

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國（地區） 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權
歐洲專利機構 2000年05月24日 000111148.3 ☐有☒無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝
訂
線

五、發明說明 (1)

發明範疇

本發明係關於製造類胡蘿蔔素的分子生物學，以及對其有用的生物物質。

發明背景

已知蝦青素分佈在各式各樣的生物中，像是動物(例如鳥類，像是紅鶴和朱鷺，以及魚類，像是虹鱒魚和鮭魚)，藻類和微生物。亦承認蝦青素具有對抗活性氧物種的強抗氧化性質，預期可應用在藥學用途上，保護活細胞免於一些疾病，像是癌症。此外，從工業應用的觀點來看，特別是在諸如鮭魚之類的養殖魚業上，對於做為著色劑之蝦青素的需求正持續增加，因為蝦青素賦與動物特殊的橘紅色，並在市場上引起消費者的興趣。

已知紅酶法菲亞酵母(*Phaffia rhodozyma*)是產生胡蘿蔔素的酵母菌品系，其特別產生蝦青素。與其他產生胡蘿蔔素的酵母菌，紅酵母屬(*Rhodotorula*)不同，紅酶法菲亞酵母可使一些諸如D-葡萄糖之類的糖類發酵。從工業應用的觀點來看，這是一個很重要的特徵。在最近的分類學研究中，揭露了紅酶法菲亞酵母的有性周期，並將其遠距刺激變形的狀態命名為枝狀葉黃素黴(*Xanthophyllomyces dendrorhous*)(W.I. Golubev; Yeast 11, 101-110, 1995)。已經進行一些從紅酶法菲亞酵母中獲得蝦青素之超高生產者的品系改良研究，但在最近十年中，這類努力已經受到使用傳統的突變生成作用和原生質體融合之方法的限制。最近，Wery等人發展出使用紅酶法菲亞酵母的宿主載體系

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

評

線

五、發明說明 (2)

統，其中以多副本之方式，使用不可-複製的質體，在核糖體DNA之處整合到紅酶法菲亞酵母的基因組上(Wery等人, Gene, 184, 89-97, 1997)。而Verdoes等人報告了更多改良的載體，獲得紅酶法菲亞酵母的轉化物，以及其三個產生胡蘿蔔素的基因，其編碼催化從焦磷酸槐牛兒基槐牛兒酯至 β -胡蘿蔔素之反應的酵素(國際專利公告WO97/23633)。在不久的將來，將增加遺傳工程方法對紅酶法菲亞酵母之品系改良研究的重要性，突破由傳統方法所能達到的生產力。

許多研究者已經推測蝦青素可能在紅酶法菲亞酵母中扮演抗氧化劑的角色，因為在生長的呼吸階段而非發酵階段中刺激其產生。通常，在呼吸階段易於產生活性氧物種，是在呼吸鏈中電子溢流的結果，這是由於在泛醌池之還原速度和在呼吸鏈下游之電子傳遞之間的電子傳遞不平衡而引起。在這類推測中，蝦青素可能中止這類活性氧物種，就像超氧物歧化酶在活生物中所進行的。

Schroeder等人報告了紅酶法菲亞酵母的呼吸鏈，在生長的晚期，從KCN-敏感性的呼吸轉換為KCN-耐受性的呼吸，此時刺激蝦青素的產生(J. Biol. Chem., 270, 18374-18379, 1995)。KCN-敏感性的呼吸鏈是共同的電子傳遞鏈，其中將在泛醌池中的電子，經由分佈在各種生物中的複合物III傳遞至複合物IV。已知藉著KCN或抗霉素A抑制該呼吸鏈。另一方面，KCN-耐受性的呼吸鏈分佈在植物和真菌中。在該呼吸鏈中，稱為交替氧化酶(AOX)的粒線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (3)

體膜蛋白質，藉著使用氧分子作為接受者，扮演將在泛醌池中之電子傳遞至 H_2O 分子的重要角色。已知由沒食子酸正-丙酯(n-PG)或水楊基羥肼酸(SHAM)抑制AOX之活性。

在衍生自紅酶法菲亞酵母之蝦青素的抗霉素-敏感性超高生產者之特徵研究中，An等人推測這類突變種產生多很多的蝦青素，中止活性氧物種，其可能由來自電子傳遞鏈之電子溢流所產生 (Appl. Env. Microbiol, 55, 116-124, 1989)。

以在還原狀態下之電子傳遞鏈的條件下，可能向上調節蝦青素的生物合成的假定為基礎，創造本發明。可藉著加入特定的抑制劑，像是抗霉素A、KCN、n-PG或SHAM，而誘導這類還原狀態。亦可藉著一些將導致電子傳遞不平衡的突變作用，誘導這類狀態。

根據本發明，獲得賦與對SHAM之耐受性的突變種。這類突變種獲得比其親代品系高50%的蝦青素生產力。

本發明涉及基因選殖，其編碼得自紅酶法菲亞酵母的交替氧化酶。本發明亦涉及由於這類基因在適當宿主生物中，像是大腸桿菌或酒酵母菌中表現之結果的酵素特徵。可使用如此選殖之基因，藉著在適當宿主中，像是紅酶法菲亞酵母中，使用啟動基因序列的指定-位置之突變生成作用，或反義方法，降低AOX之活性。並可藉著在適當的培養基中，在適當的培養的條件下，培養這類轉化物，證實其對胡蘿蔔素生成作用的影響。

發明概要

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(4)

本發明提供產製類胡蘿蔔素的新穎方法，其包括培養可藉著在引起交替氧化酶活性降低的條件下，處理可產生類胡蘿蔔素之親代生物而獲得的生物，並選擇提高其類胡蘿蔔素生產力的生物。在本發明之方法中使用的生物，可以是藉著幫助改變其對交替氧化酶抑制劑之耐受性，而提高其類胡蘿蔔素生產力的突變種品系。可藉著使用屬於原生生物或真菌界的生物，實行根據本發明之方法，更佳的是賽內奇球菌屬(Synechococcus)、賽內奇囊球菌屬(Synechocystis)、血液球菌屬(Haematococcus)、多納利菌屬(Dunaliella)、法菲亞酵母菌屬(Phaffia)、葉黃素黴屬(Xanthophyllomyces)、鏈孢黴屬(Neurospora)、紅酵母屬(Rhodotorula)、布拉黴屬(Blakeslea)或藻狀菌屬(Phycomyces)，其中最佳的生物可以是紅酶法菲亞酵母和枝狀葉黃素黴的品系。

本發明可使用之交替氧化酶抑制劑，可選自包括沒食子酸正-丙酯和水楊基羥肪酸。

本發明亦提供建立突變種品系之方法，其相對於親代生物，能夠產生提高含量的類胡蘿蔔素，該方法包括在降低交替氧化酶活性的條件下，培養可產生類胡蘿蔔素之生物，並選擇能夠以比該親代生物更高的程度產生類胡蘿蔔素的生物。降低交替氧化酶活性的條件，可包括交替氧化酶抑制劑的存在。爲了此一目的，交替氧化酶抑制劑可選自包括沒食子酸正-丙酯和水楊基羥肪酸。本發明之突變種品系的生物，可屬於原生生物或真菌界，更佳的是賽內

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (5)

奇球菌屬、賽內奇囊球菌屬、血液球菌屬、多納利菌屬、法菲亞酵母菌屬、葉黃素黴屬、鏈孢黴屬、紅酵母屬、布拉黴屬或藻狀菌屬，其中最佳的生物可以是紅酶法菲亞酵母和枝狀葉黃素黴的品系。

另一方面，本發明亦關於能夠以相對於其親代生物，以提高之含量產製類胡蘿蔔素之生物的突變種品系，其可藉著上述的方法而獲得。更特定而言，該突變種之特徵在於即使培養基含有0.3至0.45毫克/毫升的SHAM，其可以類似在不含SHAM之培養基中的生長速率生長。

如同在本發明的一個具體實施例中，提供SHAM-耐受性的突變種，其衍生自紅酶法菲亞酵母ATCC96594。在2000年4月3日，將這類SHAM-耐受性突變種分別以DSM 13429、DSM 13430和DSM 13431存放於DSMZ (Deutsche Sammlung der Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany)中。

在本發明之方法中使用的生物，可以是重組的生物，改變其交替氧化酶的基因表現，以便與親代生物相比較，降低其效力。本發明更提供能夠以相對於宿主生物，以提高之含量產製類胡蘿蔔素的重組生物，其特徵在於改變其交替氧化酶的基因表現，以便與宿主生物相比較，降低其效力。這類生物可藉著選自反義技術、指定-位置之突變生成作用、化學突變生成作用等等技術的幫助，改變交替氧化酶的基因表現。爲了此一目的，該生物可屬於原生生物或真菌界，更佳的是賽內奇球菌屬、賽內奇囊球菌屬、血

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (6)

液球菌屬、多納利菌屬、法菲亞酵母菌屬、葉黃素黴屬、鏈孢黴屬、紅酵母屬、布拉黴屬或藻狀菌屬，其中最佳的生物可以是紅酶法菲亞酵母和枝狀葉黃素黴的品系-特別是上文提及的存放物。

本發明亦提供重組的DNA序列，編碼衍生自可產生類胡蘿蔔素之生物的交流氧化酶。該重組的DNA可獲自屬於原生生物或真菌界的生物，更佳的是賽內奇球菌屬、賽內奇囊球菌屬、血液球菌屬、多納利菌屬、法菲亞酵母菌屬、葉黃素黴屬、鏈孢黴屬、紅酵母屬、布拉黴屬或藻狀菌屬，其中最佳的生物可以是紅酶法菲亞酵母和枝狀葉黃素黴的品系-特別是上文提及的存放物。可藉著序列識別2號確認根據本發明之重組DNA序列，或與序列識別2號具有高於55%，更佳的是高於75%，最佳的是高於95%同一性者。

更特定而言，該重組的DNA序列其特徵在於(a)其編碼之酵素具有在序列識別1號中描述的胺基酸序列；或(b)其編碼該酵素之變體，選自(i)對偶基因變體和(ii)具有一或多個胺基酸添加、插入、刪除及/或取代，並具有陳述之酵素活性的酵素。上文提及之特別指定分離的DNA序列，可以是衍生自紅酶法菲亞酵母之基因，並分離自(i)以序列識別2號代表的DNA序列，(ii)以序列識別2號代表之DNA序列的同類編碼(isocoding)或對偶基因變體，(iii)以序列識別2號代表之DNA序列的衍生物，帶有一或多個核苷酸(群)的添加、插入、刪除及/或取代作用，並編碼具有該酵素

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(7)

活性的多肽。

本發明亦提供使用該重組DNA來轉化宿主生物。重組DNA的便利形式可以是載體。藉著使用重組DNA而獲得的重組生物，能夠降低交替氧化酶的酵素活性。以該重組DNA轉化的宿主生物，可用來改良類胡蘿蔔素的生產方法，特別是蝦青素。因此，本發明亦提供這類重組生物。

此外，本發明亦提供類胡蘿蔔素之生物產製的方法，其包括將上述的重組DNA導入適當的載體生物中，並培養如此而獲得的重組生物。因此，產製類胡蘿蔔素的方法，其特徵在於在可傳導產生類胡蘿蔔素的條件下培養上述的重組生物，亦為本發明的一方面。可將該方法應用在蝦青素的生物產製上。

圖式簡單說明

圖1敘述在紅酶法菲亞酵母中呼吸鏈的工作模式。

發明詳細說明

如同上述，許多研究者已經推測蝦青素在紅酶法菲亞酵母中扮演抗氧化劑的角色，因為在生長的呼吸階段而非發酵階段中刺激其產生。通常，在呼吸階段易於產生活性氧物種，是在呼吸鏈中電子溢流的結果，這是由於在泛醌池之還原速度和在呼吸鏈下游之電子傳遞之間的電子傳遞不平衡而引起(圖1)。在這類推測中，蝦青素可能中止這類活性氧物種，就像超氧物歧化酶所做的。

以此推測為基礎，在紅酶法菲亞酵母中藉著抑制呼吸，可能實現蝦青素的過度產生。事實上，An等人分離阻斷其

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (8)

KCN-敏感性呼吸的突變種，且其從紅酶法菲亞酵母中產生多很多的蝦青素(Appl. Env. Microbiol, 55, 116-124, 1989)。

另一方面，如同Schroeder等人報告的，紅酶法菲亞酵母的呼吸鏈，在生長的晚期從KCN-敏感性呼吸轉變為KCN-耐受性呼吸，此時刺激蝦青素的產生(J. Biol. Chem., 270, 18374-18379, 1995)。關於此點，KCN-耐受性呼吸，其由交替氧化酶調節，將在蝦青素產生期間對呼吸有更多的影響。交替氧化酶的抑制，將導致蝦青素的過度產生。

爲了檢查呼吸活性之特定抑制作用，在紅酶法菲亞酵母中對蝦青素產生的影響，以連續稀釋之濃度將SHAM，已知其抑制交替氧化酶，加至生長瓊脂培養基中。在本研究的過程中，數個自然的突變種，即使是在0.3至0.45毫克/毫升SHAM的存在下，仍顯示類似在不含SHAM之培養基的生長活性。驚人的發現這類突變種產生比其親代高50%的蝦青素。這代表某些導致蝦青素過度產生的突變，可藉著呼吸鏈的還原狀態，補充生長抑制，其將由交替氧化酶活性的降低而引起。

因此，本發明提供經過分離的突變種，其抵抗0.3至0.45毫克/毫升交替氧化酶的特定抑制劑，SHAM。與上文相同，熟諳此藝者迅速的瞭解，可藉著在任何一或多個交替氧化酶之抑制劑的存在下，培養適當的生物，並藉著篩選在該抑制劑(群)的存在下顯示出生長活性，以及比親代生物更高之蝦青素生產力的生物，來建立能夠以較高之生產力產生蝦青素的突變種品系。可藉著從紅酶法菲亞酵母之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (9)

細胞中萃取類胡蘿蔔素，並按照在實例2中舉例說明的，測量蝦青素含量，來判定蝦青素的生產力。生產力增加大約10%，將是選擇能夠以比親代品系更高之程度產生蝦青素之突變種品系的可能基準。可使用在交替氧化酶抑制劑之壓力下再度-培養和篩選如此獲得的突變種品系，以便改善生產力。可將如此獲得的突變種品系，應用於在適當培養基中產製蝦青素。

爲了降低交替氧化酶的活性，使用遺傳工程的方法比在培養基中加入特定抑制劑，像是SHAM的方法具有數個優點。這些優點之一是經濟上的理由。加入這類抑制劑將增加產製的成本。且在培養基中加入這類抑制劑，在純化步驟中，從終產物中移除加入的抑制劑方面有其他的缺點。

此外，本發明提供經過分離的重組DNA序列，其編碼得自紅酶法菲亞酵母之交替氧化酶。

本發明之DNA可意指cDNA，其僅含有位在其5'-至3'-未轉譯區中短片段之間側面的開放編閱架構，還有基因組DNA，其含有它的插入序列和調節序列，像是其啓動基因和終止轉錄之序列，其涉及感興趣之基因的表現。

首先，我們藉著使用簡併PCR方法，選殖含有一部份AOX基因的部份基因片段。該簡併PCR是選殖感興趣基因的方法，該感興趣基因與得自其他物種之具有相同或類似功能的已知酵素，具有高度的胺基酸序列同種性。藉著相對應核苷酸("簡併的")之胺基酸序列的逆轉譯作用，設計在簡併PCR中用來作為引子的簡併引子。在這類簡併引子

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

中，通常使用由任何A、C、G或T所組成的混合引子，或在雙關性密碼處含有肌苷的引子。在本發明中，使用混合引子作為簡併引子，來選殖上述的基因。所使用的PCR條件是依據引子和待選殖之基因，按照下文的描述而有所不同的。

可藉著篩選以噬菌體載體或質體載體在適當之宿主中建構的基因組庫，藉著使用經由上述之簡併PCR而獲得的部份DNA片段，並在將其標示之後作為探針，從染色體中選殖含有其密碼區，與其插入序列及其調節區，像是啟動基因或終止轉錄之序列的完整基因。在建構庫和後續的遺傳操作，像是定序、限制消化、連接及其類似者時，通常使用大腸桿菌作為宿主品系，並使用大腸桿菌載體、噬菌體載體，像是 λ 噬菌體載體，或質體載體，像是pUC載體。在本發明中，在 λ 載體之衍生物， λ gt11中，建構紅酶法菲亞酵母的EcoRI基因組庫。在建構庫之前，藉著南方墨點雜交作用判定插入物的尺寸，必須選殖多長的插入物。在本發明中，依據由供應者準備的草案(Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany)，以毛地黃毒苷(DIG)，一種類固醇附著素來代替傳統的 ^{32}P 標記，標示用來作為探針的DNA。藉著使用以DIG標示之DNA片段，其具有一部份感興趣的基因作為探針，篩選從紅酶法菲亞酵母之染色體中建構的基因組庫。在分離陽性的斑點之後，將插入物片段繼代選殖到適當的質體載體中，其可便利的用於定序。在本發明中，可將在陽性噬菌體載體中的插入物片段繼代

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

選殖到 pOCUS-2 載體內，使用它來建構轉因子-插入定序衍生物 (Locus Pocus System, Novagene, Madison, U.S.A.)。

在本發明中，與自動循環定序草案一起使用自動螢光 DNA 定序器，ALFred 系統 (Pharmacia, Uppsala Sweden)，其中在大部份定序的案例中使用 Taq DNA 聚合酶。

在判定基因組序列之後，使用密碼區的序列來選殖相對應基因的 cDNA。亦開發 PCR 方法來選殖 cDNA 片段。利用加入適當的限制位置，合成其序列與在開放編閱架構 (ORF) 之 5'-至 3'-末端之序列相同的 PCR 引子，並使用那些 PCR 引子進行 PCR。在本發明中，在以 PCR 選殖 cDNA 時使用 cDNA 池作為模板。該 cDNA 池由各種 cDNA 物種所組成，其在活體外藉著病毒的逆轉錄酶和 Taq 聚合酶 (由 Clontech, Palo Alto, U.S.A. 製造的 CapFinder 套組) 合成，藉著使用獲自紅酶法菲亞酵母之 mRNA 作為模板。可在其序列中證實如此獲得感興趣的 cDNA。此外，可使用如此獲得的 cDNA，在將該 cDNA 片段選殖到在大腸桿菌或酒酵母菌中，在適當之啟動基因下發揮功能的表現載體內之後，證實其酵素活性。

欲表現衍生自真核生物的基因，通常使用其中在大腸桿菌或酒酵母菌中，將該 cDNA 選殖到表現載體內的程序。這由於插入序列結構之專一性隨著生物改變，且在其他的物種中不能認出該插入序列的事實所引起。事實上，原核生物在其自己的遺傳背景中，不具有插入序列結構。即使是在酵母菌中，在屬於子囊菌綱 (Ascomycetes) 的酒酵母菌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

與屬於擔子菌綱(Basidiomycetes)的紅酶法菲亞酵母之間的遺傳背景仍是不同的。Wery等人顯示得自紅酶法菲亞酵母之肌動蛋白基因的插入序列結構，不能由子囊菌綱之酵母菌，酒酵母菌認出，亦不能與其接合(Yeast, 12, 641-651, 1996)。

一些其他的研究者報告了一些種類基因之插入序列結構涉及其基因表現的調節(Dabeva, M.D.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5854, 1986)。在感興趣基因之自我-選殖的案例中，使用具有其插入序列之基因組片段可能是重要的，使其插入序列結構得以涉及它自己之基因表現的調節。

欲應用遺傳工程的方法來進行品系改良研究，結果必須研究其遺傳機制，像是轉錄和轉譯作用。不僅對其表現序列，判定其上游激活序列(UAS)、啟動基因、插入序列結構和終止轉錄之序列的遺傳序列亦是很重要的，以便研究遺傳機制。

根據本發明，從紅酶法菲亞酵母的基因組DNA中選殖編碼交替氧化酶的基因，並判定其含有交替氧化酶(AOX)基因，包括其5'-和3'-相鄰區，以及其插入序列結構的基因組序列。

在證實酵素活性之後，可使用基因修改研究，以便降低交替氧化酶之活性。

在本發明中，多肽序列包括序列識別2號及其具有AOX活性之片段，且該多肽序列在足以確認與序列識別2號之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

專一結合的嚴格條件下，與序列識別2號雜交，而其雜化物編碼具有交替氧化酶之功能的多肽。例如，可使用下列雜交和沖洗條件的任何組合，來完成需要的專一性結合：

高嚴格度的雜交：

6X SSC

0.5% SDS

100微克/毫升變性的鮭精DNA

50% 甲醯胺

在42°C下培養過夜，並溫和的擺動。

高嚴格度的沖洗：

以2X SSC，0.5% SDS在室溫下沖洗一次15分鐘，接著以0.1X SSC，0.5% SDS在室溫下沖洗另一次15分鐘。

低嚴格度的雜交：

6X SSC

0.5% SDS

100微克/毫升變性的鮭精DNA

50% 甲醯胺

在37°C下培養過夜，並溫和的擺動。

低嚴格度的沖洗：

以0.1X SSC，0.5% SDS在室溫下沖洗一次15分鐘。

可藉著改變進行雜交反應的溫度及/或上述的沖洗條件，獲得中等嚴格度的條件。在本發明中，最好是使用高嚴格度的雜交和沖洗條件。

欲利用遺傳方法降低基因表現，可開發一些方法。這類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

方法之一是反-義法。反-義法是藉著導入人造的基因片段，降低感興趣之基因表現的方法，該人造基因片段的序列是與感興趣基因互補的。且這類反-義基因片段將在活體內與目標基因之成熟的mRNA片段形成複合物，結果抑制從該mRNA中的有效轉譯。爲了建構AOX基因之反-義RNA，可使用PCR方法，選殖AOX基因的互補cDNA股。

其他方法是啓動基因區的突變作用。通常，基因由數個部份組成，彼此具有不同的功能。在真核生物中，編碼相對應之蛋白質，轉錄成早熟信使RNA (前-mRNA)的基因，與核糖體RNA (rRNA)、小形核RNA (snRNA)和轉移RNA (tRNA)的基因不同。雖然RNA聚合酶II (PolII)在該轉錄事件中扮演重要的角色，但PolII不能沒有涵蓋上游區的順式-元件而單獨開始轉錄作用，該上游區含有啓動基因和UAS，以及反式-作用的蛋白質因子。首先，轉錄開始複合物由數個基本的蛋白質組份所組成，其認得在待表現之基因5'-相鄰區中的啓動基因序列。在該事件中，在某些特定的調節之下，像是熱休克反應，或適應營養饑餓等等，表現基因的案例中，需要一些額外的參與者。在這類情況下，需要有UAS出現在啓動基因序列周圍的5'-未轉錄上游區中，而一些陽性或陰性的調節蛋白質認出並與UAS結合。轉錄開始複合物對啓動基因序列的結合強度，受到在啓動基因周圍反式-作用因子之結合作用的影響，且其能夠調節轉錄活性。

在藉著磷酸化作用激活轉錄開始複合物之後，轉錄開始

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (15)

複合物從轉錄開始位置發動轉錄作用。某些部份的轉錄開始複合物以延長複合物之形式，從啓動基因區中分離，至基因之3'-方向(將該步驟稱為啓動基因清除事件)，且延長複合物繼續轉錄，直到其到達位在該基因之3'-相鄰下游區的終止轉錄序列為止。

欲降低感興趣之基因的表現，通常使用藉著傳統的化學突變生成作用或遺傳之指定-位置之突變生成作用，使含有上述之UAS序列之目標基因的啓動基因區發生突變的作用。在該方法中，使含有報告者基因的基因卡匣發生突變，該報告者基因在其5'-末端與衍生自感興趣基因之啓動基因區融合，而在其3'-末端與得自感興趣基因之終止轉錄序列區融合，然後將其導入紅酶法菲亞酵母內。可藉著以具有這類經過突變之啓動基因區的重組DNA轉化宿主品系，獲得其中可能降低感興趣之酵素表現的突變種品系。

可將諸如含有反-義AOX基因或AOX基因之突變啓動基因的載體之類的構築體，轉移感染到適當的宿主品系內。在使用紅酶法菲亞酵母作為宿主品系的案例中，了解將這類構築體選殖到適當的載體內，該載體藏匿有在紅酶法菲亞酵母中具有功能的可選擇標記。通常使用編碼能夠使宿主在毒性抗生素的存在下存活之酵素的藥物抗藥性基因，作為可選擇標記。藏匿在pGB-Ph9中的G418抗藥性基因(Wery等人, Gene, 184, 89-97, 1997)，是藥物抗藥性基因的實例。可經由在染色體和質體之間的同種重組作用，將這類質體整合到紅酶法菲亞酵母的染色體上。

五、發明說明 (16)

至於轉化方法，LiAc法和電穿透作用法(Wery等人，184，89-97，1997)，適用於轉化紅酶法菲亞酵母。

可在適當的培養基中培養這類以遺傳方式設計的紅酶法菲亞酵母，並評估其蝦青素的生產力。

利用下述的實例，藉著參考附圖，進一步解釋本發明。

實例

在下述的實例中，使用下列的材料和方法：

品系

紅酶法菲亞酵母 ATCC 96594 (遵照布達佩斯條約，於1998年4月8日，以登錄編號 ATCC 74438再存放)

大腸桿菌 Y1090r⁻ : araD139, hsdR (r_k⁺, m_k⁺), mcrB⁺, rpsL, supF, trpC12::的 Tn10, ΔlacU169, Δlon, F⁻, λ⁻, (pMC9) (Clontech)

大腸桿菌 DH5 α : F⁻, ϕ80d, lacZ ΔM15, Δ(lacZYA-argF) U169, hsd(r_k⁺, m_k⁺), recA1, endA1, deoR, thi-1, gyrA96, relA1 (Toyobo, Osaka, Japan)

大腸桿菌 γ δ 捐贈者 : Δ(gpt-proA)62, leu, 44, ara14, galK2, lacY1, Δ(mcrC-mrr), (r_B⁻, m_B⁻), xyl-5, mtl-1, recA13, [F⁺::Tn1000(tet^s)](Novagene)

大腸桿菌 γ δ 接受者 : F⁻, araD139, Δ(ara-leu)7696, galE15, galK16, Δ(lac)X74, (Str^r), hsdR2(r_{K12}⁻, m_{K12}⁺), mcrA, mcrB1::Tn5(kan^r)(Novagene)

大腸桿菌 TOP10 : F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ80, M15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, (ara-leu)7697, galU,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (17)

galK, rpsL(Str^r), endA1, nupG(Invitrogen, NV Leek, the Netherlands)

載體

λ gt11 (Clontech)

pCR2.1- TOPO (Invitrogen)

pOCUS-2

pBluescript II SK- (Stratagene)

pGBPh9 (Wery 等人, Yeast, 12, 641-651, 1996)

培養基

例行的將紅酶法菲亞酵母維持在YPD培養基的瓊脂盤(DIFCO, Detroit, USA)上。將大腸桿菌維持在LB培養基(10克細菌-胰蛋白酶水解產生的酶(trypton)(DIFCO), 5克酵母萃取物(DIFCO)和5克NaCl每公升)上。爲了在軟瓊脂(0.7%瓊脂; WAKO)上繁殖λ噬菌體, 使用NZY培養基(5克NaCl, 2克MgSO₄-7 H₂O, 5克酵母萃取物(DIFCO), 10克NZ胺A型(WAKO, Osaka, Japan)每公升)。在製備瓊脂培養基時, 補充1.5%瓊脂(WAKO)。水楊基羧胺酸(SHAM)購自Aldrich(Milwaukee, U.S.A.)。

方法

分子遺傳學技術的共同方法, 係根據在Molecular cloning: a Laboratory Manual, 第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中的方法。限制酵素和T4 DNA連接酶購自Takara Shuzo(Japan)。

藉著使用QIAGEN基因組套組(QIAGEN, Hilden, Germany),

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (18)

依據製造者提供的草案，進行從紅酶法菲亞酵母中分離染色體DNA。利用自動的DNA分離系統(PI-50, Kurabo, Co, Ltd., Osaka, Japan)，進行從經過轉化之大腸桿菌中，質體DNA的迷你-製備作用。藉著使用QIAGEN管柱(QIAGEN)，進行從大腸桿菌轉化物中，質體DNA的迷你-製備作用。藉著使用QIAquick或QIAEX II (QIAGEN)，從瓊脂糖中分離和純化DNA片段。

利用酚方法，藉著使用Isogen(Nippon Gene, Toyama, Japan)，進行從紅酶法菲亞酵母中分離總RNA。藉著使用mRNA分離套組(Clontech)，從如此獲得的總RNA中純化mRNA。藉著使用CapFinder cDNA建構套組(Clontech)，合成cDNA。

藉著使用Gigapack III金包裝萃取(Stratagene, La Jolla, U.S.A.)，進行在活體外的包裝。藉著Wizard λ 製備DNA純化系統(Promega, Madison, U.S.A.)，依據製造者準備的草案，進行 λ DNA的分離。

利用Perkin Elmer 2400型的熱循環器，進行聚合酶連鎖反應(PCR)。在實例中分別描述每個PCR條件。PCR引子係購自供應商。利用自動的螢光DNA定序器(ALFred, Pharmacia)進行DNA定序。

DH5 α 的合格細胞，購自Toyobo。除非另行陳述，所有的化學物質均購自WAKO。

實例1：從紅酶法菲亞酵母ATCC96594中分離SHAM-耐受性突變種SHAM1、SHAM2和SHAM3

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (19)

爲了檢查由交替氧化酶調節的 KCN- 耐受性呼吸之抑制作用對紅酶法菲亞酵母的影響，進行在 YPD- 瓊脂培養基中加入 SHAM，來培養紅酶法菲亞酵母。將 SHAM 溶解於乙醇中，並分別以 0.05、0.15、0.30、0.45 和 0.90 毫克/毫升之終濃度，加至 YPD- 瓊脂培養基中。在這些培養基中，在稀釋之後，散播 2×10^7 個細胞/毫升的紅酶法菲亞酵母 ATCC96594。在 20°C 下培養三天之後，計算產生的菌落。結果，在含有 SHAM 之 YPD 瓊脂上生長的菌落數目，與在不含 SHAM 之對照組培養基上的幾乎相同。但是，生長在含有 SHAM 之培養基上的菌落尺寸，比對照組培養物更小。表 1 顯示對於對照組菌落的相對菌落直徑。

表 1 生長在含有 SHAM 之 YPD 瓊脂上的菌落之相對尺寸

SHAM (毫克/毫升)	0.05	0.15	0.30	0.45	0.90
相對菌落直徑 (%)	100	70	40	30	12

有趣的是，在生長在含有 0.3 和 0.45 毫克/毫升 SHAM 之培養基上的菌落之中，一些菌落顯示出類似對照組菌落的尺寸。這類菌落亦顯示出比對照組菌落更深的染色。挑選出四個顯示出類似對照組菌落尺寸之尺寸的菌落，並在 YPD- 瓊脂培養基上劃條紋。所有的菌落顯示比對照組菌落更深的染色，即使是在不含 SHAM 的 YPD- 瓊脂培養基上。從該結果，暗示這些品系可能是自然的突變種，並命名爲 SHAM1、SHAM2、SHAM3 和 SHAM4。

實例 2：耐受性突變種 SHAM1、SHAM2 和 SHAM3 的燒瓶發

五、發明說明(20)

酵作用

欲評估 SHAM- 耐受性突變種 SHAM1、SHAM2 和 SHAM3 的蝦青素生產力，進行在振盪燒瓶中的發酵作用。將這些突變種及其親代品系 ATCC96594，從新近製備的瓊脂-培養基接種到尺寸 500 毫升之折流燒瓶中的 50 毫升 YPD 培養基中，至在 660 毫微米處的最終 OD 值為 0.05。在 20°C 下以 200 r.p.m. 進行發酵。以適當之間隔，取回 3 毫升肉湯，並分析細胞產量和蝦青素內含量。

以在 600 毫微米處之 OD 值來測量細胞產量。按乾細胞重，其係藉著在 1.5 毫升微量離心管中，在加熱至 120°C 過夜之後，稱取衍生自 1.0 毫升肉湯的細胞重量來測量的。利用 HPLC 法，在藉著如下以玻璃小珠使起破裂，從紅酶法菲亞酵母的細胞中萃取類胡蘿蔔素之後，測量紅酶法菲亞酵母的蝦青素內含量。利用蒸餾水份，將在離心之後獲自 1 毫升肉湯的細胞濃縮兩倍，並將 10.0 克的玻璃小珠加至在以棕色遮蔽之試管(13.5 毫米，11 公分)中的細胞懸浮液中。接著，加入 1.5 毫升丙酮/丁基化羥基甲苯(BHT)/水(在 450 毫升丙酮和 50 毫升水中的 45 毫克 BHT)，然後以水平的桌上型振盪器振盪一小時。在萃取之後，加入作為內部標準物的 5 毫升丙酮/BHT/含有適當濃度之胭脂樹橙(nacalai tesque, Kyoto, Japan)的水。利用下列的 HPLC 系統(HPLC 系統的硬體，購自 Tosoh(Tokyo, Japan))，分析上清液之蝦青素內含量。

HPLC 管柱：YMC-Pak ODS-A(6 毫米，150 毫米(YMC, Inc.,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (21)

Milford, U.S.A.)。

溫度：室溫

洗脫液：乙腈/甲醇/異丙醇(85/10/5)

注射體積：10微升

流速：2.0毫升/分鐘

檢測：以471毫微米之UV

在表2中概述結果。所有的突變種均顯示比親代品系ATCC96594高50%的蝦青素生產力。從該結果中，在這些突變種中可能出現的一些突變，藉著增加蝦青素的產生，補償交替氧化酶活性的抑制作用。

表2 SHAM-耐受性突變種的蝦青素生產力

蝦青素生產力						
(毫克/公升)	(毫克/克-乾細胞)		OD@660毫微米			
(小時)	38	72	38	72	38	72
SHAM-1	1.65	4.07	0.179	0.380	24.5	30.6
SHAM-2	2.36	4.43	0.217	0.385	29.5	30.5
SHAM-3	2.87	3.97	0.247	0.381	29.2	29.5
ATCC96594	2.00	2.76	0.164	0.258	27.4	28.7

實例3：從紅酶法菲亞酵母中分離mRNA，並建構cDNA庫

欲建構紅酶法菲亞酵母的cDNA庫，在打破細胞之後馬上藉著酚萃取法分離總mRNA，並藉著使用mRNA分離套組(Clontech)純化得自紅酶法菲亞酵母ATCC96594品系的mRNA。

五、發明說明(22)

首先，藉著離心(1500 x g，10分鐘)從10毫升在YPD培養基中的兩-天-培養物中，收獲ATCC96594品系的細胞，並以萃取緩衝溶液(10 mM檸檬酸鈉/HCl (pH 6.2)，含有0.7 M KCl)沖洗一次。在懸浮於2.5毫升萃取緩衝溶液中之後，藉著法式擠壓均質器(Ohtake Works Corp., Tokyo, Japan)，以1500公斤力/平方公分將細胞打破，並根據製造者指定的方法，立刻與兩倍體積的isogen (Nippon gene)混合。在此步驟中，回收400微克的總RNA。

然後根據製造者指定的方法，藉著使用mRNA分離套組(Clontech)純化總RNA。最後，從紅酶法菲亞酵母ATCC96594品系中，獲得16克的mRNA。

欲建構cDNA庫，根據製造者指定的方法，使用CapFinder PCR cDNA建構套組(Clontech)。將1微克經過純化的mRNA應用在第一股的合成上，接著是PCR擴大作用。在藉著PCR擴大之後，獲得1毫克的cDNA池。

實例4：從紅酶法菲亞酵母中選殖部份的AOX(交替氧化酶)基因

欲從紅酶法菲亞酵母中選殖部份的AOX基因，開發簡併的PCR方法。為了多重排列分析(ClustalW, Thompson J.D., 等人, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680, 1994)，使用其交替氧化酶之序列的物種和資料庫之登錄編號如下。

黑麴菌(<i>Aspergillus niger</i>)	AB016540 (DDBJ/GenBank/EMBL)
白色念珠菌(<i>Candida albicans</i>)	AF031229 (DDBJ/GenBank/EMBL)
瑞哈帝厚膜單孢菌(<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

錄

五、發明說明 (23)

	AF047832 (DDBJ/GenBank/EMBL)
格瑞西美格納波斯菌(Magnaporthe grisea)	
	AB005144 (DDBJ/GenBank/EMBL)
粗糙鏈孢黴(Neurospora crassa)	Q01355 (Swissprot)
沙帝伐稻黴(Oryza sativa)	AB004813 (DDBJ/GenBank/EMBL)
無形畢赤酵母(Pichia anomala)	Q00912 (Swissprot)
布氏錐蟲(Trypanosoma brucei brucei)	Q26710 (Swissprot)

按照在表3中所示，以得自其他物種之已知交替氧化酶基因的共同序列為基礎，設計並合成兩個混合引子的核苷酸序列。

表 3

在選殖AOX基因時所使用之引子的序列

aox3; AAYGARMGNATGCAYYTNYTNACNTT (有意義引子)
(序列識別3號)

aox5; GCYTCYTCYTCNARRTANCCNACRAA (反義引子)(序列識別4號)

(N= A, C, G 或 T ; R= A 或 G , Y= C 或 T , M= A 或 C)

在藉著使用 ExTaq (Takara Shuzo) 作為 DNA 聚合酶，並使用在實例1中獲得的 cDNA 池作為模板，進行 95°C 30秒，50°C 30秒和 72°C 15秒 25次循環的 PCR 反應之後，將反應混合物應用於瓊脂糖凝膠電泳上。回收具有想要長度的 PCR 譜帶，並根據製造者的方法，藉著 QIAquick (QIAGEN) 純化之，然後與 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 連接。在轉化合格的大腸桿菌 TOP10 之後，選擇白色的菌落，並利用自動的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (24)

DNA分離系統分離質體。由於定序的結果，發現3個純種系所具有之序列，其推衍的胺基酸序列類似已知的交替氧化酶基因。將該經過分離的cDNA純種系命名為pAOX514，並用來進一步研究。

實例5：從紅酶法菲亞酵母中分離基因組DNA

欲從紅酶法菲亞酵母中分離基因組DNA，根據製造者指定的方法，使用QIAGEN基因組套組。

首先，藉著離心(1500 x g，10分鐘)從100毫升在YPD培養基中過夜的培養物中，收獲紅酶法菲亞酵母ATCC96594品系的細胞，並以TE緩衝溶液(10 mM Tris/HCl (pH 8.0)，含有1 mM EDTA)沖洗一次。在懸浮於8毫升QIAGEN基因組套組的Y1緩衝溶液中之後，以2毫克/毫升之濃度加入溶解酶(lyticase)(SIGMA, St. Louis, U.S.A.)，藉著酵素的降解作用打破細胞，並在30°C下培養該反應混合物90分鐘，然後進行至下一個萃取步驟。最後，獲得20微克的基因組DNA。

實例6：藉著使用pAOX514作為探針的南方墨點雜交作用

進行南方墨點雜交作用，選殖含有得自紅酶法菲亞酵母之AOX基因的基因組片段。藉著EcoRI消化2微克的基因組DNA，並接受瓊脂糖凝膠電泳，接著是酸和鹼的處理。藉著使用transblot (Joto Rika, Tokyo, Japan)一小時，將變性的DNA移至尼龍膜(Hybond N+, Amersham, Buckinghamshire, U.K.)上。藉著熱處理(80°C，90分鐘)將移至尼龍膜上的DNA固定。藉著以DIG多重裝填(multipriming)法(Boeh-

五、發明說明 (25)

ringer Mannheim) 標示模板 DNA(EcoRI- 消化的 pAOX514) , 來製備探針。利用製造者指定的方法進行雜交作用。結果, 在從 5.5 至 7.0 千個鹼基(kb) 的範圍內可看見雜交譜帶。

實例 7: 選殖含有 AOX 基因的基因組片段

藉著 EcoRI 消化 4 微克的基因組 DNA, 並接受瓊脂糖凝膠電泳。然後根據製造者指定的方法, 藉著 QIAEX II 凝膠萃取套組 (QIAGEN) 回收其長度範圍在 5.0 至 7.0 kb 的 DNAs。在 16°C 下, 將經過純化的 DNA 與 0.5 微克以 EcoRI- 消化, 並以 CIAP (牛腸鹼性磷酸酶)- 處理之 λ gt11 (Clontech) 連接過夜, 並藉著 Gigapage III 金包裝萃取 (Stratagene) 包裝。將經過包裝的萃取物感染到大腸桿菌 Y1090 品系中, 並將 NZY 培養基倒在 LB 瓊脂培養基上覆蓋之。藉著使用 EcoRI- 消化過的 pAOX514 作為探針, 篩選大約 6000 個斑點。一個斑點與經過標示的探針雜交。

藉著使用 Wizard λ 製備 DNA 純化系統 (Promega), 製備含有得自紅酶法菲亞酵母之假定 AOX 基因的 λ gt11 衍生物。藉著 EcoRI 消化的結果, 其顯示該 λ gt11 衍生物含有 6 kb EcoRI 插入序列。接著, 藉著使用該 λ gt11 衍生物作為模板, 並使用兩個引子 aox3 和 aox5 作為引子, 來進行 PCR。在與實例 4 中描述相同的 PCR 條見下, PCR 的結果, 產生預測的 0.3 kb 之譜帶。這暗示該 λ gt11 衍生物可能含有得自紅酶法菲亞酵母的假定 AOX 基因。藉著使用 QIAquick (QIAHEN) 純化在該 λ gt11 衍生物中的 6.0 kb 之插入 EcoRI 片段, 並接受繼代選殖到 pOCUS-2 載體 (No-vagen) 內, 藉著

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (26)

使用 DH5 α 作為宿主品系，並產生 pOCUSAOX607。

實例 8：含有 AOX 基因之基因組片段的定序

將 pOCUSAOX607 轉移至合格的 γ δ 捐贈者細胞內，並用來製備定序衍生物，其可用於 Locus Pocus 系統 (Novagen)。製備定序衍生物的方法，係依據製造者提供的草案。合成作為定序引子的 Cy5-標示之引子，其序列列舉於表 4 中，並藉著使用自動循環定序套組 (Pharmacia)，用來進行定序。

表 4

用來定序 AOX 基因的引子序列

poc1; (Cy5-) AGCTACAACATACGAAAGGG (序列識別 5 號)

poc2; (Cy5-) GGGGAAGTGAAGAGCTCTAAA (序列識別 6 號)

由於定序的結果，判定包括 2561 個鹼基對之基因組片段的核苷酸序列含有得自紅酶法菲亞酵母的 AOX 基因。

在 1206 個鹼基對中的密碼區，由 10 個表現序列和 9 個插入序列所組成。插入序列分散在整個密碼區中，並不偏愛 5' 或 3'。藉著使用遺傳分析軟體，GENETYX-SV/RC (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan) 4.0.1 版，發現開放編閱架構由 402 個胺基酸 (序列識別 1 號) 組成，其序列顯著的類似得自其他物種之交替氧化酶的已知胺基酸序列 (與得自黑麴菌之交替氧化酶有 51.5% 的同一性)。在胺基終端之忌水性胺基酸殘基的伸展，預期它形成 α -螺旋結構，代表該胺基終端區可能是膜連結功能部位，或粒線體的過渡肽。PSORTII 程式 (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (27)

以 82.6% 之預測值，預測該蛋白質可能是粒線體蛋白質。

實例 9：選殖 AOX 基因的上游區

藉著使用基因組步行者套組 (Clontech)，進行 AOX 基因之 5'-相鄰區的選殖，因為似乎 pAOX514 可能不具有足以含有 AOX 基因之啟動基因的長度。首先，合成在表 5 中顯示其序列的 PCR 引子。

表 5

在選殖 AOX 基因之 5'-相鄰區時所使用的引子序列
aox13; GTGTCAGAAACCTCAGATCAACAGGC (主要引子)
(序列識別 7 號)

aox14; CAACAGGCAGTACAGTCAGCAGATTC (巢式引子)
(序列識別 8 號)

庫選殖之草案和 PCR 條件與製造者指定的那些相同。使用在實例 5 中獲得的基因組 DNA 製品作為 PCR 模板。回收在 5'-末端具有 ScaI 位置 (1.2 kb)，並在 5'-末端具有 DraI 位置 (3.0 kb) 的 PCR 片段，並藉著使用大腸桿菌 TOP10 作為宿主品系，選殖到 pCR2.1-TOPO 內。由於定序得自兩種構築體之每 2 個獨立純種系的結果，證實選殖 AOX 基因的 5'-相鄰區。將在上述的實驗中，藉著 ScaI 構築體而獲得的純種系命名為 pAOXSc702，並用在進一步的研究中。以在 pAOXAc702 中之插入片段的序列基礎，合成在表 6 中列舉其序列的 4 個 PCR 引子。

表 6

在選殖 AOX 啟動基因區時所使用的引子序列

五、發明說明 (28)

aox15; GAATTCAACAGGTCAAATGA (有意義引子)(序列識別9號)

aox16; ATCCACCCACGCCTGTTTCC (反義引子)(序列識別10號)

aox17; GGAAACAGGCGTGGGTGGAT (有意義引子)(序列識別11號)

aox18; GAATTCAGTAAACGCATTAG (反義引子)(序列識別12號)

PCR條件與在實例4中所示的相同，除了使用HF聚合酶(Clontech)作為DNA聚合酶以外。以aox 15和aox 16之組合，擴大具有0.7 kb之長度的片段。以aox 17和aox 18之組合，擴大具有0.5 kb之長度的片段。將這些片段選殖到pCR2.1-TOPO內，並轉化大腸桿菌TOP10。分別從6個獨立的白色菌落製備質體，並使其接受定序。結果，獲得預期的純種系，其插入片段的序列是彼此相同的。將以aox 15和aox 16之組合獲得的純種系命名為pAOX714#1516。將以aox 17和aox 18之組合獲得的純種系命名為pAOX714#1718。由於定序的結果，判定pAOX714#1516和pAOX714#1718之序列，含有得自紅酶法菲亞酵母之AOX基因的啟動基因區。經過判定含有AOX啟動基因之序列的長度為1406個鹼基對。

混合在實例8和9中獲得的序列，判定該核苷酸序列(3.7 kb)含有AOX基因及其啟動基因和終止轉錄之序列(序列識別2號)。

五、發明說明 (29)

實例 10：建構 AOX 基因的反義質體

藉著 PCR 方法擴大涵蓋 AOX 基因之整個結構基因的反義基因片段，然後選殖到整合載體內，其中藉著在紅酶法菲亞酵母中的 AST 啟動基因轉錄反義 AOX 基因。

表 7

在反義建構 AOX 基因時所使用的引子序列

aox101; GGCCATTATGGCCTCAATTGGTCTGAGACATGC (序列識別 13 號)

aox102; GGCCGAGGCGGCCATGTCTCTTGCTAGATGTCT (序列識別 14 號)

兩個引子，aox101 和 102 對限制酵素 SfiI (GGCCNNNNNGGCC) 具有不對稱的認知序列，但設計其不對稱的殘留序列將是不同的。這可能得以定向選殖至在其連接序列處具有相同不對稱之序列的表現載體內。

藉著使用 HF 聚合酶 (Clontech) 作為 Taq 聚合酶，並使用在實例 3 中製備的 cDNA 作為模板，在如下的條件下進行 PCR：94°C 15 秒，55°C 30 秒，和 72°C 45 秒，30 次循環。純化經過擴大的 PCR 片段，並選殖到 pCR2.1-TOPO 載體內。由於定序的結果，顯示一個純種系具有正確的片段，並將該純種系稱為 pAOX1007 #0102。在序列識別 15 號中列舉 AOX 基因之反義片段的序列。

至於駕馭反義 AOX 基因轉錄的啟動基因和終止轉錄序列的片段，可從在實例 5 中製備之染色體中選殖 AST 啟動基因和終止轉錄之序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (30)

表 8

選殖AST啓動基因和終止轉錄序列時所使用的引子序列
ast49; GCGGCCGCACGTACAGACTAAGATCGAC (有意義
引子)(序列識別16號)

ast50; GGCCATAATGGCCATGGAGAAAGTAGGTGGCAA (反
義引子)(序列識別17號)

ast36; CTGCAGGCCGCCTCGGCCGTTGATTCTTCATATGTTAA
(有意義引子)(序列識別18號)

ast37; GGTACCCTGCAGTCGACAAACATGAA (反義引子)
(序列識別19號)

PCR條件如下；94℃ 15秒，55℃ 30秒和72℃ 90秒，25次
循環。以ast49和ast50之組合，擴大具有1.25 kb之長度的片
段。ast36和ast37之組合，擴大具有0.3 kb之長度的片段。
將這些片段選殖到pCR2.1-TOPO內，並轉化大腸桿菌
TOP10。分別從6個獨立的白色菌落製備質體，並使其接受
定序。結果，選出具有正確AST啓動基因和終止轉錄序列
(歐洲專利1 035 206 A1號)之序列的純種系，以供進一步
的研究(對於AST啓動基因而言為pUAST407，對AST終止
轉錄之序列而言為pAST526 #3637)。

接下來，藉著使NotI-加KpnI-消化之pAST526 #3637和
KpnI-加SacI-消化之pG418Sa330 (歐洲專利1 035 206 A1號)
與NotI-和SacI-消化之pBluescriptII SK-(Stratagene)連接，
將AST終止轉錄的序列與G418抗藥性卡匣融合。將該連接
混合物轉化至合格的KB822細胞內。由於限制分析的結

五、發明說明 (31)

果，選出一個具有正確結構的純種系(pUAST418)，以供進一步的研究。

然後將含有核糖體 DNA (rDNA) 位點 (Wery 等人, Gene, 184, 89-97, 1997) 的 3.1 kb 之 SacI 片段插入 pUAST418 之 G418 卡匣的下游。rDNA 片段以多重副本出現在真核生物的染色體上。經由 rDNA 片段的整合事件，導致在所使用之宿主的染色體上整合多重副本，並得以過度表現藏匿在表現載體中的外來基因。爲了此一目的，將得自含有 rDNA 基因之 pGBPh9 的 SacI 片段，與以 SacI- 消化並以細菌鹼性磷酸酶 - 處理的 pUAST418 連接。將連接混合物轉化至合格的 KB822 細胞中。由於限制分析的結果，選出兩個純種系，其中以彼此不同的方位將 rDNA 片段插入，以供進一步的研究 (pURDNA421 和 pURDNAR421)。

接著，將 AST 啟動基因插入 AST 終止轉錄之序列的上游，以便建構在紅酶法菲亞酵母中具有功能的表現載體。將 pUAST407 的 1.0 kb 之 NotI- 和 BglII- 片段，和 pUAST407 的 0.25 kb 之 BglII- 和 PstI- 片段，與以 NotI- 和 Sse8387I- 消化的 pURDNA421 或 pURDNAR421 連接。藉著以連接混合物轉化合格的 KB822 細胞，並使 6 個所得的菌落分別接受限制分析。選出具有正確插入 AST 啟動基因的純種系，以供進一步的研究 (pF718 和 pR718 具有彼此相反之方位的 rDNA 片段)。

最後，藉著將 pAOX1007#0102 的 1.2 kb 之 SfiI 片段插入以 SfiI- 消化的 pF718 或 pR718 內，完成反義 AOX 構築體。將所

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(32)

得的質體命名為pFAOX828和pRAOX828。

實例 11：以 AOX-反義載體轉化紅酶法菲亞酵母

將 AOX-反義載體，pFAOX828和pRAOX828轉化至紅酶法菲亞酵母野外型品系，ATCC96594內。根據在 Methods in Molecular Biology(Johnson等人, 53; 147-153, 1996)中描述的方法，進行生物列舉(Biolistic)轉化作用。在 YPD 培養基中培養紅酶法菲亞酵母品系 ATCC96594 至穩定相。在離心肉湯之後，利用蒸餾水份，將細胞濃縮 10 倍，並將 200 微升細胞懸浮液散播在含有 100 微克/毫升選擇試劑和 0.75M D-甘露糖醇和 D-山梨糖醇的 YPD 培養基上。將 5 微克質體塗覆在 1.5 毫克的 0.9 微米金顆粒上，並用來作為生物列舉轉化作用的捐贈者 DNAs。選出一個以 pFAOX828 轉化，並顯示出增加染色的選擇試劑耐受性菌落，就其蝦青素生產力及其降低由 AOX 基因編碼之交替氧化酶活性的觀點，進一步定出特徵。

實例 12：定出衍生自紅酶法菲亞酵母，ATCC96594 之 pFAOX828 整合體的特徵

藉著使用其在試管(直徑 21 毫米)中，在 10 毫升 YPD 培養基中生長 3 天的種子培養物，將紅酶法菲亞酵母轉化物，ATCC96594::pFAOX828，連同其親代品系 ATCC96594 一起，在 20°C 下，在 500 毫升錐形燒瓶中，培養在 50 毫升 YPD 培養基中 3 天。在不同的時間點，例如在接種之後 24、43 和 65 小時時，取回適當體積的培養肉湯，並用來分析其生長、蝦青素之生產力，以及在 KCN 的存在或缺乏之下，其

五、發明說明 (33)

氧攝取的活性。該24、43和65小時-時間點，分別相當於其生長的晚對數-相、中-穩定相和晚期穩定相。

關於生長的分析，藉著使用UV-1200光度計(Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)測量在660毫微米處的光密度，此外，藉著在100°C下，弄乾在微量離心之後衍生自1毫升肉湯的細胞一天，判定其乾細胞質量。

關於蝦青素和總類胡蘿蔔素之內含量的分析，在微量離心之後，從1.0毫升肉湯中收獲細胞，並用來進行藉著以玻璃小珠打破，從紅酶法菲亞酵母的細胞中萃取類胡蘿蔔素的作用。在萃取之後，藉著離心移除打破的細胞，並利用HPLC對殘餘物進行類胡蘿蔔素內含量的分析。所使用的HPLC條件如下：

HPLC管柱：Chrompack Lichrosorb si-60 (4.6毫米，250毫米)

溫度：室溫

洗脫液：乙腈/己烷(18/82)在洗脫液中加入1毫升/公升的水
注射體積：10微升

流速：2.0毫升/分鐘

檢測：以450毫微米之UV

從F. Hoffmann-La Roche AG(Basel, Switzerland)獲得蝦青素的參考試樣。

爲了在KCN的存在或缺乏之下，藉著測量氧攝取活性來判定呼吸活性，使用由Iijima Electronics Corporation (Aichi, Japan)製造的DO計量器B-505型和DO探針GU-BM。以0.5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (34)

M KPB (pH 7.4)使收獲的細胞再懸浮。然後，在DO分析的小室中，以2.3毫升的水稀釋200微升該細胞懸浮液。藉著在0.48 mM KCN的存在或缺乏之下，加入0.2毫升1 M葡萄糖開始測量。

在表9中概述其結果。

表 9

品 系	ATCC96594:: pFAOX828			ATCC96594		
	24	43	65	24	43	65
時間(小時)	24	43	65	24	43	65
在660毫微米處之OD	22.75	28.26	27.91	28.75	31.707	31.10
乾細胞(毫克/毫升)	10.8	12.7	12.3	11.6	12.1	11.6
蝦青素(毫克/克-乾細胞)	0.090	0.223	0.240	0.107	0.194	0.211
類胡蘿蔔素(毫克/克-乾細胞)	0.218	0.336	0.354	0.213	0.269	0.288
呼 吸						
- KCN敏 感 性	11.29	5.84	4.02	16.03	6.13	4.96
- KCN耐 受 性	0.29	0	0	1.48	0.78	0.15

(以毫微莫耳 O₂-攝取/分鐘x毫克-乾細胞，表示呼吸的活性)。

如同在表9中所示，反義 AOX 轉化物 ATCC96594::pFAOX828，在培養43小時時，顯示出類似親代品系ATCC96594的細胞產量，雖然其在24小時處顯示較慢的生長。轉化物的蝦青素和類胡蘿蔔素內含量增加了15%。從其呼吸活性的觀點來看，轉化物對其宿主品系具有類似的

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (35)

KCN-敏感性呼吸活性(95%)，但在24小時時，降低由交替氧化酶調節之KCN-耐受性呼吸，至其宿主品系的20%含量，並在培養的43小時時完全損害。

從該結果中，指出降低調節KCN-耐受性呼吸的交替氧化酶活性，可能導致在紅酶法菲亞酵母中過度產生蝦青素和類胡蘿蔔素。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (36)

序 列 - 覽 表

<110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

<120> 類胡蘿蔔素之生物產製的改良及其生物物質

<130> Case 20685

<140> -

<141> -

<150> 00111148.3

<151> 2000-05-24

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 401

<212> 蛋白質

<213> 紅酶法菲亞酵母

<400> 1

Met	Ser	Leu	Ala	Arg	Cys	Leu	Val	Gln	Ala	Ser	Thr	Arg	Ser	Leu
1				5					10					15

Ser	Arg	Thr	Val	Arg	Pro	Ser	Tyr	Leu	Thr	Pro	Leu	Thr	Val	His
				20					25					30

Phe	Phe	Ser	Ser	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Cys	Ser	Arg	Ser	Tyr	Ser
				35					40					45

Thr	Ser	Asn	Thr	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	Asn	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr
				50					55					60

His	His	Leu	Ala	Asp	Asn	Val	Pro	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Gln	Arg
				65					70					75

His	Leu	Gln	Gly	Val	Ile	Gly	Gly	Glu	Gly	Met	His	Gln	His	Asp
				80					85					90

Ala	Thr	Thr	Val	Ala	His	Thr	Asp	Pro	Leu	Ala	Ser	Val	Ile	Gln
				95					100					105

Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	Val	Met	His	Asn	Pro
				110					115					120

Val	Tyr	Thr	Arg	Thr	Glu	Leu	Asp	Ala	Val	Gln	Val	Val	His	Arg
				125					130					135

Pro	Pro	Thr	Asn	Thr	Ser	Asp	Gln	Val	Ser	Thr	Lys	Leu	Val	Lys
				140					145					150

Met	Leu	Arg	Trp	Gly	Phe	Asp	Leu	Val	Ser	Asn	Tyr	Lys	His	Val
				155					160					165

Pro	Phe	Pro	Ala	Asn	His	Lys	Glu	Leu	Ser	Val	Thr	Gln	Leu	Arg
				170					175					180

五、發明說明 (37)

Gln Met Gly Cys	Leu	Leu Ser Pro Asp	Gln Trp Met Thr Arg Phe
	185		190 195
Ile Phe Leu Glu	Thr Thr Ala Ala Ile	Pro Gly Met Val Gly Gly	
	200	205	210
Leu Leu Arg His	Leu Gln Ser Leu Arg	Leu Met Arg Arg Asp Gly	
	215	220	225
Gly Trp Ile His	Thr Leu Leu Ala Glu	Ala Glu Asn Glu Arg Leu	
	230	235	240
His Leu Leu Thr	Phe Met Ser Met Ala	Asn Pro Pro Leu Trp Phe	
	245	250	255
Arg Ala Leu Ile	Leu Gly Ala Gln Gly	Val Phe Tyr Asn Leu Phe	
	260	265	270
Phe Ile Thr Tyr	Leu Ile Ser Pro Pro	Val Ala His Arg Phe Val	
	275	280	285
Ala Cys Leu Glu	Glu Glu Ala Val Val	Thr Tyr Thr Arg Ile Ile	
	290	295	300
Ser Asp Ile Glu	Asn Gly Tyr Val Pro	Glu Trp Glu Lys Leu Pro	
	305	310	315
Ala Pro Glu Ile	Ala Ile Ser Tyr Trp	Arg Leu Pro Pro Asp Ala	
	320	325	330
Thr Phe Leu Asp	Thr Leu Arg Ala Ile	Arg Ala Asp Glu Ala Thr	
	335	340	345
His Arg Phe Val	Asn His Thr Phe Ala	Ser Leu Asp Ser Lys Lys	
	350	355	360
Asp Phe Asn Pro	Phe Ala Ile Ala Glu	Pro Asp Ala Thr Thr Lys	
	365	370	375
Gly Ser Val Tyr	Gly Phe Thr Arg Asp	Glu Ala Ala Ala Phe Ala	
	380	385	390
Gln Lys Thr Arg	Glu Arg Met Ser Gln	Thr Asn	
	395	400	

<210> 2

<211> 3724,

<212> DNA

<213> 紅酶法菲亞酵母

<220>

<221> 表現序列

<222> (1407)..(1674)

<220>

<221> 插入序列

<222> (1675)..(1769)

<220>

<221> 表現序列

五、發明說明 (38)

<222> (1770) .. (1873)

<220>

<221> 插入序列

<222> (1874) .. (1948)

<220>

<221> 表現序列

<222> (1949) .. (2155)

<220>

<221> 插入序列

<222> (2156) .. (2264)

<220>

<221> 表現序列

<222> (2265) .. (2295)

<220>

<221> 插入序列

<222> (2296) .. (2372)

<220>

<221> 表現序列

<222> (2373) .. (2423)

<220>

<221> 插入序列

<222> (2424) .. (2515)

<220>

<221> 表現序列

<222> (2516) .. (2645)

<220>

<221> 插入序列

<222> (2646) .. (2735)

<220>

<221> 表現序列

<222> (2736) .. (2831)

<220>

<221> 插入序列

<222> (2832) .. (2914)

<220>

<221> 表現序列

<222> (2915) .. (2998)

<220>

<221> 插入序列

<222> (2999) .. (3085)

<220>

<221> 表現序列

<222> (3086) .. (3206)

<220>

<221> 插入序列

<222> (3207) .. (3320)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (39)

<220>
 <221> 表現序列
 <222> (3321)..(3434)

<220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1295)..(1296)
 <223> (EXPERIMENTAL)

<220>
 <221> 聚A_位置
 <222> (3682)..(3683)
 <223> (EXPERIMENTAL)

<400> 2
 gaattcaaca ggtcaaatga gaaaggacaa ggtgaagaga tggaaccaga 50
 agcaatcagc gagagtaaag acgatggttc taaacataca ttgggcacga 100
 ctcccttgat ccgaggcagg tatacgacca gatacaaaaa caagctgacg 150
 gtcacggccg aaaataggaa ggagagttgc aacgctcggc taaagaaggt 200
 ggattcaatc acaacacacg gtcaaggcaa gcatgacata ttgagctttt 250
 gcttgagtat ctgcgatca aagtgatgat ggatgcttct aaggatcgtc 300
 tttatctttc cgccaggaga tgtgcaataa caagagagga agagaaacgt 350
 aaaggagtgt actcacatgc ccaaaccacc ggcgttggat tcgagaagag 400
 ctcttcttag gctgtctccg acgcccgaat ggcgagcgcc caatagtcca 450
 aacacgatgt acttgccatt ccgaagaagg ttaggaaggt atgggctcga 500
 agctgctgat tgaccagaca taggacaaga acaaataaag agacaagaaa 550
 cgacaacgac cgagcagata tctgactaga gaaaaccgtg gcgacgttgc 600
 aatgtttggg cccgaaaaaa gatgagttgc tttgttttcg agtcgtcctg 650
 tagccccagc tggggactag ccgctgtcac gaggaaacag gcgtgggtgg 700
 atgctccacc acatggatgg ttacacacgc cacactgccg cacgctgcgc 750
 agatataacc cgttcaacac ccgacaacga actggttgac cttccgaggt 800
 gaccatcaag cttggatggt cagctgcgat attcagctac gatgatatgt 850
 atgccgaaca caagtagtaa aatggctcag aaagacacag aagaaacggc 900
 gttcattact ccgaaagacg agacatcccc gcatgaatct ctggacgata 950
 aagccaagcg gacggacgga agccattgg cgatggtcgg ttactaacc 1000
 tgctggcttc actgcttggc ctgacttgac tgtctcttcc tcaacttgctg 1050
 tcttgactcg gtcgacggat aactcgccaa acccatcaac acggcagtcc 1100
 gtttagatatt ccgttccac ctcttcttcg agtttccgtt catgctctac 1150
 taatgcgttt actgaattca acacaatgtc taattgaatc tgctgactgt 1200

五、發明說明 (40)

actgcctggt gatctgaggt ttctgacact aacatgactt atcatttggc 1250
 tgacttataa atagttcgag accaacagct cttaattctg atcctgccta 1300
 catacatatc tactctttgc tggaccattg catcaaacca ttgcacgctt 1350
 ctctccatac tggctatatc acaatacctg ccatatacat tgcccaacta 1400
 ccaaca atg tct ctt gct aga tgt ctt gtc cag gca tca act 1442
 cgg tca ctt tgc cgt acc gtt cgg cca tcc tat ctc aca cct 1484
 cta aca gtt cac ttc ttc tcc tca aca atc tca agg agc tgc 1526
 tcc agg tca tat tca acg tgc aac acc cgc ctt tca aca tct 1568
 aat ggt caa caa tca acg cat cat ctt gcg gac aat gtt cct 1610
 ctc acc acc gac aaa caa agg cac ctt caa ggc gtc atc ggc 1652
 ggt gag ggc atg cat cag cat g gtccgttctt ctgtcctcta 1694
 tcatattcgt atcaaaatat ggattagtgc ttattcacaa ttctttatct 1744
 catcaaacat gcttactgtc catag at gca acg acg gta gct cat 1789
 acg gat ccc tta gct tcc gtc ata caa gat ttg act gtt ccc 1831
 act aac gga tct tgg gtg atg cat aat ccc gtc tat act cga 1873
 gtacgtctct gaacgcttcg cttcaattat tctgcgcta gctacagctc 1923
 accggtcctt ctccctttct gacag act gag tta gat gct gtt cag 1969
 gtc gtt cat cgt ccc ccc acc aac acg tcc gac caa gtc tcc 2011
 acc aag ctt gtc aag atg ctc cga tgg gga ttc gac ctt gtc 2053
 agc aac tac aaa cat gtt ccc ttt ccc gca aac cac aaa gaa 2095
 ctc agc gtc act caa ttg cgc caa atg ggc tgt ctt ctc tgc 2137
 cct gat caa tgg atg acg gttagtatta cttactcttg tgcgcagtat 2185
 tcatggcaac atattgctca tctagtcaag tgcacacgtc catttcgtct 2235
 aatttggttac tttttctgaa aattcacag agg ttc atc ttt cta gaa 2282
 aca aca gct gct a gttcgttcac ccaccaacac aaccattctt 2325
 gataataccc actttttctt cgatactgat atttatactc aacctag tt 2374
 cct gga atg gtt ggc ggt ctc ttg cgc cat ctt cag tct ctc 2416
 cga ctc a gttcgtttca ttctttcttc tgcattgatc atcgttttgg 2463
 catcatctgt tgataagcat agtccttacg cattcgatct tgattcgttc 2513
 ag tg cga cgg gat ggt ggt tgg att cac acg ctt ctt gct 2553
 gaa gct gaa aac gaa cgt ctc cac ctt ctg acg ttc atg agc 2604

五、發明說明 (41)

atg gct aat cca cct ctg tgg ttc cga gct ttg ata ctg gga 2637
 gct caa gg gtcagccttt tttatcatta ttaatatataa tttctctctc 2685
 tagacgatca cggaccatgt gctgagaggg tcttcatata tgctttgcag 2735
 g gtt ttt tat aac ctg ttc ttc ata act tat tta att tcc 2775
 ccg ccg gtg gct cat cga ttc gtt gcc tgc ctg gag gaa gaa 2817
 gct gtc gtt act ta gtaagatcga tcgttgcaat catgctcgag 2861
 tagtctttta gtttggttaat cattcgattg ggattggttt cgtatttcat 2911
 cag c aca aga att atc agt gat atc gag aac ggc tat gta 2951
 cct gaa tgg gaa aag ctt ccc gct ccc gag att gct ata tct 2993
 tac tg gtctgcttga cttcagtcgc acagtttcat ttgtcttgac 3038
 atgtaaattg ttactgacaa tatgctcaca aatatcacct tcatcag g 3086
 cga ctt cct ccc gat gct acc ttt ttg gac aca ctg cga gcc 3128
 atc cga gca gat gag gcc act cat cga ttc gtg aat cac aca 3170
 ttt gcc agc ctg gac tct aag aaa gac ttc aat cca 3206
 gttcgtatag accttccaaa ccctaactgc gcgtcctcga ctgaaactta 3256
 tagattgac aaatctcaaa ccttcattcg cctgtcatto atctctgttt 3306
 cgaaatcaca taag ttt gcg ata gcc gag cca gac gcc act act 3350
 aaa ggc tcg gta tat ggt ttc aca cgg gac gag gcc gcc gcc 3392
 ttc gct cag aag acg aga gaa cgc atg tct cag acc aat tga 3434
 tattcatccc taattgtcct atactctttc tcttcttcat gtttgattct 3484
 ctgtactatt ttctggcggt ttgtatagtt ttatgggtca agttcggttt 3534
 tcttttttgg ttgttcttct ctttcccata ttgaataaaa tccgtctatg 3584
 ttttcccttga tcttgattcg gatcgattgt cactcctcac tccctctctcc 3634
 tcattcatct actctacctc agtcttatat gggttatgtc gcttccttct 3684
 caaatgacat acgcaaactc agtatttgag aacattgtga 3724

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

<223> 人造序列的說明：簡併PCR引子(有意義引子)

<400> 3

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (42)

aaygarmgna tgcayytnyt nacntt 26

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

<223> 人造序列的說明：簡併PCR引子(反義引子)

<400> 4

gcytcytcyt cnarrtancec nacraa 26

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

<223> 人造序列的說明：定序引子(5'核苷酸以Cy5-標示)

<400> 5

agctacaaca tacgaaaggg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

<223> 人造序列的說明：定序引子(5'核苷酸以Cy5-標示)

<400> 6

ggggaactga gagctctaaa 20

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

<223> 人造序列的說明：基因組步行PCR引子(主要引子)

<400> 7

gtgtcagaaa cctcagatca acaggc 26

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

<223> 人造序列的說明：基因組步行PCR引子(巢式引子)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (43)

<400> 8
caacaggcag tacagtcagc agattc 26

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造的序列

<220>
<223> 人造序列的說明：PCR引子，用來選殖啟動基因區
(有意義引子)

<400> 9
gaattcaaca ggtcaaatga 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造的序列

<220>
<223> 人造序列的說明：PCR引子，用來選殖啟動基因區
(反義引子)

<400> 10
atccacccac gcctgtttcc 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造的序列

<220>
<223> 人造序列的說明：PCR引子，用來選殖啟動基因區
(有意義引子)

<400> 11
ggaaacaggc gtgggtggat 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造的序列

<220>
<223> 人造序列的說明：PCR引子，用來選殖啟動基因區
(反義引子)

<400> 12
gaattcagta aacgcattag 20

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> 人造的序列

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(44)

<220>

<223> 人造序列的說明：PCR引子，用來建構反義AOX基因
(有意義引子)

<400> 13

ggccattatg gcctcaattg gtctgagaca tgc

33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

<223> 人造序列的說明：PCR引子，用來建構反義AOX基因
(反義引子)

<400> 14

ggccgaggcg gccatgtctc ttgctagatg tct

33

<210> 15

<211> 1232

<212> DNA

<213> 紅酶法菲亞醇

<400> 15

ggccattatg gcctcaattg gtctgagaca tgcgttctct cgtcttctga 50

gcgaaggcgg cgccctcgtc ccgtgtgaaa ccatataccg agcccttagt 100

agtggcgtct ggctcggcta tcgcaaattg attgaagtct ttcttagagt 150

ccaggctggc aaatgtgtga ttcacgaatc gatgagtggc ctcatctgct 200

cggatggctc gcagtgtgtc caaaaaggta gcatcgggag gaagtcgcca 250

gtaagatata gcaatctcgg gagcgggaag cttttcccat tcaggtagat 300

agccgttctc gatatcactg ataattcttg tgtaagtaac gacagcttct 350

tcctccaggc aggcaacgaa tcgatgagcc accggcgggg aaattaaata 400

agttatgaag aacaggttat aaaaaacccc ttgagctccc agtatcaaag 450

ctcggaaacca gagaggtgga ttagccatgc tcatgaacgt cagaagggtg 500

agacgttctg tttcagcttc agcaagaagc gtgtgaatcc aaccaccatc 550

ccgtcgcgatg agtcggagag actgaagatg gcgcaagaga ccgccaacca 600

ttccaggaat agcagctgtt gtttctagaa agatgaacct cgtcatccat 650

tgatcaggcg agagaagaca gccattttgg cgcaattgag tgacgctgag 700

ttctttgtgg tttgcgggaa agggaacatg tttgtagttg ctgacaaggt 750

cgaatcccca tcggagcatc ttgacaagct tgggtggagac ttggtcggac 800

gtgttggtgg ggggacgatg aacgacctga acagcatcta actcagttcg 850

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (45)

agtatagacg ggattatgca tcacccaaga tccgtttagtg ggaacagtca 900
 aatcttgat gacggaagct aagggatccg tatgagctac cgtcgttgca 950
 tcatgctgat gcatgccctc accgccgatg acgccttgaa ggtgcctttg 1000
 tttgtcgggtg gtgagaggaa cattgtccgc aagatgatgc gttgattgtt 1050
 gaccattaga tggtgaaagg cgggtgttcg acgttgaata tgacctggag 1100
 cagctccttg agattgttga ggagaagaag tgaactgtta gaggtgtgag 1150
 ataggatggc cgaacggtac gcgaaagtga ccgagttgat gcctggacaa 1200
 gacatctagc aagagacatg gccgcctcgg cc 1232

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

<223> 人造序列的說明：PCR引子，用來選殖AST啟動基因
(有意義引子)

<400> 16

gcggccgcac gtacagacta agatcgac 28

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

<223> 人造序列的說明：PCR引子，用來選殖AST啟動基因
(反義引子)

<400> 17

ggccataatg gccatggaga aagtaggtgg caa 33

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

<223> 人造序列的說明：PCR引子，用來選殖AST終止轉錄之序列
(有意義引子)

<400> 18

cctgcaggggcc gcctcggccg ttgattcttc atatgttaa 39

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> 人造的序列

<220>

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (46)

<223> 人造序列的說明：PCR引子，用來選殖AST終止轉錄之序列
(反義引子)

<400> 19

ggtaccctgc agtcgacaaa catgaa

26

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

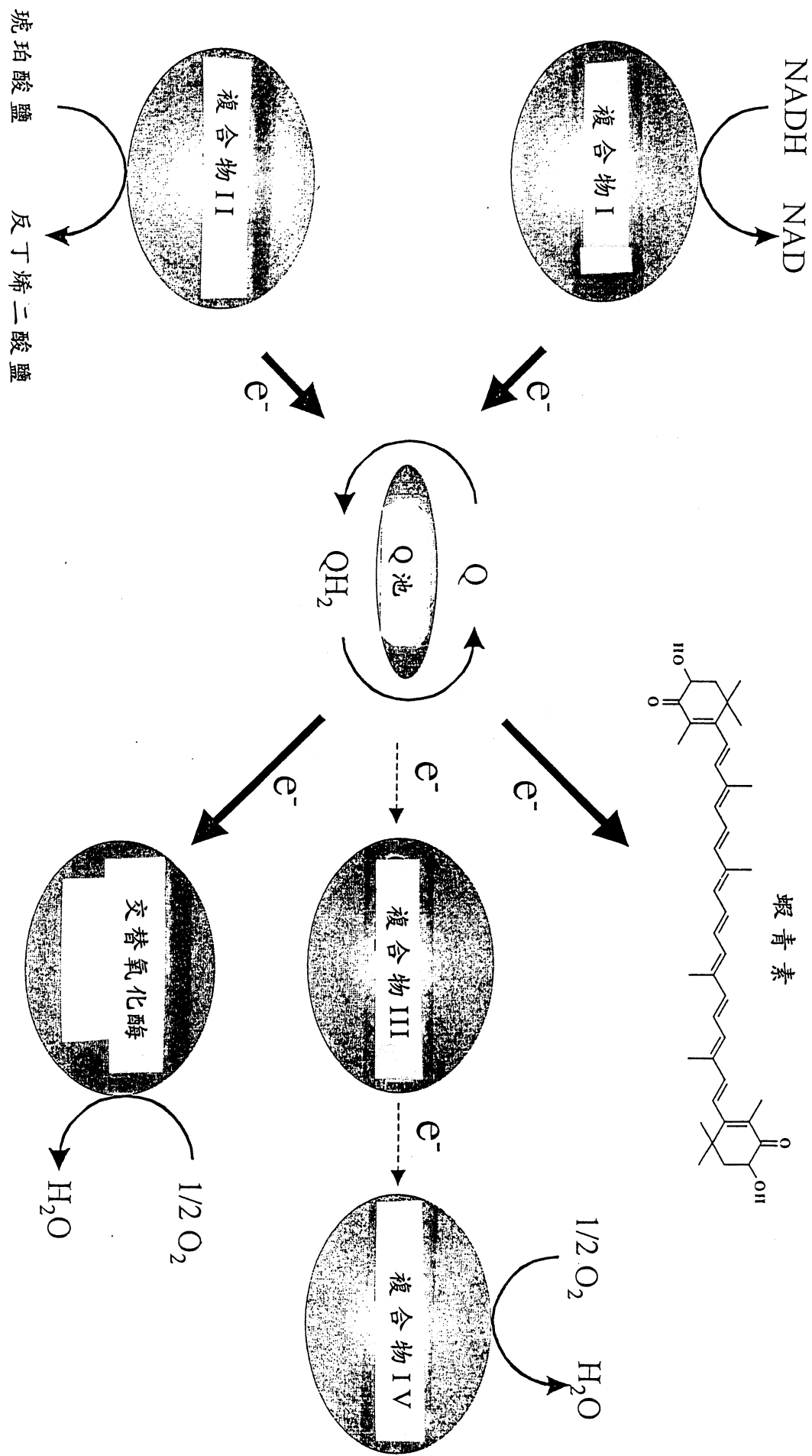


圖 1

申請日期	90. 5. 21.
案 號	090112095
類 別	C12N 15/33, 15/11

A4

C4

中文說明書替換頁(94年8月)

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	製備類胡蘿蔔素之方法
	英 文	"PROCESS FOR PRODUCING CAROTENOIDS"
二、發明人	姓 名	1.星野 辰夫 2.小島 和幸 TATSUO HOSHINO KAZUYUKI OJIMA 3.瀨戶口 豊 YUTAKA SETOGUCHI
	國 籍	1-3.均日本
	住、居所	1.日本國神奈川縣鎌倉市蒲江田808-47 2.日本國神奈川縣富士澤市善行檀園地3-22-304 3.日本國神奈川縣富士澤市片瀨山4-27-2
三、申請人	姓 名 (名 稱)	荷蘭商DSM智財資產公司 DSM IP ASSETS B.V.
	國 籍	荷蘭
	住、居所 (事務所)	荷蘭提希蘭市海特奧芙倫路1號
	代 表 人 姓 名	J 丹 哈托 HARTOG, J. DEN

70747-940803.doc

-1-

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱： 製備類胡蘿蔔素之方法)

本發明係關於製備類胡蘿蔔素之方法，其包括培養可藉著在引起交替氧化酶活性降低的條件下，處理可產生類胡蘿蔔素之親代生物而獲得的生物，並選擇提高其類胡蘿蔔素生產力的生物。

英文發明摘要(發明之名稱： "PROCESS FOR PRODUCING CAROTENOIDS")

Process for producing carotenoids, which comprises cultivating an organism which is obtainable by treating a parent organism producible of carotenoids under the condition to induce a reduction of an alternative oxidase activity and selecting an organism of which productivity of carotenoids is enhanced.



六、申請專利範圍

1. 一種產製具增進類胡蘿蔔素生產力之微生物的方法，其包括：

- (a) 選擇可產生類胡蘿蔔素之親代微生物，且其包含編碼具有交替氧化酶(AOX)活性之多肽之聚核苷酸序列，其中該聚核苷酸序列係選自由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:2之片段及與SEQ ID NO:2之互補物在下述條件下進行雜交之聚核苷酸所組成之群組：

雜交條件

6X SSC

0.5% SDS

100微克/毫升變性的鮭精DNA

50% 甲醯胺

在42℃下培養過夜；

以2X SSC，0.5% SDS在室溫下沖洗一次15分鐘，

接著以0.1X SSC，0.5% SDS在室溫下沖洗另一次15分鐘；

- (b) 在親代微生物中改變該聚核苷酸序列以形成一突變微生物，該突變具有相較於親代微生物降低之AOX酵素活性；及

- (c) 選擇突變微生物，其中該突變微生物相較於親代微生物可產生至少多10%的類胡蘿蔔素。

2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該改變步驟包括選自於該微生物導入產生對微生物中該聚核苷酸互補之反義股的質體及指定-位置突變生成作用之技術。

六、申請專利範圍

3. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該親代微生物係原生生物或真菌。
4. 根據申請專利範圍第3項之方法，其中該親代微生物係選自由賽內奇球菌屬 (*Synechococcus*)、賽內奇囊球菌屬 (*Synechocystis*)、血液球菌屬 (*Haematococcus*)、多納利菌屬 (*Dunaliella*)、法菲亞酵母菌屬 (*Phaffia*)、葉黃素黴屬 (*Xanthophyllomyces*)、鏈孢黴屬 (*Neurospora*)、紅酵母屬 (*Rhodorula*)、布拉黴屬 (*Blakeslea*) 及藻狀菌屬 (*Phycomyces*) 所組成之一員。
5. 根據申請專利範圍第4項之方法，其中該親代微生物係紅酶法菲亞酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 之品系。
6. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該親代微生物係選自由 DSM 13429、13430 和 13431 品系所組成之群組。
7. 一種具增進類胡蘿蔔素生產力之突變微生物，其係得自一親代類胡蘿蔔素生產力之微生物，其中該親代微生物包含編碼具有交替氧化酶(AOX)活性之多肽之聚核苷酸序列，其中該聚核苷酸序列係選自由 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:2 之片段及與 SEQ ID NO:2 之互補物在下述條件下進行雜交之聚核苷酸所組成之群組：

雜交條件

6X SSC

0.5% SDS

100微克/毫升變性的鮭精DNA

50% 甲醯胺

六、申請專利範圍

在42℃下培養過夜；

以2X SSC，0.5% SDS在室溫下沖洗一次15分鐘，接著以

0.1X SSC，0.5% SDS在室溫下沖洗另一次15分鐘；

其中突變體之AOX酵素活性相較於親代微生物係降低的，且

該突變體可產製相較於親代微生物至少多10%的類胡蘿蔔素。