

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202291748 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.10.18(51) Int. Cl. C12P 7/50 (2006.01)  
C12N 1/12 (2006.01)  
C12P 7/40 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2020.12.02

## (54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭТИЛЕНА ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

(31) 62/942,895

(72) Изобретатель:

(32) 2019.12.03

Карими Тахерех, Нгуен Труонг Хуу,  
Куэва Мигель Эухенио (US)

(33) US

(86) PCT/US2020/062938

(74) Представитель:

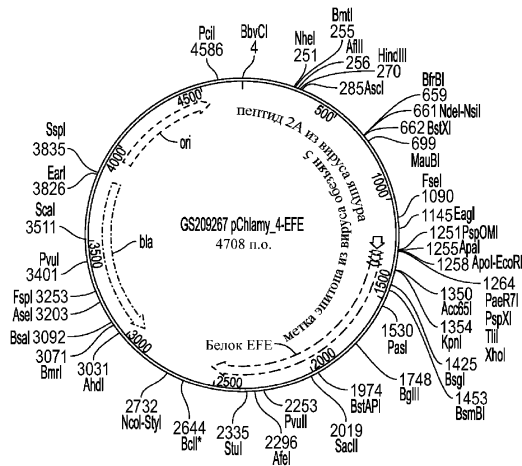
(87) WO 2021/113396 2021.06.10

Хмара М.В. (RU)

(71) Заявитель:

СЕМВИТА ФЭКТОРИ, ИНК. (US)

(57) Изобретение относится к рекомбинантным микроорганизмам, обладающим улучшенной способностью продуцировать этилен, способам получения вышеуказанного и способам получения этилена. Польза от рекомбинантных микроорганизмов и способов, раскрытых в данном документе, может включать увеличенное получение этилена из микробных культур. Дополнительная польза может заключаться в использовании диоксида углерода в получении биоэтилена, полезного в качестве сырья для получения пластмассы, текстиля и химических веществ, и для использования в других применениях. Еще одна польза от способов и систем, раскрытых в данном документе, может включать уменьшение избытка диоксида углерода в окружающей среде.



A1

202291748

202291748

A1

## СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭТИЛЕНА ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

### Перекрестная ссылка

5 [0001] Данная заявка заявляет приоритет по первоначальной заявке США № 62/942895, поданной 03 декабря 2019 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

### Область изобретения

10 [0002] Настоящее раскрытие относится к рекомбинантным микроорганизмам, обладающим улучшенной способностью продуцировать этилен, способам получения вышеуказанного и способам сбора этилена из таких рекомбинантных организмов. Польза от данных рекомбинантных микроорганизмов и способов, раскрытых в данном документе, может включать увеличенную продукцию этилена  
15 из микробных культур. Дополнительной пользой может являться применение диоксида углерода для получения биоэтилена, полезного в качестве сырья для производства пластмассы, текстиля и химических веществ, и для использования в других применениях. Еще одна польза раскрытых в данном документе способов и систем может включать уменьшение избытка диоксида углерода из окружающей  
20 среды.

### Предшествующий уровень техники

[0003] Увеличенная потребность в энергии во всем мире привела к избытку диоксида углерода в результате сгорания ископаемых видов топлива, таких как  
25 нефть и газ, что по существу способствовало тому, что многие объявляют о кризисе глобального потепления. Промышленность так отчаялась предотвратить поступление диоксида углерода в атмосферу, что они прибегли к удалению диоксида углерода из потоков выхлопных газов и атмосферы. Затем они хранят диоксид углерода в подземной окружающей среде. Однако, все современные  
30 известные способа только удаляют диоксид углерода из атмосферы посредством хранения его под землей. Они фактически не превращают диоксид углерода обратно ни в какое другое полезное вещество.

[0004] Ограниченный запас нефтепродукта и его вредные воздействия на окружающую среду подтолкнули к разработкам возобновляемых источников  
35 топлива и химических веществ. Этилен представляет собой наиболее широко получаемое органическое соединение в мире, полезное в широком спектре отраслей

промышленности, включая пластмассу, растворители и текстиль. Этилен в настоящее время производится посредством парового крекинга ископаемых видов топлива или дегидрогенизации этана. При миллионах метрических тонн этилена, производимых каждый год, однако, более чем достаточно диоксида углерода  
5 продуцируется посредством таких процессов, внося значительный вклад в мировой «углеродный след». Получение этилена посредством способов на основе возобновляемых источников, соответственно, поможет удовлетворить огромную потребность энергетической и химической отраслей промышленности, также одновременно помогая защитить окружающую среду.

10 [0005] Поскольку этилен представляет собой потенциально возобновляемое сырье, существует огромный интерес в разработке технологий для получения этилена из возобновляемых источников, таких как диоксид углерода и биомасса. Биоэтилен в настоящее время получают с использованием этанола, происходящего из кукурузы или сахарного тростника. Множество микробов, включая бактерии и  
15 грибы, в природе производит этилен в маленьких количествах. Гетерологичная экспрессия фермента, производящего этилен, продемонстрирована в нескольких видах микробов, где хозяева способны утилизировать множество источников углерода, включая лигноцеллюлозу и диоксид углерода.

[0006] На основе современной истории, справедливо сказать, что избыток  
20 диоксида углерода в атмосфере не будет уменьшен до тех пор, пока не станет выгодно его уменьшить. Остается необходимость в улучшениях в микробных системах и процессах, связанных с биоэтиленом, для получения этилена в коммерческом масштабе. Остается необходимость в получении углеводородов посредством более эффективных возобновляемых технологий. Остается  
25 необходимость в удалении избытка диоксида углерода из атмосферы. Остается необходимость в улучшенных способах получения этилена из возобновляемого сырья для промышленных и коммерческих применений.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

30 [0007] Воплощения в данном документе направлены на рекомбинантный микроорганизм, обладающий улучшенной способностью продуцировать этилен, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – фермент, образующий этилен (EFE – от англ. ethylene forming enzyme), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID  
35 NO: 1 (см. прилагаемое Приложение), посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, при этом количество

белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм также экспрессирует по меньшей мере один белок альфа-кетоглутаратпермеазу (AKGP – от англ. alpha-ketoglutarate permease), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2 (см. прилагаемое Приложение), посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP, при этом количество белка AKGP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка AKGP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP. В одном воплощении количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 5% до примерно 200% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

[0008] В разных воплощениях рекомбинантный микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли, микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку.

[0009] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в бактериальную векторную плазмиду, бактериальную векторную плазмиду с большим числом копий, бактериальную векторную плазмиду, имеющую индуцибельный промотор, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3 (см. прилагаемое Приложение), и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas* sp.

[0010] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность,

экспрессирующая АКРР, вставлены в бактериальную векторную плазмиду, бактериальную векторную плазмиду с большим числом копий, бактериальную векторную плазмиду, имеющую индуцибельный промотор, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4 (см. прилагаемое Приложение), и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКРР, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Escherichia* sp.

[0011] В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм дополнительно включает ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую АКРР, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКРР, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 (см. прилагаемое Приложение), и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКРР, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus* sp. В еще одном воплощении рекомбинантный микроорганизм дополнительно включает ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую АКРР, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКРР, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6 (см. прилагаемое Приложение), и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКРР, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus* sp.

[0012] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок фосфоенолпируватсинтазу (PEP – от англ. phosphoenolpyruvate synthase), имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 15, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, при этом количество белка PEP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше чем количество белка PEP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной

нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, и где количества АКГ, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество АКГ, продуцируемого контрольным микроорганизмом. В некоторых таких воплощениях рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

[0013] В некоторых воплощениях рекомбинантный белок экспрессирует по меньшей мере один белок фосфоенолпируватсинтазу (PEP), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 15, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, при этом количество белка PEP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка PEP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, и где количество АКГ, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка АКГ, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

[0014] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок цитратсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 17, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу, при этом количество белка цитратсинтазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка цитратсинтазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу.

[0015] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок изоцитратдегидрогеназу (IDH – от англ. isocitrate dehydrogenase), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 20, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH, при этом количество белка IDH, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка IDH, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH, и

где количество AKG, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество AKG, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

5 [0016] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм содержит делецию в нуклеотидной последовательности, экспрессирующей глюкозо-1-фосфатаденилилтрансферазу, при этом количество белка глюкозо-1-фосфатаденилилтрансферазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, меньше, чем количество белка глюкозо-1-фосфатаденилилтрансферазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим делеции.

10 [0017] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – сахарозопермеазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 24, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу, при этом количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу.

15 [0018] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок сахарозопермеазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 24, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу, при этом количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу.

20 [0019] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок сахарозопермеазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 24, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу, при этом количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу.

[0020] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из белка сахарозофосфатсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 26, белка сахарозо-6-фосфатазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 28, белка гликогенфосфорилазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 30, и белка UTP (от англ. uridine triphosphate – уридинтрифосфат)-глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 32, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один белок, где количество по меньшей мере одного белка, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один белок, где количество сахарозы, продуцируемой рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое контрольным микроорганизмом.

[0021] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм содержит по меньшей мере одну делецию в по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, где по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность кодирует по меньшей мере один белок, выбранный из белка инвертазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 34, белка глюкозилглицеринфосфатсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 36, и белка гликогенсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 38, где количество по меньшей мере одного белка, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, меньше, чем количество, продуцируемое контрольным микроорганизмом, не имеющим по меньшей мере одной делеции.

[0022] Воплощения в данном документе направлены на способы получения рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен. В одном воплощении способ включает получение рекомбинантного микроорганизма посредством вставки ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, или ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, объединенной с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, в бактериальную



плазмиду микроорганизма, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7 (см. Приложение).

[0023] В разных воплощенных способах микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли, микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку.

[0024] В одном воплощении способов в данном документе ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3, и микроорганизм представляет собой бактерию *Chlamydomonas* sp. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4, и микроорганизм представляет собой бактерию *Escherichia* sp. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6, и микроорганизм представляет собой бактерию *Synechococcus* sp. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7, и микроорганизм представляет собой бактерию *Synechococcus* sp.

[0025] Способы получения этилена воплощены в данном документе. Воплощение такого способа включает предоставление рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – фермент, образующий этилен (EFE), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, при этом количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE; культивирование рекомбинантного микроорганизма в сосуде биореактора для культивирования в условиях, достаточных для получения этилена в сосуде биореактора для культивирования; и сбор этилена из сосуда биореактора для культивирования.

[0026] В одном воплощении способов получения этилена в данном документе рекомбинантный микроорганизм содержит ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, или ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, объединенную с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКGP, вставленную в бактериальную плазмиду микроорганизма, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКGP, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКGP, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6.

[0027] В разных воплощениях получения этилена в данном документе рекомбинантный микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли,

микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку.

[0028] Воплощение способа получения этилена дополнительно включает увеличение количества продукции этилена посредством добавления по меньшей мере одного активатора к культуре, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенный в сосуде биореактора для культивирования. В одном воплощении такой способ включает добавление  $\text{CO}_2$  к атмосфере культуры, содержащейся в пределах сосуда биореактора для культивирования, со скоростью от примерно 100 мл/минута до примерно 500 мл/минута. В одном воплощении такой способ дополнительно включает уменьшение количества продукции этилена посредством удаления по меньшей мере одного молекулярного переключателя из клеточной культуры, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенный в сосуде биореактора для культивирования. В одном воплощении такой способ дополнительно включает осуществление контроля над количеством этилена, продуцируемым из культуры микроба, посредством увеличения или уменьшения концентрации по меньшей мере одного питательного вещества или количества по меньшей мере одного стимула при культивировании рекомбинантного микроорганизма. В одном воплощении концентрация по меньшей мере одного питательного вещества и количество по меньшей мере одного стимула находятся в соотношении от примерно 0,5-1,5 гр./литр до примерно 0,1 мМ в микробной культуре. В одном воплощении такой способ дополнительно включает удаление продуцируемого количества этилена из микробной культуры посредством конденсации этилена из газового в жидкое состояние, или когда количество выделенного этилена составляет от примерно 0,5 мл до примерно 10 мл/литр/ч.

[0029] Воплощения в данном документе направлены на рекомбинантный микроорганизм, обладающий способностью продуцировать альфа-кетоглутарат (AKG). В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок фосфоенолпируватсинтазу (PEP), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 15, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, и при этом количество белка PEP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка PEP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP.

[0030] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – изоцитратдегидрогеназу (IDH),

имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 20, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH, и при этом количество белка IDH, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка IDH, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH; где количество AKG, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество AKG, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

[0031] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – цитратсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 17, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу, при этом количество белка цитратсинтазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка цитратсинтазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу.

[0032] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм содержит делецию в нуклеотидной последовательности, экспрессирующей глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазу, при этом количество белка – глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, меньше, чем количество белка – глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим делеции.

[0033] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

### **Краткое описание графических материалов**

[0034] Предшествующее краткое изложение сущности изобретения, а также следующее подробное описание воплощений будет лучше понятно при прочтении вместе с прилагаемыми графическими материалами. С целью иллюстрации в графических материалах показаны некоторые воплощения, которые могут быть предпочтительными. Следует понимать, что изображенные воплощения не

ограничиваются показанными точными подробностями. Если не указано иное, графические материалы представлены не в масштабе.

[0035] Фиг. 1 представляет собой блок-схему, изображающую воплощение способа получения этилена в данном документе.

5 [0036] Фиг. 2 представляет собой иллюстрацию векторной плазмиды для экспрессии белка – фермента, образующего этилен (EFE), согласно воплощениям в данном документе.

10 [0037] Фиг. 3A представляет собой фотографию геля SDS-PAGE (от англ. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis - электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия), показывающую экспрессию белка EFE согласно воплощениям в данном документе.

[0038] Фиг. 3B представляет собой фотографию вестерн-блоттинга, показывающую экспрессию белка EFE согласно воплощениям в данном документе.

15 [0039] Фиг. 4A представляет собой график, показывающий скорость роста *E.coli* BL 21 PUC19 EFE с течением времени согласно воплощениям в данном документе.

[0040] Фиг. 4B представляет собой график, показывающий выход этилена с течением времени для культуры *E.coli* BL 21 PUC19 EFE согласно воплощениям в данном документе.

20 [0041] Фиг. 5A представляет собой фотографию, показывающую рост колоний бактерий согласно воплощениям в данном документе.

[0042] Фиг. 5B представляет собой фотографию, показывающую рост колоний бактерий согласно воплощениям в данном документе.

25 [0043] Фиг. 6 представляет собой фотографию саузерн-блоттинга, показывающую результаты эксперимента по клонированию в отношении продукции АКГ и сахарозы согласно воплощениям в данном документе.

[0044] Фиг. 7A представляет собой фотографию саузерн-блоттинга, показывающую результаты эксперимента по клонированию в отношении продукции сахарозы согласно воплощениям в данном документе.

30 [0045] Фиг. 7B представляет собой фотографию культуры бактерий, выращиваемой в колбе, согласно воплощениям в данном документе.

[0046] Фиг. 8A представляет собой фотографию саузерн-блоттинга, показывающую результаты эксперимента по клонированию в отношении продукции этилена согласно воплощениям в данном документе.

[0047] Фиг. 8В представляет собой фотографию саузерн-блоттинга, показывающую результаты эксперимента по клонированию в отношении продукции этилена согласно воплощениям в данном документе.

5 [0048] Фиг. 9А представляет собой фотографию саузерн-блоттинга, показывающую результаты эксперимента по клонированию в отношении продукции АКГ согласно воплощениям в данном документе.

[0049] Фиг. 9В представляет собой фотографию культуры бактерий, выращиваемой в колбе, согласно воплощениям в данном документе.

## 10 **Подробное описание**

[0050] Если не указано иное, все измерения представлены в стандартных метрических единицах.

[0051] Если не указано иное, все примеры слов в единственном числе могут относиться к одному или более чем одному слову, которое они модифицируют.

15 [0052] Если не указано иное, фраза «по меньшей мере один» означает один или более чем один объект. Например, «по меньшей мере одно питательное вещество» означает одно питательное вещество, больше чем одно питательное вещество или любую их комбинацию.

20 [0053] Если не указано иное, термин «примерно» относится к  $\pm 10\%$  числа, не выраженного в процентах, которое описано, округлено до ближайшего целого числа. Например, примерно 100 мл/минута будет включать 90-110 мл/минута. Если не указано иное, термин «примерно» относится к  $\pm 5\%$  числа, выраженного в процентах. Например, примерно 95% будет включать от 90 до 100%. Когда термин «примерно» обсуждается с точки зрения интервала, тогда термин относится к соответствующему  
25 количеству, меньше чем нижняя граница и больше чем верхняя граница. Например, от примерно 100 до примерно 500 мл/минута будет включать от 90 до 550 мл/минута.

[0054] Если не указано иное, под поддающимися измерению свойствами (высота, ширина, длина, степень и т.д.), как описано в данном документе, понимают усредненные измерения.

30 [0055] Если не указано иное, термины «предоставляют», «предоставленный» или «предоставление» относятся к снабжению, продукции, приобретению, изготовлению, сборке, образованию, выбору, конфигурации, превращению, введению, добавлению или включению какого-либо элемента, количества, компонента, реагента, количества, измерения или анализа  
35 какого-либо состава вещества, способа или системы какого-либо воплощения в данном документе.

[0056] Идентичность последовательностей в данном документе определяется, как взаимосвязь между двумя или более аминокислотными (полипептидными или белковыми) последовательностями или двумя или более нуклеотидными (полинуклеотидными) последовательностями, как определено посредством сравнения последовательностей.

5 Обычно, идентичности или сходства последовательностей сравнивают по всей длине сравниваемых последовательностей. В данной области «идентичность» также означает степень родства последовательностей между аминокислотными или нуклеотидными последовательностями, в зависимости от ситуации, как определено совпадением между цепями таких последовательностей. «Сходство» между двумя аминокислотными

10 последовательностями определяется сравнением аминокислотной последовательности и ее консервативных замен аминокислот одного полипептида с последовательностью второго полипептида. «Идентичность» и «сходство» можно легко рассчитать разными способами, известными специалистам в данной области. В одном воплощении идентичность последовательностей определяется сравнением всей длины последовательностей, как

15 идентифицировано в данном документе.

[0057] Иллюстративные способы определения идентичности созданы для получения самого большого совпадения между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности и сходства систематизированы в общедоступных компьютерных программах. Иллюстративные компьютерные программы способов определения

20 идентичности и сходства между двумя последовательностями включают, например, BestFit, BLASTP (от англ. Protein Basic Local Alignment Search Tool - средство поиска основного локального выравнивания для белков), BLASTN (от англ. Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool - средство поиска основного локального выравнивания для нуклеотидов) и FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), общедоступные у NCBI и

25 других источников (BLAST.RTM. Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894). Наиболее типичным используемым алгоритмом является EMBOSS (от англ. European Molecular Biology Open Software Suite). Иллюстративные параметры для сравнения аминокислотных последовательностей с использованием EMBOSS представляют собой открытие гэпа 10.0, продолжение гэпа 0,5, матрицу Blosum.

30 Иллюстративные параметры для сравнения последовательностей нуклеиновой кислоты с использованием EMBOSS представляют собой открытие гэпа 10.0, продолжение гэпа 0,5, полную матрицу ДНК (матрица идентичности ДНК). В воплощениях возможно сравнивать последовательности ДНК/белков у разных видов для определения гомологии последовательностей с использованием онлайн-

35 данных, таких как Gene bank, KEG, BLAST и Ensemble.

[0058] Возможно, в определении степени сходства аминокислот специалист может также принимать во внимание так называемые «консервативные» замены аминокислот, как будет понятно специалисту. Консервативные замены аминокислот относятся к взаимозаменяемости остатков, имеющих похожие боковые цепи.

5 Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, представляет собой глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические гидроксил-содержащие боковые цепи, представляет собой серин и треонин; группа аминокислот, имеющих амид-содержащие боковые цепи, представляет собой аспарагин и глутамин;

10 аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, представляет собой фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, представляет собой лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, представляет собой цистеин и метионин.

Предпочтительные группы консервативных замен аминокислот представляют собой

15 следующие: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин. Варианты замен аминокислотной последовательности, раскрытые в данном документе, представляют собой варианты, в которых по меньшей мере один остаток в раскрытых последовательностях удален, и другой остаток вставлен на его место.

20 Предпочтительно, замена аминокислоты является консервативной. Предпочтительные консервативные замены для каждой из встречающихся в природе аминокислот выглядят следующим образом: Ala на ser; Arg на lys; Asn на gln или his; Asp на glu; Cys на ser или ala; Gln на asn; Glu на asp; Gly на pro; His на asn или gln; Ile на leu или val; Leu на ile или val; Lys на arg; gln или glu; Met на leu или

25 ile; Phe на met, leu или tyr; Ser на thr; Thr на ser; Trp на tyr; Tyr на trp или phe; и Val на ile или leu.

[0059] Если не указано иное, термин «адаптированный» или «адаптированный в отношении кодона» относится к «оптимизации кодонов» полинуклеотидов, как раскрыто в данном документе, последовательность которых может быть нативной или ненативной, или

30 может быть адаптирована для экспрессии в других микроорганизмах. Оптимизация кодонов адаптирует частоту использования кодона для кодируемого полипептида к предпочтению кодонов организма, в котором должен экспрессироваться полипептид. Оптимизация кодонов обычно помогает повысить уровень продукции кодируемого полипептида в клетке-хозяине.

[0060] Выбросы диоксида углерода, происходящие в результате применения

35 ископаемых видов топлива, продолжают расти в глобальном масштабе. Уменьшение уровней диоксида углерода в атмосфере является ключевым



фактором для уменьшения или обращения изменения климата. Улавливание и хранение углерода (CCS – от англ. carbon capture and storage) является выдающейся технологией для удаления промышленного диоксида углерода из атмосферы; оценивается, что более 20 триллионов тонн диоксида углерода, улавливаемого в результате очистки и других производственных процессов, можно транспортировать и хранить в разных типах подземной окружающей среды или резервуаров для хранения. Несмотря на то, что CCS является экономически эффективным и доступным путем уменьшения выбросов диоксида углерода, по сравнению с другими доступными в настоящее время способами, остается проблема, заключающаяся в том, что диоксид углерода только хранится под землей до тех пор, пока не улетучится. Таким образом, способы CCS не обеспечивают надежного решения для уменьшения избытка диоксида углерода в атмосфере. Кроме того, у отраслей промышленности существует маленький финансовый стимул для закачивания диоксида углерода в подземную окружающую среду, если их не вынуждает это делать природоохранное законодательство, или им не платят за то, чтобы это делать в рамках их модели коммерческой деятельности. Спорно, глобальное потепление является критическим моментом, поскольку оно более перспективно в продукции диоксида углерода, чем в устранении диоксида углерода.

[0061] Остается необходимость в удалении избытка диоксида углерода из атмосферы более эффективными и надежными путями. Остается необходимость в технологиях, которые могут взять под контроль переизбыток диоксида углерода, создавая полезные продукты, и для других применений, которые являются полезными для промышленности и окружающей среды.

[0062] Проблемы ограниченного запаса нефти и вредные воздействия операций с нефтью на окружающую среду простимулировали растущую значимость максимизации выхода из существующих источников и в разработке возобновляемых источников топлива и химических веществ, что могло бы минимизировать воздействия на окружающую среду. Поскольку этилен представляет собой потенциально возобновляемое сырье, существует большой интерес к разработке технологий для получения этилена из возобновляемых источников, таких как диоксид углерода и биомасса. Этилен является наиболее широко производимым органическим соединением в мире, полезным в широком диапазоне отраслей промышленности, включая пластмассу, растворители и текстиль. Этилен в настоящее время производится посредством парового крекинга ископаемых видов топлива или дегидрогенизации этана. При миллионах метрических тонн этилена, производимых каждый год, однако, более чем достаточно диоксида углерода

5 продуцируется посредством таких процессов, оказывая значительное содействие мировому «углеродному следу». Получение этилена способами на основе возобновляемых источников, соответственно, поможет удовлетворить огромную потребность энергетической и химической отраслей промышленности, одновременно также помогая защитить окружающую среду.

[0063] Разработаны традиционные способы получения биоэтилена с использованием этанола, происходящего из кукурузы или сахарного тростника. Однако, получение биоэтилена из биомассы (например, кукурузы и сахарного тростника) является времязатратным и экономически нерентабельным способом, требующим высаживания, транспортировки и расщепления биомассы. Например, существуют огромные неэффективности, ассоциированные с ростом и транспортировкой кукурузы и сахарного тростника, которые сами вызывают эмиссию CO<sub>2</sub>. Множество микробов, включая бактерии и грибы, в природе продуцируют этилен в небольших количествах. Такие микробы используют фермент, образующий этилен (EFE). В типе пути этилена, таком как обнаружен в *Pseudomonas syringae* и *Penicillium digitatum*, используется альфа-кетоглутарат (AKG) и аргинин в качестве субстрата в реакции, катализируемой ферментом, образующим этилен. Этилен-образующие ферменты обеспечивают перспективную мишень, поскольку экспрессии одного гена может быть достаточно для продукции этилена. Методики, использующие гетерологичную экспрессию EFE, продемонстрированы в нескольких видах микробов, где микробные хозяева способны использовать множество источников углерода в цикле Кальвина, включая лигноцеллюлозу и диоксид углерода. Кроме того, недавние разработки в экономически эффективных технологиях генетического секвенирования с высокой пропускной способностью привели к повышенному уровню понимания экспрессии генов микробов. Однако, доступные в настоящее время технологии не приводят к получению релевантных с промышленной точки зрения количеств этилена посредством микробной активности. Остается необходимость в улучшениях в продукции биоэтилена микробами, которые могут продуцировать этилен в коммерческом масштабе. Остается необходимость в способах получения этилена, полезного для применений в промышленности и других применений с использованием сырья на основе диоксида углерода.

[0064] Согласно воплощениям настоящего раскрытия может быть обеспечена польза, заключающаяся не только в удалении диоксида углерода из окружающей среды, наряду с пользой, заключающейся в получении ценного органического соединения, способного продаваться в промышленных масштабах.

Таким образом, согласно воплощениям настоящего раскрытия может быть предложена возобновляемая альтернатива традиционному хранению диоксида углерода посредством использования технологии на основе рекомбинантных микроорганизмов для превращения диоксида углерода в этилен в качестве полезного органического соединения. Одна польза воплощений настоящего раскрытия заключается в том, что данные способы могут делать для нефтяных компаний или компаний по снабжению природным газом экономически выгодным удалять диоксид углерода из окружающей среды. Нефтяная компания или ее подрядчик мог бы, вместо закачивания диоксида углерода в подземную окружающую среду или оставления удаленного диоксида углерода под землей, использовать диоксид углерода в качестве источника углерода для культивирования рекомбинантных микроорганизмов для превращения диоксида углерода в этилен экономически эффективным путем. Кроме того, значительную часть диоксида углерода, образуемого в результате транспортировки, можно избежать, поскольку данный способ может быть осуществлен на месте или, как будут ожидать, потребляет больше диоксида углерода, чем он производит.

[0065] Наиболее эффективными способами защиты окружающей среды являются такие способы, которые люди фактически используют. Чем более выгодными данные способы являются, тем с большей вероятностью люди должны их использовать. Одним из преимуществ способов, раскрытых в данном документе, является экономическая эффективность использования биореакторной системы. Согласно воплощениям настоящего раскрытия может быть обеспечена польза конструирования фотосинтезирующего микроорганизма, продуцирующего этилен, посредством адаптации релевантных метаболических сигнальных путей к продукции этилена в промышленном масштабе. Такие воплощения могут сделать выгодным удаление диоксида углерода из атмосферы и пассивное образование ценных органических соединений, в то время как микробы осуществляют работу в масштабе, ранее невообразимом.

[0066] Что бы случилось с кризисом глобального потепления, если бы стало более выгодно, или настолько же выгодно, превращать диоксид углерода в ценные органические соединения, как изначально было с образованием диоксида углерода? Раскрытые в настоящее время способы могли бы превращать производителей энергии из компаний глобального потепления в компании глобального охлаждения.

[0067] Настоящее раскрытие относится к рекомбинантным микроорганизмам, обладающим улучшенной способностью продуцировать этилен. Настоящее раскрытие относится к способам получения этилена, включающим предоставление

рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен согласно разным воплощениям в данном документе. В качестве общего обзора способа, раскрытого в данном документе, ссылаясь на Фиг. 1, способ включает предоставление рекомбинантного микроорганизма, экспрессирующего по меньшей мере один белок EFE согласно воплощениям, раскрытым в данном документе 102; культивирование рекомбинантного микроорганизма в сосуде биореактора для культивирования в условиях, достаточных для продукции этилена в сосуде биореактора для культивирования 104; увеличение количества продукции этилена посредством добавления по меньшей мере одного активатора к культуре в пределах сосуда биореактора для культивирования 106; уменьшение количества продукции этилена посредством удаления по меньшей мере одного молекулярного переключателя из клеточной культуры 108; осуществление контроля над количеством этилена, продуцируемым из культуры микроба, посредством увеличения или уменьшения концентрации по меньшей мере одного питательного вещества или количества по меньшей мере одного стимула при культивировании рекомбинантного микроорганизма 110; и удаление количества этилена, продуцируемого из микробной культуры посредством конденсации этилена из газового в жидкое состояние 112. В качестве иллюстрации векторной плазмиды для экспрессии белка EFE согласно воплощениям в данном документе, ссылаясь на Фиг. 2, ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas* sp. В качестве иллюстрации рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен, ссылаясь на иллюстрацию геля SDS-PAGE на Фиг. 3А и иллюстрацию вестерн-блоттинга на Фиг. 3В, белок EFE экспрессируется с векторной плазмиды бактерии *Escherichia* sp., имеющей ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, вставленную в векторную плазмиду, как показано стрелками.

### **Воплощения рекомбинантных микроорганизмов**

[0068] Настоящее раскрытие относится к рекомбинантному микроорганизму, обладающему улучшенной способностью продуцировать этилен. В таких воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – фермент, образующий этилен (EFE), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная

последовательность, экспрессирующая EFE, кодирует EFE *Pseudomonas savastanoi*. В одном воплощении белок EFE имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1. В одном воплощении белок EFE имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 1. В разных воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 5% до примерно 200% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 50% до примерно 150% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 75% до примерно 100% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

[0069] В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм также экспрессирует по меньшей мере один белок – альфа-кетоглутаратпермеазу (AKGP) посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP. В одном воплощении белок AKGP имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2. В одном воплощении белок AKGP имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2. В одном воплощении белок AKGP имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 2. В одном воплощении исходная последовательность для SEQ ID NO: 2 была из AKGP из *Pseudomonas syringe*, но для улучшения экспрессии данной последовательности в *Synechococcus elongatus* проводили инновацию последовательности. В разных воплощениях количество белка AKGP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка AKGP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP.

В некоторых воплощениях количество белка АКРР, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 5% до примерно 200% или более больше, чем количество белка АКРР, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей АКРР. В некоторых воплощениях количество белка АКРР, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 50% до примерно 150% или более больше, чем количество белка АКРР, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей АКРР. В некоторых воплощениях количество белка АКРР, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 75% до примерно 100% или более больше, чем количество белка АКРР, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей АКРР.

[0070] В разных воплощениях рекомбинантный микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли, микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку. В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм может включать *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* и табак.

[0071] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas* sp. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном

воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Chlamydomonas sp.*

[0072] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в векторную плазмиду бактерии *Escherichia sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Escherichia sp.* или в бактерии *Escherichia coli*.

[0073] В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм дополнительно включает ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую AKGP. В некоторых таких воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6. В таких воплощениях объединенная аминокислотная последовательность может включать одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает последовательность His-TEV; в одном воплощении последовательность His-TEV включает SEQ ID NO. 10. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная

последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в цианобактериях. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Synechococcus sp.*

Воплощения способов получения рекомбинантного микроорганизма

[0074] Воплощения в данном документе направлены на способы получения рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен. В одном воплощении способ включает получение рекомбинантного микроорганизма посредством вставки ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, в бактериальную плазмиду микроорганизма. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, кодирует EFE *Pseudomonas savastanoi*.



В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, является адаптированной в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Chlamydomonas sp.* В одном воплощении бактерия *Chlamydomonas sp.* включает *Chlamydomonas reinhardtii*.

[0075] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, является адаптированной в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Escherichia sp.* В одном воплощении бактерия *Escherichia sp* включает *E. coli*. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, включает N-концевой сайт клонирования NdeI (SEQ ID NO. 8 (См. Приложение)). В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, включает одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку на С-конце с последующим стоп-кодоном и сайтом клонирования HindIII (SEQ ID NO. 9 (См. Приложение)).

[0076] В одном воплощении способ включает получение рекомбинантного микроорганизма посредством вставки ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, объединенной с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, в бактериальную плазмиду микроорганизма. В одном таком воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессирует

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, экспрессируют объединенную

5 аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6. В таких воплощениях объединенная аминокислотная последовательность может включать одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает последовательность His-TEV; в одном воплощении последовательность His-TEV

10 включает SEQ ID NO. 10 (см. Приложение). В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В других воплощениях ненативная

15 нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная

20 нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID

25 NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная

30 нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в

35 цианобактериях. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная

последовательность, экспрессирующая АКГР, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Synechococcus sp.*

[0077] В разных воплощенные способах микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли, микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку. В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм может включать *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* и табак.

[0078] В воплощениях способов в данном документе ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Chlamydomonas sp.*

[0079] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, вставлены в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность,

экспрессирующая AKGP, вставлены в векторную плазмиду бактерии *Escherichia sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Escherichia sp.* или в бактерии *Escherichia coli*.

10 [0080] В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм дополнительно включает ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую AKGP. В некоторых таких воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6. В таких воплощениях объединенная аминокислотная последовательность может включать одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает последовательность His-TEV; в одном воплощении последовательность His-TEV включает SEQ ID NO. 10. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная

нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в цианобактериях. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Synechococcus sp.*

#### **Воплощения способов получения этилена**

[0081] Способы получения этилена воплощены в данном документе. Одно воплощение такого способа включает предоставление рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен. В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок - фермент, образующий этилен (EFE), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, при этом количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE; культивирование рекомбинантного микроорганизма в сосуде биореактора для культивирования в условиях, достаточных для получения этилена в сосуде биореактора для культивирования; и сбор этилена из сосуда биореактора для культивирования.

[0082] В некоторых воплощениях способов получения этилена ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, кодирует EFE *Pseudomonas savastanoi*. В одном воплощении белок EFE имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей

мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1. В одном воплощении белок EFE имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 1. В разных воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 5% до примерно 200% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 50% до примерно 150% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 75% до примерно 100% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

[0083] В одном воплощении способов получения этилена ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Chlamydomonas* sp. В одном воплощении бактерия *Chlamydomonas* sp. включает *Chlamydomonas reinhardtii*.

[0084] В одном воплощении способов а данном документе ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная

последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Escherichia sp.* В одном воплощении бактерия *Escherichia sp* включает *E. coli*. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, включает N-концевой сайт клонирования NdeI (SEQ ID NO. 8). В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, включает одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку на С-конце с последующим стоп-кодоном и сайтом клонирования HindIII (SEQ ID NO. 9).

[0085] В одном воплощении способ получения этилена включает получение рекомбинантного микроорганизма посредством вставки ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, объединенной с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, в бактериальную плазмиду микроорганизма. В одном таком воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6. В таких воплощениях объединенная аминокислотная последовательность может включать одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает последовательность His-TEV; в одном воплощении последовательность His-TEV включает SEQ ID NO. 10. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В некоторых

воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в цианобактериях. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Synechococcus sp.*

[0086] В разных воплощенных способах микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли, микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку. В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм может включать *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* и табак.

[0087] В воплощениях способов в данном документе ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3, и



ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas* sp. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Chlamydomonas* sp.

10 [0088] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлена в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в векторную плазмиду бактерии *Escherichia* sp. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Escherichia* sp или в бактерии *Escherichia coli*.

30 [0089] В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм дополнительно включает ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую AKGP. В некоторых таких воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5. В некоторых воплощениях ненативная экспрессирующая нуклеотидная последовательность и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6. В таких воплощениях объединенная аминокислотная последовательность может включать одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает последовательность His-TEV; в одном воплощении последовательность His-TEV включает SEQ ID NO. 10. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в цианобактериях. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Synechococcus sp.*

35 [0090] Воплощения получения этилена в данном документе включают культивирование рекомбинантного микроорганизма в культуре

биореактора в условиях, достаточных для получения этилена в сосуде биореактора для культивирования. Культура биореактора согласно воплощенным способам может включать один или более подходящих реагентов или сред для выращивания для поддержки роста культуры рекомбинантного микроорганизма. Такие реагенты или культуральные среды могут включать воду, один или более углеводов, одну или более аминокислот или производных аминокислот, один или более буферов, морскую воду, бульон Луриа, бульон Луриа-Бертани, среды BG-11, диоксид углерода, свет, температуру, электричество или их комбинации.

[0091] Воплощение способа получения этилена включает увеличение количества продукции этилена посредством добавления по меньшей мере одного активатора к культуре, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенной в сосуде биореактора для культивирования. Добавление такого активатора может включать повышение концентрации одного или более субстратов фермента EFE, экспрессируемого культурой рекомбинантного микроорганизма. Такой субстрат может включать альфа-кетоглутарат или аргинин или их комбинации, а также другие источники углерода, такие как глицерин и глюкоза. В других воплощениях добавление по меньшей мере одного активатора может включать добавление молекулярного переключателя. В некоторых воплощениях добавление по меньшей мере одного активатора может включать вставку индуцибельного промотора выше гена EFE; один такой промотор включает промотор IPTG. В таких воплощениях IPTG можно добавлять в качестве молекулярного переключателя к культуральным средам. В некоторых воплощениях добавление по меньшей мере одного активатора может включать добавление к культуре одного или более питательных веществ или стимулов. Такие питательные вещества или стимулы могут включать один или более углеводов, одну или более аминокислот или производных аминокислот, один или более субстратов EFE, сукцинат, диоксид углерода, свет, температуру, электричество, глицерин, сахара или их комбинации. В таких воплощениях добавление по меньшей мере одного активатора к культуре может обеспечивать пользу, заключающуюся в осуществлении контроля над циклами продукции этилена и усилении скорости продукции этилена. В некоторых воплощениях продуцируемый этилен можно удалять из сосуда биореактора для культивирования, когда он образуется. В таких воплощениях удаление этилена может включать конденсацию этилена, продуцируемого в виде газа, в жидкую форму для удаления из сосуда биореактора для культивирования.

[0092] В одном воплощении способ получения этилена включает добавление  $\text{CO}_2$  в атмосферу культуры, содержащуюся в сосуде для культивирования биореактора, со скоростью от примерно 100 мл/минута до примерно 500 мл/минута. В одном воплощении способ включает добавление  $\text{CO}_2$  к атмосфере культуры, содержащейся в сосуде биореактора для культивирования со скоростью от примерно 150 мл/минута до примерно 450 мл/минута. В одном воплощении способ включает добавление  $\text{CO}_2$  к атмосфере культуры, содержащейся в сосуде биореактора для культивирования, со скоростью от примерно 250 мл/минута до примерно 350 мл/минута. Такие воплощения могут обеспечивать пользу, заключающуюся в усилении или осуществлении контроля над скоростью продукции этилена в сосуде биореактора для культивирования, а также обеспечении пользы, заключающейся в превращении  $\text{CO}_2$  в полезный продукт.

[0093] В одном воплощении способ получения этилена включает уменьшение количества продукции этилена посредством удаления по меньшей мере одного молекулярного переключателя из микробной культуры, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенной в сосуде биореактора для культивирования. В одном воплощении такой способ дополнительно включает осуществление контроля над количеством этилена, продуцируемым из микробной культуры, посредством увеличения или уменьшения концентрации по меньшей мере одного питательного вещества или количества по меньшей мере одного стимула при культивировании рекомбинантного микроорганизма. В одном воплощении концентрация по меньшей мере одного питательного вещества или количество по меньшей мере одного стимула находятся в соотношении от примерно 0,5-1,5 гр./литр до примерно 0,1 мМ в микробной культуре. В одном воплощении такой способ дополнительно включает удаление количества этилена, продуцируемого из микробной культуры, посредством конденсации этилена из газового в жидкое состояние, или где количество выделенного этилена составляет от примерно 0,5 мл до примерно 10 мл/литр/ч. Такие воплощения могут обеспечивать пользу, заключающуюся в осуществлении контроля над количеством продукции этилена, посредством осуществления контроля над степенью активности цикла Кальвина в микробной культуре. Например, возможно осуществлять переход с экспрессионной системы на систему роста, когда клеткам дают расти в течение 5-7 суток, и следят за условиями их роста. Когда клетки достигают состояния экспоненциального роста (что означает, что клетки метаболически активны), возможно осуществлять переход с системы роста на экспрессионную систему, когда клетки переходят на цикл продукции этилена с продукцией этилена для

осуществления сбора. Данная экспрессионная система может поддерживаться в течение 7 или более суток.

### Примеры

5           **Пример 1. Клонирование последовательности гена фермента, образующего этилен, в векторную плазмиду *Chlamydomonas reinhardtii***

          [0094]           Белок EFE (фермент, образующий этилен) будет экспрессироваться и продуцироваться в *Chlamydomonas reinhardtii*. Плазмиду pChlamy\_4-EFE успешно создавали для использования в экспрессии белка EFE  
10 (Creative Enzymes, Shirley, NY).

          [0095]           Полинуклеотид, кодирующий белок EFE *Pseudomonas savastanoi pv. Phaseolicola* (GenBank: KPB44727. 1, SEQ ID NO: 1), клонировали в векторную плазмиду pChlamy\_4 (ThermoFisher). Другие реагенты и применение проборов предоставлены Creative Biostructure.

15           [0096]           Последовательность гена фермента, образующего этилен (EFE), из штамма *Pseudomonas savastanoi pv. Phaseolicola* (GenBank: KPB44727. 1) использовали для получения рекомбинантного белка EFE. Соответствующие нуклеотидные последовательности адаптировали в отношении кодона для экспрессии в *Chlamydomonas reinhardtii* и синтезировали (SEQ ID NO: 3).  
20 Конструкцию EFE клонировали в вектор pChlamy\_4 с сайтами рестрикции *KpnI* и *PstI*.

          [0097]           В соответствии с характеристикой вектора pChlamy\_4 конструировали и получали EFE с N-меткой. Вектор pChlamy\_4 содержит инициаторный кодон ATG (вектор ATG) для соответствующей инициации трансляции в положении 497-499, обнаруженном в начале гена *Sh ble* после  
25 удаления интрона-1 Rbc S2. Ген пептида FMDV 2A, фланкирующий сайт множественного клонирования 1 (MCSI), находится внутри рамки с геном *Sh ble*. Для применения N-концевой метки 6x His-V5-TEV последовательность EFE клонировали внутри рамки после сайта TEV в вектор pChlamy\_4, расщепляемый *KphI/PstI*. TAA (стоп-кодон) конструировали для соответствующей терминации трансляции.  
30 Полученная хроматограмма последовательностей показана на Фиг. 2; ссылаясь на Фиг. 2, кодирующие последовательности гена белка EFE показаны в стрелке с надписью «EFE-белок». Ориентацию открытой рамки считывания подтверждали проверкой плазмиды посредством секвенирования последовательности.

35           **Пример 2: Оценка экспрессии белка EFE в *E. coli***

[0098] Полинуклеотид, кодирующий белок EFE *Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola* (GenBank: KPB44727.1, SEQ ID NO: 1), клонировали в векторную плазмиду рЕТ-30a(+). Соответствующие нуклеотидные последовательности подвергали адаптации кодонов для экспрессии в *E. coli* (SEQ ID NO: 4), содержащие возможную His-метку на С-концевом конце с последующим стоп-кодоном и сайтом HindIII (SEQ ID NO: 9). Сайт NdeI использовали для клонирования на 5'-конце, где сайт NdeI содержит старт-кодон ATG (SEQ ID NO: 8). Компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали рекомбинантной плазмидой. Единичную колонию инокулировали в среду LB, содержащую канамицин; культуры инкубировали при 37°C при 200 об./мин. Как только плотность клеток достигала OD (от англ. optical density - оптическая плотность), равной 0,6-0,8 при 600 нм, 0,5 мМ IPTG вводили для индукции. Проводили пилотную экспрессию EFE (примерно 44,5 кДа)\_BL21(DE3). SDS-PAGE (Фиг. 3А) и вестерн-блоттинг (Фиг. 3В) использовали для отслеживания экспрессии белка EFE (GenScript USA, Inc., Piscataway, NJ). Со ссылкой на Фиг. 3А и Фиг. 3В:

[0099] Анализ SDS PAGE (слева) и вестерн-блоттинг (справа, с использованием антитела против His (GenScript, кат. № A00186)) пилотной экспрессии EFE при экспрессии в *E. coli* в конструкции рЕТ 30a(+).

Дорожка M1: Белковый маркер  
 Дорожка M2: Маркер вестерн-блоттинга  
 Дорожка PC1: BSA (от англ. bovine serum albumin - бычий сывороточный альбумин) (1 мкг)  
 Дорожка PC2: BSA (2 мкг)  
 Дорожка NC: клеточный лизат без индукции  
 Дорожка 1: клеточный лизат с индукцией в течение 16 ч при 15°C  
 Дорожка 2: клеточный лизат с индукцией в течение 4 ч при 37°C  
 Дорожка NC<sub>1</sub>: Супернатант клеточного лизата без индукции  
 Дорожка 3: Супернатант клеточного лизата с индукцией в течение 16 ч при 15°C  
 Дорожка 4: Супернатант клеточного лизата с индукцией в течение 4 ч при 37°C  
 Дорожка NC<sub>2</sub>: Осадок клеточного лизата без индукции  
 Дорожка 5: Осадок клеточного лизата с индукцией в течение 16 ч при 15°C  
 Дорожка 6: Осадок клеточного лизата с индукцией в течение 4 ч при 37°C

[00100] Результаты SDS-PAGE и вестерн-блоттинга показали, что EFE экспрессировался в *E. coli*. Были обнаружены условия самого высокого уровня

экспрессии EFE с индукцией в течение 16 ч при 15°C, что приводило к уровню экспрессии 5 мг/л и растворимости 30%.

**Пример 3: Нуклеотидные последовательности, экспрессирующие рекомбинантный EFE и АКGP, адаптированные для экспрессии в бактериях *Synechococcus spp.***

[00101] Получали объединенную полинуклеотидную последовательность (EFE\_-P2A-aKGP, SEQ ID NO: 7) для экспрессии белка EFE и для экспрессии белка АКGP (SEQ ID NO. 2), после адаптации нуклеотидной последовательности для экспрессии в видах цианобактерий *Synechococcus elongatus* и *Synechococcus leopoliensis* (GenScript, Piscataway, NJ). Использовали алгоритм анализа адаптации кодонов, который адаптирует множество параметров, которые являются особо важными для эффективности экспрессии гена, включая, но, не ограничиваясь предпочтением кодонов, содержанием GC, содержанием динуклеотидов CpG, вторичной структурой мРНК, криптическими сайтами сплайсинга, сайтами преждевременного полиА, внутренними chi-сайтами и сайтами связывания рибосомы, отсутствием CpG-островков, мотивом нестабильности РНК (ARE), последовательностями повторов (прямой повтор, обратный повтор и повтор диада) и сайтами рестрикции, которые могут мешать клонированию. Регуляцию предпочтения кодонов осуществляли с использованием распределения частоты использования кодона по всей длине последовательности гена с полученным индексом адаптации кодонов (CAI - от англ. Codon Adaptation Index), равным 0,95. Считается, что CAI 1,0 прекрасен в желательном организме экспрессии, и CAI больше чем 0,8 считается хорошим с точки зрения высокого уровня экспрессии гена. Частоту встречаемости оптимальных кодонов (FOP – от англ. Frequency of Optimal Codons) оценивали, как выраженное в процентах распределение благоприятных кодонов в группах рассчитанного качества кодонов, со значением 100, установленным для кодона с наиболее высокой частотой использования для данной аминокислоты в желательном организме экспрессии. Результат 80% кодонов был обнаружен в группе с самым высоким качеством кодонов 91-100, 3% - в группе со вторым по высоте качеством кодонов 81-90 и 14% - в третьей группе по высоте качества кодонов 71-80. Регуляцию содержания GC проводили, приводя к получению среднего содержания GC 56,46%, с идеальным выраженным в процентах интервалом содержания GC, составляющим от 30 до 70%. Один возможный сайт клонирования HindIII (SEQ ID NO: 12) включали на 5'-конце в положении 1

последовательности; один возможный сайт клонирования KpnI (SEQ ID NO: 13) включали на 3'-конце в положении 2524 последовательности.

[00102] Соответствующие объединенные аминокислотные последовательности EFE и AKGP, экспрессируемые SEQ ID. NO. 7, имеют последовательность расщепления P2A (SEQ ID NO: 11), вставленную между аминокислотными последовательностями EFE и AKGP. Кодируемая аминокислотная последовательность, имеющая одновременно последовательности EFE и AKGP, показана в SEQ ID NO. 5 (EFE-P2A\_pSyn\_6 (без His). Возможная последовательность His-TEV может быть включена на N-конце (SEQ ID NO: 10), приводя к получению аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 6 (EFE-P2A-aKGP\_pSyn\_6).

#### Пример 4: Экспериментальные методики в лабораторном масштабе

[00103] 1. Будут получены «сшитые»-сконструированные ДНК-конструкции, которые кодируют крайне важные промежуточные соединения пути синтеза биоэтилена. 2. Затем аккуратно отобранные фотосинтезирующие микроорганизмы будут размножены для клонирования и экспрессии гена. 3. Генетическое и метаболическое конструирование микроорганизмов будут затем осуществлять для непрерывной продукции биоэтилена. 4. Затем биосконструированные микроорганизмы будут отобраны и размножены в фотобиореакторе. 5. Условия культивирования в биореакторе (включая концентрацию CO<sub>2</sub>, время световой экспозиции и длину волны излучения, температуру, pH) будут адаптированы. 6. Образцы будут собирать и анализировать посредством ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) для измерения синтеза биоэтилена. 7. Продукция биоэтилена в генетически модифицированных микроорганизмах будет адаптирована. 8. Способы получения этилена будут масштабированы.

#### Пример 5: Конструирование продукции АКГ в цианобактериях

[00104] Предыдущая работа показала, что удаление гена glgC приводит к увеличению продукции АКГ в цианобактериях. Также показано, что сверхэкспрессия гена pps (SEQ ID NO. 14, Genbank P74299), который кодирует фосфоенолпируватсинтазу (SEQ ID NO. 15), и гена gltA (SEQ ID NO. 16, Genbank Q59977), который кодирует цитратсинтазу (SEQ ID NO. 17), может усиливать продукцию АКГ в качестве субстрата для продукции других соединений. На основе данного исследования, выбирали две категории генов, включая гены, которые



непосредственно связаны с путями синтеза и секреции АКГ, включая *ppc* и *gltA* (сверхэкспрессия), и гены, которые участвуют в путях накопления энергии, включая *ggC* (делеция), который играет решающую роль в пути синтеза гликогена. Конструкцию *ppc-p2A-gltA* (SEQ ID NO. 18) создавали для клонирования в плазмиду рSyn6 перед интеграцией в *Synechococcus elongatus* и ростом трансформированных колоний. ПЦР (полимеразная цепная реакция) проводили на колониях рSyn6-PPC-gltA для подтверждения экспрессии конструкции в цианобактериях; наблюдали ожидаемый размер полос для PPC-gltA из 4621 пар оснований.

[00105] Для сверхэкспрессии АКГ в цианобактериях конструкцию гена IDH (SEQ ID NO: 19), который кодирует изоцитратдегидрогеназу (SEQ ID NO. 20), получали посредством клонирования гена IDH в плазмиду рSyn6. Успешное клонирование гена IDH в плазмиду рSyn6-IDH подтверждали посредством роста бактериальных колоний (Фиг. 5А) и посредством гель-электрофореза и анализа ДНК (Фиг. 6). Штамм *Synechococcus elongatus* S2434-IDH, включающий конструкцию IDH, подтверждали посредством роста бактериальной культуры (Фиг. 9В) и гель-электрофореза, и анализа ДНК (Фиг. 9А). Показано, что рост клеточной культуры был улучшен значительно посредством повышения концентрации бикарбоната в среде для роста на 0,5 г/л или 1,0 г/л. Также получали и проверяли плазмиду для удаления гена *glgC* (SEQ ID NO. 21, Genbank CP000100.1), который кодирует глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазу (SEQ ID NO. 22) в цианобактериях (*Synechococcus elongatus*).

#### **Пример 6: Конструирование продукции сахарозы в цианобактериях**

[00106] Для продукции сахарозы в цианобактериях получали конструкцию гена *cscB* из *E. coli* (SEQ ID. NO. 23, Genbank P300000), который кодирует сахарозопермеазу (SEQ ID NO. 24), посредством клонирования гена *cscB* в плазмиду рSyn6. Успешное клонирование гена *cscB* в конструкцию рSyn6-cscB подтверждали посредством роста колоний бактерий (Фиг. 5В) и посредством гель-электрофореза и анализа ДНК (Фиг. 6). Штамм *Synechococcus elongatus* UTEX S2434 (S2434-cscB), включающий *cscB*, подтверждали посредством роста культуры бактерий (Фиг. 7В) и посредством гель-электрофореза и анализа ДНК (Фиг. 7А).

[00107] Помимо сверхэкспрессии гена *cscB* и удаления гена *glgC*, другие гены-мишени включают сверхэкспрессию гена *sps* (SEQ ID NO. 25, Genbank A0A0H3K0V9), который кодирует сахарозофосфатсинтазу (SEQ ID NO. 26); гена *spp* (SEQ ID NO. 27, Genbank Q7BII3), который кодирует сахарозо-6-фосфатазу (SEQ ID

NO. 28), гена *glgP* (SEQ ID NO. 29, Genbank Q3IRP3), который кодирует гликогенфосфорилазу (SEQ ID NO. 30), и гена *galU* (SEQ ID NO. 31, Genbank P0AEP3), который кодирует UTP-глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазу (SEQ ID NO. 32), для изменения направления промежуточных соединений пути в сторону сахарозы. Кроме того, удаление гена *inv* (SEQ ID NO. 33, Genbank P74573), который кодирует инвертазу (SEQ ID NO. 34), и ген *ggpS* (SEQ ID NO. 35, Genbank P74258), который кодирует глюкозилглицеролфосфатсинтазу (SEQ ID NO. 36), будет предотвращать превращение в альтернативные продукты; и удаление гена *glgA* (SEQ ID NO: 37, Genbank P74521), который кодирует гликогенсинтазу (SEQ ID NO.38), будет исключать превращение субстрата в гликоген, который потенциально может увеличивать выход сахарозы.

#### Пример 7: Конструирование продукции этилена в *E.coli*

[00108] Для конструирования продукции этилена в *E. coli* получали генетическую конструкцию рUC-EFE (SEQ ID NO. 39), кодирующую фермент, образующий этилен (EFE), под IPTG-индуцибельным промотором в плазмиде с большим числом копий, рUC19. Экспрессию плазмиды PUC-EFE в *E.coli* подтверждали посредством роста колоний на средах с агаром с добавлением ампициллина, IPTG и X-gal, и наблюдения ожидаемого размера полосы 2322 пар оснований посредством гель-электрофореза и анализа ДНК (Фиг.8А и Фиг. 8В). На Фиг. 8А, стрелка показывает ДНК-конструкцию EFE; на Фиг. 8В, стрелка показывает элемент ДНК, контролирующей число копий плазмиды. Результаты секвенирования ДНК подтвердили наличие плазмиды. Продукцию EFE подтверждали посредством анализа SDS-PAGE и вестерн-блоттинга. Уровни экспрессии этилена 5 мг/л и растворимость 30% наблюдали в условиях индукции 16 часов при 15 градусах Цельсия.

[00109] Для конструирования продукции этилена *E.coli* плазмиду конструировали для непрерывного получения EFE в *E. coli*. Во всех подходах экспрессия EFE осуществлялась под контролем промотора *psbA* хлоропласта. В первой конструкции EFE-AKGP-*psbA* (SEQ ID NO. 40), гены EFE и AKGP помещали под контроль промотора *psbA* (SEQ ID NO. 41) и терминатора *tmB* (SEQ ID NO. 42). Во второй конструкции EFE-*psbA* (SEQ ID NO. 43), только экспрессия гена EFE была помещена под контроль промотора *psbA* (SEQ ID NO. 41) и терминатора T7 (SEQ ID NO. 44). Обе конструкции клонировали в каркас плазмиды рUC19 для того, чтобы воспользоваться преимуществом большого числа копий плазмиды, перед

экспрессией белка в *E.coli* BL21 (DE3), DH5альфа или клеточных линиях MG1655. Конструировали плазмиду pUC-psb-EFE (SEQ ID NO. 45).

[00110] Измеряли эффект сред для роста, а также добавления АКГ и аргинина, оказываемый на продукцию этилена. Результаты показали, что максимум  
5 продукции этилена 0,037 фунтов/галлон/месяц в случае *E.coli* BL 21 PUC19 EFE получали при ферментации в условиях, показанных в Таблице 1.

Таблица 1. Условия получения этилена в случае *E.coli* BL 21 PUC19 EFE при 30°C

10	Среда	MOPS
	Глюкоза	4 г/л
	IPTG	0,5 мМ
	Аргинин	3 мМ
	АКГ	2 мМ
15	Индукция	Индукцируемый в начале

[00111] Результаты наблюдаемой скорости роста *E. coli* BL 21 PUC19 EFE показаны на Фиг. 4А. Наблюдаемый выход этилена в условиях, показанных в  
Таблице 1, показан на Фиг. 4В. Анализ на основе газовой хроматографии образцов  
20 паровой фазы подтвердил продукцию этилена культурой *E. coli*.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

SEQ ID NO: 1-

MIHAPSRWGVFPSLGLCSPDVVWNEHPSLYMDKEETSMTNLQTFELPTEVTGCAADISLG  
 RALIQAWQKDGIFQIKTDSEQDRKTQEAMAASKQFCKEPLTFKSSCVSDLTYSG  
 5 YVASGEEVTAGKPDFPEIFTVCKDLSVGDQRVKAGWPCHGVPVWPNNTYQKSMKT  
 FMEELGLAGERLLKLTALGFELPINTFTDLTRDGWHHMRVLRFPQTSTLSRGIGAHT  
 DYGLLVIAAQDDVGGLYIRPPVEGEKRNRNWLPGESSAGMFEHDEPWTFVTPTPGV  
 WTVFPGDILQFMTGGQLLSTPHKVKLNTRERFACAYFHEPNFEASAYPLFEPSANERI  
 HYGEHFTNMFMRCPDRITTQRINKENRLAHLEDLKKYSDTRATGS

10

SEQ ID NO: 2-

MTESITSNGLTVASDTRRRVWAIVSASSGNLVEWDFYVYSFCSLYFAHIFFPSGNTT  
 TQLLQTAGVFAAGFLMRPIGGWLFGRADRRGRKTSMLISVCMCMCFGSLIIACLPGY  
 DAIGTWAPALLLLARLFQGLSVGGEYGT SATYMSEIALEGRKGFYASFQYVTLIGGQ  
 15 LLAILVVILQQILTDSQLHEWGWRIPFAMGAALAIVALWLRRLDETSQKEVRALK  
 EAGSFKGLWRNRKAFLMVLGFTAGGSLSFYFTTYMQKYLVNTTGMHANVASVIM  
 TAALFVFMLIQPLIGALS DKIGRRTSMLIFGGMSALCTVPILTALQHVSSPYAAFALV  
 MLAMVIVSFYTSISGILKAEMFPAQVRALGVGLSYAVANALFGGSAEYVALSLKSW  
 GSETTFFWYVTIMGALAFIVSLMLHRKKGK GIRL

20

SEQ ID NO: 3-

ATGATTCACGCCCGCTCGCGCTGGGGCGTGTTTCCCTCGCTGGGCCTGTGCAGCCC  
 CGACGTGGTGTGGAACGAGCACCCGAGCCTGTACATGGACAAGGAGGAGACGTCTGA  
 TGACCAACCTGCAGACGTTTCGAGCTGCCGACCGAGGTGACCGGCTGCGCCG  
 25 CCGACATCTCCCTGGGCCGGGCGCTGATCCAGGCGTGCCAGAAGGACGGCATCT  
 TCCAGATCAAGACCGACAGCGAGCAGGACCGGAAGACCCAGGAGGCGATGGCG  
 GCCTCCAAGCAGTTCTGCAAGGAGCCCCTGACCTTCAAGTCGTCCTGCGTCAGCG  
 ACCTGACCTACTCGGGCTACGTGGCCTCGGGCGAGGAGGTGACCGCCGGCAAGC  
 CGGACTTTCCGGAGATCTTACCGTGTGCAAGGACCTGAGCGTGGGCGACCAGC  
 30 GGGTCAAGGCGGGCTGGCCCTGCCACGGCCCCGTGCCGTGGCCGAACAACACCT  
 ACCAGAAGTCCATGAAGACGTTTCATGGAGGAGCTGGGCCTGGCCGGCGAGCGCC  
 TGCTGAAGCTGACCGCGCTGGGCTTCGAGCTGCCATCAACACGTTACCGACCT  
 GACCCGGGACGGCTGGCACCATGCGCGTCTGCGGTTTCCGCCCCAGACCAG  
 CACGCTGAGCCGCGGCATTGGCGCGCACACGGACTACGGCCTGCTGGTGATTGC  
 35 CGCGCAGGACGACGTGGGCGGCCTGTACATTGCCCGCCGGTGGAGGGCGAGAA  
 GCGCAACCGGA ACTGGCTGCCCGGCGAGTCTCGGCGGGCATGTTTCGAGCACGA

CGAGCCCTGGACGTTTCGTGACCCCCACGCCGGGCGTGTGGACGGTGTTCCTCCGGC  
 GACATCCTGCAGTTCATGACCGGCGGCCAGCTG  
 CTGTGCGACGCCGCACAAGGTGAAGCTGAACACCCGGGAGCGCTTCGCCTGCGCG  
 TACTTCCACGAGCCGAACCTTCGAGGCCTCGGCCTACCCCTGTTTCGAGCCCTCCG  
 5 CGAACGAGCGCATCCACTACGGCGAGCACTTCACCAATATGTTTATGCGCTGCTA  
 CCCCACCGCATCACCCAGCGCATCAACAAGGAGAATCGCCTGGCGCACCT  
 GGAGGACCTGAAGAAGTACAGCGACACCCGCGCCACCGGCTCG

## SEQ ID NO: 4-

10 ATGATACACGCTCCAAGTAGATGGGGAGTATTTCCCTCACTAGGGTTATGCAGCC  
 CGGACGTTGTGTGGAATGAGCATCCGAGCCTGTACATGGACAAAGAGGAAACCA  
 GCATGACCAACCTGCAGACCTTTGAACTGCCGACCGAAGTGACCGGTTGCGCGG  
 CGGACATCAGCCTGGGTTCGTGCGCTGATTCAGGCGTGGCAAAGGATGGTATCT  
 TCCAGATTAACCGACAGCGAGCAGGATCGTAAGACCCAAGAAGCGATGGCG  
 15 GCGAGCAAGCAATTTTGCAAAGAGCCGCTGACCTTCAAAGCAGCTGCGTTAGC  
 GACCTGACCTACAGCGGTTATGTGGCGAGCGGCGAGGAAGTTACCGCGGGCAAG  
 CCGGATTTCCCGGAAATTTTTACCGTGTGCAAGGACCTGAGCGTGGGCGATCAGC  
 GTGTTAAAGCGGGTTGGCCGTGCCATGGTCCGTTCCGTGGCCGAACAACACCTA  
 TCAAAGAGCATGAAAACCTTTATGGAGGAACTGGGTCTGGCGGGCGAGCGTCT  
 20 GCTGAAACTGACCGCGCTGGGTTTTGAACTGCCGATCAACACCTTCACCGACCTG  
 ACCCGTGATGGCTGGCACCACATGCGTGTGCTGCGTTTCCCGCCGCAGACCAGCA  
 CCCTGAGCCGTGGTATTGGTGCACACCGACTACGGTCTGCTGGTGATTGCGGC  
 GCAAGACGATGTTGGTGGCCTGTATATCCGTCCGCCGGTGGAGGGCGAAAAGCG  
 TAACCGTAACTGGCTGCCGGGCGAGAGCAGCGCGGGCATGTTTGAGCACGACGA  
 25 ACCGTGGACCTTCGTTACCCCGACCCCGGGTGTGTGGACCGTTTTTCCGGGCGAT  
 ATTCTGCAGTTCATGACCGGTGGCCAACTGCTGAGCACCCCGCACAAGGTTAAAC  
 TGAACACCCGTGAACGTTTTGCGTGCCTACTTTCACGAGCCGAACCTTCGAAGC  
 GAGCGCGTATCCGCTGTTTCGAGCCGAGCGCGAACGAACGTATCCACTACGGCGA  
 GCACTTCACCAACATGTTTATGCGTTGCTATCCGGATCGTATCACCCCAACGT  
 30 ATTAACAAGAAAACCGTCTGGCGCACCTGGAAGACCTGAAGAAATACAGCGAC  
 ACCCGTGCGACCGGCAGC

## SEQ ID NO: 5-

MIHAPSRWGVFPSLGLCSPDVVWNEHPSLYMDKEETSMTNLQTFELPTEVTGCAADISLG  
 35 RALIQAWQKDGIFQIKTDSEQDRKTQEAMAASKQFCKEPLTFKSSCVSDLTYSG  
 YVASGEEVTAGKPDFPEIFTVCKDLSVGDQRVKAGWPCHGPVWPNNYQKSMKT

FMEELGLAGERLLKLTALGFELPINTFTDLTRDGWHHMRVLRFPQTSTLSRGIGAHT  
 DYGLLVIAAQDDVGGLYIRPPVEGEKRNRNWLPGESSAGMFEHDEPWTFVTPTPGV  
 WTVFPGDILQFMTGGQLLSTPHKVKLNTRERFACAYFHEPNFEASAYPLFEPSANERI  
 HYGEHFTNMFMRCYPDRITTQRINKENRLAHLEDLKKYSDTRATGSGATNFSLLKQ  
 5 AGDVEENPGPMTESITSNGLTVASDTRRRVWVAIVSASSGNLVEWDFYVYSFCSLYF  
 AHIFFPSGNTTTQLLQTAGVFAAGFLMRPIGGWLFGRADRRGRKTSMLISVCMFCF  
 GSLIIACLPGYDAIGTWAPALLLLARLFQGLSVGGEYGTSATYMSEIALEGRKGFYAS  
 FQYVTLIGGQLLAILVVILQQILTDSLHEWGWRIPFAMGAALAIVALWLRRLDE  
 TSQKEVRALKEAGSFKGLWRNRKAFLMVLGFTAGGSLSFYTFTTYMQKYLVTG  
 10 MHANVASVIMTAALFVFMILIQPLIGALS DKIGRRTSMLIFGGMSALCTVPILTALQHV  
 SSPYAAFALVMLAMVIVSFYTSISGILKAEMFPAQVRALGVGLSYAVANALFGGSAE  
 YVALSLKSWGSETTFFWYVTIMGALAFIVSLMLHRKKGK GIRL

SEQ ID. NO: 6-

15 MHHHHHHENLYFQGKLMIHAPSRWGVFPSLGLCSPDVVWNEHPSLYMDKEETSMT  
 NLQTFELPTEVTGCAADISLGRALIQAWQKDGIFQIKTDSEQDRKTQEAMAASKQFC  
 KEPLTFKSSCVSDLTYSGYVASGEEVTAGKPDFPEIFTVCKDLSVGDQRVKAGWPCH  
 GPVPWPNTYQKSMKTFMEELGLAGERLLKLTALGFELPINTFTDLTRDGWHHMRV  
 LRFPPQTSTLSRGIGAHTDYGLLVIAAQDDVGGLYIRPPVEGEKRNRNWLPGESSAG  
 20 MFEHDEPWTFVTPTPGVWTVFPGDILQFMTGGQLLSTPHKVKLNTRERFACAYFHEP  
 NFEASAYPLFEPSANERIH YGEHFTNMFMRCYPDRITTQRINKENRLAHLEDLKKYS  
 DTRATGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMTESITSNGLTVASDTRRRVWVAIVSASSGN  
 LVEWDFYVYSFCSLYFAHIFFPSGNTTTQLLQTAGVFAAGFLMRPIGGWLFGRADRR  
 RGRKTSMLISVCMFCFGSLIIACLPGYDAIGTWAPALLLLARLFQGLSVGGEYG TSA  
 25 TYMSEIALEGRKGFYASFQYVTLIGGQLLAILVVILQQILTDSLHEWGWRIPFAMG  
 AALAIVALWLRRLDETSQKEVRALKEAGSFKGLWRNRKAFLMVLGFTAGGSLSFY  
 TFTTYMQKYLVTG MHANVASVIMTAALFVFMILIQPLIGALS DKIGRRTSMLIFGG  
 MSALCTVPILTALQHVSSPYAAFALVMLAMVIVSFYTSISGILKAEMFPAQVRALGV  
 GLSYAVANALFGGSAEYVALSLKSWGSETTFFWYVTIMGALAFIVSLMLHRKKGKGI RL  
 30

SEQ ID NO: 7-

ATGATTCATGCCCCCTCCCGCTGGGGCGTGTTTCCCAGTCTGGGTCTCTGCTCCCC  
 GATGTGGTGTGGAACGAACACCCCAGCCTGTACATGGATAAGGAAGAGACCAG  
 TATGACCAATCTGCAAACCTTTGAACTGCCACCGAGGTGACCGGTTGCGCCGCC  
 35 GATATTAGCCTCGGTCGCGCCCTGATTCAAGCCTGGCAAAGGATGGCATCTTCC

AAATCAAGACCGATTCCGAACAAGATCGCAAGACCCAAGAGGCCATGGCCGCCA  
GCAAACAATTTTGCAAGGAACCCCTGACCTTTAAATCCAGCTGCGTGAGCGATCT  
CACCTACAGTGGCTATGTGGCCAGTGGTGAAGAGGTGACCGCCGGCAAGCCCGA  
TTTTCCCGAGATTTTTACCGTGTGCAAGGATCTGAGTGTGGGTGATCAACGCGTG  
5 AAAGCCGGTTGGCCCTGCCATGGTCCCGTGCCCTGGCCCAACAATACCTATCAAA  
AATCCATGAAGACCTTTATGGAAGAACTCGGTCTGGCCGGTGAACGCCTGCTCA  
AACTGACCGCCCTCGGCTTTGAGCTGCCATTAACACCTTTACCGATCTCACCCG  
CGATGGTTGGCACCACATGCGCGTGCTGCGCTTTCTCCCAAACCAGCACCCCTG  
AGCCGCGGTATTGGTGCCACACCGATTACGGCCTGCTCGTGATTGCCGCCCAAG  
10 ATGATGTGGGCGGTCTGTATATTCGCCCTCCCGTGGAAGGCGAGAAACGCAACC  
GCAATTGGCTCCCCGGCGAAAGTTCCGCCGGCATGTTTGAACACGATGAACCCTG  
GACCTTTGTGACGCCACGCCCGGCGTGTGGACCGTGTTTCCCGGTGATATTCTG  
CAATTTATGACCGGCGGTCAACTGCTCTCCACGCCCCACAAAGTGAAGCTCAACA  
CCCGCGAACGCTTTGCCTGCGCCTACTTTACGAACCCAATTTTGAGGCCAGTGC  
15 CTATCCCCTGTTTGAACCCTCCGCCAACGAGCGCATTCACTACGGCGAGCACTTT  
ACCAATATGTTTATGCGCTGCTATCCCGATCGCATTACCACCCAACGCATTAACA  
AGGAAAATCGCCTGGCCACCTCGAGGATCTGAAAAGTATAGTGATACCCGCG  
CCACCGGTAGTGGTGCCACCAACTTTAGCCTGCTCAAACAAGCCGGCGATGTGG  
AAGAGAACCCCGGTCCCATGACCGAAAGTATTACCAGCAATGGCACCCCTGGTGG  
20 CCAGTGATACCCGTGCGCGGTGTGGGCCATTGTGAGTGCCAGCAGTGGTAACCT  
GGTGGAGTGGTTTGATTTTTACGTGTATAGCTTTTGCAGTCTCTACTTTGCCACA  
TTTTCTTTCCAGTGGCAATACCACCACCCAAGTCTGCAAACCGCCGGCGTGT  
TGCCGCCGGTTTTCTGATGCGCCCCATTGGCGGTTGGCTCTTTGGCCGCATTGCCG  
ATCGTCGCGGTGCAAGACCAGCATGCTGATTAGCGTGTGCATGATGTGCTTTGG  
25 CTCCCTGATTATTGCCTGCCTCCCCGGCTATGATGCCATTGGCACCTGGGCCCCC  
GCCCTGCTCCTGCTGGCCCGCCTCTTTCAAGGCCTGAGCGTGGGCGGTGAATACG  
GCACCAGCGCCACCTATATGAGTGAAATTGCCCTGGAGGGCCGCAAAGGTTTTT  
ACGCCAGTTTTCAATATGTGACCCTGATTGGCGGTCAACTGCTCGCCATTCTCGT  
GGTGGTGATTCTCCAACAAATTCTGACCGATTCCCAACTGCACGAATGGGGCTGG  
30 CGCATTCCCTTTGCCATGGGTGCCGCCCTGGCCATTGTGGCCCTGTGGCTCCGTC  
GCCAACTCGATGAAACCAGCCAAAAGAGGTGCGCGCCCTGAAAGAAGCCGGC  
AGTTTTAAAGGTCTCTGGCGCAACCGCAAGGCCTTTCTCATGGTGCTGGGCTTTA  
CCGCCGGCGGTAGTCTGTCTTTTACACCTTTACCACCTACATGCAAAAATATCT  
CGTGAACACCACCGGCATGCACGCCAATGTGGCCAGCGTGATTATGACCGCCGC  
35 CCTGTTTGTGTTTATGCTCATTCAACCCTGATTGGCGCCCTCAGCGATAAGATTG  
GTCGTGCGACCAGTATGCTGATTTTTGGCGGTATGAGTGCCCTCTGCACCGTGCC

CATTCTCACCGCCCTGCAACACGTGTCCAGCCCCTACGCCGCCTTTGCCCTCGTG  
 ATGCTGGCCATGGTGATTGTGTCTTTTATAACCAGCATTAGTGGCATTCTGAAGG  
 CCGAAATGTTTCCCGCCCAAGTGC GCGCCCTGGGCGTGGGTCTCAGTTACGCCGT  
 GGCCAATGCCCTGTTTGGCGGTTCCGCCGAATATGTGGCCCTGTCCCTCAAAGC  
 5 TGGGGCAGTGAGACCACCTTTTTCTGGTACGTGACCATTATGGGTGCCCTGGCCT  
 TTATTGTGAGCCTGATGCTCCACCGCAAAGGCAAGGGTATTCGCCTCTAG

SEQ ID NO: 8-

CATATG

10 SEQ ID NO: 9-

CACCACCACCATCATCATTAAATGAAAGCTT

SEQ ID NO: 10-

MHHHHHHENLYFQGKL

SEQ ID NO: 11-

15 GATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO: 12-

AAGCTT

SEQ ID NO: 13-

GGTACC

20

SEQ ID NO: 14-

ATGACTGATTTTTTACGCGATGACATCAGGTTCTCGGTCAAATCCTCGGTGAGG  
 TAATTGCGGAACAAGAAGGCCAGGAGGTTTATGAACTGGTTCGAACAAGCGCGCC  
 TGA CT TCTTTT GATATCGCCAAGGGCAACGCCGAAATGGATAGCCTGGTTCAGGT  
 25 TTTGACGGCATTACTCCAGCCAAGGCAACACCGATTGCTCGCGCATTTTCCCAC  
 TTCGCTCTGCTGGCTAACCTGGCGGAAGACCTCTACGATGAAGAGCTTCGTGAAC  
 AGGCTCTCGATGCAGGCGACACCCCTCCGGACAGCACTCTTGATGCCACCTGGCT  
 GAAACTCAATGAGGGCAATGTTGGCGCAGAAGCTGTGGCCGATGTGCTGCGCAA  
 TGCTGAGGTGGCGCCGTTCTGACTGCGCACCCAACTGAGACTCGCCGCCGCACT  
 30 GTTTTTGATGCGCAAAGTGGATCACCACCCACATGCGTGAACGCCACGCTTTGC  
 AGTCTGCGGAGCCTACCGCTCGTACGCAAAGCAAGTTGGATGAGATCGAGAAGA  
 ACATCCGCCGTGCGATCACCATTTTGTGGCAGACCGCGTTGATTCGTGTGGCCCG  
 CCCACGTATCGAGGACGAGATCGAAGTAGGGCTGCGCTACTACAAGCTGAGCCT  
 TTTGGAAGAGATTCCACGTATCAACCGTGATGTGGCTGTTGAGCTTCGTGAGCGT  
 35 TTCGGCGAGGGTGTTCCTTTGAAGCCCGTGGTCAAGCCAGGTTCTGGATTGGTG  
 GAGACCACGACGGTAACCCTTATGTCACCGCGGAAACAGTTGAGTATTCCACTC



ACCGCGCTGCGGAAACCGTGCTCAAGTACTATGCACGCCAGCTGCATTCCCTCGA  
GCATGAGCTCAGCCTGTCGGACCGCATGAATAAGGTCACCCCGCAGCTGCTTGC  
GCTGGCAGATGCAGGGCACAACGACGTGCCAAGCCGCGTGGATGAGCCTTATCG  
ACGCGCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTATCCTCGCGACGACGGCCGAGCTGAT  
5 CGGCGAGGACGCCGTTGAGGGCGTGTGGTTC AAGGTCTTTACTCCATACGCATCT  
CCGGAAGAATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTCTGCGTGAATCCA  
AGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTGTGCTGATTTCTGCCATCGAGAG  
CTTTGGATTCAACCTTTACGCACTGGATCTGCGCCAAAACCTCCGAAAGCTACGAG  
GACGTCCACCGAGCTTTTTCGAACGCGCCCAAGTCACCGCAAACCTACCGCGAG  
10 CTGTCTGAAGCAGAGAACTTGAGGTGCTGCTGAAGGAACTGCGCAGCCCTCGT  
CCGCTGATCCCGCACGGTTCAGATGAATACAGCGAGGTCACCGACCGCGAGCTC  
GGCATCTTCCGCACCGCGTTCGGAGGCTGTTAAGAAATTCGGGCCACGGATGGTG  
CCTCACTGCATCATCTCCATGGCATCATCGGTACCGATGTGCTCGAGCCGATGG  
TGTTGCTCAAGGAATTCGGACTCATCGCAGCCAACGGCGACAACCCACGCGGCA  
15 CCGTCGATGTCATCCCCTGTTTCGAAACCATCGAAGATCTCCAGGCCGGCGCCGG  
AATCCTCGACGAACTGTGGAAAATTGATCTCTACCGCAACTACCTCCTGCAGCGC  
GACAACGTCCAGGAAGTCATGCTCGGTTACTCCGATTCCAACAAGGATGGCGGA  
TATTTCTCCGCAAACCTGGGCGCTTTACGACGCGGAACTGCAGCTCGTGAACAT  
GCCGATCAGCCGGGGTCAACGTTTCGCTGTTCCACGGCCGTGGTGGCACCGTCCG  
20 CCGCGGTGGCGGACCTTCTACGACGCGATTCTTGCCAGCCAGGGGGGCTGT  
CAAGGTTCCGTGCGCATCACCGAGCAGGGCGAGATCATCTCCGCTAAGTACGGC  
AACCCCGAAACCGCGCGCCGAAACCTCGAAGCCCTGGTCTCAGCCACGCTTGAG  
GCATCGCTTCTCGACGTCTCCGAACTCACCGATCACCAACGCGCGTACGACATCA  
TGAGTGAGATCTCTGAGCTCAGCTTGAAGAAGTACGCCTCCTTGGTGCACGAGG  
25 ATCAAGGCTTCATCGATTACTTACCCAGTCCACGCCGCTGCAGGAGATTGGATC  
CCTCAACATCGGATCCAGGCCTTCTCACGCAAGCAGACCTCCTCGGTGGAAGAT  
TTGCGAGCCATCCCATGGGTGCTCAGCTGGTCCAGTCTCGTGTGATGCTGCCAG  
GCTGGTTTTGGTGTTCGGAACCGCATTAGAGCAGTGGATTGGCGAAGGGGAGCAGG  
CCACCCAACGCATTGCCGAGCTGCAAACACTCAATGAGTCCTGGCCATTTTTACC  
30 CTCAGTGTTGGATAACATGGCTCAGGTGATGTCCAAGGCAGAGCTGCGTTTGGCA  
AAGCTCTACGCAGACCTGATCCCAGATACGGAAGTAGCCGAGCGAGTCTATTCC  
GTCATCCGCGAGGAGTACTTCTGACCAAGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGCT  
CTGATGATCTGCTTGTGATGACAACCCACTTCTCGCACGCTCTGTCCAGCGCCGATA  
CCCCTACCTGCTTCCACTCAACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGACGCTACCGA  
35 AAAGGCGACCAAAGCGAGCAAGTGTCCCGCAACATTCAGCTGACCATGAACGGT  
CTTTCCACTGCGGTGCGCAAACCTCCGGC

SEQ ID NO: 15-

MTDFLRDDIRFLGQILGEVIAEQEGQEVYELVEQARLTSFDIAKGNAEMDSLQVFDGI  
 TPAKATPIARAFSHFALLANLAEDLYDEELREQALDAGDTPPDSTLDATWLKLINE  
 5 GNVGAEAVADVLRNAEVAPVLT AHPTETRRRTVFDAQKWITTHMRERHALQSAEP  
 TARTQSKLDEIEKNIRRRITILWQTALIRVARPRIEDEIEVGLRYYKLSLLEEIPRINRDV  
 AVELRERFGEGVPLKPVVKPGSWIGGDHDGNPYVTAETVEYSTHRAAETVLKYYAR  
 QLHSLEHELSSLDRMNKVTPQLLALADAGHNDVPSRVDEPYRRAVHGVRGRILATT  
 AELIGEDAVEGWVFKVFTPYASPEEFLNDALTIDHSLRESKDVLIADDRLSVLISAIES  
 10 FGFNLYALDLRQNSESYEDVLT ELFERAQVTANYRELSEAEKLEVLLKELRSPRPLIP  
 HGSDEYSEVTDRELGIFRTASEAVKKFGPRMVPHCIISSMASSVTDVLEPMVLLKEFGL  
 IAANGDNPRGTVDVIPLFETIEDLQAGAGILDELWKIDLYRNYLLQRDNVQEVMLGY  
 SDSNKDGGYFSANWALYDAELQLVELCRSAGVNVRLFHGRGGTVGRGGGPSYDAI  
 LAQPRGAVQGGSVWRITEQGEIISAKYGNPETARRNLEALVSATLEASLLDVSELTDHQR  
 15 AYDIMSEISELSLKKYASLVHEDQGFIDYFTQSTPLQEIGSLNIGSRPSSRKQTSSVEDL  
 RAIPWVLSWSQSRVMLPGWFGVGTALEQWIGEGEQATQRIAEQLTLNESWPFLPSV  
 LDNMAQVMSKAELRLAKLYADLIPDEVAERVYSVIREEYFLTKKMFCVITGSDDL  
 DDNPLLARSVQRRYPYLLPLNVIQVEMMRRYRKGDQSEQVSRNIQLTMNGLSTAVR  
 NSG

20

SEQ ID NO: 16-

ATGTTTGAAGGGATATCGTGGCTACTGATAACAACAAGGCTGTCCTGCACTACCCCG  
 GTGGCGAGTTCGAAATGGACATCATCGAGGCTTCTGAGGGTAACAACGGTG  
 TTGTCCTGGGCAAGATGCTGTCTGAGACTGGACTGATCACTTTTGACCCAGGTTA  
 25 TGTGAGCACTGGCTCCACCGAGTCGAAGATCACCTACATCGATGGCGATGCGGG  
 AATCCTGCGTTACCGCGGCTATGACATCGCTGATCTGGCTGAGAATGCCACCTC  
 AACGAGGTTTCTTACTACTTATCAACGGTGAGCTACCAACCCAGATGAGCTTC  
 ACAAGTTTAACGACGAGATTCGCCACCACACCCTTCTGGACGAGGACTTCAAGTC  
 CCAGTTCAACGTGTTCCACGCGACGCTCACCCAATGGCAACCTTGGCTTCTCTCG  
 30 GTTAACATTTTGTCTACTACTACCAGGACCAGCTGAACCCACTCGATGAGGCAC  
 AGCTTGATAAGGCAACCGTTCGCCTCATGGCAAAGGTTCCAATGCTGGCTGCGTA  
 CGCACACCGCGCACGCAAGGGTGCTCCTTACATGTACCCAGACAACCTCCCTCAAT  
 GCGCGTGAGAACTTCTGCGCATGATGTTCCGTTACCCAACCGAGCCATACGAG  
 ATCGACCCAATCATGGTCAAGGCTCTGGACAAGCTGCTCATCCTGCACGCTGACC  
 35 ACGAGCAGAACTGCTCCACCTCCACCGTTCGTATGATCGGTTCCGCACAGGCCAA

CATGTTTGTCTCCATCGCTGGTGGCATCAACGCTCTGTCCGGCCCACTGCACGGT  
 GGCGCAAACCAGGCTGTTCTGGAGATGCTCGAAGACATCAAGAGCAACCACGGT  
 GGCGACGCAACCGAGTTCATGAACAAGGTCAAGAACAAGGAAGACGGCGTCCG  
 CCTCATGGGCTTCGGACACCGCGTTTACAAGA ACTACGATCCACGTGCAGCAATC  
 5 GTCAAGGAGACCGCACACGAGATCCTCGAGCACCTCGGTGGCGACGATCTTCTG  
 GATCTGGCAATCAAGCTGGAAGAAATTGCACTGGCTGATGATTACTTCATCTCCC  
 GCAAGCTCTACCCGAACGTAGACTTCTACACCGGCCTGATCTACCGCGCAATGGG  
 CTTCCCAACTGACTTCTTCACCGTATTGTTTCGCAATCGGTCTGTCTGCCAGGATGG  
 ATCGCTCACTACCGCGAGCAGCTCGGTGCAGCAGGCAACAAGATCAACCGCCCA  
 10 CGCCAGGTCTACACCGGCAACGAATCCCGCAAGTTGGTTCCTCGCGAGGAGCGC  
 TAA

SEQ ID NO: 17-

MFERDIVATDNNKAVLHYPGGEFEMDIEASEGNNGVVLGKMLSETGLITFDPGYVSTGST  
 15 ESKITYIDGDAGILRYRGYDIADLAENATFNEVSYLLINGELPTPDELHKFNDEI  
 RHHTLLDEDFKSQFNVFPRAHPMATLASSVNILSTYYQDQLNPLDEAQLDKATVRL  
 MAKVPMLAAYAHRARKGAPYMYPDNSLNARENFLRMMFGYPTEPYEIDPIMVKAL  
 DKLLILHADHEQNCSTSTVRMIGSAQANMFVSIAGGINALSGPLHGGANQAVLEMLE  
 DIKSNHGGDATEFMNKVKNKEDGVRLMGFGHRVYKNYDPRAAIVKETAHEILEHL  
 20 GGDDLLDLAIKLEEIALADDYFISRKLYPNVDFYTGLIYRAMGFPTDFFTFLFAIGRLP  
 GWIAHYREQLGAAGNKINRPRQVYTGNESRKLVPREER

SEQ ID NO: 18-

ATGACTGATTTTTTACGCGATGACATCAGGTTCTCGGTCAAATCCTCGGTGAGGTAA  
 25 TTGCGGAACAAGAAGGCCAGGAGGTTTATGAACTGGTCGAACAAGCGCGCC  
 TGACTTCTTTTATGATATCGCCAAGGGCAACGCCGAAATGGATAGCCTGGTTCAGGT  
 TTTTCGACGGCATTACTCCAGCCAAGGCAACACCGATTGCTCGCGCATTTTCCCAC  
 TTCGCTCTGCTGGCTAACCTGGCGGAAGACCTCTACGATGAAGAGCTTCGTGAAC  
 AGGCTCTCGATGCAGGCGACACCCCTCCGGACAGCACTCTTGATGCCACCTGGCT  
 30 GAAACTCAATGAGGGCAATGTTGGCGCAGAAGCTGTGGCCGATGTGCTGCGCAA  
 TGCTGAGGTGGCGCCGTTCTGACTGCGCACCCAACTGAGACTCGCCGCCGCACT  
 GTTTTTGATGCGCAAAGTGGATCACCACCCACATGCGTGAACGCCACGCTTTGC  
 AGTCTGCGGAGCCTACCGCTCGTACGCAAAGCAAGTTGGATGAGATCGAGAAGA  
 ACATCCGCCGTCGCATCACCATTTTGTGGCAGACCGCGTTGATTCGTGTGGCCCG  
 35 CCCACGTATCGAGGACGAGATCGAAGTAGGGCTGCGCTACTACAAGCTGAGCCT

TTTGGAAGAGATTCCACGTATCAACCGTGATGTGGCTGTTGAGCTTCGTGAGCGT  
TTCGGCGAGGGTGTTCCTTTGAAGCCCGTGGTCAAGCCAGGTTCTGGATTGGTG  
GAGACCACGACGGTAACCCTTATGTCACCGCGGAAACAGTTGAGTATTCCACTC  
ACCGCGCTGCGGAAACCGTGCTCAAGTACTATGCACGCCAGCTGCATTCCCTCGA  
5 GCATGAGCTCAGCCTGTCGGACCGCATGAATAAGGTCACCCCGCAGCTGCTTGC  
GCTGGCAGATGCAGGGCACAACGACGTGCCAAGCCGCGTGGATGAGCCTTATCG  
ACGCGCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTATCCTCGCGACGACGGCCGAGCTGAT  
CGGCGAGGACGCCGTTGAGGGCGTGTGGTTCAAGGTCTTTACTCCATACGCATCT  
CCGGAAGAATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTCTGCGTGAATCCA  
10 AGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTGTGCTGATTTCTGCCATCGAGAG  
CTTTGGATTCAACCTTTACGCACTGGATCTGCGCCAAACTCCGAAAGCTACGAG  
GACGTCTCACCGAGCTTTTTCGAACGCGCCCAAGTCACCGCAAACCTACCGCGAG  
CTGTCTGAAGCAGAGAACTTGAGGTGCTGCTGAAGGAACTGCGCAGCCCTCGT  
CCGCTGATCCCGCACGGTTCAGATGAATACAGCGAGGTCACCGACCGCGAGCTC  
15 GGCATCTTCCGCACCGCGTTCGGAGGCTGTTAAGAAATTCCGGGCCACGGATGGTG  
CCTCACTGCATCATCTCCATGGCATCATCGGTCACCGATGTGCTCGAGCCGATGG  
TGTTGCTCAAGGAATTCGGACTCATCGCAGCCAACGGCGACAACCCACGCGGCA  
CCGTCGATGTCATCCCCTGTTTCGAAACCATCGAAGATCTCCAGGCCGGCGCCGG  
AATCCTCGACGAACTGTGGAAAATTGATCTCTACCGCAAACCTACCTCCTGCAGCGC  
20 GACAACGTCCAGGAAGTCATGCTCGGTTACTCCGATTCCAACAAGGATGGCGGA  
TATTTCTCCGCAAACCTGGGCGCTTTACGACGCGGAACTGCAGCTCGTCTGAACTAT  
GCCGATCAGCCGGGGTCAACGTTTCGCTGTTCCACGGCCGTGGTGGCACCGTCCG  
CCGCGGTGGCGGACCTTCTACGACGCGATTCTTGCCAGCCAGGGGGGCTGTG  
CAAGGTTCCGTGCGCATCACCGAGCAGGGCGAGATCATCTCCGCTAAGTACGGC  
25 AACCCCGAAACCGCGCGCCGAAACCTCGAAGCCCTGGTCTCAGCCACGCTTGAG  
GCATCGCTTCTCGACGTCTCCGAACTCACCGATACCAACGCGCGTACGACATCA  
TGAGTGAGATCTCTGAGCTCAGCTTGAAGAAGTACGCCTCCTTGGTGCACGAGG  
ATCAAGGCTTCATCGATTACTTCACCCAGTCCACGCCGCTGCAGGAGATTGGATC  
CCTCAACATCGGATCCAGGCCTTCTCACGCAAGCAGACCTCCTCGGTGGAAGAT  
30 TTGCGAGCCATCCCATGGGTGCTCAGCTGGTCAAGTCTCGTGTATGCTGCCAG  
GCTGGTTTTGGTGTTCGGAACCGCATTAGAGCAGTGGATTGGCGAAGGGGAGCAGG  
CCACCCAACGCATTGCCGAGCTGCAAACACTCAATGAGTCTGGCCATTTTTACC  
CTCAGTGTTGGATAACATGGCTCAGGTGATGTCCAAGGCAGAGCTGCGTTTGGCA  
AAGCTCTACGCAGACCTGATCCAGATACGGAAGTAGCCGAGCGAGTCTATTCC  
35 GTCATCCGCGAGGAGTACTTCTGACCAAGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGCT  
CTGATGATCTGCTTGTGACAACCCACTTCTCGCACGCTCTGTCCAGCGCCGATA

CCCCTACCTGCTTCCACTCAACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGACGCTACCGA  
AAAGGCGACCAAAGCGAGCAAGTGTCCCGCAACATTCAGCTGACCATGAACGGTCTT  
TCCACTGCGGTGCGCAACTCCGGCGCCACCAACTCAACTCCGGCGCCACCAA  
CTTTAGCCTGCTCAAACAAGCCGGCGATGTGGAAGAGAACCCCGGTCCCATGTTT  
5 GAAAGGGATATCGTGGCTACTGATAACAACAAGGCTGTCCTGCACTACCCCGGT  
GGCGAGTTCGAAATGGACATCATCGAGGCTTCTGAGGGTAACAACGGTGTTGTC  
CTGGGCAAGATGCTGTCTGAGACTGGACTGATCACTTTTGACCCAGGTTATGTGA  
GCACTGGCTCCACCGAGTCGAAGATCACCTACATCGATGGCGATGCGGGAATCC  
TGCGTTACCGCGGCTATGACATCGCTGATCTGGCTGAGAATGCCACCTTCAACGA  
10 GGTTTCTTACCTACTTATCAACGGTGAGCTACCAACCCAGATGAGCTTCACAAG  
TTTAACGACGAGATTCCGCCACCACACCCTTCTGGACGAGGACTTCAAGTCCCAGT  
TCAACGTGTTCCACGCGACGCTCACCCAATGGCAACCTTGGCTTCTCGGTAA  
CATTTTGTCTACCTACTACCAGGACCAGCTGAACCCACTCGATGAGGCACAGCTT  
GATAAGGCAACCGTTCGCCTCATGGCAAAGGTTCCAATGCTGGCTGCGTACGCA  
15 CACCGCGCACGCAAGGGTGCTCCTTACATGTACCCAGACAACCTCCCTCAATGCGC  
GTGAGAACTTCTGCGCATGATGTTCCGGTTACCCAACCGAGCCATACGAGATCGA  
CCCAATCATGGTCAAGGCTCTGGACAAGCTGCTCATCCTGCACGCTGACCACGAG  
CAGAACTGCTCCACCTCCACCGTTCGTATGATCGGTTCCGCACAGGCCAACATGT  
TTGTCTCCATCGCTGGTGGCATCAACGCTCTGTCCGGCCCACTGCACGGTGGCGC  
20 AAACCAGGCTGTTCTGGAGATGCTCGAAGACATCAAGAGCAACCACGGTGGCGA  
CGCAACCGAGTTCATGAACAAGGTCAAGAACAAGGAAGACGGCGTCCGCCTCAT  
GGGCTTCGGACACCGCGTTTACAAGAACTACGATCCACGTGCAGCAATCGTCAA  
GGAGACCGCACACGAGATCCTCGAGCACCTCGGTGGCGACGATCTTCTGGATCT  
GGCAATCAAGCTGGAAGAAATTGCACTGGCTGATGATTACTTCATCTCCCGCAAG  
25 CTCTACCCGAACGTAGACTTCTACACCGGCCTGATCTACCGCGCAATGGGCTTCC  
CAACTGACTTCTTACCGTATTGTTTCGCAATCGGTCGTCTGCCAGGATGGATCGC  
TCACTACCGCGAGCAGCTCGGTGCAGCAGGCAACAAGATCAACCGCCCACGCCA  
GGTCTACACCGGCAACGAATCCCGCAAGTTGGTTCTCGCGAGGAGCGCTAA

30 SEQ ID NO: 19-

ATGTACGAGAAGATTCAACCCCCTAGCGAAGGCAGCAAAATTCGCTTTGAAGCC  
GGCAAGCCGATCGTTCGCGACAACCCGATCATTCCCTTCATTTCGTGGTGACGGCG  
CTGGCGTTGATATCTGGCCCGCAACTGAGCGCGTTCTCGATGCCGCTGTCGCTAA  
AGCCTATGGCGGTCAGCGCAAAATCACTTGGTTCAAAGTCTACGCGGGTGATGA  
35 AGCCTGCGACCTCTACGGCACCTACCAATATCTGCCTGAAGATACGCTGACAGCG  
ATCCGCGAGTACGGCGTGGCAATCAAAGGCCCGCTGACGACGCCGATCGGTGGT

GGCATTGATCGCTGAACGTGGCGCTACGGCAAATCTTCGATCTCTATGCCTGCG  
 TCCGCCCTGTGCTACTACACCGGCACACCCTCGCCCCACCGCACGCCCGAACA  
 ACTCGATGTGGTGGTCTACCGCGAAAACACCGAGGATATCTACCTCGGCATCGA  
 ATGGAAGCAAGGTGATCCCACCGGCGATCGCCTGATCAAGCTGCTGAACGAGGA  
 5 CTTCAATCCCAACAGCCCCAGCTTGGGTAAAAAGCAAATCCGTTTGGATTCCGGC  
 ATTGGTATTAAGCCGATCAGTAAAACGGGTAGCCAGCGTCTGATTTCGTCGTGCGA  
 TCGAGCATGCCCTACGCCTCGAAGGCCGCAAGCGACATGTCACCCTTGTCCACAA  
 GGGCAACATCATGAAGTTCACGGAAGGTGCTTTCCGGGACTGGGGCTATGAACT  
 GGCCACGACTGAGTTCCGAACCGACTGTGTGACTGAACGGGAGAGCTGGATTCT  
 10 TGCCAACCAAGAAAGCAAGCCGGATCTCAGCTTGGAAAGACAATGCGCGGCTCAT  
 CGAACCTGGCTACGACGCGATGACGCCCCGAAAAGCAGGCAGCAGTGGTGGCTGA  
 AGTGAAAGCTGTGCTCGACAGCATCGGCGCCACCCACGGCAACGGTCAGTGGAA  
 GTCTAAGGTGCTGGTTGACGATCGCATTGCTGACAGCATCTTCCAGCAGATTCAA  
 ACCCGCCCCGGGTGAATACTCGGTGCTGGCGACGATGAACCTCAATGGCGACTAC  
 15 ATCTCTGATGCAGCGGCGGCGGTGGTGGTGGCCTGGGCATGGCCCCCGGTGCC  
 AACATTGGCGACGAAGCGGCGATCTTTGAAGCGACCCACGGCGCAGCGCCCAAG  
 CACGCTGGCCTCGATCGCATTAAACCCCGGCTCGGTCATCCTCTCCGGCGTGATGA  
 TGCTGGAGTACCTAGGCTGGCAAGAGGCTGCTGACTTGATACCAAGGGCATCA  
 GCCAAGCGATCGCTAACCGTGAGGTACCTACGATCTGGCTCGGTTGATGGAAC  
 20 CGGCGGTTGATCAACCACTCAAGTGCTCGGAATTTGCCGAAGCCATCGTCAAGC  
 ATTCGACGATTAG

SEQ ID NO: 20-

MYEKIQPPSEGSKIRFEAGKPIVPDNPIIPFIRGDGTGVDIWPATERVLDAAVAKAYGG  
 25 QRKITWFKVYAGDEACDLYGTYQYLPEDTLTAIREYGVAIKGPLTTPIGGGIRSLNVA  
 LRQIFDLYACVRPCRYTGTSPHRTPEQLDVVVYRENTEDIYLGIEWKQGDPTGDR  
 LIKLLNEDFIPNSPSLGKKQIRLDSGIGIKPISKTGSQRLIRRAIEHALRLEGRKRHVTLV  
 HKGNIMKFTEGAFRDWGYELATTEFRDTCVTERESWILANQESKPDLSLEDNARLIE  
 PGYDAMTPEKQAAVVAEVKAVLDSIGATHGNGQWKS KVLVDDRIADSIFQQIQTRP  
 30 GEYSVLATMNLNGDYISDAAA VVGLGMAPGANIGDEAAIFEATHGTAPKHAGL  
 DRINPGSVILSGVMMLEYL GWQEAADLITKGISQAIANREVTYDLARLM EPAVDQPL  
 KCSEFAEAIVKHFDD

SEQ ID NO: 21-

35 GTGAAAACGTGCTGGCGATCATTCTCGGTGGAGGCGCAGGCAGTCGTCTCTATCC  
 ACTAACCAACAGCGCGCCAAACCAGCGGTCCCCCTGGCGGGCAAATACCGCT

TGATCGATATTCCCGTCAGCAATTGCATCAACGCTGACATCAACAAAATCTATGT  
 GCTGACGCAGTTTAACTCTGCCTCGCTCAACCGCCACCTCAGTCAGACCTACAACCTC  
 TCCAGCGGCTTTGGCAATGGCTTTGTTGAGGTGCTAGCAGCTCAGATTACGCCGGAG  
 A ACCCCAACTGGTTCCAAGGCACCGCCGATGCGGTTCCGCCAGTATCTCTGGCTAAT  
 5 CAAAGAGTGGGATGTGGATGAGTACCTGATCCTGTCTGGGGGATCATCTCTACCG  
 CATGGACTATAGCCAGTTCATTCAGCGGCACCGAGACACCAATGCCGACATCAC  
 ACTCTCGGTCTTGCCGATCGATGAAAAGCGCGCCTCTGATTTTGGCCTGATGAAG  
 CTAGATGGCAGCGGCCGGGTGGTTCGAGTTCAGCGAAAAGCCCAAAGGGGATGA  
 ACTCAGGGCGATGCAAGTCGATAACCACGATCCTCGGGCTTGACCCTGTCGCTGCT  
 10 GCTGCCAGCCCTTCATTGCCTCGATGGGCATCTACGTCTTCAAGCGGGATGTTC  
 TGATCGATTTGCTCAGCCATCATCCCGAGCAAACCGACTTTGGCAAGGAAGTGAT  
 TCCCGCTGCAGCCACCCGCTACAACACCCAAGCCTTTCTGTTCAACGACTACTGG  
 GAAGACATCGGCACGATCGCCTCATTCTACGAGGCCAATCTGGCGCTGACTCAG  
 CAACCTAGCCCACCCTTCAGCTTCTACGACGAGCAGGCGCCGATTTACACCCGCG  
 15 CTCGCTACCTGCCGCCAACCAAGCTGCTCGATTGCCAGGTGACCCAGTCGATCAT  
 TGGCGAGGGCTGCATTCTCAAGCAATGCACCGTTCAGAATTCCGTCTTAGGGATT  
 CGTCCCGCATTGAGGCCGACTGCGTGATCCAGGACGCCTTGTTGATGGGCGCTG  
 ACTTCTACGAAACCTCGGAGCTACGGCACCAAGAATCGGGCCAATGGCAAAGTGC  
 CGATGGGAATCGGCAGTGGCAGCACCATCCGTCTCGGCCATCGTCGACAAAAATG  
 20 CCCACATTGGCCAGAACGTTTCAGATCGTCAACAAAGACCATGTGGAAGAGGCCGATC  
 GCGAAGATCTGGGCTTTATGATCCGCAGCGGCATTGTCGTTGTGGTCAAAGGGGCGG  
 TTATTCCCGACAACACGGTGATCTAA

SEQ ID NO: 22-

25 MKNVLAIIILGGGAGSRLYPLTKQRAKPAVPLAGKYRLIDIPVSN CINADINKIYVLTQ  
 FNSASLNRHLSQTYNLSSFGNGFVEVLAAQITPENPNWFQGTADAVRQYLWLIKE  
 WDVDEYLILSGDHLYRMDYSQFIQRHRDTNADITLSVLPIDEKRASDFGLMKLDGSG  
 RVVEFSEKPKGDELRAMQVDTTILGLDPVAAAAQPFIASMGIIYVFKRDVLIIDLLSHH  
 PEQDFGKEVIPAAATRYNTQAF LFNDYWEDIGTIA SFYEANLALTQQPSPPF SFYDE  
 30 QAPIYTRARYLPPTKLLDCQVTQSIIGEGCILKQCTVQNSVLGIRSR IEADCVIQDALL  
 MGADFYETSELRHQNRANGKVP MGIGSGSTIRRAIVDKNAHIGQNVQIVNKDHVEE  
 ADREDLGFMIRSGIVVVVKGAVIPDNTVI

SEQ ID NO: 23-

35 ATGGCACTGAATATTCCATTCAGAAATGCGTACTATCGTTTTGCATCCAGTTACT  
 CATTCTCTTTTTATTTCTGGTCGCTGTGGTGGTCGTTATACGCTATTTGGCTGA

AAGGACATCTAGGATTAACAGGGACGGAATTAGGTACACTTTATTCCGGTCAACC  
 AGTTTACCAGCATTCTATTTATGATGTTCTACGGCATCGTTCAGGATAAACTCGGT  
 CTGAAGAAACCGCTCATCTGGTGTATGAGTTTCATTCTGGTCTTGACCGGACCGT  
 TTATGATTTACGTTTATGAACCGTACTGCAAAGCAATTTTTCTGTAGGTCTAATT  
 5 CTGGGGGCGCTCTTTTTTGGCCTGGGGTATCTGGCGGGATGCGGTTTGCTTGACA  
 GCTTCACCGAAAAAATGGCGCGAAATTTTCATTTTCAATATGGAACAGCGCGCG  
 CCTGGGGATCTTTTGGCTATGCTATTGGCGCGTTCTTTGCCGGTATATTTTTAGT  
 ATCAGTCCCATATCAACTTCTGGTTGGTCTCGCTATTTGGCGCTGTATTTATGAT  
 GATCAACATGCGTTTTAAAGATAAGGATCACCAGTGCATAGCGGCGGATGCGGG  
 10 AGGGGTAAAAAAGAGGATTTTATCGCAGTTTTCAAGGATCGAACTTCTGGGTT  
 TTCGTCATATTTATTGTGGGGACGTGGTCTTTCTATAACATTTTTGATCAACA  
 CTTTCCTGTCTTTTATGCAGGTTTATTTCGAATCACACGATGTAGGAACGCGCCTGT  
 ATGTTTATCTCAACTCATTCCAGGTGGTACTCGAAGCGCTGTGCATGGCGATTAT  
 TCCTTTCTTTGTGAATCGGGTAGGGCCAAAAAATGCATTACTTATCGGTGTTGTG  
 15 ATTATGGCGTTGCGTATCCTTTCTGCGCGTTGTTGTTAACCCTGGATTATTTT  
 ATTAGTGAAGCTGTTACATGCCATTGAGGTTCCACTTTGTGTCATATCCGTCTTCA  
 AATACAGCGTGGCAAACCTTTGATAAGCGCCTGTCGTCGACGATCTTTCTGATTGG  
 TTTTCAAATTGCCAGTTCGCTTGGGATTGTGCTGCTTTCAACGCCGACTGGGATA  
 CTCTTTGACCACGCAGGCTACCAGACAGTTTTCTTCGCAATTTCCGGTATTGTCTG  
 20 CCTGATGTTGCTATTTGGCATTCTTCTCCTGAGTAAAAACGCGAGCAAATAGTT  
 ATGGAAACGCCTGTACCTTCAGCAATATAG

## SEQ ID NO: 24-

MALNIPFRNAYYRFASSYSFLFFISWSLWWSLYAIWLKGHGLTGTGLTLYSVNQF  
 25 TSILFMMFYGIVQDKLGLKKPLIWCMSFILVLTGPFMIYVYEPLLQSNFSVGLILGALF  
 FGLGYLAGCGLLDSFTEKMARNFHFYGTARAWGSFGYAIGAFFAGIFFSISPHINFW  
 LVSLFGAVFMMINMRFKDKDHQCIAADAGGVKKEDFIAVFKDRNFVWFVIVGTW  
 SFYNIFDQQLFPVIFYAGLFE

## 30 SEQ ID NO: 25-

ATGGTGGCAGCTCAAATCTCTACATTCTGCACATTCAGACCCATGGTCTGCTGC  
 GAGGGCAGAACTTGGAACCTGGGGCGAGATGCCGACACCGGCGGGCAGACCAAG  
 TACGTCTTAGAACTGGCTCAAGCCCAAGCTAAATCCCCACAAGTCCAACAAGTC  
 GACATCATCACCCGCCAAATCACCGACCCCGCGTCAGTGTTGGTTACAGTCAGG  
 35 CGATCGAACCTTTGCGCCCAAAGGTCGGATTGTCCGTTTGCCTTTTGGCCCCAA



ACGCTACCTCCGTAAAGAGCTGCTTTGGCCCCATCTCTACACCTTTGCGGATGCA  
ATTCTCCAATATCTGGCTCAGCAAAGCGCACCCCGACTTGGATTGAGGCCACT  
ATGCTGATGCTGGCCAAGTGGGATCACTGCTGAGTCGCTGGTTGAATGTACCGCT  
AATTTTCACAGGGCATTCTCTGGGGCGGATCAAGCTAAAAAGCTGTTGGAGCA  
5 AGACTGGCCGCTTGAGGAAATTGAAGCGCAATTCAATATTCAACAGCGAATTGA  
TGCGGAGGAGATGACGCTCACTCATGCTGACTGGATTGTCGCCAGCACTCAGCA  
GGAAGTGGAGGAGCAATACCGCGTTTACGATCGCTACAACCCAGAGCGCAA  
TGTCATTCCACCGGGTGTGATACCGATCGCTTCAGGTTTCAGCCCTTGGGCGAT  
CGCGGTGTTGTTCTCCAACAGGAACTGAGCCGCTTTCTGCGCGACCCAGAAAAAC  
10 CTCAAATTCTCTGCCTCTGTGCCCCGCACCTCGCAAAAATGTACCGGCGCTGGT  
GCGAGCCTTTGGCGAACATCCTTGGCTGCGCAAAAAGCCAACCTTGTCTTAGTA  
CTGGGCAGCCGCCAAGACATCAACCAGATGGATCGCGGCAGTCGGCAGGTGTT  
CAAGAGATTTTCCATCTGGTCGATCGCTACGACCTCTACGGCAGCGTCGCCTATC  
CCAAACAGCATCAGGCTGATGATGTGCCGGAGTTCTATCGCCTAGCGGCTCATT  
15 CGGCGGGGTATTCTGCAATCCGGCGCTGACCGAACCTTTTGGTTTGACAATTTTG  
GAGGCAGGAAGCTGCGGCGTGCCGGTGGTGGCAACCCATGATGGCGGCCCCAG  
GAAATTCTCAAACACTGTGATTTTCGGCACTTTAGTTGATGTCAGCCGACCCGCTA  
ATATCGCGACTGCACTCGCCACCCTGCTGAGCGATCGCGATCTTTGGCAGTGCTA  
TCACCGCAATGGCATTGAAAAAGTTCCCGCCCATTACAGCTGGGATCAACATGTC  
20 AATACCCTGTTTGAGCGCATGGAAACGGTGGCTTTGCCTCGTCGTCGTGCTGTCA  
GTTTCGTACGGAGTCGCAAACGCTTGATTGATGCCAAACGCCTTGTGCTTAGTGA  
CATCGACAACACACTGTTGGGCGATCGTCAAGGACTCGAGAATTTAATGACCTAT  
CTCGATCAGTATCGCGATCATTTTGCCTTTGGAATTGCCACGGGGCGTCGCCTAG  
ACTCTGCCCAAGAAGTCTTGAAAGAGTGGGGCGTTCCTTCGCCAAACTTCTGGGT  
25 GACTTCCGTGCGCAGCGAGATTCACTATGGCACCGATGCTGAACCGGATATCAG  
CTGGGAAAAGCATATCAATCGCAACTGGAATCCTCAGCGAATTCGGGCAGTAAT  
GGCACAACACTACCCTTTCTTGAAGTGCAGCCGGAAGAGGATCAAACACCCTTCAA  
AGTCAGCTTCTTTGTCCGCGATCGCCACGAGACTGTGCTGCGAGAAGTACGGCAA  
CATCTTCGCCGCCATCGCCTGCGGCTGAAGTCAATCTATTCCCATCAGGAGTTTC  
30 TTGACATTCTGCCGCTAGCTGCCTCGAAAGGGGATGCGATTGCGCACCTCTCACT  
CCGCTGGCGGATTCTCTTGAGAACATTTTGGTGGCAGGCGATTCTGGTAACGAT  
GAGGAAATGCTCAAGGGCCATAATCTCGGCGTTGTAGTTGGCAATTAACCCG  
GAATTGGAGCCACTGCGCAGCTACGAGCGCGTCTATTTTGTGAGGGCCACTATG  
CTAATGGCATTCTGGAAGCCTTAAACACTATCGCTTTTTTGGAGGCGATCGCTTAA

35

SEQ ID NO: 26 -

MVA AQNLYILHIQTHGLLRGQNLELGRDADTGGQTKYVLELAQAQAKSPQVQQVDIIT  
 RQITDPRVSVGYSQAIPEFAPKGRIVRLPFGPKRYLRKELLWPHLYTFADAILQYLA  
 QQKRTPTWIAHYADAGQVGSLLSRWLNVP LIFTGHSLGRIK LKKLLEQDWPLEEIE  
 AQFN IQQRIDAEEMTLTHADWIVASTQQEVEEQYRVYDRYNPERKLVIPPGVDTDRF  
 5 RFQPLGDRGVVLQQELSRFLRDPEKPQILCLCRPAPRKNVPALVRAFGEHPWLRKKA  
 NLV LVLGSRQDINQMDRGRSRQVFQEIFHLVDRYDLYGSAVYPKQH QADDVPEFYRL  
 AAHSGGVFVNPALTEPFGLTILEAGSCGVPVATHDGGPQEILKH CDFGLVDVSRP  
 ANIATALATLLSDRD LWQCYHRNGIEKVP AHYSWDQHVNTL FERMETVALPRRRA  
 VSFVRSRKRLIDAKRLV VSDIDNTLLGDRQGLENLMTYLDQYRDHFAFGIATGRRLD  
 10 SAQEV LKEWGVPSPNFWWTSVGSEIHYGTDAEPDISWEKHINRNWNPQRIRAVMAQ  
 LPFLELQPEEDQTPFKVSFFVRDRHETVLRVQRHLRRHRLRLKSIYSHQEFLDILPLA  
 ASKGD AIRHLSLRWRIPLENILVAGDSGNDEEMLKGHN LGVVVGNYSPELEPLRSYE  
 RVYFAEGHYANGILEALKHYRFFEAIA

15 SEQ ID NO: 27-

ATGCGACAGTTATTGCTAATTTCTGACCTGGACAATACCTGGGTCGGAGATCAACAAG  
 CCCTGGAACATTTGCAAGAATATCTAGGCGATCGCCGGGGAAATTTTTATTT  
 GGCCTATGCCACGGGGCGTTCCTACCATTCCGCGAGGGAGTTGCAAAAACAGGT  
 GGGACTCATGGAACCGGACTATTGGCTCACCGCGGTGGGGAGTGAAATTTACCA  
 20 TCCAGAAGGCCTGGACCAACATTGGGCTGATTACCTCTCTGAGCATTGGCAACGG  
 GATATCCTCCAGGCGATCGCCGATGGTTTTGAGGCCTTAAAACCCCAATCTCCCT  
 TGGAACAAAACCCATGGAAAATTAGCTATCATCTCGATCCCCAGGCTTGCCCCAC  
 CGTCATCGACCAATTAACGGAGATGTTGAAGGAAACCGGCATCCCGGTGCAGGT  
 GATTTTCAGCAGTGGCAAAGATGTGGATTTATTGCCCAACGGAGTAACAAAGG  
 25 TAACGCCACCCAATATCTGCAACAACATTTAGCCATGGAGCCGTCTCAAACCCCTG  
 GTGTGTGGGGACTCCGGCAATGATATTGGCTTATTTGAAACTTCCGCTCGGGGTG  
 TCATTGTCCGTAATGCCAGCCGAATTATTGCACTGGTATGACCAATGGGGGGA  
 TTCTCGTCATTATCGGGCCCAATCGAGCCATGCTGGCGCTATCCTAGAGGCGATC  
 GCCCATTTGATTTTTTTGAGCTGA

30

SEQ ID NO: 28-

MRQLLLISDLN TWG DQQALEHLQEYLGDRRGNFY LAYATGRSYHSARELQKQVGLME  
 PDYWLTA VGSEIYHPEGLDQHWADYLSEHWQRDILQAIADGFEALKPQSPL  
 QNPWKISYHLDPQACPTVIDQLTEMLKETGIPVQVIFSSGKDVDLLPQRSNKGNATQ  
 35 YLQQHLAMEPSQTLVCGDSGNDIGLFETSARGVIVRNAQPELLHWYDQWGDSRHY  
 RAQSSHAGAILEAIAHFDFLS

SEQ ID NO: 29-

ATGAGTGATTCCACCGCCCAACTCAGCTACGACCCACACGAGCTACCTCGAGC  
CCAGTGGCTTGGTCTGTGAGGATGAACGGACTTCTGTGACTCCCGAGACCTTGAA  
5 ACGGGCTTACGAGGCCATCTCTACTACAGCCAGGGCAAACCTCAGCGATCGC  
CACCTGCGTGATCACTACATGGCACTGGCCTACATGGTCCGCGATCGCCTCCTG  
CAACGGTGGCTAGCTTCACTGTGACCTATCAACAACAGCACGTCAAAGTGGTCT  
GTTACCTGTCCGCTGAGTTTTTGTATGGGTGCGCACCTCGAAAACCTGCCTGATCAA  
CCTGCATCTTACGACCGCGTTCAGCAAGTTTTGGATGAACTGGGTCTCGATTTT  
10 GAGCAACTGCTAGAGAAAGAGGAAGAACCCGGGCTAGGCAACGGTGGCCTCGG  
TCGCCTCGCAGCTTGTTCCTCGACTCCATGGCTACCCTCGACATTCCTGCCGTCG  
GCTATGGCATTGCTATGAGTTCGGTATCTTCCACCAAGAACTCCACAACGGCTG  
GCAGATCGAAATCCCGATAACTGGCTGCGCTTTGGCAACCCTTGGGAGCTAGA  
GCGGCGCGAACAGGCCGTGGAAATTAAGTTGGGCGGCCACACGGAGGCCTACCA  
15 CGATGCGCGAGGCCGCTACTGCGTCTCTTGGATCCCGATCGCGTCATTCGCGCC  
ATCCCCTACGACACCCCGTACCGGGCTACGACACCAATAACGTCAGCATGTTGC  
GGCTCTGGAAGGCTGAGGGCACACGGAACCTCAACCTTGAGGCTTTCAACTCAG  
GCAACTACGACGATGCGGTTGCCGACAAAATGTCGTGCGAAACGATCTCGAAGG  
TGCTCTATCCCAACGACAACACCCCCAAGGGCGGGAACCTGCGGCTGGAGCAGC  
20 AGTATTTCTTCGTCTCGGCTTCGCTCCAAGACATCATCCGTCGCCACTTGATGAAC  
CACGGTCATCTTGAGCGGCTGCATGAGGCGATCGCAGTCCAGCTTAACGACACC  
CATCCAGCGTGGCGGTGCCGGAGTTGATGCGCCTCCTGATCGATGAGCATCACC  
TGACTTGGGACAATGCTTGGACGATTACACAGCGCACCTTCGCCTACACCAACCA  
CACGCTGCTACCTGAAGCCTTGGAACGCTGGCCCGTGGGCATGTTCCAGCGCACT  
25 TTACCGCGCTTGATGGAGATTATCTACGAAATCAACTGGCGCTTCTTGGCCAATG  
TGCGGGCCTGGTATCCCGGTGACGACACGAGAGCTCGCCGCCTCTCCCTGATTGA  
GGAAGGAGCTGAGCCCCAGGTGCGCATGGCTCACCTCGCCTGCGTGGGCAGTCA  
TGCCATCAACGGTGTGGCAGCCCTGCATACGCAACTGCTCAAGCAAGAAACCCT  
GCGAGATTTCTACGAGCTTTGGCCCCGAGAAATTCTTCAACATGACCAACGGTGTG  
30 ACGCCCCGCCGCTGGCTGCTGCAAAGTAATCCTCGCCTAGCCAACCTGATCAGCG  
ATCGCATTGGCAATGACTGGATTCATGATCTCAGGCAACTGCGACGGCTGGAAG  
ACAGCGTGAACGATCGCGAGTTTTTACAGCGCTGGGCAGAGGTCAAGCACCAAA  
ATAAGGTCGATCTGAGCCGCTACATCTACCAGCAGACTCGCATAGAAGTCGATC  
CGCACTCTCTTTGATGTGCAAGTCAAACGGATTACGAATACAAACGCCAGCT  
35 CCTCGCTGTCATGCATATCGTGACGCTCTACAACTGGCTGAAGCACAATCCCCAG  
CTCAACCTGGTGCCGCGCACTTTTATCTTTGCGGGCAAAGCGGCCCCGGGTTACT

ACCGTGCCAAGCAAATCGTCAAACCTGATCAATGCGGTTCGGGAGCATCATCAACC  
 ATGATCCCGATGTCCAAGGGCGACTGAAGGTCGTCTTCCTACCTAACTTCAACGT  
 TTCCTTGGGGCAGCGCATTATCCAGCTGCCGATTTGTTCGGAGCAAATCTCAACT  
 GCAGGGAAAGAAGCGTCCGGCACCGGCAACATGAAGTTCACCATGAATGGCGCG  
 5 CTGACAATCGGAACCTACGATGGTGCCAACATCGAGATCCGCGAGGAAGTCGGC  
 CCCGAAAACCTTCTTCCTGTTTGGCCTGCGAGCCGAAGATATCGCCCGACGCCAAA  
 GTCGGGGCTATCGACCTGTGGAGTTCTGGAGCAGCAATGCGGAACTGCGGGCAG  
 TCCTCGATCGCTTTAGCAGTGGTCACTTCACACCGGATCAGCCCAACCTCTTCCA  
 AGACTTGGTCAGCGATCTGCTGCAGCGGGATGAGTACATGTTGATGGCGGACTA  
 10 TCAGTCCTACATCGACTGCCAGCGCGAAGCTGCTGCTGCCTACCGCGATTCCGAT  
 CGCTGGTGGCGGATGTGCTACTCAACACCGCGAGATCGGGCAAGTTCTCCTCCG  
 ATCGCACGATCGCTGACTACAGCGAACAGATCTGGGAGGTCAAACCAGTCCCCG  
 TCAGCCTAAGCACTAGCTTTTAG

15 SEQ ID NO: 30 -

MSDSTAQLSYDPTTSYLEPSGLVCEDETSVTPETLKRAYEAHLYYSQGKTSIAIATLRDHY  
 MALAYMVRDRLLQRWLASLSTYQQQHVKVVCYLSAEFLMGRHLENCLINLHL  
 HDRVQQVLDELGLDFEQLLEKEEPEGLNGGLGRLAACFLDSMATLDIPAVGYGIR  
 YEFGIFHQELHNGWQIEIPDNWLRFGNPWELERREQAVEIKLGGHTEAYHDARGRY  
 20 CVSWIPDRVIRAIPYDTPVPGYDTNNVSMRLRLWKAEGTTELNLEAFNSGNYDDAVA  
 DKMSSETISKVLYPNDNTPQGRELRLEQQYFFVSASLQDIIRRHLMNHGHLERLHEAI  
 AVQLNDTHPSVAVPELMRLLIDEHHLTWDNAWTITQRTFAYTNHTLLPEALERWPV  
 GMFQRTLPRLMETIYEINWRFLANVRAWYPGDDTRARRLSLIEEGAEPQVRMAHLA  
 CVGSHAINGVAALHTQLLKQETLRDFYELWPEKFFNMTNGVTPRRWLLQSNPRLAN  
 25 LISDRIGNDWIHLRQLRRLLEDVNDREFLQRWAEVKHQNKVDLSRYIYQQTRIEVD  
 PHSLFDVQVKRIHEYKRQLLAVMHIVTLYNWLKHNPQLNLVPRTFIFAGKAAPGY  
 RAKQIVKLINAVGSIINHDPDVQGRLKVVFLPNFVSLGQRIYPAADLSEQISTAGKE  
 ASGTGNMKFTMNGALTIGTYDGANIEIREEVGPENFFLFGRLAEDIARRQSRGYRPVE  
 FWSSNAELRAVLDRFSSGHFTPDQPNLFQDLVSDLLQRDEYMLMADYQSYIDCQRE  
 30 AAAAYRDSRWWRMSLLNTARSGKFSSDRTIADYSEQUIWEVKPVPVSLSTSF

SEQ ID NO: 31-

ATGGCTGCCATTAATACGAAAGTCAAAAAGCCGTTATCCCCGTTGCGGGATTA  
 GGAACCAGGATGTTGCCGGCGACGAAAGCCATCCCGAAAGAGATGCTGCCACTT  
 35 GTCGATAAGCCATTAATTCAATACGTCGTGAATGAATGTATTGCGGCTGGCATT  
 CTGAAATTGTGCTGGTTACACACTCATCTAAAACTCTATTGAAAACCACTTTGA

TACCAGTTTTGAACTGGAAGCAATGCTGGAAAACGTGTAAAACGTCAACTGCT  
 GGTCTGGCGAAAGGCCTGGGACACGCGGTATTGTGTGCTCACCCGGTAGTGGGT  
 GATGAACCGGTAGCTGTTATTTGCCTGATGTTATTCTGGATGAATATGAATCCG  
 ATTTGTCACAGGATAACCTGGCAGAGATGATCCGCCGCTTTGATGAAACGGGTC  
 5 ATAGCCAGATCATGGTTGAACCGGTTGCTGATGTGACCGCATATGGCGTTGTGGA  
 TTGCAAAGGCGTTGAATTAGCGCCGGGTGAAAGCGTACCGATGGTTGGTGTGGT  
 AGAAAAACCGAAAGCGGATGTTGCGCCGTCTAATCTCGCTATTGTGGGTCGTTAC  
 GTACTTAGCGCGGATATTTGGCCGTTGCTGGCAAAAACCCCTCCGGGAGCTGGTG  
 ATGAAATTCAGCTCACCGACGCAATTGATATGCTGATCGAAAAAGAAACGGTGG  
 10 AAGCCTATCATATGAAAGGGAAGAGCCATGACTGCGGTAATAAATTAGGTTACA  
 TGCAGGCCTTCGTTGAATACGGTATTCGTCATAACACCCTTGGCACGGAATTTAA  
 AGCCTGGCTTGAAGAAGAGATGGGCATTAAGAAGTAA

SEQ ID NO: 32-

15 MAINTKVKKAVIPVAGLGRMLPATKAIPKEMLPLVDKPLIQYVVNECIAAGITEIV  
 LVTHSSKNSIENHFDTSELEAMLEKRVKRQLLDEVQSICPPHVTIMQVRQGLAKGL  
 GHAVLCAHPVVGDEPVAVILPDVILDEYESDLSQDNLAEMIRRFDETGHSQIMVEPV  
 ADVTAYGVVDCKGVELAPGESVPMVGVVEKPKADVAPSNLAIVGRYVLSADIWPL  
 LAKTPPGAGDEIQLTDAIDMLIEKETVEAYHMKGKSHDCGNKLGVMQAFVEYGIRH  
 20 NTLGTEFKAWLEEEMGIKK

SEQ ID NO: 33-

ATGAAATCCCCCAGGCTCAACAAATCCTAGACCAGGCCCGCCGTTTGCTCTACG  
 AAAAAGCCATGGTCAAATCAATGGGCAATACGTGGGGACGGTGGCGGCCATTC  
 25 CCCAATCGGATCACCATGATTTGAACTATACGGAAGTTTTTCATTCGGGACAATGT  
 GCCGGTGATGATCTTCTTGTACTGCAAAATGAAACGGAAATTGTCCAAAACCTT  
 TTGAAATTTGCCTCACCTCCAAAGTAAGGGCTTTCCACCTACGGCATTTTTCC  
 CACTAGTTTTGTGGAAACGGAAAACCATGAACTCAAGGCAGACTATGGCCAACG  
 GGCGATCGGTGAGTTTGCTCGGTGGATGCGTCCCTCTGGTGGCCTATTTTGGCC  
 30 TACTACTAGTGCAAAGAACCGGCAATGAAGCCTGGGCTAGACAAACCCATGTG  
 CAATTGGGGCTACAAAAGTTTTTAAACCTCATTCTCCATCCAGTCTTTTCGGGATG  
 CACCCACTTTGTTTGTGCCCGACGGGGCCTTTATGATTGACCGCCCCATGGATGT  
 GTGGGGAGCGCCGTTGGAAATCCAAACCCTGCTCTACGGAGCCCTGAAAAGTGC  
 GGCGGGGTTACTGTTAATCGACCTCAAGGCGAAGGGTTATTGCAGCAATAAAGA  
 35 CCATCCTTTTGACAGCTTCACGATGGAGCAGAGTCATCAATTTAACCTGAGTGTG

GATTGGCTCAAAAACTCCGCACCTATCTGCTCAAGCATTATTGGATTAATTGCA  
 ATATTGTCCAAGCTCTCCGCCGCGTCCCACGGAACAGTACGGTGAAGAAGCCA  
 GCAACGAACATAATGTCCACACAGAAACCATTCCCAACTGGCTCCAGGATTGGC  
 TCGGCGATCGGGGAGGCTATTTAATCGGCAATATCCGCACGGGTGCCCCGATTT  
 5 TCGCTTTTTCTCCCTGGGTAATTGCTTGGGGGCAATTTTCGATGTCACTAGCTTGG  
 CCCAGCAACGTTCTTTTTCCGTTTGGTATTAATAATCAGCGGGAGTTATGTGC  
 CCAAATGCCCTGAGGATTTGCCATCCCCCCTCAAAGATGACGATTGGCGCAGT  
 AAAACCGGCTTTGACCGCAAAAATTTACCCTGGTGCTACCACAACGCCGGCCATT  
 GGCCCTGTTTATTTGGTTTCTGGTGGTGGCGGTGCTCCGCCATAGCTGCCATTCC  
 10 AACTACGGCACGGTGGAGTATGCGGAAATGGGGAACCTAATTCGCAATAACTAT  
 GAGGTGCTTTTGCGCCGTTTGCCCAAGCATAAATGGGCTGAATATTTTGATGGCC  
 CCACGGGCTTTTGGGTGCGGCAACAATCCCGTTCCTACCAAACCTGGACCATTGT  
 GGGCCTATTGCTAGTACACCATTTACAGAAGTTAACCCCGACGATGCTTTGATG  
 TTCGATTTGCCTAGTTTGAAAAGTTTGCATCAAGCGCTGCATTAA

15

SEQ ID NO: 34-

MKSPQAQQILDQARRLLYEKAMVKINGQYVGTVAaipQSDHHDLNYTEVFIRDNVP  
 VMIFLLLQNETEIVQNfLEICLTLQSKGFPTYGIFPTSFVETENHELKADYGQRAIGRV  
 CSVDASLWWPILAYYYVQRTGNEAWARQTHVQLGLQKFLNLILHPVFRDAPTLFVP  
 20 DGAFMIDRPMDVWGAPLEIQTLlyGALKSAAGLLLIDLKAKGYCSNKDHPFDSFTM  
 EQSHQFNLSVDWLKKLRtyLLKHYWincNIVQALRRRPTEQYGEEASNEHNVHTETI  
 PNWLQDWLGDRGGYLIGNIRTGRPDFRFFSLGNCLGAIFDVTSLAQQRsFFRLVLNN  
 QRELCAQMPLRICHpPLKDDDWRSKTGFDRKNLPWCYHNAGHWPClFWFLVAVL  
 RHsCHSNYGTVEYAEMGNLIRNNYEVLLRRLPKHKWAEYFDGPTGFwVGQQSRsY  
 25 QTWTIVGLLLVHHFTEVNPDDALMFDLPSLkSLHQALH

SEQ ID NO: 35-

ATGAATTCATCCCTTGTGATCCTTTACCACCGTGAGCCCTACGACGAAGTTAGGG  
 AAAATGGCAAAACGGTGTATCGAGAGAAAAAGAGTCCCAACGGGATTTTGCCCA  
 30 CCCTCAAAGTTTTTTTGCCGATGCGGAACAGAGCACCTGGGTGCGATGGAAAC  
 AGGTTTCGCCGAAGCAAAGGATGATTTTCAGGCGGATATGTCCATTGAAGGCC  
 TTGGCGATCGTTGTACGGTGCGCCGGGTGCCCTGACGGCGGAGCAGGTAAAAA  
 ACTTCTATCACATCACTTCCAAGGAAGCCTTTTGGCCCATTCTCCACTCTTTCCCC  
 TGGCAGTTCACCTACGATTCTTCTGATTGGGATAATTTTCAGCACATTAACCGCTT  
 35 ATTTGCCGAGGCGGCCTGTGCCGATGCCGATGACAATGCATTGTTTTGGGTCCAC  
 GACTATAACCTCTGGTTAGCGCCCCTTTACATTCGTCAGCTCAAGCCCAACGCCA

AGATTGCCTTTTTCCACCACACCCCCTTCCCCAGCGTTGATATTTTCAATATTTTG  
 CCCTGGCGGGAGGCGATCGTAGAAAGCTTGCTGGCCTGTGATCTCTGTGGTTTTTC  
 ATATTCCCCGCTACGTAGAAAATTTTGTGCGCCGTGGCCCGTAGTCTCAAGCCGGT  
 GGAAATCACCAGACGGGTTGTGGTAGACCAAGCCTTTACCCCCTACGGTACGGC  
 5 CCTGGCGGAACCGGAACTCACCACCCAGTTGCGTTATGGCGATCGCCTCATTAAC  
 CTCGATGCGTTTTCCCGTGGGCACCAATCCGGCAAATATCCGGGCGATCGTGGCCA  
 AAGAAAGTGTGCAACAAAAAGTTGCTGAAATTAACAAGATTTAGGCGGTAAGA  
 GGCTAATTGTTTCCGCTGGGCGGGTGGATTACGTGAAGGGCACCAAGGAAATGT  
 TGATGTGCTATGAACGTCTACTGGAGCGTCGCCCCGAATTGCAGGGGGAAATTA  
 10 GCCTGGTAGTCCCCGTAGCCAAGGCCGCTGAGGGAATGCGTATTTATCGCAACG  
 CCCAAAACGAAATTGAACGACTGGCAGGGAAAATTAACGGTCGCTTTGCCAAC  
 TGTCTGGACACCAGTGATGCTGTTACCTCTCCTTTAGCCTATGAGGAGCTCATT  
 GCCCTGTTCTGTGCCGCCGACATTGCCTGGATCACTCCCCTGCGGGATGGGCTAA  
 ACCTGGTGGCTAAGGAGTATGTGGTGGCTAAAAATGGCGAAGAAGGAGTTCTGA  
 15 TCCTCTCGGAATTTGCCGGTTGTGCGGTGGAACCTACCCGATGCGGTGTTGACTAA  
 CCCCTACGCTTCCAGCCGTATGGACGAATCCATTGACCAGGCCCTGGCCATGGAC  
 AAAGACGAACAGAAAAACGCATGGGGAGAATGTACGCCGCCATTAAGCGTTA  
 CGACGTTCAACAATGGGCCAATCACCTACTGCGGGAAGCCTACGCCGATGTGGT  
 ACTGGGAGAGCCCCCCCCAAATGTAG  
 20

SEQ ID NO: 36 -

MNSSLVILYHREPYDEVRENGKTVYREKKSPNGILPTLKSFFADAEQSTWWAWKQV  
 SPKQKDDFQADMSIEGLGDRCTVRRVPLTAEQVKNFYHITSKEAFWPILHSFPWQFT  
 YDSSDWDNFQHINRLF AEACADADDNALFWHDYNLWLAPLYIRQLKPNAKIAFF  
 25 HHTPFPSVDIFNILPWREAIVESLLACDLCGFHIPRYVENFVAVARSLKPVEITRRVV  
 DQAFTPYGTALAEPELTTQLRYGDRLINLDAFPVGTNPANIRAIVAKESVQQKVAEIK  
 QDLGGKRLIVSAGRVDYVKGTKEMLMCYERLLERRPELQGEISLVVPVAKAAEGMR  
 IYRNAQNEIERLAGKINGRFAKLSWTPVMLFTSPLAYEELIALFCAADIAWITPLRDG  
 LNLVAKEYVVAKNGEELVILSEFAGCAVELPDAVLTPYASSRMDDESIDQALAMD  
 30 KDEQKKRMGRMYAAIKRYDVQQWANHLLREAYADVVLGEPQPM

SEQ ID NO: 37-

ATGAAGATTTTATTTGTGGCGGCGGAAGTATCCCCCTAGCAAAGGTAGGTGGCATG  
 GGGGATGTGGTGGGTTCCCTGCCTAAAGTTCTGCATCAGTTGGGCCATGATG  
 35 TCCGTGTCTTCATGCCCTACTACGGTTTCATCGGCGACAAGATTGATGTGCCCAA  
 GGAGCCGGTCTGGAAAGGGGAAGCCATGTTCCAGCAGTTTGCTGTTTACCAGTCC

TATCTACCGGACACCAAATTCCTCTCTACTTGTTTCGGCCATCCAGCTTTCGACTC  
 CCGAAGGATCTATGGCGGAGATGACGAGGCGTGGCGGTTCACTTTTTTTCTAAC  
 GGGGCAGCTGAATTTGCCTGGAACCATTGGAAGCCGGAAATTATCCATTGCCAT  
 GATTGGCACACTGGCATGATCCCTGTTTGGATGCATCAGTCCCCAGACATCGCCA  
 5 CCGTTTTACCATCCATAATCTTGCTTACCAAGGGCCCTGGCGGGGCTTGCTTGA  
 AACTATGACTTGGTGTCTTGGTACATGCAGGGAGACAATGTGATGGCGGCGGC  
 GATTCAATTTGCCAATCGGGTGACTACCGTTTCTCCACCTATGCCAACAGATC  
 CAAACCCCGGCCTATGGGGAAAAGCTGGAAGGGTTATTGTCCTACCTGAGTGGT  
 AATTTAGTCGGTATTCTCAACGGTATTGATACGGAGATTTACAACCCGGCGGAAG  
 10 ACCGCTTTATCAGCAATGTTTTCGATGCGGACAGTTTGGACAAGCGGGTGAAAA  
 ATAAAATTGCCATCCAGGAGGAAACGGGGTTAGAAATTAATCGTAATGCCATGG  
 TGGTGGGTATAGTGGCTCGCTTGGTGAACAAAAGGGGATTGATTTGGTATTCA  
 GATCCTTGACCGCTTCATGTCCTACACCGATTCCCAGTTAATTATCCTCGGCACTG  
 GCGATCGCCATTACGAAACCCAACTTTGGCAGATGGCTTCCCGATTTCTGGGCG  
 15 GATGGCGGTGCAATACTCCACAACGATGCCCTTTCCCGTCGAGTCTATGCCGGG  
 GCGGATGTGTTTTAATGCCTTCTCGCTTTGAGCCCTGTGGGCTGAGTCAATTGAT  
 GGCCATGCGTTATGGCTGTATCCCCATTGTGCGGCGGACAGGGGGTTTGGTGGAT  
 ACGGTATCCTTCTACGATCCTATCAATGAAGCCGGCACCGGCTATTGCTTTGACC  
 GTTATGAACCCCTGGATTGCTTTACGGCCATGGTGCGGGCCTGGGAGGGTTTCCG  
 20 TTTCAAGGCAGATTGGCAAAAATTACAGCAACGGGCCATGCGGGCAGACTTTAG  
 TTGGTACCGTTCCGCCGGGGAATATATCAAAGTTTATAAGGGCGTGGTGGGGAA  
 ACCGGAGGAATTAAGCCCCATGGAAGAGGAAAAAATCGCTGAGTTAACTGCTTC  
 CTATCGCTAA

25 SEQ ID NO: 38 -  
 MKILFVAAEVSPLAKVGGMGDVVGS LPKVLHQLGHDVRVFM PYYGFIGDKIDVPKE  
 PVWKGEAMFQQFAVYQSYLPDTKIPLYLFGHPAFDSRRIYGGDDEAWRFTFFSNGA  
 AEFawnHWKPEIIHCHDWHTGMIPVWMHQSPDIATVFTIHNLAYQGPWRGLLETMT  
 WCPWYMQGDNVMAAAIQFANRVTTVSPTYAQQIQTPAYGEKLEGLLSYLSGNLVGI  
 30 LNGIDTEIYNPAEDRFISNVFDADSLDKRVKNKIAIQEETGLEINRNAMVVGIVARLV  
 EQKGIDLVIQILDRFMSYTDSQLIILGTGDRHYETQLWQMASRFPGRMAVQLLHND  
 LSRRVYAGADVFLMPSRFEPCLSQLMAMRYGCIPVRRRTGGLVDTVSYDPINEAG  
 TGYCFDRYEPLDCFTAMVRAWEGFRFKADWQKLQQRAMRADFSWYRSAGEYIKV  
 YKGVVGKPEELSPMEEEKIAELTASYR

35

SEQ ID NO: 39 -



TGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGC  
AACTCGTAGGACAGGTGGTACCTACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA  
GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC  
CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAT  
5 CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCG  
TTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGG  
ATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT  
GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA  
ACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC  
10 AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT  
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC  
TACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTA  
CCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTA  
GCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCA  
15 AGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCA  
CGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTGCTAGCGAA  
GATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTT  
AAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAA  
GGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAA  
20 TTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGG  
CAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTG  
TTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCA  
GACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCG  
TACTCCTGATGATGCATGGTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTC  
25 CAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAG  
TGTTCTGCGCCGGTTGCATTGATTCTGTTTGTAAATTGCCTTTTAAACAGCGAT  
CGCGTATTTGCTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATG  
CGAGTGATTTTGTGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAG  
AAATGCATAAACTTTTGCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTT  
30 TCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGTTGTATTGATGTTG  
GACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCC  
TCGGTGAGTTTTCTCCTTATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTATTGAT  
AATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGA  
ATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGG  
35 GGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATT  
TTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGC

CGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAG  
TGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTC  
AAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCC  
TAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAA  
5 GGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAA  
GGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGG  
TCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCG  
CGTCCCATTGCCAATCCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAG  
ACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAG  
10 CCAACTCAGCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTG  
GTGGTGTCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCATTAATGATGATGGTGGTGGTGGCTG  
CCGGTGCACGGGTGTCGCTGTATTTCTTCAGGTCTTCCAGGTGCGCCAGACGGT  
TTTCTTTGTTAATACGTTGGGTGGTGATACGATCCGGATAGCAACGCATAAACAT  
GTTGGTGAAGTGCTCGCCGTAGTGGATACGTTTCGTTTCGCGCTCGGCTCGAACAGC  
15 GGATACGCGCTCGCTTGAAGTTCGGCTCGTGAAAGTACGCGCACGCGAAACGT  
TCACGGGTGTTTACGTTTAACTTGTGCGGGGTGCTCAGCAGTTGGCCACCGGTCA  
TGAAGTGCAGAATATCGCCCGGAAAAACGGTCCACACACCCGGGGTTCGGGGTAA  
CGAAGGTCCACGGTTCGTCGTGCTCAAACATGCCCGCGCTGCTCTCGCCCGGCAG  
CCAGTTACGTTACGCTTTTTCGCCCTCCACCGGCGGACGGATATACAGGCCACCA  
20 ACATCGTCTTGCGCCGCAATCACCAGCAGACCGTAGTCGGTGTGCGCACCAATAC  
CACGGCTCAGGGTGTGGTCTGCGGGCGGAAACGCAGCACACGCATGTGGTGCC  
AGCCATCACGGGTCAGGTCGGTGAAGGTGTTGATCGGCAGTTCAAACCCAGCG  
CGGTCAGTTTCAGCAGACGCTCGCCCGCAGACCCAGTTCCTCCATAAAGGTTTT  
CATGCTCTTTTGATAGGTGTTGTTTCGGCCACGGAACCGGACCATGGCACGGCCAA  
25 CCCGCTTTAACACGCTGATCGCCACGCTCAGGTCCTTGCACACGGTAAAAATTT  
CCGGGAAATCCGGCTTGCCCGCGGTAACCTCCTCGCCGCTCGCCACATAACCGCT  
GTAGGTCAGGTCGCTAACGCAGCTGCTTTTGAAGGTCAGCGGCTCTTTGCAAAAT  
TGCTTGCTCGCCGCCATCGCTTCTTGGGTCTTACGATCCTGCTCGCTGTCGGTTTT  
AATCTGGAAGATACCATCCTTTTGCACGCCTGAATCAGCGCACGACCCAGGCTG  
30 ATGTCCGCCGCGCAACCGGTCACCTTCGGTCGGCAGTTCAAAGGTCTGCAGGTTGG  
TCATGCTGGTTTTCTCCTTTGTCCATGTACAGGCTCGGATGCTCATTCCACACAACG  
TCCGGGCTGCATAACCCTAGTGAGGGAAATACTCCCATCTACTTGGAGCGTGTA  
TCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGT  
TATCCGCTCACAATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGCGGGATCGAGATC  
35 GATCTCGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGT  
GCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGC

CACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCCCGTGG  
 CCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCCCTTGCGGCGGCGGT  
 GCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAG  
 GGAGAGCGTCGAGATCCCGGACACCATCGAATGGCGCAAACCTTTCGCGGTAT  
 5 GGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCACT  
 AACGTTATACGATGTGCGAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGC  
 GTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCG  
 GCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGC  
 AAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGT  
 10 CGCAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGT  
 GGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAA  
 TCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAG  
 GATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGCGTATTCTTCTGATGT  
 CTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGA  
 15 CTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATTGGGTCACCAGCAAATCGCGCTGTTAGCG  
 GGCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATC  
 TCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCA  
 TGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGC  
 GATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGA  
 20 GTCCGGGCTGCGCGTTGGTTCGCGGACATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGA  
 AGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTG  
 CTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTG  
 AAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCG  
 CCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGG  
 25 CACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTA  
 AGTTAGCTCACTCATTAGGCACCGGGATCTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCA  
 ACCCAGTCAGCTCCTTCCGG

SEQ ID NO: 40-

30 ATTTAGCGTCTTCTAATCCAGTGTAGACAGTAGTTTTGGCTCCGTTGAGCACTGTAGC  
 CTTGGGCGATCGCTCTAACATTACATAAATTCACAAAGTTTTTCGTTACATAA  
 AAATAGTGTCTACTTAGCTAAAAATTAAGGGTTTTTTACACCTTTTTTGACAGTTAA  
 TCTCCTAGCCTAAAAAGCAAGAGTTTTTA ACTAAGACTCTTGCCCTTTACAACCT  
 CGAAGGAGCGTCAGATCTCATATGCACCACCACCATCACCACGAAAACCTGTAC  
 35 TTTAGGGCAAGCTTATGATTCATGCCCCCTCCCGCTGGGGCGTGTTCAGTCT  
 GGGTCTCTGCTCCCCGATGTGGTGTGGAACGAACCCCCAGCCTGTACATGGAT

AAGGAAGAGACCAGTATGACCAATCTGCAAACCTTTGAACTGCCACCGAGGTG  
ACCGGTTGCGCCGCCGATATTAGCCTCGGTGCGCCCTGATTCAAGCCTGGCAAA  
AGGATGGCATCTTCCAAATCAAGACCGATTCCGAACAAGATCGCAAGACCCAAG  
AGGCCATGGCCGCCAGCAAACAATTTTGCAAGGAACCCCTGACCTTTAAATCCA  
5 GCTGCGTGAGCGATCTCACCTACAGTGGCTATGTGGCCAGTGGTGAAGAGGTGA  
CCGCCGGCAAGCCCGATTTTCCCGAGATTTTACCCTGTGCAAGGATCTGAGTGT  
GGGTGATCAACGCGTGAAAGCCGGTTGGCCCTGCCATGGTCCCGTGCCCTGGCCC  
AACAAATACCTATCAAAAATCCATGAAGACCTTTATGGAAGAACTCGGTCTGGCC  
GGTGAACGCCTGCTCAAACCTGACCGCCCTCGGCTTTGAGCTGCCATTAACACCT  
10 TTACCGATCTCACCCGCGATGGTTGGCACCACATGCGCGTGCTGCGCTTTCCTCC  
CCAAACCAGCACCCCTGAGCCGCGGTATTGGTGCCACACCGATTACGGCCTGCTC  
GTGATTGCCGCCAAGATGATGTGGGCGGTCTGTATATTCGCCCTCCCGTGGAAG  
GCGAGAAACGCAACCGCAATTGGCTCCCCGGCGAAAGTTCCGCCGGCATGTTTG  
AACACGATGAACCCTGGACCTTTGTGACGCCACGCCCGGCGTGTGGACCGTGTT  
15 TCCCGGTGATATTCTGCAATTTATGACCGGCGGTCAACTGCTCTCCACGCCCCAC  
AAAGTGAAGCTCAACACCCGCGAACGCTTTGCCTGCGCCTACTTTCACGAACCCA  
ATTTTGAGGCCAGTGCCTATCCCCTGTTTGAACCCTCCGCCAACGAGCGCATTCA  
CTACGGCGAGCACTTTACCAATATGTTTATGCGCTGCTATCCCGATCGCATTACC  
ACCCAACGCATTAACAAGGAAAATCGCCTGGCCACCTCGAGGATCTGAAAAAG  
20 TATAGTGATAACCCGCGCCACCGGTAGTGGTGCCACCAACTTAGCCTGCTCAAAC  
AAGCCGGCGATGTGGAAGAGAACCCCGGTCCCATGACCGAAAGTATTACCAGCA  
ATGGCACCCCTGGTGGCCAGTGATACCCGTGCGCCGCGTGTGGGCCATTGTGAGTGC  
CAGCAGTGGTAACCTGGTGGAGTGGTTTGATTTTACGTGTATAGCTTTTGCAGT  
CTCTACTTTGCCACATTTTCTTTCCAGTGGCAATACCACCACCCAACCTGCTGCA  
25 AACCGCCGGCGTGTGGCCGCGGTTTCTGATGCGCCCCATTGGCGGTTGGCTC  
TTTGGCCGCATTGCCGATCGTCGCGGTGCGAAGACCAGCATGCTGATTAGCGTGT  
GCATGATGTGCTTTGGCTCCCTGATTATTGCCTGCCTCCCCGGCTATGATGCCATT  
GGCACCTGGGCCCCCGCCCTGCTCCTGCTGGCCCGCCTCTTTCAAGGCCTGAGCG  
TGGGCGGTGAATACGGCACCCAGCGCCACCTATATGAGTGAAATTGCCCTGGAGG  
30 GCCGCAAAGGTTTTTACGCCAGTTTTCAATATGTGACCCTGATTGGCGGTCAACT  
GCTCGCCATTCTCGTGGTGGTATTCTCCAACAATTCTGACCGATTCCCAACTG  
CACGAATGGGGCTGGCGCATTCCCTTTGCCATGGGTGCCGCCCTGGCCATTGTGG  
CCCTGTGGCTCCGTGCGCAACTCGATGAAACCAGCCAAAAAGAGGTGCGCGCCC  
TGAAAGAAGCCGGCAGTTTTAAAGGTCTCTGGCGCAACCGCAAGGCCTTTCTCAT  
35 GGTGCTGGGCTTTACCGCCGGCGGTAGTCTGTCTTTTACACCTTTACCACCTACA  
TGCAAAAATATCTCGTGAACACCACCGGCATGCACGCCAATGTGGCCAGCGTGA

TTATGACCGCCGCCCTGTTTGTGTTTATGCTCATTCAACCCCTGATTGGCGCCCTC  
AGCGATAAGATTGGTCGTCGCACCAGTATGCTGATTTTTGGCGGTATGAGTGCCC  
TCTGCACCGTGCCCATTCTCACCGCCCTGCAACACGTGTCCAGCCCCCTACGCCGC  
CTTTGCCCTCGTGATGCTGGCCATGGTGATTGTGTCCTTTTATACCAGCATTAGTG  
5 GCATTCTGAAGGCCGAAATGTTTCCCGCCCAAGTGCGCGCCCTGGGCGTGGGTCT  
CAGTTACGCCGTGGCCAATGCCCTGTTTGGCGGTTCCGCCGAATATGTGGCCCTG  
TCCCTCAAAGCTGGGGCAGTGAGACCACCTTTTTCTGGTACGTGACCATTATGG  
GTGCCCTGGCCTTTATTGTGAGCCTGATGCTCCACCGCAAAGGCAAGGGTATTCCG  
CCTCTAGGGTACCAGGCAAACCCATCCCCAACCCCTGCTGGGCCTGGATAGCAC  
10 CGGTGGTGGTCACCACCACCATCACCCTAGAGTACTGTATGCATCGAGTGCCTG  
GCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAAGTCAAAGTAAAC  
GCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCC  
AGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTT

15 SEQ IDNO: 41-

ATTTAGCGTCTTCTAATCCAGTGTAGACAGTAGTTTTGGCTCCGTTGAGCACTGTAGC  
CTTGGGCGATCGCTCTAAACATTACATAAATTCACAAAGTTTTTCGTTACATAA  
AAATAGTGTCTACTTAGCTAAAAATTAAGGGTTTTTTACACCTTTTTGACAGTTAA  
TCTCCTAGCCTAAAAAGCAAGAGTTTTTAATAAGACTCTTGCCCTTTACAACCT  
20 C

SEQ IDNO: 42-

TGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAAGTCAAAG  
TGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGA  
25 ACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTT

SEQ IDNO: 43 -

GAGGTTGTAAAGGGCAAGAGTCTTAGTTAAAACTCTTGCTTTTTAGGCTAGGAGATTA  
ACTGTCAAAAAGGTGTAAAAACCCCTTAATTTTTAGCTAAGTAGACACTAT  
30 TTTTATGTAACGAAAACCTTTGTGAATTTATGTAATGTTTAGAGCGATCGCCCAAG  
GCTACAGTGCTCAACGGAGCCAAAACCTACTGTCTACACTGGATTAGAAGACGCT  
AAATGGTACCTACGATCTCATATGATACACGCTCCAAGTAGATGGGGAGTATTC  
CCTCACTAGGGTTATGCAGCCCGGACGTTGTGTGGAATGAGCATCCGAGCCTGTA  
CATGGACAAAGAGGAAACCAGCATGACCAACCTGCAGACCTTTGAACTGCCGAC  
35 CGAAGTGACCGGTTGCGCGGCGGACATCAGCCTGGGTCTGCGCTGATTCAGGC  
GTGGCAAAGGATGGTATCTTCCAGATTAACCGACAGCGAGCAGGATCGTAA

GACCCAAGAAGCGATGGCGGCGAGCAAGCAATTTTGCAAAGAGCCGCTGACCTT  
 CAAAAGCAGCTGCGTTAGCGACCTGACCTACAGCGGTTATGTGGCGAGCGGCGA  
 GGAAGTTACCGCGGGCAAGCCGATTTCCCGGAAATTTTTACCGTGTGCAAGGA  
 CCTGAGCGTGGGCGATCAGCGTGTTAAAGCGGGTTGGCCGTGCCATGGTCCGGTT  
 5 CCGTGGCCGAACAACACCTATCAAAGAGCATGAAAACCTTTATGGAGGAACTG  
 GGTCTGGCGGGCGAGCGTCTGCTGAAACTGACCGCGCTGGGTTTTGAACTGCCG  
 ATCAACACCTTCACCGACCTGACCCGTGATGGCTGGCACCACATGCGTGTGCTGC  
 GTTTCCCGCCGACAGACCAGCACCCCTGAGCCGTGGTATTGGTGCGCACACCGACTA  
 CGGTCTGCTGGTGATTGCGGGCGCAAGACGATGTTGGTGGCCTGTATATCCGTCCG  
 10 CCGGTGGAGGGCGAAAAGCGTAACCGTAACTGGCTGCCGGGCGAGAGCAGCGC  
 GGGCATGTTTGAGCACGACGAACCGTGGACCTTCGTTACCCCGACCCCGGGTGTG  
 TGGACCGTTTTTCCGGGCGATATTCTGCAGTTCATGACCGGTGGCCAACTGCTGA  
 GCACCCCGCACAAAGGTTAAACTGAACACCCGTGAACGTTTCGCGTGCGCGTACTT  
 TCACGAGCCGAACTTCGAAGCGAGCGCGTATCCGCTGTTTCGAGCCGAGCGCGAA  
 15 CGAACGTATCCACTACGGCGAGCACTTCACCAACATGTTTATGCGTTGCTATCCG  
 GATCGTATCACCACCCAACGTATTAACAAAGAAAACCGTCTGGCGCACCTGGAA  
 GACCTGAAGAAATACAGCGACACCCGTGCGACCCGGCAGCCACCACCACCATCAT  
 CATTAAATGAAAGCTTGCGGGCCGACTCGAGCACCCACCACCACCACCTGAGAT  
 CCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAG  
 20 CAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

SEQ ID NO: 44-

CAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAG

25 SEQ ID NO: 45-  
 GAGCGTGTATCATATGAGATCTGACGCTCCTTCGAGGTTGTAAAGGGCAAGAGT  
 CTTAGTTAAAACTCTTGCTTTTTAGGCTAGGAGATTAAGTGTAAAAAGGTGTA  
 AAAAACCTTAATTTTTAGCTAAGTAGACACTATTTTTATGTAACGAAAACCTTG  
 TGAATTTATGTAATGTTTAGAGCGATCGCCCAAGGCTACAGTGCTCAACGGAGCC  
 30 AAAACTACTGTCTACACTGGATTAGAAGACGCTAAATGGTACCTACGATCTCATA  
 TGATACACGCTCCAAGTAGATGGGGAGTATTTCCCTCACTAGGGTTATGCAGCCC  
 GGACGTTGTGTGGAATGAGCATCCGAGCCTGTACATGGACAAAGAGGAAACCAG  
 CATGACCAACCTGCAGACCTTTGAACTGCCGACCGAAGTGACCGGTTGCGCGGC  
 GGACATCAGCCTGGGTGCTGCGCTGATTCAGGCGTGGCAAAGGATGGTATCTT  
 35 CCAGATTAACCGACAGCGAGCAGGATCGTAAGACCCAAGAAGCGATGGCGG

CGAGCAAGCAATTTTGC AAAGAGCCGCTGACCTTCAA AAGCAGCTGCGTTAGCG  
ACCTGACCTACAGCGGTTATGTGGCGAGCGGCGAGGAAGTTACCGCGGGCAAGC  
CGGATTTCCCGGAAATTTTACCGTGTGCAAGGACCTGAGCGTGGGCGATCAGCG  
TGTTAAAGCGGGTTGGCCGTGCCATGGTCCGGTCCGTGGCCGAACAACACCTAT  
5 CAAAAGAGCATGAAAACCTTTATGGAGGAACTGGGTCTGGCGGGCGAGCGTCTG  
CTGAAACTGACCGCGCTGGGTTTTGAACTGCCGATCAACACCTTCACCGACCTGA  
CCCGTGATGGCTGGCACCACATGCGTGTGCTGCGTTTCCCGCCGCAGACCAGCAC  
CCTGAGCCGTGGTATTGGTGCGCACACCGACTACGGTCTGCTGGTGATTGCGGCG  
CAAGACGATGTTGGTGGCCTGTATATCCGTCCGCCGGTGGAGGGCGAAAAGCGT  
10 AACCGTAACTGGCTGCCGGGCGAGAGCAGCGCGGGCATGTTTGAGCACGACGAA  
CCGTGGACCTTCGTTACCCCGACCCCGGGTGTGTGGACCGTTTTTCCGGGCGATA  
TTCTGCAGTTCATGACCGGTGGCCAACTGCTGAGCACCCCGCACAAGGTTAACT  
GAACACCCGTGAACGTTTCGCGTGC GCGTACTTTCACGAGCCGA ACTTCGAAGCG  
AGCGCGTATCCGCTGTTGAGCCGAGCGCGAACGAACGTATCCACTACGGCGAG  
15 CACTTCACCAACATGTTTATGCGTTGCTATCCGGATCGTATCACCACCCAACGTA  
TTAACAAAGAAAACCGTCTGGCGCACCTGGAAGACCTGAAGAAATACAGCGACA  
CCCGTGCGACCGGCAGCCACCACCACCATCATCATTAAATGAAAGCTTGCGGCCG  
CACTCGAGCACCAACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAA  
AGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTG  
20 GGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGG  
ATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTG  
GTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCG  
CTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAAT  
CGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAA  
25 AACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTT  
TCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTG  
GAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCG  
ATTTGCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATT  
TTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTT CAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCG  
30 CGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA  
ATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATAT  
CAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAA  
CTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCG  
ACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTAT  
35 CAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTT  
TATGCATTTCTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAA

ATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGA  
AATACGCGATCGCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGG  
CGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTT  
CTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATC  
5 ATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTGAG  
CCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCAT  
GTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTCGC  
ACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCC  
ATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCA  
10 TAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATTGTTTCATGACCAA  
AATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATC  
AAAGGATCTTCGCTAGCAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATC  
CCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG  
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAA  
15 CCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC  
CGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTA  
GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT  
CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG  
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGG  
20 GGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGAT  
ACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG  
ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT  
CCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGAC  
TTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG  
25 CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATG  
TTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTAGGTACCATTTAGCGTC



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный микроорганизм, обладающий улучшенной способностью продуцировать этилен, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок фермент, образующий этилен (EFE), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE,

при этом количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

2. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок альфа-кетоглутаратпермеазу (AKGP), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP,

при этом количество белка AKGP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка AKGP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP.

3. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, в котором количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 5% до примерно 200% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

4. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, где рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

5. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в бактериальную векторную

плазмиду, бактериальную векторную плазмиду с большим числом копий, бактериальную векторную плазмиду, имеющую индуцибельный промотор, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию.

6. Рекомбинантный микроорганизм по п. 2, в котором ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную векторную плазмиду, бактериальную векторную плазмиду с большим числом копий, бактериальную векторную плазмиду, имеющую индуцибельный промотор, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию.

7. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, в котором ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 3, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas sp.*

8. Рекомбинантный микроорганизм по п. 2, в котором ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 4, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в векторную плазмиду бактерии *Escherichia sp.*

9. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, дополнительно содержащий ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую AKGP, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.*

10. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, дополнительно содержащий ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую AKGP, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 6, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.*

11. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок -фосфоенолпируватсинтазу (PEP), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 15, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP,

при этом количество белка PEP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка PEP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, и

где количество AKG, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество AKG, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

12. Рекомбинантный микроорганизм по п. 11, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – цитратсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 17, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу, при этом количество белка цитратсинтазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка цитратсинтазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу.

13. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – изоцитратдегидрогеназу (IDH), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 20, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH,

при этом количество белка IDH, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка IDH, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH, и

где количество AKG, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество AKG, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

14. Рекombинантный микроорганизм по п. 13, где рекombинантный микроорганизм содержит делецию в нуклеотидной последовательности, экспрессирующей глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазу, при этом количество белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого рекombинантным микроорганизмом, меньше, чем количество белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим делеции.

15. Рекombинантный микроорганизм по п. 11, где рекombинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

16. Рекombинантный микроорганизм по п. 1, где рекombинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – сахарозопермеазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 24, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу,

при этом количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого рекombинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу.

17. Рекombинантный микроорганизм по п. 1, где рекombинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из белка – сахарозофосфатсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO. 26, белка сахарозо-6-фосфатазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 28, белка гликогенфосфорилазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 30, и белка UTP-глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 32, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один белок,

где количество по меньшей мере одного белка, продуцируемого рекombинантным микроорганизмом, больше, чем количество по меньшей мере одного белка,

продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один белок,

где количество сахарозы, продуцируемой рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество сахарозы, продуцируемой контрольным микроорганизмом.

18. Рекомбинантный микроорганизм по п. 17, где рекомбинантный микроорганизм содержит по меньшей мере одну делецию в по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, где по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность кодирует по меньшей мере один белок, выбранный из белка инвертазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 34, белка – глюкозилглицеринфосфатсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 36, и белка гликогенсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 38, где количество по меньшей мере одного белка, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, меньше, чем количество по меньшей мере одного белка, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим по меньшей мере одной делеции.

19. Способ получения рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен, включающий:

получение рекомбинантного микроорганизма посредством вставки ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, или ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, объединенной с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, в бактериальную плазмиду микроорганизма,

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4, или

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6; или

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7.

20. Способ по п. 19, в котором микроорганизм выбран из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

21. Способ по п. 19, в котором ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3, и микроорганизм представляет собой бактерию *Chlamydomonas* sp; или

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4, и микроорганизм представляет собой бактерию *Escherichia* sp; или

ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6, и микроорганизм представляет собой бактерию *Synechococcus* sp; или

ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7, и микроорганизм представляет собой бактерию *Synechococcus* sp.

22. Способ получения этилена, включающий:

предоставление рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – фермент, образующий этилен (EFE), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE,

при этом количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE;

культивирование рекомбинантного микроорганизма в сосуде биореактора для культивирования в условиях, достаточных для получения этилена в сосуде биореактора для культивирования; и

сбор этилена из сосуда биореактора для культивирования.

23. Способ по п. 22, в котором рекомбинантный микроорганизм содержит ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, или ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, объединенную с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, вставленную в бактериальную плазмиду микроорганизма,

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4, или

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7; или

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6.

24. Способ по п. 22, в котором микроорганизм выбран из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

25. Способ по п. 22, дополнительно включающий увеличение количества продукции этилена посредством добавления по меньшей мере одного активатора к культуре, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенной в сосуде биореактора для культивирования; или добавление CO<sub>2</sub> к атмосфере культуры, содержащейся в сосуде биореактора для культивирования, со скоростью от примерно 100 мл/минута до примерно 500 мл/минута.

26. Способ по п. 22, дополнительно включающий уменьшение количества продукции этилена посредством удаления по меньшей мере одного молекулярного переключателя из клеточной культуры, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенной в сосуде биореактора для культивирования.

27. Способ по п. 22, дополнительно включающий осуществление контроля над количеством этилена, продуцируемым из микробной культуры, посредством увеличения или уменьшения концентрации по меньшей мере одного питательного вещества или количества по меньшей мере одного стимула при культивировании рекомбинантного микроорганизма.

28. Способ по п. 22, в котором концентрация по меньшей мере одного питательного вещества и количество по меньшей мере одного стимула находятся в соотношении от примерно 0,5-1,5 гр./литр до примерно 0,1 мМ в микробной культуре.

29. Способ по п. 22, дополнительно включающий удаление продуцируемого количества этилена из микробной культуры посредством конденсации этилена из газового в жидкое состояние, или когда количество выделенного этилена составляет от примерно 0,5 мл до примерно 10 мл/литр/ч.

30. Рекомбинантный микроорганизм, обладающий улучшенной способностью продуцировать альфа-кетоглутарат (AKG),

где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок фосфоенолпируватсинтазу (PEP), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 15, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, и

при этом количество белка PEP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка PEP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP; или

где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – изоцитратдегидрогеназу (IDH), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 20, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH, и

при этом количество белка IDH, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка IDH, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH;

где количество АКГ, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество АКГ, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

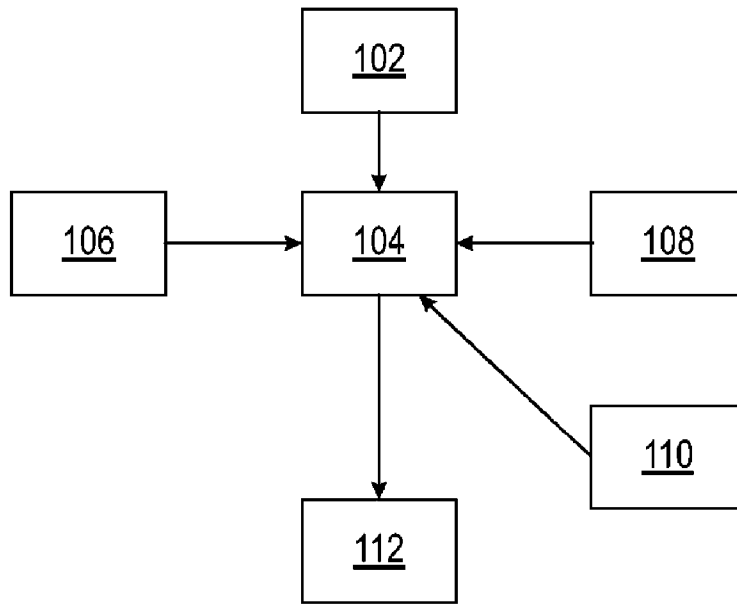
31. Рекомбинантный микроорганизм по п. 30, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – цитратсинтазу, имеющий аминокислотную



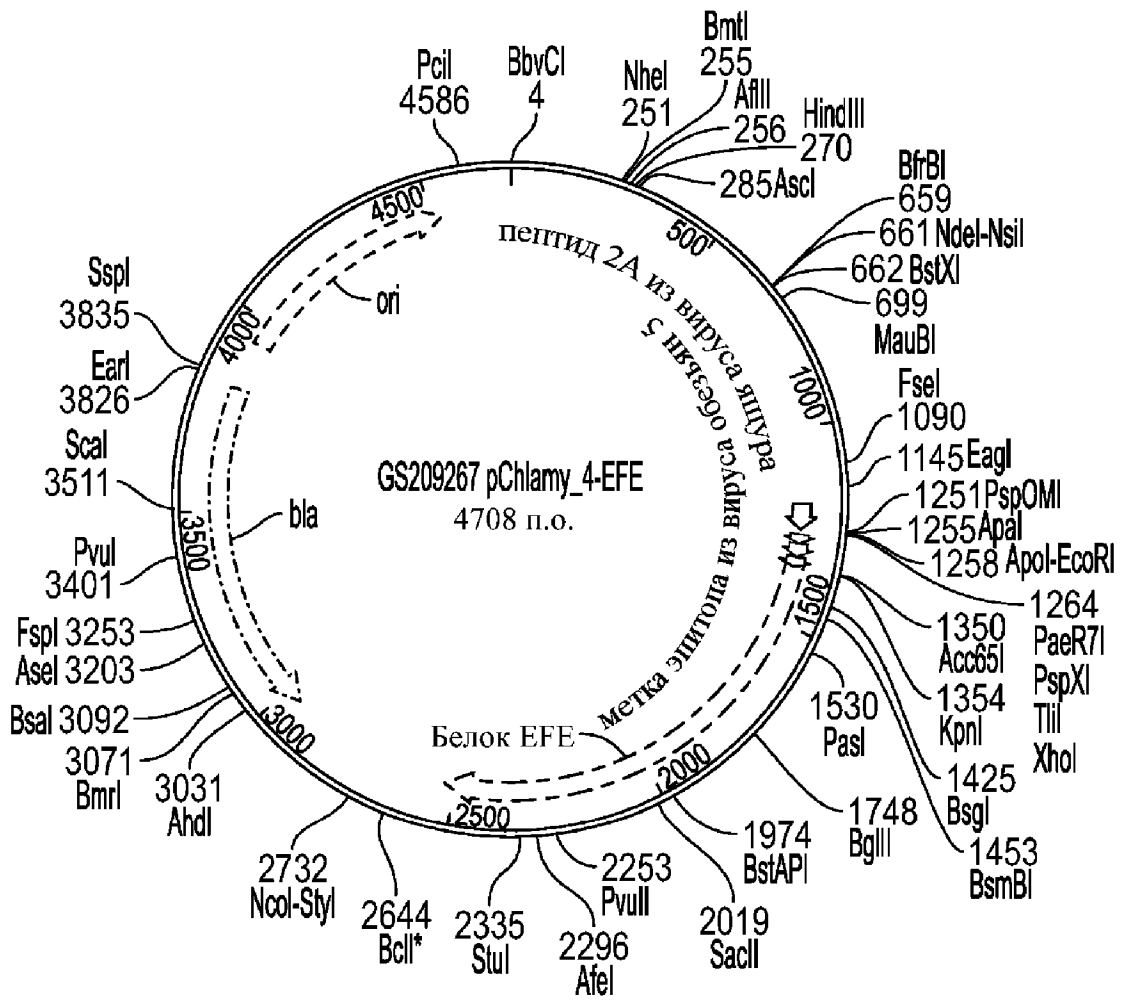
последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 17, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу, при этом количество белка цитратсинтазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка цитратсинтазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу.

32. Рекомбинантный микроорганизм по п. 30, где рекомбинантный микроорганизм содержит делецию в нуклеотидной последовательности, экспрессирующей глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазу, при этом количество белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, меньше, чем количество белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим делеции.

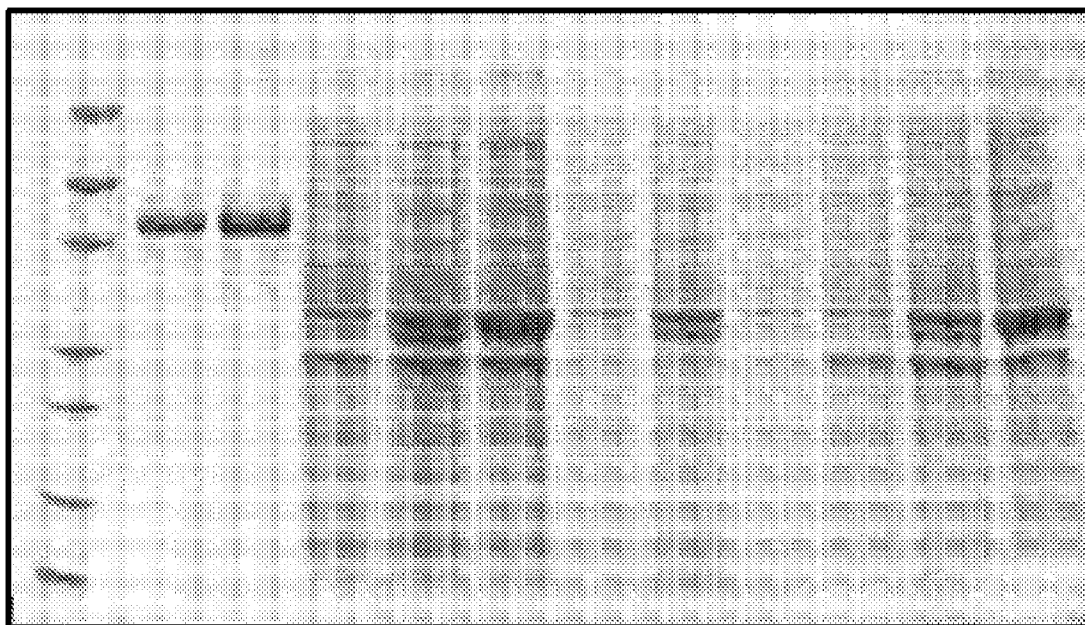
33. Рекомбинантный микроорганизм по п. 30, где рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.



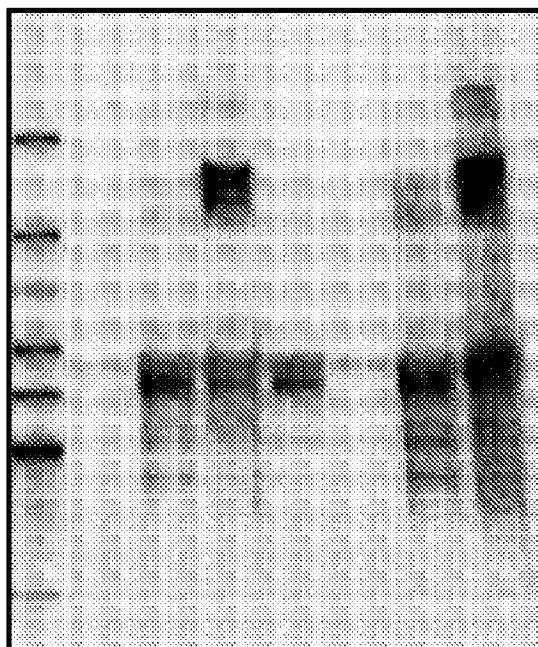
ФИГ. 1



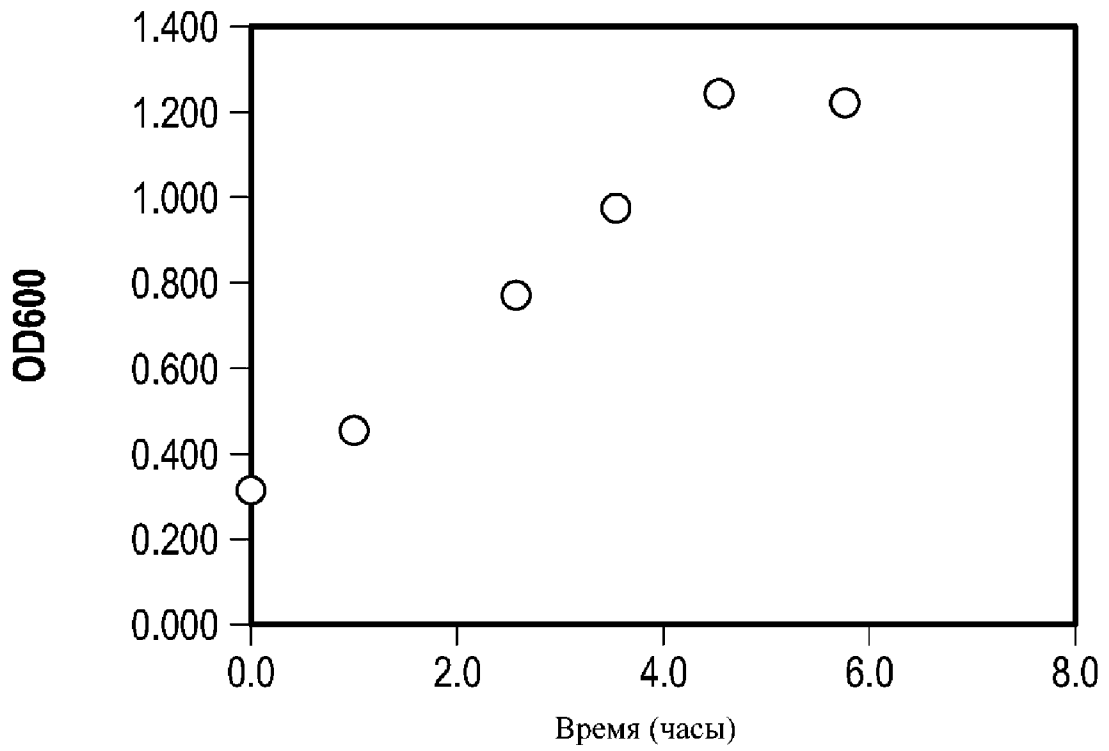
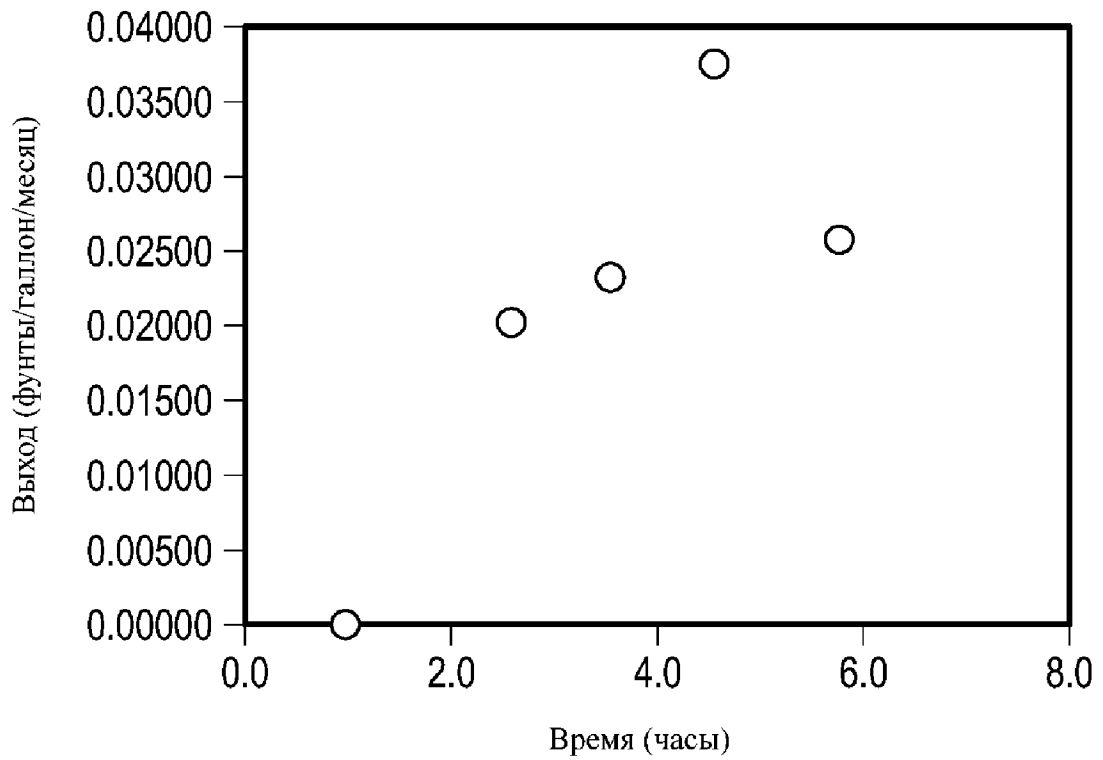
ФИГ. 2

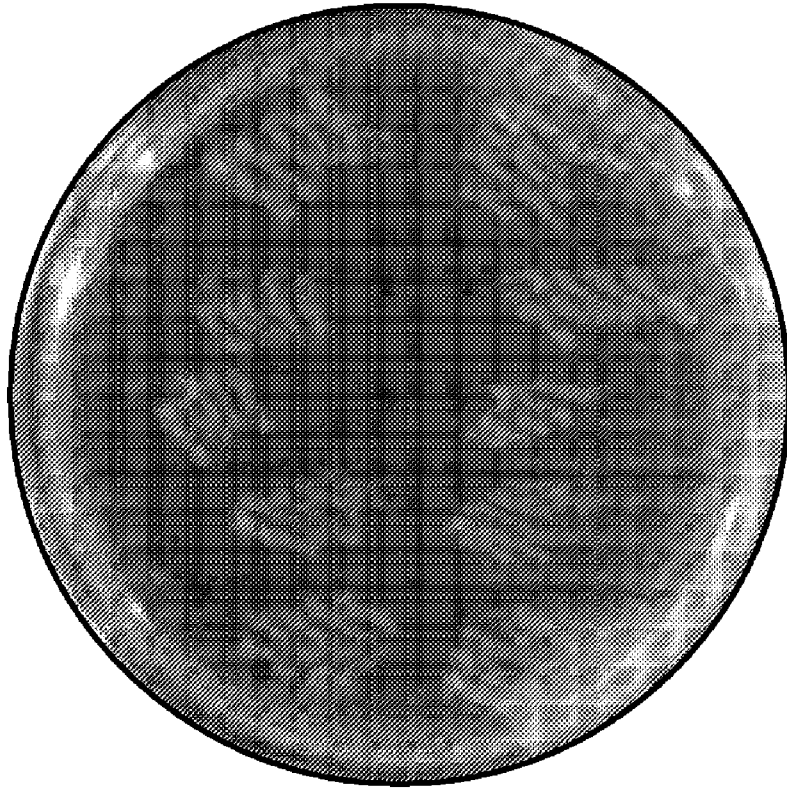


*ФИГ. 3А*

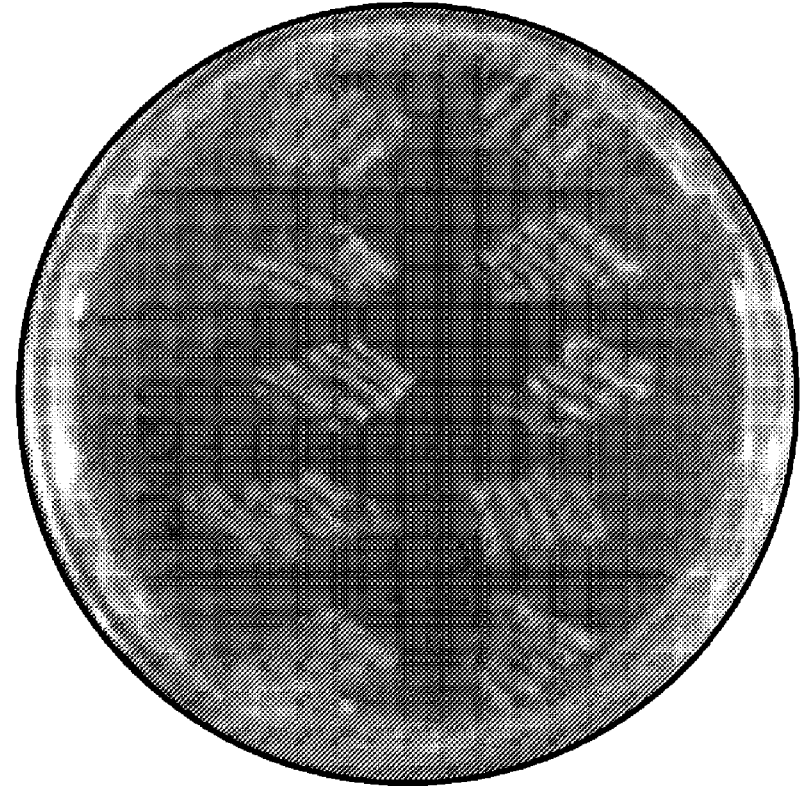


*ФИГ. 3В*

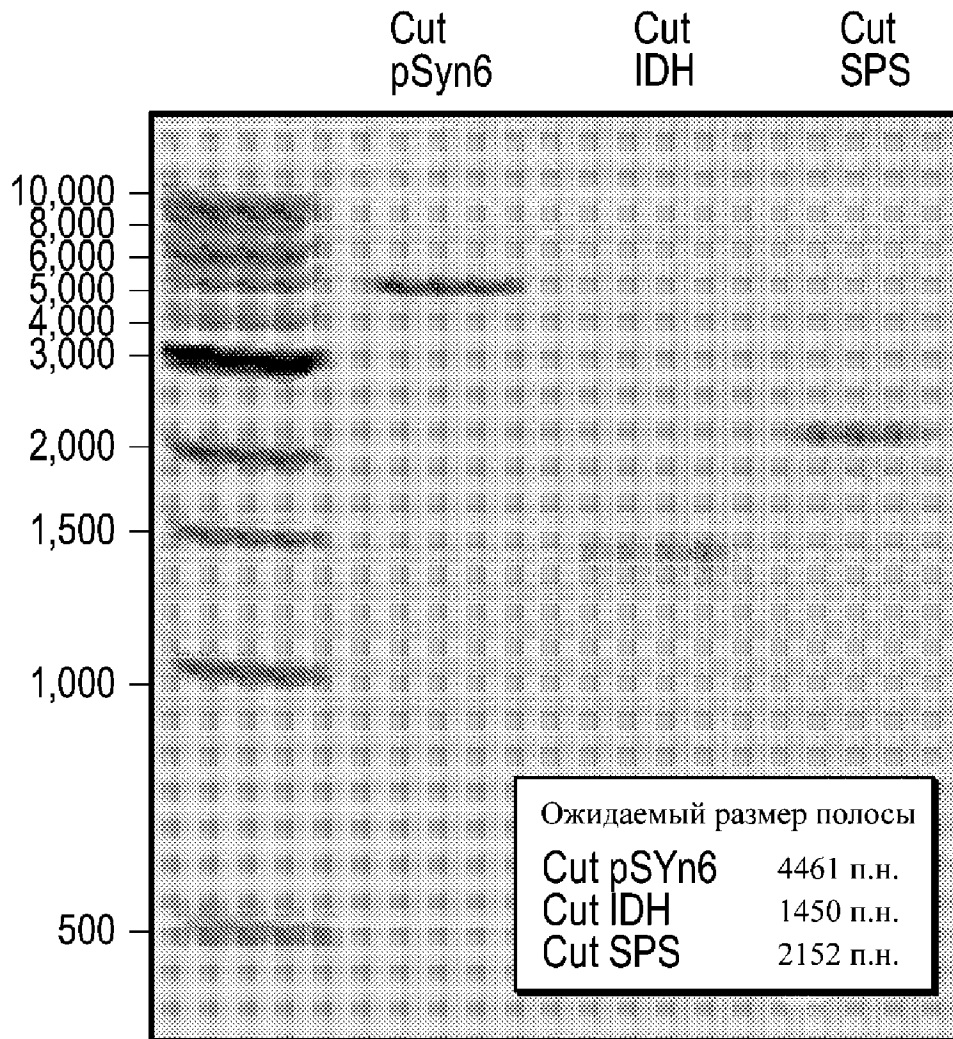
**ФИГ. 4А****ФИГ. 4В**



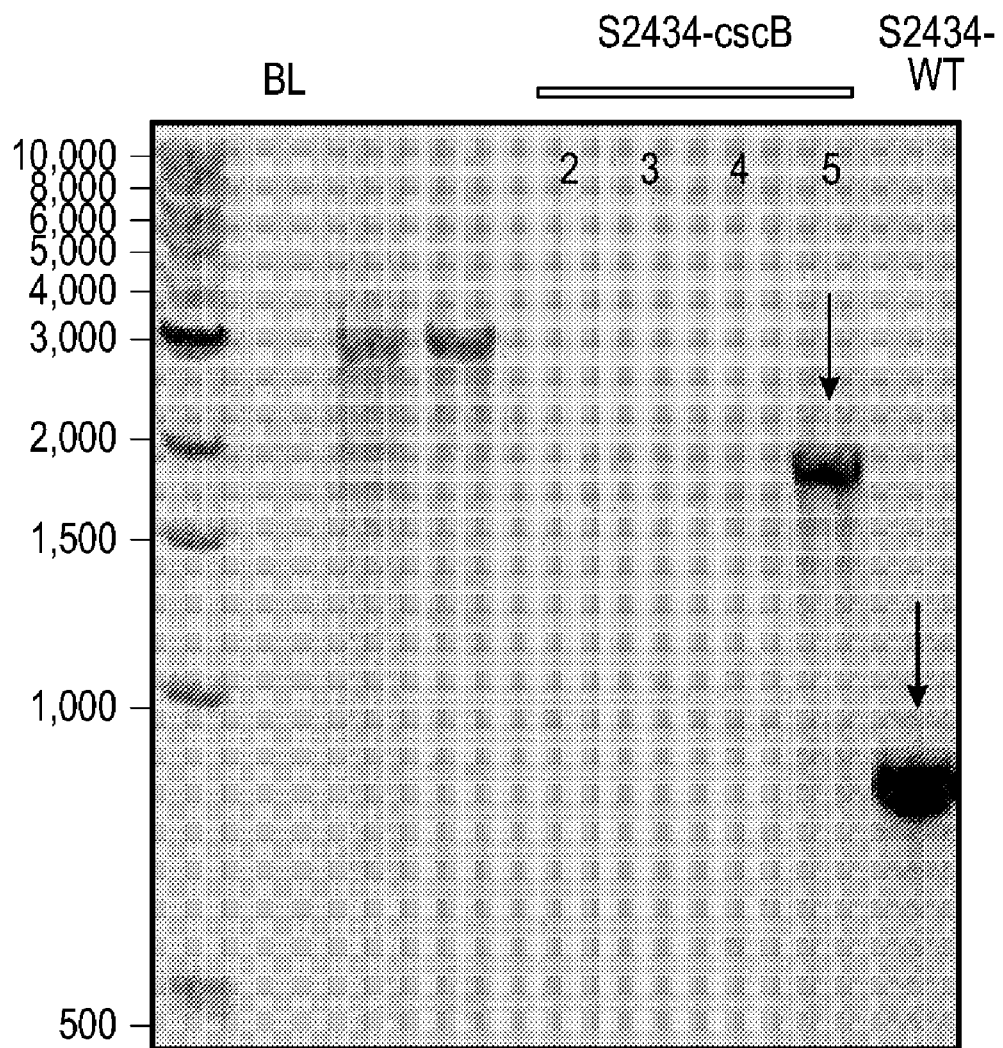
*ФИГ. 5А*



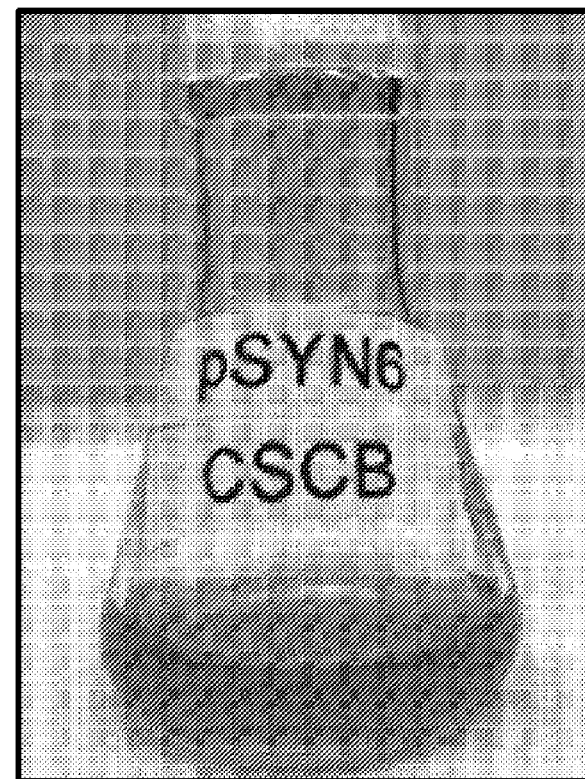
*ФИГ. 5В*



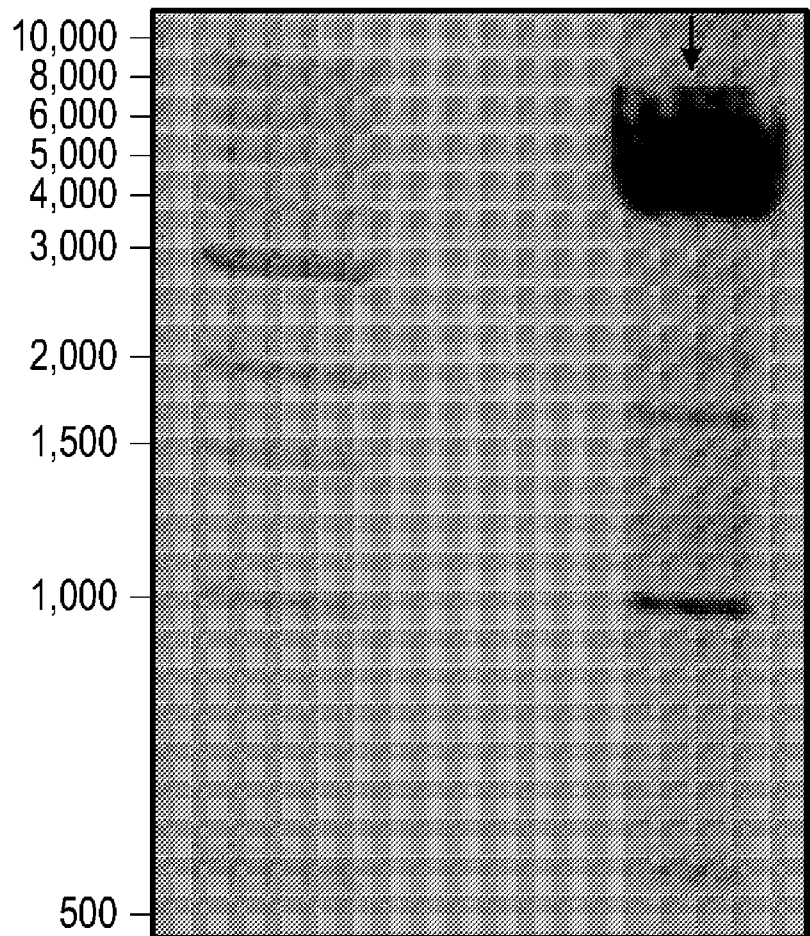
ФИГ. 6



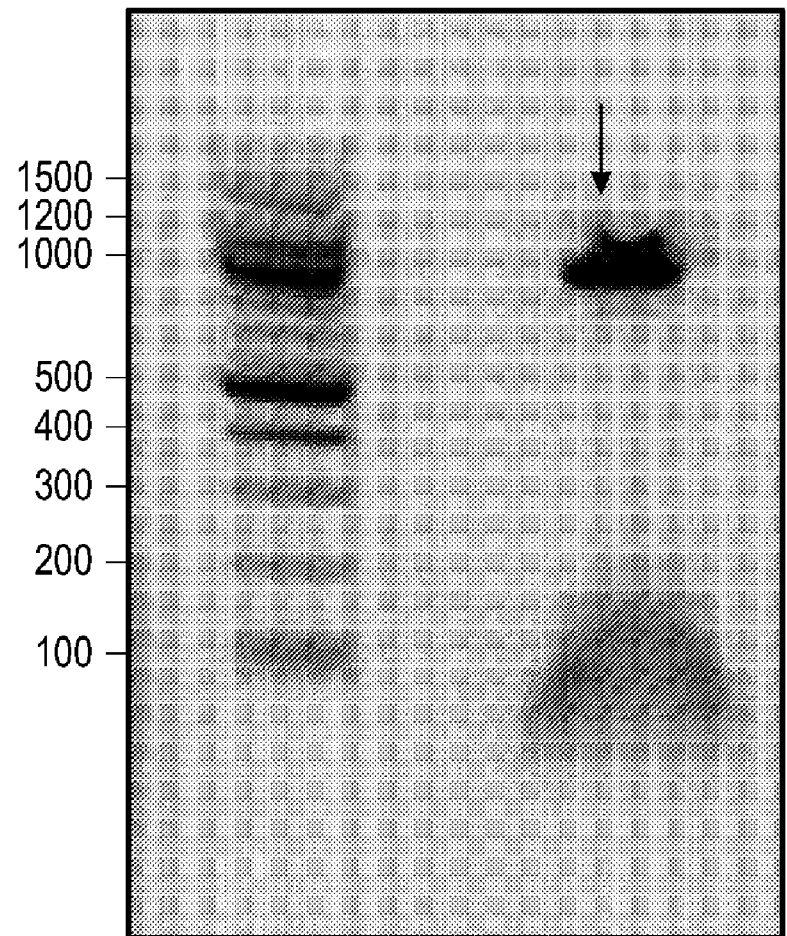
**ФИГ. 7А**



**ФИГ. 7В**

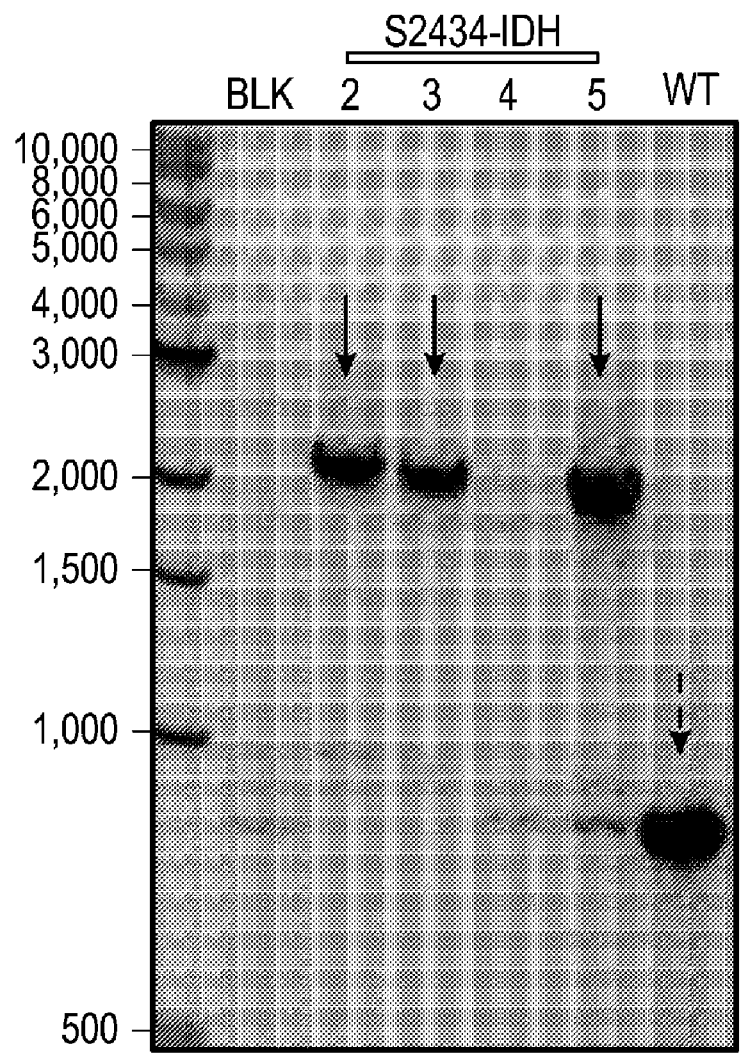


**ФИГ. 8А**

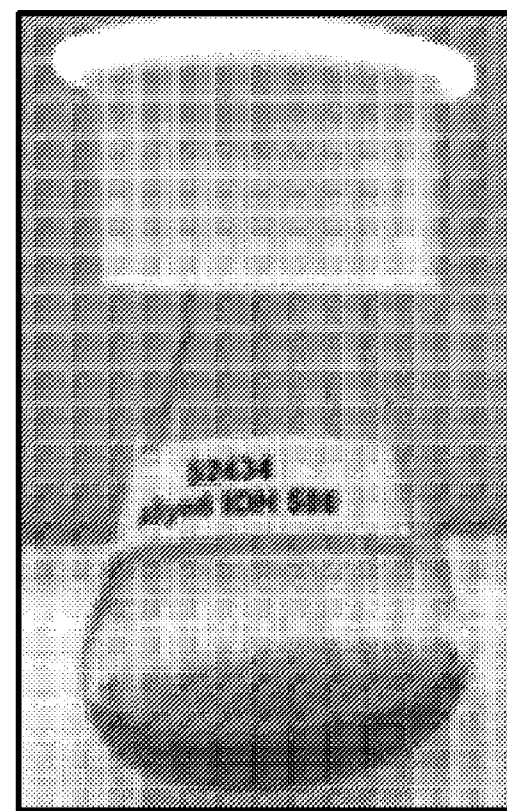


**ФИГ. 8В**





**ФИГ. 9А**



**ФИГ. 9В**