



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104754954 B

(45)授权公告日 2018.08.28

(21)申请号 201380055161.4

(22)申请日 2013.08.21

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104754954 A

(43)申请公布日 2015.07.01

(30)优先权数据

61/692,240 2012.08.23 US

61/781,103 2013.03.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.04.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2013/050712 2013.08.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/030165 EN 2014.02.27

(73)专利权人 特朗萨格以色列有限公司

地址 以色列雷霍沃特

(72)发明人 西瑞·摩什茨科

多伦·艾森施塔特 盖伊·列维

奥芙拉·陈

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 刘小立 郑霞

(51)Int.Cl.

G12N 1/13(2006.01)

A23J 3/20(2006.01)

G12N 15/18(2006.01)

A61K 38/22(2006.01)

审查员 温婧

权利要求书2页 说明书20页

序列表18页 附图14页

(54)发明名称

转基因微藻和其用于口服递送蛋白质的用途

(57)摘要

本发明提供了表达至少一种外源生物活性蛋白质的转基因微藻。该蛋白质表达微藻(protein-expressing microalgae)被用于向靶生物体口服递送呈其完整的和有功能形式的生物活性蛋白质。在藻类中表达的外源蛋白质的特征在于是生物活性的、发挥至少一种对摄入该藻类的受试者具有有益作用的特定活性。特别地,转基因微藻被用于作用于水生或陆生动物保健的动物食物或用于作用于人类健康的食物补充剂。

1. 一种转基因真核微藻,所述转基因真核微藻包括包含编码生物活性外源蛋白质的至少一种可转录的多核苷酸的表达盒,其中所述表达盒还包括核酸序列为SEQ ID NO:18所示的多核苷酸,所述核酸序列为SEQ ID NO:18所示的多核苷酸编码氨基酸序列为SEQ ID NO:4所示的功能性液泡靶向肽,并且其中所表达的生物活性外源蛋白质靶向所述转基因真核微藻的细胞的液泡,并且其中所述转基因真核微藻选自以下组成的组:三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、杜氏藻属(*Dunaliella* spp.)、微拟球藻属(*Nannochloropsis* spp.)、微绿球藻属(*Nannochloris* spp.)、四片藻属(*Tetraselmis* spp.)、球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)、巴夫藻属(*Pavlova* spp.)、透明茧形藻(*Amphiprora hyaline*)、牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)和富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)。

2. 如权利要求1所述的转基因真核微藻,其中所述表达盒还包括编码蛋白结构域的多核苷酸,所述蛋白结构域增强所述生物活性外源蛋白质被异种细胞或组织的摄入。

3. 如权利要求1所述的转基因真核微藻,所述转基因真核微藻是三角褐指藻。

4. 如权利要求1所述的转基因真核微藻,其中所述生物活性外源蛋白质具有多达150kDa的分子量。

5. 如权利要求4所述的转基因真核微藻,其中所述生物活性外源蛋白质具有治疗活性。

6. 如权利要求4所述的转基因真核微藻,其中所述生物活性外源蛋白质是激素。

7. 如权利要求6所述的转基因真核微藻,其中所述激素选自生长激素、食欲诱导激素和产卵激素组成的组。

8. 如权利要求7所述的转基因真核微藻,其中所述激素是具有SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的鲑鱼生长激素。

9. 如权利要求7所述的转基因真核微藻,其中所述激素是具有SEQ ID NO:24中列出的氨基酸序列的产卵激素。

10. 如权利要求7所述的转基因真核微藻,其中所述激素是具有SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列的食欲诱导激素。

11. 一种可食用组合物,所述可食用组合物包含根据权利要求1-10中任一项所述的转基因真核微藻。

12. 如权利要求11所述的可食用组合物,所述可食用组合物是动物食物组合物。

13. 如权利要求12所述的可食用组合物,所述动物食物组合物用于饲养水生动物。

14. 如权利要求12所述的可食用组合物,所述动物食物组合物用于饲养陆生农场动物。

15. 如权利要求11所述的可食用组合物,所述可食用组合物用于人类摄入。

16. 一种用于向有相应需要的受试者口服递送蛋白质的方法,所述方法包括向所述受试者口服施用有效量的如权利要求1-4中任一项所述的转基因真核微藻或包含其的组合物,其中所述蛋白质对所述受试者的生长、发育和存活中的至少一种具有有益的作用,条件是所述作用不是治疗作用。

17. 有效量的权利要求1-4中任一项所述的其中所述生物活性外源蛋白质对受试者具有治疗作用的转基因真核微藻在制备用于将具有治疗作用的所述生物活性外源蛋白质口服递送至所述受试者的组合物中的用途。

18. 如权利要求17所述的用途,其中所述生物活性外源蛋白质促进所述受试者的生长。

19. 如权利要求17所述的用途,其中所述生物活性外源蛋白质促进所述受试者的存活。
20. 如权利要求17所述的用途,其中所述生物活性外源蛋白质提高所述受试者的生殖率。
21. 如权利要求17-20中任一项所述的用途,其中所述受试者选自水生动物和陆生农场动物。
22. 如权利要求17-20中任一项所述的用途,其中所述动物受试者是人类。
23. 如权利要求11所述的可食用组合物用于饲养水生动物的用途。
24. 如权利要求11所述的可食用组合物用于饲养陆生农场动物的用途。

转基因微藻和其用于口服递送蛋白质的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及表达外源生物活性蛋白质的转基因微藻和其用于向动物和人类口服递送生物活性蛋白质的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 生物活性蛋白质对于活生物体的细胞功能是必不可少的,并且负责包括代谢过程的催化、通信、防御、移动和运输的大多数细胞活性。生物活性蛋白质的口服递送典型是用于两个主要目的所需的:治疗性蛋白质的递送和对动物包括人类具有营养的或另一种有益作用的蛋白质的递送。

[0004] 随着世界范围内对食物特别地对动物蛋白质增加的需求,加之意识到动物生长的环境影响,需要开发将改进陆生(terrestrial)和水生农场动物(aquatic farm animals)的繁殖和体重增加的精细化农业管理工具。用于海洋动物包括鱼、甲壳纲动物(crustaceans)和软体动物(mollusks)的生长的水产养殖的发展尤其重要,因为海洋动物被认为是更健康的蛋白质来源。

[0005] 然而,水产养殖对于生长海洋动物且特别是鱼仍然不是完全有效的系统。典型地,鱼需要相对长的时间周期以达到可接受的尺寸和重量。此外,许多品种的鱼以无效的方式成熟,使得问题可在鱼群中发生,导致由于过度缓慢生长、差的形态(对于观赏鱼)等造成的部分群体的损失。此外,在人工水产养殖环境中,水生动物对传染病更为敏感,并且当疾病确实发生时,疾病可以以高的致死率快速传遍整个群体。

[0006] 因此对向陆生和水生农场动物施用治疗性或营养性蛋白质的途径存在需求,所述途径是不昂贵的且不需要费力。向人类口服递送治疗性或营养性蛋白质也是高度可期望的,因为这种施用模式不需要专业人力并且显著提高患者对处方剂量的依从性。蛋白质的生物活性取决于它的序列和/或构象,该构象在蛋白质到达它的活性靶之前必须被维持。对于成功的口服递送,蛋白质应该被保护免受化学和酶促降解,这种降解可发生在将蛋白质加工成食物或饲料组合物的过程和通过经由动物胃肠道的递送过程。除此之外,蛋白质应该克服阻止进入动物或接近靶目的地的结构障碍。

[0007] 微藻类(单细胞藻类或浮游植物)代表地球上最大的、但是最缺乏了解的微生物界。如同植物对于陆生动物,微藻代表水生食物链中所有植物营养素的天然营养基础和主要来源。已经报道了藻类中重组蛋白质的表达,并且多种方法可用于在藻类细胞中尤其是在细胞质体中产生外源蛋白质。国际(PCT)申请公布号W0 2011/063284公开了在光合生物体包括原核生物如蓝藻细菌和真核生物如藻类和植物中表达治疗性蛋白质的方法。真核生物转化优选地进入质体基因组,典型地进入叶绿体基因组。此申请公开了藻类细胞中特定治疗性蛋白质的表达。

[0008] 已经做出多种尝试以使用微藻作为用于蛋白质的递送工具。例如,国际(PCT)申请公布号W0 01/98335公开了用于向宿主动物递送生物活性蛋白质的递送系统和方法。提供的系统和方法包括获得被表达载体转化的藻类细胞,所述表达载体包括可操作地连接到启动子的编码生物活性蛋白质的核苷酸序列。在一个阐述的实施方案中,生物活性蛋白质是

抗原表位并且向动物施用后藻类细胞诱导宿主动物体内的免疫应答。

[0009] 国际 (PCT) 申请公布号 WO 2002/076391 公开了微生物细胞的用途, 该微生物细胞用作水产养殖和农业中的饲料成分, 并且该微生物细胞还包括外源肽、蛋白质、和/或抗体, 其将传递对病毒或细菌病原体的耐受性或免疫力或以其他方式改善摄入所述微生物细胞的物种的健康和表现。微生物细胞可以是酵母、真菌、细菌或藻类。蛋白质和/或抗体可通过微生物自身的直接遗传修饰或通过使用已被改变以表达感兴趣蛋白质的病毒感染微生物, 在微生物细胞内表达。

[0010] 国际 (PCT) 申请公布号 WO 2008/027235 公开了用于水生动物中疾病或紊乱的预防、改善或治疗的方法, 该方法通过使用遗传修饰的微藻直接地或间接地饲养水生动物, 该微藻表达特异性靶向感染水生动物的病原体的一种或更多种关键表位的重组分子。

[0011] 美国专利申请公布号 2011/0014708 公开了在藻类中生产外来的期望的基因产物的方法和包含转基因藻类或它的后代的饲料组合物, 该方法包括使用蛋白酶溶液弱化或移除藻类细胞壁以促进基因转化。本发明还提供了用于在藻类中表达牛乳铁蛋白 (LFB) 的修饰的核酸。

[0012] 然而, 对易于生产和使用、维持蛋白质的生物活性并且改善生物活性蛋白质的全身吸收的口服递送系统仍然有未满足的需求并且具有所述口服递送系统将是高度有益的。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供了用于向生物体口服递送生物活性蛋白质的基于藻类的平台, 提供呈其活性形式的生物活性蛋白质的全身性吸收。特别地, 本发明提供了在预定的亚细胞区室中表达至少一种外源蛋白质的转基因微藻。蛋白质表达微藻 (protein-expressing microalgae) 被用作适用于饲养水生动物和陆生动物的动物食物或食物添加剂以及适用于人类的食物补充剂。外源蛋白质的特征在于是生物活性的、发挥至少一种对靶生物体具有有益作用的特定活性。

[0015] 本发明部分地基于以下的意外发现: 当藻类被水生动物 (包括鱼和甲壳纲动物) 以及被陆生动物 (包括小鼠和家禽) 口服摄入时, 表达的蛋白质保持活性并且发挥其具有有益作用的特定活性。典型地, 蛋白质保持呈其完整形式。不希望受任何特殊的理论或作用机制约束, 保持的蛋白质活性可归因于其位于完整的微藻中, 使得微藻细胞作为保护蛋白质免受在动物的胃肠道和/或酸性的胃中的降解的天然包装材料。根据本发明的某些典型的实施方案, 蛋白质在微藻的亚细胞区室中, 尤其是在液泡中表达。

[0016] 因此, 根据一方面, 本发明提供了包括包含编码生物活性外源蛋白质的至少一种可转录的多核苷酸的表达盒的转基因真核微藻, 其中生物活性外源蛋白质在微藻细胞的亚细胞区室中表达。

[0017] 蛋白质在其中表达的亚细胞区室取决于微藻的种类、表达的蛋白质的类型和将要饲养的动物种类。根据某些实施方案, 亚细胞区室选自液泡、内质网、高尔基系统、溶酶体和过氧化物酶体组成的组。每一种可能性代表了本发明的单独实施方案。

[0018] 根据某些示例性实施方案, 外源蛋白质在微藻细胞的液泡中表达。根据这些实施方案, 表达盒还包括编码液泡靶向肽 (vacuole targeting peptide) 的多核苷酸。根据一些实施方案, 将外源蛋白质靶向液泡中的肽是具有 SEQ ID NO:4 中列出的氨基酸序列的短的液泡前导序列。根据其他实施方案, 编码短的液泡前导肽的多核苷酸包括 SEQ ID NO:18 中

列出的核酸序列。

[0019] 根据某些其他示例性实施方案,外源蛋白质在微藻细胞的内质网(ER)中表达。根据这些实施方案,表达盒还包括编码ER靶向肽(ER targeting peptide)的多核苷酸。根据一些实施方案,将外源蛋白质靶向ER中的肽是具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)内质网(Bip)前导序列。根据其他实施方案,编码ER前导肽的多核苷酸包括SEQ ID NO:16中列出的核酸序列。

[0020] 根据本发明的教导可使用各种微藻种类。根据某些实施方案,根据本发明的教导使用的微藻是海洋微藻。根据某些实施方案,微藻选自但不限于由以下组成的组:三角褐指藻;杜氏藻属(*Dunaliella* spp.);微拟球藻属(*Nannochloropsis* spp.)包括眼点拟微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)、盐生微拟球藻(*Nannochloropsis salina*)、海洋富油微拟球藻(*Nannochloropsis gaditana*);微绿球藻属(*Nannochloris* spp.);四片藻属(*Tetraselmis* spp)包括亚心形扁藻(*Tetraselmis suecica*)、朱氏扁藻(*Tetraselmis chui*);球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*);巴夫藻属(*Pavlova* spp.);透明茧形藻(*Amphiprora hyaline*);牟氏角毛藻(*Chaetoceros mueller*);和富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)。每一种可能性代表了本发明的单独实施方案。

[0021] 根据某些特定的实施方案,微藻选自由三角褐指藻、微绿球藻属、微拟球藻属和杜氏藻属组成的组。

[0022] 根据其他特定的实施方案,微藻是三角褐指藻。

[0023] 本发明的转基因微藻可以被转化以表达对摄入其的靶动物具有作用的任何蛋白质。

[0024] 根据某些实施方案,表达的蛋白质的分子量多达150kDa。根据其他实施方案,表达的蛋白质的分子量多达140kDa、130kDa、120kDa或110kDa。根据其他实施方案,表达的蛋白质的分子量在1-100kDa的范围内。根据某些示例性实施方案,表达的蛋白质的分子量在1-50kDa的范围内。

[0025] 根据某些实施方案,蛋白质对摄入动物的生长、发育和存活中的至少一种具有有益的作用。每一种可能性代表了本发明的单独实施方案。根据其他实施方案,蛋白质对摄入转基因微藻的动物具有治疗作用。

[0026] 根据又另外的实施方案,动物是水生动物并且表达的蛋白质影响水生动物形态。根据一些实施方案,蛋白质对水生动物身体变形具有影响。身体变形包括但不限于任何形态的不规则、任何体型的不对称、不规则的身体形状、不规则的鳍的形状、不规则的尾巴的形状;不规则的身体/鳍的面积、长度或宽度的比例;不规则的身体/尾巴的面积、长度或宽度的比例;不规则的尾巴/鳍的面积、长度或宽度的比例;或身体任何部位的不规则。根据某些当前特定的实施方案,表达的蛋白质降低或消除水生动物的身体变形。

[0027] 根据某些另外的实施方案,转基因微藻表达激素。根据一些实施方案,动物是水生动物并且激素选自由生长激素、食欲诱导激素(appetite inducing hormone)和产卵激素组成的组。每一种可能性代表了本发明的单独实施方案。

[0028] 根据某些当前特定的实施方案,表达的蛋白质是鱼生长激素。根据一些实施方案,鱼生长激素是具有SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的鲑鱼生长激素。根据某些特定的实施方案,鱼生长激素由具有SEQ ID NO:1中列出的核酸序列的多核苷酸编码。

[0029] 根据另外的实施方案,表达的蛋白质是具有SEQ ID NO:24(登录号:P68072)中列出的氨基酸序列的产卵激素。根据某些特定的实施方案,产卵激素由具有SEQ ID NO:25中列出的核酸序列的多核苷酸编码。

[0030] 根据又另外的实施方案,表达的蛋白质是具有SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列的食欲诱导激素。根据某些特定的实施方案,食欲诱导激素由具有SEQ ID NO:21中列出的核酸序列的多核苷酸编码。

[0031] 根据另外的方面,本发明提供了可食用组合物,所述可食用组合物包含本发明的转基因微藻。根据一些实施方案,可食用组合物是动物食物组合物。根据示例性实施方案,动物食物组合物用于饲养水生动物。根据又其他实施方案,可食用组合物用于人类摄入。如上文描述的,可食用组合物用于生物活性蛋白质的口服递送。根据一些实施方案,特别地当可食用组合物用于动物摄入时,可食用组合物基本上由转基因藻类组成。根据另外的实施方案,可食用组合物由转基因藻类组成。可食用组合物本身可被使用或用作动物或人类食物的添加剂。

[0032] 根据另一方面,本发明提供了向动物递送生物活性蛋白质的方法,所述方法包括向动物受试者口服施用转基因真核微藻,所述转基因真核微藻包括包含编码生物活性蛋白质的至少一种可转录的多核苷酸的表达盒,其中所述生物活性蛋白质在微藻细胞的亚细胞区室中表达。

[0033] 根据某些实施方案,亚细胞区室选自自由液泡、内质网、高尔基系统、溶酶体和过氧化氢酶体组成的组。每一种可能性代表了本发明的单独实施方案。

[0034] 根据某些特定的实施方案,外源蛋白质在微藻细胞的液泡中表达。根据其他特定的实施方案,外源蛋白质在微藻细胞的内质网中表达。

[0035] 根据一些实施方案,转基因真核微藻在动物或人类食物组合物中施用。

[0036] 根据另外的方面,本发明提供了用于改进动物生长速率、生长模式、生殖健康状态、存活或其任何组合中的至少一种的方法,所述方法包括向动物施用有效量的本发明的转基因微藻或包含其的组合物,从而改进所述动物的生长速率和/或生长模式和/或存活和/或生殖健康状态。

[0037] 根据某些实施方案,动物受试者是陆生动物或水生动物。陆生动物可任选地是生长用于食用或非食用目的的任何动物(后者包括但不限于役用动物、宠物等等),包括但不限于牛、猪、马、狗、猫、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、家禽等等。水生动物可任选地是生长用于食用或非食用目的的任何动物(后者包括但不限于观赏性的等等),包括但不限于鱼、甲壳纲动物和珊瑚。根据另外的实施方案,动物受试者是人类。

[0038] 本发明的其他目标、特征和优势将从以下描述和附图中变得清楚。

[0039] 附图简述

[0040] 图1显示了完整的pPhaT1表达载体的示意图。

[0041] 图2显示了提取自表达靶向不同亚细胞器的鲑鱼生长激素的转基因藻类物种三角褐指藻的蛋白质的蛋白印迹。

[0042] 图3显示了与使用普通鱼食物饲养的鱼(对照)相比,使用包含过表达靶向ER(356)或靶向液泡(398)的鱼生长激素的转基因藻类的鱼商业普通食物饲养的神仙鱼(Angel fish)的总的生长表现。鱼生长展示为相对于初始鱼重量,重量增加的百分比。

[0043] 图4显示了与使用普通鱼食物饲养的鱼相比,使用包含表达靶向液泡的fGH的藻类(398)的普通食物饲养鱼导致鱼的数目增加超过2gr。

[0044] 图5显示了过表达fGH的转基因藻类作为食物补充剂施用对神仙鱼的总重量的影响。398-包含4%的表达液泡靶向的fGH的藻类的普通鱼食物。对照-仅普通鱼食物。鱼生长展示为相对于初始鱼重量,重量增加的百分比。

[0045] 图6显示了摄入包含过表达液泡靶向的fGH的转基因藻类的鱼普通食物对锦鲤外形的变形的影响。398-包含4%的表达fGH的藻类的普通鱼食物。对照-仅普通鱼食物。

[0046] 图7显示了过表达fGH的转基因藻类的摄入对金鱼总重量的影响。398-包含4%的表达液泡靶向的fGH的藻类的普通鱼食物。对照-仅普通鱼食物。

[0047] 图8显示了使用野生型三角褐指藻(图8A)、野生型微绿球藻(图8B)和表达液泡靶向的鱼生长激素的三角褐指藻(图8C)饲养的丰年虾(brine shrimp)(卤虫(*Artemia*))的图。饲料以活的藻类补充。

[0048] 图9显示了使用野生型微绿球藻(对照)、使用野生型三角褐指藻(w.t.)、或使用表达靶向液泡的fGH(398)的三角褐指藻饲养的丰年虾的体长。饲料以活的藻类补充。

[0049] 图10显示了包含表达fGH的微藻的食物对虾罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)重量的影响。398-使用补充有过表达靶向藻类液泡的鱼生长激素的转基因藻类的普通食物饲养的虾。对照-仅使用普通食物饲养的虾。虾的重量在6周后测量。

[0050] 图11显示了使用野生型藻类(图11A)或使用表达液泡靶向的GFP的藻类(构建体527,图11B)饲养的罗非鱼的胃的荧光成像。图像在饲养4小时后在荧光下拍摄。

[0051] 图12显示了使用野生型藻类(图12A)或使用表达液泡靶向的GFP的藻类(图12B)饲养的罗非鱼的肠的荧光成像。图像在饲养5小时后在荧光下拍摄。

[0052] 图13显示了使用野生型(图13A)和表达液泡靶向的GFP的藻类(图13B)饲养的丰年虾(*Brine Shrimp Artemia*)的培养物的荧光成像。图像在饲养4小时后在荧光下拍摄。

[0053] 图14显示了使用野生型(WT)和表达液泡靶向的GFP的藻类饲养的虾罗氏沼虾在亮光(图14A)和荧光下(图14B)拍摄的图像。

[0054] 图15显示了饲养6小时后从使用野生型(WT)和表达液泡靶向的GFP的藻类饲养的鸡分离的肝脏在亮光(图15A)和荧光下(图15B)拍摄的图像。

[0055] 图16显示了表达fGH的藻类吸收进入鱼血液中。罗非鱼使用表达液泡-GFP的藻类(构建体527)或使用表达液泡-fGH的藻类(构建体398)强制饲养。血液中fGH的水平通过使用特异性针对重组fGH的ELISA确定。结果以平均值 $\pm$ SEM显示。结果是4次独立实验的代表。

[0056] 图17展示了在藻类液泡中表达的GFP的活性形式,以完整的和有功能的形式从鱼的肠道吸收进入它的血液。罗非鱼使用表达液泡-GFP的藻类(构建体527)或使用表达液泡-fGH的藻类(构建体398)强制饲养。血液中GFP的水平通过使用荧光酶标仪(515nm)确定。结果以平均值 $\pm$ SD显示。结果是3次独立实验的代表。

[0057] 图18展示了靶向藻类细胞液泡的外源蛋白质在鱼胃肠道中被保护免受降解。图18A显示了获自表达液泡靶向的-GFP的藻类(构建体527)、这些藻类的全蛋白质提取物(GFP)和来自表达液泡靶向的-fGH的藻类(构建体398)的初始GFP-荧光。图18B显示了获自使用以上描述的藻类或蛋白质提取物的每一种饲养的罗非鱼的血液样品的荧光。血液中GFP的水平通过使用荧光酶标仪(515nm)确定。结果以平均值 $\pm$ SD显示。

[0058] 图19展示了靶向藻类细胞液泡的外源fGH到达使用所述藻类饲养的小鼠的血液和肝脏。小鼠使用表达液泡-fGH的藻类(构建体398)或表达液泡-GFP的藻类(构建体527)饲养。肝脏中fGH的水平通过使用特异性针对重组fGH的ELISA确定。结果以平均值±SD显示。

[0059] 发明详述

[0060] 本发明提供了用于向需要生物活性蛋白质的生物体口服递送生物活性蛋白质的组合物和方法。特别地,本发明提供了表达生物活性蛋白质的微藻和包含其的可食用组合物。本发明展示了,蛋白质的生物活性在被摄入的藻类中维持,且此外还展示了,蛋白质在摄入转基因微藻的生物体的细胞或组织中发挥其生物活性。

[0061] 定义

[0062] 术语“微藻”或“微藻类”在本文以其最宽的范围使用并指单细胞的微观的真核藻类,通常见于淡水和海洋系统中。取决于种类,微藻的大小范围可从几微米(μm)到几百微米。根据某些当前特定的实施方案,该术语指海洋真核微藻或微藻类。

[0063] 术语“基因”指包含用于产生RNA或多肽必需的编码序列的核酸(例如DNA或RNA)序列。多肽可以被全长编码序列编码或被其任何部分编码。当涉及基因使用时,术语“其部分”指该基因的片段。片段的大小范围可以从几个核苷酸到整个基因序列减去一个核苷酸。因此,“包含基因的至少一部分的核酸序列”可以包括基因的片段或整个基因。

[0064] 术语“基因”任选地还包含结构基因的编码区以及包含位于5'和3'两者末端临近编码区、任一末端上约1kb的距离的序列,使得基因对应于相应全长mRNA的长度。位于编码区5'的和在mRNA上出现的序列称为5'非翻译序列。位于编码区3'或下游的和出现在mRNA上的序列称为3'非翻译序列。

[0065] 遍及说明书中可互换地使用术语“蛋白质”、“蛋白质序列”和“氨基酸序列”以命名通过肽键彼此连接的氨基酸残基的线性系列。该术语还包括肽。

[0066] 术语“多核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核酸序列”在本文可互换地使用。这些术语包括核苷酸序列等。多核苷酸可以是RNA或DNA的聚合物或其杂合体,即是单或双链的、线性的或支链的,以及任选地包括合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。术语还包括RNA/DNA杂合体。根据某些当前示例性实施方案,本发明的多核苷酸基于感兴趣蛋白质的氨基酸序列,使用待转化的特定微藻种类的密码子使用被设计。

[0067] 术语“表达盒”和“构建体”或“DNA构建体”在本文可互换地使用并指人工组装的或分离的核酸分子,其包含编码感兴趣蛋白质的多核苷酸。构建体还包含标志物基因,其在一些情况中也可以编码感兴趣蛋白质。表达盒还包含可操作地连接到编码感兴趣蛋白质的多核苷酸的合适的调节序列。应该理解的是,构建体中包含调节序列是任选地,例如,在将使用宿主细胞的调节序列的情况下可以不需要这样的序列。

[0068] 根据某些实施方案,生物体包括包含可操作地连接的启动子序列、编码感兴趣蛋白质的多核苷酸和终止序列的表达盒。

[0069] 术语“可操作地连接”指核酸序列在单个核酸片段上的缔合以便一个的功能被另一个调节。例如,启动子可操作地与编码序列连接,此时它能够调节该编码序列的表达(即,编码序列在启动子的转录控制下)。编码序列可以以正义或反义方向可操作地连接到调节序列。

[0070] 在本文使用的术语“启动子元件”、“启动子”或“启动子序列”指位于DNA聚合物的

蛋白质编码区的5'末端的上游(即在其之前)的DNA序列。自然界中已知的大多数启动子位于转录区之前。启动子起开关的作用,激活基因或其部分的表达。如果基因被激活,称其被转录,或参与转录。转录包括从基因合成mRNA。因此,启动子作为转录调节元件并且还提供了用于基因转录为mRNA的起始位点。启动子可以整体地衍生自天然的基因,或由衍生自自然界中发现的不同启动子的不同元件组成、或甚至包括合成的DNA区段。本领域技术人员能够理解,不同的启动子可以指导基因或其部分在不同组织或细胞类型中、或在不同的发育阶段、或对不同环境条件响应的表达。还认识到,因为在大多数情况下调节序列的精确边界并没有完全定义,一些变化形式的DNA片段可以具有相同的启动子的活性。在大多数时间在大多数细胞类型中引起基因表达的启动子通常称为“组成型启动子”。

[0071] 根据本发明的教导,启动子可以是生物体的天然的启动子或异源启动子,其可以是组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子。

[0072] 根据本发明的教导,本领域已知的在微藻类中有活性的任何启动子可被使用。非限制实例是墨角藻黄素叶绿素蛋白(fucoxanthin chlorophyll protein)A(fcpA)、B(fcpB)、C(fcpC)和E(fcpE)启动子和任何捕获光能的叶绿素复合体(light harvesting complex)(Lhc)启动子。非捕获光能的相关启动子也可被使用,包括但不限于,胭脂氨酸合酶启动子、来自根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的Ti质粒的聚腺苷化序列、tubB2的启动子区、来自噬菌体λ的PL启动子、CaMV 35S启动子、细菌 ϕ 启动子、热休克蛋白70A启动子(HSP70A)、以及Rubisco小亚基2的启动子(RBCS2)。

[0073] 在本文使用的术语“食物”指用于人类或动物摄入的食物,所述动物包括陆生和水生动物。

[0074] 在本文使用的术语“水产养殖”指受控制条件下培养的水生生物体。“水生生物体”是在淡水或盐水水中生长的生物体。水生生物体包括但不限于,鱼例如鲈鱼、条纹鲈鱼、罗非鱼、鲶鱼、海鲷、虹鳟鱼、斑马鱼、眼斑拟石首鱼、金鱼、锦鲤、神仙鱼、和鲤鱼;甲壳纲动物例如对虾、丰年虾、淡水和盐水虾、和卤虫;以及轮虫。

[0075] 用于实施本发明的特定实施方案

[0076] 以下提及动物尤其是水产养殖中生长的动物和模式陆生动物阐述本发明的教导,作为用于本发明的至少一些方面的实施的非限制实例。

[0077] 目前可得的水产养殖系统一般分为开放的或封闭的。开放的系统典型地通过在例如湖泊或溪流的水体中建立网箱来创建。封闭的系统一般地在封闭的水槽中再循环水,水从水槽泵出通过处理循环并且回到水槽。

[0078] 水产养殖系统用于生长水生动物例如鱼、甲壳纲动物和软体动物,至它们可市售用于不同用途的大小,主要地作为食物产品但也作为观赏品。根据至少一些实施方案,本发明提供了用于鱼或其他水生动物的改进的食物。合适的食物构成了水产养殖系统的重要方面;本发明的教导提供了用于生产具有增强的结果的食物的手段和方法,该增强的结果包括改进的生长(包括增强长度和/或重量增加)、改进的生长模式(特别地减少或消除身体变形)、缩短至性成熟或另一生命周期阶段的时间、改进整体健康(包括提高存活率)或其组合。

[0079] 包含生物活性蛋白质的可食用组合物的口服施用在水产养殖和农业中具有明显的经济价值,消除向每一个动物单独地施用组合物的需要。

[0080] 治疗性可食用组合物也是人类高度期望的,因为它们施用不需要(治疗性化合物的施用例如静脉注射所需的)专业人力并且容易摄入从而加强患者在服用规定剂量方面的依从性。

[0081] 根据一方面,本发明提供了包括包含编码生物活性外源蛋白质的至少一种可转录的多核苷酸的表达盒的转基因真核微藻,其中生物活性外源蛋白质在微藻细胞的亚细胞区室中表达。

[0082] 根据本发明的教导可使用各种藻类物种。根据某些实施方案,藻类是海洋微藻。根据本发明的教导可使用的海洋微藻的示例性列表包括但不限于,三角褐指藻;杜氏藻属;微拟球藻属包括眼点拟微绿球藻、盐生微拟球藻、海洋富油微拟球藻;微绿球藻属;四片藻属包括亚心形扁藻、朱氏扁藻;球等鞭金藻;巴夫藻属;透明茧形藻;牟氏角毛藻;以及富油新绿藻。藻类来自并代表大的分类学横截面的物种(表1)。

[0083] 表1:一些真核藻类的系统发生

[0084]

属	科	目	门	界
褐指藻属	褐指藻科 (Phaeodactylaceae)	舟形藻目 (Naviculales)	硅藻门 (Bacillariophyta)	囊泡藻界 (Chromalveolata)
杜氏藻属	杜氏藻科 (Dunaliellaceae)	团藻目 (Chlamydomonadales)	绿藻门 (Chlorophyta)	绿色植物界 (Viridaplantae)
微绿球藻属	胶球藻科 (Coccomyxaceae)	绿球藻目 (Chlorococcales)	绿藻门	绿色植物界
四片藻属	绿枝藻科 (Chlorodendraceae)	Chlorodendrales	绿藻门	绿色植物界
微拟球藻属	拟单胞藻科 (Monodopsidaceae)	真眼藻目 (Eustigmatales)	异鞭藻门 (Heterokontophyta)	Chromobiota
巴夫藻属	Pavlovaceae	巴夫藻目 (Pavlovales)	定鞭藻门 (Haptophyta)	Chromobiota
等鞭金藻属 (Isochrysis)	等鞭金藻科 (Isochrysidaceae)	等鞭金藻目 (Isochrysidales)	定鞭藻门	Chromobiota

[0085] 系统发生根据Guiry, M D和Guiry G M. 2013. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.

[0086] 根据某些特定的实施方案,根据本发明的教导使用的转基因微藻是三角褐指藻。藻类三角褐指藻是构成部分浮游植物以及源自温带气候的硅藻的单细胞藻类。这种藻类容易接受转化并且转化的藻类在水产养殖中生长良好。此外,这种藻类是无毒性的且非致病的,并且可作用于动物尤其是鱼和海洋无脊椎动物但也用于陆生动物的食物来源。

[0087] 本发明的转基因微藻的主要用途是作为可食用组合物。在藻类细胞中表达的外源蛋白质应以其活性形式到达摄入组合物的受试者的靶细胞或组织,其中受试者是水生或陆生动物,包括人类。在生物活性蛋白质的口服递送中一个主要障碍是在口服递送产品的制备和其存储过程期间以及其后在靶受试者体内在胃肠道中,蛋白质对环境条件的敏感性。

[0088] 本发明目前显示了,当微藻被水生和陆生动物摄入时,在微藻的亚细胞区室中表达的外源蛋白质保持其活性。不希望被任何特定理论或作用机制束缚,蛋白质活性可以通过完整的藻细胞特别地通过细胞壁被保持,其可以作为保护蛋白质在藻类生物量的生长和处理过程中免受外部严酷环境并且此外保护蛋白质免受摄入藻类的受试者动物的胃肠道环境的包装形式起作用。

[0089] 根据某些实施方案,亚细胞区室选自自由液泡、内质网、高尔基系统、溶酶体和过氧化物酶体组成的组。每一种可能性代表了本发明的单独实施方案。根据某些当前特定的实施方案,外源蛋白质在微藻细胞的液泡中表达。在藻类叶绿体中表达外源蛋白质明确地从本发明排除。

[0090] 口服递送蛋白质过程中需要解决的另一个问题是蛋白质和肽穿透通过严格限制它们的穿透的靶动物受试者的胃肠道上皮细胞膜。蛋白质分配进入上皮细胞膜用于跨细胞吸收需要最低水平的亲脂性。出乎意料地,本发明目前展示了,将待表达的多核苷酸靶向植物液泡中导致表达的、生物活性蛋白质向摄入转基因微藻的动物的血流中的有效转移。将蛋白质靶向液泡中相对于靶向其他细胞区室包括叶绿体是有优势的。液泡是细胞内膜系统的部分;因此,不希望受单个假设或作用机制的限制,将肽或蛋白质靶向作为内膜系统的部分的微藻细胞液泡,可以提高藻类被动物受试者摄入并且其壁被动物受试者降解后通过动物胃肠道的吸收。这种吸收方面的提高可能是由于提高肽和蛋白质分子被上皮细胞膜“感知的”亲脂性,导致通过肠道的有效吸收。此外,还有可能的是通过液泡提供蛋白提高了蛋白的存储稳定性。以上各种组合也可起作用。在任何一种情况下,将蛋白质靶向液泡明显提高了口服施用蛋白质的功能效力,如以下更详细示例的描述。

[0091] 此外,通过微藻表达的外源蛋白质可被设计使得增强其被摄入转基因藻类的动物受试者的上皮细胞膜的摄取。根据一些实施方案,本发明的表达盒还包含编码蛋白结构域的多核苷酸,该蛋白结构域增强表达的外源蛋白质被异种细胞或组织的摄取。

[0092] 增强特定摄取的结构域根据异种细胞的类型选择,其依赖于摄入转基因微藻的受试动物的种类。根据某些实施方案,表达盒还包含编码细胞穿透肽(CPP)的多核苷酸。根据一些实施方案,CPP选自但并不限于由以下组成的组:来自根据三角褐指藻密码子使用合成的人类免疫缺陷病毒1的反式激活转录激活因子(trans-activating transcriptional activator,TAT)(SEQ ID NO:9)或其部分;以及根据三角褐指藻密码子使用合成的成纤维细胞生长因子的膜移位序列(SEQ ID NO:7)或其部分。每一种可能性代表了本发明的单独实施方案。

[0093] 根据本发明的教导,具有各种生物活性的蛋白质可以在微藻细胞中表达。根据某些实施方案,蛋白质对摄入转基因微藻的受试者具有治疗作用。根据其他实施方案,蛋白质促进摄入转基因微藻的受试者的生长。根据又另外的实施方案,蛋白质促进摄入转基因微藻的受试者的存活。根据又另外的实施方案,蛋白质提高摄入转基因微藻的受试者的生殖率。

[0094] 根据某些示例性实施方案,转基因微藻表达激素。根据一些实施方案,激素选自食欲诱导激素、促性腺激素释放激素(产卵激素)和生长激素组成的组。根据某些当前特定的实施方案,生长激素是鱼生长激素。

[0095] 需要理解的是本发明不包括使用本发明的转基因微藻作为用于疫苗的外源蛋白质的来源。

[0096] 根据本发明的教导,可使用现有技术中已知的用于转化微藻的任何方法。转化方法包括粒子轰击、电穿孔、微穿孔(microporation)、在外源DNA存在下涡流细胞、酸洗珠和聚乙二醇介导的转化。用于真核藻类转化的方法和工具可见于例如国际(PCT)申请公布号WO 1997/039106。

[0097] 典型地,为了制备用于制造转基因藻类的载体,编码外源蛋白质的多核苷酸首先被克隆进入表达载体,即可以整合进入藻类基因组的质粒。在这种表达载体中,编码外源蛋白的DNA序列可操作地连接到表达控制序列即启动子,该启动子指导mRNA合成。如上所述,启动子可以是内源性启动子,即,指导通常存在于藻类中的基因转录的启动子。根据某些实施方案,载体还包含编码能够选择转化的藻类的抗性基因的多核苷酸。根据某些当前示例性实施方案,载体包含编码赋予zeocine和腐草霉素抗性的蛋白质的多核苷酸。

[0098] 转化的藻类的培养条件取决于使用的藻类的种类,如技术人员已知的以及如以下示例的。典型地藻类在能够进行光合作用的条件下生长。因为光合作用需要日光和CO₂并且微藻还需要混合有适当的肥料的淡水、咸水或海水来生长,微藻可以在例如开放的池塘和湖泊中进行培养。但是,开放的系统比封闭的系统更易污染,并且此外,在开放的水体(aqueous reservoirs)中生长的遗传修饰的微藻对环境可能是危险的。此外,在开放的系统中对水的温度、CO₂的浓度、以及光照条件的控制较少。生长季节主要地取决于位置,并且除了热带区域以外,受限于一年中较温暖的月份。但是,开放的系统比建立和/或维持封闭系统更便宜。

[0099] 因此生长微藻的另一种方法是使用半封闭系统,例如使用一种构造物例如温室类型的构造物覆盖池塘或水池。虽然这可导致较小的系统,但它解决了与开放的系统相关的许多问题。半封闭系统的优势是其可以通过允许感兴趣的微藻与入侵的生物体竞争其生长需要的养分,允许期望的微藻对入侵的生物体占有优势,并且可以延长生长季节。例如,如果系统被加热或冷却,微藻可以一年四季生长。

[0100] 可选地,微藻可以在例如光生物反应器的封闭构造物中生长,其中,环境处于比在开放的系统或半封闭系统中更严格的控制下。光生物反应器是并入一些类型的光源以提供输入反应器的光子能量的生物反应器。术语光生物反应器可以指对环境是封闭的并且与环境不具有直接的气体 and 污染物交换的系统。光生物反应器可以被描述为设计用于光养性液体细胞悬浮培养物的受控的生物量产生的封闭的、照明的培养物容器。光生物反应器的实例包括,例如,玻璃容器、塑料/玻璃管道、储水池、塑料套管以及袋。可用于提供维持光合作用所需的能量的光源的实例包括,例如,荧光灯、LED和自然阳光。因为这些系统是封闭的,生物体生长需要的一切事物(例如,二氧化碳、养分、水和光)必须被引进生物反应器。尽管建立和维持光生物反应器需要成本,它们相比开放的系统具有一些优势,例如,它们可阻止或最小化污染、提供对培养条件(例如,pH、光、二氧化碳和温度)更好的控制、阻止水分蒸发、由于排气而降低二氧化碳损耗、以及允许更高的细胞浓度。另一方面,光生物反应器的某些要求,例如冷却、混合、氧气积累以及生物污染的控制,使得建立和操作这些系统比开放的系统或半封闭系统更昂贵。光生物反应器可被建立用于持续地收获(如同大多数较大体积培养系统)或一次收获一批(例如,使用聚乙烯袋培养)。批次光生物反应器被建立具有例如,养分、微藻和水,并且微藻被允许生长直到该批次被收获。可例如持续地、每天地或以固定的时间间隔收获持续的光生物反应器。

[0101] 可例如通过从包含微藻的液体表面下鼓泡CO₂将CO₂递送至本文描述的任何系统。喷雾法也可以用于将CO₂注射进入液体。喷雾器是例如多孔盘或管道组件,其也称为起泡器、碳酸化器、充气器、多孔石和扩散器。

[0102] 可以用在本文描述的系统中的养分包括,例如,氮气(以NO₃⁻或NH₄的形式、磷和微

量金属(Fe、Mg、K、Ca、Co、Cu、Mn、Mo、Zn、V和B)。养分可以以例如固体形式或液体形式。如果养分以固体形式,它们可在向包含微藻的液体递送前或在向光生物反应器递送前与例如淡水或盐水混合。

[0103] 微藻可以在大规模培养物中生长,其中大规模培养物指在大于约6升、或大于约10升、或大于约20升的体积中生长培养物。大规模生长也可以是在50升或更多、100升或更多、或200升及以上的体积中生长培养物。

[0104] 最佳的生长温度典型地是约20℃至约25℃,但是其取决于物种。根据某些实施方案,微藻细胞在收获之前达到 10^5 至 10^8 /ml的密度。

[0105] 一些种类的收获后加工可以用于制备用于口服摄入或作为食物组合物的材料。传统的过程典型地包括从其中藻类生长的液体培养基至少部分分离藻类生物量。任选地,取决于靶受试者和应用的模式,藻类生物量可被均质化和/或干燥以构成各种尺寸的团粒。其他制备模式包括喷雾干燥、流化床干燥或甚至提供材料作为液体悬浮液。

[0106] 本发明收获的转基因微藻本身可被施用,可配制成可食用组合物,所述可食用组合物还包括可食用稀释剂、赋形剂或载体。微藻或包括其的组合物可进一步用作食物添加剂。根据一些实施方案,可食用组合物是动物食物组合物。根据某些当前特定的实施方案,动物食物组合物用于饲养水生和陆生动物。根据又其他实施方案,可食用组合物用于人类摄入。

[0107] 根据另外的方面,本发明提供了用于改进动物生长速率、生长模式、生殖健康状况、存活或其任何组合中的至少一种的方法,所述方法包括向动物施用本发明的转基因微藻或包括其的组合物,从而改进所述动物的生长速率和/或生长模式和/或存活和/或生殖健康状况。

[0108] 下面展示的实施例是为了更充分地阐明本发明的一些实施方案。但是,它们绝不应该被理解为限制本发明的广泛范围。本领域技术人员能够容易地设想本文公开的原理的许多变形和修改,而不背离本发明的范围。

实施例

[0109] 这些实施例涉及本发明实施方案的至少一些方面的具体实施方式。这些实施例仅仅是示例性的且不意图以任何方式限制。

[0110] 材料和方法

[0111] 鲑鱼生长激素基因的合成

[0112] 鲑鱼生长激素的氨基酸序列(登录号AAT02409)用作用于编码成熟鲑鱼生长激素(SEQ ID NO:12,在本文称为“鱼生长激素”或“fGH”)的多核苷酸的合成的基础。使用“Entelechon GmbH”的三角褐指藻密码子使用执行多核苷酸的合成,从而构成显示在SEQ ID NO:1中的新的多核苷酸序列。该新的序列以前未公开,因为该密码子使用并未用于该蛋白质。此外,该特定序列被设计以被三角褐指藻更有效地表达,如在以下更详细地讨论的。

[0113] 靶向ER的鲑鱼生长激素基因的构建

[0114] 根据以下将fGH生长激素基因在其5'末端融合到编码Bip内质网前导序列的多核苷酸(Kilian O和Kroth P.2005.The Plant Journal:41:175-183)(核酸:SEQ ID NO:16;氨基酸:SEQ ID NO:2)以产生Bip-fGH(核酸:SEQ ID NO:17;氨基酸:SEQ ID NO:3):

- [0115] Bip前导序列使用以下引物从三角褐指藻基因组DNA扩增:
- [0116] 正向BiP:GGAATTCATGATGTTTCATGAGAATTGC (SEQ ID NO:36)
- [0117] 反向Bip-fGH-V2:ACGCTGGTTTTCAATCACGGTACCCATCTT (SEQ ID NO:37)。
- [0118] Bip前导序列产物使用以下引物扩增:
- [0119] 正向BiP:GGAATTCATGATGTTTCATGAGAATTGC (SEQ ID NO:38)。
- [0120] 反向Bip-fGH-V2:ACGCTGGTTTTCAATCACGGTACCCATCTT (SEQ ID NO:39)。
- [0121] fGH使用以下引物扩增:
- [0122] 正向Bip-fGH-V2:AAGATGGGTACCGTGATTGAAAACCAGCGT (SEQ ID NO:40)。
- [0123] 反向fGH BglIII:GAGATCTGAGGGTGCAGTTGG (SEQ ID NO:41)。
- [0124] 使用扩增的PCR产物 (Bip、fGH), 以及提及的用于Bip+Revf BglIII的引物, 通过第三PCR将Bip前导序列融合到fGH, 产生称为356的构建体, 所述构建体具有SEQ ID NO:17中列出的核酸序列和SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列。
- [0125] 靶向液泡的鲑鱼生长激素基因的构建
- [0126] 根据以下将编码fGH的多核苷酸在其5'末端融合到液泡前导序列 (核酸:SEQ ID NO:18;氨基酸:SEQ ID NO:4) 并且在其3'末端融合到HA标签 (核酸:SEQ ID NO:47;氨基酸:SEQ ID NO:5) 以产生液泡-fGH-HA多核苷酸 (核酸:SEQ ID NO:19;氨基酸:SEQ ID NO:6):
- [0127] 合成的fGH使用以下引物扩增:
- [0128] 正向fGH EcoRI:GGAATTCATGGGCCAAGTCTTTCTCTTG (SEQ ID NO:42)
- [0129] 反向fGH BglIII:GAGATCTGAGGGTGCAGTTGG (SEQ ID NO:41)。
- [0130] 产物通过使用EcoRI、BglIII连接到pPhaT1-HA质粒。
- [0131] fGH-HA模板使用以下引物扩增:
- [0132] 正向fGH BamHI:GGATCCATTGAAAACCAGCGTTTGTTC AAC (SEQ ID NO:43)。
- [0133] 反向Hind HA:
- [0134] AAGCTTTTACTGGGCGGCGTAGTCCGGGACGTCGTAGGGGTA (SEQ ID NO:44)。
- [0135] PCR产物通过BamHI和HindIII克隆进入pPhaT1。
- [0136] 液泡前导序列使用以下引物从三角褐指藻cDNA扩增:
- [0137] EcoRI-Vac54681:ATGAATTCATGTCGATTCGTCTCT (SEQ ID NO:45)。
- [0138] BamHI-Vac54681:ATGGATCCAGTTTGGGCAGTTGCC (SEQ ID NO:46)。
- [0139] 使用EcoRI和BamHI将fGH-HA与液泡前导序列连接, 产生称为398的构建体, 所述构建体具有编码具有SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列的多肽的SEQ ID NO:19中列出的核酸序列。
- [0140] 靶向液泡的GFP编码多核苷酸的构建
- [0141] 在上述构建体中, 编码鱼生长激素的多核苷酸通过BamHI和HindIII替换为编码GFP的多核苷酸 (登录号P42212, 具有SEQ ID NO:29中列出的核酸序列以及编码具有SEQ ID NO:28中列出的氨基酸序列的蛋白质), 导致液泡靶向的GFP (SEQ ID NO:30, 氨基酸序列; SEQ ID NO:31, 核酸序列-使用三角褐指藻密码子使用制备), 产生称为527的构建体, 所述构建体具有SEQ ID NO:31中列出的核酸序列和SEQ ID NO:30中列出的氨基酸序列。
- [0142] 液泡-fGH-MTS-HA的构建
- [0143] 根据三角褐指藻密码子使用通过Biomatik合成来自成纤维细胞生长因子的膜移

位序列(MTS)(SEQ ID NO:7)。使用BgIII在fGH的3' 将移位序列连接到液泡-fGH-HA,以产生编码具有SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列的液泡-fGH-MTS-HA的构建体。

[0144] 液泡-GFP-MTS的构建

[0145] 根据三角褐指藻密码子使用通过Biomatik合成来自成纤维细胞生长因子的膜移位序列(MTS)。使用HindIII在GFP的3' 将移位序列连接到液泡-GFP,以产生液泡-GFP-MTS构建体(核酸序列:SEQ ID NO:33;氨基酸序列:SEQ ID NO:32)。

[0146] 液泡-fGH-TAT-HA的构建

[0147] 根据三角褐指藻密码子使用通过Biomatik合成来自人类免疫缺陷病毒1(HIV-1)的反式激活转录激活因子(TAT)(SEQ ID NO:9)。通过BgIII在fGH的3' 将结构域以两个重复段串联地融合到液泡-fGH-HA以产生液泡-fGH-TAT-HA构建体(SEQ ID NO:10)。

[0148] 液泡-GFP-TAT的构建

[0149] 根据三角褐指藻密码子使用通过Biomatik合成来自人类免疫缺陷病毒1(HIV-1)的反式激活转录激活因子(TAT)。使用HindIII在GFP的3' 将基因连接到液泡-GFP,以产生液泡-GFP-TAT构建体,所述构建体具有SEQ ID NO:35中列出的核酸序列,编码具有SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列的液泡-GFP-TAT蛋白质。

[0150] 将构建体克隆到藻类表达载体

[0151] 根据Apt等(1996.Mol.Gen Genet.252:572-579),将本发明的各种多核苷酸和构建体进一步克隆在质粒pPHAT1(登录号AF219942)(SEQ ID NO:11)中的fcpA启动子和fcpA终止子的控制下。fcpA启动子是目前已知的在三角褐指藻中可操作的仅有的启动子。但是,将明确理解的是,其他启动子可用于三角褐指藻以及其他藻类。

[0152] 载体包括:

[0153] • fcpA(墨角藻黄素叶绿素蛋白A)启动子,感兴趣基因被克隆在其控制下。

[0154] • MCS-多克隆位点

[0155] • fcpB(墨角藻黄素叶绿素蛋白B)启动子,其控制来自印度斯坦链异壁菌(*Streptoalloteichus hindustanus*)的sh ble基因,其编码赋予zeocine和腐草霉素抗性的蛋白质。

[0156] • fcpA终止子,其在感兴趣基因之后以及在zeocine抗性基因之后出现。

[0157] • 氨苄青霉素抗性基因

[0158] • 来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的复制起点。

[0159] 图1显示了完整的pPhaT1表达载体。

[0160] 编码fGH的多核苷酸(SEQ ID NO:1)被克隆处于fcpA启动子和fcpA终止子的控制下。质粒包含在fcpB启动子和fcpA终止子控制下的选择标志物博来霉素。

[0161] 克隆和分子技术

[0162] PCR反应使用Phusion Polymerase目录号FZ-F-530S Finnzymes(Zotal)或REDTaq ready mix PCR reaction mix目录号R2523-100RXN Sigma进行。PCR反应物通过使用Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System(目录号A9281,Promega)清洁。

[0163] 连接使用DNA连接试剂盒(Mighty Mix)-Takara目录号6023(Ornat)或T4DNA连接酶M0202T NEB(Eldan)执行。5' 或3' 突出端的平端化使用T4聚合酶:(Fermentas#EP0061)执行。

[0164] DNA中等量制备(Midi preps)使用Pure Yield™ Plasmid Midiprep System A2492执行。PROMEGA和DNA小量制备(minipreps)使用AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit-BIONEER K-3030执行。DNA基因组的分离根据Fawley&Fawley (Fawley M W和Fawley K P.2004.J Phycol 40:223-225)执行。所有的试剂盒和酶根据制造商的说明书处理。

[0165] 藻类的培养和收获

[0166] 藻类的培养和收获按照本发明申请人的美国专利申请公布号2011/0081706中描述的进行。简要地,藻类在富含用于生长硅藻的F/2养分(修改自Andersen R等.2005.Recipes for freshwater and seawater media于:Algal Culturing Techniques (R.A.Andersen,eds)中,第429-538页.Elsevier,Amsterdam)的过滤的海水中培养。F/2每72小时以相对最终培养体积1:1000的剂量添加。恒温方案维持在21℃。将光照:黑暗设置在16:8小时,以100μmol光子每m²s⁻¹的光密度。将CO₂与空气混合并通过通风系统以控制的比例递送到培养物。将藻类在其最大培养密度附近进行收获用于实验。为了辅助藻类絮凝,将氢氧化钙加入到培养物中作为颗粒在包含0.15g/ml Ca(OH)₂的水中的精细悬浮液,并且随后将培养物过滤或离心。将所得藻类沉淀物冻干。

[0167] 藻类转化

[0168] I.通过粒子轰击转化

[0169] 将新鲜的藻类培养物在如上所述的人工海水(ASW)F/2培养基中生长到中间指数期(2-5*10⁶细胞/ml)。轰击前24小时将细胞收获,用新鲜的ASW+F/2洗涤两次并且重悬在1/10的ASW+F/2中的原始细胞体积中。将0.5ml的细胞悬浮液点到包含固化的ASW+F/2培养基的55mm培养皿的中心。将平板在正常生长条件下静置至干燥。使用PDS 1000/He基因枪转化系统根据制造商说明书(BioRad Laboratories Inc.,Hercules,CA USA)使用用于直径大于2微米的细胞的M17钨粉(BioRad Laboratories Inc.)执行轰击,并且钨粉包括用于更小细胞的小于0.6微米的颗粒(FW06,Canada Fujian Jinxin Powder Metallurgy Co.,Markham,ON,Canada)。钨粉包被有线性DNA。使用1100或1350psi的破裂盘(rupture discs)。所有一次性用品购自BioRad Laboratories Inc.。轰击后将平板在正常生长条件下孵育24小时,之后将细胞铺板在选择性固体培养基上,并在正常生长条件下孵育直到单集落出现。

[0170] II.通过电穿孔转化

[0171] 如上所述,将藻类培养物在人工海水(ASW)+F/2培养基中生长到中间指数期。然后收获细胞并且使用新鲜的培养基洗涤两次。在1/50的原始体积中重悬细胞后,原生质体通过在ASW中添加相等体积的4%半纤维素酶(Sigma)和2%崩溃酶(Sigma)并且在37℃孵育4小时来制备。原生质体的形成通过非荧光增白剂染色进行测试。原生质体用包含0.6M D-甘露醇和0.6M D-山梨醇的ASW洗涤两次并且重悬在同样的培养基中,其后加入DNA(10μg线性DNA用于每100μl原生质体)。将原生质体转移到冷的电穿孔比色皿中并且在冰上孵育7分钟,然后在ECM830电穿孔设备(BTX,Harvard Apparatus,Holliston,MA,USA)中进行脉冲。通常应用多种脉冲,范围从1000至1500伏特,10-20毫秒每脉冲。每一个比色皿脉冲5-10次。脉冲之后将比色皿立即置于冰上5分钟,且然后将原生质体加入到250μl新鲜的生长培养基(非选择性)。将原生质体于25℃在低光条件下孵育24小时后,将细胞铺板到选择性固体培养基并且在正常生长条件下孵育直到单集落出现。

[0172] III通过微穿孔转化

[0173] 将新鲜的藻类培养物在ASW+F/2培养基中生长到中间指数期。收获10ml培养物样品,使用达尔伯克磷酸盐缓冲盐水(DPBS,Gibco,Invitrogen,Carslbad,CA,USA)洗涤两次并且重悬在250 μ l缓冲液R中(由微穿孔装置和试剂盒的生产商Digital Bio,NanoEnTek Inc.,Seoul,Korea供应)。每100 μ l细胞加入8 μ g线性DNA后,对细胞进行脉冲。典型地需要多种脉冲,取决于细胞类型,范围从700至1700伏特,10-40毫秒脉冲长度;每一个样品脉冲1-5次。脉冲之后,将细胞立即转移到200 μ l新鲜的培养基(非选择性)中。于25 $^{\circ}$ C在低光条件下孵育24小时后将细胞铺板到选择性固体培养基上并且在正常生长条件下孵育直到单集落出现。

[0174] 蛋白质提取

[0175] 收获在 5×10^6 细胞/ml的10ml细胞并且重悬在500 μ l提取缓冲液(50mM Tris pH=7.0;1mM EDTA;100mM NaCl;0.5%NP-40;和蛋白酶抑制剂(Sigma目录号P9599)中。然后加入100 μ l玻璃珠(425-600 μ m, Sigma)并且将细胞在珠破碎器(MP FastPrep-24, MP Biomedicals, Solon, OH, USA)中破碎20秒。将管内容物在4 $^{\circ}$ C, 13000xg离心15分钟。将上清液转移到新的瓶子用于定量和蛋白印迹分析。

[0176] 通过SDS-PAGE的蛋白分离和蛋白印迹分析

[0177] 将提取的蛋白质在100伏下在4-20%梯度的SDS-PAGE(Gebs gels 4-20%Bio-lab, 10GG0420-8)上分离1小时。在封闭缓冲液中(5%脱脂奶粉,Difco)孵育1小时后,将蛋白质通过考马斯(Sigma)染色或者布点到PVDF(Millipore,Billerica,MA,USA)膜上,于100伏下在转移缓冲液(25mM Tris,192mM甘氨酸和20%甲醇)中持续1小时。使用在封闭缓冲液中稀释到1:1000的比例的抗HA(Biotest MMS-101P-500)或鲑鱼生长激素(GroPep: PAN1)抗体检测蛋白质。使用封闭缓冲液中1:10000稀释的鼠(用于HA抗体)或兔(用于鲑鱼生长激素)辣根过氧化物酶二抗(Millipore,Billerica,MA,USA)。检测根据制造商说明书使用EZ-ECL试剂盒(Bio Ind.Promega:20-500-120)进行。

[0178] ELISA分析

[0179] ELISA平板(microlon, Greiner)在碳酸盐/碳酸氢盐pH 9.6中使用单克隆抗HA抗体(Sigma Aldrich)在4 $^{\circ}$ C包被过夜。接下来,将平板使用PBST(0.05%吐温)洗涤,并且使用含1%BSA(Sigma Aldrich)的PBS在室温(RT)下封闭4小时。将血清样品在ELISA包被缓冲液中连续地稀释并且上样到平板上。与血清样品一起过夜孵育后,将平板用PBST洗涤并且与抗HA生物素(Roche)一起在室温下孵育1小时。另外的洗涤步骤后,加入辣根过氧化物酶(HRP)结合的链霉亲和素并且将平板在室温(RT)下孵育1小时。将平板用PBST洗涤并且将四甲基联苯胺(TMB)底物加入到平板。显现足够的颜色之后,将反应用0.16M硫酸停止。每孔中的吸光度使用Enspire 2300多标记读取器(PerkinElmer)在450nm测量。

[0180] 鱼的维持和饲养

[0181] 将体重在70-100克的10条罗非鱼的组在100升充气容器中以26-28 $^{\circ}$ C的温度下维持。光周期是12小时光:12小时黑暗。处理前将所有的鱼在容器中适应1周。对使用100ppm的丁香茴提取物(Roth)轻微麻醉的鱼进行藻类悬浮液的口服施用。将附接到注射用注射器的聚乙烯管(长6-8cm,直径3mm)用于不同藻类悬浮液的口服施用(填喂饲养)。

[0182] 饲养试验

[0183] 将表达鲑鱼生长激素的冻干的转基因藻类以最终浓度为1-4%加入到普通鱼饲料。鱼接受它们总体重的10%-15%的饲料。转基因藻类和普通鱼饲料用于饲养观赏鱼、锦鲤、天使鱼 (Scalare) 和翘尾五花金鱼 (Goldfish Shubunkin) 6周。监测每一个试验的温度、pH、氨、亚硝酸盐水平等。在每一个实验结束时分析鱼的总生长、形态异常和存活率。

[0184] 实施例1:表达鱼(鲑鱼)生长激素的藻类

[0185] 包含编码鲑鱼生长激素的靶向ER(称为构建体356)或液泡(称为构建398)的多核苷酸的物种三角褐指藻的转基因藻类,被培养并分析转基因蛋白质表达。等量的总可溶性蛋白质(20 μ g)提取自用于蛋白印迹分析的转基因藻类。通过使用抗鲑鱼生长激素抗体进行检测,如在图2中显示的。

[0186] 与表达液泡靶向的生长激素的藻系相比,表达ER靶向的鲑鱼生长激素的藻系显示了较高的转基因蛋白表达水平。

[0187] 实施例2:神仙鱼饲养试验

[0188] 观赏神仙鱼(天使鱼),在6周期间使用补充有过表达靶向ER或液泡(分别是构建体356、398)的鱼生长激素的转基因三角褐指藻的鱼食物饲养,或使用普通的非转基因鱼食物(对照)饲养。藻类补充物以4%加入到普通鱼食物中。追踪容器中鱼的生长,作为各包括20条鱼的独立的重复(n=5)。图3显示了与使用普通鱼食物饲养的鱼相比,使用(混合在鱼食物中的)转基因藻类处理的神仙鱼的总的生长表现。

[0189] 与使用普通食物饲养的鱼(对照)相比,使用包括包含构建体398(其中生长激素靶向液泡)的转基因藻类的食物饲养的鱼给出了更高的总的鱼生物量(~15%),而与对照相比,使用包括包含构建体356(其中生长激素靶向ER)的转基因藻类的食物饲养的鱼并未显著地生长更好。

[0190] 在同样使用神仙鱼实施的平行实验中,与使用普通鱼食物饲养的鱼相比,使用包含表达靶向液泡的fGH(构建体398)的藻类的普通食物饲养鱼导致鱼数目的增加,达到超过2gr(图4)。从市场角度而言,这结果意味着,普通鱼食物使用表达靶向液泡的fGH的藻类的补充增加了适合市场的鱼的数目而不需要增加群体中起始的鱼数目,或以其他方式则必需调整起始鱼群的任一方面。

[0191] 以每次25条鱼的5次重复,使用神仙鱼持续8周进行的另一实验,导致与使用普通鱼食物饲养的鱼相比,摄入补充有4%的表达fGH(靶向液泡的fGH表达,构建体398)的藻类的食物的鱼的显著的生物量增长(图5)。

[0192] 这些结果意味着,尽管显示表达水平低于靶向细胞ER的fGH的表达水平,fGH对藻类细胞的液泡的亚细胞靶向导致蛋白质的更好的功能效力。

[0193] 实施例3:锦鲤饲养试验

[0194] 将幼体后期的锦鲤(4次独立重复,每次包括600条幼体后期的锦鲤)用普通鱼食物饲养或用补充有4%的表达靶向液泡的fGH(构建体398)的藻类的普通鱼食物饲养。饲养试验执行超过8周。在实验结束时,扫描鱼的身体变形(如Jha P等.2006.Journal of Applied Ichthyology;23(1)87-92中定义的)。身体变形包括但不限于任何形态的不规则、任何体型的不对称、不规则身体形状、不规则的鳍的形状、不规则的尾巴的形状;不规则的身体/鳍的面积、长度或宽度的比例;不规则的身体/尾巴的面积、长度或宽度的比例;不规则的尾巴/鳍的面积、长度或宽度的比例;或身体任何部位的不规则。图6显示了使用普通鱼食物饲养

的鱼和使用包含4%的表达靶向液泡的fGH(构建体398)的藻类的普通食物饲养的鱼的正常和变形的形状百分比。

[0195] 如从图6中明显的,接受普通鱼食物的鱼群展示了45%变形的鱼,而接受补充有表达fGH(构建体398)的藻类的鱼食物的鱼群仅展示了38%变形的鱼。

[0196] 实施例4:金鱼饲养试验

[0197] 将幼体后期观赏性金鱼(翘尾五花(Shubunkin))用补充有过表达靶向液泡的鱼生长激素(构建体398)的转基因三角褐指藻的鱼食物,或用普通鱼食物(对照)饲养超过6周。藻类补充物以4%向普通鱼食物添加。在每次40条鱼的6次独立重复中测试处理。图7显示了与用普通食物饲养的鱼相比,用转基因藻类饲养的金鱼的总体重高约~15%。

[0198] 除了生长表现之外,试验期间对照容器中小鱼的存活大约64%。在其中使用补充有表达fGH(构建体398)的藻类的食物饲养的鱼的容器中,存活率被提升到大约80%,表明表达fGH的藻类除了其生长促进效应以外,还有助于鱼存活。

[0199] 实施例5:卤虫饲养试验

[0200] 将丰年虾(卤虫)用野生型三角褐指藻、野生型微绿球藻或用表达鱼生长激素(fGH)的三角褐指藻(构建体398)饲养12天。当与分别使用野生型微绿球藻或野生型三角褐指藻饲养的卤虫相比时,使用表达fGH的三角褐指藻饲养的卤虫显著更大(约40%)并且雌性早3天达到性成熟(图8和9)。

[0201] 特别地,图8显示了使用野生型三角褐指藻(图8A)、野生型微绿球藻(图8B),或使用表达鱼生长激素的三角褐指藻饲养丰年虾后的结果。图像在12天后拍摄。

[0202] 图9显示了接受不同藻类作为唯一食物的丰年虾的测量的平均体长。为了确定体长,12天后测量使用野生型微绿球藻(对照)、野生型三角褐指藻(wt)或表达鱼生长激素的三角褐指藻(构建体398)饲养的26只随机选择的丰年虾的体长。发现用表达fGH的藻类饲养的丰年虾显著更长。总的来说,这些结果表明,在丰年虾和甲壳纲动物中使用表达靶向藻类液泡的鱼生长激素的藻类作为食物或食物添加剂促进了它们的生长,尤其是关于体长和性成熟。

[0203] 实施例6:罗氏沼虾饲养试验

[0204] 将淡水虾罗氏沼虾PL 10用普通食物(对照),或用补充有过表达靶向藻类液泡的鱼生长激素(构建体398)的转基因三角褐指藻的普通食物饲养超过6周。藻类补充物以8%向普通食物添加。图10显示了与用普通食物饲养的虾相比,使用转基因藻类处理的罗氏沼虾的总体重显著地高21%,表明表达fGH的藻类有助于虾的促进的生长。

[0205] 实施例7:鱼的GFP吸收

[0206] 将饥饿1周的50-100克大小的罗非鱼用以1:1的鱼食物和藻类的比与野生型三角褐指藻或与表达靶向液泡的GFP的三角褐指藻混合的鱼食物饲养。罗非鱼的胃和肠在饲养1-4小时后取出并且在荧光双目镜下分析。图11清晰地显示了饲养4小时后在罗非鱼胃中表达的外源GFP的荧光,表明荧光蛋白在胃的酸性环境下未降解。此外,蛋白的清楚的荧光也在肠中观察到(图12)。总之,这些结果显示了该蛋白在胃的酸性环境下未降解;其从微藻递送进入鱼的肠道;并且此外,蛋白在这些条件下保持了其生物功能。

[0207] 实施例8:虾的GFP吸收

[0208] 孵化后持续3天将丰年虾(卤虫)仅用野生型藻类(三角褐指藻)饲养或仅用表达靶

向液泡的GFP的藻类(表达液泡-GFP的藻类)饲养。在 $1 \times \text{ASW}$ 培养基中生长的8000只卤虫使用 1.5×10^9 藻类饲养。图13展示了在藻类中表达的GFP蛋白质以其完整的及生物活性形式位于卤虫的消化系统内(图13B)。这些结果再次证明了本发明公开的微藻系统高度适合于蛋白质的口服递送,蛋白质以其完整的且有生物活性的形式从微藻递送并进入到接受者的消化系统中。

[0209] 在又其他实验中,将饥饿的淡水虾罗氏沼虾PL10用由以食物和藻类1:1的比例与野生型藻类(三角褐指藻)粉末或表达液泡-GFP的藻类的粉末混合的普通食物组成的团粒饲养。饲养后4小时将虾在荧光下分析。图14展示了GFP蛋白质位于虾的肝胰腺(hepatopancrease gland),表明GFP蛋白质在该动物中的口服递送。再次地,蛋白质以完整的且有活性的形式递送。

[0210] 实施例9:鸡的GFP吸收

[0211] 将两周大的鸡的每一只用悬浮在5ml的0.5X人工海水(ASW)中的野生型藻类(三角褐指藻)或表达靶向液泡的GFP的藻类的100mg粉末强制饲养。饲养2、4、6和24小时后将鸡处死并且取出肝脏并且在荧光下分析。图15展示了饲养6小时后,GFP蛋白质以其完整的且有功能的形式吸收进入鸡的肝脏中,表明GFP蛋白质通过酸性消化道,然后吸收通过肠壁进入血液、循环到肝脏。结果证明了蛋白质口服递送至鸡的全路径。

[0212] 实施例10:蛋白质向鱼血液中的口服递送

[0213] 将罗非鱼用表达鱼生长激素的藻类(三角褐指藻)或用表达GFP的藻类(二者均靶向藻类液泡;分别是表达液泡-fGH和表达液泡-GFP的藻类)饲养。将800mg的藻类粉末悬浮在30ml的0.5x ASW中。将每一条鱼用2ml藻类悬浮液强制饲养。血液样品通过使用无菌注射器和管从尾静脉取出。将50微升(μl)的每种血液样品分配用于在荧光平板读取器中的直接荧光分析以确认GFP活性,并且将余下的样品室温下静置15分钟,并且 4°C 过夜后,将血清于 4°C 以250g通过离心10分钟分离,并且在 -20°C 保存在无菌管中用于ELISA分析。

[0214] fGH在罗非鱼中的吸收

[0215] 将罗非鱼用表达液泡-fGH(构建体398)或液泡-GFP的藻类(构建体527)强制饲养。血液样品在饲养1小时后取出用于ELISA分析。fGH蛋白的存在通过检测HA结构域的表达确认,该HA结构域使用抗HA抗体融合到fGH(见于上述的材料和方法)。取自用表达液泡-fGH的藻类饲养的鱼的血液样品与抗HA抗体阳性反应,而取自用表达液泡-GFP的藻类饲养的鱼的血液样品未给出明显的信号(图16)。ELISA结果提供了血液中存在fGH蛋白的支持,显示了在藻类中表达的蛋白质到达口服摄入藻类的生物体的血液。

[0216] 罗非鱼中GFP的吸收和活性

[0217] 将罗非鱼($n=5$)用表达液泡-GFP的藻类(构建体527)或表达液泡-fGH的藻类(构建体398)强制饲养。血液样品在饲养1小时后收集并且使用Enspire 2300多标记读取器在荧光(激发光480nm,发射光515nm)下分析。收集自使用表达液泡-GFP的藻类饲养的鱼的血液样品显示荧光。与之相比,使用表达液泡-fGH的藻类(构建体398)饲养的鱼的血液样品没有给出明显的信号(图17)。这些结果表明GFP以其完整的且有功能的形式从鱼肠道吸收进入鱼的血液。

[0218] 实施例11:液泡靶向的外源蛋白在胃肠道中受保护

[0219] 表达液泡-GFP和液泡-fGH的藻类(分别包含构建体527和398)和提取自表达液泡-

GFP的藻系的总蛋白在通过强制饲养施用于鱼之前测量GFP荧光强度(图18A)以及应用1小时后测量取自鱼的血液样品中的GFP荧光强度(图18B)。荧光通过使用Enspire 2300多标记读取器(激发光480nm,发射光515nm)测量。如可以看出的,只有取自用表达GFP的藻类饲养的鱼的血液样品是发荧光的,而取自用提取自表达液泡-GFP的藻类的分离的蛋白质饲养的鱼的血液样品没有给出信号或者仅仅给出背景信号,如在取自用表达液泡-fGH的藻类饲养的鱼的血液样品中观察到的。这些结果清楚地证明了,藻类细胞保护GFP蛋白并且使其以完整的和有功能的形式递送到摄入藻类的生物体的血液中。与之相比,裸露的荧光蛋白(GFP)的口服施用导致其荧光的消失,可能是由于其胃肠道中的降解。

[0220] 实施例12:蛋白质向小鼠的口服递送

[0221] fGH递送至小鼠的肝脏中

[0222] 将12周大的ba1b-C雄性小鼠在实验前持续12小时饥饿。小鼠使用异氟烷轻微麻醉,并且使用1.5ml的表达液泡-fGH的藻类(构建体398)或表达液泡-GFP的藻类(构建体527)通过填喂法饲养。

[0223] 在藻类施用两小时后通过超剂量的异氟烷使小鼠安乐死。将肝脏取出并且冷冻在液氮中。从肝脏提取总蛋白,随后通过针对HA标签的ELLSA分析,特异性识别在藻类中表达的重组fGH。图19中显示的ELLSA结果证明,重组fGH在小鼠肝脏中是可检测的,表明其口服通过小鼠消化道进入血液和肝脏。

[0224] GFP向血液的吸收

[0225] 将小鼠如上述处理,且饲养2小时后,血液样品取自心脏。然后将血液样品离心并将血浆在荧光(激发光480nm,发射光515nm)下分析。与用表达液泡-fGH的藻类饲养的小鼠的血液样品相比,用表达液泡-GFP的藻类饲养的小鼠的血液样品显示出显著更强的荧光,证明了GFP以完整的和有功能的形式通过消化道进入血液。

[0226] 实施例13:鱼和小鼠的加强的蛋白吸收

[0227] CPP是促进细胞摄取各种分子负荷的短肽。CPP的实例包括来自人类免疫缺陷病毒1(HIV-1)的反式激活转录激活因子(TAT)以及来自成纤维细胞生长因子的膜移位序列(MTS)。包括编码靶向液泡的fGH的基因或编码靶向液泡的GFP的基因的构建体被进一步设计以包括一种CPP,如在上述“材料和方法”部分描述的。

[0228] 将表达液泡-fGH-MTS-HA或液泡-fGH-TAT-HA的藻系用于在上述描述的饲养实验中饲养鱼。使用上述构建体转化的藻系用作模型系统,其中fGH被GFP替代(液泡-GFP-MTS-或液泡-GFP-TAT-)。此外,这些藻系用于通过填喂法饲养小鼠。在饲养试验结束时,用藻类饲养的鱼或小鼠的血液中藻类表达的蛋白的存在通过使用针对HA标签的ELISA或蛋白印迹分析进行检查。此外,血液样品的GFP荧光通过荧光平板读取器进行直接检测或GFP蛋白通过使用抗GFP抗体的ELISA进行检测。

[0229] 上述展示的结果证明藻类三角褐指藻作为有效的手段向各种靶动物口服递送重组蛋白。不希望被任何特定的理论或作用机制束缚,藻类作为天然的生物包装,藻类细胞壁保护重组蛋白使其免受在酸性胃中的酶促降解。结果还表明,再次不希望受任何特定的理论或作用机制束缚,液泡靶向的蛋白使得其能够从肠道有效吸收到靶细胞器。

[0230] 总之,本申请第一次展示了基于藻类的平台的建立,其能以它们的完整的和有功能的形式向动物口服施用重组蛋白质。

[0231] 具体实施方案的以上描述如此充分地揭示了本发明的一般本质以至于通过应用目前的知识,其他人可以容易地修改和/或调整此类具体实施方案为了各种应用而无需过度的实验和不背离一般的概念,以及,因此,这些调整和修改应该并意图为被包括在公开的实施方案的等价物的意义和范围内。应该理解的是在本文使用的措辞或术语是为了描述的目的并且不是限制。用于实施各种公开的功能的手段、材料和步骤可采取各种改变的形式,而不背离本发明。

[0001]

序列表

<110> 特郎萨格以色列有限公司
 <120> 转基因微藻和其用于口服递送蛋白质的用途
 <130> TRAG/005 PCT
 <150> 61/692240
 <151> 2012-08-23
 <150> 61/781103
 <151> 2013-03-14
 <160> 47
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 567
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多核苷酸（按照三角褐指藻（*Phaeodactylum tricornutum*）密码子使用的鲑鱼生长激素）

<400> 1
 atgattgaaa accagcgttt gttcaacatt gccgtctccc gtgtccagca cctccaacct 60
 ttggcccaga agatgttcaa cgacttcgac ggaaccctcc tcccgcagca acgtcgtag 120
 ctcaacaaga ttctctctct cgactttctg aactcgcact ccattgtctc ccccgtagac 180
 aagcacgaaa cccagaagtc ctccgtcttc aagctctctc acatttctct cgcctctatc 240
 gaatctctggg aatacccttc ccagaccctc attatttcca actccctcat ggtccgcaac 300
 gccaacccaga tttccgaaaa gctctccgat ctcaaggctg gaatcaacct cctcattacc 360
 ggttcccagg acggactctc ctccctcgac gacaacgact cccagcagct ccccccctac 420
 ggaaactact accagaacct cggaggcgac ggaaacgtcc gtcgttaact cgaactcttc 480
 gcctgcttca agaaggacat gcacaaggte gaaacctacc tcaccgtcgc caagtgcgcg 540
 aagtcctctg aagccaaactg caccctc 567

<210> 2
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的肽（三角褐指藻内质网前导序列）

<400> 2
 Met Met Phe Met Arg Ile Ala Val Ala Ala Leu Ala Leu Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Pro Ser Ile Arg Ala Glu Glu Ala Gly Glu Glu Ala Lys Met Gly Thr
 20 25 30
 Val

<210> 3
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多肽
 <400> 3

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

[0002]

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽（三角褐指藻短液泡前导序列）

<400> 4

Met Ser Ile Arg Leu Phe Ser Thr Ala Leu Leu Ala Ala Cys Leu Ala
 1 5 10 15
 Lys Ala Thr Ala Gln Thr
 20

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 5

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro
 1 5 10 15
 Asp Tyr Ala Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Gln

	20	25	30
<210>	6		
<211>	251		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的多肽		
<400>	6		
	Met Ser Ile Arg Leu Phe Ser Thr Ala Leu Leu Ala Ala Cys Leu Ala		
	1 5 10 15		
	Lys Ala Thr Ala Gln Thr Gly Ser Ile Glu Asn Gln Arg Leu Phe Asn		
	20 25 30		
	Ile Ala Val Ser Arg Val Gln His Leu His Leu Leu Ala Gln Lys Met		
	35 40 45		
	Phe Asn Asp Phe Asp Gly Thr Leu Leu Pro Asp Glu Arg Arg Gln Leu		
	50 55 60		
	Asn Lys Ile Phe Leu Leu Asp Phe Cys Asn Ser Asp Ser Ile Val Ser		
	65 70 75 80		
	Pro Val Asp Lys His Glu Thr Gln Lys Ser Ser Val Leu Lys Leu Leu		
	85 90 95		
	His Ile Ser Phe Arg Leu Ile Glu Ser Trp Glu Tyr Pro Ser Gln Thr		
	100 105 110		
	Leu Ile Ile Ser Asn Ser Leu Met Val Arg Asn Ala Asn Gln Ile Ser		
	115 120 125		
[0003]	Glu Lys Leu Ser Asp Leu Lys Val Gly Ile Asn Leu Leu Ile Thr Gly		
	130 135 140		
	Ser Gln Asp Gly Leu Leu Ser Leu Asp Asp Asn Asp Ser Gln Gln Leu		
	145 150 155 160		
	Pro Pro Tyr Gly Asn Tyr Tyr Gln Asn Leu Gly Gly Asp Gly Asn Val		
	165 170 175		
	Arg Arg Asn Tyr Glu Leu Leu Ala Cys Phe Lys Lys Asp Met His Lys		
	180 185 190		
	Val Glu Thr Tyr Leu Thr Val Ala Lys Cys Arg Lys Ser Leu Glu Ala		
	195 200 205		
	Asn Cys Thr Leu Arg Ser Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Pro Tyr Asp Val		
	210 215 220		
	Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser		
	225 230 235 240		
	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Gln		
	245 250		
<210>	7		
<211>	12		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的肽		
<400>	7		
	Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro		
	1 5 10		

<210> 8
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多肽
 <400> 8
 Met Ser Ile Arg Leu Phe Ser Thr Ala Leu Leu Ala Ala Cys Leu Ala
 1 5 10 15
 Lys Ala Thr Ala Gln Thr Gly Ser Ile Glu Asn Gln Arg Leu Phe Asn
 20 25 30
 Ile Ala Val Ser Arg Val Gln His Leu His Leu Leu Ala Gln Lys Met
 35 40 45
 Phe Asn Asp Phe Asp Gly Thr Leu Leu Pro Asp Glu Arg Arg Gln Leu
 50 55 60
 Asn Lys Ile Phe Leu Leu Asp Phe Cys Asn Ser Asp Ser Ile Val Ser
 65 70 75 80
 Pro Val Asp Lys His Glu Thr Gln Lys Ser Ser Val Leu Lys Leu Leu
 85 90 95
 His Ile Ser Phe Arg Leu Ile Glu Ser Trp Glu Tyr Pro Ser Gln Thr
 100 105 110
 Leu Ile Ile Ser Asn Ser Leu Met Val Arg Asn Ala Asn Gln Ile Ser
 115 120 125
 Glu Lys Leu Ser Asp Leu Lys Val Gly Ile Asn Leu Leu Ile Thr Gly
 130 135 140
 Ser Gln Asp Gly Leu Leu Ser Leu Asp Asp Asn Asp Ser Gln Gln Leu
 145 150 155 160
 Pro Pro Tyr Gly Asn Tyr Tyr Gln Asn Leu Gly Gly Asp Gly Asn Val
 165 170 175
 Arg Arg Asn Tyr Glu Leu Leu Ala Cys Phe Lys Lys Asp Met His Lys
 180 185 190
 Val Glu Thr Tyr Leu Thr Val Ala Lys Cys Arg Lys Ser Leu Glu Ala
 195 200 205
 Asn Cys Thr Leu Arg Ser Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala
 210 215 220
 Ala Pro Arg Ser Gly Gly Gly Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
 225 230 235 240
 Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser Tyr Pro
 245 250 255
 Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Gln
 260 265

 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的肽
 <400> 9
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1	5	10
<210> 10		
<211> 277		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的多肽		
<400> 10		
Met Ser Ile Arg Leu Phe Ser Thr Ala Leu Leu Ala Ala Cys Leu Ala		
1 5 10 15		
Lys Ala Thr Ala Gln Thr Gly Ser Ile Glu Asn Gln Arg Leu Phe Asn		
20 25 30		
Ile Ala Val Ser Arg Val Gln His Leu His Leu Leu Ala Gln Lys Met		
35 40 45		
Phe Asn Asp Phe Asp Gly Thr Leu Leu Pro Asp Glu Arg Arg Gln Leu		
50 55 60		
Asn Lys Ile Phe Leu Leu Asp Phe Cys Asn Ser Asp Ser Ile Val Ser		
65 70 75 80		
Pro Val Asp Lys His Glu Thr Gln Lys Ser Ser Val Leu Lys Leu Leu		
85 90 95		
His Ile Ser Phe Arg Leu Ile Glu Ser Trp Glu Tyr Pro Ser Gln Thr		
100 105 110		
Leu Ile Ile Ser Asn Ser Leu Met Val Arg Asn Ala Asn Gln Ile Ser		
115 120 125		
[0005] Glu Lys Leu Ser Asp Leu Lys Val Gly Ile Asn Leu Leu Ile Thr Gly		
130 135 140		
Ser Gln Asp Gly Leu Leu Ser Leu Asp Asp Asn Asp Ser Gln Gln Leu		
145 150 155 160		
Pro Pro Tyr Gly Asn Tyr Tyr Gln Asn Leu Gly Gly Asp Gly Asn Val		
165 170 175		
Arg Arg Asn Tyr Glu Leu Leu Ala Cys Phe Lys Lys Asp Met His Lys		
180 185 190		
Val Glu Thr Tyr Leu Thr Val Ala Lys Cys Arg Lys Ser Leu Glu Ala		
195 200 205		
Asn Cys Thr Leu Arg Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg		
210 215 220		
Arg Arg Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Arg Ser		
225 230 235 240		
Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr		
245 250 255		
Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro		
260 265 270		
Asp Tyr Ala Ala Gln		
275		
<210> 11		
<211> 4095		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> 合成的多核苷酸 (pPhaT1 藻类表达载体)

<400> 11

gggctgcagg	acgcaatgga	ggattatcac	cgcaaaaatg	aacttcgaaa	aaaacttttcg	60
agcgaccatg	gaaaaggagg	atcagattca	gattacaaca	gtggattgct	ctggtagcaa	120
atatcttctg	ctagatttgc	tcattgtcgg	ttttggacgt	tcgaagctca	ccgtcaaaaag	180
aaacaaaaga	gaagaatgac	gtcttcgtga	cgtagaatct	acgactgtac	tcggatcttg	240
gaaatgaatt	gactcacggt	cttcctcgag	tcctgttaca	ggcccttggt	ccgaaccccc	300
acacgatttt	tgcaccaaa	atcttcttca	atttcttgga	tgctttgact	gcaagatcag	360
ctggcctagc	aagagtgtc	gtgttgcttc	gtcgggaatc	ccctacgaat	tcagttctgc	420
acaaatttgt	ctgccgtttc	gagaattcga	tatcatcgac	taattcgagc	tcggtaccgc	480
gggatcctct	agagtcgacc	tgcaggcatg	caagcttcag	aagcgtgcta	tcgaactcaa	540
ccagggaagt	gcggcacaaa	tgggcaccc	tgctctcatg	gtgcacgaac	agttgggagt	600
ctctatcctt	cccttaaaa	tttaatttca	ttagttgcag	tcactccgct	ttggtttcac	660
agtcaggaat	aacactagct	cgtcttcacc	atggatgcca	atctcgccca	ttcatgggtg	720
ataaaagttc	aacatccaaa	gctagaactt	ttggaaagag	aaagaatata	cgaatagggc	780
acggcgtgcc	gtattgttgg	agtggactag	cagaaagtga	ggaaggcaca	ggatgagttt	840
tctcgagaca	tacctcagc	gtcgtcttca	ctgtcacagt	caactgacag	taatcgttga	900
tccggagaga	ttcaaaaatc	aatctgtttg	gacctggata	agacacaaga	gcgacatcct	960
gacatgaacg	ccgtaaacag	caaatcctgg	ttgaacacgt	atccttttgg	ggccctccgc	1020
tacgacgctc	gctccagctg	gggtctcctt	actatacaca	gcgcgcata	ttcacggttg	1080
ccagatgtca	agatggccaa	gttgaccagt	gccgttccgg	tgctcaccgc	gcgcgacgtc	1140
gccggagcgg	tcgagttctg	gaccgaccgg	ctcgggttct	cccgggactt	cgtggaggac	1200
gaactcgccg	gtgtgttccg	ggacgacgtg	accctgttca	tcagcgcggt	ccaggaccag	1260
gtggtgccgg	acaacacctt	ggcctgggtg	tgggtgcgcg	gcctggacga	gctgtacgcc	1320
gagtgttcgg	aggtcgtgtc	cacgaacttc	cgggacgcct	ccgggccggc	catgaccgag	1380
atcggcgagc	agccgtgggg	gcggggagtc	gccctgcgcg	acccggccgg	caactgcgtg	1440
cacttcgttg	ccgaggagca	ggactgaacc	ttcttataaa	atttaatttt	cattagttgc	1500
agtcaccccg	ctttgttttc	acagtcagga	ataacactag	ctcgtcttca	ccatggatgc	1560
caatctcgcc	tattcatggt	gtataaaaag	tcaacatcca	aagctagaac	ttttggaaag	1620
agaaagaata	tcgaatagg	gcacggcgtg	ccgtattgtt	ggagtggact	agcagaaagt	1680
gaggaaaggc	caggatgagt	tttctcgagg	cgggtctccc	tatagtgagt	cgtattaatt	1740
tcgataagcc	aggttaacct	gcattaatga	atcgcccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	1800
cgtattgggc	gtcttccgcg	ttctcgtctc	actgactcgc	tgccgtcggg	cgttcggctg	1860
cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaaggc	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	1920
aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaagg	cagcaaaaag	ccaggaaccg	taaaaaggcc	1980
gcgtttgctg	cgtttttcca	taggtctcgc	ccctctgacg	agcatcaca	aaatcgacgc	2040
tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcagaga	ctataaaag	accaggcggt	ttcccttgga	2100
agctccctcg	tgcgtctctc	tgcttcgacc	ctgcgcctta	ccggatacct	gtccgccttt	2160
ctcccttcgg	gaagcgtggc	gtttctcaca	tgctcagctt	gtaggtatct	cagttcgggtg	2220
taggtcgttc	gtctcaagct	gggtctgtgt	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgtctc	2280
gccttatccg	gtaactatcg	tccttgagtc	aacccggtaa	gacacgactt	atcgccactg	2340
gcagcagcca	ctggtaacag	gatttagcaga	gcgaggtatg	taggcggtgc	tacagagttc	2400
ttgaagtggg	ggcctaacta	cggtacactt	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgtcttg	2460
ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	2520
gctggtagcg	gtggtttttt	tggtttgcaag	cagcagatta	cgcgagaaa	aaaaggatct	2580
caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	cttgacgtct	agtgaacga	aaactcacgt	2640
taagggattt	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaatata	2700
aatgaagt	ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggtctga	cagttaccaa	2760
tgcttaata	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcac	catagttgcc	2820
tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	ccccagtgtc	2880
gcaatgatac	cgcgagaccc	acgtctaccg	gtctcagatt	tatcagcaat	aaaccagcca	2940

[0006]

```

gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagttctatt 3000
aatgtgtgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcc caacgttggt 3060
gccattgeta caggcatcgt ggtgtcacgc tegtgtttg gtatggettc attcagctcc 3120
ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggtttagc 3180
tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttate actcatggtt 3240
atggcagcac tgcataatte tottactgtc atgccatccg taagatgett ttctgtgact 3300
ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgtctttgc 3360
ccggcgtaaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gtcacatatt 3420
ggaaaacgtt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac cgtgtttgag atccagttcg 3480
atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 3540
gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 3600
tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 3660
ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 3720
acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc 3780
tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcggiga tgacggtgaa 3840
aacctctgac acatgcagct cccgggagcg gtcacagctt gtcgttaagc ggatgcgggg 3900
agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg ctggettaac 3960
tatcggcgat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tggacataat gtcgttagaa 4020
cgcggctaca attaatatcat aaccttatgt atcatacaca tacgatttag gtgacactat 4080
agaaccagat cccccc
4095

```

<210> 12

<211> 189

<212> PRT

<213> 人工序列

[0007]

<220>

<223> 合成的多肽 (成熟鲑鱼生长激素)

<400> 12

```

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

```

	180	185
	<210> 13	
	<211> 30	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的肽(三角褐指藻全液泡前导序列)	
	<400> 13	
	Met Ser Ile Arg Leu Phe Ser Thr Ala Leu Leu Ala Ala Cys Leu Ala	
	1 5 10 15	
	Lys Ala Thr Ala Gln Thr Cys Pro Thr Leu Ile Trp Ser Asp	
	20 25 30	
	<210> 14	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 14	
	gccgcgcgtcc tcctccccgt ctgtttggtt gcccc	36
	<210> 15	
	<211> 33	
[0008]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 15	
	tacggacgta agaagcgtcg tcagcgccgt cgt	33
	<210> 16	
	<211> 99	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 16	
	atgatgttca tgagaattgc cgtacgagca ctggccttgc tggctgctcc ctccattcgt	60
	gccgaagagg ctggtgaaga ggccaagatg ggtaccgtg	99
	<210> 17	
	<211> 666	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 17	
	atgatgttca tgagaattgc cgtacgagca ctggccttgc tggctgctcc ctccattcgt	60
	gccgaagagg ctggtgaaga ggccaagatg ggtaccgtga ttgaaaacea gcgtttgttc	120

```

aacattgccg tctcccgigt ccagcacctc caccctcttg cccagaagat gttcaacgac    180
ttcgacggaa cctctctccc cgaagaacgt cgtcagetca acaagatttt cctctctgac    240
ttctgcaact cgaactccat tgtctccccc gtcgacaage acgaaacca gaagtcctcc    300
gtctcaage tctctcacat tteettccgc ctcatcgaaat cctgggaata cccctcccag    360
accttcatta ttccaacte cctcatggic cgcaacgcca accagatttc cgaaaagctc    420
tccgatctca aggtcggaat caacctctc attaccgggt cccaggacgg actcctctcc    480
ctcgacgaca acgaactcca gcagctcccc ccctacggaa actactacca gaacctcgga    540
ggcgacggaa acgtccgtcg taactacgaa ctctctgctt gctteaagaa ggacatgcac    600
aaggtcgaaa cctacctcac cgtcgccaag tgcgcgaagt cctcgaagc caactgcacc    660
ctctaa
666

```

<210> 18

<211> 67

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 18

```

atgtcgattc gtctcttctc taccgcctta ctagctgctt gcttagcaaa ggcaactgcc    60
caaactg
67

```

<210> 19

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 19

```

atgtcgattc gtctcttctc taccgcctta ctagctgctt gcttagcaaa ggcaactgcc    60
caaactggat ccattgaaaa ccagcgtttg ttcaacattg ccgtctcccg tgtccagcac    120
ctccacctct tggcccagaa gatgttcaac gacttcgacg gaacctctct ccccgacgaa    180
cgtegtcagc tcaacaagat ttctctctc gactttcgca actccgactc cattgtctcc    240
ccgtcgaca agcaagaaac ccagaagtc tccgtctca agctctctca catttcttc    300
cgctcctcg aatcctggga atacccctcc cagacctca ttatttccaa ctccctcatg    360
gtccgcaacg ccaaccagat ttccgaaaag ctctccgac tcaaggctcg aatcaacctc    420
ctcattaccg gtcccagga cggactctc tccctcgacg acaacgactc ccagcagctc    480
ccccctacg gaaactacta ccagaacctc ggaggcgacg gaaacgtccg tcgtaactac    540
gaactctctg cctgcttcaa gaaggacatg cacaaggctg aaacctacct cacgctcgcc    600
aagtgcgcga agtccctega agccaactgc acctcagat ctgggtggagg tggcggatac    660
ccgtacgacg tccctgatta cgcgggatac ccttacgatg tcccgacta cgcgggttcc    720
taccctacg acgtcccgga ctacgcgcgc cagtaa
756

```

<210> 20

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽(刺鼠相关蛋白片段)

<400> 20

Cys Ile Pro His Gln Gln Ser Cys Leu Gly His His Leu Pro Cys Cys

1

5

10

15

[0009]

Asn Pro Cys Asp Thr Cys Tyr Cys Arg Phe Phe Lys Ala Phe Cys Tyr
 20 25 30
 Cys Arg Ser Met Asp Asn Thr Cys Lys Asn Glu Tyr Ala
 35 40 45

<210> 21
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多核苷酸
 <400> 21

tgcattcegc accagcagtc ctgcctcgga caccacctcc cgtgctgcaa cccctgcgac 60
 acctgctact gtctgtttctt caaagccttc tgttactgcc gtccatgga caacacctgt 120
 aagaacgaat acgcc 135

<210> 22
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的肽
 <400> 22

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

[0010]

<210> 23
 <211> 201
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多核苷酸
 <400> 23

atgtccatcc gtctcttctc caccgccctc ttggccgctt gcctcgccaa ggccacccgt 60
 cagacctgca ttccgcacca gcagtcctgc ctggacacc acctccgtg ctgcaacccc 120
 tgcgacacct gctactgtcg ttctttcaaa gccttctgtt actgccgttc catggacaac 180
 acctgtaaga acgaatacgc c 201

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 原鸡 (Gallus gallus)
 <400> 24

34

65	70	75	80
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu			
	85	90	95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu			
	100	105	110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly			
	115	120	125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr			
	130	135	140
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn			
	145	150	155
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser			
	165	170	175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly			
	180	185	190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu			
	195	200	205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe			
	210	215	220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys			
	225	230	235

<210> 29

<211> 720

<212> DNA

[0012] <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 29

atgggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggega tgccacctac	120
ggcaagctga cccgtgaagt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca cctgaceta cggcgtgcag tgcctcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
cagcaagact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggtacg tccaggagcg caccatcttc	300
tccaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tgcccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaattcaa gatecgcacc aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tctgtctgcc cgacaaccac	600
tacctgagca cccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagegcga tcacatggic	660
ctgctggagt tegtgaccgc cgccgggata actctcgga tggacgagct gtacaagtaa	720

<210> 30

<211> 263

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽

<400> 30

Met Ser Ile Arg Leu Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ala Cys Leu Ala	
1	5 10 15

Lys Ala Thr Ala Gln Thr Gly Ser Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu
 20 25 30
 Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
 35 40 45
 Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
 50 55 60
 Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
 65 70 75 80
 Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe
 85 90 95
 Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 100 105 110
 Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 115 120 125
 Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 130 135 140
 Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 145 150 155 160
 Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr
 165 170 175
 Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile
 180 185 190
 Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
 195 200 205
 Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
 210 215 220
 Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
 225 230 235 240
 Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
 245 250 255
 Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 260

[0013]

<210> 31

<211> 792

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 31

```

atgtcgattc gtctcttctc taccgcctta ctagctgctt gettagcaaa ggcaactgcc      60
caaactggat ccatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gccatcctg      120
gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgcgggcga gggcgagggc      180
gatgcacctt acggcaagct gacctgaag ttcatctgca ccaccggcaa getgcccgtg      240
ccctggccca ccctcgtgac cacctgacc tacggcgtgc agtgcctcag ccctacccc      300
gaccacatga agcagcacga ctcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag      360
cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacce gcgccgaggt gaagttcgag      420
ggcgacaacc tggatgaacc catcgagctg aagggcateg acttcaagga ggacggcaac      480
atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac      540
aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc      600
gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgetgctg      660

```

```

cccgacaacc actacctgag caccacagtc gccctgagca aagaccccaa cgagaagegc 720
gatcacaatgg tccctgtgga gttcgtgacc gccgcgggga tcactctcgg catggacgag 780
ctgtacaagt aa 792

```

<210> 32
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多肽
 <400> 32

[0014]

```

Met Ser Ile Arg Leu Phe Ser Thr Ala Leu Leu Ala Ala Cys Leu Ala
1          5          10          15
Lys Ala Thr Ala Gln Thr Gly Ser Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu
20          25          30
Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
35          40          45
Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
50          55          60
Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
65          70          75          80
Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe
85          90          95
Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
100         105         110
Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
115         120         125
Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
130         135         140
Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
145         150         155         160
Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr
165         170         175
Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile
180         185         190
Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
195         200         205
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
210         215         220
Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
225         230         235         240
Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
245         250         255
Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Lys Leu Ser Ala Ala Val Leu Leu Pro
260         265         270
Val Leu Leu Ala Ala Pro
275

```

<210> 33
 <211> 838
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 33

```

atgtcgattc gtctcttctc taccgcttta ctactgtctt gcttagcaaa ggeaactgcc      60
eaaactggat ceatggtgag caagggcgag gagctgttca ccgggggtgt gceccatctg      120
gtcagactgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tctccggcga gggcgagggc      180
gatgccacct aeggcaagct gacctgaag ttcacttgea ccaccggcaa gctgcccgtg      240
ccctggccca cctcgtgac cacctgacc tacggcgtgc agtgcttcag ccctacccc      300
gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tcgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag      360
cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgccaggt gaagttcgag      420
ggcgacaccc tggatgaacc catcgagctg aagggcctg acttcaagga ggacggcaac      480
atctgggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac      540
aagcagaaga acggcatcaa ggigaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc      600
gtcgagctcg ccgaccacta ccagcagaac accccatcg gcgacggccc cgtgtgtgtg      660
cccgacaacc actacctgag caccagctcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc      720
gatcacatgg tcctgtgga gtctgtgacc gcgccggga tcactctcgg catggacgag      780
ctgtacaaga agctttctgc cgcctctctc ctcctctctt tgttggtctc ccccataa      838

```

<210> 34

<211> 276

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽

<400> 34

[0015]

```

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

```

	195	200	205
	Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His		
	210	215	220
	Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg		
	225	230	235
	Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu		
	245	250	255
	Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Lys Leu Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg		
	260	265	270
	Gln Arg Arg Arg		
	275		
	<210> 35		
	<211> 831		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的多核苷酸		
	<400> 35		
	atgtcgatgc gtctcttctc taccgcccta ctagctgctt gettagcaaa ggcaactgcc	60	
	caaactggat ccattggtgag caagggcgag gagctgttca cgggggtggt gccatcctg	120	
	gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgccggcga ggcgagggc	180	
	gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcatttga ccaccggcaa gctgccctg	240	
	ccctggccca cctcgtgac cacctgacc tacggcgtgc agtgcctcag ccctacccc	300	
	gaccacatga agcagcaaga ctcttcaag tccgcatgc ccgaaggcta cgtccaggag	360	
[0016]	cgacacatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgcggaggt gaagttcgag	420	
	ggcgacaacc tggatgaacc catcgagctg aagggcacg acttcaagga ggacggcaac	480	
	atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac	540	
	aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgc acaacatcga ggacggcagc	600	
	gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg	660	
	cccgacaacc actacctgag caccagtcg gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc	720	
	gacacatgg tctgctgga gtctgtgacc gccgcggga tcactctcgg catggacgag	780	
	ctgtacaaga agctttacgg acgtaagaag cgtcgtcagc gccgtcgtta a	831	
	<210> 36		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的多核苷酸		
	<400> 36		
	ggaattcatg atgttcatga gaattgc	27	
	<210> 37		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的多核苷酸		
	<400> 37		
	acgttggttt tcaatcaagg taccatctt	30	

	<210> 38	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 38	
	ggaattcatg atgttcatga gaattgc	27
	<210> 39	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 39	
	acgctgggtt tcaatcaagg taccatctt	30
	<210> 40	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
[0017]	<400> 40	
	aagatgggta ccgtgattga aaaccagcgt	30
	<210> 41	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 41	
	gagatctgag ggtgcagttg g	21
	<210> 42	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 42	
	ggaattcatg ggccaagtct ttctcttg	28
	<210> 43	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 43	
	ggatccattg aaaaccagcg ttgtttcaac	30
	<210> 44	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 44	
	aagctttttac tgggcggcgt agtcggggac gtcgtagggg ta	42
	<210> 45	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
[0018]	<400> 45	
	atgaattcat gtcgattcgt ctct	24
	<210> 46	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 46	
	atggatccag tttgggcagt tgcc	24
	<210> 47	
	<211> 98	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 47	
	taccegtaag acgtccctga ttacgccgga taccettacg atgtcccgga ctacgcegt	60
	tcttaccctt acgacgtccc ggactacgcc gccagta	98

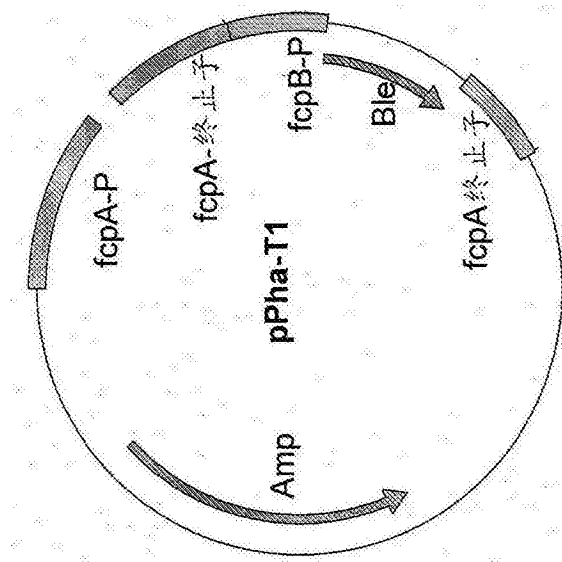


图1

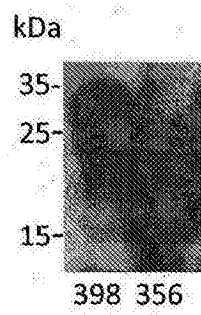


图2

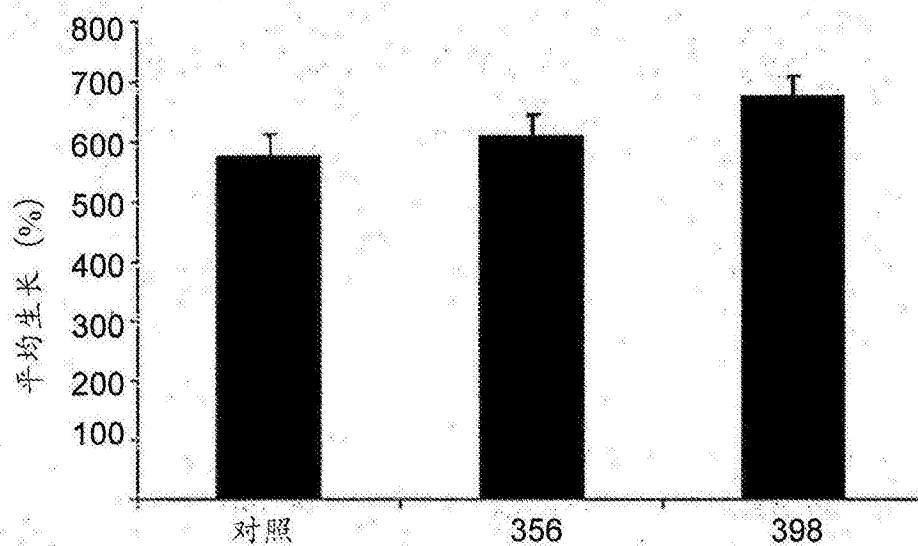


图3

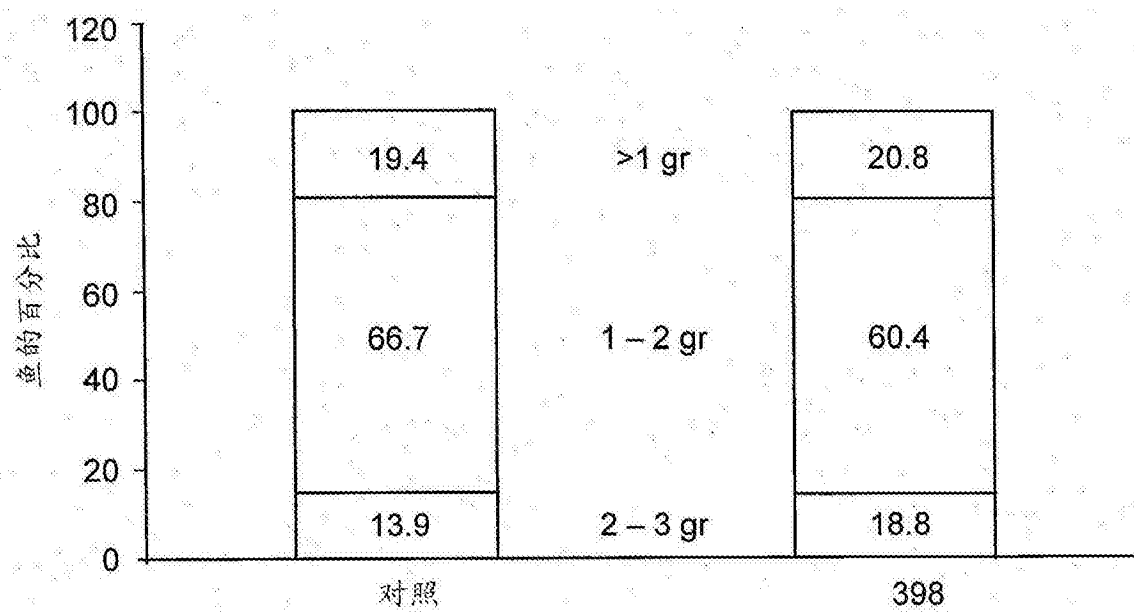


图4

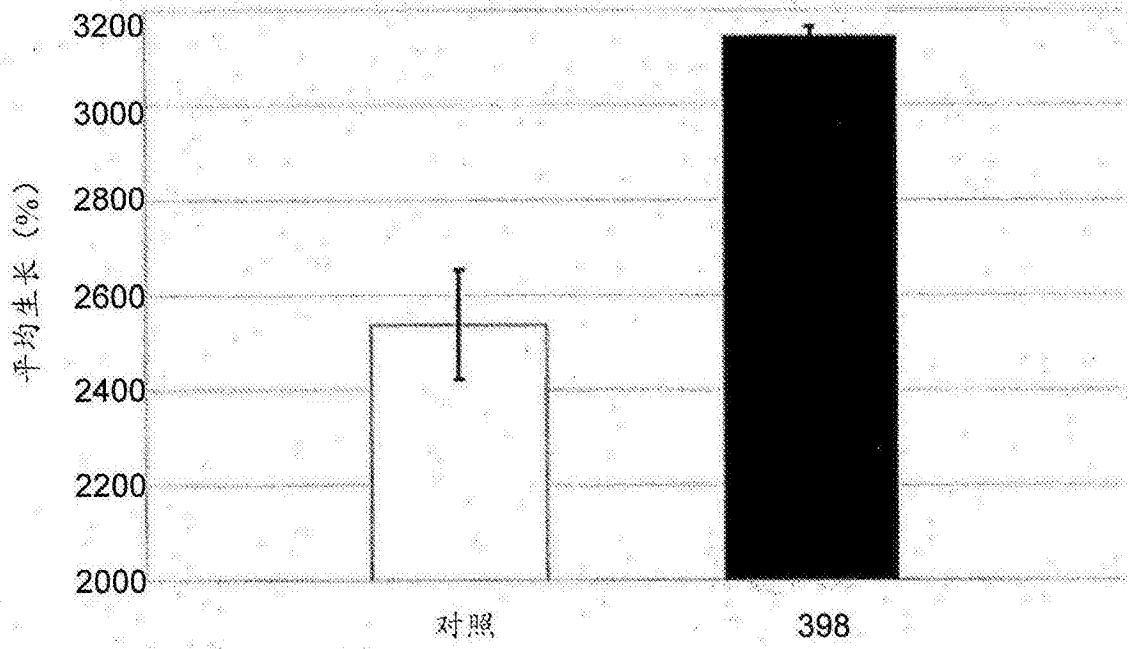


图5

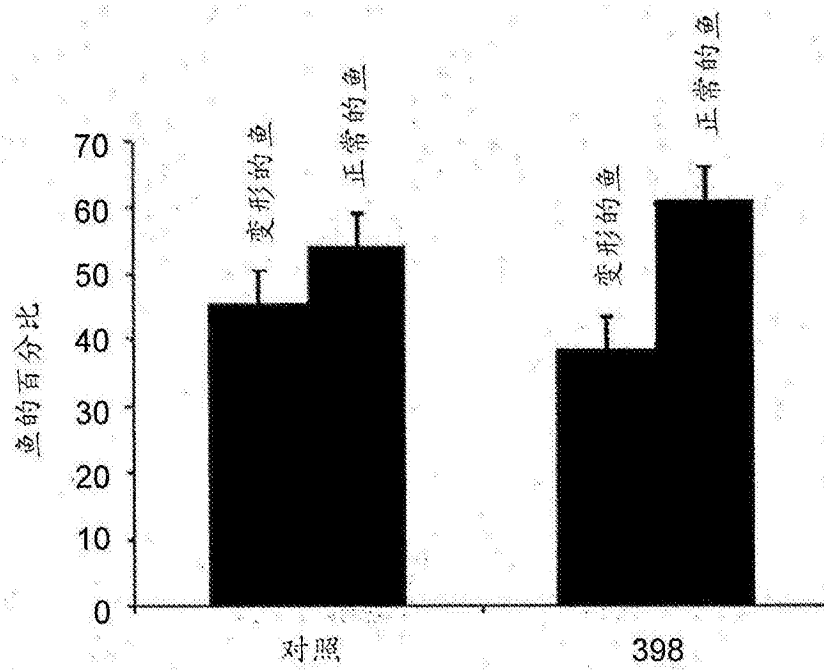


图6

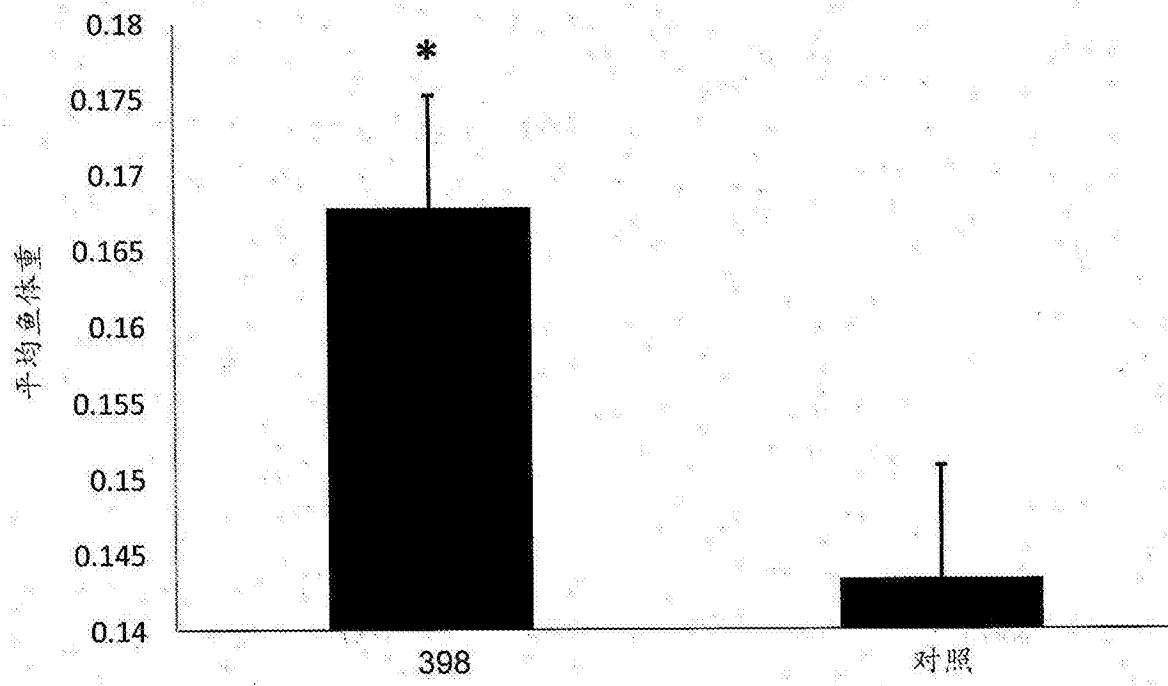


图7

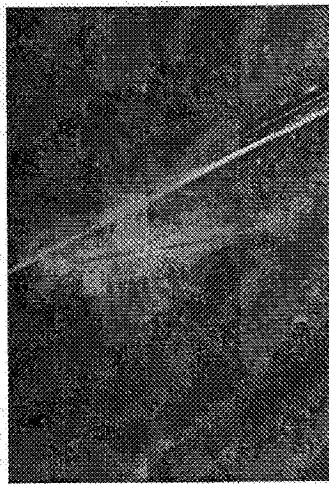


图8A

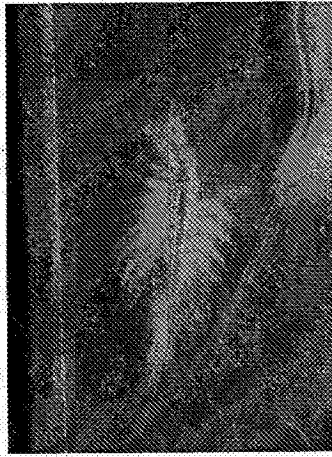


图8B



图8C

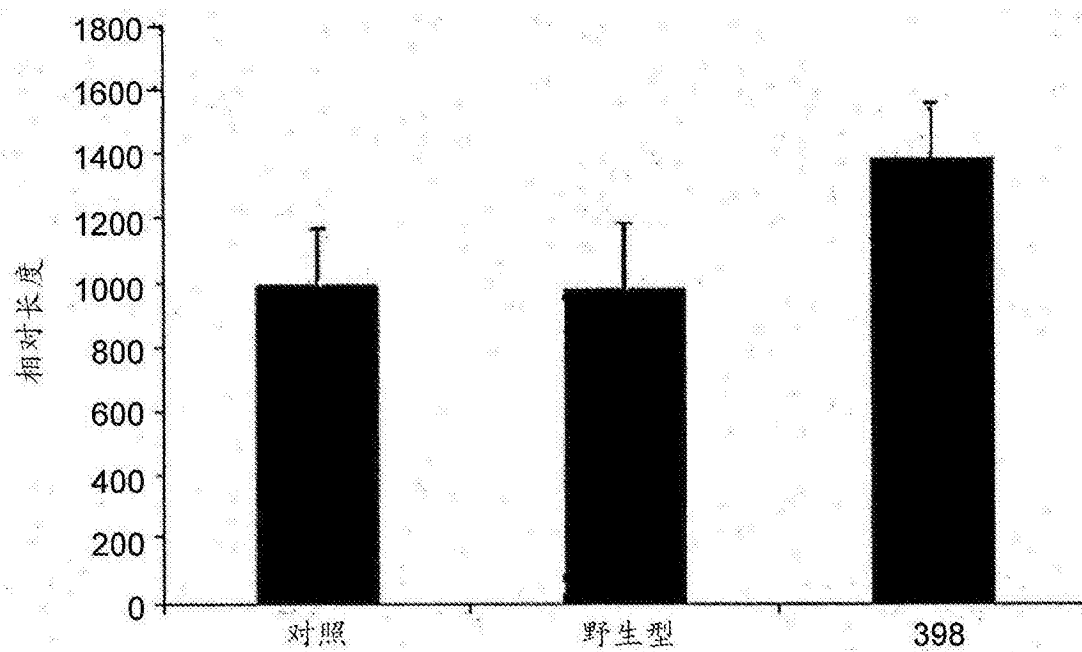


图9

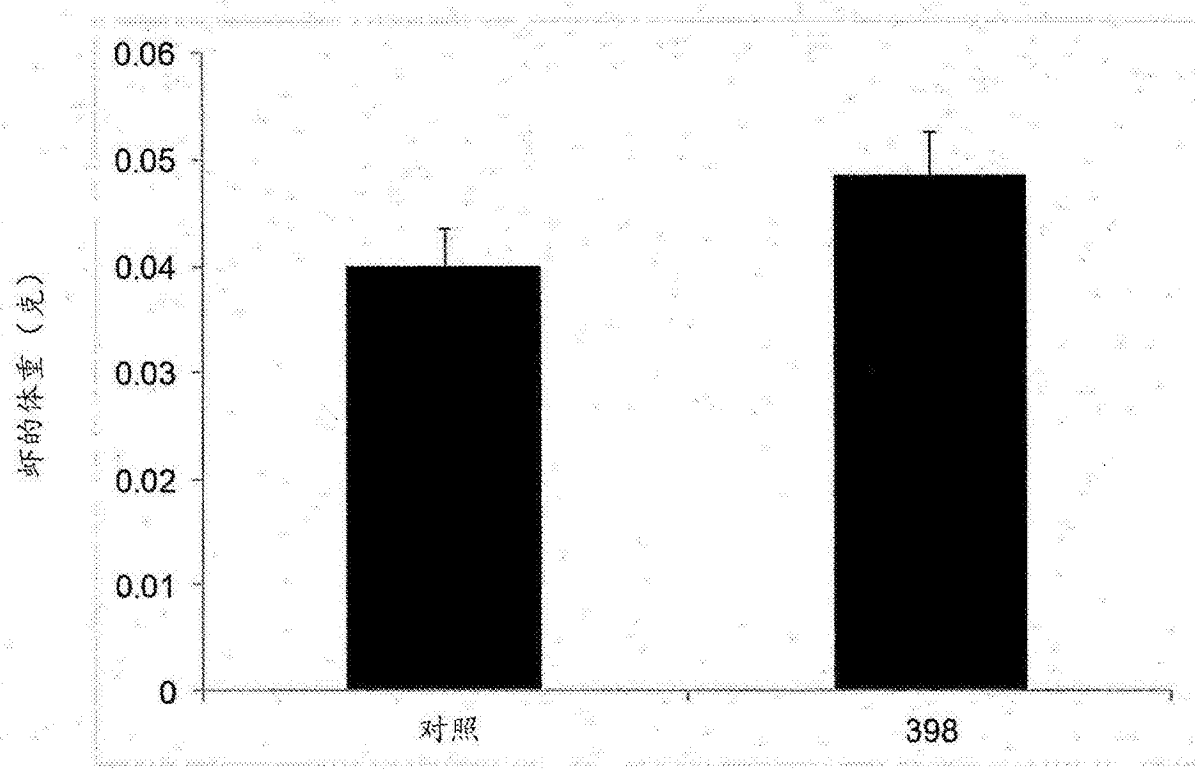


图10

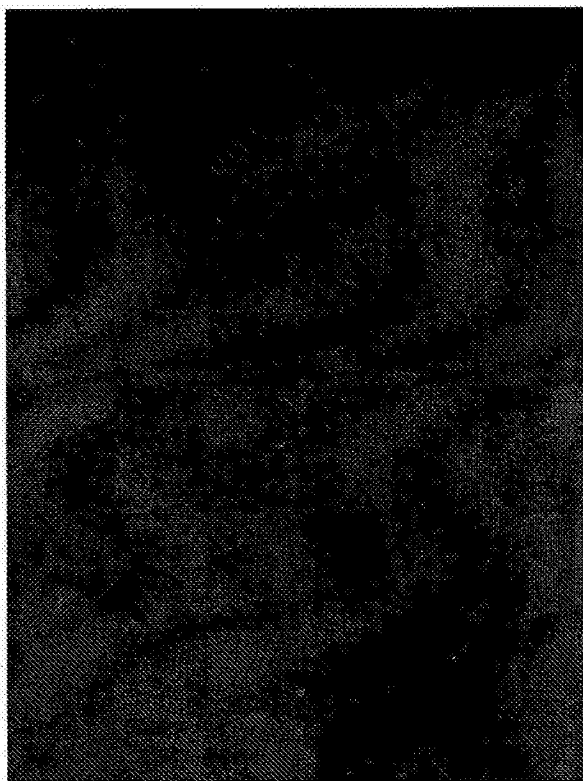


图11A

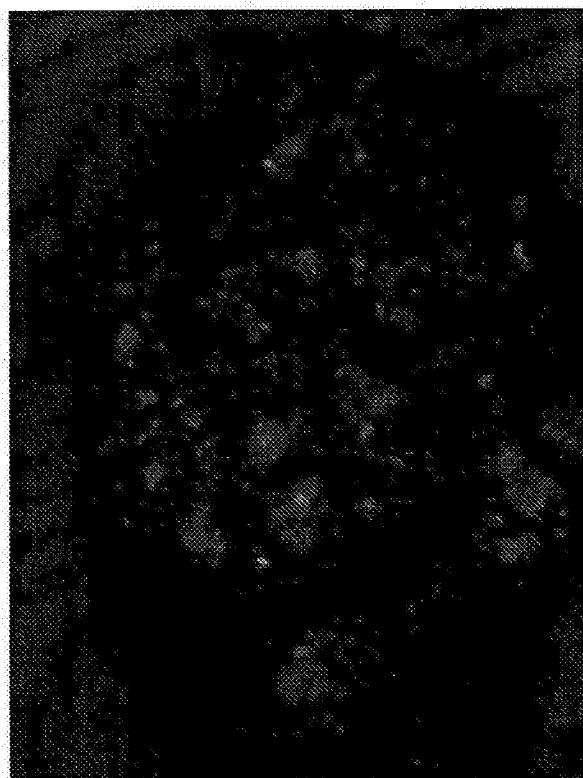


图11B



图12A



图12B

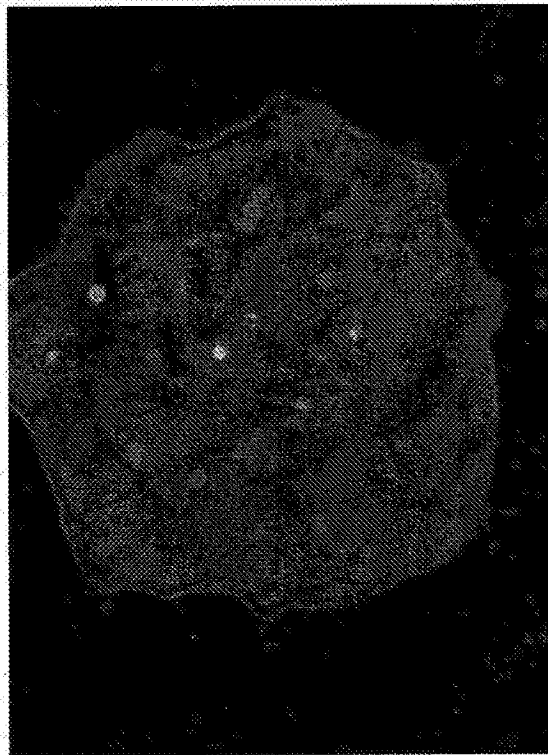


图13A

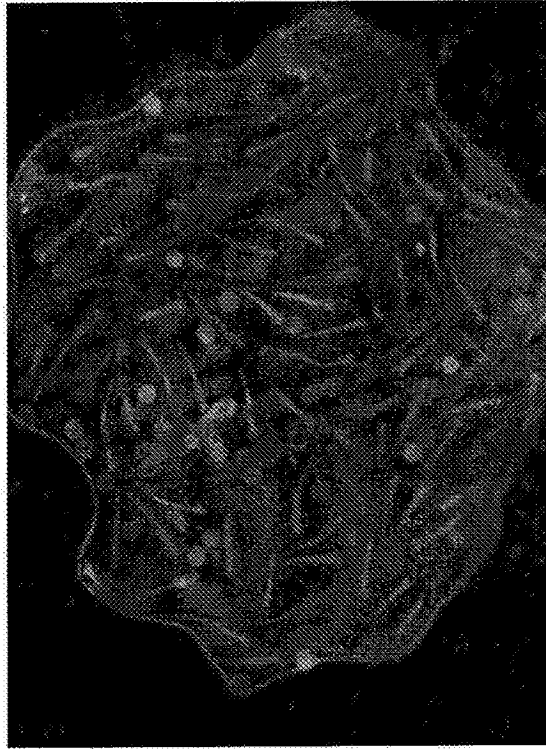


图13B

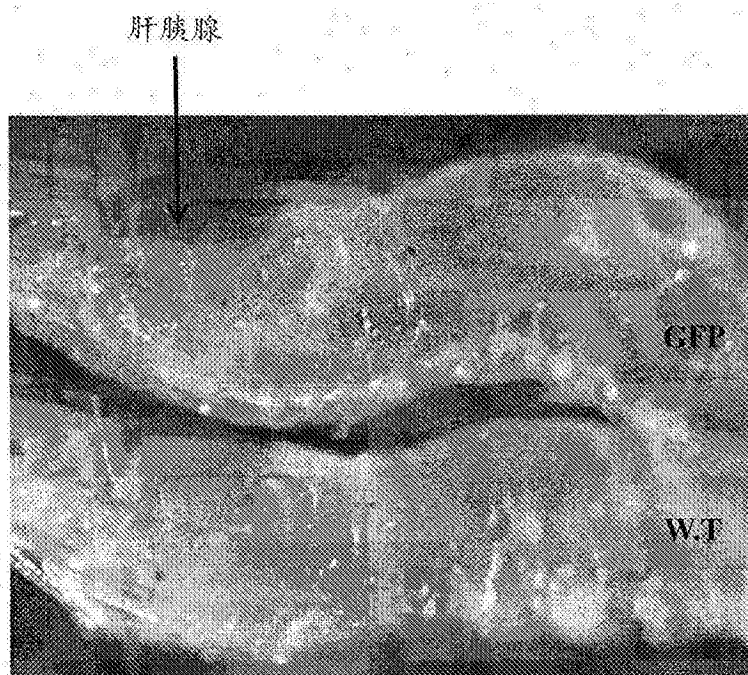


图14A

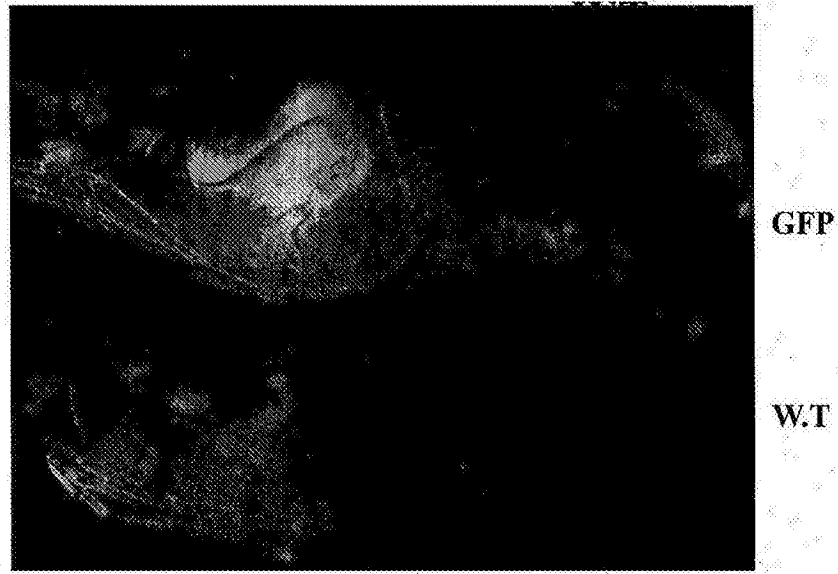


图14B



图15A

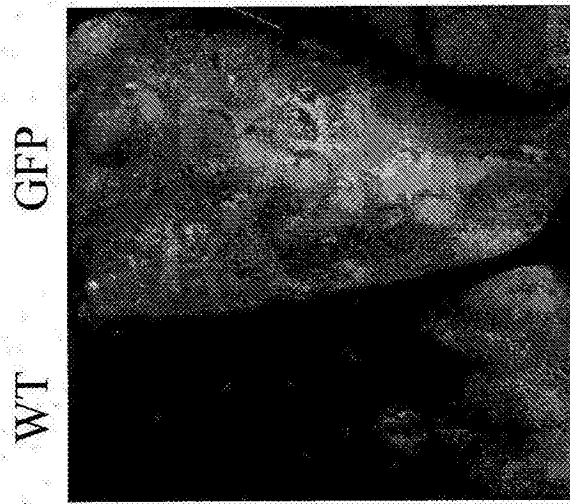


图15B

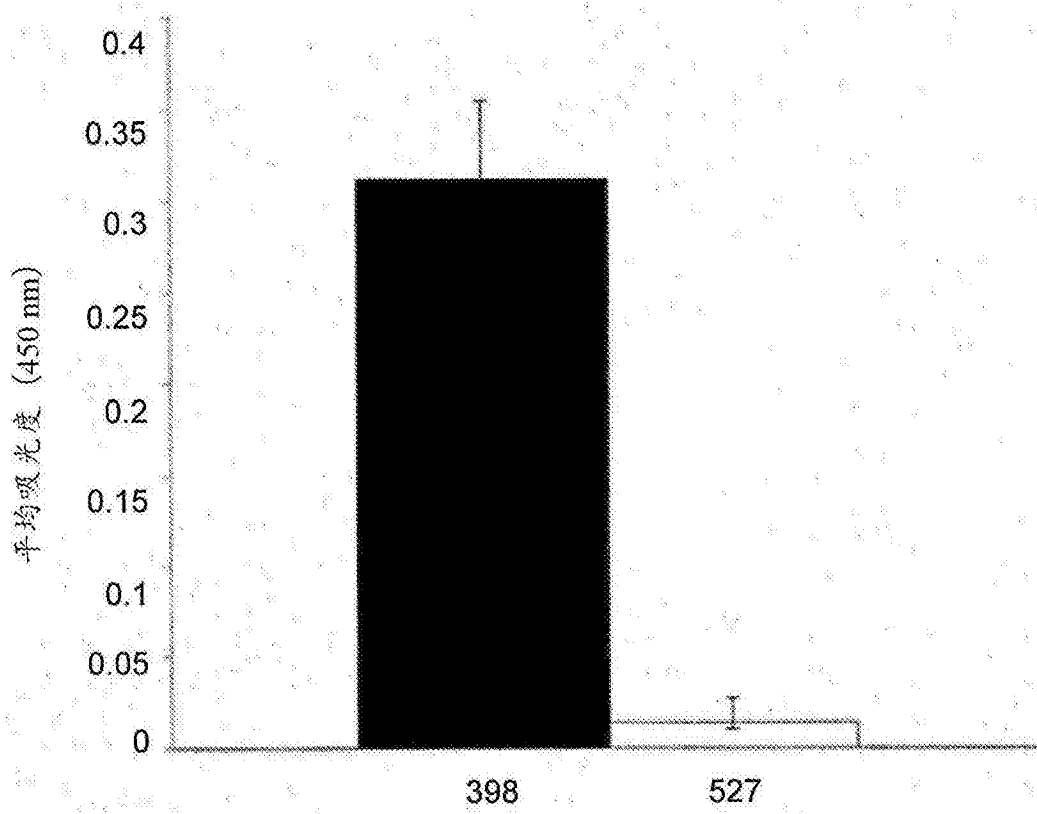


图16

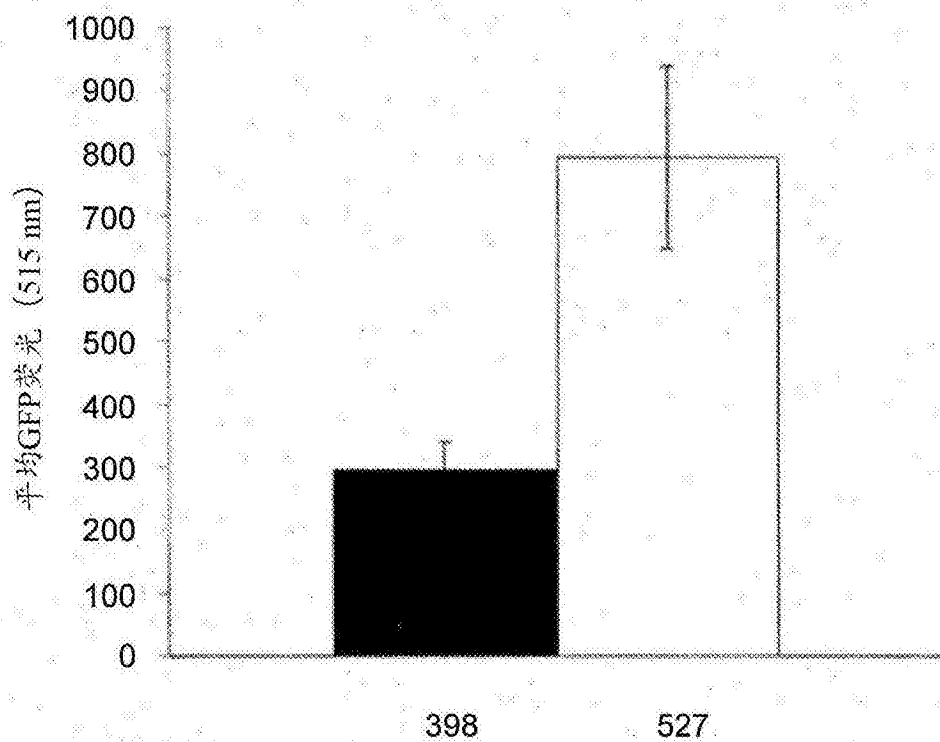


图17

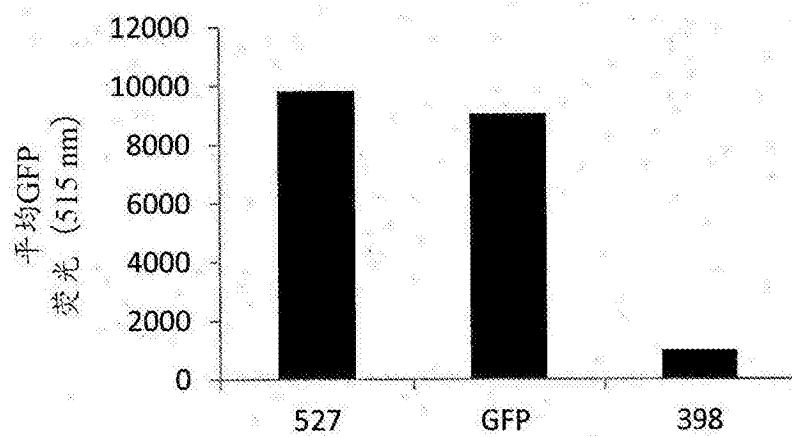


图18A

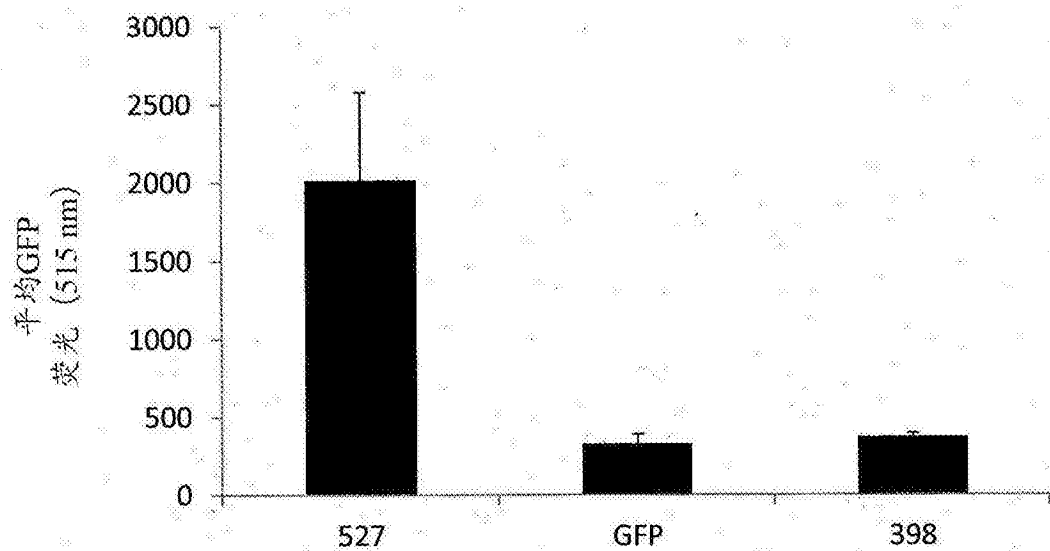


图18B

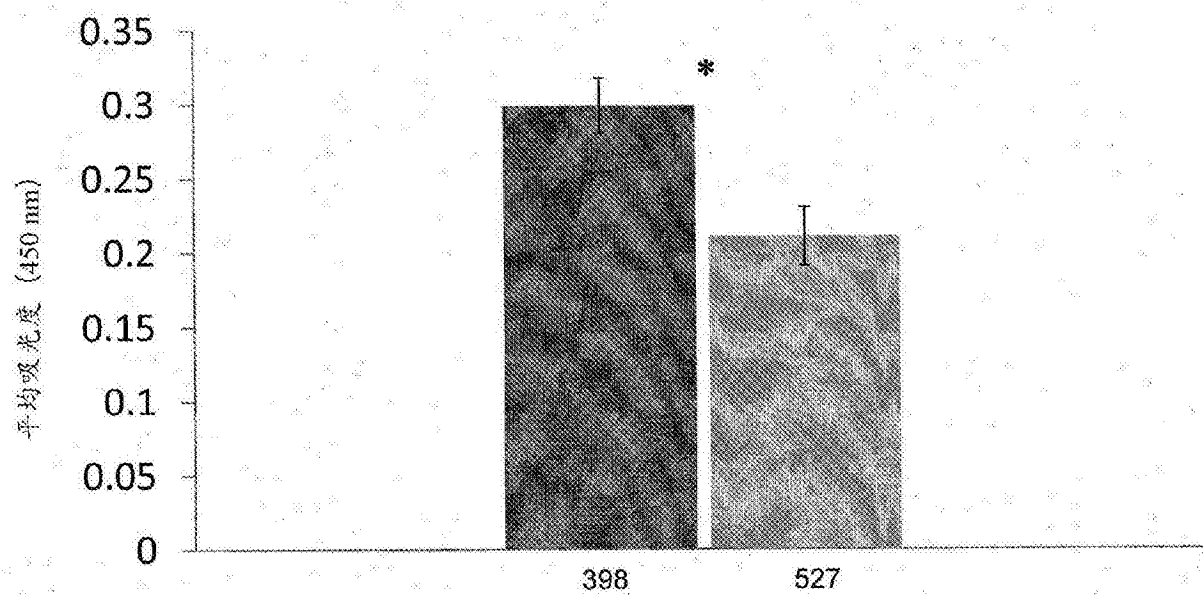


图19