



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102586129 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201110003782. 0 *C12P 7/64* (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 01. 10 *A61K 38/16* (2006. 01)

(83) 生物保藏信息 *A61K 48/00* (2006. 01)

CGMCC No. 4422 2010. 12. 08 *A61P 3/04* (2006. 01)

CGMCC No. 4379 2010. 11. 30 *A61P 3/06* (2006. 01)

CGMCC No. 4423 2010. 12. 08 *A61P 1/16* (2006. 01)

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所 *A61P 9/10* (2006. 01)

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号 *C12R 1/01* (2006. 01)

(72) 发明人 刘平生 丁云峰 张淑妍 张慧娜
汪洋 杜雅兰 于进海 彭恭
杨丽

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006. 01)

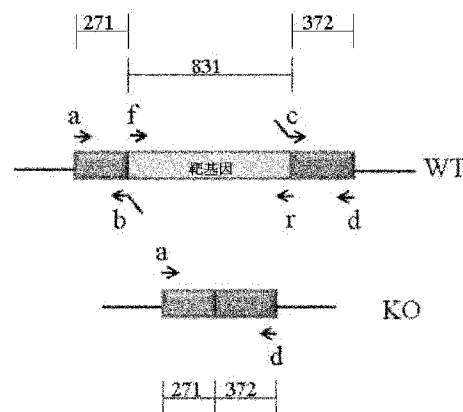
权利要求书 1 页 说明书 13 页
序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 及其用途

(57) 摘要

本发明涉及敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 及其用途。具体而言, 本发明涉及敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 及其用途, 并涉及 MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白的抑制剂在生产生物柴油中的应用, MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白和包含重组 MLDS 基因蛋白质表达产物、MLDS 基因或包含 MLDS 基因的重组表达载体的组合物在制备预防和 / 或治疗与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病的药物中的用途。本发明为生物柴油的生产提供了一种高效的微生物菌种。同时, 本发明的发现为与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病的的治疗提供了一种候选药物。



1. 敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS, 其于 2010 年 11 月 30 日保藏在中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心, 保藏号为 CGMCC No. 4379, 其中所述 MLDS 基因的 NCBI 登录号为 4218150。

2. 根据权利要求 1 所述的敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 在生产生物柴油中的应用。

3. 利用权利要求 1 所述的敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 生产生物柴油的方法。

4. MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白的抑制剂在生产生物柴油中的应用, 其中所述 MLDS 基因的 NCBI 登录号为 4218150。

5. 根据权利要求 4 所述的 MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白的抑制剂在生产生物柴油中的应用, 其特征在于所述抑制剂为 siRNA 和 / 或特异性抗 MLDS 蛋白的抗体, 所述 siRNA 和 / 或特异性抗 MLDS 蛋白的抗体能沉默和 / 或降低 MLDS 基因的表达及中和 MLDS 蛋白。

6. MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白在制备预防和 / 或治疗与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病的药物中的用途, 其中所述 MLDS 基因的 NCBI 登录号为 4218150。

7. 根据权利要求 6 所述的 MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白在制备预防和 / 或治疗与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病的药物中的用途, 其特征在于所述疾病选自肥胖症、脂肪肝或动脉粥样硬化。

8. 根据权利要求 6 所述的 MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白在制备预防和 / 或治疗与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病的药物中的用途, 其特征在于所述药物选自重组 MLDS 基因蛋白质表达产物、MLDS 基因、包含 MLDS 基因的重组表达载体或包含 MLDS 基因的重组表达载体的宿主细胞, 优选地, 所述重组 MLDS 基因蛋白质表达产物由原核表达系统或真核表达系统表达, 优选地, 所述重组表达载体为适用于基因治疗的重组表达载体。

9. 包含重组 MLDS 基因蛋白质表达产物、MLDS 基因或包含 MLDS 基因的重组表达载体的组合物在制备预防和 / 或治疗与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病的药物中的用途, 其中所述 MLDS 基因的 NCBI 登录号为 4218150。

10. 根据权利要求 9 所述的包含重组 MLDS 基因蛋白质表达产物、MLDS 基因或包含 MLDS 基因的重组表达载体的组合物在制备预防和 / 或治疗与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病的药物中的用途, 其特征在于所述疾病选自肥胖症、脂肪肝或动脉粥样硬化。

敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 及其用途, 并涉及 MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白的抑制剂在生产生物柴油中的应用, MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白和包含重组 MLDS 基因蛋白质表达产物、MLDS 基因或包含 MLDS 基因的重组表达载体的组合物在制备预防和 / 或治疗与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病的药物中的用途。

背景技术

[0002] 能源的短缺及环境的污染已经严重地限制了世界经济的发展和水平的提高。因此, 开发新型能源, 尤其是开发可持续和可再生的清洁生物能源就变得势在必行。从 2009 年我国在绿色清洁能源上的投入 (三百四十六亿美金) 高于全世界的总投入的四分之一及美国的两倍就能看出我国对绿色清洁能源的需求及重视。微生物能量转化效率远高于其它生物物种, 美国能源部的研究报告指出, 单位面积土地上微藻的产油量是地面植物的 100 倍 [1]。因此利用微生物生产生物能源已经成为人类开发可持续可再生能源的一个重要方向。其中, 利用微生物生产生物柴油又是重中之重 [2]。

[0003] 在细菌中, 生物柴油的前体甘油三酯是储存在一个叫脂滴的细胞器中。因此, 阐明调节脂滴形成及动态变化的相关分子机理将大大有助于提高生物柴油的产量及降低生产成本。同时, 人体的多种代谢疾病均与脂质的代谢和储存有着密切的 [3]。到目前为止, 脂滴的形成机理依然还处于假说之中, 其分子机理仍待研究。很显然, 脂滴结合蛋白的确定会为揭示脂滴形成机理提供有力的线索和依据。虽然真核细胞中脂滴结合蛋白已经大部分被鉴定出来了 [4-7], 但细菌的脂滴结合蛋白仍然是空白。同时, 对动物细胞脂滴有着很大作用的 PAT 家族蛋白在细菌中却没有同源蛋白。因此, 我们选定产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 [8] 为研究材料分析研究细菌脂滴的有关蛋白, 尤其是调节脂滴形成及大小变化的蛋白。Rodococcus sp. RHA1 起初是从农药污染的土壤中分离出的一种菌株, 它可以利用多种有机化合物作为碳源, 如碳水化合物、类固醇、芳香族化合物、腈类化合物等等。近期的研究主要集中于它的生物降解功能, 包括腈、丁子香酚、固醇酮、苯甲酸酯等 [9-11]。这种细菌有很强的在体内积累甘油三酯的能力, 这是一种潜在的可再生资源, 可以产生脂肪酸甲酯。因此我们选取这种菌为研究材料不仅有助于生物柴油的开发, 而且还会为治疗人类代谢疾病提供理论基础。

发明内容

[0004] 因此, 本发明的技术目的在于探究细菌脂滴的有关蛋白并探究该有关蛋白在生产生物柴油及治疗人类代谢疾病中的应用。

[0005] 因此, 本发明的第一方面涉及敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS, 其于 2010 年 11 月 30 日保藏在中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心,

其地址为中华人民共和国北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,其分类命名为红球菌 *Rhodococcus* sp., 保藏号为 CGMCC No. 4379, 其中所述 MLDS 基因的 NCBI 登录号为 4218150。

[0006] 本发明的第二方面涉及敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 在生产生物柴油中的应用。

[0007] 本发明的第三方面涉及利用敲除 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 生产生物柴油的方法。

[0008] 本发明的第四方面涉及 MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白的抑制剂在生产生物柴油中的应用, 其中所述 MLDS 基因的 NCBI 登录号为 4218150。优选地, 所述抑制剂为 siRNA 和 / 或特异性抗 MLDS 蛋白的抗体, 所述 siRNA 和 / 或特异性抗 MLDS 蛋白的抗体能沉默和 / 或降低 MLDS 基因的表达及中和 MLDS 蛋白。

[0009] 本发明的第五方面涉及 MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白在制备预防和 / 或治疗与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病的药物中的用途, 其中所述 MLDS 基因的 NCBI 登录号为 4218150。优选地, 所述疾病选自肥胖症、脂肪肝或动脉粥样硬化。优选地, 所述药物选自重组 MLDS 基因蛋白质表达产物、MLDS 基因、包含 MLDS 基因的重组表达载体或包含 MLDS 基因的重组表达载体的宿主细胞, 优选地, 所述重组 MLDS 基因蛋白质表达产物由原核表达系统或真核表达系统表达, 优选地, 所述重组表达载体为适用于基因治疗的重组表达载体。

[0010] 本发明的第六方面涉及包含重组 MLDS 基因蛋白质表达产物、MLDS 基因或包含 MLDS 基因的重组表达载体的组合物在制备预防和 / 或治疗与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病的药物中的用途, 其中所述 MLDS 基因的 NCBI 登录号为 4218150。优选地, 所述疾病选自肥胖症、脂肪肝或动脉粥样硬化。

[0011] 换言之, 由于细胞储存甘油三酯的细胞器 - 脂滴的形成和动态变化不但直接与人类代谢疾病有关, 而且还直接决定了生物体合成生物柴油的能力。因此, 揭示调控脂滴形成和动态变化的分子机理及相关基因对预防治疗代谢疾病以及开发生物柴油有重大意义。本发明通过对产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 的基因组和蛋白组分析研究从而选定相关基因, 利用基因敲除的手段对这些选定的基因进行敲除, 然后用光学和电子显微镜对这些菌株进行分析观测, 最后用其它生物化学和分子生物学方法对相关菌株进行分析研究, 重点在于测定甘油三酯含量。本发明发现敲除基因 ro2104 (NCBI 登录号 : 4218150) 可以明显增加产油红球菌脂滴的大小, 同时显著提高细菌甘油三酯含量。另外, 通过借助表达载体 JAM-egfp 使绿色荧光蛋白与 ro2104 形成融合蛋白, 使其在产油红球菌中表达, 还由此观测到该蛋白在细菌中的定位。本发明发现 ro2104 蛋白完全定位在脂滴上。因此, ro2104 有可能是一个存在于脂滴上, 保护小脂滴不被融合成大脂滴的蛋白。由此, 本发明命名它为 “Microorganism Lipid Droplet Small”, 简称 “MLDS”。由于 MLDS 阻止小脂滴融合为大脂滴, 因此, 敲除了 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 中的脂滴明显变大, 甘油三酯含量明显提高。该菌已经于 2010 年 11 月 30 日保藏在中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心 (CGMCC), 其地址为中华人民共和国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科学院微生物研究所, 保藏号为 CGMCC No. 4379, 其分类命名为红球菌 (拉丁文名称为 *Rhodococcus* sp.)。由于该菌能使菌体内的脂滴明显变大, 甘油三酯含量明显提高, 因此其可以用于生产生物柴油。由于 MLDS 阻止小脂滴融合为大脂滴, 因此, MLDS 对于生物柴油的

生产是一种负面因素,因此,MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白的抑制剂可以促进相关生物 (如产油红球菌) 细胞内的脂滴变大并显著提高甘油三酯的含量,也即 MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白的抑制剂可以用于生产生物柴油。MLDS 基因的抑制剂可以是能特异性敲除或敲降 MLDS 基因表达的小干扰 RNA (siRNA)、微 RNA (miRNA),也可以是能降低 MLDS 基因表达的其他化学物质。本领域技术人员公知如何设计特异性敲除或敲降某种基因表达的 siRNA 的方法以及筛选能降低 MLDS 基因表达的其他化学物质的方法。同时,由于抗原抗体的特异性结合能中和掉抗原的生物活性,因此,特异性结合 MLDS 蛋白的抗体也可以用于生产生物柴油。由于 MLDS 能保护小脂滴不被融合成大脂滴,因此,MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白以及包含 MLDS 基因和 / 或 MLDS 蛋白的组合物能用于预防和 / 或治疗与脂质的代谢和储存障碍有关的代谢性疾病,这样的疾病可以是肥胖症、脂肪肝或动脉粥样硬化。可以 MLDS 蛋白、MLDS 基因或包含 MLDS 基因的重组表达载体的形式应用 MLDS。

[0012] 敲除了 MLDS 基因的产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA-MLDS 已经于 2010 年 11 月 30 日保藏在中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心 (CGMCC),其地址为中华人民共和国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,保藏号为 CGMCC No. 4379,其分类命名为红球菌 *Rhodococcus* sp.。

[0013] 产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 于 2010 年 12 月 8 日保藏在中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心 (CGMCC),其地址为中华人民共和国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,其分类命名为红球菌 *Rhodococcus* sp.,保藏号为 CGMCC No. 4423。

[0014] 含有 pJAM2-eGFP 表达质粒的大肠杆菌 pJAM2-egfp/S17-1 于 2010 年 12 月 8 日保藏在中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心 (CGMCC),其地址为中华人民共和国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,分类命名为大肠埃希氏菌 *Escherichia coli*,保藏号为 CGMCC No. 4422。

附图说明

[0015] 图 1:MLDS 基因敲除的突变策略及 PCR 各引物的位置。

[0016] 图 2:MLDS 基因敲除构建物电泳图,其中敲除菌株的 PCR 扩增片段 (泳道 2) 大约 640bp,与构建的基因敲除质粒相同 (泳道 1)。而用同样的引物 PCR 扩增野生型片段大约 1470bp (泳道 3)。为了进一步确认缺失的准确性,我们也用 PCR 检测了目的基因及其两边的序列。结果表明目的基因两侧的序列 (271bp 和 372bp) 均与野生型菌株一致 (泳道 4-7),而目的基因 (831bp) 只存在于野生型菌株中,缺失菌株中 PCR 检测不到 (泳道 8-9),表明缺失菌株已经构建成功。1,阳性对照,以基因敲除质粒作为模板,以 Primer a、Primer d 作为引物。2,用 ro02104 缺失型细菌基因组作为模板,Primer a、Primer d 作为 PCR 引物。3,阴性对照,用野生型菌株基因组作为模板,Primer a、Primer d 作为 PCR 引物。4-5,以野生型和基因敲除菌株作模板,Primer a、Primer b 作为引物的 PCR 结果。6-7,以野生型和基因敲除菌株作模板,Primer c、Primer d 作为引物的 PCR 结果。8-9,以野生型和基因敲除菌株作模板,Primer f、Primer r 作为引物的 PCR 结果。

[0017] 图 3:电镜照片,其中负染电镜 (a 和 c) 和透射超薄切片电镜 (b 和 d) 分别观察了野生型菌和 MLDS 基因敲除菌中脂滴的大小,发现在基因敲除菌中脂滴远大于野生型的脂

滴。

[0018] 图 4 :TLC 实验结果,其中 TLC 显示在 MLDS 基因删除菌的甘油三脂含量增多。

[0019] 图 5 :Western blot 检测 MLDS 融合蛋白的定位。

[0020] 图 6 :用表达有 MLDS-GFP 融合蛋白的细菌定位 MLDS 的荧光显微镜照片,其中, a, 明场下转有空载体 JAM-egfp 的细菌 ;b, 荧光场下转有空载体 JAM-egfp 的细菌 ;c, 明场下转有目标基因 JAM-MLDS-egfp 的细菌 ;d, 荧光场下转有目标基因 JAM-MLDS-egfp 的细菌 (图中标尺为 5 μ m)。

具体实施方式

[0021] 下面将通过下述非限制性实施例进一步说明本发明,本领域技术人员公知,在不背离本发明精神的情况下,可以对本发明做出许多修改,这样的修改也落入本发明的范围。

[0022] 下述实验方法如无特别说明,均为常规方法,所使用的实验材料如无特别说明,均可容易地从商业公司获取。

[0023] 实施例

[0024] 实施例 1

[0025] 实验材料与设备

[0026] 1. 菌株与质粒

[0027] 产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 由加拿大英属哥伦比亚大学 (University of British Columbia) Lindsay D. Eltis 教授惠赠 (于 2010 年 12 月 8 日保藏在中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心 (CGMCC), 其地址为中华人民共和国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科学院微生物研究所, 分类命名为红球菌 *Rhodococcus* sp., 保藏号为 CGMCC No. 4423 ;大肠杆菌 S17-1 (ATCC47055) 和 pK18mobsacB (ATCC87097) 整合质粒均购自美国 ATCC ;pJAM2-eGFP 表达质粒为德国明斯特大学 (University of Munster) 的 Daniel Bröker 教授惠赠, 含有 pJAM2-eGFP 表达质粒的大肠杆菌 pJAM2-egfp/S17-1 于 2010 年 12 月 8 日保藏在中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心 (CGMCC), 其地址为中华人民共和国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科学院微生物研究所, 分类命名为大肠埃希氏菌 *Escherichia coli*, 保藏号为 CGMCC No. 4422 ;大肠杆菌 DH5 α 购自 TIANGEN 公司。

[0028] 2. 限制性内切酶和其他修饰酶

[0029] 限制性内切酶和 PCR 用 Ex Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司 ;克隆用 T 载体购自 Genstar 公司。

[0030] 3. 其他主要试剂

[0031] 硫酸卡那霉素 (Kanamycin) 和萘啶酸 (Nalidixic Acid) 购自 Sigma 公司 ;酵母粉 (Yeast Extrant) 和胰蛋白胨 (Tryptone) 购自 Oxide 公司 ;预染蛋白 Marker 为 Fermentas 公司产品 ;质粒小量提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Tiangen 公司 ;其它试剂均为分析纯试剂。

[0032] 4. 主要仪器设备

[0033] 电子显微镜 (FEI Tecnai G2F20) 为美国 FEI 公司产品 ;荧光显微镜的型号为 Zeiss-AXIO-Imager ;电转化仪为 BIO-RAD Micropulser165-2100 型 ;电热恒温培养箱 (DPX-9002B-1) 为上海福玛实验设备有限公司产品 ;双层小容量全温度恒温摇床

(ZHWHY-2102C) 为上海智城分析仪器制造有限公司产品;洁净工作台(SW-CJ-1FD)为苏州安泰空气技术有限公司产品;电转化仪为美国 BIO-RAD 公司产品;超纯水制备器为美国 PALL 公司产品;PCR 热循环仪(东胜·龙 EDC-810)为北京东胜创新生物科技有限公司产品;紫外分光光度计(D-22331Hamburg)为 Eppendorf 公司产品;离心机(microfuge 16、centrifuge5417R 和 3K30)分别为 Sigma、Eppendorf 和 Beckman 公司产品;凝胶成像系统(AlphalmagerEP)为美国 Alpha Innotech 公司产品;紫外透射反射分析仪(ZF-4)为上海长明光学电子仪器厂产品;电热恒温水槽(DK-8D)为上海一恒科技有限公司产品;高压蒸汽灭菌锅(YXQ-LS-50SII)为上海博迅实业有限公司医疗设备厂产品;电泳仪和电泳槽为北京六一厂公司产品;微波炉为 LG 和格兰仕公司产品;实验用各种冰箱为海尔公司产品;微型台式真空泵(CL-802B)为海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品;0.22 μm 滤器为德国 Sartorius 公司产品。

[0034] 实验方法

[0035] 1 用于缺失 ro02104 (MLDS) 基因的载体的构建

[0036] 1.1 ro02104 (MLDS) 基因引物的设计

[0037] 从 NCBI 数据库中查找出目标基因 RHA1 MLDS 及其两侧的序列(分别为 ro02103, NCBI 登录号为 4218149, 和 ro02105, NCBI 登录号为 4218151), 用 PCR 的方法扩增其上游 271bp 段和下游 372bp 的序列, 引物通过 primer 5.0 软件设计。其中, 271bp 序列由 Primer a (SEQ ID NO:1) 和 Primer b (SEQ ID NO:2) 扩增, Primer a 的 5' 端为 EcoR I 酶切位点。372bp 序列用 Primer c (SEQ ID NO:3) 和 Primer d (SEQ ID NO:4) 引物扩增, Primer d 的 5' 端为 HindIII 酶切位点。Primer b 和 Primer c 引物之间有 19bp 的粘性互补区, 用于 PCR 扩增时将 AB 段和 CD 段连接到一起。检测用的引物为 Primer f (SEQ ID NO:5) 和 Primer r (SEQ ID NO:6), 用于扩增目标基因 ro02104。

[0038] Primer a 5' -CGGAATTCGGAACAGCAGGAGGACGAGGAAT-3'

[0039] Primer b 5' -CCATCCACTAAACTTAAACAGGCTTGATCCTTCACGC

[0040] TTTTCG-3'

[0041] Primer c 5' -GTTTAAGTTTAGTGGATGGTCTTGACGCTGTCGATGG

[0042] TCTTCT-3'

[0043] Primer d 5' -CACAAGCTTCTGAGTCAGATCGAGCGTGGGTT-3'

[0044] Primer f 5' -ATGACTGACCAGAAGACCATCGACAG-3'

[0045] Primer r 5' -TCAAGCCTTCTTGGCCGGAGCAGC-3'

[0046] 1.2 MLDS 基因的扩增

[0047] 用 primer a 和 primer b 扩增 AB 段, 用 primer c 和 primer d 扩增 CD 段, 模板为野生型 RHA1 的基因组。

[0048] PCR 体系为:

[0049]

模板	1 μ L
引物 1	2 μ L
引物 2	2 μ L
2.5 mM dNTP	5 μ L
10 \times buffer	5 μ L
Taq 酶	0.5 μ L
ddH ₂ O	34.5 μ L
共计	50 μ L

[0050] PCR 条件为：

[0051]

预变性	94 $^{\circ}$ C, 5 min
变性	94 $^{\circ}$ C, 30 sec
退火	72 $^{\circ}$ C, 55 sec
延伸	72 $^{\circ}$ C, 1 min

[0052]

循环数	35
后延伸	72 $^{\circ}$ C, 2 min

[0053] 将 AB 段和 CD 段分别回收

[0054] 以回收后的 AB 段和 CD 段为模板,以 primer a 和 primer d 为引物扩增 AD 段,PCR 条件同 AB 段和 CD 段。

[0055] 1. 3PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

[0056] 将扩增产物和连接产物进行琼脂糖凝胶电泳,琼脂糖浓度为 0.8%,用 Goldview 核酸染料(购自赛百盛,目录号 HGV-1);进行着色,用凝胶图像分析仪对染色后的凝胶进行分析并拍照记录。

[0057] 1. 4PCR 产物的回收

[0058] 将 AD 段进行凝胶回收,操作步骤按凝胶回收试剂盒(购自 TIANGEN 公司)中的说明书进行,回收出来的 AD 段就是体外缺失掉目标基因 MLDS 的 DNA 序列。

[0059] 2 质粒整合载体的构建

[0060] 2. 1MLDS 基因与 T 载体的连接

[0061] 将回收后的 AD 段序列作为外源片段与 T 载体连接,连接体系为:外源片段 4 μ L, T 载体 1 μ L, 2 \times 预混缓冲液 5 μ L。连接条件为 16 $^{\circ}$ C, 过夜。

[0062] 2. 2CaCl₂ 法制备 DH5 α 感受态细胞

[0063] 从 LB 平板上挑取新活化的 DH5 α 单菌落,接种于 5mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 下振荡培养 12hr 左右。然后将该菌液以 1 : 100 的比例接种于 100mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C, 220rpm 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6。置于冰上 20min。在 4 $^{\circ}$ C, 5000rpm 离心 5min,弃上清液,用吸头吸尽残余培养基。加入适量的 MgCl₂-CaCl₂ 溶液清洗两次。加入适量冰预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 重悬。此时的感受态细胞既可以进行转化,也可以加入甘油之后保存于 -80 $^{\circ}$ C。

[0064] 2.3T 载体连接产物的转化

[0065] 将连接产物加入 50 μ L DH5 α 感受态细胞中,温和混匀,冰上放置 20hr,热击 (42 $^{\circ}$ C,90sec)。在冰上放置 2-3min,加入 0.8mL LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 孵育 45min,离心后用 200 μ L LB 培养基重悬,取 100 μ L 涂氨苄青霉素家 IPTG 和 X-gal 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

[0066] 2.4 转化菌落质粒的提取

[0067] 将生长出来的菌落提取质粒验证,提取质粒使用天根质粒小量快速提取试剂盒。将提取的质粒送北京擎科生物技术有限公司测序。测序结果表明所获得的重组基因序列完全正确。

[0068] 2.5 含 MLDS 基因的 PK18 质粒整合载体的构建

[0069] 1) 将测序正确的阳性克隆和载体 pK18mobsacB 进行 EcoR I 和 HindIII 双酶切,酶切体系如下表,酶切温度为 37 $^{\circ}$ C,酶切时间为 4hr。

[0070]

质粒 DNA	15 μ L
10 \times buffer M	5 μ L
EcoR I	1 μ L
HindIII	1 μ L
ddH ₂ O	28 μ L
共计	50 μ L

[0071] 2) 将酶切产物跑电泳后按凝胶回收试剂盒的说明进行凝胶回收。

[0072] 3) 将回收后的小片段作为外源片段和载体 pK18mobsacB 进行连接。连接体系为:外源片段 4 μ L, T 载体 1 μ L, 2 \times 预混缓冲液 5 μ L。连接条件为 16 $^{\circ}$ C, 过夜。

[0073] 4) 将连接产物转化经 CaCl₂ 法制备好的感受态细胞 S17-1,转化方法如 2.3。

[0074] 5) 涂卡那霉素平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。长出来的菌落即是含有重组质粒的阳性菌落。

[0075] 3RHA1 菌株基因组上 MLDS 基因的敲除

[0076] 3.1S17-1 和 RHA1 细菌的培养

[0077] 挑取大肠杆菌 S17-1 的单菌落至 10mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基,于 37 $^{\circ}$ C 培养。挑取野生型 RHA1 的单菌落至 10mL 含有 30 μ g/mL 萘啶酸的 LB 培养基,于 30 $^{\circ}$ C 培养。

[0078] 3.2S17-1 菌株和 RHA1 菌株的结合作用

[0079] 分别培养供体菌 S17-1 和受体菌野生型 RHA1 至细菌生长指数末期。各取 100 μ L 涂无抗性的固体 LB 平板,30 $^{\circ}$ C 培养过夜。这时质粒就会从供体菌转进受体菌 RHA1 中。

[0080] 3.3 整合筛选 MLDS 突变株

[0081] 向过夜培养的平板中加入 2mL 液体 LB 培养基,用涂布棒将菌体刮下,梯度稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³,涂 NA+Kan 板 (萘啶酸 + 卡那霉素平板),30 $^{\circ}$ C 培养 2-3day。长出来的为第一次整合的细菌。将长出来的菌落进行第一次整合的鉴定:挑一个单菌落分别扎到 NA+Kan 平板和 NA+Kan+10%蔗糖平板,挑选在 NA+Kan 平板生长而在 NA+Kan+10%蔗糖平板上不能生长的菌落。这样的菌落为第一次整合成功的细菌。将第一次整合成功的菌落在 10%蔗糖平板上划线,30 $^{\circ}$ C 培养 2-3day。长出来的为第二次整合的细菌。将长出来的菌落进行第

二次整合的鉴定:挑一个单菌落分别扎到 NA+Kan 平板和 NA 平板,挑选在 NA 平板生长而在 NA+Kan 平板上不能生长的菌落。这样的菌落为第二次整合成功的细菌。

[0082] 4MLDS 突变株的分子生物学水平验证

[0083] 4.1 基因组的提取

[0084] 提取方法按照 TIANGEN 公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行

[0085] 4.2 PCR 鉴定缺失突变株

[0086] 以提取的基因组做模板做 PCR 验证,阳性对照为以体外构建的重组质粒为模板,阴性对照为以野生型 RHA1 基因组为模板。同时以 primer f 和 primer r 扩增 MLDS 基因,再次确认目标基因的缺失与否。

[0087] 5 电子显微镜观察菌体形态

[0088] 5.1 电子显微镜样品切片的制备

[0089] 菌体收集:3800g 离心 2min 收集 2mL 菌体,分别用 1mL 0.1MPBS 洗涤菌体 2 次;包埋:加入 5% gelatin(明胶)(w/v),室温放置 1hr,4℃放置 30min,然后将包埋块切成 1mm³ 左右的小块;前固定:将上述小块用 2.5% (w/v) 戊二醛(pH 7.4,0.1M PBS),4℃固定过夜;洗涤:用 1mL 0.1M PBS 在 4℃洗涤去除戊二醛,洗涤 3 次,每次 10min;后固定:用 200 μ 1% (w/v) 锇酸 4℃固定样品 24hr;洗涤:用 1mL 0.1M PBS 在 4℃洗涤去除锇酸,洗涤 3 次,每次 10min;梯度乙醇脱水:室温下分别用 1mL 30%、50%、70%、90%和 95%乙醇脱水 10min,最后用 100%乙醇脱水 3 次,每次 10min;替代:室温下加入 1mL 环氧丙烷替代乙醇,替代 3 次,每次 10min;渗透:室温下以环氧丙烷:Queto1 812 分别以 3:1、1:1、1:1 的比例渗透 8hr、10hr、12hr,最后以纯 Queto1 812 树脂渗透 12hr;包埋及聚合:以加入加速剂的 Queto1 812 全树脂包埋样品,并分别在 35℃下聚合 12hr,45℃下聚合 12hr,60℃下聚合 24hr;切片:用超薄切片机 Leica EM UC6(Leica 公司)将包埋好的样品切成 90nm 的超薄切片;染色:将超薄切片用 2% (w/v) 醋酸双氧铀在室温染色 20min,水洗 3 次,然后用 2% 柠檬酸铅室温下染色 5min,水洗 3 次,此超薄切片用电镜 FEITecnai20(FEI company) 观察。

[0090] 6ro02104 基因的过表达

[0091] 6.1 表达质粒的构建

[0092] 6.1.1 目标基因的扩增

[0093] 从 NCBI 数据库中查找出目标基因 RHA1MLDS 的序列,用 PCR 的方法扩增其序列,引物通过 primer 5.0 软件设计。基因的 5' 端和 3' 端都加入 Bam HI 酶切位点。所用引物分别为 Primer F(SEQ ID NO:7) 和 Primer R(SEQ ID NO:8):

[0094] Primer F 5' -CAGGATCCACTGACCAGAAGACCATCGACAGCGT-3'

[0095] Primer R 5' -CAGGATCCAGCCTTCTTGGCCGGAGCAGCCTT-3'

[0096] PCR 体系为:

[0097]

模板	1 μ L
Primer F	2 μ L
Primer R	2 μ L
2.5 mM dNTP	5 μ L
10 \times buffer	5 μ L
Taq 酶	0.5 μ L
ddH ₂ O	34.5 μ L
共计	50 μ L

[0098] PCR 条件为：

[0099]

预变性	94 $^{\circ}$ C, 5 min
变性	94 $^{\circ}$ C, 30 sec
退火	72 $^{\circ}$ C, 55 sec
延伸	72 $^{\circ}$ C, 2 min
[0100] 循环数	35
后延伸	72 $^{\circ}$ C, 2 min

[0101] 6. 1. 2

[0102] 将 PCR 产物进行凝胶电泳及回收, 请分别参考 1. 3 和 1. 4 部分。

[0103] 将目的基因进行 T 载体的连接和转化, 请分别参考 2. 1 和 2. 3 部分。

[0104] 转化子质粒的提取, 请参考 2. 4 部分。

[0105] 6. 1. 3 含 ro02104 基因的 JAM-egfp 质粒整合载体的构建

[0106] 1) 将测序正确的阳性克隆和载体 pJAM-egfp 进行 Bam HI 酶切, 酶切体系如下表, 酶切温度为 30 $^{\circ}$ C, 酶切时间为 4hr。

[0107]

质粒 DNA	15 μ L
10 \times buffer M	5 μ L
Bam HI	2 μ L
ddH ₂ O	28 μ L
共计	50 μ L

[0108] 2) 将酶切产物跑电泳后凝胶回收, 按试剂盒说明进行凝胶回收。

[0109] 3) 将回收后的小片段作为外源片段和载体 pJAM-egf 进行连接。连接体系为：外源片段 4 μ L, 载体 1 μ L, 2 \times 预混缓冲液 5 μ L。连接条件为 16 $^{\circ}$ C, 过夜。

[0110] 4) 将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 方法同 2. 3, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

[0111] 5) 将转化子提取质粒并酶切鉴定是否有外源片段的插入, 方法同 2. 4。

[0112] 6. 2 用于电转化的感受态细胞的制备

[0113] 从 LB 平板上挑取新活化的 RHA1 单菌落, 接种于 10mL LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 下振

荡培养 48hr 左右。然后将该菌液以 1 : 100 的比例接种于 100mL LB 液体培养基中, 30℃, 220rpm 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6。各取 45mL 菌液加入 2 个无菌的 50mL 离心管中。立即置于冰上 20min, 使培养物冷却至 0℃, 以使菌停止生长。将离心管在 4℃, 6000rpm 离心 10min, 弃上清液, 用吸头吸尽残余培养基。每个离心管里加入 25mL 冰冷的无菌水重悬。置于冰上若干分钟。4℃, 6000rpm 离心 10min, 回收细胞。再次用 25mL 冰冷的无菌水重悬, 同样条件离心后弃上清液, 用吸头吸尽残余培养基。每个离心管里加入 2mL 冰冷的 10% 的甘油重悬, 分装到 1.5mL 离心管中。保存于 -80℃。

[0114] 6.3 质粒的转化和表达

[0115] 取 2 μL 阳性克隆质粒加入到 50 μL 感受态细胞中, 温和混匀后转移到 0.1cm 的电击杯中, 置于冰上 20min。选择“Ec3”程序 (3.0kV, 6.0msec) 电击一次。迅速将细胞 SMM 配制的 LB 液体培养基中, 于 30℃, 180rpm 培养 4hr。涂卡那霉素平板, 30℃培养。(SMM 配方: 0.5M 蔗糖, 20 μM MgCl₂, 20 μM 顺丁烯二酸, 用 NaOH 调 pH 至 6.5)。

[0116] 将长出来的单菌落挑至 10mL LB 液体培养基中, 加入卡那霉素至终浓度为 50 μg/mL, 加入诱导剂 acetamide (乙酰胺, 购自 sigma-aldrich, 目录号 695122-1G) 至终浓度为 0.5% (w/v), 30℃培养约 48hr。

[0117] 将菌液离心 (4℃, 8000rpm, 3min), 弃上清, 加入 1mL 0.1M PBS 重悬, 再次同样条件离心, 加入 200 μL 的 PBS 重悬, 进行荧光显微镜观察。

[0118] 7Western blot 鉴定融合蛋白

[0119] 7.1 样品的制备

[0120] 将含有诱导剂 acetamide 的细菌培养至指数生长末期, 取 0.5mL 菌液离心 (4℃, 8000rpm, 3min), 弃上清, 加入 1mL 0.1M PBS 重悬, 再次同样条件离心, 加入 200 μL 的 2×sample buffer (加样缓冲液), 200 瓦功率超声 8 次, 超声循环条件为超声 3s, 停顿 3s。然后置于金属加热器上加热至 95℃, 5min, 样品放于 4℃冰箱。

[0121] 7.2 电泳

[0122] 10% 聚丙烯酰胺凝胶的制备: 配方如下表所示

[0123]

	分离胶(10%, 10 mL)	浓缩胶 (5%, 5 mL)
水	4 mL	3.4 mL
30%丙烯酰胺	3.3 mL	0.83 mL
Tirs-HCl	2.5 mL(1.5M, pH 8.8)	0.63 mL(1M, pH 6.8)
10% SDS	0.1 mL	0.05 mL
[0124] 10% 过硫酸铵	0.1 mL	0.05 mL
TEMED	0.005 mL	0.005 mL

[0125] 分离胶的配制: 首先安装好配胶专用装置, 所用的物品需充分洗净并干燥, 测试不漏水以后方可进行。在冰上按配方配好分离胶后, 混匀。然后吸取 7.5mL 分离胶缓缓加入

制胶槽中,随即用移液器慢慢加入 2mL 去离子水进行压胶。至少聚合 45 分钟后方可进行浓缩胶的配制。浓缩胶的配制:首先吸干压胶的水,插上合适的样品梳。然后在冰上按配方配好 5mL 的浓缩胶,混匀。然后用移液器小心的将浓缩胶加入到制胶槽中直至加满为止。等待凝胶聚合。此过程中可能会有缩胶现象,需要补齐浓缩胶。大约聚合 30 分钟即可。

[0126] 点样:将梳子从凝胶中拔出,安装好电泳槽并住满电泳缓冲液,然后用移液器点样,每孔点样品 10 微升,在靠边的泳道点 10 μ L 预染 marker(分子量标准)。空泳道用上样缓冲液补齐。

[0127] 电泳:恒定电流电泳,25mA 每块胶,电泳至溴酚蓝前沿距凝胶底部 0.5cm 处停止,此过程大约需要 100min。

[0128] 7.3 转膜

[0129] 转移前准备:将凝胶取下,去除浓缩胶后,置于转移缓冲液中平衡 15min。将 PVDF 膜剪成 6.5cm*8.3cm 大小,先置于甲醇中活化 30sec,然后在转移缓冲液中平衡 15min。同时剪取 2 张 Bio-rad 专用电转滤纸 2 张,大小为 8cm*1cm,置于电转液平衡 5min。转移:取干净的 25cm 直径的大圆平皿,倒满转移缓冲液。然后将转印夹黑面朝下,依次平铺海绵垫、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、海绵垫,此过程中用厚梳子赶净凝胶与 PVDF 膜中的气泡,最后夹紧转印夹,按正负极顺序正确置于转印槽中,灌满转移缓冲液,盖好电极盖。整体置于冰上,设置恒定电流模式,200mA,转印 2hr。

[0130] 7.4 杂交

[0131] 取下 PVDF 膜,置于干净的小方盒中,用 TBS 漂洗 2 遍,每次 1min。将 PVDF 膜置于封闭液中封闭,室温摇动孵育 2hr。将封闭的膜用 TBS 漂洗 2 遍,每次 1min。加入 10mL 用抗体稀释液配制的 GFP 小鼠单克隆抗体,稀释比例为 1 : 2000,于 4 $^{\circ}$ C 下置于摇床上摇动孵育过夜。用洗膜缓冲液洗一抗 3 次。加入 20mL 山羊抗小鼠二抗,稀释比例为 1 : 10000,室温,摇动孵育 1hr。用洗膜缓冲液洗 3 次,每次 3min。

[0132] 7.5 化学发光试剂检测

[0133] 底物孵育:将底物 A 液和 B 液各取 0.5mL,在 Parafilm 膜上混匀待用。将 PVDF 取出后置于滤纸上吸干多余液体。后将其正面朝下平铺于已经混合均匀的底物上,孵育 30sec,沥干多余的底物,然后将膜用保鲜膜包好置于 X 光胶片盒中,注意防止气泡出现。曝光:在暗室红灯下操作,将胶片迅速贴紧 PVDF 膜,盖紧 X 光胶片盒盖,根据荧光强度,控制曝光时间在 10sec-2min 之间。红灯下显影至合适的条带深度,用清水漂洗停止显影,然后定影 45 秒左右至胶片完全透亮为止,最后用清水冲洗 2 遍。将胶片置于架子上晾干,标记好预染 marker(分子量标准)在胶片上的位置,最后扫描胶片获得数据。

[0134] 7.6 相关溶液的配方

[0135] Tris-甘氨酸电泳缓冲液:25mM Tris,250mM 甘氨酸,0.1% (m/v) SDS;电泳转移缓冲液:25mM Tris,192mM 甘氨酸,15% 甲醇 (v/v),冷却至 4 $^{\circ}$ C 备用;2 \times 样品缓冲液:100mM Tris-HCl(pH6.8),8% SDS(m/v),20% 甘油 (v/v),0.2% 溴酚蓝 (m/v),200mM DTT;TBS 缓冲液:20mM Tris,150mM NaCl, pH 7.5;洗膜缓冲液:TBS 缓冲液+0.2% 奶粉+0.2% Tween 20;封闭液:TBS 缓冲液+5% 脱脂奶粉+0.2% Tween 20;抗体稀释液:TBS 缓冲液+1% 脱脂奶粉+0.2% Tween 20。

[0136] 实验结果:

[0137] 1. MLDS 基因敲除

[0138] 产油红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 起初是从农药污染的土壤中分离出的一种菌株, 它可以利用多种有机化合物作为碳源, 如碳水化合物, 类固醇, 芳香族化合物, 腈类化合物等等。在实验中, 用营养肉汤 (NB) 培养基维持细胞生长, 用矿物盐培养基 (MSM), 包括少量的氮, 并有充足的葡糖酸钠作为甘油三酯 TAG 累积的碳源。在比较蛋白组学的结果中, 观察到 MLDS (GI 111019097) 蛋白的肽段数在 MSM 环境的脂滴中明显减少, 表明蛋白表达降低。有趣的是通过同源序列比较 (<http://pfam.janelia.org>), 这个基因的同源蛋白是载脂蛋白。为了研究该蛋白的功能, 我们利用 pK18mobsacB 通过同源重组的方法对该基因进行敲除 [12-13], 图 1 显示的是删除部位及其两侧的序列 PCR 引物的设计方案。并且通过 PCR 的方法对该基因的敲除进行确认 (图 2)。结果表明与阳性质粒对照 (泳道 1) 相比, MLDS (831bp) 基因被完全敲除 (泳道 2), 而细菌基因组作为阴性对照 (泳道 3), 敲除部位及其两侧的序列也分别进行了 PCR 检测, 进一步确认基因敲除成功。为了进一步分析该 MLDS 基因敲除菌的表型, 用负染电镜和透射超薄切片电镜 (TLC) 分别观察了野生菌和 MLDS 基因敲除菌, 发现在 MLDS 基因敲除菌中脂滴明显变大 (图 3)。TLC 结果显示 MLDS 基因敲除菌的甘油三酯含量增多 (图 4)。

[0139] 2. MLDS 蛋白的定位结果

[0140] JAM-egfp 是一种能够在放线菌一类微生物中表达外源蛋白的载体, 为了研究影响脂滴大小的 MLDS 蛋白的定位, 我们分别将 JAM-egfp 空载体和 JAM-MLDS-egfp 在野生型菌株中过表达 [14-16]。与此同时, 通过 Western blot 鉴定融合蛋白的表达情况。Western blot 结果显示融合蛋白 MLDS-GFP 的含量很高, 而单独的 GFP 几乎没有 (图 5)。这就确保了我们在荧光显微镜下看到的绿色是融合蛋白所发出的颜色, 能够准确地反映出 MLDS 的定位情况。通过荧光显微镜的观察, 我们看到当只有 JAM-egfp 载体转入细胞中时, 整个菌体中是均匀分布的绿色, 而当 JAM-MLDS-egfp 转入细胞中时, 可以看到细胞中有球型颗粒的分布 (图 6), 这表明 MLDS 蛋白是定位在脂滴表面的。

[0141] 脂滴的由小变大有两种可能性, 其一是脂滴自己长大, 其二是小脂滴融合成大脂滴。我们的结果支持第二种可能性, 因为在 MMLDS 敲除的突变株中脂滴的个数明显变少。而脂滴融合的过程中又有两种可能的机制在调节, 一方面是某些蛋白的正调节, 例如 SNARE、ADRP, 他们可以促使小的脂滴融合成大脂滴; 另一方面是某些蛋白的负调节, 例如 MMLDS, 它保护着脂滴, 不让脂滴之间相互融合, 这两个方面在细胞内达到动态的平衡, 而当我们把起负调节作用的 MMLDS 敲除之后就会使脂滴趋向于融合。

[0142] 参考文献

[0143] 1. Singh, A., P. S. Nigam, and J. D. Murphy, Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresour Technol*, 2010.

[0144] 2. Smith, V. H., et al., The ecology of algal biodiesel production. *Trends Ecol Evol*, 2010. 25(5) :p. 301-9.

[0145] 3. Maeda, K., et al., Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab*, 2005. 1(2) :p. 107-19.

[0146] 4. Liu, P., et al., Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to

be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem*, 2004. 279(5) : p. 3787-92.

[0147] 5. Bartz, R., et al., Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res*, 2007. 6(8) : p. 3256-65.

[0148] 6. Zehmer, J. K., et al., A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics*, 2009. 9(4) : p. 914-21.

[0149] 7. 刘平生, 张. 杜. 汪., 脂滴 - 细胞脂类代谢的细胞器. *生物物理学报*, 2010. 26(2) : p. 97-105.

[0150] 8. McLeod, M. P., et al., The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(42) : p. 15582-7.

[0151] 9. Banerjee, A., R. Sharma, and U. C. Banerjee, The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002. 60(1-2) : p. 33-44.

[0152] 10. Larkin, M. J., L. A. Kulakov, and C. C. Allen, Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility. *Curr Opin Biotechnol*, 2005. 16(3) : p. 282-90.

[0153] 11. Hernandez, M. A., et al., Biosynthesis of storage compounds by *Rhodococcus jostii* RHA1 and global identification of genes involved in their metabolism. *BMC Genomics*, 2008. 9 : p. 600.

[0154] 12. van der Geize, R., et al., Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Deltal-dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. *FEMS Microbiol Lett*, 2001. 205(2) : p. 197-202.

[0155] 13. Sharp, J. O., et al., An inducible propane monooxygenase is responsible for N-nitrosodimethylamine degradation by *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol*, 2007. 73(21) : p. 6930-8.

[0156] 14. Hanisch, J., et al., Eukaryotic lipid body proteins in oleagenous actinomycetes and their targeting to intracellular triacylglycerol inclusions. : Impact on models of lipid body biogenesis. *Appl Environ Microbiol*, 2006. 72(10) : p. 6743-50.

[0157] 15. Brown, A. C. and T. Parish, Instability of the acetamide-inducible expression vector pJAM2 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Plasmid*, 2006. 55(1) : p. 81-6.

[0158] 16. Hanisch, J., et al., The *Ralstonia eutropha* H16 phasin PhaP1 is targeted to intracellular triacylglycerol inclusions in *Rhodococcus opacus* PD630 and *Mycobacterium smegmatis* mc2155, and provides an anchor to target other proteins. *Microbiology*, 2006. 152(Pt 11) : p. 3271-80.

[0001]

序列表

- <110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> 敲除MLDS基因的产油红球菌Rhodococcus sp. RHA-MLDS及其用途
 <130> 800223CG
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Primer a
 <400> 1
 cggaattcgg gaacagcagg aggacgagga at 32
 <210> 2
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Primer b
 <400> 2
 ccattcacta aacttaaaca ggcttgatcc ttcacgcttt tcg 43
 <210> 3
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Primer c
 <400> 3
 gtttaagttt agtggatggt cttgacgctg tcgatggtct tct 43
 <210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Primer d
 <400> 4
 cacaagcttt ctgagtcaga tcgagcgtgg gtt 33
 <210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0002]

<220>		
<223>	Primer f	
<400>	5	
	atgactgacc agaagacat cgacag	26
<210>	6	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Primer r	
<400>	6	
	tcaagccttc ttggccggag cagc	24
<210>	7	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Primer F	
<400>	7	
	caggatccac tgaccagaag accatcgaca gcgt	34
<210>	8	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Primer R	
<400>	8	
	caggatccag ccttcttggc cggagcagcc tt	32

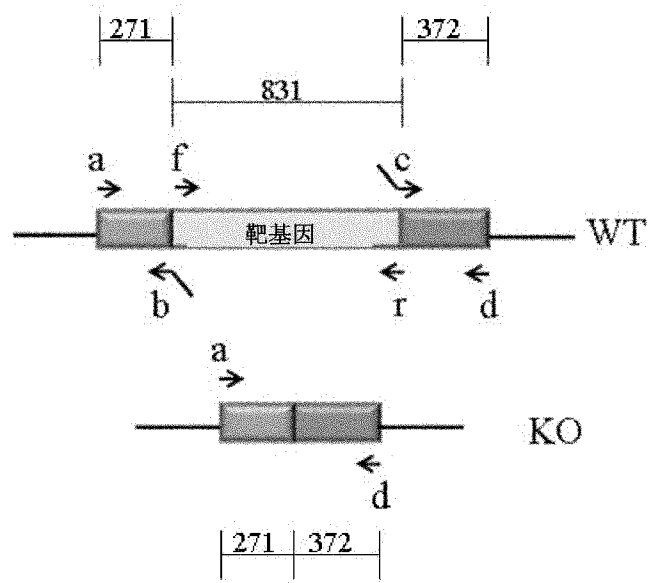


图 1

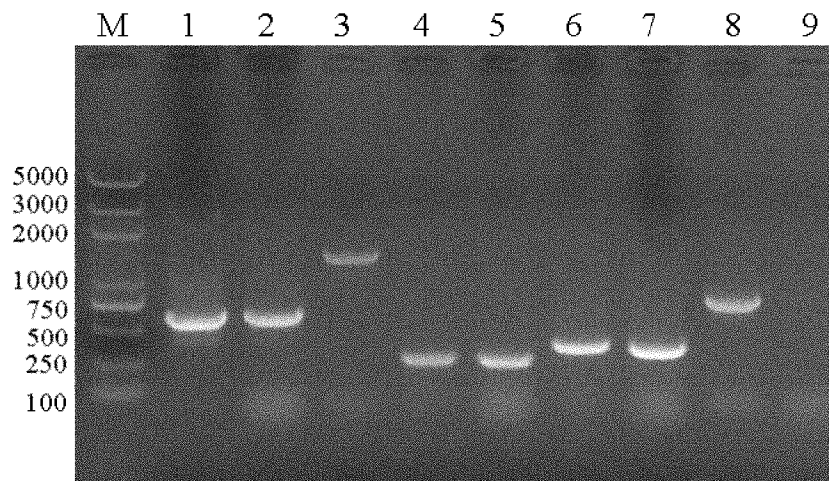


图 2