

一种提升poly(A)质粒稳定性的宿主细胞

相关申请的交叉引用

本申请要求2023年10月25日提交的申请号为202311399354.3的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引入并入本文。

发明领域

本申请涉及大肠杆菌宿主细胞在复制或表达含有poly(A)序列的核酸分子中的用途，其中该大肠杆菌宿主细胞包含下调的促旋酶活性或下调的促旋酶表达量。使用该大肠杆菌宿主细胞来复制或表达含有poly(A)序列的核酸分子，可以增加poly(A)序列的复制或表达稳定性。

背景技术

mRNA疫苗是一种核酸制剂，是将外源目的基因序列通过转录、合成等工艺制备的mRNA。这种mRNA可以通过特定的递送系统导入机体细胞，表达目的蛋白，从而刺激机体产生特异性免疫学反应，使机体获得免疫保护。与传统疫苗相比，mRNA疫苗具有一些突出的优点，如易于设计、生产速度快、成本低、能诱导细胞免疫和体液免疫、并且不与基因组DNA相互作用等。近年来，各类mRNA疫苗在基础研究和临床研究方面都取得了突破性进展。特别地，在病毒传染病如新冠病毒、流感病毒、HIV、狂犬病病毒等，免疫肿瘤学（IO），个性化癌症（PCV），遗传性疾病和罕见疾病等领域的应用，呈持续增长态势。

成熟mRNA的主体序列是编码区，在其上游侧和下游侧都有非编码区UTR。真核生物mRNA分子的两端还有5'帽子和3'的poly(A)尾结构，其中poly(A)尾对维持mRNA的稳定性、调节mRNA的翻译效率以及维持mRNA的运输发挥着重要作用。

针对mRNA的批量合成，目前较为高效的方式为体外转录（IVT）。IVT主要是以线性DNA为模板制备mRNA，主要工艺环节包括将线性化质粒DNA转录为mRNA、化学修饰（例如5'端加帽、3'端poly(A)加尾）、分离纯化等。

通过IVT合成mRNA时，poly(A)尾的添加方式主要有两种。

第一种是酶法合成，即在mRNA转录完成后，通过添加源自大肠杆菌的poly(A)聚合酶。这种方法的优点是无需模板，操作简单，但存在加尾长度不稳定的局限性。

第二种是共转录法，由已经存在于模板质粒DNA或者PCR产物上的poly(A)序列直接转录形成，其优势在于无需使用poly(A)聚合酶，减少工艺步骤，节约成本，但是存在poly(A)序列易缺失的问题。质粒的规模化生产通常以大肠杆菌发酵的方式进行。在扩增过程中，携带较长poly(A)序列的质粒本身不太稳定，在复制过程中

poly(A)尾编码序列容易缺失,造成质粒不纯。为提高质粒上poly(A)序列的稳定性,一些科学家采用分段式的poly(A)序列共转录法,由于每个poly(A)结合蛋白PABP只结合约30个A,两个结合蛋白之间有少量A充当了间隔序列,将间隔序列用其他非A碱基替代,poly(A)尾编码序列发生重组的概率变低。此外,可以对间隔序列的长度和碱基进行优化,进一步降低poly(A)尾缺失的风险。但即便如此,A缺失的风险依然存在,并且分段式制备poly(A)的质粒会对下游蛋白表达量产生一定的影响。此外,另有报道通过低温(30°C)发酵的方式,可改善质粒poly(A)尾编码序列的完整度。但低温培养细菌生长变慢,质粒拷贝降低,产量明显减少,周期延长,对质粒生产造成困难。

目前没有好的方法来避免在poly(A)质粒构建和大肠杆菌扩增过程中的A碱基缺失。一些重组缺陷的商业菌株如 NEB stable、Stabl3经常用于含poly(A)结构的质粒的构建扩增,但并不总是有效。因此,寻找更稳定的poly(A)发酵菌株,在不影响质粒产量的同时,减少poly(A)尾序列缺失或不纯的风险,或将成为新的研究方向。但目前关于不同菌株对poly(A)尾序列稳定性影响的研究鲜有报道。

促旋酶是一种对于细菌存活而言很重要的II型DNA拓扑异构酶,参与DNA的复制、修复、重组和转录等进程(Menzel, R., and Gellert, M. (1994) *Adv. Pharmacol.* 29A: 201-225)。促旋酶一般由两个GyrA亚基和两个GyrB亚基组成,GyrA亚基主要负责DNA的结合、在DNA双链上形成缺口、以及缝合缺口,GyrB亚基主要介导能量转导和ATP水解。

特别地,促旋酶可以对复制和转录引起的(+)超螺旋进行解旋,并可以向基因组DNA引入(-)超螺旋。在大肠杆菌等菌体内,促旋酶能够通过DNA双链的一段(G段)中打开临时的缺口,使另一段(T段)经由该缺口移动到G段的前方,由此将DNA的(+)超螺旋向(-)超螺旋转变。除去(+)超螺旋是复制叉前进的前提,也是复制产生的两个双链进行分离所必须的(Nöllmann M, *et al.*, (2007) *Biochimie.* 89(4):490-499)。

每时每刻,都有至少300个DNA促旋酶分子稳定地结合在大肠杆菌的基因组上,每个复制叉上平均约有12个促旋酶(Stracy M, *et al.*, (2019) *Nucleic Acids Res.* 47(1):210-220)。当促旋酶被抑制时,大多数基因的转录活性会下降。例如,当过表达可抑制促旋酶活性的GyrI时,会抑制菌株的生长(Nakanishi A, *et al.*, (2002) *J Biol Chem.* 277(11):8949-54)。一些抗菌药,例如喹诺酮类抗生素、香豆素类药物,均以促旋酶为靶标,造成对细菌DNA的不可逆的损伤(Maxwell, A. (1993) *Mol. Microbiol.* 9: 681-686; Maxwell, A. (1997) *Trends Microbiol.* 5: 102-109)。

发明内容

本申请的发明人,意外地发现,当在宿主细胞,特别是在大肠杆菌宿主细胞中下调促旋酶的活性时,可以在维持质粒产量和质粒超螺旋比例的同时,增加质粒中

poly(A)序列的复制稳定性、和/或表达稳定性。

因而，在第一个方面，本申请提供一种宿主细胞，其包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量。特别地，提供一种重组宿主细胞，其经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量。其中，促旋酶包含GyrA和GyrB。特别地，促旋酶由GyrA和GyrB组成。宿主细胞，包括重组宿主细胞，可以包含下调的GyrA活性、GyrB活性、或由GyrA和GyrB组成的促旋酶的活性。宿主细胞，包括重组宿主细胞，可以包含下调的GyrA表达量、GyrB表达量、或由GyrA和GyrB组成的促旋酶的表达量。

宿主细胞，包括重组宿主细胞，可以经 $gyrA$ 基因或 $gyrB$ 基因的突变而包含下调的促旋酶活性。

在一些实施方式中，宿主细胞可以经 $gyrA$ 基因突变而包含下调的促旋酶活性。包含突变的 $gyrA$ 基因的宿主细胞可以表达GyrA突变体，该GyrA突变体，与不具备该突变的 $gyrA$ 基因的表达产物相比，可以引起促旋酶活性的下调或降低。宿主细胞可以经 $gyrA$ 基因突变而表达GyrA突变体，该GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含突变，或在对应于SEQ ID NO.37的第569位和第586位包含突变。在一些实施方式中，宿主细胞可以经 $gyrA$ 基因突变而表达GyrA突变体，该GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，或在对应于SEQ ID NO.37的第569位和第586位包含A569T和T586A突变。在一些实施方式中，大肠杆菌宿主细胞经 $gyrA$ 基因突变而表达GyrA突变体，所述GyrA突变体包含：i) 在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，或ii) 在对应于SEQ ID NO.37的第569位和第586位包含A569T和T586A突变。在一些实施方式中，所述GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变。在另一些实施方式中，所述GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第569位和第586位包含A569T和T586A突变。在一些具体实施方式中，所述GyrA突变体可以包含：i) 在对应于SEQ ID NO.37第80位的H80A突变；或ii) 在对应于SEQ ID NO.37第569位和第586位的A569T和T586A突变。在一些实施方式中，GyrA突变体可以包含SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列，其中第80位、第569位和第586位的氨基酸分别为A、A和T。在一些实施方式中，GyrA突变体可以包含SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列，其中第80位、第569位和第586位的氨基酸分别为A、T和A。在一些实施方式中，突变的 $gyrA$ 基因可以包含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的 $gyrA$ 基因可以包含SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列。

在一些实施方式中，宿主细胞可以经 $gyrB$ 基因突变而包含下调的促旋酶活性。包含突变的 $gyrB$ 基因的宿主细胞可以表达GyrB突变体，该GyrB突变体，与不具备该突变的 $gyrB$ 基因的表达产物相比，可以引起促旋酶活性的下调。宿主细胞可以经 $gyrB$ 基因突变而表达GyrB突变体，该GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第42位包含E42D突变，在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变，或在对应

于SEQ ID NO.39的第498位包含D498A突变。在一些实施方式中，所述大肠杆菌宿主细胞经*gyrB*基因突变而表达GyrB突变体，所述GyrB突变体可以包含：i) 在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变，ii) 在对应于SEQ ID NO.39的第42位包含E42D突变，或iii) 在对应于SEQ ID NO.39的第498位包含D498A突变。在一些实施方式中，所述GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变。在另一些实施方式中，所述GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第42位包含E42D突变。在一些实施方式中，所述GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第498位包含D498A突变。在一些具体实施方式中，所述GyrB突变体可以包含：i) 在对应于SEQ ID NO.39第136位的R136C突变，ii) 在对应于SEQ ID NO.39第42位的E42D突变，或iii) 在对应于SEQ ID NO.39第498位的D498A突变。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为D、R和D。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为E、C和D。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为E、R和A。在一些实施方式中，突变的*gyrB*基因可以包含SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的*gyrB*基因可以包含SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的*gyrB*基因可以包含SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列。

在一些实施方式中，宿主细胞可以经*gyrA*基因和*gyrB*基因突变而包含下调的促旋酶活性。包含突变的*gyrA*基因可以表达GyrA突变体，包含突变的*gyrB*基因可以表达GyrB突变体。该GyrA突变体和GyrB突变体形成的促旋酶，与不具备这些突变的*gyrA*和*gyrB*基因的宿主细胞的表达产物所形成的促旋酶相比，可以具有下调的促旋酶活性。在一些实施方式中，GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，且GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变。在一些实施方式中，GyrA突变体可以包含SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列，其中第80位、第569位和第586位的氨基酸分别为A、A和T，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为E、C和D。在一些实施方式中，突变的*gyrA*基因可以包含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列，突变的*gyrB*基因可以包含SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列。

在一些实施方式中，宿主细胞可以进一步包括一项或多项以下突变：i) *RecA*基因突变，ii) 插入*lacI*基因表达盒，和iii) *RecQ*基因敲除。在一些实施方式中，宿主细胞可以包括：i) *RecA*基因突变，ii) 插入*lacI*基因表达盒，和iii) *RecQ*基因敲除。在另一些实施方式中，宿主细胞可以包括：i) 突变后*RecA*基因包含SEQ ID NO.44所示的核苷酸序列，ii) 插入的*lacI*基因表达盒包含SEQ ID NO.42所示的核苷酸序列，或iii) 所述*RecQ*基因包含SEQ ID NO.41所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，宿主细胞可以包括*RecA*基因突变，突变后*RecA*基因包含SEQ ID NO.44所示的

核苷酸序列。在另一些实施方式中，宿主细胞可以包括插入*lacI*基因表达盒，所述插入的*lacI*基因表达盒包含SEQ ID NO.42所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，宿主可以包括*RecQ*基因敲除，所述*RecQ*基因包含SEQ ID NO.41所示的核苷酸序列。在一些具体实施方式中，所述大肠杆菌宿主细胞可以包括：

- i) *RecA*基因突变，突变后*RecA*基因包含SEQ ID NO.44所示的核苷酸序列，
- ii) 插入*lacI*基因表达盒，所述插入的*lacI*基因表达盒包含SEQ ID NO.42所示的核苷酸序列，或/和
- iii) *RecQ*基因敲除，所述*RecQ*基因包含SEQ ID NO.41所示的核苷酸序列。

在另一些具体实施方式中，所述大肠杆菌宿主细胞可以包括：

- i) *gyrA*基因突变，所述突变的*gyrA*基因包含SEQ ID NO.3或4所示的核苷酸序列，
- ii) *RecA*基因突变，突变后*RecA*基因包含SEQ ID NO.44所示的核苷酸序列，
- iii) 插入*lacI*基因表达盒，所述插入的*lacI*基因表达盒包含SEQ ID NO.42所示的核苷酸序列，和
- vi) *RecQ*基因敲除，所述*RecQ*基因包含SEQ ID NO.41所示的核苷酸序列。

宿主细胞，包括重组宿主细胞，可以经*gyrA*基因或*gyrB*基因的敲降、或者*gyrA*基因或*gyrB*基因的敲除加GyrA/GyrB载体表达等包含下调的促旋酶表达量。

宿主细胞可以经*gyrA*基因的敲降，或者敲除*gyrA*基因并向宿主细胞导入表达GyrA的载体等而包含下调的促旋酶表达量。*gyrA*基因的敲降可以通过提供针对GyrA的抑制性核酸分子（例如shRNA）而实现。重组宿主细胞可以经*gyrB*基因的敲降，或者敲除*gyrB*基因并向宿主细胞导入表达GyrB的载体等而包含下调的促旋酶表达量。*gyrB*基因的敲降可以通过提供针对GyrB的抑制性核酸分子（例如shRNA）而实现。

宿主细胞可以是大肠杆菌宿主细胞。特别地，宿主细胞，特别是重组宿主细胞，可以是经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的JM108、NEB Stable、Top10、DH5 α 、DH10B、MG1655、AG1、BL21、DB3.1、DC10B、DH1、E.Cloni 10G、EPI300、EPI400、JM109、JM110、STBL2、STBL3、SURE、TOP10F'、XL1-Blue或XL10-Gold。在一些实施方式中，重组宿主细胞可以是JM108、NEB Stable、Top10、DH5 α 、DH10B或MG1655。

宿主细胞，包括重组宿主细胞，可以包含含有poly(A)序列的核酸分子。例如，宿主细胞可以包含载体，载体可以包含含有poly(A)序列的核酸分子。或者，宿主细胞可以在其基因组中整合有含有poly(A)序列的核酸分子。poly(A)序列可以包含连续的A碱基，连续的A碱基的数量可以为例如20-250个。poly(A)序列可以包含2-5个由非A碱基间隔开的连续A碱基片段，其中各段连续A碱基片段中的连续A碱基的数量可以为例如10-100个，连续A碱基片段可以由例如1-20个非A碱基间隔开。

宿主细胞，包括重组宿主细胞，也可以包含含有poly(T)序列的核酸分子。

在第二个方面，本申请提供一种制备重组宿主细胞的方法，包括：

- i) 提供一种宿主细胞，例如原核宿主细胞，该宿主细胞包含 $gyrA$ 基因和 $gyrB$ 基因，以及
- ii) 下调该宿主细胞中的促旋酶的活性、或下调该宿主细胞中的促旋酶的表达量。

步骤i)中的宿主细胞可以为大肠杆菌宿主细胞，特别是大肠杆菌载体制备株，包括，但不限于JM108、NEB Stable、Top10、DH5 α 、DH10B、MG1655、AG1、BL21、DB3.1、DC10B、DH1、E.Cloni 10G、EPI300、EPI400、JM109、JM110、STBL2、STBL3、SURE、TOP10F'、XL1-Blue和XL10-Gold。

其中，促旋酶包含GyrA和GyrB。特别地，促旋酶由GyrA和GyrB组成。步骤ii)可以包括下调GyrA活性、GyrB活性、或由GyrA和GyrB组成的促旋酶的活性。步骤ii)可以包括下调GyrA表达量、GyrB表达量、或由GyrA和GyrB组成的促旋酶的表达量。

步骤ii)中的下调促旋酶的活性可以通过 $gyrA$ 基因或 $gyrB$ 基因的突变而实现。

在一些实施方式中，下调促旋酶的活性可以通过 $gyrA$ 基因的突变而实现。包含突变的 $gyrA$ 基因的大肠杆菌宿主细胞可以表达GyrA突变体。该GyrA突变体，与不具备该突变的 $gyrA$ 基因的表达产物相比，可以引起促旋酶活性的下调。GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，或在对应于SEQ ID NO.37的第569位和第586位包含A569T和T586A突变。在一些实施方式中，GyrA突变体可以包含SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列，其中第80位、第569位和第586位的氨基酸分别为A、A和T。在一些实施方式中，GyrA突变体可以包含SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列，其中第80位、第569位和第586位的氨基酸分别为A、T和A。在一些实施方式中，突变的 $gyrA$ 基因可以包含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的 $gyrA$ 基因可以包含SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列。

在一些实施方式中，下调促旋酶的活性可以通过 $gyrB$ 基因的突变而实现。包含突变的 $gyrB$ 基因的大肠杆菌宿主细胞可以表达GyrB突变体。该GyrB突变体，与不具备该突变的 $gyrB$ 基因的表达产物相比，可以引起促旋酶活性的下调。GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第42位包含E42D突变，在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变，或在对应于SEQ ID NO.39的第498位包含D498A突变。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为D、R和D。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为E、C和D。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为E、R和A。在一些实施方式中，突变的 $gyrB$ 基因可以包含SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的 $gyrB$ 基因可以包含SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列。在一些

实施方式中，突变的*gyrB*基因可以包含SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列。

在一些实施方式中，下调促旋酶的活性可以通过*gyrA*基因和*gyrB*基因的突变而实现。包含突变的*gyrA*基因可以表达GyrA突变体，包含突变的*gyrB*基因可以表达GyrB突变体。该GyrA突变体和GyrB突变体形成的促旋酶，与不具备这些突变的*gyrA*和*gyrB*基因的大肠杆菌宿主细胞的表达产物所形成的促旋酶相比，可以具有下调的促旋酶活性。在一些实施方式中，GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，且GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变。在一些实施方式中，GyrA突变体可以包含SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列，其中第80位、第569位和第586位的氨基酸分别为A、A和T，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为E、C和D。在一些实施方式中，突变的*gyrA*基因可以包含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列，突变的*gyrB*基因可以包含SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列。

在一些实施方式中，步骤ii)可以包括，

- 1) 使*gyrA*基因包含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列，
- 2) 使*gyrB*基因包含SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列，
- 3) 使*gyrA*基因包含SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列，
- 4) 使*gyrB*基因包含SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列，或
- 5) 使*gyrB*基因包含SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列。

在一些实施方式中，步骤ii)可以包括，向步骤i)的宿主细胞导入Cas9酶，以及

- 1) 包含SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.13所示的核苷酸序列的供体序列，
- 2) 包含SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.14所示的核苷酸序列的供体序列，
- 3) 包含SEQ ID NO.10所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.15所示的核苷酸序列的供体序列，
- 4) 包含SEQ ID NO.11所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.16所示的核苷酸序列的供体序列，或
- 5) 包含SEQ ID NO.12所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.17所示的核苷酸序列的供体序列。

Cas9酶的编码基因可以位于载体中。sgRNA和供体序列可以位于载体中。步骤ii)可以包括，向步骤i)的宿主细胞导入含有Cas9酶编码基因的载体、以及含有sgRNA和供体序列的载体。

步骤ii)中的下调促旋酶的表达量可以通过*gyrA*基因或*gyrB*基因的敲降、或者*gyrA*基因或*gyrB*基因的敲除并向宿主细胞导入表达GyrA/GyrB的载体而实现。

步骤ii)中的下调促旋酶的表达量可以经*gyrA*基因的敲降，或者敲除*gyrA*基因

并向宿主细胞导入表达GyrA的载体而实现。*gyrA*基因的敲降可以通过提供针对GyrA的抑制性核酸分子（例如shRNA）而实现。步骤ii）中的下调促旋酶的表达量可以经*gyrB*基因的敲降，或者敲除*gyrB*基因并向宿主细胞导入表达GyrB的载体而包含下调的促旋酶表达量。*gyrB*基因的敲降可以通过提供针对GyrB的抑制性核酸分子（例如shRNA）而实现。

在一些实施方式中，所述大肠杆菌宿主细胞可以进一步包括以下操作步骤中任一项或多项：1）*RecA*基因突变，2）插入*lacI*基因表达盒，和3）*RecQ*基因敲除。在一些实施方式中，所述大肠杆菌宿主细胞可以包括：1）*RecA*基因突变，2）插入*lacI*基因表达盒，和3）*RecQ*基因敲除。

在一些实施方式中，可以包括向步骤ii）宿主细胞中导入Cas9酶，以及

1）包含SEQ ID NO.47所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.50所示的核苷酸序列的供体序列，

2）包含SEQ ID NO.46所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.49所示的核苷酸序列的供体序列，或

3）包含SEQ ID NO.45所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.48所示的核苷酸序列的供体序列。

在第三个方面，本申请提供包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的宿主细胞，特别是原核宿主细胞，包括本申请的宿主细胞（包括重组宿主细胞），以及由本申请的制备方法而获得的重组宿主细胞，在复制或表达含有poly(A)序列、或poly(T)序列的核酸分子中的用途。

根据本申请的用途的宿主细胞可以是大肠杆菌宿主细胞。特别地，根据本申请的用途的宿主细胞可以是经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的JM108、NEB Stable、Top10、DH5 α 、DH10B、MG1655、AG1、BL21、DB3.1、DC10B、DH1、E.Cloni 10G、EPI300、EPI400、JM109、JM110、STBL2、STBL3、SURE、TOP10F'、XL1-Blue或XL10-Gold。在一些实施方式中，根据本申请的用途的宿主细胞可以是经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的JM108、NEB Stable、Top10、DH5 α 、DH10B、或MG1655。

根据本申请的用途的宿主细胞，在一些实施方式中，包含引起促旋酶活性下降的*gyrA*基因或*gyrB*基因的突变。包含突变的*gyrA*基因的宿主细胞可以表达GyrA突变体。GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，或在对应于SEQ ID NO.37的第569位和第586位包含A569T和T586A突变。在一些实施方式中，GyrA突变体可以包含SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列，其中第80位、第569位和第586位的氨基酸分别为A、A和T。在一些实施方式中，GyrA突变体可以包含SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列，其中第80位、第569位和第586位的氨基酸分别为A、T和A。在一些实施方式中，突变的*gyrA*基因可以包含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的*gyrA*基因可以包含SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列。包

含突变的 $gyrB$ 基因的宿主细胞可以表达GyrB突变体。GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第42位包含E42D突变，在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变，或在对应于SEQ ID NO.39的第498位包含D498A突变。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为D、R和D。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为E、C和D。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为E、R和A。在一些实施方式中，突变的 $gyrB$ 基因可以包含SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的 $gyrB$ 基因可以包含SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的 $gyrB$ 基因可以包含SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，宿主细胞可以包含 $gyrA$ 基因和 $gyrB$ 基因的引起促旋酶活性下降的突变。包含突变的 $gyrA$ 基因可以表达GyrA突变体，包含突变的 $gyrB$ 基因可以表达GyrB突变体。GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，且GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变。根据本申请的用途的宿主细胞，在一些实施方式中，可以经 $gyrA$ 基因或 $gyrB$ 基因的敲降、或者 $gyrA$ 基因或 $gyrB$ 基因的敲除加GyrA/GyrB载体表达等包含下调的促旋酶表达量。例如，宿主细胞可以经 $gyrA$ 基因的敲降，或者敲除 $gyrA$ 基因并向宿主细胞导入表达GyrA的载体而包含下调的促旋酶表达量。 $gyrA$ 基因的敲降可以通过提供针对GyrA的抑制性核酸分子（例如shRNA）而实现。宿主细胞可以经 $gyrB$ 基因的敲降，或者敲除 $gyrB$ 基因并向宿主细胞导入表达GyrB的载体而包含下调的促旋酶表达量。 $gyrB$ 基因的敲降可以通过提供针对GyrB的抑制性核酸分子（例如shRNA）而实现。

根据本申请的用途的宿主细胞，可以进一步包括一项或多项以下突变：i) $RecA$ 基因突变，ii) 插入 $lacI$ 基因表达盒，和iii) $RecQ$ 基因敲除。在一些实施方式中，宿主细胞可以包括：i) $RecA$ 基因突变，ii) 插入 $lacI$ 基因表达盒，和iii) $RecQ$ 基因敲除。在另一些实施方式中，宿主细胞可以包括：i) 突变后 $RecA$ 基因包含SEQ ID NO.44所示的核苷酸序列，ii) 插入的 $lacI$ 基因表达盒包含SEQ ID NO.42所示的核苷酸序列，或iii) 所述 $RecQ$ 基因包含SEQ ID NO.41所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，宿主细胞可以包括 $RecA$ 基因突变，突变后 $RecA$ 基因相对于野生型 $RecA$ 基因表达的蛋白活性下降（如重组缺陷型突变），突变后的 $RecA$ 基因可以是 $RecA1$ 。在一些具体实施方式中，宿主细胞可以包括 $RecA$ 基因突变，突变后 $RecA$ 基因包含SEQ ID NO.44所示的核苷酸序列。在另一些实施方式中，宿主细胞可以包括插入 $lacI$ 基因表达盒，该表达盒包括 $lacIq$ 启动子、 $lacI$ 和/或终止子。在一些具体实施方式中，所述插入的 $lacI$ 基因表达盒包含SEQ ID NO.42所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，宿主可以包括 $RecQ$ 基因敲除，所述 $RecQ$ 基因包含SEQ ID NO.41所示的核苷酸序列。

在一些具体实施方式中，所述大肠杆菌宿主细胞可以包括：

- i) *RecA*基因突变，突变后*RecA*基因包含SEQ ID NO.44所示的核苷酸序列，
- ii) 插入*lacI*基因表达盒，所述插入的*lacI*基因表达盒包含SEQ ID NO.42所示的核苷酸序列，或/和

iii) *RecQ*基因敲除，所述*RecQ*基因包含SEQ ID NO.41所示的核苷酸序列。含有poly(A)序列的核酸分子，可以包含在载体中，而载体包含在宿主细胞中；也可以整合在宿主细胞的基因组中。poly(A)序列可以包含连续的A碱基，连续的A碱基的数量可以为例如20-250个。poly(A)序列可以包含2-5个由非A碱基间隔开的连续A碱基片段，其中各段连续A碱基片段中的连续A碱基的数量可以为例如10-100个，连续A碱基片段可以由例如1-20个非A碱基间隔开。

在第四个方面，本申请提供一种使用包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的宿主细胞，特别是原核宿主细胞，包括本申请的宿主细胞，以及由本申请的方法制备得到的重组宿主细胞，来复制或表达含有poly(A)序列、或poly(T)序列的核酸分子的方法。

复制含有poly(A)序列的核酸分子的方法可以包括：

- i) 向宿主细胞导入载体，载体中包含含有poly(A)序列的核酸分子，和
- ii) 在利于载体复制的条件下培养宿主细胞。

表达含有poly(A)序列的核酸分子的方法可以包括：

- i) 向宿主细胞导入载体，载体中包含含有poly(A)序列的核酸分子，
- ii) 任选地，在利于载体复制的条件下培养宿主细胞，以及
- iii) 在利于载体表达的条件下培养宿主细胞，或

从步骤i) 或ii) 的宿主细胞中提取载体，并对载体进行体外转录。

表达含有poly(A)序列的核酸分子的方法可以包括：

- i) 在宿主细胞的基因组中整合入含有poly(A)序列的核酸分子，以及
- ii) 在利于含有poly(A)序列的核酸分子的表达的条件下培养宿主细胞。

宿主细胞可以是大肠杆菌宿主细胞。特别地，宿主细胞可以是经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的JM108、NEB Stable、Top10、DH5 α 、DH10B、MG1655、AG1、BL21、DB3.1、DC10B、DH1、E.Cloni 10G、EPI300、EPI400、JM109、JM110、STBL2、STBL3、SURE、TOP10F'、XL1-Blue或XL10-Gold。在一些实施方式中，宿主细胞可以是经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的JM108、NEB Stable、Top10、DH5 α 、DH10B或MG1655。

宿主细胞，包括重组宿主细胞，在一些实施方式中，可以包含引起促旋酶活性下降的*gyrA*基因或*gyrB*基因的突变。包含突变的*gyrA*基因的宿主细胞可以表达GyrA突变体。GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，或在对应于SEQ ID NO.37的第569位和第586位包含A569T和T586A突变。在一些实施方式中，GyrA突变体可以包含SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列，其中第80位、

第569位和第586位的氨基酸分别为A、A和T。在一些实施方式中，GyrA突变体可以包含SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列，其中第80位、第569位和第586位的氨基酸分别为A、T和A。在一些实施方式中，突变的*gyrA*基因可以包含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的*gyrA*基因可以包含SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列。包含突变的*gyrB*基因的宿主细胞可以表达GyrB突变体。GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第42位包含E42D突变，在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变，或在对应于SEQ ID NO.39的第498位包含D498A突变。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为D、R和D。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为E、C和D。在一些实施方式中，GyrB突变体可以包含SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列，其中第42位、第136位和第498位的氨基酸分别为E、R和A。在一些实施方式中，突变的*gyrB*基因可以包含SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的*gyrB*基因可以包含SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，突变的*gyrB*基因可以包含SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列。在一些实施方式中，宿主细胞可以包含引起促旋酶活性下降的*gyrA*基因和*gyrB*基因的突变。包含突变的*gyrA*基因可以表达GyrA突变体，包含突变的*gyrB*基因可以表达GyrB突变体。GyrA突变体可以在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，且GyrB突变体可以在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变。

宿主细胞，包括重组宿主细胞，在一些实施方式中，可以经*gyrA*基因或*gyrB*基因的敲降、或者*gyrA*基因或*gyrB*基因的敲除加GyrA/GyrB载体表达等而包含下调的促旋酶表达量。例如，宿主细胞可以经*gyrA*基因的敲降，或者敲除*gyrA*基因并向宿主细胞导入表达GyrA的载体而包含下调的促旋酶表达量。*gyrA*基因的敲降可以通过提供针对GyrA的抑制性核酸分子（例如shRNA）而实现。宿主细胞可以经*gyrB*基因的敲降，或者敲除*gyrB*基因并向宿主细胞导入表达GyrB的载体而包含下调的促旋酶表达量。*gyrB*基因的敲降可以通过提供针对GyrB的抑制性核酸分子（例如shRNA）而实现。

poly(A)序列可以包含连续的A碱基，连续的A碱基的数量可以为例如20-250个。poly(A)序列可以包含2-5个由非A碱基间隔开的连续A碱基片段，其中各段连续A碱基片段中的连续A碱基的数量可以为例如10-100个，连续A碱基片段可以由例如1-20个非A碱基间隔开。

基于以下具体描述和实施例，当前公开内容的其他特征和优势之处将会更加明晰，具体描述和实施例不应解读为限制性的。在本申请中引用的所有文献、Genbank记录、专利和已公开专利申请的内容通过引用的方式明确地包含在本文中。

附图说明

以下以示例方式给出但不意在将本发明限制于所述具体实施方式的具体描述，可以结合附图更好地理解。

图1A和1B为本申请中用于大肠杆菌基因突变的靶（all-in-one）质粒（图1A）、以及Cas9蛋白表达质粒（图1B）的图谱。

图2示出含有poly(A)序列的测试质粒的图谱。

图3A-3C示出poly(A)序列纯度合格（图3A）、poly(A)序列纯度不合格（图3B）、和poly(A)序列缺失（图3C）的Sanger测序峰图。

图4示出不同重组基因型菌株的平均超螺旋比例结果。

具体实施方式

本文中用到的术语，除非特别指出，均具有字典、教科书、技术工具书中的普通含义，或本领域技术人员通常所理解的意思。以下对于一些术语的描述，仅出于便于理解本申请的目的，而不意在对这些术语进行特别的限定，除非特别指出。

如本文和所附权利要求书中所使用的，单数形式“一个”、“一种”、和“该”包括所指对象的复数形式，除非上下文另有明确规定。

术语“或”是指列举的可选择要素中的单个要素，除非上下文明确地另外指出。

术语“包含”或“包括”是指将所述的要素、整数或步骤包括在内，但是不排除任意其他要素、整数或步骤的加入。在文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，也涵盖由所述及的要素、整数或步骤的组合。

“poly(A)结构”或“poly(A)序列”是指包含连续重复A碱基的核苷酸序列，也包括几个连续A碱基片段经非A碱基隔开的核苷酸序列。同理，“poly(T)结构”或“poly(T)序列”是指包含连续重复T碱基的核苷酸序列，也包括几个连续T碱基片段经非T碱基隔开的核苷酸序列。

“宿主细胞”和“菌株”在本文中均指，可引入外源核酸分子（如载体）并使得该外源核酸分子得以复制或表达的任何细胞。本申请的宿主细胞可以为原核细胞，例如大肠杆菌。“大肠杆菌”和“*E. coli*”可交换地使用，包括野生型大肠杆菌、以及包含人工或天然突变的大肠杆菌菌株，例如JM108、NEB Stable、Top10、DH5α或DH10B菌株等。

“超螺旋”包括(+)超螺旋和(-)超螺旋，是DNA链的螺旋状态。DNA的(+)超螺旋和(-)超螺旋之间的主要区别在于，在DNA的(+)超螺旋期间，DNA链与松弛状态相比过度缠绕，而在DNA的(-)超螺旋期间，DNA链与松弛状态相比处于缠绕状态。大多数生物体的DNA在正常状态下呈(-)超螺旋，(+)超螺旋仅发生在特定的细胞功能期间。

“促旋酶”又称为回旋酶、或旋转酶，是解旋酶的一种，具体属于II型拓扑异构酶。这种酶可以向DNA引入(-)超螺旋，将(+)超螺旋转化为(-)超螺旋，在原核细胞中参与复制、转录、修复和重组等重要程序。促旋酶由GyrA和GyrB亚基

构成，GyrA主要负责在DNA双链上形成缺口、以及缝合缺口，GyrB亚基主要介导能量转导和ATP水解。GyrA由gyrA基因编码，GyrB由gyrB基因编码，已知GyrA中的H80A突变、A569T和T586A双突变，GyrB中的E42D突变、R136C突变、和D498A突变等，会引起促旋酶的活性下降（Hockings SC, Maxwell A. (2002) *J Mol Biol.* 318(2):351-9; Oram M, Fisher LM. (1992) *J Bacteriol.* 174(12):4175-8; Gross CH et al., (2003) *Antimicrob Agents Chemother.* 47(3):1037-46; Contreras A, Maxwell A. (1992) *Mol Microbiol.* 6(12):1617-24; Noble CG, Maxwell A. (2002) *J Mol Biol.* 318(2):361-71)。

“稳定性”在本文中指poly(A)、poly(T)等序列的结构（碱基）完整性、结构基因的纯度等。“完整性”是指菌株中复制或表达的poly(A)序列与最初构建并转入菌株的poly(A)序列的一致性。

大体上而言，“下调”是指降低。例如，“下调”促旋酶的活性，是指通过突变gyrA基因和/或gyrB基因、提高GyrI表达等手段，降低GyrA、GyrB、或由两者组成的促旋酶的活性，包括将(+)超螺旋转化为(-)超螺旋的活性。“下调”促旋酶的表达量，是指通过敲降gyrA基因、和/或gyrB基因等手段，来降低GyrA、GyrB、或两者的表达量。

本文中的“敲降”，是指通过一定的手段，例如RNAi等技术，特异性地降解目标mRNA、或干扰正常的RNA翻译或剪切等，从而使靶基因或序列，例如文中的gyrA基因、和/或gyrB基因，的表达降低，但不包括完全消除gyrA基因、和/或gyrB基因的表达。而“敲除”是指通过一定的手段，例如同源重组，而去除某一特定基因或序列，彻底消除该基因或序列的表达。

“导入”是指运用一定的手段，例如转染、转导、或转化，将载体引入宿主细胞中。“整合”是指运用一定的手段，例如同源重组，将一定的序列嵌入基因组中，从而能够随着基因组序列的表达而表达。

“重组”细胞是指通过DNA重组技术等改变基因序列、基因表达模式、基因表达量等而得到的细胞。“重组”宿主细胞，是指通过DNA重组技术等改变基因序列、基因表达模式、基因表达量等而得到的，可导入外源核酸分子并使外源核酸分子得以复制或表达的细胞。

“载体”是指一段天然存在的或合成的DNA片段，包括单链和双链DNA片段，例如化学合成的DNA片段、天然的质粒、或经改造的病毒基因组等。载体中可以插入有外源DNA片段，以进行该外源DNA片段的克隆和/或表达。载体可以包含，例如复制起点、选择性标记或报告基因、多克隆位点(MCS)等。该术语包括线性的DNA片段（如PCR产物、线性化的质粒片段等）、质粒载体、病毒载体、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)等。当载体为双链DNA时，对于元件的排序、以及元件序列的方向的描述，是针对其中一条DNA链而言的。

“体外转录”或“IVT”是指在含有RNA转录酶、NTP等的条件下，在体外无细

胞体系中，以DNA为模板，模拟体内转录过程形成RNA的过程。当使用质粒载体作为DNA模板时，在体外转录前，利用酶切位点对质粒线进行酶切，使其线性化。

在mRNA的成熟过程中，会在末端加上poly(A)尾，该poly(A)尾对于mRNA的结构稳定性和翻译效率都有着较大的影响。在当下的mRNA分子生产中，通常会在载体中包含poly(A)尾的编码序列，即包含连续重复的A碱基，或经非A碱基隔开的几个连续重复A碱基片段的序列。这种poly(A)尾编码序列，经常会随着宿主细胞的繁殖、传代等行为，出现大量的含A碱基的核苷酸的缺失。目前没有好的办法可以防止这种缺失现象的发生。甚至于，由于生物体细胞中并不存在天然的poly(A)尾编码序列，很难找到好的方法去研究这种序列结构在体内不稳定的原因。

本申请的发明人，意外地发现，当下调原核宿主细胞，例如大肠杆菌宿主细胞中的促旋酶的活性时，含有poly(A)序列的载体在该原核宿主细胞中具有改善的复制稳定性，即在载体的复制中，poly(A)序列的A碱基丢失情况得到改善。

本领域所公知的是，促旋酶是原核生物细胞中重要的DNA解旋酶，参与DNA的复制、修复、重组和转录等进程。靶向促旋酶、并抑制促旋酶活性的药物，如喹诺酮和香豆素，被用作抗菌药，对细菌的DNA造成不可逆的损伤。

鉴于GyrA和GyrB的重要作用，除基因或蛋白研究目的外，不会想到在菌株中下调GyrA、GyrB、或由其构成的促旋酶的活性而用于生产目的，因为这种下调很可能引起菌株的死亡。

然而，令人意外的是，在宿主细胞中下调促旋酶的活性时，宿主细胞竟然能够维持原有的质粒产量。也就是说，通过下调宿主细胞中促旋酶的活性，能够以较高的质粒产量，制备出稳定性高的poly(A)序列载体。这对于含poly(A)序列的载体的生产而言，具有重大的意义。同时，质粒的质量，例如超螺旋比例，也维持原有水平。

促旋酶由GyrA亚基和GyrB亚基构成，GyrA由gyrA基因编码，GyrB由gyrB基因编码。已有研究指出，GyrA中的H80A突变、A569T和T586A双突变，GyrB中的E42D突变、R136C突变、和D498A突变，会引起促旋酶的活性下降。

利用该已有的信息，本申请的发明人在宿主细胞中，经基因编辑，对gyrA基因或gyrB基因做了相应的突变，使得促旋酶的活性下降。

具体地，用载体做媒介，向宿主细胞，例如大肠杆菌宿主细胞，特别是作为载体制备株的JM108、NEB Stable、Top10、DH5α和DH10B，导入Cas9酶，以及i) 包含SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.13所示的核苷酸序列的供体序列，ii) 包含SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.14所示的核苷酸序列的供体序列，iii) 包含SEQ ID NO.10所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.15所示的核苷酸序列的供体序列，iv) 包含SEQ ID NO.11所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.16所示的核苷酸序列的供体序列，或v) 包含SEQ ID NO.12所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.17所示的

核苷酸序列的供体序列。在得到的宿主细胞中，*gyrA*基因包含SEQ ID NO.3或4所示的核苷酸序列，或者*gyrB*基因包含SEQ ID NO.5、6、或7所示的核苷酸序列。也可以向宿主细胞导入上述sgRNA/供体序列的组合，例如i)和iv)的组合。

当使用如此得到的任一宿主细胞来复制或表达含有poly(A)序列的载体时，相对于没有下调促旋酶活性的宿主细胞，poly(A)序列的复制稳定性得到改善，尤其是，随着复制次数的增加、宿主细胞传代的代数增加，这种改善效果会更加明显。

从仅*gyrA*基因突变、仅*gyrB*基因突变、以及*gyrA*基因+*gyrB*基因突变的数据来看，促旋酶的活性受GyrA和GyrB两者的影响。即，GyrA的突变、或GyrB的突变，均会影响促旋酶的活性。

通过下调宿主细胞中促旋酶的表达量，也可以使得载体中poly(A)的复制和表达稳定性得到提高。

具体地，可以通过*gyrA*基因或*gyrB*基因的敲降、或者*gyrA*基因或*gyrB*基因敲除加GyrA/GyrB载体表达等，下调宿主细胞中促旋酶的表达量。宿主细胞可以经*gyrA*基因的敲降，或者敲除*gyrA*基因并向宿主细胞导入表达GyrA的载体等而包含下调的促旋酶表达量。*gyrA*基因的敲降可以通过提供针对GyrA的抑制性核酸分子（例如shRNA）而实现。重组宿主细胞可以经*gyrB*基因的敲降，或者敲除*gyrB*基因并向宿主细胞导入表达GyrB的载体等而包含下调的促旋酶表达量。*gyrB*基因的敲降可以通过提供针对GyrB的抑制性核酸分子（例如shRNA）而实现。敲除可以通过例如同源重组的方式进行，同源重组的操作为本领域技术人员所熟知。构建GyrA或GyrB的表达载体并导入宿主细胞的技术，为本领域技术人员熟知。

通过上述方法得到的重组宿主细胞，以及通过其他任何方法的经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的重组宿主细胞，特别是经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的重组载体制备株，如JM108、NEB Stable、Top10、DH5 α 、DH10B、MG1655、AG1、BL21、DB3.1、DC10B、DH1、E.Cloni 10G、EPI300、EPI400、JM109、JM110、STBL2、STBL3、SURE、TOP10F'、XL1-Blue或XL10-Gold，可以用于复制或表达含有poly(A)序列的核酸分子。此外，因各种原因，如*gyrA*基因或*gyrB*基因的自然突变、*gyrA*基因或*gyrB*基因的自然敲降等，而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的天然突变菌株，也可以用于复制或表达含有poly(A)序列的核酸分子。

进一步，通过联合*RecA*、*lacI*、*RecQ*等其他基因型的突变可以进一步提高复制或表达含有poly(A)序列的核酸分子的稳定性。具体地，在大肠杆菌宿主细胞仅*gyrA*基因突变、仅*gyrB*基因突变、或*gyrA*基因+*gyrB*基因突变基础上，进一步包括*RecA*基因突变、插入*lacI*基因表达盒或/和*RecQ*基因敲除。其中宿主细胞突变后*RecA*基因相对于野生型*RecA*基因表达的蛋白活性下降（如重组缺陷型突变），突变后的*RecA*基因可以是*RecA1*。其中插入*lacI*基因表达盒的位点是在大肠杆菌宿主细胞*yghX*基因位点，*lacI*基因表达盒包括*lacIq*启动子、*lacI*和/或终止子。大肠杆菌宿主

细胞基因型可以是如JM108[gyrA(H80A), *RecA1*, *lacIq*]和 JM108[gyrA(H80A), *RecA1*, *lacIq*, *RecQ*]。

具体地，可以i) 向大肠杆菌宿主细胞导入载体，载体中包含含有poly(A)序列的核酸分子，以及ii) 在利于载体复制的条件下培养大肠杆菌宿主细胞。

或者，可以i) 向大肠杆菌宿主细胞导入载体，载体中包含含有poly(A)序列的核酸分子，ii) 任选地，在利于载体复制的条件下培养大肠杆菌宿主细胞，以及iii) 在利于载体表达的条件下培养大肠杆菌宿主细胞，或者从步骤i) 或ii) 的大肠杆菌宿主细胞中提取载体，并对载体进行体外转录。

载体可以是任何合适的载体，例如质粒载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体等。对于载体的构建，各种载体的复制条件和具体操作，以及表达条件和具体操作，本领域技术人员可以根据实际情况和需要进行。

或者，可以i) 在大肠杆菌宿主细胞的基因组中整合入含有poly(A)序列的核酸分子，以及ii) 在利于含有poly(A)序列的核酸分子的表达的条件下培养大肠杆菌宿主细胞。

本领域技术人员可以通过例如同源重组的方式在大肠杆菌宿主细胞的基因组中整合入含有poly(A)序列的核酸分子，并使得该含有poly(A)序列的核酸分子得以表达。且本领域技术人员可以根据实际情况找出利于含有poly(A)序列的核酸分子的表达的条件。

含有poly(A)序列的核酸分子可以编码带有poly(A)尾的mRNA。

poly(A)序列可以是任何poly(A)序列，只要其包含连续的A碱基重复。在一些实施方式中，poly(A)序列可以包含1个连续A碱基片段。在一些实施方式中，连续的A碱基片段可以包含连续的20-250个A碱基。在一些实施方式中，poly(A)序列可以包含多个，例如2-5个，由非A碱基间隔开的连续A碱基片段，其中各个连续A碱基片段可以包含连续的10-100个A碱基，且由1-20个非A碱基互相隔开。

本申请的发明人测试了多种poly(A)序列在经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的重组宿主细胞中的复制情况，包括连续poly(A)序列，如80A、100A和120A，以及分段的poly(A)序列，如30A+70A、和30A+30A+43A。结果表明，对于各种poly(A)序列，本申请的宿主细胞均可改善其复制稳定性，对于极不稳定的120A的效果尤其明显。

本申请也涉及包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的宿主细胞，包括天然突变株和重组菌株，在复制或表达含有poly(A)序列的核酸分子中的用途。

由本申请的方法得到，或者由任何其他方法得到的经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的重组宿主细胞，包括自然界中天然存在的宿主细胞，都在本申请的保护范围内。

以下，将结合具体实施例，对本申请的内容做进一步详细说明。实施例仅以实例的方式给出，而不限本申请的保护范围。

实施例1. 菌株突变体的构建

采用CRISPR-Cas9技术在JM108、NEB Stable、Top10、DH5α或DH10B菌株的基因组上突变*gyrA*和/或*gyrB*基因，其中突变前的野生型*gyrA*和*gyrB*基因序列分别如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

具体地，在JM108菌株中，对*gyrA*基因进行突变，使其表达产物包含H80A、或A569T&T586A突变。此外，对*gyrB*基因进行突变，使其表达产物包含E42D、R136C、或D498A突变。

1.1.1 将 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 上传至 sgRNA 设计网站 (www.atum.bio/eCommerce/cas9/input)，分别针对*gyrA*中含有H80的片段、*gyrA*中含有A569&T586的片段、*gyrB*中含有E42的片段、*gyrB*中含有R136的片段、和*gyrB*中含有D498的片段，设计出长度为20 bp的sgRNA，如SEQ ID NO.8-12所示。

1.1.2 将上述sgRNA与对应的供体序列SEQ ID NO.13-17构建在靶 (all-in-one) 质粒上，质粒图谱见图1A。

1.1.3 通过化学转化法将pCas质粒 (质粒图谱见图1B) 转入化学感受态的JM108、NEB Stable、Top10、DH5α或DH10B中，涂布至LB固体卡那霉素抗性平板，30℃倒平板培养14 h。挑取单个菌落，通过菌落PCR，使用SEQ ID NO.18和19所示的引物，及Sanger测序，验证获得阳性克隆。

表1. 菌落PCR引物序列

SEQ ID NO.	引物ID	序列
SEQ ID NO.18	pCas-F	GCATGACACCGGACATTATCCTGCAGC
SEQ ID NO.19	pCas-R	TCCCCAAATACAAAACCAATTTTCAGCC
SEQ ID NO.20	<i>gyrA</i> (H80A)-F	CATCATACTGCCCGGCATGTTTTGC
SEQ ID NO.21	<i>gyrA</i> (H80A)-R	CGGCATCGGTGATCATCATGATCTGG
SEQ ID NO.22	<i>gyrA</i> (A569T&T586 A)-F	CTCGCGATCGTGCTCATATCCTTGAAG
SEQ ID NO.23	<i>gyrA</i> (A569T&T586 A)-R	ACACGTTGCAGACCCACTACGTTTTCA
SEQ ID NO.24	<i>gyrB</i> (E42D) -F	GATTTTTTCACCGCCTGGAGCAATCTCAAG
SEQ ID NO.25	<i>gyrB</i> (E42D) -R	AAGCGTTACGTGTTGACCCAAAAAGTATAGAT
SEQ ID NO.26	<i>gyrB</i> (R136C) -F	TAGATGATTTTGCCTCTGAGCTTGATGATGAG
SEQ ID NO.27	<i>gyrB</i> (R136C) -R	AAGCGTTACGTGTTGACCCAAAAAGTATAGAT
SEQ ID NO.28	<i>gyrB</i> (D498A) -F	TAGATGATTTTGCCTCTGAGCTTGATGATGAG
SEQ ID NO.29	<i>gyrB</i> (D498A) -R	AAGCGTTACGTGTTGACCCAAAAAGTATAGAT

1.1.4 将靶质粒电转入带有pCas质粒的上述五种感受态细胞中，转化平板，涂布至LB固体卡那霉素和壮观霉素双抗平板，倒平板在30℃培养14 h，挑取单个菌落，采用菌落PCR，以及Sanger测序，鉴定阳性克隆，所用引物为SEQ ID NO.20-29，从而获取成功编辑的阳性克隆。

1.1.5 在所获取的成功编辑的阳性克隆中，加入0.5 mM的IPTG诱导剂至4 mL含阳

性克隆菌液的LB试管中并在30°C培养7-8 h，以消除壮观霉素抗性的靶质粒。

1.1.6 将4 mL含阳性克隆菌液的LB试管置于37°C培养7-8 h，以消除卡那霉素抗性的pCas质粒。

1.1.7 将获得的菌株，制备成感受态备用。

当制备含有两种上述基因突变组合的菌株时，先经上述1.1.3导入pCas质粒，经1.1.4导入含有一种突变对应的sgRNA和供体序列的靶质粒，筛选得到成功编辑的阳性克隆菌株，经1.1.5从菌株中去除靶质粒，并将菌株制备为感受态。之后，回到1.1.4，导入含有另一种突变对应的sgRNA和供体序列的靶质粒，筛选得到成功编辑的阳性克隆菌株，再按照1.1.5-1.1.7的顺序进行。具体地，在制备包含*gyrA*(H80A)和*gyrB*(R136C)突变的菌株中，先在1.1.4中导入含有对应于*gyrA*(H80A)的sgRNA和供体序列的靶质粒，经1.1.5从菌株中去除该靶质粒，将菌株制备为感受态，之后，回到1.1.4，导入含有*gyrB*(R136C)对应的sgRNA和供体序列的靶质粒。

同理，在制备含有三种以上上述基因突变组合的菌株时，按照1.1.3-1.1.4-1.1.5-(1.1.4-1.1.5) n-1.1.6-1.1.7的顺序进行操作，其中n取决于所要包含的上述基因突变的种类，n大于等于2。

*gyrA*基因在编辑后的序列分别如SEQ ID NO.3和4所示（分别对应H80A和A569T&T586A），*gyrB*基因在编辑后的序列分别如SEQ ID NO.5-7所示（分别对应E42D、R136C、和D498A）。

实施例2. 含有poly(A)序列的质粒的制备

制备含有连续poly(A)序列（SEQ ID NO.30-32）或者分段poly(A)序列（SEQ ID NO.33和34）的五个测试质粒，即poly(A)-测试1（80A）、poly(A)-测试2（100A）、poly(A)-测试3（120A）、poly(A)-测试4（30&70A）、和poly(A)-测试5（30&30&43A）。

poly(A)-测试1（80A）质粒的图谱示于图2，其中编码mRNA部分的序列如SEQ ID NO.35所示。除poly(A)序列不同外，其他几个测试质粒的图谱与图2相同，且除poly(A)序列不同外，编码mRNA部分的序列同SEQ ID NO.35。

具体地，合成按序含有T7启动子、编码5'UTR的序列、编码EGFP的序列、编码3'UTR的序列、poly(A)序列、和线性化位点BspQI的核苷酸序列SEQ ID NO: 35等（金斯瑞生物科技有限公司），利用Gibson方法分别组装到pVAX1卡那霉素抗性载体上（金斯瑞生物科技有限公司，SEQ ID NO: 36）。

挑选阳性克隆进行Sanger测序，得到测序正确的五种测试质粒。

实施例3. *gyrA*基因突变的大肠杆菌提高poly(A)的复制稳定性

在实施例2得到的五种测试质粒中，分别随机挑选1个质粒，转化至实施例1中获得的感受态*gyrA*基因突变菌株、以及感受态的商业化菌株，包括NEB Stable。每个转化后的平板挑取8个克隆，使用LB液体培养基37°C，220 rpm培养过夜，此菌为第一代。抽提第一代菌液的质粒，同时将第一代菌液为种子液按照1: 1000接种培养过夜，此菌为第二代，连续传代至第三代。

选取从第一代和第三代传代克隆中抽提的质粒，使用Sanger测序验证poly(A)序列的有效碱基数和纯度合格率。poly(A)有效碱基数，定义为poly(A)序列的第一个到最后一个底峰不超过50%的A碱基之间的碱基个数。当poly(A)有效碱基数与转化质粒的初始碱基数误差在1 nt范围内，最后3个有效A碱基的底峰低于50%，且剩余poly(A)序列的底峰低于10%时，记为纯度合格，反之记为不合格，以此计算出纯度合格率。图3A-3C分别示出poly(A)纯度合格（3A）、纯度不合格（3B）和poly(A)缺失（3C）的示例性Sanger测序峰图。

从这些传代克隆的poly(A)有效碱基数和纯度合格率数据，判断不同突变宿主菌复制poly(A)结构的稳定性。Sanger测序poly(A)有效碱基数越多，poly(A)纯度合格率越高，说明该突变宿主对复制poly(A)结构的稳定性越高。

表2示出poly(A)-测试3质粒在第一代和第三代菌株中的poly(A)有效碱基，以及5种测试质粒在第一代和第三代gyrA基因突变菌株中的平均纯度合格率。

Sanger测序显示，在第一代NEB Stable菌株中，poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为115.6 nt，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率为62.5%，第三代克隆中的poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为114.8 nt，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率为47.5%。而在突变gyrA基因的NEB Stable菌株中，不论在第一代还是第三代，相应的poly(A)有效碱基数和纯度合格率均高于改造前的商业化菌株。其中，在第一代NEB Stable [gyrA(H80A)]和NEB Stable [gyrA(A569T, T586A)]中，poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数分别为117.6 nt和116.3 nt，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率分别为80.0%和67.5%，第三代克隆中poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为分别为117.6 nt和116.1 nt，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率分别为72.5%和65.0%。同样地，突变gyrA基因的JM108、TOP10、DH5α和DH10B，相对于各自未做突变的商业化菌株，不论在第一代还是第三代，相应的poly(A)有效碱基数和纯度合格率均呈现为更高水平。

上述数据表明，gyrA基因突变的大肠杆菌对于poly(A)质粒的复制稳定性有积极效果。

表2. poly(A)质粒在商业化菌株和gyrA突变菌株中的传代稳定性

菌株ID	第一代		第三代	
	poly(A) 有效碱基数	poly(A) 纯度合格率	poly(A) 有效碱基数	poly(A) 纯度合格率
JM108	116.9	55.0%	116.5	47.5%
JM108 [gyrA(H80A)]	118.3	82.5%	118.1	77.5%
JM108 [gyrA(A569T, T586A)]	117.4	75.0%	116.9	65.0%
NEB Stable	115.6	62.5%	114.8	47.5%
NEB Stable [gyrA(H80A)]	117.6	80.0%	117.6	72.5%

NEB Stable [<i>gyrA</i> (A569T, T586A)]	116.3	67.5%	116.1	65.0%
TOP10	115.5	55.5%	115.8	40.0%
TOP10 [<i>gyrA</i> (H80A)]	116.7	62.5%	117.6	57.5%
TOP10 [<i>gyrA</i> (A569T, T586A)]	116.6	65.0%	115.9	57.5%
DH5α	115.3	42.5%	114.7	30.0%
DH5α [<i>gyrA</i> (H80A)]	118.2	70.0%	117.9	52.5%
DH5α [<i>gyrA</i> (A569T, T586A)]	116.1	67.5%	115.3	47.5%
DH10B	115.9	52.5%	115.7	45.0%
DH10B [<i>gyrA</i> (H80A)]	117.5	72.5%	117.3	65.0%
DH10B [<i>gyrA</i> (A569T, T586A)]	117.3	75.0%	116.9	57.5%

实施例4. *gyrB*基因突变的大肠杆菌提高poly(A)的复制稳定性

根据实施例3的操作，在实施例2得到的五种测试质粒中，分别随机挑选1个质粒，转化至实施例1中获得的感受态*gyrB*基因突变菌株、以及感受态的商业化菌株，包括NEB Stable。统计在这些菌株的第一代和第三代传代克隆中的poly(A)序列有效碱基数和纯度合格率。

表3汇总了poly(A)-测试3质粒在第一代和第三代菌株中的poly(A)有效碱基，以及5种测试质粒在第一代和第三代*gyrB*基因突变菌株中的平均poly(A)纯度合格率。

Sanger测序显示，在第一代NEB Stable菌株中，poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为115.6 nt，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率为62.5%，第三代克隆中的poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为114.8 nt，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率为47.5%。而在突变*gyrB*菌株的NEB Stable菌株中，不论是第一代还是第三代克隆中的质粒，相应的poly(A)有效碱基数和纯度合格率均高于改造前的商业化菌株。其中，在NEB Stable [*gyrB*(E42D)]、NEB Stable [*gyrB*(R136C)]、和NEB Stable [*gyrB*(D498A)]中，第一代克隆中poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数分别为116.2 nt、117.6 nt、和116.9，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率分别为67.5%、77.5%和72.5%，第三代克隆中poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数分别为115.2 nt、117.1 nt、和116.3 nt，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率均为57.5%、67.5%、和60.0%。同样地，突变*gyrB*基因的JM108、TOP10、DH5α和DH10B，相对于各自未做突变的商业化菌株，不论在第一代还是第三代，相应的poly(A)有效碱基数和/或纯度合格率，特别是纯度合格率，呈现为更高水平。

以上数据表明，*gyrB*基因突变的大肠杆菌对于poly(A)质粒的复制稳定性有积极效果。

表3. poly(A)质粒在商业化菌株和*gyrB*突变菌株中的传代稳定性

菌株ID	第一代	第三代
------	-----	-----

	poly(A) 有效碱基数	poly(A) 纯度合格率	poly(A) 有效碱基数	poly(A) 纯度合格率
JM108	116.9	55.0%	115.5	47.5%
JM108 [<i>gyrB</i> (E42D)]	116.7	70.0%	115.9	57.5%
JM108 [<i>gyrB</i> (R136C)]	118.1	80.0%	117.3	67.5%
JM108 [<i>gyrB</i> (D498A)]	116.9	72.5%	116.6	60.0%
NEB Stable	115.6	62.5%	114.8	47.5%
NEB Stable [<i>gyrB</i> (E42D)]	116.2	67.5%	115.2	57.5%
NEB Stable [<i>gyrB</i> (R136C)]	117.6	77.5%	117.1	67.5%
NEB Stable [<i>gyrB</i> (D498A)]	116.9	72.5%	116.3	60.0%
TOP10	115.5	55.5%	115.8	40.0%
TOP10 [<i>gyrB</i> (E42D)]	115.4	60.0%	115.6	52.5%
TOP10 [<i>gyrB</i> (R136C)]	116.1	70.0%	116.2	60.0%
TOP10 [<i>gyrB</i> (D498A)]	116.9	67.5%	115.3	55.0%
DH5α	115.3	42.5%	114.7	30.0%
DH5α [<i>gyrB</i> (E42D)]	117.1	70.0%	116.6	62.5%
DH5α [<i>gyrB</i> (R136C)]	117.0	70.0%	116.8	65.0%
DH5α [<i>gyrB</i> (D498A)]	116.1	62.5%	115.6	52.5%
DH10B	115.9	52.5%	115.7	45.0%
DH10B [<i>gyrB</i> (E42D)]	116.8	70.0%	116.3	57.5%
DH10B [<i>gyrB</i> (R136C)]	117.3	72.5%	117.6	65.0%
DH10B [<i>gyrB</i> (D498A)]	117.1	72.5%	116.4	62.5%

实施例5. *gyrA* & *gyrB*基因突变的大肠杆菌提高poly(A)的复制稳定性

根据实施例3的操作，在实施例2得到的五种测试质粒中，分别随机挑选1个质粒，转化至实施例1中获得的感受态*gyrA* & *gyrB*基因突变菌株、以及感受态的商业化菌株，包括NEB Stable。统计第一代和第三代传代克隆中的poly(A)序列有效碱基数和纯度合格率。

表4汇总了poly(A)-测试3质粒在第一代和第三代菌株中的poly(A)有效碱基数，以及五种测试质粒在第一代和第三代菌株中的poly(A)纯度合格率。

Sanger测序显示，在第一代的NEB Stable菌株中，poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为115.6 nt，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率为62.5%，在第三代克隆中，poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为114.8 nt，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率为47.5%。在同时突变*gyrA*和*gyrB*基因的NEB Stable菌株中，不论在第一代还是第三代，相应的poly(A)有效碱基数和纯度合格率均高于改造前的商业化菌株。其中，在NEB Stable [*gyrA*(H80A) *gyrB*(R136C)]中，第一代传代克隆中poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为118.1 nt，5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率为87.5%，第三代克隆中的poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为为

117.9 nt, 5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率为75.0%。同样地, 突变*gyrA* & *gyrB* 基因的JM108、TOP10、DH5α和DH10B, 相对于各自未做突变的商业化菌株, 不论在第一代还是第三代, 相应的poly(A)有效碱基数和纯度合格率, 均呈现为更高水平。

以上数据表明, *gyrA*和*gyrB*基因同时突变的大肠杆菌对于poly(A)质粒的复制稳定性有积极效果。

表4. poly(A)质粒在*gyrA*和*gyrB*基因突变宿主和商业化菌株中的传代稳定性

菌株ID	第一代		第三代	
	poly(A) 有效碱 基数	poly(A) 纯度合 格率	poly(A) 有效碱 基数	poly(A) 纯度合 格率
JM108	116.9	55.0%	116.5	47.5%
JM108 [<i>gyrA</i> (H80A) <i>gyrB</i> (R136C)]	118.2	82.5%	117.7	77.5%
NEB Stable	115.6	62.5%	114.8	47.5%
NEB Stable [<i>gyrA</i> (H80A) <i>gyrB</i> (R136C)]	118.1	87.5%	117.9	75.0%
TOP10	115.5	55.5%	115.8	40.0%
TOP10 [<i>gyrA</i> (H80A) <i>gyrB</i> (R136C)]	116.9	67.5%	116.6	62.5%
DH5α	115.3	42.5%	114.7	30.0%
DH5α [<i>gyrA</i> (H80A) <i>gyrB</i> (R136C)]	117.4	70.0%	117.1	52.5%
DH10B	115.9	52.5%	115.7	45.0%
DH10B [<i>gyrA</i> (H80A) <i>gyrB</i> (R136C)]	117.2	77.5%	116.8	67.5%

实施例6. 突变菌株中质粒的产量

选择实施例2中得到的poly(A)-测试3质粒, 转化至poly(A)稳定性较好的突变菌株JM108 [*gyrA*(H80A)]、NEB Stable [*gyrA*(H80A)]、DH10B [*gyrA*(H80A)]、JM108 [*gyrB*(R136C)]、和JM108 [*gyrA*(H80A) *gyrB*(R136C)], 以及对应的商业化菌株JM108、NEB Stable、DH10B。随机挑选单克隆至4 mL LB液体培养基中, 30℃, 200 rpm培养15 h, 得到种子液。将种子液按照1: 1000接种至100 mL LB液体培养基中, 37℃, 200 rpm培养13h, 抽提质粒, 用nanodrop测值仪测质粒产量。

表5汇总了poly(A)-测试3质粒转化不同菌株的质粒产量, 可以看出, 突变菌株中获得的质粒产量与未突变菌株几乎一致。

表5. poly(A)质粒在*gyrA*和/或*gyrB*基因突变宿主和商业化菌株中的质粒产量

菌株ID	质粒产量 (μg)
JM108	388.35
JM108 [<i>gyrA</i> (H80A)]	369.73
JM108 [<i>gyrB</i> (R136C)]	349.98

JM108 [<i>gyrA</i> (H80A) <i>gyrB</i> (R136C)]	403.12
NEB Stable	422.06
NEB Stable [<i>gyrA</i> (H80A)]	400.98
DH10B	350.57
DH10B [<i>gyrA</i> (H80A)]	322.97

实施例7. 突变菌株中质粒的超螺旋比例

选择实施例2中得到的poly(A)-测试2（100A）质粒和poly(A)-测试3（120A）质粒，根据实施例3的操作，分别转化至商业化菌株JM108、以及突变菌株JM108 [*gyrA*(H80A)]、JM108 [*gyrB*(R136C)]、和JM108 [*gyrA*(H80A) *gyrB*(R136C)]，随机挑选单克隆进行连续传代实验。

对第一代和第三代菌株进行质粒抽提，取200 ng所抽提的质粒进行DNA凝胶电泳，并用全自动凝胶成像分析系统GIS300分析质粒的超螺旋比例。

图4示出每种菌株对应的平均超螺旋比例。可以看出，突变菌株中获得的质粒的超螺旋比例与JM108几乎一致，皆大于80%。

综上所述，突变*gyrA*和/或*gyrB*基因，使得大肠杆菌宿主能够提升poly(A)质粒的复制稳定性，但不影响质粒的质量，例如超螺旋比例。

实施例8. *gyrA*突变与其他基因型突变组合的大肠杆菌进一步提升poly(A)序列复制稳定性

*RecA*基因表达的是ATP依赖型DNA重组酶，帮助DNA在受到损伤或需要进行复制时，寻找并配对正确的序列，从而促进DNA修复或复制的完成。*RecA1*是*RecA*基因的重组缺陷型突变，可以减少DNA的非特异性重组，降低外源DNA的重组机率，使插入的外源DNA更稳定，有利于DNA的转化和高纯度质粒的提取。

Lac启动子是目前商业化载体中常见的功能元件，常作为蓝白斑筛选的启动元件，例如pUC57，其多克隆位点（MCS）紧邻Lac启动子，当研究者将mRNA功能序列插入MCS之后，通常会导致polyA序列出现在Lac启动子下游，而Lac启动子的转录活性会导致polyA序列稳定性下降。*lacIq*是*lacI*基因的变异型，其能大量表达阻遏蛋白，从而降低Lac启动子在非诱导条件下的转录活性，提升其下游poly(A)序列的稳定性。

*RecQ*基因属于*RecQ*解旋酶家族，参与DNA解旋、复制、DNA损伤修复等过程。*RecQ*基因的敲除使插入的外源DNA更稳定，有利于DNA的高效转化。

参照实施例1的方法，采用CRISPR-Cas9技术在大肠杆菌JM108菌株的基因组上突变、敲除或敲入相关基因。其中，要敲除的基因如下所示：*RecQ*(SEQ ID NO.41)，要敲入的基因如下所示：*lacIq*启动子+*lacI*+*rrnB* T1 终止子 +*rrnB* T2 终止子 (SEQ ID NO.42)，要进行突变的野生型基因如下所示：*RecA*(SEQ ID NO.43)。具体地，使野生型*RecA*基因突变成*RecA1*(SEQ ID NO.44)。

参照实施例1中的方法构建得到大肠杆菌突变菌株并制备得到对应的感受态JM108[*gyrA*(H80A), *RecA1*, *lacIq*]和 JM108[*gyrA*(H80A), *RecA1*, *lacIq*, *RecQ*]基因突变菌株。其中, 靶向*RecQ*、*yghX* (Gene ID: 2847694) 和 *RecA*的sgRNA序列如SEQ ID NO.45-47所示, 对应的供体序列如SEQ ID NO.48-50所示, 菌落PCR引物序列如表6所示。

表6. 菌落PCR引物序列

SEQ ID NO.	引物ID	序列
SEQ ID NO.51	<i>RecA</i> -F	CATTGCAGACCTTGTGGCAACAAT
SEQ ID NO.52	<i>RecA</i> -R	GGATGTTGATTCTGTCATGGCATATCCTTACAAC
SEQ ID NO.53	<i>RecQ</i> -F	TATAACCACGACTCTAACGGGCGTTCC
SEQ ID NO.54	<i>RecQ</i> -R	CGAAATAATCAAATGAATGCCAAATCCGGC
SEQ ID NO.55	<i>lacI</i> -F	CATACTGCCCTTTGTACTTCTCGAGAGC
SEQ ID NO.56	<i>lacI</i> -R	ACCCAGCGGTTTCAGTAAATTGTACGA

根据实施例3的操作, 在实施例2得到的五种测试质粒中, 分别随机挑选1个质粒, 转化至参照实施例1方法获得的感受态JM108[*gyrA*(H80A), *RecA1*, *lacIq*]和 JM108[*gyrA*(H80A), *RecA1*, *lacIq*, *RecQ*]基因突变菌株、以及对应的商业化菌株JM108。统计第一代和第三代传代克隆中的poly(A)序列有效碱基数和纯度合格率。

表7汇总了poly(A)-测试3质粒在第一代和第三代菌株中的poly(A)有效碱基数, 以及五种测试质粒在第一代和第三代菌株中的poly(A)纯度合格率。

Sanger测序显示, 在第一代JM108菌株中, poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为116.9 nt, 5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率为55.0%, 第三代克隆中的poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为116.5 nt, 5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率为47.5%。而在突变菌株中, 不论在第一代还是第三代, 相应的poly(A)有效碱基数和纯度合格率均高于商业化菌株JM108。其中, 在第一代JM108[*gyrA*(H80A), *RecA1*, *lacIq*]和JM108[*gyrA*(H80A), *RecA1*, *lacIq*, *RecQ*]突变菌株中, poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数分别为118.6 nt、118.3 nt, 5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率分别为83.2%、85.5%, 第三代克隆中poly(A)-测试3质粒的poly(A)有效碱基数为分别为117.9 nt、118.1 nt, 5种测试质粒的平均poly(A)纯度合格率分别为80.5%、82.5%。

上述数据表明, *gyrA*(H80A)与*RecA1*、*lacIq*、*RecQ*等基因型的组合突变或敲除可以进一步提升菌株对于poly(A)质粒的复制稳定性。

表7. poly(A)质粒在*gyrA*突变与其他基因型突变组合的宿主和商业化菌株中的复制稳定性

菌株ID	第一代		第三代	
	poly(A) 有效碱	poly(A) 纯度合	poly(A)有 效碱基数	poly(A)纯 度合格率

	基数	格率		
JM108	116.9	55.0%	116.5	47.5%
JM108[gyrA(H80A)]	118.3	82.5%	118.1	77.5%
JM108[gyrA(H80A), RecA1, lacIq]	118.6	83.2%	117.9	80.5%
JM108[gyrA(H80A), RecA1, lacIq, RecQ]	118.3	85.5%	118.1	82.5%

实施例9. *gyrA*突变与其他基因型突变组合的大肠杆菌进一步提升poly(A)质粒连续传代复制的稳定性

将实施例2得到的五种测试质粒分别转化至实施例1中获得的JM108[gyrA(H80A), RecA1, lacIq, RecQ]和商业化菌株JM108。每个转化后的平板挑取16个克隆,使用LB液体培养基37℃, 220 rpm培养过夜,此菌为传代模板(P0代)。取200μl P0代菌液和200μl 50%甘油混匀,放至-80℃保存。抽提P0代菌液的质粒,使用Sanger测序验证poly(A)序列的有效碱基数和峰型纯度。各挑选4个Sanger测序结果通过的克隆,以对应的P0代甘油菌为种子液按照1: 1000接种培养过夜,此菌为第一代(P1代),同时将第一代菌液作为种子液按照1: 1000接种培养过夜,此菌为第二代,连续传代至第十代(P10代)。

选取从第一代(P1代)到第十代(P10代)传代克隆中抽提的质粒,使用Sanger测序验证poly(A)序列的有效碱基数和纯度是否合格。当有效碱基数和纯度合格时,记为克隆合格,反之记为克隆不合格,由此计算出克隆合格率。从每一代传代克隆合格率数据,判断不同突变宿主菌复制poly(A)结构的稳定性。每一代的传代克隆合格率数据越高,说明该突变宿主对复制poly(A)结构的稳定性越高。表8示出5种测试质粒在第一代(P1代)到第十代(P10代)菌株中的poly(A)克隆合格率。

Sanger测序显示,在第一代JM108菌株中,5种测试质粒的平均传代克隆合格率为60.7%,随着传代的进行,JM108菌株的传代克隆合格率快速降低,到第五代平均传代克隆合格率已低于42.0%,到第十代平均传代克隆合格率仅为14.6%。而在JM108[gyrA(H80A), RecA1, lacIq, RecQ]基因突变菌株中,不论在第一代还是到第十代,相应的poly(A)传代克隆合格率均高于商业化菌株JM108。其中,在第一代JM108[gyrA(H80A), RecA1, lacIq, RecQ]基因突变菌株中,5种测试质粒的平均传代克隆合格率为87.5%,传至第十代平均传代克隆合格率仍为42.0%,高于商业化菌株JM108第五代的传代克隆合格率。

上述数据表明, *gyrA*(H80A)与*RecA1*、*lacIq*、*RecQ*等基因型的组合突变或敲除对于poly(A)质粒的传代稳定性有积极效果。

表8 poly(A)质粒在商业化菌株和基因型突变菌株中的克隆合格率

菌株 ID 传代代次(代)	JM108	JM108[gyrA(H80A), RecA1, lacIq, RecQ]
P1	60.7%	87.5%
P2	53.8%	78.1%
P3	50.9%	71.9%
P4	42.1%	56.3%
P5	40.2%	53.1%
P6	30.3%	53.1%
P7	20.4%	53.1%
P8	20.4%	43.8%
P9	15.6%	42.6%
P10	14.6%	42.0%

尤其对于poly(A)结构难度较高的质粒而言，例如连续A碱基大于120 bp的质粒，在使用本申请菌株时，相比于商业化的菌株，随着传代的不断进行，poly(A)复制稳定性的优势逐渐增大。

本申请的实施方式并不限于上述实施例所述，在不偏离本发明的精神和范围的情况下，本领域普通技术人员可以在形式和细节上对本申请做出各种改变和改进，而这些均落在本申请的保护范围内。

本文中提及的核苷酸序列如下。

SEQ ID NO.1: 野生型gyrA
ATGAGCGACCTTGCGAGAGAAATTACACCGGTCAACATTGAGGAAGAGCTGAAGAGCTCCTA
TCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCCGAGATGGCCTGAA
GCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACGTACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTA
TAAAAATCTGCCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTCGGC
GGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGT
CAGGGTAACTTCGGTTCTATCGACGGCGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGGAATCCGT
CTGGCGAAAATTGCCCATGAACTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTCGATTTTCGTTGAT
AACTATGACGGCACGGAAAAAATTCGGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGT
GAACGGTTCTTCCGGTATCGCCGTAGGTATGGCAACCAACATCCCGCCGCACAACCTGACGG
AAGTCATCAACGGTTGTCTGGCGTATATTGATGATGAAGACATCAGCATTGAAGGGCTGATGG
AACACATCCCGGGGCCGACTTCCCGACGGCGGCAATCATTAACGGTCGTCGCGGTATTGAA
GAAGCTTACCGTACCGGTCGCGGCAAGGTGTATATCCGCGCTCGCGCAGAAGTGGAAGTTGA
CGCCAAAACCGGTCGTGAAACCATTATCGTCCACGAAATTCGTATCAGGTAAACAAAGCGC
GCCTGATCGAGAAGATTGCGGAACTGGTAAAAGAAAAACGCGTGGAAGGCATCAGCGCGCT
GCGTGACGAGTCTGACAAAGACGGTATGCGCATCGTGATTGAAGTGAAACGCGATGCGGTGCG
GTGAAGTTGTGCTCAACAACCTCTACTCCAGACCCAGTTGCAGGTTTCTTTTCGGTATCAACA
TGGTGGCATTGCACCATGGTCAGCCGAAGATCATGAACCTGAAAGACATCATCGCGGCGTTTG
TTCGTCACCGCCGTGAAGTGCGTACCCGTCGTAATTTTCGAACTGCGTAAAGCTCGCGATC
GTGCTCATATCCTTGAAGCATTAGCCGTGGCGCTGGCGAACATCGACCCGATCATCGAACTGA
TCCGTCATGCGCCGACGCTGCAGAAGCGAAAACCTGCGCTGGTTGCTAATCCGTGGCAGCTG
GGCAACGTTGCCGCGATGCTCGAACGTGCTGGCGACGATGCTGCGCGTCCGGAATGGCTGGA

GCCAGAGTTCGGCGTGCGTGATGGTCTGTACTACCTGACCGAACAGCAAGCTCAGGCGATTCTGGATCTGCGTTTGCAGAACTGACCGGTCTTGAGCACGAAAACTGCTCGACGAATACAAAGAGCTGCTGGATCAGATCGCGGAAGTGTGCGTATTCTTGGTAGCGCCGATCGTCTGATGGAA GTGATCCGTGAAGAGCTGGAGCTGGTTCGTGAACAGTTCGGTGACAAACGTCGTAAGTAAAT CACCGCCAACAGCGCAGACATCAACCTGGAAGATCTGATCACCCAGGAAGATGTGGTCGTGA CGCTCTCTACCGAGGCTACGTAAAGTATCAGCCGCTTTCTGAATACGAAGCGCAGCGTCGTG GCGGGAAAGGTAAATCTGCCGCACGTATTAAGAAGAAGACTTTATCGACCGACTGCTGGTG GCGAACACTCACGACCATATTCTGTGCTTCTCCAGCCGTGGTCGCGTCTATTCGATGAAAGTTT ATCAGTTGCCGGAAGCCACTCGTGGCGCGCGCGGTCTCCGATCGTCAACCTGCTGCCGCTG GAGCAGGACGAACGTATCACTGCGATCCTGCCAGTGACCGAGTTTGAAGAAGGCGTGAAAG TCTTCATGGCGACCGCTAACGGTACCGTGAAGAAAACTGTCCTCACCGAGTTCAACCGTCTG CGTACCGCCGGTAAAGTGCGGATCAAAGTGGTTGACGGCGATGAGCTGATCGGCGTTGACCT GACCAGCGGCGAAGACGAAGTAATGCTGTTCTCCGCTGAAGGTAAAGTGGTGCGCTTTAAAG AGTCTTCTGTCCGTGCGATGGGCTGCAACACCACCGGTGTTTCGCGGTATTTCGTTAGGTGAAG GCGATAAAGTCGTCTCTCTGATCGTGCCTCGTGGCGATGGCGCAATCCTCACCGCAACGCAAA ACGGTTACGGTAAACGTACCGCAGTGGCGGAATACCCAACCAAGTCGCGTGCGACGAAAGG GGTATCTCCATCAAGGTTACCGAACGTAACGGTTTAGTTGTTGGCGCGGTACAGGTAGATGA CTGCGACCAGATCATGATGATCACCGATGCCGCTACGCTGGTACGTACTCGCGTTTCGGAAAT CAGCATCGTGGGCCGTAAACCCAGGGCGTGATCCTCATCCGTACTGCGGAAGATGAAAACG TAGTGGGTCTGCAACGTGTTGCTGAACCGGTTGACGAGGAAGATCTGGATACCATCGACGGC AGTGCCGCGGAAGGGGACGATGAAATCGCTCCGGAAGTGACGTTGACGACGAGCCAGAAG AAGAATAA

SEQ ID NO.37: 野生型GyrA

MSDLAREITPVNIEELKSSYLDYAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWNKAYK KSARVVGDVIGKYHPHGDSAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAMRYTEIRLA KIAHELMADLEKETVDFVDNYDGTEKIPDVMPTKIPNLLVNGSSGIAVGMATNIPPHNLTEVINGC LAYIDDEDISIEGLMEHIPGPDFPTAAIINGRRGIEEAYRTGRGKVYIRARAEVEVDAKTGRETIIVH EIPYQVNKARLIEKIAELVKEKRVEGISALRDESDKDGMRIVIEVKRDAVGEVVLNNLYSQTQLQV SFGINMVALHHGQPKIMNLKDIIAAFVRHRRREVVTTRTIFELRKARDRAHILEALAVANIDPIIE LIRHAPTAEAKTALVANPWQLGNVAAMLERAGDDAARPEWLEPEFGVRDGLYYLTEQQAQAIL DLRLQKLTGLEHEKLLDEYKELLDQIAELLRLGSADRLMEVIREELELVREQFGDKRRTEITANS ADINLEDLITQEDVVVTLSHQGYVKYQPLSEYEAQRRGGKGKSAARIKEEDFIDRLLVANTHDHI LCFSSRGRVYSMKVYQLPEATRGARGRPVNLPLEQDERITAILPVTEFEEGVKVFMATANGTVK KTVLTFENRLRTAGKVAIKLVDGDELIGVDLTSGEDEVMLFSAEGKVVRFKESSVRAMGCNTTGV RGIRLGE GDKVVSLIVPRGDGAILTATQNGYGKRTAVAEYPTKSRATKGVISIKVTERNGLVVGAV QVDDCDQIMMITDAGTLVRTRVSEISIVGRNTQGVLIRTAEDENVVGLQRVAEPVDEEDLDTIDG SAAEGDDEIAPEVDVDDEPEEE*

SEQ ID NO.38: GyrA突变体

MSDLAREITPVNIEELKSSYLDYAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWNKAYK KSARVVGDVIGKYHPX1GDSAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAMRYTEIRL AKIAHELMADLEKETVDFVDNYDGTEKIPDVMPTKIPNLLVNGSSGIAVGMATNIPPHNLTEVING CLAYIDDEDISIEGLMEHIPGPDFPTAAIINGRRGIEEAYRTGRGKVYIRARAEVEVDAKTGRETIIV HEIPYQVNKARLIEKIAELVKEKRVEGISALRDESDKDGMRIVIEVKRDAVGEVVLNNLYSQTQLQ V SFGINMVALHHGQPKIMNLKDIIAAFVRHRRREVVTTRTIFELRKARDRAHILEALAVANIDPII ELIRHAPTAEAKTALVANPWQLGNVAAMLERAGDDAARPEWLEPEFGVRDGLYYLTEQQAQAI LDRLQKLTGLEHEKLLDEYKELLDQIAELLRLGSADRLMEVIREELELVREQFGDKRRTEITAN SADINLEDLITQEDVVVTLSHQGYVKYQPLSEYEAQRRGGKGKXS2ARIKEEDFIDRLLVANX3H

DHILCFSSRGRVYSMKVYQLPEATRGRGRPIVNLPLEQDERITAILPVTEFEEGVKVFMATANG
TVKKTVLTFENRLRTAGKVAIKLVDGDELIGVDLTSGEDEVMLFSAEGKVVRFKESSVRAMGCNT
TGVRGIRLGEGDKVVSLIVPRGDGAILTATQNGYGKRTAVAEYPTKSRATKGVISIKVTERNGLVV
GAVQVDDCDQIMMITDAGTLVTRVSEISIVGRNTQGVILIRTAEDENVVGLQ RVAEPVDEEDLDT
IDGSA AEGDDEIAPEVDVDDEPEEE*

X1=H或A、X2=A或T、X3=T或A

SEQ ID NO.2: 野生型 *gyrB*

ATGTCGAATTCTTATGACTCCTCCAGTATCAAAGTCCTGAAAGGGCTGGATGCGGTGCGTAAG
CGCCCGGTATGTATATCGGCGACACGGATGACGGCACCGGTCTGCACCACATGGTATTCGAG
GTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCACCAT
CACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCATTCCGACCGGTATTCACCCG
GAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAATTTGA
CGATAACTCCTATAAAGTGTCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGTTTCGGTAGTAAACGCCCT
GTCGCAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCACCGTCAGATCTACGAAC
ACGGTGTACCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACCGGCACCATGGT
GCGTTTCTGGCCAGCCTCGAAACCTTCACCAATGTGACCGAGTTCGAATATGAAATTCTGGC
GAAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCCCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGCGCGACAAGCG
CGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTGAATATCTGA
ACAAGAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAAGACGGTATTG
GCGTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTTTACCAAC
AACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCCGTAC
CCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCGGT
GACGATGCGCGTGAAGGCCTGATTGCGGTGCTTTCCGTGAAAGTGCCGGACCCGAAATTCTC
CTCCCAGACCAAAGACAAACTGGTTTCTTCTGAGGTGAAATCGGCGGTTGAACAGCAGATGA
ACGAAGTGTGGCAGAATACCTGCTGGAAAACCCAACCGACGCGAAAAATCGTGGTTGGCAA
AATTATCGATGCTGCCCGTGCCCGTGAAGCGGCGCGTTCGCGCGCGTGAAATGACCCGCCGTA
AAGGTGCGCTCGACTTAGCGGGCTGCCGGGCAAACCTGGCAGACTGCCAGGAACGCGATCC
GGCGCTTTCCGAAGTGTACCTGGTGGAAGGGGACTCCGCGGGCGGCTCTGCGAAGCAGGGG
CGTAACCGCAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAAATCCTCAACGTCGAGAAAGC
GCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACAGCATCATCATGACCGA
TATCGGTCTGACGAGTACAACCCGGACAAACTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGA
TGCGGACGTCGACGGCTCGCACATTCTGACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCC
GGAAATCGTTGAACGCGGTACGCTCTACATCGCTCAGCCGCCGCTGTACAAAGTGAAGAAAG
GCAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATCGCG
CTGGACGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGACCGGCATTGGCTGGCGAAGCGTTAG
AGAAACTGGTATCTGAGTACAACGCGACGCAGAAAATGATCAATCGTATGGAGCGTCGTTATC
CGAAAGCAATGCTGAAAGAGCTTATCTATCAGCCGACGTTGACGGAAGCTGACCTTTCTGATG
AGCAGACCGTTACCCGCTGGGTGAACGCGCTGGTCAGCGAACTGAACGACAAAGAACAGCA
CGGCAGCCAGTGGAAGTTTGATGTTACACCAATGCTGAGCAAAACCTGTTTCGAGCCGATTG
TTCGCGTGCGTACCCACGGTGTGGATACTGACTATCCGCTGGATCACGAGTTTATCACCGGTG
GCGAATATCGTCGTATCTGCACGCTGGGTGAGAACTGCGTGGCTTGCTGGAAGAAGATGCG
TTTATCGAACGTGGCGAGCGTCGTCAGCCGGTAGCCAGCTTCGAGCAGGCGCTGGACTGGCT
GGTGAAAGAGTCCCGTCGCGGCCTCTCCATCCAGCGTTATAAAGGTCTGGGCGAGATGAACC
CGGAACAGCTGTGGGAAACCACTATGGACCCGGAAGTCGTCGTATGCTGCGCGTTACCGTT
AAAGATGCGATTGCTGCCGACCAGTTGTTCAACACGCTGATGGGCGACGCCGTTGAACCGCG
CCGTGCGTTTATTGAAGAGAACGCCCTGAAAGCGGCGAATATCGATATTTAA

SEQ ID NO.39: 野生型 *GyrB*

MSNSYDSSSIKVLKGLDAVRKRPGMYIGDTHDDGTGLHHMVFEVVDNAIDEALAGHCKEIIVTIH
ADNSVSVQDDGRGIPTGIHP EEGVSAAEVIMTVLHAGGKFDDNSYKVS GGLHGVGVSVVNALS
QKLELVIQREGKIHRQIYEHGVPQAPLAVTGTEKGTMTVRFWPSLETFTNVTEFEYEILAKRLRE
LSFLNSGV SIRLRDKRDGKEDHFHYEGGIKAFVEYLNKNKTPIHPNIFYFSTEKDGIGVEVALQWN
DGFQENIYCFTNNIPQRDGGTHLAGFRAAMTRTLNAYMDKEGYSKKAKVSATGDDAREGLIAVV
SVKVPDPKFSSQTKDKLVSEVKS SAVEQQMNELLA EYLLNPTDAKIVVGKIIDAARAREARRA
REMTRRK GALDLA GLPGKL ADCQERDPALSELYLVEGDSAGGSAKQGRNRKNQAILPLKGKILN
VEKARFDKMLSSQEVATLITALGCGIGRDEYNPDKLRYSIIIMTDADVDGSHIRTLTLLTFFYRQM
PEIVERGHVYIAQPLYKVKKGKQEYIKDDEAMDQYQISIALDGATLHTNASAPALAGEALEKL
VSEYNATQKMINRMERRY PKAMKELIYQPTLTEADLSDEQTVTRWVNALVSELNDKEQHGSQ
WKFDVHTNAEQNLFEPIVRVRTHGVD TDYPLDHEFITGGEYRRIC TLGEKLRGLLEEDAFIERGE
RRQPVASFEQALDWLVKESRRGLSIQRYKGLGEMNPEQLWETTMDPESRRMLRVTVKDAIAADQ
LFTTLMGDAVEPRRAFIEENALKAANIDI*

SEQ ID NO.40: GyrB突变体

MSNSYDSSSIKVLKGLDAVRKRPGMYIGDTHDDGTGLHHMVFXI VVDNAIDEALAGHCKEIIVTIH
ADNSVSVQDDGRGIPTGIHP EEGVSAAEVIMTVLHAGGKFDDNSYKVS GGLHGVGVSVVNALS
QKLELVIQX2EGKIHRQIYEHGVPQAPLAVTGTEKGTMTVRFWPSLETFTNVTEFEYEILAKRLR
ELSFLNSGV SIRLRDKRDGKEDHFHYEGGIKAFVEYLNKNKTPIHPNIFYFSTEKDGIGVEVALQW
NDGFQENIYCFTNNIPQRDGGTHLAGFRAAMTRTLNAYMDKEGYSKKAKVSATGDDAREGLIAV
VSVKVPDPKFSSQTKDKLVSEVKS SAVEQQMNELLA EYLLNPTDAKIVVGKIIDAARAREARRA
AREMTRRK GALDLA GLPGKL ADCQERDPALSELYLVEGDSAGGSAKQGRNRKNQAILPLKGKIL
NVEKARFDKMLSSQEVATLITALGCGIGRDEYNPDKLRYSIIIMTX3ADVDGSHIRTLTLLTFFYRQ
MPEIVERGHVYIAQPLYKVKKGKQEYIKDDEAMDQYQISIALDGATLHTNASAPALAGEALE
KLVSEYNATQKMINRMERRY PKAMKELIYQPTLTEADLSDEQTVTRWVNALVSELNDKEQHGS
QWKFDVHTNAEQNLFEPIVRVRTHGVD TDYPLDHEFITGGEYRRIC TLGEKLRGLLEEDAFIERG
ERRQPVASFEQALDWLVKESRRGLSIQRYKGLGEMNPEQLWETTMDPESRRMLRVTVKDAIAAD
QLFTTLMGDAVEPRRAFIEENALKAANIDI*

X1=E或D、X2=R或C、X3=D或A

SEQ ID NO.3: *gyrA*编辑后-*gyrA*(H80A)编码序列

ATGAGCGACCTTGCGAGAGAAATTACACCGGTCAACATTGAGGAAGAGCTGAAGAGCTCCTA
TCTGGATTATGCGATGTCIGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCCGAGATGGCCTGAAG
CCGGTACACCGTCCGCTACTTTACGCCATGAACGTACTAGGCAATGACTGGAACAAAAGCCTAT
AAAAAATCTGCCCCGTGCTGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCgcaGGTGACTCGGCGG
TCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCA
GGGTAACTTCGGTTCTATCGACGGCGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTCT
GGCGAAAATTGCCCATGAACTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTCGATTTCTGTTGATA
ACTATGACGGCACGGAAAAAATCCGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTG
AACGGTTCTCCGGTATCGCCGTAGGTATGGCAACCAACATCCCGCCGCACAACCTGACGGA
AGTCATCAACGGTTGTCTGGCGTATATTGATGATGAAGACATCAGCATTGAAGGGCTGATGGA
ACACATCCCGGGGCGGACTTCCCGACGGCGGCAATCATTAACGGTCGTCGCGGTATTGAAG
AAGCTTACCGTACCGGTGCGGCAAGGTGTATATCCGCGCTCGCGCAGAAAGTGGAAGTTGAC
GCCAAAACCGGTCTGAAACATTATCGTCCACGAAATTCGTATCAGGTAAACAAAAGCGCG
CCTGATCGAGAAGATTGCGGAACTGGTAAAAGAAAAACGCGTGGAAGGCATCAGCGCGCTG
CGTGACGAGTCTGACAAAGACGGTATGCGCATCGTGATTGAAGTGAAACGCGATGCGGTGCGG
TGAAGTTGTGCTCAACAACCTCTACTCCCAGACCCAGTTGCAGGTTTCTTTCCGGTATCAACAT
GGTGGCATTGCACCATGGTCAGCCGAAGATCATGAACCTGAAAGACATCATCGCGCGTTTGT
TCGTCACCGCCGTGAAGTGGTGACCCGTCGTACTATTTTCGAACTGCGTAAAGCTCGCGATCG

TGCTCATATCCTTGAAGCATTAGCCGTGGCGCTGGCGAACATCGACCCGATCATCGAACTGAT
CCGTCATGCGCCGACGCCTGCAGAAGCGAAAACTGCGCTGGTTGCTAATCCGTGGCAGCTGG
GCAACGTTGCCGCGATGCTCGAACGTGCTGGCGACGATGCTGCGCGTCCGGAATGGCTGGAG
CCAGAGTTCGGCGTGCGTGATGGTCTGTACTACCTGACCGAACAGCAAGCTCAGGCGATTCT
GGATCTGCGTTTGCAGAACTGACCGGTCTTGAGCACGAAAACTGCTCGACGAATACAAAG
AGCTGCTGGATCAGATCGCGGAACTGTTGCGTATTCTTGGTAGCGCCGATCGTCTGATGGAAG
TGATCCGTGAAGAGCTGGAGCTGGTTCGTGAACAGTTCGGTGACAAACGTCTACTGAAATC
ACCGCCAACAGCGCAGACATCAACCTGGAAGATCTGATCACCCAGGAAGATGTGGTCTGTGAC
GCTCTCTACACAGGGCTACGTTAAGTATCAGCCGCTTTCTGAATACGAAGCGCAGCGTCTGTGG
CGGAAAAGGTAAATCTGCCGCACGTATTAAAGAAGAAGACTTTATCGACCGACTGCTGGTGG
CGAACACTCACGACCATATTCTGTGCTTCTCCAGCCGTGGTCTGCGCTCTATTTCGATGAAAGTTTA
TCAGTTGCCGGAAGCCACTCGTGGCGCGCGCGGTCTGCGATCGTCAACCTGCTGCCGCTGG
AGCAGGACGAACGTATCACTGCGATCCTGCCAGTGACCGAGTTTGAAGAAGGCGTGAAAGTC
TTCATGGCGACCGCTAACGGTACCGTGAAGAAAACTGTCCTCACCGAGTTCAACCGTCTGCG
TACCGCCCGTAAAGTGCGGATCAAACTGGTTGACGGCGATGAGCTGATCGGCGTTGACCTGA
CCAGCGGCGAAGACGAAGTAATGCTGTTCTCCGCTGAAGGTAAAGTGGTGCCTTTAAAGAG
TCTTCTGTCCGTGCGATGGGCTGCAACACCACCGGTGTTGCGGTATTTCGCTTAGGTGAAGGC
GATAAAGTCGTCTCTCTGATCGTGCCTCGTGGCGATGGCGCAATCCTCACCGCAACGCAAAAC
GGTTACGGTAAACGTACCGCAGTGGCGGAATACCCAACCAAGTCGCGTGCGACGAAAGGGGT
TATCTCCATCAAGGTTACCGAACGTAACGGTTTAGTTGTTGGCGCGGTACAGGTAGATGACTG
CGACCAGATCATGATGATCACCGATGCCGGTACGCTGGTACGTAATCGCGTTTCGGAAATCAG
CATCGTGGGCCGTAAACCCAGGGCGTGATCCTCATCCGTAATGCGGAAGATGAAAACGTAG
TGGGTCTGCAACGTGTTGCTGAACCGGTTGACGAGGAAGATCTGGATACCATCGACGGCAGT
GCCGCGGAAGGGGACGATGAAATCGCTCCGGAAGTGACGTTGACGACGAGCCAGAAGAAG
AATAA

SEQ ID NO.4: *gyrA*编辑后-*gyrA*(A569T&T586A)编码序列

ATGAGCGACCTTGCAGAGAGAAATTACACCGGTCAACATTGAGGAAGAGCTGAAGAGCTCCTA
TCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCCGAGATGGCCTGAA
GCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACGTACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTA
TAAAAAATCTGCCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTCGGC
GGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGT
CAGGGTAACTTCGGTTCTATCGACGGCGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGT
CTGGCGAAAATTGCCCATGAACTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTCGATTTCTGTTGAT
AACTATGACGGCACGGAATAATCCGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGT
GAACGGTTCTTCCGGTATCGCCGTAGGTATGGCAACCAACATCCCGCCGCACAACTGACGG
AAGTCATCAACGGTTGTCTGGCGTATATTGATGATGAAGACATCAGCATTGAAGGGCTGATGG
AACACATCCCGGGGCGGACTTCCCGACGGCGGCAATCATTAACGGTCGTCGCGGTATTGAA
GAAGCTTACCGTACCGGTGCGCGCAAGGTGTATATCCGCGCTCGCGCAGAAAGTGGAAGTTGA
CGCCAAAACCGGTGCTGAAACATTATCGTCCACGAAATTCGTATCAGGTAAACAAAGCGC
GCCTGATCGAGAAGATTGCGGAACTGGTAAAGAAAAACGCGTGGAAGGCATCAGCGCGCT
GCGTGACGAGTCTGACAAAGACGGTATGCGCATCGTGATTGAAGTGAAACGCGATGCGGTGCG
GTGAAGTTGTGCTCAACAACCTCTACTCCAGACCCAGTTGCAGGTTTCTTTCCGTATCAACA
TGGTGGCATTGCACCATGGTCAGCCGAAGATCATGAACCTGAAAGACATCATCGCGGCGTTTG
TTCGTACCCGCCGTGAAGTGGTGACCCGTGCTACTATTTTCGAACTGCGTAAAGCTCGCGATC
GTGCTCATATCCTTGAAGCATTAGCCGTGGCGCTGGCGAACATCGACCCGATCATCGAACTGA
TCCGTGATGCGCCGACGCCTGCAGAAGCGAAAACTGCGCTGGTTGCTAATCCGTGGCAGCTG
GGCAACGTTGCCGCGATGCTCGAACGTGCTGGCGACGATGCTGCGCGTCCGGAATGGCTGGA
GCCAGAGTTCCGGCTGCGTGATGGTCTGTACTACCTGACCGAACAGCAAGCTCAGGCGATTCT

TGGATCTGCGTTTGCAGAACTGACCGGTCTTGAGCACGAAAACTGCTCGACGAATACAAA
GAGCTGCTGGATCAGATCGCGGAACTGTTGCGTATTCTTGGTAGCGCCGATCGTCTGATGGAA
GTGATCCGTGAAGAGCTGGAGCTGGTTCGTGAACAGTTCGGTGACAAACGTCGTACTGAAAT
CACCGCCAACAGCGCAGACATCAACCTcGAAGATCTGATCACCCAGGAAGATGTGGTCGTGA
CGTCTCTCACCAAGGGCTACGTTAAGTATCAGCCGCTTTCTGAATACGAAGCGCAGCGTCGTG
GCGGGAAAGGTAAATCTactGCACGTATTAAAGAAGAAGACTTTATCGACCGACTGCTGGTGGC
GAACgccCACGACCATATTCTGTGCTTCTCCAGCCGTGGTCGCGTCTATTTCGATGAAAGTTATC
AGTTGCCGGAAGCCACTCGTGGCGCGCGCGGTCTGTCGATCGTCAACCTGCTGCCGCTGGAG
CAGGACGAACGTATCACTGCGATCCTGCCAGTGACCGAGTTTGAAGAAGGCGTGAAAGTCTT
CATGGCGACCGCTAACGGTACCGTGAAGAAAACTGTCCTCACCGAGTTCAACCGTCTGCGTA
CCGCCGGTAAAGTGGCGATCAAACCTGGTTGACGGCGATGAGCTGATCGGCGTTGACCTGACC
AGCGGCGAAGACGAAGTAATGCTGTTCTCCGCTGAAGGTAAAGTGGTGCGCTTTAAAGAGTC
TTCTGTCCGTGCGATGGGCTGCAACACCACCGGTGTTTCGCGGTATTTCGTTAGGTGAAGGCGA
TAAAGTCGTCTCTCTGATCGTGCCTCGTGGCGATGGCGCAATCCTCACCGCAACGCAAAACG
GTTACGGTAAACGTACCGCAGTGGCGGAATACCAACCAAGTCGCGTGCGACGAAAGGGGTT
ATCTCCATCAAGGTTACCGAACGTAAACGGTTTAGTTGTTGGCGCGGTACAGGTAGATGACTGC
GACCAGATCATGATGATCACCGATGCCGGTACGCTGGTACGTACTCGCGTTTCGGAAATCAGC
ATCGTGGGCCGTAAACCCCAGGGCGTGATCCTCATCCGTACTGCGGAAGATGAAAACGTAGT
GGGTCTGCAACGTGTTGCTGAACCGGTTGACGAGGAAGATCTGGATACCATCGACGGCAGTG
CCGCGGAAGGGGACGATGAAATCGCTCCGGAAGTGACGTTGACGACGAGCCAGAAGAAGA
ATAA

SEQ ID NO.5: *gyrB*编辑后-*gyrB*(E42D)编码序列

ATGTCGAATTCCTATGACTCCTCCAGTATCAAAGTCCTGAAAGGGCTGGATGCGGTGCGTAAG
CGCCCGGGTATGTATATCGGCGACACGGATGACGGCACCGGTCTGCACCACATGGTATTCGAIG
TGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCcGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCACCATTC
CGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCATTCCGACCGGTATTCACCCGGA
AGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAATTTGACG
ATAACTCCTATAAAGTGTCGGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGTTTCGGTAGTAAACGCCCTGT
CGCAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCACCGTCAGATCTACGAACAC
GGTGTACCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGGAGACTGAAAAAACCGGCACCATGGTGC
GTTTCTGGCCCAGCCTCGAAACCTTCACCAATGTGACCGAGTTCGAATATGAAATTCGGCGA
AACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGCGCGACAAGCGCG
ACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTGAATATCTGAAC
AAGAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAAGACGGTATTGGC
GTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTTTACCAACAA
CATTCGCGACGCTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCCGTACCCT
GAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCGGTGAC
GATGCGCGTGAAAGGCCTGATTGCGGTGCTTTCCGTGAAAAGTGCCGGACCCGAAATTCCTCTCC
CAGACCAAAGACAAACTGGTTTCTTCTGAGGTGAAATCGGCGGTTGAACAGCAGATGAACG
AACTGCTGGCAGAATACCTGCTGGAAAACCCAACCGACGCGAAAAATCGTGGTTGGCAAAATT
ATCGATGCTGCCCCTGCCCCTGAAGCGGCGCGTCGCGCGCGTGAAATGACCCGCCGTAAAGG
TGCGCTCGACTTAGCGGGCCTGCCGGGCAAACCTGGCAGACTGCCAGGAACGCGATCCGGCG
CTTTCGAACTGTACCTGGTGGAAGGGGACTCCGCGGGCGGCTCTGCGAAGCAGGGGCGTAA
CCGCAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAAATCCTCAACGTCGAGAAAGCGCGCT
TCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGCGACGCTTATCACCGCGCTTGGCTGTGGTATCG
GTCGTGACGAGTACAACCCGACAAACTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGG
ACGTGACGGCTCGCACATTCTGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAAA
TCGTTGAACGCGGTCACGTCTACATCGCTCAGCCGCCGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGCAAG

CAGGAACAGTACATTAAGACGACGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATCGCGCTGGA
CGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGGCATTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAA
CTGGTATCTGAGTACAACGCGACGCAGAAAATGATCAATCGTATGGAGCGTCGTTATCCGAAA
GCAATGCTGAAAGAGCTTATCTATCAGCCGACGTTGACGGAAGCTGACCTTTCTGATGAGCAG
ACCGTTACCCGCTGGGTGAACGCGCTGGTCAGCGAACTGAACGACAAAGAAGCAGCACGGCA
GCCAGTGGAAGTTTGATGTTACACCAATGCTGAGCAAAACCTGTTTCGAGCCGATTGTTTCGC
GTGCGTACCCACGGTGTGGATACTGACTATCCGCTGGATCACGAGTTTATCACCGGTGGCGAA
TATCGTCGTATCTGCACGCTGGGTGAGAACTGCGTGGCTTGCTGGAAGAAGATGCGTTTATC
GAACGTGGCGAGCGTCGTACCCGGTAGCCAGCTTCGAGCAGGCGCTGGACTGGCTGGTGA
AAGAGTCCCGTCGCGGCCCTCTCCATCCAGCGTTATAAAGGTCTGGGCGAGATGAACCCGGAA
CAGCTGTGGGAAACCACTATGGACCCGGAAGTGTCTGTCGTATGCTGCGCGTTACCGTTAAAGAT
GCGATTGCTGCCGACCAGTTGTTACACGCTGATGGGCGACGCCGTTGAACCGCGCCGTGC
GTTTATTGAAGAGAACGCCCTGAAAGCGGCGAATATCGATATTTAA

SEQ ID NO.6: *gyrB*编辑后-*gyrB*(R136C)编码序列

ATGTCGAATTCTTATGACTCCTCCAGTATCAAAGTCCTGAAAGGGCTGGATGCGGTGCGTAAAG
CGCCCGGTATGTATATCGGCGACACGGATGACGGCACCGGTCTGCACCACATGGTATTCGAG
GTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCACCATT
CACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCATTCCGACCGGTATTACCCG
GAAGAGGGCGTATCGGCcGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAATTTGA
CGATAACTCCTATAAAGTGTCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGTTTCGGTAGTAAACGCCCT
GTCGCAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGcGCGAGGGTAAAATTCACCGTCAGATCTACGAACA
CGGTGTACCGCAGGCCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACCGGCACCATGGTGC
GTTTCTGGCCCAGCCTCGAAACCTTCACCAATGTGACCGAGTTCGAATATGAAATTCTGGCGA
AACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGTCGCGGACAAGCGCG
ACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTGAATATCTGAAC
AAGAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAAGACGGTATTGGC
GTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTTTACCAACAA
CATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCCGTACCCCT
GAACGCCTACATGGACAAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCGGTGAC
GATGCGCGTGAAAGGCCTGATTGCGGTCTGTTCCGTGAAAGTGCCGGACCCGAAATTCCTCTCC
CAGACCAAAGACAAACTGGTTTCTTCTGAGGTGAAATCGGCGGTTGAACAGCAGATGAACG
AACTGCTGGCAGAATACCTGCTGGAACCCCAACCGACGCGAAAATCGTGGTTGGCAAAATT
ATCGATGCTGCCCCGTGCCCCGTGAAGCGGCGCGTTCGCGCGCGTGAAATGACCCGCCGTAAAGG
TGCGCTCGACTTAGCGGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACGCGATCCGGCG
CTTTCCGAACTGTACCTGGTGGAAGGGGACTCCGCGGGCGGCTCTGCGAAGCAGGGGCGTAA
CCGCAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACGTCGAGAAAGCGCGCT
TCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGCGACGCTTATCACCGCGCTTGGCTGTGGTATCG
GTCTGTACGAGTACAACCCGGACAAACTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGG
ACGTGACGCGCTCGCACATTCTGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAAA
TCGTTGAACGCGGTACGTCTACATCGCTCAGCCGCCGCTGTACAAAAGTGAAGAAAGGCAAG
CAGGAACAGTACATTAAGACGACGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATCGCGCTGGA
CGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGGCATTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAA
CTGGTATCTGAGTACAACGCGACGCAGAAAATGATCAATCGTATGGAGCGTCGTTATCCGAAA
GCAATGCTGAAAGAGCTTATCTATCAGCCGACGTTGACGGAAGCTGACCTTTCTGATGAGCAG
ACCGTTACCCGCTGGGTGAACGCGCTGGTCAGCGAACTGAACGACAAAGAAGCAGCACGGCA
GCCAGTGGAAGTTTGATGTTACACCAATGCTGAGCAAAACCTGTTTCGAGCCGATTGTTTCGC
GTGCGTACCCACGGTGTGGATACTGACTATCCGCTGGATCACGAGTTTATCACCGGTGGCGAA
TATCGTCGTATCTGCACGCTGGGTGAGAACTGCGTGGCTTGCTGGAAGAAGATGCGTTTATC

GAACGTGGCGAGCGTCGTCAGCCGGTAGCCAGCTTCGAGCAGGCGCTGGACTGGCTGGTGA
AAGAGTCCCGTCGCGGCCTCTCCATCCAGCGTTATAAAGGTCTGGGCGAGATGAACCCGGAA
CAGCTGTGGGAAACCACTATGGACCCGGAAGTCTGTCGTATGCTGCGCGTTACCGTTAAAGAT
GCGATTGCTGCCGACCAGTTGTTACACACGCTGATGGGCGACGCCGTTGAACCGCGCCGTGC
GTTTATTGAAGAGAACGCCCTGAAAGCGGCGAATATCGATATTAA

SEQ ID NO.7: *gyrB*编辑后-*gyrB*(D498A)编码序列

ATGTCGAATTCTTATGACTCCTCCAGTATCAAAGTCCTGAAAAGGGCTGGATGCGGTGCGTAAAG
CGCCCGGTATGTATATCGGCGACACGGATGACGGCACCGGTCTGCACCACATGGTATTCGAG
GTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCACCAAT
CACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCATTCCGACCGGTATTCACCCG
GAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAATTTGA
CGATAACTCCTATAAAGTGTCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGTTCGGTAGTAAACGCCCT
GTCGAAAAAAGTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCACCGTCAGATCTACGAAC
ACGGTGTACCGCAGGCCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACGGCACCATGGT
GCGTTTCTGGCCCAGCTCGAAACCTTCACCAATGTGACCGAGTTCGAATATGAAATTCTGGC
GAAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGCGCGACAAGCG
CGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTGAATATCTGA
ACAAGAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAAGACGGTATTG
GCGTCGAAGTGGCGTTGCAAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAAATCTACTGCTTTACCAAC
AACATTCCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCCGTAC
CCTGAACGCCTACATGGACAAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCGGT
GACGATGCGCGTGAAGGCCTGATTGCGGTGCTTTCCGTGAAAAGTGCCGACCCGAAATTCTC
CTCCCAGACCAAAGACAAACTGGTTTCTTCTGAGGTGAAATCGGCGGTTGAACAGCAGATGA
ACGAACTGCTGGCAGAATACCTGCTGGAAAACCAACCGACGCGAAAAATCGTGGTTGGCAA
AATTATCGATGCTGCCCGTGCCCGTGAAGCGGCGCGTCCGCGCGGTGAAATGACCCGCCGTGA
AAGGTGCGCTCGACTTAGCGGGCTGCCGGGCAAACCTGGCAGACTGCCAGGAACGCGATCC
GGCGCTTTCCGAACTGTACCTGGTGGAAGGGGACTCCGCGGGCGGCTCTGCGAAGCAGGGG
CGTAACCGCAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAAATCCTCAACGTCGAGAAAGC
GCGCTTCGATAAGATGCTCTTCTCAaGAAGTGGCGACGCTTATCACCGCGCTTGCTGTGGT
ATCGGTGCTGACGAGTACAACCCGGACAAACTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGcG
CGGACGTCGACGGCTCGCACATTCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGG
AAATCGTTGAACGCGGTACGTCTACATCGCTCAGCCGCCGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGC
AAGCAGGAACAGTACATTAAAGACGACGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATCGCGCT
GGACGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGACCGGCATTGGCTGGCGAAGCGTTAGAG
AACTGGTATCTGAGTACAACGCGACGACGAGAAATGATCAATCGTATGGAGCGTCGTTATCCG
AAAGCAATGCTGAAAGAGCTTATCTATCAGCCGACGTTGACGGAAGCTGACCTTTCTGATGAG
CAGACCGTTACCCGCTGGGTGAACGCGCTGGTCAGCGAACTGAACGACAAAAGAACAGCAGC
GCAGCCAGTGGAAGTTTGATGTTACACCAATGCTGAGCAAAACCTGTTTCGAGCCGATTGTT
CGCGTGCGTACCCACGGTGTGGATACTGACTATCCGCTGGATCACGAGTTTATACCCGGTGGC
GAATATCGTCGTATCTGCACGCTGGGTGAGAAACTGCGTGGCTTGCTGGAAGAAGATGCGTTT
ATCGAACGTGGCGAGCGTCGTCAGCCGGTAGCCAGCTTCGAGCAGGCGCTGGACTGGCTGGT
GAAAGAGTCCCGTCGCGGCCTCTCCATCCAGCGTTATAAAGGTCTGGGCGAGATGAACCCGG
AACAGCTGTGGGAAACCACTATGGACCCGGAAGTCTGTCGTATGCTGCGCGTTACCGTTAAA
GATGCGATTGCTGCCGACCAGTTGTTACACACGCTGATGGGCGACGCCGTTGAACCGCGCCG
TGCGTTTATTGAAGAGAACGCCCTGAAAGCGGCGAATATCGATATTAA

SEQ ID NO.8: 靶向*gyrA* (H80A) 的sgRNA

ctatctggattatcgatgt

SEQ ID NO.9: 靶向 $gyrA$ 基因(A569T&T586A)的sgRNA

caacagcgagacatcaacc

SEQ ID NO.10: 靶向 $gyrB$ 基因(E42D)的sgRNA

cgctatcgacgaagcgctcg

SEQ ID NO.11: 靶向 $gyrB$ 基因(R136C)的sgRNA

cccgaagaggcgatcgg

SEQ ID NO.12: 靶向 $gyrB$ 基因(D498A)的sgRNA

cgataagatgctctcttc

SEQ ID NO.13: $gyrA$ (H80A)供体序列

GCGGTTTGAATCACCTTCCAGATCCCACCAGCGGGAGGCGACGGCTTCAAATTTAGCGATCT
CTTCGTGGTCTACGTTATGGTTTACCGGCGATTTTCGGCATTCAATTGGCACTTCTACTCCGTAA
TTGGCAAGACAAAACGAGTATATCAGGCATTGGATGTGAATAAAGCGTATAGGTTTACCTCAAA
CTGCGCGGCTGTGTTATAATTTGCGACCTTTGAATCCGGGATACAGTAGAGGGATAGCGGTTA
GATGAGCGACCTTGCAGAGAGAAATTACACCGGTCAACATTGAGGAAGAGCTGAAGAGCTCCT
ATCTGGATTATGCGATGTCTGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCCGAGATGGCCTGAA
GCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACGTAAGTACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTA
TAAAAAATCTGCCCGTGTCTGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCGcaGGTGACTCGGCG
GTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTC
AGGGTAACTTCGGTTCTATCGACGGCGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTC
TGCGGAAAATTGCCCATGAACTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTCGATTTCTGTTGATA
ACTATGACGGCACGGAAAAAATCCGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTG
AACGGTTCTTCGGTATCGCCGTAGGTATGGCAACCAACATCCCGCCGCACAACCTGACGGA
AGTCATCAACGGTTGTCTGGCGTATATTGATGATGAAGACATCAGCATTGAAGGGCTGATGGA
ACACATCCCGGGGCCGACTTCCCGACGGCGGCAATCATTAACGGTCGTCGCGGTATTGAAG
AAGCTTACCGTACCGGTGCGCGCAAGGTGTATATCCGCGCTCGCGCAGAAAGTGG

SEQ ID NO.14: $gyrA$ (A569T&T586A) 供体序列

GTTCCGGCTGCGTGATGGTCTGTACTACCTGACCGAACAGCAAGCTCAGGCGATTCTGGATCT
GCGTTTGCAAACTGACCGGTCTTGAGCACGAAAACTGCTCGACGAATACAAAGAGCTG
CTGGATCAGATCGCGAACTGTTGCGTATTCTTGGTAGCGCCGATCGTCTGATGGAAGTGATC
CGTGAAGAGCTGGAGCTGGTTCTGTGAACAGTTCGGTGACAAACGTCGTAAGTCAACCGC
CAACAGCGCAGACATCAACCTcGAAGATCTGATCACCCAGGAAGATGTGGTCTGTGACGCTCTC
TCACCAGGGCTACGTTAAGTATCAGCCGCTTTCTGAATACGAAGCGCAGCGTCGTGGCGGGA
AAGGTAAATCTactGCACGTATTAAAGAAGAAGACTTTATCGACCGACTGCTGGTGGCGAACgcc
CACGACCATATTCTGTGCTTCTCCAGCCGTGGTCGCGTCTATTGATGAAAGTTTATCAGTTGC
CGGAAGCCACTCGTGGCGCGCGCGGTCTGTCGATCGTCAACCTGCTGCCGCTGGAGCAGGAC
GAACGTATCACTGCGATCCTGCCAGTGACCGAGTTTGAAGAAGGCGTGAAAGTCTTCATGGC
GACCGCTAACGGTACCGTGAAGAAAATGTCTCACCAGATTCAACCGTCTGCGTACCGCCG
GTAAAGTGGCGATCAAACTGGTTGACGGCGATGAGCTGATCGGCGTTGACCTGACCAGCGGC
GAAGACGAAGTAATGCTGTTCTCCGCTGAAGGTAAAGTGGTGGCGTTTAAAGAGTCTTCTGT
CCGTGCGATGGGTGCAACACCACCGGTGTTGCGCGTATTGCTTAGGTGAAGGCGATAAAG
TCGTCTCTGATCGTGCCTCGTGGCGATGGCGCAATCCTCACCAGCAACGCAAAACGGTTACG
GTAAACGTACCGCAGTGCGGAATACCAACCAAGTCGCGTGCGACGAAAGGGGTTATCTCC

SEQ ID NO.15: *gyrB*(E42D) 供体序列

CGACGGTGC GCCGTGGAAGATACCTTATCGCGTGGGCAGCTTAAGCTGTTGATGTGCGCCTT
ACGTCTGGCGCAAGGAGAGTTCCTCACCCGTGAAAGCGGGCGGCGGTGTCTCTACCTGATAG
ATGATTTTGCTCTGAGCTTGATGATGAGCGTCGCGGGCTGCTTGCCAGCCGCTTAAAAGCGA
CGCAATCACAGGTCTTTGTCAGCGCGATCAGTGCTGAACACGTTATAGACATGTCGGACGAAA
ATTGGAAGATGTTTACCGTGGAAGAGGGTAAAAATAACGGATTAACCCAAGTATAAATGAGCGA
GAAACGTTGATGTCGAATTCTTATGACTCCTCCAGTATCAAAGTCTGAAAGGGCTGGATGCG
GTGCGTAAGCGCCCGGTATGTATATCGGCGACACGGATGACGGCACCGGTCTGCACCACATG
GTATTCGAiGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGC₆GGTCACTGTAAAGAAATTATCG
TCACCATTACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCATTCCGACCGGTA
TTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGT
AAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCGGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGTTTCGGTAGTA
AACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTACCGTCAGAT
CTACGAACACGGTGATCCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACCGGC
ACCATGGTGCGTTTCTGGCCAGCCTCGAAACCTTCACCAATGTGACCGAGTTGCAATATGAA
ATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCTTCCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGCGC
GACAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCCTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGT

SEQ ID NO.16: *gyrB*(R136C)供体序列

CGTTGATGTCGAATTCTTATGACTCCTCCAGTATCAAAGTCTGAAAGGGCTGGATGCGGTGC
GTAAGCGCCCGGTATGTATATCGGCGACACGGATGACGGCACCGGTCTGCACCACATGGTAT
TCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCA
CCATTACGCGGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCATTCCGACCGGTATTC
ACCCGGAAGAGGGCGTATCGGC₆GCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAA
TTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCGGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGTTTCGGTAGTAAAC
GCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGiGCGAGGGTAAAATTACCGTCAGATCTAC
GAACACGGTGATCCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACCGGCACCA
TGGTGCGTTTCTGGCCAGCCTCGAAACCTTCACCAATGTGACCGAGTTGCAATATGAAATTC
TGCGGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCTTCCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGCGCGACA
AGCGCGACGGCAAAGAAGACCCTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCTGTTGAATAT
CTGAACAAGAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAAGACGG
TATTGGCGTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTTTAC
CAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCC
GTACCCTGAACGCCTACATGGACAAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCAC
CGGTGACGATGCGCGTGAAGGCCTGATTGCGGTCTGTTCCGTGAAAGTGCCGGACCCGAAAT
T

SEQ ID NO.17: *gyrB*(D498A)供体序列

TGAACGAACTGCTGGCAGAATACCTGCTGGAAGACCAACCGACGCGAAAATCGTGTTGGC
AAAATTATCGATGCTGCCCGTGCCCGTGAAGCGGCGCGTCGCGCGCGTGAAATGACCCGCCG
TAAAGGTGCGCTCGACTTAGCGGGCTGCCGGGCAAACCTGGCAGACTGCCAGGAACGCGATC
CGGCGCTTTCCGAACTGTACCTGGTGGAAGGGGACTCCGCGGGCGGCTCTGCGAAGCAGGG
GCGTAACCGCAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAAATCCTCAACGTCGAGAAAG
CGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCaGAAGTGCGACGCTTATCACCGCGCTTGGCTGTG
GTATCGGTCTGTGACGAGTACAACCCGACAAACTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCG
ccGCGGACGTGACGGCTCGCACATTCTGACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCC
GGAAATCGTTGAACGCGGTACGTCTACATCGCTCAGCCGCCGCTGTACAAAGTGAAGAAAG
GCAAGCAGGAACAGTACATTAAAGACGACGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATCGCG

CTGGACGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGGCATTGGCTGGCGAAGCGTTAG
AGAAACTGGTATCTGAGTACAACGCGACGCAGAAAATGATCAATCGTATGGAGCGTCGTTATC
CGAAAGCAATGCTGAAAGAGCTTATCTATCAGCCGACGTTGACGGAAGCTGACCTTTCTGATG
AGCAGACCGTTACCCGCTGGGTGAACGCGCTGGTCAGCGAACTGAACGACAAAGAACAGCA
CGGCAGCCAGTGGAAAGTTTGATGTTACACCAATGCTGAGCAAAACCTGTTTCGAGCCGATTG
TTCGCGTGCGTACCCACGGTGTGGATACTGACTATCCGCTGGATCACGAGTTTATCACCCGCTG
CGCA

SEQ ID NO.30: poly(A)序列-80A

aa

SEQ ID NO.31: poly(A)序列-100A

aa
aaaaa

SEQ ID NO.32: poly(A)序列-120A

aa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID NO.33: poly(A)序列-30&70A

aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagcatatgactaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID NO.34: poly(A)序列-30&30&43A

aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagcatatgactaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagcatatgactaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID NO.35: poly(A)-测试1(80A)的mRNA功能区序列

taatcagactcactataagggtcttctgtgtcccccagactcagagagaacccgccaccatggtgagcaaggcgaggagctgttcaccgggggtgt
gccatcctgtgtcagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgaggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacct
gaagttcatctgaccaccggcaagctgccctgtccctggccaccctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgttcagccgctaccccgacc
acatgaagcagcacgacttctcaagtcgccatgccgaaggtacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacgcaactacaagaccgc
gccgaggtgaagttcaggggcgacacctgtgaaccgcatcagctgaaggcgcacgacttcaaggaggacggaacatcctggggcacaagctg
gagtacaactacaacgccacaagctctatcatgcccgacaagcagaagaacgcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcaggacg
gcagcgtgcagctcgcgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccacaaccactacctgagcaccagctccg
ccctgagcaagaccccacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagtctgtgaccgccgccggatcactctcgcatggacgagctgtacaa
gtaatagtaagctggagcctcgtggccatgcttctgtcccttgggcctccccagccccctcctccctcctgcacccgtacccccgtgcttgaat
aaagtctgagtgggcggaactagtAAA
AAAaggagagc

SEQ ID NO.36: pVAX1载体序列

gactcttcgcatgtacgggccagatatcgcgtgacattgattattgactagtattaatagtaataattacggggcattagttcatagcccatatgga
gttccgcgttacataacttacggttaaatggccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgc
caatagggactttccattgacgtcaatgggtggactatttacgttaactgccacttggcagttacatcaagtgatcatatgccaaagtcgccccctattga
cgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgccagttacatgaccttattgggactttctacttggcagttacatcgtattagtcgctattacca
tggtgatgcggttttgccagttacatcaatggcgctggatagcgtttgactcacgggatttccaagttccacccattgacgtcaatgggaggtttgtt
gcacaaaatcaacgggactttccaaatgtcgtacaaactccgccccattgacgcaaatggcggttagcgtgtacgggtgggaggtctatataagcag
agctctctgctaactagagaacccactgcttactggcttatcgaatataacgactcactataggagaccgaagctggctagcgtttaacttaagcttg

gtaccgagctcggatccactagtcacagtgtggggaattctgcagatatccagcacagtggcgccgctcgaagtctagaggcccggtttaaacccgctg
atcagccctgactgtgccttctagttgccagccatctgtgtttgccccctccccctgctccttctgaccctggaaagtgccactcccactgtccttcttaata
aaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaata
gcaggcatgctggggatgcggtgggctctatggccttactggcggtttatggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgcctctggttaa
ggttgggaagccctgcaaagtaaaactggatggctttctcgcgccaaggatctgatggcgaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgaggat
cgtttcgatgattgaacaagatgattgcacgcagggttctccggcgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacacagacaatcggtg
ctctgatcccgccgtgtccggctgcagcgcaggggcgcccggttcttttgcgaagaccacgttccgggtccctgaatgaactgcaagacgaggca
gcgcggctatctgtgctggccacgacggcggttcttgcgcagctgtgtcgcaggtgttgcactgaagcggaaggaggactggctgctattggcggaat
gcccgggagcagatctctgtcatctcacttgcctcctccgagaaaatccatcatggctgatgcaatgcggcgctgcatacgttgcacggctacct
gcccattcgaccaccaagcgaacatcgcacgcagcagcagctactcggatggaagccggcttctgcgatcaggatgatctgcaggaagacatcag
gggctcgcggcagccgaactgttcggcggtcaaggcgagcatcccgcagcgagagatctcgtgacccatggcgatgcctgttgcggaatat
catgttggaaaatggccgcttcttggattcatcactgtggcggttgggtgtggcgaccgctatcaggacatagcgttggctaccctgataattgctg
aagagcttggcgccgaatgggctgaccgttccctgtgctttacgggtatcgccgtcccgattcgcagcgcacgccttctatgccttctgacgagttct
ctgaattattaacgttacaatttctgatgcgggtatttctctacgatctgtgcgggtatttccaccgcatacagggtggcacttttggggaaatgtgcgc
ggaacccctattgtttatttttaataacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatagcacgtgctaanaacttattt
taatttaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagacccctagaaaagat
caaggatcttctgagatccttttctgcgcgtaactctgtcttgcgaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgttgggttgcggatcaagagctac
caactcttttccgaagtaactggcttcagcagagcgagataccaataactgtccttctagtgtgccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagc
accgctacatactcgtctgctaactctgttaccagtggctgtgcccagtgcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatgttaccgga
taaggcgagcgggtgggctgaacgggggttctgtcacacagcccagcttggagcgaacacacacacgaactgagatactacagcgtgagct
atgagaagcgccacgcttcccgaaggagaaaaggcgacaggtatccgtaagcggcagggtcggaacaggagagcgacgaggagcttcca
gggggaacccctgtatcttctatagctctgtcgggttccgacacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcaggggggcgagagcctatggaaa
aacgccagcaacgcggccttttaccggttcttgggcttctgtcggccttctgtcacatgttctt

SEQ ID NO.41: *RecQ*

GTGGCGCAGGCGGAAGTGTGAATCTGGAGTCCGGAGCTAAACAGGTTTTACAAGAAACCTT
TGGCTACCAACAGTTTCGCCCCGGCCAGGAAGAAATTATCGACACTGTGCTTTCCGGCCGCG
ATTGCCTCGTCGTATGCCCCTGGTGGCGGAAAATCCCTTTGCTATCAAATCCCTGCCTTATT
GCTAAACGGCCTTACCGTGTTGTTTACCGCTGATTTTCGTTGATGAAAGATCAGGTGGATCA
ACTGCAAGCCAACGGCGTGGCGGGCGGCTGCCTTAACTCGACGCAAACCCGCGAACAGCAA
CTTGAAAGTGATGACAGGCTGCCGCACCGGGCAAATTCGTCGTGCTTTATATCGCCCCGGAACGC
CTGATGCTGGATAACTTTCTTGAGCATCTGGCGCACTGGAATCCGGTGTATTAGCCGTTGATG
AAGCGCACTGTATCTCCAATGGGGCCACGATTTCCGCCCCGGAATATGCCGCGCTCGGTCAGT
TGCGCCAGCGGTTCCCGACGCTGCCGTTTATGGCGCTGACCGCCACAGCCGACGACACCACG
CGCCAGGATATCGTGCCTGCTGCGGCTGAACGATCCGCTGATTCAAATCAGCAGTTTTGAC
CGTCCGAATATTTCGTACATGCTGATGGAGAAGTTCAAACCGCTCGATCAGTTGATGCGCTAC
GTGCAGGAACAGCGCGTAAGTCAGGCATTATCTACTGCAACAGCCGCGCGAAAGTAGAAGA
CACCGCTGCGCGCTGCAAAGCAAGGGAATTAGCGCGGCGGCTATCATGCCGGGCTGGAAA
ATAATGTTTCGCGCGGATGTGCAGGAAAAATTCCAGCGCGATGACCTGCAAATTGTGGTGGCGA
CGGTGGCGTTTCGGCATGGGCATCAATAAACCAACGTTTCGCTTCGTGGTCCACTTTGATATTC
CGCGCAATATCGAATCCTATTATCAGGAAACCGGACGCGCGCGGGCGTGATGGCCTGCCCGCGG
AAGCGATGCTGTTTTACGATCCGGCTGATATGGCGTGGCTGCGCCGTTGTCTGGAAGAGAAGC
CGCAGGGGCGATTGAGGATATCGAGCGCCACAACTCAATGCGATGGGCGCGTTTGCCGAA
GCGCAAACCTTGCCGTCGTCTGGTATTGCTGAACATTTTGGCGAAGGGCGTCAGGAGCCGTCG
GGAACTGCGATATCTGCCTCGATCCGCCGAAACAGTACGACGTTCAACCGATGCTCAGATT
GCCCTTTCCACCATTTGGTCGTGTGAATCAGCGGTTTGGGATGGGTTATGTGGTGGAAGTGATT
CGTGGTGCTAATAACAGCGTATCCGCGACTATGGTCATGACAACTGAAAGTCTATGGCATG
GGCCGTGATAAAAGCCATGAACATTGGGTGAGCGTGATCCGCCAGCTGATTCACCTCGGCCTG
GTGACGCAAAATATTGCCAGCATTCTGCCCTACAACCTGACAGAGGCCGCGCGCCCGGTGCT

GCGCGGCGAATCCTCTTTGCAACTTGCCGTGCCGCTATCGTGGCGCTCAAACCGAAAGCGA
TGCAGAAATCGTTCGGCGGCAACTATGATCGCAAACCTGTTTCGCCAAATTACGCAAACCTGCGTA
AATCGATAGCCGATGAAAAGTAATGTCCCGCCGTACGTGGTGTTTAACGACGCAACCTTGATTG
AGATGGCTGAACAGATGCCGATCACCGCCAGCGAAATGCTCAGCGTTAACGGCGTTGGGATG
CGCAAGCTGGAACGCTTTGGCAAACCGTTTATGGCGCTGATTGCTGCGCATGTTGATGGCGAT
GACGAAGAGTAG

SEQ ID NO.42: lacIq 启动子+lacI+rmB T1 终止子 +rmB T2 终止子

GACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCA
ATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGAGAGTATGCCGGTGTCTC
TTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAA
AAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCG
GGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCA
AATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGT
AGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTC
AGTGGGCTGATCATTAATACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGC
ACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTCTC
CCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATTGGGTACCAGCAAATCG
CGCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAAT
ATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCC
GGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCC
AACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGC
GGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACC
ACCATCAAACAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTC
TCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACC
ACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATATGCAGCTG
GCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAAATTCGCGCAACGCAATTAATGTAAG
TTAGCTCACTCATTAGGCACCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCTGT
TTTATCTGTTGTTGTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTG
AACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCCGCCATAAACTGCCAGGC
ATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTT

SEQ ID NO.43: *RecA*

ATGGCTATCGACGAAAAACAAACAGAAAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAAC
AATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAAACCATCT
CTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCG
TCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCA
GCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTA
CGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCGGACACCGGCGAGC
AGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATCGTCGTTGACT
CCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCACATGGG
CCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCTGAAGCAGTCCA
ACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGATGAAAATTGGTGTGATGTTTCGGTAACCCGG
AAACCACTACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTACGCCTCTGTTCTGCTCTGACATCCGTCGTA
TCGGCGCGGTGAAAGAGGGCGAAAACGTGGTGGGTAGCGAAACCCGCGTGAAAGTGGTGA
AGAACAAAATCGCTGCGCCGTTTAAACAGGCTGAATTCCAGATCCTCTACGGCGAAGGTATCA
ACTTCTACGGCGAACTGGTTGACCTGGGCGTAAAAGAGAAGCTGATCGAGAAAGCAGGCGC
GTGGTACAGCTACAAAGGTGAGAAGATCGGTCAGGGTAAAGCGAATGCGACTGCCTGGCTGA
AAGATAACCCGGAAACCGCGAAAGAGATCGAGAAGAAAGTACGTGAGTTGCTGCTGAGCAA

CCCGAACTCAACGCCGGATTTCTCTGTAGATGATAGCGAAGGCGTAGCAGAACTAACGAAG
ATTTTAA

SEQ ID NO.44: *RecA*编辑后-*RecA1*编码序列

ATCTACAGAGAAATCCGGCGTTGAGTTCGGGTTGCTCAGCAGCAACTCACGTACTTTCTTCTC
GATCTCTTTTCGCGGTTTCCGGGTTATCTTTCAGCCAGGCAGTCGCATTTCGCTTTACCTGACCG
ATCTTCTCACCTTTGTAGCTGTACCACGCGCCTGCTTCTCGATCAGCTTCTCTTTACGCCCA
GGTCAACCAGTTTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTT
TAAACGGCGCAGCGATTTTGTCTTACCACCTTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTT
CGCCCTCTTTCACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTCAGC
GCGTTACCACCGGTAGTGGTTTCCGGGTTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGT
TGATGAAGATCAGCAGCGTGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGC
TCATCATACGTGCCGAAGaCCCATGTGAGAGTCGtCGATTTGCCTTCGATTTCCGCTTTCGGC
GTCAGTGCCGCCACGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCGCCAGAACGCGCCAGGGCGTC
ACAGATTTCCAGTGCCTGCTCGCCGGTGTCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGA
CGCCAGTTTACGTGCGTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTT
TACCTTCACGCTGCGCTGCGGCGATCACCTGCAGCGTCAGCGTGTTTACCGGAAGATTCCG
GTCCGTAGATTTTCGACGATACGGCCCATCGGCAGACCACCTGCCCCAAGCGCGATATCCAGTG
AAAGCGAACCGGTAGAGATGGTTTCCACATCCATGGAACGGTCTTCACCCAGGCGCATGATG
GAGCCTTTACCAAATTGTTTCTCAATCTGGCCCAGTGCTGCCGCCAACGCTTCTGTTTGT
CGTCGATAGCCAT

SEQ ID NO.45: 靶向*RecQ*的sgRNA

atggggccacgatttcgcc

SEQ ID NO.46: 靶向*yghX*的sgRNA

gggctggcctgcttacgagg

SEQ ID NO.47: 靶向*RecA*的sgRNA

ggctcatcatagtgccgca

SEQ ID NO.48: 敲除*RecQ*供体序列

AGTTAGGCTTAAGTTACCCGATCACCAAACATGTGCGCCTTTATACTCAGGTTTACAGCGGCTA
TGGCGAATCGCTCATCGACTATAACTTCAACCAGACCCGTGTCGGTGTGGGGGTTATGCTAAA
CGATTTGTTTTGATGAACGGTTGAGTGGTTGGCAAATCTGGAATCCAGCATCCAGGATTACCC
TCTCAGAGACTAAAAGCATTGCAGTTTCTCGCGCAGGCGCTGAAAATAGCGCCTGTTTTATT
TCAGGCAATCGGGGTGAATGTGGCGCAGGCGGAAGTGTTGAATCTGGAGTCCGGAGCTAAAC
AGGTTTTACAAGAAACCTTTGGCTACCAACAGTTTTCGCCCCGGCCAGGAAGAAATTATCGAC
ACTGTGCTTTCCGGCCGCGATTGCCTCGTCGTCATGCCCACTGGTGGCGGAAAATCCCTTTCG
TATCAAATCCCTGCCTTATTGCTAAACGGCCTTACCGTGGTTGTTTCACCGCTGATTCGCTGTT
CGCCAAATTACGCAAACTGCGTAAATCGATAGCCGATGAAAGTAATGTCCCGCCGTACGTGGT
GTTTAACGACGCAACCTTGATTGAGATGGCTGAACAGATGCCGATCACCGCCAGCGAAATGC
TCAGCGTTAACGGCGTTGGGATGCGCAAGCTGGAACGCTTTGGCAAACCGTTTATGGCGCTG
ATTCTGTCGTCATGTTGATGGCGATGACGAAGAGTAGTCAGCAGCATAAAAAAGTGCCAGTATG
AAGACTCCGTAAACGTTTCCCCCGGAGTCAAATGTATGTTGATGTTATTTCTACCGTCGCCA
TGGTGACATTGTGGCGCTTATGAGCCCCGGTCCCGATTCTTTTTTGTCTCTCAGACCGCTGT
CAGTCGTTCCCGTAAAGAAGCGATGATGGGCGTGCTGGGCATTACCTGCGGCGTAATGGTTTG

GGCTGGGATTGCGCTGCTTGGCCTGCATTTGATTATCGAAAAAATGGCCTGGCT

SEQ ID NO.49: 敲入lacIq 启动子+lacI+rrnB T1 终止子 +rrnB T2 终止子供体序列

TGGTTATCGATATCATGATACTGCGGCGGGGCGCTAAAACGAAGGGAAGAAGCATTAGTGTAATTAATTAAGCAAGATAATACGTATGTTTGATCAATTTTCGAGGCGATAACCGGCCATAAAAAAGCGCAACGTAGAACAGGAATTATTCTCACGAAAGAAATCCATTACCATCTCTTTATCCAGTCCATAGCGGCGCGTCAGAATACCCGCTTCCCAGGCGCTAAGCTGGCGATCTCCGGTCTTTTCGTACATCCGGTGTGAGTAGCCTAATAACAAACCGCGTTTATAATCGGCACAGAATTTGTGCACATTAAACCGCACTGTCTGGCATGCGTTGCTTTTAATCCCGCCATTAAAGCCTTTACCAAATGGTTATTCATCGTTCACCTCATTGCTATATATTGTCATATATAGCGATATTTAGGCAAAGAACGACTTTTGCGCACGCTATTTTTTCATGCTTGTTTAAGACGTAATCCCGTAAGAGATAAACCTATTCCGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGTGGTGAAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCTGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAACACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAATTGTGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAATCTCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTCTCCCATGAGACGGTACGCGACTGGGCGTGAGCATCTGGTGCATTGGGTCACCAGCAAATCGCGCTGTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCATCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACACCATCAAACAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCTGGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAAATTTCGCGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTATTAGGCACCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTAGTAATCCAGCAACTCTTGTTGGGAAATCTTTGGCGGTTAAACGCGGCATCGTTGCACTCCTCAGTTGGTGTTTTTTAAGCAAAGCATAAGCACGTATTTTTGCCCAGTTTTTCGTCACTCTGTGAGCCAGACTACGGGATACGCGCTGGCGAATCGCTAAACTAGAAACATTGTTTCGAAATTGAACGGTGGAAAGGAGAGGTGATGGTCTGGTTAGCGAATCCCGAACGTTACGGGCAGATGCAATACCGCTATTGCGGAAAAAGTGGTTTACGCCTGCCGCGTTATCGCTCGGTTTATGGCACAATTTTCGGTCACGTTAACGCGCTGGAATCACAGCGTGCATCCTGCGTAAAGCGTTTGATTGGGCATTACGCACTTTGATTAGCCAACAATTACGGGGCCGCTCCAGGAAGCGCAGAAGAGAACTTTGGTGCCTGCTGCGGGAGGATTTTGCCGCTTATCGCATGAACTGATTATCTCTACCAAGGCTG

SEQ ID NO.50: 突变*RecA*为*RecA1*供体序列

ATCTACAGAGAAATCCGGCGTTGAGTTCGGGTTGCTCAGCAGCAACTCACGTACTTTCTTCTCGATCTCTTTTCGCGGTTTCCGGGTTATCTTTAGCCAGGCAGTCGCATTTCGCTTTACCCTGACCGATCTTCTCACCTTTGTAGCTGTACCACGCGCTGCTTTCTCGATCAGCTTCTCTTTACGCCCAAGTCAACCAGTTCGCGGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTTAAACGGCGCAGCGATTTTGTTCTTACCACCTTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTTCGCCCTCTTTCACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTCAGC

GCGTTACCAACCGGTAGTGGTTTTCCGGGTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGT
TGATGAAGATCAGCAGCGTGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGC
TCATCATACTGCGCAAGaCCCATGTGAGAGTCGtCGATTTGCGCTTCGATTTCCGCTTTCCGGC
GTCAGTGCCGCCACGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCGCCAGAACGCGCCAGGGCGTC
ACAGATTTCCAGTGCCTGCTCGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTTCGATATCGA
CGCCAGTTTACGTGCGTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTT
TACCTTCACGCTGCGCTGCGGCGATCACCTGCAGCGTCAGCGTGGTTTTACCGGAAGATTCCG
GTCCGTAGATTTGACGATACGGCCCATCGGCAGACCACCTGCCCCAAGCGCGATATCCAGTG
AAAGCGAACCGGTAGAGATGGTTTTCCACATCCATGGAACGGTCTTCACCCAGGCGCATGATG
GAGCCTTTACCAAATTGTTTCTCAATCTGGCCCAGTGCTGCCGCCAACGCTTTCTGTTTGT
CGTCGATAGCCATTTTTACTCCTGTCATGCCGGGTAATACCGGATAGTCAATATGTTCTGTTGAA
GCAAT

尽管本申请已经结合一个或多个实施方式进行了描述，应当理解的是，本申请并不受限于这些实施方式。本申请中的描述意在涵盖所有变体形式以及等同物，均包含在所附权利要求的主旨和范围内。所有在本文中引用的文献通过引用的方式全部并入本文。

权 利 要 求 书

1. 大肠杆菌宿主细胞在复制或表达含有poly(A)序列的核酸分子中的用途，其中所述大肠杆菌宿主细胞包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量。
2. 如权利要求1所述的用途，其中所述大肠杆菌宿主细胞经*gyrA*基因或*gyrB*基因突变而包含下调的促旋酶活性。
3. 如权利要求2所述的用途，其中所述大肠杆菌宿主细胞经*gyrA*基因突变而表达GyrA突变体，所述GyrA突变体包含：
 - i) 在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，或
 - ii) 在对应于SEQ ID NO.37的第569位和第586位包含A569T和T586A突变。
4. 如权利要求2所述的用途，其中所述大肠杆菌宿主细胞经*gyrB*基因突变而表达GyrB突变体，所述GyrB突变体包含：
 - i) 在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变，
 - ii) 在对应于SEQ ID NO.39的第42位包含E42D突变，或
 - iii) 在对应于SEQ ID NO.39的第498位包含D498A突变。
5. 如权利要求2所述的用途，其中，所述大肠杆菌宿主细胞经*gyrA*基因和*gyrB*基因突变而表达GyrA突变体和GyrB突变体，所述GyrA突变体在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，所述GyrB突变体在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的用途，其中所述大肠杆菌宿主细胞进一步包括一项或多项以下突变：
 - i) *RecA*基因突变，
 - ii) 插入*lacI*基因表达盒，和
 - iii) *RecQ*基因敲除。
7. 如权利要求6所述用途，所述大肠杆菌宿主细胞包括：
 - i) 突变后*RecA*基因包含SEQ ID NO.44所示核苷酸序列，
 - ii) 插入的*lacI*基因表达盒包含SEQ ID NO.42所示核苷酸序列，或
 - iii) 所述*RecQ*基因包含SEQ ID NO.41所示核苷酸序列。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的用途，其中所述大肠杆菌宿主细胞为经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的JM108、NEB Stable、Top10、

DH5 α 、DH10B、MG1655、AG1、BL21、DB3.1、DC10B、DH1、E.Cloni 10G、EPI300、EPI400、JM109、JM110、STBL2、STBL3、SURE、TOP10F'、XL1-Blue或XL10-Gold。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的用途，其中所述大肠杆菌宿主细胞包含载体，所述载体包含所述含有poly(A)序列的核酸分子，或者
所述大肠杆菌宿主细胞在基因组中包含所述含有poly(A)序列的核酸分子。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的用途，其中，所述含有poly(A)序列的核酸分子中的poly(A)序列包含：

- i) 连续的20-250个A碱基；或
- ii) 2-5个由非A碱基间隔开的连续A碱基片段，其中各个连续A碱基片段包含连续的10-100个A碱基，且由1-20个非A碱基互相隔开。

11. 一种重组大肠杆菌宿主细胞，其为经改造而包含下调的促旋酶活性、或下调的促旋酶表达量的JM108、NEB Stable、Top10、DH5 α 、DH10B、MG1655、AG1、BL21、DB3.1、DC10B、DH1、E.Cloni 10G、EPI300、EPI400、JM109、JM110、STBL2、STBL3、SURE、TOP10F'、XL1-Blue或XL10-Gold。

12. 一种重组大肠杆菌宿主细胞，其经 $gyrA$ 基因或 $gyrB$ 基因的突变而包含下调的促旋酶活性。

13. 如权利要求11或12所述的重组大肠杆菌宿主细胞，其表达GyrA突变体，所述GyrA突变体包含：

- i) 在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，或
- ii) 在对应于SEQ ID NO.37的第569位和第586位包含A569T和T586A突变。

14. 如权利要求11或12所述的重组大肠杆菌宿主细胞，其表达GyrB突变体，所述GyrB突变体包含：

- i) 在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变，
- ii) 在对应于SEQ ID NO.39的第42位包含E42D突变，或
- iii) 在对应于SEQ ID NO.39的第498位包含D498A突变。

15. 如权利要求11或12所述的重组大肠杆菌宿主细胞，所述大肠杆菌宿主细胞经 $gyrA$ 基因和 $gyrB$ 基因突变而表达GyrA突变体和GyrB突变体，所述GyrA突变体在对应于SEQ ID NO.37的第80位包含H80A突变，所述GyrB突变体在对应于SEQ ID NO.39的第136位包含R136C突变。

16. 如权利要求11-15中任一项所述的重组大肠杆菌宿主细胞，其进一步包括一项或多项以下突变：

- i) *RecA*基因突变，
- ii) 插入*lacI*基因表达盒，和
- iii) *RecQ*基因敲除。

17. 如权利要求11-15中任一项所述重组大肠杆菌宿主细胞，进一步包括：

- i) *RecA*基因突变，突变后*RecA*基因包含SEQ ID NO.44所示的核苷酸序列，
- ii) 插入*lacI*基因表达盒，所述插入的*lacIq*基因包含SEQ ID NO.42所示的核苷酸序列，或
- iii) *RecQ*基因敲除，所述*RecQ*基因包含SEQ ID NO.41所示的核苷酸序列。

18. 如权利要求16或17所述重组大肠杆菌宿主细胞，包括：

- i) *gyrA*基因突变，所述突变的*gyrA*基因包含SEQ ID NO.3或4所示的核苷酸序列，
- ii) *RecA*基因突变，突变后*RecA*基因包含SEQ ID NO.44所示的核苷酸序列，
- iii) 插入*lacI*基因表达盒，所述插入的*lacIq*基因包含SEQ ID NO.42所示的核苷酸序列，和
- vi) *RecQ*基因敲除，所述*RecQ*基因包含SEQ ID NO.41所示的核苷酸序列。

19. 一种使用大肠杆菌宿主细胞来复制含有poly(A)序列的核酸分子的方法，所述方法包括：

- i) 向权利要求11-18中任一项所述大肠杆菌宿主细胞导入载体，所述载体包含含有poly(A)序列的核酸分子，和
- ii) 在利于载体复制的条件下培养所述大肠杆菌宿主细胞。

19. 一种使用大肠杆菌宿主细胞来表达含有poly(A)序列的核酸分子的方法，所述方法包括：

- i) 向权利要求11-18中任一项所述大肠杆菌宿主细胞导入载体，所述载体包含含有poly(A)序列的核酸分子，
- ii) 任选地，在利于载体复制的条件下培养所述大肠杆菌宿主细胞，以及
- iii) 在利于载体表达的条件下培养所述大肠杆菌宿主细胞，或
从步骤i) 或ii) 的大肠杆菌宿主细胞中提取载体，并对载体进行体外转录；或者
- i) 在权利要求11-18中任一项所述大肠杆菌宿主细胞的基因组中整合入含

有poly(A)序列的核酸分子，以及

ii) 在利于含有poly(A)序列的核酸分子的表达的条件下培养所述大肠杆菌宿主细胞。

20. 一种用于制备重组大肠杆菌宿主细胞的方法，包括：

i) 提供大肠杆菌宿主细胞，该大肠杆菌宿主细胞包含 $gyrA$ 基因和 $gyrB$ 基因，

ii) 下调所述大肠杆菌宿主细胞中促旋酶的活性、或下调所述大肠杆菌宿主细胞中促旋酶的表达量。

21. 如权利要求20所述的方法，其中，步骤ii) 包括，

1) 使 $gyrA$ 基因包含SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列，

2) 使 $gyrB$ 基因包含SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列，

3) 使 $gyrA$ 基因包含SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列，

4) 使 $gyrB$ 基因包含SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列，或

5) 使 $gyrB$ 基因包含SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列。

22. 如权利要求21所述的方法，其中，步骤ii) 包括向步骤i) 的大肠杆菌宿主细胞导入Cas9酶，以及

1) 包含SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.13所示的核苷酸序列的供体序列，

2) 包含SEQ ID NO.11所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.16所示的核苷酸序列的供体序列，

3) 包含SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.14所示的核苷酸序列的供体序列，

4) 包含SEQ ID NO.10所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.15所示的核苷酸序列的供体序列，或

5) 包含SEQ ID NO.12所示的核苷酸序列的sgRNA、和包含SEQ ID NO.17所示的核苷酸序列的供体序列。

23. 如权利要求20-22中任一项所述的方法，所述大肠杆菌宿主细胞进一步包括以下操作步骤中任一项或多项：

1) $RecA$ 基因突变，

2) 插入 $lacI$ 基因表达盒，和

3) $RecQ$ 基因敲除。

24. 如权利要求20-23中任一项所述的方法，其中步骤i) 中的大肠杆菌宿主细胞选自JM108、NEB Stable、Top10、DH5 α 、DH10B、MG1655、AG1、BL21、DB3.1、

DC10B、DH1、E.Cloni 10G、EPI300、EPI400、JM109、JM110、STBL2、STBL3、
SURE、TOP10F'、XL1-Blue或XL10-Gold。