

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192652 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.12(22) Дата подачи заявки
2020.03.24(51) Int. Cl. C40B 40/06 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)

(54) СПОСОБ КОНСТРУИРОВАНИЯ ХИМЕРНОЙ ПЛАЗМИДНОЙ БИБЛИОТЕКИ

(31) 2019-069798

(32) 2019.04.01

(33) JP

(86) PCT/JP2020/013133

(87) WO 2020/203496 2020.10.08

(71) Заявитель:

НЭШНЛ ЮНИВЕРСИТИ
КОРПОРЕЙШН КОБЕ
ЮНИВЕРСИТИ (JP)

(72) Изобретатель:

Цуге Кендзи, Исии Дзун, Кондо
Акихико (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение направлено на проблему предоставления нового способа получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток, посредством которого может быть эффективно сконструирована комбинаторная библиотека длинноцепочечных ДНК и облегчено подтверждение генотипа полученного клона. Настоящее изобретение относится к способу получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток, имеющего по меньшей мере один элемент ДНК-вставки, которая включает ДНК, содержащую ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине, и ДНК-вставку, в которой связаны единичные ДНК, причем способ характеризуется включением (А) стадии получения способом OGAB множества типов плазмид, имеющих элемент ДНК-вставки, в которых связано множество типов единичных ДНК, способных быть связанными в конкретном порядке связывания; (В) стадии расщепления плазмиды на единичные ДНК посредством обработки множества типов плазмид, полученных на стадии (А), ферментом рестрикции, пригодным для каждой плазмиды, и получения смешанной жидкости с множеством типов единичных ДНК; и (С) стадии получения фрагмента длинноцепочечной ДНК посредством повторной сборки единичных ДНК способом OGAB с использованием смешанной жидкости с множеством типов единичных ДНК, полученных на стадии (В).

A1

202192652

202192652

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 571165EA/072

СПОСОБ КОНСТРУИРОВАНИЯ ХИМЕРНОЙ ПЛАЗМИДНОЙ БИБЛИОТЕКИ

[Область техники]

[0001]

Настоящее изобретение относится к новому способу конструирования химерной плазмидной библиотеки.

[Уровень техники]

[0002]

В связи с прогрессом в синтетической биологии возрастает потребность в длинноцепочечной ДНК, в которой связаны множество генов. При конструировании последовательности для длинноцепочечной ДНК маловероятно, что представляющий интерес результат может быть достигнут посредством конструирования последовательности за один раз, поскольку обязательно необходимо изучить множество параметров экспрессии, таких как выбор используемого типа гена или выбор интенсивности экспрессии гена. Таким образом, во многих случаях конструирование последовательности проводят в условиях проведения цикла DBTL (цикл моделирования-конструирования-тестирования-изучения), в котором сначала моделируют длинноцепочечную ДНК, затем длинноцепочечную ДНК конструируют, затем длинноцепочечную ДНК тестируют, ее содержимое изучают, и конструируют новую ДНК на основе полученных данных. Для изучения множества параметров экспрессии одновременно в этом цикле DBTL является желательным с точки зрения эффективности способ комбинаторной библиотеки для отбора одного варианта выбора из множества вариантов выбора для каждого параметра экспрессии и связывания каждого из них для конструирования различных типов длинноцепочечных ДНК. Иными словами, проще установить направление моделирования ДНК для каждого параметра экспрессии в более коротком цикле путем одновременного конструирования и сравнения множества типов длинноцепочечных ДНК с варьированием каждого параметра экспрессии, чем сконструировать и протестировать только одну длинноцепочечную ДНК.

[0003]

Однако синтез длинноцепочечной ДНК, как правило, вовлекает расходы и отнимает время, и часто является трудным конструирование множества длинноцепочечных ДНК. Для конструирования длинноцепочечной ДНК используют способ сборки множества фрагментов генов для получения множества коротких фрагментов ДНК с функциональным элементом гена и т.п. в качестве индексного и связывание (сборку) их для конструирования, например, поскольку длина ДНК, которая может быть обеспечена посредством химического синтеза, составляет только приблизительно 200 оснований. Для этого типа способа сборки фрагментов ДНК были разработаны различные способы, включая способ OGAB (патентные документы 1: выложенная публикация Японии № 2004-129654, непатентный документ 1: Tsuge, K., et

al., Nucleic Acids Res.31, e133 (2003)), способ SLIC (непатентный документ 2: Li MZ, Elledge SJ (2007) Nature Methods 4:251-256), способ Golden Gate (непатентный документ 3: Engler, C. et al. PLoS ONE (2008)), способ Gibson Assembly (непатентный документ 4: Gibson, D. G., et al. Nat. Methods, 6, 343-345. (2009)), способ LCR (непатентный документ 5: de Kok, S. et al. ACS Synth. Biol. (2014)), способ сборки генов с использованием почкующихся дрожжей (непатентный документ 6: Gibson, D. G., et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 6, 105, 20404-20409, 2008) и т.п.

[0004]

Для легкого предоставления множества типов длинноцепочечной ДНК при низких расходах является возможным одновременное получение множества коротких фрагментов ДНК, каждый из которых имеет отличающийся параметр экспрессии, для применения в этой сборке генов и связывания их комбинационным образом с получением комбинаторной библиотеки. В описанном выше способе сборки генов разработан способ конструирования комбинаторной библиотеки.

[0005]

Кроме того, является необходимым, чтобы генотип длинноцепочечной ДНК соответствовал ее фенотипу, при тестировании комбинаторной библиотеки длинноцепочечной ДНК, обеспечиваемой этими способами, и изучении направления конструирования параметров экспрессии. В общепринятом конструировании комбинаторной библиотеки, главным образом, существует два способа. Первым способом является конструирование одного типа длинноцепочечной ДНК в виде одной генной сборки. В этом случае генную сборку с использованием отличающегося материала проводят индивидуально столько раз, чтобы присутствовало соответствие комбинаторной библиотеке. Этот способ имеет преимущество, состоящее в том, что является возможным быстрое получение соответствующего фенотипа даже без отдельного подтверждения генотипа в тесте, поскольку заранее может быть установлено, какая генная сборка приводит к какому генотипу. Однако этот способ имеет недостаток, состоящий в том, что трудно увеличить масштаб. Вторым способом является смешение всех материалов, подлежащих применению в комбинаторной библиотеке, и конструирование библиотеки с одной генной сборкой. Этот способ имеет преимущество, состоящее в том, что может быть без труда получена крупномасштабная комбинаторная библиотека. Однако является необходимым индивидуальное подтверждение последовательности оснований посредством секвенирования, чтобы знать генотип клона, отобранного из этой библиотеки, и чем длиннее цепь ДНК, тем больше времени отнимает подтверждение последовательности оснований. Таким образом, этот способ имеет проблему, состоящую в том, что этот тест представляет собой скорость-определяющую стадию.

[Список литературы]

[Патентная литература]

[0006]

[PL1] Выложенная публикация Японии № 2004-129654 (патент Японии № 4479199)

[Непатентные документы]

[0007]

[NPL 1] Tsuge, K., et al., Nucleic Acids Res.31, e133, 2003

[NPL 2] Li MZ, Elledge SJ, Nature Methods 4:251-256, 2007

[NPL 3] Engler, C. et al. PLoS ONE, 2008

[NPL 4] Gibson, D. G., et al. Nat. Methods, 6, 343-345., 2009

[NPL 5] de Kok, S. et al. ACS Synth. Biol., 2014

[NPL 6] Gibson, D. G., et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 6, 105, 20404-20409, 2008

[Сущность изобретения]

[Техническая проблема]

[0008]

В этих обстоятельствах проблемой, решаемой посредством настоящего изобретения, является предоставление нового способа получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток, посредством которого может быть эффективно сконструирована комбинаторная библиотека длинноцепочечной ДНК и посредством которого может быть быстро получена комбинаторная библиотека длинноцепочечной ДНК для следующего цикла DBTL даже без подтверждения последовательности оснований, которое является скоростью-определяющей стадией.

[Решение проблемы]

[0009]

Является предпочтительным использование способа сборки множества фрагментов генов, как описано выше, для эффективного конструирования комбинаторной библиотеки длинноцепочечной ДНК. Однако, независимо от типа способа сборки генов, является важной сборка фрагментов генов в равном количестве, иными словами, важно, чтобы молярная концентрация всех фрагментов генов была равной. Однако трудно эффективно сконструировать комбинаторную библиотеку, состоящую из множества вариантов выбора, с использованием способа сборки генов, поскольку является трудным довести молярную концентрацию множества фрагментов генов, в частности, более 10, до равной молярной концентрации.

[0010]

Фрагменты генов, которые являются материалами для проведения сборки генов, как правило, необходимо получать по одному для каждого фрагмента. Кроме того, при объединении этих фрагментов так, чтобы они присутствовали в равной молярной концентрации, концентрацию по массе ДНК измеряют и количество, подлежащее добавлению, определяют посредством вычисления на основе длины фрагмента ДНК. Однако является чрезвычайно трудным точно объединить фрагменты в эквимольных концентрациях вследствие ошибки измерения концентрации ДНК, ошибки при отборе ДНК в пипетку и т.п. Между тем, когда сборку, которая находится в состоянии плазмиды после сборки, расщепляют ферментом рестрикции до исходного материала, полученный материал находится в идеальном эквимольном состоянии. Авторы настоящего

изобретения обнаружили, что, если его фактически вновь использовать для сборки, эффективность сборки повышается в 100 раз или более по сравнению описанным выше случаем, где фрагменты ДНК вручную объединяют и собирают (Tsuge, NAR, 2003). Более того, в случае сборки, которая расщеплена на выбранные фрагменты путем расщепления ферментом рестрикции, даже когда последовательность оснований выбранных фрагментов не идентифицирована, присутствие фактической ДНК позволяет конструирование комбинаторной библиотеки путем смешения выбранных фрагментов с выбранным фрагментом, происходящим из другой сборки, полученной аналогичным образом. У авторов настоящего изобретения из этого результата возникла идея осуществления высокоэффективного способа конструирования комбинаторной библиотеки длинноцепочечной ДНК по настоящему изобретению.

[0011]

В частности, в результате тщательного исследования для решения описанной выше проблемы, подлежащей решению, авторы настоящего изобретения использовали описанный выше способ так, чтобы все соотношения между молярными концентрациями фрагментов ДНК, которые используются для сборки комбинаторной библиотеки, были близки к 1 насколько это возможно, в способе сборки генов с использованием плазмидной системы трансформации *Bacillus subtilis* (способ OGAB). В частности, выбранные фрагменты генов, подлежащие включению в комбинаторную библиотеку, связывают в нить для конструирования затравочной плазмиды. Кроме того, конструируют другие затравочные плазмиды для других выбранных фрагментов генов для получения затравочных плазмид, количество типов которых является таким же, как и максимальное количество вариантов выбора. Расщепление каждой затравочной плазмиды ферментом рестрикции обеспечивает раствор, в котором фрагменты генов смешаны в эквимольном состоянии. Эквимольность этого раствора сохраняется, даже когда его смешивают с другой затравочной плазмидой. Затем различные фрагменты генов, содержащиеся в таком растворе, подвергают линейному связыванию с получением полимерной ДНК в состоянии псевдотандемных повторов, в котором периодически встречается часть плазмидного вектора, и эта ДНК используется для трансформации *Bacillus subtilis*. Комбинаторную библиотеку эффективно конструируют путем циркуляризации в организме *Bacillus subtilis* с использованием гомологии с частью плазмидного вектора.

[0012]

Этот способ имеет признак, состоящий в том, что фрагменты генов в равной молярной концентрации, необходимые для конструирования комбинаторной библиотеки, могут быть без труда и непременно получены, и масштаб конструирования библиотеки может быть увеличен в большей степени, чем когда-либо ранее. Кроме того, с использованием этого способа можно конструировать комбинаторную библиотеку длинноцепочечной ДНК следующего цикла даже без подтверждения генотипа полученной плазмиды. В частности, настоящее изобретение может быть обобщено следующим образом.

[0013]

[1] Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток, причем фрагмент ДНК имеет по меньшей мере один элемент ДНК-вставки, содержащий: ДНК, содержащую ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине; и ДНК-вставку, в которой единичные ДНК связаны, отличающийся тем, что способ включает:

(А) получение множества типов плазмид способом OGAB, где плазмиды содержат элемент ДНК-вставки, в котором связано множество типов единичных ДНК, способных быть связанными в определенном порядке связывания;

(В) обработку множества типов плазмид, полученных на стадии (А), ферментом рестрикции, пригодным для расщепления каждой плазмиды на единичные ДНК и получения растворов со смесью множества типов единичных ДНК; и

(С) повторную сборку единичных ДНК способом OGAB с использованием растворов со смесью множества типов единичных ДНК, полученных на стадии (В), с получением фрагмента длинноцепочечной ДНК.

[2] Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробной клетки согласно [1], отличающийся тем, что все соотношения между молярными концентрациями для фрагментов ДНК в растворах со смесью единичных ДНК, полученных на стадии (В), составляют от 0,8 до 1,2.

[3] Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток согласно [1] или [2], отличающийся тем, что на стадии (А) количество типов единичных ДНК, содержащихся в одном типе элемента ДНК-вставки, составляет от 3 до 60.

[4] Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток согласно любому из [1]-[3], где количество типов ферментов рестрикции, используемых на стадии (В), составляет три или менее.

[5] Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток согласно любому из [1]-[4], где фермент рестрикции представляет собой фермент рестрикции, который образует выступающий конец.

[6] Плазида, содержащая фрагмент ДНК для трансформации микробных клеток, полученный способом получения согласно любому из [1]-[5].

[7] Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток, причем фрагмент ДНК имеет по меньшей мере один элемент ДНК-вставки, содержащий: ДНК, содержащую ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине; и ДНК-вставку, в которой связаны единичные ДНК, отличающийся тем, что способ включает:

(В') обработку множества типов плазмид согласно [6] ферментом рестрикции, пригодным для каждой плазмиды, для расщепления плазмид на единичные ДНК и получения множества типов растворов со смесью единичных ДНК; и

(С) повторную сборку единичных ДНК способом OGAB с использованием растворов со смесью единичных ДНК, полученных на стадии (В'), с получением

фрагмента длинноцепочечной ДНК.

[8] Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток согласно [7], отличающийся выбором множества типов плазмид, содержащих полученный фрагмент длинноцепочечной ДНК, и повторное использование плазмид в качестве плазмид на стадии (В').

[9] Способ конструирования химерной плазмидной библиотеки с использованием способа получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток согласно [1]-[5], [7] и [8].

[Преимущественные эффекты изобретения]

[0014]

В соответствии с настоящим изобретением, является возможным быстрое и эффективное конструирование комбинаторной библиотеки длинноцепочечных ДНК. Также является возможным повторное использование множества плазмид, которые выбраны из одной и той же библиотеки и последовательности оснований которых не подтверждены, для конструирования новой химерной библиотеки.

[Краткое описание чертежей рисунков]

[0015]

[Фиг.1] На фиг.1 представлена структура pGETS302—SfiI-pBR, который представляет собой плазмидный вектор для сборки.

[Фиг.2] На фиг.2 представлена детальная структура единичной ДНК, составляющей элемент вставки.

[Фиг.3] На фиг.3 представлен искусственный метаболический путь почкующихся дрожжей, который предназначен для продуцирования изобутанола на высоком уровне.

[Фиг.4] На фиг.4 схематически представлен способ конструирования химерной плазмидной библиотеки по настоящему изобретению.

[Фиг.5] На фиг.5 представлено направление единичного гена в каждой плазмиде в первой химерной плазмидной библиотеке, полученной способом по настоящему изобретению, и продуцирование изобутанола.

[Фиг.6] На фиг.6 представлены стадии конструирования новой комбинаторной библиотеки с плазмидой, используемой для трансформации в качестве затравочной плазмиды.

[Фиг.7] На фиг.7 представлено направление единого гена в каждой плазмиде во второй химерной плазмидной библиотеке, полученной способом по настоящему изобретению, и продуцирование изобутанола.

[Описание вариантов осуществления]

[0016]

Настоящее изобретение подробно описано в настоящем описании далее. Как используют в рамках изобретения, молекулярно-биологический подход можно выполнять посредством способа, описанного в обычных экспериментальных руководствах, известных специалистам в данной области, или способа, эквивалентного ему, если

конкретно и явно не указано иное. Кроме того, термины, используемые в настоящем описании, подразумеваются в значении, которое часто используется в данной области, если конкретно не указано иное.

[0017]

<Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток>

Настоящее изобретение относится к новому способу получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток, посредством которого комбинаторная библиотека длинноцепочечных ДНК может быть эффективно сконструирована, и посредством которого может быть без труда сконструирована новая комбинаторная библиотека даже без подтверждения генотипа полученного клона. В частности, указанный способ получения представляет собой способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток, имеющего по меньшей мере один элемент ДНК-вставки, содержащий: ДНК, содержащую ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине; и ДНК-вставку, в которой связаны единичные ДНК, отличающийся тем, что способ включает:

(А) получение множества типов плазмид способом OGAB, где плазмиды содержат элемент ДНК-вставки, в котором связано множество типов единичных ДНК, способных связываться в определенном порядке связывания;

(В) обработку множества типов плазмид, полученных на стадии (А), ферментом рестрикции, пригодным для расщепления каждой плазмиды на единичные ДНК и получения множества типов растворов со смесью единичных ДНК; и

(С) повторную сборку единичных ДНК способом OGAB с использованием множества типов растворов со смесью единичных ДНК, полученных на стадии (В), с получением фрагмента длинноцепочечной ДНК.

[0018]

Настоящее изобретение относится к способу, где ДНК (плазмидный вектор), содержащую ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине, и элемент ДНК-вставки, содержащий ДНК-вставку, получают в качестве множества единичных ДНК, имеющих структуру, в которой они могут быть поочередно связаны, причем единичные ДНК связаны с образованием фрагмента ДНК, который имеет по меньшей мере один элемент ДНК-вставки и имеет по меньшей мере две единичных ДНК, которые являются идентичными, затем проводят сокультивирование фрагмента ДНК и компетентной клетки микроорганизма-хозяина, плазмидную ДНК собирают из микроорганизма с получением комбинаторной библиотеки, и плазмидная ДНК, отобранная из комбинаторной библиотеки, может быть использована в качестве затравочной плазмиды для новой библиотеки.

[0019]

В рамках настоящего изобретения элемент ДНК-вставки относится к элементу, который содержит: ДНК, содержащую ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине; и ДНК-вставку. Фрагмент ДНК для трансформации микробных

клеток содержит один или более элементов ДНК-вставки. Более того, элемент ДНК-вставки при необходимости может включать соответствующую последовательность оснований в дополнение к ДНК, содержащей ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине, и ДНК-вставку. Например, когда плазмиду для экспрессии гена, содержащегося в ДНК-вставке, создают способом по настоящему изобретению, элемент ДНК-вставки может содержать последовательность оснований, которая контролирует транскрипцию и трансляцию, такую как промоторы, операторы, активаторы или терминаторы. В частности, промоторы, используемый в хозяине, включает промотор для первичного метаболита системы гликолиза и т.п.

[0020]

В рамках настоящего изобретения ДНК, содержащая ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине, может представлять собой любую ДНК при условии, что ДНК реплицируется в микроорганизме, который может быть трансформирован полученным фрагментом ДНК. В качестве микроорганизма по настоящему изобретению используют бактерии, которые принадлежат роду *Bacillus*. Примеры конкретного микроорганизма и ДНК, содержащей ориджин репликации, эффективный в микроорганизме, включают *B. subtilis* (*Bacillus subtilis*) и ДНК, имеющую механизм репликации Θ -типа, которая конкретно включает последовательность ориджина репликации и т.п., содержащуюся в плазмиде, такой как pTB19 (Imanaka, T., et al. *J. Gen. Microbioi.* 130, 1399-1408. (1984)) или pLS32 (Tanaka, T and Ogra, M. *FEBS Lett.* 422, 243-246. (1998), pAM β 1 (Swinfield, T. J., et al. *Gene* 87, 79-90. (1990)).

[0021]

В рамках настоящего изобретения ДНК-вставка относится к ДНК, подлежащей клонированию, и ее тип и размер конкретно не ограничены. ДНК может представлять собой любой тип ДНК, который представляет собой не только встречающуюся в природе последовательность прокариотического организма, эукариотического организма, вируса и т.п., но также искусственно сконструированную последовательность. Тип ДНК конкретно не ограничен. Предпочтительно, ДНК включает группу генов, составляющую серию метаболических путей, группу генов антисмысловой РНК, предназначенной для инактивации экспрессии гена, присутствующего в организме-хозяине, смесь как группы генов метаболических путей, так и группы антисмысловых РНК, и т.п. ДНК-вставка по настоящему изобретению имеет структуру, в которой единичные ДНК связаны.

[0022]

В рамках настоящего изобретения единичные ДНК имеют структуру, в которой они могут быть повторяющимся образом связаны друг с другом при сохранении порядка. Единичные ДНК, которые связаны по порядку, составляют фрагмент ДНК, который представляет собой одну ДНК-вставку. Длина цепи ДНК в единичном фрагменте ДНК конкретно не ограничена. Связывание друг с другом при сохранении порядка означает, что единичные ДНК, имеющие последовательности, соседние друг с другом, на ДНК-вставке связаны при сохранении порядка и направления. Кроме того, связывание

повторяющимся образом означает, что 5'-конец единичной ДНК, имеющей последовательность оснований 5'-конца ДНК-вставки, и 3'-конец единичной ДНК, имеющей последовательность оснований 3'-концевой ДНК-вставки, связаны. Конкретные примеры таких единичных ДНК включают фрагменты ДНК, имеющие концы, которые могут быть повторяющимся образом связаны друг с другом при сохранении порядка с использованием комплементарности между последовательностями оснований на выступающих концах фрагментов. Структура этого выступающего конца, включая отличия в форме выступающего конца между 5'-концевым выступающим концом и 3'-концевым выступающим концом, конкретно не ограничена при условии, что она не является палиндромной структурой (палиндром). В этом отношении, является предпочтительным, чтобы выступающий конец мог быть получен посредством расщепления ферментом рестрикции при получении единичной ДНК. Если в качестве фермента рестрикции используют фермент, способный распознавать конкретную последовательность и создавать выступающий конец любой последовательности вблизи распознаваемой последовательности, выступающие концы единичных фрагментов ДНК могут различаться на каждом участке связывания, так что порядок связывания сохраняется. Примеры такого фермента рестрикции включают TALEN и ZNF, которые являются искусственными ферментами рестрикции или связанными со способом CRISPR ферментами, способными создавать выступающий конец, такими как CRISPR-Cpf1 и т.п. в дополнение к основным ферментам рестрикции, используемых для молекулярной биологии. Является предпочтительным применение фермента рестрикции типа II, такого как AarI, AlwNI, BbsI, BbvI, BcoDI, BfuAI, BglI, BsaI, BsaXI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BspMI, BspQI, BtgZI, DraIII, FokI, PflMI, SfaNI или SfiI.

[0023]

Что касается количества типов ферментов рестрикции, используемых для создания выступающего конца, расщепление посредством одного типа фермента рестрикции является предпочтительным для расщепления одной единичной ДНК. Не все единичные ДНК обязательно должны быть получены посредством расщепления одним и тем же типом фермента рестрикции. Однако лучше, чтобы общее количество типов используемых ферментов рестрикции было меньшим, где предпочтительными являются три или менее типов, более предпочтительными являются два или менее типов, и еще более предпочтительным является один тип.

[0024]

Одна или более единичных ДНК среди единичных ДНК, составляющих элемент ДНК-вставки, должны содержать ориджин репликации, эффективный в клетке-хозяине. Остальные единичные ДНК представляют собой элементы, составляющие непрерывную последовательность оснований, такую как кластер метаболического пути, часть или целую непрерывную геномную последовательность организма, искусственный ген или искусственный генный цикл, и отсутствует ограничение, что одна единичная ДНК должна соответствовать биологически функциональному элементу.

[0025]

Способ получения единичной ДНК может представлять собой любой способ при условии, что он может создавать единичную ДНК по настоящему изобретению. Например, фрагмент ДНК, амплифицированный посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймера, в который добавлена последовательность распознавания ферментом рестрикции, который создает выступающий конец в последовательности оснований на матричной ДНК, или химически синтезированный фрагмент ДНК, включающий последовательность распознавания ферментом рестрикции для получения любой выступающей последовательности на конце заранее и т.п., клонируют в плазмидный вектор и используют после подтверждения последовательности оснований. Каждая единичная ДНК сконструирована так, чтобы связываться в определенном порядке, чтобы в конечном итоге получить желаемый фрагмент ДНК для трансформации микробных клеток. Количество (тип) единичных ДНК, которые связывают для получения представляющей интерес ДНК-вставки, составляет от 3 до 60 (типов), предпочтительно от 5 до 50 (типов), более предпочтительно от 8 до 25 (типов) и еще более предпочтительно от 10 до 20 (типов).

[0026]

Каждая стадия способа получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток по настоящему изобретению далее подробно описана.

[0027]

[Стадия (A)]

На стадии (A) в способе получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток по настоящему изобретению получают так называемую затравочную плазмиду. Затравочная плазида должна иметь структуру, где соответствующая последовательность распознавания ферментом рестрикции внесена на или вблизи границы между единичными ДНК, в соответствии с каждой конструкцией, так чтобы плазида после конструирования сборки могла быть разделена на единичные фрагменты ДНК с учетом стадии (B) и стадии (C). Является предпочтительным использование фермента, способного создавать выступающий конец с любой последовательностью, такого как AarI, AlwNI, BbsI, BbvI, BcoDI, BfuAI, BglI, BsaI, BsaXI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BspMI, BspQI, BtgZI, DraIII, FokI, PflMI, SfaNI или SfiI, в качестве фермента рестрикции. Множество выступающих последовательностей, полученных посредством процессинга этими ферментами рестрикции, должны представлять собой уникальную последовательность в одной затравочной плазмиде. Кроме того, группа затравочных плазмид должна иметь одну и ту же выступающую последовательность в одной и той же цепи и в одном и том же порядке в элементе рекомбинации комбинаторной библиотеки (хотя единичная ДНК часто соответствует указанному элементу, рекомбинационный элемент может состоять из множества единичных ДНК в некоторых затравочных плазидах).

[0028]

При конструировании затравочной плазмиды OGAB, в частности, также является

возможным создание фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток путем связывания (лигирования) с использованием ДНК-лигазы и т.п. в растворах со смесями единичных ДНК, где все из описанных единичных ДНК доведены до практически эквимольного состояния. В этом отношении исходный материал для сборки гена не ограничивается только каждой из описанных выше единичных ДНК. Можно использовать сборку, полученную любым способом сборки, при условии, что она в конечном итоге имеет структуру, которая может быть разделена на каждую единичную ДНК, как описано выше. В этом случае, практически эквимольный означает, что все соотношения между молярными концентрациями для фрагментов ДНК в растворах со смесями единичных ДНК находятся в диапазоне от 0,8 до 1,2, предпочтительно в диапазоне от 0,9 до 1,1, более предпочтительно в диапазоне от 0,95 до 1,05, еще более предпочтительно 1,0. Все соотношения между молярными концентрациями для фрагментов ДНК в растворах со смесями единичных ДНК, находящимися в описанном выше числовом диапазоне величин, могут быть также перефразированы как величина, полученная путем деления наибольшей величины концентрации единичных ДНК, содержащихся в растворах со смесями единичных ДНК, на наиболее низкую величину, находящаяся в диапазоне от 1,0 до 1,5, находящуюся в диапазоне от 1,0 до 1,2, составляющую 1,0-1,1, или составляющую 1,0.

[0029]

Единичная ДНК затравочной плазмиды, полученной на этой стадии, может представлять собой любую форму, такую как кластер генов, ген или фрагмент гена.

[0030]

Хотя способ связывания единичных ДНК конкретно не ограничен, предпочтительно проводить связывание в присутствии полиэтиленгликоля и соли. В качестве соли является предпочтительной соль одновалентного щелочного металла. В частности, является более предпочтительным проведение связывания в растворе для реакции лигирования, содержащем 10% полиэтиленгликоль 6000 и 250 мМ хлорид натрия. Кроме того, хотя концентрация каждой единичной ДНК в реакционном растворе конкретно не ограничена, предпочтительно, чтобы каждая единичная ДНК имела концентрацию 1 фмоль/мкл или более и была эквимольной. Хотя фермент, температура реакции и время лигирования конкретно не ограничены, предпочтительным является лигирование с ДНК-полимеразой Т4 при 37°C в течение 30 минут или более.

[0031]

Микроорганизм-хозяин для фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток по настоящему изобретению конкретно не ограничен при условии, что он имеет естественную способность к трансформации. Такой микроорганизм включает микроорганизм, который имеет естественную способность к трансформации для процессинга ДНК в одноцепочечную ДНК для захвата ДНК и т.п. В частности, включены бактерии, которые принадлежат роду *Bacillus*, бактерии, которые принадлежат роду *Streptococcus*, бактерии, которые принадлежат роду *Haemophilus*, бактерии, которые принадлежат роду *Neisseria*, и т.п. Более того, бактерии, которые принадлежат роду

Bacillus, включают *B. subtilis* (*Bacillus subtilis*), *B. megaterium* (*Bacillus megaterium*), *B. stearothermophilus* (*Bacillus stearothermophilus*) и т.п. Наиболее предпочтительный микроорганизм среди них включает *Bacillus subtilis*, имеющие превосходную природную способность к трансформации и способность к рекомбинации.

[0032]

В качестве способа преобразования микробной клетки в компетентную может быть выбран известный способ, пригодный для каждого микроорганизма. В частности, например, является предпочтительным использование способа, описанного в Anagnostopoulou, C. and Spizizen, J. J. *Bacteriol.*, 81, 741-746 (1961), для *Bacillus subtilis*. Кроме того, в качестве способа трансформации может использоваться любой способ, пригодный для каждого микроорганизма. Количество жидкости в продукте лигирования, вводимом в компетентную клетку, также конкретно не ограничено. Предпочтительно это количество составляет от 1/20 до равного количества, и более предпочтительно половинное количество относительно культуры компетентных клеток. В качестве способа очистки плазмиды от трансформации также может использоваться известный способ.

[0033]

Может быть подтверждено, что плазида, полученная описанным выше способом, имеет представляющую интерес ДНК-вставку, по паттерну размера фрагментов, полученных посредством расщепления ферментом рестрикции, способом ПЦР или способом секвенирования. Кроме того, когда ДНК-вставка имеет функцию, такую как продуцирование вещества, подтверждение может быть осуществлено посредством обнаружения функции.

[0034]

Для коррекции затравочной плазмиды, используемой для конструирования комбинаторной библиотеки, может использоваться любой способ при условии, что он представляет собой обычный способ очистки кольцевой плазмиды. Является желательным способ со снижением риска контаминации посредством ДНК, отличной от плазмидной ДНК. В частности, предпочтительным является способ ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия-бромид этидия.

[0035]

[Стадия (В)]

Эта стадия представляет собой обработку множества типов плазмид (затравочные плазмиды), полученных на стадии (А) ферментом рестрикции, пригодным для расщепления каждой плазмиды на единичные ДНК и получения множества типов растворов со смесями единичных ДНК. Множество типов плазмид (затравочных плазмид), полученных на стадии (А), очищают до высокой чистоты, а затем расщепляют на единичные ДНК. Для расщепления на единичные ДНК, соответствующий фермент рестрикции может быть выбран в зависимости от конструкции на стадии (А).

[0036]

Что касается количества типов ферментов рестрикции, используемых для создания

выступающего конца, для расщепления одной единичной ДНК является предпочтительным расщепление одним типом фермента рестрикции. Не все единичные ДНК обязательно должны быть получены посредством расщепления тем же типом фермента рестрикции. Однако лучше, чтобы общее количество типов используемых ферментов рестрикции было меньшим, где предпочтительными являются три или менее типов, более предпочтительными являются два или менее типов, или еще более предпочтительным является один тип.

[0037]

Растворы со смесями единичных ДНК, полученные на этой стадии, являются свободными от фрагмента ДНК, отличного от плазмиды, поскольку затравочные плазмиды очищают до чрезвычайно высокой чистоты. Полученную длинноцепочечную ДНК расщепляют ферментом рестрикции и фермент рестрикции удаляют, посредством чего могут быть получены растворы с фрагментами ДНК (растворы со смесями единичных ДНК), в которых все соотношения между молярными концентрациями фрагментов ДНК максимально близки к 1.

[0038]

[Стадия (C)]

Эта стадия представляет собой повторную сборку единичных ДНК способом OGAB с использованием множества типов растворов со смесями единичных ДНК, полученных на стадии (B), для получения фрагмента длинноцепочечной ДНК. Является возможным более эффективное проведение сборки гена путем проведения способа сборки гена (способ OGAB) с использованием растворов фрагментов ДНК (растворы со смесями единичных ДНК), полученных на стадии (B), в которых все соотношения между молярными концентрациями для фрагментов ДНК максимально близки к 1, в качестве исходного материала. Пояснение для стадии (A) может быть применено к способу повторной сборки единичных ДНК посредством способа OGAB с использованием растворов со смесями единичных ДНК на этой стадии.

[0039]

Более того, настоящее изобретение также относится к способу получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток, причем ДНК имеет по меньшей мере один элемент ДНК-вставки, содержащий: ДНК, содержащую ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине; и ДНК-вставку, в которой связаны единичные ДНК, отличающийся тем, что способ включает:

(B') обработку множества типов плазмид, полученных описанным выше способом по настоящему изобретению, ферментом рестрикции, пригодным для расщепления каждой плазмиды на единичные ДНК и получения множества типов растворов со смесями единичных ДНК; и

(C) повторную сборку единичных ДНК способом OGAB с использованием растворов со смесями единичных ДНК, полученных на стадии (B'), с получением фрагмента длинноцепочечной ДНК.

[0040]

Множество типов плазмид, содержащих фрагмент длинноцепочечной ДНК, полученный описанным выше способом по настоящему изобретению, может быть выбрано и повторно использовано в качестве плазмид на стадии (В').

[0041]

Настоящее изобретение также относится к плазмиде, содержащей фрагмент ДНК для трансформации микробных клеток, полученный описанным выше способом получения по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к способу конструирования химерной плазмидной библиотеки с использованием способа получения по настоящему изобретению.

[Примеры]

[0042]

Настоящее изобретение конкретно описано в примерах ниже. Однако настоящее изобретение не ограничивается этими примерами.

[0043]

Обычный способ тестирования и т.п., например, реагенты, используемые в примерах, являются следующими.

В качестве хозяина *Bacillus subtilis* использовали штамм RM125 (Uozumi, T., et al. *Mo. Gen. Genet.*, 152, 65-69 (1977)) и его производный штамм, штамм BUSY9797. В качестве плазмидного вектора, способного к репликации в *Bacillus subtilis*, использовали pGET118 (Kaneko, S., et al. *Nucleic Acids Res.* 31, e112 (2003)). Карбенициллин, который является антибиотиком, приобретали от Wako Pure Chemical Industries. Тетрациклин, который является антибиотиком, приобретали от Sigma. SfiI и BspQI, которые являются ферментами рестрикции, приобретали от NEB. ДНК-лигазу T4 приобретали от Takara Bio. Для обычного лигирования для конструирования плазмиды для *Escherichia coli* использовали набор Takara Ligation Kit (Mighty) (Takara Bio). Для реакции ПЦР для получения единичной ДНК использовали полимеразу KOD plus от TOYOBO. Между тем, для ПЦР колоний для секвенирования ДНК, клонированной в плазмиду, использовали Ex-Taq HS, производимую Takara Bio. pMD-19 (простая) приобретали от Takara Bio. В качестве Plasmid Safe, который представляет собой фермент для очистки кольцевой плазмиды, использовали продукт, производимый EPICENTER. 2-гидроксиэтилагарозу, которая представляет агарозный гель с низкой температурой плавления для электрофореза ДНК, приобретали от Sigma. Агарозу UltraPure от Invitrogen использовали для других распространенных агарозных гелей для электрофореза. Использовали фенол:хлороформ:изоамиловый спирт 25:24:1 и ТЕ-насыщенный фенол (содержащий 8-хинолинол), произведенный Nacalai Tesque. Лизоцим приобретали от Wako Pure Chemical Industries. В качестве компонента среды использовали среду LB и агар, производимый Becton Dickinson. Использовали IPTG (изопропил β -D-тиогалактопиранозид), производимый Wako Pure Chemical Industries. Для всех других компонентов сред и биохимических реагентов использовали продукты, производимые Wako Pure Chemical

Industries.

[0044]

Для конструирования плазмиды, которая конкретно не указана, использовали либо штамм DH5 α *Escherichia coli*, либо штамм JM109, либо штамм TOP10. Для очистки малого количества сконструированной плазмиды от *Escherichia coli* использовали набор QIAprep Spin Miniprep Kit от Qiagen, в то время как для очистки большого количества использовали набор QIAfilter Midi Kit от Qiagen. Для очистки ДНК от раствора фермента рестрикции использовали набор MinElute Reaction Cleanup Kit от Qiagen или набор QIAquick PCR purification Kit от Qiagen. Для очистки из геля блока, полученного после разделения на обычном агарозном гель-электрофорезе, использовали набор MinElute Gel Extraction Kit от Qiagen. В качестве ультраследового спектрофотометра использовали nano-drop 2000 от Thermo. Для секвенирования использовали генетический анализатор 3130xl, который представляет собой флуоресцентный автоматический секвенатор, производимый Applied Biosystems.

[0045]

Другие общеизвестные манипуляции с ДНК проводили в соответствии со стандартным протоколом (Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)). Трансформацию *Bacillus subtilis* и экстракцию плазмиды способом OGAB и т.п. проводили в соответствии с известным способом (Tsuge, K., et al., *Nucleic Acids Res.* 31, e133. (2003)).

[0046]

1. Получение элемента ДНК-вставки

(1) Конструирование плазмидного вектора для сборки

pGETS302—SfiI-pBR, плазмидный вектор для сборки, представляет собой челночный плазмидный вектор *Escherichia coli*-*Bacillus subtilis*-дрожжей, который имеет ориджин репликации pBR322 *Escherichia coli*, *repA*, который представляет собой ориджин репликации, функциональный в *Bacillus subtilis*, и ARS4 и CEN6, способные к репликации в почкующихся дрожжах. Она представляет собой плазмиду, сконструированную посредством многостадийных процессов на основе pGETS109 (Tsuge, et. al., *Nucleic Acids Res.*, 31, e133. (2003)). На фиг.1 представлена его структура и под SEQ ID NO: 1 представлена его последовательность оснований. Участок клонирования для гена, подлежащего сборке, находится между двумя участками расщепления SfiI, и для сборки используется наибольший фрагмент SfiI размером 15 т.п.н. Для селекции в *Escherichia coli* использовали ампициллин. К 5 мкг этой плазмиды добавляли стерильную воду, так что общий объем составлял 40 мкл, с последующим добавлением 5 мкл 10x буфера NEB2.1, прилагаемого к ферменту рестрикции, и 5 мкл фермента рестрикции SfiI (NEB), и осуществлением реакции их смеси при 50°C в течение 2 часов. Полученную жидкость подвергали разделению посредством гель-электрофореза на агарозе с низкой температурой плавления, затем фрагмент остова вектора размером приблизительно 15 т.п.н. вырезали из геля, представляющий интерес фрагмент ДНК очищали, затем фрагмент ДНК растворяли

в 20 мкл ТЕ, 1 мкл раствора собирали и концентрацию в нем определяли с использованием ультраследового спектрофотометра.

[0047]

(2) Способ конструирования выступающей последовательности единичной ДНК

В качестве единичных ДНК, составляющих один элемент-вставку, существует всего 14 фрагментов, включающих pGETS302, который представляет собой вектор для сборки, как показано на фиг.2. Существует всего 12 генов, составляющих группу, вовлеченную в метаболический путь изобутанола в почкующихся дрожжах. Эти гены определяют как 1-12-я единичная ДНК по порядку. *kanMX4*, который выступает в качестве селективного маркера для трансформации в почкующихся дрожжах, определяют как 13-ю единичную ДНК, и вектор для сборки определяют как 14-ю единичную ДНК. 1-14-я единичные ДНК являются соседними в порядке в соответствии с номером, и они формируют структуру, в которой 14-я единичная ДНК и 1-я единичная ДНК связаны, тем самым образуя один элемент вставки. Конец каждого элемента ДНК имеет 3 уникальных 3'-концевых выступающих основания, которые указываются для каждого номера единичной ДНК как слева, так и справа от фрагмента. С использованием этой комплементарности обозначают партнера по связыванию. Конкретная конфигурация является следующей. (14-я единичная ДНК)-GTT-(1-я единичная ДНК)-TGA-(2-я единичная ДНК)-CGA-(3-я единичная ДНК)-TGT-(4-я единичная ДНК)-GAT-(5-я единичная ДНК)-TTG-(6-я единичная ДНК)-GTC-(7-я единичная ДНК)-ATG-(8-я единичная ДНК)-TGG-(9-я единичная ДНК)-TAG-(10-я единичная ДНК)-ACT-(11-я единичная ДНК)-GTA-(12-я единичная ДНК)-CTT-(13-я единичная ДНК)-TCT-(14-я единичная ДНК).

[0048]

2. Регуляция уровня экспрессии генов в почкующихся дрожжах из группы изобутанол-продуцирующих генов

(1) Почкующиеся дрожжи

Почкующиеся дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) представляют собой эукариотический микроорганизм. Исследование почкующихся дрожжей было внедрено в качестве эукариотического модельного микроорганизма, его геномная последовательность была полностью установлена, и была собрана различная информация. Почкующиеся дрожжи осуществляют спиртовую ферментацию в качестве анаэробного дыхания. Почкующиеся дрожжи используются для ферментации пива, вина, японского саке и т.п. в течение длительного времени, и широко используются в качестве хозяев для продуцирования биоэтанола вследствие их высокой способности к продуцированию этанола. В настоящее время почкующиеся дрожжи также широко используются для промышленных целей в качестве хозяев для производства полезных веществ, отличных от этанола, и также используются для продуцирования дополнительных полезных продуктов, таких как красители, отдушки или добавки, в дополнение к высшим спиртам, имеющим цепь из трех или более атомов углерода, или различным органическим

кислотам. В отличие от бактерий, которые являются прокариотами, почкующиеся дрожжи, которые являются эукариотами, имеют органеллы, такие как митохондрии или ядро. Кроме того, поскольку почкующиеся дрожжи, как правило, имеют моноцистронный формат экспрессии вместо полицистронного формата экспрессии, для одного гена требуется один промотор. Например, для экспрессии 12 генов требуется 12 промоторов.

[0049]

(2) Конструирование метаболического пути изобутанола

Основным применением изобутанола является применение в качестве растворителя для органического синтеза, растворителя для удаления краски и исходного материала для изобутилметакрилата. Кроме того, изобутанол может быть конвертирован в изобутилен посредством дегидратации, может использоваться в качестве исходного материала для агента топливной смеси или реактивного биотоплива, такого как этил-трет-бутиловый эфир (ЕТБЕ), и может далее использоваться в качестве исходного материала для различных полимеров посредством конвертирования изобутилена в изооктен (диизобутилен). Хотя почкующиеся дрожжи первоначально продуцируют этанол в качестве основного продукта, почкующиеся дрожжи немного продуцируют изобутанол в качестве сивушного спирта. На фиг.3 представлен искусственный метаболический путь для почкующихся дрожжей, которые предназначены для продуцирования изобутанола на высоком уровне. Если два гена (например, *kivd*, происходящий из *Lactococcus lactis*, и *ADH6*, происходящий из почкующихся дрожжей), кодирующих декарбоксилазу кетокислот (KDC) и алкогольдегидрогеназу (ADH), добавить к 2-кетоизовалерату в метаболическом пути L-валина в почкующихся дрожжах, продуцирование изобутанола возрастает. Таким образом, эти гены добавляли к объекту сборки. Однако изобутанол не может эффективно продуцироваться по множеству причин, таких как то, что 2-кетоизовалерат является субстратом, который первоначально продуцируется в митохондриях, или NADPH, требуемый для редуктоизомеразы кетол-кислота (ILV5) и *ADH6*, является дефицитным. Таким образом, три гена, кодирующих ацетолактатсинтазу (ILV2), редуктоизомеразу кетол-кислота (ILV5) и дегидратазу дигидроксикислот (ILV3), составляющие путь от пировиноградной кислоты до 2-кетоизовалерата (метаболический путь, указанный двойной линией на фиг.3), который осуществляется в митохондрии, и яблочный фермент (MAE1) для коррекции уровня NADPH в митохондриях, т.е. всего четыре гена (гены, указанные двойной подчеркнутой линией на фиг.3), добавляли в объект сборки для повышения экспрессии этих генов. Более того, три гена: *ilv2CEс*, *ilvDL1* и *alsLp*, добавляли к объекту сборки так, чтобы метаболический путь описанных выше генов также конструировался на стороне цитоплазмы, и три гена фиксирующего угольную кислоту фермента (PYC2), яблочной дегидрогеназы (MDH2) и *sMAE1*, из которых удален сигнал митохондриальной локализации на N-конце яблочного фермента (MAE1), добавляли к объекту сборки для устранения дефицита NADPH в цитоплазме, иными словами, к объекту сборки добавляли всего шесть генов (гены, указанные однократным подчеркиванием на фиг.3). Каждый из описанных выше 12 генов вносили с

промотором и терминатором первичного метаболического каскада, способными к экспрессии в дрожжах на высоком уровне.

[0050]

(3) Затравочная плаزمида 1: конструирование набора из группы сверхэкспрессирующихся генов

Экспрессирующие кассеты с использованием 12 типов промоторов и терминаторов конструировали так, чтобы 12 генов могли экспрессироваться в почкующихся дрожжах. В частности, промоторы и терминаторы ADH1, FBA1, HXT7, PDC1, PGK1, SED1, TDH1, TDH2, TDH3, TEF1, TEF2 и TPI1 использовали для конструирования 12 типов экспрессирующих кассет (стрелки на ORF гена на фиг.4 указывают на промоторную последовательность, в то время как указатели в виде булавок указывают на последовательность терминатора). Последовательность (...atgAGAAGAGCTCTTCAtaa...), в которой два участка BspQI размещены обратным образом, добавляли между промотором и терминатором каждой экспрессирующей кассеты, так чтобы часть от иницирующего кодона (ATG) до стоп-кодона (TAA) гена, подлежащего встраиванию, могла быть субклонирована. Для промотора PDC1 и промотора TDH2, в качестве промотора промотора PDC1 и промотора TDH2 использовали последовательность, в которой G в положении -492 был заменен на C, и последовательность, в которой C в положении -462 был заменен на G, соответственно, для удаления участков BspQI, содержащихся в последовательности. Участок фермента рестрикции (участок SfiI), сконструированный так, чтобы уникальный 3'-концевой выступающий конец из 3 оснований, указанный для каждого номера единичной ДНК, появлялся после расщепления SfiI, был добавлен к левой и правой концевым последовательностям 12 типов экспрессирующих кассет, содержащих промотор и терминатор, и последовательность конструировали так, чтобы партнер по связыванию определялся посредством комплементарности. Эти экспрессирующие кассеты, содержащие 12 типов промоторов и терминаторов, были предназначены для клонирования в вектор pMA или pMK. Далее были выбраны *ilvEc*, *ilvDL1*, *alsLp*, *kivd*, *ILV3*, *ILV5*, *ADH6*, *PYC2*, *ILV2*, *MDH2*, *maeBEc* и *sMAE1* в качестве 12 генов, составляющих группу, вовлеченную в метаболический путь изобутанола в почкующихся дрожжах, и последовательность модифицировали так, чтобы иницирующий кодон и стоп-кодон каждого гена были унифицированы как ATG и TAA, соответственно. Эти гены также конструировали так, чтобы в них была добавлена последовательность (TAGGCTCTTCAatg...taaAGAAGAGCCTA), в которой участок BspQI помещен на обоих концах, так чтобы эти гены могли быть субклонированы в любую из 12 типов экспрессирующих кассет (фиг.2). Эти гены, имеющие участок BspQI на обоих концах, конструировали так, чтобы клонировать их в вектор PCR-BluntII-TOPO. Наконец, конструировали всего 12 типов сверхэкспрессирующих кассет (*ilvCEc*-1st, *ilvDL1*-2nd, *alsLp*-3rd, *kindEc*-4th, *ILV3*-5th, *ILV5*-6th, *ADH6*-7th, *PYC2*-8th, *ILV2*-9th, *MDH2*-10th, *maeBEc*-11th и *sMAE1*-12th) (SEQ ID NO: 2-13), так чтобы *ilvEc*, *ilvDL1*, *alsLp*, *kivd*, *ILV3*, *ILV5*, *ADH6*, *PYC2*, *ILV2*, *MDH2*, *maeBEc* или *sMAE1* были встроены в каждый из

участков BspQI 12 типов экспрессирующих кассет, имеющих промоторы и терминаторы ADH1, FBA1, HXT7, PDC1, PGK1, SED1, TDH1, TDH2, TDH3, TEF1, TEF2 и TPI1, клонированные в рМА или рМК. Кроме того, фрагмент KanMX (kanMX4-13th) добавляли в качестве 13-го фрагмента (SEQ ID NO: 14) для обеспечения селекции с использованием агента в почкующихся дрожжах.

[0051]

(4) Затравочная плазмида 2: конструирование набора из группы генов, подавляющих экспрессию

Хотя использовали ту же последовательность промотора и терминатора, что и для конструирования (3) затравочной плазмиды 1: набора из группы сверхэкспрессирующихся генов, фрагмент ORF каждого гена, подлежащего встраиванию, конструировали так, чтобы он имел противоположное направление относительно набора из группы сверхэкспрессирующихся генов. В частности, плазмиду, организованную так, чтобы она была способной к субклонированию части от иницирующего кодона (ATG) до стоп-кодона (TAA) гена, подлежащего встраиванию между промотором и терминатором каждой экспрессирующей кассеты, который был сконструирован в (3), расщепляли BspQI и последовательность, в которой участки BspQI размещены в обратном направлении, вновь связывали с ней, тем самым получая плазмиду с измененной выступающей последовательностью (подчеркнутая последовательность ...atgtttaAGAAGAGCTCTTCAcattaa...). Последовательности оснований подавляющих экспрессию кассет (ilvCEc-as-1st, ilvDL1-as-2nd, alsLp-as-3rd, kindEc-as-4th, ILV3-as-5th, ILV5-as-6th, ADH6-as-7th, PYC2-as-8th, ILV2-as-9th, MDH2-as-10th, maeBEc-as-11th, и sMAE1-as-12th), полученных посредством этих процессов, представлены в SEQ ID NO: 15-26. Что касается единичной ДНК, единичные ДНК затравочной плазмиды 2, следовательно, являются более длинными, чем единичные ДНК затравочной плазмиды 1, на шесть оснований выступающей последовательности, которые были вновь внесены. Тот же маркер, что и у затравочной плазмиды 1, использовали для KanMX, который является маркером для селекции с агентом.

[0052]

(5) Конструирование затравочной плазмиды

Ген (область ORF) амплифицировали из почкующихся дрожжей (штамм YPH499) с использованием способа ПЦР. Сначала использовали праймеры, в которые был добавлен участок распознавания для фермента рестрикции, определенный выше, на 5'-конце праймеров для амплификации последовательности ДНК между комбинациями выступающих концов, определенных выше, в положении для вырезания желаемого выступающего конца, и в которых была дополнительно добавлена последовательность TAG на 5'-конец. Фрагмент ДНК сконструированной области амплифицировали из генома почкующихся дрожжей с использованием пары этих праймеров. Условия реакции ПЦР определялись добавлением для каждой реакции (50 мкл): 5 мкл 10x буфера KOD Plus Ver. 2, 3 мкл 25 mM MgSO₄, 5 мкл dNTP (по 2 mM каждого), 1 мкл KOD Plus (1 единица/мкл),

48 пг ДНК фага лямбда (ТОУОВО), 15 пмоль праймеров (F-праймер и R-праймер, соответственно) и стерильной воды, и реакцию проводили с использованием системы GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) в соответствии со следующей программой. После инкубации при 94°C в течение 2 минут проводили 30 циклов, каждый из которых включал 98°C в течение 10 секунд, 55°C в течение 30 секунд и 68°C в течение 1 минуты, и конечную инкубацию проводили при 68°C в течение 7 минут.

[0053]

К амплифицированному фрагменту ДНК применяли напряжение 100 В (приблизительно 8 В/см) с использованием устройства для гель-электрофореза общего назначения (i-MyRun.N, система электрофореза нуклеиновых кислот, Cosmo Bio) и подвергали электрофорезу в течение 1 часа в присутствии 1х буфера ТАЕ (буфер Tris-ацетат-EDTA) в 0,7% агарозном геле с низкой температурой плавления (2-гидроксиэтилагароза типа VII, Sigma), посредством чего плазмидный вектор и единичные ДНК разделяли. Этот гель для электрофореза окрашивали 100 мл 1х буфера ТАЕ, содержавшего 1 мкг/мл бромида этидия (Sigma), в течение 30 минут и освещали ультрафиолетовыми лучами с длиной волны (366 нм) для визуализации, после чего продукт ПЦР, имевший представляющий интерес размер, вырезали с использованием лезвия и собирали в 1,5-мл пробирку. К собранному агарозному гелю с низкой температурой плавления (приблизительно 300 мг) добавляли 1х буфер ТАЕ, так чтобы общий объем составлял приблизительно 700 мкл, который затем поддерживали при постоянной температуре 65°C в течение 10 минут, тем самым растворяя гель. Затем добавляли равное количество ТЕ-насыщенного фенола (Nacalai Tesque) и хорошо перемешивали для деактивации фермента рестрикции. Смесь разделяли на фенольную фазу и водную фазу посредством центрифугирования (20000×g, 10 минут), и водную фазу (приблизительно 900 мкл) собирали в новую 1,5-мл пробирку. К ней добавляли 500 мкл 1-бутанола (Wako Pure Chemical Industries) и хорошо перемешивали, а затем проводили разделение посредством центрифугирования (20000×g, 1 минута) и удаления насыщенного водой 1-бутанола. Это действие повторяли до тех пор, пока объем водной фазы не составил 450 мкл или менее, тем самым уменьшая объем водной фазы. Добавляли 50 мкл 3 М буфера на основе ацетата калия-уксусной кислоты (pH 5,2) и 900 мкл этанола и проводили центрифугирование (20000×g, 10 минут) для преципитации ДНК, которую затем ополаскивали 70% этанолом и растворяли в 20 мкл ТЕ (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Эту собранную ДНК хранили при -20°C до применения.

[0054]

Полученный фрагмент ДНК клонировали в плазмидный вектор *Escherichia coli* способом клонирования с ТА, представленным ниже. 1 мкл 10х буфера Ex-Taq, прилагаемого к Ex-Taq, который представляет собой фермент для реакции ПЦР от TAKARA, 0,5 мкл 100 mM dATP, и 0,5 мкл Ex-Taq добавляли к 8 мкл фрагмента ДНК, и эту смесь поддерживали при постоянной температуре 65°C в течение 10 минут, чтобы тем самым добавить выступающий конец А к 3'-концу фрагмента ДНК. 1 мкл pMD19-Simple

от TAKARA и 3 мкл стерильной воды смешивали с 1 мкл этого раствора фрагмента ДНК, затем к нему добавляли 5 мкл смеси TAKATA Ligation (Mighty) Mix, и смесь поддерживали при постоянной температуре 16°C в течение 30 минут. 5 мкл этого раствора для лигирования добавляли к 50 мкл химически компетентных клеток DH5α *Escherichia coli*, и смесь поддерживали при постоянной температуре на льду в течение 15 минут, затем ее подвергали тепловому шоку при 42° в течение 30 секунд, оставляли ее на льду в течение 2 минут, а затем к ней добавляли 200 мкл среды LB. Смесь поддерживали при постоянной температуре 37°C в течение 1 часа, затем распределяли на чашке с LB, содержащей 1,5% агар и содержащей карбенициллин в концентрации 100 мкг/мл, и культивировали в течение ночи при 37°C, посредством чего получали трансформант плазмиды.

[0055]

Полученную колонию обрабатывали с использованием реагента для получения матричной ДНК для ПЦР (реагент для получения ДНК Cica geneus®, Kanto Kagaku). В частности, получали 2,5 мкл раствора, в котором реагент а и реагент b из набора реагентов были смешаны в соотношении 1:10, и небольшую часть колонии на чашке, собранную с использованием зубочистки, суспендировали в растворе, а затем суспензию обрабатывали при 72°C в течение 6 минут, а затем ее обрабатывали при 94°C в течение 3 минут. К полученной жидкости добавляли 2,5 мкл 10х фермента для TAKARA Ex-Taq, 2 мкл 2,5 мМ раствора dNTP, 0,25 мкл праймера M13F в концентрации 10 пмоль/мкл, 0,25 мкл праймера M13R в концентрации 10 пмоль/мкл, 17 мкл стерильной воды, и 0,5 мкл Ex-TaqHS, и смесь инкубировали при 94°C в течение 5 минут с последующим проведением 30 циклов, каждый из которых состоял из 98°C в течение 20 секунд, 55°C в течение 30 секунд и 72°C в течение 1 минуты, для амплификации ДНК. Последовательность оснований этого продукта ПЦР анализировали для исследования того, совпадает ли она полностью с желаемой последовательностью. В результате, правильная последовательность была получена для всех клонов.

[0056]

Каждый из трансформантов *Escherichia coli*, имевших плазмиду, в которую был клонирован фрагмент ДНК, имевший желаемую последовательность, культивировали в 2 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл карбенициллина при 37°C и 120 об/мин в течение ночи. Полученную микробную массу очищали с использованием набора QIAfilter Plasmid miniKit (Qiagen) в соответствии с руководством. Полученную плазмиду расщепляли BspQI и область ORF собирали путем фракционирования по размеру с использованием электрофореза.

[0057]

Thermo Fisher просили синтезировать ДНК (для сверхэкспрессии согласно фиг.2), так чтобы фрагменты ДНК, в которых промотор и терминатор дрожжей связаны в участке BspQI, можно было вырезать в участке SfiI. Эти фрагменты ДНК доставляли в ходе клонирования в плазмидный вектор pAM или pMK. Эту плазмиду расщепляли BspQI и

фрагмент BspQI описанной выше ORF, связывали с ней с получением конструкции, которая имела форму плазмиды, имевшей единичные ДНК затравочной плазмиды 1. Последовательности этих единичных фрагментов ДНК являются такими, как показано в SEQ ID NO: 2-13. Для затравочной плазмиды 2 описанные выше фрагменты ДНК, клонированные в рМА или рМК, в которых промотор и терминатор связаны в участке BspQI, расщепляли посредством BspQI и вносили линкерную ДНК, тем самым получая новую конструкцию как и в конструкции для подавления экспрессии согласно фиг.2. Эту плазмиду расщепляли посредством BspQI и фрагмент BspQI описанной выше ORF вносили для получения конструкции. Каждый из трансформантов *Escherichia coli*, имевших эти плазмиды, в которые был клонирован фрагмент ДНК, имевший желаемую последовательность, культивировали в 2 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл карбенициллина, при 37°C и 120 об/мин в течение ночи. Полученную микробную массу очищали с использованием набора QIAfilter Plasmid miniKit (Qiagen) в соответствии с руководством. 10 мкл полученной плазмиды фракционировали, добавляли 30 мкл стерильной воды, 5 мкл 10х буфера #2 NEB, и 5 мкл фермента рестрикции SfiI (NEB), и смеси позволяли реагировать при 50°C в течение 2 часов, тем самым отделяя единичные фрагменты ДНК от плазмидного вектора. К полученному продукту применяли напряжение 50 В (приблизительно 4 В/см) с использованием устройства для гель-электрофореза общего назначения, и подвергали электрофорезу в течение 1 часа в присутствии 1х буфера TAE в 0,7% агарозном геле с низкой температурой плавления, посредством чего плазмидный вектор и единичные ДНК разделяли. Этот гель для электрофореза окрашивали 100 мл 1х буфера TAE, содержавшего 1 мкг/мл бромида этидия (Sigma), в течение 30 минут и освещали ультрафиолетовым лучом с длиной волны (366 нм) для визуализации, после чего участок размером приблизительно 3 т.п.н. вырезали с использованием лезвия и собирали в 1,5-мл пробирку. Собранный агарозный гель с низкой температурой плавления (приблизительно 300 мг) очищали описанным выше образом и растворяли в 20 мкл ТЕ. Единичную ДНК-плазмиду, полученную таким образом, количественно определяли с использованием флуоресцентного устройства считывания планшетов для SYBR GreenII, который представляет собой флуоресцентный краситель для нуклеиновой кислоты, с использованием калибровочной кривой, созданной на основе серии разведений коммерчески доступной ДНК генома фага-лямбда (TOYOBO).

[0058]

(6) Сборка гена

11 мкл 2х буфера для лигирования добавляли к 10 мкл раствора со смесью, содержавшего 0,1 фмоль или более единичных ДНК SEQ ID NO: 2-14 для сборки затравочной плазмиды 1 или единичных ДНК SEQ ID NO: 14-26 для сборки затравочной плазмиды 2 и рGETS302-SfiI (SEQ ID NO: 1), который представляет собой вектор для сборки гена, в эквимоларных количествах. Всю смесь поддерживали при постоянной температуре 37°C в течение 5 минут с последующим добавлением 1 мкл ДНК-лигазы T4

(Takara) и поддержанием смеси при постоянной температуре 37°C в течение 4 часов. Из нее отбирали 10 мкл и подвергали электрофорезу для подтверждения лигирования. Затем, из нее отбирали 10 мкл в новую пробирку, в нее добавляли 100 мкл компетентных клеток *Bacillus subtilis*, и смесь подвергали культивированию с вращением посредством ротора Dusk при 37°C в течение 30 минут. Затем добавляли 300 мкл среды LB и смесь подвергали культивированию с вращением посредством ротора Dusk при 37°C в течение 1 часа, а затем культуральный раствор распределяли на чашку LB, содержащую 10 мкг/мл тетрациклина, и культивировали в течение ночи при 37°C. Из колоний было получено 100 трансформантов как для конструкции для сверхэкспрессии, так и для конструкции для подавления экспрессии генов. Плазмиду экстрагировали и паттерн расщепления ферментом рестрикции анализировали для селекции одного трансформанта, имевшего представляющую интерес структуру (затравочные плазмиды стадии (A) фиг.4), для каждой из конструкций.

[0059]

(7) Очистка затравочной плазмиды до высокой степени чистоты

Плазмидную ДНК с высокой степенью очистки предоставляли посредством способа ультрацентрифугирования в градиенте хлорида цезия-бромид этидия. В частности, получали 200 мл среды LB, дополненной антибиотиком (тетрациклин), каждые ее 100 мл помещали в 500-мл коническую колбу и культивировали в течение ночи при 37°C. После достаточной пролиферации в каждую колбу добавляли 100 мкл 1 М IPTG для увеличения количества копий плазмиды, и смесь далее культивировали в течение приблизительно 3-12 часов. После завершения культивирования 50 мл каждого из полученных продуктов распределяли в четыре 50-мл пробирки (Falcon 2070) и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант выбрасывали и бактериальный остаток полностью освобождали посредством встряхивания. Получали раствор 10 мг/мл Sol.I, содержащий лизоцим (композиция: 50 mM глюкоза, 25 mM Tris-Cl (pH 8,0) и 10 mM EDTA), и 2,5 мл каждого раствора добавляли в четыре пробирки, содержавшие бактерии, и хорошо перемешивали. Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Центрифугирование проводили при 5000 об/мин в течение 10 минут, супернатант удаляли путем декантирования, в каждую из четырех пробирок снова добавляли 2,5 мл Sol.I, свободного от лизоцима, и осадок суспендировали до однородного состояния. Получали свежий Sol.II (композиция: 0,2 Н NaOH и 1% (масс./об.) додецилсульфат натрия), 5 мл каждого раствора добавляли в четыре пробирки и смесь медленно перемешивали до прозрачного состояния. В каждую пробирку добавляли 3,75 мл Sol.III (композиция: 60 мл 5 М ацетат калия, 11,5 мл ледяной уксусной кислоты и 28,5 мл воды) и смешивали при умеренном усилии до определенной степени, так чтобы белое мутное вещество полностью диспергировалось. Центрифугирование проводили при 5000 об/мин в течение 10 минут и супернатант аспирировали пипеткой и переносили в четыре новых 50-мл пробирки (Falcon 2070) с навинчивающейся крышкой. В каждую пробирку добавляли 5 мл смеси фенол/хлороформ и энергично перемешивали. Центрифугирование

проводили при 5000 об/мин в течение 10 минут, и супернатант аспирировали пипеткой и переносили в четыре новых 50-мл пробирки (Falcon 2070) с навинчивающейся крышкой. В каждую из пробирок добавляли 25 мл 100% этанола и перемешивали, а затем проводили центрифугирование при 5000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант удаляли. В каждую пробирку добавляли 2,5 мл каждого раствора (конечная концентрация 10 мкг/мл), в котором 10 мкл 10 мг/мл раствора РНК-азы А было добавлено к 10 мл ТЕ, и осадок растворяли. Жидкость из четырех пробирок собирали в одну пробирку и инкубировали в течение 30 минут с использованием инкубатора с газовой фазой при 37°C. После завершения инкубации добавляли 5 мл смеси фенол/хлороформ и хорошо перемешивали, а затем проводили центрифугирование при 5000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант переносили в новую 50-мл пробирку, в нее добавляли 1 мл Sol. III, а затем к смеси добавляли 25 мл 100% этанола и перемешивали. Затем проводили центрифугирование при 5000 об/мин в течение 10 минут для удаления супернатанта. К остатку добавляли 5,4 мл ТЕ и полностью растворяли. Затем добавляли точно отвешенные 6,40 г хлорида цезия и полностью растворяли. Более того, добавляли 2,6 мл раствора хлорида цезия в концентрации 1,3 г/мл (раствор, полученный путем смешения 1,3 г хлорида цезия и 1 мл воды, в котором не проводили волюметрическую коррекцию). Наконец, добавляли 600 мкл раствора бромида этидия 10 мг/мл и хорошо перемешивали. Подготавливали одну пробирку для ультрацентрифугирования (Beckman 362181) и описанную выше смесь переносили в пробирку для ультрацентрифугирования. Добавляли воду или раствор хлорида цезия 1,3 г/мл (с удельной плотностью приблизительно 1,5 г/мл) для тонкой коррекции массы, так чтобы отличие массы от противовеса составляло 20 мг или менее. Центрифугирование проводили с использованием устройства для ультрацентрифугирования (Beckman Coulter) в следующих условиях. Центрифугирование проводили при температуре 18°C, скорости 50000 об/мин, максимальном ускорении и максимальном торможении, в течение 15 часов или более. После завершения центрифугирования подготавливали 1-мл шприц с иглой (21G × 5/8") и помещали в полосу плазмиды в ссс-форме для сбора раствора плазмиды и переноса его в 15-мл пробирку при наблюдении с использованием ультрафиолетового луча (365 нм). Добавляли 500 мкл Sol. III, а затем добавляли воду, так чтобы общий объем составлял 3 мл. Затем добавляли 9 мл 100% этанола. Центрифугирование проводили при 5000 об/мин в течение 10 минут для удаления супернатанта. К полученному преципитату добавляли 700 мкл ТЕ в 15-мл пробирке и ДНК растворяли. Полученный продукт переносили в 1,5-мл пробирку, добавляли 600 мкл 1-бутанола и перемешивали, смесь центрифугировали при 15000 об/мин в течение приблизительно 10 секунд для разделения смеси на два слоя, и верхний слой бутанола выбрасывали. Снова добавляли 600 мкл 1-бутанола и перемешивали, смесь центрифугировали при 15000 об/мин в течение приблизительно 10 секунд для разделения смеси на два слоя, и верхний слой бутанола выбрасывали. Это действие продолжали до тех пор, пока объем водного слоя не становился 450 мкл или менее. Добавляли 50 мкл Sol. III и далее добавляли 900 мкл 100% этанола. Центрифугирование проводили при 15000

об/мин в течение 10 минут. Супернатант выбрасывали и осадок ополаскивали 70% этанолом. Осадок растворяли в 22 мкл ТЕ.

[0060]

(8) Получение единичной ДНК из затравочной плазмиды

Получение единичной ДНК на стадии (В), представленной на фиг.4, проводили следующим образом. 300 нг затравочной плазмиды, очищенной до высокой степени чистоты способом ультрацентрифугирования, фракционировали и разбавляли до 40 мкл стерильной водой, затем добавляли 5 мкл 10х буфера #2 NEB и 5 мкл фермента рестрикции SfiI (NEB), и их смеси позволяли реагировать при 37°C в течение 2 часов. 1 мкл реакционного раствора подвергали электрофорезу для подтверждения расщепления. Затем реакционные растворы двух затравочных плазмид объединяли и к ним добавляли 450 мкл смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1) (Nacalai Tesque) и перемешивали, а затем смесь разделяли на фенольную фазу и водную фазу посредством центрифугирования (20000×g, 10 минут) и сбора водной фазы (приблизительно 900 мкл) в новую 1,5-мл пробирку. Добавляли 500 мкл 1-бутанола (Wako Pure Chemical Industries) и тщательно перемешивали, а затем проводили разделение посредством центрифугирования (20000×g, 1 минута) и удаление насыщенного водой 1-бутанола. Это действие повторяли до тех пор, пока объем водной фазы не составлял 450 мкл или менее, тем самым уменьшая объем водной фазы. Добавляли 50 мкл 3 М буфера ацетат калия-уксусная кислота (pH 5,2) и 900 мкл этанола и проводили центрифугирование (20000×g, 10 минут) для осаждения ДНК, которую затем промывали 70% этанолом и растворяли в 20 мкл ТЕ.

[0061]

(9) Конструирование комбинаторной библиотеки

Конструирование комбинаторной библиотеки на стадии (С) фиг.4 проводили следующим образом. Раствор со смесью ДНК, полученный согласно (8), собирали способом сборки генов, представленным в (6), с получением приблизительно 400 трансформантов. Колонии 96 штаммов случайным образом отбирали из полученных трансформантов и культивировали в течение ночи в среде LB, содержащей 2 мл тетрациклина в концентрации 10 мкг/мл. Добавляли IPTG для увеличения количества копий внутренней части плазмиды, так чтобы конечная концентрация составляла 1 mM, и смесь далее культивировали при 37°C в течение 3 часов. Плазмиды экстрагировали из полученной микробной массы. Направление гена каждой из этих экстрагированных плазмид определяли способом ПЦР с использованием набора праймеров, представленных в SEQ ID NO: 27-62 (фиг.5). В результате, было выявлено 75 клонов, имевших все элементы 12 генов, и в 21 клоне была обнаружена частичная утрата или перекрытие единичных ДНК. Был выявлен 71 тип различных комбинаций в 75 клонах, и в 4 клонах было выявлено перекрытие типов.

[0062]

(10) Введение комбинаторной библиотеки в дрожжи

96 комбинаторных библиотек, полученных согласно (9), вводили в дрожжи с

использованием способа с ацетатом лития (LiAc). В частности, *S. cerevisiae* штамма YPH499, который является родительским штаммом, инокулировали в 5 мл среды YPDA (10 г/л сухого дрожжевого экстракта [произведенный Nacalai Tesque], 20 г/л пептона [произведенный Becton Dickinson (BD Difco)], 20 г/л глюкозы и 40 мг/л аденинсульфата) и культивировали при 30°C и 150 об/мин в течение ночи. Культуру центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут и среду удаляли, а затем осадок с микробной массой суспендировали посредством 5 мл стерильной дистиллированной воды. Более того, центрифугирование проводили при 3000 об/мин в течение 5 минут, затем супернатант удаляли и осадок с микробной массой суспендировали в 1,5 мл раствора TE/LiAc (150 мкл 10x TE, 150 мкл 10x LiAc и 1200 мкл стерильной дистиллированной воды). 100 мкл суспензии микробной массы переносили в 1,5-мл пробирку Eppendorf, добавляли 1-5 мкл плазмидной ДНК (комбинаторная библиотека) и 2 мкл ДНК-носителя [производимая Takara Bio (Clontech)], затем добавляли 600 мкл раствора TE/LiAc/PEG (60 мкл 10x TE, 60 мкл 10x LiAc и 480 мкл 50% раствора PEG3350), и смесь перемешивали посредством встряхивания в течение 10 секунд. После инкубации раствора со смесью при 30°C в течение 30 минут добавляли 70 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и переворачивали и перемешивали, а затем далее инкубировали при 42°C в течение 15 минут. После проведения центрифугирования при 14000 об/мин в течение 5 секунд супернатант полностью удаляли, добавляли 250 мкл 100x исходного раствора аминокислот, свободного от L-лейцина (4 г/л аденинсульфата, 2 г/л L-гистидина, 4 г/л L-триптофана, 2 г/л урацила и 3 г/л L-лизина), осадок с микробной массой суспендировали и добавляли 550 мкл стерильной дистиллированной воды, а затем все количество суспензии распределяли на чашке агаром со средой SD (6,7 г/л азотистых оснований дрожжей без аминокислот (YNB) [произведенные Becton Dickinson (BD Difco)] и 20 г/л глюкозы) (к среде добавляли 20 г/л порошкового агара) и сушили, а затем инкубировали при 30°C в течение 3 суток с получением трансформанта.

[0063]

(11) Оценка способности продуцировать изобутанол в почкующихся дрожжах

Колонии полученных дрожжевых трансформантов инокулировали в 5 мл селективной среды SD (среда SD с добавлением 100x исходного раствора аминокислот, свободного от L-лейцина) и культивировали при 30°C и при 150 об/мин в течение 3 суток. После проведения центрифугирования при 3000 об/мин в течение 5 минут и удаления среды осадок с микробной массой суспендировали в 5 мл стерильной дистиллированной воды. После проведения дополнительного центрифугирования при 3000 об/мин в течение 5 минут и удаления супернатанта осадок с микробной массой суспендировали в 5 мл новой селективной среды SD и культивировали при 30°C и при 150 об/мин в течение 48 часов. После центрифугирования культуры при 3000 об/мин в течение 5 минут супернатант собирали. 5100 мкл собранного супернатанта среды добавляли к 45900 мкл ацетона, смесь перемешивали путем встряхивания и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 минут, а затем супернатант собирали. Собранный супернатант переносили в

стеклянный флакон и концентрацию изобутанола, содержащегося в среде, количественно определяли с использованием колонки DB-FFAP [производимая Agilent Technologies] с газовым хроматографическим масс-спектрометром (GCMS QP2010 Ultra [производимый Shimadzu]). В результате были получены штаммы, демонстрировавшие различное продуцирование изобутанола, имевшие 146 мг/л клона 96, как показано на фиг.5. Среди них были получены штаммы с более высоким продуцированием изобутанола (29 мг/л и 15 мг/л, соответственно), чем продуцирование дрожжевыми штаммами, в которые была внесена затравочная плазмида для сверхэкспрессии и затравочная плазмида для подавления экспрессии генов.

[0064]

(12) Селекция наилучшей плазмиды из библиотеки и переконструирование библиотеки

Конструировали новую комбинаторную библиотеку с плазмидой, использованной в трансформации для получения клона 8, 42, 68 или 96, в которых продуцирование изобутанола составляло 120 мг/мл или более, в качестве затравочной плазмиды (фиг.6). Сначала культивировали большое количество *Bacillus subtilis*, имевших описанную выше плазмиду, плазмиду экстрагировали способом ультрацентрифугирования, представленным в (7), и единичные ДНК, смешанные в эквимольном количестве, получали способом, представленным в (8). Затем, проводили сборку генов, представленную в (6), для конструирования комбинаторной библиотеки 2-го цикла, состоявшей приблизительно из 200 трансформантов. 24 колонии, случайным образом отобранные из этой библиотеки, подвергали экстракции плазмиды из *Bacillus subtilis*, полученную плазмиду индивидуально вводили в дрожжи способом, представленным в (10), и продуцирование изобутанола определяли способом, представленным в (11). Для плазмиды, экстрагированной из *Bacillus subtilis*, направление гена в каждой единичной ДНК по отдельности идентифицировали способом, описанным в (9). Эти результаты представлены на фиг.7. Что касается библиотеки, 6-я, 9-я, 11-я и 12-я единичные ДНК, которые являются общими в четырех затравочных плазмидах, были общими в 22 клонах за исключением двух клонов, т.е. клонов 3 и 12, в которых сборка была неполной, и остальные единичные ДНК, как правило, отражали ожидаемое соотношение композиции для затравочных плазмид. Среди 22 клонов было 19 типов различных комбинаций, и 2 из них были идентичными клоном 68 и 96 первой библиотеки, которые были затравочными плазмидами. Клоны 8, 4, 23 и 13 имели продуцирование изобутанола 173, 171, 169, 164 мг/л, соответственно, причем были получены многие клоны, демонстрирующие более высокую продуктивность, чем наиболее высокая величина 146 мг/л первой библиотеки.

[Промышленная применимость]

[0065]

В соответствии с настоящим изобретением, является возможным быстрое и эффективное конструирование комбинаторной библиотеки длинноцепочечной ДНК. В частности, поскольку в рамках настоящего изобретения возможно повторно использовать

множество плазмид, отобранных из одной и той же библиотеки, для конструирования новой химерной библиотеки даже без подтверждения генотипа полученной плазмиды, настоящее изобретение имеет отличительный признак, состоящий в том, что является возможным быстрое конструирование второй и последующей библиотек.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток, причем фрагмент ДНК имеет по меньшей мере один элемент ДНК-вставки, содержащий: ДНК, содержащую ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине; и ДНК-вставку, в которой единичные ДНК связаны, отличающийся тем, что способ включает:

(А) получение множества типов плазмид способом OGAB, где плазмиды содержат элемент ДНК-вставки, в котором связано множество типов единичных ДНК, способных быть связанными в определенном порядке связывания;

(В) обработку множества типов плазмид, полученных на стадии (А), с использованием фермента рестрикции, пригодного для расщепления каждой плазмиды на единичные ДНК и получения множества типов растворов со смесями единичных ДНК; и

(С) повторную сборку единичных ДНК способом OGAB с использованием множества типов растворов со смесями единичных ДНК, полученных на стадии (В), с получением фрагмента длинноцепочечной ДНК.

2. Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток по п.1, отличающийся тем, что все соотношения между молярными концентрациями для фрагментов ДНК в растворах со смесями единичных ДНК, полученных на стадии (В), составляют от 0,8 до 1,2.

3. Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток по п.1 или 2, отличающийся тем, что на стадии (А), количество типов единичных ДНК, содержащихся в одном типе элемента ДНК-вставки, составляет от 3 до 60.

4. Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток по любому из пп.1-3, где количество типов ферментов рестрикции, используемых на стадии (В), составляет три или менее.

5. Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток по любому из пп.1-4, где фермент рестрикции представляет собой фермент рестрикции, который образует выступающий конец.

6. Плазида, содержащая фрагмент ДНК для трансформации микробных клеток, полученная способом получения по любому из пп.1-5.

7. Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток, причем фрагмент ДНК имеет по меньшей мере один элемент ДНК-вставки, содержащий: ДНК, содержащую ориджин репликации, эффективный в микроорганизме-хозяине; и ДНК-вставку, в которой связаны единичные ДНК, отличающийся тем, что способ включает:

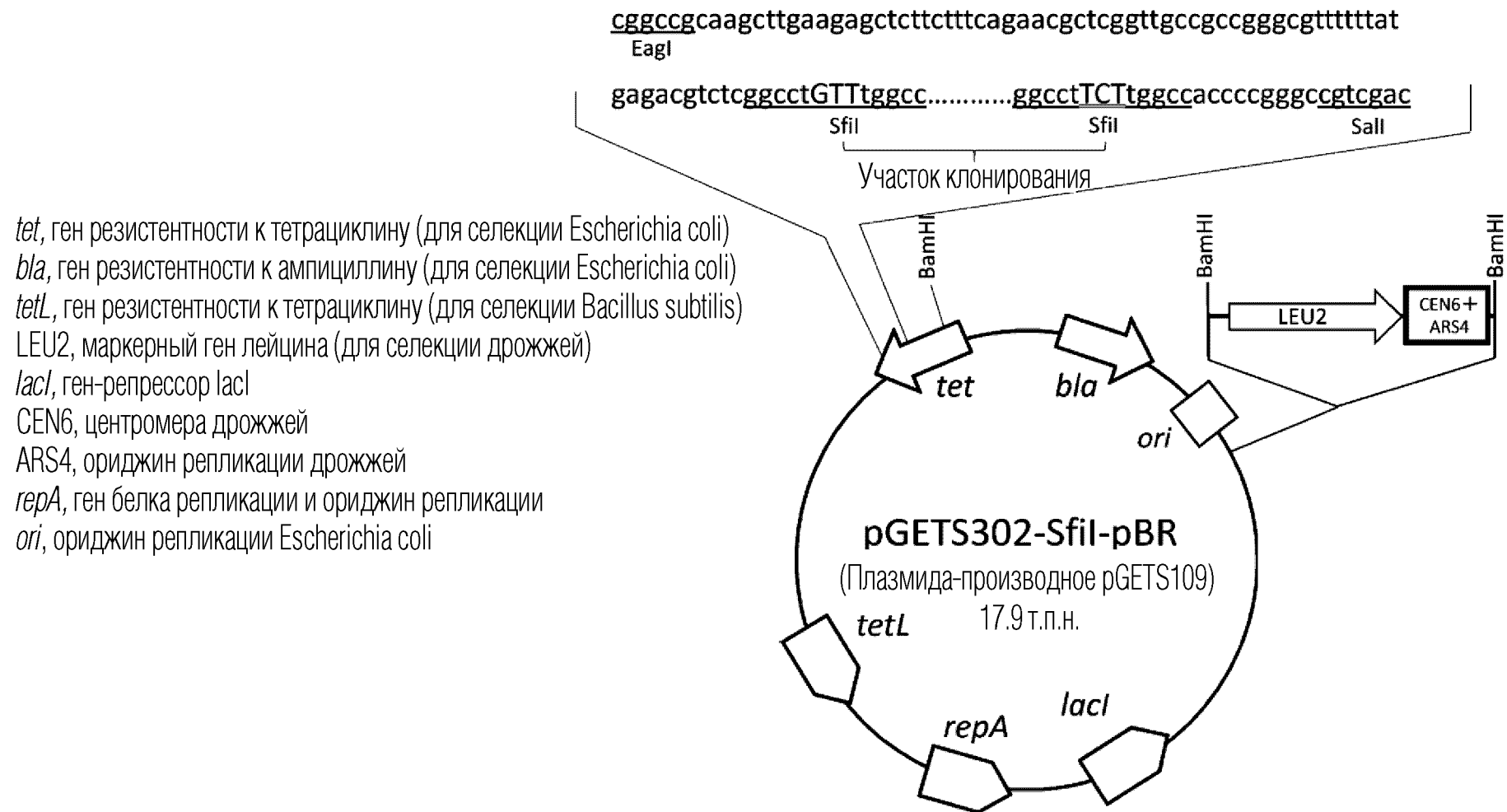
(В') обработку множества типов плазмид по п.6 ферментом рестрикции, пригодным для расщепления каждой плазмиды на единичные ДНК и получения множества типов растворов со смесями единичных ДНК; и

(С) повторную сборку единичных ДНК способом OGAB с использованием растворов со смесями единичных ДНК, полученных на стадии (В'), с получением

фрагмента длинноцепочечной ДНК.

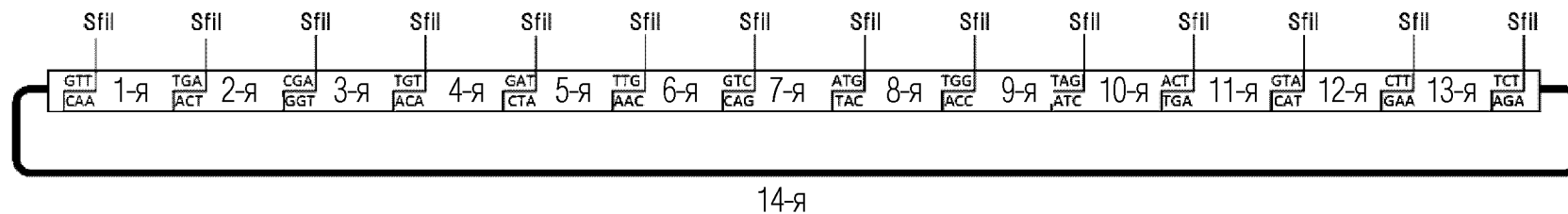
8. Способ получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток по п.7, отличающийся селекцией множества типов плазмид, содержащих полученный фрагмент длинноцепочечной ДНК, и повторное применение плазмид в качестве плазмид на стадии (В').

9. Способ конструирования химерной плазмидной библиотеки с использованием способа получения фрагмента ДНК для трансформации микробных клеток по любому из пп.1-5, 7 и 8.

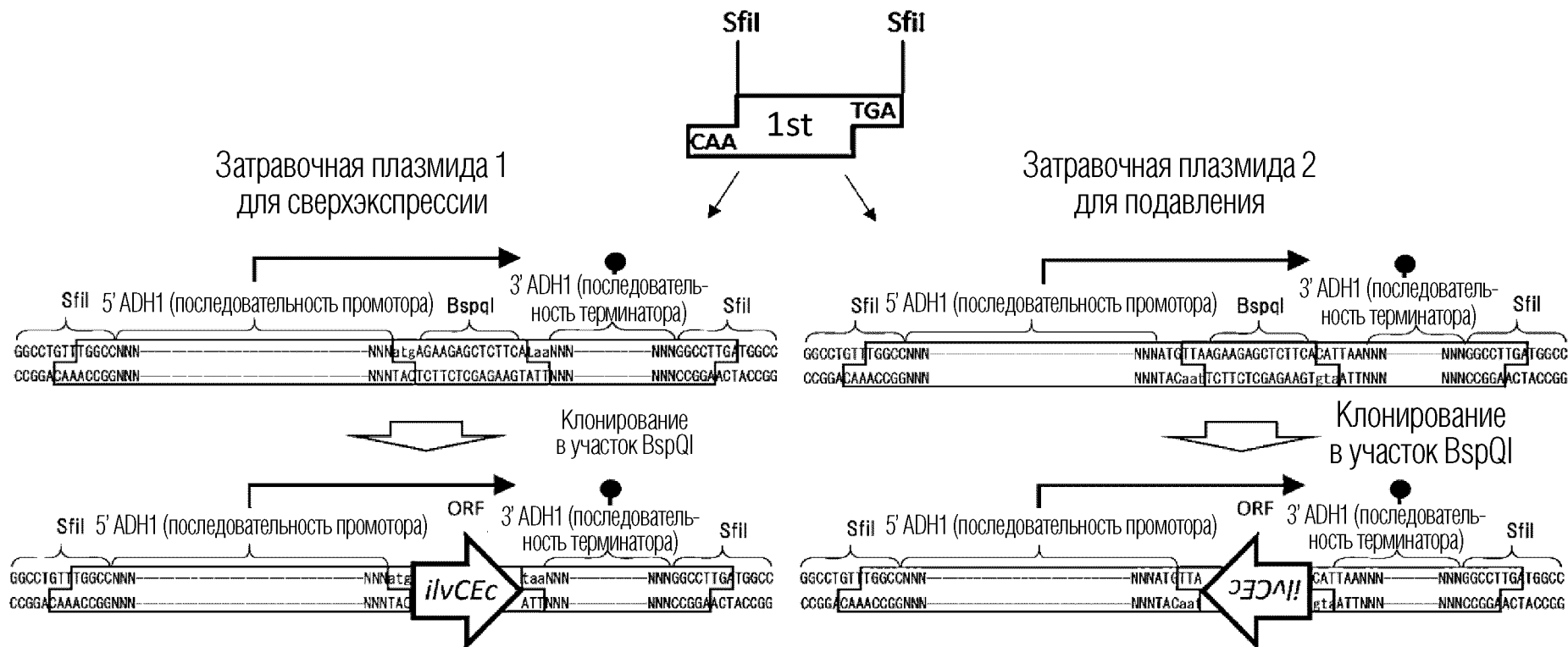


ФИГ. 1

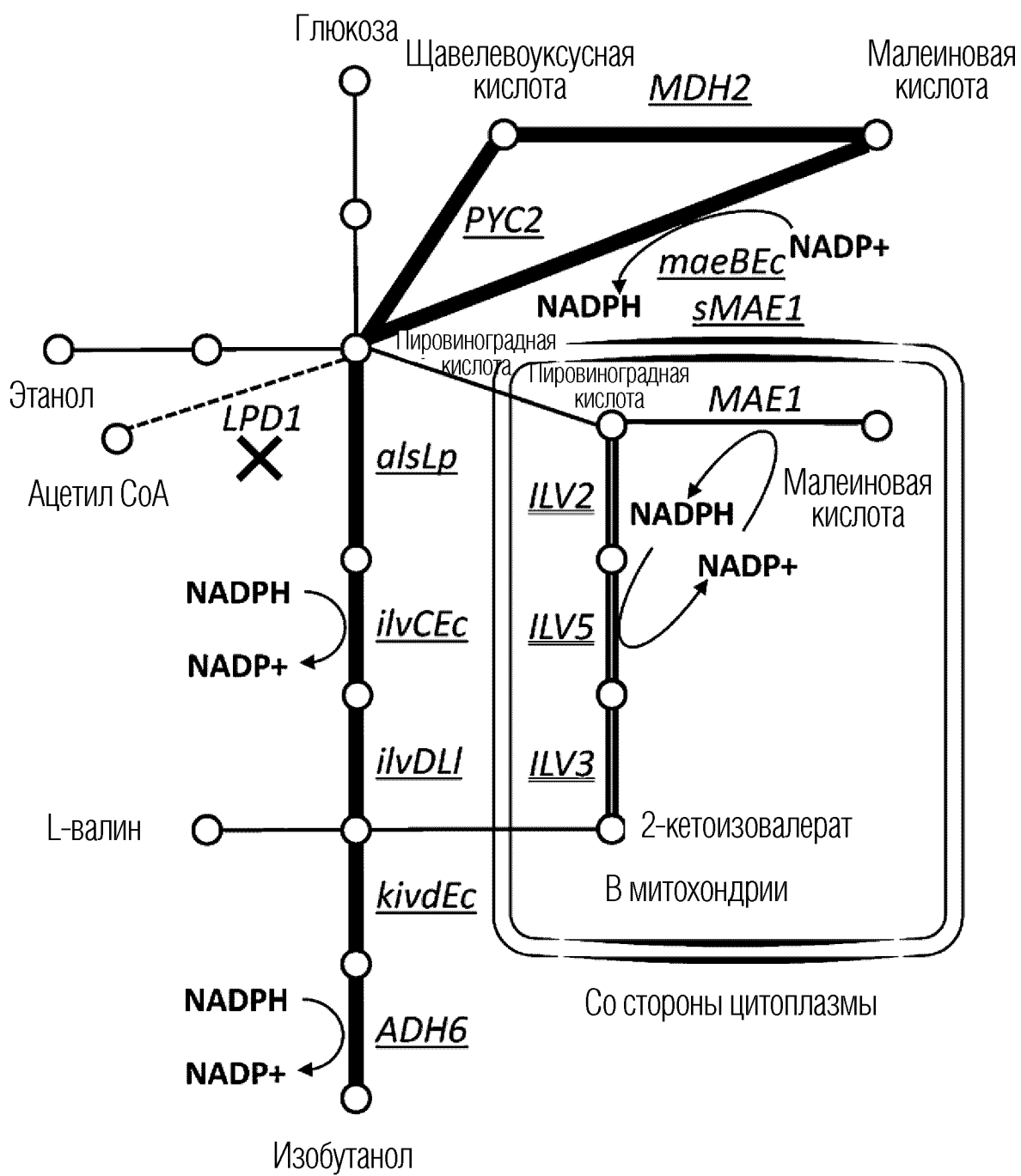
Базовая структура единичных ДНК



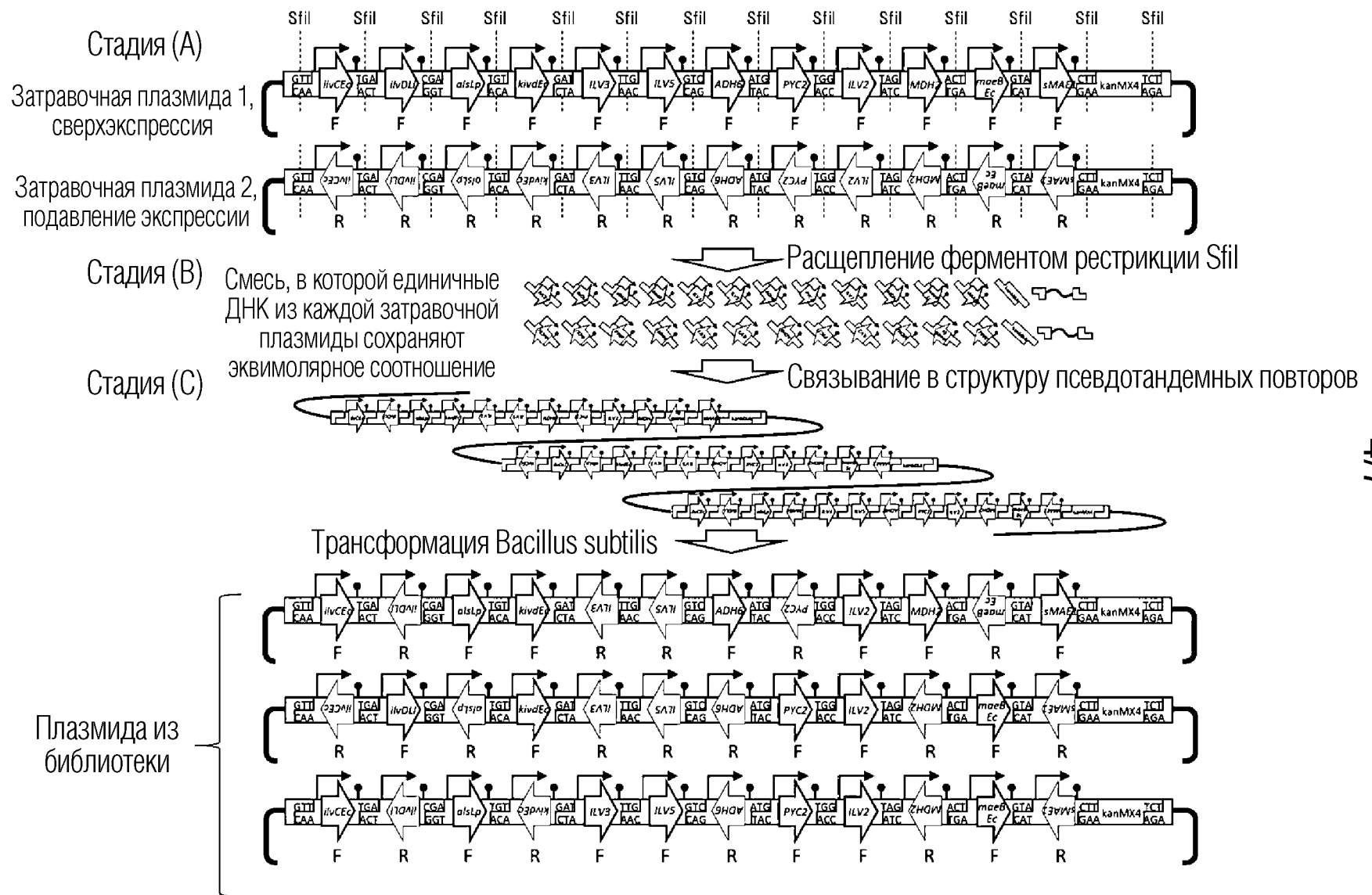
Пояснение детальной структуры единичной ДНК с 1-й единичной ДНК в качестве примера



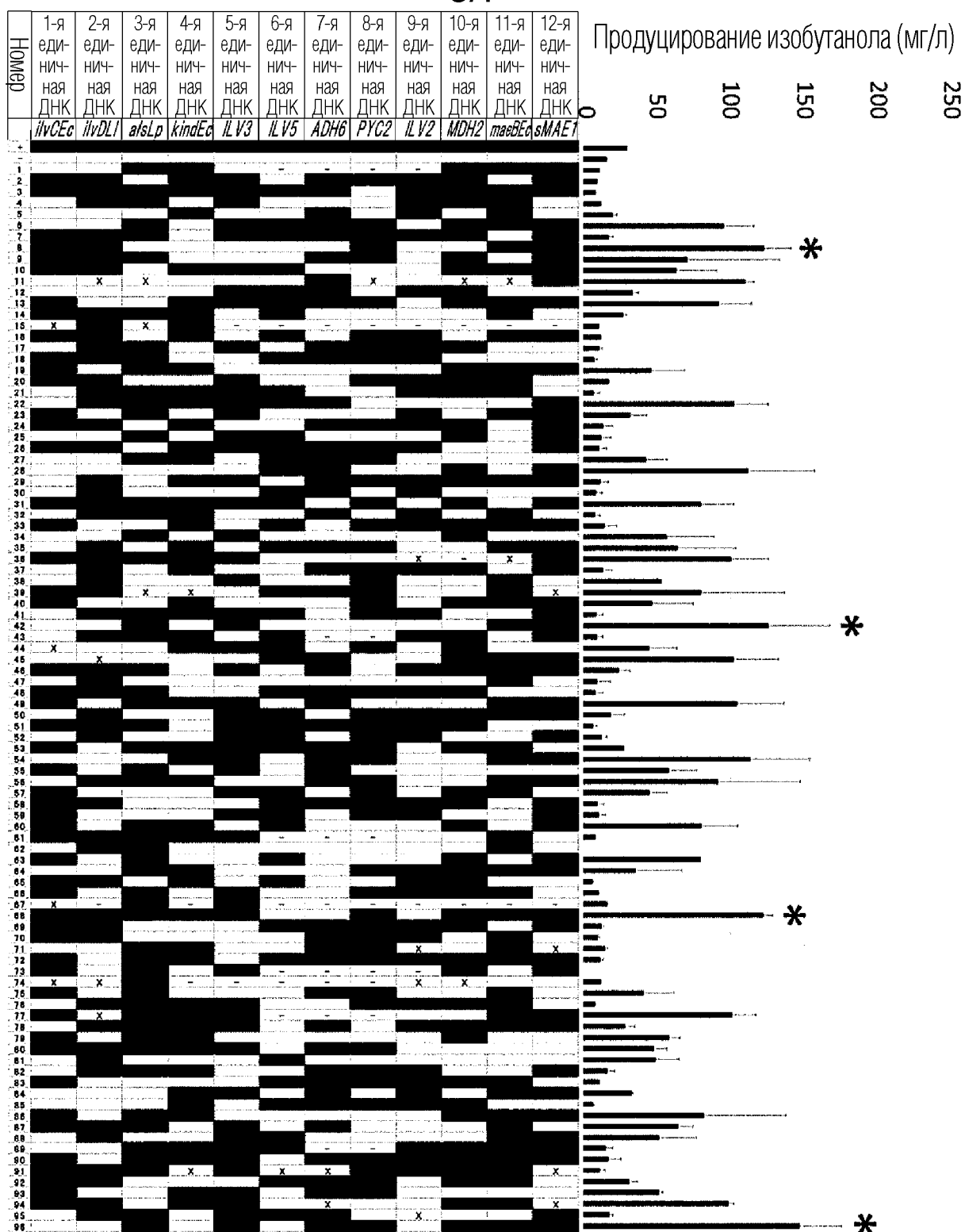
ФИГ. 2



ФИГ. 3



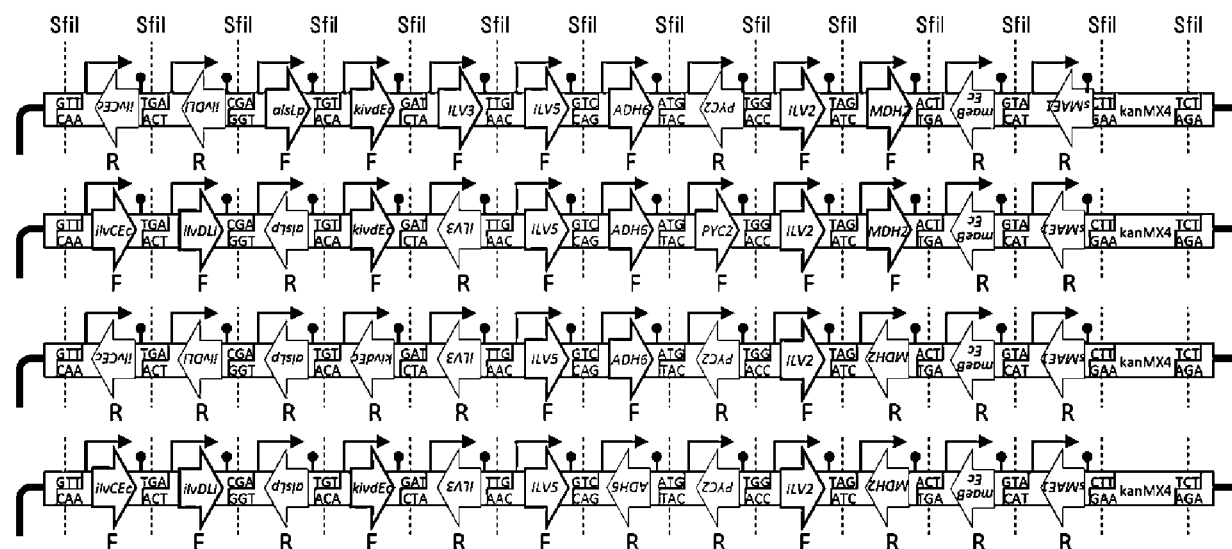
ФИГ. 4



Белым цветом указано прямое (F) направление, черным цветом указано обратное (R) направление, × указывает на ген, для которого не может быть определено, является ли он F или R, - указывает на потерю единичной ДНК и * указывает на ген, используемый для затравочной плазмиды для второй библиотеки. Продуцирование изобутанола показано с помощью средней величины и стандартного отклонения для продуцирования в среде, в два или более раз превышающего продуцирование в независимой культуре

ФИГ. 5

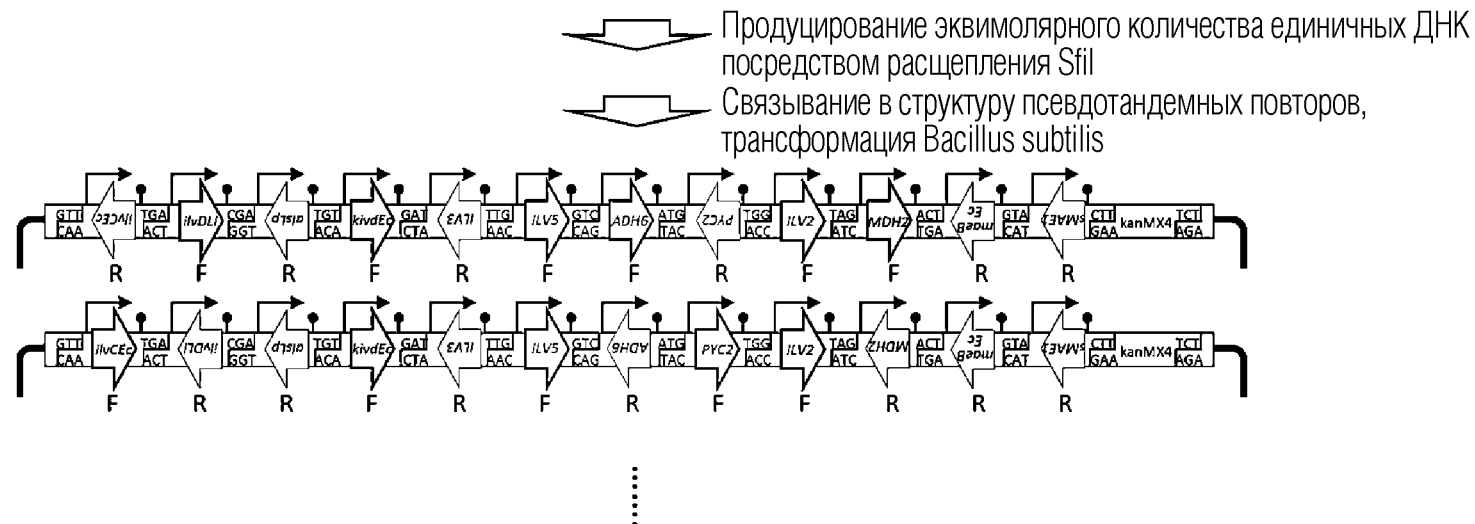
Стадия (С)

Затравочная плазмида
клона 8Затравочная плазмида
клона 42Затравочная плазмида
клона 68Затравочная плазмида
клона 96

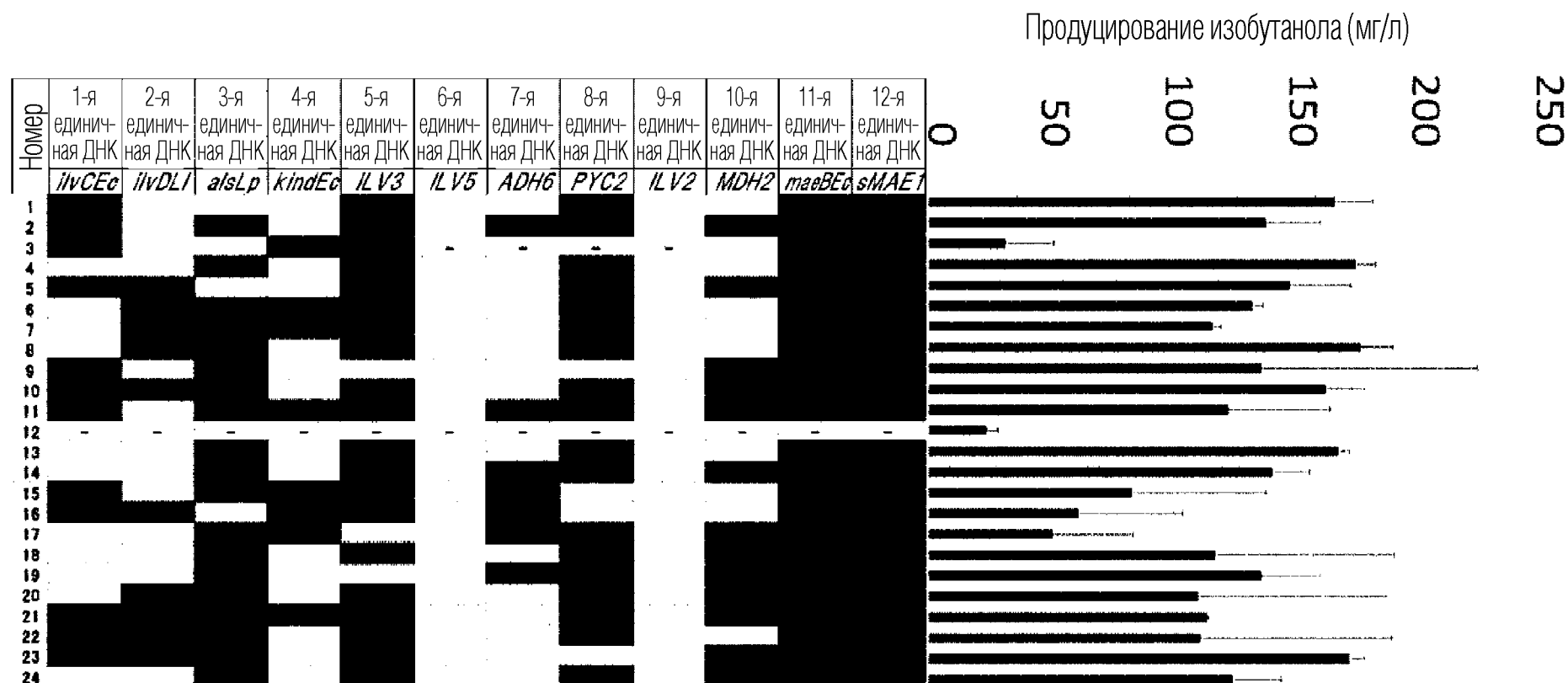
Стадия (В')

Стадия (С)

Плазмида из библиотеки



ФИГ. 6



7/7

Белым цветом указано прямое (F) направление, черным цветом указано обратное (R) направление, - указывает на потерю единичной ДНК
Продуцирование изобутанола показано с помощью средней величины и стандартного отклонения для продуцирования в среде, в три
раза превышающего продуцирование в независимой культуре

ФИГ. 7