(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
2023 年 2 月 16 日 (16.02.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/015441 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/21 (2006.01) *A61K 35/74* (2015.01)
C12N 15/09 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/111757

(22) 国际申请日: 2021 年 8 月 10 日 (10.08.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(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: 付生伟(**FU, Shengwei**); 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)。 张荣荣 (**ZHANG, Rongrong**); 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)。 金帆 (**JIN, Fan**); 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号楼2单元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,

(54) **Title:** LIGHT-CONTROLLED LYSIS ENGINEERING BACTERIUM, AND CONSTRUCTION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种光控裂解工程菌及其构建方法和应用

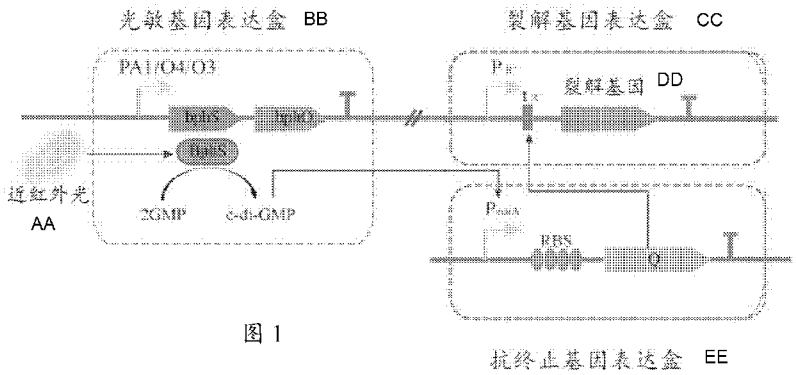


图 1

AA Near-infrared light
BB Photosensitive gene expression cassette
CC Lysis gene expression cassette
DD Lysis gene
EE Anti-termination gene expression cassette

(57) **Abstract:** Provided are a light-controlled lysis engineering bacterium, and a construction method therefor and the use thereof. The light-controlled lysis engineering bacterium can respectively express a photosensitive protein, an anti-termination protein and a lysis protein by means of constructing a photosensitive gene expression cassette, an anti-termination gene expression cassette and a lysis gene expression cassette; a messenger molecule is synthesized by means of the photosensitive protein under the control of near-infrared light and induces the expression of the anti-termination protein, and the anti-termination protein induces the expression of the lysis protein; and when the light intensity of the photosensitive protein is regulated to be greater than a lysis threshold, the expression amount of the lysis protein causes the engineering bacterium to lyse, thereby releasing substances inside the bacterium. Under the stimulation of an external near-infrared light source, the light-controlled lysis engineering bacterium can grow normally when the light intensity is lower than a lysis threshold, and is lysed when the light intensity reaches the lysis threshold, so that the controllable lysis of the engineering bacterium is achieved and no toxic side effects are present.

WO 2023/015441 A1

[见续页]

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, 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))。

(57) 摘要：提供了一种光控裂解工程菌及其构建方法和应用，该光控裂解工程菌通过构建光敏基因表达盒、抗终止基因表达盒和裂解基因表达盒，可分别表达得到光敏蛋白、抗终止蛋白和裂解蛋白，通过光敏蛋白在近红外光调控下合成信使分子，信使分子诱导抗终止蛋白表达，抗终止蛋白诱导裂解蛋白表达，当调控所述光敏蛋白的光强大于裂解阈值时，所述裂解蛋白的表达量使所述工程菌裂解，从而释放菌内物质。该光控裂解工程菌在外界近红外光光源的刺激下，当光强低于裂解阈值时，细菌可以正常生长；当光强达到裂解阈值时，细菌裂解，实现了工程菌的可控裂解，并且无毒副作用。

一种光控裂解工程菌及其构建方法和应用

技术领域

本发明涉及生物医药技术领域，特别涉及一种光控裂解工程菌及其构建方法和应用。

背景技术

现有的癌症疗法存在对系统的高毒性、对肿瘤的低靶向性以及对肿瘤组织内部的低渗透性问题，高风险以及低收益的治疗手段使得发展新的肿瘤治疗技术迫在眉睫。工程化细菌由于自身特殊的性质可以完美解决这些问题，它可以靶向肿瘤组织的所有区域，在其中定植，并且可以作为携带治疗药物的载体。为了避免传统药物造成的系统性毒性，如何严格控制细菌在到达肿瘤组织时释放药物是一个需要解决的问题。

有研究报道通过对细菌加以改造后，施加2戈瑞电离辐射强度的刺激，细菌的基因组会被破坏而激活SOS响应，recA启动子开启表达合成可分泌的治疗药物，对肿瘤进行治疗。SOS系统的开启虽然可以让recA启动子表达，但是由于自身基因组遭到破坏，细菌是否继续维持其功能性值得商榷。还有工作在沙门氏菌内构建了一个由tet启动子控制的λ噬菌体裂解基因表达系统，在外源加入四环素或者四环素类似物之后，细菌可以被诱导裂解从而释放治疗药物。类似的工作还有采用阿拉伯糖诱导启动子表达来自另一噬菌体iEPS5的裂解基因使沙门氏菌裂解释放治疗药物，或者用乙酰水杨酸诱导。

现有的技术主要依赖于外界化学小分子或者肿瘤内部微环境刺激细菌产生治疗药物，进入体内后外界无法对其行为进行控制，且化学小分子的诱导是一种不可逆过程，一旦发生就无法停止。并且化学小分子诱导物可能存在毒副作用以及被代谢系统降解，例如沙门氏菌的代谢系统可以将阿拉伯糖转化为木酮糖，低浓度的阿拉伯糖无法诱导相应启动子的表达。另一种基于recA修复系统的触发方式由于会对工程菌基因组产生破坏，系统本身的鲁棒性会受到难以估量的影响，且辐射源不易获得，因此也不是理想的诱导方式。

发明内容

本发明的主要目的是提供一种光控裂解工程菌，旨在解决现有技术诱导工程菌裂解释放药物不可控且有毒副作用的问题。

为实现上述目的，本发明第一方面提出一种光控裂解工程菌，包括：

光敏基因表达盒，表达得到光敏蛋白，所述光敏蛋白受光调控合成信使分子；

抗终止基因表达盒，所述抗终止基因表达盒的启动子受所述信使分子调控，表达得到抗终止蛋白；

裂解基因表达盒，所述裂解基因表达盒的启动子受所述抗终止蛋白调控，表达得到裂解蛋白，用于裂解所述工程菌；其中，

当调控所述光敏蛋白的光强达到裂解阈值时，所述裂解蛋白的表达量使所述工程菌裂解。

可选地，所述光敏基因表达盒和所述裂解基因表达盒整合到所述工程菌的基因组中，所述抗终止基因表达盒存在于外源质粒中。

可选地，所述工程菌还包括：

药物基因表达盒，表达得到药物蛋白，当所述工程菌裂解后，所述药物蛋白从所述工程菌释放。

可选地，所述药物基因表达盒与所述抗终止基因表达盒存在于同一个外源质粒中。

可选地，所述光敏基因包括 BphS、IlaC*、IlaD9、IlaM4 和 IlaM5 中的任一种；

所述信使分子包括 c-di-GMP 或 cAMP；

所述抗终止基因表达盒的启动子包括受 c-di-GMP 调控的 cdrA 启动子、pel 启动子或 psl 启动子，或者受 cAMP 调控的 lac 启动子；

所述抗终止基因包括 λ 噬菌体的 Q 蛋白；

所述裂解基因包括 LKD16。

本发明第二方面提出一种光控裂解工程菌的构建方法，包括质粒构建和质粒转化，所述质粒构建包括：

光敏基因表达载体的构建，所述光敏基因表达得到光敏蛋白，所述光敏蛋白受光调控合成信使分子；

抗终止基因表达载体的构建，所述抗终止基因表达载体的启动子受所述信使分子调控，表达得到抗终止蛋白；

裂解基因表达载体的构建，所述裂解基因表达载体的启动子受所述抗终止蛋白调控，表达得到裂解蛋白，用于裂解所述工程菌；

所述质粒转化包括：

将上述构建好的光敏基因表达载体、抗终止基因表达载体和裂解基因表达载体转化到出发菌中得到所述光控裂解工程菌。

可选地，所述光敏基因表达载体和所述裂解基因表达载体由自杀质粒构建得到，所述抗终止基因表达载体由复制质粒构建得到，所述光敏基因和所述裂解基因整合到所述工程菌的基因组中，所述抗终止基因以质粒形式存在。

可选地，所述质粒构建还包括：

药物基因表达载体的构建，所述药物基因表达得到药物蛋白；

所述质粒转化还包括：

将构建的药物基因表达载体转化到出发菌中得到所述光控裂解工程菌；其中，

当所述工程菌裂解后，所述药物蛋白从所述工程菌释放。

可选地，所述药物基因表达载体和所述抗终止基因表达载体构建到同一质粒上。

可选地，所述光敏基因包括 BphS、IlaC*、IlaD9、IlaM4 和 IlaM5 中的任一种；

所述信使分子包括 c-di-GMP 或 cAMP；

所述抗终止基因表达载体的启动子包括受 c-di-GMP 调控的 cdrA 启动子、pel 启动子或 psl 启动子，或者受 cAMP 调控的 lac 启动子；

所述抗终止基因包括 λ 噬菌体的 Q 蛋白；

所述裂解基因包括 LKD16。

本发明第三方面提出一种药物组合物，包括上述第一方面任一项所述的一种光控裂解工程菌。

本发明第四方面提出上述第一方面任一项所述的一种光控裂解工程菌在制备治疗肿瘤药物中的应用。

本发明第五方面提出一种肿瘤治疗系统，其特征在于，包括肿瘤治疗装置和肿瘤治疗药物；

所述肿瘤治疗药物包括上述第一方面任一项所述的一种光控裂解工程菌；

所述肿瘤治疗装置包括激光元件，所述激光元件可发射光源；其中，

所述肿瘤治疗系统在使用的时候，将所述肿瘤治疗药物注射到待治疗肿瘤部位，然后使用所述肿瘤治疗装置的光源照射所述肿瘤部位，

当所述光强达到裂解阈值时，所述光控裂解工程菌裂解释放菌内治疗物。

本发明第六方面提出如第一方面任一项所述的一种光控裂解工程菌在治疗疾病中的用途。

本发明技术方案在工程菌中构建光敏基因表达盒、抗终止基因表达盒和裂解基因表达盒，可分别表达得到光敏蛋白、抗终止蛋白和裂解蛋白，通过光敏蛋白在光调控下合成信使分子，信使分子诱导抗终止蛋白表达，抗终止蛋白诱导裂解蛋白表达，并且当调控光敏蛋白的光强达到裂解阈值时，所述裂解蛋白的表达量能够使所述光控裂解工程菌裂解，从而释放菌内物质。从而本发明技术方案得到的光控裂解工程菌在外界光源的刺激下，当光强低于裂解阈值时，细菌可以正常生长；当光强达到裂解阈值时，细菌裂解，实现了工程菌的可控裂解，并且无毒副作用。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面

描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图示出的结构获得其他的附图。

图1为本发明光控裂解工程菌一实施例的基因结构示意图；

图2为本发明光控裂解工程菌另一实施例的基因结构示意图；

图3为mini-CTX2质粒的图谱示意图；

图4为PUCP20质粒的图谱示意图；

图5为miniTn7质粒的图谱示意图；

图6为pEX18Gm质粒的图谱示意图；

图7为本发明光控裂解工程菌抗终止基因表达盒的RBS筛选部分结果图；

图8a为本发明光控裂解工程菌治疗小鼠肿瘤实验的肿瘤体积结果图；

图8b为本发明光控裂解工程菌治疗小鼠肿瘤实验的小鼠体重结果图；

图8c为本发明光控裂解工程菌治疗小鼠肿瘤实验的肿瘤重量结果图；

图9a至图9d为对照菌株治疗小鼠肿瘤实验的结果图；

图10为本发明光控裂解工程菌治疗小鼠肿瘤实验的组织切片染色结果图；

图11a为PBAD-B0034-Q-pJN105质粒和pR'-tR'-mScarlet-miniTn7质粒的结构示意图；

图11b为测试pR'-tR'启动子-终止子转录系统在PAO1菌种中的背景表达水平以及诱导表达水平的显微镜观察结果；

图11c为mScarlet荧光强度的定量结果；

图12a为本发明实施例标定RBS光响应强度的质粒结构示意图；

图12b为本发明实施例随机合成的RBS的相对强度标定结果图。

本发明目的的实现、功能特点及优点将结合实施例，参照附图做进一步说明。

具体实施方式

下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有

作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

本文所用的术语“基因表达盒”是指由启动子，靶基因，筛选基因和终止子组成，能在特定组织中表达并易于检测的一组DNA序列，该DNA序列可以存在于外源表达载体中，也可以整合到特定组织的基因组中。

术语“表达载体(Expression vectors)”是指在克隆载体基本骨架的基础上增加表达元件（如启动子、RBS、终止子等），使目的基因能够表达的载体。表达载体四部分：目的基因、启动子、终止子、标记基因。本发明包括但不限于原核细胞表达载体、真核细胞表达载体或其它细胞表达载体。

术语“质粒”是一种裸露的、结构简单、独立于细菌拟核DNA之外，并具有自我复制能力的很小的双链环状DNA分子，是常用的克隆载体，用于构建表达载体。

术语“自杀质粒”为R质粒的衍生质粒，常有宿主范围广的特点，具有接合转移基因。它的复制需要一种特殊的蛋白，大多数细菌不产生这种蛋白质，因此，当进入寄主细胞时，要么不能复制，被消除，要么被整合入染色体上，和染色体一起复制，利用自杀质粒的该特性可以将外源基因整合到细菌基因组中。

本发明第一方面提出一种光控裂解工程菌，请参阅图 1，包括：

光敏基因表达盒，表达得到光敏蛋白，所述光敏蛋白受光调控合成信使分子；

抗终止基因表达盒，所述抗终止基因表达盒的启动子受所述信使分子调控，表达得到抗终止蛋白；

裂解基因表达盒，所述裂解基因表达盒的启动子受所述抗终止蛋白调控，表达得到裂解蛋白，用于裂解所述工程菌；其中，

当调控所述光敏蛋白的光强达到裂解阈值时，所述裂解蛋白的表达量使所述工程菌裂解。

上述光敏基因表达盒、抗终止基因表达盒、裂解基因表达盒整合到细菌基因组，或者以外源质粒形式存在可以为任意组合。详细而言，例如可以为光敏基因表达盒整合到细菌基因组，抗终止基因表达盒和裂解基因表达盒以质粒形式存在；还可以为裂解基因表达盒整合到细菌基因组，光敏基因表达盒和抗终止基因表达盒以质粒形式存在。上述基因表达盒的形式不限于所举

例这些，其他实施例不再一一例举，可以理解的是，凡是通过基因工程构建的菌株包括上述光敏基因表达盒、抗终止基因表达盒以及裂解基因表达盒都属于本发明技术方案保护的范围。

具体的，光敏基因表达盒的启动子为组成型启动子，可以持续表达光敏蛋白，光敏蛋白在光照射下可以合成信使分子，信使分子的浓度一方面促进生物被膜的形成，另一方面促进抗终止蛋白的表达，促进细菌裂解。光强大小与合成的信使分子浓度成正相关，因此，光强大小也与抗终止蛋白的产生浓度成正相关。在一优选实施例中，所述光敏基因表达盒通过构建在自杀质粒中整合到细菌基因组中，提高光敏基因遗传稳定性。

具体的，抗终止基因表达盒的启动子为诱导型启动子，受信使分子的浓度调控表达得到抗终止蛋白，抗终止蛋白可以特异的阻止终止子的作用，使酶越过终止子继续转录。

具体的，裂解基因表达盒的启动子为启动子-终止子（PR'-tR'）系统，其中，抗终止蛋白不表达或表达浓度低时，裂解基因表达盒的 PR'-tR' 系统在终止子的作用下不转录，因而无法表达得到裂解蛋白，当抗终止蛋白的表达浓度足够多时，抗终止蛋白可以阻止 PR'-tR' 系统的终止子的作用，使得裂解基因正常转录表达得到裂解蛋白，从而对细菌进行裂解。

由此可见，抗终止蛋白的浓度与裂解蛋白的浓度成正相关，因而，调控光敏蛋白的光强大小与裂解蛋白的表达浓度成正相关。因此可以理解，调控光敏蛋白的光强的裂解阈值即为可以使得裂解蛋白的表达量使工程菌裂解的光强值。达到裂解阈值可以为与裂解阈值相同，也可以为超过裂解阈值。还应当说明的是，对于不同的工程菌，由于其性质不同，即使其采用本发明技术方案进行改造，其裂解阈值也有可能不同，因此，本发明技术方案对于具体的裂解阈值不做具体限定。

本发明技术方案在工程菌中构建光敏基因表达盒、抗终止基因表达盒和裂解基因表达盒，可分别表达得到光敏蛋白、抗终止蛋白和裂解蛋白，通过光敏蛋白在光调控下合成信使分子，信使分子诱导抗终止蛋白表达，抗终止蛋白诱导裂解蛋白表达，并且当调控光敏蛋白的光强达到裂解阈值时，所述裂解蛋白的表达量能够使所述光控裂解工程菌裂解，从而释放菌内物质。从而本发明技术方案得到的光控裂解工程菌在外界光源的刺激下，当光强低于

裂解阈值时，细菌可以正常生长；当光强达到裂解阈值时，细菌裂解，实现了工程菌的可控裂解，并且无毒副作用。

可选地，所述光敏基因表达盒和所述裂解基因表达盒整合到所述工程菌的基因组中，所述抗终止基因表达盒存在于外源质粒中。

可选地，请参阅图 2，所述工程菌还包括：

药物基因表达盒，表达得到药物蛋白，当所述工程菌裂解后，所述药物蛋白从所述工程菌释放。

可选地，所述药物基因表达盒与所述抗终止基因表达盒存在于同一个外源质粒中。

可选地，所述光敏基因包括 BphS、IlaC*、IlaD9、IlaM4 和 IlaM5 中的任一种；

所述信使分子包括 c-di-GMP 或 cAMP；

所述抗终止基因表达盒的启动子包括受 c-di-GMP 调控的 cdrA 启动子、pel 启动子或 psl 启动子，或者受 cAMP 调控的 lac 启动子；

所述抗终止基因包括 λ 噬菌体的 Q 蛋白；

所述裂解基因包括 LKD16。

具体的，BphS 受近红外光调控可合成信使分子 c-di-GMP；IlaC*、IlaD9、IlaM4 和 IlaM5 受近红外光调控可合成信使分子 cAMP。

在一实施例中，所述光敏基因为 BphS；所述信使分子为 c-di-GMP；所述抗终止基因表达盒的启动子为 cdrA 启动子。

本发明第二方面提出一种光控裂解工程菌的构建方法，包括质粒构建和质粒转化，所述质粒构建包括：

光敏基因表达载体的构建，所述光敏基因表达得到光敏蛋白，所述光敏蛋白受光调控合成信使分子；

抗终止基因表达载体的构建，所述抗终止基因表达载体的启动子受所述信使分子调控，表达得到抗终止蛋白；

裂解基因表达载体的构建，所述裂解基因表达载体的启动子受所述抗终止蛋白调控，表达得到裂解蛋白，用于裂解所述工程菌；

所述质粒转化包括：

将上述构建好的光敏基因表达载体、抗终止基因表达载体和裂解基因表达载体转化到出发菌中得到所述光控裂解工程菌。

具体的，所述出发菌例如可以为铜绿假单胞菌、大肠杆菌或沙门氏菌等。

可选地，所述光敏基因表达载体和所述裂解基因表达载体由自杀质粒构建得到，所述抗终止基因表达载体由复制质粒构建得到，所述光敏基因和所述裂解基因整合到所述工程菌的基因组中，所述抗终止基因以质粒形式存在。

可选地，所述质粒构建还包括：

药物基因表达载体的构建，所述药物基因表达得到药物蛋白；

所述质粒转化还包括：

将构建的药物基因表达载体转化到出发菌中得到所述光控裂解工程菌；其中，

当所述工程菌裂解后，所述药物蛋白从所述工程菌释放。

可选地，所述药物基因表达载体和所述抗终止基因表达载体构建到同一质粒上。

可选地，所述光敏基因包括 BphS、IlaC*、IlaD9、IlaM4 和 IlaM5 中的任一种；

所述信使分子包括 c-di-GMP 或 cAMP；

所述抗终止基因表达载体的启动子包括受 c-di-GMP 调控的 cdrA 启动子、pel 启动子或 psl 启动子，或者受 cAMP 调控的 lac 启动子；

所述抗终止基因包括 λ 噬菌体的 Q 蛋白；

所述裂解基因包括 LKD16。

具体的，BphS 受近红外光调控可合成信使分子 c-di-GMP；IlaC*、IlaD9、IlaM4 和 IlaM5 受近红外光调控可合成信使分子 cAMP。

在一实施例中，所述光敏基因为 BphS；所述信使分子为 c-di-GMP；所述抗终止基因表达盒的启动子为 cdrA 启动子。

本发明第三方面提出一种药物组合物，包括上述第一方面任一项所述的一种光控裂解工程菌。

本发明第四方面提出上述第一方面任一项所述的一种光控裂解工程菌在制备治疗肿瘤药物中的应用。

本发明第五方面提出一种肿瘤治疗系统，其特征在于，包括肿瘤治疗装置和肿瘤治疗药物；

所述肿瘤治疗药物包括上述第一方面任一项所述的一种光控裂解工程菌；

所述肿瘤治疗装置包括激光元件，所述激光元件可发射光源；其中，

所述肿瘤治疗系统在使用的时候，将所述肿瘤治疗药物注射到待治疗肿瘤部位，然后使用所述肿瘤治疗装置的光源照射所述肿瘤部位，

当所述光强达到裂解阈值时，所述光控裂解工程菌裂解释放菌内治疗物。

本发明第六方面提出如第一方面任一项所述的一种光控裂解工程菌在治疗疾病中的用途。

下面将结合具体实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下述实施例中所使用的引物序列如表 1 所示。

表 1 为所用引物序列表

pR'-LKD-ass-R：	ctgcaggaattcctcgagaagctttcagtctccttgattcagggcg
Tn7-pR'-ass-F：	ctgcaggaattcctcgagaagctttcagtctccttgattcagggcg
Tn7-ass-F：	aagcttctcgaggaattcctgcag
Tn7-ass-R：	ggtacctcgcgaaggccttg
BphS-CTX-F：	gataccgtcgacctcgaaccccacgcccctcga
BphS-CTX-R:	ggtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacg
PA1O4O3-F:	ctcactatagggcgaattgggtacctgccacctgacgtctaagaaaccat
BphS-R:	cggccgctctagaactagttccttcatacccgccgggc
Q-F：	tgagtaggacaaatccgccccccgggctaaactgatgcagcgtagttttcgtcgtttgc
PcdrA-R：	attaatgtgagttagctcacgaattctggaaggttccttggcggcagcgga
PUCP-Q-R：	gacgaaaactacgctgcatcagtttagcccgggggcggatttgtcctactcagga

PUCP-F：	aattcgtgagctaactcacattaattgcgttgcg
PUCP-R：	aagcttggcactggccgtcgttttacaacgtcgtg
PUCP-PcdrA-Q-F：	actagtgggttcgaggtcgacggtatcgataagctagctt
J23118-F：	taaaacgacggccagtgccaagcttttgacggctagctcagtcctaggta
HlyE-PUCP-R：	ataccgtcgacctcgaacccactagtttagacttcaggtacctcaaagagtgtcttttt

实施例 1 光控裂解工程菌的构建

1.1 质粒构建

1.1.1 光敏基因 BphS 表达载体的构建

本方案中以能够在肺部有效定植的铜绿假单胞菌 PAO1 作为出发菌，以此为基础构建光控裂解工程菌。

光敏基因 BphS（SEQ ID NO.1）编码得到光敏蛋白 BphS（SEQ ID NO.2），光敏蛋白 BphS 可以在近红外光调控下合成 c-di-GMP，光强大小与合成的 c-di-GMP 浓度成正相关，BphS 表达载体构建在自杀质粒 miniCTX2 中（质粒图谱见图 3 所示），以通过自杀质粒将 BphS 基因及其相关表达元件整合到细菌基因组中，相关表达元件包括组成型启动子 PA1/O4/O3（SEQ ID NO.3），光响应组件 BphO（SEQ ID NO.4），使得 BphS 蛋白可以持续表达。其中，从上海生工生物有限公司合成 PA1O4O3-BphS-BphO 基因片段，并利用引物对 PA1O4O3-F 和 BphS-R 对其进行聚合酶链式 PCR 反应，miniCTX2 质粒利用引物对 BphS-CTX-F 和 BphS-CTX-R 进行聚合酶链式 PCR 反应，以获得带有 25 个碱基同源臂的能持续性表达光响应组件 BphO 和 BphS 的基因片段以及线性化的载体质粒 miniCTX2，最后利用吉布森连接法（Gibson assembly）将 2 个基因片段连接，即构建得到 BphS 表达载体 PA1/O4/O3-BphS-CTX2。

1.1.2 抗终止基因 Q 表达载体的构建

其中抗终止基因 Q（SEQ ID NO.5）来自λ噬菌体基因组，通过 Gibson assembly 构建到载体质粒 PUCP20（质粒图谱见图 4 所示）中，PUCP20 质粒为可自主复制的外源质粒，通过该质粒构建抗终止基因 Q 表达载体，抗终止基因 Q 不会整合到细菌基因组中，而是以外源质粒形式存在，这样可以方便对抗终止基因 Q 的表达进行调整。

抗终止基因 Q 表达载体使用的启动子为响应 c-di-GMP 的 cdrA 启动子（SEQ ID NO.6），c-di-GMP 的浓度越高，抗终止基因 Q 表达载体表达得到的抗终止蛋白 Q（SEQ ID NO.7）越多。

首先人工合成以PAO1为宿主进行碱基优化的PcdrA-Q基因片段，分别通过引物Q-F和PcdrA-R进行聚合酶链式PCR反应得到带有同源臂的PcdrA-Q片段，通过引物PUCP-Q-R和PUCP-F进行聚合酶链式PCR反应得到线性化的PUCP20载体片段；然后利用Gibson assembly方法将PcdrA-Q碱基片段插入到PUCP20中，从而构建载体PcdrA-Q-PUCP20。然后将抗终止基因Q前的RBS进行批量置换筛选，即得到一系列PcdrA-RBS-Q-T0/T1-PUCP20质粒。

1.1.3 hlyE基因表达载体的构建

hlyE（血溶素E）基因（SEQ ID NO.8）采用组成型启动子J23118（SEQ ID NO.9），持续表达hlyE蛋白（SEQ ID NO.10），通过PCR方法获得J23118-hlyE基因片段（引物为J23118-F和HlyE-PUCP-R），模板为人工合成；随后通过吉布森连接法在PcdrA-RBS-Q-T0/T1-PUCP20质粒（线性化载体引物为PUCP-PcdrA-Q-F和PUCP-R）的T0/T1双终止子后插入J23118-hlyE基因片段，最终得到PcdrA-RBS-Q-T0/T1 -J23118-hlyE-PUCP20质粒，可以同时表达抗终止蛋白Q和药物hlyE。

1.1.4 裂解基因LKD16表达载体的构建

裂解基因LKD16（SEQ ID NO.11）表达得到裂解蛋白LKD16（SEQ ID NO.12），为了降低裂解基因LKD16的背景表达水平，选用了来自λ噬菌体的启动子-终止子转录系统（pR'-tR'）（SEQ ID NO.13）作为LKD16表达载体的启动子，该系统在抗终止蛋白Q存在时可以正常转录下游基因，当抗终止蛋白Q不存在时，由于终止子的存在，导致启动子pR'无法表达下游LKD16基因。因此设计将裂解基因LKD16放置在pR'-tR'控制下，同时希望将其整合到工程菌基因组上，提升其稳定性的同时进一步降低其表达量，因此将裂解基因LKD16构建到自杀质粒miniTn7（质粒图谱见图5所示）中。为了避免抗终止蛋白Q累计造成的泄露表达，我们在抗终止基因Q后加上了ssrA水解标签（SEQ ID NO.14）。

首先人工合成PR'-tR'-LKD16基因片段，通过PCR获得PR'-tR'-LKD16基因片段（引物：pR'-LKD-ass-R/Tn7-pR'-ass-F）和线性化的miniTn7质粒（引物：Tn7-ass-F/Tn7-ass-R），从而将合成裂解基因LKD16和pR'-tR'基因序列插入miniTn7质粒，从而得到pR'-tR'-B0034-LKD-T0/T1-miniTn7质粒。

1.2 质粒转化

将上述构建出来的质粒在测序正确后通过电转的方法转入铜绿假单胞菌PAO1中对其进行工程化改造。

1.2.1 LKD16表达载体和BphS表达载体的转化

首先将pR'-tR'-B0034-LKD-T0/T1-miniTn7质粒在辅助质粒PTNS2的帮助下，电转至野生型铜绿假单胞菌PAO1中，然后涂板于LB+Gen30（30微克每毫升庆大霉素）的琼脂培养板上，挑取12小时后长出来的单克隆点，用LB+Gen30的液体培养基37℃，250转每分钟摇菌8小时，将质粒pflp2电转入其中，涂于LB+Carb300（300微克每毫升羧苄青霉素）的琼脂培养板上。

将长出来的点划线于LB+5%sucrose（蔗糖）板上，37℃培养12小时后挑单克隆点溶解于20微升无菌水中，每个点分别点于LB、LB+gen30、LB+carb300培养板上，选取只在LB琼脂培养板上生长但在Gen、Carb两种抗性板上均未生长的点做PCR鉴定并送测序，得到将pR'-tR'-B0034-LKD-T0/T1-miniTn7质粒插入基因组的菌种pR'-tR'-B0034-LKD-T0/T1-miniTn7-PAO1。

质粒PA1/O4/O3-BphS-CTX2也采用同样的方法电转入pR'-tR'-B0034-LKD-T0/T1-miniTn7-PAO1中，只需将抗性由Gen30更改为Tc100（100微克每毫升的四环素），得到菌种PA1/O4/O3-BphS-CTX2-pR'-tR'-B0034-LKD-T0/T1-miniTn7-PAO1，此菌种标记为BphS-LKD-PAO1。

1.2.2 工程菌毒性的减弱

野生型的PAO1菌种毒性较大，为了减少毒性，采用无抗敲除的办法在BphS-LKD-PAO1的基础上敲除了三个基因以控制其毒性，分别为vfR（基因组编号为PA0652）、exoS（基因组编号为PA3841）、exoT（基因组编号为PA0044），最终得到的减毒菌株命名为ExoST，相较于野生型PAO1菌株，ExoST菌株的毒性大大降低。

基因敲除采用无缝重组敲除的方法，以vfR基因敲除的载体构建为例，首先需要通过PCR技术从基因组上获得目的片段的上游及下游的1000个碱基的片段，记为vfR-up和vfR-dn；随后通过Gibson assembly方法将他们插入到自杀型载体pEX18Gm的酶切位点EcoRI和HindIII之间（质粒图谱见图6所示），构建载体vfR-pEX18Gm。

首先将构建的敲除质粒 vfR-pEX18Gm 电转入目的菌种，在含有庆大霉素的平板上筛选出单克隆菌斑；随后在含有 15%蔗糖的不含氯化钠的 LB 平板上划线。37℃培养 16 小时后，挑选单克隆菌斑 PCR 鉴定目的基因 vfR 是否成功敲除。测序验证后，以相同的方法进行第二个基因的敲除直至三个毒力基因全部敲除成功，该菌种记为 ExoST。

1.2.3 PcdrA-RBS-Q-T0/T1-J23118-hlyE-PUCP20 质粒的转化

抗终止蛋白 Q 的表达量直接影响了裂解基因 LKD16 的表达量，若背景表达量较高则工程菌可能在未光照时就已经开始裂解，而若背景表达量过低，则工程菌在高光强照射时也无法裂解。

启动子与核糖体结合位点（RBS）均可以影响 Q 的背景表达水平，RBS 是指基因起始密码子 AUG 上游的一段富含嘌呤的非翻译区。Q 的背景表达水平如果比较高，即没有光照时，Q 的表达量也足够开启裂解基因的表达使细菌裂解，细菌只需微弱的光甚至不光照就会裂解。与之相对，Q 的背景表达水平如果太低，即使光强很强，也无法诱导足够的 Q 表达来使细菌裂解。所以说不同 RBS 序列导致整个系统对光强的响应行为是不一样的，因此对抗终止基因 Q 前的 RBS 进行筛选是必要的。

选用随机引物 PCR 的方法构建了一个可以标定 RBS 光响应强度的质粒库，请参阅图 12a，通过公司合成了一批随机引物，其序列未知，后面连接绿色荧光蛋白，而橙色荧光蛋白则有持续性启动子和固定的已知 RBS 表达，我们通过绿色荧光强度与橙色荧光强度的比值来标定不同 RBS 的相对强度，结果如图 12b 所示，相对强度越高，说明 RBS 对光响应越强。

根据 RBS 的相对强度，利用两头夹的方法，将不同 RBS 序列放置于 Q 基因前，通过微流实验筛选得到可在低光生长、高光裂解的菌株。由于微流实验筛选过程比较麻烦，所以当得到一次实验结果的时候，需要知道 Q 蛋白表达量是高还是低，如果高就要往低调，换用更弱的 RBS，如果低就要往高调，换用更强的 RBS，就好比两头夹击。

微流实验前期准备：将不同 RBS 构建的 PcdrA-RBS-Q-T0/T1-J23118-hlyE-PUCP20 质粒转化 ExoST 菌株得到的菌株在实验前一天晚上划线于 LB+Gen30 琼脂板上，第二天挑菌用 FAB 培养基加 1

微摩氯化铁、30 毫摩谷氨酸盐、30 微克每毫升的庆大抗生素（简记为 FAB+++）的一毫升培养基于 37℃，250rpm 摇床培养至 OD600 值约为 1.0，离心后用 PBS 重悬清洗两次，备用。注意全程避光操作。

微流实验的操作流程：微流通道由 PDMS 与盖玻片粘接而成，通道宽度为 50 微米，高度为 200 微米，形状为单直通道，通道的一端为进液口，另一端为废液口。选用的培养基为 Mccoy’s 5A，其中含 30 微摩的氯化铁，30 微克每毫升的庆大霉素（Gen30）以及 10%的胎牛血清（FBS），实验前一晚配置完成后吸入注射器内，放置于室温，第二天排空气泡，实验温度控制为 30℃。将准备好的菌液由进液口注入，设定流速为 3mL/h，在激光共聚焦显微镜下拍摄。选用的 BphS 激发光源为 640nm 激光器，由功率计测量 60 倍物镜处 640nm 激光光照强度，根据设定的拍摄程序，计算后得到约化后 60 倍物镜一个视野内的平均光强。部分筛选结果如图 7 所示，图 7 为不能裂解的菌株 PcdrA-GFP、RBS004 构建的菌株 RBS004-Q 和 RBS017 构建的菌株 RBS017-Q 的微流实验结果，根据图 7 可知，RBS017-Q 可以在低光强 16.2μW/cm^2 下正常生长，而在高光强 50.8μW/cm^2 下裂解，证明 RBS017 符合要求。根据图 7 还可以知道，RBS017-Q 菌株的裂解阈值可以为 50.8μW/cm^2，也可以为 16.2μW/cm^2~50.8μW/cm^2 之间的任一值，例如可以为（20、30 或 40）μW/cm^2。

经过微流实验筛选后，发现 RBS017（序列为：AACGCGGTGCAA）对光响应效果好，因此使用 RBS017 构建 Q 蛋白表达质粒并转化，得到符合要求的菌株分别为：将 pcdrA-RBS017-Q-PUCP20 质粒电转入 ExoST 菌种内，得到的菌株命名为 Q017，作为对照；将 PcdrA-RBS017-Q-T0/T1-J23118-hlyE-PUCP20 质粒电转入 ExoST 菌种内，得到的菌种命名为 H017，得到构建好的光控裂解工程菌。

实施例 2 测试 pR’-tR’启动子-终止子转录系统在 PAO1 菌种中的背景表达水平以及诱导表达水平

pR’-tR’启动子-终止子转录系统直接决定裂解蛋白 LKD16 的背景表达水平，LKD16 蛋白的背景表达水平太高，则在低光强或无光强的时候细菌都会裂解，LKD16 蛋白的诱导表达水平太低，则在高光强时细菌也无法裂解，因此，测试 pR’-tR’启动子-终止子转录系统在 PAO1 菌种中的背景表达水平以及

诱导表达水平是需要的。

如图 11a 所示，通过构建阿拉伯糖诱导的 PBAD-B0034-Q-pJN105 载体质粒，以及 pR'-tR'启动子-终止子转录系统控制的红色荧光蛋白表达体系 pR'-tR'-mScarlet-miniTn7 质粒，在体系中添加阿拉伯糖会诱导 PBAD 启动子后基因的表达，PBAD-B0034-Q-pJN105 载质粒通过电转的方法导入 pR'-tR'-mScarlet-miniTn7-PAO1 中，并用阿拉伯糖诱导 Q 蛋白的表达，以观察红色荧光蛋白的表达情况，并使用只有 pR'启动表达的 pR'-mScarlet-miniTn7 质粒和 pR'-tR'启动表达的 pR'-tR'-mScarlet-miniTn7 质粒做对照，结果如图 11b 和图 11c 所示。

图 11b 中上排图像为显微镜明场图片，下排图像为显微镜荧光图片，pR'-mScarlet 列为没有终止子 tR'时，pR'-mScarlet-PAO1 的明场图片和荧光图片，荧光强度很强，证明 pR'可以正常驱动红色荧光蛋白的表达，pR'-tR'-mScarlet 列为加上终止子 tR'后，pR'-tR'-mScarlet-PAO1 的明场图片和荧光图片，几乎没有荧光，证明 tR'可以阻止红色荧光蛋白的表达，背景表达水平较低。pR'-tR'-mScarlet-Q-pJN105+0.6%L-ara 是 PBAD-B0034-Q-pJN105-pR'-tR'-mScarlet-miniTn7-PAO1 菌种在加入 0.6%阿拉伯糖诱导之后的图片，有一定强度的荧光产生，证明阿拉伯糖可以诱导红色荧光蛋白的表达，图 11c 为三种菌种 mScarlet 荧光强度的定量数据。以上实验结果说明 pR'-tR'启动子-终止子转录系统的背景表达水平低，诱导表达水平较高，验证了该系统的可行性。

实施例 3 光控裂解工程菌的小鼠体内实验

待用菌种在注菌前一夜由-80℃冰箱划线于 LB+Gen30 琼脂板上，第二天早上挑取单克隆点于 1mL FAB+++摇菌至 OD600 值约为 0.6，离心后用 PBS 重悬清洗两次，注意全程避光操作。

取 100 微升待用菌种注射到荷瘤（A549 细胞系）Balb/c 小鼠的瘤内，将小鼠分为高光强照射组（H017-Light）和黑暗处理组（H017-Dark），其中高光强照射组小鼠采用 10mW/cm^2 的光强照射，考虑到光穿透动物组织到达肿瘤部位会减弱的问题，因此，动物实验照射的光强高于细菌实验照射的光强。于第 1、2、7、8、12、14、15、21 天再次注菌，并在第 1、2、6、10、14、19、21 天测量肿瘤体积、小鼠体重的变化以及肿瘤重量，结果分别如图 8a、

图 8b 和图 8c 所示。说明菌株 H017 在光照条件下可以释放药物治疗肿瘤，而避光条件下不行。同时小鼠的体重未受到明显影响，表明释放药物不会给小鼠带来显著的生存压力。

将工程菌更换为可裂解释放红色荧光蛋白（mScarlet）或者不可裂解的菌株（ExoST）时，在光照与避光条件下均无法抑制肿瘤生长，如图 9a 和图 9c 所示，同时对小鼠体重也无显著影响，如图 9b 和图 9d 所示。

对上述初次注菌 21 天后的肿瘤进行组织切片染色分析，分别进行 HE 染色、DAPI 染色、TUNEL 染色，其中 TUNEL 染色的原理是基因组 DNA 断裂时，暴露的 3'-OH 可以在末端脱氧核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 的催化下加上荧光素 (FITC) 标记的 dUTP (fluorescein-dUTP)，从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测，荧光强度越强，细胞凋亡越多。结果如图 10 所示，发现 H017 光照组肿瘤组织内部大量细胞凋亡，而避光组几乎没有检测到凋亡的细胞，证实了药物的可控释放程度非常高，本发明实施例的光控裂解工程菌仅在高光强照射下才会释放治疗药物诱导细胞凋亡。

以上所述仅为本发明的可选实施例，并非因此限制本发明的专利范围，凡是在本发明的发明构思下，利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构变换，或直接/间接运用在其他相关的技术领域均包括在本发明的专利保护范围内。

权 利 要 求 书

1、一种光控裂解工程菌，其特征在于，包括：

光敏基因表达盒，表达得到光敏蛋白，所述光敏蛋白受光调控合成信使分子；

抗终止基因表达盒，所述抗终止基因表达盒的启动子受所述信使分子调控，表达得到抗终止蛋白；

裂解基因表达盒，所述裂解基因表达盒的启动子受所述抗终止蛋白调控，表达得到裂解蛋白，用于裂解所述工程菌；其中，

当调控所述光敏蛋白的光强达到裂解阈值时，所述裂解蛋白的表达量使所述工程菌裂解。

2、如权利要求 1 所述的一种光控裂解工程菌，其特征在于，所述光敏基因表达盒和所述裂解基因表达盒整合到所述工程菌的基因组中，所述抗终止基因表达盒存在于外源质粒中。

3、如权利要求 2 所述的一种光控裂解工程菌，其特征在于，所述工程菌还包括：

药物基因表达盒，表达得到药物蛋白，当所述工程菌裂解后，所述药物蛋白从所述工程菌释放。

4、如权利要求 3 所述的一种光控裂解工程菌，其特征在于，所述药物基因表达盒与所述抗终止基因表达盒存在于同一个外源质粒中。

5、如权利要求 1 至 4 中任意一项所述的一种光控裂解工程菌，其特征在于，所述光敏基因包括 BphS、IlaC*、IlaD9、IlaM4 和 IlaM5 中的任一种；

所述信使分子包括 c-di-GMP 或 cAMP；

所述抗终止基因表达盒的启动子包括受 c-di-GMP 调控的 cdrA 启动子、pel 启动子或 psl 启动子，或者受 cAMP 调控的 lac 启动子；

所述抗终止基因包括 λ 噬菌体的 Q 蛋白；

所述裂解基因包括LKD16。

6、一种光控裂解工程菌的构建方法，其特征在于，包括质粒构建和质粒转化，所述质粒构建包括：

光敏基因表达载体的构建，所述光敏基因表达得到光敏蛋白，所述光敏蛋白受光调控合成信使分子；

抗终止基因表达载体的构建，所述抗终止基因表达载体的启动子受所述信使分子调控，表达得到抗终止蛋白；

裂解基因表达载体的构建，所述裂解基因表达载体的启动子受所述抗终止蛋白调控，表达得到裂解蛋白，用于裂解所述工程菌；

所述质粒转化包括：

将上述构建好的光敏基因表达载体、抗终止基因表达载体和裂解基因表达载体转化到出发菌中得到所述光控裂解工程菌。

7、如权利要求6所述的一种光控裂解工程菌的构建方法，其特征在于，所述光敏基因表达载体和所述裂解基因表达载体由自杀质粒构建得到，所述抗终止基因表达载体由复制质粒构建得到，所述光敏基因和所述裂解基因整合到所述工程菌的基因组中，所述抗终止基因以质粒形式存在。

8、如权利要求7所述的一种光控裂解工程菌的构建方法，其特征在于，所述质粒构建还包括：

药物基因表达载体的构建，所述药物基因表达得到药物蛋白；

所述质粒转化还包括：

将构建的药物基因表达载体转化到出发菌中得到所述光控裂解工程菌；其中，

当所述工程菌裂解后，所述药物蛋白从所述工程菌释放。

9、如权利要求8所述的一种光控裂解工程菌的构建方法，其特征在于，所述药物基因表达载体和所述抗终止基因表达载体构建到同一质粒上。

10、如权利要求 6 至 9 任一项所述的一种光控裂解工程菌的构建方法，其特征在于，所述光敏基因包括 BphS、IlaC*、IlaD9、IlaM4 和 IlaM5 中的任一种；

所述信使分子包括 c-di-GMP 或 cAMP；

所述抗终止基因表达载体的启动子包括受 c-di-GMP 调控的 cdrA 启动子、pel 启动子或 psl 启动子，或者受 cAMP 调控的 lac 启动子；

所述抗终止基因包括 λ 噬菌体的 Q 蛋白；

所述裂解基因包括 LKD16。

11、一种药物组合物，其特征在于，包括权利要求 1 至 5 任一项所述的一种光控裂解工程菌。

12、如权利要求 1 至 5 任一项所述的一种光控裂解工程菌在制备治疗肿瘤药物中的应用。

13、一种肿瘤治疗系统，其特征在于，包括肿瘤治疗装置和肿瘤治疗药物；

所述肿瘤治疗药物包括权利要求 1 至 5 任一项所述的一种光控裂解工程菌；

所述肿瘤治疗装置包括激光元件，所述激光元件可发射光源；其中，

所述肿瘤治疗系统在使用的时候，将所述肿瘤治疗药物注射到待治疗肿瘤部位，然后使用所述肿瘤治疗装置的光源照射所述肿瘤部位，

当所述光强达到裂解阈值时，所述光控裂解工程菌裂解释放菌内治疗物。

14、如权利要求1至5任一项所述的一种光控裂解工程菌在治疗疾病中的用途。

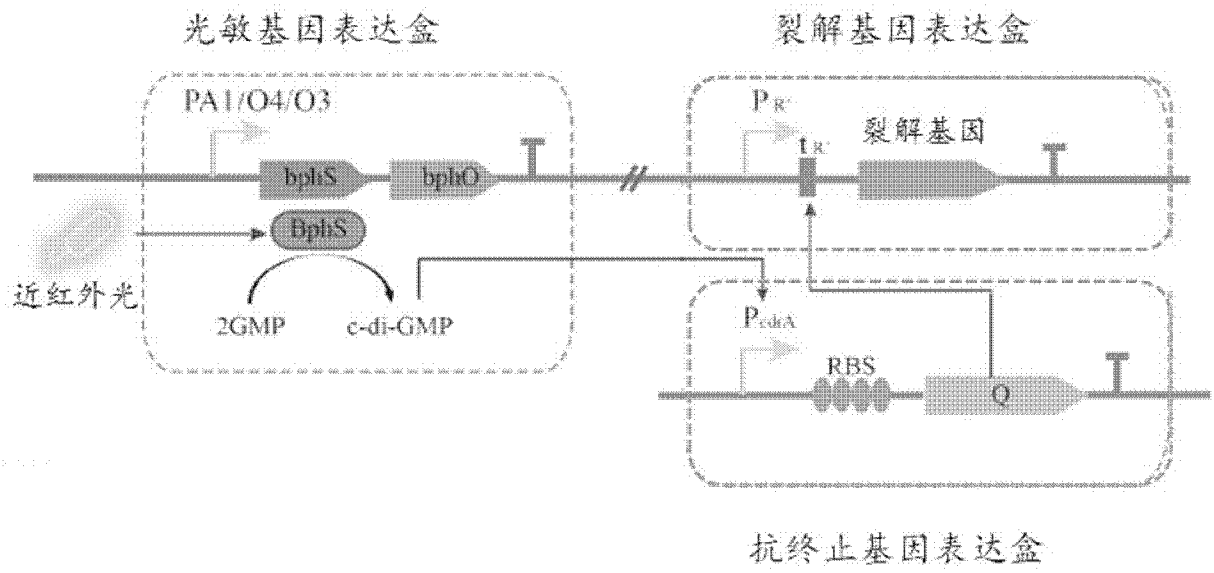

光敏基因表达盒
裂解基因表达盒
PA1/O4/O3
bphS
bphO
BphS
近红外光
2GMP
c-di-GMP
$P_{R'}$
$t_{R'}$
裂解基因
P_{cdrA}
RBS
Q
抗终止基因表达盒

图 1

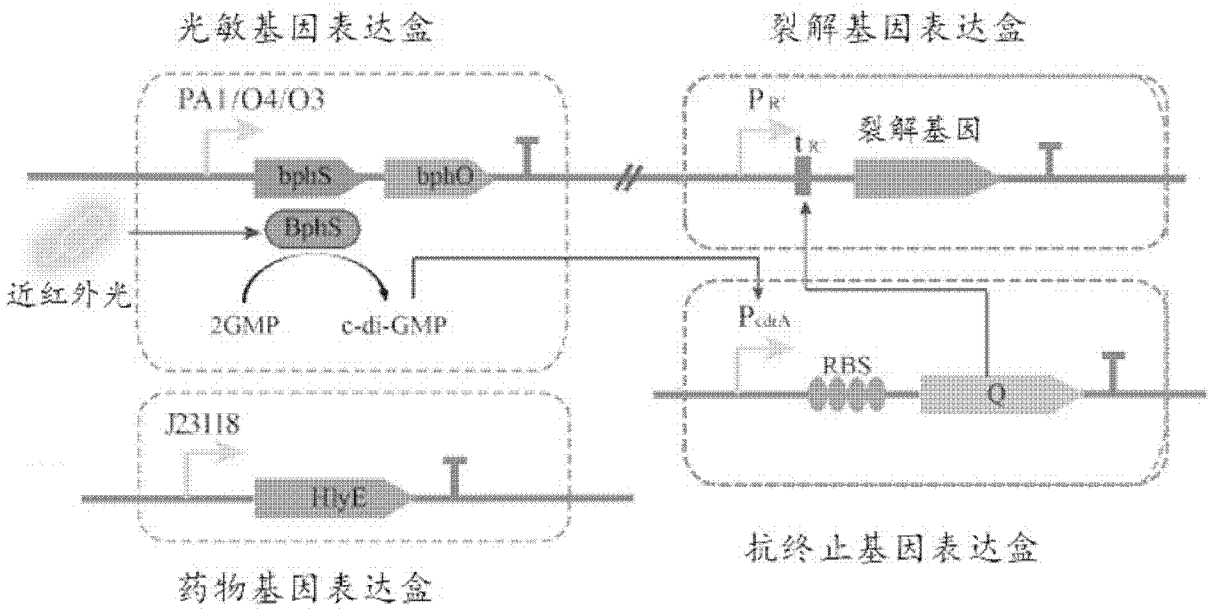

光敏基因表达盒
裂解基因表达盒
PA1/O4/O3
bphS
bphO
BphS
近红外光
2GMP
c-di-GMP
$P_{R'}$
$t_{R'}$
裂解基因
P_{cdrA}
RBS
Q
J23118
HygE
抗终止基因表达盒
药物基因表达盒

图 2

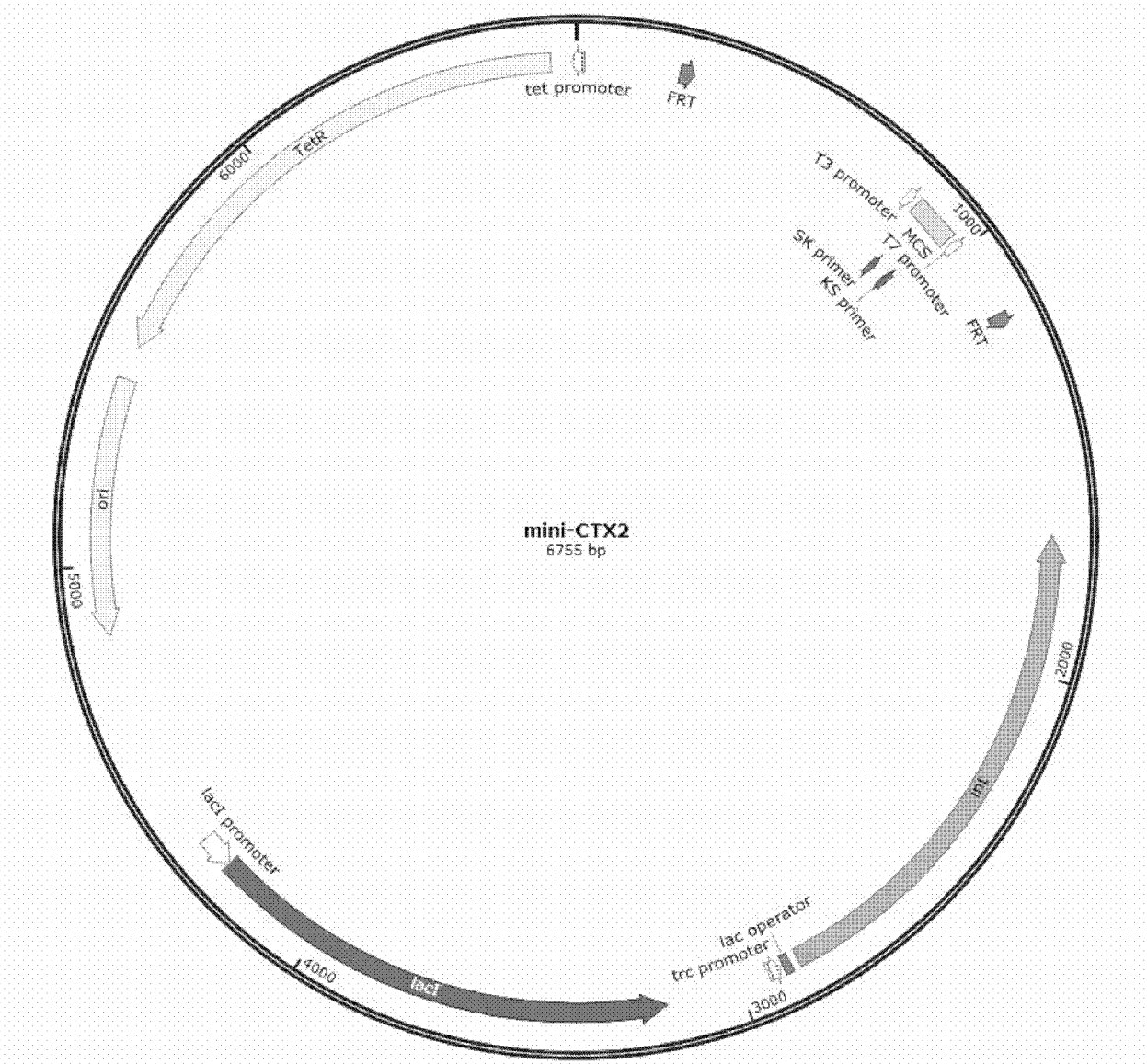

tet promoter
FRT
TetR
6000
T3 promoter
MCS
T7 promoter
1000
SK primer
KS primer
FRT
ori
mini-CTX2
6755 bp
5000
2000
lacI promoter
lacI
4000
lac operator
trc promoter
3000

图 3

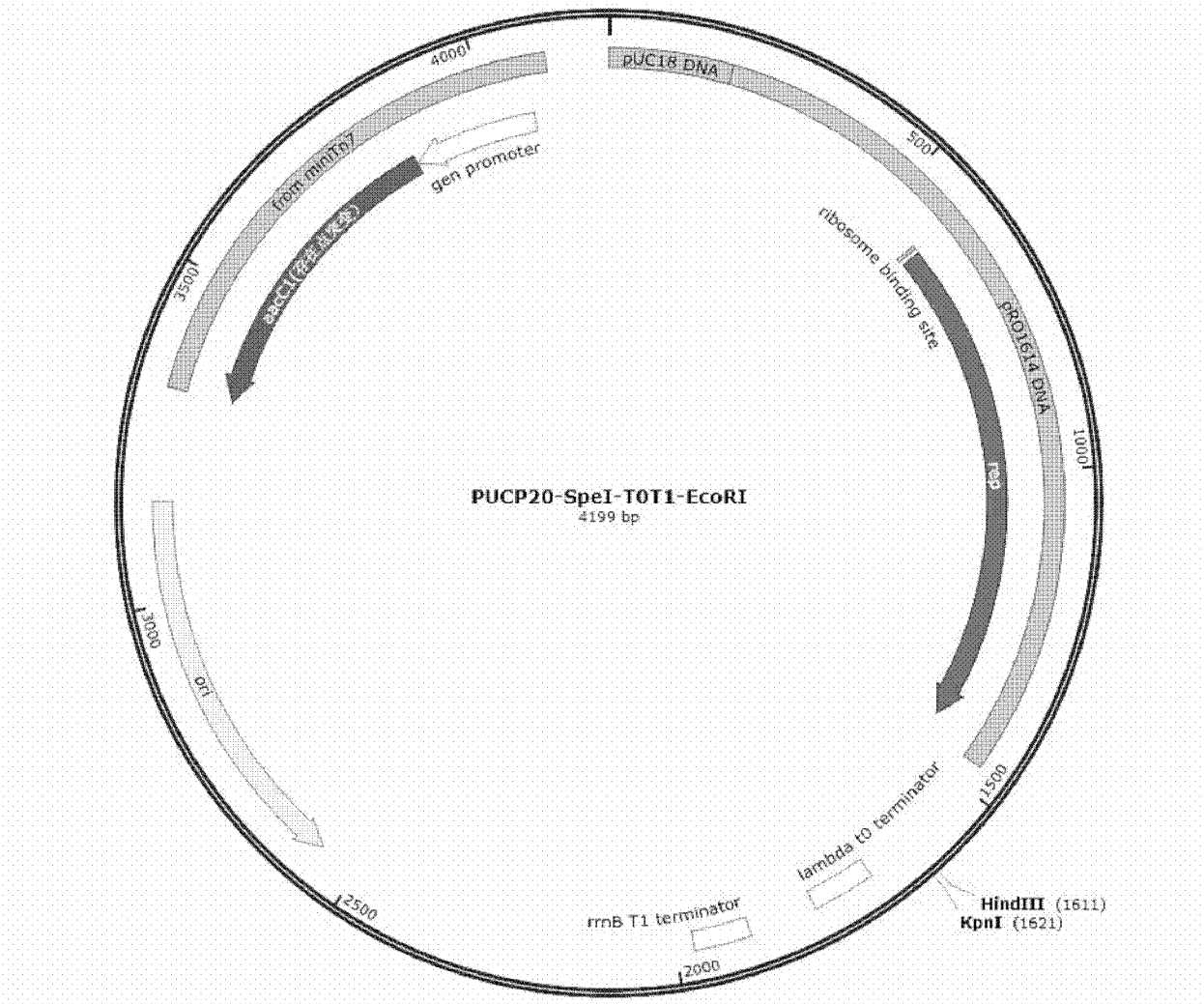

pUC18 DNA
500
pRO1614 DNA
1000
rep
1500
lambda t0 terminator
HindIII (1611)
KpnI (1621)
2000
rrnB T1 terminator
2500
ori
3000
from mini67
3500
4000
gen promoter
ribosome binding site
PUCP20-SpeI-T0T1-EcoRI
4199 bp

图 4

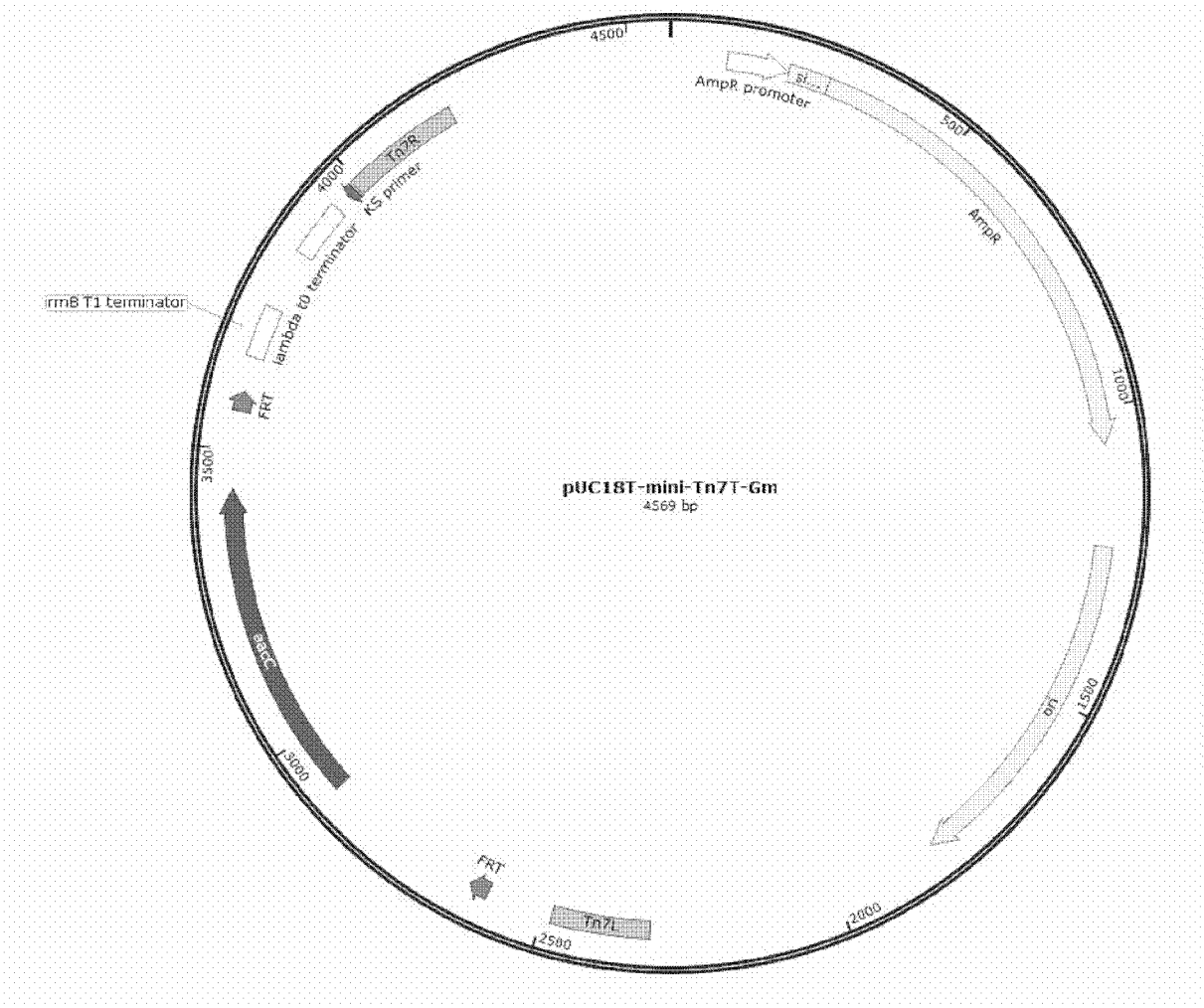

4500
AmpR promoter
SI
500
AmpR
1000
1500
ori
2000
Tn7L
2500
FRT
3000
aacC
3500
FRT
lambda t0 terminator
4000
Tn7R
KS primer
rrnB T1 terminator
pUC18T-mini-Tn7T-Gm
4569 bp

图 5

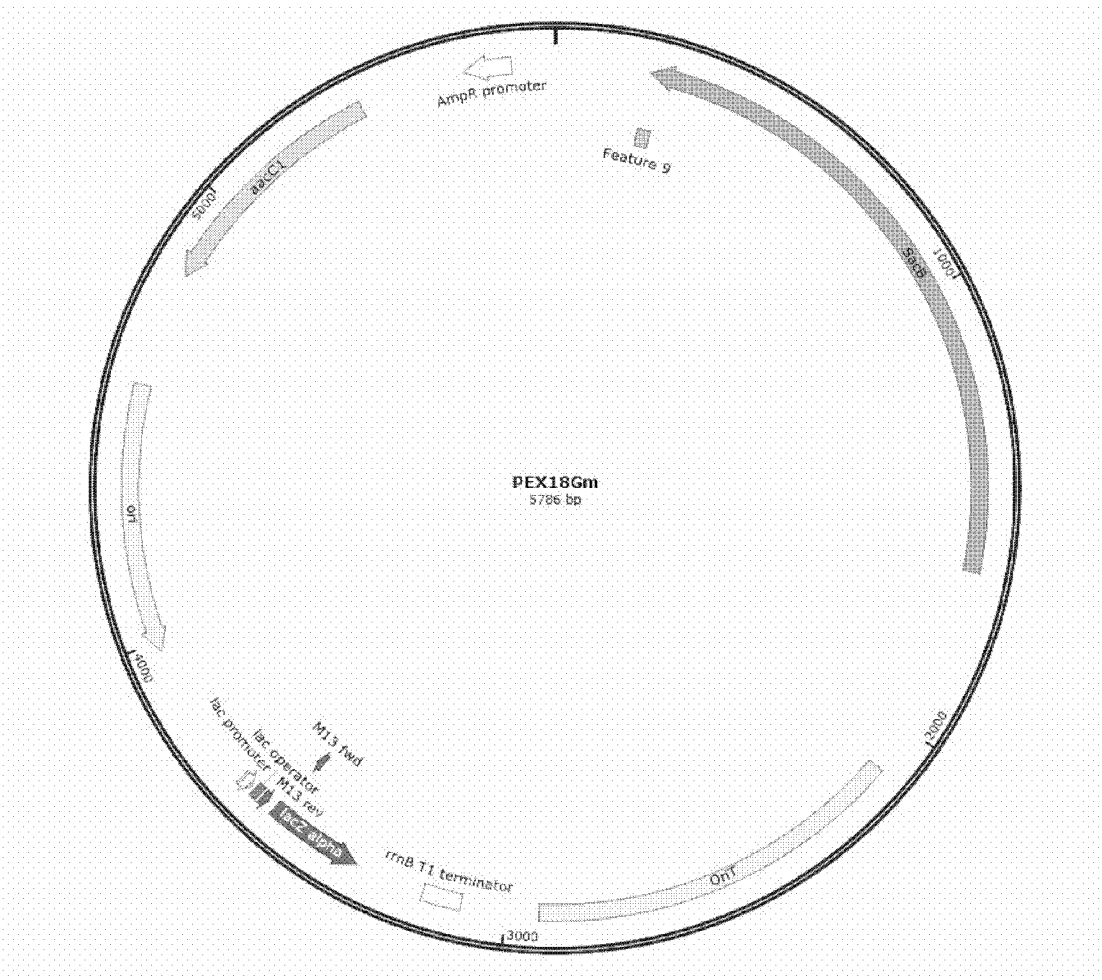

AmpR promoter
Feature 9
aacC1
5000
SacB
1000
ori
4000
2000
lac promoter
lac operator
M13 fwd
M13 rev
lacZ alpha
rrnB T1 terminator
ori
3000
PEX18Gm
5786 bp

图 6

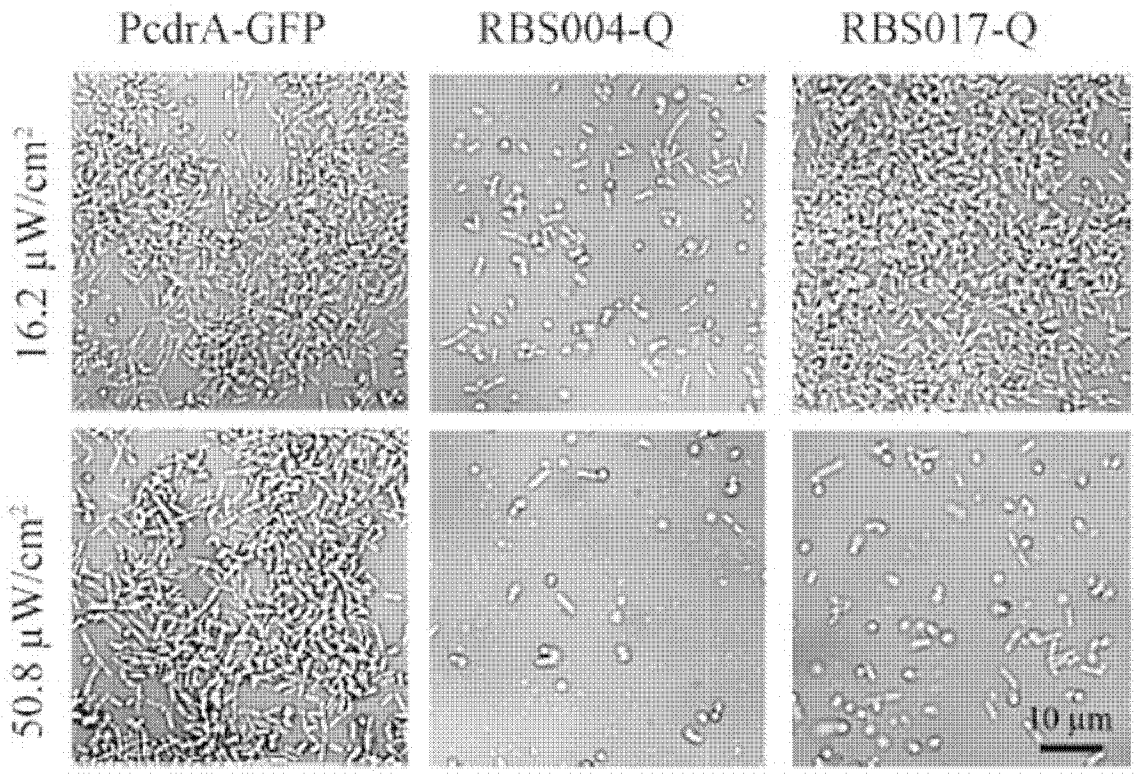

PcdrA-GFP
RBS004-Q
RBS017-Q
16.2 μW/cm²
50.8 μW/cm²
10 μm

图 7

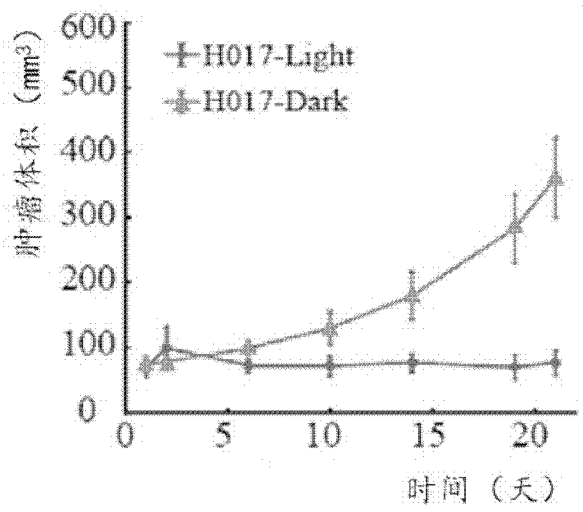

肿瘤体积（mm³）
600
500
400
300
200
100
0
H017-Light
H017-Dark
0
5
10
15
20
时间（天）

图 8a

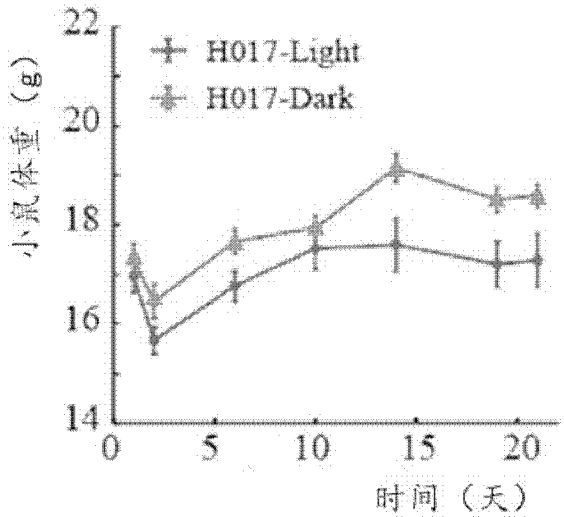

小鼠体重（g）
22
20
18
16
14
H017-Light
H017-Dark
0
5
10
15
20
时间（天）

图 8b

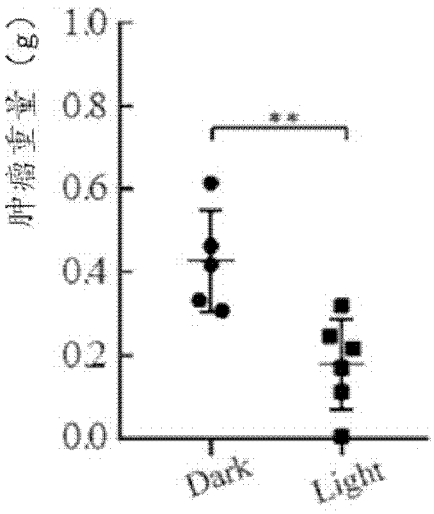


图 8c

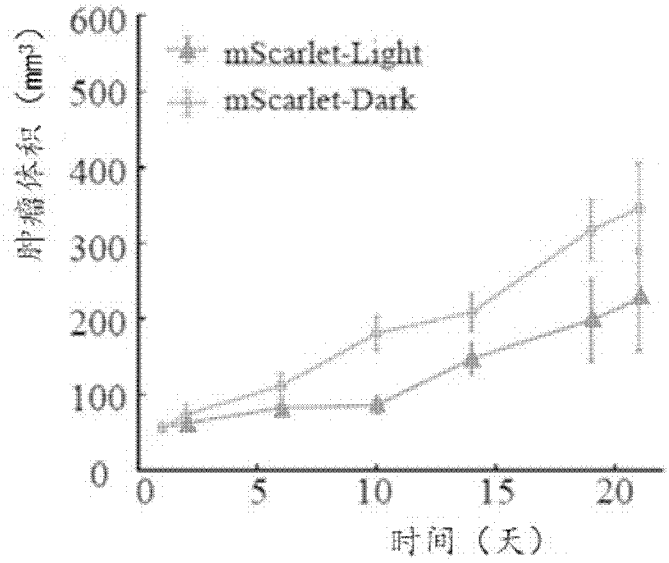


图 9a

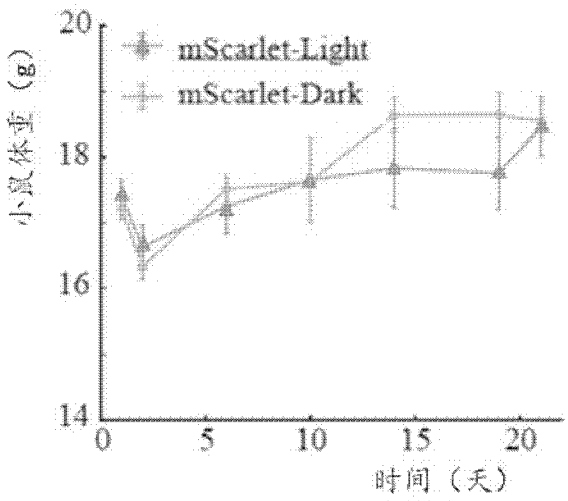


图 9b

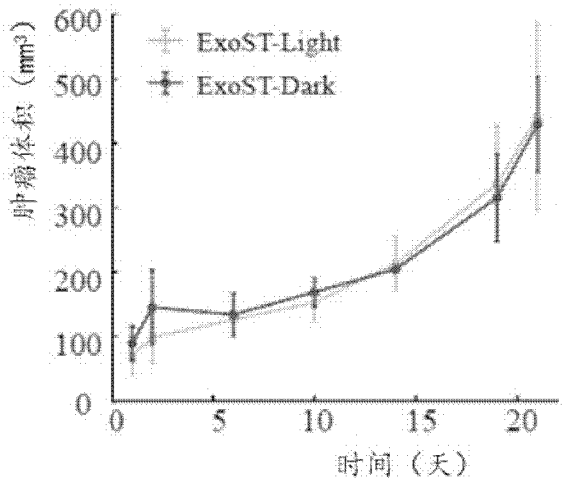


图 9c

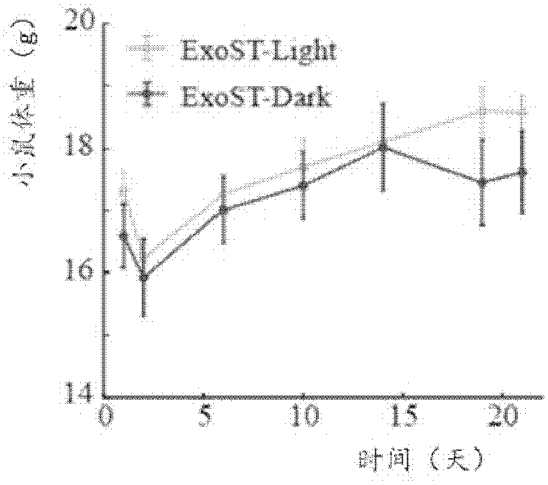


图 9d

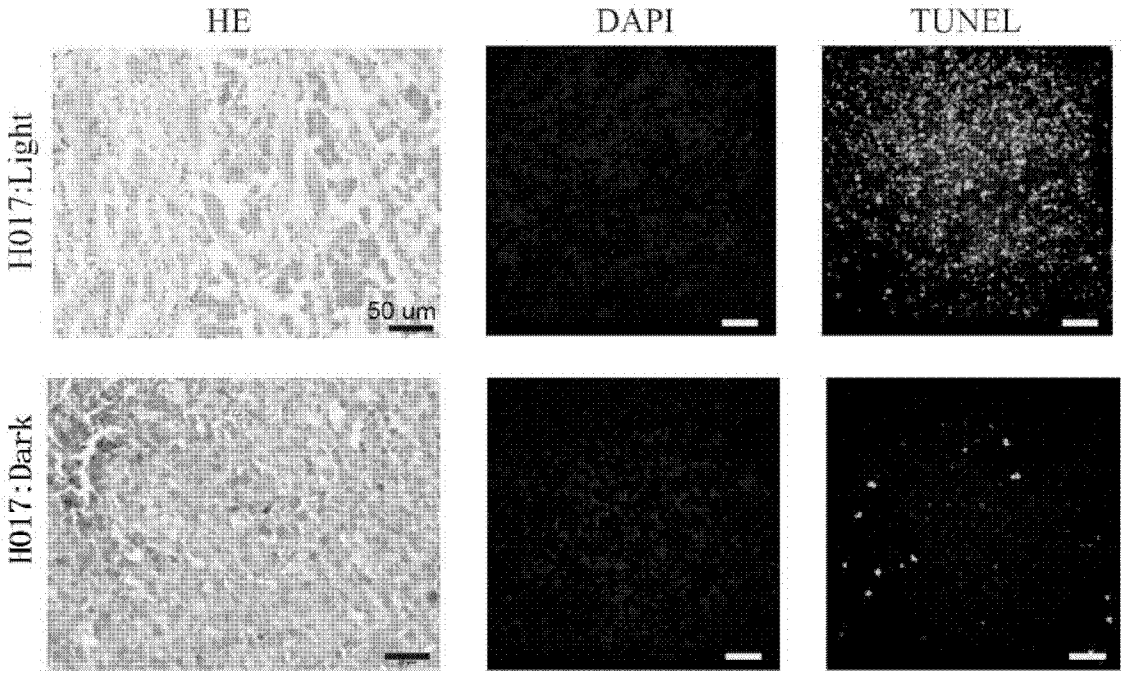


图 10

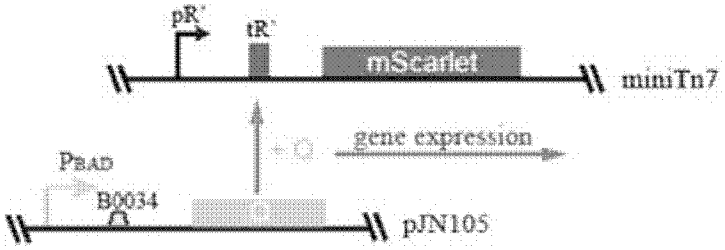


图 11a

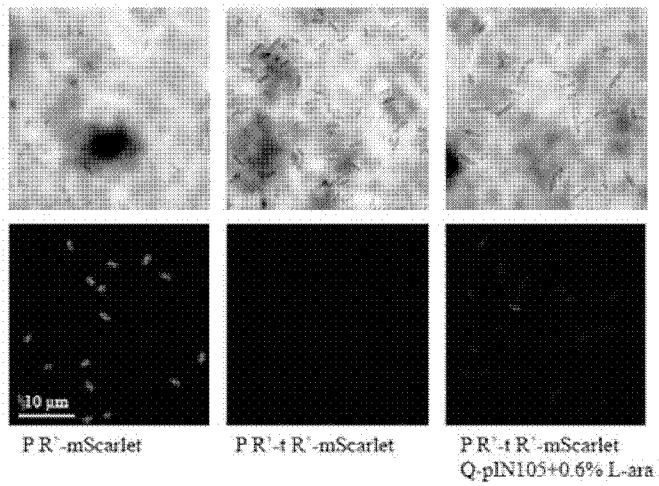


图 11b

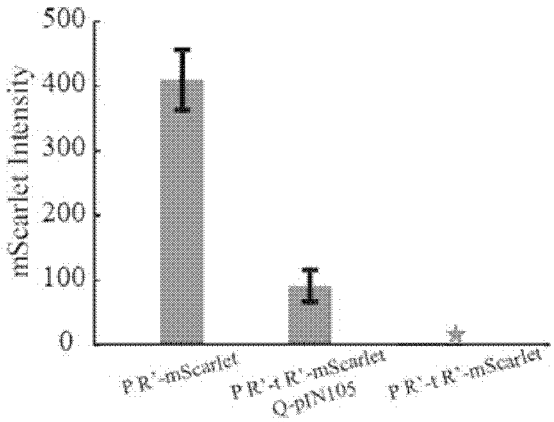


图 11c

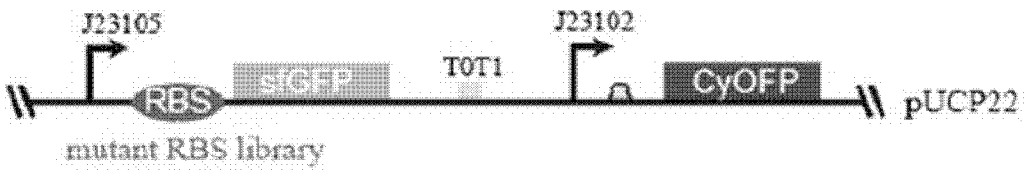


图 12a

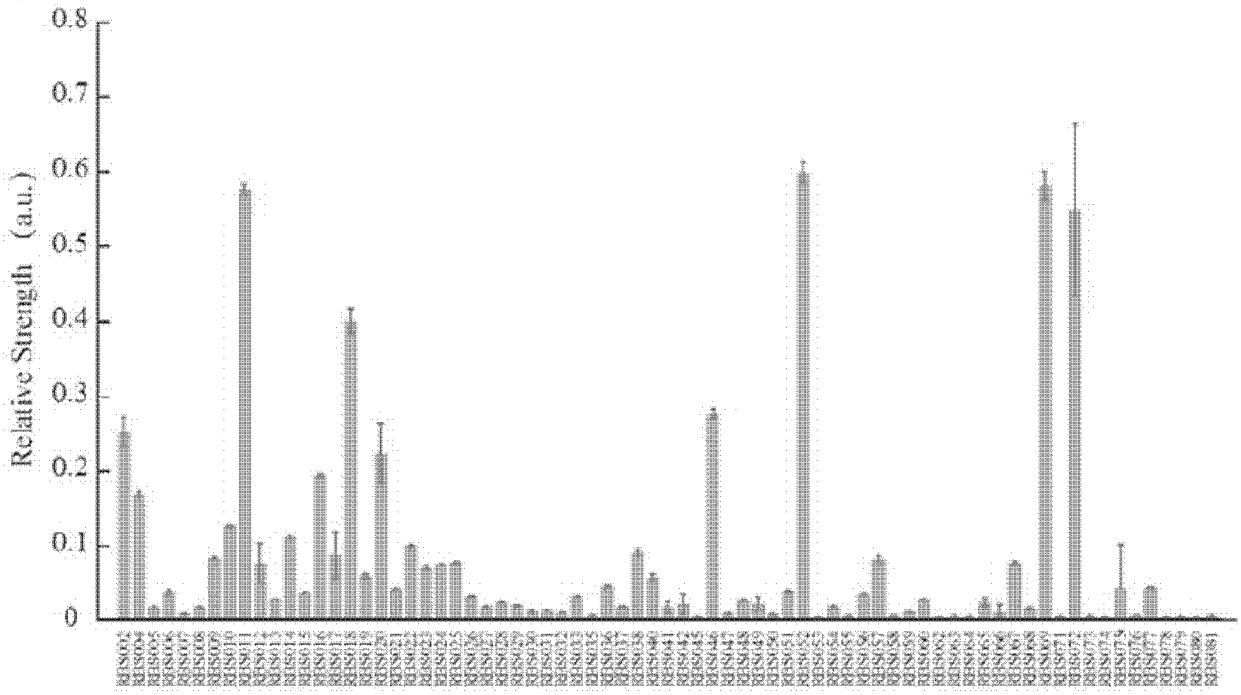


图 12b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/111757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/64(2006.01)i; A61K 35/74(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12R 1/01(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; A61K; A61P; C12R

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)

CNABS; DWPI; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; 万方数据库; WANFANG DATABASE; ISI WEB OF SCIENCE; PUB MED: 光敏基因, 裂解基因, 光, 敏感, 控制, 裂解, light sensitive gene, photo sensitive gene, lysis gene, light, photo, sensitive, lysis, control, LKD16, BphS, IlaC, IlaD9, IlaM4, IlaM5; 中国专利生物序列检索系统+GenBank+EMBL: 关于SEQ ID NOs: 1-13的序列检索; Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System+GenBank+EMBL: sequence search for SEQ ID NOs: 1-13.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019068006 A1 (CHARLES STARK DRAPER LABORATORY INC.) 04 April 2019 (2019-04-04) see claims 1-32	1-13
Y	CN 107177621 A (YE HAIFENG) 19 September 2017 (2017-09-19) see claims 1-12, and embodiments	1-13
Y	CN 107174655 A (EAST CHINA NORMAL UNIVERSITY) 19 September 2017 (2017-09-19) see claims 1-24, and embodiments	1-13
A	US 2006040393 A1 (JIA XIYU et al.) 23 February 2006 (2006-02-23) see entire document	1-13
A	CN 106244613 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 21 December 2016 (2016-12-21) see entire document	1-13
A	WO 9531561 A1 (QUEST INTERNATIONAL et al.) 23 November 1995 (1995-11-23) see entire document	1-13

☑ 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	Date of mailing of the international search report
27 April 2022	**13 May 2022**
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/CN2021/111757

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 113136396 A (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 20 July 2021 (2021-07-20) see entire document	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/111757

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

International application No.
PCT/CN2021/111757

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The subject matter of claim 14 relates to a method for treatment of a human or animal body, and belongs to the cases defined in PCT Rule 39.1(iv) for which no search is required.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/111757

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2019068006 A1	04 April 2019	None	
CN 107177621 A	19 September 2017	None	
CN 107174655 A	19 September 2017	None	
US 2006040393 A1	23 February 2006	None	
CN 106244613 A	21 December 2016	None	
WO 9531561 A1	23 November 1995	US 5955258 A	21 September 1999
		JP H10500012 A	06 January 1998
		AU 2353995 A	05 December 1995
		EP 0759998 A1	05 March 1997
		AU 1999023539 A1	14 October 1999
CN 113136396 A	20 July 2021	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/111757

A. 主题的分类

C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/64(2006.01)i; A61K 35/74(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12R 1/01(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; A61K; A61P; C12R

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）)

CNABS;DWPI;CNTXT;WOTXT;USTXT;EPTXT;CNKI;万方数据库;ISI WEB OF SCIENCE;PUB MED：光敏基因，裂解基因，光，敏感，控制，裂解，light sensitive gene，photo sensitive gene，lysis gene，light，photo，sensitive，lysis，control，LKD16，BphS，IlaC，IlaD9，IlaM4，IlaM5； 中国专利生物序列检索系统+GenBank+EMBL：关于SEQ ID NOs：1-13的序列检索。

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
Y	WO 2019068006 A1 (CHARLES STARK DRAPER LABORATORY INC) 2019年4月4日 (2019-04-04) 参见权利要求1-32	1-13
Y	CN 107177621 A (叶海峰) 2017年9月19日 (2017-09-19) 参见权利要求1-12，实施例	1-13
Y	CN 107174655 A (华东师范大学) 2017年9月19日 (2017-09-19) 参见权利要求1-24，实施例	1-13
A	US 2006040393 A1 (JIA XIYU等) 2006年2月23日 (2006-02-23) 参见全文	1-13
A	CN 106244613 A (江南大学) 2016年12月21日 (2016-12-21) 参见全文	1-13
A	WO 9531561 A1 (QUEST INT等) 1995年11月23日 (1995-11-23) 参见全文	1-13

☑ 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	国际检索报告邮寄日期
2022年4月27日	2022年5月13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	受权官员 王慧梅 电话号码 62411090

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/111757

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
A	CN 113136396 A (华东理工大学) 2021年7月20日 (2021 - 07 - 20) 参见全文	1-13

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/111757

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

国际申请号
PCT/CN2021/111757

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 14
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求14的主题涉及人体或动物体的治疗方法，属于PCT实施细则第39.1（iv）规定的无须检索的情况。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/111757

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	2019068006	A1	2019年4月4日	无			
CN	107177621	A	2017年9月19日	无			
CN	107174655	A	2017年9月19日	无			
US	2006040393	A1	2006年2月23日	无			
CN	106244613	A	2016年12月21日	无			
WO	9531561	A1	1995年11月23日	US	5955258	A	1999年9月21日
				JP	H10500012	A	1998年1月6日
				AU	2353995	A	1995年12月5日
				EP	0759998	A1	1997年3月5日
				AU	1999023539	A1	1999年10月14日
CN	113136396	A	2021年7月20日	无			