

(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 106632622 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201710024418.X

(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)

*C07K 19/00*(2006.01)

*C12N 15/62*(2006.01)

*A61K 47/64*(2017.01)

*A61K 48/00*(2006.01)

权利要求书3页 说明书15页  
序列表15页 附图7页

(54)发明名称

MLDS蛋白在促进脂滴或脂肪体结合DNA中的应用

(57)摘要

本发明公开了MLDS蛋白在促进脂滴或脂肪体结合DNA中的应用。通过实验表明：脂滴通过一种主要脂滴蛋白MLDS结合并保护基因组DNA，从而增加了RHA1在紫外线照射和极端低氮环境下的存活率。通过体内和体外试验表明：脂滴会通过MLDS结合及招募DNA，为研究脂滴与核酸的相互作用提供理论指导及技术支持，也为脂载核酸药物的开发提供建设性的思路。

1. MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白在如下(1)-(5)中任一种中的应用:

- (1) 结合或招募DNA;
- (2) 介导或辅助介导脂滴或脂肪体结合或招募DNA;
- (3) 定位于脂滴或脂肪体;
- (4) 提高细菌在逆境胁迫下的生存率;
- (5) 制备脂载核酸药物。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於:

所述MLDS蛋白截短体为蛋白质MLDS-C或蛋白质MLDS-N;

所述蛋白质MLDS-C为去除MLDS蛋白N端第1-232位氨基酸,且保持其他氨基酸序列不变后得到的蛋白质;

所述蛋白质MLDS-N为去除MLDS蛋白C端第233-276位氨基酸,且保持其他氨基酸序列不变后得到的蛋白质;

所述MLDS蛋白截短体的融合蛋白为蛋白质ADRP-MLDS-C或蛋白质MLDS-N-H1;

所述蛋白质ADRP-MLDS-C为所述蛋白质MLDS-C与ADRP蛋白融合得到的蛋白质;

所述蛋白质MLDS-N-H1为所述蛋白质MLDS-N与组蛋白H1蛋白融合得到的蛋白质。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於:

所述蛋白质MLDS-C为b1) 或b2) 或b3):

b1) 氨基酸序列是序列4第232-275位所示的蛋白质;

b2) 在序列4第232-275位所示的蛋白质的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质;

b3) 将序列4第232-275位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/或添加得到的功能相同的蛋白质;

所述蛋白质MLDS-N为c1) 或c2) 或c3):

c1) 氨基酸序列是序列9第232-462位所示的蛋白质;

c2) 在序列9第232-462位所示的蛋白质的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质;

c3) 将序列9第232-462位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/或添加得到的功能相同的蛋白质;

所述蛋白质ADRP-MLDS-C为d1) 或d2) 或d3):

d1) 氨基酸序列是序列13第232-714位所示的蛋白质;

d2) 在序列13第232-714位所示的蛋白质的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质;

d3) 将序列13第232-714位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/或添加得到的功能相同的蛋白质;

所述蛋白质MLDS-N-H1为e1) 或e2) 或e3):

e1) 氨基酸序列是序列11第232-657位所示的蛋白质;

e2) 在序列11第232-657位所示的蛋白质的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质;

e3) 将序列11第232-657位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/或添加得到的功能相同的蛋白质。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於:

所述融合蛋白质的氨基酸序列为序列4或序列9或序列11或序列13。

5. 根据权利要求1-4中任一所述的应用,其特征在于:  
所述提高细菌在逆境胁迫下的生存率体现在提高细菌在逆境胁迫下的菌落数目和/或降低细菌在逆境胁迫下DNA链断裂水平。
6. 根据权利要求1-5中任一所述的应用,其特征在于:所述逆境胁迫为低氮和/或紫外线照射。
7. 与权利要求1所述的MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白相关的生物材料在如下(1)-(5)中任一种中的应用:
- (1) 结合或招募DNA;
  - (2) 介导或辅助介导脂滴或脂肪体结合或招募DNA;
  - (3) 定位于脂滴或脂肪体;
  - (4) 提高细菌在逆境胁迫下的生存率;
  - (5) 制备脂载核酸药物;
- 所述与权利要求1所述的MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白相关的生物材料,为下述A1)至A12)中的任一种:
- A1) 编码权利要求1所述的MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白的核酸分子;
  - 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。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于:
- A1) 所述核酸分子为如下1)或2)或3)或4)或5)或6)或7)所示的基因:
- 1) 其编码序列是序列1所示的cDNA分子或DNA分子;
  - 2) 其编码序列是序列1第694-828位所示的cDNA分子或DNA分子;
  - 3) 其编码序列是序列1第1-693位所示的cDNA分子或DNA分子;
  - 4) 其编码序列是序列12第1318-1449位所示的cDNA分子或DNA分子;
  - 5) 其编码序列是序列10第1-693位所示的cDNA分子或DNA分子;
  - 6) 与1)或2)或3)或4)或5)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MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白的cDNA分子或基因组DNA分子;
  - 7) 在严格条件下与1)或2)或3)或4)或5)限定的核苷酸序列杂交,且编码权利要求1所述的MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白的cDNA分子或基因组DNA分

子。

9. 根据权利要求7或8所述的应用,其特征在于:

所述提高细菌在逆境胁迫下的生存率体现在提高细菌在逆境胁迫下的菌落数目和/或降低细菌在逆境胁迫下DNA链断裂水平。

10. 根据权利要求7-9中任一所述的应用,其特征在于:所述逆境胁迫为低氮和/或紫外线照射。

## MLDS蛋白在促进脂滴或脂肪体结合DNA中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及MLDS蛋白在促进脂滴或脂肪体结合DNA中的应用。

### 背景技术

[0002] 脂滴是一种已经在几乎所有的生物中都被发现的细胞器。除了熟知的功能外,在不同的生物体的细胞中,脂滴发挥着不同的作用。脂滴作为细胞器发挥着存储、新陈代谢、物质转运和信号转导的功能。脂滴的动态和功能变化直接影响到人们的日常生活。例如,在植物和动物中脂滴的数量和大小,以及脂肪酸组成对食物的营养至关重要。此外,植物和微生物中脂滴的三酰基甘油可被用于生产生物柴油。因此,脂滴在人类健康、食品质量和生物燃料的开发中起着重要的作用。

[0003] 脂滴与其它膜质细胞器的区别在于它的中性脂核及单层磷脂膜 (Farese和瓦尔特,2009;马丁和帕顿,2006年),这使脂滴成为一种独特的细胞内膜细胞器。另外,其常驻蛋白主要定位在脂滴上而不是其它内膜细胞器上。以前的研究发现,真核的脂滴蛋白PLIN1/perilipin和PLIN2/ADRP能定位到细菌的脂滴上 (Hanisch等人,2006)。而线虫的脂滴蛋白DHS-3和MDT-28也能定位到哺乳动物CHO K2细胞的脂滴上 (那等人,2015年)。这表明脂滴常驻蛋白几乎没有物种特异性。

[0004] 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。

[0005] Ding等人(2012年)和陈等人(2014年)通过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)。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白的新用途。

[0007] 本发明提供了MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白在如下(1)-(5)中任一种中的应用:

[0008] (1) 结合或招募DNA;

[0009] (2) 介导或辅助介导脂滴或脂肪体结合或招募DNA;

[0010] (3) 定位于脂滴或脂肪体;

[0011] (4) 提高细菌在逆境胁迫下的生存率;

[0012] (5) 制备脂载核酸药物。

- [0013] 上述应用中，
- [0014] 所述MLDS蛋白截短体为蛋白质MLDS-C或蛋白质MLDS-N；
- [0015] 所述蛋白质MLDS-C为去除MLDS蛋白N端第1-232位氨基酸，且保持其他氨基酸序列不变后得到的蛋白质；
- [0016] 所述蛋白质MLDS-N为去除MLDS蛋白C端第233-276位氨基酸，且保持其他氨基酸序列不变后得到的蛋白质；
- [0017] 所述MLDS蛋白截短体的融合蛋白为蛋白质ADRP-MLDS-C或蛋白质MLDS-N-H1；
- [0018] 所述蛋白质ADRP-MLDS-C为所述蛋白质MLDS-C与ADRP蛋白融合得到的蛋白质；
- [0019] 所述蛋白质MLDS-N-H1为所述蛋白质MLDS-N与组蛋白H1蛋白融合得到的蛋白质。
- [0020] 上述应用中，
- [0021] 所述蛋白质MLDS-C为b1) 或b2) 或b3)：
- [0022] b1) 氨基酸序列是序列4第232-275位所示的蛋白质；
- [0023] b2) 在序列4第232-275位所示的蛋白质的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质；
- [0024] b3) 将序列4第232-275位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/或添加得到的功能相同的蛋白质；
- [0025] 所述蛋白质MLDS-N为c1) 或c2) 或c3)：
- [0026] c1) 氨基酸序列是序列9第232-462位所示的蛋白质；
- [0027] c2) 在序列9第232-462位所示的蛋白质的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质；
- [0028] c3) 将序列9第232-462位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/或添加得到的功能相同的蛋白质；
- [0029] 所述蛋白质ADRP-MLDS-C为d1) 或d2) 或d3)：
- [0030] d1) 氨基酸序列是序列13第232-714位所示的蛋白质；
- [0031] d2) 在序列13第232-714位所示的蛋白质的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质；
- [0032] d3) 将序列13第232-714位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/或添加得到的功能相同的蛋白质；
- [0033] 所述蛋白质MLDS-N-H1为e1) 或e2) 或e3)：
- [0034] e1) 氨基酸序列是序列11第232-657位所示的蛋白质；
- [0035] e2) 在序列11第232-657位所示的蛋白质的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质；
- [0036] e3) 将序列11第232-657位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/或添加得到的功能相同的蛋白质。
- [0037] 上述应用中，
- [0038] 所述融合蛋白质的氨基酸序列为序列4或序列9或序列11或序列13。
- [0039] 上述应用中，
- [0040] 所述提高细菌在逆境胁迫下的生存率体现在提高细菌在逆境胁迫下的菌落数目和/或降低细菌在逆境胁迫下DNA链断裂水平。

[0041] 上述应用中，

[0042] 所述逆境胁迫为低氮和/或紫外线照射。

[0043] 本发明的另一个目的是提供与上述MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白相关的生物材料的新用途。

[0044] 本发明提供了与上述MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白相关的生物材料在如下(1)–(5)中任一种中的应用：

[0045] (1) 结合或招募DNA；

[0046] (2) 介导或辅助介导脂滴或脂肪体结合或招募DNA；

[0047] (3) 定位于脂滴或脂肪体；

[0048] (4) 提高细菌在逆境胁迫下的生存率；

[0049] (5) 制备脂载核酸药物；

[0050] 所述与上述MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白相关的生物材料，为下述A1)至A12)中的任一种：

[0051] A1) 编码上述MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白的核酸分子；

[0052] A2) 含有A1)所述核酸分子的表达盒；

[0053] A3) 含有A1)所述核酸分子的重组载体；

[0054] A4) 含有A2)所述表达盒的重组载体；

[0055] A5) 含有A1)所述核酸分子的重组微生物；

[0056] A6) 含有A2)所述表达盒的重组微生物；

[0057] A7) 含有A3)所述重组载体的重组微生物；

[0058] A8) 含有A4)所述重组载体的重组微生物；

[0059] A9) 含有A1)所述核酸分子的转基因植物细胞系；

[0060] A10) 含有A2)所述表达盒的转基因植物细胞系；

[0061] A11) 含有A3)所述重组载体的转基因植物细胞系；

[0062] A12) 含有A4)所述重组载体的转基因植物细胞系。

[0063] 上述应用中，

[0064] A1)所述核酸分子为如下1)或2)或3)或4)或5)或6)或7)所示的基因：

[0065] 1) 其编码序列是序列1所示的cDNA分子或DNA分子；

[0066] 2) 其编码序列是序列1第694–828位所示的cDNA分子或DNA分子；

[0067] 3) 其编码序列是序列1第1–693位所示的cDNA分子或DNA分子；

[0068] 4) 其编码序列是序列12第1318–1449位所示的cDNA分子或DNA分子；

[0069] 5) 其编码序列是序列10第1–693位所示的cDNA分子或DNA分子；

[0070] 6) 与1)或2)或3)或4)或5)限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性，且编码上述MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白的cDNA分子或基因组DNA分子；

[0071] 7) 在严格条件下与1)或2)或3)或4)或5)限定的核苷酸序列杂交，且编码上述MLDS蛋白或MLDS蛋白截短体或MLDS蛋白截短体的融合蛋白的cDNA分子或基因组DNA分子。

[0072] 上述应用中，所述提高细菌在逆境胁迫下的生存率体现在提高细菌在逆境胁迫下

的菌落数目和/或降低细菌在逆境胁迫下DNA链断裂水平。

[0073] 上述应用中,所述逆境胁迫为低氮和/或紫外线照射。

[0074] 上述应用中,所述MLDS蛋白为a1) 或a2) 或a3) :

[0075] a1) 氨基酸序列是序列2第232-506位所示的蛋白质;

[0076] a2) 在序列2第232-506位所示的蛋白质的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质;

[0077] a3) 将序列2第232-506位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/或添加得到的功能相同的蛋白质。

[0078] 本发明通过对细菌脂滴蛋白质组的序列分析,发现MLDS包含DNA结合基序PAKKA。首先,通过超分辨率显微观察及链式聚合反应(PCR)验证发现基因组DNA能通过MLDS定位在红球菌RHA1的脂滴上;然后,通过凝胶阻滞实验发现,在体外MLDS会通过其C端PAKKA基序结合DNA,并且脂肪体(adiposomes)结合实验证实脂肪体会通过MLDS或其融合蛋白(MLDS的N端及组蛋白H1(MLDS-N-H1)和人的脂滴主要蛋白ADRP和MLDS的C端(ADRP-MLDS-C))结合及招募DNA;最后,通过紫外敏感实验和极端低氮培养发现在红球菌中脂滴通过MLDS与DNA的结合会有利于细菌在极端条件下生存,MLDS的缺失会引起脂滴和DNA的分离,并且增加了细菌对极端环境,包括UV和低氮环境的敏感性。通过实验表明:脂滴通过一种主要脂滴蛋白MLDS结合并保护基因组DNA,从而增加了细菌RHA1在紫外线照射和极端低氮环境下的存活率。通过体内和体外试验表明:脂滴会通过MLDS结合及招募DNA,为研究脂滴与核酸的相互作用提供理论指导及技术支持,也为脂载核酸药物的开发提供建设性的思路。

## 附图说明

[0079] 图1为在细菌RHA1中脂滴通过MLDS结合基因组DNA的超分辨率显微图片,脂滴用LipidTOX Red染色(红色),DNA用SYTO9染色(绿色)。WT,野生型细菌;MLDS KO,MLDS敲除突变株。

[0080] 图2为以野生型和MLDS突变株的脂滴为模板,做48个基因的PCR结果。

[0081] 图3为野生型和MLDS突变株的脂滴上存在基因的比例统计图。

[0082] 图4为全长MLDS与DNA结合的凝胶阻滞分析。

[0083] 图5为MLDS的C端与DNA结合的凝胶阻滞分析。

[0084] 图6为脂肪体结合实验。将体外表达的带有GST标签的MLDS蛋白,MLDS的N端蛋白与脂肪体以及DNA混合,孵育,之后离心,并用银染和PCR分别检测蛋白和DNA。结果表明全长MLDS而非MLDS的N端会将DNA结合到脂肪体。

[0085] 图7为改变样品的孵育顺序进行脂肪体结合实验。无论先将脂肪体与MLDS孵育,再加入DNA(泳道4,8),还是先MLDS与DNA孵育,再加入脂肪体(泳道5,9),MLDS都会将DNA结合到脂肪体上。

[0086] 图8为使用MLDS的融合蛋白(ADRP-MLDS-C和MLDS-N-H1)进行脂肪体结合实验。这两种MLDS的融合蛋白会将DNA招募到脂肪体上(泳道3,5)。其中,ADRP为融合蛋白SMT3-ADRP。

[0087] 图9为在0.5g/L的氮源浓度下四种菌种的生长状况。WT+GFP,对照菌;MLDS KO+GFP,MLDS敲除株;MLDS KO+MLDS-GFP,MLDS敲除后过表达MLDS的细菌;MLDS KO+MLDS-N-



GFP, MLDS敲除后过表达MLDS的N端的细菌。

[0088] 图10为在0.1g/L的氮源浓度下四种菌种的生长状况。

[0089] 图11为野生型及MLDS突变株在0.1g/L的氮源浓度下培养24小时后进行的彗星实验。

[0090] 图12为野生型及MLDS突变株在0.1g/L的氮源浓度下培养不同时间后进行的彗星试验星尾距统计图。

[0091] 图13为三种不同菌株在紫外处理后的存活。

[0092] 图14为三种不同菌株在紫外处理后的存活率统计图。

[0093] 图15为野生型及MLDS突变株紫外处理后的彗星实验。

[0094] 图16为野生型及MLDS突变株紫外处理后的彗星实验星尾距统计图。

### 具体实施方式

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 实施例1、脂滴通过MLDS结合或招募DNA

[0100] 一、在体内脂滴通过MLDS结合或招募DNA

[0101] 1、在体内脂滴通过MLDS结合或招募DNA

[0102] 用SYTO9 (绿色) 和LipidTOX red (红色) 分别对野生型细菌RHA1 (WT) 细胞和MLDS缺失突变体 (MLDS KO) 细胞中的DNA和脂滴进行染色, 分别得到SYTO9和LipidTOX red共同染色的野生型细菌RHA1细胞和SYTO9和LipidTOX red共同染色的MLDS缺失突变体细胞。

[0103] 通过超分辨率的三维结构照明显微镜 (3D-SIM) 对染色后细胞进行观察。三维结构照明显微镜 (3D-SIM) 图片是在DeltaVision OMX V3成像系统 (Applied Precision, GE) 上以100×1.512油物镜 (Olympus UPlanSApo), 固态多模激光器 (488nm, 405nm, 561nm) 和电子倍增CCD (电荷耦合器件) 摄像机 (Evolve 512×512, Photometrics) 获得的。串行Z堆栈切片做了125纳米的间隔。该显微镜定期校准以100纳米的荧光球来计算两个横向和轴向图像分辨率的极限。采集设置如下: 对于LipidTOX red, 561nm激光 (100%的涨幅), 10-30毫秒的曝光; 对于SYTO9, 488nm激光 (100%的涨幅), 10-20毫秒的曝光。SIM图像堆栈用softWoRx 5.0 (Applied Precision) 按照以下设置重建: 像素大小39.5nm; 通道特定光传递功能; 维纳滤波常数0.0020; 去除负强度的背景; 相对于第一角度漂移校正; 定制K0猜测角度对摄像机位置。像素登录校正到小于1个像素。

[0104] 结果如图1所示, 从图中可以看出, 野生型细菌RHA1细胞中的脂滴会与细胞中的基因组DNA相结合, DNA被凝缩在脂滴周围。但和野生型细菌RHA1细胞 (WT) 中的脂滴相比, MLDS

缺失突变体细胞中的脂滴结合的DNA明显减少。上述结果表明：细胞中的基因组DNA通过脂滴蛋白MLDS定位到脂滴上，脂滴蛋白MLDS是一个与脂滴和DNA结合相关的蛋白。

[0105] 2、PCR检测

[0106] (1) 脂滴的分离

[0107] 从野生型细菌RHA1细胞和MLDS缺失突变体细胞中分离脂滴，分离的方法参照文献“Ding等人, Isolating lipid droplets from multiple species, 2013年”中的方法。具体步骤如下：分别收集野生型细菌RHA1细胞和MLDS缺失突变体细胞，并分别在溶液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，取上清液（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），收集在梯度顶部的含有脂滴的白色条带，并用200微升溶液B洗涤三次，分别得到野生型细菌RHA1细胞中的脂滴和MLDS缺失突变体细胞中的脂滴。

[0108] (2) 用脂滴提取过程中使用的溶液B对野生型细菌RHA1细胞中的脂滴和MLDS缺失突变体细胞中的脂滴进行稀释，分别以稀释后的野生型细菌RHA1细胞中的脂滴溶液和MLDS缺失突变体细胞中的脂滴溶液为模板，采用如下表1中的引物（表1中的引物为扩增随机选取的细菌中48个基因的引物）进行PCR扩增，分别得到PCR扩增产物，以检测野生型细菌RHA1细胞中的脂滴和MLDS缺失突变体细胞中的脂滴上结合的细菌中随机选取的48个基因的含量。

[0109] 表1、在分离的脂滴上检测基因使用的引物

引物名称	序列 (5' -3')
<i>RHAI_ro00156-f</i>	GCGAAGCAGGTGGTGTCCGACTCGT
<i>RHAI_ro00156-r</i>	CGAGGTTGCCGATTCTCGCTTCGC
<i>RHAI_ro00318-f</i>	CAAGGCATCGAACGAGGTTTGCG
<i>RHAI_ro00318-r</i>	GAGCAATGAACTCACGTTCCGCTG
<i>RHAI_ro00342-f</i>	AATATGAGCTTGCCGCACCTCG
<i>RHAI_ro00342-r</i>	GATCTTCTCGCCCGCGTCGACGC
<i>RHAI_ro00765-f</i>	CCTGCTCGCCCGCATCGCACAGTCG
<i>RHAI_ro00765-r</i>	GTCCAGTTTGAGCCCGTATTGAGG
<i>RHAI_ro00766-f</i>	ACCGAGCAGATCACCGATGCACCGA
<i>RHAI_ro00766-r</i>	GGGTTGATCGTCAGCGTCGGGTAAG
<i>RHAI_ro00963-f</i>	CGTGTGAAGATGCACTCCGCTTGG
<i>RHAI_ro00963-r</i>	GCTGGTCGGCGCTTCGCCGGG
<i>RHAI_ro01080-f</i>	CCGCTGACTCCCCTGATGTGC
<i>RHAI_ro01080-r</i>	GCTATTGCCCTTGGCGTAGGACTGG
<i>RHAI_ro01081-f</i>	GCCTTGTCTCGGTGATCTACTTG
<i>RHAI_ro01081-r</i>	CACCAGACCCGTAGCACGCGCTTGT
<i>RHAI_ro01082-f</i>	AGCAGTCTGCACAAGTTCAAGG
<i>RHAI_ro01082-r</i>	CTTCTGGCTGTAGAAGCCGTT
<i>RHAI_ro01083-f</i>	AGCAGGGTCGGGAGATCGAGGC
<i>RHAI_ro01083-r</i>	TTTCGAGTTATAGGCCTCGAAC
<i>RHAI_ro01084-f</i>	AGTTCACCGTCCGCCCCGATTCA
<i>RHAI_ro01084-r</i>	CACGCTGTCTTGCCCAGTATCCAT
<i>RHAI_ro01085-f</i>	ACGCCCCCGCACAACTACC
<i>RHAI_ro01085-r</i>	ACGACGCATGAAGGAGGGCAC
[0110] <i>RHAI_ro01086-f</i>	GGCGCCGTCAGTGTCTGTCGTGGTCG
<i>RHAI_ro01086-r</i>	CCGCACCGTCCGCAGGTCCGGGGCTC
<i>RHAI_ro01089-f</i>	ACCTCCGCCGGAGCCCGCACCCGAC
<i>RHAI_ro01089-r</i>	CCTACGAAATCCTCGCTCTCCTG
<i>RHAI_ro01457-f</i>	GTAACCGAGCAGGACCGTGGTTC
<i>RHAI_ro01457-r</i>	GCTTCCCGTCTTCACGGTCCGC
<i>RHAI_ro01921-f</i>	GCGAAGGCCAAGTTCGAGCGGACG
<i>RHAI_ro01921-r</i>	CTTGTGATCTTCGTGACCTTGCC
<i>RHAI_ro02102-f</i>	AAGGAATACCGGATCGACGACCTCGC
<i>RHAI_ro02102-r</i>	ACTTGCTCTGTTGGTGTCTGTGCTC
<i>RHAI_ro02103-f</i>	ATTCAAGTTGACGGCGTCTCT
<i>RHAI_ro02103-r</i>	CCAGCGAGGCCCGCTGCAC
<i>RHAI_ro02105-f</i>	GCAAGCGATGATCGCGACGCAGCC
<i>RHAI_ro02105-r</i>	GTCATCGGCTTCTCCTGTTCAACG
<i>RHAI_ro02107-f</i>	ACGAAGCTGGACAAGGCAGCAAAG
<i>RHAI_ro02107-r</i>	GTCCGCCTCGGCCGAGGCGGG
<i>RHAI_ro06757-f</i>	GCTAATCCTTTCGTCAAGGATGGAAG
<i>RHAI_ro06757-r</i>	CTGCGCGGCCCGGTCTGGCC
<i>RHAI_ro02583-f</i>	CGGGACGTCATCGACGGTCCGCTGC
<i>RHAI_ro02583-r</i>	TGCGTGCCTGCCGGTGGTGTCTG
<i>RHAI_ro02712-f</i>	ACAGCAACGAAAATCTCACCCGA
<i>RHAI_ro02712-r</i>	GTCTGCTACCGCAGGAGCGCATAAG
<i>RHAI_ro03446-f</i>	AATCGCATCACACGGTTAGGTCCG
<i>RHAI_ro03446-r</i>	CCCATGGTCGGGTTCTCCTTTTTTC
<i>RHAI_ro03699-f</i>	TCGGTCGCAAGTGCATCACCGGGG
<i>RHAI_ro03699-r</i>	TGAGCGCGCACCATCTCGGTCCGG
<i>RHAI_ro04321-f</i>	CAGCAAATCGCGCACAATATG

	<i>RHA1_ro04321-r</i>	CCGCGCGCAGCTGCCAGGC
	<i>RHA1_ro04482-f</i>	ACGACCAGCTCTCGATCACGGTCCT
	<i>RHA1_ro04182-r</i>	CTCGGGTCTGCGGCTTCCGTAC
	<i>RHA1_ro04884-f</i>	CCGTCCCGGACGACACCGAGGTGA
	<i>RHA1_ro04884-r</i>	GCCGCCGAGGCGCCGGAACACGAGA
	<i>RHA1_ro05197-f</i>	GCCGGCGGCACCAAGCGACTG
	<i>RHA1_ro05197-r</i>	CTCCGGCTTTTCTTGCCCG
	<i>RHA1_ro05981-f</i>	CCAGTCTGAGCGAGTCCGCTGT
	<i>RHA1_ro05981-r</i>	GAGGTGGCGGTGGTGTGCGATCC
	<i>RHA1_ro06408-f</i>	CGTGCCAGTTTCATTTTCAGTGAGG
	<i>RHA1_ro06408-r</i>	TTCGCGACGTACAAGCGCAGGGT
	<i>RHA1_ro06529-f</i>	GGCGGCGTGACTACCGGAGCTTGA
	<i>RHA1_ro06529-r</i>	GCCGAGCAACCGCTCGCAAGG
	<i>RHA1_ro06765-f</i>	GCACCACAGGCACCGATCGAGACA
	<i>RHA1_ro06765-r</i>	GAATTCGACCGGGCGGCGTCATCC
	<i>RHA1_ro07176-f</i>	ACAGCAGAGGTCAAAGACGAACTCA
	<i>RHA1_ro07176-r</i>	GGCGTCGTCGAGAAGGTCTGCGGTG
	<i>RHA1_ro07210-f</i>	AAGAACGGGGTGCGGCCAACGGAT
	<i>RHA1_ro07210-r</i>	CCGTGGCTGGTTCATCGCCGTCG
	<i>RHA1_ro05869-f</i>	GTTCAGACTACGGGTACCCC
	<i>RHA1_ro05869-r</i>	CTTCGCTTGCGGAGGTGATGC
	<i>RHA1_ro08612-f</i>	GGAAATCAGAAGGGAACGCCTTG
[0111]	<i>RHA1_ro08612-r</i>	TTGGGAGACACTCCCTAGTAGACGC
	<i>RHA1_ro08831-f</i>	AGATTGTATGGTGAATCCTCGGGC
	<i>RHA1_ro08831-r</i>	ACGAGCGTCATCACTGGCGCCGGA
	<i>RHA1_ro08900-f</i>	TCTGGTACGGAGACGGAAACGG
	<i>RHA1_ro08900-r</i>	CGGCACGTTCCGCGCCGAAAGATT
	<i>RHA1_ro00687-f</i>	GCCACGTCGGAGCAGACGA
	<i>RHA1_ro00687-r</i>	GCCCTGGCCCTCCGGCTTCGG
	<i>RHA1_ro00688-f</i>	ACCACGGCAGGTGGACCCAGC
	<i>RHA1_ro00688-r</i>	CCGGTCACCTCGAGTCGATT
	<i>RHA1_ro06501-f</i>	AATAAGGCAGAGCTCATCGATGT
	<i>RHA1_ro06501-r</i>	CTTGCGCGCTTCGCGGA
	<i>RHA1_ro00689-f</i>	ACCTCGAACCTCGACAGTGCAG
	<i>RHA1_ro00689-r</i>	CCGAGCGTAGGACAGGACACGCGCA
	<i>RHA1_ro03674-f</i>	GGCGCCTGCGTCGGGCATTGGACGG
	<i>RHA1_ro03674-r</i>	GACGTCGAGGAAGCGGACGTCCTTG
	<i>RHA1_ro07173-f</i>	CCCATCCTTCGACATATCGCCCG
	<i>RHA1_ro07173-r</i>	CTCGACACCTGTCCGTTGCGAAGC
	<i>RHA1_ro03428-f</i>	GGGAAGTCCGTCGAGTGGCTGTAG
	<i>RHA1_ro03428-r</i>	GCCCCGCGCATGTCGACGAACTTG
	<i>RHA1_ro01922-f</i>	GCACAGGAAGTGCTGACCGACCTGA
	<i>RHA1_ro01922-r</i>	AATCATCGCCAAGGCGACCGGCGAG
	<i>RHA1_ro05484-f</i>	CTCGACATCGAACCAGCGGTGCC
	<i>RHA1_ro05484-r</i>	GGAGTCGCGGAATACCGTGGCCC

[0112] 结果如图2和图3所示,野生型细菌RHA1细胞中的脂滴结合的基因占总的检测的基因的比例为80%(在随机选取的48个基因中,经过PCR检测发现有38个在野生型的脂滴上),而MLDS缺失突变体细胞中的脂滴结合的基因占总的检测的基因的比例为60%(在随机选取的48个基因中,经过PCR检测发现有28个在突变株的脂滴上),说明MLDS的缺失会使脂滴结合的DNA减少,进一步表明MLDS蛋白是一个能将DNA结合到脂滴的蛋白。

[0113] 二、在体外MLDS通过其C端的PAKKA基序结合DNA

[0114] 1、融合蛋白的制备

[0115] (1) 融合蛋白1的制备

[0116] 将序列1所示的mlDs基因插入pGEX-6P-2质粒(GE Healthcare)的BamH1和EcoR1酶切位点间,得到重组载体1,该重组载体1表达在N端带有GST标签的MLDS蛋白的融合蛋白,将其记作融合蛋白1(GST-MLDS),融合蛋白1(GST-MLDS)的氨基酸序列为序列表中序列2。其中,第1-231位为GST标签的氨基酸序列,第232-506位为MLDS蛋白的氨基酸序列(MLDS蛋白的氨基酸序列第2-276)。

[0117] 将上述重组载体1转化到大肠杆菌BL21(DE3)(TIANGEN CB105)中,得到重组菌1。挑取单个菌落培养在37℃,200rpm下,在LB中培养直到OD<sub>600</sub>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(GEHealthcare)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1(GST-MLDS),并通过NanoDrop(Eppendorf)进行定量。

[0118] (2) 融合蛋白2的构建

[0119] 将序列3所示的DNA片段插入pGEX-6P-2质粒(GE Healthcare)的BamH1和EcoR1酶切位点间,得到重组载体2,该重组载体2表达在N端带有GST标签的MLDS蛋白C端截短体的融合蛋白,将其记作融合蛋白2(GST-MLDS-C),融合蛋白2(GST-MLDS-C)的氨基酸序列为序列表中序列4。其中,第1-231位为GST标签的氨基酸序列,第232-275位为MLDS蛋白C端的氨基酸序列(MLDS蛋白的氨基酸序列第233-276位)。

[0120] 将上述重组载体2转化到大肠杆菌BL21(DE3)(TIANGEN CB105)中,得到重组菌2。按照步骤(1)中的方法诱导重组菌2,得到融合蛋白2(GST-MLDS-C),并通过NanoDrop(Eppendorf)进行定量。

[0121] (3) 融合蛋白3的构建

[0122] 将序列5所示的DNA片段插入pGEX-6P-2质粒(GE Healthcare)的BamH1和EcoR1酶切位点间,得到重组载体3,该重组载体3表达在N端带有GST标签的突变的MLDS蛋白C端截短体的融合蛋白,将其记作融合蛋白3(GST-MLDS-C'),融合蛋白3(GST-MLDS-C')的氨基酸序列为序列表中序列6。其中,第1-231位为GST标签的氨基酸序列,第232-275位为C端突变的MLDS蛋白C端的氨基酸序列。(突变的MLDS蛋白C端的氨基酸序列为将MLDS蛋白氨基酸序列的第232-275位中的第233,238,244,245,250,261,262,268,269,274,275位的赖氨酸均突变为谷氨酸后得到的氨基酸序列)

[0123] 将上述重组载体3转化到大肠杆菌BL21(DE3)(TIANGEN CB105)中,得到重组菌3。按照步骤(1)中的方法诱导重组菌3,得到融合蛋白3(GST-MLDS-C'),并通过NanoDrop(Eppendorf)进行定量。

[0124] 2、用电泳迁移率变动分析(EMSA)来验证MLDS与DNA的结合

[0125] (1) DNA的扩增

[0126] 以野生型细菌RHA1的基因组DNA为模板,采用引物ACGGCGGGGGCGTCACTCC和GTTCTCGACGTTGCTGTTTCGGC进行PCR扩增,得到大小为2.5kb的PCR产物,其为序列7所示的DNA分子。

[0127] (2) 融合蛋白与DNA的结合

[0128] 将融合蛋白1 (GST-MLDS)、0.4pmol步骤(1)得到的DNA分子与结合溶液(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 4% (体积/体积) 甘油, 1mM DTT, 5mM MgCl<sub>2</sub>) 混匀, 得到反应体系。其中, 融合蛋白1与DNA分子的摩尔比分别为0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350, 400。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0.5%的琼脂糖凝胶在0.5×TBE溶液中以30V恒压电泳13-15小时。DNA用溴化乙锭染色, 并用凝胶成像仪拍摄。

[0129] 将融合蛋白2 (GST-MLDS-C)、0.4pmol步骤(1)得到的DNA分子与结合溶液(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 4% (体积/体积) 甘油, 1mM DTT, 5mM MgCl<sub>2</sub>) 混匀, 得到反应体系。其中, 融合蛋白2与DNA分子的摩尔比分别为0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 240, 280, 320, 360, 400, 450, 500。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0.5%的琼脂糖凝胶在0.5×TBE溶液中以30V恒压电泳13-15小时。DNA用溴化乙锭染色, 并用凝胶成像仪拍摄。

[0130] 将融合蛋白3 (GST-MLDS-C')、0.4pmol步骤(1)得到的DNA分子与结合溶液(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 4% (体积/体积) 甘油, 1mM DTT, 5mM MgCl<sub>2</sub>) 混匀, 得到反应体系。其中, 融合蛋白3与DNA分子的摩尔比分别为100, 200, 400, 500。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0.5%的琼脂糖凝胶在0.5×TBE溶液中以30V恒压电泳13-15小时。DNA用溴化乙锭染色, 并用凝胶成像仪拍摄。

[0131] 融合蛋白1 (GST-MLDS) 与DNA的结合结果如图4所示。从图中可以看出: 结合到2.5kb的DNA分子的GST-MLDS蛋白分子数量为220个时达到饱和。说明一个GST-MLDS蛋白分子能够非序列特异性地结合12bp的DNA分子。

[0132] 融合蛋白2 (GST-MLDS-C) 与DNA的结合结果如图5所示。从图中可以看出: 结合到2.5kb的DNA分子的GST-MLDS-C蛋白分子数量为360个时达到饱和。由于MLDS的C末端含有带正电荷的赖氨酸, 因此具有DNA结合能力。MLDS能够通过其C-末端PAKKA基序结合DNA。

[0133] 融合蛋白3 (GST-MLDS-C') 与DNA的结合结果如图5所示。从图中可以看出: MLDS的C末端突变后, 所有的赖氨酸被带负电荷谷氨酸所取代, 在EMSA实验中无凝胶移位被检测到, 表明GST-MLDS-C'完全失去了DNA结合能力。

[0134] 上述结果证明MLDS能够通过其C-末端PAKKA基序结合DNA。

[0135] 三、在体外脂肪体通过MLDS的C端PAKKA基序结合或招募DNA

[0136] 脂滴是细胞内的一种细胞器, 其结构为甘油三酯核心, 单层磷脂膜和外周蛋白包被; 脂肪体adiposomes是有着三酰甘油的核心和单层磷脂膜的球体结构(用来模拟细胞内的脂滴)。可以在体外用一个纯净的不受其他因素干扰的系统(脂肪体)来模拟细胞内的脂滴进行实验来验证脂滴通过MLDS结合DNA的功能。

[0137] 1、融合蛋白的制备

[0138] (1) 融合蛋白4的制备

[0139] 将序列8所示的DNA片段插入pGEX-6P-2质粒(GE Healthcare)的BamH1和EcoR1酶

切位点间,得到重组载体4,该重组载体4表达在N端带有GST标签的MLDS蛋白N端截短体的融合蛋白,将其记作融合蛋白4 (GST-MLDS-N),融合蛋白4 (GST-MLDS-N)的氨基酸序列为序列表中序列9,其中第1-231位为GST标签的氨基酸序列,第232-462位为MLDS的N端截短体的氨基酸序列 (MLDS的N端截短体的氨基酸序列为MLDS蛋白的氨基酸序列第2-232位)。

[0140] 将上述重组载体4转化到大肠杆菌BL21 (DE3) (TIANGEN CB105)中,得到重组菌4。按照步骤二的1的(1)中的方法诱导重组菌4,得到融合蛋白4 (GST-MLDS-N),并通过NanoDrop (Eppendorf)进行定量。

[0141] (2) 融合蛋白5的构建

[0142] 将序列10所示的DNA片段插入pGEX-6P-2质粒 (GE Healthcare)的BamH1和Xho1酶切位点间,得到重组载体5,该重组载体5表达在N端带有GST标签的MLDS蛋白N端截短体和组蛋白H1的融合蛋白,将其记作融合蛋白5 (GST-MLDS-N-H1),融合蛋白5 (GST-MLDS-N-H1)的氨基酸序列为序列表中序列11。其中,第1-231位为GST标签的氨基酸序列,第232-462位为MLDS蛋白N端的氨基酸序列 (MLDS蛋白的氨基酸序列的第2-232位),第465-657位为组蛋白H1的氨基酸序列 (组蛋白H1的氨基酸序列的第1-193位)。

[0143] 将上述重组载体5转化到大肠杆菌BL21 (DE3) (TIANGEN CB105)中,得到重组菌5。按照步骤二的1的(1)中的方法诱导重组菌5,得到融合蛋白5 (GST-MLDS-N-H1),并通过NanoDrop (Eppendorf)进行定量。

[0144] (3) 融合蛋白6的构建

[0145] 将序列12所示的DNA片段插入pGEX-6P-2质粒 (GE Healthcare)的Xho1和EcoR1酶切位点间,得到重组载体6,该重组载体6表达在N端带有GST标签的ADRP蛋白和MLDS蛋白C端截短体的融合蛋白,将其记作融合蛋白6 (GST-ADRP-MLDS-C),融合蛋白6 (GST-ADRP-MLDS-C)的氨基酸序列为序列表中序列13,其中第1-231位为GST标签的氨基酸序列,第232-667位为ADRP蛋白的氨基酸序列,第671-714位为MLDS蛋白C端截短体的氨基酸序列 (MLDS蛋白C端截短体的氨基酸序列为MLDS蛋白的氨基酸序列的第233-276位)。

[0146] 将上述重组载体6转化到大肠杆菌BL21 (DE3) (TIANGEN CB105)中,得到重组菌6。按照步骤二的1的(1)中的方法诱导重组菌6,得到融合蛋白6 (GST-ADRP-MLDS-C),并通过NanoDrop (Eppendorf)进行定量。

[0147] (4) 融合蛋白7的构建

[0148] 该融合蛋白的构建及纯化的具体操作见文献“汪等人,2016,Construction of Nano-Droplet/Adiposome and Artificial Lipid Droplets.”这里简述如下:

[0149] 将序列12第232-667所示的DNA片段插入pET28a-SMT3质粒 (一种改造的质粒,见文献Hu, W., Wu, H., Zhang, H., Gong, W. & Perrett, S. Resonance assignments for the substrate binding domain of Hsp70 chaperone Ssa1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomol NMR Assign* 9, 329-332, doi:10.1007/s12104-015-9603-5 (2015)。)的Xho1和EcoR1酶切位点间,得到重组载体7,该重组载体7表达N端带有6×His SMT标签的ADRP蛋白,将其记作融合蛋白7 (SMT3-ADRP),融合蛋白7 (SMT3-ADRP)中的ADRP蛋白的氨基酸序列为序列表中序列13的第232-667位。

[0150] 将上述重组载体7转化到大肠杆菌BL21 (DE3) (TIANGEN CB105)中,得到重组菌7。挑取单个菌落培养在37℃,200rpm下,在LB中培养直到OD<sub>600</sub>为0.6,然后加入终浓度为0.4mM

的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 16℃诱导24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) 重悬。细菌被破碎,在18000rpm下离心45分钟。收集上清液。将上清液加入到镍离子金属亲和层析柱 (填料为螯合有镍离子的Chelating Sepharose Fast Flow, 柱体购自Thermo, 产品目录号为29924, 柱体积4mL, 内径1.2cm), 然后先用含20mM咪唑的缓冲液T洗脱12个柱体积以去除非目的蛋白一次,再用含500mM咪唑的缓冲液T洗脱3个柱体积以收集目的蛋白,然后用离心超滤管 (Amicon公司产品) 进行缓冲液交换去除咪唑,通过尺寸排阻色谱法 (Size Exclusive Chromatography, SEC) 再次纯化 (HiLoad 16/600 Superdex 200柱, GE公司产品), 洗脱流速为0.8mL/min。最后得到ADRP蛋白组分,并通过NanoDrop (Eppendorf) 进行定量。

[0151] 2、脂肪体结合实验 (adiposome binding assay) 验证MLDS将DNA招募到脂肪体上

[0152] (1) 脂肪体的制备

[0153] 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5μL大鼠的甘油三酯以及100μL溶液B (20mM HEPES、100mM KCl、2mM MgCl<sub>2</sub>, 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。

[0154] (2) 用MLDS及其N端截短体 (MLDS-N) 进行脂肪体结合实验

[0155] 将步骤(1)制备的脂肪体 (50μl), 步骤二的2中的(1)得到的DNA分子 (340ng) 和融合蛋白1 (GST-MLDS) (7μg) 混合, 得到反应体系X, 室温孵育30分钟, 然后将反应体系X在15,000rpm条件下离心5分钟, 收集上层部分 (脂肪体或脂滴密度小, 离心后会飘在上层), 得到脂肪体组分X; 收集下层溶液, 得到溶液组分X。

[0156] 将步骤(1)制备的脂肪体 (50μl), 步骤二的2中的(1)得到的DNA分子 (340ng) 和融合蛋白4 (GST-MLDS-N) 混合 (7μg), 得到反应体系Y, 室温孵育30分钟, 然后将反应体系Y在15,000rpm条件下离心5分钟, 收集上层部分, 得到脂肪体组分Y; 收集下层溶液, 得到溶液组分Y。

[0157] 将脂肪体组分X和脂肪体组分Y分别用溶液B洗3次, 然后将样品用溶液B调成等体积 (50μl)。脂肪体组分X、脂肪体组分Y、溶液组分X和溶液组分Y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℃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。

[0158] 结果如图6所示, DNA和MLDS都能被招募到脂肪体组分中 (图6, 6泳道), 而MLDS蛋白N端截短体 (GST-MLDS-N) 能定位于脂肪体, 但不能招募DNA (图6, 4泳道)。

[0159] 说明: MLDS能通过其C端将DNA招募到脂肪体上。

[0160] (3) 脂肪体结合实验研究结合顺序

[0161] 为了研究是脂滴先与MLDS结合, 之后招募DNA, 或是MLDS和DNA先在胞质中形成复合物, 然后复合物移动到脂滴上, 还是两者兼而有之, 进行了如下实验:

[0162] 1) 先将脂肪体 (50μl) 和融合蛋白1 (GST-MLDS) (7μg) 混合, 室温孵育30分钟, 得到反应体系M, 然后将反应体系M在15,000rpm条件下离心5分钟, 收集上层部分, 得到脂肪体组分M; 用溶液B洗脂肪体M 2次, 然后与步骤二的2中的(1)得到的DNA分子 (340ng) 孵育30分钟, 得到反应体系M', 然后将反应体系M' 在15,000rpm条件下离心5分钟, 收集上层部分, 得



到脂肪体组分M'；收集下层溶液，得到溶液组分M'。

[0163] 2) 先将步骤二的2中的(1)得到的DNA分子(340ng)和融合蛋白1(GST-MLDS)(7μg)混合，室温孵育30分钟，得到反应体系N，然后向反应体系N中加入脂肪体(50μl)，再在室温孵育30分钟，得到反应体系N'，再将反应体系N'在15,000rpm条件下离心5分钟，收集上层部分，得到脂肪体组分N'；收集下层溶液，得到溶液组分N'。

[0164] 将脂肪体组分M'和脂肪体组分N'分别用溶液B洗3次，之后将样品用溶液B调成等体积(50μl)。脂肪体组分M'、脂肪体组分N'、溶液组分M'和溶液组分N'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℃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。

[0165] 结果如图7所示，在这两种条件下DNA分子都能在脂肪体组分中被检测到，但不能在溶液组分中被检测到(图7，泳道4和5,8和9)，表明MLDS可以通过这两种方式招募DNA到脂肪体上。也说明了在脂肪体或脂滴上的MLDS相比于溶液中的MLDS对DNA有更强的亲和力。

[0166] (4) 脂肪体结合实验研究脂滴定位区域和结合区域

[0167] 用融合蛋白5(GST-MLDS-N-H1)和融合蛋白6(GST-ADRP-MLDS-C)进行脂肪体结合实验，研究脂滴定位区域和结合区域。具体步骤如下：

[0168] 将步骤(1)制备的脂肪体(50μl)，步骤二的2中的(1)得到的DNA分子(280ng)和融合蛋白5(GST-MLDS-N-H1)(3μg)混合，得到反应体系P，室温孵育30分钟，然后将反应体系P在15,000rpm条件下离心5分钟，得到脂肪体组分P和溶液组分P。

[0169] 将步骤(1)制备的脂肪体(50μl)，步骤二的2中的(1)得到的DNA分子(280ng)和融合蛋白6(GST-ADRP-MLDS-C)(3μg)混合，得到反应体系Q，室温孵育30分钟，然后将反应体系Q在15,000rpm条件下离心5分钟，得到脂肪体组分Q和溶液组分Q。

[0170] 将步骤(1)制备的脂肪体(50μl)，步骤二的2中的(1)得到的DNA分子(280ng)和融合蛋白4(GST-MLDS-N)(3μg)混合，得到反应体系S，室温孵育30分钟，然后将反应体系S在15,000rpm条件下离心5分钟，得到脂肪体组分S和溶液组分S。

[0171] 将步骤(1)制备的脂肪体(50μl)，步骤二的2中的(1)得到的DNA分子(280ng)和融合蛋白7(SMT3-ADRP)(3μg)混合，得到反应体系T，室温孵育30分钟，然后将反应体系T在15,000rpm条件下离心5分钟，得到脂肪体组分T和溶液组分T。

[0172] 将脂肪体组分P、脂肪体组分Q、脂肪体组分S和脂肪体组分T分别用溶液B洗3次，然后将样品用溶液B调成等体积(50μl)。脂肪体组分P,Q,S,T与溶液组分P,Q,S,T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℃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。

[0173] 结果如图8所示，融合蛋白5(GST-MLDS-N-H1)和融合蛋白6(GST-ADRP-MLDS-C)均可结合DNA分子到脂肪体上。融合蛋白5是由MLDS-N与组蛋白H1重组而成的，组蛋白H1是自己不能定位在脂滴上的DNA结合蛋白，需要与脂滴相关蛋白相互作用才能定位。组蛋白H1与MLDS-N重组后能在脂肪体上且招募DNA(图8，泳道3)，说明MLDS的N端能起到脂滴定位作用。融合蛋白6是由ADRP与MLDS-C重组而成的，ADRP是真核细胞脂滴的主要蛋白，但不能结合DNA。与MLDS-C重组后能将DNA定位在脂肪体上(图8，泳道5)，再次说明MLDS-C具有结合DNA的能力。这个实验也说明可以通过构建不同融合蛋白的方式设计出更合适的能将DNA招募到脂肪体上的融合蛋白。

[0174] 实施例2、脂滴通过MLDS结合DNA在提高细菌在极端条件下生存率中的应用

[0175] 一、细菌RHA1在低氮条件下的生长曲线及中性细菌彗星实验

[0176] 1、将pJAM2-gfp质粒转入细菌菌株*Rhodococcus jostii* RHA1 (RHA1) 细胞,得到过表达pJAM2-gfp质粒的RHA1 (WT+GFP); pJAM2-gfp质粒为将gfp基因插入pJAM2载体的Xba1酶切位点间,且保持其他序列不变得到的载体。

[0177] 将pJAM2-gfp质粒转入MLDS缺失突变的RHA1细胞,得到过表达pJAM2-gfp质粒的MLDS缺失突变体 (MLDS KO+GFP);

[0178] 将pJAM2-mls-gfp质粒转入MLDS缺失突变的RHA1细胞,得到过表达pJAM2-mls-gfp质粒的MLDS缺失突变体 (MLDS KO+MLDS-GFP); pJAM2-mls-gfp质粒为将序列1所示的MLDS基因插入pJAM2-gfp质粒的BamH1酶切位点间,且保持其他序列不变得到的载体。

[0179] 将pJAM2-mls-n-gfp质粒转入MLDS缺失突变的RHA1细胞,得到过表达pJAM2-mls-n-gfp质粒的MLDS缺失突变体 (MLDS KO+MLDS-N-GFP); pJAM2-mls-n-gfp质粒为将序列8所示的DNA片段插入pJAM2-gfp质粒的BamH1酶切位点间,且保持其他序列不变得到的载体。

[0180] 2、分别将过表达pJAM2-gfp质粒的RHA1 (WT+GFP)、过表达pJAM2-gfp质粒的MLDS缺失突变体 (MLDS KO+GFP)、过表达pJAM2-mls-gfp质粒的MLDS缺失突变体 (MLDS KO+MLDS-GFP) 和过表达pJAM2-mls-n-gfp质粒的MLDS缺失突变体 (MLDS KO+MLDS-N-GFP) 这四种不同的细胞分别在10mL低氮培养基和10mL极端低氮培养基中培养,检测和统计各个细胞中的OD<sub>600</sub>吸光度,并绘制生长曲线。

[0181] 上述低氮培养基为MSM培养基(见文献“丁等人,2012. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.”), MSM培养基中包含溶质NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>Cl在MSM培养基中的浓度为0.5g/L。

[0182] 上述极端低氮培养基为将MSM培养基中NH<sub>4</sub>Cl的浓度替换为0.1g/L,且保持MSM培养基中其他组分及浓度不变后得到的培养基。

[0183] 结果如图9和图10所示。图9为在低氮培养基中的生长曲线;图10为极端低氮培养基中的生长曲线。从图中可以看出,在低氮条件下,和 (MLDS KO+GFP) 相比, (WT+GFP) 的细胞密度下降缓慢,但 (MLDS KO+MLDS-GFP) 可以将细胞密度补偿到 (WT+GFP) 水平,但 (MLDS KO+MLDS-N-GFP) 却不能;在极端低氮条件下,无论是细胞的存活率还是生长速率, (WT+GFP) 的细胞都明显高于 (MLDS KO+GFP) 细胞,并且 (MLDS KO+MLDS-GFP) 能够部分补偿,但 (MLDS KO+MLDS-N-GFP) 却不能。实验结果表明为保护RHA1细胞在低氮环境下生存MLDS的DNA结合区是必要的,进而说明MLDS将基因组DNA招募到脂滴上有利于细胞在极端低氮条件下生存。

[0184] 3、将过表达pJAM2-gfp质粒的RHA1 (WT+GFP)、过表达pJAM2-gfp质粒的MLDS缺失突变体 (MLDS KO+GFP) 的细胞在极端低氮培养基中培养,每隔24小时取出细菌进行中性细菌彗星实验,中性细菌彗星实验具体步骤参照文献“Solanky和Haydel, Adaptation of the neutral bacterial comet assay to assess antimicrobial-mediated DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*., 2012”中的方法。

[0185] 结果如图11和图12所示。从图中可以看出:相比于 (WT+GFP), (MLDS KO+GFP) 中有更多的DNA链断裂,而且培养在极端缺乏氮源24小时时这种差异最大。说明了MLDS能够稳定基因组DNA从而有利于细菌在极端条件下生存。

[0186] 二、细菌RHA1在紫外处理后的生存率及中性细菌彗星实验

[0187] 1、细菌RHA1在紫外处理后的生存率

[0188] 分别将过表达pJAM2-gfp质粒的RHA1 (WT+GFP)、过表达pJAM2-gfp质粒的MLDS缺失突变体 (MLDS KO+GFP)、过表达pJAM2-mls-n-gfp质粒的MLDS缺失突变体 (MLDS KO+MLDS-N-GFP) 的细胞进行紫外照射处理,处理剂量分别为0,10,20,30和40J/m<sup>2</sup>,并通过统计存活的克隆数来检测三种不同菌株的紫外敏感性。

[0189] 结果如图13和图14所示。从图中可以看出:紫外照射处理后,(WT+GFP)比(MLDS KO+GFP)具有更多的克隆数,并且(MLDS KO+GFP)的存活率与(MLDS KO+MLDS-N-GFP)无显著性差异,表明脂滴通过MLDS蛋白与DNA的结合能提高细菌在极端条件下的生存率,保护细胞免受紫外的伤害。

[0190] 2、中性细菌彗星实验

[0191] 分别将过表达pJAM2-gfp质粒的RHA1 (WT+GFP)、过表达pJAM2-gfp质粒的MLDS缺失突变体 (MLDS KO+GFP) 的细胞用紫外照射处理 (30J/m<sup>2</sup>),处理后继续在LB平板上培养0.5小时,之后取出进行中性细菌彗星实验,具体步骤参照文献“Solanky和Haydel,Adaptation of the neutral bacterial comet assay to assess antimicrobial-mediated DNAdouble-strand breaks in Escherichia coli.,2012”中的方法。

[0192] 结果如图15和16所示。从图中可以看出:(MLDS KO+GFP)中星尾距明显高于(WT+GFP),(MLDS KO+GFP)中有更多的DNA链断裂。进一步说明了MLDS能够稳定基因组DNA,降低细菌在极端条件下DNA链断裂水平,有利于细菌在极端条件下生存。

[0193] 综上所述,MLDS介导的脂滴结合基因组DNA可以稳定基因组并保护细菌在极端环境下生存。

## 序列表

&lt;110&gt;中国科学院生物物理研究所

&lt;120&gt;MLDS蛋白在促进脂滴或脂肪体结合DNA中的应用

&lt;160&gt;13

&lt;210&gt;1

&lt;211&gt;828bp

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt;1

```

atgactgacc agaagacat cgacagcgtc aagacctcgc tgtacgcggc cgtagggccc 60
ggagacgtcg tcgtgcagge cgtggccgac gtcgtcgcgc aggtccgcgc gcgcgcgcgag 120
tccaccaggg gtgacgtcga agagcgtgtc ggcggcgcca aggagcgcgc cgcgcggactc 180
caggaagagg tcaccgaggg tctcgagaac ctctcgcgac gcctcgcggg actgcccgtcc 240
gagctgcccc aggagcttgc cgagctgcgt gagaagtcca ccgccgacga gctgcgcaag 300
gttgccgagg cctacctgaa ggtcgcctcc gacctgtaca cgtcgcctgc cgagcgcgggc 360
gaggacaccg tcgagcgcgc ccgcaagcag ccggtcgtcg aggagggcat cggccgcgccc 420
gagaccgcct tcggtgacgc cgtcgcgctg accgaggaag ctctcggcac cgttgacgcgc 480
cagacgcgcg ccgtcggcga gcagcccgca aagctcgcgg gccgcgcttc gggtcgcatc 540
tccgacaccg ccgagggact cggcgaggcc atcgcgcgac ccggcgacga ggctgcccctg 600
aaggttctcg acctgggcca ccaggccgag gaagcgtcga aggacgctgc cgatcgcgctc 660
accgccaccg cggccgacgt ccaggtcgc gccacaagg ctgccccggc caagcacgcc 720
gctcccgcga agaaggctgc tccggccaag gctcggcga ccccgcccc ggccccggcc 780
aagaaggccg ccgtcggc caagaaggct gctcggcca agaaggct 828

```

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;506

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt;2

```

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 Thr Asp Gln Lys Thr Ile Asp Ser Val  
 225 230 235 240  
 Lys Thr Ser Leu Tyr Ala Ala Val Gly Ala Gly Asp Val Val Val Gln  
 245 250 255  
 Ala Val Ala Asp Val Val Ala Gln Val Arg Ser Arg Ala Glu Ser Thr  
 260 265 270  
 Gln Gly Asp Val Glu Glu Arg Val Gly Gly Ala Lys Glu Arg Ile Ala  
 275 280 285  
 Gly Leu Gln Glu Glu Val Thr Glu Gly Val Glu Asn Leu Arg Asp Arg  
 290 295 300  
 Leu Ala Gly Leu Pro Ser Glu Leu Pro Glu Glu Leu Ala Glu Leu Arg  
 305 310 315 320  
 Glu Lys Phe Thr Ala Asp Glu Leu Arg Lys Val Ala Glu Ala Tyr Leu  
 325 330 335  
 Lys Val Ala Ser Asp Leu Tyr Thr Ser Leu Ala Glu Arg Gly Glu Asp  
 340 345 350  
 Thr Val Glu Arg Ile Arg Lys Gln Pro Val Val Glu Glu Gly Ile Gly

355	360	365
Arg Ala Glu Thr Ala Phe Gly Asp Ala Val Glu Leu Thr Glu Glu Ala		
370	375	380
Leu Gly Thr Val Ala Arg Gln Thr Arg Ala Val Gly Glu Gln Ala Ala		
385	390	395
Lys Leu Ala Gly Arg Ala Ser Gly Arg Ile Ser Asp Thr Ala Glu Gly		
	405	410
Leu Gly Glu Ala Ile Ala Asp Ala Gly Asp Glu Ala Ala Leu Lys Val		
	420	425
Leu Asp Leu Gly Asp Gln Ala Glu Glu Ala Ser Lys Asp Ala Ala Asp		
	435	440
Arg Val Thr Ala Thr Ala Ala Asp Val Gln Ala Arg Ala Asp Lys Ala		
	450	455
Ala Pro Ala Lys His Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys		
	465	470
Ala Ala Ala Thr Pro Ala Pro Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Pro		
	485	490
Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala		
	500	505

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;135bp

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt;3

gacaaggctg ccccgccaa gcacgccgct cccgcgaaga aggctgctcc ggccaaggct 60  
 gcggcaaccc cggccccgc cccggccaag aaggccgccg ctccggccaa gaaggctgct 120  
 cccggccaaga aggct 135

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;275

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt;4

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 Lys Ala Ala Pro Ala Lys His Ala Ala				
225		230		235	240
Pro	Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Thr Pro Ala Pro				
		245		250	255
Ala	Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala				
	260		265		270
Lys	Lys Ala				
	275				

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;132bp

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt;5

gaggctgccc cggccgagca cgccgctccc gcggaggagg ctgctccggc cgaggctgcg 60  
 gcaacccccg cccccgcccc ggccgaggag gccgcccgtc cgcccgagga ggctgctccg 120  
 gccgaggagg ct 132

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt;275

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt;6

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





tgacggccct gttccggcat ccgctgggggt tgccgatccc gcacaccgcg atcatcaage 1500  
 gcaagaagga ccagctgggg gcgagcctcg gcaacttcgt cggccagaac ttctctgccc 1560  
 ccgaggtggt gtccgccaag gtcgaggccg cggagatccc gctgcggctg ggcaggtgga 1620  
 tggcgcagcc caagcacgcc gcgcgctcg ctgccgagac ggccaccatc ctgcgcggct 1680  
 tcgtcgagat cctgcgcgac gaggacgtgc agcagatcat cgacagcacg ctggtgcgca 1740  
 ggctggccga gccccagtgg gggccgccga tcgggcgctg gctcggcgaa ctctgcgcg 1800  
 agaaccggca gctgccgac ctggatctgc tcgccgagcg ggcgaccag tgggcgctcg 1860  
 ggagtcagga gaccatcgac cggatcgtea gccgcgattc gcccgcctgg tcgccaagt 1920  
 tcgtcgacgc catgctcggc gagaagatec accgcgagct cgtcgaattc acctggaagg 1980  
 tgcgatccaa cccggagcac gaggtgcggc aggcggccaa ccgcttctc gtcgacttcg 2040  
 ccgacgacct gcagaacgac cccgcgacca tggagaaggc cgagaagatc aaggccgaga 2100  
 tcatggggcg cgaggagtg accggtctcg ccgcggcgac gtggaccgtc gccaaagcgc 2160  
 tgatcatgga atccgtcgac gaccgcaaca gcacgctcg cacgaaggtc gcggagaacg 2220  
 tcgtgcgctt cggcgagcgg ctgcgcgacg accacgagct gagagtcaag gtcgacgggt 2280  
 ggggtctcgc cggcacgcgc tacgtcgtgg tccattacac cgacgagatc accgcgatca 2340  
 tctccgacac cgtcgagcgc tgggacgcc aggaggcgtc caagaagatc gagctgcagg 2400  
 tgggacggga cctccagttc atccgatca acggcaccgt cgtcgggtcg atcgcgggtc 2460  
 tgctgatcta cacgttctcg acgttctgt tcggc 2495

<210>8

<211>693bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>8

actgaccaga agaccatcga cagcgtcaag acctcgctgt acgcggccgt aggcgccgga 60  
 gacgtcgtcg tgcaggccgt ggccgacgtc gtcgccagg tccgctcgcg cgccgagtc 120  
 acccaggggtg acgtcgaaga gcgtgtcggc ggcgccaagg agcgcacgcg cggactccag 180  
 gaagaggtea ccgaggggtg cgagaacctt cgcgaccgcc tcgccggact gccgtccgag 240  
 ctgcccagag agcttgccga gctgcgtgag aagtaccg ccgacgagct gcgcaagggt 300  
 gccgaggcct acctgaaggt cgctccgac ctgtacacgt cgctcgccga gcgcggcgag 360  
 gacaccgtcg agcgcacccg caagcagccg gtcgtcgagg agggcatcgg ccgcgccgag 420  
 accgccttcg gtgacgccgt cgagctgacc gaggaagctc tcggcaccgt tgcacgccag 480  
 acgcgcgccg tcggcgagca ggccgcaaag ctgcggggcc gccttcggg tcgcatctcc 540  
 gacaccgccg agggactcgg cgaggccatc gccgacgccg gcgacgagge tgccctgaag 600  
 gttctcgacc tgggcgacca ggccgaggaa gcgtcgaagg acgctgccga tcgcgtcacc 660  
 gccaccgcgg ccgacgtcca ggctcgcgcc gac 693

<210>9

<211>462



Gln Gly Asp Val Glu Glu Arg Val Gly Gly Ala Lys Glu Arg Ile Ala  
 275 280 285

Gly Leu Gln Glu Glu Val Thr Glu Gly Val Glu Asn Leu Arg Asp Arg  
 290 295 300

Leu Ala Gly Leu Pro Ser Glu Leu Pro Glu Glu Leu Ala Glu Leu Arg  
 305 310 315 320

Glu Lys Phe Thr Ala Asp Glu Leu Arg Lys Val Ala Glu Ala Tyr Leu  
 325 330 335

Lys Val Ala Ser Asp Leu Tyr Thr Ser Leu Ala Glu Arg Gly Glu Asp  
 340 345 350

Thr Val Glu Arg Ile Arg Lys Gln Pro Val Val Glu Glu Gly Ile Gly  
 355 360 365

Arg Ala Glu Thr Ala Phe Gly Asp Ala Val Glu Leu Thr Glu Glu Ala  
 370 375 380

Leu Gly Thr Val Ala Arg Gln Thr Arg Ala Val Gly Glu Gln Ala Ala  
 385 390 395 400

Lys Leu Ala Gly Arg Ala Ser Gly Arg Ile Ser Asp Thr Ala Glu Gly  
 405 410 415

Leu Gly Glu Ala Ile Ala Asp Ala Gly Asp Glu Ala Ala Leu Lys Val  
 420 425 430

Leu Asp Leu Gly Asp Gln Ala Glu Glu Ala Ser Lys Asp Ala Ala Asp  
 435 440 445

Arg Val Thr Ala Thr Ala Ala Asp Val Gln Ala Arg Ala Asp  
 450 455 460

<210>10

<211>1278bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>10

actgaccaga agaccatcga cagcgtcaag acctcgtgt acgcggccgt aggcgccgga 60  
 gacgtcgtcg tgcaggccgt ggccgacgtc gtcgccagg tccgctcgcg cgccgagtec 120  
 acccaggggtg acgtcgaaga gegtgtcggc ggcgccaagg agcgcategc cggactccag 180  
 gaagaggtea ccgaggggtgt cgagaacctt cgcgaccgcc tcgccggact gccgtccgag 240  
 ctgcccgagg agettgccga gctgcgtgag aagtaccg ccgacgagct gcgcaaggtt 300  
 gccgaggcct acctgaaggt cgctccgac ctgtacacgt cgctcggcga gcgcggcgag 360  
 gacaccgtcg agcgcacccg caagcagccg gtcgtcgagg agggcatcgg ccgcgccgag 420  
 accgccttcg gtgacgccgt cgagctgacc gaggaagctc tcggcaccgt tgcacgccag 480

acgcgcgccg tcggcgagca ggccgcaaag ctcgcgggcc gcgcttcggg tcgcatctcc 540  
 gacaccgccg agggactcgg cgaggccatc gccgacgccg gcgacgagge tgccctgaag 600  
 gttctcgacc tgggcgacca ggccgaggaa gcgtcgaagg acgctgccga tcgctcacc 660  
 gccaccgccg ccgacgtcca ggctcgcgcc gacaagctta ccgagaattc cacgtccgcc 720  
 cctgcggcca agcccaagcg ggccaaggcc tccaagaagt ccacagacca cccaagtat 780  
 tcagacatga tcgtgggtgc catccaggcc gagaagaacc gcgctggctc ctcgcgccag 840  
 tccattcaga agtatatcaa gagccactac aaggtgggtg agaacgctga ctcgcagatc 900  
 aagttgtcca tcaagcgect ggtcaccacc ggtgtcctca agcagaccaa aggggtgggg 960  
 gcctcgggggt cttccggct agccaagagc gacgaacca agaagtcagt ggccttcaag 1020  
 aagaccaaga aggaaatcaa gaaggtagec acgccaaga aggcattcaa gccaagaag 1080  
 gctgcctcca aagcccaac caagaaacc aaagccacc cggtaagaa ggccaagaag 1140  
 aagctggctg ccacgcecaa gaaagccaaa aaaccaaga ctgtcaaagc caagccggtc 1200  
 aagcatcca agccccaaaa ggccaaacca gtgaaacca aagcaaagtc cagtgccaa 1260  
 agggccggca agaagaag 1278

<210>11

<211>657

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>11

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



450	455	460
Thr Glu Asn Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ala Lys Pro Lys Arg Ala Lys		
465	470	475
Ala Ser Lys Lys Ser Thr Asp His Pro Lys Tyr Ser Asp Met Ile Val		
	485	490
Ala Ala Ile Gln Ala Glu Lys Asn Arg Ala Gly Ser Ser Arg Gln Ser		
	500	505
Ile Gln Lys Tyr Ile Lys Ser His Tyr Lys Val Gly Glu Asn Ala Asp		
	515	520
Ser Gln Ile Lys Leu Ser Ile Lys Arg Leu Val Thr Thr Gly Val Leu		
	530	535
Lys Gln Thr Lys Gly Val Gly Ala Ser Gly Ser Phe Arg Leu Ala Lys		
545	550	555
Ser Asp Glu Pro Lys Lys Ser Val Ala Phe Lys Lys Thr Lys Lys Glu		
	565	570
Ile Lys Lys Val Ala Thr Pro Lys Lys Ala Ser Lys Pro Lys Lys Ala		
	580	585
Ala Ser Lys Ala Pro Thr Lys Lys Pro Lys Ala Thr Pro Val Lys Lys		
	595	600
Ala Lys Lys Lys Leu Ala Ala Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Pro Lys		
	610	615
Thr Val Lys Ala Lys Pro Val Lys Ala Ser Lys Pro Lys Lys Ala Lys		
625	630	635
Pro Val Lys Pro Lys Ala Lys Ser Ser Ala Lys Arg Ala Gly Lys Lys		
	645	650
		655

Lys

&lt;210&gt;12

&lt;211&gt;1449bp

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt;12

gcattcgttg cagttgatec acaaccgagt gtggtgactc gggtggtcaa cctgcccttg 60  
 gtgagctcca cgtatgacct catgtectea gcctatctca gtacaaagga ccagtatecc 120  
 tacctgaagt ctgtgtgtga gatggcagag aacggtgtga agaccatcac ctccgtggcc 180  
 atgaccagtg ctctgcecat catccagaag ctagagccgc aaattgcagt tgccaatacc 240  
 tatgcctgta aggggctaga caggattgag gagagactgc ctattctgaa tcagccatca 300  
 actcagattg ttgccaatgc caaaggcget gtgactgggg caaagatgc tgtgacgact 360

actgtgactg gggccaagga ttctgtggcc agcacgatca caggggtgat ggacaagacc 420  
 aaaggggcag tgactggcag tgtggagaag accaagtctg tggtcagtgg cagcattaac 480  
 acagtcttgg ggagtcggat gatgcagctc gtgagcagtg gcgtagaaaa tgcactcacc 540  
 aaatcagagc tgttggtaga acagtacctc cctctcactg aggaagaact agaaaaagaa 600  
 gcaaaaaaag ttgaaggatt tgatctggtt cagaagccaa gttattatgt tagactggga 660  
 tcctgtctca ccaagcttca ctcccgtgcc taccagcagg ctctcagcag ggttaaagaa 720  
 gctaagcaaa aaagccaaca gaccatttct cagctccatt ctactgttca cctgattgaa 780  
 tttgccagga agaattgtga tagtgccaat cagaaaattc aggatgctca ggataagctc 840  
 tacctctcat gggtagagtg gaaaaggagc attggatatg atgatactga tgagtccac 900  
 tgtgctgagc acattgagtc acgtactctt gcaattgccc gcaacctgac tcagcagctc 960  
 cagaccacgt gccacacct cctgtccaac atccaaggtg taccacagaa catccaagat 1020  
 caagccaagc acatgggggt gatggcaggc gacatctact cagtgttccg caatgctgcc 1080  
 tcctttaaag aagtgtctga cagectctc acttctagca aggggcagct gcagaaaatg 1140  
 aaggaatctt tagatgacgt gatggattat cttgttaaca acacgccct caactggctg 1200  
 gtaggtccct tttatctca gctgactgag tctcagaatg ctcaggacca aggtgcagag 1260  
 atggacaaga gcagccagga gaccagcga tctgagcata aaactcattc tagagacaag 1320  
 gctgccccgg ccaagcacgc cgtccccgcg aagaaggctg ctccggccaa ggctgcggca 1380  
 accccggccc cggccccggc caagaaggcc gccctccgg ccaagaaggc tgctccggcc 1440  
 aagaaggct 1449

<210>13

<211>714

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>13

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





Val Glu Gln Tyr Leu Pro Leu Thr Glu Glu Glu Leu Glu Lys Glu Ala  
 420 425 430  
 Lys Lys Val Glu Gly Phe Asp Leu Val Gln Lys Pro Ser Tyr Tyr Val  
 435 440 445  
 Arg Leu Gly Ser Leu Ser Thr Lys Leu His Ser Arg Ala Tyr Gln Gln  
 450 455 460  
 Ala Leu Ser Arg Val Lys Glu Ala Lys Gln Lys Ser Gln Gln Thr Ile  
 465 470 475 480  
 Ser Gln Leu His Ser Thr Val His Leu Ile Glu Phe Ala Arg Lys Asn  
 485 490 495  
 Val Tyr Ser Ala Asn Gln Lys Ile Gln Asp Ala Gln Asp Lys Leu Tyr  
 500 505 510  
 Leu Ser Trp Val Glu Trp Lys Arg Ser Ile Gly Tyr Asp Asp Thr Asp  
 515 520 525  
 Glu Ser His Cys Ala Glu His Ile Glu Ser Arg Thr Leu Ala Ile Ala  
 530 535 540  
 Arg Asn Leu Thr Gln Gln Leu Gln Thr Thr Cys His Thr Leu Leu Ser  
 545 550 555 560  
 Asn Ile Gln Gly Val Pro Gln Asn Ile Gln Asp Gln Ala Lys His Met  
 565 570 575  
 Gly Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val Phe Arg Asn Ala Ala Ser  
 580 585 590  
 Phe Lys Glu Val Ser Asp Ser Leu Leu Thr Ser Ser Lys Gly Gln Leu  
 595 600 605  
 Gln Lys Met Lys Glu Ser Leu Asp Asp Val Met Asp Tyr Leu Val Asn  
 610 615 620  
 Asn Thr Pro Leu Asn Trp Leu Val Gly Pro Phe Tyr Pro Gln Leu Thr  
 625 630 635 640  
 Glu Ser Gln Asn Ala Gln Asp Gln Gly Ala Glu Met Asp Lys Ser Ser  
 645 650 655  
 Gln Glu Thr Gln Arg Ser Glu His Lys Thr His Ser Arg Asp Lys Ala  
 660 665 670  
 Ala Pro Ala Lys His Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys  
 675 680 685  
 Ala Ala Ala Thr Pro Ala Pro Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Pro  
 690 695 700  
 Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala  
 705 710

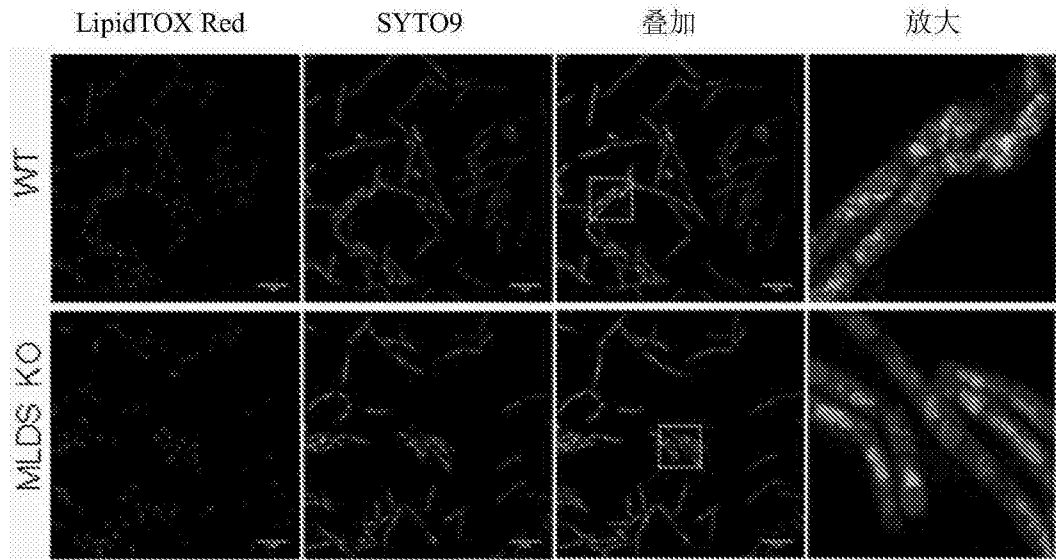


图1

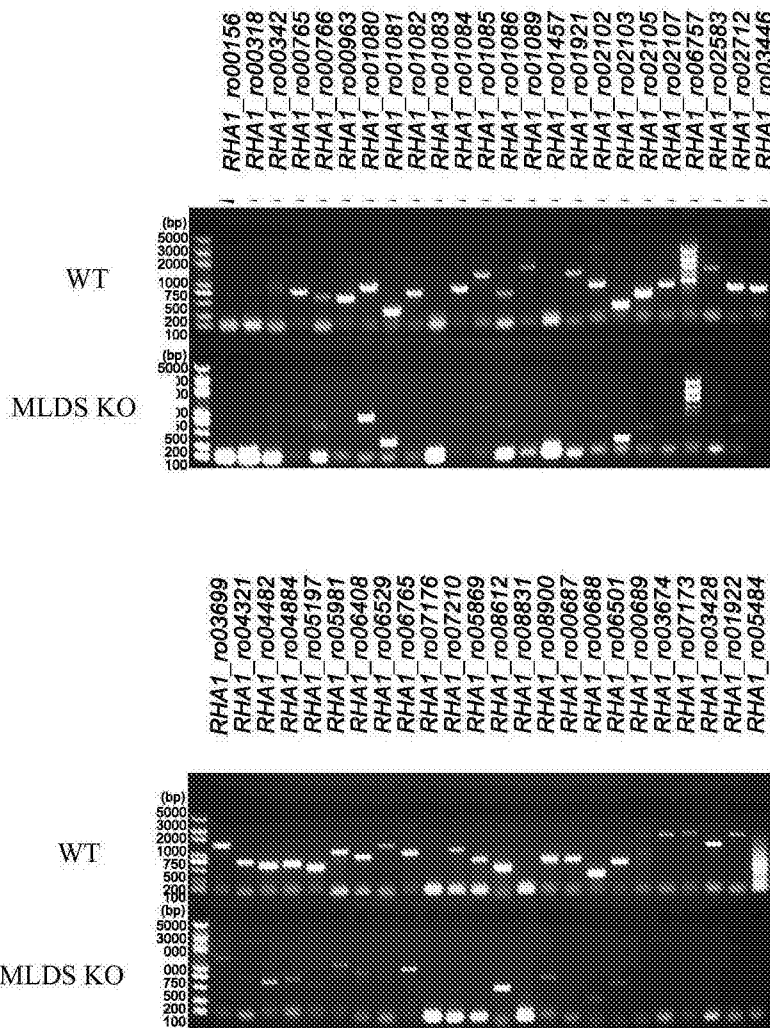
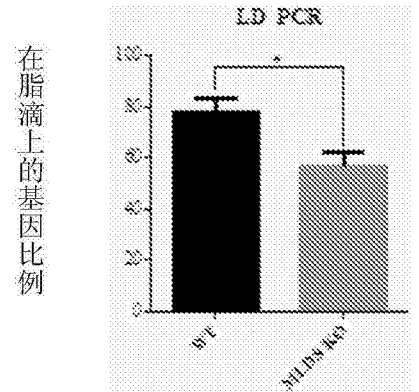


图2



在脂滴上的基因比例

图3

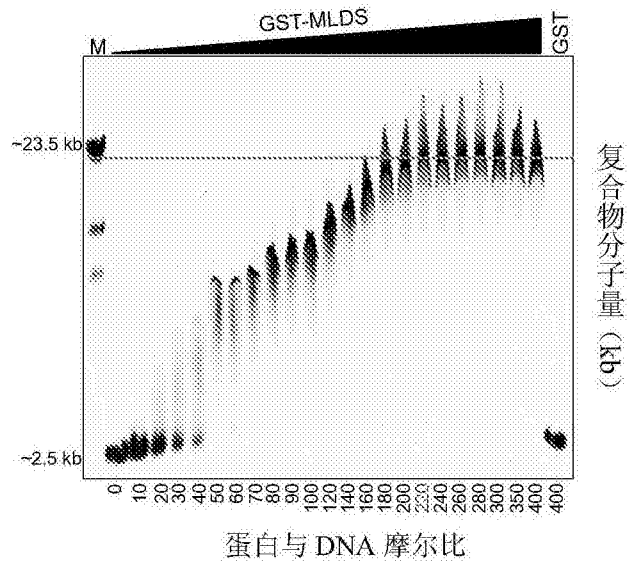


图4

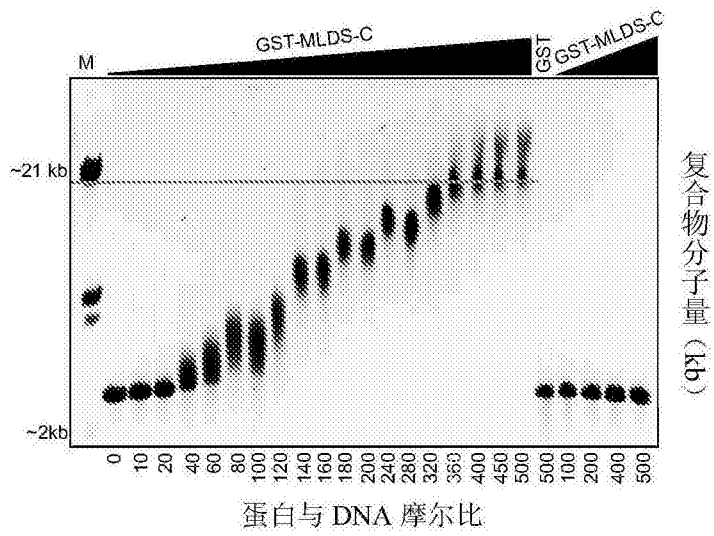


图5

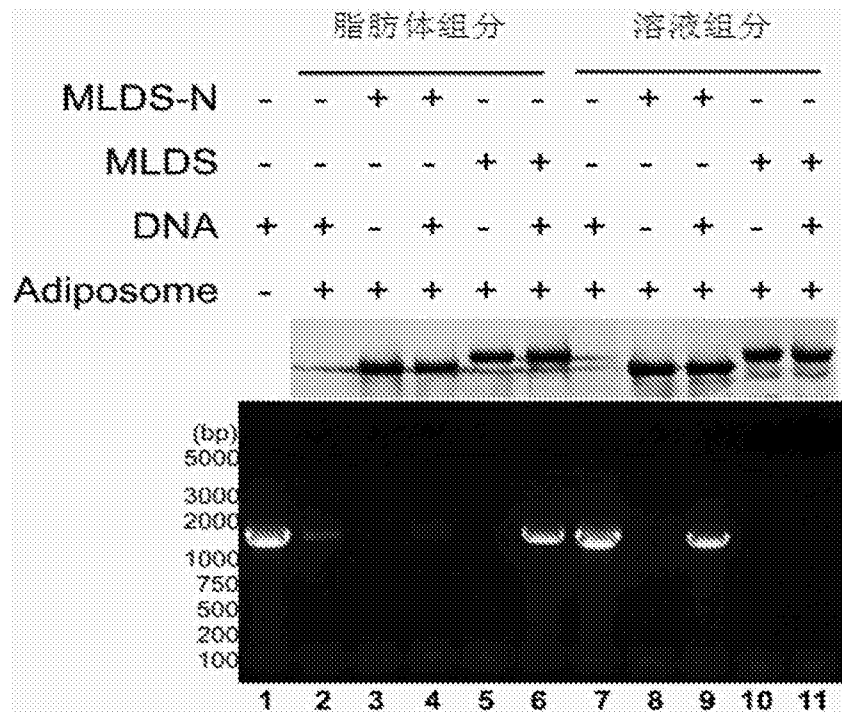


图6

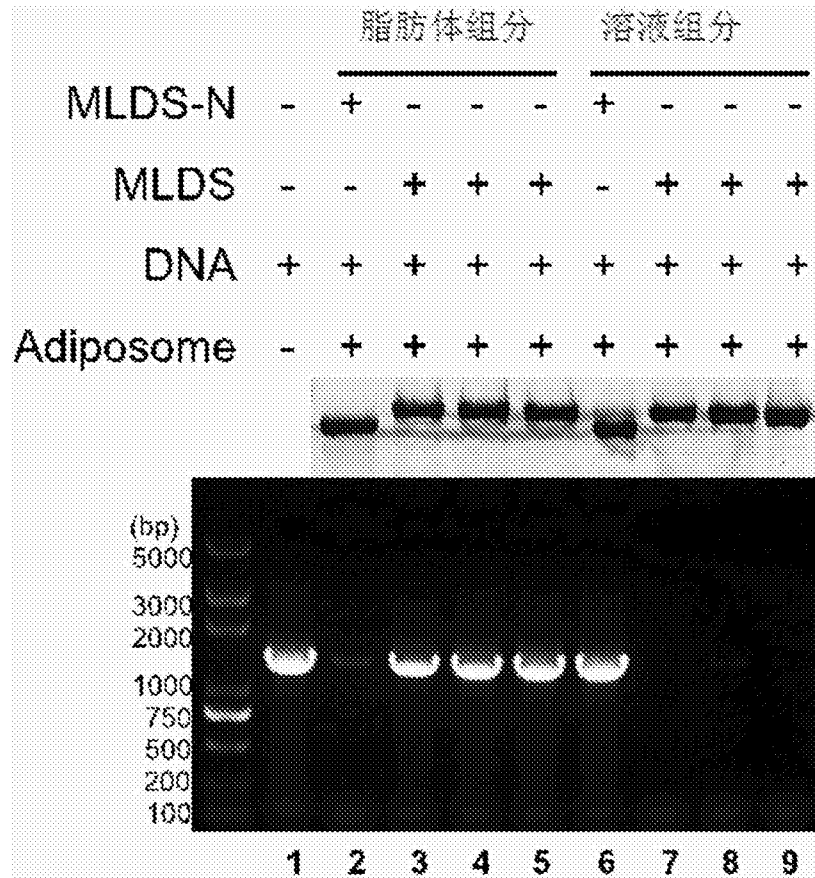


图7

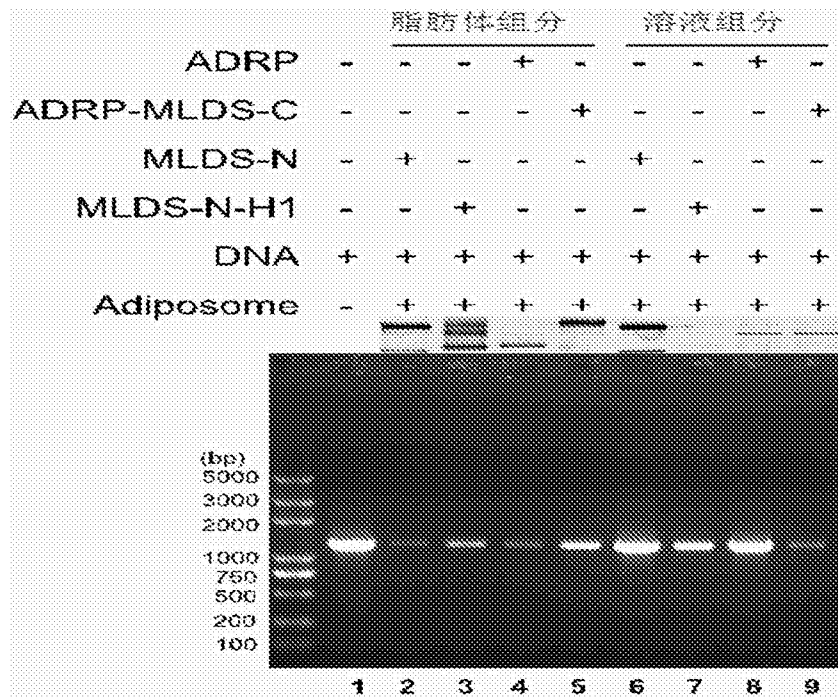


图8

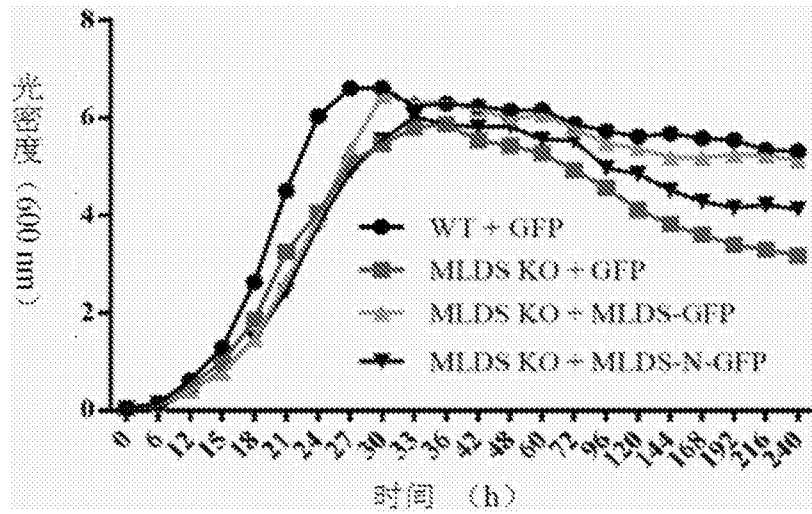


图9

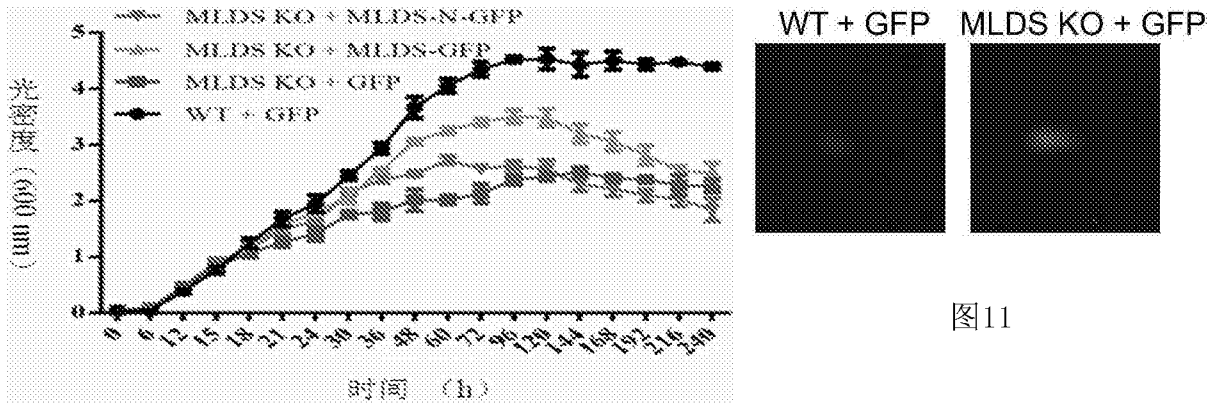


图11

图10

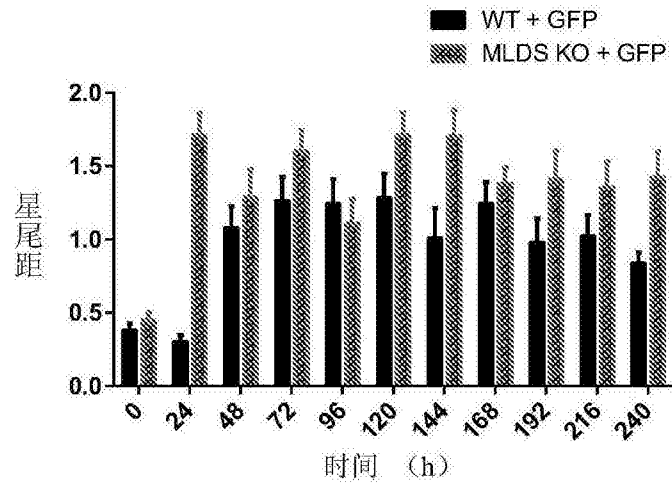


图12

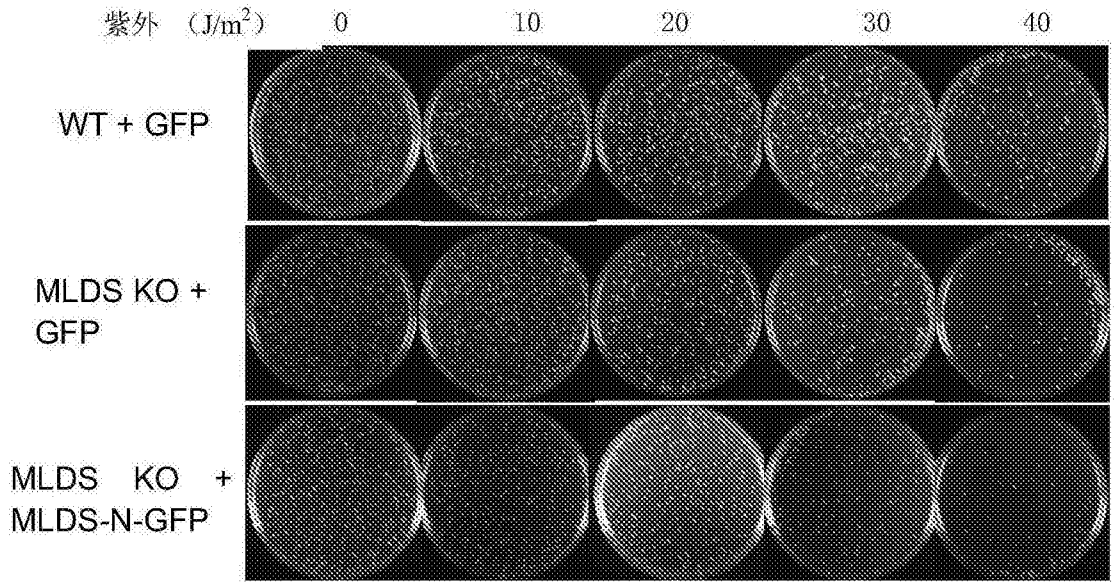


图13

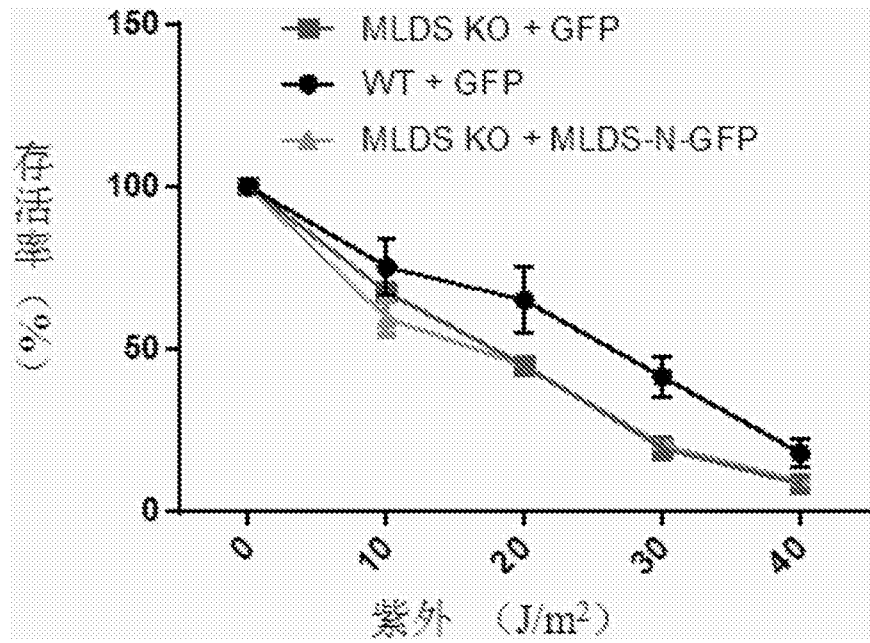


图14



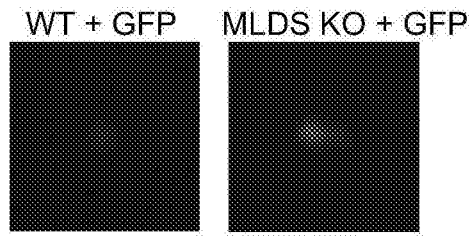


图15

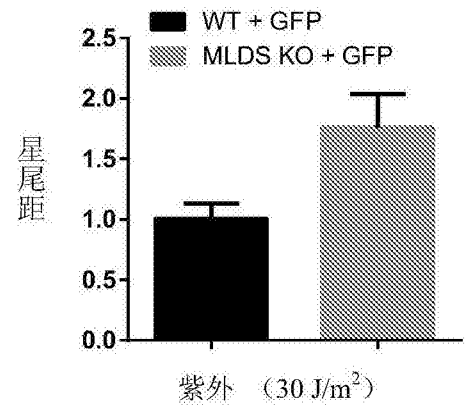


图16