

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 6 月 2 日 (02.06.2022)



(10) 国际公布号

WO 2022/110377 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/70 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/73 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/137060

(22) 国际申请日: 2020 年 12 月 17 日 (17.12.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202011336348.X 2020 年 11 月 25 日 (25.11.2020) CN

(71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 刘陈立 (LIU, Chenli); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 赖旺生 (LAI, Wangsheng); 中国广

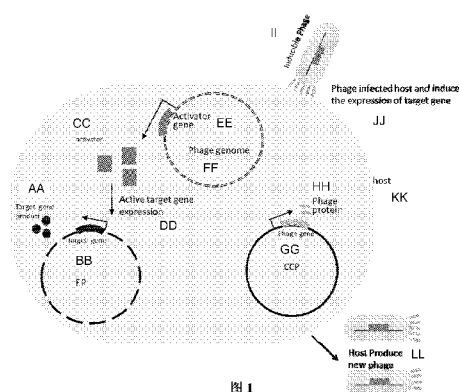
东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 魏婷 (WEI, Ting); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 陈茜 (CHEN, Qian); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 孙陈健 (SUN, Chenjian); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳北路 99 号 2 号楼 905, Beijing 100123 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: PHAGE-RELATED GENE-INDUCED EXPRESSION SYSTEM

(54) 发明名称: 一种噬菌体相关的基因诱导表达系统



AA Target gene product
BB Target gene
CC oocyte
DD Active target gene expression
EE Activator gene
FF Phage genome
GG phage gene
HH Phage protein
II Inducible Phage
JJ Phage infected host and induce the expression of target gene
KK host
LL Host Produce new phage

(57) Abstract: Provided is a phage-related gene-induced expression system, comprising a host strain and a phage, wherein the host strain comprises a target gene, the phage comprises a regulatory gene capable of expressing a regulatory factor after the phage is infected into a host strain, the regulatory factor obtained by the expression of the regulatory gene can specifically regulate the promoter of the target gene, or can specifically regulate the expression or post-expression modification of the target gene. According to the expression system, the phage infection is used as an induction factor to start the expression of a downstream target gene, thereby realizing the expression of a target gene or a signal gene in a specific host strain, so that the host strains in the same culture system are distinguished on the basis of whether the host strains are infected by a phage.

(57) 摘要: 提供了一种噬菌体相关的基因诱导表达系统, 该系统包括宿主菌和噬菌体, 该宿主菌中包含目标基因, 该噬菌体中包含能够在噬菌体感染宿主菌后表达调控因子的调控基因, 该调控基因表达获得的调控因子能够特异性调控目标基因的启动子, 或者能够特异性地调控目标基因的表达或表达后的修饰。该表达系统以噬菌体感染作为诱导因素, 启动下游目标基因的表达, 进而实现特定宿主菌中的目标基因或信号基因的表达, 使得同一培养系统中的宿主菌基于是否被噬菌体感染而进行区别。

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种噬菌体相关的基因诱导表达系统

技术领域

本发明涉及生物技术领域，尤其涉及噬菌体感染与基因诱导表达领域。

背景技术

基因诱导表达是生物技术领域常见的一种基因控制技术。通过向细菌或者细胞培养系统中添加小分子诱导剂来解除目的基因的受抑制状态，进而激活其表达。比如在 lac operon 中，通过添加 IPTG 诱导剂解除阻遏蛋白 lacI 对 lac 启动子的抑制作用，从而启动 lacZ 基因的表达。又比如在核糖开关控制的基因回路中，mRNA 通过折叠成特殊的二级结构来抑制自身的翻译表达。而对应的配体可以和 mRNA 结合解开其二级结构，启动翻译。所以添加小分子配体可以诱导核糖开关控制的基因表达。

这些基因诱导系统虽然可以有效的控制目的基因的表达。但是小分子诱导剂可以在整个培养体系中自由扩散，对体系中所有细菌的诱导表达是同步进行的。

在实际应用中（例如环境检测及报告系统），实验者有时希望仅在体系中特定一部分细菌中实现目的基因的表达，且只有在噬菌体感染发生时才表达。由于难以确定培养体系中哪部分细菌被感染，什么时候被感染，此时通过人工添加小分子诱导剂等非特异性的方法难以实现这样的诱导目的。

发明内容

为了解决上述问题，本发明一个方面提供一种噬菌体感染相关的基因诱导表达系统，所述基因诱导表达系统包括宿主菌和噬菌体；

其中，所述宿主菌中包含目标基因，所述噬菌体中包含调控基因；

所述的调控基因能够在噬菌体感染宿主菌后表达调控因子的基因，所述的调控基因表达获得的调控因子能够特异性调控地目标基因的启动子，或者能够特异性地调控目标基因的表达或表达后的修饰。

在本发明的一些技术方案中，调控因子能够特异性地调控目标基因的启动子的启动，所述的调控因子不参与启动子下游基因的转录。

在本发明的一些技术方案中，调控因子能够特异性地调控目标基因的表达。

在本发明的一些技术方案中，调控因子能够特异性地调控目标基因的表达产物的修饰，使表达产物转变为活性状态。

在本发明的一些技术方案中，所述的调控因子为噬菌体内源性基因表达产物，或者为噬菌体外源性基因表达产物。

在本发明的一些技术方案中所述调控因子为直接激活目标基因的启动子的调控因子，所述调控因子直接作用于目标基因的启动子；

在本发明的一些优选的技术方案中，所述调控因子为 σ 因子的 σF 蛋白，调控基因为 σ 因子的 σF 基因，且目标基因的启动子采用 pF1 启动子；

在本发明的一些优选的技术方案中，所述调控因子为 σ 因子的 σB 蛋白，调控基因为 σ 因子的 σB 基因，且目标基因的启动子采用 pB1 启动子。

在本发明的一些技术方案中，所述调控因子为间接激活目标基因的启动子的调控因子；

在本发明的一些优选的技术方案中，所述调控因子为 pspF 蛋白，调控基因为 pspF 基因，且目标基因的启动子采用 psp 启动子。

在本发明的一些的技术方案中，所述调控因子为通过抑制能够抑制启动子启动的物质，进而实现启动子的激活，

在本发明的一些优选的技术方案中，所述调控因子为 pIV 蛋白，调控基因为 gIV 基因，

且目标基因的启动子采用包含上游的基因 *pspF* 和下游的基因 *pspABCDE* 的 *psp* 启动子。

在本发明的一些的技术方案中，所述宿主菌中不包含与目标基因的启动子竞争调控因子的基因或蛋白。

本发明另一个方面提供了一种噬菌体感染相关的基因诱导表达方法，其包括采用本发明上述基因诱导表达系统，将噬菌体加入宿主菌中进行感染和复制。

本发明再一个方面提供了一种检测噬菌体感染的方法，其包括以下步骤：

- 1) 采用本发明上述基因诱导表达系统，将噬菌体加入宿主菌中进行感染和增殖，
- 2) 检测目标基因的表达水平。

本发明再一个方面提供了本发明所述的噬菌体感染相关的基因诱导表达系统的制备方法，其包括如下步骤：

- i) 制备宿主菌；
- ii) 制备噬菌体。

在本发明的技术方案中，步骤 i) 为将目标基因和启动目标基因的启动子克隆到宿主菌内。

优选地，步骤 i) 通过将目标基因和启动目标基因的启动子克隆到诱导表达质粒上，并将诱导表达质粒转入宿主菌内。

更优选地，步骤 i) 中还包括将宿主菌染色体上的竞争性抑制调控因子的基因敲除的步骤。

更优选地，步骤 i) 中还包括将辅助质粒转入宿主细胞的步骤。更优选地，所述的辅助质粒通过将的基因缺陷型噬菌体中缺失的基因克隆到质粒。

在本发明的技术方案中，步骤 ii) 为将调控基因克隆到噬菌体内，所述调控基因在噬菌体感染宿主菌后表达调控因子。

优选地，将噬菌体内的部分基因敲除，制成基因缺陷型噬菌体。

本发明再一个方面提供了本发明所述的噬菌体感染相关的基因诱导表达系统的用途，所述用途为噬菌体感染相关的基因诱导表达系统用于检测噬菌体感染宿主菌的时间或用于特异性识别已经被噬菌体感染的宿主菌。

本发明再一个方面提供了本发明所述的噬菌体感染相关的基因诱导表达系统的用途，所述用途为提供在目标细胞中表达目标蛋白的用途，所述的目标细胞为被所述噬菌体感染的细胞，所述的目标蛋白为宿主菌中的目标基因表达的蛋白。

在本发明的技术方案中，所述目标基因为任意希望进一步转录或表达的基因。在一个具体实施方案中为报告基因。在一个具体实施方案中，目标基因为进一步串联了报告基因的基因。在本发明的具体技术方案中，报告基因优选为以下蛋白或多肽的基因：绿色荧光蛋白(GFP)、生物素信号传导肽、蓝色荧光蛋白(BFP)、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)。在一个具体实施方案中，当用于检测目标基因表达时，如果目标基因为报告基因或串联了报告基因，可以通过常规方法检测报告基因表达得到的蛋白，例如光学检测手段。如果目标基因中不包含报告基因，也可以采用其他检测蛋白的手段检测目标蛋白的表达，例如 RT-PCR 或者 Western blotting 等。在一个具体实施方案中，所述的目标基因为仅转录 RNA 的基因。

在本发明的技术方案中，所述目标基因位于宿主菌染色体上和或宿主菌携带的质粒上。

在本发明的一些技术方案中，所述目标基因位于宿主菌携带的质粒上时，其宿主菌染色体上不包含目标基因的启动子的。

在本发明的一些技术方案中，所述目标基因位于宿主菌染色体上时，其宿主菌携带的质粒上不包含目标基因的启动子的。

在本发明的技术方案中，所述目标基因的启动子选自诱导型启动子，所述诱导型启动子通过调控因子进行调控启动。所述目标基因及其启动子位于宿主细胞内，优选位于宿主细胞的诱导表达质粒中。在本发明的具体方案中，所述目标基因的启动子是宿主菌的内源性启动子或外源性启动子，且所述启动子能够在宿主菌中启动。在本发明的具体方案中，所述目标基因的启动子仅在宿主细胞的诱导表达质粒中。在本发明的具体方案中，所述目标基因的启

动子不存在于宿主细胞的诱导表达质粒以外的染色体中。

在本发明中，所述的调控因子是一种蛋白、多肽或 RNA。在一个具体的实施例中，所述的调控因子用于激活或抑制启动子的启动，但不参与下游基因的转录。在本发明中，所述的调控因子不参与启动子下游基因的转录和蛋白的表达。在本发明中所述的调控因子激活启动子下游基因的表达有多种表达方式，例如，直接激活目标基因的启动子，例如本发明中的方案 S5、S6 和 S7，采用了直接表达 σ 因子的 σB 或 σF ， σB 或 σF 作为调控因子直接作用于启动子 pB1 或 pF1，并启动了启动子 pB1 或 pF1。或者间接激活目标基因的启动子，所述间接激活目标基因的启动子是指通过激活能够激活启动子的物质，进而实现启动子的激活，例如本发明中的方案 S3 中，采用了先表达 pspF 蛋白，即一种 ATP 水解酶，该水解酶通过水解 ATP 提供能量，进而启动 psp 下游基因的表达。再或者通过抑制能够抑制启动子启动的物质，进而实现启动子的激活，例如通过表达调控因子 pIV 蛋白，pIV 蛋白通过抑制抑制因子 pspA 蛋白，进而启动 psp 启动子。

在本发明的技术方案中，所述的调控基因为直接表达调控因子的基因。其中，“直接表达调控因子的基因”是指噬菌体感染宿主菌后在复制过程中，通过表达产生调控因子的基因。

在本发明优选的实施方案中，所述诱导型启动子选自 psp 启动子 (SEQ ID NO: 1)、pF1 启动子 (SEQ ID NO: 12)、pB1 启动子 (SEQ ID NO: 15)。

在本发明优选的实施方案中，所述调控因子选自 σ 因子的 σB 蛋白、 σ 因子的 σF 蛋白、pspF 蛋白；其中，优选地，表达 σ 因子的 σF 蛋白的基因为 SEQ ID NO: 10，表达 σ 因子的 σB 蛋白的基因为 SEQ ID NO: 14。

在本发明优选的实施方案中，目标基因的启动子为 psp 启动子 (SEQ ID NO: 1)，而调控因子选自 pspF 蛋白。

在本发明优选的实施方案中，目标基因的启动子为 pF1 启动子 (SEQ ID NO: 12)，而调控因子选自 σ 因子的 σF 蛋白。

在本发明优选的实施方案中，目标基因的启动子为 pB1 启动子 (SEQ ID NO: 15)，而调控因子选自 σ 因子的 σB 蛋白。

在本发明的一些技术方案中，所述的宿主菌选自能够被噬菌体感染的宿主菌。在本发明一些优选的实施例中，所述的宿主菌选自大肠杆菌、志贺氏菌、巴斯德菌属的细菌。本发明一些优选的实施例中，所述的噬菌体选自丝状噬菌体、有尾噬菌体。在本发明一个优选的实施例中，所述的宿主菌为大肠杆菌，且大肠杆菌中包含 F 质粒。在本发明一个优选的实施例中，宿主菌为大肠杆菌，噬菌体为 M13 噬菌体、 λ 噬菌体。在本发明一个优选的实施例中，宿主菌选自包含 F 质粒的细菌，噬菌体为 M13 噬菌体。

在本发明的一些技术方案中，所述的宿主菌中包含诱导表达质粒，所述诱导表达质粒上包含目标基因以及启动目标基因的启动子。在一个优选的实施例中，当系统内的噬菌体为基因缺陷型噬菌体所述宿主菌中还携带有帮助基因缺陷型噬菌体进行感染增殖的辅助质粒，所述辅助质粒中包含基因缺陷型噬菌体进行感染增殖必须的且缺失的基因。

在本发明的一些技术方案中，所述的噬菌体为温和噬菌体或烈性噬菌体。

在本发明的一些技术方案中，所述的噬菌体为完整的噬菌体。所述完整的噬菌体指没有缺失自身基因的噬菌体。

在本发明的一些技术方案中，所述的噬菌体为基因缺陷型噬菌体，且所述宿主菌中还携带有帮助基因缺陷型噬菌体进行感染增殖的辅助质粒。所述基因缺陷型噬菌体中缺失的基因在辅助质粒上表达。

有益效果

1) 本发明提供了一种以噬菌体感染相关的诱导表达系统，该表达系统首次以噬菌体感染作为诱导因素，诱导特异性的启动子启动下游目标基因的表达，进而实现特定宿主菌（即被噬菌体感染的）中的目标基因或信号基因的表达。本发明的方法不仅实现了目标蛋白或信号

蛋白的表达,而且实现了特定宿主菌中的目标蛋白或信号蛋白的表达,使得同一培养系统中的宿主菌基于是否被噬菌体感染而进行区别。

2) 本发明发现了在本发明的系统中,可以通过多种途径降低本底,和或增加特异性的诱导表达。例如本发明通过敲除宿主菌染色体中的调控因子竞争性位点,实现特异性诱导表达强度的增加。又例如本发明通过采用宿主菌的外源性基因作为调控基因,实现了保持低本底的同时增加特异性诱导表达效果。

附图说明

以下结合附图对本发明进行说明:

图 1 是携带调控基因的噬菌体诱导目的基因表达的示意图。

图 2 是 *psp* operon 示意图。(a) *psp* operon 基因在染色体上的排列。(b) 位于 *pspA* 与 *pspF* 之间的 *psp* 启动子示意图。(c) *psp* operon 激活示意图。*pspF* 为 ATP 水解酶,为转录提供能量。*pspF* 的活性被 *pspA* 所抑制。*pspB* 和 *pspC* 组合成 *pspBC* 可以接收 pIV 的信号并呈递给 *pspA*,使其解除对 *pspF* 的抑制。IHF 使 DNA 弯曲,促进 *pspF* 和 σ 因子结合 DNA。

图 3 是实现方案 S1、S2 的质粒与噬菌体图谱。(a)质粒 EP1_*pspsfGFP* 图谱,(b)噬菌体 IP1_SPT7 图谱,(c)质粒 CCP1-174T7 图谱,(d)质粒 EP2_*pspAEsfGFP* 图谱。

图 4 是实现方案 S3、S4 和 S5 的质粒与噬菌体图谱。(a)噬菌体 IP2_SPT7F 的图谱,(b)噬菌体 IP3_SPF 的图谱,(c)质粒 CCP2-174T7IIV 图谱。(d)噬菌体 IP4_SPFs 图谱,(e)质粒 EP3_*pF1sfGFP* 图谱。

图 5 是实现方案 S6 和 S7 的质粒与噬菌体图谱。(a)质粒 EP4_*pB1sfGFP* 图谱,(b)噬菌体 IP5_SPB 图谱,(c)噬菌体 IP6_SPT7Fs 图谱。

图 6 是方案 S1、S2、S3、S4 中携带调控基因的噬菌体特异性诱导目的基因表达的荧光检测结果。

图 7 是方案 S1、S2、S5、S6、S7 中携带调控基因的噬菌体特异性诱导目的基因表达的荧光检测结果。

具体实施方式

为了使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面对本发明的具体实施方式做详细的说明,但不能理解为对本发明的可实施范围的限定。

如图 1 所示,本发明提供一种噬菌体相关的基因诱导表达系统,使目的基因的表达与噬菌体感染活动相互关联。其特征在于所述噬菌体 IP (inducer phage) 携带调控基因,在感染后可以特异性的激活诱导表达质粒 EP(inducible expression plasmid)上目的基因的表达。所述噬菌体可以是完整的噬菌体(除了携带调控基因外,噬菌体没有缺失自身基因),也可以是缺失部分基因的基因缺陷型噬菌体。所述“基因缺陷型噬菌体”则是指缺失了一部分基因的噬菌体或者部分基因没有正常功能的噬菌体。所述基因缺陷型噬菌体缺失的基因或没有正常功能部分基因在宿主染色体或者辅助质粒 CCP(complementary component plasmid)上表达。这种缺陷型噬菌体只能在携带辅助质粒的宿主菌中进行感染增殖,可以有效避免对实验环境造成污染。需要说明的是使用缺陷型噬菌体只是一种控制实验室污染的便利手段,而不是实现噬菌体相关的基因诱导表达的必需途径。

下面以缺失部分基因的 M13 丝状噬菌体,及其对应的宿主菌和目的基因 sfGFP (绿色荧光蛋白) 为例对本发明的实验设计与实验方法进行说明。并通过检测单位细菌的相对荧光强度(RFU/OD₆₀₀)来分析噬菌体对目的基因的诱导效果。需要说明的是以下内容仅是示例性的,并且其目的仅在于说明本发明的可行性,并不意在限制本发明的保护范围。本发明所述的噬菌体可以是 M13 噬菌体,也可以是其他任意可培养的噬菌体。另外烈性噬菌体在裂解宿主菌之前亦有完整的基因表达过程,所以烈性噬菌体也适用于本发明。本发明所述的宿主菌

可以是天然宿主菌也可以是经过实验室改造后获得易感性的宿主菌。本发明的目的基因可以是 sfGFP 基因也可以是其他任意需要诱导表达的基因。本发明虽然使用调控基因激活目的基因表达作为展示例,但也可以根据需要使用具有阻遏功能的调控基因来抑制目的基因的表达。

本发明所涉及的细菌接合、基因敲除以及质粒构建是本领域的公知技术,并且确定能够获得相应的菌株、质粒和噬菌体。因此本发明的宿主菌、质粒和噬菌体具有可重复性的特征,本领域的技术人员只要按照常规方法即可得到。据此本领域的技术人员应当理解,本发明无需提供菌种保藏和构建方法也能满足充分公开条件。

在本发明中为了便于描述,会使用一些符号来表示相应的蛋白质,并加上“基因”一词作为前缀或后缀来表示编码该蛋白质的基因。

作为本发明的一个实现方法,可以直接利用大肠杆菌天然的噬菌体诱导激活的操纵子 psp operon(phage shock protein operon)来控制目的基因的表达。如图 2 所示 psp operon 包含一个双向启动子,位于启动子上游的基因 pspF 和位于启动子下游的基因 pspABCDE(基因 pspABCDE 在本发明中用于指代 pspA、pspB、pspC、pspD 和 pspE 5 个基因)。pspF 为组成型表达的 ATP 水解酶,通过为 DNA 转录提供能量来启动下游基因的表达。pspA 是一个抑制因子,能够抑制 pspF 的水解酶活性使下游基因的转录无法进行。这样 psp operon 就处于自我抑制状态,只有少量的泄露表达作为本底。M13 噬菌体感染宿主菌后,基因 gIV 会表达出 pIV 蛋白。此时 pspBC(蛋白 pspB 与 pspC 组成的复合物)识别接收 pIV 信号后,能够解除 pspA 对 pspF 的抑制作用,使得 operon 下游基因得以顺利表达。此时 gIV 充当着调控基因的角色。

基于 psp operon 的原理,本发明的一个实现方案 S1(system1)将 psp operon 中的 psp 启动子 (SEQ ID NO: 1)克隆到诱导表达质粒 EP1_pspsfGFP (SEQ ID NO: 2)上控制目的基因绿色荧光蛋白基因 sfGFP 的表达(如图 3a)。此时 sfGFP 也是报告基因。如图 3b 所示,为了构建噬菌体 IP,本发明将 M13 噬菌体上的基因 gIII(gene III 表达次要衣壳蛋白 pIII)替换成 T7RNAP 基因(表达 T7 聚合酶 T7RNAP),由此得到噬菌体 IP1_SPT7 (SEQ ID NO: 3)。如图 3c 所示,将 IP1_SPT7 缺失的基因 gIII 克隆到辅助质粒 CCP1-174T7 (SEQ ID NO: 4)上并由 T7 启动子 (SEQ ID NO: 5)控制其表达。通过细菌接合实验,向大肠杆菌 MG1655 导入一个 F 质粒后可以得到一个能够被丝状噬菌体感染的宿主菌 FM15,其基因型为 $F' proA+B+lacI^q \Delta(lacZ)M15 zzf::Tn10 (TetR)/\lambda-ihvG-rfb-50 rph-1 attB::Kan^R \Delta(lacZ)M15$ 。FM15 可以支持野生型 M13 噬菌体感染增殖,但是缺失部分基因的 IP1_SPT7 不能在 FM15 菌中产生子代噬菌体。用辅助质粒 CCP1-174T7 和诱导表达质粒 EP1_pspsfGFP 共转化 FM15 菌,得到宿主菌 host1。host1 携带辅助质粒,可以表达基因 gIII,能够支持缺陷噬菌体 IP1_SPT7 的感染增殖。如图 1 所示,感染发生时,噬菌体上的调控基因 gIV 表达出 pIV,进而启动诱导表达质粒 EP1_pspsfGFP 上的绿色荧光蛋白基因 sfGFP 的表达。根据实验的需要和实验室条件,任何携带 F 质粒的大肠杆菌均可以作为宿主菌使用,而不必局限于 FM15 菌。

由于 psp operon 在宿主菌染色体上只有一个拷贝,pspF 和 pspABCDE 等基因的表达水平较低。诱导表达质粒 EP1_pspsfGFP 上的 psp 启动子需要和宿主染色体上的 psp 启动子竞争 pspF 和 pspABCDE。这会抑制 EP1_pspsfGFP 质粒上 psp 启动子的活性,降低目的基因 sfGFP 的表达水平和整个诱导系统的可靠性。如图 6 所示,通过检测被噬菌体感染的 host1 宿主菌绿色荧光蛋白的相对荧光强度 RFU,可以分析出 EP1_pspsfGFP 上目的基因 sfGFP 的表达水平。同时通过检测宿主菌菌液在 600nm 处的光密度值 (OD_{600}),可以知道其菌体的相对浓度变化。对比单位宿主菌的相对荧光强度 (RFU/OD_{600}),可知此时的 S1 方案诱导表达质粒上的荧光基因基本没有被诱导表达(图 6)。

作为 S1 的一个改进方案 S2,如图 3d 所示,本发明把 psp operon 中的 psp 启动子连同 pspABCDE 基因一起克隆到诱导表达质粒上,控制 sfGFP 基因的表达。得到的新诱导表达质粒为 EP2_pspAEsfGFP (SEQ ID NO: 6)。EP2_pspAEsfGFP 与 CCP1-174T7 共转化 FM15 菌,得到宿主菌 host2。方案 S2 与 S1 使用相同的 IP1_SPT7 和 CCP1-174T7,但 S2 拥有更多拷贝

的 pspABCDE 基因, 因此其诱导表达质粒 EP2_pspAEsfGFP 对 IP1_SPT7 的诱导具有更强的响应效果。但 S2 方案中 EP2_pspAEsfGFP 的本底表达也更高。(图 6)

如图 2 所示, psp operon 要完成目的基因的诱导表达, 需要通过噬菌体感染, 表达出蛋白 pIV, pspBC 识别 pIV 信号, 之后 pspBC 再解除 pspA 对 pspF 的抑制作用。如此 pspF 才可以开始启动 psp operon 下游基因的表达。整个诱导回路较长。而在基因的表达调控中, 基因回路越长其响应时间也越长, 相应的表达调控效率也越低。对此的一个改进方法是, 去除 psp operon 诱导表达过程的中间步骤, 直接由噬菌体携带的调控基因启动 psp 启动子。

做为 S1 的另一个改进方案 S3, 本发明将宿主菌 FM15 中的整个 psp operon 从染色体中敲除, 得到 FM20 菌。同时将 pspF 基因直接作为调控基因插入噬菌体 IP1_SPT7 基因组上, 得到一个如图 4a 所示, 可以表达调控基因 pspF 的新噬菌体 IP2_SPT7F(SEQ ID NO:7)。EP1_pspsfGFP 与 CCP1-174T7 共转化 FM20 菌, 得到宿主菌 host3。方案 S3 不需要宿主 Host3 提供 psp operon 的调控蛋白, 由 IP2_SPT7F 直接表达调控基因 pspF, 启动诱导表达质粒 EP1_pspsfGFP 中荧光蛋白 sfGFP 的表达。它不需要与宿主竞争, 并且基因回路更加简洁。S3 方案中的 IP2_SPT7F 噬菌体可以较好的诱导目的基因表达, 同时整个系统的目的基因本底表达水平更低, 具有更好的特异性诱导表达效果。(图 6)

方案 S1, S2, S3 构建缺陷噬菌体时将 M13 噬菌体基因 gIII 从噬菌体基因组中敲除, 并在辅助质粒 CCP1-174T7 中重新表达基因 gIII, 以支持缺陷噬菌体 IP1_SPT7、IP2_SPT7F 的感染增殖。用于构建缺陷噬菌体的基因除了基因 gIII 外, 也可以是噬菌体基因组上的其它基因。

作为本发明的另一个实现方案 S4, 本发明进一步将已经缺失 gIII 基因的 IP1_SPT7 噬菌体的另外 3 个基因 gII、gV 和 gX 也一起敲除, 同时将宿主菌的 pspF 基因作为调控基因克隆到一共敲除了 4 个基因的噬菌体上, 得到新的缺陷噬菌体 IP3_SPF(SEQ ID NO:8) (图 4b)。敲除的 4 个噬菌体基因则由辅助质粒 CCP2-174T7IIV(SEQ ID NO:9) (图 4c) 表达, 以支持噬菌体 IP3_SPF 感染增殖。CCP2-174T7IIV 与 EP1_pspsfGFP 共转化 FM20 菌, 得到宿主菌 host4。在 CCP2-174T7IIV 的帮助下, IP3_SPF 感染 host4 并表达 pspF 基因, 从而启动 EP1_pspsfGFP 质粒上的 sfGFP 基因表达。其诱导激活效果和 S3 没有明显区别。(图 6)

如图 6 所示, 对于噬菌体携带调控基因 gIV 或 pspF, 激活 psp 启动子并诱导目的基因表达的三个方案 S1、S2 和 S3: S1 方案没有诱导效果; S2 方案在获得较强诱导效果时, 系统的本底表达也很高, 系统变的不严谨; 改进方案 S3 和 S4 在维持较低本底表达时, 具有较强的特异性诱导表达效果, 整体更加严谨可靠。

除了宿主基因和噬菌体自身基因, 噬菌体 IP 上携带的调控基因也可以是来自其它生物基因组的异源基因。作为本发明的另一个实现方案 S5, 用来源于芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 菌株的 σ 因子 σ_F 基因替换 IP3_SPF 噬菌体携带的 pspF 基因, 得到一个可以表达异源 σ 因子 σ_F (SEQ ID NO:10) 的新噬菌体 IP4_SPFs(SEQ ID NO:11) (图 4d)。同时用 σ_F 特异识别的启动子 pF1(SEQ ID NO:12)代替 EP1_pspsfGFP 中的 psp 启动子, 得到新的诱导表达质粒 EP3_pF1sfGFP(SEQ ID NO:13) (图 4e)。IP4_SPFs 与 IP3_SPF 缺失的噬菌体基因相同, 只是携带不同的调控基因, 它们使用相同的辅助质粒 CCP2-174T7IIV。CCP2-174T7IIV 与 EP3_pF1sfGFP 共转化 FM15 菌得到宿主菌 host5。IP4_SPFs 感染 host5 后, 自身携带的 σ_F 基因表达, 并特异性地启动 EP3_pF1sfGFP 上的目的基因 sfGFP 表达。 σ_F 具有比 pspF 更强的特异活性, 其诱导激活目的基因表达的能力更强, 同时其对应的启动子 pF1 控制的目的基因在大肠杆菌中保持着极低的本底表达水平。(如图 7)

作为本发明的另一个实现方案 S6, 可以使用芽孢杆菌的 *B. subtilis* 168 的 σ 因子 σ_B (SEQ ID NO:14)基因替换 σ_F 基因, 用启动子 pB1(SEQ ID NO:15)代替 pF1。得到新的噬菌体 IP5_SPB(SEQ ID NO:16) (图 5b) 和诱导表达质粒 EP4_pB1sfGFP (SEQ ID NO:17) (图 5a)。CCP2-174T7IIV 与 EP4_pB1sfGFP 共转化 FM15 菌得到 host6。IP5_SPB 感染 host6 以后, 可以

看到与方案 S5 相似的 sfGFP 目的基因特异性诱导表达效果。(如图 7)

作为本发明的另一个实施方案 S7, 用芽孢杆菌的 *B. subtilis* 168 的 σ 因子 σ_F 基因替换 IP2_SPT7F 噬菌体携带的 *pspF* 基因, 得到一个可以表达异源 σ 因子 σ_F 的新噬菌体 IP6_SPT7Fs(SEQ ID NO:18) (图 5c)。IP6_SPT7Fs 与 IP4_SPFs 均表达 σ_F 因子, 使用共同的 EP3_pF1sfGFP。其差别在于 IP6_SPT7Fs 的基因组只缺失了一个基因 *gIII*, 而 IP4_SPFs 缺失了 4 个基因。CCP1-174T7 和 EP3_pF1sfGFP 共转化 FM15 菌得到宿主菌 host7。IP6_SPT7Fs 感染 host7 后, 自身携带的 σ_F 基因表达, 并特异性地启动 EP3_pF1sfGFP 上的目的基因 sfGFP 表达。如图 7 所示, 在保持和方案 S5 相当的低本底的同时, S7 方案获得了最强的特异性诱导表达效果。

以下通过具体的实施例来说明本发明的可行性。

实施例 1 噬菌体 IP1_SPT7 的制备

1) 将 CCP1-174T7 转化 FM15 菌得到的宿主菌 host8 制备成感受态细胞备用。

准备一个 10 cm 的无抗性 LB 固体培养平板备用。

准备含 0.6% (w/v) 琼脂和 15 μ g/mL 四环素、50 μ g/mL 羧苄青霉素的 LB 半固体培养基, 50°C 预热备用。

2) 将宿主菌 host8 单克隆在含 15 μ g/mL 四环素、50 μ g/mL 羧苄青霉素的 LB 液体培养基中过夜培养。培养条件为 37°C, 200 rpm。

3) 将过夜培养的宿主菌 host8 在 37°C 预热的相同培养基中稀释 100 倍, 相同条件继续活化培养至对数期 $OD_{600} \approx 0.3$ 。(使用 1 cm 比色皿检测)

4) 将对数期宿主菌 host8 继续用 37°C 预热的相同培养基稀释 20 倍, 相同条件继续活化培养至对数期 $OD_{600} \approx 0.3$ 。(使用 1 cm 比色皿检测)

5) 在活化 host8 同时, 将 6 fmol 通过分子克隆拼接好的 IP1_SPT7 噬菌体基因组 DNA 与 100 μ L host8 电转感受态细胞混匀后转入预冷的电击杯, 进行电击转化。(Bio-Rad165-2100 电穿孔仪, 电压为 1.8 kv)

6) 用 1 mL 新鲜的无抗性 LB 液体培养基, 将电击杯中的 host8 重悬至 1.5 mL 离心管中。37°C, 200 rpm, 活化培养 1 h。

7) 向 4 mL 预备好的 LB 半固体培养基中加入 20 μ L 活化培养的电击细菌和 200 μ L“步骤 4”中 活化至对数期的宿主菌 host8, 混匀后涂布在预备好的固体培养平板上, 制成双层平板。平板室温静置 30 min, 待双层平板凝固后于 37°C 生化培养箱过夜倒置培养。

8) 第二天可以在双层平板中看到噬菌体 IP1_SPT7 形成的噬菌斑。

实施例 2 噬菌体 IP1_SPT7 扩增。

1) 将宿主菌 host8 单克隆在含 1% (w/v) CAA、0.4% (w/v) 葡萄糖、15 μ g/mL 四环素、50 μ g/mL 羧苄青霉素的 M9 液体培养基中过夜培养, 培养条件为 37°C, 200 rpm。

2) 将过夜培养的宿主菌 host8 在 37°C 预热的相同培养基中稀释 100 倍, 相同条件继续活化培养至对数期 $OD_{600} \approx 0.3$ 。(使用 1 cm 比色皿检测)

3) 将对数期宿主菌 host8 继续用 37°C 预热的相同培养基稀释 20 倍, 相同条件继续活化培养至对数期 $OD_{600} \approx 0.3$ 。(使用 1 cm 比色皿检测)

4) 将活化好的 host8 在相同培养基中稀释 100 倍至 2 mL 体积中。再用接种环将“实施例 1”中噬菌体 IP1_SPT7 形成的噬菌斑接种到稀释好的 host8 宿主菌中, 之后 37°C, 200 rpm 过夜培养。

5) 对过夜培养物, 12000 rpm 离心收集上清。上清再用 0.22 μ m 的针孔过滤器过滤后得到 IP1_SPT7 噬菌体储存液。噬菌体储存液保存于 4°C 备用。

实施例 3 噬菌体 IP1_SPT7 滴度测定

1) 准备 8 个 10 cm 的无抗性 LB 固体培养平板备用 (平板数量可以根据后续噬菌体稀释梯度增加或者减少)

准备含 0.6% (w/v) 琼脂和 15 $\mu\text{g/mL}$ 四环素、50 $\mu\text{g/mL}$ 羧苄青霉素的 LB 半固体培养基, 50 $^{\circ}\text{C}$ 预热备用。

2) 使用“实施例 1”中相同方法将宿主菌 host8 活化两轮至对数期备用。

3) 将“实施例 2”中得到的噬菌体储存液稀释 10^{4-11} 倍共 8 个梯度。(具体稀释梯度可以根据实际需要进行增减, 但每个梯度需要一个 10 cm 的无抗性 LB 固体培养平板)

4) 将稀释好的各梯度 IP1_SPT7 噬菌体各取 10 μL 与 200 μL 对数期的 host8 宿主菌混合后, 加入 4 mL 预备好的 LB 半固体培养基, 混匀后各样品分别涂布在不同固体培养平板上, 制成双层平板。室温静置 30 min, 待双层平板凝固后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱过夜倒置培养。

8) 第二天可以在双层平板中看到噬菌体 IP1_SPT7 形成的噬菌斑。统计各稀释梯度下噬菌斑的数量, 计算噬菌体滴度。

实施例 4 IP2_SPT7F、IP3_SPF、IP4_SPFs、IP5_SPB、IP6_SPT7Fs 噬菌体的制备、扩增与滴度测定

1) 将 CCP2-174T7IIV 转化 FM15 菌得到的宿主菌 host9。

2) 噬菌体 IP2_SPT7F 与 IP6_SPT7Fs 的制备、扩增与滴度测定与 IP1_SPT7 相同。将拼接好的 IP2_SPT7F 与 IP6_SPT7Fs 噬菌体基因组 DNA 按实施例 1、实施例 2 和实施例 3 进行操作即可。

3) 噬菌体 IP3_SPF、IP4_SPFs、IP5_SPB 的制备、扩增与滴度测定与 IP1_SPT7 相同。但需要将实施例 1、实施例 2 和实施例 3 中的宿主菌改成 host9。将拼接好的噬菌体 IP3_SPF、IP4_SPFs、IP5_SPB 基因组 DNA 按更换为 host9 后的实施例 1、实施例 2 和实施例 3 进行操作即可。

实施例 5 实现方案 S1 噬菌体 IP1_SPT7 诱导 EP1_pspGFP 质粒中 sfGFP 基因表达效果的检测

1) 将携带诱导表达质粒 EP1_pspGFP 与辅助质粒 CCP1-174T7 的宿主菌 host1 单克隆在含 1% (w/v) CAA 和 0.4% (w/v) 葡萄糖的 M9 液体培养基中过夜培养。培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 rpm。培养基抗性为 15 $\mu\text{g/mL}$ 四环素、50 $\mu\text{g/mL}$ 羧苄青霉素和 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素。

2) 将过夜培养的宿主菌 host1 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的相同培养基中稀释 100 倍, 相同条件继续活化培养至对数期 $\text{OD}_{600}=0.1\sim0.2$ 。(使用 1 cm 比色皿检测)

3) 将对数期宿主菌 host1 继续用 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的相同培养基稀释 20 倍, 相同条件继续活化培养至对数期 $\text{OD}_{600}=0.1\sim0.2$ 。用相同培养基将培养物调整至 $\text{OD}_{600}=0.1$ 。(使用 1 cm 比色皿检测)

4) 用相同的 M9 培养基将噬菌体 IP1_SPT7 稀释至 10^9 PFU/mL。将 100 μL 活化好的 host1 宿主菌和 100 μL 稀释噬菌体 IP1_SPT7 混匀, 加入带盖的 96 孔黑色底透培养板中。对照组加入 100 μL 活化好的 host1 宿主菌和 100 μL 相同的 M9 培养基的混合物。空白组加入 200 μL 相同的 M9 培养基。每组做 3 个重复。

5) 将 96 孔培养板转移到样品台已经预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 Bio-Tek Synergy H1 多功能酶标仪中, 边进行震荡培养, 边进行荧光和光密度值检测。

6) 以 807 cpm 的速度, 进行 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的, 双轨道连续震荡培养。平板每震荡 5 min 检测一次荧光与光密度值, 持续 3~4 h。

荧光为激发光 485 nm, 发射光 515 nm, 增益 75 条件下的相对荧光值 RFU。

光密度值为样品在 600 nm 波长下的光密度值 OD_{600} 。

以上相对荧光值 RFU 和光密度值 OD_{600} 均在 96 孔培养板上测得。由于测量设备的差异, 这些值和利用 1 cm 比色皿获得的测量值之间会存在差异。结果如图 6, 7 所示。

实施例 6 实现方案 S2、S3、S4、S5、S6 和 S7 噬菌体诱导 EP 质粒中 sfGFP 基因表达效果的检测

1) 实现方案 S2、S3、S4、S5、S6 和 S7 中的噬菌体诱导 EP 质粒中 sfGFP 基因表达效果

的检测与实现方案 S1 相同。将“实施例 5”中宿主菌 host1 和噬菌体 host1 更换成各实现方案所述的噬菌体和对应的宿主菌后，既可以按照“实施例 5”所述方法进行检测，噬菌体和宿主菌的选择见下表 1。

检测结果如图 6, 7 所示, S1 方案没有诱导效果。S2 方案在获得较强诱导效果时, 系统的本底表达也很高, 系统变的不严谨。改进方案 S3, S4 在维持较低本底表达时, 具有较强的特异性诱导表达效果, 整体更加严谨可靠。通过方案 S1-S4 的结果对比可知, 只要能够实现足够多的调控因子作用于目标基因的启动子, 且调控因子和目标基因具有特异性, 则可以实现以噬菌体感染为诱发条件的, 对感染噬菌体的宿主细胞中目标基因的特异性调控。方案 S3 和 S4 证实了噬菌体缺失的基因只要能够在宿主细胞中表达, 即可完成噬菌体的感染复制和组装, 换言之, 噬菌体是完整噬菌体还是基因缺陷型噬菌体均不会对噬菌体感染引发调控基因表达调控因子, 并作用于启动子产生影响。

使用异源 σ 因子作为调控基因的方案 S5、S6、S7 具有比 S1、S2、S3 更强的特异性诱导表达效果。并且方案 S5、S6、S7 在获得更强诱导表达效果时, 能够维持和方案 S3 与 S4 一样的低本底, 整体更加稳定可靠。S5、S6、S7 的方案证明了, 只要实现本发明的方案中, 只要调控因子和启动子具有特异性, 且噬菌体的感染可以引发调控因子的表达即可实现本发明的效果, 而不局限于噬菌体内源性基因。现有技术中具有上述功能的调控因子和启动子对都可以用于本发明技术方案中。

2) 以上各实现方案所述的噬菌体和对应的宿主菌如下表 1 所示:

表 1 实现方案与噬菌体、宿主菌列表

实现方案	噬菌体	宿主菌	宿主菌携带的诱导表达质粒	宿主菌携带的辅助质粒
S1	IP1_SPT7	host1	EP1_pspsfGFP	CCP1-174T7
S2	IP1_SPT7	host2	EP2_pspAEsfGFP	CCP1-174T7
S3	IP2_SPT7F	host3	EP1_pspsfGFP	CCP1-174T7
S4	IP3_SPF	host4	EP1_pspsfGFP	CCP2-174T7IIV
S5	IP4_SPFs	host5	EP3_pF1sfGFP	CCP2-174T7IIV
S6	IP5_SPB	host6	EP4_pB1sfGFP	CCP2-174T7IIV
S7	IP6_SPT7Fs	host7	EP3_pF1sfGFP	CCP1-174T7

其中上表 1 中的各缩写为:

IP1_SPT7 代表: M13 噬菌体上的基因 gIII(gene III 表达次要衣壳蛋白 pIII) 替换成 T7RNAP 基因 (表达 T7 聚合酶 T7RNAP) 所得的噬菌体。

IP2_SPT7F 代表: 在噬菌体 IP1_SPT7 基因组上插入调控基因 pspF 基因所得的噬菌体。

IP3_SPF 代表: 在噬菌体 IP1_SPT7 基因组上敲除 gII、gV 和 gX 基因, 并插入调控基因 pspF 基因所得的噬菌体。

IP4_SPFs 代表: 将噬菌体 IP3_SPF 基因组上携带的 pspF 基因替换为芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 菌株 σ 因子的 σ F 基因所得的噬菌体。

IP5_SPB 代表: 将噬菌体 IP4_SPFs 基因组上携带的芽孢杆菌的 *B. subtilis* 168 的 σ 因子 σ F(SEQ ID NO:14) 基因替换为 σ B 基因所得的噬菌体。

IP6_SPT7Fs 代表: 将 IP2_SPT7F 噬菌体携带的 pspF 基因替换为芽孢杆菌的 *B. subtilis* 168 的 σ 因子 σ F 基因所得的噬菌体。

EP1_pspsfGFP 代表: 包含 psp 启动子和绿色荧光蛋白基因 sfGFP 的诱导表达质粒, 且 psp 启动子控制绿色荧光蛋白基因 sfGFP 的表达。

EP2_pspAEsfGFP 代表: 包含 psp 启动子、pspABCDE 基因和绿色荧光蛋白基因 sfGFP 的诱导表达质粒, 且 psp 启动子和 pspABCDE 基因一同控制绿色荧光蛋白基因 sfGFP 的表达。

EP3_pF1sfGFP 代表: 包含 σ F 特异识别的启动子 pF1 和绿色荧光蛋白基因 sfGFP 的诱导表达质粒, 且 σ F 特异识别的启动子 pF1 控制绿色荧光蛋白基因 sfGFP 的表达。

EP4_pB1sfGFP 代表：包含 σF 特异识别的启动子 pB1 和绿色荧光蛋白基因 sfGFP 的诱导表达质粒，且 σF 特异识别的启动子 pB1 控制绿色荧光蛋白基因 sfGFP 的表达。

CCP1-174T7 代表：包含基因 gIII 的辅助质粒。

CCP2-174T7IIV 代表：包含基因 gIII、gII、gV 和 gX 的辅助质粒。

host1 代表：携带诱导表达质粒 EP1_pspsfGFP 与辅助质粒 CCP1-174T7，且包含 F 质粒的大肠杆菌。

host2 代表：携带诱导表达质粒 EP2_pspAEsfGFP 与辅助质粒 CCP1-174T7，且包含 F 质粒的大肠杆菌。

host3 代表：携带诱导表达质粒 EP1_pspsfGFP 与辅助质粒 CCP1-174T7，包含 F 质粒且敲除宿主中 psp 操纵子的大肠杆菌。

host4 代表：携带诱导表达质粒 EP1_pspsfGFP 与辅助质粒 CCP2-174T7IIV，包含 F 质粒且敲除宿主中 psp 操纵子的大肠杆菌。

host5 代表：携带诱导表达质粒 EP3_pF1sfGFP 与辅助质粒 CCP2-174T7IIV，且包含 F 质粒的大肠杆菌。

host6 代表：携带诱导表达质粒 EP4_pB1sfGFP 与辅助质粒 CCP2-174T7IIV，且包含 F 质粒的大肠杆菌。

host7 代表：携带诱导表达质粒 EP3_pF1sfGFP 与辅助质粒 CCP1-174T7，且包含 F 质粒的大肠杆菌。

以上表述仅用于说明各缩写所代表的噬菌体宿主菌等的组成，而并不用来限定制备方法，例如 IP4_SPFs 噬菌体，其代表 M13 噬菌体上的基因 gIII 替换成 T7RNAP 基因，插入了调控基因芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 菌株 σ 因子的 σF 基因，且敲除 gII、gV 和 gX 基因的噬菌体。而并不限定其制备方法一定采用将 IP3_SPF 基因组上携带的 pspF 基因替换为芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 菌株 σ 因子的 σF 基因的方法制备得到的噬菌体。

以上内容是结合具体的实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。

1、一种噬菌体感染相关的基因诱导表达系统，所述基因诱导表达系统包括宿主菌和噬菌体，其特征在于，

其中，所述宿主菌中包含目标基因，所述噬菌体中包含调控基因；

所述的调控基因为能够在噬菌体感染宿主菌后表达调控因子的基因，所述的调控基因表达获得的调控因子能够特异性调控地目标基因的启动子，或者能够特异性地调控目标基因的表达，或者能够特异性地调控目标基因的表达产物的修饰；

优选地，所述的宿主菌选自能够被噬菌体感染的宿主菌；

更优选地，所述的宿主菌选自大肠杆菌、志贺氏菌、巴斯德菌属的细菌；噬菌体选自丝状噬菌体、有尾噬菌体。

2、根据权利要求 1 所述的基因诱导表达系统，其特征在于，所述调控因子为能够特异性地激活或抑制目标基因的启动子的启动，所述的调控因子不参与启动子下游基因的转录；

优选地，所述的调控因子是一种蛋白、多肽或 RNA；

优选地，所述的调控因子为宿主菌内源性基因表达产物，或者为宿主菌外源性基因表达产物。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的基因诱导表达系统，其特征在于，所述调控因子为直接激活目标基因的启动子的调控因子，所述调控因子直接作用于目标基因的启动子；

优选地，所述调控因子为 σ 因子的 σF 蛋白，调控基因为 σ 因子的 σF 基因，且目标基因的启动子采用 pF1 启动子；

优选地，所述调控因子为 σ 因子的 σB 蛋白，调控基因为 σ 因子的 σB 基因，且目标基因的启动子采用 pB1 启动子。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的基因诱导表达系统，其特征在于，所述调控因子为间接激活目标基因的启动子的调控因子；

优选地，所述调控因子为 pspF 蛋白，调控基因为 pspF 基因，且目标基因的启动子采用 psp 启动子。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的基因诱导表达系统，其特征在于，所述调控因子为通过抑制能够抑制启动子启动的物质，进而实现启动子的激活，

优选地，所述调控因子为 pIV 蛋白，调控基因为 gIV 基因，且目标基因的启动子采用包含上游的基因 pspF 和下游的基因 pspABCDE 的 psp 启动子。

6、据权利要求 1 或 2 所述的基因诱导表达系统，其特征在于，所述宿主菌中不包含与目标基因的启动子竞争调控因子的基因或蛋白。

7、一种噬菌体感染相关的基因诱导表达方法，其包括采用权利要求 1-6 任一项所述的基因诱导表达系统，将噬菌体加入宿主菌中进行感染和增殖。

8、一种检测噬菌体感染的方法，其包括以下步骤：

1) 采用权利要求 1-6 任一项所述的基因诱导表达系统，将噬菌体加入宿主菌中进行感染和增殖，

2) 检测目标基因表达水平。

9、权利要求 1-6 任一项所述的基因诱导表达系统的制备方法，其包括如下步骤：

i) 制备宿主菌；

ii) 制备噬菌体；

优选地，步骤 i) 为将目标基因和启动目标基因的启动子克隆到宿主菌内；或者步骤 i) 为将目标基因和启动目标基因的启动子克隆到诱导表达质粒上，并将诱导表达质粒转入宿主菌内；

更优选地，步骤 i) 中还包括将宿主菌染色体上的竞争性抑制调控因子的基因敲除的步骤；

更优选地，所述噬菌体为基因缺陷型噬菌体时，步骤 i) 中还包括将辅助质粒转入宿主细胞的步骤，所述的辅助质粒为包含因基因缺陷型噬菌体中缺失的基因的质粒；

优选地，步骤 ii) 为将调控基因克隆到噬菌体内。

10、权利要求 1-6 任一项所述的基因诱导表达系统的用途，所述用途为噬菌体感染相关的基因诱导表达系统用于检测噬菌体感染宿主菌的时间或用于特异性识别已经被噬菌体感染的宿主菌；

或者所述用途为提供在目标细胞中表达目标 RNA 或蛋白的用途，所述的目标细胞为被所述噬菌体感染的细胞，所述的目标蛋白为宿主菌中的目标基因表达的 RNA 或蛋白。

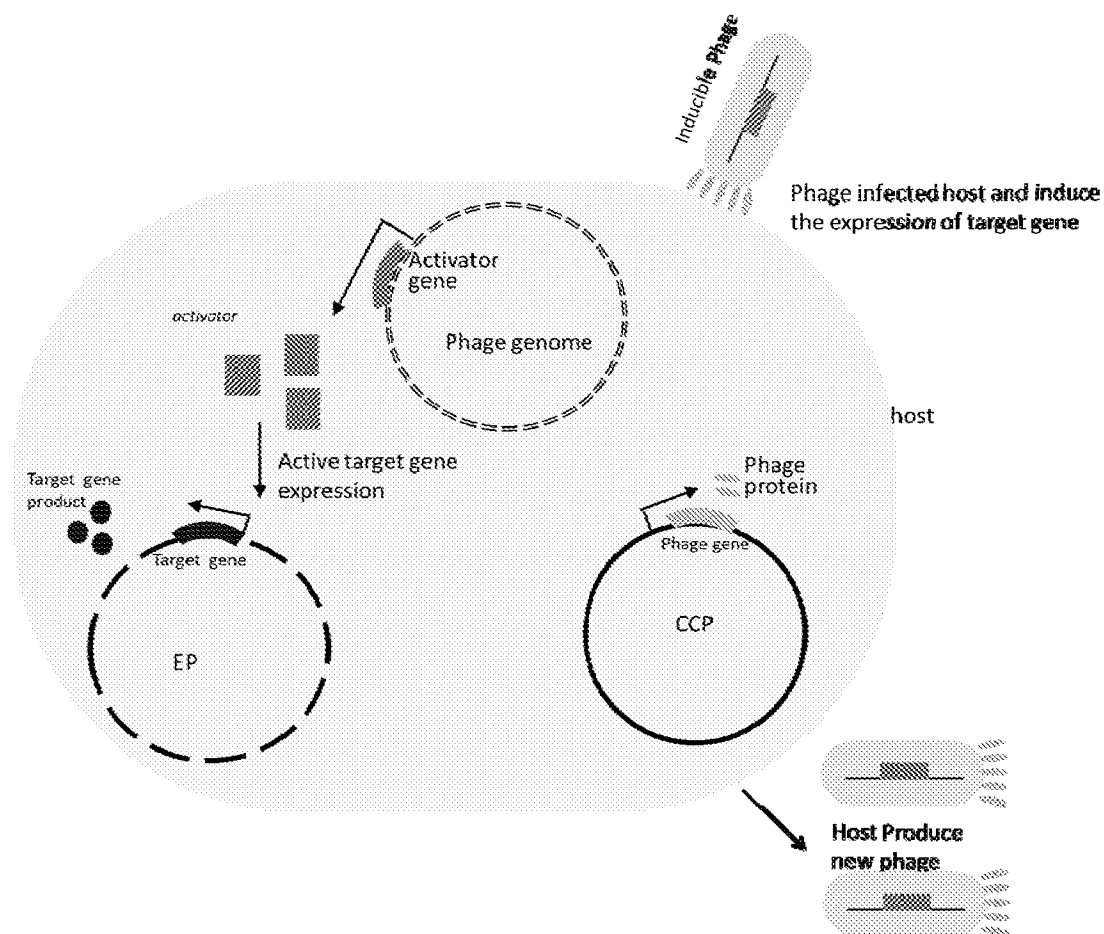


图 1

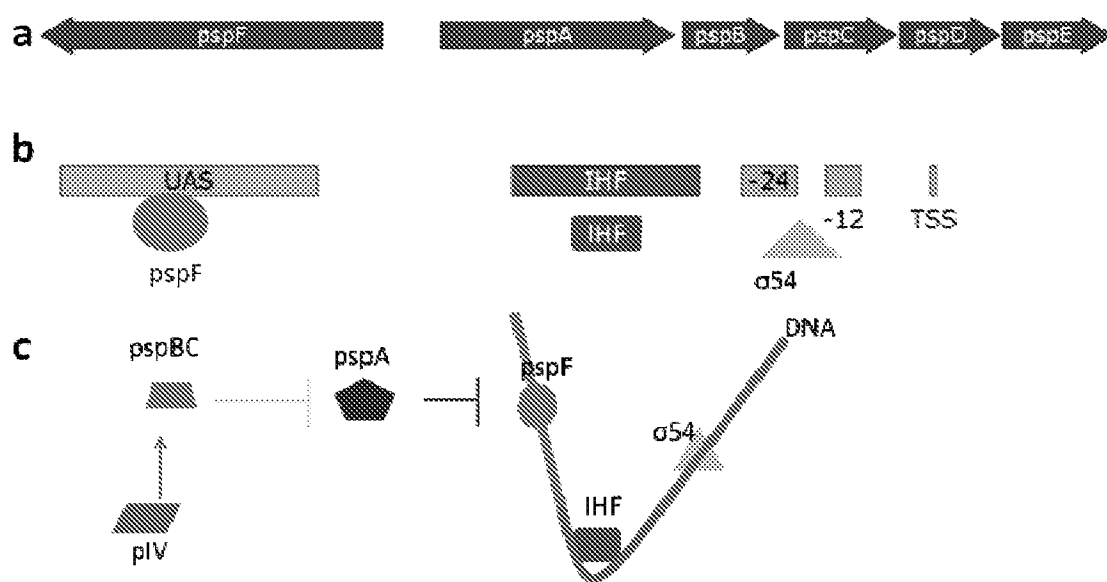


图 2

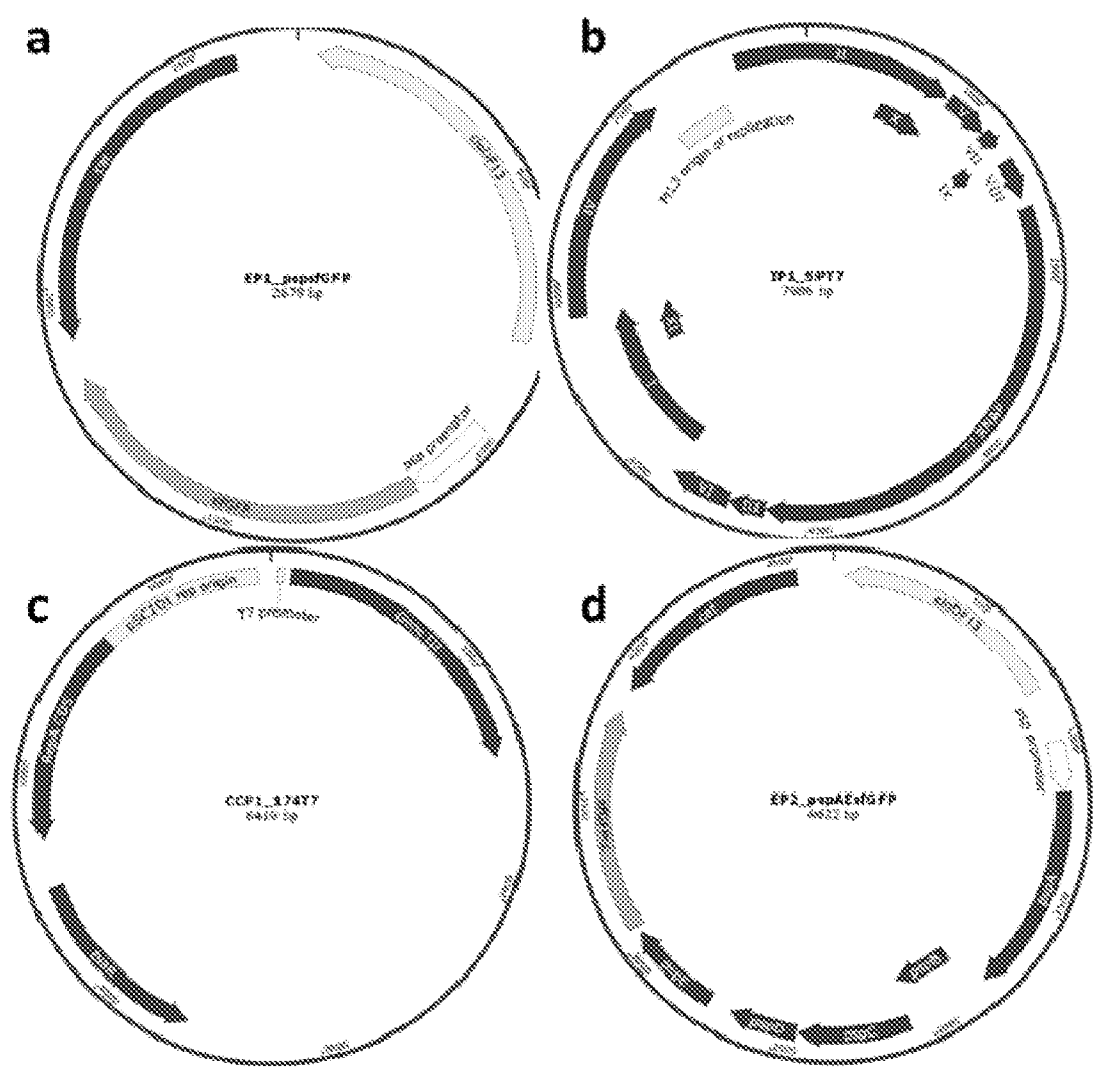


图 3

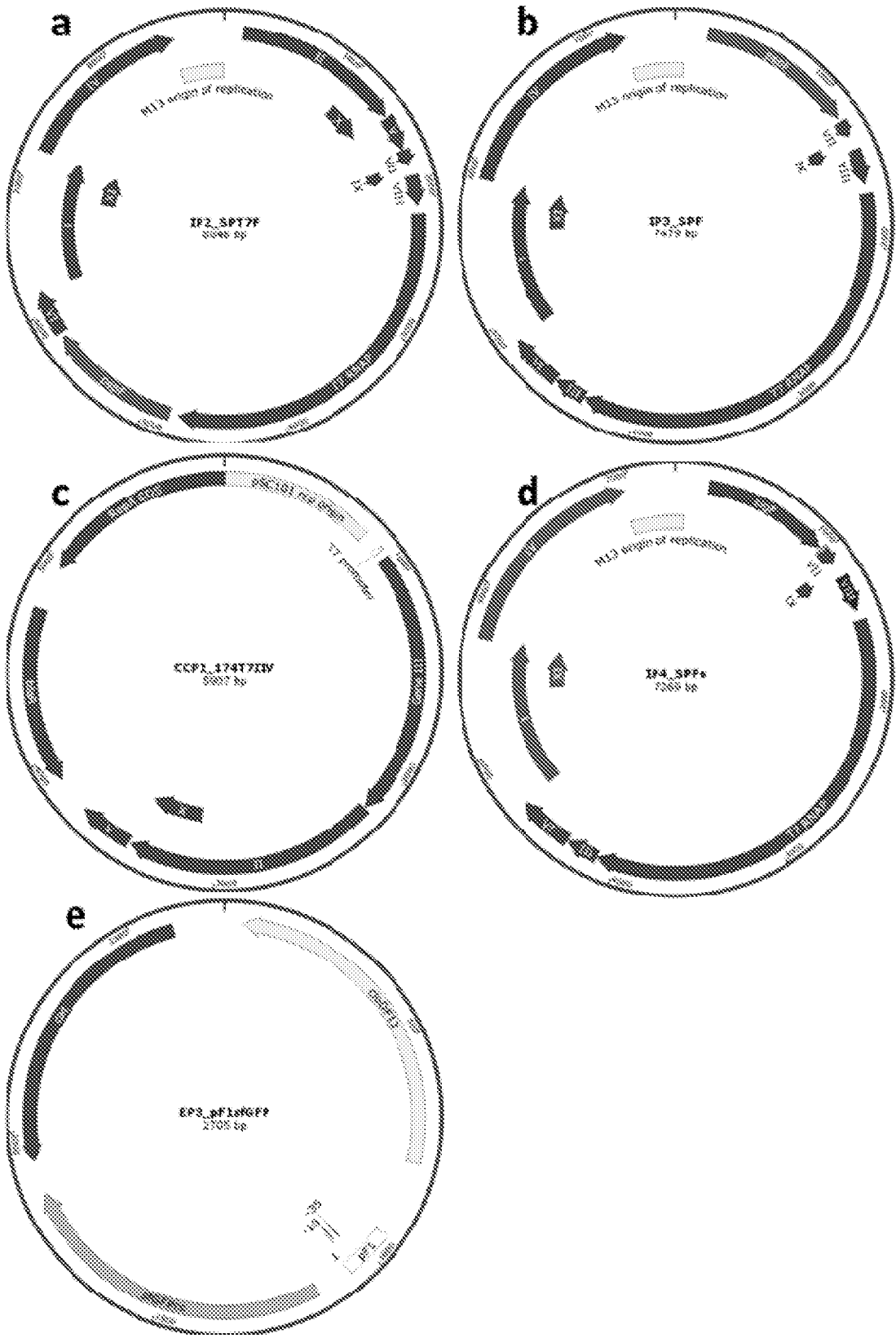


图 4

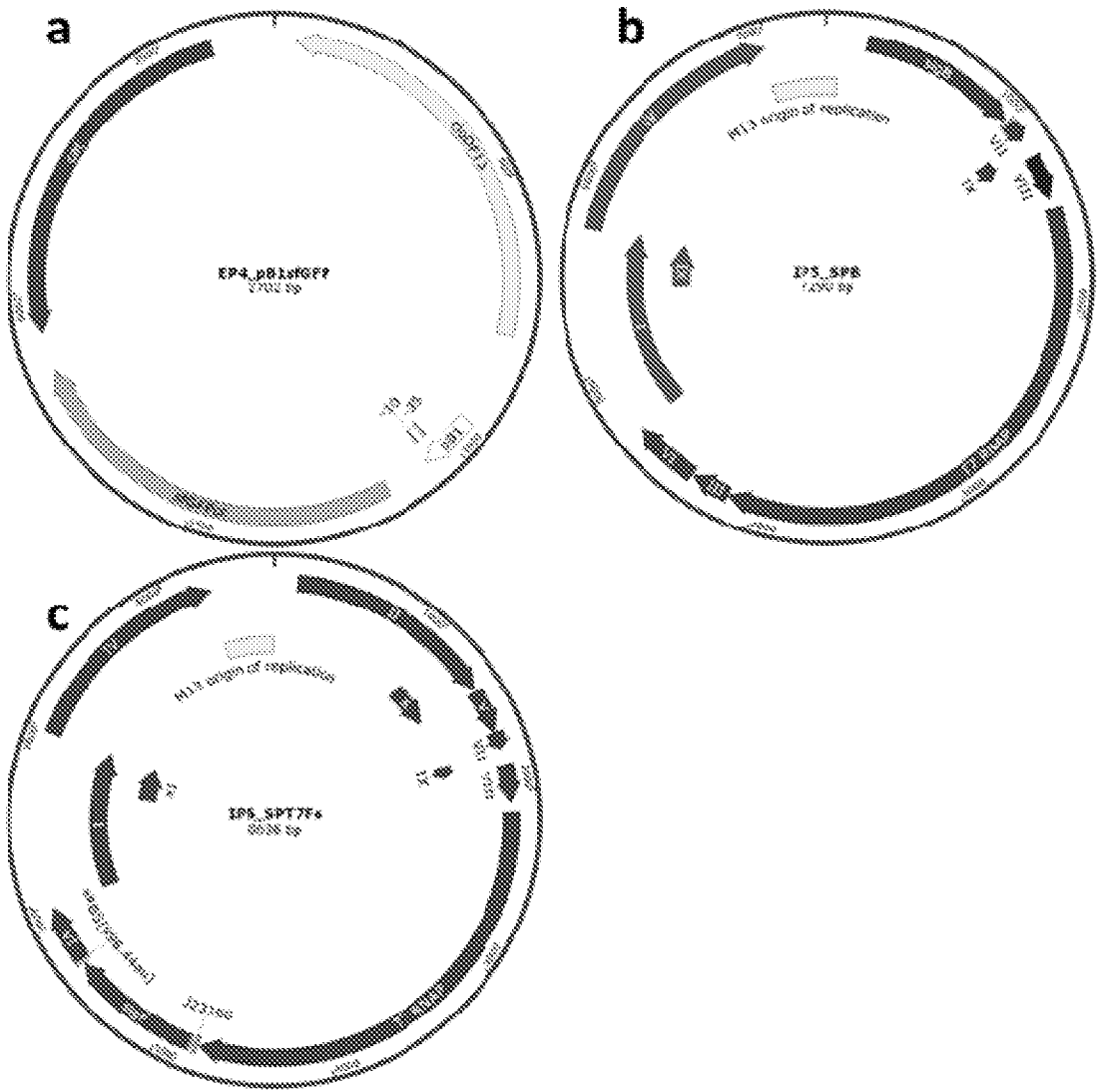


图 5

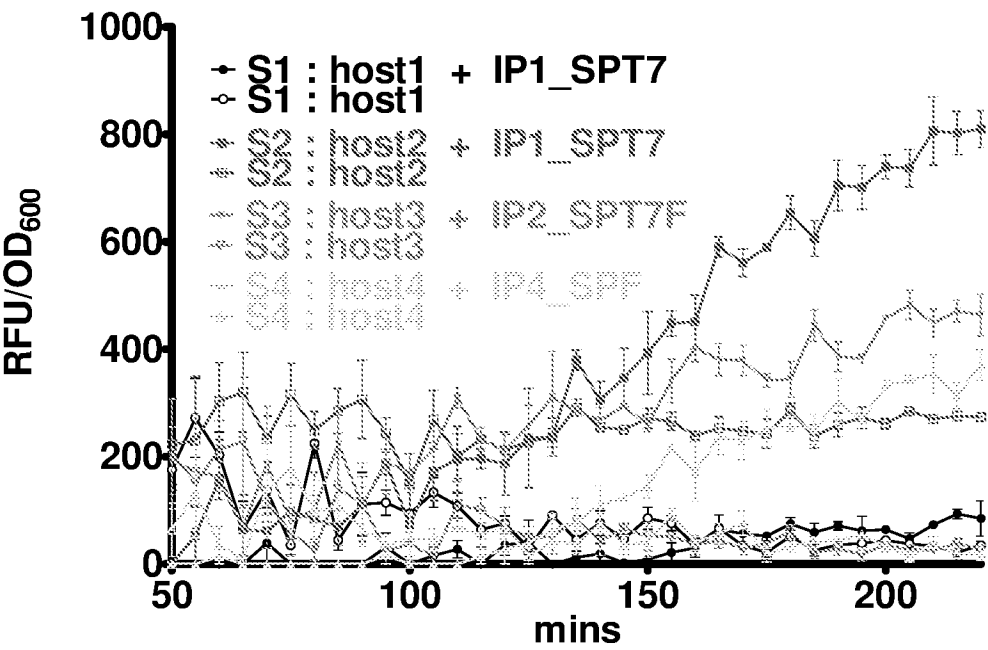


图 6

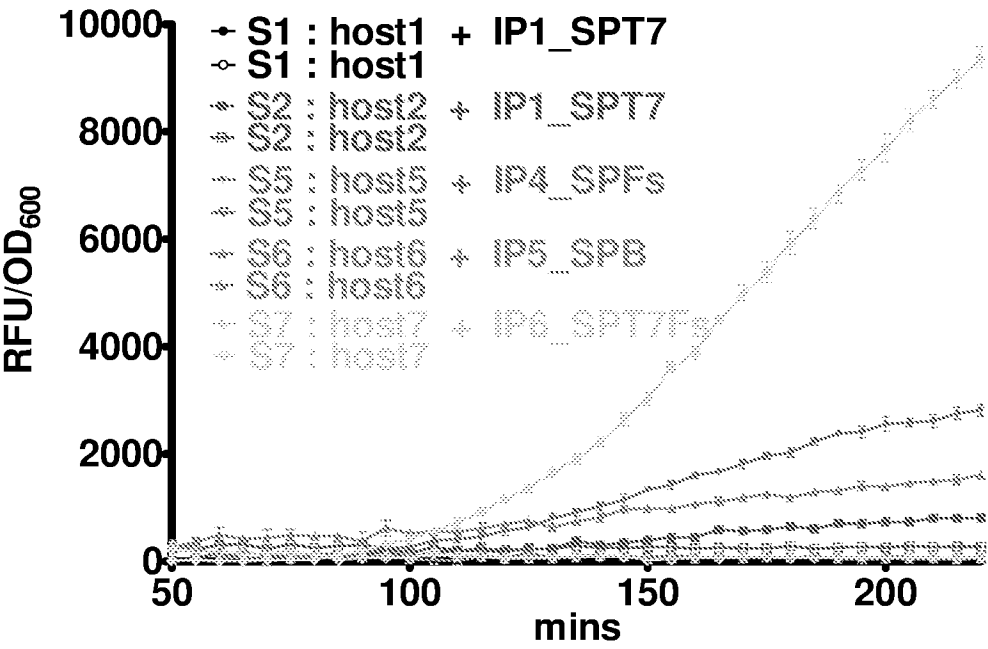


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/137060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/70(2006.01)i; C12N 15/73(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DATABASE: CNABS, VEN (DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT; CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science search terms: tracked search for inventors, 噬菌体, phage, 宿主, host, 表达系统, Expression system, 启动子, Promoter, 调控, Regulatory, oF, oB, pspF, pFl, pB1, psp

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	陈长征 等 (CHEN, Changzheng et al.). "利用重组噬菌体诱导表达的大肠杆菌表达系统 (A T7-promoter Based Escherichia coli Expression System Induced with Bacteriophage M13HEP)" <i>生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)</i> , Vol. 12, No. 4, 31 December 1996 (1996-12-31), abstract, page 380 section 1.7, page 382 paragraph 2	1-10
A	WO 2016012607 A1 (DELPHI GENETICS) 28 January 2016 (2016-01-28) claims 1-15, DWPI abstract	1-10
A	WO 2016168631 A1 (HARVARD COLLEGE) 20 October 2016 (2016-10-20) entire document	1-10
A	US 10174293 B1 (CHARLES STARK DRAPER LABORATORY INC et al.) 08 January 2019 (2019-01-08) entire document	1-10
A	Andrey VM. "Tightly regulated, high-level expression from controlled copy number vectors" <i>Gene</i> , Vol. 395, No. 1-2, 15 June 2007 (2007-06-15), entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June 2021

Date of mailing of the international search report

22 July 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/137060

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/137060

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016012607	A1	28 January 2016	JP	2020202828	A	24 December 2020
				CA	2956107	A1	28 January 2016
				AU	2015293825	B2	13 June 2019
				EP	3172334	A1	31 May 2017
				US	2017211118	A1	27 July 2017
				US	10718001	B2	21 July 2020
				CN	106715681	A	24 May 2017
				BR	112017001463	A2	20 February 2018
				CL	2017000200	A1	14 July 2017
				JP	2017523780	A	24 August 2017
				AU	2015293825	A1	16 February 2017
US	10174293	B1	08 January 2019	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/137060

A. 主题的分类

C12N 15/70(2006.01)i; C12N 15/73(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CNABS, VEN (DWPI+SIP0ABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT; CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science 检索词: 对发明人的追踪检索, 噬菌体, phage, 宿主, host, 表达系统, Expression system, 启动子, Promoter, 调控, Regulatory, σ F, σ B, pspF, pF1, pB1, psp

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	陈长征 等. "利用重组噬菌体诱导表达的大肠杆菌表达系统" 生物工程学报, 第12卷, 第4期, 1996年 12月 31日 (1996 - 12 - 31), 摘要, 第380页1.7节, 第382页第2段	1-10
A	WO 2016012607 A1 (DELPHI GENETICS) 2016年 1月 28日 (2016 - 01 - 28) 权利要求1-15, DWPI摘要	1-10
A	WO 2016168631 A1 (HARVARD COLLEGE) 2016年 10月 20日 (2016 - 10 - 20) 全文	1-10
A	US 10174293 B1 (CHARLES STARK DRAPER LABORATORY INC等) 2019年 1月 8日 (2019 - 01 - 08) 全文	1-10
A	Andrey VM. "Tightly regulated, high-level expression from controlled copy number vectors" Gene, 第395卷, 第1-2期, 2007年 6月 15日 (2007 - 06 - 15), 全文	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2021年 6月 24日

国际检索报告邮寄日期

2021年 7月 22日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

董桂灵

电话号码 010-62411081

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/137060

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2016012607	A1	2016年 1月 28日	JP	2020202828	A	2020年 12月 24日
				CA	2956107	A1	2016年 1月 28日
				AU	2015293825	B2	2019年 6月 13日
				EP	3172334	A1	2017年 5月 31日
				US	2017211118	A1	2017年 7月 27日
				US	10718001	B2	2020年 7月 21日
				CN	106715681	A	2017年 5月 24日
				BR	112017001463	A2	2018年 2月 20日
				CL	2017000200	A1	2017年 7月 14日
				JP	2017523780	A	2017年 8月 24日
				AU	2015293825	A1	2017年 2月 16日
US	10174293	B1	2019年 1月 8日	无			