

## (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 4 月 25 日 (25.04.2019)



(10) 国际公布号  
**WO 2019/076262 A1**

(51) 国际专利分类号:  
**G01N 33/53** (2006.01)

沈玥(SHEN, Yue); 中国广东省深圳市盐田区北山  
工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/110245

(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:  
201710972547.1 2017 年 10 月 18 日 (18.10.2017) CN

(71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院 (BGI  
SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区  
北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 刘龙英(LIU, Longying); 中国广东省深圳  
市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083  
(CN)。 陈泰(CHEN, Tai); 中国广东省深圳市盐田  
区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司  
(DHC IP ATTORNEYS); 中国广东省深圳市福  
田区金田路与福华路交汇处现代商务大  
厦2201, Guangdong 518048 (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。

(54) Title: BIOSENSOR FOR DETECTING TARGET MOLECULAR COMPOUND, AND SYSTEM COMPRISING BIOSENSOR

(54) 发明名称: 检测目标分子化合物的生物感应器及包含该生物感应器的系统

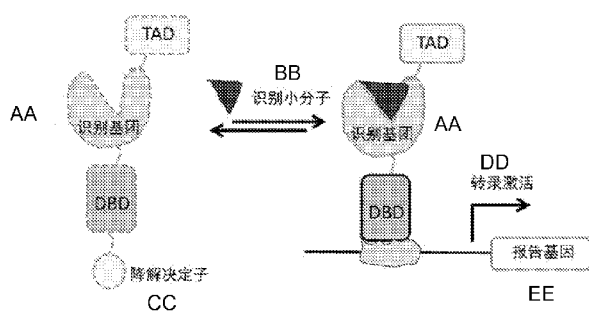


图 1

AA Recognition group  
BB Recognition small molecule  
CC Degradation determinant

DD Transcriptional activation  
EE Reporter gene

(57) Abstract: A biosensor for detecting a target molecular compound, and a system comprising the biosensor. The biosensor is a fusion protein, and comprises a target molecule synthase, a DNA-binding domain and a transcriptional activation domain respectively ligated to both ends of the target molecule synthase, and a degradation determinant. When there is no precursor substance of the target molecule, the degradation determinant degrades the biosensor; when there is a precursor substance of the target molecule, the target molecule synthase recognizes and binds the precursor substance to stabilize the biosensor, so that the degradation determinant fails and is automatically detached, the DNA-binding domain binds to a promoter region of a reporter gene, and the transcriptional activation domain activates reporter gene expression. The present invention can implement accurate and high-throughput screening of various molecular metabolites, greatly reduce complicated manual operations, and lower the costs of detection using high-precision instruments, and can be widely applied.

(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: 一种检测目标分子化合物的生物感应器及包含该生物感应器的系统, 该生物感应器是融合蛋白, 包括目标分子合成酶, 和分别连接在目标分子合成酶两端的DNA结合结构域、转录激活结构域, 以及降解决定子; 当不存在目标分子的前体物质时, 降解决定子将生物感应器降解; 当存在目标分子的前体物质时, 目标分子合成酶识别并结合前体物质以稳定生物感应器, 使得降解决定子失效而自动脱离, DNA结合结构域与报告基因的启动子区域结合, 转录激活结构域激活报告基因表达。本发明能够使各类分子代谢产物实现准确、高通量的筛选, 极大减少了繁琐的人工操作并且降低了使用高精度仪器检测的成本, 具有广泛应用价值。

## 检测目标分子化合物的生物感应器及包含该生物感应器的系统

### 技术领域

本发明涉及化合物检测技术领域，具体涉及一种检测目标分子化合物的生物感应器及包含该生物感应器的系统。

### 背景技术

天然产物是生物体内的组成部分或其代谢产物，通常具有特殊的生物活性及功能，是新药发现的主要途径，也是当前代谢研究的热点。由于天然产物通常因含有较多的活性基团而结构复杂，化学合成步骤繁琐且产率极低，因此其主要的获取途径是从植物等中提取，然而，植物生长周期长，提取过程有大量损耗，以及处理过程的影响使得具有活性的天然产物的获得远远不能满足需求。因此，天然产物的生物合成研究成为实现工业化生产的主要途径。

天然产物的生物合成最成功的例子是具有重要医药价值的抗疟疾药物青蒿素。Keasling 等人选择酿酒酵母作为宿主，使法尼基焦磷酸得到积累并引入相应外源合成酶，使酿酒酵母可以直接合成青蒿酸。2013 年，Paddon 等人将青蒿酸生物合成中由单一细胞色素氧化酶 CYP71AV1 催化的、由紫穗槐二烯 (Amorphadiene) 到青蒿酸的三步反应，转变为由多个酶 (CYP71AV1、CPR1、CYB5、ADH1、ALDH1) 催化的三步反应，在酵母中重构了青蒿酸的生物合成途径，大大提高了青蒿酸的产量。Stephanopoulos 等人将紫杉二烯的合成途径引入大肠杆菌中，并对整个代谢途径进行优化，获得高产紫杉二烯的大肠杆菌细胞，是四环二萜类抗癌新药紫杉醇的生物合成研究的重大进展。2013 年，张学礼等人与黄璐琦等人合作，共同开展人工细胞合成药用萜类化合物的研究，显著提高了人工酵母细胞合成二萜及三萜化合物的能力，将丹参酮 II A 合成前体次丹参酮二烯 (Miltiradiene) 的产量提高到达 488mg/L，将三萜角鲨烯 (Squalene) 的产量提高到达 852mg/L，将番茄红素的产量提高到达 21.17mg/L。近年来，刘天罡等人利用合成生物学方法在模式生物中构建了高效代谢途径，有效生产稀有来源药物以及药物前体，其中包括番茄红素、虾青素、紫杉醇等多种高附加值天然化合物。

随着人们不断探索微生物合成天然产物的过程，小分子化合物的生物感应器在代谢产物合成路径的研究中得到广泛应用，早在 2000 年 Gil 等人设计了生物感应器对环境的毒素进行监测；在 2012 年，Paige 等人便设计出能够检测相应代谢产物溶度的生物感应器。近几年，许多研究人员对各类代谢产物的生物感应器进行了相关研究并取得了一定的进展，但当前的方法中并没有提出一种简单的策略能够设计出非常有效的、具有宽泛性应用价值的生物感应器。

当前针对小分子化合物识别所需要的 LBD (ligand-binding domain, 配体结合域) 模块，设计过程十分繁琐。2013 年，科学家们以结合类固醇的蛋白为例，通过计算机运算定位于最佳取向配体周围的氨基酸侧链，在支架蛋白结构上标记出可能结合的位点，根据这些侧链的性质和构造来优化产生一些额外蛋白与配体的相互作用关系。此设计是依据这些典型的天然复合体或者是在游离状态下 Boltzmann-weighted 值较低而已经存在侧链相互作用的蛋白结构。根据这些方法以及表型的高度互补性，设计出 17 种可能具有结合能力的蛋白用于实验的测试筛选。而在实验过程中，为了筛选获得高度结合能力的 LBD，使用了酵母表面显示技术 (yeast surface display) 和流式细胞仪进行探测。同时辅助使用等温滴定量热法 (Isothermal titration

calorimetry) 来确认相互作用关系 (Boltzmann-weighted 值), 而最终 LBD 的优化, 也需要饱和定点突变技术 (site-saturation mutagenesis), 同时借助酵母表面显示技术和流式细胞仪分选技术 (fluorescence activated cell sorting (FACS)) 来进行分选。仅仅 LBD 的挖掘过程就经过了十分复杂的前期理论设计和繁琐的实验筛选优化过程。

近期, Jester 等人通过一系列计算机模型设计、蛋白酶工程、以及分子生物技术进行优化筛选, 获得了能够高度识别目标小分子的 LBD。并以地高辛为例, 阐述了设计生物感应器的整个过程。首先通过计算机模拟设计以及引入突变等手段获得多个可以有效结合地高辛的 LBD, 并在此基础上, 通过在 LBD 的 N 端连接一个 DBD (DNA-binding domain), C 端连接一个 TAD (transcriptional activation domain), 并在 DBD 的一端连接降解决定子 (degron), 组成一个融合蛋白, 经过测试证明, 这三者融合的蛋白识别目标分子地高辛的活性有显著提高 (10 倍, DBD 突变体为 60 倍)。以此融合蛋白为生物感应器, 最终获得能够高度识别目标分子地高辛的 LBD。但是, 该生物感应器的设计仍需要依赖于通过计算机设计、构建及优化筛选出的高度专一性结合目标小分子的 LBD, 整个挖掘过程十分繁琐。并且, 随着目标小分子的改变, 需要再次进行计算机运算、构建、筛选等繁琐的挖掘。因此, 当前的生物感应器设计策略仅仅针对某一代谢产物进行设计和构建, 并不能实现非常有效、具有宽泛性应用价值的生物感应器。

## 发明内容

本发明提供一种检测目标分子化合物的生物感应器及包含该生物感应器的系统, 能够便捷地构建高度专一性和有效识别能力的各类分子化合物的生物感应器, 使得各类分子代谢产物实现准确、高通量的筛选, 极大减少了繁琐的人工操作并且降低了使用高精度仪器检测的成本, 具有广泛应用价值。

根据第一方面, 一种实施例中提供一种检测目标分子化合物的生物感应器, 该生物感应器是融合蛋白, 该生物感应器包括目标分子合成酶, 和分别连接在上述目标分子合成酶两端的 DNA 结合结构域、转录激活结构域, 以及降解决定子; 当不存在目标分子的前体物质时, 上述降解决定子将上述生物感应器降解; 当存在目标分子的前体物质时, 上述目标分子合成酶识别并结合上述前体物质以稳定上述生物感应器, 使得上述降解决定子失效而自动脱离, 上述 DNA 结合结构域与报告基因的启动子区域结合, 上述转录激活结构域激活上述报告基因表达。

进一步地, 上述生物感应器从氮端到碳端依次连接降解决定子、DNA 结合结构域、目标分子合成酶和转录激活结构域。

进一步地, 上述目标分子化合物选自天然产物, 相应地, 所述目标分子合成酶是合成所述天然产物的酶。需要说明的是, 术语“天然产物”是在自然界中由活生物产生的通常具有药理学或生物学活性的化学物质, 其主要包括蛋白质、多肽、氨基酸、核酸、各种酶类、单糖、寡糖、多糖、糖蛋白、树脂、胶体物、木质素、维生素、脂肪、油脂、蜡、生物碱、挥发油、黄酮、糖苷类、萜类、苯丙素类、有机酸、酚类、醌类、内酯、甾体化合物、鞣酸类、抗生素类等天然存在的化学成分, 通常可被用于药学上的药物研发与药物设计。

进一步地, 上述目标分子合成酶是野生型的合成上述天然产物的酶。

进一步地, 上述目标分子化合物选自药物和/或药物前体化合物, 相应地, 上述目标分子合成酶是合成上述药物和/或药物前体化合物的酶。

进一步地，上述目标分子是番茄红素，上述目标分子合成酶是番茄红素合成酶；优选地，上述番茄红素合成酶由 *CrtI* 基因编码；优选地，上述目标分子的前体物质是八氢番茄红素。

进一步地，上述目标分子是白藜芦醇，上述目标分子合成酶是对二苯烯合成酶；优选地，上述对二苯烯合成酶由 *STS* 基因编码；优选地，上述目标分子的前体物质是 *p*-香豆酰辅酶 A。

进一步地，上述降解决定子是酵母中的降解决定子 *MAT $\alpha$ 2*。

进一步地，上述报告基因为抗性筛选基因和/或荧光标记基因。优选地，上述抗性筛选基因选自氨苄青霉素、卡那霉素、壮观霉素、和/或四环素；或上述荧光标记基因选自绿色荧光蛋白 *GFP* 基因、红色荧光蛋白 *RFP* 基因、和/或黄色荧光蛋白 *YFP* 基因。

根据第二方面，一种实施例中提供一种构建第一方面的生物感应器的方法，包括：首先将编码目标分子合成酶的核酸片段，和分别连接在所述目标分子合成酶两端的 DNA 结合结构域的核酸片段、转录激活结构域的核酸片段，以及降解决定子的核酸片段组装起来；然后将组装后的核酸片段连入质粒载体中。

进一步地，上述方法还包括：构建报告基因的表达质粒，上述 DNA 结合结构域与报告基因的启动子区域结合，上述转录激活结构域激活上述报告基因表达。

进一步地，上述核酸片段的组装通过 *PCA* 组装和/或 *Gibson* 组装实现。

根据第三方面，一种实施例中提供一种编码第一方面的生物感应器的核苷酸序列。

进一步地，上述核苷酸序列包括如 SEQ ID NO: 134 所示的序列。

进一步地，上述核苷酸序列包括如 SEQ ID NO: 171 所示的序列。

进一步地，上述核苷酸序列还包括第一载体序列。

进一步地，上述第一载体序列是载体骨架 *pRS415* 的序列。

进一步地，还包括编码上述报告基因的表达序列。

进一步地，上述报告基因表达序列包括如 SEQ ID NO: 133 所示的序列。进一步地，上述报告基因表达序列还包括第二载体序列。

进一步地，上述第二载体序列是载体骨架 *pRS413* 的序列。

根据第四方面，一种实施例中提供一种检测目标分子化合物的方法，包括：将第一方面的生物感应器或者第三方面的核苷酸序列，与报告基因共同导入宿主细胞内进行表达；通过检测上述报告基因的表达对目标分子化合物进行定性和/或定量分析。

根据第五方面，一种实施例中提供一种检测目标分子化合物的生物感应系统，包括编码第一方面的生物感应器的核苷酸序列，报告基因表达序列，任选地，还包括使上述生物感应器的核苷酸序列和报告基因表达序列在其内表达的宿主细胞。

进一步地，上述生物感应器的核苷酸序列包括如 SEQ ID NO: 134 所示的序列，上述报告基因表达序列包括如 SEQ ID NO: 133 所示的序列。

进一步地，上述生物感应器的核苷酸序列包括如 SEQ ID NO: 171 所示的序列，所述报告基因表达序列包括如 SEQ ID NO: 133 所示的序列。

进一步地，上述生物感应器的核苷酸序列还包括第一载体序列，上述报告基因表达序列还包括第二载体序列，上述宿主细胞是酵母细胞。

进一步地，上述第一载体序列是载体骨架 *pRS415* 的序列，上述第二载体序列是载体骨架 *pRS413* 的

序列。

根据第六方面，一种实施例中提供一种第一方面的生物感应器或者第三方面的核苷酸序列或者第五方面的生物感应系统在检测目标分子化合物中的用途。

进一步地，上述用途包括对上述目标分子化合物进行相对定性、定量分析、和/或对产生上述目标分子化合物的宿主细胞进行筛选。

本发明的检测目标分子化合物的生物感应器的设计，如果只为最终产物的筛选，将报告基因选择为抗性筛选基因，将大大降低高成本的批量筛选过程，如果需要获得不同产量的菌株库，可将报告基因设计为各类荧光标记基因，可以通过检测荧光的强度来对代谢产物进行定性及定量分析。

本发明的检测目标分子化合物的生物感应器，根据天然存在的目标代谢通路进行设计，以各种目标分子合成酶为识别基团，上述目标分子合成酶是天然存在的，并对目标分子的前体物质具有高度专一性和有效的识别能力，省略了针对目标分子 LBD 进行计算机设计、构建及优化筛选的繁琐的挖掘过程，显著地减少了时间成本。此外，本发明的生物感应器，选用目标分子合成酶作为识别目标分子前体物质的基团，设计构建的融合生物感应器的各个元件相对独立，单一元件替换相对简单，而且自然界中所有的天然化合物分子均可以找到能够识别其前体物质的基团，即便是目标分子进行更换，也能很快将其融合的生物感应器快速的拼装起来，具有相对宽泛的应用范围。

## 附图说明

图 1 为本发明实施例中生物感应器的模型结构及功能示意图；

图 2 为本发明实施例中番茄红素机体合成示意图；

图 3 为本发明实施例中白藜芦醇机体合成示意图；

图 4 为本发明实施例中整合质粒图谱；

图 5 为本发明实施例中整合质粒构建相关的电泳图；

图 6 为本发明实施例中番茄红素生物感应器转化酵母菌株之后在荧光显示仪上观察到的荧光结果图；

图 7 为本发明实施例中番茄红素生物感应器转化酵母菌株之后在酶标仪上检测的荧光结果图；

图 8 为本发明实施例中白藜芦醇生物感应器转化酵母菌株之后在荧光显示仪上观察到的荧光结果图；

图 9 为本发明实施例中白藜芦醇生物感应器转化酵母菌株之后在酶标仪上检测的荧光结果图。

## 具体实施方式

下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。在以下的实施方式中，很多细节描述是为了使得本发明能被更好的理解。然而，本领域技术人员可以毫不费力的认识到，其中部分特征在不同情况下是可以省略的，或者可以由其他元件、材料、方法所替代。在某些情况下，本发明相关的一些操作并没有在说明书中显示或者描述，这是为了避免本发明的核心部分被过多的描述所淹没，而对于本领域技术人员而言，详细描述这些相关操作并不是必要的，他们根据说明书中的描述以及本领域的一般技术知识即可完整了解相关操作。

针对当前生物感应器中识别目标分子基团挖掘的整个流程，主要是蛋白质工程等方面的技术，通过计算机运算模型计算蛋白与配体分子之间的结合关系来预测二者之间的结合能力，需要构建一个通用而简易

的生物感应器，目的在于，不需要随同目标分子的改变而进行重新的计算机运算、构建、筛选等繁琐的工作。在代谢路径中需要很多酶的相互作用，才能实现目标分子的表达。目标分子的形成是负责该步骤的酶识别上一步的底物而进行作用的结果，那么，这一步的合成酶对前体物质应具有高度的识别能力或者结合能力。

图 1 示出了本发明实施例中分子化合物的生物感应器的模型结构及功能，该生物感应器是融合蛋白，该生物感应器包括目标分子合成酶（作为“识别基团”），和分别连接在目标分子合成酶两端的 DNA 结合结构域（DBD）、转录激活结构域（TAD），以及降解决定子（例如连接在 DBD 的上游）。

报告基因可以选择抗性筛选标记或者荧光显示标记，最终将构建好的融合蛋白（即生物感应器）导入细胞内。当不存在目标分子的前体物质时，识别基团无法与目标分子的前体物质结合，从而导致生物感应器不稳定，降解决定子将不稳定的生物感应器降解；当目标分子的前体物质在机体中生成时，目标分子合成酶高度识别前体物质并有效与其结合，生物感应器因有效结合底物而变得更加稳定，降解决定子因此失效而自动脱离，DBD 将能够有效结合下游报告基因的启动子区域，TAD 将有效激活报告基因进行表达。因此，最终可以通过抗性筛选标记对产生目标分子的宿主细胞进行筛选，或者通过检测报告基因的表达量来对目标分子进行相对定性/定量分析。

以下实施例中所描述的实验流程仅用于证明本发明的可行性，本发明的应用并不仅限于此。实施例中所提及的实验操作，如无特殊说明，均为常规实验方法；所提及的试剂耗材，如无特殊说明，均为常规试剂耗材。

#### 实施例 1 检测番茄红素的生物感应器

如图 2 所示，以番茄红素酵母工程菌的构建为例，番茄红素（lycopene）的形成是在番茄红素合成酶 CrtI 的作用下，将八氢番茄红素（phytoene）合成番茄红素。因此，可以将 CrtI 作为生物感应器的识别基团。根据文献报道，DBD 的最优突变体为 Gal4，而在 Gal4 二聚体（dimer）中获得的两个突变体 L77F 和 R60S，均能够很好地提高识别基团的识别能力。因此，可以使用 G<sub>L77F</sub> 或 G<sub>R60S</sub> 作为 DBD 的突变体来构建番茄红素的生物感应器，在本实施例中选择 G<sub>L77F</sub>。根据文献报道，TAD 的最优突变体为 VP16 或 VP64，二者均能够通过控制下游的 *GALI* 启动子来驱动 yEGFP 的表达。因此，可以使用 VP16 或 VP64 作为 TAD 的突变体来构建番茄红素的生物感应器，在本实施例中选择 VP16。在 DBD 的 N 端连接酵母系统中常见的降解决定子 MAT $\alpha$ 2，下游的报告基因选择酵母中荧光蛋白 yEGFP，能够很好地通过检测荧光蛋白的表达量来对目标代谢产物进行相对定性定量。通过基因合成将它们的序列片段合成出来，再通过 Gibson 组装形成融合片段插入质粒中，组装成为具有融合蛋白的质粒转入能够代谢番茄红素的酵母菌株中，观察并检测荧光蛋白的表达情况。

实验过程主要分为两大模块：报告质粒构建（pRS413+GYC）和 G-I-V（Gal4-crtI-VP16）质粒构建（pRS415+MGIV）。报告质粒包含 yEGFP，并选择 *GALI* 启动子作为启动子，*CYC1* 终止子作为终止子，以及载体骨架 pRS413；G-I-V（Gal4-crtI-VP16）质粒包含降解决定子 MAT $\alpha$ 2，DBD 最优突变体 G<sub>L77F</sub>，番茄红素合成酶 CrtI 以及 TAD 最优突变体 VP16，以及载体骨架 pRS415，最终构建的整合质粒的图谱如图 4 所示。

以 DNA 柱状合成 5'-*GALI* 启动子+yEGFP+*CYC1*-3'终止子片段(1467 bp, 切分成 3 段: GYC-F1 581bp; GYC-F2 491bp; GYC-F3 565bp)和 MAT $\alpha$ 2-G<sub>L77F</sub>-I-V 片段 (2610 bp, 切分成 5 段: MGIV-F1 567bp; MGIV-F2

583bp; MGIV-F3 558bp; MGIV-F4 577bp; MGIV-F5 580bp), 各片段拆分的寡核苷酸(如下表1所示)分别进行PCA组装获得亚片段,例如GYC-F1-1至GYC-F1-16经过PCA组装获得亚片段GYC-F1(SEQ ID NO: 125),其余以此类推,分别得到亚片段GYC-F2(SEQ ID NO: 126)、GYC-F3(SEQ ID NO: 127)、MGIV-F1(SEQ ID NO: 128)、MGIV-F2(SEQ ID NO: 129)、MGIV-F3(SEQ ID NO: 130)、MGIV-F4(SEQ ID NO: 131)、MGIV-F5(SEQ ID NO: 132);再进行TA克隆,PCR筛选,测序鉴定;测序正确的亚片段继续进行Gibson一步组装拼接成最终的大片段,5'-*GALI* 启动子+ yEGFP+*CYC1*-3'终止子片段(SEQ ID NO: 133)、MAT $\alpha$ 2-G<sub>L77F</sub>-I-V片段(SEQ ID NO: 134),并连入载体骨架;将最终组装好的质粒进行酶切验证并测序,选择测序正确的两种构建质粒共转化番茄红素酵母工程菌中,观察其实验结果。

番茄红素酵母工程菌:来源于深圳华大基因生命科学研究院国家基因库,该菌是以酿酒酵母菌株 SynYII(保藏号为 CCTCC NO: M 2014434)为底盘细胞,将番茄红素生物合成途径所需的3个外源基因(CrtE、CrtB、CrtI)拼接形成重组质粒,导入底盘细胞进行代谢产物检测,能够表达番茄红素的菌株为番茄红素酵母工程菌。

表1 构建番茄红素生物感应器所需序列

| 寡核苷酸名称    | 寡核苷酸序列                                                                          |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|
| GYC-F1-1  | CCCGGGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGTGGA<br>TT (SEQ ID NO: 1)               |
| GYC-F1-2  | TACTTCAATATAGCAATGAGCAGTTAAGCGTATTACTGAAAGTTCCA<br>CGGTACCCAATT (SEQ ID NO: 2)  |
| GYC-F1-3  | AACTGCTCATTGCTATATTGAAGTACGGATTAGAAGCCGCCGAGCGG<br>GCGACAGCCCTC (SEQ ID NO: 3)  |
| GYC-F1-4  | GCGACCGGTGAAGACGAGGACGCACGGAGGAGAGTCTTCCGTCGGA<br>GGGCTGTCGCCCCG (SEQ ID NO: 4) |
| GYC-F1-5  | TCGTCTTCACCGGTCGCGTTCCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGC<br>ACTGCTCCGAA (SEQ ID NO: 5)  |
| GYC-F1-6  | CCTCTTCATAACCATAAAAGCTAGTATTGTAGAATCTTTATTGTTCGG<br>AGCAGTGCGGC (SEQ ID NO: 6)  |
| GYC-F1-7  | ACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCC<br>CACAAACCTTC (SEQ ID NO: 7)  |
| GYC-F1-8  | CGCATTATCATCCTATGGTTGTAAATTTGATTCGTTAATTTGAAGGTTT<br>GTGGGGCCAG (SEQ ID NO: 8)  |
| GYC-F1-9  | TTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCT<br>GGGGTAATTAA (SEQ ID NO: 9)  |
| GYC-F1-10 | TCTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCTTCGCTGATTAATTACCCAG<br>AATAAGGCTAA (SEQ ID NO: 10)   |
| GYC-F1-11 | GCGATGATTTTTGATCTATTAACAGATATATAAATGGAAAAGCTGCAT<br>AACCACTTTAA (SEQ ID NO: 11) |



|           |                                                                                  |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|
| GYC-F1-12 | GAAGTAATACAACTGAAAATGTTGAAAGTATTAGTTAAAGTGGTTAT<br>GCAGCTTTTCC (SEQ ID NO: 12)   |
| GYC-F1-13 | CTTTCAACATTTTCAGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTCATAAAAG<br>TATCAACAAA (SEQ ID NO: 13)  |
| GYC-F1-14 | ACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTTGTGATACTTTTATG<br>ACATTTGAAT (SEQ ID NO: 14)    |
| GYC-F1-15 | AAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACTAT<br>AATGAGTAAAG (SEQ ID NO: 15)  |
| GYC-F1-16 | CCCGGGACAACTCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATTATAGTTT<br>TTTCTCCTTG (SEQ ID NO: 16)  |
| GYC-F2-1  | CCCGGGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTT<br>GTTG (SEQ ID NO: 17)         |
| GYC-F2-2  | ACAGAAAATTTGTGCCCATTAACATCACCATCTAATTCAACAAGAATT<br>GGGACAACTCC (SEQ ID NO: 18)  |
| GYC-F2-3  | GTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCA<br>ACATACGGAAA (SEQ ID NO: 19)  |
| GYC-F2-4  | GTAGTTTTCCAGTAGTGCAAATAAATTAAAGGGTAAGTTTTCCGTATGT<br>TGCATCACCT (SEQ ID NO: 20)  |
| GYC-F2-5  | TTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCA<br>CTACTTTCGG (SEQ ID NO: 21)     |
| GYC-F2-6  | ATGATCTGGGTATCTCGCAAAGCATTGAACACCATAACCGAAAGTAGT<br>GACAAGTGTTG (SEQ ID NO: 22)  |
| GYC-F2-7  | TTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGT<br>GCCATGCCTGA (SEQ ID NO: 23)  |
| GYC-F2-8  | GTCATCTTTGAAAAATATAGTTCTTTCCTGTACATAACCTTCAGGCATG<br>GCACTCTTGA (SEQ ID NO: 24)  |
| GYC-F2-9  | AGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTG<br>CTGAAGTCAAG (SEQ ID NO: 25)  |
| GYC-F2-10 | TTTTAACTCGATTCTATTAACAAGGGTATCACCTTCAAACCTTGACTTCA<br>GCACGTGTCT (SEQ ID NO: 26) |
| GYC-F2-11 | ACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGAT<br>GGAAACATTCT (SEQ ID NO: 27)  |
| GYC-F2-12 | GTGAGTTATAGTTGTATTCCAATTTGTGTCCAAGAATGTTTCCATCTTC<br>TTTAAATCA (SEQ ID NO: 28)   |
| GYC-F2-13 | ACAAATTGGAATACAACTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAG                                 |

|           |                                                                                 |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|
|           | ACAAACAAAAG (SEQ ID NO: 29)                                                     |
| GYC-F2-14 | CCCGGGATTCCATTCTTTTGTCTGCTGCCATGATG (SEQ ID NO: 30)                             |
| GYC-F3-1  | CCCGGGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTT<br>AACTTCAAA (SEQ ID NO: 31)    |
| GYC-F3-2  | TGAACGCTTCCATCTTCAATGTTGTGTCTAATTTTGAAGTTAACTTTGA<br>TTCCATTCTT (SEQ ID NO: 32) |
| GYC-F3-3  | CATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATAC<br>TCCAATTGGCG (SEQ ID NO: 33) |
| GYC-F3-4  | GACAGGTAATGGTTGTCTGGTAAAAGGACAGGGCCATCGCCAATTGGA<br>GTATTTTGTG (SEQ ID NO: 34)  |
| GYC-F3-5  | ACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTCGAAAGATCC<br>CAACGAAAAGA (SEQ ID NO: 35)  |
| GYC-F3-6  | CAGCTGTTACAACTCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGG<br>ATCTTTCGA (SEQ ID NO: 36)   |
| GYC-F3-7  | TTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACT<br>ATACAAATAA (SEQ ID NO: 37) |
| GYC-F3-8  | CGTGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGATTATTTGTATAGTTC<br>ATCCATGCCA (SEQ ID NO: 38) |
| GYC-F3-9  | TTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCTCCCACATCCGCTCTAACCGA<br>AAAGGAAGGA (SEQ ID NO: 39) |
| GYC-F3-10 | AAAAAATAAATAGGGACCTAGACTTCAGGTTGTCTAACTCCTTCCTTTT<br>CGGTTAGAGC (SEQ ID NO: 40) |
| GYC-F3-11 | TGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTAATAGTTATGTTAGTATTAAG<br>AACGTTATT (SEQ ID NO: 41) |
| GYC-F3-12 | TGTACAGAAAAAAAAGAAAAATTTGAAATATAAATAACGTTCTTAATA<br>CTAACATAACT (SEQ ID NO: 42) |
| GYC-F3-13 | ATATTTCAAATTTTCTTTTTTTTCTGTACAAACGCGTGACGCATGTAA<br>CATTATACT (SEQ ID NO: 43)   |
| GYC-F3-14 | TCGAGCGTCCCAAACCTTCTCAAGCAAGGTTTTTCAGTATAATGTTACA<br>TGCGTACACG (SEQ ID NO: 44) |
| GYC-F3-15 | AGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCCACTAGTTCTAGAGCGG<br>CCGCCACCGC (SEQ ID NO: 45) |
| GYC-F3-16 | CCCGGGCTCCACCGCGGTGGCGGCCG (SEQ ID NO: 46)                                      |
| MGIV-F1-1 | CGTACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTAC (SEQ ID NO: 47)                          |
| MGIV-F1-2 | TGGATTTAAAAGGTCTTTAATGGGTATTTTATTCATCGGTACCCAATTC                               |

|            |                                                                                  |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|            | GCCCTATAGT (SEQ ID NO: 48)                                                       |
| MGIV-F1-3  | ACCCATTAAAGACCTTTTAAATCCACAAATCACAGATGAGTTTAAATC<br>CAGCATACTAG (SEQ ID NO: 49)  |
| MGIV-F1-4  | TACAGCAAATAGAAAAGAGCTTTTTATTTATGTCTAGTATGCTGGATT<br>TAAACTCATCT (SEQ ID NO: 50)  |
| MGIV-F1-5  | AAAAAGCTCTTTTCTATTTGCTGTAATTTACCTAAGTTACCAGAGAGT<br>GTAACAACAGA (SEQ ID NO: 51)  |
| MGIV-F1-6  | AAGAATCCTAATATATCCCTTAATTCAACTTCTTCTTCTGTTGTTACAC<br>TCTCTGGTAA (SEQ ID NO: 52)  |
| MGIV-F1-7  | GTTGAATTAAGGGATATATTAGGATTCTTATCTAGGGCCAACAAAAAC<br>CGTAAGATTAT (SEQ ID NO: 53)  |
| MGIV-F1-8  | ATATCGCATGCTTGTTGATAGAAAGACAGTAGCTTCATAATCTTACGG<br>TTTTTGTTGGC (SEQ ID NO: 54)  |
| MGIV-F1-9  | CTATCGAACAAGCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGCTCAAGTGCT<br>CCAAAGAAAAA (SEQ ID NO: 55)  |
| MGIV-F1-10 | ACTCCCAGTTGTTCTTCAGACACTTGGCGCACTTCGGTTTTTCTTTGGA<br>GCACTTGAGC (SEQ ID NO: 56)  |
| MGIV-F1-11 | GTCTGAAGAACAACCTGGGAGTGTGCTACTCTCCCAAACCAAAAGG<br>TCTCCGCTGACT (SEQ ID NO: 57)   |
| MGIV-F1-12 | GTCTTTCTAGCCTTGATTCCACTTCTGTCAGATGTGCCCTAGTCAGCG<br>GAGACCTTTTG (SEQ ID NO: 58)  |
| MGIV-F1-13 | GTGGAATCAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTACTGATTTT<br>TCCTCGAGAAGA (SEQ ID NO: 59)  |
| MGIV-F1-14 | CTGTAAAGAATCCATTTTCAAATCATGTCAAAGTCTTCTCGAGGAA<br>AAATCAGTAGAA (SEQ ID NO: 60)   |
| MGIV-F1-15 | CATGATTTTGAAAATGGATTCTTTACAGGATATAAAAGCATTGTAA<br>TGGGTAAGGAAC (SEQ ID NO: 61)   |
| MGIV-F1-16 | CGTACGATGATAGCGGTTGGCTTGTCTTGGTCTTGTTCCCTACCCATT<br>AACAATGCT (SEQ ID NO: 62)    |
| MGIV-F2-1  | CGTACGAACAAGACCAAGACA (SEQ ID NO: 63)                                            |
| MGIV-F2-2  | ACCACCGATACCACAACCAACGATGATAGCGGTTGGCTTGTCTTGGT<br>CTTGTTTCGTACG (SEQ ID NO: 64) |
| MGIV-F2-3  | TGGTTGTGGTATCGGTGGTATCGCTACCGCTGCTAGATTGGCTAAGG<br>AAGGTTTCCAAG (SEQ ID NO: 65)  |
| MGIV-F2-4  | TCTACCACCAGAGTAGTCGTTCTTTTCGAAAACGGTAACTTGGAAC                                   |

|            |                                                                                  |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|            | CTTCCTTAGCCA (SEQ ID NO: 66)                                                     |
| MGIV-F2-5  | AACGACTACTCTGGTGGTAGATGTTCTTTGATCGAACGCGACGGTTA<br>CAGATTCGACCA (SEQ ID NO: 67)  |
| MGIV-F2-6  | TGCTTGAACAAGTCTGGCAACAACAACAAAGATGGACCTTGGTCGAA<br>TCTGTAACCGTC (SEQ ID NO: 68)  |
| MGIV-F2-7  | TTGCCAGACTTGTTCAGCAAACCTTCGAAGACTTGGGTGAAAAGATG<br>GAAGACTGGGT (SEQ ID NO: 69)   |
| MGIV-F2-8  | AGTGACAAACGTAGTTTGGTTCACACTTGATCAAGTCAACCCAGTCTT<br>CCATCTTTTCA (SEQ ID NO: 70)  |
| MGIV-F2-9  | GAACCAAACCTACGTTTGTCACTTCCACGACGAAGAAACCTTCACCTTC<br>TCTACCGACAT (SEQ ID NO: 71) |
| MGIV-F2-10 | TACCTTCGAATCTTTCAACTTCTCTCTTCAACAAAGCCATGTCGGTAGA<br>GAAGGTGAAG (SEQ ID NO: 72)  |
| MGIV-F2-11 | GAGAAGTTGAAAGATTCTGAAGGTAAGGACGGTTTCGACAGATTCTTGT<br>CTTTCATCCAA (SEQ ID NO: 73) |
| MGIV-F2-12 | TGAACAACAGCCAATTCGTAGTGTCTGTGAGCTTCTTGGATGAAAGAC<br>AAGAATCTGTC (SEQ ID NO: 74)  |
| MGIV-F2-13 | CTACGAATTGGCTGTTGTTACGTTTTGCAAAAGAACTTCCCAGGTTTC<br>GCTGCTTTCT (SEQ ID NO: 75)   |
| MGIV-F2-14 | GGGTGCAAAGCCAAGATTTGACCGATGAATTGCAATCTCAAGAAAGCA<br>GCGAAACCTGG (SEQ ID NO: 76)  |
| MGIV-F2-15 | CAAATCTTGGCTTTGCACCCATTCGAATCTATCTGGACCAGAGTTTGTA<br>GATACTTCAA (SEQ ID NO: 77)  |
| MGIV-F2-16 | CGTACGAAAACCTTCTCAATCTGTCTGGTCTTGAAGTATCTACAACTC<br>TGGTC (SEQ ID NO: 78)        |
| MGIV-F3-1  | CGTACGATACTTCAAGACCGACA (SEQ ID NO: 79)                                          |
| MGIV-F3-2  | ATGTACATAACAGCGAAAGAGAAAACCTTCTCAATCTGTCTGGTCTTGA<br>AGTATCGTAC (SEQ ID NO: 80)  |
| MGIV-F3-3  | TTTTCTCTTTCGCTGTTATGTACATGGGTCAATCTCCATACTCTGCTCCA<br>GGAACCTAC (SEQ ID NO: 81)  |
| MGIV-F3-4  | CAGATACCTTCGGTCAATTTCGGTGTATTGCAACAAAGAGTAGGTTCTG<br>GAGCAGAGTA (SEQ ID NO: 82)  |
| MGIV-F3-5  | CCGAATTGACCGAAGGTATCTGGTATCCAAGAGGTGGTTTCTGGCAAG<br>TTCCAAACACC (SEQ ID NO: 83)  |
| MGIV-F3-6  | CTTAGCAGATGGGTGTTTCTCTTAACGATTTGCAACAAGGTGTTTGG                                  |

|            |                                                                                  |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|            | AACTTGCCAGA (SEQ ID NO: 84)                                                      |
| MGIV-F3-7  | GAGAAACAACCCATCTGCTAAGTTCAACTTCAACGCTCCAGTTTCTCA<br>AGTTTTGTTGT (SEQ ID NO: 85)  |
| MGIV-F3-8  | CCAATCTAACACCGGTAGCTCTGTCCTTAGCTGGAGACAACAAAATT<br>GAGAAACTGGA (SEQ ID NO: 86)   |
| MGIV-F3-9  | GAGCTACCGGTGTTAGATTGGAATCTGGTGAAGAACACCACGCTGACG<br>TTGTTATCGTT (SEQ ID NO: 87)  |
| MGIV-F3-10 | TGGGATCAAGTGTTTCAAGCGTAAACCAAGTCAGCGTTAACGATAAC<br>AACGTCAGCGT (SEQ ID NO: 88)   |
| MGIV-F3-11 | GCTTCTGAACACTTGATCCCAGACGACGCTAGAAACAAGATCGGTCAA<br>TTGGGTGAAGT (SEQ ID NO: 89)  |
| MGIV-F3-12 | TCTTACCACCAACCAAGTCAGCCACCAAGATCGCTTAACTTCACCCAA<br>TTGACCGATC (SEQ ID NO: 90)   |
| MGIV-F3-13 | CTGACTTGGTTGGTGGTAAGAAGTTGAAGGGTTCTTGTTCTTCTTTGT<br>CTTTCTACTGG (SEQ ID NO: 91)  |
| MGIV-F3-14 | GACCACCCAAACCGTCAACGATTCTGTCCATAGACCAGTAGAAAGA<br>CAAAGAAGAACAA (SEQ ID NO: 92)  |
| MGIV-F3-15 | GTTGACGGTTTGGGTGGTCACAACATCTTCTTGGCTGAAGACTTCAA<br>GGGTTCTTTCTGA (SEQ ID NO: 93) |
| MGIV-F3-16 | CGTACGATGGTGTGCGAAAGAACCCTTGAAGTCT (SEQ ID NO: 94)                               |
| MGIV-F4-1  | CGTACGCTGAAGACTTCAAGGGTT (SEQ ID NO: 95)                                         |
| MGIV-F4-2  | CAGCTGGCAAACCCAATTCTTCGAAGATGGTGTGCGAAAGAACCCTT<br>GAAGTCTTCAGCG (SEQ ID NO: 96) |
| MGIV-F4-3  | GAATTGGGTTTGCCAGCTGACCCATCTTTCTACGTTAACGTTCCAAG<br>TAGAATCGACCC (SEQ ID NO: 97)  |
| MGIV-F4-4  | AGATAACGATAGCGTCCTTACCTTCTGGAGCAGCAGATGGGTCGATT<br>CTACTTGGAACG (SEQ ID NO: 98)  |
| MGIV-F4-5  | GGTAAGGACGCTATCGTTATCTTGGTCCATGTGGTCACATCGACG<br>CTTCTAACCCACA (SEQ ID NO: 99)   |
| MGIV-F4-6  | AACGAACTTTCTAGCTCTAGCAACCAACTTGTTGTAGTCTTGTGGGT<br>TAGAAGCGTCGA (SEQ ID NO: 100) |
| MGIV-F4-7  | TGCTAGAGCTAGAAAGTTCGTTATCCAAACCTTGCTGCTAAGTTGGGT<br>TTGCCAGACT (SEQ ID NO: 101)  |
| MGIV-F4-8  | AGCGTCGTGAACCTTTTCAGCAACGATCATCTTTTCGAAGTCTGGCAAA<br>CCCAACTTAG (SEQ ID NO: 102) |

|            |                                                                                    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| MGIV-F4-9  | TGAAAAGGTTACGACGCTCCATCTTGGGAAAAGGAATTCAACTTGAA<br>GGACGGTTCTA (SEQ ID NO: 103)    |
| MGIV-F4-10 | CCCAAACTTGCATGAAGTTGTGAGCCAAACCCAAGATAGAACCGTCC<br>TTCAAGTTGAA (SEQ ID NO: 104)    |
| MGIV-F4-11 | ACAACTTCATGCAAGTTTTGGGTTTCAGACCATCTACCAGACACCCAA<br>AGTACGACAAG (SEQ ID NO: 105)   |
| MGIV-F4-12 | CCGGTTCCTGGGTGGGTAGAAAGCACCAACGAAGAACAACCTTGTCGTA<br>CTTTGGGTGTCT (SEQ ID NO: 106) |
| MGIV-F4-13 | CCCACCCAGGAACCGGTGTTCCAATCGTTTTGGCTGGTGCTAAGTTGA<br>CCGCTAACCAA (SEQ ID NO: 107)   |
| MGIV-F4-14 | GGGTCTGGAGCTGGAGATCGGTCGAAAGATTCCAAAACCTTGGTTAGC<br>GGTCAACTTAGC (SEQ ID NO: 108)  |
| MGIV-F4-15 | ATCTCCAGCTCCAGACCCAAACATGTCTTTGTCTGTTCCATACGGTAA<br>GCCATTGAAGT (SEQ ID NO: 109)   |
| MGIV-F4-16 | CGTACGTTAGACTTCAATGGCTTACCGTATGG (SEQ ID NO: 110)                                  |
| MGIV-F5-1  | CGTACGTCTGTTCCATACGGTAAGCCATTGAAGTCTAACGGAACCGG<br>TATCGACTCT (SEQ ID NO: 111)     |
| MGIV-F5-2  | AAACCCATCTTTCCAAGTCCATGAACTTCAATTGAACTTGAGAGTCG<br>ATACCGGTTCCG (SEQ ID NO: 112)   |
| MGIV-F5-3  | TGGACTTGGAAGATGGGTTTACTTGTTGGTTTTGTTGATCGGTGCTG<br>TTATCGCTCGA (SEQ ID NO: 113)    |
| MGIV-F5-4  | CAGTACAGCAGGGACCCCAGGAAAGCCAAAACACCAACAGATCGAG<br>CGATAACAGCACC (SEQ ID NO: 114)   |
| MGIV-F5-5  | GGGGTCCCTGCTGTACTGGCCCGGGGTGCGCGCGCTGCTGGACCGCG<br>ACTGTCGCGTGG (SEQ ID NO: 115)   |
| MGIV-F5-6  | GGCCCCGGTGGCCAGGTACGTCATGCGGCCGGCATAGCGGGCGGCC<br>ACGCGACAGTCGC (SEQ ID NO: 116)   |
| MGIV-F5-7  | TGGCCACCGGGGCCCTGCTCGCCCGCTTCAATCCCGACGCCGTCCGGT<br>GCGTTTTGACG (SEQ ID NO: 117)   |
| MGIV-F5-8  | CGCCAGCACATCCAGCACGCGCCCCAGGAAGGCGGCCTCCCGCGTCA<br>AAACGCACCGGA (SEQ ID NO: 118)   |
| MGIV-F5-9  | GCTGGATGTGCTGGCGGTGATGGCGGAGCAGACGGTCCAGTGGCTCT<br>CGGTGGTCGTGG (SEQ ID NO: 119)   |
| MGIV-F5-10 | TCCGCAAAGGCGGGGTGGTGCACGTGCGGGTGCAGGCGCGCCCCAC<br>GACCACCGAGAG (SEQ ID NO: 120)    |

|            |                                                                                  |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| MGIV-F5-11 | CCCCGCCTTTGCGGACGTGGCGCGGGAGGAGCTGTTTCGCGCCCTGC<br>CCCTGGGAAGCC (SEQ ID NO: 121) |
| MGIV-F5-12 | GCGGTGTGCCCCAGCGCCTCGTGCTCGGCCCCACGACCGCGGGGCT<br>TCCCAGGGGCAG (SEQ ID NO: 122)  |
| MGIV-F5-13 | GCTGGGCGACACCGCAGCGCGCCGGCTGCTCGCCCACTAGTTCTAGA<br>GCGGCCGCCACC (SEQ ID NO: 123) |
| MGIV-F5-14 | CGTACGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTC (SEQ ID NO: 124)                                   |

具体实验流程如下:

#### 1. PCA 两步组装获得亚片段:

委托深圳华大基因科技服务有限公司合成表 1 的所有寡核苷酸, 并将合成的寡核苷酸分别稀释至 10  $\mu$ M, 各取出 2.5  $\mu$ L 混合, 取出 2  $\mu$ L 为模板进行 SOE PCA 第一步组装, 其中加入 Q5 DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L, 5 $\times$ 缓冲液 4  $\mu$ L, 2.5 mM dNTPs 1.6  $\mu$ L, 加水补足 20  $\mu$ L。反应程序为 98  $^{\circ}$ C 30 sec, 98  $^{\circ}$ C 10 sec, 55 $^{\circ}$ C 1sec、60 $^{\circ}$ C 30 sec (-0.5  $^{\circ}$ C/循环)、72  $^{\circ}$ C 30 sec, 20 个循环, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 12  $^{\circ}$ C 保持。第二步: 配置以下反应体系, Ex Taq DNA 聚合酶 (TAKARA) 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$ 缓冲液 5  $\mu$ L, 2.5 mM dNTPs 4  $\mu$ L, 第一步 PCR 产物 10  $\mu$ L, 每个亚片段的第一条和最后一条寡核苷酸作为引物, 各取 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 50 $\mu$ L。反应程序为 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 sec、55  $^{\circ}$ C 30 sec、72  $^{\circ}$ C 30 sec, 29 个循环, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 12  $^{\circ}$ C 保持。

电泳检测: 准备 1%琼脂糖凝胶, 取 5  $\mu$ L PCR 产物进行电泳检测, 3 $\mu$ L DL 2000 DNA ladder, 180 V 电压 30 min, 电泳图如图 5 (a) 所示, 均获得了最终拼接的 500 bp 左右的亚片段。

#### 2. TA 克隆

使用凝胶纯化试剂盒切胶纯化步骤 1 中的 PCR 产物, 使用 TA 克隆试剂盒 (TAKARA) 克隆 PCR 纯化产物。

#### 3. 菌液 PCR

从步骤 2 中的 TA 克隆平板挑选单克隆, 培养过夜后取出 2  $\mu$ L 菌液为模板进行菌液 PCR, M13-F 和 M13-R 各 0.5  $\mu$ L, 2 $\times$ PCR Mix 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 10 $\mu$ L。反应程序为 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 sec、55  $^{\circ}$ C 30 sec、72  $^{\circ}$ C 30 sec, 29 个循环, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 12  $^{\circ}$ C 保持。取 5  $\mu$ L 酶切产物进行电泳检测, 采用 1%琼脂糖凝胶, 180 V 电泳 30 min。电泳结果如图 5 (b) 所示, 正确条带大小如箭头所示。

#### 4. 测序分析

挑选菌液 PCR 正确的菌提取质粒进行 sanger 测序, 分析、获得带有正确组装序列的质粒。

#### 5. Gibson 一步组装获得最终整合质粒

将步骤 4 中获得的正确的亚片段克隆质粒和载体骨架进行一步组装, 20  $\mu$ L 反应体系如下: 4 $\times$ 缓冲液 5  $\mu$ L, 亚片段克隆质粒和载体骨架加入的摩尔比为 5:1, 内切酶 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 $\mu$ L, 温浴 1 h, 其中报告质粒构建体的内切酶为 Bswi I, 反应温度为 55  $^{\circ}$ C; G-I-V (Gal4-crtI-VP16)质粒构建体的内切酶为 TspM I, 反应温度为 75  $^{\circ}$ C, 温浴之后取出 10  $\mu$ L 进行克隆转化。

#### 6. 酶切鉴定

从步骤 5 中的 TA 克隆平板挑单克隆, 培养过夜后使用试剂盒提取质粒, 用设计的酶切位点酶切鉴定。酶切体系: XbaI (NEB) 0.2  $\mu$ L, XhoI/PstI (NEB) 0.2  $\mu$ L, 缓冲液 1  $\mu$ L, 质粒 DNA 3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足

10  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 酶切 1 h。取 5  $\mu$ L 酶切产物进行电泳检测, 采用 1% 琼脂糖凝胶, 180 V 电泳 30 min。电泳结果如图 5 (c) 所示, 并附有模拟酶切示意图。

#### 7. 测序分析

挑选酶切正确的质粒进行测序, 分析、获得带有正确组装序列的质粒。

#### 8. 酶标仪检测荧光值

将测序正确的两种整合质粒按摩尔比 1:1 混合, 并检测其浓度, 取出 200 ng 转化番茄红素酵母工程菌 (作为阳性酵母菌株), 并涂布相应营养缺陷型培养基, 挑取单菌落进行液体培养基过夜培养, 同时将未转化任何质粒的番茄红素酵母工程菌株 (作为阴性酵母菌株) 进行过夜培养, 如图 6 所示, 在荧光显示仪上可以发现含有生物感应器的番茄红素酵母菌株 (A) 相比没有生物感应器的番茄红素酵母菌株 (B) 有着较为明显的绿色荧光显示。

为了得到更为确切的数据以说明番茄红素生物感应器的检测功能, 将上述作为阳性和阴性的菌株进行培养, 分时间段检测其 OD 值并用酶标仪读取荧光值 (yEGFP 的激发波长为 488 nm, 发射波长为 575 nm), 以菌液浓度 OD 值作为横坐标、荧光值作为纵坐标将数据绘制成图, 如图 7 所示。从图中可以看出, 阳性的酵母菌株荧光值明显高于阴性酵母菌株, 证明本实施例成功构建了番茄红素生物感应器, 并且使用该生物感应器可以对菌株是否产番茄红素进行检测。

#### 实施例 2 检测白藜芦醇的生物感应器

白藜芦醇 (resveratrol) 的形成是在对二苯烯合成酶 (STS) 的作用下, 将 p-香豆酰辅酶 A (p-Coumaroyl-CoA) 合成白藜芦醇 (如图 3)。因此, 可以将 STS 作为生物感应器的识别基团, 构建所用寡核苷酸序列如表 2 所示, 其他构建元件与实施例 1 相同, 且实验构建方法与实施例 1 一致, 具体信息可参见实施例 1。最终组装好的大片段为 5'-GAL1 启动子+yEGFP+CYC1-3'终止子片段 (SEQ ID NO: 133)、Mata2-GL77F-S-V 片段 (SEQ ID NO: 171), 将它们连入载体骨架 (同实施例 1)。

最终将组装好的质粒进行酶切验证并测序, 选择测序正确的两种构建质粒共转化白藜芦醇酵母工程菌中, 观察其实验结果。

白藜芦醇酵母工程菌: 来源于深圳华大基因生命科学研究院国家基因库, 该菌是以酿酒酵母菌株 SynYII (保藏号为 CCTCC NO: M 2014434) 为底盘细胞, 将白藜芦醇合成途径所需的外源基因 (Z26250、CYP81B1C、TAL、4CL3、STS 和 PAL) 拼接形成重组质粒, 导入底盘细胞进行代谢产物检测, 能够表达白藜芦醇的菌株为白藜芦醇酵母工程菌。将转化了两种整合质粒的白藜芦醇酵母工程菌作为阳性菌株, 未转化任何质粒的白藜芦醇酵母工程菌作为阴性菌株, 分别对这两种菌株的单克隆进行液体培养基过夜培养, 如图 8 所示, 在荧光显示仪上可以发现含有生物感应器的白藜芦醇酵母菌株 (C) 相比没有生物感应器的白藜芦醇酵母菌株 (D) 有着较为明显的绿色荧光显示。

并且, 分时间段检测阳性菌株与阴性菌株的 OD 值, 采用酶标仪读取其荧光值 (yEGFP 的激发波长为 488 nm, 发射波长为 575 nm), 以菌液浓度 OD 值作为横坐标、荧光值作为纵坐标将数据绘制成图, 如图 9 所示, 从图中可以看出, 阳性的酵母菌株荧光值明显高于阴性酵母菌株, 证明本实施例成功构建了白藜芦醇生物感应器, 并且使用该生物感应器可以对菌株是否产白藜芦醇进行检测。

表 2 构建白藜芦醇生物感应器所需序列



| 寡核苷酸名称 | 寡核苷酸序列                                                                            |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| STS-0  | TTACAGGATATAAAAGCATTGTTAATGGGTAAGGAACAAGACCAAGACAAGCCAA<br>CCGC (SEQ ID NO: 135)  |
| STS-1  | AGCGTGGGTCTCAGATGGCTTCAGTCGAGGAAATCAGAAATGCTCAACGTGCC<br>(SEQ ID NO: 136)         |
| STS-2  | TAGCTGTGCCAATGGCTAGGATGGTGGCCGGACCCTTGGCACGTTGAGCATTTCT<br>GATT (SEQ ID NO: 137)  |
| STS-3  | TCCTAGCCATTGGCACAGCTACCCCCGACCACTGTGTCTACCAGTCTGATTATGCT<br>GAT (SEQ ID NO: 138)  |
| STS-4  | TCATGTGCTCGCTCTTAGTGACCCTGAAATAGTAATCAGCATAATCAGACTGGTA<br>GACA (SEQ ID NO: 139)  |
| STS-5  | GTCATAAGAGCGAGCACATGACTGAGTTGAAGAAGAAGTTCAATCGCATATGTG<br>ACAA (SEQ ID NO: 140)   |
| STS-6  | CGTCAAATGAATATAACGCTTCTTGATCATTGATTTGTCACATATGCGATTGAACT<br>TCT (SEQ ID NO: 141)  |
| STS-7  | GATCAAGAAGCGTTATATTCATTTGACGGAAGAAATGCTTGAGGAGCACCCAAAC<br>ATTG (SEQ ID NO: 142)  |
| STS-8  | TCTTGGCGTATGTTAAGAGATGGAGCCATATAAGCCCCAATGTTTGGGTGCTCCTC<br>AAG (SEQ ID NO: 143)  |
| STS-9  | CTCCATCTCTTAACATACGCCAAGAGATTATCACTGTTGAGGTACCCAACTTGGG<br>AAG (SEQ ID NO: 144)   |
| STS-10 | GTTGACCCCACTCCTTAAGAGCCTTCAATGCTGCTTCCTTCCCAAGTTTGGGTACC<br>TCA (SEQ ID NO: 145)  |
| STS-11 | GCTCTTAAGGAGTGGGGTCAACCCAAATCAAAGATCACCCATCTTGATTTTGTAC<br>CAC (SEQ ID NO: 146)   |
| STS-12 | TTTATAATCTGCACCAGGCATTTCTACACCCGAGGTGGTACAAAATACAAGATGG<br>GTGA (SEQ ID NO: 147)  |
| STS-13 | AGAAATGCCTGGTGCAGATTATAAACTCGCTAATCTCTTAGGCCTCGAAACATCG<br>GTTA (SEQ ID NO: 148)  |
| STS-14 | CTGCATAGCACCCCTTGATGGTACAACATCACTCTTCTAACCGATGTTTCGAGGCCT<br>AAG (SEQ ID NO: 149) |
| STS-15 | ACCATCAAGGGTGCTATGCAGGTGGAAGTGTCCCTAGAACAGCTAAGGATCTTGC<br>AGAG (SEQ ID NO: 150)  |
| STS-16 | AGCACACCACAAGAACTCTTGCTCCTGCATTATTCTCTGCAAGATCCTTAGCTGTT<br>CTA (SEQ ID NO: 151)  |

|        |                                                                                   |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| STS-17 | GCAAGAGTTCTTGTGGTGTGCTCTGAGATCACAGTTGTTACATTTTCGTGGCCCTTC<br>CGA (SEQ ID NO: 152) |
| STS-18 | ACCAAAAAGGGCTTGGCCAACTAAAGAGTCCAAAGCATCTTCGGAAGGGCCACG<br>AAATG (SEQ ID NO: 153)  |
| STS-19 | TGGCCAAGCCCTTTTTGGTGATGGGTCTGCAGCTGTAATTGTAGGATCAGATCCAG<br>ATG (SEQ ID NO: 154)  |
| STS-20 | GACAAGCTGGAAGAGTGGTCGTTCAATTGAGACATCTGGATCTGATCCTACAATT<br>ACAG (SEQ ID NO: 155)  |
| STS-21 | CGACCACTCTTCCAGCTTGTCTCAGCAGCCCAAACATTTATTCCTAATTCTGCAGG<br>TGC (SEQ ID NO: 156)  |
| STS-22 | GGTGAGTCCACCTCACGTAAGTTTCCTGCAATTGCACCTGCAGAATTAGGAATA<br>AATG (SEQ ID NO: 157)   |
| STS-23 | TTACGTGAGGTGGGACTCACCTTTCATTTGTGGCCCAATGTGCCCACTTTAATTTTC<br>TGA (SEQ ID NO: 158) |
| STS-24 | GTCAAAAGCCTGAGTCAAACATTTCTCTACGTTCTCAGAAATTAAAGTGGGCACA<br>TTGG (SEQ ID NO: 159)  |
| STS-25 | GAAATGTTTGACTCAGGCTTTTGACCCACTTGGTATTAGCGATTGGAACCTCGTTAT<br>TTT (SEQ ID NO: 160) |
| STS-26 | AAGAATTGCAGGGCCACCTGGGTGAGCAATCCAAAATAACGAGTTCCAATCGCTA<br>ATAC (SEQ ID NO: 161)  |
| STS-27 | CAGGTGGCCCTGCAATTCTTGATGCAGTTGAAGCAAACTCAATTTAGATAAAAA<br>GAAA (SEQ ID NO: 162)   |
| STS-28 | CTTAGCACATGCCTCGTTGCTTCAAGTTTCTTTTTATCTAAATTGAGTTTTGCTTCA<br>AC (SEQ ID NO: 163)  |
| STS-29 | AGCAACGAGGCATGTGCTAAGTGAGTATGGAAACATGTCAAGTGCATGTGTGTTG<br>TTTA (SEQ ID NO: 164)  |
| STS-30 | CCCTTATGGGATTTCTTTCTCATCTCATCCAAAATAAACAACACACATGCACTTGA<br>CAT (SEQ ID NO: 165)  |
| STS-31 | GAGATGAGAAAGAAATCCCATAAGGGGGAGAAGGCCACCACAGGTGAAGGATTG<br>GATTG (SEQ ID NO: 166)  |
| STS-32 | ATAGTCAAGCCTGGTCCAAAACCGAATAATACTCCCAATCCAATCCTTCACCTGT<br>GGT (SEQ ID NO: 167)   |
| STS-33 | GGTTTTGGACCAGGCTTGACTATTGAACTGTTGTGTTGCATAGCATTCCTATGGT<br>TAC (SEQ ID NO: 168)   |
| STS-34 | GTGCTGGGTCTCGGCTATTAATTTGTAACCATAGGAATGCTATGCAACA (SEQ                            |

|        |                                                                                  |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------|
|        | ID NO: 169)                                                                      |
| STS-35 | CACCCCGGGCCAGTACAGCAGGGACCCCAGGAAAGCCAAAACACCAACAGATCG<br>AGCGA (SEQ ID NO: 170) |

以上应用了具体个例对本发明进行阐述，只是用于帮助理解本发明，并不用以限制本发明。对于本发明所属技术领域的技术人员，依据本发明的思想，还可以做出若干简单推演、变形或替换。

18  
权 利 要 求 书

1. 一种检测目标分子化合物的生物感应器，其特征在于，所述生物感应器是融合蛋白，所述生物感应器包括目标分子合成酶，和分别连接在所述目标分子合成酶两端的 DNA 结合结构域、转录激活结构域，以及降解决定子；当不存在目标分子的前体物质时，所述降解决定子将所述生物感应器降解；当存在目标分子的前体物质时，所述目标分子合成酶识别并结合所述前体物质以稳定所述生物感应器，使得所述降解决定子失效而自动脱离，所述 DNA 结合结构域与报告基因的启动子区域结合，所述转录激活结构域激活所述报告基因表达。

2. 根据权利要求 1 所述的生物感应器，其特征在于，所述生物感应器从氮端到碳端依次连接降解决定子、DNA 结合结构域、目标分子合成酶和转录激活结构域。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物感应器，其特征在于，目标分子化合物选自天然产物，相应地，所述目标分子合成酶是合成所述天然产物的酶。

4. 根据权利要求 3 所述的生物感应器，其特征在于，所述目标分子合成酶是野生型的合成所述天然产物的酶。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物感应器，其特征在于，所述目标分子化合物选自药物和/或药物前体化合物，相应地，所述目标分子合成酶是合成所述药物和/或药物前体化合物的酶。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物感应器，其特征在于，所述目标分子是番茄红素，所述目标分子合成酶是番茄红素合成酶。

7. 根据权利要求 6 所述的生物感应器，其特征在于，所述番茄红素合成酶由 *CrtI* 基因编码。

8. 根据权利要求 6 所述的生物感应器，其特征在于，所述目标分子的前体物质是八氢番茄红素。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物感应器，其特征在于，所述目标分子是白藜芦醇，所述目标分子合成酶是对二苯烯合成酶。

10. 根据权利要求 9 所述的生物感应器，其特征在于，所述对二苯烯合成酶由 *STS* 基因编码。

11. 根据权利要求 9 所述的生物感应器，其特征在于，所述目标分子的前体物质是 *p*-香豆酰辅酶 A。

12. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物感应器，其特征在于，所述降解决定子是酵母中的降解决定子 MAT $\alpha$ 2。

13. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物感应器，其特征在于，所述报告基因为抗性筛选基因和/或荧光标记基因。

14. 根据权利要求 13 所述的生物感应器，其特征在于，所述抗性筛选基因选自氨苄青霉素、卡那霉素、壮观霉素、和/或四环素。

15. 根据权利要求 13 所述的生物感应器，其特征在于，所述荧光标记基因选自绿色荧光蛋白 GFP 基因、红色荧光蛋白 RFP 基因、和/或黄色荧光蛋白 YFP 基因。

16. 一种构建权利要求 1-15 任一项所述的生物感应器的方法，其特征在于，所述方法包括：首先将编码目标分子合成酶的核酸片段，和分别连接在所述目标分子合成酶两端的 DNA 结合结构域的核酸片段、转录激活结构域的核酸片段，以及降解决定子的核酸片段组装起来；然后将组装后的核酸片段连入质粒载体中。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括：构建报告基因的表达质粒，所述 DNA 结合结构域与报告基因的启动子区域结合，所述转录激活结构域激活所述报告基因表达。

18. 根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述核酸片段的组装通过 PCA 组装和/或 Gibson 组装

实现。

19. 一种编码权利要求 1-15 任一项所述的生物感应器的核苷酸序列。
20. 根据权利要求 19 所述的核苷酸序列，其特征在于，所述核苷酸序列包括如 SEQ ID NO: 134 所示的序列。
21. 根据权利要求 19 所述的核苷酸序列，其特征在于，所述核苷酸序列包括如 SEQ ID NO: 171 所示的序列。
22. 根据权利要求 19-21 任一项所述的核苷酸序列，其特征在于，所述核苷酸序列还包括第一载体序列。
23. 根据权利要求 22 所述的核苷酸序列，其特征在于，所述第一载体序列是载体骨架 pRS415 的序列。
24. 根据权利要求 19 所述的核苷酸序列，其特征在于，还包括如权利要求 1、13-15 任一项所述报告基因的表达序列。
25. 根据权利要求 24 所述的核苷酸序列，其特征在于，所述报告基因表达序列包括如 SEQ ID NO: 133 所示的序列。
26. 根据权利要求 24 或 25 所述的核苷酸序列，其特征在于，所述报告基因表达序列还包括第二载体序列。
27. 根据权利要求 26 所述的核苷酸序列，其特征在于，所述第二载体序列是载体骨架 pRS413 的序列。
28. 一种检测目标分子化合物的方法，其特征在于，所述方法包括：将权利要求 1-15 任一项所述的生物感应器或者权利要求 19-23 任一项的核苷酸序列，与报告基因共同导入宿主细胞内进行表达；通过检测所述报告基因的表达对目标分子化合物进行定性和/或定量分析。
29. 一种检测目标分子化合物的生物感应系统，其特征在于，所述生物感应系统包括编码权利要求 1-15 任一项所述的生物感应器的核苷酸序列，和报告基因表达序列。
30. 根据权利要求 29 所述的生物感应系统，其特征在于，还包括使所述生物感应器的核苷酸序列和报告基因表达序列在其内表达的宿主细胞。
31. 根据权利要求 29 或 30 所述的生物感应系统，其特征在于，所述生物感应器的核苷酸序列包括如 SEQ ID NO: 134 所示的序列，所述报告基因表达序列包括如 SEQ ID NO: 133 所示的序列。
32. 根据权利要求 29 或 30 所述的生物感应系统，其特征在于，所述生物感应器的核苷酸序列包括如 SEQ ID NO: 171 所示的序列，所述报告基因表达序列包括如 SEQ ID NO: 133 所示的序列。
33. 根据权利要求 29-32 任一项所述的生物感应系统，其特征在于，所述生物感应器的核苷酸序列还包括第一载体序列，所述报告基因表达序列还包括第二载体序列，所述宿主细胞是酵母细胞。
34. 根据权利要求 33 所述的生物感应系统，其特征在于，所述第一载体序列是载体骨架 pRS415 的序列，所述第二载体序列是载体骨架 pRS413 的序列。
35. 权利要求 1-15 任一项所述的生物感应器或者权利要求 19-27 任一项所述的核苷酸序列或者权利要求 29-34 任一项所述的生物感应系统在检测目标分子化合物中的用途。
36. 根据权利要求 35 所述的用途，其特征在于，所述用途包括对所述目标分子化合物进行相对定性分析、定量分析、和/或对产生所述目标分子化合物的宿主细胞进行筛选。

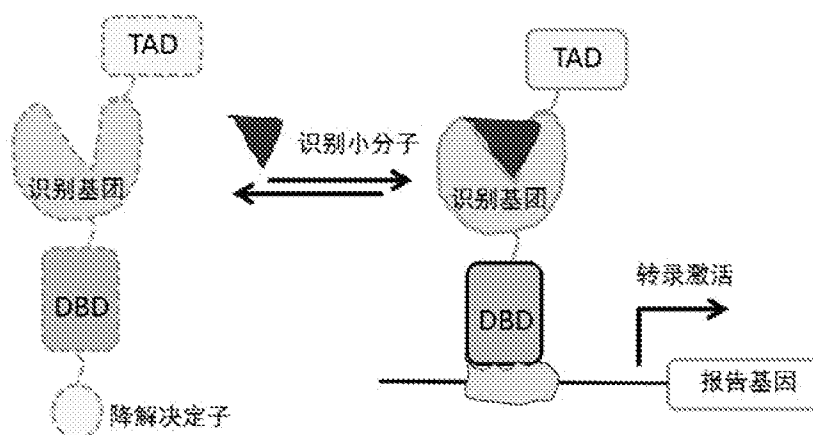


图 1

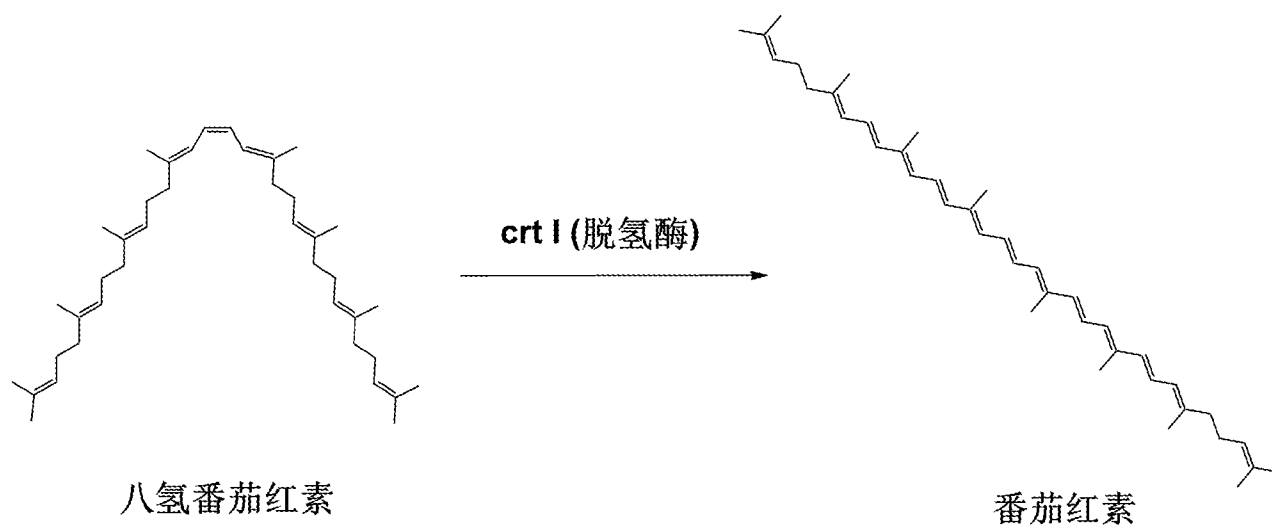


图 2

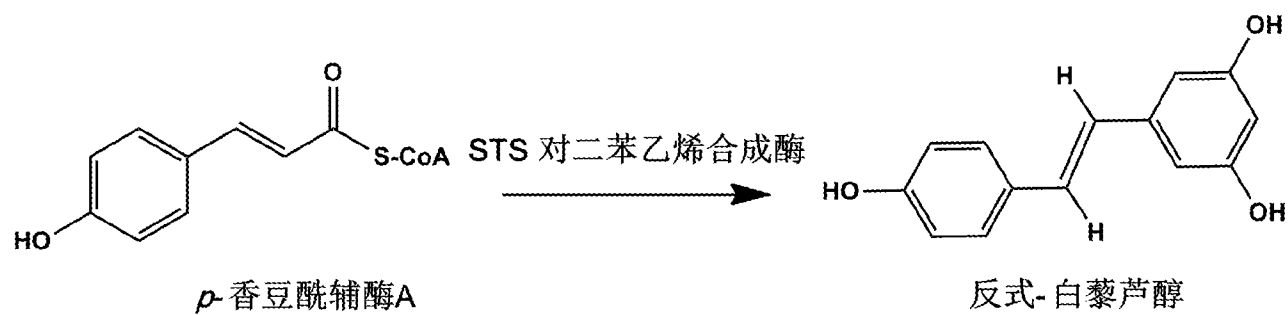


图 3

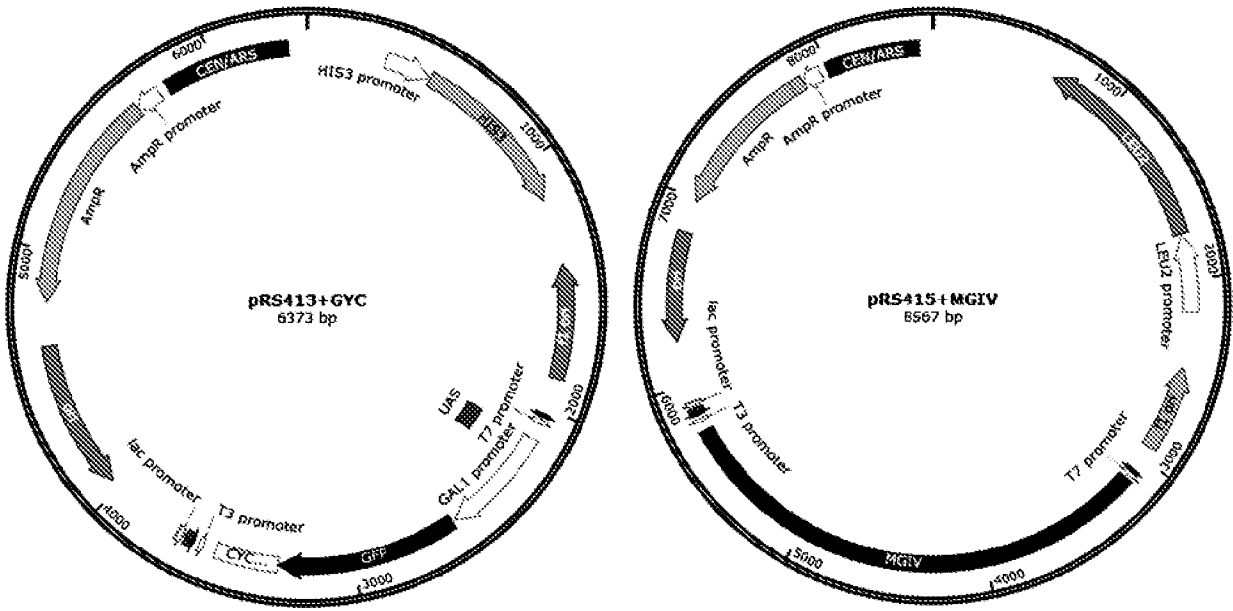


图 4

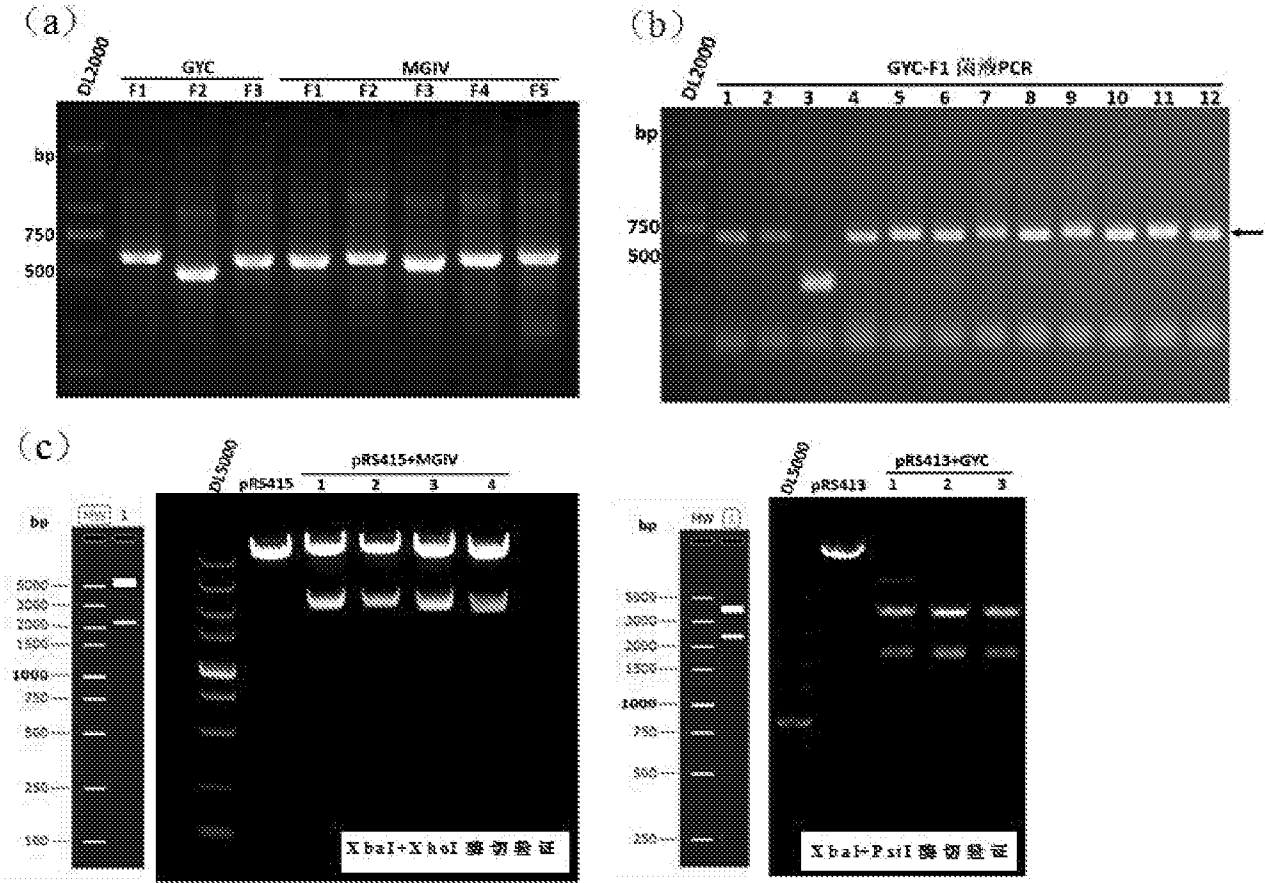


图 5

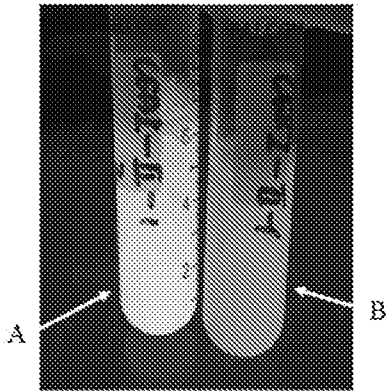


图 6

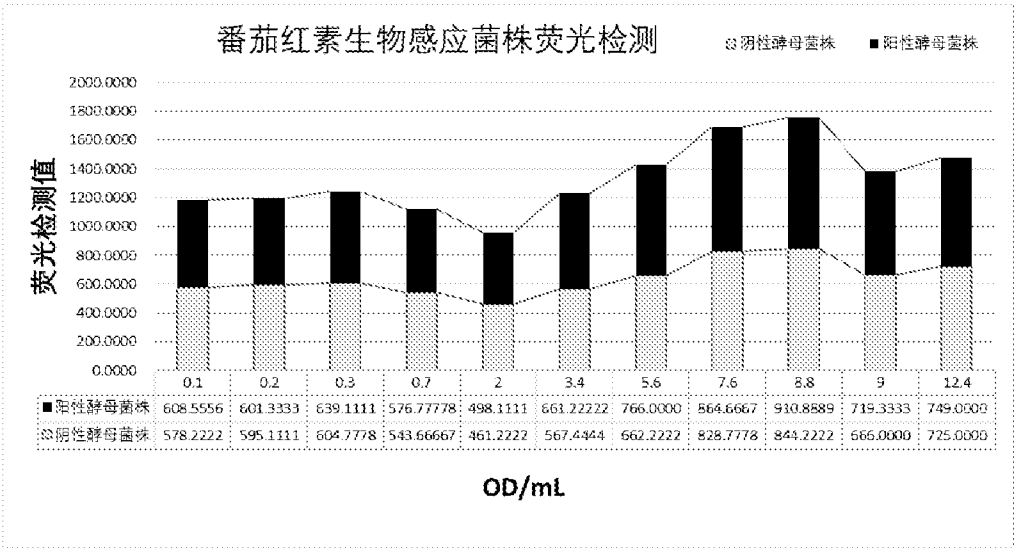


图 7

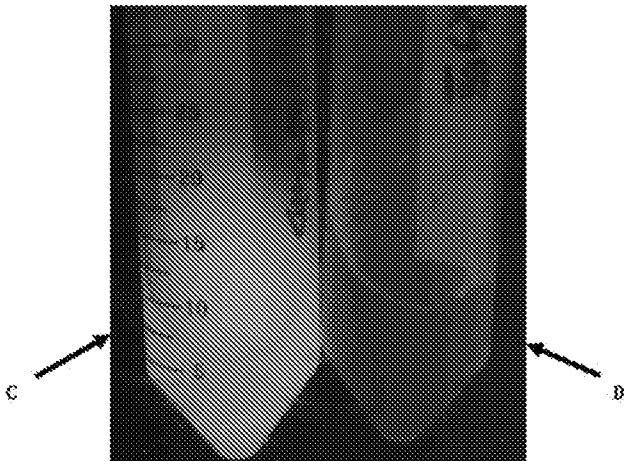


图 8



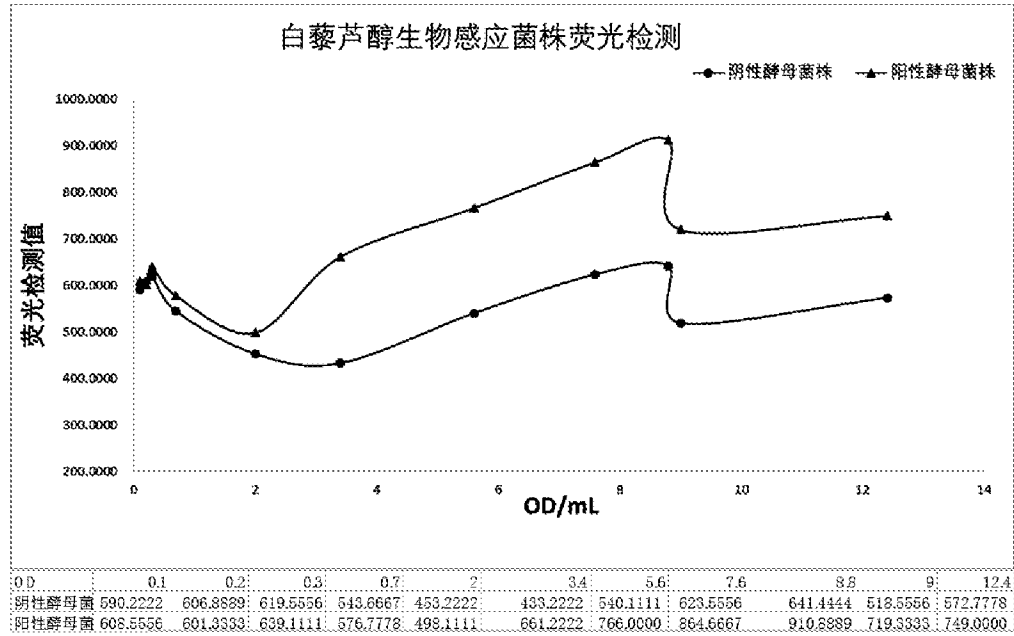


图 9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/110245

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

G01N 33/53(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)

G01N33 C12Q1

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, CNTXT, CNKI, VEN, EPTXT, USTXT, WOTXT, ISI, PUBMED: 生物感应器, 融合蛋白, 酶, DNA结合结构域, 转录激活结构域, 降解决定子, 报告基因, biosensor, fusion protein, enzyme, DNA-binding domain, DBD, transcriptional activation domain, TAD, degron, reporter

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                          | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | WO 2017117248 A1 (COLORADO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION ET AL.) 06 July 2017 (2017-07-06)<br>abstract, description, paragraphs 6-15, 16-26 and 30-69, embodiment 2, sequence listing, figures 1-11, and claims 1-28 | 1-36                  |
| Y         | US 2016202256 A1 (HARVARD COLLEGE ET AL.) 14 July 2016 (2016-07-14)<br>abstract, figures 1-7, description, paragraphs 6-15, 23-39 and 51-67 and embodiments 3-4, and claims 1-19                                            | 1-36                  |
| Y         | WO 2017048316 A1 (HARVARD COLLEGE) 23 March 2017 (2017-03-23)<br>abstract, description, page 4, lines 1-5, 13-15 and 19-27, page 5, lines 4-7 and 17-18 and embodiments 4-5, figures 2A and 7A-7C, and claims 1-31          | 1-36                  |
| Y         | WO 2017156238 A1 (HARVARD COLLEGE) 14 September 2017 (2017-09-14)<br>description, pages 2-3, 5 and 8                                                                                                                        | 1-36                  |
| A         | CN 104094115 A (CANVAX BIOTECH S.L.) 08 October 2014 (2014-10-08)<br>entire document                                                                                                                                        | 1-36                  |
| A         | WO 2016058094 A1 (UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL) 21 April 2016 (2016-04-21)<br>entire document                                                                                                                                     | 1-36                  |



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

10 January 2019

Date of mailing of the international search report

16 January 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China  
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/CN2018/110245****C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | WO 2016161088 A2 (FUNDAMENTAL SOLUTIONS CORP.) 06 October 2016<br>(2016-10-06)<br>entire document                                                                                                         | 1-36                  |
| Y         | FENG, J. et al. "A General Strategy to Construct Small Molecule Biosensors in Eukaryotes"<br><i>eLife</i> , Vol. vol. 4, 29 December 2015 (2015-12-29),<br>abstract, pages 1-3, 6 and 14, and figures 1-7 | 1-36                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/110245

**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/CN2018/110245**

| Patent document<br>cited in search report |            |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |              |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|------------|----|--------------------------------------|-------------------------|--------------|----|--------------------------------------|
| WO                                        | 2017117248 | A1 | 06 July 2017                         | US                      | 2017198363   | A1 | 13 July 2017                         |
| US                                        | 2016202256 | A1 | 14 July 2016                         | US                      | 2017363648   | A1 | 21 December 2017                     |
|                                           |            |    |                                      | US                      | 9766255      | B2 | 19 September 2017                    |
| WO                                        | 2017048316 | A1 | 23 March 2017                        | US                      | 2018259541   | A1 | 13 September 2018                    |
| WO                                        | 2017156238 | A1 | 14 September 2017                    | None                    |              |    |                                      |
| CN                                        | 104094115  | A  | 08 October 2014                      | CN                      | 104094115    | B  | 08 March 2017                        |
|                                           |            |    |                                      | EP                      | 2810064      | B1 | 20 January 2016                      |
|                                           |            |    |                                      | WO                      | 2013113369   | A1 | 08 August 2013                       |
|                                           |            |    |                                      | US                      | 2015260724   | A1 | 17 September 2015                    |
|                                           |            |    |                                      | JP                      | 2015505464   | A  | 23 February 2015                     |
|                                           |            |    |                                      | ES                      | 2568879      | T3 | 05 May 2016                          |
|                                           |            |    |                                      | US                      | 9714947      | B2 | 25 July 2017                         |
|                                           |            |    |                                      | EP                      | 2810064      | A1 | 10 December 2014                     |
| WO                                        | 2016058094 | A1 | 21 April 2016                        | IL                      | 250949       | D0 | 30 April 2017                        |
|                                           |            |    |                                      | EP                      | 3207052      | A4 | 25 April 2018                        |
|                                           |            |    |                                      | CA                      | 2963579      | A1 | 21 April 2016                        |
|                                           |            |    |                                      | AU                      | 2015333543   | A1 | 23 March 2017                        |
|                                           |            |    |                                      | EP                      | 3207052      | A1 | 23 August 2017                       |
|                                           |            |    |                                      | US                      | 2017234870   | A1 | 17 August 2017                       |
|                                           |            |    |                                      | CN                      | 107074926    | A  | 18 August 2017                       |
|                                           |            |    |                                      | JP                      | 2017536104   | A  | 07 December 2017                     |
|                                           |            |    |                                      | SG                      | 11201701895V | A  | 27 April 2017                        |
| WO                                        | 2016161088 | A2 | 06 October 2016                      | EP                      | 3404410      | A2 | 21 November 2018                     |
|                                           |            |    |                                      | EP                      | 3404411      | A2 | 21 November 2018                     |
|                                           |            |    |                                      | EP                      | 3404412      | A2 | 21 November 2018                     |
|                                           |            |    |                                      | KR                      | 20170132861  | A  | 04 December 2017                     |
|                                           |            |    |                                      | IL                      | 254687       | D0 | 30 November 2017                     |
|                                           |            |    |                                      | JP                      | 2018516590   | A  | 28 June 2018                         |
|                                           |            |    |                                      | EP                      | 3277831      | A2 | 07 February 2018                     |
|                                           |            |    |                                      | CN                      | 107429286    | A  | 01 December 2017                     |
|                                           |            |    |                                      | CA                      | 2982133      | A1 | 06 October 2016                      |

| <b>A. 主题的分类</b><br>G01N 33/53 (2006.01) i<br><br>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>B. 检索领域</b><br>检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)<br>G01N33 C12Q1<br><br>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献<br><br>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))<br>CNABS, CNTXT, CNKI, VEN, EPTXT, USTXT, WOTXT, ISI, PUBMED: 生物感应器, 融合蛋白, 酶, DNA 结合结构域, 转录激活结构域, 降解决定子, 报告基因, biosensor, fusion protein, enzyme, DNA-binding domain, DBD, transcriptional activation domain, TAD, degron, reporter                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                |                                              |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| <b>C. 相关文件</b> <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>Y</td> <td>WO 2017117248 A1 (UNIV COLORADO STATE RES FOUND等) 2017年 7月 6日 (2017 - 07 - 06)<br/>摘要, 说明书第6-15、16-26、30-69段, 实施例2, 序列表, 图1-11, 权利要求1-28</td> <td>1-36</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2016202256 A1 (HARVARD COLLEGE等) 2016年 7月 14日 (2016 - 07 - 14)<br/>摘要, 图1-7, 说明书第6-15、23-39、51-67段, 实施例3-4, 权利要求1-19</td> <td>1-36</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017048316 A1 (HARVARD COLLEGE) 2017年 3月 23日 (2017 - 03 - 23)<br/>摘要, 说明书第4页第1-5、13-15、19-27行, 第5页第4-7、17-18行, 实施例4-5, 图2A, 图7A-7C, 权利要求1-31</td> <td>1-36</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017156238 A1 (HARVARD COLLEGE) 2017年 9月 14日 (2017 - 09 - 14)<br/>说明书第2-3、5、8页</td> <td>1-36</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104094115 A (坎瓦克斯生物技术公司) 2014年 10月 8日 (2014 - 10 - 08)<br/>全文</td> <td>1-36</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016058094 A1 (UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL) 2016年 4月 21日 (2016 - 04 - 21)<br/>全文</td> <td>1-36</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 | Y | WO 2017117248 A1 (UNIV COLORADO STATE RES FOUND等) 2017年 7月 6日 (2017 - 07 - 06)<br>摘要, 说明书第6-15、16-26、30-69段, 实施例2, 序列表, 图1-11, 权利要求1-28 | 1-36 | Y | US 2016202256 A1 (HARVARD COLLEGE等) 2016年 7月 14日 (2016 - 07 - 14)<br>摘要, 图1-7, 说明书第6-15、23-39、51-67段, 实施例3-4, 权利要求1-19 | 1-36 | Y | WO 2017048316 A1 (HARVARD COLLEGE) 2017年 3月 23日 (2017 - 03 - 23)<br>摘要, 说明书第4页第1-5、13-15、19-27行, 第5页第4-7、17-18行, 实施例4-5, 图2A, 图7A-7C, 权利要求1-31 | 1-36 | Y | WO 2017156238 A1 (HARVARD COLLEGE) 2017年 9月 14日 (2017 - 09 - 14)<br>说明书第2-3、5、8页 | 1-36 | A | CN 104094115 A (坎瓦克斯生物技术公司) 2014年 10月 8日 (2014 - 10 - 08)<br>全文 | 1-36 | A | WO 2016058094 A1 (UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL) 2016年 4月 21日 (2016 - 04 - 21)<br>全文 | 1-36 |
| 类 型*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                              | 相关的权利要求                                      |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2017117248 A1 (UNIV COLORADO STATE RES FOUND等) 2017年 7月 6日 (2017 - 07 - 06)<br>摘要, 说明书第6-15、16-26、30-69段, 实施例2, 序列表, 图1-11, 权利要求1-28        | 1-36                                         |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2016202256 A1 (HARVARD COLLEGE等) 2016年 7月 14日 (2016 - 07 - 14)<br>摘要, 图1-7, 说明书第6-15、23-39、51-67段, 实施例3-4, 权利要求1-19                         | 1-36                                         |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2017048316 A1 (HARVARD COLLEGE) 2017年 3月 23日 (2017 - 03 - 23)<br>摘要, 说明书第4页第1-5、13-15、19-27行, 第5页第4-7、17-18行, 实施例4-5, 图2A, 图7A-7C, 权利要求1-31 | 1-36                                         |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2017156238 A1 (HARVARD COLLEGE) 2017年 9月 14日 (2017 - 09 - 14)<br>说明书第2-3、5、8页                                                               | 1-36                                         |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | CN 104094115 A (坎瓦克斯生物技术公司) 2014年 10月 8日 (2014 - 10 - 08)<br>全文                                                                                | 1-36                                         |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2016058094 A1 (UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL) 2016年 4月 21日 (2016 - 04 - 21)<br>全文                                                                  | 1-36                                         |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| <input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                |                                              |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| * 引用文件的具体类型:<br>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br>“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)<br>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br>“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<br>“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<br>“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<br>“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<br>“&” 同族专利的文件                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                |                                              |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| 国际检索实际完成的日期<br><br>2019年 1月 10日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                | 国际检索报告邮寄日期<br><br>2019年 1月 16日               |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局 (ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10) 62019451                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                | 授权官员<br><br>胡晓佳<br><br>电话号码 (86-10) 62085681 |      |                   |         |   |                                                                                                                                         |      |   |                                                                                                                        |      |   |                                                                                                                                                |      |   |                                                                                  |      |   |                                                                 |      |   |                                                                               |      |

| 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       | WO 2016161088 A2 (FUNDAMENTAL SOLUTIONS CORP) 2016年 10月 6日 (2016 - 10 - 06)<br>全文                                                                            | 1-36    |
| Y       | Feng等. "A general strategy to construct small molecule biosensors in eukar-<br>yotes"<br>eLife, 第4卷, 2015年 12月 29日 (2015 - 12 - 29),<br>摘要, 第1-3、6、14页, 图1-7 | 1-36    |

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/CN2018/110245

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |              |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|--------------|----|----------------|
| WO          | 2017117248 | A1 | 2017年 7月 6日    | US   | 2017198363   | A1 | 2017年 7月 13日   |
| US          | 2016202256 | A1 | 2016年 7月 14日   | US   | 2017363648   | A1 | 2017年 12月 21日  |
|             |            |    |                | US   | 9766255      | B2 | 2017年 9月 19日   |
| WO          | 2017048316 | A1 | 2017年 3月 23日   | US   | 2018259541   | A1 | 2018年 9月 13日   |
| WO          | 2017156238 | A1 | 2017年 9月 14日   | 无    |              |    |                |
| CN          | 104094115  | A  | 2014年 10月 8日   | CN   | 104094115    | B  | 2017年 3月 8日    |
|             |            |    |                | EP   | 2810064      | B1 | 2016年 1月 20日   |
|             |            |    |                | WO   | 2013113369   | A1 | 2013年 8月 8日    |
|             |            |    |                | US   | 2015260724   | A1 | 2015年 9月 17日   |
|             |            |    |                | JP   | 2015505464   | A  | 2015年 2月 23日   |
|             |            |    |                | ES   | 2568879      | T3 | 2016年 5月 5日    |
|             |            |    |                | US   | 9714947      | B2 | 2017年 7月 25日   |
|             |            |    |                | EP   | 2810064      | A1 | 2014年 12月 10日  |
| WO          | 2016058094 | A1 | 2016年 4月 21日   | IL   | 250949       | D0 | 2017年 4月 30日   |
|             |            |    |                | EP   | 3207052      | A4 | 2018年 4月 25日   |
|             |            |    |                | CA   | 2963579      | A1 | 2016年 4月 21日   |
|             |            |    |                | AU   | 2015333543   | A1 | 2017年 3月 23日   |
|             |            |    |                | EP   | 3207052      | A1 | 2017年 8月 23日   |
|             |            |    |                | US   | 2017234870   | A1 | 2017年 8月 17日   |
|             |            |    |                | CN   | 107074926    | A  | 2017年 8月 18日   |
|             |            |    |                | JP   | 2017536104   | A  | 2017年 12月 7日   |
|             |            |    |                | SG   | 11201701895V | A  | 2017年 4月 27日   |
| WO          | 2016161088 | A2 | 2016年 10月 6日   | EP   | 3404410      | A2 | 2018年 11月 21日  |
|             |            |    |                | EP   | 3404411      | A2 | 2018年 11月 21日  |
|             |            |    |                | EP   | 3404412      | A2 | 2018年 11月 21日  |
|             |            |    |                | KR   | 20170132861  | A  | 2017年 12月 4日   |
|             |            |    |                | IL   | 254687       | D0 | 2017年 11月 30日  |
|             |            |    |                | JP   | 2018516590   | A  | 2018年 6月 28日   |
|             |            |    |                | EP   | 3277831      | A2 | 2018年 2月 7日    |
|             |            |    |                | CN   | 107429286    | A  | 2017年 12月 1日   |
|             |            |    |                | CA   | 2982133      | A1 | 2016年 10月 6日   |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)