



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112662607 A

(43) 申请公布日 2021.04.16

(21) 申请号 202110017460.5 *A61K 35/741* (2015.01)
(22) 申请日 2021.01.07 *A61K 38/51* (2006.01)
(71) 申请人 上海陶宇晟生物技术有限责任公司 *A61P 3/00* (2006.01)
地址 201201 上海市浦东新区瑞庆路528号 *C12R 1/19* (2006.01)
1号楼甲
(72) 发明人 蒋宇
(74) 专利代理机构 上海申浩律师事务所 31280
代理人 贾师英
(51) Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)

权利要求书2页 说明书25页
序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

具备表面展示苯丙氨酸解氨酶的工程益生菌

(57) 摘要

本发明公开了一种具备表面展示苯丙氨酸解氨酶的工程益生菌,其为大肠杆菌Nissle 1917衍生菌,在基因组上敲除了基因argR和/或发生了基因argA(Y19C)突变,整合了L-苯丙氨酸解氨酶基因stlA、L-苯丙氨酸内运蛋白基因pheP、L-氨基酸脱氨酶基因pma、外排泵基因acrA。该工程益生菌能够用于治疗苯丙酮尿症。

1. 一种工程益生菌, 其为大肠杆菌Nissle 1917衍生菌, 其特征在于, 具备表面展示的L-苯丙氨酸解氨酶。

2. 如权利要求1所述的工程益生菌, 其特征在于, 以大肠杆菌Nissle 1917为底盘菌, 通过质粒表达或者基因组整合而得到; 或者

以胞内已具备苯丙氨酸解氨酶的大肠杆菌Nissle 1917工程菌为基础, 再进行表面展示苯丙氨酸解氨酶的基因工程改造而得到。

3. 如权利要求2所述的工程益生菌, 其特征在于, 所述胞内已具备苯丙氨酸解氨酶的大肠杆菌Nissle 1917工程菌通过下述步骤构建得到: 在大肠杆菌Nissle 1917基因组上整合了外源L-苯丙氨酸解氨酶基因st1A、外源L-苯丙氨酸内运蛋白基因pheP和外源L-氨基酸脱氨酶基因pma。

4. 如权利要求3所述的工程益生菌, 其特征在于, 还整合了内源的外排泵基因acrA; 并且/或者敲除了基因argR和/或发生了基因argA(Y19C) 突变; 并且/或者对st1A、pheP、acrA基因的RBS序列进行优化。

5. 如权利要求4所述的工程益生菌, 其特征在于, 所述L-苯丙氨酸解氨酶基因st1A的核苷酸序列是SEQ ID NO:1; 所述L-苯丙氨酸内运蛋白基因pheP的核苷酸序列是SEQ ID NO:2; 所述L-氨基酸脱氨酶基因是pma的核苷酸序列是SEQ ID NO:3; 所述外排泵基因acrA的核苷酸序列是SEQ ID NO:4。

6. 如权利要求4所述的工程益生菌, 其特征在于, st1A基因的RBS序列变化为SEQ ID NO:5; pheP基因的RBS序列变化为SEQ ID NO:6; acrA基因的RBS序列变化为SEQ ID NO:7。

7. 如权利要求1所述的工程益生菌, 其特征在于, 菌株的基因型是: EcN(malP::Pj23119H-st1A, yicS::Pj23119H-st1A, malE::Pj23119H-st1A, rthC::Ptac-st1A, exo::Ptac-st1A, lacZ::Pj23119H-pheP, agaI::Pj23119H-pheP, araBD::Para-pma, dapA::inaK-st1A, argA*, Δ argR, lacZ::Pj23119H-acrA)。

8. 一种构建如权利要求1-7中任一项所述工程益生菌的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

A. 以含表面展示st1A质粒pINP-st1A的工程益生菌EcN/pINP-st1A为底盘菌, 分别在基因组的malP位点、yicS位点、malE位点、rthC位点和exo位点中的一个以上位点敲入L-苯丙氨酸解氨酶基因st1A, 获得st1A基因整合菌株;

B. 对于步骤A中获得的st1A基因整合菌株, 在其基因组的lacZ位点和agaI位点中的一个以上位点敲入L-苯丙氨酸内运蛋白基因pheP, 得到st1A+pheP整合菌株;

C. 对于步骤B中获得的st1A+pheP整合菌株, 在其基因组的araBD位点敲入L-氨基酸脱氨酶基因pma, 得到st1A+pheP+pma整合菌株;

D. 对于步骤C中获得的st1A+pheP+pma整合菌株, 敲除其基因组中的二氢吡啶二羧酸合酶基因dapA, 得到st1A+pheP+pma Δ dapA菌株;

E. 对于步骤D中获得的st1A+pheP+pma Δ dapA菌株, 对其基因组的argA位点进行(Y19C) 突变, 得到st1A+pheP+pma Δ dapA argA*菌株;

F. 对于步骤E中获得的st1A+pheP+pma Δ dapA argA*菌株, 敲除其基因组中的argR, 得到st1A+pheP+pma Δ dapA argA* Δ argR菌株。

9. 如权利要求8所述的方法, 其特征在于, 还包括以下步骤:

G. 对于步骤F中获得的stlA+pheP+pma Δ dapA argA* Δ argR菌株,在其基因组的lacZ位点敲入外排泵基因acrA,得到stlA+pheP+pma+acrA Δ dapA argA* Δ argR菌株;

H. 对于步骤G中获得的stlA+pheP+pma+acrA Δ dapA argA* Δ argR菌株,将其基因组中stlA基因的RBS序列变化为SEQ ID NO:5,pheP基因的RBS序列变化为SEQ ID NO:6,acrA基因的RBS序列变化为SEQ ID NO:7,得到RBS优化菌株;

I. 对于步骤H中获得的RBS优化菌株,在其基因组的dapA位点敲入表面展示stlA基因,得到具备表面展示苯丙氨酸解氨酶的工程益生菌。

10. 如权利要求1-7中任一项所述的工程益生菌在制备苯丙酮尿症治疗药物中的应用。

具备表面展示苯丙氨酸解氨酶的工程益生菌

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,具体地说,涉及一种具备表面展示苯丙氨酸解氨酶的工程益生菌、其构建方法及其在制备苯丙酮尿症治疗药物中的应用。

背景技术

[0002] 苯丙酮尿症(phenylketonuria,PKU)是一种先天的苯丙氨酸代谢障碍疾病,是一种常染色体隐性遗传病。在中国,PKU在新生儿中的发病率大概在1/11000,已被列为新生儿必查的疾病项目。

[0003] 苯丙酮尿症是因肝脏苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase,PAH)缺乏或四氢生物喋呤合成酶、二氢生物喋呤还原酶突变导致。正常情况下,苯丙氨酸经PAH催化生成酪氨酸,然后通过酪氨酸代谢途径合成甲状腺、肾上腺和黑色素等。PAH突变,导致苯丙氨酸在肝脏中出现代谢紊乱,无法转化为酪氨酸,而是苯丙氨酸与 α -酮戊二酸在血液与组织中堆积并被排泄到尿液中,另外,其代谢产物在中枢神经中蓄积会产生毒性,从而诱发患儿出现兴奋不安、多动和精神异常等。

[0004] 目前对PKU的治疗方法主要是食疗法。苯丙氨酸作为人体必需氨基酸之一,主要从食物中获取,对于PKU患儿不能无苯丙氨酸饮食,所以为了保证机体的正常生长发育,需要对PKU患儿采取低苯丙氨酸饮食,但食疗存在长期坚持困难和经济负担重等问题。随着分子生物学技术的发展,基因治疗已进入了实验阶段,例如,将携带表达PAH基因的cDNA重组腺病毒置于小鼠体内,以恢复肝脏PAH活性,但目前主要存在转运效率低的问题。

发明内容

[0005] 益生菌是一大类药物,一般通过口服活菌制剂达到治疗疾病和康复保健效果。益生菌药物制剂的优点在于给药方便,口感较好,病人乐于接受,顺从性高,而且能够持续地在肠道内增殖从而稳定地发挥治疗作用。

[0006] 大肠杆菌属*E.coli* Nissle 1917(简称为EcN或者Nissle 1917)是一种非致病性大肠杆菌,也是一种益生菌。申请人在发明专利CN202011457369.7中报道了一种可用于治疗苯丙酮尿症的Nissle 1917工程益生菌对苯丙氨酸的降解能力,增强其治疗苯丙酮尿症的效果。发明人继续利用基因工程技术来改造Nissle 1917工程益生菌,使其具备表面展示苯丙氨酸解氨酶,进一步提高其降解苯丙氨酸的能力。具体而言,本发明包括如下技术方案:

[0007] 一种工程益生菌,其为大肠杆菌Nissle 1917衍生菌,其具备表面展示的苯丙氨酸解氨酶(L-phenylalanine ammonia-lyase,PAL)。

[0008] 上述的工程益生菌是以大肠杆菌Nissle 1917为底盘菌,通过质粒表达或者基因组整合构建出表面展示L-苯丙氨酸解氨酶PAL的大肠杆菌Nissle 1917工程益生菌;或者是以胞内已具备苯丙氨酸解氨酶PAL的大肠杆菌Nissle 1917工程菌为基础,再进行表面展示苯丙氨酸解氨酶PAL的基因工程改造而得到的Nissle 1917工程益生菌。

[0009] 例如,以大肠杆菌Nissle 1917为底盘菌,通过质粒表达或者基因组整合构建出表面展示L-苯丙氨酸解氨酶基因stlA的大肠杆菌Nissle 1917工程益生菌。所述质粒例如可以是pINP-stlA质粒,转化入Nissle 1917 (EcN) 后,得到重组工程益生菌EcN/pINP-stlA。

[0010] 上述的胞内已具备苯丙氨酸解氨酶PAL的大肠杆菌Nissle 1917工程菌可以通过下述步骤构建得到:在大肠杆菌Nissle 1917基因组上整合了外源L-苯丙氨酸解氨酶基因stlA、外源L-苯丙氨酸内运蛋白基因pheP和外源L-氨基酸脱氨酶基因pma。

[0011] 优选地,还整合了内源(即,来源于Nissle 1917)的外排泵基因acrA;并且/或者

[0012] 敲除了基因argR和/或发生了基因argA (Y19C) 突变;并且/或者

[0013] 对stlA、pheP、acrA基因的RBS序列进行优化。

[0014] 优选地,所述L-苯丙氨酸解氨酶 (Genbank号KGM29850.1) 基因stlA的核苷酸序列为SEQ ID NO:1;

[0015] 所述L-苯丙氨酸内运蛋白 (Genbank号QPA14453.1) 基因pheP的核苷酸序列为SEQ ID NO:2;

[0016] 所述L-氨基酸脱氨酶 (Genbank号AAA86752.1) 基因pma的核苷酸序列为SEQ ID NO:3。

[0017] 所述外排泵蛋白 (Genbank号WP_001295833.1) 基因acrA的核苷酸序列可以是SEQ ID NO:4。

[0018] 进一步地,上述的RBS序列优化可以是,基因组中stlA基因的RBS (ribosome binding site,核糖体结合位点) 序列由GCTAGCAGGATACTTCCAATCCATGGCAACAAAACAAAAGTAGAGGAGGTAAAT优化为CTCGCGAGAATTAAGAAGAAAGGAGGTTTTTTTT (SEQ ID NO:5);pheP基因的RBS序列由GCTAGCAGGATACTTCCAATCCATGGCAACAAAACAAAAGTAGAGGAGGTAAAT优化为GGAGTTATCTCTCCCGGTCACAATATTAAGGAGGTTTTATTT (SEQ ID NO:6);acrA基因的RBS序列由GCTAGCAGGATACTTCCAATCCATGGCAACAAAACAAAAGTAGAGGAGGTAAAT优化为GAGGCTAACAGGCACATTCATAAGGAGGTTTTTTTT (SEQ ID NO:7)。

[0019] 上述大肠杆菌Nissle 1917衍生菌的基因组中还可以敲除二氢吡啶二羧酸合酶基因dapA。

[0020] 优选地,上述工程益生菌的基因型是:EcN (malP::Pj23119H-stlA,yicS::Pj23119H-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,dapA::inaK-stlA,argA*, Δ argR,lacZ::Pj23119H-acrA)。

[0021] 本发明的第二个方面提供了一种构建上述工程益生菌的方法,其可以包括以下步骤:

[0022] A.以含表面展示stlA质粒pINP-stlA的工程益生菌EcN/pINP-stlA为底盘菌,分别在基因组的malP位点、yicS位点、malE位点、rthC位点和exo位点中的一个以上位点、优选两个以上位点、优选三个以上位点、优选四个以上位点、优选五个位点敲入L-苯丙氨酸解氨酶基因stlA,获得stlA基因整合菌株;

[0023] B.对于步骤A中获得的stlA基因整合菌株,在其基因组的lacZ位点和agaI位点中的一个以上位点、优选两个位点敲入L-苯丙氨酸内运蛋白基因pheP,得到stlA+pheP整合菌株;

[0024] C.对于步骤B中获得的stlA+pheP整合菌株,在其基因组的araBD位点敲入L-氨基酸脱氨酶基因pma,得到stlA+pheP+pma整合菌株;

[0025] D.对于步骤C中获得的stlA+pheP+pma整合菌株,敲除其基因组中的二氢吡啶二羧酸合酶基因dapA,得到stlA+pheP+pma Δ dapA菌株;

[0026] E.对于步骤D中获得的stlA+pheP+pma Δ dapA菌株,对其基因组的argA位点进行(Y19C)突变,得到stlA+pheP+pma Δ dapA argA*菌株;

[0027] F.对于步骤E中获得的stlA+pheP+pma Δ dapA argA*菌株,敲除其基因组中的argR,得到stlA+pheP+pma Δ dapA argA* Δ argR菌株。

[0028] 优选地,上述方法还可以包括以下步骤:

[0029] G.对于步骤F中获得的stlA+pheP+pma Δ dapA argA* Δ argR菌株,在其基因组的lacZ位点敲入外排泵基因acrA,得到stlA+pheP+pma+acrA Δ dapA argA* Δ argR菌株。

[0030] 上述方法还可以包括以下步骤:

[0031] H.对于步骤G中获得的stlA+pheP+pma+acrA Δ dapA argA* Δ argR菌株,将其基因组中stlA基因的RBS序列由优化为SEQ ID NO:5,pheP基因的RBS序列优化为SEQ ID NO:6,acrA基因的RBS序列优化为SEQ ID NO:7,得到RBS优化菌株。

[0032] I.对于步骤H中获得的RBS优化菌株,在其基因组的dapA位点敲入表面展示stlA基因,得到具备表面展示苯丙氨酸解氨酶的工程益生菌。

[0033] 上述各基因的敲入和敲除可以通过基因编辑技术实施,所述基因编辑采用CRISPR-Cas9系统、CRISPR-Cpf1系统、CRISPR-Cas相关的转座系统INTEGRATE系统或者CAST系统。

[0034] 本发明的第三个方面提供了上述工程益生菌在制备苯丙酮尿症治疗药物中的应用。

[0035] 上述药物优选是口服剂型,可通过口服给药。相应地,药物剂型为适用于口服、同时保持益生菌活性的口服剂型,包括固体颗粒、片剂和液体活菌制剂。

[0036] 可选地,所述药物中,除了药物活性成分工程益生菌外,还包含至少一种辅助治疗剂,从而形成复方药物。优选地,所述辅助治疗剂是其他用于治疗苯丙酮尿症、但不损害益生菌活性的药物成分。

[0037] 通过体外实验表明,本发明构建的工程益生菌能够显著降解苯丙氨酸,生成反式肉桂酸,有希望开发成治疗苯丙酮尿症的有效药物。

附图说明

[0038] 图1为原始菌株E.coli Nissle 1917、各工程菌降解苯丙氨酸生成反式肉桂酸能力的比较柱形图。

具体实施方式

[0039] 发明人在不具有降解苯丙氨酸能力的原始大肠杆菌Nissle 1917的基础上,通过基因组改造,使重组Nissle 1917 (EcN) 工程菌能够表达苯丙氨酸解氨酶基因,从而具备了降解苯丙氨酸能力;重组Nissle 1917 (EcN) 工程菌既可以在胞内表达苯丙氨酸解氨酶基因,也可以表面展示L-苯丙氨酸解氨酶PAL。表面展示L-苯丙氨酸解氨酶PAL的重组Nissle

1917 (EcN) 工程菌可以具备较强的降解苯丙氨酸能力,从而作为工程益生菌使用。进一步地,可以通过失活基因argR并且对argA做抗反馈抑制突变(Y19C),增强了精氨酸合成途径;接着,进一步通过基因工程使菌株能够表达L-苯丙氨酸内运蛋白基因和/或L-氨基酸脱氨酶基因,得到了对苯丙氨酸降解能力显著提高的工程益生菌TYS009和TYS010。已在专利CN202011457369.7中进行了描述,将其全部内容并入本文中。

[0040] 本发明在工程益生菌TYS010的基础上,进一步强化苯丙氨酸外排泵基因比如acrA,并且对stlA、pheP、acrA基因的RBS序列进行优化,得到了具备表面展示苯丙氨酸解氨酶PAL、从而进一步提高降解苯丙氨酸能力的工程益生菌TYS013。

[0041] 为简要起见,本文中有时将“工程益生菌”简称为“(基因)工程菌”或者“益生菌”,它们表示相同的意义,可以互换使用。

[0042] 基因argR是一个在细菌中普遍存在的精氨酸操纵子调节基因,在不同的细菌中有不同的功能,发明人研究发现,通过敲除大肠杆菌Nissle 1917基因组中的这一负调控基因,可一定程度上解除其对精氨酸合成的抑制。

[0043] N-乙酰谷氨酸合成酶(NAGS)编码基因argA,Y19C突变具有解除精氨酸反馈抑制的效果。

[0044] 在一种具体实施方式中,本发明是在益生菌E.coli Nissle 1917基因组上引入了利用组成型启动子Pj23119调控来源于发光分枝杆菌(Photorhabdus luminescens)的苯丙氨酸解氨酶基因(stlA)和增强了大肠杆菌MG1655来源苯丙氨酸特异转运体基因(pheP),可有效提高胞内苯丙氨酸的运输,并将其转化为反式肉桂酸;同时引入了来源于奇异变形杆菌(Proteus mirabilis HI4320)的L-氨基酸脱氨酶基因(pma),可将苯丙氨酸降解为苯丙酮酸;敲除argR和突变argA(Y19C)强化精氨酸合成途径,可有效利用苯丙氨酸被转化为反式肉桂酸和苯丙酮酸时释放的氨,从而促进苯丙氨酸向反式肉桂酸和苯丙氨酸转化反应进行,达到有效降解苯丙氨酸目的。通过增强反式肉桂酸外排泵基因arcA,有效降低胞内反式肉桂酸含量,进一步促进苯丙氨酸向反式肉桂酸转化反应进行。并且通过对stlA、pheP和acrA的核糖体结合位点RBS进行优化,提高这些基因的表达。进一步将stlA进行细胞表面展示,使工程益生菌成为“固定化细胞工厂”进行催化反应,进一步提高益生菌对苯丙氨酸的降解能力。

[0045] 应理解,在构建本发明的基因工程菌的具体操作中,步骤A、步骤B、步骤C直至步骤I等的排序并非完全根据英文字母顺序由前到后地固定不变,它们可以交叉、颠倒地操作,只要每个步骤能实现各自的功能、完成宿主细胞基因型的定向改变即可。

[0046] 下面以下结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。

[0047] 本文中涉及到多种物质的添加量、含量及浓度,其中所述的百分含量,除特别说明外,皆指质量百分含量。

[0048] 实施例

[0049] 材料和方法

[0050] 本文中的全基因合成、引物合成及测序皆由南京金瑞斯生物科技有限公司完成。

[0051] 实施例中的分子生物学实验包括质粒构建、酶切、感受态细胞制备、转化等主要参照《分子克隆实验指南》(第三版),J.萨姆布鲁克,D.W.拉塞尔(美)编著,黄培堂等译,科学

出版社,北京,2002)进行。比如感受态细胞转化方法及感受态制备方法均参照《分子克隆实验指南》(第三版)第1章96页进行。必要时可以通过简单试验确定具体实验条件。

[0052] 主要培养基:

[0053] LB培养基:10g/L胰蛋白胨,5g/L酵母提取物,10g/L氯化钠。(固体培养基另加20g/L琼脂粉。)

[0054] 原始大肠杆菌Nissle 1917、质粒pTargetF (Addgene:62226)、pCas (Addgene:62225)和pSU2718等由中国科学院分子植物科学卓越创新中心杨晟课题组惠赠。

[0055] pTargetF质粒 (Addgene:62226)、pCas质粒 (Addgene:62225)和pSU2718等质粒由上海陶宇晟生物技术有限责任公司保存,任何单位和个人都可以获得该质粒及相关质粒和细菌用于验证本发明,但未经上海陶宇晟生物技术有限责任公司允许不得用作其他用途,包括开发利用、科学研究和教学。

[0056] 表面展示PAL工程益生菌的构建参考Isabella,V.等的文献(Development of a synthetic live bacterial therapeutic for the human metabolic disease phenylketonuria.Nat Biotechnol 36,857-864,2018.)和Kurtz,C.等的文献(An engineered E.coli Nissle improves hyperammonemia and survival in mice and shows dose-dependent exposure in healthy humans.Sci.Transl.Med.11, eaau7975,2019.)。利用Jiang Y等的文献的Crispr-Cas9方法(Multigene Editing in the Escherichia coli Genome via the CRISPR-Cas9 System,Appl Environ Microbiol, 2015)进行益生菌基因组改造。

[0057] 以下实施例中使用的引物序列信息如表1所示。

[0058] 表1、实施例中使用的引物列表

[0059]

引物名称	方向 (5'→3')
malP-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTAAATCTATTAAGAATGAGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pTargetF-R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAG
malP-F1	GACGTCCCAGACCACCGTTC
malP-R1	CCTGCTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAACTTAATTTATAGAGTTACC
malP-F2	GAAATCATGCTGGAAGAATAAGTCGACGCATGCATCGGATGGCACTTTCATCAGAAATG
malP-R2	AAGCTGGGCGAAGAGTGACG
stlA(malP)-F	CAAAAAGTAGAGGAGGTAATATGAAAGCTAAAGATGTTTCAGCC
stlA(malP)-R	TTATTCTTCCAGCATGATTTTC
Pj23119(malP)-F	GCGGAAGGTAACCTCTATAAATTAAGTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAG
Pj23119(malP)-R	GGCTGAACATCTTTAGCTTTTCATATTTACCTCCTCTACTTTTTG
malP-V-F	GACGTGAAAGCGCTTCCTG
stlA-V-R	AGTTCAGTGATCTCCGTTG
yicS-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTACGCTTCTTTACCTGATATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
yicS-F1	TCGCAACCTGCCAGCAGAAC
yicS-R1	CTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAGTCAGTGGTTGTTGCCGTTCTTAC
yicS-F2	CAGAAATCATGCTGGAAGAATAATAAGGTACCCTGCAGACTAGTG
yicS-R2	TGAACCTTCGCATCAGAAAC
Pj23119(yicS)-F	GTAAGAACGGCAACAACCACTGACTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAG
yicS-V-F	GTCGCCATTCAGTTCTCTACAG
Apr(malE)-F	GAAATTCCTTACATGACCTCGGTTTAGTTACAGATTCCGGGGATCCGTCGACC
Apr(malE)-R	TGGGGGAGGAGGCGGGAGGATGAGAACGCGGCTTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
malE-V-F	GTTAATGCGGATAATGCGAGG
Apr-V-R	CAAGGTTGAGAAGCTGACCGATG
Apr-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTGGCGAAAAGCCGAGCTCATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC

[0060]

malE-F1	GTAACGTACGGCATCCCAGG
malE-R1	CTAGGACTGAGCTAGCTGTCAACTGTGAACTAAACCGAGGTCATG
malE-F2	AAATCATGCTGGAAGAATAAGTCGACGCATGCATCGATAAGCCGC GTTCTCATCCTC
malE-R2	GCAGCATCGAGGTTGGAGAGCG
rhtC-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTCATCAGAGTAAGTCGGATAGTTTTAGA GCTAGAAATAGC
rhtC-F1	GTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCGCACATTGTGGCGCT TATG
rhtC-R1	GGAGCTGCATGTGTCAGAGGATCCGACTTACTCTGATGAC
rhtC-F2	CTGGTGTCAAAAATAACTCAATACGGTCGACAGCATCCGACATTAT TTTCAC
rhtC-R2	GTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTAATGGTGGTTTGCCT ACCTG
tac-F	GTCATCAGAGTAAGTCGGATCCTCTGACACATGCAGCTCC
tac-R	ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC
stlA(rhtC)-F	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGCTAAAGATGTTC AGCC
stlA(rhtC)-R	GTTGGTCTGGTGTCAAAAATAACTCAATACGGTTATTCTTCCAGCA TGATTC
rhtC-V-F	GAAAGCAATGTCCCGCCGTAC
exo-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTTTATTGATATATTTACGTCGTTTTAGAG CTAGAAATAGC
exo-F1	GTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCGCTTCCAGAGGAAG CTTTG
exo-R1	GACGTCATGATGATGCGTCGACTGGATAACGTAAATGATTGC
exo-F2	GTCGACCGTATTGAGTTATAATAGCAATCCCCAGATACC
exo-R2	GTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTTGTCCGGCTCAGTTA ACCGG
tac(exo)-F	GCAATCATTTACGTTATCCAGTCGACGCATCATCATGACGTC
stlA(exo)-R	GGTATCTGGGGGATTGCTATTATAACTCAATACGGTCGAC
exo-V-F	CTGCACTATACTGTAGCTTC
lacZ-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTGATAGTTTTCTTGCGGCCCGTTTTAGA GCTAGAAATAGC
lacZ-F1	CACTAACATGCCGGTAATAATC
lacZ-R1	CTAGGACTGAGCTAGCTGTCAACGTCTTCCCGAGCGAAAACG

[0061]

lacZ-F2	CATATGGACCATGGCTAATTCCTTGCCGTTTTTCATCATATTTAATC
lacZ-R2	TGGTCTGCTGCTGCTGAACG
Pj23119(lacZ)-F	CGTTTTCGCTCGGGAAGACGTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAG
Pj23119(lacZ)-R	GATACGGTTGACGCGTTTTTTCATATTTACCTCCTCTACTTTTTTG
pheP(lacZ)-F	CAAAAAGTAGAGGAGGTAAATATGAAAAACGCGTCAACCGTATC
pheP(lacZ)-R	GATTAAATATGATGAAAACGGCAAGGAATTAGCCATGGTCCATATG
lacZ-V-F	CACCAATCCCCATATGGAAACC
pheP-V-R	AATCAGGAAAGCGATGATCC
agaI-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTGTCGTTAACTCGCCAGGTAAGTTTTAG AGCTAGAAATAGC
agaI-F1	GCCATTACTGACGTATCATTATC
agaI-R1	GGACTGAGCTAGCTGTCAATTACCTGGCGAGTTAACGAC
agaI-F2	GGGCTTTTTTCTGTGTTTCCTGCGACGCCTGTAATCAC
agaI-R2	ATTGCGCTGGTTTCCGATG
pheP(agaI)-F	GTCGTTAACTCGCCAGGTAATTGACAGCTAGCTCAGTCC
pheP(agaI)-R	GTGATTACAGGCGTCGCAGGAAACACAGAAAAAAGCCC
agaI-V-F	GACTCGTGGGATCACCTTAGGC
araBD-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTCAGTGATTCTGTGCGAGCTTGTTTTAGA GCTAGAAATAGC
araBD-F1	GTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCGTAAACCCACTGGTG ATACC
araBD-R1	CTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGTATGGAGAAA CAGTAG
araBD-F2	ATTCATATGGTTGAGTCATCCGCAGAAGAGACGAGGTATTAGAAGC CAACCTGG
araBD-R2	GTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTGGTAACTGCGGCGCT AACTG
pma(araBD)-F	TCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCTCTAGAAATAATTTGTTT AAC
pma(araBD)-R	GTTTTGGCAGCGCCAGGTTGGCTTCTAATACCTCGTCTCTTCTGCG GATGACTC
araBD-V-F	CAAGCACAGTTTTTCAGCGCC
pma-V-R	AGATATACATTGAGCGTTGG
dapA-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTAGATCGCAGCCAGTACGGGAGTTTTAG AGCTAGAAATAGC
dapA-F1	GTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCACCAGCAATGAAGC

[0062]

	GGTATCG
dapA-R1	CATTGAGACACTTGTGTTGCACAGTCATGGGGTTATTTCCGTTAC
dapA-F2	GTAACGGAAATAACCCCATGACTGTGCAAACAAGTGTCTCAATG
dapA-R2	GTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTGGGCTTTGAACGCTTGCTC
dapA-V-F	GAACTGGGTACGCGCGCCAG
dapA-V-R	CATCACGATTAAGATCCAGCTC
Apr(argA)-F	AATACAATAATTTTGAATAATCATGCAAAGAGGTGTACCATTCCGGGGATCCGTCGACC
Apr(argA)-R	TTTGCCTCGATCTGCGGACGTGCGCCATAGACCACCACCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
argA-V-F	GACTTGATGAACGGGTCGTCAG
argA-V-R	CACCGTCGTCATTAGTGACGCC
argAmu-F1	GTTTCAGGATTACTCAACGCGAAC
argAmu-R1	GGGTATTGATACAGGGAACCGAA
argAmu-F2	TTCGGTTCCTGTATCAATACCC
argAmu-R2	GTGGCAATCTCTTCCGAGGTCAG
argR-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTGTCGCCGCGTTGCAGGAGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
argR-aL-F	GGTTTTTAACAGTAGTGCAAG
argR-aL-R	CATTTTCCCCGCCGCCAGAAGCGACGGGGCAGAGAAAGTCACCCGATATGGTGGTTG
argR-aR-F	CAATAATGTTGTATCAACCACCATATCGGGTGACTTTCTCTGCCCCGTCGCTTCTGG
argR-aR-R	GCCACACCACTTACGGATAC
lacZ2-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTATTTTCGGCGCTCCACAGTTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
lacZ2-L-F	GCTGGAGTGCGATCTTCCTGAC
lacZ2-L-R	CTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAACACGCTCATCGATAATTTACCC
lacZ2-R-F	CCAAGTCTTAACTTAAACAGGAGCCGTTAAGACTGGTCTGCTGCTGCTGAACGG
lacZ2-R-R	GCCGTTTTTCATCATATTTAATC
acrA-F	TCCATGGCAACAAAACAAAAGTAGAGGAGGTAAATATGAACAAAAACAGAGGGTTTAC
acrA-R	GTCTTAACGGCTCCTGTTTAAG

[0063]

acrA-F2	AGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCAGGATACTTCCAATCC ATGGCAACAAAAC
lacZ2-V-F	GGAGTGACGGCAGTTATCTG
acrA-V-R	ATCAGCCAGAGCCTGATCGTAC
agaI2-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTGATCCCACGAGTCACGGGAGTTTTAG AGCTAGAAATAGC
agaIH-F	ACGGCATTAAAGTGAACGTGCC
agaIH-R	TGGCGAAAAGCCGAGCTCATCGGCGGTCCGCGGTTTTTAACATCT C
phePH-F	CCGATGAGCTCGGCTTTTCGCCAATGAAAAACGCGTCAACCG
23119H(agaI)-R	CCTTAATATTGTGACCCGGGAGAGATAACTCCATTATACCTAGGAC TGAGCTAGC
pheP(23119H)-F	CTCCCGGTCACAATATTAAGGAGGTTTTATTATGAAAAACGCGT CAACCG
lacZ3-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTCAGTTGTTGTTGGCTGTAGGTTTTAGA GCTAGAAATAGC
lacZH-F	GCGACCAAATTCGAAATTACTGC
malE-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTACTGGAAGAGAAATCCCTCGTTTTAG AGCTAGAAATAGC
malE-LH-F	ATACTTGAACGCATAACCCCG
malE-LH-R	TGGCGAAAAGCCGAGCTCATCGGCTGACATTATCTTCTGGGCGCA C
stlAH-F	CCGATGAGCTCGGCTTTTCGCCAATGAAAGCTAAAGATGTTTCAG
23119H(malE)-R	CTTCTTCTTAATTCTCGCGAGATTATACCTAGGACTGAGCTAGC
stlA(23119H)-F	CTCGCGAGAATTAAGAAGAAAGGAGGTTTTTTTTATGAAAGCTAA AGATGTTTCAG
malP2-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTTGATTTGCTGCTAATCCTGGTTTTAGA GCTAGAAATAGC
malP-LH-F	ACAGTTGCCATTGAGTCGAGG
malP-LH-R	TGGCGAAAAGCCGAGCTCATCGGTTGAACTCCTATGTCACAACC
yicS2-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTGCCATTTCAGTTCTCTACAGTGTTTTAGA GCTAGAAATAGC
yicS-LH-F	CATCAAGCTCGCCATGATTTG
yicS-LH-R	TGGCGAAAAGCCGAGCTCATCGGAGAAGTGCCAGACTTTATATTC
lacZ4-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTCATTAAAGAGAGTGGAACCTGTTTTAG AGCTAGAAATAGC

lacZ4-LH-F	GCTGGAGTGCATCTTCCTGAC
acZ4-LH-R	ATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAACAGGTCAAATTCAGACG GCAAAC
acrA(23119H)-F	GAGGCTAACAGGCACATTCAATAAGGAGGTTTTTTATGAACAAAA ACAGAGGGTTTAC
23119H(acrA)-R	ATTGAATGTGCCTGTTAGCCTCATTATACCTAGGACTGAGCTAGC
15A-F	CGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC
Psu-RG	CTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGCGGGGCGTAATTTTTTTAAGG CAG
Kan-FG	CTGCCTTAAAAAATTACGCCCGCAACCAATTAACCAATTCTGAT TAG
Kan-R(15A)	CTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAGGAAAGCCACGTTGTGTC
inaK-F	GACACAACGTGGCTTTCCTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAG
inaK-R	AGATCTGGTCTGCAAATTCTGCGGGCGTC
stlA(inaK)-F	GTGACGACGCCGAGAATTTGCAGACCAGATCTATGAAAGCTAAA GATGTTTCAGC
stlA-R	CTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTAGAAAGCTTTATTCTTCCAGCA TGATTTCTGGC
rrnB-F	AGCTTTCTAGAACAAAACTC
rrnB-R	GTGAGCGCAACGCAATTAATGTGCACCGACAAACAACAGATAAAA CG
dapA2-N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTAGAGCGGCGCTTAAGCATGCGTTTTAG AGCTAGAAATAGC
dapA2-L-F	AGATTTGATAACGACCACGATAC
23119-R	CTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAAGTTTAGGGAGA TTTGATGGC
dapA2-R-F2	GTTTGTGCGGTGCACATTAATTGCGTTGCGCTCACGATTGGGTTTCGA CAAATAGTTTG
dapA2-R-R	GATAAACGTGAACTCTTCTCCCAG
Pj23119-F	AGTTTAGGGAGATTTGATGGCTTACTTGACAGCTAGCTCAGTCCTA G

[0065] 表1中,名称中的“-F”代表正向;“-R”代表反向。

[0066] 实施例1:表面展示PAL工程益生菌EcN/pINP-stlA构建

[0067] 1.1 pINP-stlA质粒构建

[0068] (1) 以pSU2718质粒为模板,15A-F/Psu-RG为引物,PCR扩增15A片段,约1kb;以pPIC9k质粒为模板,Kan-FG/Kan-R(15A)为引物,PCR扩增Kan片段,约1kb;以pUC-inaK质粒为模板(金斯瑞合成),inaK-F/inaK-R为引物,PCR扩增获得inaK-N片段,约600bp;以pUC-stlA质粒(金斯瑞合成)为模板,stlA(inaK)-F/stlA-R为引物,PCR扩增stlA(inaK)片段,约1.6kb;以pTrc99a质粒为模板,rrnB-F/rrnB-R为引物,PCR扩增获得rrnB片段,约400bp。

[0069] (2) 15A、Kan、inaK-N、stlA(inaK)和rrnB片段利用DNA assembly方法(DNA

assembly Kit购自全式金)进行连接,连接产物转化入DH5 α 化学感受态细胞,复苏液涂布于含卡那霉素(终浓度50 μ g/mL)LB固体平板,获得含pINP-stlA质粒转化子。

[0070] 1.2重组工程益生菌EcN/pINP-stlA构建

[0071] (1) 制备大肠杆菌Nissle 1917 (EcN) 化转感受态细胞,化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0072] (2) pINP-stlA质粒转化入EcN化转感受态细胞,菌液涂布于含卡那霉素(终浓度50 μ g/mL)LB固体平板,获得EcN/pINP-stlA重组工程益生菌。

[0073] 实施例2:降解苯丙氨酸的工程益生菌TYS009及TYS009/pINP-stlA构建

[0074] 2.1 pTargetF-malP质粒构建

[0075] 以pTargetF质粒(Addgene:62226)为模板,malP-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增malP-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-malP质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0076] 2.2 malP位点敲入Pj23119-stlA

[0077] (1) 电转片段制备:以E.coli Nissle 1917基因组为模板,分别以malP-F1/malP-R1、malP-F2/malP-R2为引物,PCR扩增分别获得malP-UP和malP-DN片段,分别约600bp;以pUC-sltA质粒(金斯瑞合成)为模板,以stlA(malP)-F/stlA(malP)-R为引物,PCR扩增获得stlA(malP)片段,约1.6kb;以pTargetF质粒为模板,Pj23119(malP)-F/Pj23119(malP)-R为引物,PCR扩增Pj23119(malP)片段,约100bp;以Pj23119(malP)/stlA(malP)片段为模板,Pj23119(malP)-F/stlA(malP)-R为引物,Overlap PCR扩增获得stlA(malP)-2片段,约1.7kb;以malP-UP/stlA(malP)-2/malP-DN片段为模板,以malP-F1/malP-R2为引物,Overlap PCR扩增获得malP::Pj23119-stlA片段,约3kb。

[0078] (2) 感受态细胞制备:将pCas质粒转化至大肠杆菌E.coli Nissle 1917化学感受态细胞中,在含卡那霉素(50 μ g/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得EcN/pCas转化子(化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版))。挑取EcN/pCas单菌落于4mL含卡那霉素(50 μ g/mL)的LB试管中,30 $^{\circ}$ C 220rpm培养,在菌浓OD₆₀₀为0.4时,添加终浓度为10mM阿拉伯糖进行诱导,继续培养1小时,制备电转感受态细胞(电转感受态细胞制备方法参考文献(Multigene Editing in the Escherichia coli Genome via the CRISPR-Cas9 System,Jiang Y,Chen B,et al.,Appl Environ Microbiol,2015));

[0079] (3) 电转:将malP::Pj23119-stlA片段及pTargetF-malP质粒电转入EcN/pCas感受态细胞中(电转化条件:2.5kV,200 Ω ,25 μ F),涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)和卡那霉素(50 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用malP-V-F/stlA-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约600bp;

[0080] (4) pTargetF-malP质粒丢失:挑取菌落PCR验证为阳性单菌落,接种于含卡那霉素(终浓度为50 μ g/ml)的LB试管中,同时加入终浓度为1mM IPTG,30 $^{\circ}$ C过夜培养;次日试管中菌液直接划线于含卡那霉素(终浓度50 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C过夜培养;次日挑取单菌落转接于含壮观霉素(终浓度为50 μ g/ml)LB平板上,若不能生长,表明pTargetF-malP质粒已丢失,得到EcN(malP::Pj23119-stlA)/pCas菌株。

[0081] 2.3 pTargetF-yicS质粒构建

[0082] 以pTargetF质粒为模板,yicS-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增yicS-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-yicS质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0083] 2.4 yicS位点敲入Pj23119-stlA

[0084] (1) 电转片段制备:以E.coli Nissle 1917基因组为模板,分别以yicS-F1/yicS-R1、yicS-F2/yicS-R2为引物,PCR扩增分别获得yicS-UP和yicS-DN片段,分别约600bp;以stlA(malP)-2片段为模板,以Pj23119(yicS)-F/stlA(malP)-R为引物,PCR扩增获得stlA(yicS)片段,约1.7kb;以yicS-UP/stlA(yicS)/yicS-DN片段为模板,以yicS-F1/yicS-R2为引物,Overlap PCR扩增获得yicS::Pj23119-stlA片段,约3kb。

[0085] (2) 电转:方法同2.2,将yicS::Pj23119-stlA片段及pTargetF-yicS质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)和卡那霉素(50 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用yicS-V-F/stlA-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约500bp;

[0086] (3) pTargetF-yicS质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119stlA)/pCas菌株。

[0087] 2.5 malE位点敲入安普霉素抗性基因

[0088] (1) 含同源臂片段扩增:以pIJ773质粒(Gust B, et al., PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003, 100:1541-1546.)为模板,Apr(malE)-F/Apr(malE)-R为引物,PCR扩增Apr(malE)片段,约1.4kb,DpnI消化PCR片段;

[0089] (2) 电转:方法同2.2, Apr(malE)片段电转化入EcN(malP::stlA,yicS::stlA)/pCas感受态细胞中,涂布于含安普霉素(50 μ g/ml)和卡那霉素(50 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用malE-V-F/Apr-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约800bp,获得EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Apr)/pCas菌株。

[0090] 2.6 pTargetF-Apr质粒构建

[0091] 以pTargetF质粒为模板,Apr-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增Apr-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-Apr质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0092] 2.7 malE位点敲入Pj23119-stlA

[0093] (1) 电转片段制备:以E.coli Nissle 1917基因组为模板,分别以malE-F1/malE-R1、malE-F2/malE-R2为引物,PCR扩增分别获得malE-UP和malE-DN片段,分别约600bp;以stlA(malP)-2片段为模板,以Pj23119(malE)-F/stlA(malP)-R为引物,PCR扩增获得stlA(malE)片段,约1.7kb;以malE-UP/stlA(malE)/malE-DN片段为模板,以malE-F1/malE-R2为引物,Overlap PCR扩增获得malE::Pj23119-stlA片段,约3kb。

[0094] (2) 电转:方法同2.2,将malE::Pj23119-stlA片段及pTargetF-Apr质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Apr)/pCas感受态细胞中,涂布于

含壮观霉素 (50 μ g/ml) 和卡那霉素 (50 μ g/ml) 的LB平板上, 30 $^{\circ}$ C培养过夜; 长出单菌落利用 malE-V-F/stlA-V-R引物进行菌落PCR验证, 阳性片段约500bp;

[0095] (3) pTargetF-Apr质粒丢失: 方法同2.2, 得到EcN (malP::Pj23119-stlA, yicS::Pj23119-stlA, malE::Pj23119-stlA) /pCas菌株。

[0096] 2.8 pTargetF-rhtC质粒构建

[0097] 以pTargetF质粒为模板, rhtC-N20-F/pTargetF-R为引物, PCR扩增rhtC-N20片段, 约2.2kb, DpnI消化PCR片段后自连, 转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中, 37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素 (50 μ g/mL) 的LB固体平板上进行筛选, 获得pTargetF-rhtC质粒; 化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0098] 2.9 pTargetT-Ptac-stlA (rhtC) 质粒构建

[0099] 以E.coli Nissle 1917基因组为模板, 分别以rhtC-F1/rhtC-R1、rhtC-F2/rhtC-R2为引物, PCR扩增分别获得rhtC-UP和rhtC-DN片段, 分别约600bp; 以p57-tac质粒为模板, tac-F/tac-R为引物, PCR扩增tac片段, 约1.5kb; 以stlA (malP) -2片段为模板, 以stlA (rhtC) -F/stlA (rhtC) -R为引物, PCR扩增获得stlA (rhtC) 片段, 约1.6kb; 将rhtC-UP、tac、stlA (rhtC) 和rhtC-DN片段利用DNA assembly方法 (DNA assembly Kit购自全式金) 克隆入pTargetF-rhtC的EcoRI/HindIII位点, 获得pTargetT-Ptac-stlA (rhtC) 质粒。

[0100] 2.10 rhtC位点敲入Ptac-stlA

[0101] (1) 电转: 方法同2.2, 将pTargetT-Ptac-stlA (rhtC) 质粒电转化入EcN (malP::Pj23119-stlA, yicS::Pj23119-stlA, malE::Pj23119-stlA) /pCas感受态细胞中, 涂布于含壮观霉素 (50 μ g/ml) 和卡那霉素 (50 μ g/ml) 的LB平板上, 30 $^{\circ}$ C培养过夜; 长出单菌落利用 rhtC-V-F/stlA-V-R引物进行菌落PCR验证, 阳性片段约2.5kb;

[0102] (2) pTargetT-Ptac-stlA (rhtC) 质粒丢失: 方法同2.2, 得到EcN (malP::Pj23119-stlA, yicS::Pj23119-stlA, malE::Pj23119-stlA, rhtC::Ptac-stlA) /pCas菌株。

[0103] 2.11 pTargetF-exo质粒构建

[0104] 以pTargetF质粒为模板, exo-N20-F/pTargetF-R为引物, PCR扩增exo-N20片段, 约2.2kb, DpnI消化PCR片段后自连, 转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中, 37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素 (50 μ g/mL) 的LB固体平板上进行筛选, 获得pTargetF-exo质粒; 化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0105] 2.12 pTargetT-Ptac-stlA (exo) 质粒构建

[0106] 以E.coli Nissle 1917基因组为模板, 分别以exo-F1/exo-R1、exo-F2/exo-R2为引物, PCR扩增分别获得exo-UP和exo-DN片段, 分别约600bp; 以p57-tac质粒为模板, tac (exo) -F/tac-R为引物, PCR扩增tac (exo) 片段, 约2.1kb; 以pTargetT-Ptac-stlA (rhtC) 质粒为模板, 以stlA (rhtC) -F/stlA (exo) -R为引物, PCR扩增获得stlA (exo) 片段, 约1.6kb; 将exo-UP、tac (exo)、stlA (exo) 和exo-DN片段利用DNA assembly方法 (DNA assembly Kit购自全式金) 克隆入pTargetF-exo的EcoRI/HindIII位点, 获得pTargetT-Ptac-stlA (exo) 质粒。

[0107] 2.13 exo位点敲入Ptac-stlA

[0108] (1) 电转: 方法同2.2, 将pTargetT-Ptac-stlA (exo) 质粒电转化入EcN (malP::Pj23119-stlA, yicS::Pj23119-stlA, malE::Pj23119-stlA, rhtC::Ptac-stlA) /pCas感受

态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)和卡那霉素(50 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用exo-V-F/stlA-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约3kb;

[0109] (2) pTargetT-Ptac-stlA(exo) 质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA)/pCas菌株。

[0110] 2.14 pTargetF-lacZ质粒构建

[0111] 以pTargetF质粒为模板,lacZ-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增lacZ-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-lacZ质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0112] 2.15 lacZ位点敲入Pj23119-pheP

[0113] (1) 电转片段制备:以E.coli Nissle 1917基因组为模板,分别以lacZ-F1/lacZ-R1、lacZ-F2/lacZ-R2为引物,PCR扩增分别获得lacZ-UP和lacZ-DN片段,分别约600bp和700bp;以pTargetF质粒为模板,以Pj23119(lacZ)-F/Pj23119(lacZ)-R为引物,PCR扩增Pj23119(lacZ)片段,约100bp;以E.coli MG 1655基因组为模板,以pheP(lacZ)-F/pheP(lacZ)-R为引物,PCR扩增获得pheP(lacZ)-1片段,约1.4kb;以Pj23119(lacZ)/pheP(lacZ)-1片段为模板,以Pj23119(lacZ)-F/pheP(lacZ)-R为引物,PCR扩增获得pheP(lacZ)-2片段,约1.5kb;以lacZ-UP/pheP(lacZ)-2/lacZ-DN片段为模板,以lacZ-F1/lacZ-R2为引物,Overlap PCR扩增获得lacZ::Pj23119-pheP片段,约2.8kb。

[0114] (2) 电转:方法同2.2,将lacZ::Pj23119-pheP片段及pTargetF-lacZ质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)和卡那霉素(50 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用lacZ-V-F/pheP-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约500bp;

[0115] (3) pTargetF-lacZ质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP)/pCas菌株。

[0116] 2.16 pTargetF-agaI质粒构建

[0117] 以pTargetF质粒为模板,agaI-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增agaI-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-agaI质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0118] 2.17 agaI位点敲入Pj23119-pheP

[0119] (1) 电转片段制备:以E.coli Nissle 1917基因组为模板,分别以agaI-F1/agaI-R1、agaI-F2/agaI-R2为引物,PCR扩增分别获得agaI-UP和agaI-DN片段,分别约600bp;以pheP(lacZ)-2片段为模板,以pheP(agaI)-F/pheP(agaI)-R为引物,PCR扩增获得pheP(agaI)片段,约1.4kb;以agaI-UP/pheP(agaI)-2/agaI-DN片段为模板,以agaI-F1/agaI-R2为引物,Overlap PCR扩增获得agaI::Pj23119-pheP片段,约2.7kb。

[0120] (2) 电转:方法同2.2,将agaI::Pj23119-pheP片段及pTargetF-agaI质粒电转化入

EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)和卡那霉素(50 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用agaI-V-F/pheP-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约500bp;

[0121] (3) pTargetF-agaI质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP)/pCas菌株。

[0122] 2.18 pTargetF-araBD质粒构建

[0123] 以pTargetF质粒为模板,araBD-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增araBD-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-araBD质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0124] 2.19 pTargetT-Para-pma(araBD)质粒构建

[0125] 以E.coli Nissle 1917基因组为模板,分别以araBD-F1/araBD-R1、araBD-F2/araBD-R2为引物,PCR扩增分别获得araBD-UP和araBD-DN片段,分别约600bp;以pUC-pma质粒(金斯瑞合成)为模板,以pma(araBD)-F/pma(araBD)-R为引物,PCR扩增获得pma(araBD)片段,约1.6kb;将araBD-UP、araBD-DN和stlA(araBD)片段利用DNA assembly方法(DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetF-araBD的EcoRI/HindIII位点,获得pTargetT-Para-pma(araBD)质粒。

[0126] 2.20 araBD位点敲入Para-pma

[0127] (1)电转:方法同2.2,将pTargetT-Para-pma(araBD)质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)和卡那霉素(50 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用araBD-V-F/pma-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约1.6kb;

[0128] (2) pTargetT-Para-pma(araBD)质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::stlA,yicS::stlA,malE::stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::pheP,agaI::pheP,araBD::Para-pma)/pCas菌株。

[0129] 2.21 pTargetF-dapA质粒构建

[0130] 以pTargetF质粒为模板,dapA-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增dapA-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-dapA质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0131] 2.22 pTargetT-dapA质粒构建

[0132] 以E.coli Nissle 1917基因组为模板,分别以dapA-F1/dapA-R1、dapA-F2/dapA-R2为引物,PCR扩增分别获得dapA-UP和dapA-DN片段,分别约600bp;将dapA-UP和dapA-DN片段利用DNA assembly方法(DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetF-dapA的EcoRI/HindIII位点,获得pTargetT-dapA质粒。

[0133] 2.23 dapA基因敲除

[0134] (1) 电转:方法同2.2,将pTargetT-dapA质粒电转化入EcN(malP::stlA,yicS::stlA,malE::stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::pheP,agaI::pheP,araBD::Para-pma)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)、卡那霉素(50 μ g/ml)和二氨基庚二酸(100 μ g/mL)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用dapA-V-F/dapA-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约1kb;

[0135] (2) pTargetT-dapA质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA)/pCas菌株。

[0136] (3) pCas质粒丢失:挑取pTargetT-dapA质粒丢失阳性菌落,接种于LB试管中,37 $^{\circ}$ C过夜培养;次日菌液划线接种于LB平板上,37 $^{\circ}$ C过夜培养;次日挑取单菌落转接于含卡那霉素(终浓度为50 μ g/ml)和二氨基庚二酸(100 μ g/mL) LB平板上,若不能生长,表明pCas质粒丢失,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA)菌株,命名为TYS009。

[0137] 2.24重组工程益生菌TYS009/pINP-stlA构建

[0138] (1) 制备工程益生菌TYS009化转感受态细胞,化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0139] (2) pINP-stlA质粒转化入TYS009化转感受态细胞,菌液涂布于含卡那霉素(终浓度50 μ g/mL) LB固体平板,获得TYS009/pINP-stlA重组工程益生菌。

[0140] 实施例3:精氨酸途径增强工程益生菌TYS010构建

[0141] 3.1 argA位点敲入安普霉素抗性基因

[0142] (1) 含同源臂片段扩增:以pIJ773质粒(Gust B, et al., PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003, 100:1541-1546.)为模板, Apr(argA)-F/Apr(argA)-R为引物,PCR扩增Apr(argA)片段,约1.4kb, DpnI消化PCR片段;

[0143] (2) 电转:方法同2.2, Apr(argA)片段电转化入实施例2所得EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA)/pCas感受态细胞中,涂布于含安普霉素(50 μ g/ml)、卡那霉素(50 μ g/ml)和二氨基庚二酸(100 μ g/mL)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用argA-V-F/argA-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约2.6kb,获得EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA,argA::Apr)/pCas菌株。

[0144] 3.2 argA定点突变(Y19C)构建

[0145] (1) 电转片段制备:以E. coli Nissle 1917基因组为模板,分别以argAmu-F1/argAmu-R1、argAmu-F2/argAmu-R2为引物,PCR扩增分别获得argAmu-1和argAmu-2片段,分别约500bp;以argAmu-1和argAmu-2片段为模板,以argAmu-F1/argAmu-R2为引物,Overlap PCR扩增获得argA*(即argAmut(Y19C))片段,约1kb。

[0146] (2) 电转:方法同2.2,将argA*片段及pTargetF-Apr质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA,argA::Apr)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)、卡那霉素(50 μ g/ml)和二氨基庚二酸(100 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用argA-V-F/argA-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约1.1kb;

[0147] (3) pTargetF-Apr质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA,argA*)/pCas菌株。

[0148] 3.3 pTargetF-argR质粒构建

[0149] 以pTargetF质粒为模板,argR-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增argR-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/ml)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-argR质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0150] 3.4 argR基因敲除

[0151] (1) 电转片段制备:以E.coli Nissle 1917基因组为模板,分别以argR-aL-F/argR-aL-R、argR-aR-F/argR-aR-R为引物,PCR扩增分别获得argR-K01和argR-K02片段,分别约500bp;以argR-K01和argR-K02片段为模板,以argR-aL-F/argR-aR-R为引物,Overlap PCR扩增获得argR-K0片段,约1kb。

[0152] (2) 电转:方法同2.2,将argR-K0片段及pTargetF-argR质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA,argA*)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)、卡那霉素(50 μ g/ml)和二氨基庚二酸(100 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用argR-aL-F/argR-aR-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约1kb;

[0153] (3) pTargetF-argR质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA,argA*, Δ argR)/pCas菌株。

[0154] (4) pCas质粒丢失:方法同2.23,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA,argA*, Δ argR)菌株,命名为TYS010。

[0155] 实施例4:外排泵增强工程益生菌TYS011构建

[0156] 4.1 pTargetF-lacZ2质粒构建

[0157] 以pTargetF质粒为模板,lacZ2-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增lacZ2-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/ml)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-lacZ2质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0158] 4.2 lacZ位点敲入Pj23119-acrA

[0159] (1) 电转片段制备:以E.coli Nissle1917基因组为模板,分别以lacZ2-L-F/

lacZ2-L-R、lacZ2-R-F/lacZ2-R-R为引物,PCR扩增分别获得lacZ2-UP和lacZ2-DN片段,分别约600bp和700bp;以E.coli Nissle1917基因组为模板,以acrA-F/acrA-R为引物,PCR扩增获得acrA-1片段,约1.2kb;以acrA-1片段为模板,以acrA-F2/acrA-R为引物,PCR扩增获得Pj23119-acrA片段,约1.3kb;以lacZ2-UP/Pj23119-acrA/lacZ2-DN片段为模板,以lacZ2-L-F/lacZ2-R-R为引物,Overlap PCR扩增获得lacZ2::Pj23119-acrA片段,约2.6kb。

[0160] (2) 电转:方法同2.2,将lacZ2::Pj23119-acrA片段及pTargetF-lacZ2质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50µg/ml)、卡那霉素(50µg/ml)和二氨基庚二酸(100µg/mL)的LB平板上,30℃培养过夜;长出单菌落利用lacZ2-V-F/acrA-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约800bp;

[0161] (3) pTargetF-lacZ2质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas菌株。

[0162] (4) pCas质粒丢失:方法同2.23,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)菌株,命名为TYS011。

[0163] 实施例5:RBS优化工程益生菌TYS012及TYS012/pINP-stlA构建

[0164] 5.1 pTargetF-agaI2质粒构建

[0165] 以pTargetF质粒为模板,agaI2-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增agaI2-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5α化学感受态细胞中,37℃条件下在含壮观霉素(50µg/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-agaI2质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0166] 5.2 agaI基因敲除

[0167] (1) 电转片段制备:以TYS010基因组为模板,分别以agaIH-F/agaIH-R、phePH-F/pheP-seq-R为引物,PCR扩增分别获得agaIK0-UP和agaIK0-DN片段,分别约500bp和200bp;以agaIK0-UP和agaIK0-DN片段为模板,以agaIH-F/pheP-seq-R为引物,Overlap PCR扩增获得agaI-K0片段,约700bp。

[0168] (2) 电转:方法同2.2,将agaI-K0片段及pTargetF-agaI2质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50µg/ml)、卡那霉素(50µg/ml)和二氨基庚二酸(100µg/mL)的LB平板上,30℃培养过夜;长出单菌落利用agaIH-F/pheP-seq-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约700bp;

[0169] (3) pTargetF-agaI2质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA,△agaI)/pCas菌株。

[0170] 5.3 agaI位点插入RBS增强的Pj23119H-pheP

[0171] (1) 电转片段制备:以TYS010基因组为模板,分别以agaIH-F/23119H(agaI)-R、pheP(23119H)-F/pheP-seq-R为引物,PCR扩增分别获得agaIH-UP和phePH-DN片段,分别约800bp和300bp;以agaIH-UP和phePH-DN片段为模板,以agaIH-F/pheP-seq-R为引物,Overlap PCR扩增获得agaI::Pj23119H-pheP片段,约1.1kb。

[0172] (2) 电转:方法同2.2,将agaI::Pj23119H-pheP片段及pTargetF-Apr质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,araBD::Para-pma,△dapA, argA*, △argR, lacZ::Pj23119-acrA, △agaI)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50μg/ml)、卡那霉素(50μg/ml)和二氨基庚二酸(100μg/mL)的LB平板上,30℃培养过夜;长出单菌落利用agaIH-F/pheP-seq-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约900bp;

[0173] (3) pTargetF-Apr质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA, argA*, △argR, lacZ::Pj23119-acrA)/pCas菌株。

[0174] 5.4 pTargetF-lacZ3质粒构建

[0175] 以pTargetF质粒为模板,lacZ3-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增lacZ3-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5α化学感受态细胞中,37℃条件下在含壮观霉素(50μg/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-lacZ3质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0176] 5.5 lacZ位点敲入RBS增强的Pj23119H-pheP

[0177] (1) 电转片段制备:以TYS010基因组为模板,以lacZH-F/23119H(agaI)-R为引物,PCR扩增获得lacZH-UP,约700bp;以lacZH-UP和phePH-DN片段为模板,以lacZH-F/pheP-seq-R为引物,Overlap PCR扩增获得lacZ::Pj23119H-pheP片段,约1kb。

[0178] (2) 电转:方法同2.2,将lacZ::Pj23119H-pheP片段及pTargetF-lacZ3质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA, argA*, △argR, lacZ::Pj23119-acrA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50μg/ml)、卡那霉素(50μg/ml)和二氨基庚二酸(100μg/mL)的LB平板上,30℃培养过夜;长出单菌落利用lacZH-F/pheP-seq-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约1kb;

[0179] (3) pTargetF-lacZ3质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA, argA*, △argR, lacZ::Pj23119-acrA)/pCas菌株。

[0180] 5.6 pTargetF-malE质粒构建

[0181] 以pTargetF质粒为模板,malE-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增malE-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5α化学感受态细胞中,37℃条件下在含壮观霉素(50μg/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-malE质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0182] 5.7 malE基因敲除

[0183] (1) 电转片段制备:以TYS010基因组为模板,分别以malE-LH-F/malE-LH-R、stlAH-F/stlA-seq-R为引物,PCR扩增分别获得malEKO-UP和malEKO-DN片段,分别约300bp和100bp;以malEKO-UP和malEKO-DN片段为模板,以malE-LH-F/stlA-seq-R为引物,Overlap PCR扩增获得malE-KO片段,约400bp。

[0184] (2) 电转:方法同2.2,将malE-KO片段及pTargetF-malE质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50µg/ml)、卡那霉素(50µg/ml)和二氨基庚二酸(100µg/mL)的LB平板上,30℃培养过夜;长出单菌落利用malE-LH-F/stlA-seq-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约400bp;

[0185] (3) pTargetF-malE质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,△malE,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas菌株。

[0186] 5.8 malE位点敲除RBS增强的Pj23119H-stlA

[0187] (1) 电转片段制备:以TYS010基因组为模板,分别以malE-LH-F/23119H(malE)-R、stlA(23119H)-F/stlA-seq-R为引物,PCR扩增分别获得malEH-UP和stlAH-DN,分别约900bp和100bp;以malEH-UP和stlAH-DN片段为模板,以malE-LH-F/stlA-seq-R为引物,Overlap PCR扩增获得malE::Pj23119H-stlA片段,约1kb。

[0188] (2) 电转:方法同2.2,将malE::Pj23119H-stlA片段及pTargetF-Apr质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,△malE,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50µg/ml)、卡那霉素(50µg/ml)和二氨基庚二酸(100µg/mL)的LB平板上,30℃培养过夜;长出单菌落利用malE-LH-F/stlA-seq-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约1kb;

[0189] (3) pTargetF-Apr质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas菌株。

[0190] 5.9 pTargetF-malP2质粒构建

[0191] 以pTargetF质粒为模板,malP2-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增malP2-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5α化学感受态细胞中,37℃条件下在含壮观霉素(50µg/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-malP2质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0192] 5.10 malP基因敲除

[0193] (1) 电转片段制备:以TYS010基因组为模板,以malP-LH-F/malP-LH-R为引物,PCR扩增获得malPKO-UP片段,约400bp;以malPKO-UP和malEKO-DN片段为模板,以malP-LH-F/stlA-seq-R为引物,Overlap PCR扩增获得malP-KO片段,约500bp。

[0194] (2) 电转:方法同2.2,将malP-K0片段及pTargetF-malP2质粒电转化入EcN(malP::Pj23119-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50μg/ml)、卡那霉素(50μg/ml)和二氨基庚二酸(100μg/mL)的LB平板上,30℃培养过夜;长出单菌落利用malP-LH-F/stlA-seq-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约500bp;

[0195] (3) pTargetF-malP质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(△malP,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas菌株。

[0196] 5.11 malP位点敲入RBS增强的Pj23119H-stlA

[0197] (1) 电转片段制备:以TYS010基因组为模板,以malP-LH-F/23119H(malE)-R为引物,PCR扩增获得malPH-UP,约700bp;以malPH-UP和stlAH-DN片段为模板,以malP-LH-F/stlA-seq-R为引物,Overlap PCR扩增获得malP::Pj23119H-stlA片段,约800bp。

[0198] (2) 电转:方法同2.2,将malP::Pj23119H-stlA片段及pTargetF-Apr质粒电转化入EcN(△malP,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50μg/ml)、卡那霉素(50μg/ml)和二氨基庚二酸(100μg/mL)的LB平板上,30℃培养过夜;长出单菌落利用malP-LH-F/stlA-seq-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约800bp。

[0199] (3) pTargetF-Apr质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119H-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas菌株。

[0200] 5.12 pTargetF-yicS2质粒构建

[0201] 以pTargetF质粒为模板,yicS2-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增yicS2-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5α化学感受态细胞中,37℃条件下在含壮观霉素(50μg/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-yicS2质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0202] 5.13 yicS基因敲除

[0203] (1) 电转片段制备:以TYS010基因组为模板,以yicS-LH-F/yicS-LH-R为引物,PCR扩增获得yicSK0-UP片段,约400bp;以yicSK0-UP和malEKO-DN片段为模板,以yicS-LH-F/stlA-seq-R为引物,Overlap PCR扩增获得yicS-K0片段,约500bp。

[0204] (2) 电转:方法同2.2,将yicS-K0片段及pTargetF-yicS2质粒电转化入EcN(malP::Pj23119H-stlA,yicS::Pj23119-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,△dapA,argA*,△argR,lacZ::Pj23119-acrA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50μg/ml)、卡那霉素(50μg/ml)和二氨基庚二酸(100μg/mL)的LB平板上,30℃培养过夜;长出单菌落利用yicS-LH-F/stlA-seq-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约500bp;

[0205] (3) pTargetF-yicS2质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119H-stlA, Δ yicS, malE::Pj23119H-stlA, rthC::Ptac-stlA, exo::Ptac-stlA, lacZ::Pj23119H-pheP, agaI::Pj23119H-pheP, araBD::Para-pma, Δ dapA, argA*, Δ argR, lacZ::Pj23119-acrA)/pCas菌株。

[0206] 5.14 yicS位点敲入RBS增强的Pj23119H-stlA

[0207] (1) 电转片段制备:以TYS010基因组为模板,以yicS-LH-F/23119H(malE)-R为引物,PCR扩增获得yicSH-UP,约800bp;以yicSH-UP和stlAH-DN片段为模板,以yicS-LH-F/stlA-seq-R为引物,Overlap PCR扩增获得yicS::Pj23119H-stlA片段,约900bp。

[0208] (2) 电转:方法同2.2,将yicS::Pj23119H-stlA片段及pTargetF-Apr质粒电转化入EcN(malP::Pj23119H-stlA, Δ yicS, malE::Pj23119H-stlA, rthC::Ptac-stlA, exo::Ptac-stlA, lacZ::Pj23119H-pheP, agaI::Pj23119H-pheP, araBD::Para-pma, Δ dapA, argA*, Δ argR, lacZ::Pj23119-acrA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)、卡那霉素(50 μ g/ml)和二氨基庚二酸(100 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用yicS-LH-F/stlA-seq-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约900bp。

[0209] (3) pTargetF-Apr质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119H-stlA, yicS::Pj23119H-stlA, malE::Pj23119H-stlA, rthC::Ptac-stlA, exo::Ptac-stlA, lacZ::Pj23119H-pheP, agaI::Pj23119H-pheP, araBD::Para-pma, Δ dapA, argA*, Δ argR, lacZ::Pj23119-acrA)/pCas菌株。

[0210] 5.15 pTargetF-lacZ4质粒构建

[0211] 以pTargetF质粒为模板, lacZ4-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增lacZ4-N20片段,约2.2kb, DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/ml)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-lacZ4质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0212] 5.16 lacZ位点敲入RBS增强的Pj23119H-acrA

[0213] (1) 电转片段制备:以TYS010基因组为模板,分别以lacZ4-LH-F/lacZ4-LH-R、acrA(23119H)-F/acrA-V-R为引物,PCR扩增分别获得lacZ4H-UP-1和arcAH-DN片段,分别约330bp和500bp;以lacZ4H-UP-1片段为模板, lacZ4-LH-F/23119H(acrA)-R为引物,Overlap PCR扩增获得lacZ4H-UP片段,约360bp;以lacZ4H-UP和arcAH-DN片段为模板,以lacZ4-LH-F/acrA-V-R为引物,Overlap PCR扩增获得lacZ::Pj23119H-acrA片段,约900bp。

[0214] (2) 电转:方法同2.2,将lacZ::Pj23119H-acrA片段及pTargetF-lacZ4质粒电转化入EcN(malP::Pj23119H-stlA, yicS::Pj23119H-stlA, malE::Pj23119H-stlA, rthC::Ptac-stlA, exo::Ptac-stlA, lacZ::Pj23119H-pheP, agaI::Pj23119H-pheP, araBD::Para-pma, Δ dapA, argA*, Δ argR, lacZ::Pj23119-acrA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)、卡那霉素(50 μ g/ml)和二氨基庚二酸(100 μ g/ml)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用lacZ4-LH-F/acrA-V-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约900bp。

[0215] (3) pTargetF-lacZ4质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119H-stlA, yicS::Pj23119H-stlA, malE::Pj23119H-stlA, rthC::Ptac-stlA, exo::Ptac-stlA, lacZ::Pj23119H-pheP, agaI::Pj23119H-pheP, araBD::Para-pma, Δ dapA, argA*, Δ argR, lacZ::Pj23119H-acrA)/pCas菌株。

[0216] (4) pCas质粒丢失:方法同2.23,得到EcN(malP::Pj23119H-stlA,yicS::Pj23119H-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA,argA*, Δ argR,lacZ::Pj23119H-acrA)菌株,命名为TYS012。

[0217] 5.17重组工程益生菌TYS012/pINP-stlA构建

[0218] (1) 制备工程益生菌TYS012化转感受态细胞,化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0219] (2) pINP-stlA质粒转化入TYS012化转感受态细胞,菌液涂布于含卡那霉素(终浓度50 μ g/mL)LB固体平板,获得TYS012/pINP-stlA重组工程益生菌。

[0220] 实施例6:表面展示PAL模块整合入TYS012基因组

[0221] 6.1 dapA位点敲入表面展示PAL表达模块

[0222] (1) pTargetF-dapA2质粒构建:以pTargetF质粒为模板,dapA2-N20-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增dapA2-N20片段,约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,转化至大肠杆菌DH5 α 化学感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C条件下在含壮观霉素(50 μ g/mL)的LB固体平板上进行筛选,获得pTargetF-dapA2质粒;化学转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

[0223] (2) 电转片段制备:以EcN基因组为模板,分别以dapA2-L-F/23119-R和dapA2-R-F2/dapA2-R-R为引物,PCR扩增分别获得dapA2(inaK)-UP和dapA2(inaK)-DN片段,分别约600bp和500bp;以pINP-stlA质粒为模板,Pj23119-F/INP-R为引物,PCR扩增获得INP-stlA片段,约2.6kb;以dapA2(inaK)-UP/INP-stlA/dapA2(inaK)-DN片段为模板,dapA2-L-F/dapA2-R-R为引物,Overlap PCR扩增获得dapA::inaK-stlA片段,约3.6kb。

[0224] (3) 电转:方法同2.2,将dapA::inaK-stlA片段及pTargetF-dapA2质粒电转化入EcN(malP::Pj23119H-stlA,yicS::Pj23119H-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma, Δ dapA,argA*, Δ argR,lacZ::Pj23119H-acrA)/pCas感受态细胞中,涂布于含壮观霉素(50 μ g/ml)、卡那霉素(50 μ g/ml)和二氨基庚二酸(100 μ g/mL)的LB平板上,30 $^{\circ}$ C培养过夜;长出单菌落利用dapA2-L-F/stlA-seq-R引物进行菌落PCR验证,阳性片段约1.2kb。

[0225] (4) pTargetF-dapA2质粒丢失:方法同2.2,得到EcN(malP::Pj23119H-stlA,yicS::Pj23119H-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,dapA::inaK-stlA,argA*, Δ argR,lacZ::Pj23119H-acrA)/pCas菌株。

[0226] (5) pCas质粒丢失:方法同2.23,得到EcN(malP::Pj23119H-stlA,yicS::Pj23119H-stlA,malE::Pj23119H-stlA,rthC::Ptac-stlA,exo::Ptac-stlA,lacZ::Pj23119H-pheP,agaI::Pj23119H-pheP,araBD::Para-pma,dapA::inaK-stlA,argA*, Δ argR,lacZ::Pj23119H-acrA)菌株,命名为TYS013。

[0227] 实施例7:工程益生菌对苯丙氨酸降解效果体外比较

[0228] 7.1工程益生菌体外测活

[0229] (1) 将原始菌株E.coli Nissle1917(EcN)、工程菌EcN/pINP-stlA、TYS009、TYS009/pINP-stlA、TYS010、TYS011、TYS012、TYS012/pINP-stlA和TYS013菌株分别接种于LB培养基中(除EcN、EcN/pINP-stlA外,其他菌株培养需添加终浓度为100 μ g/mL二氨基庚二

酸), 37℃、250rpm过夜培养。以1%接种量转接于30mL LB培养基中(除EcN、EcN/pINP-st1A外,其他菌株培养需添加终浓度为100μg/mL二氨基庚二酸), 37℃、250rpm条件下培养1.5小时, 1.5小时后添加10mM阿拉伯糖和1mM IPTG继续培养3小时。

[0230] (2) 4000rpm条件下离心收集菌体, M9培养基(含0.5%葡萄糖)重悬菌体, 将菌浓OD₆₀₀调至1.0。分别取0.4mL菌液于2mL离心管中, 4500rpm离心10min, 去上清, 用5mL分析缓冲液(M9培养基、5g/L葡萄糖, 50mM MOPS, 4mM L-苯丙氨酸)悬浮菌体于普通试管中, 定位T=0h, 放于37℃, 250rpm培养3小时取样1mL。13000rpm, 离心10min, 收集上清样品进行HPLC检测。

[0231] 7.2苯丙氨酸、苯丙酮酸及反式肉桂酸HPLC检测方法

[0232] 色谱柱ZORBAX SB-C18色谱柱(150mm×4.6mm, 5μm); 柱温40℃; 以1.5%乙酸和乙腈为流动相, 进行梯度洗脱; 采用紫外检测器, 检测波长260nm, 进样量5μL。

[0233] 各个菌株降解苯丙氨酸的体外检测结果显示于图1中。

[0234] 从图1可知, 工程益生菌具有明显降解苯丙氨酸生成反式肉桂酸能力。增强外排泵acrA菌株TYS011相较TYS010菌株, 反式肉桂酸生成量提高了3.1%; st1A、pheP和acrA基因RBS优化的菌株TYS012相较TYS011菌株, 反式肉桂酸生成量提高了16.8%; 表面展示st1A质粒转入TYS012菌株相较TYS012菌株, 反式肉桂酸生成量提高了16.5%; 表面展示st1A整合菌株TYS013菌株相较TYS012菌株, 反式肉桂酸生成量提高了15.7%。

[0235] 综上所述, 本发明所构建的增强外排泵基因acrA、表面展示PAL的工程益生菌TYS013在体外对苯丙氨酸具有显著降解能力, 有望在体内得以应用, 用于治疗苯丙酮尿症。

序列表

<110> 上海陶宇晟生物技术有限责任公司

<120> 具备表面展示苯丙氨酸解氨酶的工程益生菌

<130> SHPI2010685

<160> 7

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1599

<212> DNA

<213> *Photorhabdus luminescens*

<400> 1

```

atgaaagcta aagatgttca gccaaccatt attattaata aaaatggcct tatctctttg 60
gaagatatct atgacattgc gataaaacia aaaaaagtag aatatcaac ggagatcact 120
gaacttttga cgcatggtcg tgaaaaatta gagaaaaat taaattcagg agaggttata 180
tatggaatca atacaggatt tggagggaat gccaatttag ttgtgccatt tgagaaaatc 240
gcagagcatc agcaaaaatct gttaactttt ctttctgctg gtactgggga ctatatgtcc 300
aaaccttgta ttaaagcgtc acaatttact atgttacttt ctgtttgcaa aggttggtct 360
gcaaccagac caattgtcgc tcaagcaatt gttgatcata ttaatcatga cattgttctc 420
ctggttcttc gctatggctc agtgggtgca agcggtgatt taattccttt atcttatatt 480
gcacgagcat tatgtggtat cggcaaagt ttattatagg gcgcagaaat tgacgctgct 540
gaagcaatta aacgtgcagg gttgacacca ttatcgttaa aagccaaaga aggtcttgct 600
ctgattaacg gcacccgggt aatgtcagga atcagtgcaa tcaccgtcat taaactggaa 660
aaactattta aagcctcaat ttctgcgatt gcccttgctg ttgaagcatt acttgcattc 720
catgaacatt atgatgccc gattcaacia gtaaaaaatc atcctggtca aaacgcggtg 780
gcaagtgcatt tgcgtaattt attggcaggt tcaacgcagg ttaatctatt atctgggggt 840
aaagaacaag ccaataaagc ttgtcgtcat caagaaatta cccaactaaa tgatacctta 900
caggaagttt attcaattcg ctgtgcacca caagtattag gtatagtgcc agaattctta 960
gctaccgctc ggaaaaatatt ggaacgggaa gttatctcag ctaatgataa tccattgata 1020
gatccagaaa atggcgatgt tctacacggt gaaatttta tggggcaata tgtcgcccga 1080
acaatggatg cattaact ggatattgct ttaattgcca atcatcttca cgccattgtg 1140
gctcttatga tggataaccg tttctctcgt ggattaccta attcactgag tccgacacc 1200
ggcatgtatc aaggttttaa aggcgtccaa ctttctcaaa ccgctttagt tgctgcaatt 1260
cgccatgatt gtgctgcatc aggtattcat accctcgcca cagaacaata caatcaagat 1320
attgtcagtt taggtctgca tgccgtcaa gatgttttag agatggagca gaaattacgc 1380
aatattgttt caatgacaat tctggtagtt tgtcaggcca ttcattctcg cggcaatatt 1440
agtgaaattg cgctgaaac tgctaaattt taccatgcag tacgcgaaat cagttctctc 1500
ttgatcactg atcgtgcggt ggatgaagat ataatccgca ttgcggatgc aattattaat 1560
gatcaacttc ctctgccaga aatcatgctg gaagaataa 1599

```

<210> 2

<211> 1377

<212> DNA

<213> *Escherichia coli* MG1655

<400> 2

```

atgaaaaaacg cgtcaaccgt atcggaagat actgcgtcga atcaagagcc gacgcttcat 60
cgcggtattac ataaccgtca tattcaactg attgcgttgg gtggcgcaat tggactgtgt 120
ctgtttcttg gcattggccc ggcgattcag atggcgggtc cggctgtatt gctgggctac 180
ggcgtcgccg ggatcatcgc tttctgatt atgcgccagc ttggcgaat ggtggttgag 240
gagccggat ccggttcatt tgcccacttt gcctataaat actggggacc gtttgcgggc 300
ttcctctctg gctggaacta ctgggtaatg ttcgtgctgg tgggaatggc agagctgacc 360
gctgcgggca tctatatgca gtaactggtc ccggatgttc caacgtggat ttgggctgcc 420
gccttcttta ttatcatcaa cgccgttaac ctggtgaacg tgcgcttata tggcgaacc 480
gagttctggg ttgcgttgat taaagtgctg gcaatcatcg gtatgatcgg ctttggcctg 540
tggtctgtgt tttctggta cggcggcgag aaagccagta tcgacaacct ctggcgctac 600
ggtggtttct tcgccaccgg ctggaatggg ctgattttgt cgctggcggg aattatgttc 660
tccttcggcg gtctggagct gattgggatt actgccgctg aagcgcgca tccgaaaaa 720
agcattccaa aagcggtaaa tcaggtggtg tatcgcattc tgctgtttta catcggttca 780
ctgggtggtt tactggcgct ctatccgtgg gtggaagtga aatccaacag tagcccgttt 840
gtgatgattt tccataatct cgacagcaac gtggtagctt ctgcgctgaa cttcgtcatt 900
ctggtagcat cgctgtcagt gtataacagc ggggtttact ctaacagccg catgctgttt 960
ggcctttctg tgcagggtaa tgcgccgaag tttttgactc gcgtcagccg tcgcggtgtg 1020
ccgattaact cgctgatgct ttccggagcg atcacttcgc tgggtggtgtt aatcaactat 1080
ctgctgccgc aaaaagcgtt tggctctctg atggcgcctg tggtagcaac gctgctgttg 1140
aactggatta tgatctgtct ggcgcatctg cgttttctgt cagcgatgcg acgtcagggg 1200
cgtgaaacac agtttaaggc gctgctctat ccgttcggca actatctctg cattgccttc 1260
ctcggcatga ttttctgtct gatgtgcacg atggatgata tgcgcttgtc agcgatcctg 1320
ctgccggtgt ggattgtatt cctgtttatg gcatttaaaa cgctgcgtcg gaaataa 1377

```

<210> 3

<211> 1422

<212> DNA

<213> *Proteus mirabilis* HI4320

<400> 3

```

atgaacatth caaggagaaa gctactttta ggtgttggtg ctgcgggcgt ttagcaggt 60
ggtgcggctt tagttccaat ggttcgccgt gacggcaaat ttgtggaagc taaatcaaga 120
gcatcatttg ttgaaggtag gcaaggggct cttcctaaag aagcagatgt agtgattatt 180
ggtgccggta ttcaagggat catgaccgct attaaccttg ctgaacgtgg tatgagtgtc 240
actatcttag aaaagggtca gattgccggt gagcaatcag gccgtgcata cagccaaatt 300
attagttacc aaacatcgcc agaaatcttc ccattacacc attatgggaa aatattatgg 360

```

cgtggcatga atgagaaaat tgggtcggat accagttatc gtactcaagg tcgtgtagaa 420
 gcgctggcag atgaaaaagc attagataaa gctcaagcgt ggatcaaac agctaaagaa 480
 gcggcagggtt ttgatacacc attaaatact cgcatcatta aaggtgaaga gctatcaaat 540
 cgcttagtcg gtgctcaaac gccatggact gttgctgcat ttgaagaaga ttcaggctct 600
 gttgatcctg aaacaggcac acctgcactc gctcgttatg ccaacaaat cgggtgtagaa 660
 atttatacca actgtgcagt aagaggtatt gaaactgcgg gtggtaaaat ctctgatgtg 720
 gtgagtgaga aaggggcgat taaaacgtct caagttgtac tcgctggggg tatctggtcg 780
 cgtttattta tgggcaatat gggtattgat atcccaacgc tcaatgtata tctatcacia 840
 caacgtgtct caggggttcc tgggtcacca cgtggtaatg tgcatttacc taatggtatt 900
 catttccgcg aacaagcgga tggtaactat gccgttgac cacgtatctt tacgagttca 960
 atagtcaaag atagcttctt gctagggcct aaatztatgc acttattagg tggcggagag 1020
 ttaccgttgg aattctctat tgggtgaagat ctatttaatt catttaaat gccgacctct 1080
 tggaaattag atgaaaaaac accattcgaa caattccgag ttgccacggc aacacaaaat 1140
 acgcaacact tagatgctgt tttccaaaga atgaaaacag aattcccagt atttgaaaaa 1200
 tcagaagttg ttgaacgttg ggggtccgtt gtgagtccaa catttgatga attacctatc 1260
 atttctgagg tcaaagaata cccaggctta gtgattaaca cggcaacagt gtggggtatg 1320
 acagaaggcc cggcagcggg tgaagtgacc gctgatattg tcatgggcaa gaaacctggt 1380
 attgatccaa cgccgtttag tttggatcgt tttagaagt aa 1422

<210> 4

<211> 1194

<212> DNA

<213> Escherichia coli Nissle 1917

<400> 4

atgaacaaaa acagagggtt tacgcctctg gcggtcgttc tgatgctctc aggcagctta 60
 gccctaacag gatgtgacga caaacaggcc caacaaggtg gccagcagat gcccgccgtt 120
 ggcgtagtaa cagtcaaac tgaacctctg cagatcacia ccgagcttcc gggtcgcacc 180
 agtgcctacc ggatcgaga agttcgtcct caagttagcg ggattatcct gaagcgtaat 240
 ttcaaagaag gtagcgacat cgaagcaggt gtctctctct atcagattga tctgcgacc 300
 tatcaggcgg catacgacag tgcgaaaggt gatctggcga aagcccaggc tgcagccaat 360
 atcgcgcaat tgacggtgaa tcgttatcag aaattgctcg gtactcagta catcagtaag 420
 caagagtacg atcaggctct ggctgatgcg caacaggcga atgctgcggt aactgcggcg 480
 aaagctgccg ttgaaactgc gcgaatcaat ctggcttaca ccaaagttac ctctccgatt 540
 agtggtcgca ttggtaagtc aaacgtgacg gaaggcgcgt tggtagagaa cggtcaggcg 600
 actgcgctgg caaccgtgca gcaacttgat ccgatctacg ttgatgtgac ccagtccagc 660
 aacgacttcc tgcgcctgaa acaggaactg gcgaatggca cgctgaaaca agagaacggc 720
 aaagccaaag tgtcgtgat caccagtacg ggcattaagt tcccgcagga cggtagcgtg 780
 gaattctctg acgttaccgt tgatcagacc actgggtcta tcaccctacg cgctatcttc 840
 ccgaaccggg atcacactct gctgccgggt atgttcgtgc gtgcacgtct ggaagaaggg 900
 cttaatccaa acgctatttt agtcccgcaa cagggcgtaa cccgtacgcc gcgtggcgat 960

gccaccgtac tggtaggttg cgcggatgac aaagtggaaa cccgtccgat cgttgcaagc 1020
caggctatcg gcgataagtg gctggtgaca gaaggtctga aagcaggcga tcgcgtagta 1080
ataagtgggc tgcagaaagt gcgtcctggt gtccaggtaa aagcacaaga agttaccgct 1140
gataataacc agcaagccgc aagcggtgct cagcctgaac agtccaagtc ttaa 1194

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 5

ctcgcgagaa ttaagaagaa aggaggtttt tttt 34

<210> 6

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 6

ggagttatct ctcccgggtc acaatattaa ggaggtttta ttt 43

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 7

gaggctaaca ggcacattca ataaggaggt ttttt 35

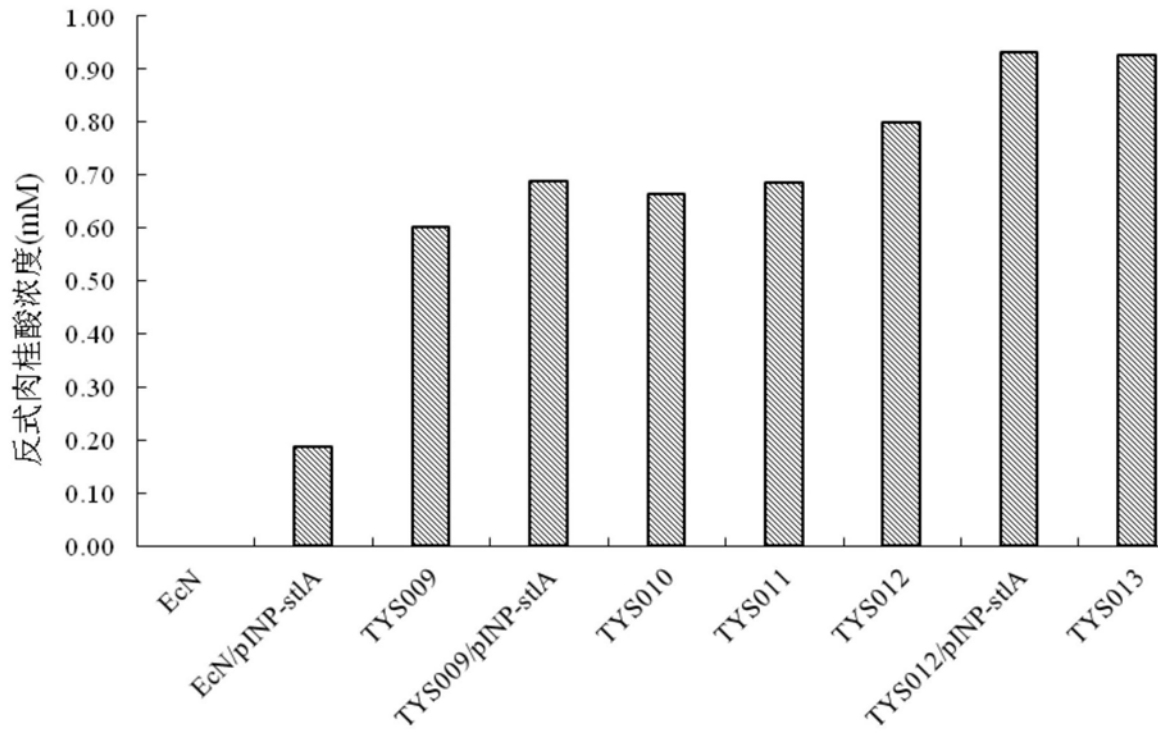


图1