



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109251940 B

(45) 授权公告日 2020.10.16

(21) 申请号 201811273509.8

C12N 1/19 (2006.01)

(22) 申请日 2018.10.30

C12P 7/42 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109251940 A

(56) 对比文件

CN 101886048 A, 2010.11.17

(43) 申请公布日 2019.01.22

审查员 韩婧

(73) 专利权人 浙江华睿生物技术有限公司

地址 313000 浙江省湖州市红丰路1366号6
幢5层西侧502室

(72) 发明人 范文超 高书良 王金刚 梁岩

袁圣伦 任亮

(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 15/90 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

一种产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌的构建方法

(57) 摘要

本发明公开了一种产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌的构建方法,包括下述步骤:以解脂耶氏酵母为底盘细胞,对其基因组中参与脂肪酸降解代谢的pox2、pox3、hbd、hcd和faa1共5个基因进行中断失活处理,得到基因剪切菌株;将黏细菌来源的LiuC、AibA和AibB基因、以及大肠杆菌来源的TesB基因整合入所述基因剪切菌株的基因组,得到产 β -羟基- β -甲基丁酸的工程菌。本发明构建的工程菌能够以葡萄糖为碳源发酵合成目标产物HMB,产量最高可达10g/L。

1. 一种产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌,其通过包括下述步骤的方法构建:

1) 以解脂耶氏酵母为底盘细胞,对其基因组中参与脂肪酸降解代谢的pox2、pox3、hbd、hcd和faa1共5个基因进行中断失活处理,得到基因剪切菌株;

2) 将黏细菌来源的LiuC、AibA和AibB基因、以及大肠杆菌来源的TesB基因整合入步骤1)中得到的基因剪切菌株基因组,其中基因LiuC的碱基序列为SEQ ID NO:1,基因AibA的碱基序列为SEQ ID NO:2,基因AibB的碱基序列为SEQ ID NO:3,基因TesB的碱基序列为SEQ ID NO:4;

3) 挑取阳性转化子,对基因组进行PCR验证,得到产 β -羟基- β -甲基丁酸的工程菌。

2. 如权利要求1所述的产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌,其特征在于,步骤1)中的5个基因中断失活处理是通过利用CRISPR/Cas9系统进行基因编辑而完成的。

3. 如权利要求1所述的产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌,其特征在于,步骤2)中的基因整合是通过将LiuC、AibA、AibB和TesB基因表达模块共转化步骤1)中得到的基因剪切菌株,利用细胞自身的DNA组装重组能力来实现的。

4. 如权利要求1所述的产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌,其特征在于,步骤2)是以URA3基因作为筛选标记,以酵母染色体rDNA位点作为整合位点,将各基因表达模块整合组装在染色体上。

5. 如权利要求4所述的产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌,其特征在于,所述基因表达模块包括:LiuC基因表达模块rDNAu-TEF1p-LiuC-xpr2t,含有启动子TEF1p、LiuC基因、终止子Xpr2t;AibA基因表达模块EXP1p-AibA-mig1t,含有启动子EXP1p、AibA基因、终止子Mig1t;AibB基因表达模块GPDp-AibB-lip2t,含有启动子GPDp、AibB基因、终止子Lip2t;TesB基因表达模块GPM1p-TesB-lip1t,含有启动子GPM1p、TesB基因、终止子Lip1t。

6. 如权利要求4所述的产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌,其特征在于,所述基因表达模块还包括筛选标记URA3基因表达模块URA3-rDNAd。

7. 如权利要求1所述的产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌,其特征在于,所述解脂耶氏酵母底盘细胞是*Yarrowia lipolytica* ATCC MYA-2613。

8. 如权利要求2所述的产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌,其特征在于,所述pox2基因的中断失活处理可以是利用CRISPR/Cas9系统对YALIOF10857g基因进行剪切;所述pox3基因的中断失活处理可以是利用CRISPR/Cas9系统对YALIOD24750g基因进行剪切;所述hbd基因的中断失活处理可以是利用CRISPR/Cas9系统对YALIOC08811g基因进行剪切;所述hcd基因的中断失活处理可以是利用CRISPR/Cas9系统对YALIOC07414g基因进行剪切;所述faa1基因的中断失活处理可以是利用CRISPR/Cas9系统对YALIOD17864g基因进行剪切。

9. 如权利要求4所述的产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌,其特征在于,所述基因表达模块在染色体上的整合组装顺序为:从上游至下游依次是LiuC基因表达模块、AibA基因表达模块、AibB基因表达模块、TesB基因表达模块、URA3基因表达模块。

10. 如权利要求1中所述的产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌在发酵法生产 β -羟基- β -甲基丁酸中的用途。

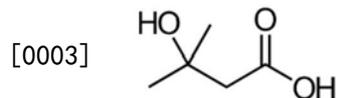
一种产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌的构建方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,涉及一种产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌的构建方法,具体涉及一种用于生产 β -羟基- β -甲基丁酸的解脂耶氏酵母菌的构建方法。

背景技术

[0002] β -羟基- β -甲基丁酸 (3-Hydroxy-3-methylbutyrate Hydrate, HMB) 是无色晶体,分子式为 $C_5H_{10}O_3$,结构式为:



[0004] HMB的钙盐是一种营养补剂,可以在运动员耐力训练中防止肌肉损伤、肌蛋白断裂,也可作为减肥食品的有效成分;可促进动物生长、减少脂肪、增加瘦肉,保证动物健康。该化合物在1995年通过美国GRAS认证,推荐使用量 $\leq 3g$ /天,市场潜力巨大。

[0005] 在人和动物体内的天然代谢途径中, β -羟基- β -甲基丁酸可经由支链氨基酸代谢途径中的亮氨酸(leucine)降解的中间产物 α -KIC (α -ketosiocaproate)生成 (Miyazaki, T., A.Honda, T.Ikegami, J.Iwamoto, T.Monma, T.Hirayama, Y.Saito, K.Yamashita and Y.Matsuzaki. Simultaneous quantification of salivary 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyisobutyrate, 3-hydroxy-3-methylbutyrate, and 2-hydroxybutyrate as possible markers of amino acid and fatty acid catabolic pathways by LC-ESI-MS/MS. SpringerPlus. 2015, 4 (1) : 494.). 目前HMB主要依赖化学合成法进行制备,例如主要是以次氯酸钠、二丙酮醇、盐酸、乙酸乙酯、乙醇、氢氧化钙为反应原料,经过氧化合成、酸化、萃取、中和反应、离心、干燥等步骤制得。但是,化学合成法存在着有机溶剂、腐蚀性酸等试剂使用量大、废料污染严重等无法克服的缺陷,使得化学合成法受到环境保护政策的严重管控和限制,承受着巨大的环保压力。

[0006] 目前,人们普遍认为天然或生物来源的化合物更安全,对于药品、食品、化妆品成分的来源越来越追求“天然化”。出于市场推广目的,药品、食品、化妆品生产商都更乐意使用生物来源的产品来替代化学方法合成出来的相同物质。HMB作为广泛使用的天然化合物,寻找一种绿色环保的生物方法替代化学方法来生产已成为一种研究热点。

[0007] 近些年来,生物合成法日益受到业内青睐。目前研究的HMB生物法主要是利用 *Galactomyces reessii* 菌体细胞发酵、同步流加底物 β -甲基丁酸进行生物催化来制备HMB (Lee, I.Y. and J.P.N. Rosazza. Archives of Microbiology. 1998, 169 (3) : 257-262. Lee, I.Y., S.L. Nissen and J.P. Rosazza. Applied and Environmental Microbiology. 1997, 63 (11) : 4191-4195.). 但是,该方法存在反应产物组分复杂、后期分离纯化困难等问题。

[0008] 目前还未有直接通过天然真菌或真菌工程菌进行发酵来生产HMB的报道,这成为本发明要实现的目标。

发明内容

[0009] 为了构建能够以葡萄糖为碳源通过发酵来生产HMB的无致病性的微生物,本发明利用基因工程技术来改造解脂耶氏酵母的原有脂肪酸降解代谢途径,构建出新的HMB的合成途径,得到一种能够通过发酵来产生HMB的工程菌。具体而言,本发明包括如下技术方案:

[0010] 一种产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌的构建方法,包括下述步骤:

[0011] 1) 以解脂耶氏酵母*Yarrowia lipolytica*为底盘细胞,对其基因组中参与脂肪酸降解代谢的pox2、pox3、hbd、hcd和faa1共5个基因进行中断失活处理,得到基因剪切菌株;

[0012] 2) 将黏细菌*Myxococcus xanthus* (又称黄色粘球菌)来源的LiuC、AibA和AibB基因、以及大肠杆菌来源的TesB基因整合入步骤1)中得到的基因剪切菌株基因组,从而构建出HMB的合成途径;

[0013] 3) 挑取阳性转化子,对基因组进行PCR验证,得到产 β -羟基- β -甲基丁酸的工程菌。

[0014] 在一种实施方式中,步骤1)中的5个基因的中断失活处理是通过利用CRISPR/Cas9系统进行基因编辑而完成的。

[0015] 上述pox2基因的中断失活处理可以是利用CRISPR/Cas9系统对YALIOF10857g基因进行剪切。

[0016] 上述pox3基因的中断失活处理可以是利用CRISPR/Cas9系统对YALIOD24750g基因进行剪切。

[0017] 上述hbd基因的中断失活处理可以是利用CRISPR/Cas9系统对YALIOC08811g基因进行剪切。

[0018] 上述hcd基因的中断失活处理可以是利用CRISPR/Cas9系统对YALIOC07414g基因进行剪切。

[0019] 上述faa1基因的中断失活处理可以是利用CRISPR/Cas9系统对YALIOD17864g基因进行剪切。

[0020] 优选地,步骤2)中的基因整合是通过将LiuC、AibA、AibB和TesB基因表达模块共转化步骤1)中得到的基因剪切菌株,利用细胞自身的DNA组装重组能力来实现的。

[0021] 在一种实施方式中,步骤2)是以URA3基因作为筛选标记,以酵母染色体rDNA位点作为整合位点,将各基因表达模块(又称基因表达片段)整合组装在染色体上。

[0022] 上述基因表达模块包括:LiuC基因表达模块rDNAu-TEF1p-LiuC-xpr2t,含有启动子TEF1p、LiuC基因、终止子Xpr2t;AibA基因表达模块EXP1p-AibA-mig1t,含有启动子EXP1p、AibA基因、终止子Mig1t;AibB基因表达模块GPDp-AibB-lip2t,含有启动子GPDp、AibB基因、终止子Lip2t;TesB基因表达模块GPM1p-TesB-lip1t,含有启动子GPM1p、TesB基因、终止子Lip1t。

[0023] 优选上述基因表达模块还包括筛选标记URA3基因表达模块URA3-rDNAd。

[0024] 上述基因表达模块在染色体上的整合组装顺序优选为:从上游至下游依次是LiuC基因表达模块、AibA基因表达模块、AibB基因表达模块、TesB基因表达模块、URA3基因表达模块。

[0025] 优选地,上述基因LiuC的碱基序列为SEQ ID NO:1;基因AibA的碱基序列为SEQ ID NO:2;基因AibB的碱基序列为SEQ ID NO:3;基因TesB的碱基序列为SEQ ID NO:4。

[0026] 上述解脂耶氏酵母底盘细胞例如是 *Yarrowia lipolytica* ATCC MYA-2613。

[0027] 根据本发明的第二个方面,提供了一种产 β -羟基- β -甲基丁酸的工程菌,其通过上述的方法得到。

[0028] 根据本发明的第三个方面,提供了上述工程菌在发酵法生产 β -羟基- β -甲基丁酸中的用途。

[0029] 优选地,解脂耶氏酵母工程菌以葡萄糖为主要碳源进行发酵。

[0030] 实验表明,本发明构建的解脂耶氏酵母工程菌能够以葡萄糖为主要碳源,通过发酵直接产生HMB,产量最高可达10g/L,具有工业化开发和应用前景。

附图说明

[0031] 图1是解脂耶氏酵母菌的脂肪酸降解代谢途径图。

[0032] 图2是本发明的 β -羟基- β -甲基丁酸生物合成途径示意图。

[0033] 图3是本发明构建的基因表达模块整合组装结构示意图。

[0034] 图4是本发明构建的基因表达模块PCT验证的凝胶电泳照片,显示出各切割条带。

具体实施方式

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 在本文中,术语“基因表达模块”又可称为“基因表达片段”和“基因表达元件”表示相同的意义,可以互换使用,都是指包含X基因、相应启动子和相应终止子的一端DNA序列。其中X是指LiuC、AibA、AibB、TesB和URA3,这是本领域技术人员所熟知的。

[0038] 为了满足消费者以及药品、食品生产商对于HMB“天然化”或“生物化”来源的追求,发明人研究了用微生物发酵来生产HMB的方法。发明人对于用于构建基因工程菌株的微生物品种进行了筛选,摒弃了虽然常用、但有潜在致病性的微生物比如大肠杆菌,选择无致病性的细菌比如谷氨酸棒杆菌和乳糖发酵短杆菌等、或者真菌比如酵母菌作为宿主,构建了基因工程菌,通过筛选,得到可通过一步发酵生产HMB的几种菌株。这些菌株在发酵过程中不会产生可能对于大部分人群造成危害的内毒素,符合“无毒无害”的设计思想。

[0039] 本发明选取解脂耶氏酵母底盘细胞。为了改变其脂肪酸降解代谢途径(参见图1),建立新的HMB生物合成路线(参见图2),将对脂肪酸降解代谢途径中的5个基因pox2、pox3、hbd、hcd和faa1进行中断失活,以减少或降低潜在的细胞内部对脂肪酸的代谢降解。由于CRISPR/Cas9在基因组编辑中已经是一种较为成熟的技术,可以用于剪切/删除选定的基因,通过基因敲除,改变了解脂耶氏酵母中的脂肪酸降解代谢途径,获得了基因剪切菌株。

[0040] 为了在基因剪切菌株建立HMB生物合成路线(参见图2),要将4个外源基因LiuC、AibA、AibB和TesB整合入基因剪切菌株的基因组中。本发明选用了黏细菌来源的LiuC、AibA和AibB基因、以及大肠杆菌来源的TesB基因作为整合的外源基因。至于HMB工程菌的构建,可参考文献(Shuliang Gao, et al., One-step integration of multiple genes into the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnology Letters*, 36(12) DOI:

10.1007/s10529-014-1634-y) 策略,通过对宿主进行一步多基因表达模块共转化,利用细胞自身的DNA组装重组能力,快速实现HMB工程菌的构建。

[0041] 通过本发明构建的解脂耶氏酵母菌发酵制备的HMB及其盐不含细菌内毒素,也不包含有毒害性的化学物质,因此可以保障其食品安全性。另外,由于不含化学残留物或化学反应杂质,本发明的HMB不含化学异味比如苦味,可以直接用于制作药品、保健品。

[0042] 本发明所构建的HMB生产菌在发酵过程中能够实现发酵液中HMB的有效积累,得到食品级的HMB,因而具有广阔的工业应用前景。

[0043] 实施例

[0044] 材料和方法

[0045] 实施例中的全基因合成、引物合成及测序皆由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

[0046] 实施例中的分子生物学实验包括质粒构建、酶切、连接、感受态细胞制备、转化、培养基配制等等,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。必要时可以通过简单试验确定具体实验条件。

[0047] PCR扩增实验根据质粒或DNA模板供应商提供的反应条件或试剂盒说明书进行。必要时可以通过简单试验予以调整。

[0048] 主要培养基:

[0049] LB培养基:5g/L酵母提取物,10g/L胰蛋白胨,10g/L氯化钠。(LB固体培养基另加20g/L琼脂粉。)

[0050] YPD培养基:10g/L酵母提取物,20g/L胰蛋白胨,20g/L葡萄糖。(固体培养基另加20g/L琼脂粉。)

[0051] YPD4培养基:10g/L酵母提取物,20g/L胰蛋白胨,40g/L葡萄糖。

[0052] HPLC测定HMB的条件:

[0053] 色谱柱为岛津SB-AQ柱,流动相A浓度0.3%的磷酸,流动相B为乙腈,流动相比例A:B=80:20,柱温40℃,检测波长215nm,检测时长8min,保留时间为4.08min。

[0054] 实施例1:解脂耶氏酵母基因组中五个基因的失活

[0055] 1.1选取作为代谢路径改变对象的底盘细胞

[0056] 采用解脂耶氏酵母*Yarrowia lipolytica* ATCC MYA-2613(购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),USA)作为宿主菌即底盘细胞。为了改变其脂肪酸降解代谢途径(参见图1),选用并构建了用于靶向剪切这5个基因的质粒。

[0057] 使用质粒pCRISPRy1(购自Addgene公司),参考文献(Schwartz,C.M.,M.S.Hussain,M.Blenner and I.Wheeldon.Synthetic RNA Polymerase III Promoters Facilitate High-Efficiency CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Yarrowia lipolytica*.ACS Synthetic Biology.2016,5(4):356-359.)的方法描述,构建如下质粒,如表1所示。

[0058] 表1

[0059]

质粒名称	靶向基因	所用sgRNA
pCRISPRy1-pox2	YAL10F10857g	GCUGGAGUUCGGGCUGCUGU

pCRISPRy1-pox3	YALI0D24750g	CGACGUCUGGUAGCUGGGAU
pCRISPRy1-hbd	YALIO08811g	GGAGUACGGGAUGUAGUUGC
pCRISPRy1-hcd	YALIO07414g	AAAGUUCGACCUGCACAGGU
pCRISPRy1-faa1	YALI0D17864g	ACCGGACCGAAGAGACAGAG

[0060] 1.2构建靶向pox2基因的质粒pCRISPRy1-pox2

[0061] 将pCRISPRy1质粒转入大肠杆菌DH5 α 感受态中,并将转化子转接含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基,过夜培养,使用axygen质粒抽提试剂盒进行pCRISPRy1质粒抽提。pCRISPRy1质粒经AvrII单酶切后,进行凝胶电泳纯化回收,用作载体。使用合成的DNA寡核苷酸单链引物,经退火获得60bp的双链DNA。将上述胶回收的酶切后pCRISPRy1载体DNA和60bp双链DNA进行Gibson组装(参考Daniel G Gibson,et al.,Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases.Nature Methods.2009),得到用于pox2中断失活操作的p CRISPRy1-pox2质粒。

[0062] 1.3构建pCRISPRy1-pox3、pCRISPRy1-hbd、pCRISPRy1-hcd和pCRISPRy1-faa1质粒

[0063] 按照与上述pCRISPRy1-pox2质粒构建步骤1.3相似的方法,构建出另外分别靶向pox2、pox3、hbd、hcd和faa1基因的四个质粒pCRISPRy1-pox3、pCRISPRy1-hbd、pCRISPRy1-hcd和pCRISPRy1-faa1。

[0064] 1.4CRISPR/Cas9系统中sgRNA的转录表达

[0065] 本发明中使用的单链向导sgRNA以表达载体形式存在,作为各RNA转录模板的双链DNA及N20序列如下表2所示:

[0066] 表2

靶基因	sgRNA 转录模板 (5'-3')
[0067] pox2	Pox2-N20-F: GGGTCGGCGCAGGTTGACGT <i>cgacctcaagcccgcagaca</i> CTTTTAGAGCTAGAAATAGC
	Pox2-N20-R: GCTATTTCTAGCTCTAAAAG <i>gtcgtcggcgttaggtcg</i> ACGTCAACCTGCGCCGACCC
pox3	Pox3-N20-F: GGGTCGGCGCAGGTTGACGT <i>gctgcagaccatcgacccta</i> CTTTTAGAGCTAGAAATAGC
	Pox3-N20-R: GCTATTTCTAGCTCTAAAAG <i>tagggctgatggctgcagc</i> ACGTCAACCTGCGCCGACCC
[0068] hbd	Hbd-N20-F: GGGTCGGCGCAGGTTGACGT <i>ectcatgccctacatcaacg</i> CTTTTAGAGCTAGAAATAGC
	Hbd-N20-R: GCTATTTCTAGCTCTAAAAG <i>cgttgatgtagggcatgagg</i> ACGTCAACCTGCGCCGACCC
hcd	Hcd-N20-F: GGGTCGGCGCAGGTTGACGT <i>tttcaagctggcagtgcca</i> CTTTTAGAGCTAGAAATAGC
	Hcd-N20-R: GCTATTTCTAGCTCTAAAAG <i>tggacacgtccagcttga</i> ACGTCAACCTGCGCCGACCC
faa1	Faa1-N20-F: GGGTCGGCGCAGGTTGACGT <i>tggcctggcttctctgtctc</i> CTTTTAGAGCTAGAAATAGC
	Faa1-N20-R: GCTATTTCTAGCTCTAAAAG <i>gagacagagaagccaggcca</i> ACGTCAACCTGCGCCGACCC

[0069] *表2中,名称中的“-F”代表正向;“-R”代表反向;小写斜体为sgRNA模板序列。

[0070] 1.5质粒pCRISPRy1-pox2转化解脂耶氏酵母及筛选

[0071] 将宿主菌ATCC MYA-2613菌种在YPD固体培养基上划线,30 $^{\circ}$ C培养2天,挑单菌落转接装有4ml YPD液体培养基的试管。30 $^{\circ}$ C,220rpm过夜培养,转接装有25ml YPD液体培养基的250ml摇瓶,30 $^{\circ}$ C,220rpm培养4~6h,培养至OD₆₀₀为0.8~1.0,菌液用于制备解脂耶氏酵

母的转化感受态。感受态的制作和转化,使用Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit进行,严格参考其使用说明书。转化产物涂布SC-leu(葡萄糖20g/l,YNB基本氮源1.7g/l,赖氨酸和尿嘧啶各50mg/l),30℃培养4天。使用验证引物Pox2-verify-F/Pox2-verify-R对转化子进行菌落PCR验证,PCR反应体系配置严格参考High efficient&High fidelity PCR enzyme KOD FX(购自东洋纺公司)。PCR产物送苏州金维智生物技术有限公司,使用Pox2-verify-F引物进行测序,根据测序结果判定阳性转化子。阳性转化子用于进一步的其他4个靶点基因的操作。

[0072] 1.6质粒pCRISPRy1-pox3、pCRISPRy1-hbd、pCRISPRy1-hcd和pCRISPRy1-faa1转化

[0073] 按照与上述pCRISPRy1-pox2质粒转化解脂耶氏酵母步骤1.5相似的方法,将另外四个质粒pCRISPRy1-pox3、pCRISPRy1-hbd、pCRISPRy1-hcd和pCRISPRy1-faa1转化入解脂耶氏酵母。

[0074] PCR验证引物如下表3所示:

[0075] 表3

靶基因	引物 (5'-3')	
[0076]	pox2	Pox2-verify-F: TGATATCGGAAAGAAGATGG Pox2-verify-R: CTTGTATCGCTTCAGGTAAG
	pox3	Pox3-verify-F: AAGGTCTCGTCTACCGGCAA Pox3-verify-R: CTCAAGACCCTTGTTAGCCA
	hbd	hbd-verify-F: GTTGGCAAAGGCCGTCTGACC hbd-verify-R: CCGAGCCAGCCAGCATCGAC
[0077]	hcd	hcd-verify-F: GGAGATAAAGCTGCTGCTCG hcd-verify-R: GTGTCGATGTTCTCTTTTCG
	faa1	faa1-verify-F: GGATACACAATTTCTCATAA faa1-verify-R: CCAGAGGTGTACATGATGAA

[0078] *表2中,名称中的“-F”代表正向;“-R”代表反向。

[0079] 经过5轮操作,对各中断靶点进行PCR扩增后,进行sanger测序确认,证明通过CRISPR/Cas9系统对解脂耶氏酵母中5个基因pox2、pox3、hbd、hcd和faa1实施基因剪切,获得了基因剪切菌株ATCC MYA-2613 Δ pox2 Δ pox3 Δ hbd Δ hcd Δ faa1。这5个基因的敲除改变了解脂耶氏酵母中的脂肪酸降解代谢途径。

[0080] 实施例2:解脂耶氏酵母中外源基因的整合

[0081] 2.1设计外源基因的表达盒

[0082] 在实施例1中得到的基因剪切菌株中表达黏细菌(Myxococcus xanthus,又称黄色粘球菌)来源的LiuC、AibA和AibB基因以及大肠杆菌来源的TesB基因。LiuC(uniprot:Q1D5Y4),AibA(uniprot:Q1D414),AibB(uniprot:Q1D413)和TesB(uniprot:POAGG2)分别由苏州金维智生物技术有限公司进行密码子优化后基因合成。需要使用的启动子、基因和终止子如下表3所示。

[0083] 表3

启动子编号	启动子名称	基因编号	基因名称	终止子编号	终止子名称
A	TEF1p	1	LiuC	α	Xpr2t
B	EXP1p	2	AibA	β	Mig1t
C	GPDp	3	AibB	γ	Lip2t

D	GPM1p	4	TesB	Ω	Lip1t
---	-------	---	------	---	-------

[0085] 本发明选择以URA3基因作为筛选标记,选择解脂耶氏酵母染色体rDNA位点作为外源基因整合位点。为了实现这些外源基因的表达,设计并构建了一个表达盒,其中各基因表达模块在染色体上的整合组装顺序如图1所示。

[0086] 2.2构建外源基因表达模块

[0087] 图1所示表达盒中包含如下基因表达模块:rDNAu-TEF1p-LiuC-xpr2t,EXP1p-AibA-mig1t,GPDp-AibB-lip2t,GPM1p-TesB-lip1t,URA3-rDNAd。针对这些基因表达模块,设计引物序列用于PCR扩增以上各基因片段,如下述表4所示。

[0088] 表4

片段	引物名称	引物序列 (5'-3')
rDNAu	rDNAu-F	TCGATCCTAAGGGGTGGCAT
	rDNAu-R	CGCCGCCAACCCGGTCTCTTTGAATTTCTTCACTTTGACAATCA
TEF1p	TEF1p-F	GTCAAAGTGAAGAAATTCAAAGAGACCGGGTTGGCGGCGTAATTTGTG
	TEF1p-R	AACCTTGAATTTCTGGCATGAATGATTCTTATACTCAGA
LiuC	LiuC-F	GAGTATAAGAATCATTCATGCCAGAATTC AAGGTTGA
	LiuC-R	GGGACAGGCTAGAGGATCCCTATCTACCCTTGTAAACTGG
Xpr2t	Xpr2t-F	AGATAGGGATCCTCTAGCCTGTCCCCACGTTGCCGGT
	Xpr2t-R	GAAAAACGGGCGCCAAACTCGGACACGGGCATCTCACTTGC
EXP1p	EXP1p-F	CAAGTGAGATGCCCGTGTCCGAGTTTGGCGCCCGTTTTTT
	EXP1p-R	CAACGATCAACAATCTAGCCATTGCTGTAGATATGTCTTGTGTGTAAGGGGG
AibA	AibA-F	CACAAGACATATCTACAGCAATGGCTAGATTGTTGATCGTT
	AibA-R	GTAAATTAATCGACCGGCCAGTGCTACAAACCGAAAGAGATTCTG
Mig1t	Mig1t-F	CACAGAATCTCTTTCCGGTTTGTAGCACTGGCCGGTCGATAAATTT
	Mig1t-R	CCGTGCAGGACATCCTACTGCGAAACCCAAAAGGGCCGAAGG
GPDp	GPDp-F	GCCTTCGGCCCTTTTGGGTTTCGCGAGTAGGATGTCCTGCAC
	GPDp-R	GAGATGATAACCAATGGTCTCATTGTTGATGTGTGTTAATTCAAGAATGAAT
AibB	AibB-F	CTTGAATTAACACACATCAACAATGAGACCATTTGGTTATCAT
	AibB-R	TGTAAGAGAGTGATAAATAGCCTACTTTCTTCTCTCAAAACT
Lip2t	Lip2t-F	TGAGAAGAAGAAAGTAGGCTATTTATCACTCTTTACAAC
	Lip2t-R	TCACGTGAGAATTAATGAGGTCCACCTGTGTCAATCTTCT
GPM1p	GPM1p-F	GAAGATTGACACAGGTGGACCTCATTAATTCACGTGA
	GPM1p-R	GTTCTTCAAAGCTTGAGACATTTTGTATGTGTTTGGTGA
TesB	TesB-F	CATCACAAAACACATACAAAAATGTCTCAAGCTTTGAAGAA
	TesB-R	TATTTATATATTTATCTTCTCATGAACCCTAGTTGTGGTTTCTCATAAC
Lip1t	Lip1t-F	GGTGTATGAGAAACCACAACCTAGGGTTCATGAGAAGATAAATATA
	Lip1t-R	GAATGCTCCACAGAACACACCGTTCAAATCTTCTCTCAAGA
URA3	URA3-F	GCAGAGAGATCTTGAGAGAAGATTTGAACGGTGTGTTCTGTGGAGCATT
	URA3-R	GCCGTTTACCCGCGCGCTTGGTTGAATTTGGTGTAGTGGTAGTGCAGTG
rDNAd	rDNAd-F	ACCACCACTGCACTACCACTACACCAAATTC AACCAAGCGCGCGG
	rDNAd-R	CTTCGGTATGATAGGAAGAG

[0089]

[0090] 表2中,名称中的“-F”代表正向;“-R”代表反向。

[0091] 利用表4中所述的引物进行各基因表达片段(基因表达模块)的PCR扩增,将PCR产物使用1%浓度的琼脂糖凝胶电泳分离,割胶,纯化回收片段,并使各片段重溶浓度保持相当,保存备用。

[0092] 以PCR获得的各DNA片段为模板,采用OverlapPCR构建各基因表达模块rDNAu-TEF1p-LiuC-xpr2t(2250bp)、EXP1p-AibA-mig1t(2874bp)、GPDp-AibB-lip2t(4227bp)、GPM1p-TesB-lip1t(2428bp)、URA3-rDNAd(2565bp)。将OverlapPCR产物使用1%浓度的琼脂糖凝胶电泳,割胶,纯化回收片段,保存备用。

[0093] 2.3外源基因表达模块转化

[0094] 上述表达模块片段rDNAu-TEF1p-LiuC-xpr2t(2250bp)、EXP1p-AibA-mig1t(2874bp)、GPDp-AibB-lip2t(4227bp)、GPM1p-TesB-lip1t(2428bp)、URA3-rDNAd(2565bp)分别取200ng、300ng、400ng、200ng和300ng,混合后,浓缩至5 μ l体积,用于转化。

[0095] 将实施例1中得到的基因剪切菌株ATCC MYA-2613 Δ pox2 Δ pox3 Δ hbd Δ hcd Δ faa1、以及原始菌株ATCC MYA-2613分别在YPD固体培养基上划线,30 $^{\circ}$ C培养2天,挑单菌落转接装有4ml YPD液体培养基的试管,30 $^{\circ}$ C,220rpm过夜培养。转接装有25ml YPD液体培养基的250ml摇瓶,30 $^{\circ}$ C,220rpm培养4~6h,培养至OD₆₀₀为0.8~1.0。菌液用于制备解脂耶氏酵母的转化感受态。感受态的制作和转化,使用Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit进行,严格参考其使用说明书。涂布SC-ura(葡萄糖20g/l,YNB基本氮源1.7g/l,赖氨酸和亮氨酸各50mg/l)固体培养基,于30 $^{\circ}$ C培养3~4天,得到备选转化子。

[0096] 2.4菌种鉴定

[0097] 挑取阳性转化子,进行基因组抽提,分别使用rDNAu-F/EXP1p-R、Xpr2t-F/GPDp-R、Mig1t-F/GPM1p-R和GPM1p-F/rDNAd-R引物对目标片段进行PCR验证。如图4所示,阳性转化子可同时扩增出3429bp、4214bp、5571bp和3289bp的目的条带。图4的PCT凝胶电泳照片表明外源基因整合入基因剪切菌株的基因组中。

[0098] 实施例3:发酵验证

[0099] 对实施例2中鉴定获得的阳性转化子进行发酵验证,将转化子分别接种YPD4培养基进行发酵。阳性转化子的HMB最高产量为10g/L。相反,而未进行脂肪酸代谢途径基因敲除的宿主菌,即便整合上述HMB生物合成途径,阳性转化子未发现HMB产物。

[0100] 上述实验结果表明,本发明构建的解脂耶氏酵母工程菌可以经过发酵直接产生HMB,实现发酵液中HMB的有效积累。本领域技术人员显然容易理解,与化学合成法相比,本发明的生物合成法具有绿色环保的天然优势,因而具有工业化开发和应用前景。

[0101] 另外,需说明的是,本说明书中对先前公开的文献的列举和论述不应视为承认该文献是现有技术或者是公知常识。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 浙江华睿生物技术有限公司
- [0003] <120> 一种产 β -羟基- β -甲基丁酸工程菌的构建方法
- [0004] <130> SHPI1811676
- [0005] <160> 4
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 777
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 黏细菌()
- [0011] <400> 1
- [0012] atgccagaat tcaaggttga cgctagaggt ccaatcgaaa tctggactat cgacggtgaa 60
- [0013] tctagaagaa acgctatctc tagagctatg ttgaaggaat tgggtgaatt gtttactaga 120
- [0014] gtttcttctt ctagagacgt tagagctggt gttatcactg gtgctgggta caaggctttc 180
- [0015] tgtgctggtg ctgacttgaa ggaaagagct actatggctg aagacgaagt tagagctttc 240
- [0016] ttggacggtt tgagaagaac tttcagagct atcgaaaagt ctgactgtgt tttcatcget 300
- [0017] gctatcaacg gtgctgcttt ggggtgggtg actgaattgg ctttggcttg tgacttgaga 360
- [0018] gttgctgctc cagctgctga attgggtttg actgaagtta agttgggtat catcccaggt 420
- [0019] ggtgggtgta ctcaaagatt ggctagattg gttggtccag gtagagctaa ggacttgatc 480
- [0020] ttgactgcta gaagaatcaa cgctgctgaa gctttctctg ttggtttggc taacagattg 540
- [0021] gctccagaag gtcacttgtt ggctgttget tacggtttgg ctgaatctgt tgttgaaaac 600
- [0022] gctccaatcg ctgttgctac tgctaagcac gctatcgacg aaggtactgg tttggaattg 660
- [0023] gacgacgctt tggctttgga attgagaaaag tacgaagaaa tcttgaagac tgaagacaga 720
- [0024] ttggaaggtt tgagagcttt cgctgaaaag agagctccag tttacaaggg tagatag 777
- [0025] <210> 2
- [0026] <211> 1374
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 黏细菌()
- [0029] <400> 2
- [0030] atggctagat tgttgatcgt tgaagacaac cacgaattgg cttctttgat cgttgctttg 60
- [0031] gctcaatcta gaggtcacga cgctaaggct gctgctactg gtgaagctgc tttggaatct 120
- [0032] ttgggtccag gtcaaacctg ggacgctgct ttggttgact tgttgttgcc agacatcaga 180
- [0033] ggttctgaag ttttgctgct tttgagagct cacggtatcc cagctatcgc tgtttctggt 240
- [0034] gtttacaagg gtgacagatt cgctcaagaa gctgttcaag ttcacggtgc tagatctttc 300
- [0035] ttcgaaaagc cattcgaatt gatcactggt atggaagctt tggaacaagc tgggtggtgtt 360
- [0036] gctccacaac caagagctcc accaccaatc gctgaatctg ttttgttggc cgaattgttg 420
- [0037] gacactgaag acttgatcgt tttggaagaa ttcccaccag aaccatctga cgctgctgaa 480
- [0038] ccattgcaag ttgttccatc tactgacca ttgccagaac cagctgacac tgaacacget 540
- [0039] ttgccattgc cattcggtag aagagaacaa gtttggctctg aatctactgc tccatctact 600
- [0040] ccaccaccac caaagagagc tttgccagac tggctcttgg gtggtgtttt ggaagacgct 660
- [0041] actgttgcta gattgtttaa cgcttactac gaagctagac accacggtga attgaagtgg 720

[0042]	caacaaggtc aagttttgaa ggttgtttac ttcgaatctg gtagagttgt ttacgctgct	780
[0043]	tctaacttgg ctgctgaaag attcggtaga ttctgtgta gacaagggtg tttgccagaa	840
[0044]	gctagattgg ctgaagttgc tgctttcgtc aaggaaagag gtttgagaac tggatgaagct	900
[0045]	atggtgagaa tgggtttgat ggacgctgct caaagagaac aattggttgg tgaacaagtt	960
[0046]	aaggaaatca tctggtctac tttcacttgg aaggaaggtg gttacggttt ctctgctatg	1020
[0047]	agaccaagaa gaactgactt ggttaagttg tctgttttcc cagggtgactt ggttttggaa	1080
[0048]	ggtgttgcta agactgaaac tttggttact ttgagaagac acatgccaaag atctagaaga	1140
[0049]	ttgttcccaa ctgctgacgc tccatacggc ttgcacgaat tgaagttgga aggtgctcaa	1200
[0050]	gctttggttt tggtttacgc tgacggttct aagactgttg aagacttgtt ggctttgact	1260
[0051]	gacttgccag aaagacaaac tttggctact ttgagaggtt tggaaattgt ggggtgtttg	1320
[0052]	gaagaaagac cagacactcc atctagaaga cacagaatct ctttcggttt gtag	1374
[0053]	<210> 3	
[0054]	<211> 3096	
[0055]	<212> DNA	
[0056]	<213> 黏细菌()	
[0057]	<400> 3	
[0058]	atgagaccat tggttatcat ctctttgtgt ttgggtgttg ctactgctgc tagagctgac	60
[0059]	tgggacgttg acgaagtcc aggtatcgtc agatctgttg acgttttcgc tccaggttct	120
[0060]	tactctgttt ctacttctac tcaaaactgaa ttgttcgaaa acggtatcca atctgctgtt	180
[0061]	ttcttgcaact ctgacgtttt cggtaacttc ttgtctcaa tgggttgttt cgctgttgtt	240
[0062]	gtagaccag gtgacgttat ctctcaccia aactgtagag ctgctggtaa catcatccca	300
[0063]	ccagaccag ttaacactgt tgttggtatc agaagagta agcactctcc atctggtact	360
[0064]	ggttacgctg ctgttgcttt gtctgacggt ggtttgtcct tgttgactgc ttctgctggt	420
[0065]	ttgctggtc caactccatg gactttgtg tctgctggtg ctggtttgtt gtcttctact	480
[0066]	gacgttttg gtgttgtga aacttctgac ggtgctccac acgctttgtt ctctgttact	540
[0067]	ggtgttacta gaactgaatt cttgtgttac actagagaca gaagacaagc tcaaatggtt	600
[0068]	gttccatctc acttgacttc tgaagctcca ttgactgttg acttgctgc tggttctggt	660
[0069]	ccacaccaa tcgctttgtt cggtaactct gacggtttgt tcagaggtca attggacca	720
[0070]	gctggtacta ctttctctgc tgttatgttg ccagacggtg tgtctgacgt tagaatcaact	780
[0071]	tctgttgacg ttaacactgg taacggttct gttcacggtg aaggtttcgg tttggctgtt	840
[0072]	ggtgttgacc catctggtga accagttgtt ttgggtgctg ttccagcttc ttctgctgac	900
[0073]	aacgctggtg ctcaatggag agttcaccca gttttcgaag gttctgctt gccaggtgct	960
[0074]	tctcaagcta ctccattgga agtttctgt atcggttctt ctttctgtt gttcatcttg	1020
[0075]	gaccaaccat ctttcaactg ttttacttac gttaacgcta acgctccagt tttggacgtt	1080
[0076]	ggtccatctc caatcgttgt taacgaaact ggtactgcta ctgctagatt ctctgctact	1140
[0077]	gacgctgact ctgacgctgt tagagtttct gttgacgctt cttctactcc aggtgctgac	1200
[0078]	ttggttggg ttaacatcgt tgaacacca gaccaattgg acgttacttt ggttccaaa	1260
[0079]	agaccagttt gtaaggacga agaaggtttg ttgagagttt acgcttctga cggtttggct	1320
[0080]	tctcacgacg ttcaagctac tgttgcttac agagttgta acactaaggg tccagctcaa	1380
[0081]	ccaactgttt tgccatctag agaactact actgcttctg gtgcttctag agttttcact	1440
[0082]	gctcaaccag cttctgaagc ttgtccagct gtagatacag tttggctctc agtttctggt	1500
[0083]	caatctggtg ctccattgtt gtctactgac ggtggtgctc aagctacttt cactccacca	1560

[0084]	gaagttttgt gtcaagaatc tggacttct tacgcttacg aagtttagagg tgttgacgaa	1620
[0085]	ggtggtttga cttcttctgc tgctgctatc ttcactgttg acgttgctcc atggggtaga	1680
[0086]	ccattggttc cattcgttc tggttctgaa agaactttga cttctggctcc aggtgcttet	1740
[0087]	gttgacgttg ttccagacgc tttgcacact tgtgaaggta cttctggttt gccaaactgtt	1800
[0088]	gacactgaat ggagattgtc tgcttctggt tctggtatcc cagacgggtg tactgttaga	1860
[0089]	actgctgacg gtactgctgt tactttgcac tctccagttt cttctgaaag attgagagtt	1920
[0090]	gaagetgctg aatgtgctta cggctactttg gctttgactg ctagaacag aatcccagtt	1980
[0091]	actggtggtg gtactcaaga ctctgctgac gctgaattga gagtttagagt tgaaccatct	2040
[0092]	ttggaagacg ttgctactgg ttctttggaa ttgggtgttg ttccatctgg tgaagggtac	2100
[0093]	gttgacatcg ctttgacac ttctttgaac tgtgttgacg ctagaacttt gaaggctaga	2160
[0094]	atgttcttgg aaactttggg tgggtaagct ttggactctg ctgttggtcc agttccaggt	2220
[0095]	acttgagac cagctttgcc aagatcttgt actttggaat cttacagagt tagagggtga	2280
[0096]	ttgttcgacg actctgaagg tccagttaga gaagggtgta gagctcaaac tgaaatccca	2340
[0097]	aaccaacct tgccagctag attgggtgct ttggaagctg gtgctttggt tgctagatgt	2400
[0098]	ggtgaagtg cttctgctac tttgactcaa actatcccag ctaacgcttg tgggtaagtt	2460
[0099]	gctatctctt ggtctcaagt tgctggtcca gctttgtctg aagtttcttt ggctggtcca	2520
[0100]	tctgttactg tttctactca agaaactggt ttggaagctt tggttggtca atctatcact	2580
[0101]	ttgagagttt tggctgacgc tgggtgttct aacctgcta ctactgacta cgttttgcca	2640
[0102]	atcacttctg aaagattcgt tgacgttaga cacgctatgg aatctccaac tgcttctgaa	2700
[0103]	aagggtttgg ttggtgttgt tgttgaattg agaaacactt ctgaatgtga agttggtggt	2760
[0104]	ttgcaactact tggaaaacgt tgacggtttg gaatgggttc caggttctgt taagttggac	2820
[0105]	ggtgttctg ttgaagctag agctgttgac ggtggtttca gagttgaaga catcagattg	2880
[0106]	ccagctcaat ctactcaaat gttgacttac gttggtagat ctccattgtt gtctactcca	2940
[0107]	agattgggtg gtgaaatgac tttgaacggt gttccagttt ctggtgacgc tgctgttcca	3000
[0108]	ccaccaactt ctggttgg ttgttctggt ggtggttctg gtgctgctgt tttcggtttg	3060
[0109]	gctgctttgg ctgagtttt gagaagaaga aagtag	3096
[0110]	<210> 4	
[0111]	<211> 861	
[0112]	<212> DNA	
[0113]	<213> 大肠杆菌()	
[0114]	<400> 4	
[0115]	atgtctcaag ctttgaagaa cttgttgact ttgttgaact tggaaaagat cgaagaaggt	60
[0116]	ttgttcagag gtcaatctga agacttgggt ttgagacaag ttttcggtgg tcaagttgtt	120
[0117]	ggtcaagctt tgtacgctgc taaggaaact gttccagaag aaagattggt tcaactcttc	180
[0118]	cactcttact tcttgagacc aggtgactct aagaagccaa tcatctacga cgttgaaact	240
[0119]	ttgagagacg gtaactcttt ctctgctaga agagttgctg ctatccaaaa cggtaagcca	300
[0120]	atcttctaca tgactgcttc tttccaagct ccagaagctg gtttcgaaca ccaaaagact	360
[0121]	atgccatctg ctccagctcc agacggtttg ccatctgaaa ctcaaatcgc tcaatctttg	420
[0122]	gctcaactgt tgccaccagt tttgaaggac aagttcatct gtgacagacc attggaagtt	480
[0123]	agaccagttg aattccaca cccattgaag ggtcacgttg ctgaaccaca cagacaagtt	540
[0124]	tggatcagag ctaacggttc tgttccagac gacttgagag ttcaccaata cttgttgggt	600
[0125]	tacgcttctg acttgaactt cttgccagtt gctttgcaac cacacggtat cggtttcttg	660

-
- [0126] gaaccaggta tccaaatcgc tactatcgac cactctatgt ggttccacag accattcaac 720
[0127] ttgaacgaat ggttggtgta ctctgttgaa tctacttctg cttcttctgc tagaggtttc 780
[0128] gtttagaggtag aattctacac tcaagacggt gttttggtg cttctactgt tcaagaaggt 840
[0129] gttatgagaa accacaacta g 861

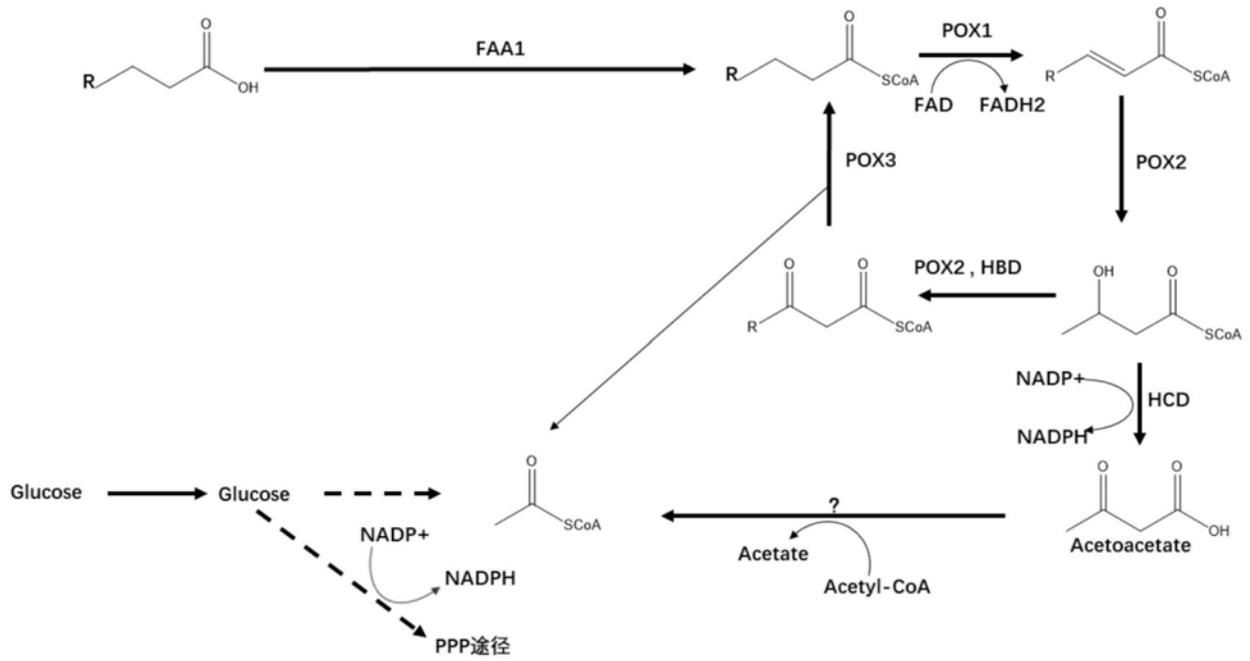


图1

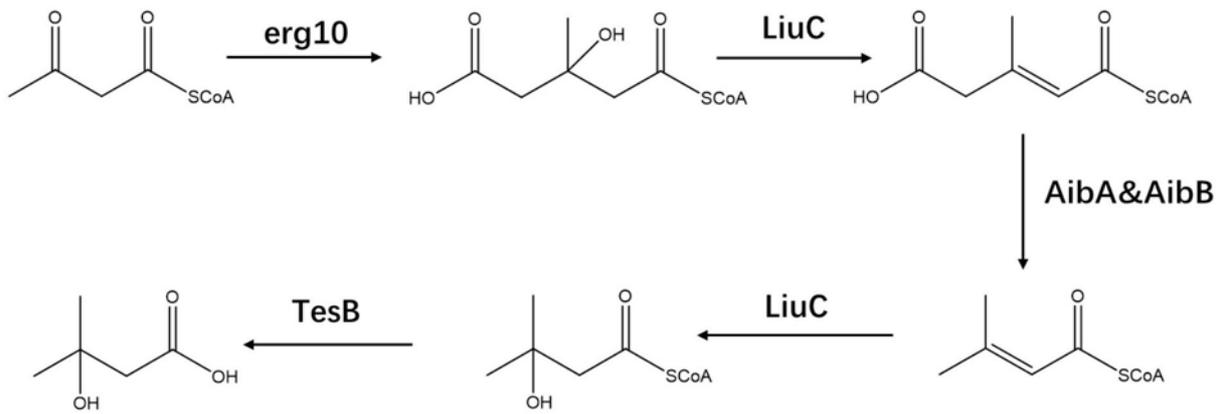


图2

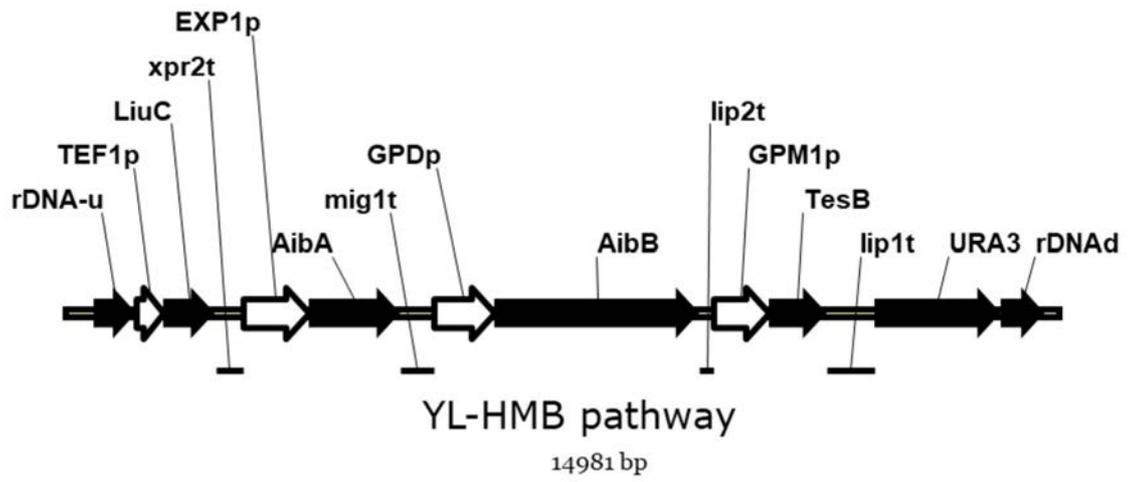


图3

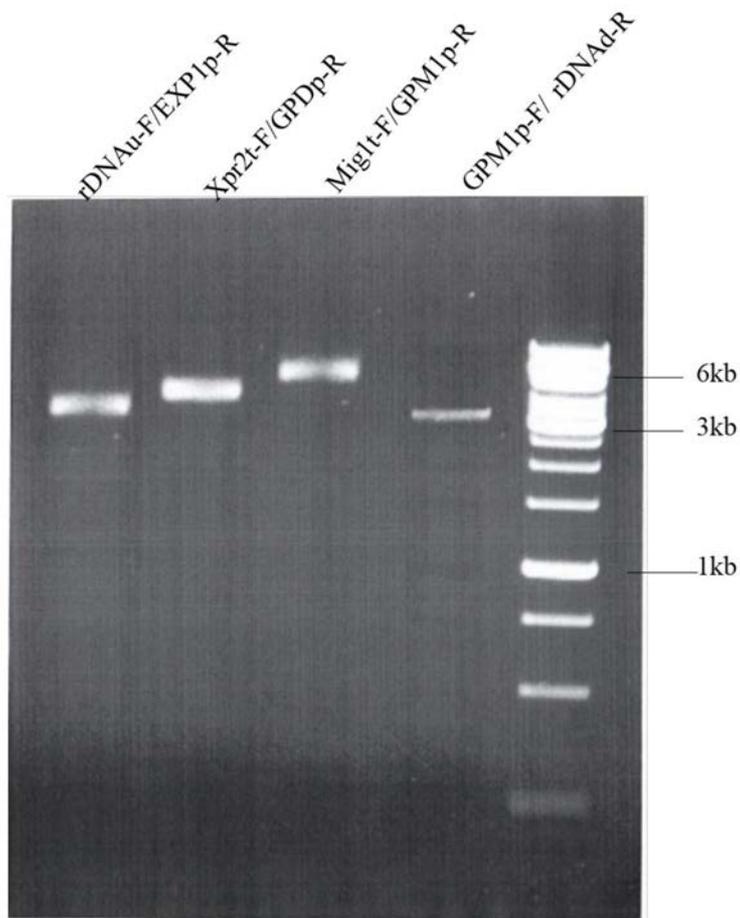


图4