



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108102940 B

(45) 授权公告日 2021.07.13

(21) 申请号 201710948677.1

(22) 申请日 2017.10.12

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108102940 A

(43) 申请公布日 2018.06.01

(83) 生物保藏信息  
CGMCC No.14272 2017.06.26

(73) 专利权人 中石化上海工程有限公司  
地址 200120 上海市浦东新区张杨路769号  
专利权人 四川大学  
中石化炼化工程(集团)股份有限公司

(72) 发明人 汤岳琴 杨白雪 陈栋 缪晔  
丁伟军

(74) 专利代理机构 上海申新律师事务所 31272  
代理人 俞涤炯

(51) Int.Cl.

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

(56) 对比文件

VN 53186 A, 2017.07.25

CN 105368732 A, 2016.03.02

焦静雨等. 基因工程技术改造木糖醇生产菌株的研究进展.《中国生物工程杂志》.2012,第32卷(第11期),第128页左栏第1段.

Scalcinati, G. et al.. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient aerobic xylose consumption.《FEMS YEAST RESEARCH》.2012,第12卷(第5期),第582-597页.

审查员 何春征

权利要求书1页 说明书8页

序列表9页 附图2页

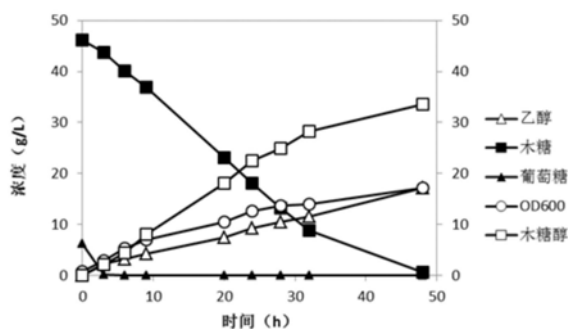
## (54) 发明名称

一株利用CRISPR/Cas9系统敲除XKS1基因的工业酿酒酵母菌株及构建方法

## (57) 摘要

本发明公开了一株敲除XKS1基因以高效产木糖醇的工业酿酒酵母菌株,其命名为SEB9,保藏编号为CGMCC No.14272;本发明还涉及一株上述酿酒酵母菌株的构建方法,其包括如下步骤:敲除出发菌株的KanMX基因构建KanMX<sup>-</sup>菌株,并筛选高木糖醇产量的KanMX<sup>-</sup>菌株;敲除所筛选的KanMX<sup>-</sup>菌株的XKS1基因构建ΔXKS1菌株,并筛选高木糖醇产率的ΔXKS1菌株。本发明通过CRISPR/Cas9基因编辑技术,可以通过一次性酵母转化迅速而快捷地敲除XKS1基因,阻断木酮糖进一步向5-磷酸木酮糖代谢从而获得高产木糖醇的菌株;通过本发明所述构建方法制备的酿酒酵母菌株SEB9,与出发菌株相比,其木糖发酵生产木糖醇的性能优越,收率可接近理论值1.0,能有效提高木糖醇的收率和木糖醇产量,其具有良好的应用前景。

CN 108102940 B



1. 一株表达木糖还原酶的酿酒酵母菌株,其特征在于,所述酿酒酵母菌株命名为SEB9,其保藏编号为CGMCC No.14272,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

## 一株利用CRISPR/Cas9系统敲除XKS1基因的工业酿酒酵母菌株及构建方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物基因工程技术领域,尤其涉及一株利用CRISPR/Cas9系统敲除XKS1基因以高效产木糖醇的工业酿酒酵母菌株及构建方法。

### 背景技术

[0002] 秸秆、皮壳、芯等农业废弃物是地球上最为丰富的可再生有机物质,在中国每年约有9亿吨秸秆产生,但由于这些农业废弃物的处理成本过高,虽然引起了广泛重视,但在转化处理方式上仍多为废弃或直接田间焚烧,造成极大的资源浪费及环境污染,还对生态平衡产生了破坏。而木糖醇可由半纤维素的水解产物(以木糖为主)还原制得。木糖醇作为21世纪新兴最有前途的生物平台化合物之一,利用农业废弃物变废为宝生产木糖醇,不仅经济价值可观,同时作为环保处理农业废弃物的有效途径,一举两得。

[0003] 近些年来基因编辑技术大热,Cre-LoxP系统是源于P1噬菌体的一个DNA重组体系,由Cre酶和相应的LoxP位点组成,它能导致重组发生在特定的DNA序列处(LoxP位点),该系统可以将外源基因定点整合到染色体上或将特定DNA片段删除。而CRISPR-Cas9基因编辑技术是继转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease,TALEN)技术与锌指核酸酶(Zinc-finger nuclease,ZFN)技术之后迅速发展起来的第3代基因组编辑技术。CRISPR/Cas9独特之处是既可以作为双链的内切酶也可被改造成成为切口酶,并在特定位点对DNA进行切割,形成双链断裂(Double strand break,DSB),通过非同源末端连接(Non-homologous end joining,NHEJ)修复机制或在同源重组(Homologous recombination,HR)修复机制以及修复模板(Donor template)DNA存在的条件下,实现定点单碱基突变、长片段的插入、敲除以及突变。Cas9蛋白目前常用的是源于产脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophiles*)中的Cas9蛋白。CRISPR/Cas系统最早是在细菌的天然免疫系统内发现的,其主要功能是对抗入侵的病毒及外源DNA。该系统是一个由核酸和蛋白质组成的核糖核蛋白复合物,通过一段短的引导RNA(Guide RNA,gRNA)识别特定的DNA序列,通过改变gRNA序列即可使蛋白定位到新的DNA序列。设计打靶位点时,只需在原有含gRNA载体的基础上替换20bp的gRNA核苷酸序列,另外靶点的唯一限制是3'端必须有原间隔相关基序(PAM)序列(NGG),所以它的靶点在基因中出现的频率远高于TALEN和ZFN。而且Cas9可与多个不同靶位点的gRNA同时导入细胞中,可高效实现多基因同时敲除,极大的提高了基因编辑的效率。该基因编辑技术相比于传统的基因编辑技术,无需标记基因,流程少、时间短、成本低,在各领域必将有越来越有广阔的应用前景,并且产生深远的影响。

[0004] 生产木糖醇的方法主要有化学加氢法和生物转化法。化学法对设备要求极高,副产物成分复杂、提纯难、成本高,且该过程所需的镍催化剂对环境污染严重,木糖醇的收益低。生物法则反应条件温和、工艺简单可行,操作性可控性强。且后者污染少,分离成本低,具有良好的应用前景,是实现废物资源化、无害化,替代化学加氢法生产的有效途径。

[0005] 可生产木糖醇的微生物总体可分三类:细菌、丝状真菌以及酵母菌,酵母的产率明显高于其他。2013年酵母产品的全球市场已达到58亿美元,预计2019年将达到92亿美元。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是经由GRAS(Generally Recognized As Safe)认证的安全菌株。而工业酿酒酵母具有耐热性能好,耐受抑制物性能佳等优点,用其作为基因编辑改造的出发菌株,可获得高效表达木糖还原酶,高产木糖醇的工程菌。将木糖还原酶(XR,由XYL1编码)基因导入酿酒酵母可使还原木糖木糖醇。但是,酿酒酵母内源基因,如木糖醇脱氢酶基因ScXYL2和山梨糖醇脱氢酶基因SOR1/SOR2的产物能够将木糖醇进一步氧化生成木酮糖,尽管氧化活性可能相当弱。木酮糖进一步被木酮糖激酶(XK,由XKS1编码)转化为5-磷酸木酮糖进入戊糖磷酸途径(PPP)被利用。这些内源代谢途径会导致木糖醇消耗,使木糖醇产率低于理论产率1.0。

[0006] 工业酿酒酵母表达系统较为复杂,目前采用的来源于热带假丝酵母CtXYL1(编码木糖还原酶)基因在酿酒酵母中异源表达后,其构建的重组菌在低浓度葡萄糖作为碳源供给时,仍存在木糖醇收率低、不能满足发酵需求的问题。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服现有技术中的缺陷,通过人为改造工业酿酒酵母以提高其高产木糖醇性能,通过新型基因编辑技术,阻断代谢支路的一些目标基因的表达来解决上述问题。本发明提供一株利用CRISPR/Cas9系统敲除XKS1基因的工业酿酒酵母菌株,其能有效提高木糖醇的收率。

[0008] 本发明首次使用具有木糖代谢背景的絮凝性工业酵母SEB6(CGMCC11326)作为出发菌株,构建一株高产木糖醇菌株。为了确保重组菌株在工业生产中的安全性,需要对G418抗性筛选标记KanMX基因进行敲除,即通过将已含热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)的木糖还原酶(xylose reductase, XR)基因CtXYL1、含有KanMX的絮凝性工业酿酒酵母SEB6的抗性基因KanMX利用Cre-LoxP系统,通过识别LoxP位点将其切除,然后利用CRISPR/Cas9基因编辑技术来敲除XKS1基因,阻断木酮糖进一步向5-磷酸木酮糖代谢从而获得高产木糖醇的菌株。

[0009] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0010] 本发明的第一个目的是提供一株表达木糖还原酶的酿酒酵母菌株,其命名为SEB9,其分类命名为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),其保藏编号为CGMCC No.14272,保藏日期为2017年6月26日,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0011] 进一步地,所述酿酒酵母菌株为敲除XKS1基因和KanMX基因的酿酒酵母菌株。

[0012] 本发明的第二个目的是提供一株上述表达木糖还原酶的酿酒酵母菌株的构建方法,其包括以下步骤:

[0013] a) 选取出发菌株;

[0014] b) 敲除出发菌株的KanMX基因构建KanMX<sup>-</sup>菌株,并筛选高木糖醇产量的KanMX<sup>-</sup>菌株;

[0015] c) 利用CRISPR/Cas9系统敲除KanMX<sup>-</sup>菌株的XKS1基因构建 $\Delta$ XKS1菌株,并筛选高木糖醇产率的 $\Delta$ XKS1菌株。

[0016] 为了进一步优化上述酿酒酵母菌株的构建方法,本发明所采取的技术措施还包括:

[0017] 进一步地,在步骤c)之后,还包括步骤d) 筛选最优  $\Delta$  XKS1 菌株。

[0018] 进一步地,步骤a) 中的出发菌株为絮凝性工业酵母SEB6,其保藏编号为CGMCC No.11326,所述SEB6菌株含有热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)的木糖还原酶(xylose reductase, XR) 基因CtXYL1。

[0019] 进一步地,步骤b) 中敲除KanMX基因的步骤包括:将诱导型质粒pSH47/ZEO转化到出发菌株中,在预定浓度的博莱霉素中筛选阳性转化子,采用Cre-LoxP系统将KanMX基因敲除。

[0020] 更进一步地,步骤b) 还包括出发菌株的Zeocin(博莱霉素)最佳耐受浓度筛选步骤。

[0021] 更进一步地,步骤b) 中Zeocin的预定浓度为50 $\mu$ g/ml~250 $\mu$ g/ml,该预定浓度更优选为出发菌株的Zeocin最佳耐受浓度。

[0022] 更进一步地,步骤b) 中筛选高木糖醇产量的KanMX<sup>-</sup>菌株采用试管发酵筛选。

[0023] 进一步地,步骤c) 中敲除XKS1基因的步骤包括:

[0024] 1) 以pMEL13质粒为模板,PCR扩增并切胶纯化回收PCR扩增产物,制得含gRNA的质粒线性骨架;

[0025] 2) 设计识别XKS1基因的gRNA片段和重组修复XKS1基因的DNA片段;

[0026] 3) 将质粒Cas9-NAT、步骤1) 制备的质粒线性骨架、步骤2) 设计的识别XKS1基因的gRNA片段和重组修复XKS1基因的DNA片段均转化到步骤b) 所筛选的KanMX<sup>-</sup>菌株中,并筛选出可能的已敲除XKS1基因的阳性转化子;

[0027] 4) 对步骤3) 所筛选的阳性转化子进行处理粗提酿酒酵母转化子基因组DNA,以提取的转化子基因组DNA为模板,进行PCR扩增,筛选已敲除XKS1基因的  $\Delta$  XKS1 菌株;

[0028] 其中,步骤1) 和步骤2) 的操作顺序可进行互换。

[0029] 进一步地,所述pMEL13质粒的序列如SEQ ID NO:1所示,其引物序列如SEQ ID NO:2~SEQ ID NO:3所示;所述识别XKS1基因的gRNA片段的序列如SEQ ID NO:4所示,所述重组修复XKS1基因的DNA片段的序列如SEQ ID NO:5所示;所述质粒Cas9-NAT的序列如SEQ ID NO:6所示;所述转化子基因组DNA的引物序列如SEQ ID NO:7~SEQ ID NO:8所示。

[0030] 进一步地,所述步骤1) 中pMEL13质粒的PCR扩增程序为:98.0 $^{\circ}$ C,预变性30s;98.0 $^{\circ}$ C,变性10s;67 $^{\circ}$ C,退火15s;72 $^{\circ}$ C,延伸6min 10s;上述过程进行35个循环后,于4 $^{\circ}$ C保存。

[0031] 进一步地,所述步骤4) 中转化子基因组DNA的PCR扩增程序为:95.0 $^{\circ}$ C,预变性4min;95.0 $^{\circ}$ C,变性30s;52 $^{\circ}$ C,退火30s;72 $^{\circ}$ C,延伸2min 30s;上述过程进行30个循环后,于4 $^{\circ}$ C保存。

[0032] 进一步地,步骤c) 中筛选高木糖醇产率的  $\Delta$  XKS1 菌株包括:脱除Cas9-NAT质粒以及pMEL13-XKS1-gRNA质粒以获得不含上述质粒的菌株,采用所得的不含上述质粒的菌株进行试管发酵以筛选高木糖醇产率  $\Delta$  XKS1 菌株。

[0033] 进一步地,步骤d) 筛选最优  $\Delta$  XKS1 菌株包括:分别对步骤a) 的出发菌株与步骤c) 筛选出的高木糖醇产率的  $\Delta$  XKS1 菌株进行接种、发酵、采样,并对发酵参数进行测定,计算木糖醇收率,其中,筛选木糖醇收率最接近于理论值1.0的菌株作为最优  $\Delta$  XKS1 菌株;其中,

发酵参数包括吸光度值OD600、乙醇含量、葡萄糖、木糖以及木糖醇的含量等。

[0034] 进一步地,在上述酿酒酵母菌株的构建方法中使用的培养基包括液体培养基(如2%YPD培养基、YPDX培养基、YPDX发酵罐用培养基等)、固体培养基(如LB/Amp培养基、2%YPD/G418/NAT固体培养基等)等,也可使用其他任一合适的培养基。

[0035] 与现有技术相比,本发明采用上述技术方案具有以下有益效果:

[0036] 1、本发明通过CRISPR/Cas9基因编辑技术,可以通过一次性酵母转化迅速而快捷地敲除XKS1基因,阻断木酮糖进一步向5-磷酸木酮糖代谢从而获得高产木糖醇的菌株;

[0037] 2、通过本发明所述构建方法制备的酿酒酵母菌株SEB9木糖发酵生产木糖醇的性能优越,木糖醇的收率接近理论值1.0。

## 附图说明

[0038] 图1是gRNA的线性骨架的PCR制备图;

[0039] 图2是本发明中出发菌株0号菌发酵罐的发酵示意图;

[0040] 图3是本发明所制备的菌株 $\Delta$ XKS1d号菌发酵罐的发酵示意图。

## 具体实施方式

[0041] 本发明使用的酿酒酵母菌株SEB9为敲除XKS1基因和敲除KanMX基因的酿酒酵母菌株,其已进行保藏,其保藏编号为CGMCC No.14272,保藏日期为2017年6月26日,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0042] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0043] 以下实施例中所采用的培养基配方如下:

[0044] 本发明的培养基配方如下:

[0045] 1、液体培养基;

[0046] 2%YPD培养基(10g/L Yeast Extract酵母浸出粉、20g/L Peptone蛋白胨、20g/L glucose葡萄糖),121℃,灭菌15min,冷却至60℃,可根据情况添加100 $\mu$ g/mL G418或80 $\mu$ g/mL 诺尔斯菌素G418。用于酵母发酵前的预培养。

[0047] YPDX培养基(10g/L Yeast Extract酵母浸出粉、20g/L Peptone蛋白胨、50g/L D-Xylose木糖,20g/L glucose葡萄糖),121℃灭菌15min,冷却至60℃,可根据情况添加100 $\mu$ g/mL G418或80 $\mu$ g/mL 诺尔斯菌素G418。用于木糖的试管发酵。

[0048] YPDX发酵罐用培养基(10g/L Yeast Extract酵母浸出粉、20g/L Peptone蛋白胨、45g/L D-Xylose木糖,5g/L glucose葡萄糖),121℃灭菌15min,冷却至60℃,可根据情况添加100 $\mu$ g/mL G418或80 $\mu$ g/mL 诺尔斯菌素G418。用于木糖的试管发酵。

[0049] 2、固体培养基;

[0050] LB/Amp培养基(10g/L Peptone蛋白胨、5g/L Yeast Extract酵母浸出粉、10g/L NaCl),121℃,冷却至60℃,加入100 $\mu$ g/mL 氨苄霉素。用于培养大肠杆菌。

[0051] 2%YPD/G418/NAT固体培养基(10g/L Yeast Extract酵母浸出粉、20g/L Peptone蛋白胨、20g/L glucose葡萄糖、15g/L Agar琼脂),121℃,冷却至60℃,加入100 $\mu$ g/mL G418,80 $\mu$

g/mL诺尔斯菌素。用于培养酵母,根据试验情况添加两种抗生素筛选酵母转化子。

[0052] 实施例1

[0053] 本实施例为酿酒酵母菌株SEB9的构建方法,其包括如下步骤:

[0054] (1) 出发酿酒酵母菌株的Zeocin(博莱霉素)最佳耐受浓度筛选:出发菌株为絮凝性工业酵母SEB6(CGMCC11326),将出发菌株涂布于Zeocin浓度梯度为0 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/ml、80 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml、150 $\mu$ g/ml、200 $\mu$ g/ml、250 $\mu$ g/ml的pH为7.22的%YPD平板上,30 $^{\circ}$ C避光静置培养2天,筛选确定出发菌株载体酿酒酵母菌株的Zeocin最佳耐受浓度;

[0055] (2) 构建KanMX<sup>-</sup>菌株:采用醋酸锂转化法将含Cre酶酵母表达的诱导型质粒pSH47/ZE0(1 $\mu$ g)转化到出发酿酒酵母菌株中,在含有Zeocin最佳耐受浓度的pH7.2的2%YPD平板中筛选菌落形态完好的阳性转化子。质粒pSH47/ZE0为现有质粒,公开在2013年Tomitaka等人报道的一篇文献中,该文献名称为:分离及鉴定一株经突变和重组的能高效利用木糖的酿酒酵母;作者有:Tomitaka M、Taguchi H、Fukuda K、Akamatsu T、Kida K;公开的刊物为:生物科学与生物工程杂志.2013,116(6):706-715。上述利用同源重组的方式,利用Cre-LoxP系统,通过识别LoxP位点将KanMX基因切除,该敲除筛选标记G418的KanMX基因的方法采用本领域的常规技术手段;

[0056] (3) 试管发酵筛选高木糖醇收率KanMX<sup>-</sup>菌株:活化敲除KanMX基因的转化子,将得到的阳性转化子菌株接种于2%YPD平板,30 $^{\circ}$ C恒温箱内培养1d;预培养:将活化后的菌株接种于含10ml 2%YPD液体培养基的试管(规格20 $\times$ 200)中,30 $^{\circ}$ C 160rpm过夜培养16h;按照1%接种于含10ml YPD(10g/LYeast Extract酵母浸出粉、20g/L Peptone蛋白胨、45g/LD-Xylose木糖,20g/Lglucose葡萄糖)液体培养基的试管(规格20 $\times$ 200)中,35 $^{\circ}$ C,160rpm恒温回转式摇床发酵培养;0h,48h取样2ml。根据发酵结果筛选高木糖醇产量KanMX<sup>-</sup>菌株,其筛选结果如表1所示:

[0057] 表1试管发酵筛选高木糖醇产率KanMX<sup>-</sup>菌株

KanMX <sup>-</sup> 菌株编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
48 h 木糖醇产率 (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0.681 $\pm$ 0.006	0.660 $\pm$ 0.010	0.742 $\pm$ 0.012	0.614 $\pm$ 0.045	0.583 $\pm$ 0.013	0.740 $\pm$ 0.017	0.761 $\pm$ 0.007	0.759 $\pm$ 0.007	0.762 $\pm$ 0.013

[0059] 根据表1的结果可知:酿酒酵母KanMX<sup>-</sup>菌株9号菌的木糖发酵生产木糖醇的性能最优越,木糖醇产率最高,因而用其作为敲除XKS1基因的出发菌。

[0060] (4) 含gRNA的线性骨架的制备:如图1所示,gRNA的线性骨架的制备以pMEL13质粒(SEQ ID NO.1)为模板,6006-Fv(SEQ ID NO.2)、6005-Rw(SEQ ID NO.3)为引物,PCR扩增并切胶纯化回收PCR扩增得到的质粒线性化骨架。PCR反应体系50 $\mu$ l组成如下:5 $\times$ PrimeSTAR Buffer (Mg<sup>2+</sup>plus) 10 $\mu$ l;dNTP Mixture (各2.5mM) 4 $\mu$ l;引物6006-Fv、6005-Rw各10 $\mu$ M,0.5 $\mu$ l;PrimeSTAR HS DNA polymerase (5U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l;质粒pK-XR-Ct 50ng;以灭菌双蒸水补加至50 $\mu$ l。 $\mu$ M是浓度单位,是 $\mu$ mol/l的意思。gRNA的线性骨架的PCR扩增程序为:将含有pMEL13质粒、引物6006-Fv、6005-Rw的反应体系在98.0 $^{\circ}$ C预变性30s,98.0 $^{\circ}$ C变性10s,67 $^{\circ}$ C退火15s,72 $^{\circ}$ C延伸6min 10s,上述过程进行35个循环后,于4 $^{\circ}$ C保存。PCR完成后,用Quick Cut<sup>TM</sup> Dpn I快切酶(TAKARA公司)在37 $^{\circ}$ C处理2h以消化质粒模板。最后在1%琼脂糖凝胶上上样,在50V电压条件下进行凝胶电泳,用胶纯化回收试剂盒(Omega公司)切胶回收获得线型骨

架,骨架长度为6110b,命名为pMEL13-backbone;

[0061] (5) 设计识别XKS1基因的gRNA片段以及重组修复DNA片段并合成双链:在网站<http://yeastriction.tnw.tudelft.nl>上,以模式酵母S288c为基准,输入需要识别的基因XKS1,可以在线设计识别XKS1基因的gRNA片段,该片段命名为XKS1-gRNA (SEQ ID NO.4)。重组修复XKS1基因的DNA片段设计为XKS1编码区上游60bp及下游60bp的组合,该片段命名为XKS1-repair (SEQ ID NO.5),并在生工生物工程(上海)股份有限公司订购合成双链;

[0062] (6) 利用CRISPR/Cas9系统敲除XKS1基因:将现有质粒Cas9-NAT (2 $\mu$ g) (SEQ ID NO.6)、线型骨架pMEL13-backbone (100ng)、XKS1-gRNA (300ng) 以及重组修复片段XKS1-repair (1.6 $\mu$ g) 通过醋酸锂转化法转化到酿酒酵母KanMX<sup>-</sup>菌株中,在含有G418以及诺尔斯菌素的2%YPD平板中筛选菌落形态完好的阳性转化子;

[0063] (7) 粗提酿酒酵母转化子基因组DNA:将可能的阳性转化子用牙签挑取至95 $\mu$ l 1% SDS (十二烷基磺酸钠) 中,并加入4 $\mu$ l 4M醋酸锂溶液,之后操作步骤按照公开在2015年 Robert Mans等人报道的一篇文献中,该文献名称为:CRISPR/Cas9:在酿酒酵母中同时引入多基因修饰的一种分子瑞士军刀;作者有:Harmen M.van Rossum#,Melanie Wijsman, Antoon Backx,Niels G.A.Kuijpers,Marcel van den Broek,Pascale Daran-Lapujade, Jack T.Pronk,Antonius J.A.van Maris and Jean-Marc G.Daran;公开的刊物为:FEMS Yeast Research (欧洲微生物学联合会酵母研究杂志) 2015,15 (2) :1-15。

[0064] (8) 菌落PCR筛选XKS1敲除菌株(用 $\Delta$ XKS1标记):以上述步骤中提取的转化子基因组DNA为模板,XKS1-dg-Fv (SEQ ID NO.7)、XKS1-dg-Rw (SEQ ID NO.8) 为引物,进行PCR扩增。PCR反应体系25 $\mu$ l组成如下:10 $\times$ PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup>plus) 10 $\mu$ l;dNTP Mixture (各2.5mM) 4 $\mu$ l;引物XKS1-dg-Fv、XKS1-dg-Rw各10 $\mu$ M,0.5 $\mu$ l;TaKaRa Taq DNA聚合酶(5U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l;转化子DNA 30-50ng;以灭菌双蒸水补加至25 $\mu$ l。PCR扩增程序为:将含有转化子基因组DNA、引物XKS1-dg-Fv、XKS1-dg-Rw的反应体系在95.0 $^{\circ}$ C预变性4min,95.0 $^{\circ}$ C变性30s,52 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸2min 30s,上述过程进行30个循环后,于4 $^{\circ}$ C保存。PCR产物长度为673bp的则为阳性转化子,PCR产物长度为2494bp的则为假阳性转化子;

[0065] (8) 脱除Cas9-NAT质粒以及pMEL13-XKS1-gRNA质粒:针对上述步骤(7)中的阳性转化子,在营养丰富的YPD培养基中30 $^{\circ}$ C,160rpm进行试管过夜培养,稀释一定倍数后,涂布于YPD平板上。之后挑取单菌落分别于YPD平板,YPD/G418平板,YPD/NAT平板上,于30 $^{\circ}$ C静置培养2-3天,选取在YPD上生长,而不在含有抗性平板上生长的菌落再次重复这样的筛选,最终得到的菌株即为不含Cas9-NAT质粒以及pMEL13-XKS1-gRNA质粒的菌株;

[0066] (9) 试管发酵筛选高木糖醇产率 $\Delta$ XKS1菌株:从上述步骤中得到的不含Cas9-NAT质粒以及pMEL13-XKS1-gRNA质粒的菌株于35 $^{\circ}$ C,140rpm条件下,利用YPD<sub>X</sub> (10g/L Yeast Extract酵母浸出粉、20g/L Peptone蛋白胨、50g/LD-Xylose木糖,20g/L glucose葡萄糖) 进行试管发酵,根据发酵结果筛选出一株高产木糖醇菌株,其筛选结果如表2所示;

[0067] 表2试管发酵筛选高木糖醇产率 $\Delta$ XKS1菌株

[0068]

$\Delta$ XKS1 菌株 及出发菌株编号	a	b	c	d	e	f	g	h	0



[0069]	48 h 木糖醇收率 (g 产生的木糖醇 /g 消耗的木糖)	1.00± 0.01	0.96± 0.02	0.94± 0.04	1.00± 0.02	0.90± 0.03	0.95± 0.03	1.00± 0.02	0.98± 0.01	0.99± 0.01
	48 h 木糖醇产率 (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0.76± 0.01	0.69± 0.01	0.69± 0.02	0.74± 0.01	0.69± 0.01	0.72± 0.01	0.71± 0.02	0.65± 0.02	0.75± 0.01

[0070] 根据表2的结果可知:酿酒酵母  $\Delta$ XKS1 菌株编号为d的木糖发酵生产木糖醇的性能优越,收率可达到理论值1.0,与出发菌株0号菌相比,在敲除XKS1基因后,木糖醇的产率并未下降。

[0071] (10) 发酵罐评价:用上述步骤中筛选出一株高产木糖醇菌株与出发菌株作比较,将这两株接种于2%YPD平板,30℃恒温箱内培养1d;预培养:将活化后的菌株接种于含100ml 2%YPD液体培养基的锥形瓶(规格500mL)中,30℃160rpm过夜培养16h。发酵:按照干重为0.5g/L接种于1L发酵罐中在35℃,300rpm,曝气率0.13vvm条件下,利用工作体积为600mL的YPD(10g/LYeast Extract酵母浸出粉、20g/LPeptone蛋白胨、45g/L D-Xylose木糖,5g/L glucose葡萄糖)进行发酵,3h后,补加600g/L的葡萄糖溶液,补加速率为1mL/h。采样时间分别为0h,3h,6h,9h,20h,24h,28h,32h以及48h,每个采样点采样5ml;

[0072] (11) 发酵参数的测定:评价菌株生长情况是在紫外分光光度计600nm处测600nm的吸光度值记为OD600,通过OD600与载体酿酒酵母菌株干重的关系,计算出重组酵母干重;通过气象色谱仪GC(353B)(GL Science Inc.公司)测出乙醇含量,通过HPLC(SHIMADZU)液相色谱仪测出葡萄糖、木糖以及木糖醇的含量。

[0073] (12) 计算木糖醇收率:通过计算消耗的木糖以及产生的木糖醇的数据,计算木糖醇的产率;筛选出收率最接近于理论值1.0的菌株作为最优菌株。

[0074] 高产木糖醇菌株与出发菌株所测定的发酵参数结果如图2~图3及表3所示:

[0075] 表3发酵罐发酵木糖醇产率比较

菌株编号	0	d
[0076] 48 h 木糖醇产量 (g·L <sup>-1</sup> )	33.51±0.27	37.07±1.19
48 h 木糖醇收率 (g 产生的木糖醇/g 消耗的木糖)	0.748±0.017	0.976±0.047
[0077] 48 h 木糖醇产率 (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0.698±0.006	0.772±0.025

[0078] 根据图2、图3以及表3的结果可知:在以初始低浓度葡萄糖与木糖的混合发酵中,出发菌株0号菌相比,酿酒酵母  $\Delta$ XKS1 菌株编号为d的木糖发酵生产木糖醇的性能优越,收率可接近理论值1.0,是出发菌株的1.3倍,提高了约30.5%,而木糖醇产量也相应提高10.6%。

[0079] 由上述实施例可知,本发明利用CRISPR/Cas9系统敲除XKS1基因构建了能高效产木糖醇的工业酿酒酵母菌株,其与出发菌株相比,能有效提高木糖醇的收率和木糖醇产量,该菌株具有良好的应用前景。

[0080] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只作为范例,本发明并不限制

于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 中石化上海工程有限公司

[0003] <120> 一株利用CRISPR/Cas9系统敲除XKS1基因的工业酿酒酵母菌株及构建方法

[0004] <160> 8

[0005] <170> PatentIn version 3.5

[0006] <210> 1

[0007] <211> 6130

[0008] <212> DNA

[0009] <213> Artificial Sequence

[0010] <220>

[0011] <223> pMEL13质粒

[0012] <400> 1

[0013] acaggcaaca cgcagatata ggtgcgacgt gaacagtgag ctgtatgtgc gcagctcgcg 60

[0014] ttgcattttc ggaagcgctc gttttcggaa acgctttgaa gttcctattc cgaagttcct 120

[0015] attctctaga aagtatagga acttcagagc gcttttgaaa accaaaagcg ctctgaagac 180

[0016] gcactttcaa aaaacaaaa acgcaccgga ctgtaacgag ctactaaaat attgccaata 240

[0017] ccgcttcac aaacattgct caaaagtatc tctttgctat atatctctgt gctatatccc 300

[0018] tatataacct acccatccac ctttcgctcc ttgaacttgc atctaaactc gacctctaca 360

[0019] tttttatgt ttatctctag tattactctt tagacaaaa aattgtagta agaactattc 420

[0020] atagagttaa tcgaaaacaa tacgaaaatg taaacattc ctatacgtag tatatagaga 480

[0021] caaaatagaa gaaaccgtc ataattttct gaccaatgaa gaatcatcaa cgctataact 540

[0022] ttctgttcac aaagtatgag caatccacat cggtagagaa tataatcggg gatgccttta 600

[0023] tcttgaaaaa atgcaccgc agcttcgcta gtaatcagta aacgcgggaa gtggagtcag 660

[0024] gcttttttta tggaagagaa aatagacacc aaagtagcct tcttctaacc ttaacggacc 720

[0025] tacagtcaa aaagttatca agagactgca ttatagagcg cacaaaggag aaaaaagta 780

[0026] atctaagatg ctttgtaga aaaatagcgc tctcgggatg catttttgta gaacaaaaaa 840

[0027] gaagtataga ttctttgtg gtaaaatagc gctctcgcgt tgcatttctg ttctgtaaaa 900

[0028] atgcagctca gattctttgt ttgaaaaatt agcgcctctc cgttgcattt ttgttttaca 960

[0029] aaaaagaagc acagattctt cgttgtaaaa atagcgttt cgcgttgcat ttctgttctg 1020

[0030] taaaaatgca gctcagattc tttgtttgaa aaattagcgc tctcgcgttg catttttgtt 1080

[0031] ctacaaaatg aagcacagat gcttcgttca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 1140

[0032] acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 1200

[0033] ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt 1260

[0034] gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttctg tttttgctca ccagaaacg 1320

[0035] ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggta catcgaactg 1380

[0036] gatctcaaca gcgtaagat cttgagagt tttcgcccc aagaacgttt tccaatgatg 1440

[0037] agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 1500

[0038] caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 1560

[0039] gaaaagcadc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataacctg 1620

[0040] agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 1680

[0041] gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 1740

[0042]	aatgaagcca	taccaaacga	cgagcgtgac	accacgatgc	ctgtagcaat	ggcaacaacg	1800
[0043]	ttgcgcaaac	tattaactgg	cgaactactt	actctagctt	cccggcaaca	attaatagac	1860
[0044]	tggatggagg	cggataaagt	tgcaggacca	cttctgcgct	cggcccttcc	ggctggctgg	1920
[0045]	tttattgctg	ataaatctgg	agccggtgag	cgtgggtctc	gcggtatcat	tgcagcactg	1980
[0046]	gggccagatg	gtaagccctc	ccgtatcgta	gttatctaca	cgacggggag	tcaggcaact	2040
[0047]	atggatgaac	gaaatagaca	gatcgcctgag	ataggtgcct	cactgattaa	gcattggtaa	2100
[0048]	ctgtcagacc	aagtttactc	atatatactt	tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	2160
[0049]	aaaaggatct	aggtgaagat	cctttttgat	aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	2220
[0050]	ttttcgttcc	actgagcgtc	agaccccgta	gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	2280
[0051]	ttttttctgc	gcgtaatctg	ctgcttcaa	acaaaaaac	caccgctacc	agcggtggtt	2340
[0052]	tgtttgccgg	atcaagagct	accaactctt	tttccgaagg	taactggctt	cagcagagcg	2400
[0053]	cagataccaa	atactgtcct	tctagtgtag	ccgtagttag	gccaccactt	caagaactct	2460
[0054]	gtagcaccgc	ctacatacct	cgctctgcta	atcctgttac	cagtggctgc	tgccagtggc	2520
[0055]	gataagtcgt	gtcttaccgg	gttgactca	agacgatagt	taccggataa	ggcgcagcgg	2580
[0056]	tcgggtgaa	cggggggttc	gtgcacacag	cccagcttgg	agcgaacgac	ctacaccgaa	2640
[0057]	ctgagatacc	tacagcgtga	gctatgagaa	agcggcacgc	ttcccgaagg	gagaaaggcg	2700
[0058]	gacaggtatc	cggtaagcgg	cagggtcggg	acaggagagc	gcacgaggga	gcttccaggg	2760
[0059]	ggaaacgcct	ggtatcttta	tagtctctgc	gggtttcgcc	acctctgact	tgagcgtcga	2820
[0060]	ttttgtgat	gctcgtcagg	ggggcggagc	ctatggaaaa	acgccagcaa	cgcgcccttt	2880
[0061]	ttacggttcc	tgcccttttg	ctggcctttt	gctcacatgt	tctttctctc	gttatccctt	2940
[0062]	gattctgtgg	ataaccgtat	taccgccttt	gagtgagctg	ataccgctcg	ccgcagccga	3000
[0063]	acgaccgagc	gcagcagatc	agtgagcag	gaagcgggag	agcggccaat	acgcaaaccg	3060
[0064]	cctctccccg	cgcgttgccc	gattcattaa	tgcagctggc	acgacaggtt	tcccactggg	3120
[0065]	aaagcgggca	gtgagcgaac	cgcaattaat	gtgagttacc	tcactcatta	ggcaccceag	3180
[0066]	gctttacact	ttatgcttcc	ggctcctatg	ttgtgtggaa	ttgtgagcgg	ataacaattt	3240
[0067]	cacacaggaa	acagctatga	ccatgattac	gccaaagcgc	caattaacce	tcactaaagg	3300
[0068]	gaacaaaagc	tggagcttct	ttgaaaagat	aatgtatgat	tatgctttca	ctcatattta	3360
[0069]	tacagaaact	tgatgttttc	tttcgagtat	atacaagggt	attacatgta	cgtttgaagt	3420
[0070]	acaactctag	atthttgtagt	gcctctctgg	gctagcggta	aagggtgcga	ttttttcaca	3480
[0071]	ccctacaatg	ttctgttcaa	aagatthttg	tcaaacgctg	tagaagtgaa	agttggtgcg	3540
[0072]	catgtttcgg	cgttcgaaac	ttctccgcag	tgaagataa	atgatcgata	cgttctctat	3600
[0073]	ggaggagttt	tagagctaga	aatagcaagt	taaaataagg	ctagtccgtt	atcaacttga	3660
[0074]	aaaagtggca	ccgagtcggt	ggtgcttttt	ttgtttttta	tgtcttcgag	tcatgtaatt	3720
[0075]	agttatgtca	cgcttacatt	cacgccttcc	ccccacatcc	gctctaaccg	aaaaggaagg	3780
[0076]	agttagacaa	cctgaagtct	aggtccctat	ttatthtttt	atagttatgt	tagtattaag	3840
[0077]	aacgttattt	atatttcaaa	ttttcttttt	ttttctgtac	agacgcgtgt	acgcatgtaa	3900
[0078]	cattatactg	aaaaccttgc	ttgagaaggt	tttgggacgc	tcgaaggctt	taatttgcgg	3960
[0079]	ccggtacceca	attcgcctca	tagtgagtcg	tattacgcgc	gctcactggc	cgctcgtttta	4020
[0080]	caacgtcgtg	actgggaaaa	ccctggcgtt	acccaactta	atcgccttgc	agcacatccc	4080
[0081]	cctttcgcca	gctggcgtaa	tagcgaagag	gcccgcaccg	atcgccttcc	ccaacagttg	4140
[0082]	cgcagcctga	atggcgaatg	gcgcgacgcg	ccctgtagcg	gcgcattaag	cgcggcgggt	4200
[0083]	gtggtgggta	cgcgacgcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcg	cgctcctttc	4260

[0084]	gctttcttcc cttcctttct cgccacgttc gccggcttcc cccgtcaagc tctaaatcgg 4320
[0085]	gggtccctt tagggttccg atttagtgt ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4380
[0086]	tagggtgatg gttcacgtag tgggcccgtg aacattctta ggctggtcga atcatttaga 4440
[0087]	cacgggcacg gtctctcga aaggtggcat aggccactag tggatctgat atcacctaata 4500
[0088]	aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt atattaaggg ttctcgagag ctcgttttccg 4560
[0089]	acactggatg gcggcgtag tatcgaatcg acagcagtat agcgaccagc attcacatac 4620
[0090]	gattgacgca tgatattact ttctgcgcac ttaacttcgc atctgggcag atgatgtcga 4680
[0091]	ggcgaaaaaa aatataaatc acgctaacat ttgattaaaa tagaacaact acaatataaa 4740
[0092]	aaaactatac aatgacaag ttcttgaaaa caagaatctt tttattgtca gtactgatta 4800
[0093]	gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatatttcc atatcaggat tatcaatacc 4860
[0094]	atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgagc agttccatag 4920
[0095]	gatggcaaga tcttggtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat 4980
[0096]	taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttacc aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga 5040
[0097]	atccggtgag aatggcaaaa gcttatgcat ttctttccag acttggtcaa caggccagcc 5100
[0098]	attacgctcg tcatcaaaat cactcgcac aaccaaaccg ttattcattc gtgattgcgc 5160
[0099]	ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgtgtt aaaaggacaa ttacaaacag gaatcgaatg 5220
[0100]	caaccggcgc aggaacactg ccagcgcac aacaatattt tcacctgaat caggatattc 5280
[0101]	ttctaatacc tggaatgctg ttttgccggg gatcgcagtg gtgagtaacc atgcatcacc 5340
[0102]	aggagtacgg ataaaaatgct tgatggtcgg aagaggcata aattccgtca gccagtttag 5400
[0103]	tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct ttgccatgtt tcagaaacaa 5460
[0104]	ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc gcacctgatt gcccgacatt 5520
[0105]	atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta atcgcggcct 5580
[0106]	cgaaacgtga gtcttttctc taccatgggt tgtttatgtt cggatgtgat gtgagaactg 5640
[0107]	tatcctagca agattttaaa aggaagtata tgaaagaaga acctcagtgg caaatcctaa 5700
[0108]	ccttttatac ttctctacag gggcgcggcg tggggacaat tcaacgcgtc tgtgagggga 5760
[0109]	gcgtttcctc gctcgcaggt ctgcagcag gagccgtaat ttttgcttcg cgccgtgcgg 5820
[0110]	ccatcaaaat gtatggatgc aatgattat acatggggat gtatgggcta aatgtacggg 5880
[0111]	cgacagtcac atcatgcccc tgagctcgc acgtcaagac tgtcaaggag ggtattctgg 5940
[0112]	gcctccatgt cgctggccgg gtgaccggc ggggacgagg caagctaac agatctctag 6000
[0113]	acctaataac ttcgtatagc atacattata cgaagttata ttaagggtg tcgacctgca 6060
[0114]	gcgtacgaag gtgcctattg atgatctggc ggaatgtctg ccgtgccata gccatgcctt 6120
[0115]	cacatatagt 6130
[0116]	<210> 2
[0117]	<211> 40
[0118]	<212> DNA
[0119]	<213> Artificial Sequence
[0120]	<220>
[0121]	<223> pMEL13质粒的正向引物 6006-Fv
[0122]	<400> 2
[0123]	gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 40
[0124]	<210> 3
[0125]	<211> 27

[0126] <212> DNA  
 [0127] <213> Artificial Sequence  
 [0128] <220>  
 [0129] <223> pMEL13质粒的反向引物 6005-Rw  
 [0130] <400> 3  
 [0131] gatcatttat ctttactgc ggagaag 27  
 [0132] <210> 4  
 [0133] <211> 120  
 [0134] <212> DNA  
 [0135] <213> Artificial Sequence  
 [0136] <220>  
 [0137] <223> 识别XKS1基因的gRNA片段 XKS1-gRNA  
 [0138] <400> 4  
 [0139] tgcgcatggt tcggcgttcg aaacttctcc gcagtgaaag ataatgatc agagcccatt 60  
 [0140] ttagatttac gtttagagc tagaaatagc aagttaaagt aaggctagtc cgttatcaac 120  
 [0141] <210> 5  
 [0142] <211> 120  
 [0143] <212> DNA  
 [0144] <213> Artificial Sequence  
 [0145] <220>  
 [0146] <223> 重组修复XKS1基因的DNA片段 XKS1-repair  
 [0147] <400> 5  
 [0148] ggcggacgaa taagggggcc ctctcgagaa aaacaaaagg aggatgagat tagtacttta 60  
 [0149] aatagtgttg aataatttat catgacctga caagtacaca caaacacaga cacataatat 120  
 [0150] <210> 6  
 [0151] <211> 10447  
 [0152] <212> DNA  
 [0153] <213> Artificial Sequence  
 [0154] <220>  
 [0155] <223> 质粒Cas9-NAT  
 [0156] <400> 6  
 [0157] gacgaaaggg cctcgtgata cgcctathtt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60  
 [0158] cttagacgga tcgcttcct gtaacttaca cgcgctcgt atcttttaat gatggaataa 120  
 [0159] tttgggaatt tactctgtgt ttatttat ttatgttttg ttttggtt tagaaagta 180  
 [0160] aataaagaag gtagaagagt tacggaatga agaaaaaaaa ataaacaaag gtttaaaaaa 240  
 [0161] tttcaacaaa aagcgtactt tacatatata tttattagac aagaaaagca gattaatag 300  
 [0162] atatacatc gattaacgat aagtaaatg taaatcaca ggattttcgt gtgtggtcct 360  
 [0163] ctacacagac aagatgaaac aattcggcat taatacctga gagcaggaag agcaagataa 420  
 [0164] aagtagtat ttgttgccga tccccctaga gtcttttaca tcttcgaaa acaaaaacta 480  
 [0165] tttttcttt aatttcttt tttactttct atttttaatt tatatattta tattaaaaaa 540  
 [0166] tttaaattat aattattttt atagcacgtg atgaaaagga cccaggtggc acttttcggg 600  
 [0167] gaaatgtgcg cggaaccct atttgtttat ttttctaaat acattcaat atgtatccgc 660

[0168]	tcatgagaca	ataaccctga	taaattgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	720
[0169]	tccaacattt	ccgtgtcgcc	cttattccct	tttttgcgpc	attttgcctt	cctgtttttg	780
[0170]	ctcaccaga	aacgctggtg	aaagtaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtg	840
[0171]	gttacatcga	actggatctc	aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	900
[0172]	gtttccaat	gatgagcact	tttaaagttc	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgtattg	960
[0173]	acgccgggca	agagcaactc	ggtcgccgca	tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	1020
[0174]	actcaccagt	cacagaaaag	catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagt	1080
[0175]	ctgccataac	catgagtgat	aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	1140
[0176]	cgaaggagct	aaccgctttt	ttgcacaaca	tggggatca	tgtaactcgc	cttgatcgtt	1200
[0177]	gggaaccgga	gctgaatgaa	gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtag	1260
[0178]	caatggcaac	aacgttgcgc	aaactattaa	ctggcgaact	acttactcta	gcttcccggc	1320
[0179]	aacaattaat	agactggatg	gaggcggata	aagttgcagg	accacttctg	cgctcggccc	1380
[0180]	ttccgctgg	ctggtttatt	gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggt	1440
[0181]	tcattgcagc	actggggcca	gatggtaaag	cctcccgtat	cgtagttatc	tacacgacgg	1500
[0182]	ggagtcaggc	aactatggat	gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	1560
[0183]	ttaagcattg	gtaactgtca	gaccaagttt	actcatatat	acttttagatt	gatttaaaac	1620
[0184]	ttcattttta	atttaaaagg	atctaggtga	agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaa	1680
[0185]	tccttaacg	tgagttttcg	ttccactgag	cgtagacc	cgtagaaaag	atcaaaggat	1740
[0186]	cttcttgaga	tcctttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	1800
[0187]	taccagcgg	ggtttgtttg	ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	1860
[0188]	gcttcagcag	agcgcagata	caaataactg	tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	1920
[0189]	acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	acctcgtct	gctaactctg	ttaccagtgg	1980
[0190]	ctgctgccag	tgccgataag	tcgtgtctta	ccgggttga	ctcaagacga	tagttaccgg	2040
[0191]	ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	2100
[0192]	cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	gtgagctatg	agaaagcgc	acgcttccc	2160
[0193]	aaggagaaaa	ggcggacagg	tatccggtaa	gcggcagggt	cggaacagga	gagcgcacga	2220
[0194]	gggagcttcc	agggggaac	gcctggtatc	tttatagtc	tgctcgggtt	cgccacctct	2280
[0195]	gacttgagcg	tcgatttttg	tgatgctcgt	cagggggcg	gagcctatgg	aaaaacgcca	2340
[0196]	gcaacgcggc	ctttttacgg	ttcttgccct	tttctgccc	ttttgctcac	atgttctttc	2400
[0197]	ctgcgttata	cctgattct	gtggataacc	gtattaccgc	ctttgagtga	gctgataacc	2460
[0198]	ctcggccag	ccgaacgacc	gagcgcagcg	agtcagttag	cgaggaagcg	gaagagcgc	2520
[0199]	caatacga	accgcctctc	cccgcgcgtt	ggccgattca	ttaatgcagc	tgccacgaca	2580
[0200]	ggtttcccga	ctggaaagcg	ggcagtgagc	gcaacgcaat	taatgtgagt	tacctcactc	2640
[0201]	attaggcacc	ccaggcttta	cactttatgc	ttccgctcc	tatgttgtgt	ggaattgtga	2700
[0202]	gcggataaca	atttcacaca	gaaacagct	atgaccatga	ttacgccaag	cgcgcaatta	2760
[0203]	acctcacta	aagggaacaa	aagctggagc	tcatagcttc	aaaatgtttc	tactcctttt	2820
[0204]	ttactcttcc	agattttctc	ggactccgcg	catgccgta	ccacttcaaa	acaccaagc	2880
[0205]	acagcatact	aaatttcccc	tctttcttcc	tctagggtgt	cgtaatttac	ccgtactaaa	2940
[0206]	ggtttggaaa	agaaaaaaga	gaccgcctcg	tttctttttc	ttcgtcgaaa	aaggcaataa	3000
[0207]	aaatttttat	cacgtttctt	tttcttgaaa	attttttttt	tgattttttt	ctctttcgt	3060
[0208]	gacctcccat	tgatatttaa	gttaataaac	ggtcttcaat	ttctcaagtt	tcagtttcat	3120
[0209]	ttttctgtt	ctattacaac	tttttttact	tcttctcat	tagaaagaaa	gcatagcaat	3180

[0210]	ctaactaag	ttttctagaa	ctagtggatc	ccccgggaaa	aatggacaag	aagtactcca	3240
[0211]	ttgggctcga	tatcggcaca	aacagcgtcg	gttgggccgt	cattacggac	gagtacaagg	3300
[0212]	tgccgagcaa	aaaattcaaa	gttctgggca	ataccgatcg	ccacagcata	aagaagaacc	3360
[0213]	tcattggcgc	cctcctgttc	gactccgggg	agacggccga	agccacgcgg	ctcaaaagaa	3420
[0214]	cagcacggcg	cagatatacc	cgcagaaaga	atcggatctg	ctacctgcag	gagatcttta	3480
[0215]	gtaatgagat	ggctaagtg	gatgactctt	tcttccatag	gctggaggag	tccttttttg	3540
[0216]	tggaggagga	taaaaagcac	gagcgccacc	caatcttttg	caatatcgtg	gacgaggtgg	3600
[0217]	cgtaccatga	aaagtacca	accatatac	atctgaggaa	gaagcttgta	gacagtactg	3660
[0218]	ataaggctga	cttgcggttg	atctatctcg	cgctggcgca	tatgatcaaa	tttcggggac	3720
[0219]	acttctcat	cgagggggac	ctgaaccag	acaacagcga	tgctgacaaa	ctctttatcc	3780
[0220]	aactggttca	gacttacaat	cagcttttcg	aagagaacc	gatcaacgca	tccggagttg	3840
[0221]	acgcaaaagc	aatcctgagc	gctaggtgt	ccaatccc	gcggtcga	aacctcatcg	3900
[0222]	cacagctccc	tggggagaag	aagaacggcc	tgtttgtaa	tcttatcgcc	ctgtcactcg	3960
[0223]	ggctgacccc	caactttaa	tctaactcg	acctggccga	agatgccaag	cttcaactga	4020
[0224]	gcaaagacac	ctacgatgat	gatctcgaca	atctgctg	ccagatcg	gaccagtacg	4080
[0225]	cagacctttt	tttggcgga	aagaacctgt	cagacgcat	tctgctgagt	gatattctgc	4140
[0226]	gagtgaacac	ggagatcacc	aaagctccgc	tgagcgtag	tatgatcaag	cgctatgatg	4200
[0227]	agcaccacca	agacttgact	ttgctgaagg	cccttgctcag	acagcaactg	cctgagaagt	4260
[0228]	acaaggaaat	tttcttcgat	cagtctaaaa	atggctacgc	cggatacatt	gacggcggag	4320
[0229]	caagccagga	ggaattttac	aaatttatta	agccatctt	ggaaaaaatg	gacggcaccg	4380
[0230]	aggagctgct	ggtaaagctt	aacagagaag	atctgttcg	caaacagcgc	actttcgaca	4440
[0231]	atggaagcat	ccccaccag	attcacctgg	gcgaactgca	cgctatcctc	aggcggcaag	4500
[0232]	aggatttcta	cccctttttg	aaagataaca	gggaaaagat	tgagaaaatc	ctcacatttc	4560
[0233]	ggatacccta	ctatgtaggc	cccctcgccc	gggaaattc	cagattcg	tggatgactc	4620
[0234]	gcaaatcaga	agagaccatc	actccctgga	acttcgagga	agtcgtggat	aagggggcct	4680
[0235]	ctgcccagtc	cttcatcgaa	aggatgacta	actttgataa	aaatctgcct	aacgaaaagg	4740
[0236]	tgcttcttaa	acactctctg	ctgtacgagt	acttcacagt	ttataacgag	ctcaccaagg	4800
[0237]	tcaatacgt	cacagaagg	atgagaaagc	cagcattcct	gtctggagag	cagaagaaag	4860
[0238]	ctatcgtgga	cctcctcttc	aagacgaacc	ggaaagtac	cgtgaaacag	ctcaaagaag	4920
[0239]	actatttcaa	aaagattgaa	tgtttcgact	ctgttgaaat	cagcggagtg	gaggatcgtc	4980
[0240]	tcaacgcac	cctgggaacg	tatcacgac	tcctgaaaat	cattaaagac	aaggacttcc	5040
[0241]	tggacaatga	ggagaacgag	gacattcttg	aggacattgt	cctcacctt	acgttgtttg	5100
[0242]	aagataggga	gatgattgaa	gaacgcttga	aaacttacgc	tcatctcttc	gacgacaaag	5160
[0243]	tcatgaaaca	gctcaagagg	cgccgatata	caggatgggg	gcggtgtca	agaaaactga	5220
[0244]	tcaatgggat	ccgagacaag	cagagtggaa	agacaatcct	ggattttctt	aagtccgatg	5280
[0245]	gatttgccaa	ccggaacttc	atgcagttga	tccatgatga	ctctctcacc	tttaaggagg	5340
[0246]	acatccagaa	agcacaagtt	tctggccagg	gggacagtct	tcacgagcac	atcgctaatac	5400
[0247]	ttgcaggtag	cccagctatc	aaaaggga	tactgcagac	cgtaaggtc	gtggatgaac	5460
[0248]	tcgtcaaagt	aatgggaagg	cataagccc	agaatatcgt	tatcgagatg	gcccagagaga	5520
[0249]	accaaactac	ccagaaggga	cagaagaaca	gtagggaaag	gatgaagagg	attgaagagg	5580
[0250]	gtataaaaga	actgggttcc	caaatcctta	aggaacacc	agttgaaaac	accagcttc	5640
[0251]	agaatgagaa	gctctacctg	tactacctgc	agaacggcag	ggacatgtac	gtggatcagg	5700



[0252] aactggacat caatcggtc tccgactacg acgtggatca tatcgtgcc cagtcttttc 5760  
[0253] tcaaagatga ttctattgat aataaagtgt tgacaagatc cgataaaaat agaggggaaga 5820  
[0254] gtgataacgt cccctcagaa gaagttgtca agaaaatgaa aaattattgg cggcagctgc 5880  
[0255] tgaacgcaa actgatcaca caacggaagt tcgataatct gactaaggct gaacgaggtg 5940  
[0256] gcctgtctga gttggataaa gccggcttca tcaaaaggca gcttggttag acacgccaga 6000  
[0257] tcaccaagca cgtggcccaa attctcgatt cacgcatgaa caccaagtac gatgaaaatg 6060  
[0258] acaaactgat tcgagaggtg aaagttatta ctctgaagtc taagctggtc tcagatttca 6120  
[0259] gaaaggactt tcagttttat aaggtgagag agatcaacaa ttaccacat gcgcatgatg 6180  
[0260] cctacctgaa tgcagtggta ggcactgcac ttatcaaaaa atatcccaag cttgaatctg 6240  
[0261] aatttgttta cggagactat aaagtgtacg atgttaggaa aatgatcgca aagtctgagc 6300  
[0262] aggaaatagg caaggccacc gctaagtact tcttttacag caatattatg aattttttca 6360  
[0263] agaccgagat tacctggcc aatggagaga ttcggaagcg accacttate gaaacaaacg 6420  
[0264] gagaacagg agaaatcgtg tgggacaagg gtagggattt cgcgacagtc cggaaggtcc 6480  
[0265] tgtccatgcc gcaggtgaac atcgttaaaa agaccgaagt acagaccgga ggcttctcca 6540  
[0266] aggaaagtat cctcccghaa aggaacagcg acaagctgat cgcacghaaa aaagattggg 6600  
[0267] accccaagaa atacggcgga ttcgattctc ctacagtcgc ttacagtgta ctggttgtgg 6660  
[0268] ccaaagtgga gaaaggaag tctaaaaaac tcaaaagcgt caaggaactg ctgggcatca 6720  
[0269] caatcatgga gcgatcaagc ttcgaaaaaa accccatcga ctttctcgag gcgaaaggat 6780  
[0270] ataaagaggt caaaaaagac ctcatcatta agcttcccaa gtactctctc tttgagcttg 6840  
[0271] aaaacggccg gaaacgaatg ctgctagtg cgggcgagct gcagaaaggt aacgagctgg 6900  
[0272] cactgcctc taaatacgtt aatttctgt atctggccag ccaatagaa aagctcaaag 6960  
[0273] ggtctcccga agataatgag cagaagcagc tgttcgtgga acaacacaaa cactacctg 7020  
[0274] atgagatcat cgagcaata agcgaattct caaaagagt gatcctcgc gacgctaacc 7080  
[0275] tcgataaggt gctttctgct tacaataagc acagggataa gcccatcagg gagcagcag 7140  
[0276] aaaacattat ccaattgttt actctgacca acttgggcgc gcctgcagcc ttcaagtaact 7200  
[0277] tcgacaccac catagacaga aagcgttaca cctctacaaa ggaggtcctg gacgccacac 7260  
[0278] tgattcatca gtcaattacg gggctctatg aaacaagaat cgacctctc cagctcgggt 7320  
[0279] gagacagcag ggctgacccc aagaagaaga ggaaggtgtg atctcttctc gagtcatgta 7380  
[0280] attagttagt tcacgcttac attcacgcc tcccccaaca tccgctctaa ccgaaaagga 7440  
[0281] aggagttaga caacctgaag tctaggtccc tatttatttt tttatagtta tgttagtatt 7500  
[0282] aagaacgta tttatattc aaattttct ttttttctg tacagacgc tgtacgatg 7560  
[0283] taacattata ctgaaaacct tgcttgagaa ggttttggga cgctcgaagg ctttaatttg 7620  
[0284] cggccggtac ccaattcgcc ctatagtgag tcgtattacg cgcgctcact ggccgtcgtt 7680  
[0285] ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttaccaaac ttaatgcct tgcagcat 7740  
[0286] cccccttcg ccagctggcg taatagcga gagcccga ccgatcgcc ttccaacag 7800  
[0287] ttgacagcc tgaatggcga atggcgcgac gcgccctgta gcggcgcat aagcgcggcg 7860  
[0288] ggtgtggtg ttacgcgag cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct 7920  
[0289] ttcgcttct tcccttctt tctcgccag ttcgcccgt tccccgta agctctaaat 7980  
[0290] cgggggctcc ctttagggtt ccgatttagt gctttacgc acctcgacc caaaaaactt 8040  
[0291] gattaggtg atggttcac tagtgggcca tcgccctgat agacggttt tcgcccttg 8100  
[0292] acgttgagc ccacgttct taatagtgga ctctgttcc aaactggaac aacactcaac 8160  
[0293] cctatctcgg tctattctt tgatttataa gggatttgc cgatttcgac ctatttggtta 8220

[0294]	aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca	8280
[0295]	atctctgat gcggtatttt ctcttacgc atctgtcgg tatttcacac cgcataggca	8340
[0296]	agtgcacaaa caatacttaa ataaacta ctacagtaata acctatttct tagcattttt	8400
[0297]	gacgaaattt gctattttgt tagagtcttt tacaccattt gtctccacac ctccgcttac	8460
[0298]	atcaacacca ataacccat ttaatctaag cgcatcacca acattttctg gcgtcagtc	8520
[0299]	accagtaac ataaaaatgta agctttcggg gctctcttg cttccaacc agtcagaaat	8580
[0300]	cgagttccaa tccaaaagtt cacctgtccc acctgcttct gaatcaaaca agggataaa	8640
[0301]	cgaatgaggt ttctgtgaag ctgcactgag tagtatgttg cagtcttttg gaaatacgag	8700
[0302]	tcttttaata actggcaaac cgaggaactc ttggtattct tgccacgact catctccatg	8760
[0303]	cagttggacg atatcaatgc cgtaatcatt gaccagagcc aaaacatcct ccttaggtg	8820
[0304]	attacgaaac acgccaacca agtatttcgg agtgctgaa ctatttttat atgcttttac	8880
[0305]	aagacttgaa attttccttg caataaccgg gtcaattgag ttttcgacac tggatggcgg	8940
[0306]	cgtagtatc gaatcgacag cagtatagcg accagattc acatacgatt gacgcatgat	9000
[0307]	attactttct gcgcaactaa ctctgcactt gggcagatga tgctgaggcg aaaaaaata	9060
[0308]	taaatcacgc taacatttga ttaaaataga acaactaca tataaaaaa ctatacaaat	9120
[0309]	gacaagttct tgaaaacaag aatcttttta ttgtcagtac tgattagggg cagggcatgc	9180
[0310]	tcatgtagag gcctgctcg ccgtccgagg cggtgccgtc gtacagggcg gtgtccaggc	9240
[0311]	cgagagggt gaacccatc cgccggtac cgtggatcgc cggtgcttg acgttggtga	9300
[0312]	cctccagcca gaggtgccc gcgcccgcct cgcgggcga cctcgtcgc agcccatca	9360
[0313]	acgcgcgcc gacccgtgc ccccggtgct ccggggcgac ctgatgtcc tcgacgtca	9420
[0314]	gccggcggt ccagccggag tacgagacga ccacgaagc gccaggtcg ccgtcgtcc	9480
[0315]	cgtacgcgac gaacgtccg gagtccgggt cgccgtctc cccgtcgtc gattcgtcgt	9540
[0316]	ccgattcgtc gtcggggaac accttggtca gggcggggtc caccggcacc tcccaggg	9600
[0317]	tgaaccgtc cccggtggcg gtgacgcgga agacgggtc ggtggtgaag gaccatcca	9660
[0318]	gtgctcgtg ggctcggcg tccccggga cactggtcgc gtaccgtaa gccgtgtcgt	9720
[0319]	caagagtgg acctatggt gtttatgtc ggatgtgat tgagaactgt atcctagcaa	9780
[0320]	gatttataaa ggaagtatat gaaagaaga cctcagtgc aaatcctaac cttttatatt	9840
[0321]	tctctacagg ggcgcggcgt ggggacaatt caacgcgtc gtgaggggag cgtttccctg	9900
[0322]	ctcgcaggtc tgcagcgagg agccgtaatt tttgcttcgc gccgtgcgc catcaaatg	9960
[0323]	tatggatgca aatgattata catgggatg tatgggctaa atgtacggc gacagtcaca	10020
[0324]	tcatgccct gagctgcga cgtcaagact gtcaaggagg gtattctgg cctccatgc	10080
[0325]	gctggccggg tgaccggcg gggacaaggc aagctaaaca gatctacgta aggtgacaag	10140
[0326]	ctattttca ataaagaata tcttcaacta ctgccatct gcgtcataac tgcaaagtac	10200
[0327]	acatatatta cgatgtgtt ctattaaatg ctctctatat tatatatata gtaatgtcgt	10260
[0328]	ttatggtgca ctctcagtac aatctgctc gatgccgat agttaagcca gccccgac	10320
[0329]	ccccaacac ccgtgacgc gccctgacgg gcttgtctg tcccggcatc cgcttacaga	10380
[0330]	caagctgtga ccgtctccg gagctgatg tgctagagg tttaccgtc atcaccgaa	10440
[0331]	cgcgca 10447	
[0332]	<210> 7	
[0333]	<211> 20	
[0334]	<212> DNA	
[0335]	<213> Artificial Sequence	

- 
- [0336] <220>  
[0337] <223> 转化子基因组DNA的正向引物XKS1-dg-Fv  
[0338] <400> 7  
[0339] tagccgctga ggtgcataac 20  
[0340] <210> 8  
[0341] <211> 20  
[0342] <212> DNA  
[0343] <213> Artificial Sequence  
[0344] <220>  
[0345] <223> 转化子基因组DNA的反向引物XKS1-dg-Rw  
[0346] <400> 8  
[0347] tcgtccagtg cttccacatc 20

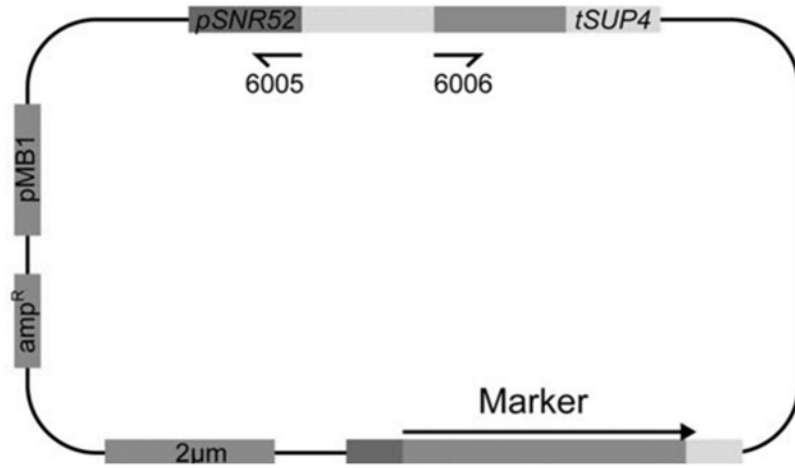


图1

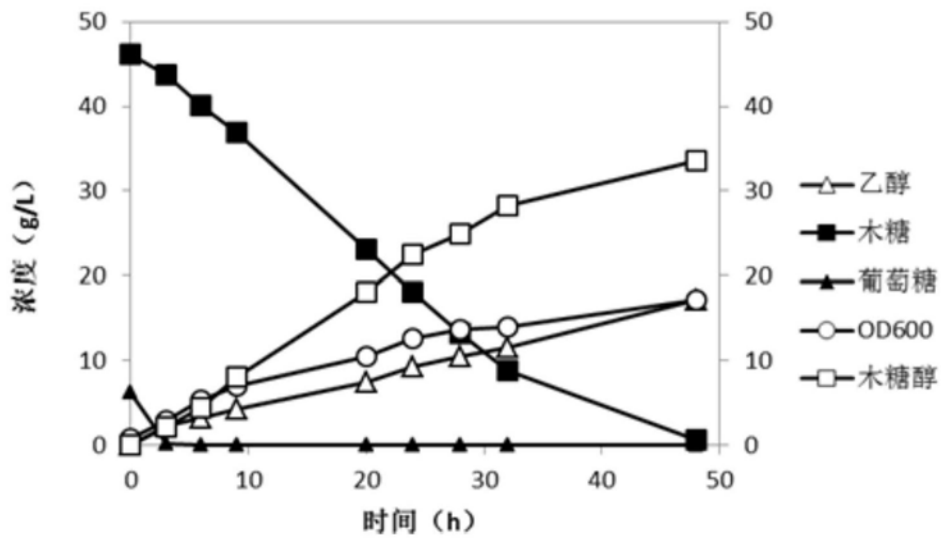


图2

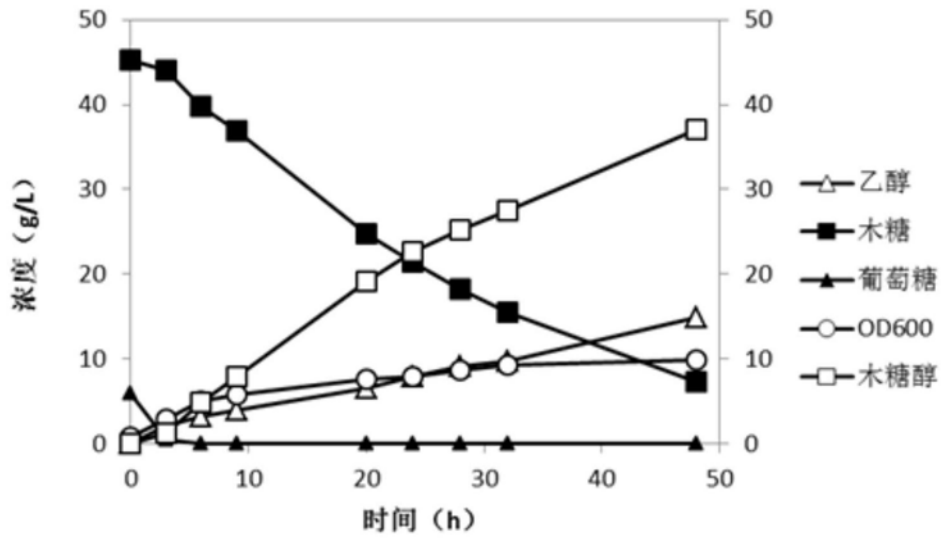


图3