(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
2019 年 11 月 14 日 (14.11.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/214347 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/76 (2006.01) *C12N 15/65* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/078798

(22) 国际申请日: 2019 年 3 月 20 日 (20.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810443289.2 2018年5月10日 (10.05.2018) CN

(71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(72) 发明人: 李永泉(LI, Yongquan); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。毛旭明(MAO, Xuming); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。罗帅(LUO, Shuai); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 杭州求是专利事务所有限公司(HANGZHOU QIUSHI PATENT OFFICE CO., LTD.); 中国浙江省杭州市西湖区玉古路147号黄鸿年科技综合大楼215赵杭丽, Zhejiang 310027 (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, 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))。
— 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** GENETIC SCREENING METHOD FOR NEGATIVE REGULATORY FACTOR OF STREPTOMYCES BIOSYNTHESIS GENE CLUSTER

(54) 发明名称: 一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的遗传筛选方法

(57) **Abstract:** Provided is a screening method for a negative regulatory factor of a Streptomyces biosynthesis gene cluster, the method comprising: constructing a reporting system in Streptomyces cells, which is mediated by a promoter of a gene of interest of the Streptomyces cells, using a random mutant system constructed on the basis of transposon Himar1 to perform random mutation on the Streptomyces cells containing the reporting system, subjecting the mutated Streptomyces strain to an enhanced screening to obtain a Streptomyces strain with high expression of the gene of interest, performing phage packaging on a genome of the Streptomyces strain with high expression of the gene of interest, and screening cosmids having randomly inserted fragments, and sequencing DNA of the cosmids to determine the position of the randomly inserted fragment in the genome of the Streptomyces strain with high expression of the gene of interest.

(57) 摘要: 提供了一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的筛选方法，该方法包括：在链霉菌细胞内构建一个以自身目的基因的启动子介导的报告系统，再使用基于转座子Himar1构建的随机突变体系对带报告系统的链霉菌作随机突变，将突变后的链霉菌菌株进行强化筛选，得到目的基因高表达的链霉菌菌株，对目的基因高表达的链霉菌菌株的基因组进行噬菌体包装并筛选出带有随机插入片段的粘粒，对粘粒的DNA测序确定目的基因高表达的链霉菌菌株基因组中随机插入片段插入的位置。

WO 2019/214347 A1

一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的遗传筛选方法

技术领域

[0001]本发明涉及生物化学与分子生物学领域，特别涉及一种新的链霉菌生物合成基因簇负调控因子的遗传筛选方法。

背景技术

[0002]过去几个世纪，科学家们从自然界中分离筛选出了数以万计的天然产物。然而近几十年来，科学家发现并分离新天然产物的难度与日俱增。自本世纪初开始蓬勃发展的基因组学，为我们发现新天然产物指明了新的方向。许多蛋白质在生物体内具有调控作用，其中有一类调控蛋白可以参与基因的表达的调控，它们可以激活或者抑制特定基因的转录水平。研究人员们企图通过寻找特异性的调控因子，激活并高表达生物体内新的次级代谢基因簇，从而发现并分离出更多有意思的化合物。然而，我们遏待简单、准确、高效的分子生物学手段，来寻找被沉默基因簇的途径特异性调控因子，以进一步激活并高表达生物体内被沉默或抑制表达的新化合物合成基因簇。

[0003]作为一个强而有力的基因组修饰工具，转座子广泛地被应用于真核细胞的基因改造中。转座子可以随机或特异性地插入基因组中的某个位置，从而影响该位置基因后续转录翻译进程，造成生物体内目的基因的功能缺失。

[0004]链霉菌属于放线菌，是革兰氏阳性菌。链霉菌具有复杂的生命周期，包括从基质菌丝、气生菌丝到孢子的形态分化。在链霉菌生命周期的不同阶段，其体内的调控蛋白通过激活或者抑制各种基因的转录水平，调控这些生命周期平稳有序地进行。世界上现在使用的大部分的抗生素都是由链霉菌次级代谢生产。因此链霉菌体内次级代谢产物合成基因簇途径特异性调控因子的发掘研究不论是从基础科研还是从工业生产上来说，都具有极其重要的意义。

[0005]调控蛋白对其调控的目的基因簇的调控作用是通过调节目的基因簇的启动子活性进行的。基于以上基础，我们发明了一种新的链霉菌生物合成基因簇未知负调控因子的体内遗传筛选方法。该方法高效，准确，操作方便，为链霉菌体内目的基因簇调控因子的筛选提供了一种新的研究方式。

发明内容

[0006]本发明的目的是针对链霉菌体内基因簇调控蛋白的遗传筛选研究，提供一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的遗传筛选方法，是一种调控蛋白体内筛选的新方法。

[0007]本发明在链霉菌细胞内构建一个以自身目的基因的启动子介导的报告系统，然后使用基于转座子 *Himar1* 构建的随机突变体系对带有报告系统的链霉菌进行随机突变。接着将随机突变后的链霉菌菌株进行强化筛选，得到目的基因高表达的链霉菌菌株。第四步通过噬菌

体包装的方法，对目的基因高表达的链霉菌菌株的基因组进行包装并筛选出带有随机插入片段的 cosmid。最后通过对 cosmid 的 DNA 测序确定目的基因高表达的链霉菌菌株基因组中随机插入片段插入的位置。具体步骤如下：

[0008]（1）选定链霉菌基因组中需要筛选调控因子的目的基因，扩增出目的基因的上游启动子序列；

[0009]（2）选择链霉菌体内可用的报告基因系统，构建该报告基因系统在该链霉菌体内可遗传操作的质粒体系，并确定质粒体系中，报告基因上游无启动子；

[0010]（3）将步骤（1）中的启动子序列整合入步骤（2）中报告质粒系统内报告基因上游；

[0011]（4）将步骤（3）得到的报告质粒通过接合转导入野生型链霉菌中，并验证；

[0012]（5）根据选择的报告基因系统，对步骤（4）得到的链霉菌菌株进行报告基因表达水平的阈值筛选；

[0013]（6）扩增三个 DNA 片段：①潮霉素抗性基因 *hph*；②潮霉素诱导启动子以及转座子 *tipAp-Himar1*；③中间加入阿泊拉霉素抗性基因的随机插入片段 ITR-*aac(3)IV*-ITR；

[0014]（7）以质粒 pKC1139 为骨架，将步骤（5）中扩增出来的三个片段分别插入质粒 pKC1139 中，得到质粒 pLRM04；

[0015]（8）将步骤（6）得到的质粒 pLRM04，接合转导入步骤（3）得到的含有报告质粒的链霉菌中，并验证；

[0016]（9）将步骤（8）得到的链霉菌菌株进行培养，并在培养过程中加入一定浓度的潮霉素，以激活 *tipAp-Himar1* 基因的表达，启动转座子活性，将 ITR-*aac(3)IV*-ITR 片段随机插入链霉菌基因组后，收集到大量的随机突变菌株；

[0017]（10）将步骤（9）得到的随机突变菌株，以步骤（5）得到的报告基因阈值进行筛选，筛选出表型高于步骤（5）阈值的菌株；

[0018]（11）将步骤（10）得到的链霉菌菌株进行液体培养后抽提高质量的基因组。并均匀打成一定大小的片段；

[0019]（12）使用 T4 DNA 聚合酶将步骤（11）得到的片段全部补成平末端，并去磷酸化。将线性化后的 cosmid 去磷酸化后，使用平末端酶酶切，将与本步骤得到的基因组片段相互连接；

[0020]（13）使用噬菌体蛋白包裹步骤（12）得到的连接产物，并侵染大肠杆菌后，涂布于带有 cosmid 抗性相应抗生素和阿泊拉霉素的 LB 平板上；

[0021]（14）将步骤（13）中 LB 平板上生长出来的大肠杆菌单菌落扩大培养，抽提 cosmid，并测序；

[0022]（15）根据步骤（14）的测序结果，使用 DNA 序列比对技术，在链霉菌基因组数据库

中比对，精确定位随机插入片段 ITR-*aac(3)IV*-ITR 在链霉菌基因组中插入的位置，以及链霉菌基因组中被破坏的基因；

[0023]（16）设计基因敲除方案，对步骤（15）定位的基因进行敲除。并验证该基因对目的基因的调控机制。

[0024]本发明中所用到的链霉菌是在实验室条件下可以进行稳定遗传操作的链霉菌。

[0025]步骤（2）中选取的报告基因系统为抗性基因报告系统，荧光蛋白报告系统，底物显色报告系统等链霉菌可用的报告基因系统。

[0026]步骤（5）中所筛选的阈值对应的是相应的报告系统，抗性基因报告系统对应抗生素浓度上限，荧光蛋白报告系统对应荧光显示强度，底物显色报告系统对应显色强度等。

[0027]步骤（12）中使用的 cosmid 是可以用于噬菌体包装的 cosmid。

[0028]步骤（13）中所选取的大肠杆菌是可以被噬菌体侵染的大肠杆菌。

[0029]步骤（16）中所使用的基因敲除体系是同源重组敲除体系，cosmid 敲除体系，crispr/cas9 介导的链霉菌敲除体系等可以稳定敲除目的基因的敲除体系。

[0030]本发明与现有技术相比具有的优势为：

[0031]1）本发明将目的基因启动子在链霉菌体内进行负调控因子的筛选，筛选环境稳定，出来的负调控因子假阳性低，可以极大减少后续调控因子的验证工作，高效，准确，操作方便。

[0032]2）本发明对目的基因启动子调控因子在链霉菌基因组上进行全局筛选，筛选通量高，理论上可以筛选出所有目的基因的负调控因子。

[0033]3）本发明在链霉菌中应用广泛，所有可以进行遗传操作的链霉菌都可以使用本发明进行目的基因的负调控因子筛选。

[0034]4）本发明可以广泛用于工业用链霉菌代谢产物高产筛选改造领域，筛选改造出来的链霉菌代谢产物产量高，遗传稳定性好，适用于工业生产应用。

附图说明

[0035]图 1：实施例 1 中使用 crispr/cas9 体系敲除 phaR 基因：图中 1，2，3，4，5 为敲除菌株的 PCR 扩增片段；

[0036]图 2：实施例 1 中 PhaR 蛋白与 dptEp 启动子的 EMSA 实验结果；

[0037]图 3：实施例 1 中 phaR 敲除菌株（ΔphaR）和玫瑰孢链霉菌 L30（WT） dptE 基因 qRT 实验结果；

[0038]图 4：实施例 1 中 phaR 基因敲除菌株（ΔphaR）与玫瑰孢链霉菌 L30（WT）达托霉素摇瓶发酵产量对比；

具体实施方式

[0039]下面结合附图和具体实施例来进一步详细描述本发明。

实施例 1

[0040]以使用本方法筛选达托霉素生产菌种玫瑰孢链霉菌 L30 中 *dptE* 基因的负调控蛋白为例。玫瑰孢链霉菌 L30 是工业生产达托霉素的链霉菌菌株。其基因组序列也被测定并且定位了达托霉素合成基因簇。整个达托霉素合成基因簇中，达托霉素直接合成蛋白由 *dptE*，*dptF*,*dptA*，*dptBC*，*dptD* 等 5 个基因编码。这五个基因组成一个顺反子，而 *dptE* 基因的启动子 *dptEp* 调控整个顺反子的转录翻译步骤。已有的研究表明，高表达 *dptE*，*dptF*,*dptA*，*dptBC*，*dptD* 等 5 个基因，可以有效地提高达托霉素的工业发酵产量。因此，我们通过本方法筛选玫瑰孢链霉菌 L30 基因组中启动子 *dptEp* 的负调控因子并敲除，以实现该菌株在工业发酵的过程中对达托霉素的高产。具体实施步骤如下：

[0041]（1）选定达托霉素生产菌株玫瑰孢链霉菌 L30 基因组中基因 *dptE*（SEQ ID No: 1），扩增出 *dptE* 基因的上游启动子序列 *dptEp*（SEQ ID No: 2）；

[0042]（2）选定玫瑰孢链霉菌 L30 体内可用的报告基因为卡那霉素抗性基因 *neo*，构建该报告基因系统在该链霉菌体内可遗传操作的质粒体系。以 pIJ8660 为骨架质粒，在 *Sac*I 酶切微点将 *Apra* 抗性基因转换为壮观霉素抗性基因 *Spec*，在 *Nde*I 和 *Not*I 酶切位点之间插入卡那霉素抗性基因 *neo*；

[0043]（3）将步骤（1）中的启动子序列 *dptEp*，整合入步骤（2）中报告质粒系统内报告基因上游 *BamH*I 和 *Bgl*II 酶切为点之间；

[0044]（4）将步骤（4）得到的报告质粒通过接合转导入野生型玫瑰孢链霉菌 L30 中，并验证；

[0045]（5）根据选择的 *neo* 卡那霉素抗性基因报告系统，对步骤（4）得到的玫瑰孢链霉菌菌株进行报告基因表达水平的阈值筛选。筛选结果为，在 YMG 平板上，步骤（4）得到的菌株卡那霉素最高抗性浓度为 300μg/mL；

[0046]（6）扩增三个 DNA 片段：①潮霉素抗性基因 *hph*；②潮霉素诱导启动子以及转座子 *tipAp-Himar1*；③中间加入阿泊拉霉素抗性基因的随机插入片段 ITR-*aac(3)IV*-ITR；

[0047]（7）以质粒 pKC1139 为骨架，将步骤（5）中扩增出来的三个片段分别插入质粒 pKC1139 中，得到质粒 pLRM04；

[0048]（8）将步骤（6）得到的质粒 pLRM04，接合转导入步骤（3）得到的含有报告质粒的玫瑰孢链霉菌中，并验证；

[0049]（9）将步骤（8）得到的玫瑰孢链霉菌菌株进行培养，并在培养过程中加入 4μg /mL 的潮霉素，以激活 *tipAp-Himar1* 基因的表达，启动转座子活性。将 ITR-*aac(3)IV*-ITR 片段

随机插入链霉菌基因组序列后，收集到大量的随机突变玫瑰孢链霉菌菌株；

[0050]（10）将步骤（9）得到的随机突变菌株，以步骤（5）得到的报告基因阈值进行筛选，卡那霉素的筛选浓度为900μg/mL，筛选出高卡那霉素抗性的菌株；

[0051]（11）将步骤（10）得到的高卡那霉素抗性菌株进行TSB液体培养后抽提出高质量的基因组，并均匀打成40Kb左右的片段；

[0052]（12）使用T4 DNA聚合酶将步骤（11）得到的片段全部补成平末端，去磷酸化。将cosmid pHAQ31使用限制性内切酶*Nhe*I线性化后去磷酸化，再用*Stu*I酶切成两段，以分开两个cos位点。将本步骤得到的基因组片段使用T4连接酶相互连接；

[0053]（13）使用噬菌体蛋白包裹步骤（12）得到的连接产物，并侵染大肠杆菌DH10B后，涂布于带有氨苄青霉素和阿泊拉霉素的LB平板上；

[0054]（14）将步骤（13）中LB平板上生长出来的大肠杆菌单菌落液体扩大培养，抽提cosmid，并测序；

[0055]（15）根据步骤（14）的测序结果，使用DNA序列比对技术，在玫瑰孢链霉菌SW0702基因组数据库中比对，精确确定随机插入片段ITR-*aac(3)IV*-ITR在链霉菌基因组中插入的位置。确定被插入突变的基因为*phaR*（SEQ ID No: 3）；

[0056]（16）设计crispr/cas9介导的基因敲除方案，对*phaR*基因进行敲除（图1）；

[0057]（17）体外表达纯化PhaR蛋白，使用EMSA实验验证PhaR蛋白与*dptEp*可以相互结合（图2）；

[0058]（18）将*phaR*基因敲除菌株和玫瑰孢链霉菌L30进行液体培养，再抽提RNA，进行荧光定量PCR分析。结果表明*phaR*基因敲除菌株中*dptE*基因的表达量是野生型玫瑰孢链霉菌中*dptE*基因的表达量的2-3倍（图3）；

[0059]（19）将步骤（16）得到的*phaR*基因敲除菌株与玫瑰孢链霉菌L30进行发酵（发酵条件见表1）；

[0060]（20）将*phaR*基因敲除菌株与玫瑰孢链霉菌L30发酵产物进行HPCL检测（检测结果见图4）。两个菌株的发酵结果表明，*phaR*基因敲除菌株的达托霉素产量明显上升，进一步证明*phaR*基因敲除菌株中达托霉素合成基因簇的高表达。

[0061]所述玫瑰孢链霉菌L30，分类命名为：玫瑰孢链霉菌（*Streptomyces roseosporus*）L30，保藏单位：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号：CGMCC No.15745，保藏日：2018年5月9日，保藏地址：北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0062]以上实验结果证明，PhaR蛋白是*dptE*基因的负调控因子，其基因敲除菌株中*dptE*，及其下游基因得到了高表达。从而证明本发明的有效性。

表 1： 实施例 1 中玫瑰孢链霉菌的发酵工艺

种子培养基	2%TSB，5%PEG6000 液体培养基
种子培养工艺	30ml 培养基/250ml 容器，30℃，22~26h，250rpm
发酵培养基	0.3%酵母提取物，0.3%麦芽提取物，0.5%胰蛋白胨，4%葡萄糖
发酵培养工艺	30ml/250ml，30℃，144~168h，250rpm
补料工艺	癸酸，发酵开始 36h 后，每次以体积比 1/1000 添加，2 次/天。

权利要求书

1.一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的筛选方法，其特征在于，在链霉菌细胞内构建一个以自身目的基因的启动子介导的报告系统，然后使用基于转座子 *Himar1* 构建的随机突变体系对带有报告系统的链霉菌进行随机突变，接着将随机突变后的链霉菌菌株进行强化筛选，得到目的基因高表达的链霉菌菌株，再通过噬菌体包装的方法，对目的基因高表达的链霉菌菌株的基因组进行包装并筛选出带有随机插入片段的 cosmid，最后通过对 cosmid 的 DNA 测序确定目的基因高表达的链霉菌菌株基因组中随机插入片段插入的准确位置。

2.根据权利要求 1 所述的一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的筛选方法，其特征在于，具体步骤如下：

（1）选定链霉菌基因组中需要筛选调控因子的目的基因，扩增出目的基因的上游启动子序列；

（2）选择链霉菌体内可用的报告基因系统，构建该报告基因系统在该链霉菌体内可遗传操作的质粒体系，并确定质粒体系中，报告基因上游无启动子；

（3）将步骤（1）中的启动子序列整合入步骤（2）中报告质粒系统内报告基因上游；

（4）将步骤（3）得到的报告质粒通过接合转导入野生型链霉菌中，并验证；

（5）根据选择的报告基因系统，对步骤（4）得到的链霉菌菌株进行报告基因表达水平的阈值筛选；

（6）扩增三个 DNA 片段：①潮霉素抗性基因 *hph*；②潮霉素诱导启动子以及转座子 *tipAp-Himar1*；③中间加入阿泊拉霉素抗性基因的随机插入片段 ITR-*aac(3)IV*-ITR；

（7）以质粒 pKC1139 为骨架，将步骤（5）中扩增出来的三个片段分别插入质粒 pKC1139 中，得到质粒 pLRM04；

（8）将步骤（6）得到的质粒 pLRM04，接合转导入步骤（3）得到的含有报告质粒的链霉菌中，并验证；

（9）将步骤（8）得到的链霉菌菌株进行培养，并在培养过程中加入一定浓度的潮霉素，以激活 *tipAp-Himar1* 基因的表达，启动转座子活性，将 ITR-*aac(3)IV*-ITR 片段随机插入链霉菌基因组后，收集到大量的随机突变菌株；

（10）将步骤（9）得到的随机突变菌株，以步骤（5）得到的报告基因阈值进行筛选，筛选出表型高于步骤（5）阈值的菌株；

（11）将步骤（10）得到的链霉菌菌株进行液体培养后抽提高质量的基因组。并均匀打成一定大小的片段；

（12）使用 T4 DNA 聚合酶将步骤（11）得到的片段全部补成平末端，并去磷酸化。将线性化后的 cosmid 去磷酸化后，使用平末端酶酶切，将与本步骤得到的基因组片段相互连接；

（13）使用噬菌体蛋白包裹步骤（12）得到的连接产物，并侵染大肠杆菌后，涂布于带有 cosmid 抗性相应抗生素和阿泊拉霉素的 LB 平板上；

（14）将步骤（13）中 LB 平板上生长出来的大肠杆菌单菌落扩大培养，抽提 cosmid，并测序；

（15）根据步骤（14）的测序结果，使用 DNA 序列比对技术，在链霉菌基因组数据库中比对，精确定位随机插入片段 ITR-*aac(3)IV*-ITR 在链霉菌基因组中插入的位置，以及链霉菌基因组中被破坏的基因；

（16）设计基因敲除方案，对步骤（15）定位的基因进行敲除，并验证该基因对目的基因的调控机制。

3.根据权利要求 2 所述的一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的筛选方法，其特征在于，所用到的链霉菌是在实验室条件下可以进行稳定遗传操作的链霉菌。

4.根据权利要求 2 所述的一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的筛选方法，其特征在于，步骤（2）中选取的报告基因系统为抗性基因报告系统，荧光蛋白报告系统，底物显色报告系统链霉菌可用的报告基因系统。

5.根据权利要求 2 所述的一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的筛选方法，其特征在于，步骤（5）中所筛选的阈值对应的是相应的报告系统，抗性基因报告系统对应抗生素浓度上限，荧光蛋白报告系统对应荧光显示强度，底物显色报告系统对应显色强度。

6.根据权利要求 2 所述的一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的筛选方法，其特征在于，步骤（12）中使用的 cosmid 是用于噬菌体包装的 cosmid。

7.根据权利要求 2 所述的一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的筛选方法，其特征在于，步骤（13）中所选取的大肠杆菌是被噬菌体侵染的大肠杆菌。

8.根据权利要求 2 所述的一种链霉菌生物合成基因簇负调控因子的筛选方法，其特征在于，步骤（16）中所使用的基因敲除体系是同源重组敲除体系，cosmid 敲除体系，crispr/cas9 介导的链霉菌敲除体系，可以稳定敲除目的基因的敲除体系。

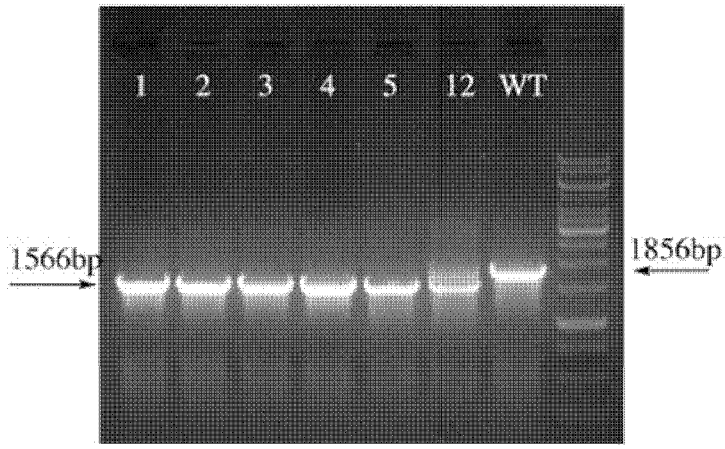

1
2
3
4
5
12
WT
1566bp
1856bp

图 1

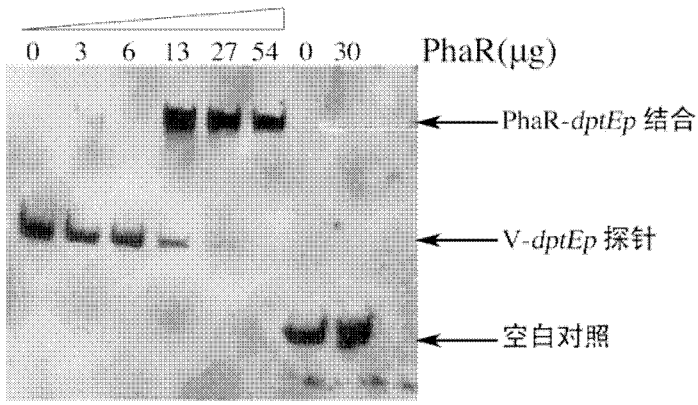

0
3
6
13
27
54
0
30
PhaR(μg)
PhaR-dptEp 结合
V-dptEp 探针
空白对照

图 2

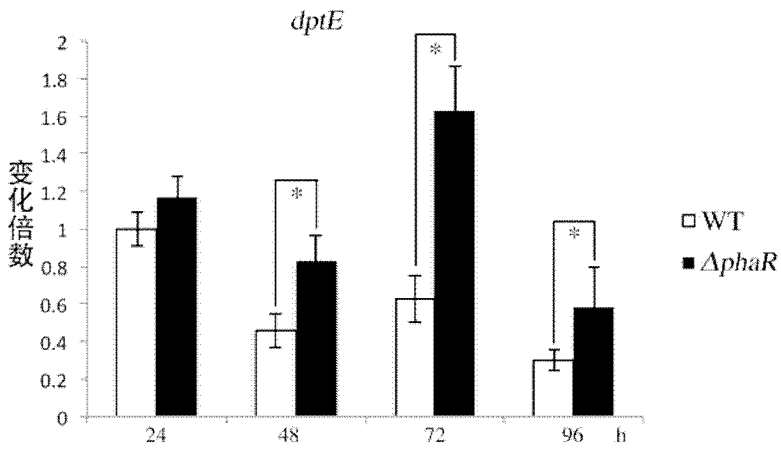

dptE
变化倍数
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
24
48
72
96
h
*
*
*
WT
ΔphaR

图 3

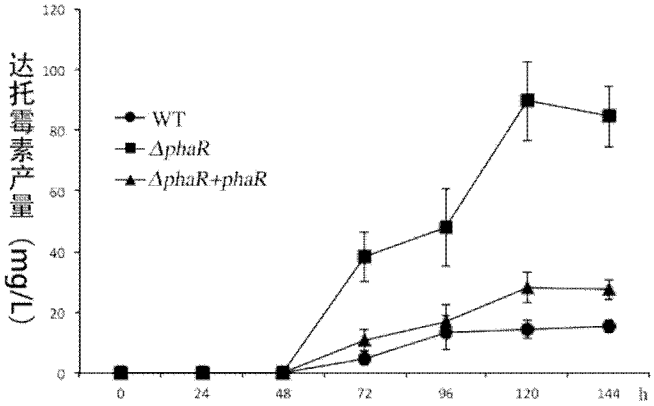

达托霉素产量 (mg/L)
120
100
80
60
40
20
0
WT
ΔphaR
ΔphaR+phaR
0
24
48
72
96
120
144
h

图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/078798

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/76(2006.01)i; C12N 15/65(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)

CNTXT; CNABS; CPRSABS; DWPI; SIPOABS; USTXT; WOTXT; JPTXT; EPTXT; VEN; ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase); CNKI; PUBMED; 百度学术, BAIDU XUESHU: 链霉菌; 转座子; 诱变; 报告基因; 拯救; 粘粒; 黏粒; 调控; 噬菌体, 李永泉; 毛旭明; 罗帅; streptomycete, transposon; Himar1, mutant+, reporter, resuce, cosmid, regulator, phage.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 108611361 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 02 October 2018 (2018-10-02) see claims 1-8	1-8
PX	LUO, S. et al. "Transposon-based Identification of a Negative Regulator for the Antibiotic Hyper-production in Streptomyces" *Applied Microbiology And Biotechnology,* Vol. 102, No. 15, 06 June 2018 (2018-06-06), ISSN: 1432-0614, pp. 6581-6592, see the abstract, p. 6582, right column, paragraph 1 to p. 6585, left column, paragraph 1	1-8
PX	罗帅 (LUO, Shuai). "达托霉素优质高效生物合成的调控机制研究 (The Regulatory Mechanisms of Daptomycin Biosynthesis in High-quality and Efficiency)" *中国博士学位论文全文数据库 工程科技I辑 (China Doctoral Dissertations Full-Text Database, Engineering Science and Technology I),* No. 06, 15 June 2018 (2018-06-15), ISSN: 1674-022X, pages B018-10, see pages 22-59	1-8

☑ 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
15 June 2019	**26 June 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/078798

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AHMED, Y. et al. "Identification of Butenolide Regulatory System Controlling Secondary Metabolism in Streptomyces Albus J1074" *Scientific Reports,* Vol. 7, 29 August 2017 (2017-08-29), ISSN: 2045-2322, Document number: 9784, see entire document	1-8
A	BILYK, B. et al. "In Vivo Random Mutagenesis of Streptomycetes Using Mariner-based Transposon Himar1" *Applied Microbiology And Biotechnology,* Vol. 97, No. 1, 11 November 2012 (2012-11-11), ISSN: 0175-7598, pp. 351-359, see entire document	1-8
A	HORBAL, L. et al. "A Transposon-based Strategy to Identify the Regulatory Gene Network Responsible for Landomycin E Biosynthesis" *Fems Microbiology Letters,* Vol. 342, No. 2, 31 May 2013 (2013-05-31), ISSN: 1574-6968, pp. 138-146, see entire document	1-8
A	BILYK, B. et al. "Chromosomal Position Effect Influences the Heterologous Expression of Genes and Biosynthetic Gene Clusters in Streptomyces Albus J1074" *Microbial Cell Factories,* Vol. 16, 04 January 2017 (2017-01-04), ISSN: 1475-2859, Document number: 5, see entire document	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/078798

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 108611361 A	02 October 2018	None	

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2019/078798

A. 主题的分类

C12N 15/76(2006.01)i; C12N 15/65(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））

CNTXT; CNABS; CPRSABS; DWPI; SIPOABS; USTXT; WOTXT; JPTXT; EPTXT; VEN; ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase); CNKI; PUBMED;百度学术:链霉菌，转座子，诱变，报告基因，拯救，粘粒，黏粒，调控，噬菌体，李永泉，毛旭明，罗帅，streptomycete, transposon, Himar1, mutant+, reporter, resuce, cosmid, regulator, phage。

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
PX	CN 108611361 A (浙江大学) 2018年 10月 2日 (2018-10-02) 参见权利要求1-8	1-8
PX	LUO, S.等. "Transposon-based identification of a negative regulator for the antibiotic hyper-production in Streptomyces" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 第102卷，第15期，2018年 6月 6日 (2018-06-06), ISSN：1432-0614, 第6581-6592页，参见摘要，第6582页右栏第1段-第6585页左栏第1段	1-8
PX	罗帅. "达托霉素优质高效生物合成的调控机制研究" 中国博士学位论文全文数据库工程科技I辑，第06期，2018年 6月 15日 (2018-06-15), ISSN：1674-022X, 第B018-10页，参见第22-59页	1-8

☑ 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
2019年 6月 15日	2019年 6月 26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 林峻凯 电话号码 86-（10）-62412317

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/078798

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	AHMED, Y.等. "Identification of butenolide regulatory system controlling secondary metabolism in Streptomyces albus J1074" SCIENTIFIC REPORTS, 第7卷, 2017年 8月 29日 (2017-08-29), ISSN: 2045-2322, 文献号: 9784, 参见全文	1-8
A	BILYK, B.等. "In vivo random mutagenesis of streptomycetes using mariner-based transposon Himar1" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 第97卷, 第1期, 2012年 11月 11日 (2012-11-11), ISSN: 0175-7598, 第351-359页, 参见全文	1-8
A	HORBAL, L.等. "A transposon-based strategy to identify the regulatory gene network responsible for landomycin E biosynthesis" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 第342卷, 第2期, 2013年 5月 31日 (2013-05-31), ISSN: 1574-6968, 第138-146页, 参见全文	1-8
A	BILYK, B.等. "Chromosomal position effect influences the heterologous expression of genes and biosynthetic gene clusters in Streptomyces albus J1074" MICROBIAL CELL FACTORIES, 第16卷, 2017年 1月 4日 (2017-01-04), ISSN: 1475-2859, 文献号: 5, 参见全文	1-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/078798

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 108611361 A	2018年 10月 2日	无	