rpm 下离心 5min,收集上清液,加水稀释 10 倍共 40mL 提取液。

3) 海藻糖含量的测定

把 1mL 提取液加在盛有 4mL 蒽酮的定糖管里,沸水中煮 10min,流水冷却,冷却后在室温下静置 10min,然后在 620nm 下读取吸光值,最后按照标准曲线得出海藻糖的浓度。

4) 结果如图 2,与原始出发菌株 control 相比,诱变菌株 6, D、N、J、H 胞内海藻糖含量均显著高于出发菌株,其中 N 号诱变菌株(即本发明的毕赤酵母 CCTCC NO: M 2016278)的海藻糖含量最高。

实施例 7: 诱变菌株的传代稳定性检测及摇瓶发酵培养

将诱变菌株 N 号在 YPD 固态培养基上划线,40°C 培养 3 天,挑取单菌落划线转接到新的 YPD 固态培养基上,40°C 培养 3 天,以此连续传代,传代 20 次后进行摇瓶发酵培养。

摇瓶发酵培养方法如下:

1) 分别接种诱变菌株 N 号和原始出发菌株于 25mL BMGY 培养基中 40°C、200rpm 培养过夜。

2) 收集菌体离心去上清,重新悬浮后接种至 100mL BMMY 培养基中,保持不同菌株初始 OD₆₀₀ 一样,置于 40°C 恒温摇床中 200rpm 发酵培养。

3) 每隔 24h 加入 1mL 甲醇进行诱导表达脂肪酶并且取样测定菌体浓度、胞外蛋白浓度和胞外脂肪酶活力。

结果表明, 连续传代 20 次后, 在 40°C 条件下, 摇瓶发酵上清液中脂肪酶活力的变化范围在 5% 以内, 说明诱变菌株的遗传稳定性良好。

除了 40°C 以外, 摇瓶发酵培养的温度同时选取 28°C、30°C、35°C、38°C 温度条件进行表达检验。结果表明在 28°C、30°C、35°C、38°C 和 40°C 条件下, 摇瓶发酵上清液中诱变菌株 N 号的脂肪酶活力分别为 756U/mL、750U/mL、645U/mL、638U/mL 和 620U/mL; 而原始出发菌株的脂肪酶活力分别为 120U/mL、50U/mL、0U/mL、0U/mL 和 0U/mL。表明该诱变菌株能够在 40°C 及其以下的诱导温度条件下高效表达脂肪酶。

实施例 8: 诱变菌株的 3-L 发酵罐小试

(1) 平板种子培养

YPD 平板划线, 30°C 培养 3 天左右。

(2) 摇瓶培养

超净台内挑取生长形态良好的菌落, 接种至 250 mL 三角瓶内培养约 22 h, 装液量为 50 mL, 取样检测当吸光值达到 2-6 之间结束培养。

(3) 发酵罐培养

准确配制 1 L 甘油生长相培养基置于 3 L 发酵罐内, 安装好挡板、搅拌桨、补料针等, 并插入已离线标定好的 DO、pH 和消泡电极, 封口保护电极头, 接上两个空气过滤器, 中间用夹子包扎好, 连接好取样器, 然后放置于灭菌锅内 121°C 灭菌 20 min。取出室温冷却, 连接上发酵调控器, 调节空气流量为 2.5 L/min, 初始搅拌转速为 300 r/min, 菌体生长温度为 35°C, 用氨水自动调控 pH 值为 5.5。将 5 瓶种子液并种, 并加入 10.875 mL 过膜除菌的 PTM₁ 溶液, 火焰接种, 接种量为 10%, 当 DO 值稳定后较 100%, 在甘油生长相期间通过蛇管冷却或加热套加热以及自动流加氨水控制温度与 pH 在设定值, 并通过调节转速维持溶氧值在 50% 以上。发酵过 20-25 h, 此时溶氧值会急剧上升, 这表明培养基中的底物甘油已基本耗尽, 维持此状态半小时后开始流加 50% 的甘油过渡相培养基, 进入甘油间歇补料阶段。同时连接上甲醇控制仪, 预热。

每 4 h 取样检测菌体浓度, 当其值达到诱导菌体浓度(细胞干重 g/L)36 g/L 时, 停止补加甘油, 维持此状态 30 min, 使得甘油彻底耗尽, 目的是避免过剩甘油阻遏启动子 *AOX1*, 重新校正溶氧值为 100%, 开始进入甲醇相。利用甲醇控制仪变速的向发酵液中流加甲醇诱导液, 起初慢慢增加甲醇补料速率, 以免菌体无法适应甲醇而中毒(适应期为 8 h 左右), 当菌体逐渐适应了甲醇之后, 提高流加速率维持甲醇浓度在 0.1±0.02% (V/V) 左右, 同时在 5h 内逐步

将诱导温度从 35°C 提高至 40°C，目的也是为了逐步提高菌体对甲醇的适应性。通过调节转速，增加流量，混合通纯氧的方式维持溶氧值在 10%-20%之间，诱导脂肪酶的高效表达。

(4) 发酵结果：如图 3、图 4，以 N 号菌株为例，胞外脂肪酶活力随着诱导时间的增加持续升高至 84h 达到 17750 U/mL，胞外蛋白浓度在 78h 达到最高 11.7g/L。

根据文献报道，原始出发菌株在 28°C 条件下，最高酶活可以达到 1412.5 U/mL，是 30°C 条件下的 2.3 倍 [诱导温度调控华根霉(*Rhizopus chinensis*)前导肽脂肪酶的表达及稳定性研究, 王同春, 喻晓蔚, 徐岩, 工业微生物, 2010,4:34-39]; 在优化甲醇诱导浓度后 (与本发明专利采用的甲醇诱导浓度一致), 原始出发菌株表达的最高脂肪酶活力仅为 2,130 U/mL [Dan Wu, Xiao-Wei Yu, Tong Chun Wang, Rui Wang, and Yan Xu. High Yield *Rhizopus chinensis* prolipase Production in *Pichia Pastoris*: Impact of Methanol Concentration. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011,16: 305-311], 本发明中脂肪酶活力是原始出发菌株的 8.3 倍。并且, 在本发明的高温发酵条件下, 原始出发菌株基本无法正常生长, 上清液中检测无脂肪酶活力。

综上所述, 本发明获得了能在高温下高效分泌表达脂肪酶的毕赤酵母基因工程菌的菌株。

实施例 9: 诱变菌株中脂肪酶基因及其启动子序列测序鉴定

为了研究诱变菌株高分泌量表达脂肪酶基因的原因是否是由于诱变过程中脂肪酶基因或者其启动子基因序列发生的突变, 通过 PCR 扩增诱变菌株基因组中的脂肪酶基因及其启动子序列, 并送上海生物工程有限公司测序。

上游引物序列 F: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' (核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示); 下游引物序列 R: 5'-CTTACAAACAGCTTCCTTCGTT-3' (核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示)。利用该对引物能够将脂肪酶基因及其启动子序列共同扩增出来。

PCR 扩增方法如下:

Step1: 98°C	30sec
Step2: 98°C	10sec
Step3: 58°C	45sec
Step4: 72°C	90sec
Step5: go to step2	30cycles
Step6: 72°C	10min
Step7: 10°C	hold

测序结果表明, 脂肪酶基因及其启动子序列均未发生突变, 说明诱变菌株高分泌量表达脂肪酶基因是由于毕赤酵母基因组中其他基因序列发生了突变导致的。

实施例 10: 敲除菌株的构建

由于诱变菌株N号（即本发明的毕赤酵母CCTCC NO: M 2016278）具有高分泌表达脂肪酶基因的特性，因此推测该菌株能够同样应用于提高其他外源基因的表达水平。因此通过同源双交换的方法敲除诱变菌株N号中包括脂肪酶基因的表达盒，构建用于表达其他外源基因的宿主菌（以下简称敲除菌株）。

敲除方法参考文献 [倪振华, 周详山, 张元兴. 毕赤酵母重组菌株直接基因缺失方法的研究. 微生物学通报, 2007, 34: 1198-1201.], 本实验敲除原理如图5所示, 由于诱变菌株中仅插入了一个拷贝的脂肪酶基因序列, 因此通过同源双交换的方式将该脂肪酶基因敲除。

通过Zeocin(博来霉素)抗性筛选敲除菌株, 将电转化后的菌液涂布在YPD-Zeo固态培养基上, 30°C培养3天, 挑选转化子进行PCR鉴定, 研究证实脂肪酶基因成功被敲除。参考《毕赤酵母表达手册》(Invitrogen公司) 鉴定敲除菌株是否为组氨酸营养缺陷型, 鉴定结果为组氨酸营养缺陷型。综上表明, 敲除菌株构建成功。

实施例 11: 利用敲除菌株表达磷脂酶基因

以敲除菌株为宿主菌, 表达来源于参考文献[Liu A, Yu XW, Sha C, Xu Y. Streptomyces violaceoruber Phospholipase A2: Expression in *Pichia pastoris*, Properties, and Application in Oil Degumming. Applied Biochemistry Biotechnology. 2015, 175: 3195-206.]中的磷脂酶 A2 基因。将文献中报道的表达质粒 pPIC9K-PLA2 用 *SaI*I 线形化后电转入敲除菌株中(电转方法: 取一管感受态细胞转移至酶切浓缩后的线性化质粒中, 均匀混合, 再转移至 2 mm 预冷的电转杯中, 冰上放置 3-5 min 后进行电转。电转化仪设置参数为: 电压 1500 V, 电阻 200 Ω , 电容 25 μ F。电转化后立即加入 1 mL 1 mol/L 的山梨醇溶液, 混匀后转移至 1.5 mL EP 管中, 30°C 复苏 1 h, 离心后除上清至剩余 100 μ L, 重悬菌体后涂布 MD-G418 平板, 30°C 培养箱中培养 3 d 后即可得到一系列单菌落转化子。), 涂布于 MD-G418 平板上, 挑取单克隆进行 PCR 验证, 验证正确的菌株即为构建成功的表达磷脂酶 A2 的毕赤酵母基因工程菌。

摇瓶发酵培养方法参考实施例 7, 接种阳性表达菌株于 25mL BMGY 培养基中 40°C、200rpm 培养过夜; 收集菌体离心去上清, 重新悬浮后接种至 100mL BMMY 培养基中, 置于 40°C 恒温摇床中 200rpm 发酵培养; 每隔 24h 加入 1mL 甲醇进行诱导表达并且取样测定上清液中磷脂酶 A2 的酶活力。

磷脂酶 A2 活力测定方法如下:

a. 称取聚乙烯醇 (PVA) 40.0g, 加水 800mL, 在沸水浴中加热、搅拌, 直至全部溶解, 冷却后定溶至 1000mL。以干净的双层纱布过滤, 取滤液备用;

b. 磷酸缓冲液和 PVA 以体积比为 19:1 的比例混合, 使 PVA 的终浓度为 0.2% (w/v)

c. 称取大豆卵磷脂 3g 溶于 60ml 磷酸缓冲液和 PVA 的混合液中; 用高速组织捣碎机处

理 6min（分 2 次处理，每次 3min，间隔 5min），即成乳白色 PVA 乳化液。

d. 取两个 100mL 三角瓶，分别于空白瓶（A）和样品瓶（B）中，各加底物溶液和磷酸缓冲液混合液 9.00mL，再于 A 瓶中加入 95%乙醇（3.3）15.0mL，于 40±0.2°C 水浴中预热 5min，然后，在 A 瓶中，加失活酶液 1.00mL，B 瓶中加入待测酶液 1ml，立即混匀计时，在 40±0.2°C 水浴中准确反应 15min，于 B 杯中立即补加 95%乙醇 15.0mL 终止反应，取出；

e. 于空白和样品溶液中各加酚酞指示液 2 滴，用 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定，直至微红色并保持 30s 不褪为其终点，记录消耗 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液的体积。

磷脂酶活力定义为：在一定温度和 pH 条件下，1min 水解底物产生 1μmol 的可滴定脂肪酸所需要的酶量为 1 个酶活力单位，以 U/ml 表示。

磷脂酶活力计算公式：

$$X_1 = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 50 \times n_1}{0.05} \times \frac{1}{15}$$

式中：

X_1 —样品的酶活力，U/mL；

V_1 —滴定样品时消耗的氢氧化钠标准溶液的体积，单位为（mL）；

V_2 —滴定空白时消耗的氢氧化钠标准溶液的体积，单位为（mL）；

c —氢氧化钠标准溶液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

50—0.05mol/L 氢氧化钠溶液 1.00mL 相当于脂肪酸 50μmol；

n_1 —样品的稀释倍数；

0.05—氢氧化钠标准溶液浓度换算系数；

15 —反应时间 15min，以 1min 计。

实验结果表明，在 40°C 发酵条件下，本实施例构建菌株的摇瓶发酵上清液中磷脂酶 A2 活力为 105U/mL，是参考文献[Liu A, Yu XW, Sha C, Xu Y. Streptomyces violaceoruber Phospholipase A2: Expression in *Pichia pastoris*, Properties, and Application in Oil Degumming. Applied Biochemistry Biotechnology. 2015,175:3195-206.]报道（35U/mL）的 3 倍。又分别检测了在 28°C、30°C、35°C、38°C 摇瓶发酵培养条件下，本实施例构建菌株发酵上清液中磷脂酶 A2 的活力分别为 156U/mL、140U/mL、123U/mL、112U/mL 和 110U/mL。

同时接种来源于参考文献[Liu A, Yu XW, Sha C, Xu Y. Streptomyces violaceoruber Phospholipase A2: Expression in *Pichia pastoris*, Properties, and Application in Oil Degumming. Applied Biochemistry Biotechnology. 2015,175:3195-206.]中的表达菌株，在本实施例 40°C 摇瓶培养条件下进行培养，结果表明由于原始菌株无法耐受高温，发酵上清液中无法检测到磷脂

酶 A2 活力。

以上研究表明该敲除菌株能够在诱导温度 40°C 条件以下高效的表达磷脂酶。

实施例 12：利用敲除菌株表达其他外源基因

为了进一步验证敲除菌株能够在高温下高分泌其他类型的外源蛋白，本实验以敲除菌株为宿主，选择来源于参考文献中的米根霉脂肪酶基因[Xiao-Wei Yu, Chong Sha, Yong-Liang Guo, Rong Xiao, Yan Xu*, High-level expression and characterization of a chimeric lipase from *Rhizopus oryzae* for biodiesel production, *Biotechnology for Biofuels* 2013, 6:29]和脯氨酸蛋白酶基因序列[Chao Kang, Xiao-Wei Yu, Yan Xu. Gene cloning and enzymatic characterization of an endoprotease Endo-Pro-*Aspergillus niger*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2013,40: 855-864]为目标进行表达，将含有米根霉脂肪酶基因的表达质粒 pPIC9K-proAROL 和含有脯氨酸蛋白酶基因序列的表达质粒 pPIC9K-EPR 酶切线性化之后电转化敲除菌株，阳性菌株的筛选步骤参考实施例 11。

通过摇瓶发酵实验表明，相比以上参考文献报道（酶活测定方法一致），米根霉脂肪酶和脯氨酸蛋白酶的酶活水平分别提高了9.1倍和2.5倍。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

序列表

<110> 江南大学

<120> 一种高分泌型耐热酵母基因工程菌及其应用

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gactggttc aattgacaag c

21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

cttacaaca gcttccttcg tt

22

1、一种高分泌型耐热毕赤酵母菌，其特征在于，所述毕赤酵母菌已于 2016 年 5 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏地址为中国武汉武汉大学，保藏编号为 CCTCC NO: M 2016278。

2、一种毕赤酵母菌，其特征在于，所述毕赤酵母菌是在毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 的基础上进行改造得到的。

3、根据权利要求 2 所述的毕赤酵母菌，其特征在于，所述毕赤酵母菌是指将毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 中的脂肪酶基因进行同源双交换敲除后得到的敲除菌株。

4、根据权利要求 2 所述的毕赤酵母菌，其特征在于，所述改造是指是对毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 进行诱变、驯化或者基因改造。

5、权利要求 1 所述的毕赤酵母菌在生产蛋白或者生物制品方面的应用。

6、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述生产是在 40°C 以下进行生产。

7、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述应用是利用毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 发酵生产脂肪酶；所述方法是在 40°C 以下诱导毕赤酵母菌发酵生产脂肪酶。

8、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述应用是将毕赤酵母菌 CCTCC NO: M 2016278 中的脂肪酶基因敲除后获得敲除菌株，然后以敲除菌株作为宿主构建表达外源蛋白基因的重组菌，再利用重组菌作为生产菌株进行生产。

9、根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述外源蛋白基因为磷脂酶基因、米根霉脂肪酶基因或者脯氨酸蛋白酶基因。

10、权利要求 2-4 任一所述毕赤酵母菌的应用。

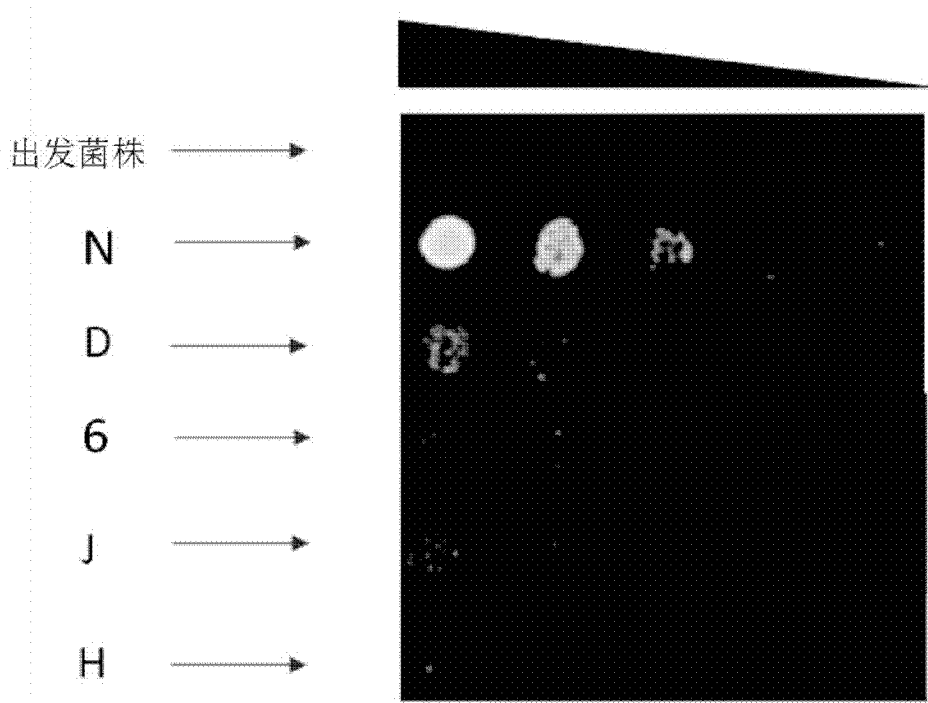


图 1

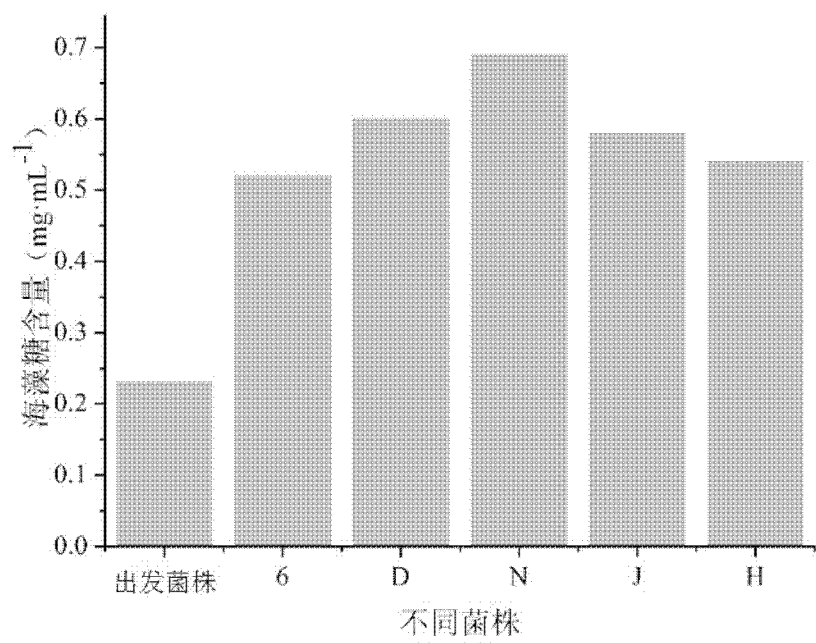


图 2

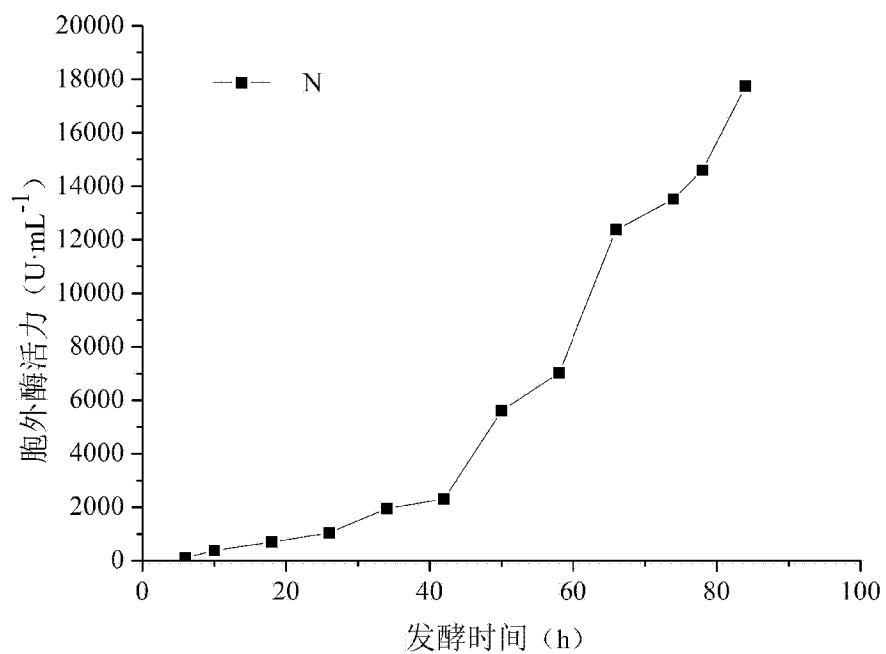


图 3

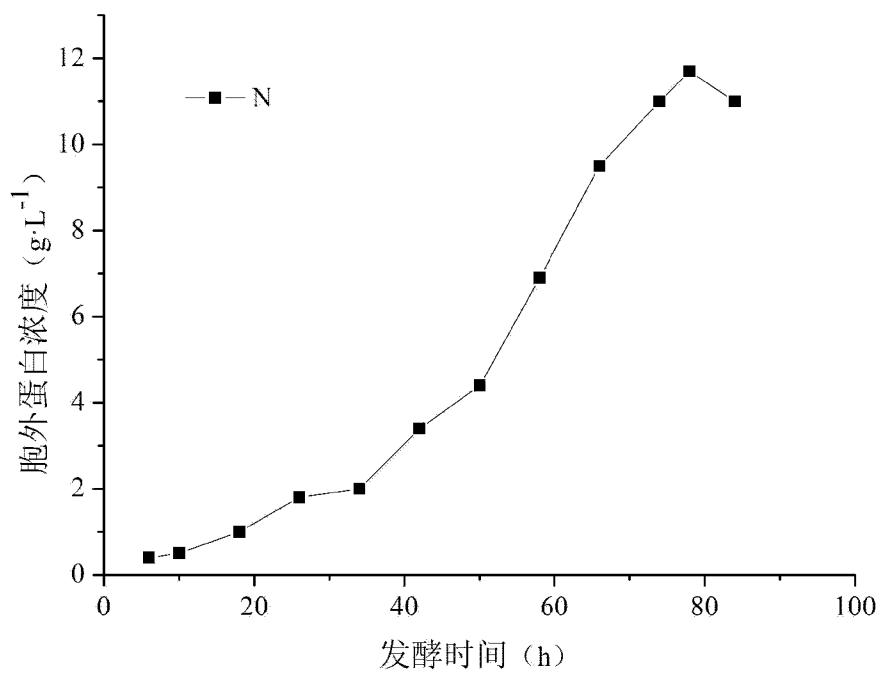


图 4

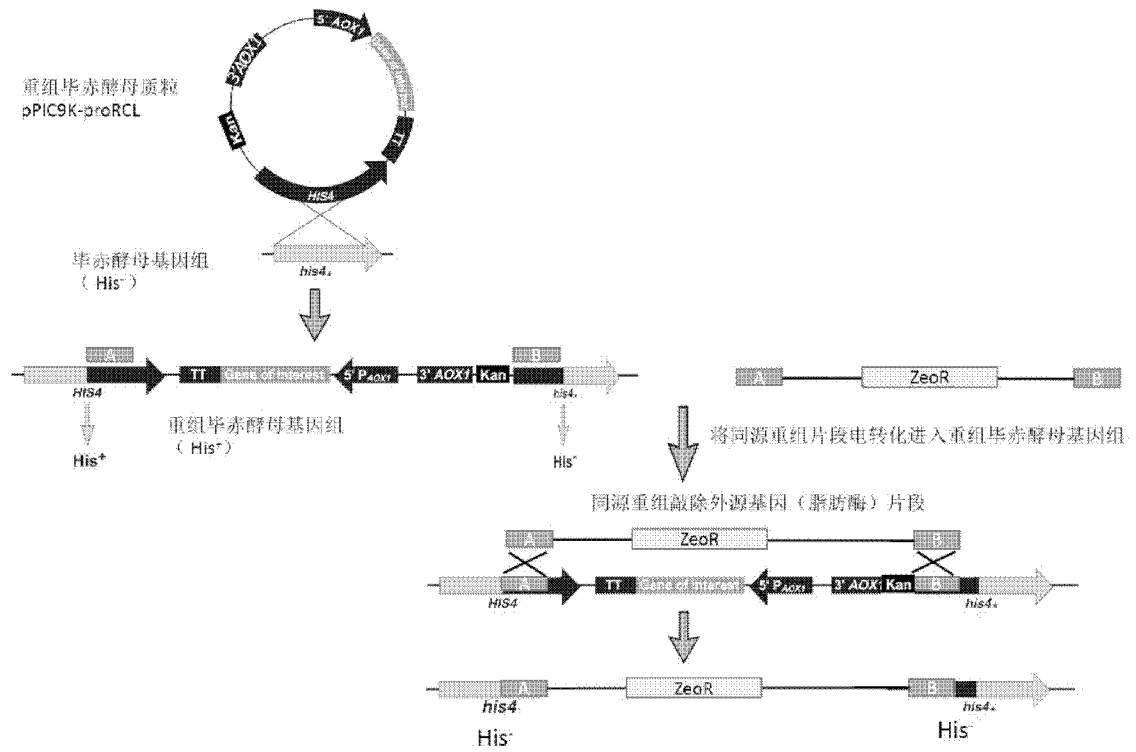


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/088057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/16 (2006.01) i; C12N 9/20 (2006.01) i; C12N 9/18 (2006.01) i; C12N 9/50 (2006.01) i; C12R 1/84 (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, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI Web of Science: pichia pastoris, heat-resisting, thermostabilization, pichia, heat, resist+, toleran+, thermostabili+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TW 201612310 A (INST NUCLEAR ENERGY RES ATOMIC ENERGY COUNCIL) 01 April 2016 (01.04.2016) see description, paragraphs [0008]-[0014]	1-10
A	CN 104164375 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 26 November 2014 (26.11.2014) see the whole document	1-10
A	SONG, Weixia. "Research progress of fermentation for bioethanol from lignocellulosic materials by improved thermotolerant yeast strains" Bulletin of Fermentation Science and Technology, vol. 42, no. 3, 15 July 2013 (15.07.2013), ISSN: 1674-2214, see pages 46-51	1-10
A	Obero, Harinder Singh et al. "Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant Pichia kudriavzevii HOP-1" JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY, vol. 39, no. 4, 30 April 2012 (30.04.2012), ISSN: 1367-5435, see pages 557-566	1-10

☐ 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 20 February 2017	Date of mailing of the international search report 28 February 2017
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 XU, Yijun Telephone No. (86-10) 62411083

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/088057

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 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 filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☒ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
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 in 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/CN2016/088057

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
TW 201612310 A	01 April 2016	TW I510616 B	01 December 2015
CN 104164375 A	26 November 2014	CN 104164375 B	13 July 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/088057

A. 主题的分类

C12N 1/16(2006.01)i; C12N 9/20(2006.01)i; C12N 9/18(2006.01)i; C12N 9/50(2006.01)i; C12R 1/84(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, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI Web of Science; 毕赤酵母, 耐热, 抗热, 热稳定, pichia, heat, resist+, toleran+, thermostabili+

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	TW 201612310 A (INST NUCLEAR ENERGY RES ATOMIC ENERGY COUNCIL) 2016年 4月 1 日 (2016 - 04 - 01) 参见说明书第[0008]-[0014]段	1-10
A	CN 104164375 A (中国科学技术大学) 2014年 11月 26日 (2014 - 11 - 26) 参见全文	1-10
A	宋维霞. "利用改进的耐高温酵母菌发酵木质纤维素生产生物乙醇的研究进展" 《发酵科技通讯》, 第42卷, 第3期, 2013年 7月 15日 (2013 - 07 - 15), ISSN: 1674-2214, 参见第46-51页	1-10
A	Obero, Harinder Singh等. "Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant Pichia kudriavzevii HOP-1" 《JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY》, 第39卷, 第4期, 2012年 4月 30日 (2012 - 04 - 30), ISSN: 1367-5435, 参见第557-566页	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

“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

2017年 2月 20日

国际检索报告邮寄日期

2017年 2月 28日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

徐益君

电话号码 (86-10)62411083

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对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☐ 含在申请提交时的国际申请中
- ☒ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☐ 为检索之用随后提交本单位
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，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申请中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：

国际申请号
PCT/CN2016/088057

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)
TW	201612310	A	2016年 4月 1日	TW	I510616	B	2015年 12月 1日
CN	104164375	A	2014年 11月 26日	CN	104164375	B	2016年 7月 13日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)