

(19)中华人民共和国国家知识产权局



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106749560 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201710024594.3

(22)申请日 2017.01.13

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 刘平生 张聪研

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51)Int.Cl.

C07K 14/195(2006.01)

C12N 15/31(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页
序列表6页 附图9页

(54)发明名称

脂滴或脂肪体通过MLDSR蛋白参与的转录调控的发现及应用

(57)摘要

本发明公开了一种脂滴或脂肪体通过MLDSR蛋白参与的转录调控的发现及应用。本发明提供了一种MLDSR蛋白,其为如下a)或b)或c)的蛋白质:a)氨基酸序列是序列2所示的蛋白质;b)在序列2所示的蛋白质的N端和/或C端连接标签得到的融合蛋白质;c)将序列2所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的蛋白质。通过实验证明:MLDSR蛋白可调控MLDS基因的转录水平,其高浓度抑制MLDS基因表达、低浓度诱导MLDS基因表达,同时脂滴或脂肪体会通过调节溶液或胞质中的MLDSR蛋白浓度间接参与基因的转录调控。

1. 蛋白质,是如下a)或b)或c)的蛋白质:
 - a) 氨基酸序列是序列2所示的蛋白质;
 - b) 在序列2所示的蛋白质的N端和/或C端连接标签得到的融合蛋白质;
 - c) 将序列2所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的蛋白质。
2. 与权利要求1所述的蛋白质相关的生物材料,为下述A1)至A12)中的任一种:
 - A1) 编码权利要求1所述的蛋白质的核酸分子;
 - A2) 含有A1)所述核酸分子的表达盒;
 - A3) 含有A1)所述核酸分子的重组载体;
 - A4) 含有A2)所述表达盒的重组载体;
 - A5) 含有A1)所述核酸分子的重组微生物;
 - A6) 含有A2)所述表达盒的重组微生物;
 - A7) 含有A3)所述重组载体的重组微生物;
 - A8) 含有A4)所述重组载体的重组微生物;
 - A9) 含有A1)所述核酸分子的转基因植物细胞系;
 - A10) 含有A2)所述表达盒的转基因植物细胞系;
 - A11) 含有A3)所述重组载体的转基因植物细胞系;
 - A12) 含有A4)所述重组载体的转基因植物细胞系。
3. 根据权利要求2所述的相关生物材料,其特征在于:A1)所述核酸分子为如下1)或2)或3)所示的基因:
 - 1) 其编码序列是序列1所示的cDNA分子或基因组DNA分子;
 - 2) 与1)限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性,且编码权利要求1所述的蛋白质的cDNA分子或基因组DNA分子;
 - 3) 在严格条件下与1)或2)限定的核苷酸序列杂交,且编码权利要求1所述的蛋白质的cDNA分子或基因组DNA分子。
4. 权利要求1所述的蛋白质在作为转录调节因子中的应用。
5. 权利要求1所述的蛋白质或权利要求2或3所述的生物材料在调控目的基因的表达水平中的应用。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于:所述表达水平为转录水平。
7. 权利要求1所述的蛋白质或权利要求2或3所述的生物材料在如下M1)–M7)中任一种中的应用:
 - M1) 结合序列6所示的DNA分子;
 - M2) 结合序列6第20–62位所示的DNA分子;
 - M3) 结合序列6第43–62位所示的DNA分子;
 - M4) 结合序列6第20–42位所示的DNA分子;
 - M5) 结合序列7所示的DNA分子;
 - M6) 与所述M1)–M5)中至少一种DNA分子结合,进而调控目的基因的转录水平;
 - M7) 与所述M1)–M5)中至少一种DNA分子一起调控目的基因的转录水平。
8. 如下N1)–N4)中任一种产品:

- N1) 权利要求7中任一所述的DNA分子；
- N2) 一种产品套装,由权利要求1所述的蛋白质和权利要求7中任一所述的DNA分子组成；
- N3) 一种产品套装,由脂滴或脂肪体、权利要求1所述的蛋白质和权利要求7中任一所述的DNA分子组成；
- N4) 一种产品套装,由脂滴或脂肪体与权利要求1所述的蛋白质组成。
9. 脂滴或脂肪体与权利要求1所述的蛋白质一起在调控目的基因的转录水平中的应用。
10. 脂滴或脂肪体、权利要求1所述的蛋白质和权利要求7中任一所述的DNA分子一起在调控目的基因的转录水平中的应用。

脂滴或脂肪体通过MLDSR蛋白参与的转录调控的发现及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及脂滴或脂肪体通过MLDSR蛋白参与的转录调控的发现及应用。

背景技术

[0002] 脂滴是一种分布广泛的细胞器,从原核生物到真核生物都存在。脂滴是一种具有存储、新陈代谢、物质转运和信号转导等功能的细胞器。在不同的物种及其细胞中,脂滴可能具有不同的功能。脂滴的动态变化会直接影响到人们的日常生活。除了在人类健康和食品质量中起着重要作用之外,微生物中脂滴的三酰基甘油是开发生物柴油的主要来源之一。能源的短缺及环境的污染要求人们尽快开发出可再生的清洁能源。由于微生物能量转化效率较高,因此利用微生物产能尤其是生物柴油的开发变得极其重要。

[0003] 由于脂滴存在于从人到细菌的各个物种中,以及脂滴常驻蛋白具有很强的保守特性,因此,脂滴可能是最早进化出来的细胞器,对于基本生命过程是至关重要的。脂滴的单层磷脂膜可以提供一种不同于其他细胞膜结构的独特膜质环境。这种特殊的化学和物理环境可以提高某些细胞过程的特异性和效率。

[0004] 为了进一步确定细菌中脂滴的功能,我们实验室已经对目前发现的含有脂滴及甘油三酯较多的两种菌株*Rhodococcus jostii* RHA1 (RHA1) 和*Rhodococcus opacus* PD630 (PD630) 的脂滴蛋白质组进行鉴定分析,发现了一种能改变脂滴大小的、主要的脂滴蛋白,并将其命名为microorganism lipid droplet small (MLDS)。同时也发现在这些蛋白脂组数据中,很多转录调控因子富集在脂滴组分中。(Ding等人,2012年Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets. 和陈等人,2014年,Integrated omics study delineates the dynamics of lipid droplets in *Rhodococcus opacus* PD630。)由此,我们推测脂滴可能会通过这些转录调控因子来参与转录调控。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种蛋白质。

[0006] 本发明提供的蛋白质是如下a) 或b) 或c) 的蛋白质,将其命名为MLDSR蛋白质:

[0007] a) 氨基酸序列是序列2所示的蛋白质;

[0008] b) 在序列2所示的蛋白质的N端和/或C端连接标签得到的融合蛋白质;

[0009] c) 将序列2所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的蛋白质。

[0010] 其中,序列2由168个氨基酸残基组成。

[0011] 为了使a) 中的蛋白质便于纯化,可在序列表中序列2所示的蛋白质的氨基末端或羧基末端连接上如表1所示的标签。

[0012] 表1、标签的序列

| | 标签 | 残基 | 序列 |
|--------|--------------|--------------|------------|
| | Poly-Arg | 5-6 (通常为5个) | RRRRR |
| [0013] | Poly-His | 2-10 (通常为6个) | HHHHHH |
| | FLAG | 8 | DYKDDDDK |
| | Strep-tag II | 8 | WSHPQFEK |
| [0014] | c-myc | 10 | EQKLISEEDL |

[0015] 上述c)中的蛋白质,所述一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加为不超过10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加。

[0016] 上述c)中的蛋白质可人工合成,也可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。

[0017] 上述c)中的蛋白质的编码基因可通过将序列1所示的DNA序列中缺失一个或几个氨基酸残基的密码子,和/或进行一个或几个碱基对的错义突变,和/或在其5'端和/或3'端连上表1所示的标签的编码序列得到。

[0018] 本发明的另一个目的是提供与MLDSR蛋白质相关的生物材料。

[0019] 本发明提供的与MLDSR蛋白质相关的生物材料为下述A1)至A12)中的任一种:

[0020] A1) 编码MLDSR蛋白质的核酸分子;

[0021] A2) 含有A1)所述核酸分子的表达盒;

[0022] A3) 含有A1)所述核酸分子的重组载体;

[0023] A4) 含有A2)所述表达盒的重组载体;

[0024] A5) 含有A1)所述核酸分子的重组微生物;

[0025] A6) 含有A2)所述表达盒的重组微生物;

[0026] A7) 含有A3)所述重组载体的重组微生物;

[0027] A8) 含有A4)所述重组载体的重组微生物;

[0028] A9) 含有A1)所述核酸分子的转基因植物细胞系;

[0029] A10) 含有A2)所述表达盒的转基因植物细胞系;

[0030] A11) 含有A3)所述重组载体的转基因植物细胞系;

[0031] A12) 含有A4)所述重组载体的转基因植物细胞系。

[0032] 上述相关生物材料中,A1)所述核酸分子为如下1)或2)或3)所示的基因:

[0033] 1) 其编码序列是序列1所示的cDNA分子或基因组DNA分子;

[0034] 2) 与1)限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性,且编码上述蛋白质的cDNA分子或基因组DNA分子;

[0035] 3) 在严格条件下与1)或2)限定的核苷酸序列杂交,且编码上述蛋白质的cDNA分子或基因组DNA分子。

[0036] 其中,所述核酸分子可以是DNA,如cDNA、基因组DNA或重组DNA;所述核酸分子也可以是RNA,如mRNA或hnRNA等。

[0037] 其中,序列1由507个核苷酸组成,编码序列2所示的氨基酸序列。

[0038] 这里使用的术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”包括与本发명의编码序列2所示的氨基酸序列组成的蛋白质的核苷酸序列具有75%或更高,或85%或更高,或90%或更高,或95%或更高同一性的核苷酸序列。同一性可以用肉眼或计算机软件

进行评价。使用计算机软件,两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同一性。

[0039] 上述75%或75%以上同一性,可为80%、85%、90%或95%以上的同一性。

[0040] 上述生物材料中,所述严格条件是在 $2\times$ SSC,0.1%SDS的溶液中,在68℃下杂交并洗膜2次,每次5min,又于 $0.5\times$ SSC,0.1%SDS的溶液中,在68℃下杂交并洗膜2次,每次15min;或, $0.1\times$ SSPE(或 $0.1\times$ SSC)、0.1%SDS的溶液中,65℃条件下杂交并洗膜。

[0041] 上述生物材料中,所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。

[0042] 上述生物材料中,所述微生物可为酵母、细菌、藻或真菌,如农杆菌。

[0043] 上述生物材料中,所述转基因植物细胞系、转基因植物组织和转基因植物器官均不包括繁殖材料。

[0044] 本发明还有一个目的是提供MLDSR蛋白质的新用途。

[0045] 本发明提供了MLDSR蛋白质在作为转录调节因子中的应用。

[0046] 上述应用中,所述转录调节因子为MLDS转录调节因子。

[0047] 本发明还有一个目的是提供MLDSR蛋白质或上述生物材料的新用途。

[0048] 本发明提供了MLDSR蛋白质或上述生物材料在调控目的基因的表达水平中的应用。

[0049] 上述应用中,所述表达水平为转录水平。

[0050] 上述应用中,所述调控为正向调控和负向调控。

[0051] 本发明还提供了MLDSR蛋白质或上述生物材料在如下在如下M1)–M7)中任一种中的应用:

[0052] M1) 结合序列6所示的DNA分子;

[0053] M2) 结合序列6第20–62位所示的DNA分子;

[0054] M3) 结合序列6第43–62位所示的DNA分子;

[0055] M4) 结合序列6第20–42位所示的DNA分子;

[0056] M5) 结合序列7所示的DNA分子;

[0057] M6) 与所述M1)–M5)中至少一种DNA分子结合,进而调控目的基因的转录水平;

[0058] M7) 与所述M1)–M5)中至少一种DNA分子一起调控目的基因的转录水平。

[0059] 上述应用中,所述调控是通过结合序列6第43–62位所示的DNA分子实现。所述调控为随着所述MLDSR蛋白质的量的逐渐降低、目的基因的转录水平逐渐升高。

[0060] 本发明还有一个目的是提供如下N1)–N4)中任一种产品:

[0061] N1) 上述M1)–M5)中任一所述的DNA分子;

[0062] N2) 一种产品套装,由MLDSR蛋白质和上述M1)–M5)中任一所述的DNA分子组成;

[0063] N3) 一种产品套装,由脂滴或脂肪体、MLDSR蛋白质和上述M1)–M5)中任一所述的DNA分子组成;

[0064] N4) 一种产品套装,由脂滴或脂肪体与MLDSR蛋白质组成。

[0065] 本发明的最后一个目的是提供脂滴或脂肪体与MLDSR蛋白质的新用途。

[0066] 本发明提供了脂滴或脂肪体与MLDSR蛋白质在调控目的基因的转录水平中的应用。

[0067] 脂滴或脂肪体、MLDSR蛋白质和上述M1)–M5)中任一所述的DNA分子一起在调控目

的基因的转录水平中的应用也属于本发明的保护范围。

[0068] 上述应用中,所述调控目的基因的转录水平是通过调控胞质或溶液中的MLDSR蛋白质的浓度实现。

[0069] 上述应用中,所述目的基因为MLDS基因。

[0070] 本发明发现了一种新的可以调节MLDS表达的脂滴蛋白。基于生物信息学分析,该蛋白质被预测是一个转录调控因子,将它命名为MLDS转录调节因子(MLDSR)。通过实验表明:基因`mlds`和`mldsr`在同一操纵子中并且MLDSR可正向和负向调节MLDS的表达。凝胶阻滞实验表明MLDSR可以结合两个相邻的DNA基序且鉴定了其中的关键碱基,从而确定了MLDSR的结合盒。细菌组分分析和MLDSR截断突变体实验表明MLDSR是一个脂滴相关蛋白。脂肪体(adiposomes)结合实验表明定位在脂肪体上的MLDSR不会与DNA结合。体外转录实验证明定位在脂肪体上的MLDSR不能调节转录而只有溶液中的MLDSR能正向和负向的调节MLDS转录,暗示了在体内脂滴会通过调节胞质中的MLDSR来参与转录调控。本发明发现了MLDSR蛋白可调控MLDS基因的转录水平,其高浓度抑制MLDS基因表达、低浓度诱导MLDS基因表达,同时脂滴参与其中的转录调控模式可为调节性合成某产物提供可行的方案。

附图说明

[0071] 图1为野生型和MLDS敲除突变株中脂滴蛋白的条带分析,并将下方箭头所示条带进行质谱鉴定,确定为RHA1_ro02105,即MLDSR。

[0072] 图2为MLDSR敲除突变株的PCR鉴定。左图显示同源重组模式图及各个引物的位置和片段大小。右图为PCR电泳图。第1道为阳性对照,以构建的敲除质粒P为模板,以a/d为引物;第2道为得到的敲除突变株条带,以突变株为模板,以a/d为引物;第3道为阴性对照,以野生型RHA1基因组为模板,以a/d为引物;第4,5道分别是以野生型和突变株为模板,以a/b为引物得到的条带;第6,7道分别是以野生型和突变株为模板,以c/d为引物;第8,9道分别是以野生型和突变株为模板,以f/r为引物得到的条带,即目的基因`mldsr`,可以看到第9道中突变株的`mldsr`基因已经被敲除。

[0073] 图3为MLDSR敲除突变株的Western blot及SDS-PAGE分析鉴定。用anti-MLDSR作为一抗。

[0074] 图4为MLSDR-GFP过表达菌株的Western blot分析,用以鉴定MLDSR-GFP过表达菌株的成功构建。使用anti-GFP作为一抗。

[0075] 图5为`mldsr`缺失突变体与过表达菌株中MLDS的转录水平分析。

[0076] 图6为`mldsr`缺失突变体与过表达菌株中MLDS的表达水平分析。

[0077] 图7为基因`mldsr`的基因组定位以及所结合的DNA基序示意图。

[0078] 图8为验证蛋白MLDSR与其DNA基序结合的凝胶阻滞实验。

[0079] 图9为进一步缩短DNA长度,用凝胶阻滞实验最终确定的两个MLDSR蛋白结合的DNA基序:Motif 1(20bp)和Motif 2(23bp)。

[0080] 图10为在Motif 1中的组成型突变分析。凝胶阻滞实验(上)和量化(下)显示了MLDSR结合的关键碱基(红色)。其中,数字前为原碱基,数字后为突变后的碱基,数字为所在位置。红框或红色碱基表示突变后结合显著改变,即为结合的关键碱基。误差条表示平均值 \pm SEM,n=3。

[0081] 图11为Motif 2中的组成型突变分析。凝胶阻滞实验(上)和量化(下)显示了MLDSR结合的关键碱基(红色)。其中,数字前为原碱基,数字后为突变后的碱基,数字为所在位置。红框或红色碱基表示突变后结合显著改变,即为结合的关键碱基。误差条表示平均值 \pm SEM, $n=3$ 。

[0082] 图12为根据上述结果所得到的最短的两段MLDSR结合的DNA序列以及其结合盒。根据序列相似性, Motif 2为启动子, Motif 1为操纵基因。

[0083] 图13为MLDSR蛋白通过结合Motif 1调节转录的体外转录实验。当MLDSR与DNA摩尔比很高时, MLDSR会抑制转录(左);当MLDSR与DNA摩尔比很低时, MLDSR会促进转录(右)。

[0084] 图14为细胞组分分析, 将细胞破碎后(全细胞裂解)通过超速离心得到不同组分(脂滴, 细胞质和质膜)。之后将这组分用不同抗体检测, 发现MLDSR是一个脂滴相关蛋白。其余抗体为对照。

[0085] 图15为MLDSR蛋白全长和截断的MLDSR蛋白(1-126, 25-126, 51-126和25-92氨基酸)与绿色荧光蛋白GFP融合后在细菌RHA1中的定位。MLDSR蛋白全长, MLDSR蛋白1-126和MLDSR蛋白的25-126氨基酸都能定位在脂滴上, 表明MLDSR蛋白是一个脂滴相关蛋白。

[0086] 图16为体外脂肪体结合实验。将体外表达的带有GST标签的MLDSR蛋白与脂肪体以及DNA混合, 孵育, 之后离心, 并用银染和PCR分别检测蛋白和DNA。结果发现MLDSR能结合在脂肪体上, 但定位在脂肪体上失去了结合DNA的能力(第4, 5, 6泳道), 而只有溶液组分中的MLDSR才能结合DNA(第9, 10, 11泳道)。GST蛋白为对照。

[0087] 图17为脂肪体结合实验和体外转录实验。先将脂肪体, MLDSR和DNA混合孵育, 并不增加脂肪体的量, 之后将离心后的溶液组分用来做体外转录实验。结果发现, 随着脂肪体浓度增加, 溶液组分中的MLDSR蛋白含量减少, 而相对转录水平不断增加, 甚至超过没有MLDSR加入的对照组。表明细胞质中的而不是脂肪体或脂滴定位的MLDSR正向和负向调控转录。在脂肪体样品和溶液样品中的蛋白通过银染检测(上)。RNA通过EB染色的琼脂糖凝胶检测(中)。使用Image J软件定量(下)。误差条表示平均值 \pm SEM, $n=3$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

[0088] 图18为上述实验结果(图13和图16)的模型图。

具体实施方式

[0089] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。

[0090] 下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。

[0091] 表1、下述实施例中的细菌菌株和质粒

[0092] 表1中“Ding et al., 2012”代表的文献为“丁等人, 2012. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.”

| 名称 | 描述 | 来源 |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| 菌株 | | |
| <i>Rhodococcus jostii</i> | 产油红球菌 | |
| RHA1 (WT) | 野生型 | (Ding et al., 2012) |
| WT + RHA1_ro02105 (MLDSR) -GFP | 过表达 RHA1_ro02105 (MLDSR) - GFP 的 RHA1 | 本发明 |
| RHA1_ro02105 (MLDSR) KO | <i>mldsr</i> 敲除株 | 本发明 |
| CON | 过表达 CON 质粒的 RHA1 | 本发明 |
| Motif 2 | 过表达 Motif 2 质粒的 RHA1 | 本发明 |
| WT + MLSDR (1-126) | 过表达 MLSDR 截短体 (1-126 氨基酸) 的 RHA1 | 本发明 |
| WT + MLSDR (25-126) | 过表达 MLSDR 截短体 (25-126 氨基酸) 的 RHA1 | 本发明 |
| WT + MLSDR (51-126) | 过表达 MLSDR 截短体 (51-126 氨基酸) 的 RHA1 | 本发明 |
| WT + MLSDR (25-92) | 过表达 MLSDR 截短体 (25-92 氨基酸) 的 RHA1 | 本发明 |
| WT + MLSDR (25-78) | 过表达 MLSDR 截短体 (25-78 氨基酸) 的 RHA1 | 本发明 |
| 大肠杆菌 | | |
| <i>E. coli</i> | 大肠杆菌 | |
| TOP10 | 用于质粒扩增 | TIANGEN |
| BL21 (DE3) | 用于蛋白表达 | TIANGEN |
| 质粒 | | |
| pJAM2- <i>gfp</i> | 用于在 RHA1 中表达蛋白 | (Ding et al., 2012) |
| pJAM2- <i>mldsr-gfp</i> | 表达 MLSDR-GFP 融合蛋白 | 本发明 |
| pJAM2- <i>mldsr (1-126)-gfp</i> | 表达 MLSDR (1-126)-GFP 融合蛋白 | 本发明 |
| pJAM2- <i>mldsr (25-126)-gfp</i> | 表达 MLSDR (25-126)-GFP 融合蛋白 | 本发明 |
| pJAM2- <i>mldsr (51-126)-gfp</i> | 表达 MLSDR (51-126)-GFP 融合蛋白 | 本发明 |
| pJAM2- <i>mldsr (25-92)-gfp</i> | 表达 MLSDR (25-92)-GFP 融合蛋白 | 本发明 |
| pJAM2- <i>mldsr (25-78)-gfp</i> | 表达 MLSDR (25-78)-GFP 融合蛋白 | 本发明 |
| pJAM2- <i>sd-rfp-his-gfp</i> | RFP 和 His 标签表达的对照 | 本发明 |
| pJAM2- <i>motif 2-sd-rfp-his-gfp</i> | 表达 RFP 和 His 标签 | 本发明 |
| pK18mobsacB | 用于敲除 | (Ding et al., 2012) |
| pK18mobsacB- <i>mldsr</i> -AB-CD | 用于敲除 <i>mldsr</i> | 本发明 |
| pGEX-6P-2 | 表达 GST 标签的蛋白 | GE Healthcare |
| pGEX-6P-2- <i>mldsr</i> | 表达蛋白 GST-MLSDR | 本发明 |
| pGEX-6P-2- <i>mldsr (25-92)</i> | 表达蛋白 GST-MLSDR (25-92) | 本发明 |
| pGEX-6P-2- <i>mldsr (25-78)</i> | 表达蛋白 GST-MLSDR (25-78) | 本发明 |
| pGEX-6P-2- <i>mldsr (51-92)</i> | 表达蛋白 GST-MLSDR (51-92) | 本发明 |

[0095] 表2、下述实施例中用到的寡核苷酸

[0096]

| 寡核苷酸 | 序列 (5' -3') |
|---|------------------------------------|
| 为克隆 <i>mldsr</i> 和截短的 <i>mldsr</i> 进入质粒 pJAM2-<i>gfp</i> 使用的引物 | |
| <i>mldsr</i> -f | TTAGGATCCGCAAGCGATGATCGCGACGCAGCC |
| <i>mldsr</i> -r | TTAGGATCCGTCATCGGCTTTCCTGTTCAACG |
| <i>mldsr</i> -r126 | TTAGGATCCACGACAGAACCGACTCGTAGAT |
| <i>mldsr</i> -r92 | TTAGGATCCCTCGAGGTAACCCGCTGGACG |
| <i>mldsr</i> -r78 | TTAGGATCCCGGAGACCCTTGGCTATCTGC |
| <i>mldsr</i> -f25 | TTAGGATCCGACATCGGAGGTTTCATTGCTGCC |
| <i>mldsr</i> -f51 | TTAGGATCCAGTAATCCGTATCTGAGTCA |
| <i>mldsr</i> -f78 | TTAGGATCCCGGTTGTCTTCGGAGGTCCTGTACG |
| <i>mldsr</i> -f93 | TTAGGATCCAGCGGCCACACGGTCCCCTCC |
| <i>mldsr</i> -f127 | TTAGGATCCGAGAACGAATCGGCGGAAGCGG |
| 为克隆 <i>mldsr</i> 和截短的 <i>mldsr</i> 进入质粒 pGEX-6p-2 使用的引物 | |
| <i>mldsr</i> -f | TTAGGATCCGCAAGCGATGATCGCGACGCAGCC |
| <i>mldsr</i> -r | TTAGAAATCCGTCATCGGCTTTCCTGTTCAACG |
| <i>mldsr</i> -r92 | TTAGAAATCCAGCGGCCACACGGTCCCCTCC |
| <i>mldsr</i> -r78 | TTAGAAATCCCGGAGACCCTTGGCTATCTGC |
| <i>mldsr</i> -f25 | TTAGGATCCGACATCGGAGGTTTCATTGCTGCC |
| <i>mldsr</i> -f51 | TTAGGATCCAGTAATCCGTATCTGAGTCA |
| 用于构建 <i>mldsr</i> 突变体使用的引物 | |
| <i>mldsr</i> -a | ACTGAATTCATGGGGCGCGAGGAGGTGAC |
| <i>mldsr</i> -b | ACTGGATCCAGTCCCTCCGTTGTGCTGGC |
| <i>mldsr</i> -c | ACTGGATCCATGACTGACCAGAAGACCATCG |
| <i>mldsr</i> -d | CAGTAAGCTTGTACCCGAAGCGGTTCTCGGGC |
| 用于 qRT-PCR 的引物 | |
| <i>mldsr</i> -f | CGGACTCCAGGAAGAGGTCA |
| <i>mldsr</i> -r | GAACCTCTCACGCAGCTCGG |
| <i>mldsr</i> -f | GGATACGGCCATTACCGAGC |
| <i>mldsr</i> -r | CGTCTGGGAATCAGAACGCT |
| <i>16s rRNA</i> -f | TATGACCTTCGGCTGCATGG |

| | |
|---|---|
| <i>16s-rRNA-r</i> | CCTTGGTAGGCCATTACCCC |
| 为合成用于凝胶阻滞实验和脂肪体结合实验的 DNA 使用的寡核苷酸 | |
| 103 bp DNA-f5505 | CAATCGCCTCGACGGAGGGT |
| 103 bp DNA-r5403 | CAGTCCTCCGTGTGCTGGGC |
| 43 bp DNA-f | TCCGCTAGCTGGGTGCTAACAGAGTGCTTGCAATTGCTAGCAC |
| 43 bp DNA-r | GTGCTAGCAATTGCAAGCACTCTGTTAGCACCCAGCTAGCGGA |
| 30 bp DNA-f | ACAGAGTGCTTGCAATTGCTAGCACCCCTGC |
| 30 bp DNA-r | GCAGGGTGCTAGCAATTGCAAGCACTCTGT |
| 28 bp DNA-f | CAGAGTGCTTGCAATTGCTAGCACCCCTG |
| 28 bp DNA-r | CAGGGTGCTAGCAATTGCAAGCACTCTG |
| 26 bp DNA-f | AGAGTGCTTGCAATTGCTAGCACCCCT |
| 26 bp DNA-r | AGGGTGCTAGCAATTGCAAGCACTCT |
| 24 bp DNA-f | GAGTGCTTGCAATTGCTAGCACCC |
| 24 bp DNA-r | GGGTGCTAGCAATTGCAAGCACTC |
| 22 bp DNA-f | AGTGCTTGCAATTGCTAGCACCC |
| 22 bp DNA-r | GGTGCTAGCAATTGCAAGCACT |
| 20 bp DNA (motif1)-f | GTGCTTGCAATTGCTAGCAC |
| 20 bp DNA (motif1)-r | GTGCTAGCAATTGCAAGCAC |
| 18 bp DNA-f | TGCTTGCAATTGCTAGCA |
| 18 bp DNA-r | TGCTAGCAATTGCAAGCA |
| 16 bp DNA-f | GCTTGCAATTGCTAGC |
| 16 bp DNA-r | GCTAGCAATTGCAAGC |
| 14 bp DNA-f | CTTGCAATTGCTAG |
| 14 bp DNA-r | CTAGCAATTGCAAG |
| 23 bp DNA (motif2)-f | TCCGCTAGCTGGGTGCTAACAGA |
| 23 bp DNA (motif2)-r | TCTGTTAGCACCCAGCTAGCGGA |
| 21 bp DNA-f | CCGCTAGCTGGGTGCTAACAG |
| 21 bp DNA-r | CTGTTAGCACCCAGCTAGCGG |
| 19 bp DNA-f | CGCTAGCTGGGTGCTAACAA |
| 19 bp DNA-r | TGTTAGCACCCAGCTAGCG |
| 17 bp DNA-f | GCTAGCTGGGTGCTAAC |
| 17 bp DNA-r | GTTAGCACCCAGCTAGC |
| 15 bp DNA-f | CTAGCTGGGTGCTAA |
| 15 bp DNA-r | TTAGCACCCAGCTAG |
| 13 bp DNA-f | TAGCTGGGTGCTA |
| 13 bp DNA-r | TAGCACCCAGCTA |
| 为合成突变的基序 1 和基序 2 使用的寡核苷酸 | |
| 20-m-1-f | ATGCTTGCAATTGCTAGCAC |
| 20-m-1-r | GTGCTAGCAATTGCAAGCAT |
| 20-m-2-f | GCGCTTGCAATTGCTAGCAC |
| 20-m-2-r | GTGCTAGCAATTGCAAGCGC |
| 20-m-3-f | GTACTTGCAATTGCTAGCAC |
| 20-m-3-r | GTGCTAGCAATTGCAAGTAC |
| 20-m-4-f | GTGTTTGCAATTGCTAGCAC |
| 20-m-4-r | GTGCTAGCAATTGCAAACAC |
| 20-m-5-f | GTGCCCTGCAATTGCTAGCAC |

[0097]

[0098]

| | |
|-----------|-------------------------|
| 20-m-5-r | GTGCTAGCAATTGCAGGCAC |
| 20-m-6-f | GTGCTCGCAATTGCTAGCAC |
| 20-m-6-r | GTGCTAGCAATTGCGAGCAC |
| 20-m-7-f | GTGCTTACAATTGCTAGCAC |
| 20-m-7-r | GTGCTAGCAATTGTAAGCAC |
| 20-m-8-f | GTGCTTGTAAATTGCTAGCAC |
| 20-m-8-r | GTGCTAGCAATTACAAGCAC |
| 20-m-9-f | GTGCTTGGCATTGCTAGCAC |
| 20-m-9-r | GTGCTAGCAATCGCAAGCAC |
| 20-m-10-f | GTGCTTGCAGTTGCTAGCAC |
| 20-m-10-r | GTGCTAGCAACTGCAAGCAC |
| 20-m-11-f | GTGCTTGCAACTGCTAGCAC |
| 20-m-11-r | GTGCTAGCAGTTGCAAGCAC |
| 20-m-12-f | GTGCTTGCAATCGCTAGCAC |
| 20-m-12-r | GTGCTAGCGATTGCAAGCAC |
| 20-m-13-f | GTGCTTGCAATTACTAGCAC |
| 20-m-13-r | GTGCTAGTAATTGCAAGCAC |
| 20-m-14-f | GTGCTTGCAATTGTTAGCAC |
| 20-m-14-r | GTGCTAACAAATTGCAAGCAC |
| 20-m-15-f | GTGCTTGCAATTGCCAGCAC |
| 20-m-15-r | GTGCTGGCAATTGCAAGCAC |
| 20-m-16-f | GTGCTTGCAATTGCTGGCAC |
| 20-m-16-r | GTGCCAGCAATTGCAAGCAC |
| 20-m-17-f | GTGCTTGCAATTGCTAACAC |
| 20-m-17-r | GTGTTAGCAATTGCAAGCAC |
| 20-m-18-f | GTGCTTGCAATTGCTAGTAC |
| 20-m-18-r | GTAAGCAATTGCAAGCAC |
| 20-m-19-f | GTGCTTGCAATTGCTAGCGC |
| 20-m-19-r | GCGCTAGCAATTGCAAGCAC |
| 20-m-20-f | GTGCTTGCAATTGCTAGCAT |
| 20-m-20-r | ATGCTAGCAATTGCAAGCAC |
| 23-m-1-f | CCCGCTAGCTGGGTGCTAACAGA |
| 23-m-1-r | TCTGTTAGCACCCAGCTAGCGGG |
| 23-m-2-f | TTCGCTAGCTGGGTGCTAACAGA |
| 23-m-2-r | TCTGTTAGCACCCAGCTAGCGAA |
| 23-m-3-f | TCTGCTAGCTGGGTGCTAACAGA |
| 23-m-3-r | TCTGTTAGCACCCAGCTAGCAGA |
| 23-m-4-f | TCCACTAGCTGGGTGCTAACAGA |
| 23-m-4-r | TCTGTTAGCACCCAGCTAGTGGA |
| 23-m-5-f | TCCGTTAGCTGGGTGCTAACAGA |
| 23-m-5-r | TCTGTTAGCACCCAGCTAACGGA |
| 23-m-6-f | TCCGCCAGCTGGGTGCTAACAGA |
| 23-m-6-r | TCTGTTAGCACCCAGCTGGCGGA |
| 23-m-7-f | TCCGCTGGCTGGGTGCTAACAGA |
| 23-m-7-r | TCTGTTAGCACCCAGCCAGCGGA |
| 23-m-8-f | TCCGCTAACTGGGTGCTAACAGA |
| 23-m-8-r | TCTGTTAGCACCCAGTTAGCGGA |
| 23-m-9-f | TCCGCTAGTTGGGTGCTAACAGA |
| 23-m-9-r | TCTGTTAGCACCCAACTAGCGGA |
| 23-m-10-f | TCCGCTAGCCGGGTGCTAACAGA |

| | | |
|--------|--------------------------|--|
| | 23-m-10-r | TCTGTTAGCACCCGGCTAGCGGA |
| | 23-m-11-f | TCCGCTAGCTAGGTGCTAACAGA |
| | 23-m-11-r | TCTGTTAGCACCTAGCTAGCGGA |
| | 23-m-12-f | TCCGCTAGCTGAGTGCTAACAGA |
| | 23-m-12-r | TCTGTTAGCACTCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-13-f | TCCGCTAGCTGGATGCTAACAGA |
| | 23-m-13-r | TCTGTTAGCATCCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-14-f | TCCGCTAGCTGGGCGCTAACAGA |
| | 23-m-14-r | TCTGTTAGCGCCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-15-f | TCCGCTAGCTGGGTACTAACAGA |
| | 23-m-15-r | TCTGTTAGTACCCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-16-f | TCCGCTAGCTGGGTGTTAACAGA |
| | 23-m-16-r | TCTGTTAACACCCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-17-f | TCCGCTAGCTGGGTGCCAACAGA |
| [0099] | 23-m-17-r | TCTGTTGCCACCCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-18-f | TCCGCTAGCTGGGTGCTGACAGA |
| | 23-m-18-r | TCTGTCAGCACCCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-19-f | TCCGCTAGCTGGGTGCTAGCAGA |
| | 23-m-19-r | TCTGCTAGCACCCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-20-f | TCCGCTAGCTGGGTGCTAATAGA |
| | 23-m-20-r | TCTATTAGCACCCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-21-f | TCCGCTAGCTGGGTGCTAACGGA |
| | 23-m-21-r | TCCGTTAGCACCCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-22-f | TCCGCTAGCTGGGTGCTAACAAA |
| | 23-m-22-r | TTTGTAGCACCCAGCTAGCGGA |
| | 23-m-23-f | TCCGCTAGCTGGGTGCTAACAGG |
| | 23-m-23-r | CCTGTTAGCACCCAGCTAGCGGA |
| | 为合成用于体外转录实验的 DNA 使用的寡核苷酸 | |
| | T7-M1-f | CACTAGTAATACGACTCACTATAGGGGTGCTTGCAATTGCTAGCACCCCT |
| | T7-M1-r | CAGCCTTCTTGGCCGGAGCAGCCTT |

[0100] 注:斜体核苷酸表示限制性酶切位点,黑体核苷酸表示引入的突变位点

[0101] 下述实施例中的pK18mobsacB质粒在文献“丁等人,2012.Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.”中公开过,公众可从中国科学院生物物理所获得。

[0102] 下述实施例中的pJAM2载体在文献“丁等人,2012.Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.”中公开过,公众可从中国科学院生物物理所获得。

[0103] 下述实施例中的野生型细菌Rhodococcus jostii RHA1 (RHA1) 和MLDS缺失突变体(脂滴蛋白MLDS被敲除的细菌RHA1, MLDS KO)均在文献“丁等人,2012.Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.”中公开过,公众可从中国科学院生物物理所获得。

[0104] 下述实施例中的MLDS抗体在文献“丁等人,2012.Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.”中公开过,公众可从中国科学院生物物理所获得。

[0105] 实施例1、MLDSR的获得

[0106] 将野生型细菌RHA1细胞和脂滴蛋白MLDS被敲除的细菌RHA1细胞 (MLDS缺失突变体, MLDS KO) 中的脂滴纯化出来,并将脂滴蛋白做成样品,具体操作步骤详见“丁等人,

2013, Isolating lipid droplets from multiple species.”。将脂滴蛋白样品进行SDS-PAGE分离,并用Colloidal Blue染色。

[0107] 结果如图1所示,从图中可以看出:在MLDS缺失突变体中含有MLDS的条带大大降低,而出现另一个条带(图1中的RHA1_ro02105)。将出现的另一条带切下,并通过质谱进行蛋白质鉴定。质谱分析表明,这一条带包含了一个转录调控因子RHA1_ro02105,其核苷酸序列如序列表中序列1所示,将序列1所示的基因命名为mldsr基因,其编码的蛋白的氨基酸序列如序列表中序列2所示,将序列2所示的氨基酸序列命名为MLDSR蛋白。

[0108] 实施例2、MLDSR蛋白在调控MLDS蛋白表达中的应用

[0109] 一、mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 和mldsr过表达菌株 (WT+MLDSR-GFP) 的获得和鉴定

[0110] 1、mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 的获得及鉴定

[0111] (1) mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 的获得

[0112] MLDSR的缺失突变体通过同源重组方法构建,具体步骤如下:

[0113] A、敲除质粒的构建

[0114] 以细菌RHA1为模板,采用mldsr-a和mldsr-b引物进行PCR扩增,得到大小为500bp的产物AB,其核苷酸序列为序列3;以细菌RHA1为模板,采用mldsr-c和mldsr-d引物进行PCR扩增,得到大小为438bp的产物CD,其核苷酸序列为序列4。连接产物AB和CD,得到连接产物,并将连接产物插入到pK18mobsacB质粒的EcoRI和HindIII酶切位点间,得到敲除质粒。

[0115] B、通过电击将敲除质粒转到野生型细菌RHA1细胞中,通过使用卡那霉素正向筛选及sacB负向筛选,获得mldsr缺失突变体 (MLDSR KO)。具体筛选步骤详见文献“丁等人, 2012. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.”中的筛选方法。

[0116] (2) mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 的鉴定

[0117] A、采用引物mldsr-a/d和mldsr-f/r对mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 进行PCR鉴定,其中,用mldsr-f/r引物PCR不能得到条带的mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 为阳性mldsr缺失突变体 (MLDSR KO)。

[0118] 鉴定结果如图2所示。从图中可以看出:第9泳道未检测到条带,说明在MLDSR KO基因组上已经将mldsr基因敲除。

[0119] B、将步骤A中鉴定的阳性克隆与野生型细菌RHA1细胞一起在LB培养基中培养48小时,取出1mL菌液转入MSM培养基培养16小时后,将它们的脂滴纯化出来,并将脂滴蛋白做成样品,细菌培养的方法具体详见“丁等人, 2012. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.”,脂滴纯化的具体操作步骤详见“丁等人, 2013, Isolating lipid droplets from multiple species.”。将脂滴蛋白样品进行SDS-PAGE分离,并用anti-MLDSR(京天成公司制作的MLDSR抗体)作为一抗,进行Western blot分析。

[0120] Western blot结果如图3,结果表明MLDSR KO中确实没有MLDSR表达。

[0121] mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 为将野生型细菌RHA1的mldsr基因的第1-499位缺失(如图2左图),且保持野生型细菌RHA1基因组的其他序列不变得到的菌。

[0122] 2、过表达mldsr的菌株 (WT+MLDSR-GFP) 的获得及鉴定

[0123] (1) 过表达mldsr的菌株 (WT+MLDSR-GFP) 的获得

[0124] A、过表达载体的构建

[0125] 将序列1所示的mldsr基因插入质粒pJAM2-gfp的BamH1位点中,得到过表达载体。其中,pJAM2-gfp质粒为将基因gfp插入pJAM2载体的Xba1酶切位点间,且保持其他序列不变得到的载体。

[0126] B、将过表达载体通过电击转到野生型细菌RHA1细胞中,通过GFP的绿色荧光信号筛选获得过表达mldsr的菌株。同时将pJAM2-gfp质粒通过电击转到野生型细菌RHA1细胞中,得到对照菌株。

[0127] (2) 过表达mldsr的菌株 (WT+MLDSR-GFP) 的鉴定

[0128] 挑取阳性克隆在LB培养基中培养48小时,取出1mL菌液离心后加入SDS上样溶液,超声破碎细菌,并在95度煮5分钟制作成蛋白样品。之后用SDS-PAGE进行分离并用anti-GFP作为一抗,进行Western blot分析。

[0129] 结果如图4所示,在过表达mldsr的菌株 (WT+MLDSR-GFP) 中,目的条带在50kDa左右 (MLDSR+GFP),而左侧对照菌株为单独GFP表达,在50kDa左右没有条带。说明成功获得MLDSR过表达的克隆。

[0130] 二、mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 和过表达mldsr的菌株 (WT+MLDSR-GFP) 中MLDS的转录和表达水平的检测

[0131] 1、用定量RT-PCR实验进行转录水平的检测

[0132] 按照文献“Chen等人,2014年,Integrated omics study delineates the dynamics of lipid droplets in Rhodococcus opacus PD630.”中的方法,检测mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 和过表达mldsr的菌株中MLDS的转录水平。简述如下,分别将mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 和过表达mldsr的菌株 (WT+MLDSR-GFP) 在培养基中培养至OD₆₀₀为2.0,然后使用Trizol试剂 (Invitrogen) 提取总RNA,并用TIANGEN RNAClean试剂盒 (TIANGEN) 纯化。对于实时定量PCR (qPCR) 分析,RNA使用M-MLV Reverse酶试剂盒 (Promega) 被反转录,并在含有SYBR绿荧光染料 (ABI) qPCR反应中进一步使用。使用DD-Ct方法并用16S表达水平做对照,来比较MLDS表达水平。定量PCR是在ABI的StepOne PLUS PCR仪上进行的。每次实验重复3次。

[0133] 结果如图5所示,在mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 和过表达mldsr的菌株 (WT+MLDSR-GFP) 中MLDS的转录水平都显著降低。

[0134] 2、用western blot实验进行表达水平的检测

[0135] 由于MLDS蛋白更多的富集在脂滴上,用western blot实验检测脂滴组分的MLDS蛋白表达。简述如下,从mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 和过表达mldsr的菌株 (WT+MLDSR-GFP) 中分离脂滴蛋白样品,具体操作步骤详见“丁等人,2013,Isolating lipid droplets from multiple species.”,将脂滴蛋白样品进行SDS-PAGE分离,并用MLDS抗体作为一抗进行western blot检测,并用Colloidal Blue染色。

[0136] 结果如图6所示,在mldsr缺失突变体 (MLDSR KO) 和过表达mldsr的菌株 (WT+MLDSR-GFP) 中MLDS的表达水平都明显降低。

[0137] 上述实验表明:MLDSR蛋白可以正向和负向控制MLDS蛋白的表达,是MLDS转录调节因子 (regulator)。

[0138] 实施例3、蛋白MLDSR结合的DNA基序的确定

[0139] 本实施例利用电泳迁移率变动分析 (EMSA) 来确定蛋白MLDSR与其特异的DNA基序的结合。具体步骤如下：

[0140] 一、融合蛋白 (GST-MLDSR) 的制备

[0141] 将序列1第4-504位所示的DNA片段插入pGEX-6P-2质粒 (GE Healthcare) 的BamHI和EcoRI酶切位点间,得到重组载体,该重组载体表达N端带有GST标签的MLDSR蛋白的融合蛋白,将其记作融合蛋白 (GST-MLDSR),融合蛋白 (GST-MLDSR) 的氨基酸序列为序列表中序列5。其中,第1-231位为GST标签的氨基酸序列,第232-398位为MLDSR蛋白的氨基酸序列 (MLDSR蛋白的氨基酸序列第2-168)。

[0142] 将上述重组载体转化到大肠杆菌BL21 (DE3) (TIANGEN CB105) 中,得到重组菌。挑取单个菌落培养在37℃,200rpm下,在LB中培养直到OD₆₀₀为0.6,然后加入终浓度为0.2mM的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导3小时,收获细胞,并用裂解缓冲液 (20mM的Tris-HCl,pH值8.0,0.5M氯化钠,1mM EDTA中,4% (体积分数) 甘油,1mM DTT) 重悬。细菌被破碎,在18000rpm下离心45分钟。收集上清液。将上清液加入到谷胱甘肽琼脂糖4B (GE Healthcare) 上。然后将样品用裂解缓冲液洗涤并用含10mM的谷胱甘肽的裂解缓冲液洗脱。蛋白质在透析缓冲液 (20mM Tris-HCl,pH 8.0,0.15M NaCl,1mM EDTA,4% (体积分数) 甘油,1mM DTT) 中进行透析,得到融合蛋白 (GST-MLDSR),并通过NanoDrop (Eppendorf) 进行定量。

[0143] 二、DNA探针的制备

[0144] 1、103bp (序列6) 的DNA探针

[0145] 以细菌RHA1基因组DNA为模板,分别采用103bp DNA-f5505和103bp DNA-r5403引物进行PCR扩增,得到103bp (序列6) 的DNA探针。

[0146] 上述PCR反应条件为66℃退火,72℃延伸30s,39个循环。上述反应体系为模板1μL,引物各2μL,DNA聚合酶Easypfu (全式金) 1μL,聚合酶溶液5μL,dNTP (全式金) 5μL和水,共50μL体系)

[0147] 2、其他DNA探针

[0148] 用43bp DNA-f和43bp DNA-r序列、30bp DNA-f和30bp DNA-r序列、28bp DNA-f和28bp DNA-r序列、26bp DNA-f和26bp DNA-r序列、24bp DNA-f和24bp DNA-r序列、22bp DNA-f和22bp DNA-r序列、20bp DNA (motif1) -f和20bp DNA (motif1) -r序列、18bp DNA-f和18bp DNA-r序列、16bp DNA-f和16bp DNA-r序列、14bp DNA-f和14bp DNA-r序列、23bp DNA (motif2) -f和23bp DNA (motif2) -r序列、21bp DNA-f和21bp DNA-r序列、19bp DNA-f和19bp DNA-r序列、17bp DNA-f和17bp DNA-r序列、15bp DNA-f和15bp DNA-r序列、13bp DNA-f和13bp DNA-r序列进行退火,分别得到43bp (序列6第20-62位)、30bp (序列6第38-67位)、28bp (序列6第39-66位)、26bp (序列6第40-65位)、24bp (序列6第41-64位)、22bp (序列6第42-63位)、20bp (序列6第43-62位)、18bp (序列6第44-61位)、16bp (序列6第45-60位)、14bp (序列6第46-59位)、23bp (序列6第20-42位)、21bp (序列6第21-41位)、19bp (序列6第22-40位)、17bp (序列6第23-39位)、15bp (序列6第24-38位)、13bp (序列6第25-37位) 的DNA探针。

[0149] 上述退火反应体系为100μM 43bp DNA-f序列、100μM 43bp DNA-r序列、50mM HEPES、100mM氯化钠和水,共20μL;上述退火反应条件为从95℃到50℃梯度退火,每个间隔5

℃,持续4分钟。其余获得DNA探针使用的退火反应体系相同。

[0150] 三、融合蛋白与DNA的结合

[0151] 1、分别将步骤二制备的103bp或43bp的DNA探针、步骤一制备的融合蛋白(GST-MLDSR)与结合溶液(20mM Tris-HCl,pH 7.5,0.15M NaCl,1mM EDTA,4%(体积/体积)甘油,1mM DTT,5mM MgCl₂)混匀,分别得到反应体系(15微升)。其中,融合蛋白(GST-MLDSR)与103bp或43bp的DNA探针的摩尔比分别为0,1,2,3,4,5,6,8,10,12,16,18,20,24和32。

[0152] 2、将各反应体系在室温孵育30-40分钟后加入6×上样溶液(30mM EDTA,36%甘油,0.05%溴酚蓝)。之后用3.5%PAGE凝胶在0.5×TBE溶液中,120V电泳40分钟。凝胶通过用EB染色15分钟观察。

[0153] MLDSR蛋白与103bp或43bp的DNA探针结合的检测结果如图7和图8所示。将基因mldsr上游的大小为103bp的非编码DNA序列作为MLDSR可能结合的DNA区域。通过EMSA实验证实MLDSR能够结合这个103bp的DNA序列,并且具有两个结合条带,如图8左所示。根据具有两个结合条带的特点,逐步缩短这个103bp DNA的长度,最后缩短到43bp(序列6的第20-62位),如图7所示。EMSA实验证实MLDSR能够结合43bp的DNA探针,且具有两个结合条带,如图8右所示。因此,将这43bp DNA确定为最短的完整的MLDSR结合的DNA区域。并根据具有的两个结合条带推测这段区域可能包含两段结合基序。

[0154] 四、蛋白MLDSR的两个结合基序的鉴定

[0155] 1、分别将步骤二制备的30bp、28bp、26bp、24bp、22bp、20bp、18bp、16bp、14bp、23bp、21bp、19bp、17bp、15bp和13bp的DNA探针、步骤一制备的融合蛋白(GST-MLDSR)与结合溶液(20mM Tris-HCl,pH 7.5,0.15M NaCl,1mM EDTA,4%(体积/体积)甘油,1mM DTT,5mM MgCl₂)混匀,分别得到反应体系(15μL)。其中,融合蛋白与30bp、28bp、26bp、24bp、22bp、20bp、18bp、16bp、14bp、23bp、21bp、19bp、17bp、15bp和13bp的DNA探针的摩尔比均为8。

[0156] 2、将各反应体系在室温孵育30-40分钟后加入6×上样溶液(30mM EDTA,36%甘油,0.05%溴酚蓝)。之后用3.5%PAGE凝胶在0.5×TBE溶液中,120V电泳40分钟。凝胶通过用EB染色15分钟观察。

[0157] MLDSR蛋白与其他逐步缩短的DNA探针结合的检测结果如图9所示。结果显示:步骤三中的43bp的DNA序列确实包含两个基序,一个是基序1,大小为20bp(图9左),其核苷酸序列为序列6的第43-62位;一个是基序2,大小为23bp(图9右),其核苷酸序列为序列6的第20-42位。

[0158] 五、蛋白MLDSR结合盒的确定

[0159] 1、定点突变的基序的制备

[0160] 分别对步骤四鉴定的基序1和基序2的序列进行单碱基对的突变,使用合成的序列进行退火即可得到突变后的基序。使用的序列详见表2中所列(表2中的加粗碱基代表即为突变后的碱基)。其中,20-m-1-f和20-m-1-r为突变基序1(20bp)第一个碱基对使用的序列;20-m-2-f和20-m-2-r为突变基序1(20bp)第二个碱基对使用的序列,以此类推。而23-m-1-f和23-m-1-r为突变基序2(23bp)第一个碱基对使用的序列;23-m-2-f和23-m-2-r为突变基序2(23bp)第二个碱基对使用的序列,以此类推。突变原则为A突变为G,G突变为A,T突变为C,C突变为T。共得到20条突变后的基序1探针和23条突变后的基序2探针。

[0161] 上述退火反应体系与步骤二中的退火反应体系相同。

[0162] 2、EMSA实验确定MLDSR的结合盒

[0163] 为了确定MLDSR的结合盒,将步骤一制备的MLDSR蛋白分别与定点突变的基序1(图10)和基序2(图11)进行EMSA实验。若定点突变的基序中某一碱基的突变导致MLDSR与其结合的条带减弱,将该碱基命名为结合的关键碱基。

[0164] 结果如图10和11所示,其中,基序1中的关键碱基包括:基序1的第3位(G3),基序1的第5位(T5),基序1的第6位(T6),基序1的第8位(C8),基序1的第13位(G13),基序1的第15位(T15),基序1的第16位(A16),基序1的第18位(C18)(如图10);基序2中的关键碱基包括:基序2的第4位(G4),基序2的第6位(T6),基序2的第7位(A7),基序2的第9位(C9),基序2的第10位(T10),基序2的第14位(T14),基序2的第15位(G15),基序2的第16位(C16),基序2的第17位(T17),基序2的第18位(A18),基序2的第20位(C20),基序2的第21位(A21)(如图11)。将基序1和基序2进行比对,发现它们的相同部分,以及结合上面关键碱基的结果,最终确定MLDSR的结合盒:一个17bp的回文序列:5'-GNTWGCTNNTGCTANCA-3'(序列7),其中,N为A或G或C或T,W为A或T)。另外,通过相似性分析发现,基序1可能是这个操纵子的操纵基因,而基序2可能是这个操纵子的启动子。

[0165] 实施例4、在体外MLDSR通过结合基序1调控转录

[0166] 一、DNA探针的获得

[0167] 以细菌RHA1为模板,采用T7-M1-f和T7-M1-r引物进行PCR扩增,得到大小为1414bp的扩增产物,该扩增产物的核苷酸序列为序列8,将其记为DNA I。DNA I为带有基序1的DNA探针,其中,第27-46位为基序1,第88-1414位依次为mldsr基因和mlds基因(mldsr-mlds)。

[0168] 二、体外转录实验

[0169] 1、将融合蛋白(GST-MLDSR)、步骤一得到的DNA I分子(0.3pmol)与结合溶液(20mM Tris-HCl,pH 7.5,0.15M NaCl,1mM EDTA,4%(体积/体积)甘油,1mM DTT,5mM MgCl₂)混匀,得到反应体系(10μL),室温孵育30-40分钟,得到反应产物。其中,融合蛋白(GST-MLDSR)与DNA I分子的摩尔比分别为10,50,100,150,200,300,400,600,900,1200以及50,10,8,6,4,2,1,0.5。

[0170] 2、然后向步骤1得到的反应产物中加入1×T7RNA聚合酶缓冲液(5mM rATP,5mM rUTP,5mM rGTP,5mM rCTP和1μL T7RNA聚合酶(RiboMAX大规模RNA生产系统-T7P1300)),得到反应体系(20μL),在室温下孵育3小时,得到反应产物。

[0171] 3、然后向步骤2的反应产物中加入0.5μL RRI(Promega)和0.5μL DNA酶I(TAKARA)在37℃下反应20分钟。样品经1%琼脂糖凝胶分离并通过EB染色观察。产生的RNA的半定量通过Image J软件进行分析。这些实验重复三次以上。

[0172] 结果如图13所示。通过将融合蛋白(GST-MLDSR)与带有基序1的DNA探针进行体外转录实验,发现MLDSR蛋白能通过结合基序1调节转录(如图13)。并且,通过对比发现,当MLDSR蛋白与DNA的摩尔比很高时(大于50),MLDSR会抑制转录(图13左);当MLDSR与DNA的摩尔比变低时,MLDSR会促进转录(图13右)。即当MLDSR与DNA的摩尔比由高变低时,MLDSR会从抑制转录变为促进转录。

[0173] 实施例5、蛋白MLDSR是一个脂滴相关蛋白的确定

[0174] 一、细胞组分分析检测蛋白MLDSR的定位

[0175] 1、细菌各组分的分离

[0176] 具体步骤参见文献“Ding等人, Isolating lipid droplets from multiple species, 2013年”中的方法。简述如下:收集野生型细菌RHA1细胞,在溶液A(溶剂为水,溶质及浓度为:25mM甘氨酸,250mM蔗糖,pH 7.8)中重悬;将重悬后的细胞破碎并在6000g下离心10分钟,收集上清,为全细胞裂解液。取全细胞裂解液(10毫升)加入2mL溶液B(溶剂为水,溶质及浓度为:20mM HEPES,100mM氯化钾,2mM氯化镁,pH7.4)中,在4℃、38000rpm下离心1小时(贝克曼SW40),得到三个组分:上层为脂滴,中间为细胞质,最下面沉淀为质膜。

[0177] 2、各组分的Western blot分析

[0178] 将上述步骤1中的全细胞裂解液、脂滴、细胞质和质膜四个组分分别加入SDS上样溶液,在95℃煮5分钟,并将得到的蛋白样品用SDS-PAGE分离后再进行western分析。使用anti-MLDSR,anti-Ro05469,anti-Ro05869和anti-GFP(后三个抗体请见文献“丁等人, 2012. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.”)四种抗体作为一抗,Western blot检测MLDSR蛋白定位情况。

[0179] 结果如图14显示,MLDSR蛋白明显的定位于脂滴组分,表明MLDSR蛋白是一个脂滴相关蛋白。

[0180] 二、荧光显微观察检测MLDSR的定位

[0181] 1、过表达mldsr截短体的菌株的获得

[0182] (1) 过表达载体的构建

[0183] 分别将序列1所示的mldsr基因的第1-378位,第73-378位,第151-378位和第73-276位插入质粒pJAM2-gfp的BamH1位点中,分别得到过表达MLDSR截短体(MLDSR蛋白的1-126位)的载体、过表达MLDSR截短体(MLDSR蛋白的25-126位)的载体、过表达MLDSR截短体(MLDSR蛋白的51-126)的载体、过表达MLDSR截短体(MLDSR蛋白的1-126位)的载体。

[0184] (2) 分别将步骤(1)获得的过表达MLDSR截短体通过电击分别转到野生型细菌RHA1细胞中,并通过GFP的绿色荧光信号筛选出阳性的各个过表达MLDSR截短体的细胞。同时将pJAM2-gfp质粒通过电击转到野生型细菌RHA1细胞中,得到对照细胞(WT+GFP)。

[0185] 2、用激光共聚焦显微镜confocal FV1000观察MLDSR及其截短体的定位

[0186] 将过表达MLDSR全长及各个MLDSR截短体的菌株先在LB培养基中培养48小时后,取600微升转移至MSM培养基培养16小时。之后用染料LipidTOX red (Invitrogen公司)对各种细胞中的脂滴进行染色。将染色后的细胞用激光共聚焦扫描显微镜进行观察。具体步骤见文献“丁等人, 2012. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.”

[0187] 结果如图15所示,在对照细胞(WT+GFP)中,绿色信号弥散在整个细胞中,而过表达MLDSR全长的细胞中,绿色荧光信号聚集在脂滴周围。说明MLDSR蛋白定位在脂滴上。同时,过表达MLDSR截短体(1-126)细胞和过表达MLDSR截短体(25-126)细胞中的绿色荧光信号也聚集在脂滴周围,也能够定位在脂滴上,相反,过表达MLDSR截短体(51-126)细胞和过表达MLDSR截短体(25-92)细胞几乎不与脂滴有接触。说明MLDSR蛋白通过其第25-126位这一区域定位在脂滴上,进一步说明MLDSR是一个脂滴相关蛋白。

[0188] 实施例6、脂滴或脂肪体通过调节蛋白MLDSR的细胞质或溶液中的浓度来参与转录调控

[0189] 一、脂肪体的制备

[0190] 脂肪体制备的具体操作方法参见文献“汪等人,2016,Construction of Nano-Droplet/Adiposome and Artificial Lipid Droplets.”中的步骤。简述如下:将2mg吹干的DOPC(Avanti 258689)和5 μ L大鼠的甘油三酯以及100 μ L溶液B(20mM HEPES、100mM KCl、2mM MgCl₂,pH 7.4)混合涡旋24次,每次10秒。离心,去掉上层及下层部分,收集中间部分即为脂肪体。

[0191] 二、脂肪体结合实验(adiposome binding assay)

[0192] 上述实施例结果表明MLDSR会特异结合DNA,同时MLDSR是一个脂滴相关蛋白,为了研究脂滴、MLDSR和DNA这三者之间的关系,用脂肪体来模拟细胞中的脂滴,在体外进行脂肪体结合实验。具体步骤如下:

[0193] 将步骤一制备的脂肪体(50 μ l)、实施例3制备得到的融合蛋白(GST-MLDSR)和实施例4制备得到的DNA I分子(融合蛋白与DNA I分子的摩尔比为50:1)混合,得到反应体系(60 μ l),室温孵育30分钟,然后将反应体系在15,000rpm条件下离心5分钟,收集上层部分,得到脂肪体组分;收集下层溶液,得到溶液组分。

[0194] 将脂肪体组分用溶液B洗3次,然后将样品用溶液B调成等体积(50 μ l)。脂肪体组分和溶液组分的一部分用作PCR的模板来检测DNA;另一部分加入SDS上样溶液,在95 $^{\circ}$ C煮5分钟,并将得到的蛋白样品用SDS-PAGE分离后再进行银染检测。

[0195] 结果如图16所示。结果表明DNA I分子主要在溶液组分中被检测到,而脂肪体组分中几乎检测不到DNA信号,说明定位在脂肪体上的MLDSR不会结合DNA,即脂滴或者脂肪体结合的MLDSR蛋白失去了结合DNA的能力。

[0196] 三、脂肪体结合实验与体外转录实验共同实验

[0197] 尽管脂滴或脂肪体不会通过MLDSR结合DNA,为了研究脂滴是否会通过MLDSR间接调控转录,进行了如下脂肪体结合实验与体外转录实验:

[0198] 1、分别将0 μ l、2 μ l、4 μ l、6 μ l、8 μ l、12 μ l、16 μ l或20 μ l(不足20 μ l,用溶液B补充至20 μ l)步骤一制备的脂肪体、实施例3制备得到的融合蛋白(GST-MLDSR)和实施例4制备得到的DNA I分子(融合蛋白与DNA I分子的摩尔比为50:1)混合,得到反应体系共25 μ l,室温孵育30分钟,然后将反应体系在15,000rpm条件下离心5分钟,收集上层部分,得到脂肪体组分;收集下层溶液,得到溶液组分。

[0199] 2、取溶液组分10 μ l作为体外转录实验的DNA模板,加入1 \times T7RNA聚合酶缓冲液(5mM rATP,5mM rUTP,5mM rGTP,5mM rCTP和1 μ L T7RNA聚合酶(RiboMAX大规模RNA生产系统-T7P1300)),得到反应体系(20 μ L),在室温下孵育3小时,得到反应产物。

[0200] 3、然后向步骤2得到的反应产物中加入0.5 μ L RRI(Promega)和0.5 μ L DNA酶I(TAKARA)在37 $^{\circ}$ C下反应20分钟。样品经1%琼脂糖凝胶分离并通过EB染色观察。产生的RNA的半定量通过Image J软件进行分析。这些实验重复三次以上。

[0201] 将脂肪体组分用溶液B洗3次,然后将样品用溶液B调成等体积(25 μ l)。剩余的溶液组分和脂肪体组分加入SDS上样溶液,在95 $^{\circ}$ C煮5分钟,并将得到的蛋白样品用SDS-PAGE分离后再进行银染检测。

[0202] 结果如图17所示,随着加入脂肪体的增多,脂肪体组分中的MLDSR蛋白明显增加,而溶液组分中的MLDSR蛋白显著减少。由于上述实验显示DNA分子主要存在于溶液组分中,所以用溶液组分作为后续体外转录实验的DNA模板,进一步发现,随着加入脂肪体的增多,

得到的转录的RNA产物持续增加,甚至最后高于未加MLDSR蛋白的对照。表明脂肪体的增多使更多的MLDSR蛋白被脂肪体招募过去,从而减少了溶液中的MLDSR浓度。

[0203] 上述研究表明,当MLDSR与DNA的摩尔比由高变低时,MLDSR会从抑制转录变为促进转录(图13)。所以当脂肪体的加入减低了溶液中MLDSR浓度后,转录产物就会由低变高。这一结果表明脂滴或脂肪体会通过调节溶液中MLDSR蛋白浓度间接参与基因的转录调控(图18)。

序列表

<110>中国科学院生物物理研究所

<120>脂滴或脂肪体通过MLDSR蛋白参与的转录调控的发现及应用

<160>8

<210>1

<211>507bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

```

atggcaagcg atgatcgcg cgcagccggg gcaggagatc tggcagctcg cgtagtcagc 60
aacgccgctc acgacatcgg aggtttcatt cgtgccccagc gcgaagcagc tcaggtgtcg 120
atgcggcagc tggcgcagct ggccggtgtc agtaatccgt atctgagtca gatcgagcgt 180
gggttgcgca agccctcggc cgaggtgctt gggcagatag ccaagggctc ccgggtgtct 240
tcggaggctc tgtacgtcca ggcgggttac ctcgagcagc ggccacacgg tcccctccgt 300
gacgctctgc tcgcggatac ggccattacc gagcggcaga agcaagtgtc gctcgagatc 360
tacgagtcgt tctgtcgtga gaacgaatcg gcggaagcgg ccgaatcccg gacgtccgag 420
cttcggacag aagaacacca gcgttctgat tcccagacgc cggaaccaga accccccacc 480
gttgaacagg agaaagccga tgactga 507

```

<210>2

<211>168

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

```

Met Ala Ser Asp Asp Arg Asp Ala Ala Gly Ala Gly Asp Leu Ala Ala
1           5           10           15
Arg Val Val Ser Asn Ala Ala His Asp Ile Gly Gly Phe Ile Arg Ala
          20           25           30
Gln Arg Glu Ala Ala Gln Val Ser Met Arg Gln Leu Ala Gln Leu Ala
          35           40           45
Gly Val Ser Asn Pro Tyr Leu Ser Gln Ile Glu Arg Gly Leu Arg Lys
          50           55           60
Pro Ser Ala Glu Val Leu Gly Gln Ile Ala Lys Gly Leu Arg Val Ser
65           70           75           80
Ser Glu Val Leu Tyr Val Gln Ala Gly Tyr Leu Glu Gln Arg Pro His

```

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| | 85 | 90 | 95 |
| Gly Pro Leu Arg Asp Ala Leu Leu Ala Asp Thr Ala Ile Thr Glu Arg | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Gln Lys Gln Val Leu Leu Glu Ile Tyr Glu Ser Phe Cys Arg Glu Asn | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| Glu Ser Ala Glu Ala Ala Glu Ser Arg Thr Ser Glu Leu Arg Thr Glu | | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| Glu His Gln Arg Ser Asp Ser Gln Thr Pro Glu Pro Glu Pro Pro Thr | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Val Glu Gln Glu Lys Ala Asp Asp | | | |
| | 165 | | |

<210>3

<211>500bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>3

```

catggggcgc gaggaggtga ccggtctcgc cgcggcgacg tggaccgtcg ccaagcgcct 60
gatcatggaa tccgtcgacg acccgaacag cacgctgcgc acgaaggctc cggagaacgt 120
cgtgcgcttc ggcgagcggc tgcgcgacga ccacgagctg agagtcaagg tcgacgggtg 180
ggtgctcgcc ggcacgcgct acgtcgtggt ccattacacc gacgagatca ccgcgatcat 240
ctccgacacc gtcgagcgtt gggacgccga ggaggcgtcc aagaagatcg agctgcaggt 300
gggacgggac ctccagtcca tccgcatcaa cggcaccgtc gtcgggtcga tcgcggttct 360
gctgatctac acgttctcga cgttgctggt cggctgacaa tcgcctcgac ggagggtccg 420
ctagctgggt gtaacagag tgcttgcaat tgctagcacc ctgctttagc cttggttctg 480
cccagcaaca cggaggactg                                     500

```

<210>4

<211>438bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>4

```

atgactgacc agaagacat cgacagcgtc aagacctcgc tgtacgcggc cgtaggcgcc 60
ggagacgtcg tcgtgcagge cgtggccgac gtcgtcgcgc aggtccgctc gcgcgccgag 120
tccaccaggg gtgacgtcga agagcgtgtc ggcgccgcca aggagcgcac cgccggactc 180
caggaagagg tcaccgaggg tgtcgagaac cttecgacgc gctecgcccg actgccgtcc 240
gagctgcccc aggagcttgc cgagctgcgt gagaagtcca ccgccgacga gctgcgcaag 300

```

gttgccgagg cctacctgaa ggtcgcctcc gacctgtaca cgtcgcctcgc cgagcgcggc 360
 gaggacaccg tcgagcgcac ccgcaagcag ccggtcgtcg aggaggccat cggcccgcgc 420
 gagaccgcct tcggtgac 438

<210>5

<211>398

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>5

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Met | Ser | Pro | Ile | Leu | Gly | Tyr | Trp | Lys | Ile | Lys | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Arg | Leu | Leu | Leu | Glu | Tyr | Leu | Glu | Glu | Lys | Tyr | Glu | Glu | His | Leu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 20 | | | | 25 | | | | | | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyr | Glu | Arg | Asp | Glu | Gly | Asp | Lys | Trp | Arg | Asn | Lys | Lys | Phe | Glu | Leu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Leu | Glu | Phe | Pro | Asn | Leu | Pro | Tyr | Tyr | Ile | Asp | Gly | Asp | Val | Lys | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Thr | Gln | Ser | Met | Ala | Ile | Ile | Arg | Tyr | Ile | Ala | Asp | Lys | His | Asn | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | Leu | Gly | Gly | Cys | Pro | Lys | Glu | Arg | Ala | Glu | Ile | Ser | Met | Leu | Glu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | 95 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Ala | Val | Leu | Asp | Ile | Arg | Tyr | Gly | Val | Ser | Arg | Ile | Ala | Tyr | Ser | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 100 | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | Asp | Phe | Glu | Thr | Leu | Lys | Val | Asp | Phe | Leu | Ser | Lys | Leu | Pro | Glu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 115 | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | Leu | Lys | Met | Phe | Glu | Asp | Arg | Leu | Cys | His | Lys | Thr | Tyr | Leu | Asn | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Asp | His | Val | Thr | His | Pro | Asp | Phe | Met | Leu | Tyr | Asp | Ala | Leu | Asp | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | 160 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Val | Leu | Tyr | Met | Asp | Pro | Met | Cys | Leu | Asp | Ala | Phe | Pro | Lys | Leu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | 175 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Cys | Phe | Lys | Lys | Arg | Ile | Glu | Ala | Ile | Pro | Gln | Ile | Asp | Lys | Tyr | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 180 | | | | | | 185 | | | | 190 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Lys | Ser | Ser | Lys | Tyr | Ile | Ala | Trp | Pro | Leu | Gln | Gly | Trp | Gln | Ala | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 195 | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Asp | His | Pro | Pro | Lys | Ser | Asp | Leu | Glu | Val | Leu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 210 | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phe | Gln | Gly | Pro | Leu | Gly | Ser | Ala | Ser | Asp | Asp | Arg | Asp | Ala | Ala | Gly | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Ala Gly Asp Leu | Ala Ala Arg Val | Val Ser Asn Ala | Ala His Asp Ile |
| | 245 | 250 | 255 |
| Gly Gly Phe Ile | Arg Ala Gln Arg | Glu Ala Ala Gln | Val Ser Met Arg |
| | 260 | 265 | 270 |
| Gln Leu Ala Gln | Leu Ala Gly Val | Ser Asn Pro Tyr | Leu Ser Gln Ile |
| | 275 | 280 | 285 |
| Glu Arg Gly Leu | Arg Lys Pro Ser | Ala Glu Val Leu | Gly Gln Ile Ala |
| | 290 | 295 | 300 |
| Lys Gly Leu Arg | Val Ser Ser Glu | Val Leu Tyr Val | Gln Ala Gly Tyr |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Leu Glu Gln Arg | Pro His Gly Pro | Leu Arg Asp Ala | Leu Leu Ala Asp |
| | 325 | 330 | 335 |
| Thr Ala Ile Thr | Glu Arg Gln Lys | Gln Val Leu Leu | Glu Ile Tyr Glu |
| | 340 | 345 | 350 |
| Ser Phe Cys Arg | Glu Asn Glu Ser | Ala Glu Ala Ala | Glu Ser Arg Thr |
| | 355 | 360 | 365 |
| Ser Glu Leu Arg | Thr Glu Glu His | Gln Arg Ser Asp | Ser Gln Thr Pro |
| | 370 | 375 | 380 |
| Glu Pro Glu Pro | Pro Thr Val Glu | Gln Glu Lys Ala | Asp Asp |
| 385 | 390 | 395 | |

<210>6

<211>103bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>6

caatgcctc gacggagggt ccgctagctg ggtgctaaca gagtgcttgc aattgctagc 60
accctgettt agcettggtt ctgccagca acacggagga ctg 103

<210> 7

<211> 17bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) .. (4)

<223> w为a或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> n为a或g或c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8) .. (8)
 <223> n为a或g或c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> n为a或g或c或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15) .. (15)
 <223> n为a或g或c或t
 <400> 7
 gntwgctnnt gctanca 17
 <210>8
 <211>1414bp
 <212>DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <223>
 <400>8
 cactagtaat acgactcaact ataggggtgc ttgcaattgc tagcacctg ctttagcctt 60
 ggttctgccc agcaacacgg aggactgatg gcaagcgatg atcgcgacgc agccggtgca 120
 ggagatctgg cagctcgcgt agtcagcaac gccgctcacg acatcgaggg ttctattcgt 180
 gccacgcgcg aagcagctca ggtgtcgatg cggcagctgg cgcagctggc cgggtgtcagt 240
 aatccgtatc tgagtcagat cgagcgtggg ttgcgcaage cctcggccga ggtgcttggg 300
 cagatagcca aggggtctccg ggtgtcttcg gaggtctctgt acgtccaggc gggttacctc 360
 gagcagcggc cacacggtec cctccgtgac gctctgctcg cggatacggc cattaccgag 420
 cggcagaagc aagtgtgtgt cgagatctac gagtcgttct gtcgtgagaa cgaatcggcg 480
 gaagcggccg aatcccggac gtccgagctt cggacagaag aacaccagcg ttctgattcc 540
 cagacgccgg aaccagaacc ccccaccgtt gaacaggaga aagccgatga ctgaccagaa 600
 gaccatcgac agcgtcaaga cctcgtctgta cgcggccgta ggcgccggag acgtcgtcgt 660
 gcaggccgtg gccgacgtcg tcgccaggt ccgctcgcgc gccgagtcca cccagggtga 720
 cgtcgaagag cgtgtcggcg gcgccaagga gcgcategcc ggactccagg aagaggtcac 780

cgaggggtgtc gagaaccttc gcgaccgcct cgccggactg ccgtccgagc tgcccgagga 840
gcttgccgag ctgcgtgaga agttaccgc cgacgagctg cgcaaggttg ccgaggccta 900
cctgaaggtc gcctccgacc tgtacacgtc gctcgccgag cgcggcgagg acaccgtcga 960
gcgcatccgc aagcagccgg tcgtcgagga gggcatcggc cgcgccgaga ccgccttcgg 1020
tgacgccgtc gagctgaccg aggaagctct cggcacctt gcacgccaga cgcgccctt 1080
cggcgagcag gccgcaaagc tcgcggggccg cgcttcgggt cgcattctccg acaccgccga 1140
gggactcggc gaggccatcg ccgacgccgg cgacgaggct gccctgaagg ttctcgacct 1200
gggcgaccag gccgaggaag cgtcgaagga cgctgccgat cgcgtcaccg ccaccgcggc 1260
cgacgtccag gctcgcgccg acaaggetgc cccggccaag cacgccctc ccggaagaa 1320
ggctgctccg gccaaaggetg cggcaacccc ggccccggcc ccggccaaga aggccgccgc 1380
tccggccaag aaggetgctc cggccaagaa ggct 1414

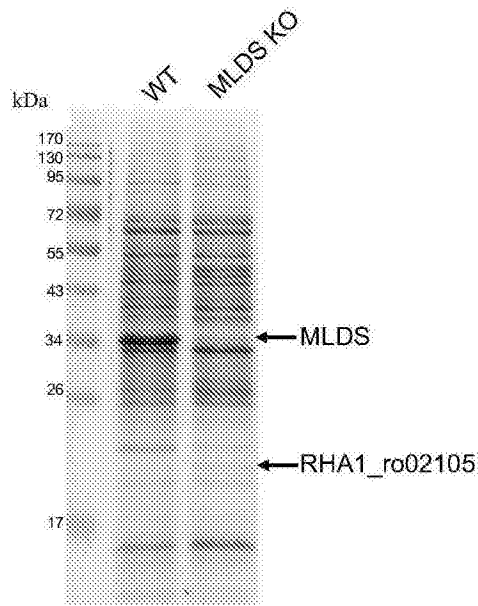


图1

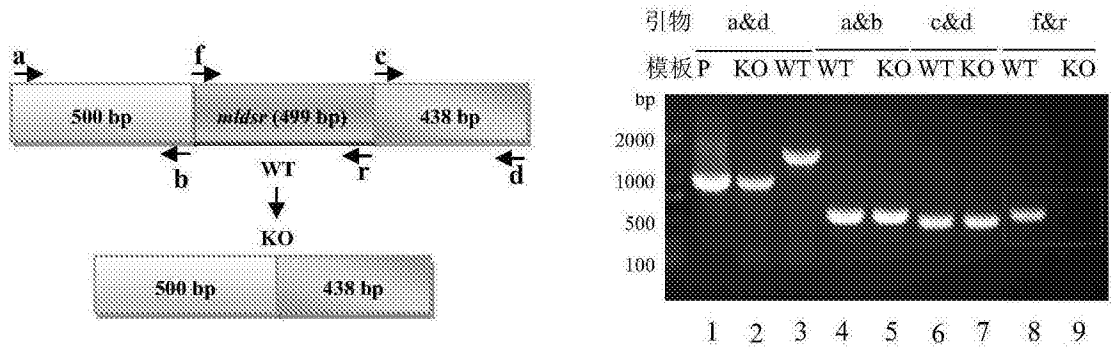


图2

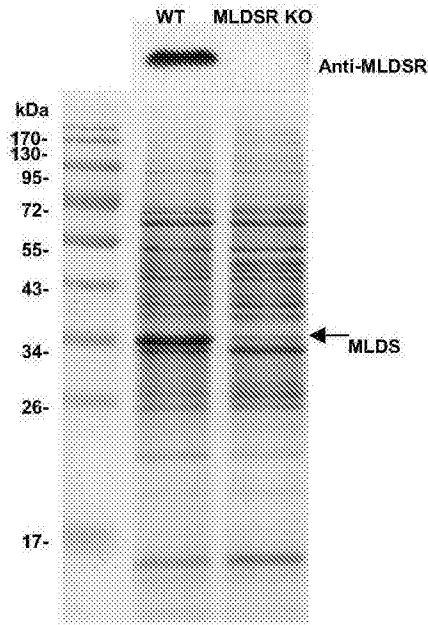


图3

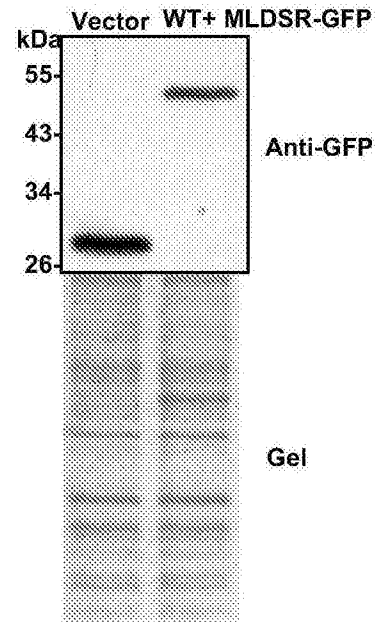


图4

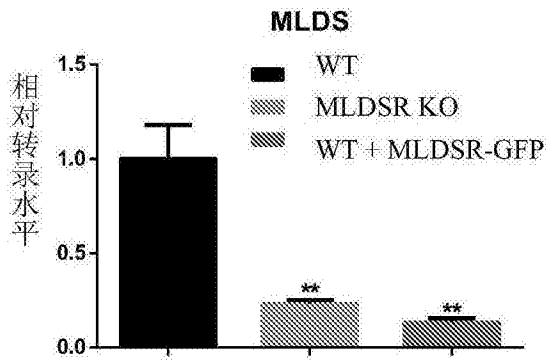


图5

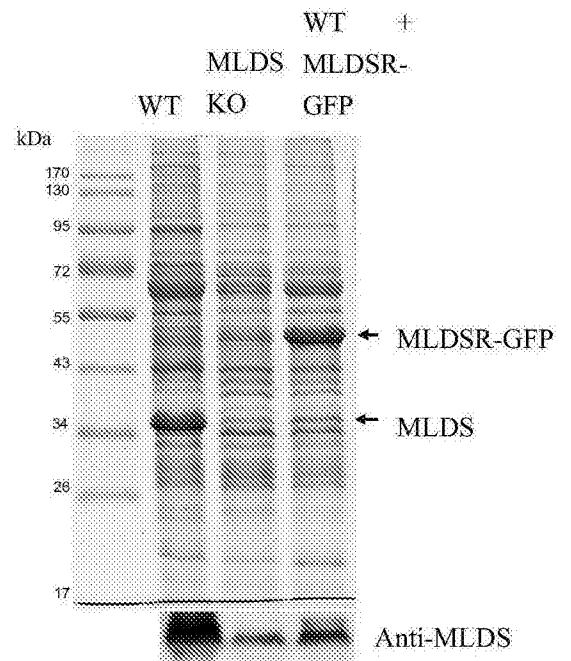


图6

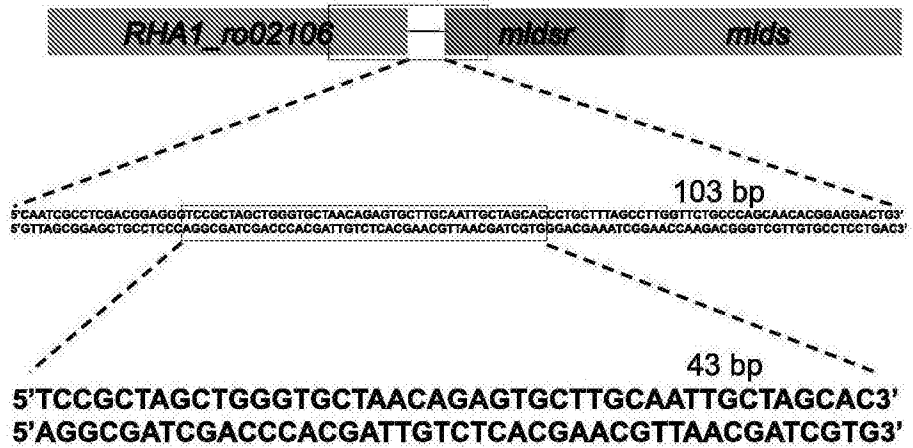


图7

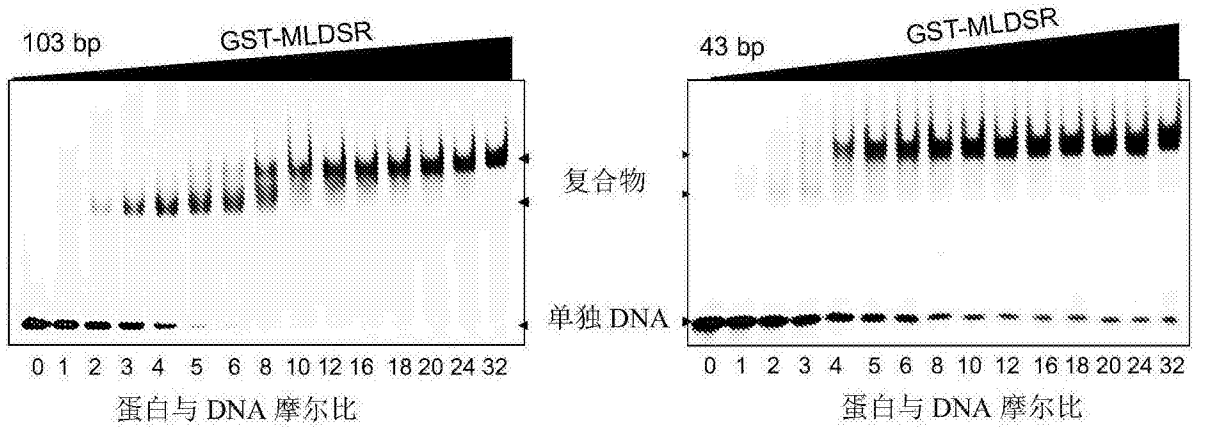


图8

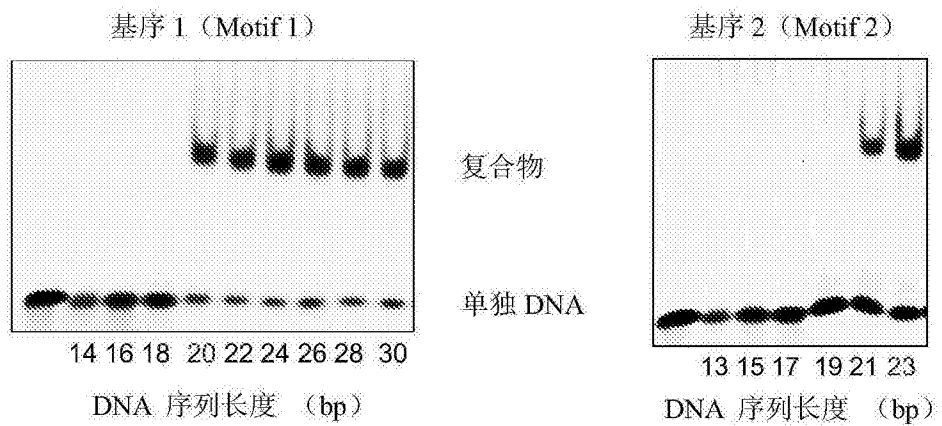


图9

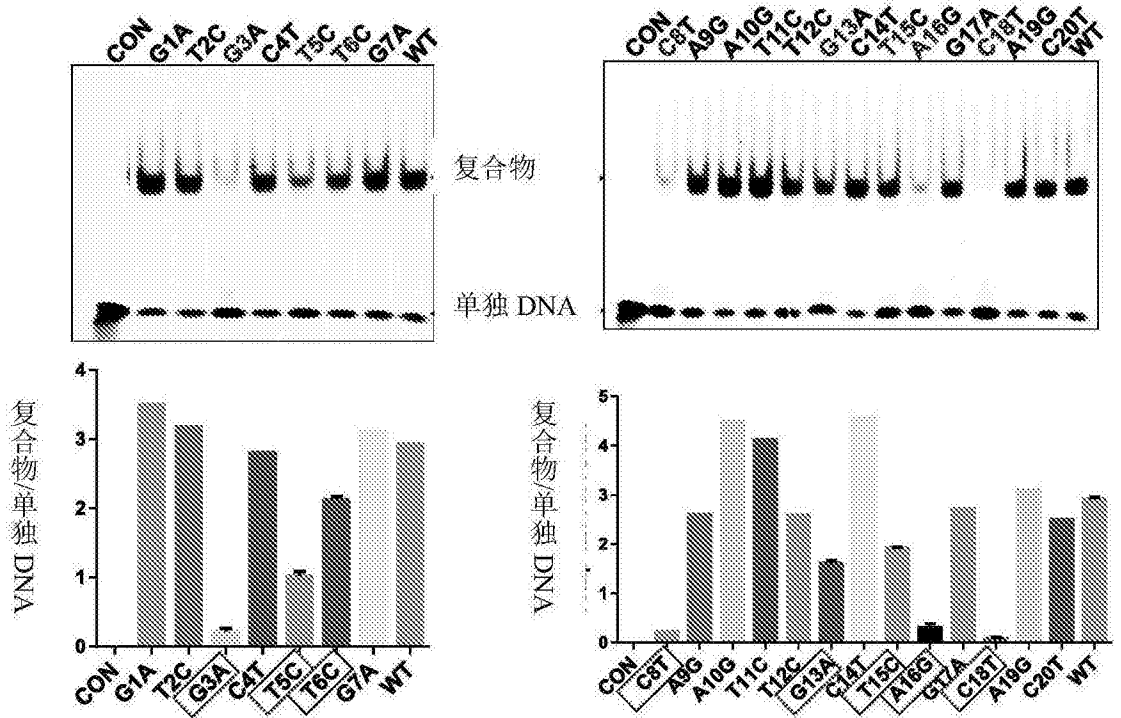


图10

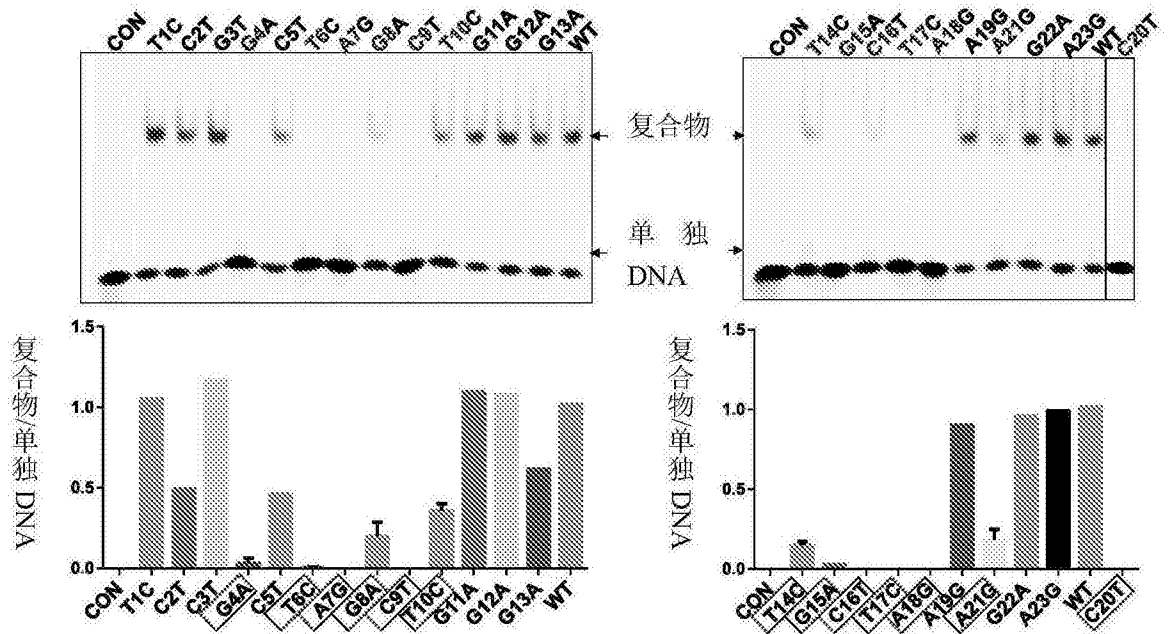


图11



图12

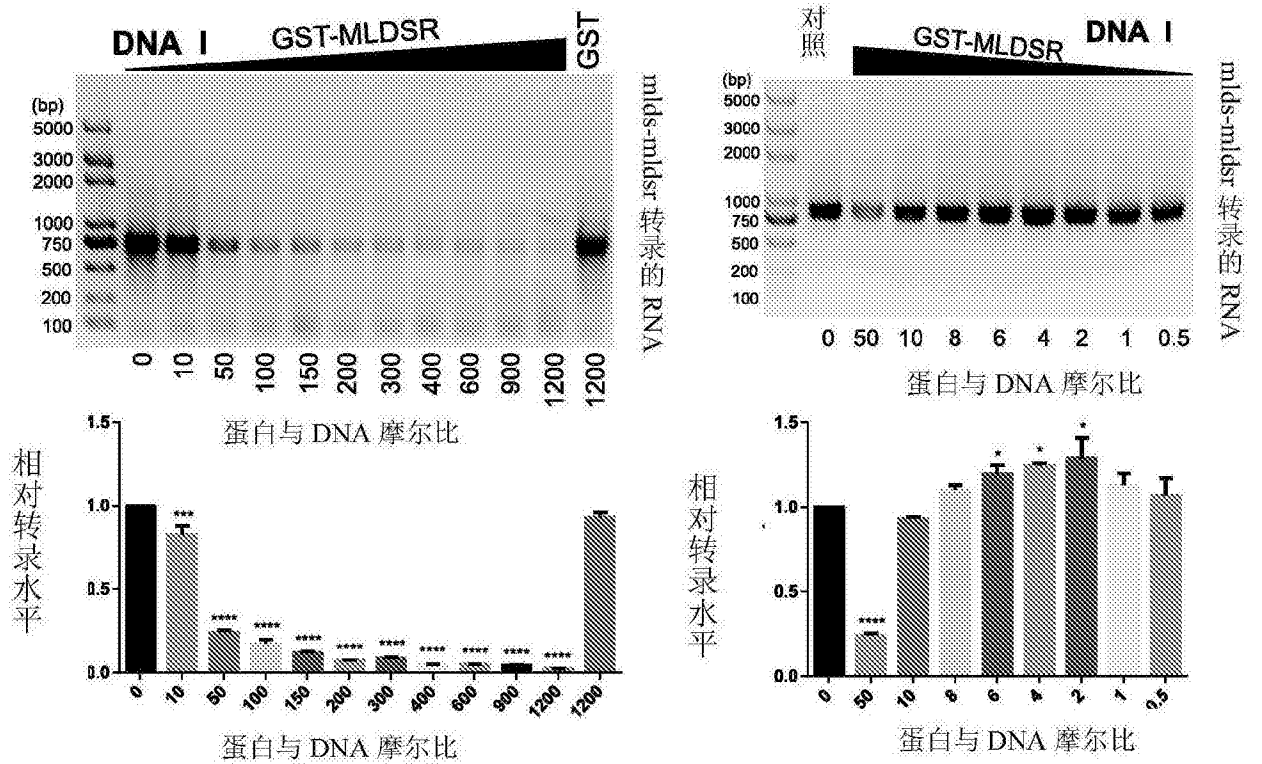


图13

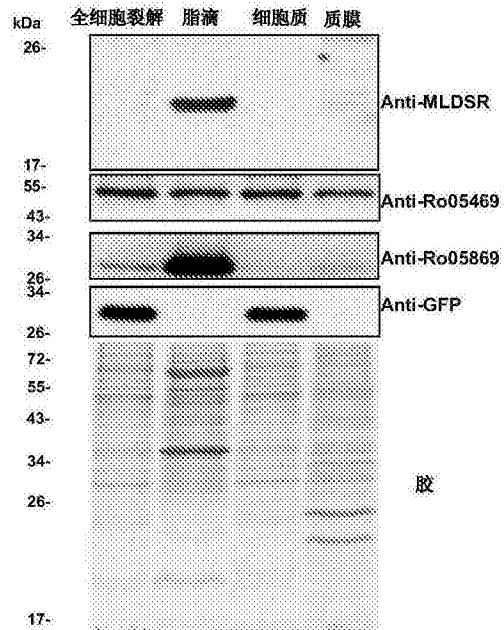


图14

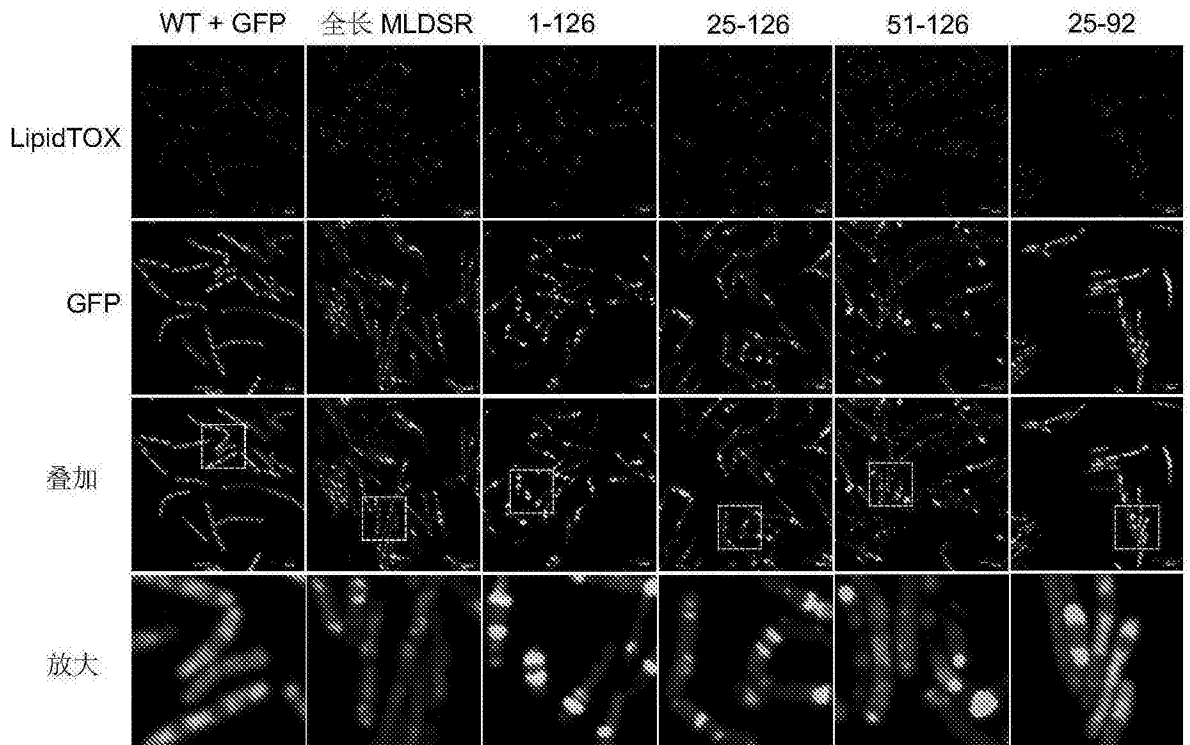


图15

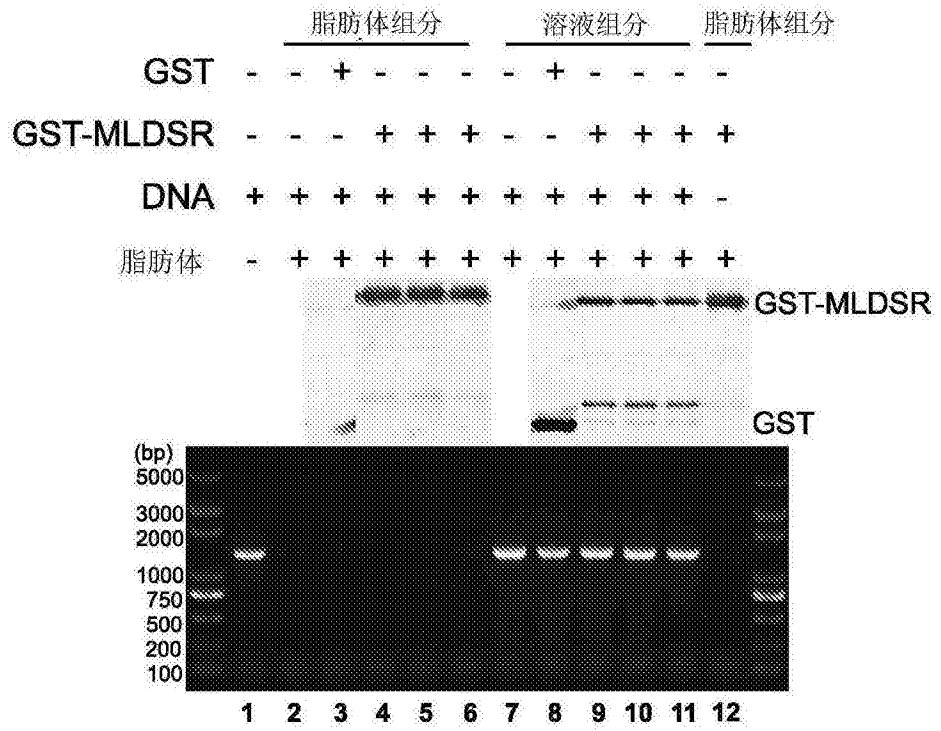


图16

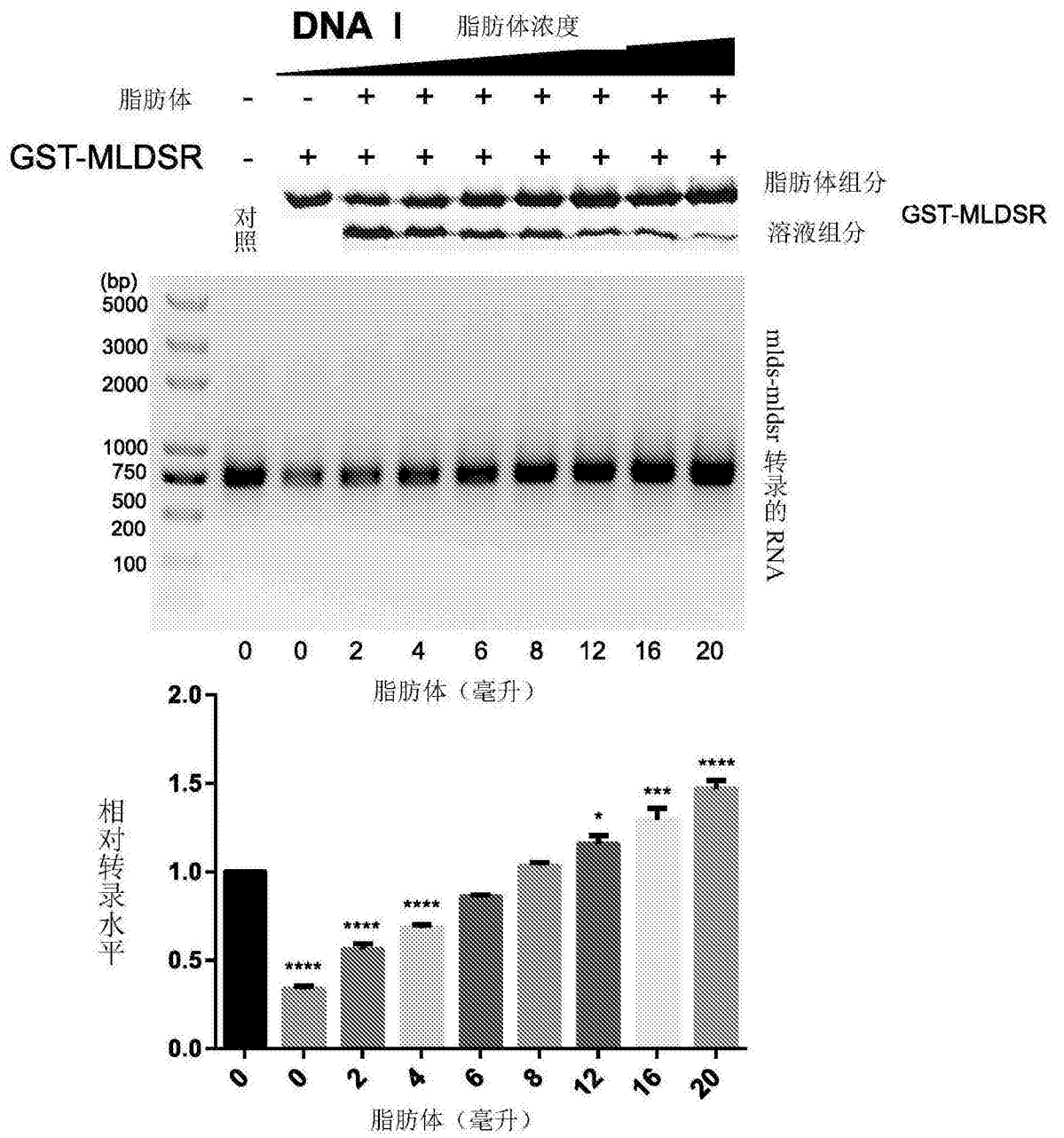


图17

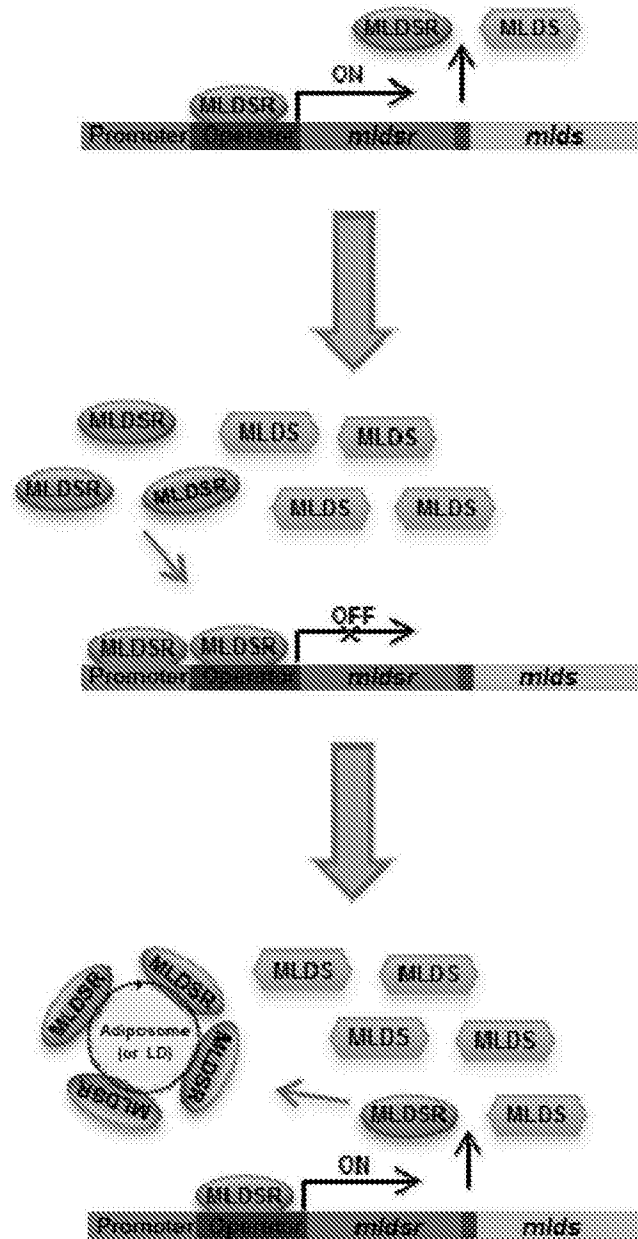


图18