



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112662606 A

(43) 申请公布日 2021.04.16

(21) 申请号 202110013298.X

A61P 3/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.01.06

C12R 1/19 (2006.01)

(71) 申请人 中国科学院分子植物科学卓越创新中心

地址 200032 上海市徐汇区枫林路300号

申请人 华东师范大学

(72) 发明人 杨晟 孙兵兵 李大力 尹树明

(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.

G12N 1/21 (2006.01)

G12N 15/70 (2006.01)

A61K 35/741 (2015.01)

A61K 38/51 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书17页

序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

用于治疗苯丙酮尿症的工程益生菌

(57) 摘要

本发明公开了一种用于治疗苯丙酮尿症的工程益生菌及其制备方法,其为大肠杆菌Nissle 1917衍生菌,在基因组上整合了外源L-苯丙氨酸解氨酶基因、L-苯丙氨酸内运蛋白基因和L-氨基酸脱氨酶基因。本发明的工程益生菌能够用于制备苯丙酮尿症治疗药物。

1. 一种用于治疗苯丙酮尿症的工程益生菌, 其为大肠杆菌Nissle 1917衍生菌, 在基因组上整合了外源L-苯丙氨酸解氨酶基因、L-苯丙氨酸内运蛋白基因和L-氨基酸脱氨酶基因。

2. 如权利要求1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是st1A (SEQ ID NO:1); 所述L-苯丙氨酸内运蛋白基因是pheP (SEQ ID NO:2); 所述L-氨基酸脱氨酶基因是pma (SEQ ID NO:3)。

3. 如权利要求1所述的工程益生菌, 其特征在于, 所述大肠杆菌Nissle 1917衍生菌的基因组中敲除二氢吡啶二羧酸合酶基因dapA。

4. 如权利要求3所述的工程益生菌, 其特征在于, 其基因型为Nissle 1917 (yicS::pfnrS-st1A, malPT::pfnrS-st1A, malE::pfnrS-st1A, lacZ::pfnrS-pheP, agaI::pfnrS-pheP, exo::ptac-st1A, rhtCB::ptac-st1A, araBD::para-pma, Δ dapA)。

5. 一种构建如权利要求1-4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. 以大肠杆菌Nissle 1917为底盘菌, 分别在基因组的yicS位点、malPT位点、malE位点、exo位点和rhtCB位点中的一个以上位点敲入L-苯丙氨酸解氨酶基因, 获得st1A整合菌株;

B. 对于步骤A中获得的st1A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, 得到st1A+pheP+pma整合菌株。

6. 如权利要求5所述的方法, 其特征在于, 还包括以下步骤:

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。

7. 如权利要求4或5所述的方法, 其特征在于, 基因st1A、pheP、pma的敲入和基因dapA的敲除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。

8. 如权利要求1-3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。

9. 如权利要求8所述的应用, 其特征在于, 所述苯丙酮尿症是苯丙氨酸羟化酶基因突变Pah^{R408W}引起的。

10. 如权利要求8所述的应用, 其特征在于, 所述药物是口服制剂。

用于治疗苯丙酮尿症的工程益生菌

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域和医药领域,具体地说,涉及一种用于治疗苯丙酮尿症的工程益生菌、其制备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)是一种先天性的苯丙氨酸代谢障碍疾病。在中国,PKU在新生儿中的发病率大概在1/11000,PKU患儿出生若不及时诊治,将会出现高苯丙酸血症,严重影响患儿的智力发育,引起癫痫和运动障碍等症状,并伴随黑色素合成障碍。

[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。PAH主要是在肝脏中表达,可将苯丙氨酸转化为酪氨酸,从而合成甲状腺、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] 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患儿不能完全不摄入苯丙氨酸,所以目前对PKU患儿的唯一治疗方法就是采取低苯丙氨酸饮食的食物限制策略,但是这种策略对于青少年的发育和孕妇具有极大的副作用,而且由于该类食品口感差,病人依从性差。另外,目前也有一些针对PKU治疗的策略尚在实验阶段,例如,通过体外重组表达具有苯丙氨酸降解能力的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, st1A),通过口服蛋白降低血液中苯丙氨酸,但缺点是直接口服蛋白易被肠道内的消化酶分解。科学家也在尝试基因疗法,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和疗效不长久的的问题。

[0005] 目前,国际上使用较多的苯丙酮尿症动物模型主要是上世纪90年代初由国外实验室通过化学诱变得到的Pah^{enu1}和Pah^{enu2}两种疾病模型,这两种疾病模型虽然能够模拟苯丙酮尿症的疾病表型,但是这两种动物模型的突变型并不能代表绝大多数的病人,因此并不具有临床代表性。从苯丙酮尿症突变型数据库中,可以发现目前临床上最具代表性的突变型为PAH^{R408W},该突变型患病人数占21.4%,是目前患者携带人数最多的突变型。因此,使用Pah^{R408W}突变的PKU小鼠模型能够更好地模拟临床病人的疾病表征,并且该Pah^{R408W}的小鼠模型在PKU治疗的研究领域中也有相关报道。

发明内容

[0006] 益生菌是一大类药物,主要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,口感一般较好,病人乐于接受,顺从性高,更重要的是能够持续地在肠道内增殖从而稳定地发挥治疗作用。

[0007] 大肠杆菌属Nissle 1917(简称EcN)是一种非致病性大肠杆菌,是1917年从一次志

贺菌痢大爆发时未出现腹泻的士兵的粪便中分离得到的。EcN是非乳酸益生菌中研究最多的益生菌,血清型为O6:K5:H1,具有独特的基因组、半粗糙O6-脂多糖(LPS)表型、K5型荚膜、3种不同的菌毛(F1A、F1C和卷曲菌毛)。EcN具有小菌素和铁摄取系统等特殊适应性因子,在与其他微生物竞争中起关键作用。EcN能长期稳定定植于肠道,与肠上皮细胞相互作用,被广泛用于预防传染性腹泻、炎性肠疾病如溃疡性结肠炎和克罗恩病,防止新生儿消化道内病原菌定殖等,和发挥免疫调节生物学功能。

[0008] 为了寻求新的苯丙酮尿症治疗药物,发明人利用基因工程技术来改造大肠杆菌Nissle1917(EcN),使其能够降解苯丙氨酸,构建出了一株经动物实验证明具有降解苯丙氨酸效应、因此有潜力用于治疗苯丙酮尿症的工程益生菌。具体而言,本发明包括如下技术方案:

[0009] 一种用于治疗苯丙酮尿症的工程益生菌,其为大肠杆菌Nissle 1917衍生菌,在基因组上整合了外源L-苯丙氨酸解氨酶基因比如st1A、L-苯丙氨酸内运蛋白基因pheP和L-氨基酸脱氨酶基因比如pma。

[0010] 优选地,所述L-苯丙氨酸解氨酶(Genbank号KGM29850.1)基因是st1A,核苷酸序列为SEQ ID NO:1;

[0011] 所述L-苯丙氨酸内运蛋白(Genbank号QPA14453.1)基因是pheP,核苷酸序列为SEQ ID NO:2;

[0012] 所述L-氨基酸脱氨酶(Genbank号AAA86752.1)基因是pma,核苷酸序列为SEQ ID NO:3。

[0013] 进一步地,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。

[0014] 在一种实施方式中,上述工程益生菌的基因型为Nissle 1917(yicS::pfnrs-st1A,malPT::pfnrs-st1A,malE::pfnrs-st1A,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-st1A,rhtCB::ptac-st1A,araBD::para-pma, Δ dapA),或者表示为EcN(yicS::pfnrs-st1A,malPT::pfnrs-st1A,malE::pfnrs-st1A,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-st1A,rhtCB::ptac-st1A,araBD::para-pma, Δ dapA),本文中命名为CIBT4564。

[0015] 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,包括以下步骤:

[0016] A.以大肠杆菌Nissle 1917为底盘菌,分别在基因组的yicS位点、malPT位点、malE位点、exo位点和rhtCB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比如st1A优选SEQ ID NO:1,获得st1A整合菌株;

[0017] B.对于步骤A中获得的st1A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比如SEQ ID NO:2,得到st1A+pheP整合菌株;

[0018] 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-氨基酸脱氨酶基因比如pma优选SEQ ID NO:3,得到st1A+pheP+pma整合菌株。

[0019] 优选地,上述方法还可以包括以下步骤:

[0020] 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stlA+pheP+pma Δ dapA菌株或称stlA+pheP+pma整合 Δ dapA菌株。

[0021] 在一种优选的实施方式中,上述基因stlA、pheP、pma的敲入和基因dapA的敲除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。

[0022] 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。

[0023] 上述苯丙酮尿症可以是苯丙氨酸羟化酶基因(Pah)突变比如Pah^{R408W}突变引起的。

[0024] 该药物中,所述工程益生菌可降解苯丙氨酸。

[0025] 在一种实施方式中,上述药物是口服制剂,通过口服给药。

[0026] 本发明构建的工程益生菌能够有效地降解苯丙氨酸,动物实验证明,该工程菌可有效降解苯丙酮尿症小鼠(Pah^{R408W})的体内苯丙氨酸,显示出良好的应用前景。

附图说明

[0027] 图1是原始菌株EcN和工程益生菌CIBT4564体外降解苯丙氨酸生成反式肉桂酸的实验结果柱形图。

[0028] 图2苯丙酮尿症小鼠口服生理盐水(saline)、原始菌株EcN和工程益生菌CIBT4564后血液中苯丙氨酸浓度的检测结果柱形图。

具体实施方式

[0029] 本发明的工程益生菌是通过对大肠杆菌Nissle 1917进行基因工程改造而产生的基因工程衍生菌,通过对原始大肠杆菌Nissle 1917的基因组进行改造,使得衍生菌株能够有效降解苯丙氨酸,从而达到治疗苯丙酮尿症的效果。

[0030] 为简要起见,本文中有时将“用于治疗苯丙酮尿症的工程益生菌”简称为“工程益生菌”、“重组益生菌”、“(基因)工程菌”、“益生菌”或者CIBT4564,它们表示相同的意义,可以互换使用。

[0031] 本文中,基因的“敲入”与“插入”表示同一概念,这是本领域技术人员容易理解的。

[0032] 在本文中,为了描述简便,有时会将某种蛋白比如苯丙氨酸羟化酶(PAH)与其编码基因Pah名称混用,本领域技术人员应能理解它们在不同描述场合表示不同的物质。本领域技术人员根据语境和上下文容易理解它们的含义。

[0033] 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(stlA)和增强了大肠杆菌MG1655来源苯丙氨酸特异转运体(pheP),可有效提高胞内苯丙氨酸的运输,并将转化为反式肉桂酸;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(pma),可将苯丙氨酸降解为苯丙酮酸。

[0034] 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和步骤D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。同样地,同一个基因比如stlA的多次敲入的不同位点的排序可以交叉、颠倒地操作。

[0035] 为了考察工程菌降解苯丙氨酸的效果,通过微生物体外催化化学反应、并且在

Pah^{R408W}突变的PKU小鼠模型中口服工程菌,验证了本发明所构建的工程益生菌CIBT4564能够在体外、体内均能有效降解苯丙氨酸,有望应用于治疗苯丙酮尿症。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 实施例

[0039] 材料和方法

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 主要培养基:

[0043] 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。)

[0044] 原始大肠杆菌Nissle 1917、pTargetF质粒(Addgene:62226)、pCas质粒(Addgene:62225)和pMDIAI质粒(addgene:51655)由中国科学院分子植物科学卓越创新中心杨晟课题组保存,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,但未经中国科学院分子植物科学卓越创新中心允许不得用作其他用途,包括开发利用、科学研究和教学。

[0045] 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.)。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。

[0046] 以下实施例中使用的引物序列信息如表1所示。

[0047] 表1、实施例中使用的引物列表

引物名称	引物序列(5'→3')
N20-yicS-F	TCCTAGGTATAATACTAGTGATATCAGGTAAAGAAGCGTGTTTTAGAGCT

[0049]

	AGAAATAGC
pTargetF-R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAG
yicS-L-F	TTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCTCGCAACCTGCC AGCAGAAC
yicS-L-R	CATGCTCGAGCCATGGGACGTATCGATGCATGCGTCGACGTCAGTGGTTG TTGCCGTTT
yicS-R-F	ACTTATACAGCGCATTTAAGGTACCCTGCAGACTAGTCAACGCTTCTTTAC CTGATATC
yicS-R-R	GAACTCGAGTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTTGAACCTTCGC ATCAGAAAC
yicS-MG1655-F1	GAGCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAATGAAAGGCT CAGTCGAAAAG
yicS-MG1655-R	GTGTAATGCTGCAATCTGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCACGCAAAAAGG CCATCCGTC
yicS-MG1655-F2	ACTGACGTCGACGCATGCATCGATACGTCCATGGCTCGAGCATGCGAGA GTAGGGAAC
pfns-stlA(yicS)-F	GAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTGGCCAGTGCCAAGCTTGC
pfns-stlA(yicS)-R	AAGAAATCCTGATATCAGGTAAAGAAGCGTTGACTAGTCTGCAGGGTACC
yicS-seq-F	TCAAGAAAGGGTCGATGCTGG
stlA-seq-R	AATCATCCTGGTCAAAAACG
N20-malP-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTAAATCTATTAAGAATGAGAGTTTTAGAGCTA GAAATAGC
malP-L-F	TTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCGACGTCCCAGAC CACCGTTC
malP-L-R	GGCAGTTCCTACTCTCGCATGCTCGAGCCATGGGACGTCCTTAATTTATA GAGTTACC
malP-R-F	GAAATCATGCTGGAAGAATAAGTCGACGCATGCATCGGATGGCACTTCA TCAGAAATG
malP-R-R	GAACTCGAGTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTAAGCTGGGCG AAGAGTGACG
pfns-stlA(malP)-F	GCGTATTTTCAAAAAGCGGAAGGTAAGTCTATAAATTAAGGACGTCCCAT GGCTCGAGC
pfns-stlA(malP)-R	CATTTCTGATGAAAGTGCCATCCGATGCATGCGTCGACTTATTCTTCCAGC ATGATTTT
malP-seq-F	TAATGGTAAACTCCGGCTCC
malE-Apr-F	CATCACGAAATTCCTTACATGACCTCGGTTTAGTTCACAGGTTCCCGGCGA

[0050]

	TCCTCTGG
malE-Apr-R	TTTTTATGGGGGAGGAGGCGGGAGGATGAGAACCGGCTTGCATGACGG CAAGTGGACG
malE-L-F1	GTAACGTACGGCATCCCAGG
malE-L-R1	CTGTGAACTAAACCGAGGTC
malE-R-F1	AAGCCGCGTTCTCATCCTC
malE-R-R1	GCAGCATCGAGGTTGGAGAG
N20-Apr-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTGGCGAAAAGCCGAGCTCATGTTTTAGAGCT AGAAATAGC
malE-L-F	CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCGTAACGTACGG CATCCCAG
malE-L-R	TGGCAGTTCCTACTCTCGCATGCTCGAGCCATGGGACGTCCTGTGAACTA AACCGAGG
malE-R-F	GAAATCATGCTGGAAGAATAAGTCGACGCATGCATCGATAAGCCGCGTTC TCATCCTCC
malE-R-R	ATGAACTCGAGTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTGCAGCATCG AGGTTGGAG
malE-seq-F	AGTGATAACGCTTCGACAGC
N20-lacZ-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCGTTTTAGAGCT AGAAATAGC
lacZ-L-F(phep)	TTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCTACGGGGTATAC ATGTCTG
lacZ-L-R(phep)	CCGGGGCCATCGATGCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGACTCTGGCT AACGGTACG
lacZ-R-F(phep)	TAAGGAGGATATTCATATGGACCATGGCTAATTCCTTGCCGTTTTATCAT ATTTAATC
lacZ-R-R(phep)	GAACTCGAGTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTTGGTCTGCTGC TGCTGAACG
pfns-phep(lacZ)-F	ACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGCATCGATGGCCCCGGTACCAGTTGTT CTTATTGG
pfns-phep(lacZ)-R	GACGCAGTATCTCCGATACGGTTGACGCGTTTTTCATATGTATATCTCCT TCTTAAAG
pfns-phep(lacZ)-F2	ACGCTGCGTCGGAAATAACCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGA GTAGGGAAC
pfns-phep(lacZ)-R2	TGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAAGGAATTAGCCATG GTCCATATG

[0051]

pfirs-phep(lacZ)-F1	CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAC GCGTCAACC
pfirs-phep(lacZ)-R1	TCTCGCATGGGGAGACCCACACTACCATCGGTTATTTCCGACGCAGCGTT TTAAATGC
lacZ-seq-F	CAATCCCCATATGGAAACCG
phep-seq-R	TTACATCGGTTCACTGGTGG
Apr-F	TTCCCGGCGATCCTCTGG
Apr-R	GCATGACGGCAAGTGGACG
agaI-L-F	AAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCGCCATTACTGACGTA TCATTATC
Apr-agaI-L-R	GATAACAGGGTAATATAATCTCCAGAGGATCGCCGGGAACGCTACAACGC CTTTACCTG
Apr-agaI-R-F	TTACCCTGTTATCCCTAATAATCGTCCACTTGCCGTCATGCTGCGACGCCT GTAATCAC
agaI-R-R	GAACTCGAGTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTATTGCGCTGGT TTCCGATGC
agaI-L-R	CGCATGCTCGAGCCATGGGACGTCATCGATGCATGCGTCGACGCTACAAC GCCTTTACC
agaI-R-F	AGCCCGCACTGTCAGGTGCGGGCTTTTTTCTGTGTTTCCTGCGACGCCTGT AATCACTC
pfirs-phep(agaI)-F	CGCCAGGTAAAGGCGTTGTAGCGTCGACGCATGCATCGATGACGTCCCAT GGCTCGAGC
pfirs-phep(agaI)-R	GCAGGAATAGCACTAGTCTGCAGGGTACCTTATTATTTCCGACGCAGCGT TTTAAATGC
pfirs-phep(agaI)-R1	GCCCGCACCTGACAGTGCGGGCTTTTTTTTTCGACCAAAGGGCAGGAATA GCACTAGTC
pfirs-phep(agaI)-R2	AGGGAGAGTGATTACAGGCGTCGCAGGAAACACAGAAAAAAGCCCGCAC CTGACAGTGC
agaI-seq-F	CATCCGGTGCTGTTAATCG
N20-exo-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTTTATTGATATATTACGTCGTTTTAGAGCTA GAAATAGC
exo-L-F	CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCGCTTCCAGAGG AAGCTTTG
exo-L-R	CGCATGCTCGAGCCATGGGACGTCATGATGATGCGTCGACTGGATAACGT AAATGATTG
exo-R-F	CACCTACCAACAACCTTAGGCGTAAACCTCGTTGCCACCTAATAGCAATCC

[0052]

	CCCAGATAC
exo-R-R	ATGAACTCGAGTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTTGTCCGGCT CAGTTAACC
ptac-stlA(exo)-F	TACCGCAATCATTACGTTATCCAGTCGACGCATCATCATGACGTCCCATG GCTCGAGC
ptac-stlA(exo)-R	TAAGAACAACCTGGTACCAGCTAGCCCTGCAGGGTGCACGCCATGGTCCAT ATGAATATC
ptac-stlA(exo)-R6	TGTCAGAGGAACAACCTGGTACCTGGGAATTAGACCACCAATAAGAACAA CTGGTACCAG
ptac-stlA(exo)-R7	GTTGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGAACAAC TGG
ptac-stlA(exo)-F1	GCTCGAAAGCGTCTCTTTTCTGGAATTTGGTACCGAGCATTTCACTGCCCG CTTTCCAG
ptac-stlA(exo)-R1	AGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCAGTCTCACTGGTGAAA AGAAAAACC
ptac-stlA(exo)-F2	TCTTTTCACCAGTGAGACTGGCAACAGCTGATTGCCCTTC
ptac-stlA(exo)-R2	TCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGATAGCTCATGTTATATCCCG CCGTAAACC
ptac-stlA(exo)-F3	GCGGGATATAACATGAGCTATCTTCGGTATCGTCGTATCC
ptac-stlA(exo)-R3	CCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAGGACGGTACGCGAC TGGGCGTGG
ptac-stlA(exo)-F4	GCCCAGTCGCGTACCGTCTCATGGGAGAAAATAACTG
ptac-stlA(exo)-R4	ATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATATGAAACCAGTA ACGTTATACG
ptac-stlA(exo)-F5	GGGGGCTTTTTATTGCGCGGACCAAAACGAAAAAAGACGCTCGAAAGCG TCTCTTTTC
ptac-stlA(exo)-R5	CGCCATCGAATGGCGCAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGG AAGAGAGTC
ptac-stlA(exo)-F6	CCCGGTGAACGCATGAGAAAGCCCCCGGAAGATCACCTTCCGGGGGCTTT TTTATTGCG
ptac-stlA(exo)-F7	CAACAAGACCTGACCTAACGGTAAGAACGATTGGTAAACCCGGTGAACG CATGAGAAAAG
ptac-stlA(exo)-F8	CCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCACAAGACC TGACCTAAC
ptac-stlA(exo)-R8	TCAGAACAAGAAAGCTATGTGGCCTGACGAAGCGGCGGCCATCGAATG GCGCAAAACC

[0053]

ptac-stlA(exo)-F9	CTCTACAAATAATTTTGTTTAAAAACAACACCCACTAAGATAACTCTAGAA ATAATTTTG
ptac-stlA(exo)-R9	TGTCGACCGTATTGAGTTATTTTGTACACCAGACCAACTTATTCTTCCAGC ATGATTTC
ptac-stlA(exo)-F10	GATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAA ATAATTTTG
ptac-stlA(exo)-R10	AAAAATTAAAGGGGAGATAAAAATCCCCCTTTTTGGTTAACTGTCGACCG TATTGAGTT
ptac-stlA(exo)-F11	TAATGTGTGGAATTGTGAGCGCTCACAAATTAGCTGTCACCGGATGTGCTTT CCGGTCTG
ptac-stlA(exo)-R11	GCGGGCTTTTTTTTCGACCAAAGGGGGAGACAGGAAAAATTAAAGGGGA GATAAAATC
ptac-stlA(exo)-F12	ACGATCGTTGGCTGTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGA ATTGTGAG
ptac-stlA(exo)-R12	ACTTCAAGGGAAACACAGAAAAAGCCCGCACCTGACAGTGCGGGCTTTT TTTTTCGAC
ptac-stlA(exo)-F13	GCTTCGTCAGGCCACATAGCTTTCCTGTTCTGATCGGAACGATCGTTGGCT GTGTTGAC
exo-seq-F	ATGACCTCCTGCTCTGCAC
N20-rhtC-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTCATCAGAGTAAGTCGGATAGTTTTAGAGCTA GAAATAGC
rhtC-L-F	CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCGCACATTGTGG CGCTTATG
rhtC-L-R	CGCATGCTCGAGCCATGGGACGTATCGATGCATGCGTCGACATCCGACTT ACTCTGATG
rhtC-R-F	CCTACCAACAACCTTAGGCGTAAACCTCGTTGCCACCTAGCATCCGACATT ATTTTCACG
rhtC-R-R	ATGAACTCGAGTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTAATGGTGGT TTGCCTACC
ptac-stlA(rhtC)-F	CGCGTCATCAGAGTAAGTCGGATGTCGACGCATGCATCGATACGTCCCAT GGCTCGAGC
ptac-stlA(rhtC)-R	AGCATCGGCGAGGCATGCGTGAAAATAATGTCGGATGCTAGGTGGCAAC GAGGTTTACG
rhtC-seq-F	GAAATGCTCAGCGTTAACG
N20-araBD-F	TCCTAGGTATAATACTAGTCAGTGATTCTGTGCGAGCTTGTTTTAGAGCTA GAAATAGC

[0054]

araBD-L-F	CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCGTAAACCCACT GGTGATAC
araBD-L-R	TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGTATGGAGAAA CAGTAGAG
araBD-R-F	AGGATATTCATATGGTTGAGTCATCCGCAGAAGAGACGAGGTATTAGAAG CCAACCTGG
araBD-R-R	GAACTCGAGTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTGGTAACTGCGG CGCTAACTG
para-pma(araBD)-F	CGCTTTTTTCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCTCTAGAAATAATTTT GTTTAAAC
para-pma(araBD)-R	AGGTTGTGTTTTGGCAGCGCCAGGTTGGCTTCTAATACCTCGTCTCTTCTG CGGATGAC
araBD-seq-F	CTCGTTAATCGCTTCCATGC
pma-seq-R	AGATATACATTGAGCGTTGG
N20-dapA-F	TCCTAGGTATAATACTAGTAGATCGCAGCCAGTACGGGAGTTTTAGAGCT AGAAATAGC
dapA-L-F	CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAATTCACCAGCAATG AAGCGGTATC
dapA-L-R	CATTGAGACACTTGTGTTGCACAGTCATGGGGTTATTTCCGTTAC
dapA-R-F	GTAACGGAAATAACCCCATGACTGTGCAAACAAGTGTCTCAATG
dapA-R-R	GAACTCGAGTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTGGGCTTTGAAC GCTTGCTC
dapA-seq-F	ACATGCATACAACAATCAGAACG
dapA-seq-R	GTACCCAATCGGTGGTCAGTG

[0055] 实施例1工程益生菌CIBT4564构建

[0056] 对菌株E.coli Nissle 1917基因组进行改造,包括如下步骤:

[0057] 1.1在菌株E.coli Nissle 1917基因组上yicS位点敲入苯丙氨酸解氨酶st1A

[0058] (1) pTargetN20-pfnrs-st1A(yicS)质粒构建

[0059] 以pTargetF(Addgene:62226)质粒为模板,N20-yicS-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增获得N20-yicS片段约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,获得pTargetN20-yicS质粒。

[0060] 以大肠杆菌Nissle 1917(EcN)基因组为模板,分别以yicS-L-F/yicS-L-R和yicS-R-F/yicS-R-R为引物,PCR扩增分别获得上游同源臂yicS-L和下游同源臂yicS-R,分别约610bp。

[0061] 以大肠杆菌MG1655基因组为模板,yicS-MG1655-F1/yicS-MG1655-R为引物,PCR扩增yicS-MG1655-1片段,约260bp;以yicS-MG1655-1片段为模板,yicS-MG1655-F2/yicS-MG1655-R为引物,PCR扩增yicS-MG1655片段,约300bp。

[0062] 以pUC-pfnrs-st1A质粒为模板(由金斯瑞合成),pfnrs-st1A(yicS)-F/pfnrs-st1A(yicS)-R为引物,PCR扩增pfnrs-st1A(yicS)片段,约2.2kb。

[0063] yicS-L,yicS-MG1655,pfnrs-st1A(yicS)和yicS-R片段利用DNA assembly方法(试剂盒DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetN20-yicS质粒的EcoRI/HindIII位

点,连接产物转化入DH5 α 化学感受态细胞,复苏液涂布于含壮观霉素(终浓度50 μ g/mL) LB固体平板,获得含pTargetN20-pfnrs-stlA(yicS) 质粒转化子。

[0064] (2) 将pCas (addgene:62225) 质粒转化至EcN化学感受态细胞中,30 $^{\circ}$ C条件下在含卡那霉素(终浓度50 μ g/mL)的LB固体平板上进行筛选(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))。

[0065] (3) 挑取EcN/pCas阳性转化子,制备电转感受态细胞,在离心收集菌体前1小时加入终浓度为10mM的阿拉伯糖诱导RED重组酶表达。

[0066] (4) 电转化转入pTargetN20-pfnrs-stlA(yicS) 辅助质粒(电转电压为2.5kV),30 $^{\circ}$ C、220rpm条件下复苏1小时,菌液涂布于含卡那霉素(50 μ g/mL)和壮观霉素(50 μ g/mL)双抗LB固体平板,30 $^{\circ}$ C过夜培养后对克隆子利用yicS-seq-F/stlA-seq-R进行菌落PCR验证(电转化感受态细胞制备方法参考《分子克隆实验指南》(第三版))。

[0067] (5) 辅助质粒消除:挑取阳性克隆子于LB液体(含卡那霉素50 μ g/mL),加入1mM IPTG,培养过夜,划线分单菌,并在含壮观霉素(50 μ g/mL) LB固体平板上验证辅助质粒的消除,获得EcN(yicS::pfnrs-stlA)/pCas。

[0068] 1.2malPT位点敲入苯丙氨酸解氨酶stlA

[0069] (1) pTargetN20-pfnrs-stlA(malPT) 质粒构建

[0070] 以pTargetF质粒为模板,N20-malP-F/pTagetF-R为引物,PCR扩增获得N20-malPT片段约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,获得pTargetN20-malPT质粒。

[0071] 以EcN基因组为模板,分别以malP-L-F/malP-L-R和malP-R-F/malP-R-R为引物,PCR扩增分别获得上游同源臂malPT-L和下游同源臂malPT-R,分别约610bp。

[0072] 以pTargetN20-pfnrs-stlA(yicS) 质粒为模板,pfnrs-stlA(malP)-F/pfnrs-stlA(malP)-R为引物,PCR扩增pfnrs-stlA(malP)片段,约2.3kb。

[0073] malPT-L、pfnrs-stlA(malP)和malPT-R片段利用DNA assembly方法(试剂盒DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetN20-malPT质粒的EcoRI/HindIII位点,连接产物转化入DH5 α 化学感受态细胞,复苏液涂布于含壮观霉素(终浓度50 μ g/mL) LB固体平板,获得含pTargetN20-pfnrs-stlA(malPT) 质粒转化子。

[0074] (2) 参考1.1(3)方法制备EcN(yicS::pfnrs-stlA)/pCas电转感受态细胞。

[0075] (3) 参考1.1(4)方法将pTargetN20-pfnrs-stlA(malPT) 质粒电转入EcN(yicS::pfnrs-stlA)/pCas感受态细胞,转化子利用malP-seq-F/stlA-seq-R进行菌落PCR验证。

[0076] (4) 参考1.1(5)方法将辅助质粒消除,获得EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA)/pCas。

[0077] 1.3malE位点敲入苯丙氨酸解氨酶stlA

[0078] (1) malE位点敲入安普霉素抗性盒

[0079] 以pMDIAI质粒(addgene:51655)为模板,malE-Apr-F/malE-Apr-R为引物,PCR扩增Apr(malE)片段,约1.4kb。以EcN基因组为模板,分别以malE-L-F1/malE-L-R1和malE-R-F1/malE-R-R1为引物,分别PCR扩增malE-L1和malE-R1片段,分别约600bp。以malE-L1/Apr(malE)/malE-R1片段为模板,malE-L1/malE-R1为引物,overlap PCR扩增malE-Apr片段,约2.7kb。

[0080] 参考1.1(3)方法制备EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA)/pCas电转感

受态细胞,并参考1.1(4)方法将malE-Apr片段电转入EcN(yicS::pfnrS-stlA,malPT::pfnrS-stlA)/pCas感受态细胞,获得EcN(yicS::pfnrS-stlA,malPT::pfnrS-stlA,malE::Apr)/pCas。

[0081] (2) pTargetN20-pfnrS-stlA(malE)质粒构建

[0082] 以pTargetF质粒为模板,N20-Apr-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增获得N20-Apr片段约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,获得pTargetN20-Apr质粒。

[0083] 以EcN基因组为模板,分别以malE-L-F/malE-L-R和malE-R-F/malE-R-R为引物,PCR扩增分别获得上游同源臂malE-L和下游同源臂malE-R,分别约600bp和630bp。

[0084] 以pTargetN20-pfnrS-stlA(malPT)质粒为模板,pfnrS-stlA(malE)-F/pfnrS-stlA(malE)-R为引物,PCR扩增pfnrS-stlA(malE)片段,约2.2kb。

[0085] malE-L,pfnrS-stlA(malE)和malE-R片段利用DNA assembly方法(试剂盒DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetN20-Apr质粒的EcoRI/HindIII位点,连接产物转化入DH5 α 化学感受态细胞,复苏液涂布于含壮观霉素(终浓度50 μ g/mL)LB固体平板,获得含pTargetN20-pfnrS-stlA(malE)质粒转化子。

[0086] (3) 参考1.1(3)方法制备EcN(yicS::pfnrS-stlA,malPT::pfnrS-stlA,malE::Apr)/pCas电转感受态细胞。

[0087] (4) 参考1.1(4)方法将pTargetN20-pfnrS-stlA(malE)质粒电转入EcN(yicS::pfnrS-stlA,malPT::pfnrS-stlA,malE::Apr)/pCas感受态细胞,转化子利用malE-seq-F/stlA-seq-R进行菌落PCR验证。

[0088] (5) 参考1.1(5)方法将辅助质粒消除,获得EcN(yicS::pfnrS-stlA,malPT::pfnrS-stlA,malE::pfnrS-stlA)/pCas。

[0089] 1.4lacZ位点敲入L-苯丙氨酸内运蛋白pheP

[0090] (1) pTargetN20-pfnrS-pheP(lacZ)质粒构建

[0091] 以pTargetF质粒为模板,N20-lacZ-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增获得N20-lacZ片段约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,获得pTargetN20-lacZ质粒。

[0092] 以EcN基因组为模板,lacZ-L-F(phep)/lacZ-L-R(phep)和lacZ-R-F(phep)/lacZ-R-R(phep)分别为引物,PCR扩增分别获得上游同源臂lacZ-L和下游同源臂lacZ-R,分别约710bp和730bp。

[0093] 以pTargetN20-pfnrS-stlA(yicS)质粒为模板,分别以pfnrS-phep(lacZ)-F/pfnrS-phep(lacZ)-R、pfnrS-phep(lacZ)-F2/pfnrS-phep(lacZ)-R2为引物,PCR扩增pfnrS-phep(lacZ)-1和pfnrS-phep(lacZ)-2片段,分别约300bp和470bp。以大肠杆菌MG1655基因为模板,pfnrS-phep(lacZ)-F1/pfnrS-phep(lacZ)-R1为引物,PCR扩增pfnrS-phep片段,约1.4kb。

[0094] lacZ-L、pfnrS-phep(lacZ)-1、pfnrS-phep、pfnrS-phep(lacZ)-2和lacZ-R片段利用DNA assembly方法(试剂盒DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetN20-lacZ质粒的EcoRI/HindIII位点,连接产物转化入DH5 α 化学感受态细胞,复苏液涂布于含壮观霉素(终浓度50 μ g/mL)LB固体平板,获得含pTargetN20-pfnrS-pheP(lacZ)质粒转化子。

[0095] (2) 参考1.1(3)方法制备EcN(yicS::pfnrS-stlA,malPT::pfnrS-stlA,malE::pfnrS-stlA)/pCas电转感受态细胞。

[0096] (3) 参考1.1 (4) 方法将pTargetN20-pfnrs-pheP (lacZ) 质粒电转入EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA)/pCas感受态细胞,转化子利用lacZ-seq-F/phep-seq-R进行菌落PCR验证。

[0097] (4) 参考1.1 (5) 方法将辅助质粒消除,获得EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP)/pCas。

[0098] 1.5agaI位点敲入L-苯丙氨酸内运蛋白pheP

[0099] (1) agaI位点敲入安普霉素抗性盒

[0100] 以pMDIAI质粒(addgene:51655)为模板,Apr-F/Apr-R为引物,PCR扩增Apr片段,约1.4kb。以EcN基因组为模板,分别以agaI-L-F/Apr-agaI-L-R和Apr-agaI-R-F/agaI-R-R为引物,分别PCR扩增Apr-agaI-L和Apr-agaI-R片段,分别约600bp。以Apr-agaI-L/Apr/Apr-agaI-R片段为模板,agaI-L-F/agaI-R-R为引物,overlap PCR扩增获得agaI-Apr片段,约2.7kb。

[0101] 参考1.1 (3) 方法制备EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP)/pCas转感受态细胞,并参考1.1 (4) 方法将agaI-Apr片段电转入EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP)/pCas感受态细胞,获得EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::Apr)/pCas。

[0102] (2) pTargetN20-pfnrs-phep(agaI) 质粒构建

[0103] 以EcN基因组为模板,agaI-L-F/agaI-L-R和agaI-R-F/agaI-R-R分别为引物,PCR扩增分别获得上游同源臂agaI-L和下游同源臂agaI-R,分别约620bp。

[0104] 以pTargetN20-pfnrs-stlA(malE) 质粒为模板,pfnrs-phep(agaI)-F/pfnrs-phep(lacZ)-R为引物,PCR扩增pfnrs(agaI) 片段,约600bp。

[0105] 以pTargetN20-pfnrs-pheP(lacZ) 质粒为模板,pfnrs-phep(lacZ)-F1/pfnrs-phep(agaI)-R为引物,PCR扩增phep(agaI)-1片段,约1.4kb;以phep(agaI)-1片段为模板,pfnrs-phep(lacZ)-F1/pfnrs-phep(agaI)-R1为引物,PCR扩增phep(agaI)-2片段,约1.4kb;以phep(agaI)-2片段为模板,pfnrs-phep(lacZ)-F1/pfnrs-phep(agaI)-R2为引物,PCR扩增phep(agaI) 片段,约1.5kb。

[0106] agaI-L、pfnrs(agaI)、phep(agaI) 和agaI-R片段利用DNA assembly方法(试剂盒DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetN20-Apr质粒的EcoRI/HindIII位点,连接产物转化入DH5 α 化学感受态细胞,复苏液涂布于含壮观霉素(终浓度50 μ g/mL)LB固体平板,获得含pTargetN20-pfnrs-phep(agaI) 质粒转化子。

[0107] (3) 参考1.1 (3) 方法制备EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::Apr)/pCas电转感受态细胞。

[0108] (4) 参考1.1 (4) 方法将pTargetN20-pfnrs-phep(agaI) 质粒电转入EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::Apr)/pCas感受态细胞,转化子利用agaI-seq-F/phep-seq-R进行菌落PCR验证。

[0109] (5) 参考1.1 (5) 方法将辅助质粒消除,获得EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP)/pCas。

[0110] 1.6exo位点敲入苯丙氨酸解氨酶stlA

[0111] (1) pTargetN20-ptac-stlA (exo) 构建

[0112] 以pTargetF质粒为模板,N20-exo-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增获得N20-exo片段约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,获得pTargetN20-exo质粒。

[0113] 以EcN基因组为模板,exo-L-F/exo-L-R和exo-R-F/exo-R-R分别为引物,PCR扩增分别获得上游同源臂exo-L和下游同源臂exo-R,分别约620bp和630bp。

[0114] 以pTargetN20-pfnrs-phep (agaI) 质粒为模板,ptac-stlA (exo) -F/ptac-stlA (exo) -R为引物,PCR扩增ptac (exo) -1片段,约500bp;依次以ptac-stlA (exo) -F/ptac-stlA (exo) -R6、ptac-stlA (exo) -F/ptac-stlA (exo) -R7为引物,前一PCR片段为模板,依次PCR扩增获得ptac (exo) -2、ptac (exo) 片段,分别约520bp、550bp。以pTrc99a质粒为模板,分别以ptac-stlA (exo) -F1/ptac-stlA (exo) -R1、ptac-stlA (exo) -F2/ptac-stlA (exo) -R2、ptac-stlA (exo) -F3/ptac-stlA (exo) -R3、ptac-stlA (exo) -F4/ptac-stlA (exo) -R4为引物,分别PCR扩增lac-1、lac-2、lac-3、lac-4片段,分别约190bp、170bp、400bp、550bp;以lac-1/lac-2/lac-3/lac-4片段为模板,ptac-stlA (exo) -F1/ptac-stlA (exo) -R4为引物,PCR扩增lac-14片段,约1.2kb;依次以ptac-stlA (exo) -F5/ptac-stlA (exo) -R5、ptac-stlA (exo) -F6/ptac-stlA (exo) -R5、ptac-stlA (exo) -F7/ptac-stlA (exo) -R5、ptac-stlA (exo) -F8/ptac-stlA (exo) -R8为引物,前一PCR片段为模板,依次PCR扩增lac-5、lac-56、lac-57和lac片段,分别约1.2kb、1.2kb、1.3kb和1.4kb。以pTargetN20-pfnrs-stlA (malE) 质粒为模板,ptac-stlA (exo) -F9/ptac-stlA (exo) -R9为引物,PCR扩增ptac-stlA-1片段,约1.8kb;依次以ptac-stlA (exo) -F10/ptac-stlA (exo) -R10、ptac-stlA (exo) -F11/ptac-stlA (exo) -R11、ptac-stlA (exo) -F12/ptac-stlA (exo) -R12为引物,前一PCR片段为模板,依次PCR扩增ptac-stlA-2、ptac-stlA-3、ptac-stlA-4片段,分别约1.8kb、1.9kb、2.0kb;以ptac-stlA-4片段为模板,ptac-stlA (exo) -F13/ptac-stlA (exo) -R12为引物,PCR扩增ptac-stlA (exo) 片段,约2kb。

[0115] exo-L、ptac (exo) 、lac、ptac-stlA (exo) 和exo-R片段利用DNA assembly方法(试剂盒DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetN20-exo质粒的EcoRI/HindIII位点,连接产物转化入DH5 α 化学感受态细胞,复苏液涂布于含壮观霉素(终浓度50 μ g/mL) LB固体平板,获得含pTargetN20-ptac-stlA (exo) 质粒转化子。

[0116] (2) 参考1.1 (3) 方法制备EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP)/pCas电转感受态细胞。

[0117] (3) 参考1.1 (4) 方法将pTargetN20-ptac-stlA (exo) 质粒电转入EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP)/pCas感受态细胞,转化子利用exo-seq-F/stlA-seq-R进行菌落PCR验证。

[0118] (4) 参考1.1 (5) 方法将辅助质粒消除,获得EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA)/pCas。

[0119] 1.7rhtCB位点敲入苯丙氨酸解氨酶stlA

[0120] (1) pTargetN20-ptac-stlA (rhtCB) 构建

[0121] 以pTargetF质粒为模板,N20-rhtC-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增获得N20-rhtC片段约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,获得pTargetN20-rhtC质粒。

[0122] 以EcN基因组为模板,rhtC-L-F/rhtC-L-R和rhtC-R-F/rhtC-R-R分别为引物,PCR扩增分别获得上游同源臂rhtC-L和下游同源臂rhtC-R,分别约620bp。

[0123] 以pTargetN20-ptac-stlA(exo)质粒为模板,ptac-stlA(rhtC)-F/ptac-stlA(rhtC)-R为引物,PCR扩增ptac-stlA(rhtC)片段,约3.2kb。

[0124] rhtC-L、ptac-stlA(rhtC)和rhtC-R片段利用DNA assembly方法(试剂盒DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetN20-rhtC质粒的EcoRI/HindIII位点,连接产物转化入DH5 α 化学感受态细胞,复苏液涂布于含壮观霉素(终浓度50 μ g/mL)LB固体平板,获得含pTargetN20-ptac-stlA(rhtC)质粒转化子。

[0125] (2)参考1.1(3)方法制备EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA)/pCas电转感受态细胞。

[0126] (3)参考1.1(4)方法将pTargetN20-ptac-stlA(rhtC)质粒电转入EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA)/pCas感受态细胞,转化子利用rhtC-seq-F/stlA-seq-R进行菌落PCR验证。

[0127] (4)参考1.1(5)方法将辅助质粒消除,获得EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA,rhtCB::ptac-stlA)/pCas。

[0128] 1.8araBD位点敲入L-氨基酸脱氨酶pma

[0129] (1)pTargetN20-para-pma(araBD)质粒构建

[0130] 以pTargetF质粒为模板,N20-araBD-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增获得N20-araBD片段约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,获得pTargetN20-araBD质粒。

[0131] 以EcN基因组为模板,分别以araBD-L-F/araBD-L-R和araBD-R-F/araBD-R-R为引物,PCR扩增分别获得上游同源臂araBD-L和下游同源臂araBD-R,分别约600bp。

[0132] 以pUC-Para-pma质粒为模板,para-pma(araBD)-F/para-pma(araBD)-R为引物,PCR扩增para-pma(araBD)片段,约1.6kb。

[0133] araBD-L、para-pma(araBD)和araBD-R片段利用DNA assembly方法(试剂盒DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetN20-araBD质粒的EcoRI/HindIII位点,连接产物转化入DH5 α 化学感受态细胞,复苏液涂布于含壮观霉素(终浓度50 μ g/mL)LB固体平板,获得含pTargetN20-para-pma(araBD)质粒转化子。

[0134] (2)参考1.1(3)方法制备EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA,rhtCB::ptac-stlA)/pCas电转感受态细胞。

[0135] (3)参考1.1(4)方法将pTargetN20-para-pma(araBD)质粒电转入EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA,rhtCB::ptac-stlA)/pCas感受态细胞,转化子利用araBD-seq-F/pma-seq-R进行菌落PCR验证。

[0136] (4)参考1.1(5)方法将辅助质粒消除,获得EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA,

rhtCB::ptac-stlA,araBD::para-pma)/pCas。

[0137] 1.9敲除二氢吡啶二羧酸合酶dapA

[0138] (1) pTargetN20-dapA质粒构建

[0139] 以pTargetF质粒为模板,N20-dapA-F/pTargetF-R为引物,PCR扩增获得N20-dapA片段约2.2kb,DpnI消化PCR片段后自连,获得pTargetN20-dapA质粒。

[0140] 以EcN基因组为模板,分别以dapA-L-F/dapA-L-R和dapA-R-F/dapA-R-R为引物,PCR扩增分别获得上游同源臂dapA-L和下游同源臂dapA-R,分别约620bp。

[0141] dapA-L和dapA-R片段利用DNA assembly方法(试剂盒DNA assembly Kit购自全式金)克隆入pTargetN20-dapA质粒的EcoRI/HindIII位点,连接产物转化入DH5 α 化学感受态细胞,复苏液涂布于含壮观霉素(终浓度50 μ g/mL)LB固体平板,获得含pTargetN20-dapA(Ho)质粒转化子。

[0142] (2) 参考1.1(3)方法制备EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA,rhtCB::ptac-stlA,araBD::para-pma)/pCas电转感受态细胞。

[0143] (3) 参考1.1(4)方法将pTargetN20-dapA(Ho)质粒电转入EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA,rhtCB::ptac-stlA,araBD::para-pma)/pCas感受态细胞,转化子利用dapA-seq-F/dapA-seq-R进行菌落PCR验证。

[0144] (4) 参考1.1(5)方法将辅助质粒消除,获得EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA,rhtCB::ptac-stlA,araBD::para-pma, Δ dapA)/pCas。

[0145] (5) pCas质粒消除:挑取辅助质粒消除阳性克隆子,直接在LB液体培养基中37 $^{\circ}$ C过夜摇床培养,吸取少量菌液于LB固体平板上划线分单菌。单菌落在含卡那霉素(50 μ g/mL)抗性LB平板上进行鉴定,验证pCas质粒消除,获得基因工程菌EcN(yicS::pfnrs-stlA,malPT::pfnrs-stlA,malE::pfnrs-stlA,lacZ::pfnrs-pheP,agaI::pfnrs-pheP,exo::ptac-stlA,rhtCB::ptac-stlA,araBD::para-pma, Δ dapA),命名为CIBT4564。

[0146] 实施例2工程益生菌CIBT4564对苯丙氨酸体外降解考察

[0147] 2.1体外测活

[0148] (1) 将EcN和CIBT4564菌株分别接种于LB培养基中(CIBT4564培养时需添加终浓度为100 μ g/mL二氨基庚二酸),37 $^{\circ}$ C、250rpm过夜培养。以1%v/v接种量转接于30mL LB培养基中,37 $^{\circ}$ C、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。

[0149] (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 $^{\circ}$ C,250rpm培养3小时取样1mL。13000rpm,离心10min,收集上清样品进行HPLC检测。

[0150] 3.1苯丙氨酸、苯丙酮酸及反式肉桂酸HPLC检测方法

[0151] 色谱柱ZORBAX SB-C18色谱柱(150mm \times 4.6mm,5 μ m);柱温40 $^{\circ}$ C;以1.5%乙酸和乙

睛为流动相,进行梯度洗脱;采用紫外检测器,检测波长260nm,进样量5 μ L。检测结果见图1。

[0152] 从图1可知,添加原始菌株EcN,无反式肉桂酸生成;而添加工程益生菌CIBT4564则有反式肉桂酸生成,表明CIBT4564降解苯丙氨酸生成了反式肉桂酸。

[0153] 实施例3工程益生菌CIBT4564在苯丙酮尿症小鼠体内对苯丙氨酸的降解考察

[0154] 苯丙酮尿症小鼠Pah^{R408W}的制备方法参照文献Yin,S.,et al.(2020).Enhanced genome editing to ameliorate a genetic metabolic liver disease through co-delivery of adeno-associated virus receptor.Sci China Life Sci 63.该模型8-12周龄,由华东师范大学构建,具备苯丙酮尿症的典型症状,在正常饲料喂养下,Pah^{R408W}苯丙酮尿症小鼠在出生6周后血液中的苯丙氨酸含量都在1200 μ mol/L以上,并且随着饲养时间延长,血液中的苯丙氨酸含量持续增加,8周龄小鼠的苯丙氨酸含量都将超过1500 μ mol/L。此外,Pah^{R408W}苯丙酮尿症小鼠的体重和体型都明显偏小,随着时间推移,小鼠的毛色也逐渐表现出棕黄色。

[0155] 8-12周龄的小鼠利用无苯丙氨酸(Phe-deficient)饲料喂养(购自Deyts),含苯丙氨酸(0.5g/L)的饮用水作为苯丙氨酸补给。动物实验开始时(T=0h),停止含苯丙氨酸饮用水补给,更换为普通饮用水,采血检测T=0h血液中苯丙氨酸浓度。接着,小鼠皮下注射0.1mg/g(BW)苯丙氨酸溶液,在皮下注射后第1、2、3小时分别灌胃300 μ L(即 5×10^{10} cfu/只小鼠)益生菌EcN或CIBT4564或生理盐水,在注射后第4小时采血检测血液中苯丙氨酸的浓度。结果如图2所示。

[0156] 从图2可知,口服工程益生菌CIBT4564后,苯丙酮尿症小鼠血液中苯丙氨酸浓度与口服生理盐水和EcN相比有明显下降。

[0157] 综上所述,本发明所构建的工程益生菌CIBT4564能够在体外、体内对苯丙氨酸均能有效降解,有望应用于治疗苯丙酮尿症。

序列表

<110> 中国科学院分子植物科学卓越创新中心

华东师范大学

<120> 用于治疗苯丙酮尿症的工程益生菌

<130> SHPI2010645

<160> 3

<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 aaatatcaac ggagatcact 120
gaacttttga cgcatggctg tgaaaaatta gagaaaaat taaattcagg agaggttata 180
tatggaatca atacaggatt tggagggaat gccaatttag ttgtgccatt tgagaaaatc 240
gcagagcatc agcaaaaatct gtttaactttt ctttctgctg gtactgggga ctatatgtcc 300
aaaccttgta ttaaagcgtc acaatttact atgttacttt ctgtttgcaa aggttggctt 360
gcaaccagac caattgtcgc tcaagcaatt gttgatcata ttaatcatga cattgttctt 420
ctggttcttc gctatggctc agtgggtgca agcgggtgatt taattccttt atcttatatt 480
gcacgagcat tatgtgggat cggcaaagtt tattatatgg gcgcagaaat tgacgctgct 540
gaagcaatta aacgtgcagg gttgacacca ttatcgttaa aagccaaaga aggtcttgct 600
ctgattaacg gcacccgggt aatgtcagga atcagtgcaa tcaccgtcat taaactggaa 660
aaactattta aagcctcaat ttctgcgatt gcccttgctg ttgaagcatt acttgcattt 720
catgaacatt atgatgccc gattcaacia gtaaaaaatc atcctgggtc aaacgcgggt 780
gcaagtgcatt tgcgtaattt attggcagg 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 tctacacggg gaaatttta tggggcaata tgtcgcccga 1080
acaatggatg cattaanaact ggatattgct ttaattgcca atcatcttca cgccattgtg 1140
gctcttatga tggataaccg tttctctcgt ggattaccta attcactgag tccgacacc 1200
ggcatgtatc aaggttttaa aggcgtccaa ctttctcaaa ccgctttagt tgctgcaatt 1260
cgccatgatt gtgtcgcac aggtattcat accctcgcca cagaacaata caatcaagat 1320
attgtcagtt taggtctgca tgccgctcaa gatgttttag agatggagca gaaattacgc 1380
aatattgttt caatgacaat tctggtagtt tgtcaggcca ttcattcttc cgccaatatt 1440
agtgaaattg cgctgaaac tgctaaattt taccatgcag tacgcgaaat cagttctctt 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

atgaaaaacg cgtcaaccgt atcggaagat actgcgtcga atcaagagcc gacgcttcat 60
 cgcggttac ataaccgtca tattcaactg attgcgttgg gtggcgcaat tggactggt 120
 ctgtttcttg gcattggccc ggcgattcag atggcgggtc cggctgtatt gctgggctac 180
 ggcgtcgccg ggatcatcgc tttcctgatt atgcgccagc ttggcgaat ggtggttgag 240
 gagccggtat ccggttcatt tgcccacttt gcctataaat actggggacc gtttgcgggc 300
 ttctctctg gctggaacta ctgggtaatg ttcgtgctgg tgggaatggc agagctgacc 360
 gctgcgggca tctatatgca gtactggttc ccgatgttc caacgtggat ttgggctgcc 420
 gccttcttta ttatcatcaa cgccgttaac ctggtgaacg tgcgcttata tggcgaacc 480
 gagttctggg ttgcgttgat taaagtctg gcaatcatc gtatgatcgg ctttggcctg 540
 tggctgctgt tttctggta cggcggcgag aaagccagta tcgacaacct ctggcgctac 600
 ggtggtttct tcgccaccgg ctggaatggg ctgattttgt cgctggcggg aattatgttc 660
 tccttcggcg gtctggagct gattgggatt actgccgctg aagcgcgca tccgaaaaa 720
 agcattcaa aagcggtaaa tcagtggtg tatcgcattc tgctgtttta catcggttca 780
 ctggtggttt tactggcgct ctatccgtgg gtggaagtga aatccaacag tagccccgtt 840
 gtgatgattt tccataatct cgacagcaac gtggtagctt ctgcgctgaa cttcgtcatt 900
 ctggtagcat cgctgtcagt gtataacagc ggggtttact ctaacagccg catgctgttt 960
 ggcctttctg tgcagggtaa tgcgccgaag ttttgactc gcgtcagccg tcgcggtgtg 1020
 ccgattaact cgctgatgct ttccggagcg atcacttcgc tgggtggtgtt aatcaactat 1080
 ctgctgccgc aaaaagcgtt tggctgctg atggcgtgg tggtagcaac gctgctgttg 1140
 aactggatta tgatctgtct ggcgcatctg cgttttcgtg cagcgatcgc acgtcagggg 1200
 cgtgaaacac agtttaaggc gctgctctat ccgttcggca actatctctg cattgccttc 1260
 ctccgcatga ttttgctgct gatgtgcag atggatgata tgcgcttgc agcgatcctg 1320
 ctgccggtgt ggattgtatt cctgtttatg gcatttaaaa cgctgcgtcg gaataa 1377

<210> 3

<211> 1422

<212> DNA

<213> Proteus mirabilis HI4320

<400> 3

atgaacattt caaggagaaa gctactttta ggtgttggtg ctgcggcgt ttagcaggt 60
 ggtgcggctt tagttccaat ggttcgccgt gacggcaaat ttgtggaagc taaatcaaga 120
 gcatcatttg ttgaaggtag gcaaggggct cttcctaaag aagcagatgt agtgattatt 180
 ggtgccggta ttcaaggat catgaccgct attaacctg 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 cgggtgtaaa 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 tggtaacttat gccgttgca cagtatctt tacgagtta 960
atagtcaaag atagcttctt gctagggcct aaatttatgc acttattagg tggcggagag 1020
ttaccgttg aattctctat tgggaagat ctatttaatt catttaaat gccgacctct 1080
tggaaattag atgaaaaaac accattcgaa caattccgag ttgccacggc aacacaaat 1140
acgcaacact tagatgctgt tttccaaaga atgaaaacag aattcccagt atttgaaaa 1200
tcagaagttg ttgaacgttg gggtgccgtt gtgagtcaa catttgatga attacctatc 1260
atctctgagg tcaaagaata cccaggctta gtgattaaca cggcaacagt gtggggtatg 1320
acagaaggcc cggcagcggg tgaagtgacc gctgatattg tcatgggcaa gaaacctgtt 1380
attgatccaa cgccgttag tttgatcgt ttaagaagt aa 1422

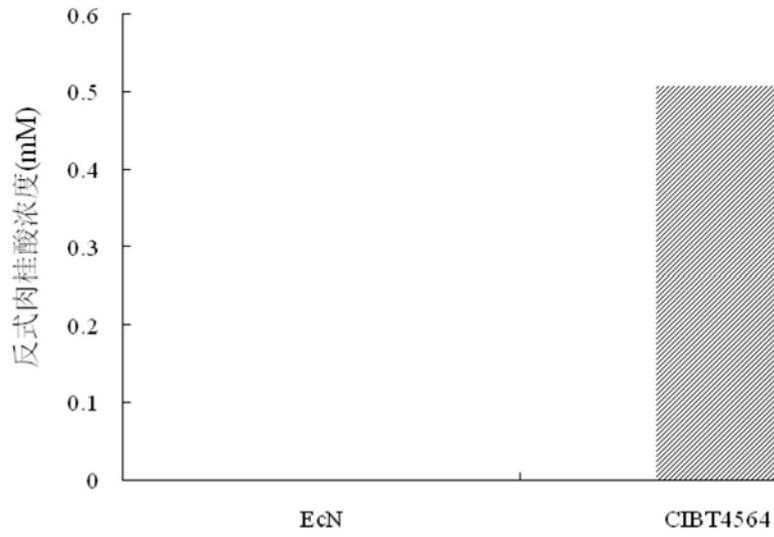


图1

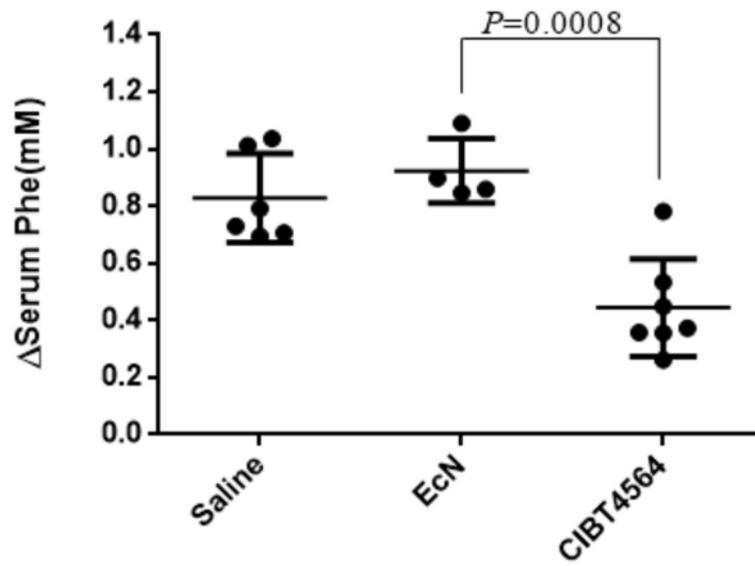


图2