

(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
2021 年 2 月 4 日 (04.02.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/017154 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 1/21 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/109099
- (22) 国际申请日: 2019 年 9 月 29 日 (29.09.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910701822.5 2019 年 7 月 31 日 (31.07.2019) CN
201910703169.6 2019 年 7 月 31 日 (31.07.2019) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。
- (72) 发明人: 王小元(WANG, Xiaoyuan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 王建莉(WANG, Jianli); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 马文渐(MA, Wenjian); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 李烨(LI, Ye); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (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 E 区 501 张勇, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, 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, 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)。

(54) Title: ESCHERICHIA COLI LIPOPOLYSACCHARIDE SIMPLIFIED ENGINEERING BACTERIA AND APPLICATION THEREOF FOR HIGH YIELD OF PHB

(54) 发明名称: 大肠杆菌脂多糖精简工程菌及其高产 PHB 的应用

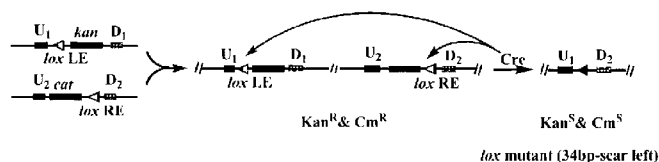


图 1

(57) Abstract: Provided are Escherichia coli lipopolysaccharide simplified engineering bacteria and an application thereof for high yield of PHB. A gmhD gene and 14 genes of a core polysaccharide gene cluster on an Escherichia coli genome are knocked out, and 11 genes of an O-antigen gene cluster on the Escherichia coli genome are knocked out, so that the capability of synthesizing PHB by Escherichia coli W3110, DH5 α , and JM109 can be significantly improved, and the PHB yield of recombinant Escherichia coli is increased by 1.8-54.7 times.

(57) 摘要: 提供了大肠杆菌脂多糖精简工程菌及其高产 PHB 的应用, 通过敲除 gmhD 基因、大肠杆菌基因组上核心糖基基因簇的 14 个基因及敲除大肠杆菌基因组上 O-抗原基因簇的 11 个基因, 可以显著改善大肠杆菌 W3110、DH5 α 和 JM109 合成 PHB 的能力, 使重组大肠杆菌的 PHB 产量提高 1.8~54.7 倍。

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))。

大肠杆菌脂多糖精简工程菌及其高产PHB的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及大肠杆菌脂多糖精简工程菌及其高产PHB的应用，属于基因工程和发酵工程领域。

背景技术

[0002] 聚羟基脂肪酸酯（Polyhydroxyalkanoates, PHA）是一类由微生物合成的可再生可降解且具有多元材料学性能的高分子聚合物，在医学、材料和环保领域有着广泛的应用前景。聚羟基脂肪酸酯广泛存在于微生物细胞内，主要作为碳源及能量的贮存载体。生长环境C:N比例越高，越有利于PHA的合成。PHA在胞内以疏水性颗粒的形式存在，在特定条件下其含量可以超过细胞干重的90%。PHA根据单体种类、聚合方式的不同，具有从坚硬质脆的硬塑料到柔软的弹性体等一系列多样性的材料学特性。由于PHA可由可再生资源为原料合成，进入自然界后可以被细菌等生物完全降解，替代常规石油基塑料可以缓解严重的“白色污染”问题，从而引起世界各国科学界和工业界的广泛重视。

[0003] 聚3-羟基丁酸酯（PHB）是PHA中的一种，大肠杆菌常用于PHB的工业生产。PHB是一种胞内产物，PHB颗粒是胞内的碳源储存物质，以不溶性微球状颗粒形式存在于细胞质中。PHB合成受到很多调控，如C:N比例，当碳过剩、氮缺乏时，PHB更易合成，当胞内其他C源代谢旺盛时，或者氨基酸转运酶活低时，PHB合成会受到影响。大肠杆菌合成PHB的关键在于平衡产物和细胞生长，既要使得细胞生长好，又要增强其合成途径的代谢流，并通过控制产物形成途径的表达水平来提高产量。而原始大肠杆菌菌株合成PHB的产量一般为细胞干重的0~50%，现有报道中主要通过优化发酵条件、优化代谢途径、提高胞内辅酶浓度和优化表达质粒等手段来改善PHB的合成。

发明概述

技术问题

[0004] 目前的PHB产量无法满足工业上生产的需求。因此，提供一种新的提高PHB合

成的方法，对于进一步提高PHB的合成具有十分重大的意义。

问题的解决方案

技术解决方案

- [0005] 本发明的第一个目的是提供一种重组大肠杆菌，敲除了（a）或（b），并表达β-酮基硫解酶，乙酰辅酶A还原酶和PHB合成酶的编码基因；其中，（a）为大肠杆菌基因组上ADP-L-甘油-D-甘露-庚糖-6-差向异构酶 *gmhD*基因；（b）为大肠杆菌核心糖基因簇 *gmhD*-*waaQ*。
- [0006] 在一种实施方式中，所述ADP-L-甘油-D-甘露-庚糖-6-差向异构酶GmhD的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
- [0007] 在一种实施方式中，所述核心糖基因簇含有14个基因，分别为waaQ, waaG, waaP, waaS, waaB, waaO, waaR, waaY, waaZ, waaU, waaL, waaC, waaF, *gmdD*，其序列的NCBI登录号依次为“BAE77660.1”，“BAE77661.1”，“BAE77662.1”，“BAE77663.1”，“BAE77664.1”，“BAE77665.1”，“BAE77666.1”，“BAE77667.1”，“BAE77668.1”，“BAE77669.1”，“BAE77670.1”，“BAE77671.1”，“BAE77672.1”，“BAE77673.1”。
- [0008] 在一种实施方式中，所述β-酮基硫解酶的protein ID为QBK40993.1；所述乙酰辅酶A还原酶的protein ID为QBK40994.1；所述PHB合成酶的protein ID为QBK40992.1。
- [0009] 在一种实施方式中，所述大肠杆菌为大肠杆菌W3110、大肠杆菌DH5α或大肠杆菌JM109。
- [0010] 在一种实施方式中，所述重组大肠杆菌是WJW01，其是敲除大肠杆菌W3110中核心糖基因簇得到。
- [0011] 在一种实施方式中，所述重组大肠杆菌在WJW01的基础上做了如下改造：敲除大肠杆菌基因组上O-抗原基因簇，将得到的菌株命名为WJW02。
- [0012] 在一种实施方式中；所述O-抗原基因簇为 *wbbL-rmlB*。
- [0013] 在一种实施方式中，所述O-抗原基因簇 *wbbL-rmlB* 含有11个基因，分别为wbbL::IS5, wbbK, wbbJ, wbbI, wzy, glf, wzx, rmlC

, *rmlA*, *rmlD*, *rmlB*, 其序列登录号依次为“BAA15873.1”, “BAA15874.1”, “BAA15875.1”, “BAA15876.1”, “BAA15877.1”, “BAA15878.1”, “BAA15879.1”, “BAA15880.1”, “BAA15881.1”, “BAA15882.1”, “BAA15883.1”, “BAA15884.1”。

[0014] 本发明的第二个目的是提供构建所述重组大肠杆菌的方法, 所述方法敲除 (a) 或 (b) 基因, 并将编码 β -酮基硫解酶的基因、编码乙酰辅酶A还原酶的基因和编码PHB合成酶的基因分别或共同连接在质粒上; 其中, (a) 为大肠杆菌基因组上ADP-L-甘油-D-甘露-庚糖-6-差向异构酶 *gmhD* 基因; (b) 为大肠杆菌核心糖基因簇 *gmhD-waaQ*。

[0015] 在一种实施方式中, 所述质粒为pDXW-8。

[0016] 在一种实施方式中, 所述方法将含有 β -酮基硫解酶, 乙酰辅酶A还原酶和PHB合成酶编码基因的基因簇 *phaCAB* 连接到质粒pDXW-8上, 得到重组质粒pDXW-8-*phaCAB*, 然后将重组质粒转化到细胞中。

[0017] 在一种实施方式中, 所述基因簇 *phaCAB* 的基因序列的NCBI登录号为MH558939.1。

[0018] 一种生产聚3-羟基丁酸酯 (PHB) 的方法, 所述方法将所述的重组大肠杆菌接种到发酵培养基中, 以葡萄糖为底物, 进行发酵生产。

[0019] 在一种实施方式中, 所述发酵培养基含有: 20 g/L 葡萄糖, 17.1 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L NaCl, 添加1 mM MgSO_4 , 0.1 mM CaCl_2 , 10 mg/mL 维生素B1。

[0020] 在一种实施方式中, 所述发酵具体是: 将所述重组菌的种子液转接至发酵培养基, 并加入卡那霉素和诱导剂IPTG (异丙基硫代半乳糖苷)后进行发酵。

[0021] 本发明还提供所述方法在药物制备、材料或环保领域的应用。

[0022] 在一种实施方式中, 所述应用是将生产得到的PHB作为高分子聚合物应用于所述领域中。

发明的有益效果

有益效果

[0023] (1) *gmhD*基因的敲除可以显著改善大肠杆菌W3110、DH5 α 和JM109合成PHB的能力，发酵24 h和48 h，WJW00/pDXW-8-*phaCAB*的PHB体积产量提高到2.24 g/L和2.13 g/L，较对照菌W3110/pDXW-8-*phaCAB*提高3.95和3.66倍；WJD00/pDXW-8-*phaCAB*细胞合成PHB干重比例提高约80%，转化率提高约1.9倍；WJJ00/pDXW-8-*phaCAB*细胞合成PHB干重比例提高约75%，转化率提高约1.8倍。

[0024] (2) 敲除大肠杆菌基因组上核心糖基因簇的14个基因得到突变菌WJW01，继续敲除大肠杆菌基因组上O-抗原基因簇的11个基因得到突变菌WJW02，随后将PHB合成的三个基因分别转化到精简菌株WJW01和WJW02中，得到的重组菌WJW01/pBHR68和WJW02/pBHR68分别可以合成PHB高达细胞干重的80.6%和82.0%，是野生型对照菌W3110/pBHR68（1.5%）的53.7和54.7倍。

对附图的简要说明

附图说明

[0025] 图1：大肠杆菌大片段敲除示意图。

[0026] 图2：工程菌WJW00的构建。

[0027] 图3：菌株W3110/pDXW-8-*phaCAB*和WJW00/pDXW-8-*phaCAB*合成PHB颗粒的激光共聚焦纤维镜观察。DIC：differential interference contrast，即白光条件下差分干涉对比度；FITC：fluorescence contrast，尼罗红染色后在激发光488 nm条件下的荧光对比度；Merged：DIC条件和FITC条件下的图片叠加后的效果，即将白光条件和荧光条件下的成像叠加。

[0028] 图4：菌株W3110/pDXW-8-*phaCAB*和WJW00/pDXW-8-*phaCAB*合成PHB颗粒的超薄切片电镜观察。

[0029] 图5：大肠杆菌W3110/pDXW-8-*phaCAB*和WJW00/pDXW-8-*phaCAB*合成PHB的摇瓶发酵。

[0030] 图6：重组菌株DH5 α /pDXW-8-*phaCAB*、WJD00/pDXW-8-*phaCAB*、JM109/pDXW-8-*phaCAB*和WJJ00/pDXW-8-*phaCAB*细胞合成PHB的摇瓶发酵。

[0031] 图7：质粒pDTW202-cat的构建

[0032] 图8: LPS精简菌株WJW02的构建

[0033] 图9: PCR验证WJW02的构建; 泳道1: 在W3110中敲除基因簇waaQ-gmhD;
泳道2: 在W3110中敲除基因簇wbbL-rmlB; 泳道3和4: 野生菌W3110对照。

[0034] 图10: 重组菌株W3110/pBHR68和WJW00/pBHR68合成PHB的电镜观察。a和b
分别为菌株W3110/pBHR68和WJW00/pBHR68合成PHB颗粒的激光共聚焦纤维镜
观察。DIC: differential interference

contrast, 即白光条件下差分干涉对比度; FITC: fluorescence contrast, 尼罗红染色后在激发光488 nm条件下的荧光对比度; Merged: DIC条件和FITC条件下的
图片叠加后的效果, 即将白光条件和荧光条件下的成像叠加。c和d分别为菌株W
3110/pBHR68和WJW00/pBHR68合成PHB颗粒的超薄切片电镜观察。

[0035] 图11: 重组菌株WJW01/pBHR68、WJW02/pBHR68和对照菌W3110/pBHR68合
成PHB的摇瓶发酵。

[0036] 生物材料

[0037] 野生型大肠杆菌W3110购买自ATCC, 保藏编号为ATCC39936。

[0038] 大肠杆菌WJW00 (基因型为E.coliW3110ΔgmhD) 已经于专利《一种产Kdo2-li
pidA的基因工程菌及其构建方法和应用》(公布号: CN103820377A, 公开日:
2014.05.28) 中公开, 其是在野生型大肠杆菌W3110中, 敲除核心糖中L-D-庚糖
合成关键基因 *gmhD* 获得。

[0039] 表1 序列表

[0040] [表1]

序列	编号
gmhD的氨基酸序列	SEQ ID NO.1
gmhD基因敲除片段的核苷酸序列	SEQ ID NO.2
waaQ基因敲除片段的核苷酸序列	SEQ ID NO.3
wbbL基因敲除片段的核苷酸序列	SEQ ID NO.4
rmlB基因敲除片段的核苷酸序列	SEQ ID NO.5

发明实施例

本发明的实施方式

[0041] (1) 大肠杆菌的电镜观察

[0042] ①细胞结晶紫染色及光学显微镜观察：离心发酵液，并从菌体部分取0.5 μL菌体涂到干净的载玻片上，固定烘干，并滴上一滴0.1%结晶紫染色1 min，冲洗烘干后滴香柏油，进行光学显微镜油镜观察，并拍照。

[0043] ②激光共聚焦纤维镜观察：取发酵菌体0.5 mL，将菌体用pH 7.4的磷酸盐缓冲液洗涤2次，配制尼罗红染液（1 μmol尼罗红，溶于1 μg/μL的DMSO中），并重悬菌液后置于37 °C暗室中染色30 min，用铝箔将EP管包好避免见光。染色结束后，再次用预冷的pH 7.4的磷酸盐缓冲液洗涤菌体三次，尽量在黑暗条件下打开操作。在暗室中吸取10 μL菌液置于载玻片上并加盖盖玻片，用拇指按压5 s以上，接着用指甲油封边，指甲油干燥后关灯黑暗条件下进行激光共聚焦纤维镜观察。首先将玻片倒置于LCFM载物台上，粗调下找到细胞区域，再对准区域调好焦距和激发波长480nm，用LCFM放大一定倍数进行观察。若观察过程中发现细胞有流动现象则应重新制样，并特别注意封边的操作，细胞的固定程度越好，成像越好越清晰。固定好发射光，调整好放大倍数，进行多视野拍照。

[0044] ③超薄切片电镜观察：采取磷钨酸负染法。首先将菌体收集后，用PBS（pH 7.4）洗涤菌体，并用2.5%的戊二醛（溶剂为终浓度为0.1 M的PBS，pH7.4）固定，需要加手套和口罩，加满静置，待5 min后用牙签将菌体团挑起，使得固定液充分将菌体固定，再加满固定液，封口，防止运输过程中把菌体打散。然后进行脱水，包埋和超薄切片，最后负染进行电镜观察。

[0045] (2) PHB产量测定方法：将发酵液倒入离心管中静止放置2 h，弃去上清后，冷冻菌体，并冷冻干燥。称取一定量冷冻干燥菌体进行甲酯化，采用已报道的常规甲酯化方法甲酯化，最后进行常规气象色谱定量。

[0046] (3) 发酵参数测定方法

[0047] ①OD和pH测定：用去离子水调零，调整稀释倍数至在比色皿中测的OD₆₀₀在0.2至0.8之间。待示数稳定后记录读数，乘以稀释倍数，即得OD。

[0048] 对刚取的发酵样品直接进行pH测定，采用pH计测定直接读数。

- [0049] ②残糖测定：SBA-40C生物传感器是通过葡萄糖分子和反应膜上的受体结合所反映出电信号变化来定量葡萄糖浓度的；测定方法是：将样品10000 rpm离心2 min，将20 μ l上清液加入到总体系为1000 μ l的待测体系中，并剧烈震荡均匀；准确吸取25 μ l标样（含有1g/L葡萄糖）快速打入进样孔内，等待仪器平衡后，待指示灯不闪烁后，重复3针以上，均基本一致，视为定标完成；准确吸取25 μ l样品快速打入进样孔内，记录仪器显示屏指数，除以2即得残糖数值。
- [0050] ③PHB的提取和测定：取不同发酵时间的PHB合成细胞，离心收集5 mL细胞，采用pH 7.4的PBS缓冲液洗涤两次，离心收集后，将细胞转移到预先准确称重的离心管中，包上保鲜膜，并扎出多个小洞，使得水分可以蒸干，又避免菌液喷出，在真空冷冻干燥机中冻干48 h至完全干燥，一般触摸管底为常温状态，表明已经完全干透，或者用手指轻弹管底，菌体可以散开并轻易脱离管壁，则视为菌体完全干燥。称重量，计算出干重。
- [0051] 称取1-10 mg完全干燥的干菌体，同时称取PHB标准样品约10 mg转移至预先准确称重的酯化管中，以便准确计算称得的样品重量。然后进行酯化操作，加入2 mL甲醇（含有3%硫酸）和2 mL氯仿，加上酯化管盖子并盖紧，期间可以超声，帮助样品散开，使得酯化更彻底，沸水浴6 h以上。大约半小时后，即可观察到PHB标样一般以粉末形式迅速熔化。若未观察到半小时后标准品的形态变化与溶解，则应更换整套试剂，甲醇和氯仿的变质都会导致酯化无法正常进行，而更换新开封的试剂往往可以解决上述问题，经过六小时沸水浴后，在通风橱中冷却充分后，小心打开酯化管并加入1 mL去离子水，这时需要分别将盖子旋紧并激烈震荡至体系完全充分混匀，此时将酯化管置于通风处中静置3 h以上以分相，分相后，上层为水相，下层为有机相，取适量有机相加入到气相样品瓶中，盖紧盖子保持密封，保存在-80℃中。
- [0052] 气相色谱是定量PHB含量的准确灵敏的手段。气相定量采用岛津GC 2010气相色谱，使用安捷伦DB WAX 30m-0.32mm气相色谱柱和火焰离子化检测器，进样温度为250℃。以不同量的商业化PHB作为标样绘制各标准样品的标准曲线。
- [0053] 实施例1 工程菌WJW00的构建
- [0054] 基因的敲除方法：采取组合式位点特异性重组方法进行大片段基因簇敲除，如

图1所示，在靶基因簇的一端通过Red重组引入 *lox L-kan* 片段，接着在另一端通过Red重组引入 *cat-lox R* 片段，然后通过Cre酶表达，识别位点 *lox L* 和 *lox R*，进行位点重组，并采用AMP抗性筛选，通过抗性验证获得无Kan、Cm抗性的转化子，进一步采用PCR验证基因型，确定转化子正确无误。采用FRT位点的精简方法类似，在靶基因簇的两端引入FRT位点（可以为两个），然后通过Flp酶表达，识别FRT位点，通过抗性筛选即可获得正确敲除突变株。Flp酶可以不断识别FRT位点，直到将不含必需基因的最远端FRT位点重组。

- [0055] 工程菌WJW00已经在SCI论文《Construction and Characterization of an *Escherichia coli* Mutant Producing Kdo₂-Lipid A》中公开（公开日：2014年3月13日）。具体构建方法已记载于公开号为CN103820377B专利中。
- [0056] 实施例2 工程菌株W3110/pDXW-8- *phaCAB*和WJW00/pDXW-8- *phaCAB*的构建
- [0057] （1）质粒的构建
- [0058] 质粒pDXW-8- *phaCAB*已经于文章《Ma, W., Wang, J., Li, Y., et.al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-produced with L-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum* WM001 [J]. Microb Cell Fact, 2018, 17 (1): 93 10.1186/s12934-018-0942-7》中公开（公开日：2018-12-31）。具体构建过程如下：
- [0059] 以罗氏真养菌基因组NC_008313.1为模板，采用引物 *phaCAB-F*/*phaCAB-R*扩增得到 *phaCAB*基因簇（*phaCAB*基因簇见登录号<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH558939.1>），用限制性内切酶 *EcoRI*和 *XhoI*消化PCR产物，载体pDXW-8（专利：一种大肠杆菌-棒状杆菌穿梭型诱导表达载体PDXW-8及其构建方法，公开日：2010-04-14）也用 *EcoRI*和 *XhoI*消化处理，酶切产物纯化后，使用T4连接酶22℃过夜连接，转化至大肠杆菌DH5α，筛选正确转化子，得到正确转化子DH5α/pDXW-8- *phaCAB*，提取质粒即获得正确重组质粒pDXW-8- *phaCAB*。
- [0060] 表2 引物序列表
- [0061]

[表2]

引物	引物序列(5'-3')
phaCAB-F	CTGGAATTCAGAAGGAGAATCAAATCATGGCGACCGG
phaCAB-R	CCGCTCGAGAGGTCAGCCCATATGCAGG

[0062] (2) 感受态的制备

[0063] 分别接种大肠杆菌W3110 (ATCC39936) 和实施例1中构建得到的工程菌WJW00于LB液体培养基中, 37°C, 200 rpm过夜培养。按2%接种量转接到50 mL LB液体培养基, 37°C, 200 rpm培养至OD₆₀₀=0.5, 将培养液冰浴半小时后转入预冷的50 mL离心管中, 4°C, 8000 rpm离心10 min收集菌体, 沉淀用预冷的0.01 M的CaCl₂洗涤3次, 最后用1 mL 0.01 M的CaCl₂悬浮, 加入1 mL 30%甘油混匀, 每管200 μL分装至预冷的无菌EP管中。

[0064] (3) 转化

[0065] 将100-200 ng的质粒pDXW-8- *phaCAB*加入感受态细胞中, 混匀, 冰浴30 min, 42°C热击90 s, 冰浴2~3 min, 加入1 mL LB培养基复苏, 37°C孵育2 h, 涂布30 μg/mL卡那霉素的LB固体平板, 37°C培养, 挑取转化子于含30 μg/mL卡那霉素的LB液体培养基中培养种子液, 即得到重组菌株W3110/pDXW-8- *phaCAB*和WJW00/pDXW-8- *phaCAB*。

[0066] 实施例3 工程菌发酵生产PHB的定性观察

[0067] LB培养基组成: 酵母粉 5 g/L, 胰蛋白胨10 g/L和NaCl 10 g/L。

[0068] M9G培养基的组成: 20g/L 葡萄糖 (Glucose), 17.1g/L 十二水合磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O), 3g/L磷酸二氢钾 (KH₂PO₄), 0.5 g/L氯化钠 (NaCl), 添加1 mM硫酸镁 (MgSO₄), 0.1 mM 氯化钙 (CaCl₂), 10mg/mL 维生素B1 (VB₁)。

[0069] (1) 种子液培养

[0070] 分别挑取重组菌W3110/pDXW-8- *phaCAB*和WJW00/pDXW-8- *phaCAB*1环菌苔至25 mL LB培养基中, 并添加30 μg/mL卡那霉素, 37 °C、200 rpm培养5 h至对数中期。

[0071] (2) 发酵合成PHB

[0072] 培养方法：将种子液（ $OD_{600}=1.8$ 左右）按照初始 $OD_{600}=0.25$ 转接至常规PHB发酵培养基M9G，并加入卡那霉素使其终浓度为 $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ ， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 200 rpm ，发酵 48 h 。

[0073] 诱导条件：0小时加入终浓度为 0.5 mM 的IPTG。

[0074] (3) 定性观察胞内合成PHB颗粒

[0075] 采用多种电镜法观察发酵细胞胞内PHB颗粒合成情况。细胞经过尼罗红染色，在激发光为 488

nm的激光共聚焦显微镜下可以发出绿色荧光，荧光越多，代表PHB含量越多。

如图3所示，对照菌W3110/pDXW-8- *phaCAB*

含有很少绿色荧光，说明所合成PHB颗粒较少，而WJW00/pDXW-8- *phaCAB*细胞合成了很多PHB颗粒，且几乎所有细胞都有绿色荧光，且细胞体积变大。

[0076] 进一步用超薄切片电镜观察，如图4所示，WJW00/pDXW-8- *phaCAB*细胞合成更多的PHB颗粒，且细胞体积明显变大，约增大5-10倍；WJW00/pDXW-8- *phaCAB*细胞膜壁厚度仅 11 nm 左右，而对照菌W3110/pDXW-8- *phaCAB*为 13 nm 左右，说明突变株WJW00的膜壁柔韧性更强，有利于PHB颗粒在胞内积累。

[0077] 实施例4 工程菌发酵生产PHB的定量测定

[0078] 采取与实施例3相同的发酵方法，对重组菌W3110/pDXW-8- *phaCAB*和WJW00/pDXW-8- *phaCAB*进行发酵，并在不同时间点取样 2 mL ，测定相应的发酵参数。

[0079] (1) 发酵 OD_{600} 和细胞干重测定

[0080] 结果表明：发酵 24 h 和 48 h 后，WJW00/pDXW-8- *phaCAB*发酵 OD_{600} 达到 9.0 和 9.8 ，而对照菌W3110/pDXW-8- *phaCAB*仅 5.6 和 6.1 （图5a），细胞干重提高 47.9% 和 67.0% （图5b），但是细胞耗糖仅增加了 30.4% 和 34.3% （图5c）。

[0081] (2) PHB产量测定：结果表明：细胞干重的提高主要是由于WJW00/pDXW-8- *phaCAB*胞内PHB颗粒积累更多，在 24 h 和 48 h ，WJW00/pDXW-8- *phaCAB*分别可以合成PHB高达细胞干重的 67.8% 和 63.4% ，而野生对照菌W3110/pDXW-8- *phaCAB*仅为 22.5% 和 20.5% （图5d）；同时使得体积产量也明显提高为 2.24

g/L和2.13 g/L, 较W3110/pDXW-8- *phaCAB*提高3.95和3.66倍(图5e); 葡萄糖转化为PHB的转化系数达到0.224 g/g和0.185 g/g, 而W3110/pDXW-8- *phaCAB*的转化系数仅为0.063 g/g和0.053 g/g(图5f)。可见, *gmhD*基因的敲除可以显著改善大肠杆菌W3110合成PHB的能力。

[0082] 表3 工程菌WJW00/pDXW-8- *phaCAB*发酵生产PHB

[0083]

测定参数	6h		24h		48h	
	W3110	WJW00	W3110	WJW00	W3110	WJW00
	/pDXW-8-	/pDXW-8-	/pDXW-8-	/pDXW-8-	/pDXW-8-	/pDXW-8-
	<i>phaCAB</i>	<i>phaCAB</i>	<i>phaCAB</i>	<i>phaCAB</i>	<i>phaCAB</i>	<i>phaCAB</i>
发酵OD ₆₀₀	2.07	4.53	5.6	9.0	6.1	9.8
细胞干重 DCW (g/L)	1.01	1.72	2.23	3.30	2.01	3.36
PHB (wt%)	25.15	48.05	22.45	67.80	20.49	63.40
PHB产量 (g/L)	0.25	0.83	0.50	2.24	0.41	2.13
葡萄糖转化率 (g/g)	0.046	0.108	0.063	0.224	0.053	0.185

[0084] 实施例5 改造其它大肠杆菌发酵生产PHB

[0085] (1) 工程菌WJD00、WJJ00的构建

[0086] 参照与实施例1中工程菌WJW00的构建方法, 分别敲除大肠杆菌DH5 α 和JM109中 *gmhD*基因, 获得 *gmhD*突变株WJD00和WJJ00。

[0087] (2) 工程菌株DH5 α /pDXW-8- *phaCAB*、WJD00/pDXW-8- *phaCAB*的构建

[0088] 参照实施例2的方法, 将含有PHB合成相关基因的质粒pDXW-8- *phaCAB*分别转化到野生型菌株DH5 α 和突变菌WJD00中, 得到重组菌DH5 α /pDXW-8- *phaCAB*、WJD00/pDXW-8- *phaCAB*。

[0089] (3) 工程菌株JM109/pDXW-8- *phaCAB*、WJJ00/pDXW-8- *phaCAB*的构建

[0090] 参照实施例2的方法, 将含有PHB合成相关基因的质粒pDXW-8- *phaCAB*分别转化到野生型菌株JM109和突变菌WJJ00中, 得到重组菌JM109/pDXW-8- *phaCAB*、WJJ00/pDXW-8- *phaCAB*。

[0091] (4) 菌株发酵生产PHB

[0092] 按照实施例3相同的发酵方法, 将步骤(2)和步骤(3)中得到的重组菌进行

发酵生产PHB。对各重组菌株的摇瓶发酵进行发酵参数测定。

[0093] 表4 重组菌发酵24h生产PHB

[0094] [表3]

测定参数	W3110 /pDXW- 8-phaCA B	WJW00 /pDXW- 8-phaCA B	DH5 α /p DXW-8- phaCAB	WJD00/p DXW-8- phaCAB	JM109/p DXW-8- phaCAB	WJJ00/p DXW-8- phaCAB
细胞干重DCW (g /L)	1.912	3.302	2.333	3.981	2.418	4.936
PHB (wt%)	22.5	67.8	39.40	78.3	46.2	84.3
葡萄糖转化率 (g/ g)	0.063	0.224	0.136	0.371	0.146	0.362

[0095] 表5 重组菌发酵48h生产PHB

[0096] [表4]

测定参数	W3110 /pDXW- 8-phaCA B	WJW00 /pDXW- 8-phaCA B	DH5 α /pDXW- 8-phaCA B	WJD00 /pDXW- 8-phaCA B	JM109 /pDXW- 8-phaC AB	WJJ00 /pDXW-8 -phaCAB
细胞干重DCW (g/L)	2.013	3.362	2.487	4.418	2.575	5.510
PHB (wt%)	20.5	63.4	43.3	78.6	48.3	84.8
葡萄糖转化率 (g /g)	0.053	0.185	0.116	0.387	0.126	0.368

[0097] (1) 重组菌株WJD00/pDXW-8- *phaCAB*发酵参数测定

[0098] 结果表明：摇瓶发酵24 h和48 h后，重组菌株WJD00/pDXW-8- *phaCAB*细胞的细胞干重达到3.98 g/L和4.42

g/L (图6a), 合成的PHB达到细胞干重的78.3%和78.6% (图6b), 葡萄糖转化为PHB的转化系数为0.37 g/g和0.39 g/g (图6c); 而DH5 α /pDXW-8- *phaCAB*细胞干重仅2.33 g/L和2.49 g/L (图6a), PHB产量为39.4%和43.3% (图6b), 葡萄糖转化为PHB的转化系数为0.14 g/g和0.12 g/g (图6c)。较对照菌DH5 α /pDXW-8- *phaCAB*而言, WJD00/pDXW-8- *phaCAB*细胞合成PHB干重比例提高约80%, 转化率提高约1.9倍。

[0099] (2) 重组菌株WJJ00/pDXW-8- *phaCAB*发酵参数测定

[0100] 摇瓶发酵24 h和48 h后, 重组菌株WJJ00/pDXW-8- *phaCAB*

细胞的细胞干重达到4.93 g/L和5.51

g/L (图6a), 合成的PHB达到细胞干重的84.3%和84.8% (图6b), 葡萄糖转化为PHB的转化系数为0.36 g/g和0.37 g/g (图6c); 而JM109/pDXW-8- *phaCAB*细胞干重仅2.42 g/L和2.57 g/L (图6a), PHB产量为46.2%和48.3% (图6b), 葡萄糖转化为PHB的转化系数为0.15 g/g和0.13

g/g (图6c)。较对照菌JM109/pDXW-8- *phaCAB*而言, WJJ00/pDXW-8- *phaCAB*细胞合成PHB干重比例提高约75%, 转化率提高约1.8倍。

[0101] 实施例6LPS精简菌株WJW01的构建

[0102] 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 包括类脂A、核心糖和O-抗原三部分, 其中类脂A为高度保守区, 而核心糖和O-抗原由不同的糖分子组成。其中核心糖合成基因簇包含14个基因, 分别是waaQ, waaG, waaP, waaS, waaB, waaO, waaR, waaY, waaZ, waaU, waaL, waaC, waaF, *gmdD*

。在实施例1得到的菌株WJW00基础上继续敲除核心糖基因簇

*gmdD-waaFC-waaQGPSBORYZUL*中除 *gmhD*基因外剩余的13个基因。

[0103] (1) 参照实施例1中 *gmhD*基因的敲除过程敲除waaQ基因

[0104] 1) *waaQ*基因敲除片段的获得: 采用化学全合成或PCR分步扩增的方法获得 *waaQ*基因敲除片段, 其两端为 *waaQ*基因上下游同源臂、中间为带有FRT位点的 *kan*片段。 *waaQ*基因敲除片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。将 *waaQ*基因敲除片段克隆到pBlueScript II SK(+), 获得重组质粒pBlueScript II SK(+)- *waaQU*-F *kan*- *waaQD*。以该质粒为模板, 可以扩增获得敲除片段 *waaQU*-F *kan*- *waaQD*

- 。
- [0105] 2) 敲除感受态的制备及电转化: 具体步骤参照实施例1, 区别在于,
- [0106] 将500-1000 ng *waaQ*敲除片段加入感受态细胞中, 混匀, 冰浴15 min, 1.5 kV电击5 ms, 30 °C孵育2 h, 涂布30 µg/mL卡那霉素的LB固体平板, 30 °C培养, 挑取转化子于含30 µg/mL卡那霉素及100 µg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中培养, PCR验证结果。
- [0107] 3) 突变株抗性筛选: 将PCR验证阳性的菌株接种含30 µg/mL卡那霉素的LB液体培养基中, 42 °C过夜培养, 将培养液划线30 µg/mL卡那霉素的LB固体平板, 37 °C培养, 挑取单菌落验证其对氨苄青霉素的敏感性, 将含有卡那霉素抗性并对氨苄青霉素敏感的菌株命名为WJW00 Δ *waaQ::kan*并保藏。
- [0108] (2) 核心糖基因簇的敲除
- [0109] 步骤(1)得到的菌株WJW00 Δ *waaQ::kan*基因组上存在三个FRT位点, 分别为 *gmhD*敲除遗留的1个FRT位点和 *waaQ*敲除引入的抗性标记两端的2个FRT位点。
- [0110] 以菌株WJW00 Δ *waaQ::kan*为出发菌株做感受态, 转入pCP20质粒 (Cherepanov P P, Wackernagel W. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 1995, 158(1): 9-14), 42 °C热激表达FLP酶, 将阳性菌株于含100 µg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中培养, 加入L-阿拉伯糖 (终浓度为30 mmol/L) 诱导Flp重组酶的表达, 介导所有的FRT位点特异性重组, 因此将三个FRT位点重组后, 不仅删除了卡那霉素抗性标记, 也删除了 *gmhD*和 *waaQ*之间的所有基因。
- [0111] 采用引物 *waaQ*-U-F和 *gmhD*-D-R PCR验证挑选转化子, 将PCR验证正确的菌株42 °C热激后划线LB平板, 挑取单菌落验证其对氨苄青霉素及卡那霉素的敏感性, 选取对两种抗生素均敏感的菌株命名为WJW01并保藏。
- [0112] 表6引物序列表

[0113] [表5]

引物	引物序列(5'-3')
waaQ-U-F	CCGCTCGAGAGCACGTCAAAGTAAGT
gmhD-D-R	AAAACCTGCAGGCTTTATCGGCAGCAACA

[0114] 实施例8 LPS精简菌株WJW02的构建

[0115] O-抗原合成基因簇 *rfbBDACX-glf-wbbHIJKL*

包含11个基因，分别是wbbL::IS5，wbbK，wbbJ，wbbI，wzy，glf，wzx，rmlC，rmlA，rmlD，rmlB。在WJW01基础上进一步敲除O-抗原合成基因簇后获得WJW02。具体操作如下：

[0116] (1) 工具质粒pDTW202-*cat*的构建

[0117] O-抗原基因簇 *wbbL-rmlB*的敲除采取 *lox LR*位点特异性重组方法。因此在构建大肠杆菌基因组精简系统时，需要构建1个工具质粒pDTW202-*cat*。该质粒的构建过程具体为：

[0118] 1) 以质粒pDTW109（参见谭延振的硕士学位论文《谷氨酸棒状杆菌基因敲除系统的构建》3.2.1节，公开日：2012.03.27）为模板，利用引物 *Tac-M-cat-F*和 *Tac-M-cat-R*，扩增带有 *Tac-M-cat*基因盒，并以酶切位点 *SmaI*进行单酶双切，得到抗性片段以备连接。

[0119] 2) 以工具质粒pDTW202质粒（参见谭延振的硕士学位论文《谷氨酸棒状杆菌基因敲除系统的构建》2.4.2节，公开日：2012.03.27）为模板，利用引物pDTW202-*lox RE-F*和pDTW202-*lox LE-R*，扩增不含有 *kan*抗性基因片段的剩余质粒片段，也采用 *SmaI*进行单酶双切，所扩增的质粒片段带有 *lox L*和 *lox R*特异性位点。

[0120] 3) 将步骤1) 与步骤2) 中得到的片段利用T4连接酶进行连接，构建得到带有 *lox L-cat-lox R*基因盒的质粒pDTW202-*cat*（见图7），其含带有较强启动性的氯霉素抗性基因 *cat*，可以用于基因簇敲除筛选标记。酶切和PCR验证均正确。

[0121] (2) *wbbL*和 *rmlB*基因的敲除[0122] 1) *wbbL*和 *rmlB*基因敲除片段的获得

- [0123] *wbbL*基因敲除片段的构建：采用化学全合成或PCR分步扩增的方法获得 *wbbL* 基因敲除片段。其上下游同源臂分别设计在引物中，以工具质粒pDTW202为模板，采用引物 *wbbL-U-loxLE-kan*和 *wbbL-D-kan*直接扩增获得*wbbL*敲除片段，该敲除片段只含有lox L位点，而不含有lox R位点。*wbbL*基因敲除片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。
- [0124] *rmlB*基因敲除片段的构建：采用化学全合成或PCR分步扩增的方法获得 *rmlB* 基因敲除片段。其上下游同源臂分别设计在引物中，以工具质粒pDTW202-cat为模板，采用引物 *rfbB-U-cat*和 *rfbB-D-loxRE-cat*直接扩增获得*rmlB*敲除片段，该敲除片段只含有lox R位点，而不含有lox L位点。*rmlB*基因敲除片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。
- [0125] 2) 敲除感受态的制备及电转化：具体步骤参照实施例1，区别在于，将500-1000 ng *wbbL*敲除片段加入感受态细胞中，混匀，冰浴15 min，1.5 kv电击5 ms，30 °C孵育2 h，涂布30 µg/mL卡那霉素的LB固体平板，30 °C培养，挑取转化子于含30 µg/mL卡那霉素及100 µg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中培养，采用引物 *wbbL-F*和 *wbbL-R* PCR验证结果。正确菌株命名为WJW01Δ*wbbL*::loxL-kan。
- [0126] 在WJW01Δ*wbbL*::loxL-kan菌株中进一步敲除*rmlB*基因，将500-1000 ng *rmlB*敲除片段加入感受态细胞中，涂布30 µg/mL氯霉素的LB固体平板，30 °C培养，挑取转化子于含30 µg/mL卡那霉素及30 µg/mL氯霉素的LB液体培养基中培养，采用引物 *rml-F*和 *rml-R* PCR验证结果。
- [0127] 将PCR验证阳性的菌株接种含30 µg/mL卡那霉素及30 µg/mL氯霉素的LB液体培养基中，42 °C过夜培养，将培养液划线30 µg/mL卡那霉素及30 µg/mL氯霉素的LB固体平板，37 °C培养，挑取单菌落验证其对氨苄青霉素的敏感性，将含有卡那霉素抗性和氯霉素抗性并对氨苄青霉素敏感的菌株命名为W3110Δ *wbbL*:: kanΔ *rmlB*:: cat并保藏。
- [0128] (3) O-抗原合成基因簇的敲除
- [0129] 步骤(2)得到的菌株W3110Δ *wbbL*:: kanΔ *rmlB*:: cat基因组上存在1个lox L位点和1个lox R位点。以此为出发菌株做感受态，转入pKD-Cre质粒（韩雅宁硕士

毕业论文《合成不同结构类脂 A 分子的大肠杆菌的构建》，公开日：2013-12-31），表达Cre酶，将阳性菌株于含100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的LB液体培养基中培养，加入L-阿拉伯糖（终浓度为30 mmol/L）诱导Cre重组酶的表达，介导lox L和lox R位点特异性重组，不仅删除了卡那霉素抗性标记和氯霉素抗性标记，也删除了 *wbbL* 和 *rmlB* 之间的所有基因。采用引物 *wbbL-F* 和 *rmlB-R* 进行PCR验证，将PCR验证正确的菌株42 °C热激后划线LB平板，挑取单菌落验证其对氨苄青霉素、卡那霉素和氯霉素的敏感性，选取对三种抗生素均敏感的菌株命名为WJW02并保藏。

[0130] 精简菌株WJW02的基因型经过PCR验证正确，而对照野生型的片段太长，扩增不出条带，说明精简菌株WJW02的LPS基因簇已经被成功删除。

[0131] 表7引物序列表

[0132]

[表6]

引物	引物序列(5'-3')
Tac-M-cat-F	TCCCCCGGGGTAAGTTGGCAGCATCACCCGACGCA
Tac-M-cat-R	TCCCCCGGGAAGTGGCCTCAGGCATTTGAGAAG
pDTW202- lox RE-F	TCCCCCGGGTGGGGTTCGATAACTTCGTAT
pDTW202- lox LE-R	TCCCCCGGGTTGCGGCAGCGTGAAATAAC
wbbL-U-loxLE -kan	ACTTATTAAAGTATAAATAGCTTATCCATGCTTATATGCTT ACGGCTTTATAAATACGACTCACTATAGGGCG
wbbL-D-kan	CCTAAAGAAAGTATCTATTCTGATACGGTTGTTGATTGGT GCGCAGGATCTATCGAACCCCAGAGTCCCG
rfbB-U-cat	TAAATGCCGCAGGGCCTGTAATTGAACGGTCAACATGGCT TTCAGCAGCCAGTATTTACGCTGCCGCAACC
rfbB-D-loxRE- cat	CTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATAT GGAATAAATTAAGCGCAATTAACCCTCACTAAAG
wbbL-F	TCCCATCACTGCCATACCGA
wbbL-R	TCGGGCGGACCAAATGATAC
rml-F	CGCGTAAGCTGTCGTCTCAGTA
rml-R	TCATAGGCATGCATGCAGTGC

[0133] 实施例 9 重组菌 W3110/pBHR68、WJW01/pBHR68 和 WJW02/pBHR68 的构建

[0134] (1) 质粒 pBHR68 的构建

[0135] 质粒 pBHR68 公开于 SCI 论文 (Spiekermann, P., Rehm, B.H., Kalscheuer, R., Baumeister, D., Steinbuchel, A., 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic

acids and other lipid storage compounds. Arch. Microbiol. 171 (2), 73-80, 公开日: 1999.01.17), 其含有 *phaCAB* 基因簇并含有氨苄青霉素抗性标记, 其中 *phaCAB* 基因簇含有 β -酮基硫解酶、乙酰辅酶A还原酶和PHB合成酶的编码基因。

[0136] (2) 感受态的制备方法参照实施例2。

[0137] (3) 转化: 将100-200 ng的质粒pBHR68加入感受态细胞中, 涂布100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄霉素的LB固体平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 挑取转化子验证正确后分别命名为W3110/pBHR68、WJW01/pBHR68和WJW02/pBHR68。

[0138] 实施例10重组菌发酵生产PHB

[0139] LB培养基组成: 酵母粉 5 g/L, 胰蛋白胨10 g/L和NaCl 10 g/L。

[0140] M9G培养基的组成: 20 g/L 葡萄糖 (Glucose), 17.1 g/L 十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 3 g/L 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4), 0.5 g/L 氯化钠 (NaCl), 添加1 mM 硫酸镁 (MgSO_4), 0.1 mM 氯化钙 (CaCl_2), 10 mg/mL 维生素B1 (VB_1)。

[0141] (1) 种子液培养

[0142] 分别挑取1环实施例4中得到的重组菌W3110/pBHR68、WJW01/pBHR68和WJW02/pBHR68菌苔至25 mL LB培养基中, 并添加100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm培养5 h至对数中期。

[0143] (2) 发酵合成PHB

[0144] 培养方法: 将种子液 ($\text{OD}_{600}=1.8$ 左右) 按照初始 $\text{OD}_{600}=0.25$ 转接至常规PHB发酵培养基M9G, 并加入氨苄青霉素使其终浓度为100 $\mu\text{g/mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm, 发酵48 h。

[0145] (3) 定性观察胞内合成PHB颗粒

[0146] 采用多种电镜法观察发酵细胞胞内PHB颗粒合成情况。细胞经过尼罗红染色, 在激发光为488 nm的激光共聚焦显微镜下可以发出绿色荧光, 荧光越多, 代表PHB含量越多。如图10a和10b所示, 对照菌W3110/pBHR68几乎不含有绿色荧光, 说明几乎不含

成PHB颗粒，而WJW02/pBHR68细胞合成了很多PHB颗粒，且几乎所有细胞都有绿色荧光，且细胞体积显著变大。

[0147] 进一步用超薄切片电镜观察，如图10d和10c所示，WJW02/pBHR68细胞合成更多的PHB颗粒，且细胞体积明显变大，最高可增大25倍；WJW02/pBHR68细胞膜壁厚度仅8-9 nm左右，而对照菌W3110/pBHR68为13 nm左右，说明突变株WJW00的膜壁柔韧性更强，有利于PHB颗粒在胞内积累。

[0148] (3) 定量测定工程菌胞内合成PHB

[0149] 对重组菌W3110/pBHR68、WJW01/pBHR68和WJW02/pBHR68进行发酵，并在不同时间点取样2 mL，测定相应的发酵参数。结果表明：WJW01/pBHR68和WJW02/pBHR68的发酵曲线OD₆₀₀较野生对照W3110/pBHR68更高（图11a），24 h时分别提高1.92倍和2.10倍；WJW01/pBHR68和WJW02/pBHR68的细胞干重也较野生对照W3110/pBHR68更高（图11b），发酵24 h后，分别可提高2.2倍和2.5倍；WJW01/pBHR68和WJW02/pBHR68分别可以合成PHB高达细胞干重的80.6%和82.0%（图11c），是野生型对照菌W3110/pBHR68（1.5%）的53.7和54.7倍（图11c）；WJW01/pBHR68和WJW02/pBHR68利用葡萄糖合成PHB的转化率分别可以达到0.32 g/g和0.34 g/g，较野生对照W3110/pBHR68（0.002 g/g）可分别提高159倍和169倍。以上结果说明敲除脂多糖核心糖基因簇14个基因以及敲除O-抗原合成基因簇 *rfbBDACX-glf-wbbHIJKL* 的11个基因可以显著提高其合成PHB的能力。

[0150] 表8菌株的摇瓶发酵（24 h）

[0151] [表7]

测定参数	W3110/pBHR68	WJW01/pBHR68	WJW02/pBHR68
		8	8
OD ₆₀₀	3.45	10.09	10.70
细胞干重DCW (g/L)	1.32	4.20	4.62
PHB (wt%)	1.5	80.6	82.0
葡萄糖转化率	0.002	0.32	0.34

权利要求书

- [权利要求 1] 一种重组大肠杆菌，其特征在于，敲除了（a）或（b），并表达 β -酮基硫解酶，乙酰辅酶A还原酶和PHB合成酶的编码基因；
其中，（a）为大肠杆菌基因组上ADP-L-甘油-D-甘露-庚糖-6-差向异构酶 *gmhD*基因；（b）为大肠杆菌核心糖基因簇 *gmhD-waaQ*。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述ADP-L-甘油-D-甘露-庚糖-6-差向异构酶GmhD的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述核心糖基因簇含有14个基因，分别为waaQ, waaG, waaP, waaS, waaB, waaO, waaR, waaY, waaZ, waaU, waaL, waaC, waaF, *gmdD*，其序列的NCBI登录号依次为“BAE77660.1”，“BAE77661.1”，“BAE77662.1”，“BAE77663.1”，“BAE77664.1”，“BAE77665.1”，“BAE77666.1”，“BAE77667.1”，“BAE77668.1”，“BAE77669.1”，“BAE77670.1”，“BAE77671.1”，“BAE77672.1”，“BAE77673.1”。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述 β -酮基硫解酶的protein ID为QBK40993.1；所述乙酰辅酶A还原酶的protein ID为QBK40994.1；所述PHB合成酶的protein ID为QBK40992.1。
- [权利要求 5] 根据权利要求1~4任一所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述大肠杆菌为大肠杆菌W3110、大肠杆菌DH5 α 或大肠杆菌JM109。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述O-抗原基因簇为 *wbbL-rmlB*。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述O-抗原基因簇 *wbbL-rmlB*含有11个基因，分别为wbbL::IS5, wbbK, wbbJ, wbbI, wzy, glf, wzx, rmlC, rmlA, rmlD, rmlB，其序列登录号依次为“BAA15873.1”，“BAA15874.1”，“BAA15875.1”，“BAA15876.1”，“BAA15877.1”，“BAA15878.1”，“BAA15879.1”，“BAA15880.1”，“BAA15881.1”，“BAA15882.1”，“BAA15883.1”，“BAA15884.1”。

- [权利要求 8] 一种构建权利要求1所述重组大肠杆菌的方法，其特征在于，敲除（a）或（b）基因，并将编码 β -酮基硫解酶的基因、编码乙酰辅酶A还原酶的基因和编码PHB合成酶的基因分别或共同连接在质粒上；其中，（a）为大肠杆菌基因组上ADP-L-甘油-D-甘露-庚糖-6-差向异构酶 *gmhD* 基因；（b）为大肠杆菌核心糖基因簇 *gmhD-waaQ*。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的方法，其特征在于，所述质粒为pDXW-8。
- [权利要求 10] 根据权利要求8或9所述的方法，其特征在于，所述方法将含有 β -酮基硫解酶，乙酰辅酶A还原酶和PHB合成酶编码基因的基因簇 *phaCAB* 连接到质粒pDXW-8上，得到重组质粒pDXW-8-*phaCAB*，然后将重组质粒转化到细胞中。
- [权利要求 11] 一种生产聚3-羟基丁酸酯的方法，其特征在于，所述方法将所述的重组大肠杆菌接种到发酵培养基中，以葡萄糖为底物，进行发酵生产。
- [权利要求 12] 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，所述发酵培养基含有：10~30 g/L 葡萄糖，15~20 g/L Na_2HPO_4 ，1~5 g/L KH_2PO_4 ，0.2~0.8 g/L NaCl ，0.5~1.5 mM MgSO_4 ，0.05~0.2 mM CaCl_2 ，5~15 mg/mL 维生素B1。
- [权利要求 13] 根据权利要求11或12所述的方法，其特征在于，所述发酵具体是：将所述重组菌的种子液转接至发酵培养基，并加入卡那霉素和诱导剂IPTG（异丙基硫代半乳糖苷）后进行发酵。
- [权利要求 14] 权利要求1~7任一所述的重组大肠杆菌或权利要求11~13任一所述的方法在药物制备、材料或环保领域的应用。
- [权利要求 15] 根据权利要求14所述的应用，其特征在于，将生产得到的聚3-羟基丁酸酯作为高分子聚合物应用于所述领域中。

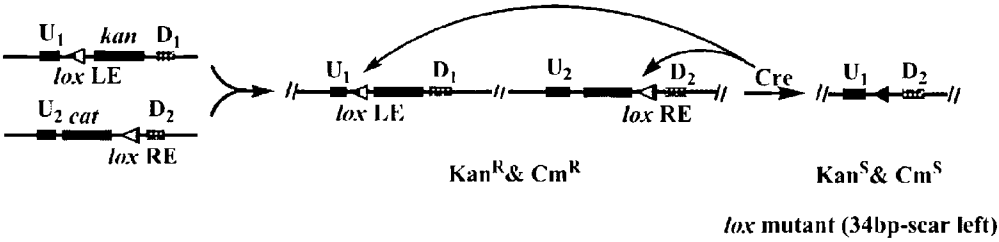


图 1

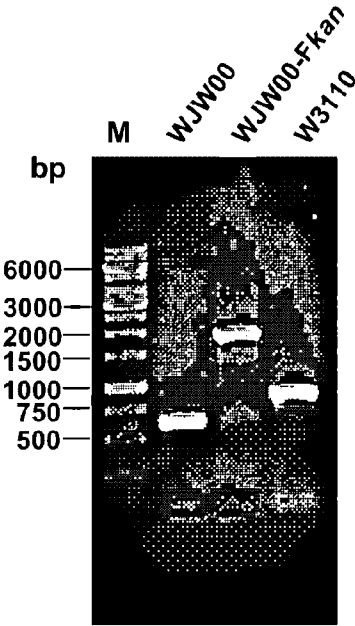


图 2

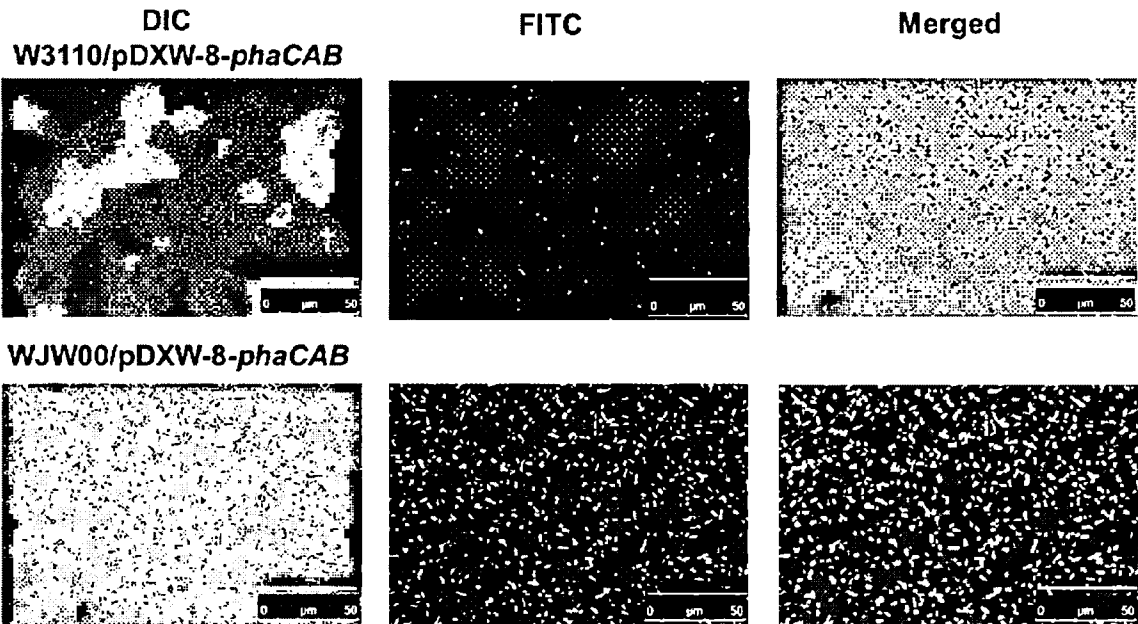
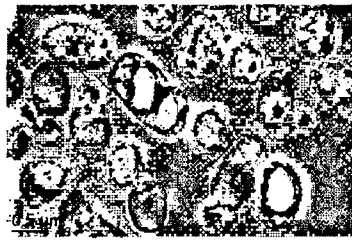


图 3

W3110/pDXW-8-*phaCAB*



WJW00/pDXW-8-*phaCAB*

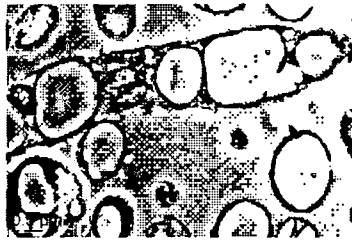
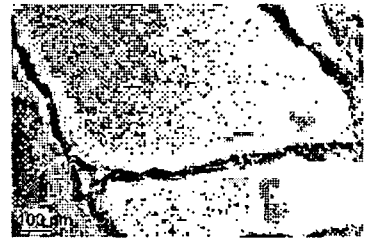


图 4

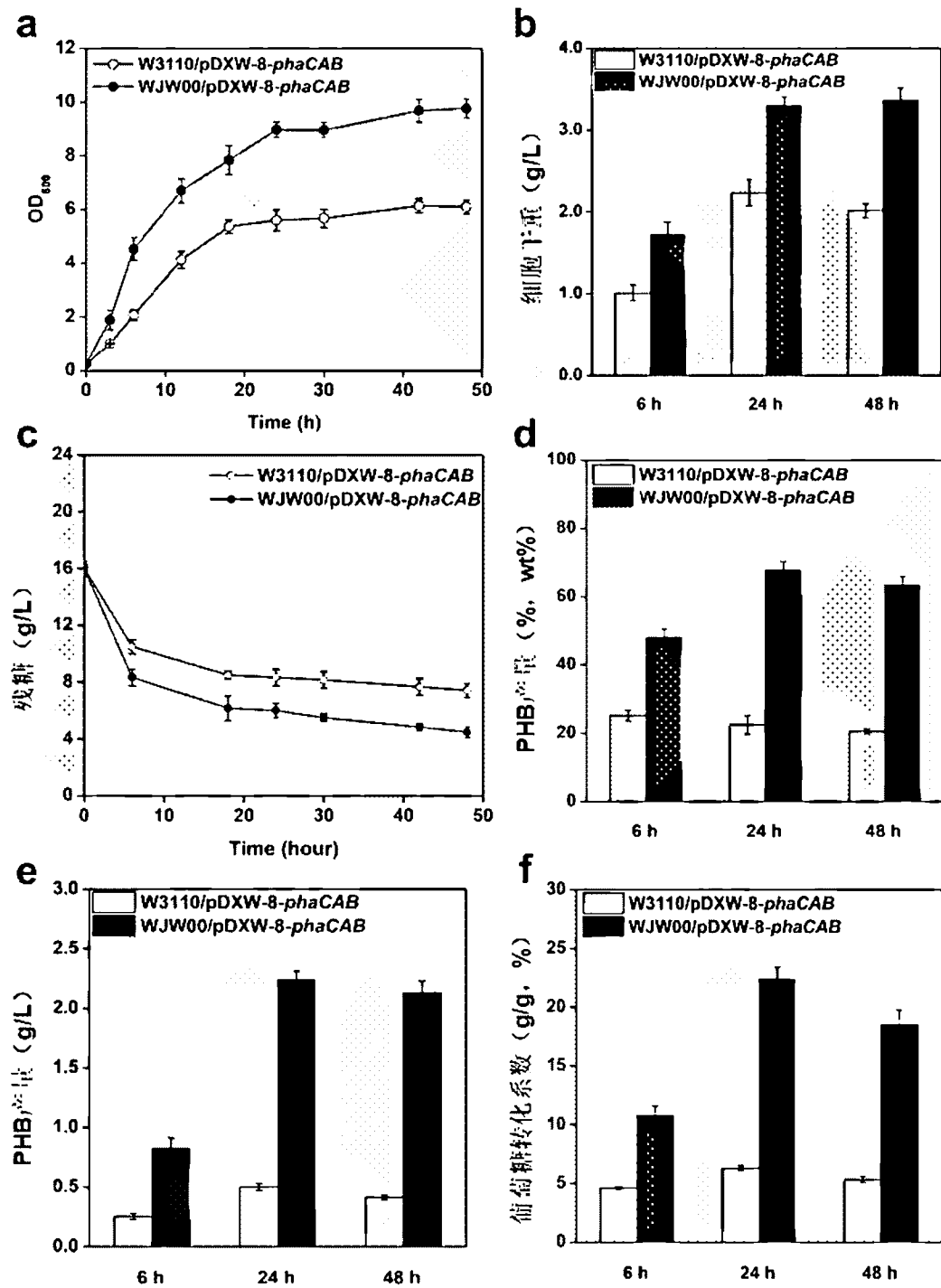


图 5

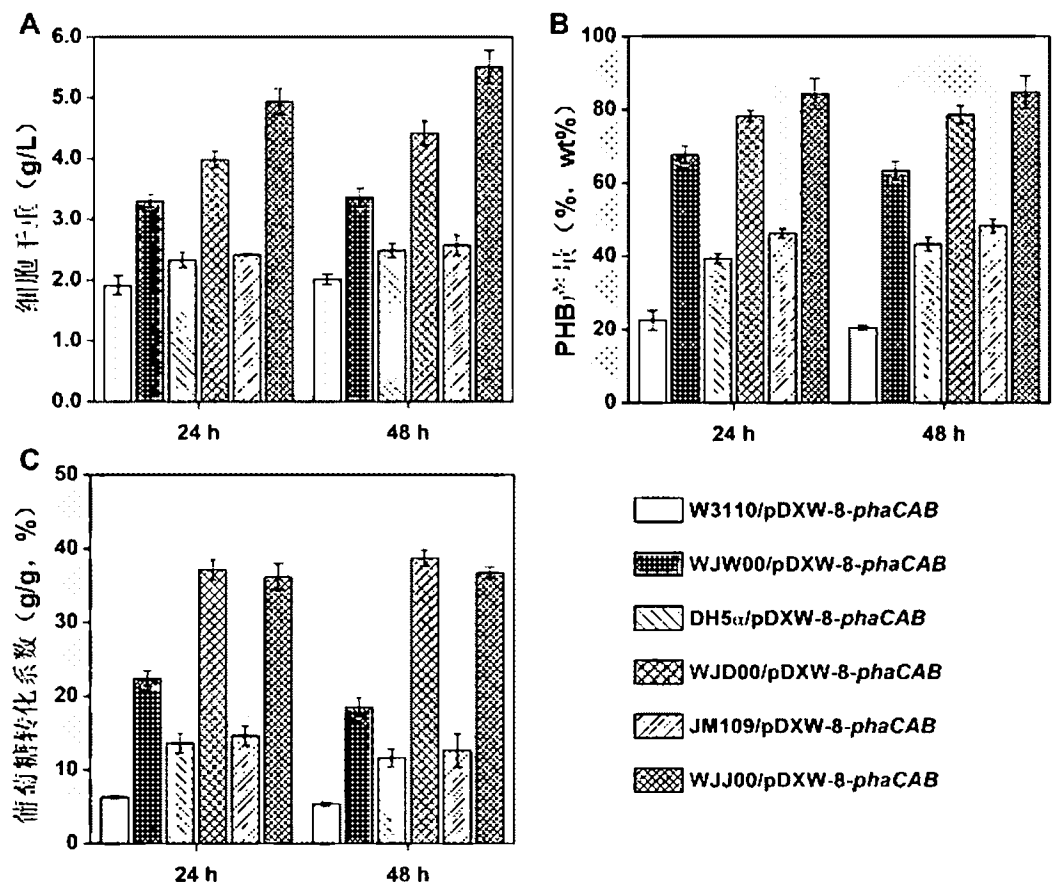


图 6

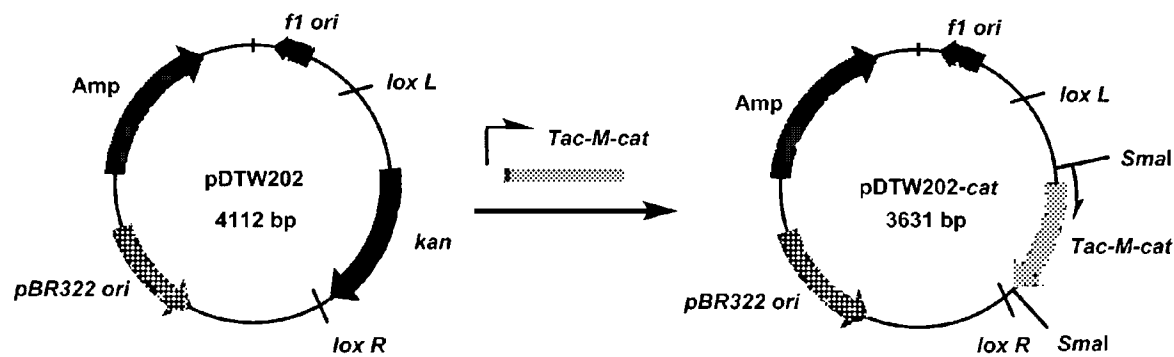


图 7

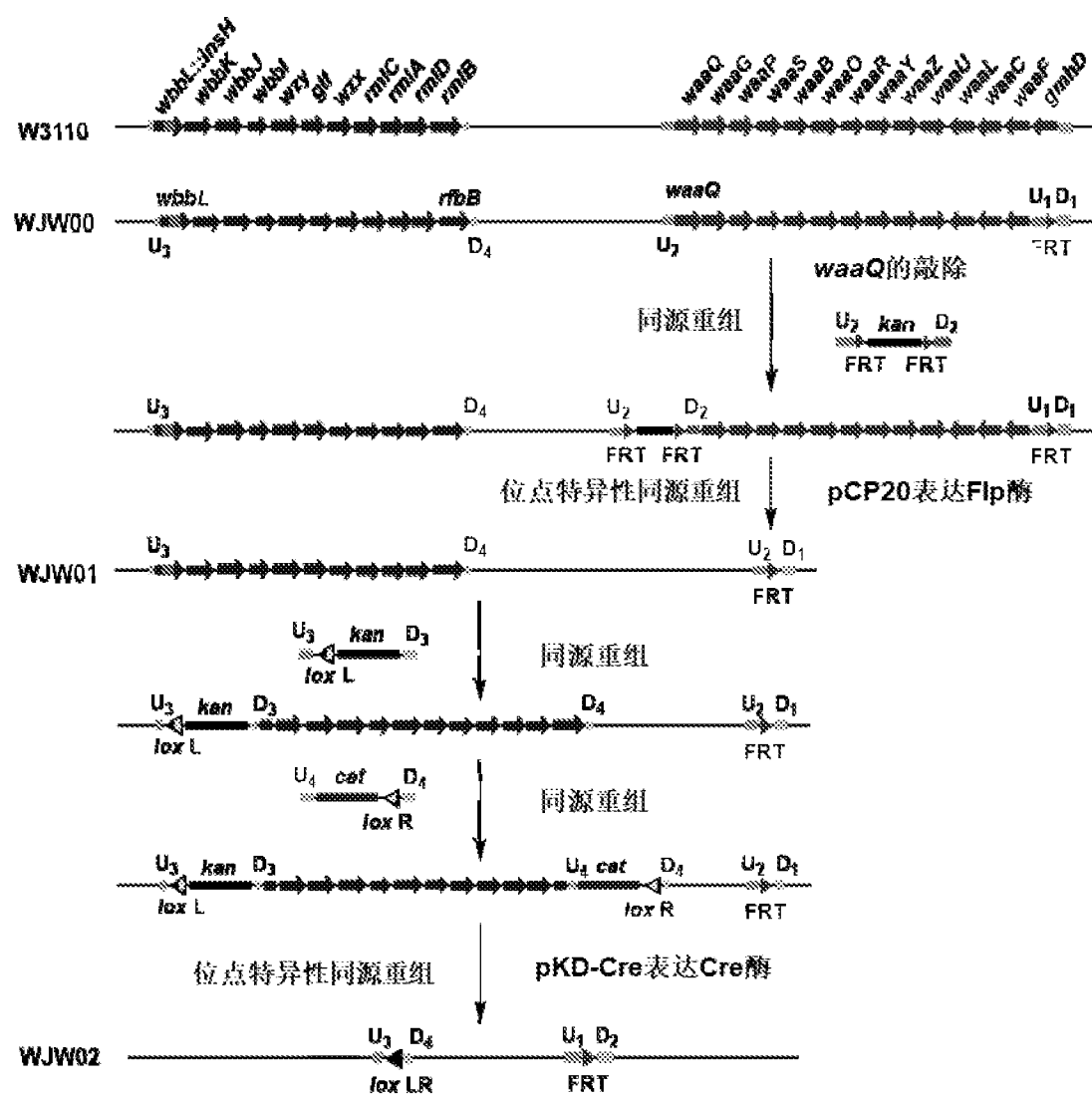


图 8

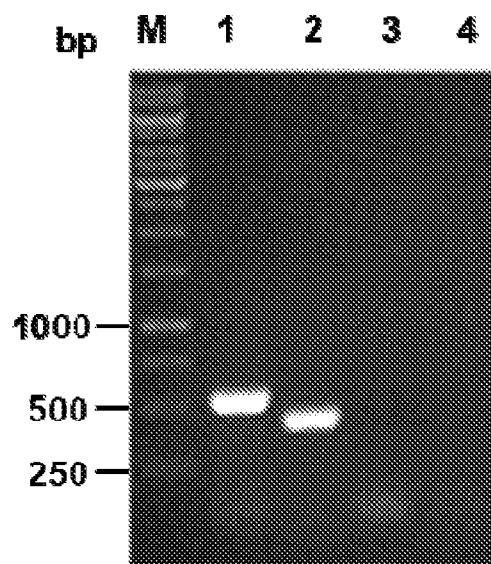


图 9

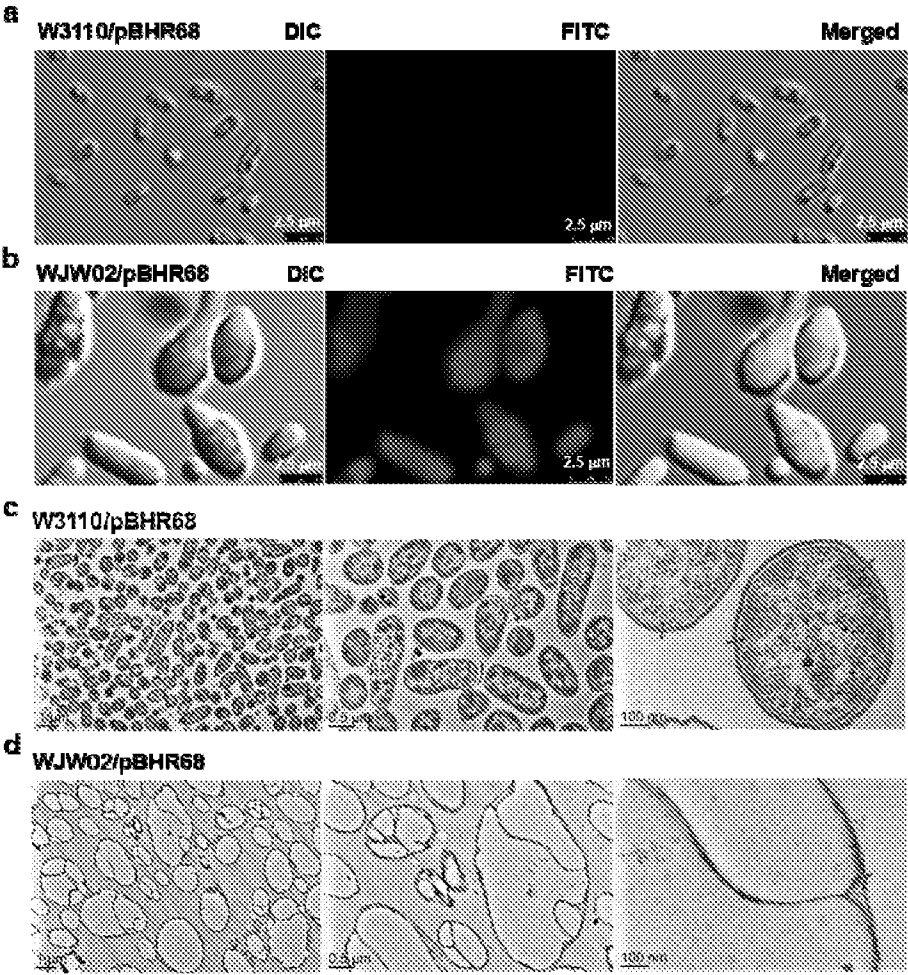


图 10

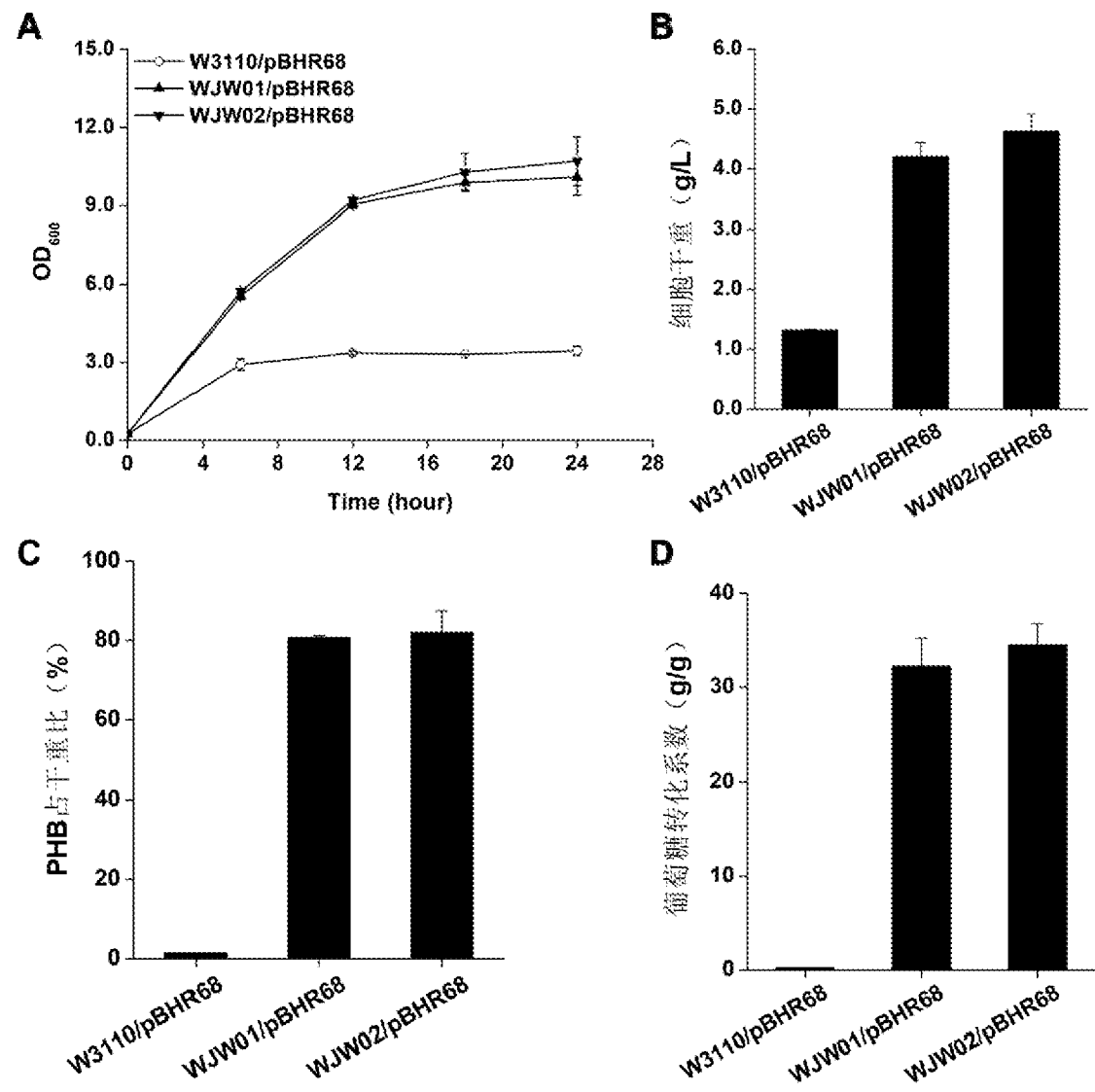


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/109099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/62(2006.01)i; C12R 1/19(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; 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, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED: 重组, 大肠杆菌, 敲除, β -酮基硫解酶, 乙酰辅酶A还原酶, PHB合成酶, ADP-L-甘油-D-甘露-庚糖-6-差向异构酶, 核心糖基因簇, 聚3-羟基丁酸酯, recombine, E COLI., knockout, gmhD, waaQ, keto thiolase, acetyl coenzyme A reductase, PHB synthetase; GenBank +EMBL+中国专利生物序列检索系统; sequence search for SEQ ID NO: 1.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	刘巧洁 (LIU, Qiaojie). "代谢工程方法改造大肠杆菌生产聚3-羟基丁酸酯 (Non-official translation: Metabolic engineering method for transforming E. coli to produce poly 3-hydroxybutyrate)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 (电子期刊) 基础科学辑 (China Master's Theses Full-text Database(Electronic Journal), Basic Sciences), No. 3, 31 March 2017 (2017-03-31), pages A006-473, see pages 11-14, part 1.4 Topic Selection Background and Research Content	11-13, 15 and 14 (in part)
A	CN 101392231 A (SHANDONG UNIVERSITY) 25 March 2009 (2009-03-25) see entire document	1-15
A	CN 107384843 A (SHANGHAI BLG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 24 November 2017 (2017-11-24) see entire document	1-15
A	CN 101363032 A (SHANDONG UNIVERSITY) 11 February 2009 (2009-02-11) see entire document	1-15



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
 "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

22 April 2020

Date of mailing of the international search report

06 May 2020

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/CN2019/109099

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Md. Mohiuddin Kabir et al. "Gene expression patterns for metabolic pathway in <i>pgi</i> knockout <i>Escherichia coli</i> with and without <i>phb</i> genes based on RT-PCR" <i>Journal of Biotechnology</i> , Vol. 105, 31 December 2003 (2003-12-31), pp. 11-31, see entire document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/109099

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101392231	A	25 March 2009	None			
CN	107384843	A	24 November 2017	None			
CN	101363032	A	11 February 2009	CN	101363032	B	30 March 2011

A. 主题的分类 C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/62(2006.01)i; C12R 1/19(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; 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)) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED: 重组, 大肠杆菌, 敲除, β -酮基硫解酶, 乙酰辅酶A还原酶, PHB合成酶, ADP-L-甘油-D-甘露-庚糖-6-差向异构酶, 核心糖基因簇, 聚3-羟基丁酸酯, recombine, E COLI., knockout, gmhD, waaQ, keto thiolase, acetyl coenzyme A reductase, PHB synthetase; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统:对SEQ ID NO:1的序列检索。																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>刘巧洁. "代谢工程方法改造大肠杆菌生产聚3-羟基丁酸酯" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊) 基础科学辑, 第3期, 2017年 3月 31日 (2017 - 03 - 31), 第A006-473页, 参见第11-14页 "1.4 选题背景和研究内容" 部分</td> <td>11-13, 15和 14 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101392231 A (山东大学) 2009年 3月 25日 (2009 - 03 - 25) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107384843 A (上海北连生物科技有限公司) 2017年 11月 24日 (2017 - 11 - 24) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101363032 A (山东大学) 2009年 2月 11日 (2009 - 02 - 11) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Md. Mohiuddin Kabir 等. "Gene expression patterns for metabolic pathway in pgi knockout Escherichia coli with and without phb genes based on RT-PCR" Journal of Biotechnology, 第105卷, 2003年 12月 31日 (2003 - 12 - 31), 第11-31页, 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	刘巧洁. "代谢工程方法改造大肠杆菌生产聚3-羟基丁酸酯" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊) 基础科学辑, 第3期, 2017年 3月 31日 (2017 - 03 - 31), 第A006-473页, 参见第11-14页 "1.4 选题背景和研究内容" 部分	11-13, 15和 14 (部分)	A	CN 101392231 A (山东大学) 2009年 3月 25日 (2009 - 03 - 25) 参见全文	1-15	A	CN 107384843 A (上海北连生物科技有限公司) 2017年 11月 24日 (2017 - 11 - 24) 参见全文	1-15	A	CN 101363032 A (山东大学) 2009年 2月 11日 (2009 - 02 - 11) 参见全文	1-15	A	Md. Mohiuddin Kabir 等. "Gene expression patterns for metabolic pathway in pgi knockout Escherichia coli with and without phb genes based on RT-PCR" Journal of Biotechnology, 第105卷, 2003年 12月 31日 (2003 - 12 - 31), 第11-31页, 参见全文	1-15
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	刘巧洁. "代谢工程方法改造大肠杆菌生产聚3-羟基丁酸酯" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊) 基础科学辑, 第3期, 2017年 3月 31日 (2017 - 03 - 31), 第A006-473页, 参见第11-14页 "1.4 选题背景和研究内容" 部分	11-13, 15和 14 (部分)																		
A	CN 101392231 A (山东大学) 2009年 3月 25日 (2009 - 03 - 25) 参见全文	1-15																		
A	CN 107384843 A (上海北连生物科技有限公司) 2017年 11月 24日 (2017 - 11 - 24) 参见全文	1-15																		
A	CN 101363032 A (山东大学) 2009年 2月 11日 (2009 - 02 - 11) 参见全文	1-15																		
A	Md. Mohiuddin Kabir 等. "Gene expression patterns for metabolic pathway in pgi knockout Escherichia coli with and without phb genes based on RT-PCR" Journal of Biotechnology, 第105卷, 2003年 12月 31日 (2003 - 12 - 31), 第11-31页, 参见全文	1-15																		
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> "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 </td> </tr> </table>			* 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																
* 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		国际检索报告邮寄日期																		
2020年 4月 22日		2020年 5月 6日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员																		
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		吴汀晨 电话号码 86-(010)-62089319																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/109099

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	101392231	A	2009年 3月 25日	无	
CN	107384843	A	2017年 11月 24日	无	
CN	101363032	A	2009年 2月 11日	CN 101363032	B 2011年 3月 30日