



国家知识产权局

100085

北京市海淀区上地十街1号院6号楼2层213-37
北京元周律知识产权代理有限公司 罗丽莲(010-82062834-810)

发文日:

2021年12月17日



申请号或专利号: 202111531540.9

发文序号: 2021121702337360

专利申请受理通知书

根据专利法第28条及其实施细则第38条、第39条的规定,申请人提出的专利申请已由国家知识产权局受理。现将确定的申请号、申请日、申请人和发明创造名称通知如下:

申请号: 202111531540.9

申请日: 2021年12月14日

申请人: 中国科学院大连化学物理研究所

发明创造名称: 一种产3-羟基丙酸的工程菌及其构建方法与应用

经核实,国家知识产权局确认收到文件如下:

核苷酸或氨基酸序列表计算机可读载体 每份页数:0页 文件份数:1份

说明书核苷酸和氨基酸序列表 每份页数:14页 文件份数:1份

说明书附图 每份页数:3页 文件份数:1份

实质审查请求书 每份页数:1页 文件份数:1份

发明专利请求书 每份页数:4页 文件份数:1份

权利要求书 每份页数:2页 文件份数:1份 权利要求项数: 10项

说明书 每份页数:9页 文件份数:1份

向外国申请专利保密审查请求书 每份页数:1页 文件份数:1份

说明书摘要 每份页数:1页 文件份数:1份

提示:

1. 申请人收到专利申请受理通知书之后,认为其记载的内容与申请人所提交的相应内容不一致时,可以向国家知识产权局请求更正。
2. 申请人收到专利申请受理通知书之后,再向国家知识产权局办理各种手续时,均应当准确、清晰地写明申请号。
3. 国家知识产权局收到向外国申请专利保密审查请求书后,依据专利法实施细则第9条予以审查。

审查员: 自动受理

审查部门: 专利局初审及流程管理部



200101
2019.11

纸件申请, 回函寄: 100088 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 国家知识产权局受理处收
电子申请, 应当通过电子专利申请系统以电子文件形式提交相关文件。除另有规定外, 以纸件等其他形式提交的文件视为未提交。

发 明 专 利 请 求 书

_代理机构内部编号DD210675I				此框内容由国家知识产权局填写	
⑦ 发明名称	一种产 3-羟基丙酸的工程菌及其构建方法与应用			① 申请号 (发明)	
				②分案提交日	
				③申请日	
⑧ 发明人	发明人 1	周雍进	<input type="checkbox"/> 不公布姓名	④费减审批	
	发明人 2	禹伟	<input type="checkbox"/> 不公布姓名	⑤向外申请审批	
	发明人 3	曹选	<input type="checkbox"/> 不公布姓名	⑥挂号号码	
⑨第一发明人国籍 中国				居民身份证件号码 36042819841221271X	
⑩ 申 请 人	申请人 (1)	姓名或名称: 中国科学院大连化学物理研究所		用户代码	申请人类型 科研单位
		居民身份证件号码或统一社会信用代码/组织机构代码 12100000400012705A			电子邮箱
		<input checked="" type="checkbox"/> 请求费减且已完成费减资格备案			
		国籍或注册国家(地区) 中国			
		省、自治区、直辖市 辽宁省			
		市县 大连市			
		城区(乡)、街道、门牌号中山路 457 号			
	申请人 (2)	经常居所地或营业所所在地 中国		邮政编码116023	电话
		姓名或名称:		用户代码	申请人类型
		居民身份证件号码或统一社会信用代码/组织机构代码 <input type="checkbox"/> 请求费减且已完成费减资格备案			
		国籍或注册国家(地区)			
		省、自治区、直辖市			
		市县			
		城区(乡)、街道、门牌号			
	申请人 (3)	经常居所地或营业所所在地		邮政编码	电话
		姓名或名称:		用户代码	申请人类型
		居民身份证件号码或统一社会信用代码/组织机构代码 <input type="checkbox"/> 请求费减且已完成费减资格备案			
		国籍或注册国家(地区)			
		省、自治区、直辖市			
		市县			
		城区(乡)、街道、门牌号			
	经常居所地或营业所所在地		邮政编码	电话	

权 利 要 求 书

1、一种产 3-羟基丙酸的工程菌的构建方法，其特征在于，所述构建方法包括：

在宿主菌株中导入 *MCRC* 基因和 *MCRN* 基因，并将宿主菌株的 *EAS1* 基因的启动子 P_{EAS1} 替换为 P_{HXT1} ；

所述 *MCRC* 基因编码的多肽为来源于 *Chloroflexus aurantiacus* 的丙二酰-CoA 还原酶的 1-549 氨基酸；

所述 *MCRN* 基因编码的多肽为来源于 *Chloroflexus aurantiacus* 的丙二酰-CoA 还原酶的 550-1219 氨基酸的突变体 N940V/K1106W/S1114R；

所述宿主菌株选自酿酒酵母中的任一种。

2、根据权利要求 1 所述的构建方法，其特征在于，所述 *MCRC* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；

所述 *MCRN* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

3、根据权利要求 1 所述的构建方法，其特征在于，所述在宿主菌株中导入 *MCRC* 基因和 *MCRN* 基因选自(a)~(c)中的任一种：

(a) 将 DNA 片段 P_{GAL7} -*MCRN*- T_{DIT1} 整合到宿主菌株的 *XI-1* 位点；将含有 $P_{GAL1,10}$ -*MCRC*- T_{TDH2} 的游离型质粒转入宿主菌株；

(b) 将 DNA 片段 P_{GAL7} -*MCRN*- T_{DIT1} 整合到宿主菌株的 *XI-1* 位点；将含有 $P_{GAL1,10}$ -*MCRC*- T_{TDH2} 的游离型质粒转入宿主菌株；将 DNA 片段 P_{TDH3} -*MCRN*- T_{FBA1} - T_{DIT1} -*MCRC*- P_{TDH3} 整合到宿主菌株的 *XII-3* 位点；

(c) 将 DNA 片段 P_{GAL7} -*MCRN*- T_{DIT1} 整合到宿主菌株的 *XI-1* 位点；将 DNA 片段 P_{TDH3} -*MCRN*- T_{FBA1} - T_{DIT1} -*MCRC*- P_{TDH3} 整合到宿主菌株的 *XII-3* 位点；将 DNA 片段 T_{FBA1} -*MCRN*- $P_{GAL1,10}$ -*MCRC*- T_{DIT1} 整合到宿主菌株的 *XII-5* 位点。

4、根据权利要求 1 所述的构建方法，其特征在于，所述构建方法还包括强化中心碳代谢途径：

将 *MmACL*、*RtME*、*MDH3*、*CTP1*、*MPC1*、*MPC3*、*AnACLa*、*AnACLb*、*RtCIT1*、*IDP2*、*YHM2*、*GND1*、*TKL1*、*TAL1* 和 *ZWF1* 基因导入宿主菌株；

将宿主菌株的 *PYCI* 基因的启动子由 P_{PYCI} 替换为 P_{TEF} ；

将宿主菌株的 *PGII* 基因的启动子由 P_{PGII} 替换为 P_{COX9} ；

将宿主菌株的 *ACCI* 基因的启动子由 P_{ACCI} 替换为 P_{TEF} ；

将宿主菌株的 *IDH2* 基因的启动子由 P_{IDH2} 替换为 P_{GSY1} ；

优选地，所述构建方法还包括强化中心碳代谢途径：

将 DNA 片段 P_{TPP} -*MmACL*- T_{FBA1} - T_{CYC1} -*RtME*- P_{TDH3} - P_{HXT7} -*MDH3*- T_{TDH2} - T_{ADH1} -*CTP1*- P_{PGK1} 整合到宿主菌株的 *HIS3* 位点；

将宿主菌株的 *PYCI* 基因的启动子由 P_{PYCI} 替换为 P_{TEF} ；

将 DNA 片段 P_{TPH} -*MPC1*- T_{MPC1} - T_{DIT1} -*MPC3*- P_{PGK1} 整合到宿主菌株的 *X-4* 位点；

将 DNA 片段 T_{CYC1} -*AnACLa*- $P_{GAL1,10}$ -*AnACLb*- T_{ADH1} 整合到宿主菌株的 *X-2* 位点；

将 DNA 片段 P_{TPH} -*RtCIT1*- T_{FBA1} - T_{CYC1} -*IDP2*- P_{TDH3} - P_{TEF1} -*YHM2*- T_{GAL1} 整合到宿主菌株的 *GAL1*、*GAL7*、*GAL10* 基因位点，即整合该 DNA 片段的同时敲除 *GAL1*、*GAL7*、*GAL10* 三个基因；

将 DNA 片段 P_{COX9} - T_{CYC1} -*GND1*- P_{TDH3} - P_{HXT7} -*TKL1*- T_{TDH2} - T_{ADH1} -*TAL1*- P_{PGK1} - P_{TEF1} -*ZWF1*- T_{ZWF1} 整合到宿主菌株的

DD210675I

P_{PGII} 位点, 即整合 *GND1*、*TKL1*、*TAL1* 和 *ZWF1* 基因的同时把 *PGII* 启动子由 P_{PGII} 替换为 P_{COX9} ;

将宿主菌株的 *ACCI* 基因的启动子由 P_{ACCI} 替换为 P_{TEF} ;

将宿主菌株的 *IDH2* 基因的启动子由 P_{IDH2} 替换为 P_{GSY1} 。

5、根据权利要求 3 或 4 所述的构建方法, 其特征在于, 将 DNA 片段整合到宿主菌株或替换宿主菌株中基因的启动子通过采用 CRISPR/Cas9 技术实现。

6、根据权利要求 1 所述的构建方法, 其特征在于, 所述构建方法还包括回补 *URA3* 基因。

7、根据权利要求 1 所述的构建方法, 其特征在于, 所述构建方法还包括细胞融合形成双倍体。

8、根据权利要求 1 所述的构建方法, 其特征在于, 所述宿主菌株选自酿酒酵母 CEN.PK 113-11C、酿酒酵母 CEN. PK 110-10C 中的任一种。

9、根据权利要求 1~8 任一项所述的构建方法构建得到的产 3-羟基丙酸的工程菌。

10、根据权利要求 1~8 任一项所述的构建方法构建得到的产 3-羟基丙酸的工程菌、权利要求 9 所述的产 3-羟基丙酸的工程菌在制备 3-羟基丙酸中的应用。