

(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
2020 年 3 月 5 日 (05.03.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/042292 A1

- (51) 国际专利分类号:
CI2N 15/113 (2010.01) *CI2N 15/77* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/110217
- (22) 国际申请日: 2018 年 10 月 15 日 (15.10.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201810990180.0 2018年8月28日 (28.08.2018) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号刘秀霞, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 刘秀霞(LIU, Xiuxia); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号刘秀霞, Jiangsu 214122 (CN)。 董贵彬(DONG, Guibin); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号刘秀霞, Jiangsu 214122 (CN)。 赵子豪(ZHAO, Zihao); 中国江

苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号刘秀霞, Jiangsu 214122 (CN)。 司雅楠(SI, Yanan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号刘秀霞, Jiangsu 214122 (CN)。 王新月(WANG, Xinyue); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号刘秀霞, Jiangsu 214122 (CN)。 杨艳坤(YANG, Yankun); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号刘秀霞, Jiangsu 214122 (CN)。 白仲虎(BAI, Zhonghu); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号刘秀霞, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 南京禹为知识产权代理事务所(特殊普通合伙)(YUV (NANJING) INTELLECTUAL PROPERTY FIRM (SPECIAL GP)); 中国江苏省南京市江宁区利源南路55号牛首工业园1号楼B栋2楼王晓东, Jiangsu 211100 (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,

(54) Title: PROMOTER, VECTOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 启动子、其载体及其应用

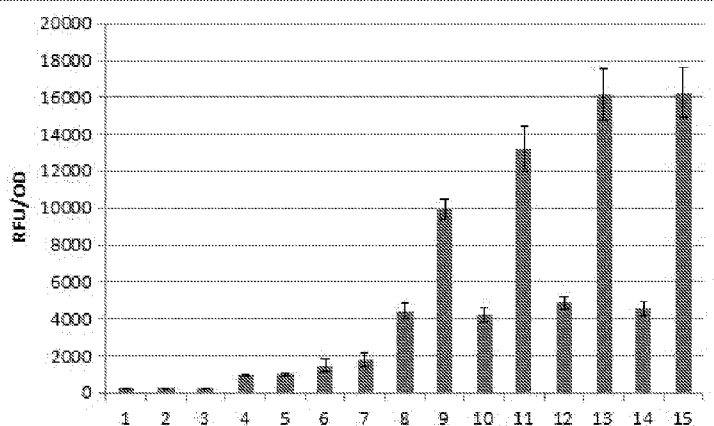


图 2

(57) Abstract: Disclosed is a promoter, a vector and an application thereof. The promoter includes a promoter core region sequence that includes at least an upstream 91-180 bp interval sequence of *Corynebacterium glutamicum* SEQ ID NO: 6 gene coding sequence ATG. The promoter and a gene fragment are constructed to form an expression cassette, which can express a large amount of protein in prokaryotes; in particular, after being induced by an inducer, the protein expression activity is significantly higher than that of conventional Ptac.

(57) 摘要: 启动子、其载体及其应用。启动子包括启动子核心区序列, 该启动子核心区序列至少包含谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 的上游 91bp ~ 180bp 区间序列。将该启动子与基因片段进行构建组成表达框, 能够在原核生物中大量表达蛋白, 特别是被诱导剂诱导后, 蛋白表达活性显著高于传统 Ptac 的诱导表达活性。

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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))。

启动子、其载体及其应用

技术领域

本发明属于生物工程技术领域，具体涉及启动子、其载体及其应用。

背景技术

启动子是一段控制着基因转录起始的关键 DNA 序列，对基因的表达具有重要的调控作用。启动子主要控制基因的转录水平，有研究通过大量的分析证明在控制基因表达的各种序列区域中，启动子区域的影响力超过 45%，因此，筛选高活性的启动子对基因表达的研究具有重要意义。

目前现有技术存在蛋白表达效率低，可用遗传工具少等问题，而开发可用于外源蛋白表达的高效启动子是解决这些问题的重要途径。近年来常用的诱导型启动子有 tac 启动子 (Ptac)、阿拉伯糖启动子、麦芽糖诱导启动子、丙酸诱导启动子、温度敏感启动子等，但是这些启动子的表达活力很有限，且可选择的种类少。鉴于诱导型启动子在蛋白表达和代谢工程研究中的重要意义，非常有必要开发一种谷氨酸棒杆菌的高活力的诱导型启动子。

发明内容

本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。在本部分以及本申请的说明书摘要和发明名称中可能会做些简化或省略以避免使本部分、说明书摘要和发明名称的目的模糊，而这种简化或省略不能用于限制本发明的范围。

作为本发明其中一个方面，本发明克服现有技术中存在的不足，提供启动子。

为解决上述技术问题，本发明提供了如下技术方案：启动子，其中：包括，启动子核心区序列，所述启动子核心区序列至少包含谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 的上游 91bp~180bp 区间序列。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：所述启动子至少包括启动子核心区序列，所述启动子核心区序列的 3' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 的上游第 91bp，5' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 的上游 181bp~200bp 中任一碱基。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：所述启动子的序列区间至少包括，3' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 的上游第 91bp，

5' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO:6 基因编码序列 ATG 的上游 201bp~257bp 中任一碱基。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：所述启动子的序列区间至少包括,3' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO:6 基因编码序列 ATG 的上游第 91bp, 5' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO:6 基因编码序列 ATG 的上游 201bp~345bp 中任一碱基。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：还包括 5' UTR 序列。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：所述 5' UTR 序列的长度为 90bp。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：所述 5' UTR 序列为谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 1bp~90bp 区间序列。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：还包括，源基因序列，所述源基因序列包括 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 以及 ATG 下游的碱基。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：所述源基因序列包括谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 以及 ATG 下游的 59bp 碱基。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：包括所述启动子序列的互补序列。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：包括源基因序列，所述源基因序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：所述启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：所述启动子能够被包括苯甲醇、苯甲醛、苯甲酸、儿茶酚的任一种或几种诱导。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：所述苯甲醇的诱导浓度范围为 1mM~50mM。

作为本发明所述的启动子的一种优选方案：所述苯甲醇的诱导浓度为 10mM。

作为本发明的另一个方面，本发明克服现有技术中存在的不足，提供载体。

为解决上述技术问题，本发明提供了如下技术方案：载体，其中：所述载体装载权利要求 1~15 任一所述的启动子。

作为本发明所述的载体的一种优选方案：所述载体包括蛋白表达载体，其核苷酸序列如 SEQ ID NO：4。

作为本发明的另一个方面，本发明克服现有技术中存在的不足，提供所述的启动子在蛋白表达中的应用。

为解决上述技术问题，本发明提供了如下技术方案：所述的启动子在蛋白表达中的应用。

作为本发明所述的启动子在蛋白表达中的应用的一种优选方案：所述启动子用于谷氨酸棒杆菌内源或外源蛋白的表达。

本发明的有益效果：将本发明启动子与基因片段进行构建组成表达框，能够在原核生物中大量表达蛋白，特别是被诱导剂诱导后，蛋白表达活性显著高于传统 P_{tac} 的诱导表达活性，是一种超高效启动子。本发明启动子能够用于原核生物内源或外源蛋白的高效表达。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案，下面将对实施例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性的前提下，还可以根据这些附图获得其它的附图。其中：

图 1 为表达载体 p19-0-ZDA 的序列图谱。

图 2 为 P_{ZDA} 不同长度诱导活性对比；

1：空质粒对照；2：P_{ZDA}-98bp 不加苯甲醇；3：P_{ZDA}-98bp 加苯甲醇（终浓度 10mM）；4：P_{ZDA}-180bp 不加苯甲醇；5：P_{ZDA}-180bp 加苯甲醇（终浓度 10mM）；6：P_{ZDA}-200bp 不加苯甲醇；7：P_{ZDA}-200bp 加苯甲醇（终浓度 10mM）；8：P_{ZDA}-257bp 不加苯甲醇；9：P_{ZDA}-257bp 加苯甲醇（终浓度 10mM）；10：P_{ZDA}-308bp 不加苯甲醇；11：P_{ZDA}-308bp 加苯甲醇（终浓度 10mM）；12：P_{ZDA}-345bp 不加苯甲醇；13：P_{ZDA}-345bp 加苯甲醇（终浓度 10mM）；14：P_{ZDA}-355bp 不加苯甲醇；15：P_{ZDA}-355bp 加苯甲醇（终浓度 10mM）；其中，P_{ZDA} 后的长度（98bp、180bp、200bp、257bp、308bp、345bp、355bp）代表 P_{ZDA} 位于 SEQ ID NO：6ATG 上游序列的长度。

图 3 为 P_{ZDA} 在不同诱导剂下的表达活性对比；

1：P_{ZDA} 不加诱导剂；2：P_{ZDA} 加苯甲醇（终浓度 10mM）；3：P_{ZDA} 加苯甲

醛（终浓度 10mM）；4: P_{ZDA} 加苯甲酸（终浓度 10mM）；5: P_{ZDA} 加儿茶酚（终浓度 10mM）。

图 4 为 P_{ZDA} 在不同浓度苯甲醇诱导下表达活性对比及其活性与 Ptac 活性对比；

1: Ptac 不加 IPTG；2: Ptac 加 IPTG（终浓度 100 μ M）；3: P_{ZDA} 不加苯甲醇；4、5、6、7、8 和 9: P_{ZDA} 加不同量的苯甲醇（终浓度依次为 1mM、10mM、15mM、20mM、25mM 和 50mM）。

图 5 为重组谷氨酸棒杆菌表达绿色荧光蛋白的 SDS-PAGE 实验分析图；

泳道 M: 蛋白 Marker26610；1: 空白对照；2: Ptac 不加 IPTG；3: Ptac 加 IPTG（终浓度 100 μ M）；4: P_{ZDA} 不加苯甲醇；5、6、7、8、9 和 10: 分别表示 P_{ZDA} 加不同量的苯甲醇（终浓度依次为 1mM、10mM、15mM、20mM、25mM 和 50mM）。

图 6 为重组谷氨酸棒杆菌应用 P_{ZDA} 表达人胃内因素蛋白应用实例；

泳道 M: 蛋白 Marker26610；1: 空白对照；2: 苯甲醇（终浓度 10mM）诱导表达人胃内因子。

图 7 重组谷氨酸棒杆菌表达 BNP 的 SDS-PAGE 实验分析图；

M: 蛋白 Marker26610；1: Ptac 不加 IPTG 2: Ptac 加 IPTG（终浓度 100 μ M）表达 BNP；3: P_{ZDA} 不诱导表达 BNP；4: P_{ZDA} 加苯甲醇（终浓度 10mM）诱导表达 BNP。

图 8 重组谷氨酸棒杆菌表达 BNP 的 ELISA 定量分析图；

1: Ptac 不加 IPTG；2: Ptac 加 IPTG（100 μ M）表达 BNP；3: P_{ZDA} 不诱导表达 BNP；4: P_{ZDA} 加苯甲醇（终浓度 10mM）诱导表达 BNP。

具体实施方式

为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂，下面结合具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明，但是本发明还可以采用其他不同于在此描述的其它方式来实施，本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似推广，因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

其次，此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少

一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个实施例中”并非均指同一个实施例，也不是单独的或选择性的与其他实施例互相排斥的实施例。

载体 p19-0 的构建：

本发明采用的质粒骨架包括探测载体 p19-0，该载体具有大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌的穿梭能力，能够在两种菌中稳定存在；该探测载体多克隆位点两侧分别有两个终止子，一个 T7 终止子和一个 *rrnB* 终止子，可以避免载体自带启动子对该表达框的影响。

探测载体 p19-0 的构建方法如下：

将 pXMJ19 质粒上的干扰性 *Bsa*I 酶切位点 GGTCTC 突变为 GGTCAC；

以 pXMJ19 为模版，p19-MUT-F、p19-MUT-R 为引物扩增突变后的线性质粒，产物用 *Dpn*I 37℃ 处理 2h 后直接转化到大肠杆菌 DH5 α ，得到正确突变的质粒命名为 p19-mut；

p19-MUT-F GATGGTAGTGTGGGGTCACCCCATGCGAGAGTAG

p19-MUT-R CTACTCTCGCATGGGGTGACCCACACTACCATC

反应体系为 10 $\times$ Q5 Buffer 5 μ L、dNTPs (2.5mmol/L) 4 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L、Q5DNA 聚合酶 (2U/ μ L) 0.5 μ L、模板 1 μ L，加水至 50 μ L；

PCR 扩增条件为：98℃ 3min；98℃ 15s；72℃ 3.25min，30 个循环；72℃ 2min；

使用 *Eco*R V 和 *Hind* III 对质粒 p19-mut 进行双酶切，去掉质粒中的 *lac* I 和 *tac* 启动子片段；使用引物 p19-0-F、p19-0-R 将两片段中间的骨架部分用 PCR 克隆出来，并在下游引物中加入 T7 终止子，得到的质粒为 p19-0；

p19-0-F ATCCTATCATGCCATACCGCG

p19-0-R

CCCAAGCTTCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTT
ATGCTA (下划线为酶切位点 *Hind* III)。

本发明质粒骨架载体可以替换为其他现有技术载体。

启动子的克隆 (本发明的启动子命名为 P_{ZDA})：

使用天根生化科技有限公司的细菌基因组提取试剂盒，提取谷氨酸棒杆菌

(以谷氨酸棒杆菌 CGMCC1.15647 为例) 的基因组, 用于启动子克隆模板; 本发明使用的谷氨酸棒杆菌 CGMCC1.15647, 其拉丁文命名为 *C. glutamicum* BZH 001, 于 2013 年受赠于张家港市华昌药业有限公司。

作为本发明其中一种实施方式: 选取 *C. glutamicum* BZH 001 的基因 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 355bp 至下游 62bp 序列区域设计启动子克隆引物 355ZDA-F 和 ZDA-R (SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 起始于 SEQ ID NO: 6 序列的第 501bp 碱基, SEQ ID NO: 6 基因编码序列为序列表 SEQ ID NO: 6 的第 501bp~第 1355bp), 克隆启动子序列及其下游基因 ATG 后 62bp 序列 (包含 ATG), 并在下游引物 ZDA-R 的 5' 端依次引入 15bp 的 RBS 序列 (AAAGGAGGACA ACTA) 和两个反向的 *Bsa* I 酶切位点以及一个 *Bam*HI 酶切位点, 且 *Bam*HI 酶切位点与第二个 *Bsa* I 酶切位点切口重合;

ZDA-F TTCGAAAGCTTCTTTGAAGCGGTGTGTGAC (下划线为酶切位点 *Hind* III)

ZDA-R
CCGGGGATCCGAGACCAAAAAATTTTTTGGTCTCACATTAGTTGTCCTCC
TTTTCAGTTGCCITGTTGCC (下划线酶切位点依次为 *Bam*HI、*Bsa* I 和 *Bsa* I)。

反应体系为 10×Q5 Buffer 5μL、dNTPs (2.5mmol/L) 4μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 1μL、Q5DNA 聚合酶 (2U/μL) 0.5μL、模板 1μL, 加水至 50μL。

PCR 扩增条件为: 98°C 3min; 98°C 15s; 60°C 15s; 72°C 15s, 30 个循环; 72°C 45s。

表达载体 p19-0-ZDA 的构建:

将前述通过 PCR 克隆的 P_{ZDA} 启动子片段和 p19-0 探测载体使用 TAKALA 公司的限制性核酸内切酶 *Bam*HI 和 *Hind* III 分别双酶切, 酶切后两片段使用 TAKALA 公司的 T4 DNA 连接酶进行连接, 得到表达载体 p19-0-ZDA。该表达质粒含有启动子 P_{ZDA}, 并在紧接启动子下游插入两个反向的 *Bsa* I 酶切位点, 方便基因的无痕插入。表达载体 p19-0-ZDA 的序列如 SEQ ID NO: 4。

EGFP 表达载体 p19-0-ZDA-egfp 的构建:

以 EGFP 为例, 将 EGFP 作为报告基因用来测试本发明启动子的活性。

采用引物 egfp-F 和 egfp-R 对荧光蛋白 EGFP 的基因 egfp 进行克隆, 并通

过 Bsa I 酶切位点克隆到表达载体 p19-0-ZDA 的启动子 P_{ZDA} 的下游得到 EGFP 表达载体 p19-0-ZDA-egfp, 进行荧光蛋白 EGFP 的表达。egfp 的基因序列如 SEQ ID NO: 5 所示。

egfp-F AAGGTCCTCAAATGGTGAGCAAGGGCGA (下划线酶切位点为 *Bsa I*)

egfp-R AAGGTCCTCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG (酶切位点 *Bsa I*)

反应体系为 10×Q5 Buffer 5μL、dNTPs (2.5mmol/L) 4μL、上下游引物 (10μmol/L) 各 1μL、Q5DNA 聚合酶 (2U/μL) 0.5μL、模板 1μL, 加水至 50μL。

PCR 扩增条件为: 98°C 3min; 98°C 15s; 60°C 15s; 72°C 30s, 30 个循环; 72°C 1min15s。

本发明以 EGFP 作为其中一种“报告基因”用来测试本发明启动子的活性, EGFP 也可以替换为其他内源基因、外源基因等目的基因。

启动子鉴定:

首先对本发明启动子 P_{ZDA} 进行 5' race 实验, 确定该启动子的转录起始位点在 SEQ ID NO: 6 基因 ATG 上游 91bp 处。方法为使用 5' race 试剂盒 SMARTer® RACE 5' /3' Kit (TaKaRa, 中国), 严格按照说明书操作, 确定该启动子的转录起始位点为 SEQ ID NO: 6ATG 上游 91bp 处。初步判定启动子核心区在 ATG 上游 91bp 之前, 5' UTR 为 ATG 上游 1-90bp。

然后, 分别设计上游引物 98ZDA-F (指启动子的 5' 端位于 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 98bp)、180ZDA-F (指启动子的 5' 端位于 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 180bp)、200ZDA-F (指启动子的 5' 端位于 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 200bp)、257ZDA-F (指启动子的 5' 端位于 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 257bp)、308ZDA-F (指启动子的 5' 端位于 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 308bp) 和 345ZDA-F (指启动子的 5' 端位于 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 345bp) 对 P_{ZDA} 的 5' 端进行截短。

作为本发明其中一种实施方式, 选取 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 下游 62bp 序列区域作为源基因, 即本发明启动子 3' 端位于 SEQ ID NO: 6

基因编码序列 ATG 及 ATG 下游 59bp, 源基因序列如 SEQ ID NO: 2 所示。作为源基因, SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 及 ATG 下游 59bp 仅为本发明其中一种实施方式, 本发明研究发现, 源基因的片段程度可以进行调整, 而仍然使本发明启动子具备诱导表达活性。

作为本发明其中一种实施方式, 操作方式为分别用上述引物与引物 egfp-R 组合, 以 p19-0-ZDA-egfp 质粒为模板进行 PCR 扩增 (PCR 体系和扩增程序同上), 将扩增得到的片段分别用 *Hind III* 和 *BamHI* 双酶切后连入探测载体 p19-0 构建相应的 EGFP 表达载体, 将构建好的载体通过大肠杆菌 DH5 α 克隆后分别电击转化谷氨酸棒杆菌, 氯霉素抗性平板进行筛选, 并通过菌落 PCR 验证, 即可得到含有表达载体并能够表达荧光蛋白的重组谷氨酸棒杆菌; 通过测量单位菌体 OD₆₀₀ 的荧光强度可以反应荧光蛋白 EGFP 的表达量, 间接测定启动子的强度。

98ZDA-F TTCGAAAGCTTTTGTTGTTATCGAGTTCAAC (下划线为酶切位点 *Hind III*)

180ZDA-F TTCGAAAGCTTAGAAATATTTATGCTTCTAAAG (下划线为酶切位点 *Hind III*)

200ZDA-F TTCGAAAGCTTTGCTTGAAGTGGGGTTA (下划线为酶切位点 *Hind III*)

257ZDA-F TTCGAAAGCTTCCCTAGGGTTTGCTCG (下划线为酶切位点 *Hind III*)

308ZDA-F TTCGAAAGCTTGCGTATGACCAACAGTG (下划线为酶切位点 *Hind III*)

345ZDA-F TTCGAAAGCTTGTGTGTGACATTTGCGAG (下划线为酶切位点 *Hind III*)

将含表达载体的重组谷氨酸棒杆菌接种到 5mL 含氯霉素浓度为 10 μ g/L 的 LBB 液体培养基, 于 30 ° C 230rpm 过夜培养制备种子液, 分别测定各种子液的 OD₆₀₀; 将各种子液分别转接于新鲜的 20mL/100mL (100mL 三角瓶装有 20mL 的培养基) LB 培养基, 使初始 OD₆₀₀ 均为 0.2, 30 ° C 230rpm 进行摇瓶培养, 其中各个重组菌于培养 2h 后加入诱导剂; 并于培养 20h 后, 分别用紫外分光光度计和荧光分光光度计测菌体 OD₆₀₀ 和菌体荧光强度, 并计算得出各菌株的

单位 OD₆₀₀ 的荧光强度用于表达活性的比较。

不同长度的 P_{ZDA} 在苯甲醇（终浓度 10mM）诱导下的表达活性，结果如图 2；当启动子位于 SEQ ID NO: 6 基因 ATG 上游序列的长度截短为 345bp 时启动子诱导表达活性与 355bp 长度对应的启动子诱导表达活性相当，因此说明本发明启动子可以包括所述 SEQ ID NO: 6 基因 ATG 上游 345bp 的 5' 端更长的序列，也可以不包括。

本发明继续选择不同长度片段的启动子用以研究启动子的活性，继续截短启动子位于 SEQ ID NO: 6 ATG 上游序列的长度为 308bp，启动子诱导表达活性虽然相较于 345bp 有所下降，但其启动子表达活性仍然明显高于现有技术的 Ptac 启动子（结合本发明图 2、图 5、图 8 可以看出，本发明 257P_{ZDA} 启动子在不经诱导剂诱导表达的条件下，其启动子表达活性已经相当于甚至高于现有技术 Ptac 在诱导剂诱导表达状态下的表达活性），当截短到 200bp 时，该启动子虽然不具有诱导表达活性，但仍具有良好的表达活性，当截短到 180bp 时，该启动子虽然不具有诱导表达活性，但仍具有良好的表达活性，以上实验表明 P_{ZDA} 的操纵子序列位于 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 201bp~345bp 之间，核心区序列位于 ATG 上游 200bp 之后；当启动子位于 SEQ ID NO: 6 ATG 上游序列的长度截短到 98bp 时，该启动子诱导表达活性完全丧失，与空质粒对照单位 OD₆₀₀ 荧光强度相当。本发明 P_{ZDA} 启动子长度为 SEQ ID NO: 6 ATG 上游 345bp 时诱导表达活性最好，单位 OD₆₀₀ 的荧光强度达到 16272，选取该结构进行后续实验。

因此，作为本发明启动子的其中一种优选方案：

本发明启动子中，操纵子区序列为谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 201bp~345bp 序列，其中，谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 345bp 长度序列如 SEQ ID NO: 1 所示；启动子核心区序列为谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 91bp~200bp 序列；

5' UTR 序列为谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 1bp~90bp 序列；部分源基因序列包括 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 和 ATG 下游的 59bp 序列，如 SEQ ID NO: 2 所示。优选地，该启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

启动子诱导活性鉴定：

分别使用苯甲醇、苯甲醛、苯甲酸和儿茶酚作为诱导剂进行了 P_{ZDA} 诱导活性实验，实验结果如图 3 所示，可见苯甲醇、苯甲醛、苯甲酸和儿茶酚对 P_{ZDA} 均有明显诱导活性，但相同浓度下（10mM），苯甲醇的诱导效果最好，单位 OD600 的荧光强度达到 16601。

以苯甲醇作为诱导剂，设置不同的浓度梯度比较 P_{ZDA} 活性的变化，对比结果如图 4 所示， $345P_{ZDA}$ 启动子在一个很宽的苯甲醇浓度范围（1mM~50mM）都有诱导活性，但在终浓度为 10mM 的 LB 培养基中表达活性最高，且远高于对照 Ptac 的表达活性，单位 OD600 的荧光强度达到 16740。

同时对各菌株表达外源蛋白情况进行 SDS-PAGE 分析：取 PBS 洗三次的等量菌体，分别用等量的 PBS 重悬菌体，并加入等量的细玻璃珠，用高通量匀质器破菌提蛋白；将匀质液离心，取溶有蛋白的上清跑蛋白胶，蛋白胶上层为 4% 的浓缩胶，下层为 12% 的分离胶；结果如图 5 所示，可见各菌株表达 EGFP（表观分子量约 30kDa）的结果与单位 OD600 菌体荧光强度结果相一致。

Ptac 是以上述 RBS 序列（AAAGGAGGACA ACTA）、外源基因片段与质粒 pXMJ19 共同构建的阳性对照质粒，应用质粒 pXMJ19 自身 Ptac 启动子，这一经典的阳性对照代表了谷氨酸棒杆菌高效表达重组蛋白的水平，其构建包括以下步骤：

克隆由 RBS 序列与 egfp 基因构成基因片段，egfp 基因如 SEQ ID NO: 5 所示，所需的引物为：SD-EGFP-F 和 SD-EGFP-R。所用的 PCR 反应体系和程序同上；

SD-EGFP-F CCCAAGCTTAAAGGAGGACA ACTAATGGTGAGCAAGGGCG
（酶切位点 *Hind III*）

SD-EGFP-R CCCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG （酶切位点 *BamHI*）

Hind III 和 *BamHI* 双酶切；

T4DNA 连接酶连接。

启动子强弱鉴定：

采用如上所说实验方案，使用引物 GIF-F 和 GIF-R 将人胃内因子蛋白（GIF，表观分子量约 45kDa，GeneID: 2694）作为表达基因进行表达，成功在菌体超声破碎沉淀中检测到大量蛋白表达，结果如图 6 所示。

GIF-F: AAGGTCTCAAATGGCCTGGTTTGCCCTG (下划线为酶切位点为 *Bsa I*)

GIF-R: AAGGTCTCGGATCCTTAATACTGGGTGAAATTGGCG (酶切位点为 *Bsa I*);

采用如上所说实验方案,使用引物:NT-ProBNP-F和NT-ProBNP-R将表达基因替换为HIS-SUMO-N端脑钠肽前体(NT-proBNP,表观分子量约25kDa,GeneID:4879)进行表达,并将含有Ptac,受IPTG诱导表达外源基因的Ptac载体做对照,结果如图7、图8所示,SDS-PAGE分析结果与ELISA定量分析结果一致,成功在菌体超声破碎的上清中检测到大量蛋白表达,并且本申请启动子345P_{ZDA}在苯甲醇诱导下比IPTG诱导的Ptac表达活性更高,HIS-SUMO-N端脑钠肽前体的表达量达到440.43mg/L。

NT-ProBNP-F : AAGGTCTCAAATGGGTCATCATCACCACCACCAC (酶切位点为 *Bsa I*)

NT-ProBNP-R : AAGGTCTCGGATCCTTAGCGCGGGGCACGCAG (酶切位点为 *Bsa I*);

结果证明,本发明的来源于谷氨酸棒杆菌的诱导型启动子345P_{ZDA}在苯甲醇诱导下比IPTG诱导的Ptac表达EGFP、HIS-SUMO-N端脑钠肽前体活性明显更高,结合本发明图2、图5、图8可以看出,本发明257P_{ZDA}启动子在不经诱导剂诱导表达的条件下,其启动子表达活性已经相当于甚至高于现有技术Ptac在诱导剂诱导表达状态下的表达活性,本发明启动子在谷氨酸棒杆菌表达外源蛋白以及代谢工程改造中具有重要意义。

应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

权 利 要 求 书

1、启动子，其特征在于：包括，启动子核心区序列，所述启动子核心区序列至少包含谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO:6 基因编码序列 ATG 的上游 91bp~180bp 区间序列。

2、如权利要求 1 所述的启动子，其特征在于：所述启动子至少包括启动子核心区序列，所述启动子核心区序列的 3' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 的上游第 91bp，5' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 的上游 181bp~200bp 中任一碱基。

3、如权利要求 2 所述的启动子，其特征在于：所述启动子的序列区间至少包括，3' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO:6 基因编码序列 ATG 的上游第 91bp，5' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO:6 基因编码序列 ATG 的上游 201bp~257bp 中任一碱基。

4、如权利要求 2 所述的启动子，其特征在于：所述启动子的序列区间至少包括，3' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO:6 基因编码序列 ATG 的上游第 91bp，5' 端位于谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO:6 基因编码序列 ATG 的上游 201bp~345bp 中任一碱基。

5、如权利要求 1~4 中任一所述的启动子，其特征在于：还包括 5' UTR 序列。

6、如权利要求 5 所述的启动子，其特征在于：所述 5' UTR 序列的长度为 90bp。

7、如权利要求 6 所述的启动子，其特征在于：所述 5' UTR 序列为谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 上游 1bp~90bp 区间序列。

8、如权利要求 1~4、6、7 中任一所述的启动子，其特征在于：还包括，源基因序列，所述源基因序列包括 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 以及 ATG 下游的碱基。

9、如权利要求 8 所述的启动子，其特征在于：所述源基因序列包括谷氨酸棒杆菌 SEQ ID NO: 6 基因编码序列 ATG 以及 ATG 下游的 59bp 碱基。

10、如权利要求 1~4、6、7、9 中任一所述的启动子，其特征在于：包括所述启动子序列的互补序列。

11、如权利要求 1~4、6、7、9 中任一所述的启动子，其特征在于：包括源基因序列，所述源基因序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

12、如权利要求 1~4、6、7、9 中任一所述的启动子，其特征在于：所述启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

13、如权利要求 3、4、6、7、9 任一所述的启动子，其特征在于：所述启动子能够被包括苯甲醇、苯甲醛、苯甲酸、儿茶酚的任一种或几种诱导。

14、如权利要求 13 所述的启动子，其特征在于：所述苯甲醇的诱导浓度范围为 1mM~50mM。

15、根据权利要求 14 所述的启动子，其特征在于：所述苯甲醇的诱导浓度为 10mM。

16、载体，其特征在于：所述载体装载权利要求 1~15 任一所述的启动子。

17、如权利要求 16 所述的载体，其特征在于：所述载体包括蛋白表达载体，其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4。

18、权利要求 1~17 任一所述的启动子在蛋白表达中的应用。

19、如权利要求 18 所述的应用，其特征在于：所述启动子用于谷氨酸棒杆菌内源或外源蛋白的表达。

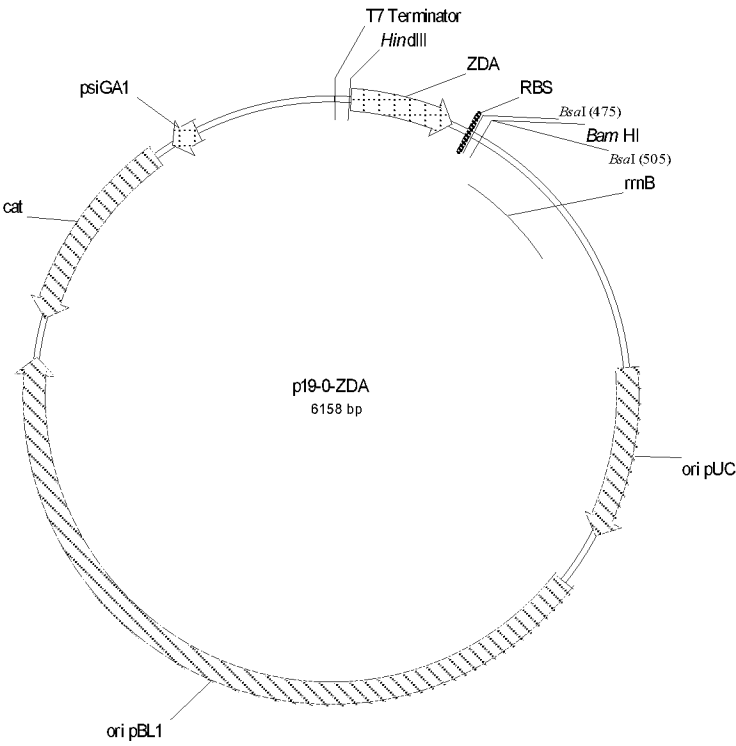


图 1

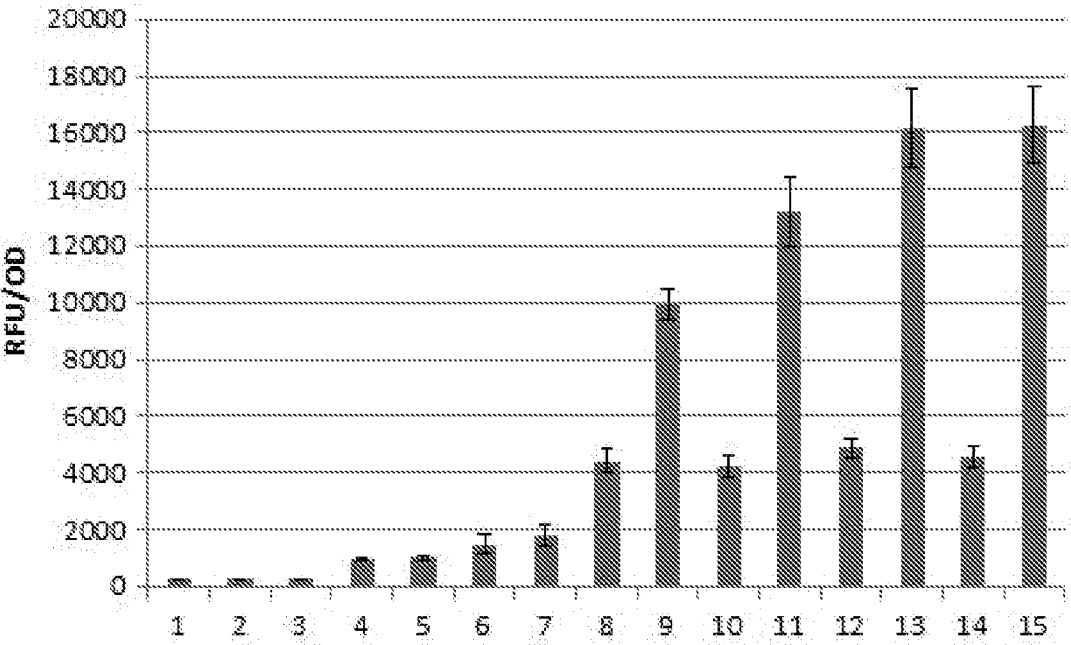


图 2

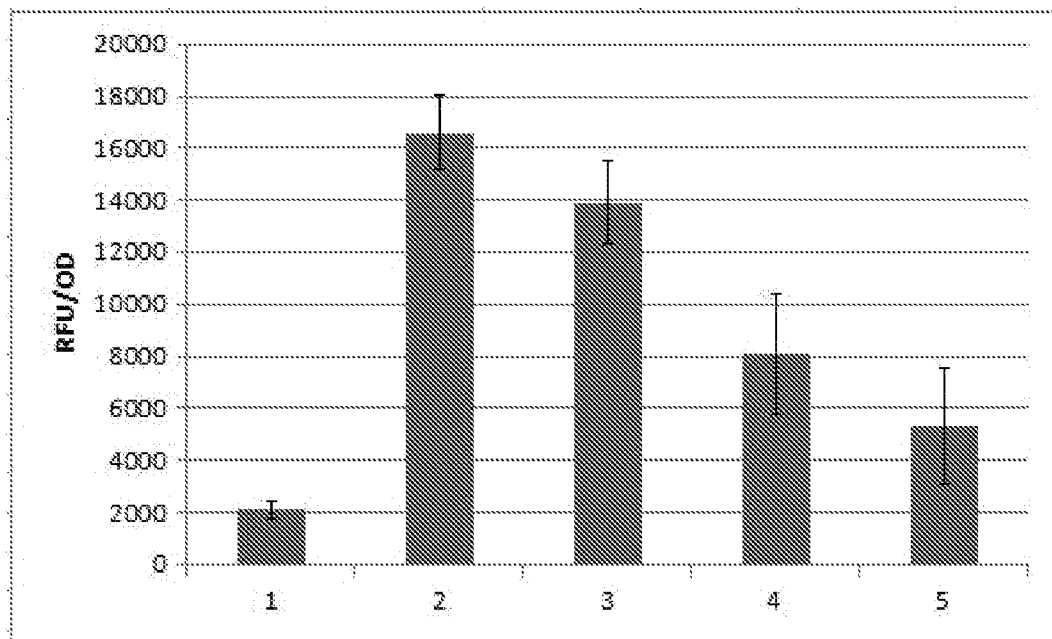


图 3

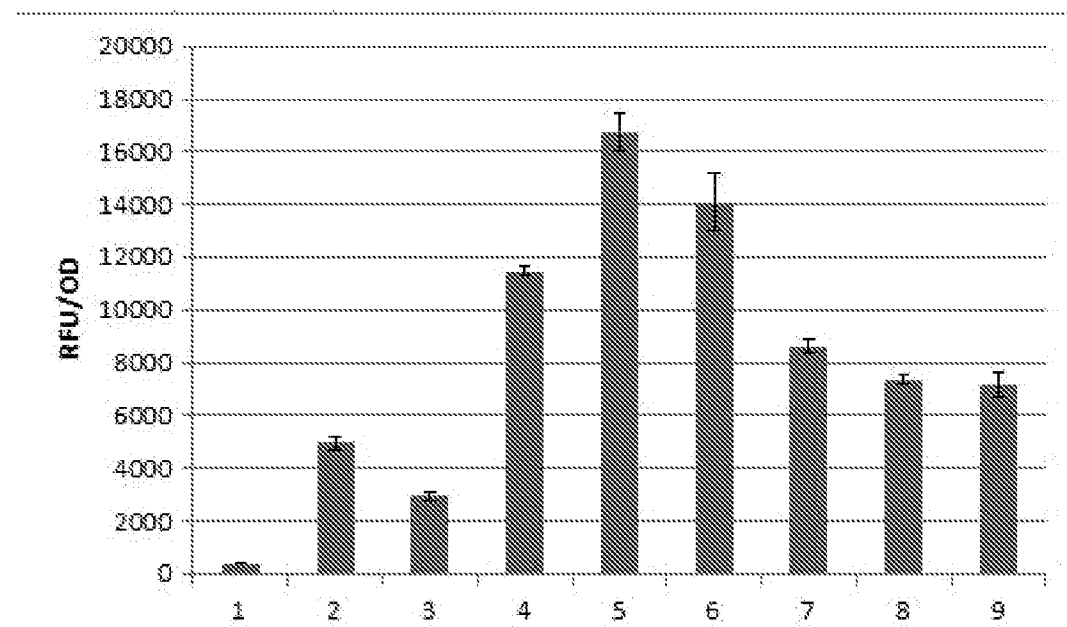


图 4

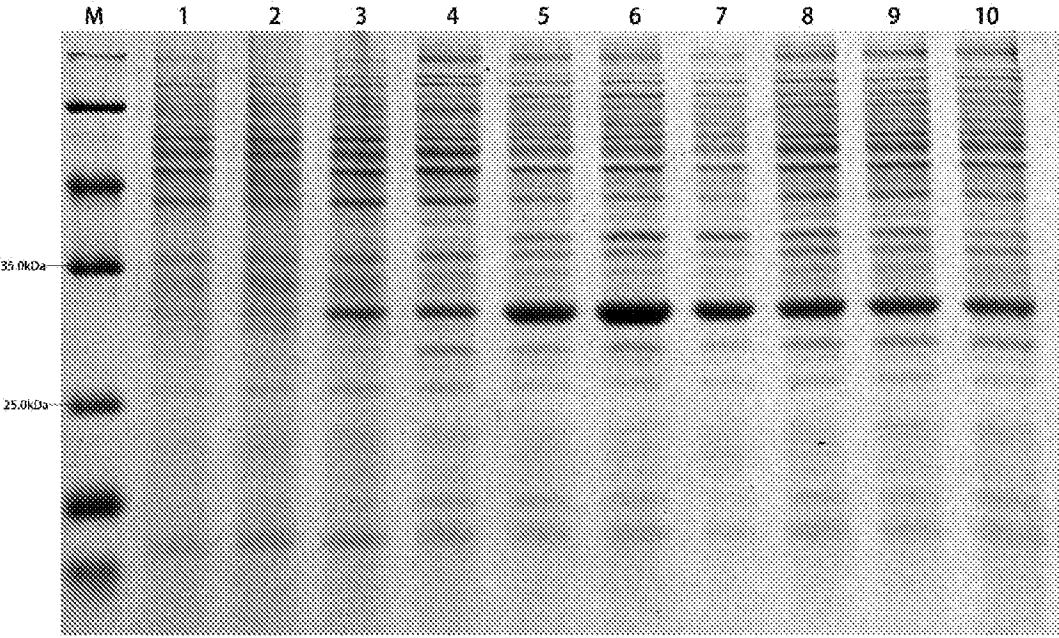


图 5

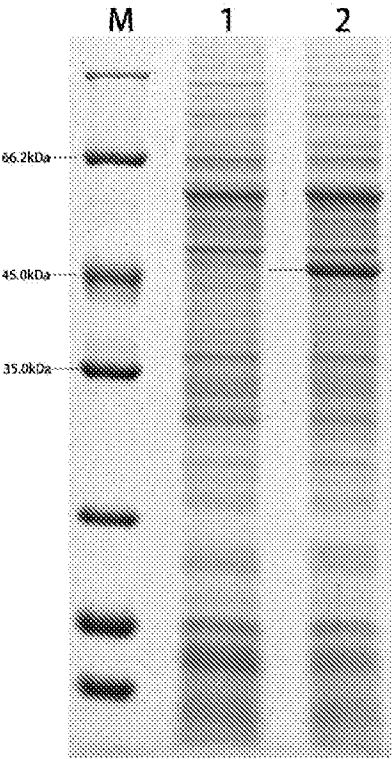


图 6

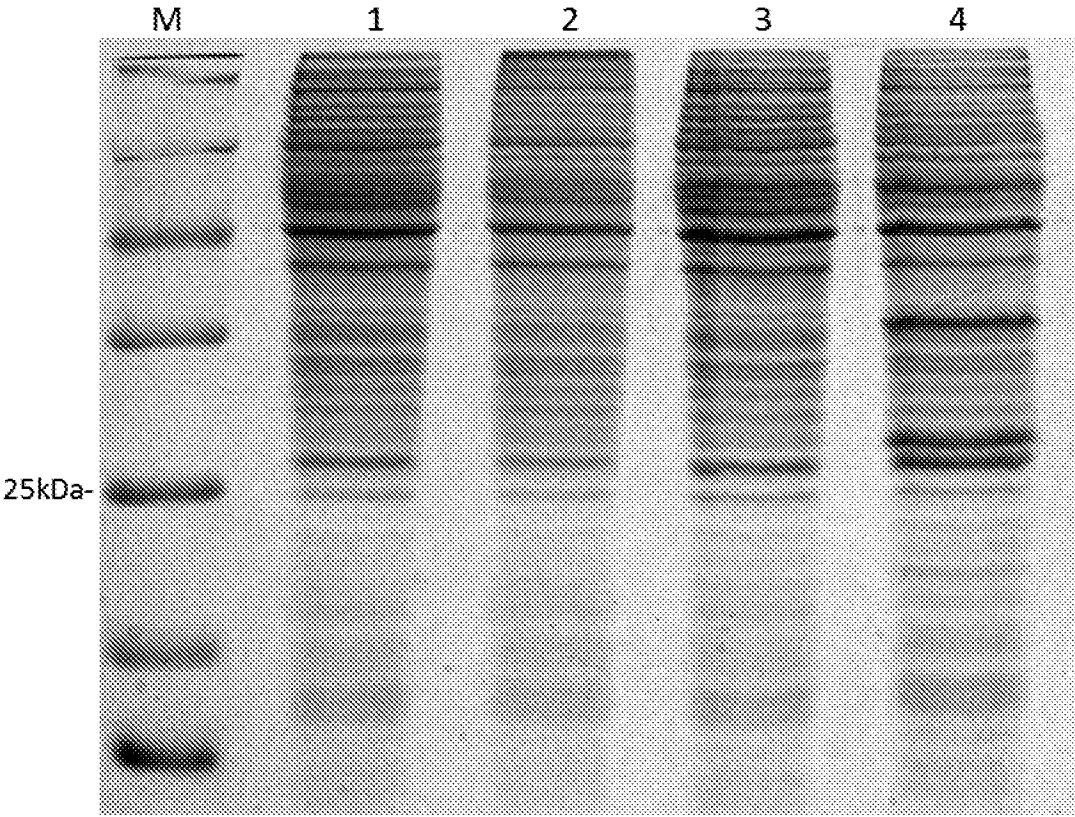


图 7

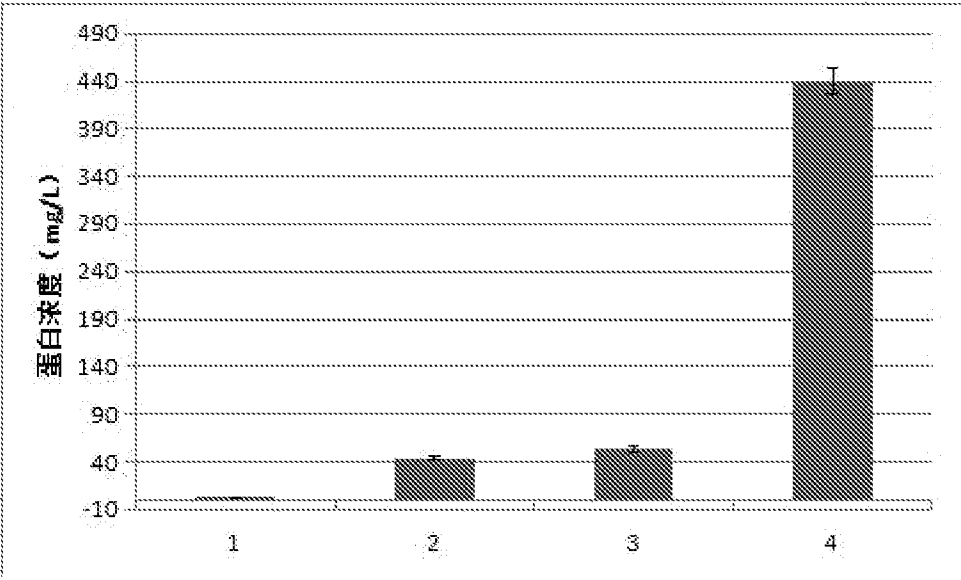


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/110217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/77(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

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: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+中国专利生物序列检索系统, GENBANK+EMBL+Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; keywords: 启动子, 谷氨酸棒杆菌, UTR, promoter, Corynebacterium glutamicum, 对序列SEQ ID Nos: 3/6 的检索, search for SEQ ID Nos: 3/6

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1766111 A (BASF AG) 03 May 2006 (2006-05-03) see entire document, especially see SEQ ID NO: 399/409	1-19
A	Harhay, G.P. et al. "Corynebacterium Glutamicum Strain USDA-ARS-USMARC-56828, Complete Genome" <i>DATABASE Genbank [Online], Accession number: CP013991.1</i> , 22 February 2016 (2016-02-22), see no. 2460006-2458649 and its related sequences	1-19
A	CN 107164369 A (WUHAN GRAND HOYO CO., LTD.) 15 September 2017 (2017-09-15) see entire document	1-19
A	US 1004735 B1 (ZYMERGEN INC.) 14 August 2018 (2018-08-14) see entire document	1-19
A	KR 20170112103 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 12 October 2017 (2017-10-12) see entire document	1-19



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

17 May 2019

Date of mailing of the international search report

11 June 2019

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/CN2018/110217

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	王崇慧等 (WANG, Chonghui et al.). "Corynebacterium glutamicum组成型启动子及核糖体结合位点的研究 (non-official translation: Study on Constitutive Promoter and Ribosome Binding Site of Corynebacterium Glutamicum)" <i>基因组学与应用生物学 (Genomics and Applied Biology)</i> , Vol. 36, No. 5, 31 December 2017 (2017-12-31), ISSN: 1674-568X, pp. 1971-1978, see entire document	1-19
A	Miroslav Pa'tek et al. "Promoters of Corynebacterium Glutamicum" <i>Journal of Biotechnology</i> , Vol. 104, 31 December 2003 (2003-12-31), ISSN: 0168-1656, pp. 311-323, see entire document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/110217

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/CN2018/110217

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	1766111	A	03 May 2006	US	7273721	B2	25 September 2007
				RU	2304616	C2	20 August 2007
				CN	1990868	A	04 July 2007
				KR	20070087031	A	27 August 2007
				US	2007111232	A1	17 May 2007
				CA	2585907	A1	24 April 2008
				US	2008096211	A1	24 April 2008
				EP	2302058	A1	30 March 2011
				JP	2007259859	A	11 October 2007
				IN	200705726	P4	28 March 2008
				CZ	200104658	A3	11 September 2002
				AU	783706	B2	24 November 2005
				BR	0011803	A	09 April 2002
				HU	0203647	A2	28 January 2003
				WO	0100842	A3	23 August 2001
				ES	2176128	T1	01 December 2002
				MX	2001012841	A1	01 July 2003
				ZA	200200585	A	27 October 2004
				SK	18902001	A3	10 September 2002
CN	107164369	A	15 September 2017	WO	2018171488	A1	27 September 2018
US	1004735	B1	14 August 2018	US	2018216100	A1	02 August 2018
KR	20170112103	A	12 October 2017	KR	1834286	B1	06 March 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/110217

A. 主题的分类 C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/77(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 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: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+中国专利生物序列检索系统; 关键词: 启动子, 谷氨酸棒杆菌, UTR, promoter, Corynebacterium glutamicum, 对序列SEQ ID NOs: 3/6的检索																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 1766111 A (BASF公司) 2006年 5月 3日 (2006 - 05 - 03) 参见全文, 具体参见SEQ ID NO:399/409</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Harhay, G.P. 等. "Corynebacterium glutamicum strain USDA-ARS-USMARC-56828, complete genome" DATABASE Genbank [Online], 登录号: CP013991.1, 2016年 2月 22日 (2016 - 02 - 22), 参见第2460006-2458649位及其相关序列</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107164369 A (武汉远大弘元股份有限公司) 2017年 9月 15日 (2017 - 09 - 15) 参见全文</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 1004735 B1 (ZYMERGEN INC) 2018年 8月 14日 (2018 - 08 - 14) 参见全文</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 20170112103 A (KOREA INST SCI & TECHNOLOGY) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 参见全文</td> <td>1-19</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 1766111 A (BASF公司) 2006年 5月 3日 (2006 - 05 - 03) 参见全文, 具体参见SEQ ID NO:399/409	1-19	A	Harhay, G.P. 等. "Corynebacterium glutamicum strain USDA-ARS-USMARC-56828, complete genome" DATABASE Genbank [Online], 登录号: CP013991.1, 2016年 2月 22日 (2016 - 02 - 22), 参见第2460006-2458649位及其相关序列	1-19	A	CN 107164369 A (武汉远大弘元股份有限公司) 2017年 9月 15日 (2017 - 09 - 15) 参见全文	1-19	A	US 1004735 B1 (ZYMERGEN INC) 2018年 8月 14日 (2018 - 08 - 14) 参见全文	1-19	A	KR 20170112103 A (KOREA INST SCI & TECHNOLOGY) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 参见全文	1-19
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	CN 1766111 A (BASF公司) 2006年 5月 3日 (2006 - 05 - 03) 参见全文, 具体参见SEQ ID NO:399/409	1-19																		
A	Harhay, G.P. 等. "Corynebacterium glutamicum strain USDA-ARS-USMARC-56828, complete genome" DATABASE Genbank [Online], 登录号: CP013991.1, 2016年 2月 22日 (2016 - 02 - 22), 参见第2460006-2458649位及其相关序列	1-19																		
A	CN 107164369 A (武汉远大弘元股份有限公司) 2017年 9月 15日 (2017 - 09 - 15) 参见全文	1-19																		
A	US 1004735 B1 (ZYMERGEN INC) 2018年 8月 14日 (2018 - 08 - 14) 参见全文	1-19																		
A	KR 20170112103 A (KOREA INST SCI & TECHNOLOGY) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 参见全文	1-19																		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * 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 </td> <td style="vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			* 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																
* 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																		
2019年 5月 17日		2019年 6月 11日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员																		
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		于娜 电话号码 86-10-62089160																		

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	王崇慧等. "Corynebacterium glutamicum组成型启动子及核糖体结合位点的研究" 基因组学与应用生物学, 第36卷, 第5期, 2017年 12月 31日 (2017 - 12 - 31), ISSN: 1674-568X, 第1971-1978页, 参见全文	1-19
A	Miroslav Pa' tek等. "Promoters of Corynebacterium glutamicum" Journal of Biotechnology, 第104卷, 2003年 12月 31日 (2003 - 12 - 31), ISSN: 0168-1656, 第311-323页, 参见全文	1-19

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/CN2018/110217

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)
CN	1766111	A	2006年 5月 3日	US	7273721	B2	2007年 9月 25日
				RU	2304616	C2	2007年 8月 20日
				CN	1990868	A	2007年 7月 4日
				KR	20070087031	A	2007年 8月 27日
				US	2007111232	A1	2007年 5月 17日
				CA	2585907	A1	2008年 4月 24日
				US	2008096211	A1	2008年 4月 24日
				EP	2302058	A1	2011年 3月 30日
				JP	2007259859	A	2007年 10月 11日
				IN	200705726	P4	2008年 3月 28日
				CZ	200104658	A3	2002年 9月 11日
				AU	783706	B2	2005年 11月 24日
				BR	0011803	A	2002年 4月 9日
				HU	0203647	A2	2003年 1月 28日
				WO	0100842	A3	2001年 8月 23日
				ES	2176128	T1	2002年 12月 1日
				MX	2001012841	A1	2003年 7月 1日
				ZA	200200585	A	2004年 10月 27日
				SK	18902001	A3	2002年 9月 10日
CN	107164369	A	2017年 9月 15日	WO	2018171488	A1	2018年 9月 27日
US	1004735	B1	2018年 8月 14日	US	2018216100	A1	2018年 8月 2日
KR	20170112103	A	2017年 10月 12日	KR	1834286	B1	2018年 3月 6日