



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104450642 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410513308. 6	<i>C12N 15/63</i> (2006. 01)
(22) 申请日 2005. 10. 17	<i>C12N 1/21</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据	<i>C12N 1/20</i> (2006. 01)
0423139. 5 2004. 10. 18 GB	<i>C12N 1/15</i> (2006. 01)
(62) 分案原申请数据	<i>C12N 1/19</i> (2006. 01)
200580035619. 5 2005. 10. 17	<i>A23L 1/30</i> (2006. 01)
	<i>A23K 1/165</i> (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

NCIMB 41248 2004. 09. 22

(71) 申请人 杜邦营养生物科学有限公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 安德烈·米亚斯尼科夫

维杰伊·库玛 奥利弗·肯施

克劳斯·佩伦加尔 伯吉塔·勒思纳

乌尔里克·凯特林

安德烈·科尔特曼

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限

公司 72003

代理人 王芝艳 吴小瑛

(51) Int. Cl.

C12N 9/16(2006. 01)

C12N 15/55(2006. 01)

权利要求书4页 说明书42页

序列表7页 附图2页

(54) 发明名称

酶

(57) 摘要

本发明涉及酶和方法。尤其描述了用编码细菌肌醇六磷酸酶和其变体的核酸转化或转染的宿主细胞。

1. 一种多肽,其包含对应于布丘氏菌属肌醇六磷酸酶或其修饰形式、同源多肽、变体、功能等同物或有效片段的氨基酸序列。

2. 权利要求 1 的多肽,其包含如 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列或与其具有至少 75%同一性(同源性),优选具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性(同源性)的序列或其功能片段。

3. 权利要求 1 或 2 的多肽,其中所述多肽为分离的和/或纯化的。

4. 权利要求 1-3 的多肽,其中所述多肽显示肌醇六磷酸酶活性。

5. 权利要求 1-4 的多肽,其特征在于它可获自、优选源自以登录号 NCIMB 41248 保藏的布丘氏菌属菌株 P1-29。

6. 权利要求 4 或 5 的多肽或其功能等同物,其特征在于所述肌醇六磷酸酶具有至少 100,更优选至少 200,最优选至少 300U/mg 的比活,其中所述比活通过将所述肌醇六磷酸酶在溶液中在 37°C 的温度温育而测定,所述溶液包含溶于 200mM 醋酸钠缓冲液、pH4.5 中的 2mM 肌醇六磷酸、0.8mM CaCl₂。

7. 权利要求 4-6 的多肽或其功能等同物,其特征在于所述肌醇六磷酸酶在约 pH 3-6,优选约 pH 4-5,最优选约 pH 4.5 具有活性最大值,其中所述活性通过将所述肌醇六磷酸酶在溶液中在 37°C 的温度温育而测定,所述溶液包含溶于 200mM 醋酸钠缓冲液中的 2mM 肌醇六磷酸、0.8mM CaCl₂。

8. 权利要求 1 至 7 中任一项的多肽,其在至少一个下列位点(根据 SEQ ID No. 3 中的编号方法进行编号)包含突变:59、70、122、125、167、193、197、204、209、211、221、223、225、240、242、244、268、281、289、294、303、336 或 351。

9. 权利要求 8 的多肽,其中所述肌醇六磷酸酶包括一个或多个下列突变:

K59A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 N70A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W 或 Y;

或 A122C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 D125A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 T167A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W 或 Y;

或 H193A、C、D、E、F、G、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 F197A、C、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 T204A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W 或 Y;

或 T209A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W 或 Y;

或 A211C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 S221A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 D223A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 G225A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W 或 Y;

或 K240A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 A242C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 D244A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 A268C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 S281A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y;

或 Q289A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W 或 Y；
或 A294C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；
或 N303A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；
或 I336A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；
或 N351A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y。

10. 权利要求 8 或 9 的多肽 / 肌醇六磷酸酶, 其包括选自下组的至少一个突变 :K59E ;
T167V ;K240T ;T167I ;K240E ;D244C ;Q289Y ;T209K 或 F197S。

11. 权利要求 8 至 10 的多肽 / 肌醇六磷酸酶, 其包括选自下组的突变组合 :

D125E/H193R ;或

A294E/N303K ;或

T167I/K240T ;或

D223E/K240E/N351D ;或

T167I/K240T/A294E/N303K ;或

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K ;或

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K ;或

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K ;或

A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K ;或

D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K ;

或

A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/
I336F 或

N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/
N303K。

12. 权利要求 8 至 11 的多肽 / 肌醇六磷酸酶, 其中所述分离的多肽或肌醇六磷酸酶为改良的肌醇六磷酸酶变体, 其与亲本肌醇六磷酸酶相比具有选自以下的一个或多个改良的特性 :

i. 更高的热稳定性和 / 或

ii. 比活和 / 或

iii. 蛋白水解稳定性。

13. 选自以下的分离的核酸分子 :

i) 编码权利要求 1 至 12 任一项的肌醇六磷酸酶的分离的核酸分子 ;

ii) 核酸, 其在中等严谨度条件下, 优选高或很高的严谨度条件下与编码 SEQ ID No. 3 的多肽或其同源物的核酸杂交 ;

iii) 分离的核酸分子, 其包括 SEQ ID NO:2 所示的序列或其同源物 ;

iv) 核酸, 其在中等严谨度条件下, 优选高或很高的严谨度条件下与 SEQ ID No. 2 或其互补序列杂交。

14. 权利要求 13 的分离的核酸分子, 其编码多肽, 所述多肽包括如 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或与其具有至少 75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 序列同一性 (同源性) 的序列或其有效片段。

15. 权利要求 13 或 14 的分离的核酸分子,其包括核苷酸序列,所述核苷酸序列与 SEQ ID NO. 2 相同或互补或包含 SEQ ID NO. 2 的任何密码子的任何合适的密码子取代或包括与 SEQ ID NO. 2 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%或 99%序列同源性的序列。

16. 权利要求 13 至 15 的分离的核酸分子,其中所述核酸分子编码权利要求 8 至 12 的多肽。

17. 质粒或载体系统,其包括权利要求 13 至 16 的核苷酸。

18. 权利要求 17 的质粒或载体系统,其中所述质粒或载体系统为微生物中用于表达权利要求 1 至 12 的任一种酶的表达载体,和 / 或包括权利要求 13 至 16 的多核苷酸。

19. 用权利要求 17 或 18 任一项的质粒或载体系统转化或转染的宿主细胞。

20. 权利要求 19 的宿主细胞,其包含肌醇六磷酸酶,所述肌醇六磷酸酶包含如 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其功能片段,或与其至少 75%同源的同源多肽序列。

21. 权利要求 19 或 20 的宿主细胞,其中所述宿主细胞源自于微生物,所述微生物包括细菌,如枯草芽孢杆菌、大肠杆菌,和真菌,其包括酵母,如多形汉森氏酵母、粟酒裂殖酵母、酿酒酵母,以及丝状真菌,如木霉属和曲霉属,如米曲霉。

22. 权利要求 21 的宿主细胞,其中所述微生物为原核细菌细胞,优选大肠杆菌。

23. 细菌细胞菌株布丘氏菌属 P1-29,以登录号 NCIMB 41248 保藏。

24. 产生多肽的方法,其包括在宿主细胞中表达权利要求 1 至 12 的氨基酸序列和 / 或表达权利要求 13 至 16 的多核苷酸,并且从宿主细胞培养基分离所述肌醇六磷酸酶。

25. 生产食品或动物饲料的方法,其包含向所述食品或动物饲料上喷洒液体形式的权利要求 1-12 任一项的多肽的步骤。

26. 生产食品或动物饲料的方法,其包含将作为干燥产品的权利要求 1-12 任一项的多肽与所述食品或动物饲料混合的步骤。

27. 权利要求 1 至 12 任一项的肌醇六磷酸酶在食物或动物饲料中的用途。

28. 食物或动物饲料组合物,其包括 i) 权利要求 1 至 12 任一项的肌醇六磷酸酶,和 / 或 ii) 通过权利要求 25 或 26 的方法产生的动物饲料。

29. 制备肌醇六磷酸酶变体的方法,所述方法包括下列连续的步骤:

a) 选择至少一种亲本肌醇六磷酸酶,其中所述至少一种亲本肌醇六磷酸酶选自 i) 权利要求 1-12 的多肽和 / 或 ii) 至少一种肌醇六磷酸酶变体;

b) 通过在所述亲本肌醇六磷酸酶中引入所述亲本肌醇六磷酸酶的至少一种变化,以获得至少一种肌醇六磷酸酶变体,所述变化是氨基酸残基的插入、缺失或取代或其组合;

c) 筛选所述至少一种肌醇六磷酸酶变体以鉴定改良的肌醇六磷酸酶变体,所述肌醇六磷酸酶变体与亲本肌醇六磷酸酶相比具有选自以下的一种或多种改良的特性:

i. 更高的热稳定性和 / 或

ii. 比活和 / 或

iii. 蛋白水解稳定性和 / 或

d) 制备所述改良的肌醇六磷酸酶变体,优选以产生分离和 / 或纯化的肌醇六磷酸酶变体。

30. 权利要求 29 的方法,其中在步骤 b) 期间产生肌醇六磷酸酶变体的群体,以及在步骤 c) 中筛选至少一部分所述肌醇六磷酸酶变体的群体。

31. 权利要求 29 或 30 的方法,其中步骤 a) 包括将编码亲本肌醇六磷酸酶的权利要求 11 至 13 的核苷酸序列进行诱变,并且步骤 b) 包括在宿主细胞中表达步骤 (a) 中获得的突变的核苷酸序列,且步骤 c) 包括针对宿主细胞或其一种或多种提取物筛选具有所述一个或多个改良特性的改良的肌醇六磷酸酶变体。

32. 权利要求 29 至 31 的方法,其在步骤 c) 和任选的 d) 后,进一步包括随后的至少一轮重复步骤 a) 至 c) 和可选择的 d) 的步骤,其中优选在所述随后的一轮或多轮中,从根据权利要求 29 至 31 的方法制备的所述至少一种肌醇六磷酸酶变体和 / 或改良的肌醇六磷酸酶变体中选择步骤 a) 的至少一种亲本肌醇六磷酸酶。

33. 权利要求 29 至 32 的方法,其中步骤 c) 包括筛选表达改良的肌醇六磷酸酶变体的宿主细胞,该肌醇六磷酸酶变体与 i) 所述亲本肌醇六磷酸酶和 / 或 ii) 包括 SEQ ID No 3 的多肽相比,具有至少 2.5 的热稳定性差异。

34. 权利要求 29 至 33 的方法,其中步骤 c) 包括筛选表达改良的肌醇六磷酸酶变体的宿主细胞,该肌醇六磷酸酶变体与 i) 所述亲本肌醇六磷酸酶和 / 或 ii) 包括 SEQ ID No 3 的多肽相比,具有至少 30 的胃蛋白酶稳定性。

35. 权利要求 29 至 34 的方法,其中步骤 c) 包括筛选表达改良的肌醇六磷酸酶变体的宿主细胞,该肌醇六磷酸酶变体与 i) 所述亲本肌醇六磷酸酶和 / 或 ii) 包括 SEQ ID No 3 的多肽相比,具有当与由 SEQ ID No 3 编码的肌醇六磷酸酶相比时至少 110 的比活比率。

36. 根据权利要求 29 至 35 的方法制备的改良的肌醇六磷酸酶变体。

37. 多核酸构建体,优选 DNA 构建体,其包括编码权利要求 16 或权利要求 36 任一项目的改良的肌醇六磷酸酶变体的多核酸序列。

38. 重组表达载体,其包括权利要求 37 的多核酸构建体。

39. 宿主细胞,其用权利要求 37 的 DNA 多核酸和 / 或权利要求 38 的载体转化。

40. 产生改良的肌醇六磷酸酶变体的方法,其包括在允许表达所述改良的肌醇六磷酸酶变体的条件下培养权利要求 39 的宿主细胞。

41. 饲料或食物组合物,其包括至少一种权利要求 8 至 12 或 36 任一项目的改良的肌醇六磷酸酶变体,或权利要求 38 的宿主细胞,其中所述食物或饲料组合物优选根据权利要求 25 或 26 的方法制备。

酶

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 10 月 17 日,题为“酶”的中国专利申请 201210119320.X(其母案为中国专利申请 200580035619.5 号)的分案申请。

[0002] 本发明涉及肌醇六磷酸酶 (phytase),其核苷酸序列,肌醇六磷酸酶的生产方法和其用途。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于饲料添加剂的酶领域。更具体地,本发明涉及可用于增强食物和动物饲料中磷酸酯消化的肌醇六磷酸酶。

[0004] 技术背景和现有技术

[0005] 肌醇六磷酸 (phytate) 为谷物和豆类中磷的主要存储形式。然而,单胃动物如猪、家禽和鱼不能代谢或吸收肌醇六磷酸 (或植酸 (phytic acid)),并且因此将其排泄,导致家畜高产区的磷污染。而且,肌醇六磷酸也通过螯合金属制剂如钙、铜和锌而在单胃动物中作为抗营养剂。

[0006] 为了提供给这些动物生长和健康足够的磷酸酯,向其饮食中添加无机磷酸酯。这种添加是昂贵的,并且进一步增加污染问题。

[0007] 通过肌醇六磷酸酶的作用,肌醇六磷酸通常由其水解,而产生低级肌醇磷酸酯和无机磷酸酯。肌醇六磷酸酶可用作动物饲料的添加剂,在其中改善动物对有机磷的利用率,并且减少环境的磷酸盐 (酯) (phosphate) 污染 (Wodzinski RJ, Ullah AH. *Adv Appl Microbiol.* 42, 263-302(1996))。

[0008] 许多真菌 (Wyss M. 等. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2), 367-373(1999) Berka R. M. 等. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(11), 4423-4427(1998); Lassen S. 等. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10), 4701-4707(2001)) 和细菌 (Greiner R. 等. *Arch. Biochem. Biophys.* 303(1), 107-113(1993); Kerovuo 等. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(6), 2079-2085(1998); Kim H. W. 等. *Biotechnol. Lett.* 25, 1231-1234(2003); Greiner R. 等. *Arch. Biochem. Biophys.* 341(2), 201-206(1997); Yoon S. J. 等. *Enzyme and microbial technol.* 18, 449-454(1996); Zinin N. V. 等. *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 283-290(2004)) 来源的肌醇六磷酸酶已在文献中描述。

[0009] 然而迄今为止,这些肌醇六磷酸酶没有一种呈现有效用作动物饲料补充物所需的特性。尤其,真菌肌醇六磷酸酶倾向于是蛋白水解不稳定的 (Igbasan F. A. 等. *Arch. Anim. Nutr.* 53, 353-373(2000)), 并且因此易受降解,而大多数细菌肌醇六磷酸酶仅对肌醇六磷酸具有窄的底物特异性,并且很难降解中间程度磷酸化的肌醇磷酸酯 (Greiner R. 等., *Arch. Biochem. Biophys.* 303(1), 107-113(1993); Kerovuo J 等. *Biochem. J.* 352, 623-628(2000))。

[0010] 因此存在对改进的肌醇六磷酸酶的需求。

发明概要

[0011] 在宽泛的方面,本发明涉及源自细菌的肌醇六磷酸酶以及其修饰的形式。本发明尤其涉及源自细菌布丘氏菌属 (*Buttiauxella* sp.) 的肌醇六磷酸酶, 以及其变体 / 修饰形式, 所述变体 / 修饰形式针对与野生型 (亲本) 酶相比的改进特性进行选择 and / 或改造。

[0012] 本发明因为提供新的肌醇六磷酸酶而是有益的, 所述新的肌醇六磷酸酶具有使其作为饲料酶特别有用和有效的特性。本发明尤其涉及如本文所述的分离的和 / 或纯化的新肌醇六磷酸酶多肽, 或其功能片段, 或变体, 或其修饰形式, 或其修饰形式。本发明还提供编码所述肌醇六磷酸酶的核酸序列。

[0013] 为了有效用作食物或动物饲料的酶添加剂, 该肌醇六磷酸酶必须组合许多不同的特性。为了能降解动物胃的酸性环境中的植酸, 其必须在低 pH 有活性, 优选在大范围的 pH 值中有活性。此外, 其必须具有高的特异性活性和优选高的热稳定性, 以使得蛋白质经得住在饲料如饲料团粒的制备中常用的高温。

[0014] 同样重要的是酶具有广泛的底物特异性, 所述底物特异性允许其不仅水解肌醇六磷酸, 而且水解肌醇六磷酸降解的中间产物, 如肌醇五磷酸、肌醇四磷酸和肌醇三磷酸。对猪中肌醇六磷酸降解的研究表明这些肌醇寡磷酸酯另外在小和大肠中基本上维持不溶, 并且因此难以被该动物和肠道微生物群落产生的碱性磷酸酶接近 (Schlemmer U. 等. *Arch. Anim. Nutr.* 55, 255-280 (2001))。已鉴定了不同酶在底物特异性谱上的变化。例如, 由来自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的肌醇六磷酸酶产生的肌醇三磷酸基本上耐受该酶的进一步水解 [Kerovuo J. 等. *Biochem J.* 352, 623-628 (2000)]。

[0015] 在本发明的另一个方面, 提供了质粒或载体系统, 或转化的或转基因生物体, 其包括如本文所述的新肌醇六磷酸酶或其修饰形式。

[0016] 本发明的另一个方面涉及转基因生物体, 其被修饰以表达如本文所述的新肌醇六磷酸酶或其修饰形式, 并且因此能产生肌醇六磷酸酶。本发明进一步提供用于肌醇六磷酸酶生物技术生产的手段和方法, 以及其作为饲料添加剂的用途。

[0017] 本发明的各方面存在于权利要求和下列注释中。

[0018] 为便于参考, 本发明的这些和更多方面将在合适的章节标题下论述。然而, 每一章节下的教导并不一定限于每一特定的章节。

[0019] 如参照本发明所用的, 术语“生产” (“produce”)、“产生” (“producing”)、“生产的” (“produced”)、“可生产的” (“produceable”)、“产物” (“production”) 与相应的术语“制备” (“prepare”)、“制备” (“preparing”)、“制备的” (“prepared”)、“制备” (“preparation”)、“生成的” (“generated”)、“生成” (“generation”) 和“可制备的” (“preparable”) 同义。

[0020] 如参照本发明所用的, 术语“表达” (“expression”)、“表达” (“expresses”)、“表达的” (“expressed”)、“可表达的” (“expressable”) 与相应的术语“转录” (“transcription”)、“转录” (“transcribes”)、“转录的” (“transcribed”) 和“可转录的” (“transcribable”) 同义。

[0021] 如参照本发明所用的, 术语“转化” (“transformation”) 和“转染” (“transfection”) 指将核酸序列导入宿主、宿主细胞、组织或器官的方法。

[0022] 涉及可用于本发明的核苷酸序列的其他方面包括: 包括本发明序列的构建体; 包括用于本发明的序列的载体; 包括用于本发明的序列的质粒; 包括用于本发明的序列的转

化细胞 ;包括用于本发明的序列的转化组织 ;包括用于本发明的序列的转化器官 ;包括用于本发明的序列的转化宿主 ;包括用于本发明的序列的转化生物体。本发明还包括利用其表达用于本发明的核苷酸序列的方法,如在宿主细胞中表达 ;包括转移其的方法。本发明进一步包括分离该核苷酸序列,如从宿主细胞分离的方法。

[0023] 涉及可用于本发明的氨基酸序列的其他方面包括 :编码用于本发明的氨基酸序列的构建体 ;编码用于本发明的氨基酸序列的载体 ;编码用于本发明的氨基酸序列的质粒 ;表达用于本发明的氨基酸序列的转化细胞 ;表达用于本发明的氨基酸序列的转化组织 ;表达用于本发明的氨基酸序列的转化器官 ;表达用于本发明的氨基酸序列的转化宿主 ;表达用于本发明的氨基酸序列的转化生物体。本发明还包括利用其纯化用于本发明的氨基酸序列的方法,如在宿主细胞中表达 ;包括转移所述序列,且随后纯化所述序列的方法。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1 显示了通过 DEAE- 琼脂糖层析从布丘氏菌属 (*Buttiauxella*)P1-29 纯化的重组肌醇六磷酸酶的 SDS PAGE 分析。该图呈现了包含布丘氏菌属肌醇六磷酸酶样品的泳道的数字照相图像的扫描图。

[0026] 图 2 显示了来自布丘氏菌属 P1-29 的肌醇六磷酸酶的 pH 谱。

[0027] 图 3 显示了来自布丘氏菌属 P1-29 的纯化的重组肌醇六磷酸酶对不同磷酸化程度的肌醇磷酸酯组分和模式底物的底物特异性。缩写 :IP6 - 肌醇六磷酸, IP5, IP4 和 IP3—分别指同分异构肌醇五磷酸、肌醇四磷酸和肌醇三磷酸的混合物。Fru P2—果糖 1,6- 二磷酸, Fru P1 - 果糖 6- 磷酸。

[0028] SEQ ID NO :1 列出获得用于细菌菌株鉴定的序列。

[0029] SEQ ID NO :2 列出包括来自布丘氏菌属 P1-29 的肌醇六磷酸酶基因的多核苷酸序列。

[0030] SEQ ID NO :3 列出来自布丘氏菌属 P1-29 的肌醇六磷酸酶基因的氨基酸序列。

[0031] 发明详述

[0032] 本发明的特征为包括对应于布丘氏菌属肌醇六磷酸酶或其修饰形式、同源物、变体、功能等同物或有效片段的氨基酸序列的酶。

[0033] 术语“肌醇六磷酸酶”指能催化磷酸酯,包括肌醇六磷酸水解并且释放无机磷酸酯的蛋白质或多肽。除肌醇六磷酸外,某些肌醇六磷酸酶能水解至少一些中间程度磷酸化的肌醇磷酸酯。

[0034] 术语“对应于布丘氏菌属的肌醇六磷酸酶”指不必从布丘氏菌属来源获得的酶。反而该酶优选必须具有布丘氏菌属肌醇六磷酸酶的相同的功能特征或序列。例如,布丘氏菌属肌醇六磷酸酶可能为源自布丘氏菌属的变体,但其并不天然存在于布丘氏菌属物种中。

[0035] 布丘氏菌属包括, *Buttiauxella agrestis*、*Buttiauxella brennerae*、*Buttiauxella ferragutiae*、*Buttiauxella gaviniae*、*Buttiauxella izardii*、*Buttiauxella noackiae*、*Buttiauxella warboldiae*。布丘氏菌属物种的菌株可从 DSMZ(German National Resource Centre for Biological Material) 得到。肌醇六磷酸酶优选通过本文所述的方法从布丘氏菌属鉴定,例如与 SEQ ID No 2 杂交。优选的用于分离本发明的多肽和 / 或多核苷酸的布丘氏菌属菌株列于实施例中。

[0036] 本发明的术语“野生型肌醇六磷酸酶”或“野生型”描述了具有在自然界中找到的

氨基酸序列的肌醇六磷酸酶。

[0037] 本发明的术语“肌醇六磷酸酶酶变体”、“肌醇六磷酸酶变体”或“变体”描述了具有源自亲本肌醇六磷酸酶氨基酸序列的氨基酸序列、但由于一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失而不同的肌醇六磷酸酶,所述氨基酸取代、插入和/或缺失总称为“突变”。设想对于进一步制备肌醇六磷酸酶变体的方法,如分子进化,肌醇六磷酸酶变体可能也是亲本肌醇六磷酸酶。

[0038] 根据本发明,术语“一个或多个同源多肽”,在此也描述为“同源物”,描述了多肽,优选肌醇六磷酸酶(即“同源肌醇六磷酸酶”或“同源酶”),其与第一多肽/肌醇六磷酸酶/酶的氨基酸序列相比具有超过75%序列同一性,优选具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性。

[0039] 术语“其功能等同物”指该酶必须具有与布丘氏菌属肌醇六磷酸酶的几乎相同的功能特征。术语“修饰形式”或“变体”指该酶已从其原来的形式被修饰,但保留与布丘氏菌属肌醇六磷酸酶的相同的酶促功能特征。尤其,术语“变体”或“修饰形式”包括具有源自亲本/野生型肌醇六磷酸酶氨基酸序列的氨基酸序列、并且具有一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失的肌醇六磷酸酶,所述氨基酸取代、插入和/或缺失总称为突变。修饰形式或变体与亲本酶相比可能呈现改变的酶特征。优选,修饰形式或变体具有一种或多种下列增强的表型:提高的热稳定性和/或;提高的蛋白水解(例如胃蛋白酶)稳定性和/或;提高的比活和/或;更广的底物特异性和/或;更广pH范围的活性。术语“功能”或“有效”片段指保留几乎相同的酶促功能或作用的布丘氏菌属肌醇六磷酸酶的片段或部分。

[0040] 优选本发明这方面的肌醇六磷酸酶具有与布丘氏菌属肌醇六磷酸酶相同的序列或至少75%同一的(同源的)序列。

[0041] 适当地,该酶包括如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列、或具有其至少75%同一性(同源性)的序列、或其功能片段。在一优选的实施方案中,本发明提供如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或具有与其至少75%同一性(同源性)的序列或其有效片段的分离和/或纯化的多肽。当涉及SEQ ID No 3和包括SEQ ID No 3的多肽时,设想这也指表达期间共加工的或翻译后加工的多肽,所述加工例如通过信号肽裂解。翻译后裂解也可能发生在C-末端。因此在一优选的实施方案中,其有效片段(也称为其功能片段)为由天然宿主或相配合适表达宿主产生的成熟多肽。

[0042] 在另一实施方案中,肌醇六磷酸酶的特征在于其源自以登录号NCIMB41248保藏的布丘氏菌属菌株P1-29。

[0043] 在一优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明第一个方面的任何实施方案的肌醇六磷酸酶,其包括在下列位点(根据SEQ ID No. 3的编号而编号)的一个或多个突变:

[0044] 59、70、122、125、167、193、197、204、209、211、221、223、225、240、242、244、268、281、289、294、303、336、351。

[0045] 这些位点的特征在于该酶在这些位点的诱变导致所需酶特征的改良。

[0046] 下列取代可以是优选的变体:

[0047] K59A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y

[0048] N70A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y

[0049] A122C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y

- [0050] D125A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0051] T167A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W 或 Y
- [0052] H193A、C、D、E、F、G、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0053] F197A、C、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0054] T204A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W 或 Y
- [0055] T209A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W 或 Y
- [0056] A211C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0057] S221A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0058] D223A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0059] G225A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W 或 Y
- [0060] K240A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0061] A242C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0062] D244A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0063] A268C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0064] S281A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0065] Q289A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W 或 Y
- [0066] A294C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0067] N303A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0068] I336A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y
- [0069] N351A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y

[0070] “保守突变”指根据氨基酸特征,与所示的氨基酸残基相比,对氨基酸残基的突变为保守的突变。氨基酸特征包括残基的大小、疏水性、极性、电荷、pK_a 值和本领域已知的其他氨基酸特征。优选的保守突变作为保守取代在下面列出。

[0071] 尤其优选的实施方案中,突变位于一个或多个下列位点:K59 ;T167 ;K240 ;T167 ;K240 ;D244 ;Q289 ;T209 和 F197。

[0072] 这些特定位点的优选突变如上所列,更优选的突变包括:K59E ;T167V ;K240T ;T167I ;K240E ;D244C ;Q289Y ;T209K 和 F197S。

[0073] 另外优选的实施方案中,提供包括选自以下的突变组合的肌醇六磷酸酶:

[0074] D125E/H193R ;

[0075] A294E/N303K ;

[0076] T167I/K240T ;

[0077] D223E/K240E/N351D ;

[0078] T167I/K240T/A294E/N303K ;

[0079] T167I/K240E/A242S/A294E/N303K ;

[0080] A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K ;

[0081] A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K ;

[0082] A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K ;

[0083] D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K ;

[0084] A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F 和

[0085] N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K.

[0086] 因此,根据本发明优选的肌醇六磷酸酶为一种变体,其包括如 SEQ ID NO :3 所列的氨基酸序列或其有效片段,(或其同源物,优选该肌醇六磷酸酶的特征为其源自以登录号 NCIMB 41248 保藏的布丘氏菌属菌株 P1-29 或其同源物),只是另外具有一种或多种上面所列的氨基酸突变或一种上面所列的突变组合。

[0087] 这些实施方案中,命名法表明了包括 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的肌醇六磷酸酶,其具有通过引用 SEQ ID NO :3 中氨基酸位点表明的突变。该命名法在底下更详细地描述。

[0088] 适当地,这些变体显示对于下列任何一项的改良的特征:温度稳定性、pH 范围、胃蛋白酶稳定性、比活、底物特异性和更广的底物特异性。在此公开了用于确定这些特征的合适方法。

[0089] 尤其,肌醇六磷酸酶特征的改良是针对食物和饲料加工条件下的酶稳定性,在胃运送期间的酶稳定性和在人或动物胃和 / 或肠道中的酶活性和稳定性,使得该改良的变体尤其适于用作饲料添加剂。因此,除其他参数之外,所述改良包括在提高的温度下稳定性的提高,优选 65°C 以上的温度,抗蛋白水解消化的稳定性的提高,优选消化道的蛋白酶如胃蛋白酶,在低 pH 下催化活性的提高,优选 pH5.5 以下的催化活性,和从肌醇六磷酸,且优选此外肌醇磷酸酯,释放磷酸盐(酯)基团的总效率。

[0090] 命名法

[0091] 在本说明书和权利要求中使用了常规的氨基酸残基一字母和三字母代码。为了易于参照,利用下述命名法描述酶变体中的突变:亲本酶的氨基酸;位点;取代的一个或多个氨基酸。根据该命名法,例如用甘氨酸残基取代第 20 位的丙氨酸表示为:Ala20Gly 或 A20G。在相同位点处缺失丙氨酸表示为:Ala20* 或 A20*。插入另一个氨基酸残基(例如甘氨酸)表示为:Ala20AlaGly 或 A20AG。缺失连续的一段氨基酸残基(例如位点 20 的丙氨酸和位点 21 的甘氨酸之间)表示为 Δ (Ala20-Gly21) 或 Δ (A20-G21)。当亲本酶序列与用于编号所述位点插入的酶序列相比含有“缺失”(例如在缺失的位点 20 插入丙氨酸)时,表示为 *20Ala 或 *20A。多个突变由加号或斜杠隔开。例如,A20G+E21S 或 A20G/E21S 分别表示在第 20 和 21 位丙氨酸和谷氨酸分别由甘氨酸和丝氨酸取代的两个突变。当给定位点的氨基酸残基用两个或更多可选择的氨基酸残基取代时,这些残基由逗号或斜杠隔开。例如,位点 20 的丙氨酸用甘氨酸或谷氨酸取代表示为 A20G,E 或 A20G/E 或者 A20G,A20E。当在此鉴定出适于修饰的位点,而没有暗示任何具体的修饰时,应理解为任何氨基酸残基可取代该位置存在的氨基酸残基。因此,例如当提到 修饰第 20 位的丙氨酸但未具体说明时,应理解为丙氨酸可以缺失,或用任何其它氨基酸取代(即 R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、V 中的任何一个)。

[0092] 适当地,本发明的肌醇六磷酸酶或功能等同物的特征为所述肌醇六磷酸酶具有至少 100U/mg 或 200U/mg,优选至少 300U/mg 的比活,其中所述比活通过将所述肌醇六磷酸酶如实施例 1 中详述的溶液在中温育而测定,所述溶液包含 pH3.5 的含有 2mM 肌醇六磷酸,

0.8mM CaCl_2 的 200mM 乙酸钠缓冲液。本发明的肌醇六磷酸酶或其功能等同物也适合表征为所述肌醇六磷酸酶在约 pH4-4.5 具有活性最大值,其中所述活性通过将所述肌醇六磷酸酶在溶液中温育而测定,所述溶液包含含有 2mM 肌醇六磷酸,0.8mM CaCl_2 的 200mM 乙酸钠缓冲液。本发明的肌醇六磷酸酶也可适当地表征为所述肌醇六磷酸酶具有在 pH2.5 和 5.5 观察到的 40%或以上的最大活性,其中甘氨酸盐酸盐缓冲液用于测定在 pH2.5 时的活性。

[0093] 适当地,在一个实施方案中,本发明的肌醇六磷酸酶或功能等同物表征为所述肌醇六磷酸酶具有 330U/mg 或更高的比活,其中所述比活通过将所述肌醇六磷酸酶在溶液中温育而测定,所述溶液为包含 2mM 肌醇六磷酸,0.8mM CaCl_2 的 pH3.5 的 200mM 乙酸钠缓冲液。在另一实施方案中,本发明的肌醇六磷酸酶或其功能等同物也可适当地表征为所述肌醇六磷酸酶在约 pH3 和 pH 4 - 4.5 具有两个活性最大值,其中所述活性通过将所述肌醇六磷酸酶在在溶液中温育而测定,所述溶液为包含 2mM 肌醇六磷酸,0.8mM CaCl_2 的 200mM 乙酸钠缓冲液。

[0094] 另一个方面,本发明提供分离和 / 或纯化的核酸分子或核苷酸序列,其编码包括对应布丘氏菌属肌醇六磷酸酶或其同源物的氨基酸序列的酶。适当地,所述分离和 / 或纯化的核酸分子编码包括如 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列或与其具有至少 75% 同一性(同源性)的序列或其有效片段的多肽。在一个实施方案中,该核酸分子编码包括 SEQ ID NO :3 并且在包含本文所列的优选位点的突变或本文所列的任何特定的突变或突变组合的多肽。在另一实施方案中,本发明提供分离和 / 或纯化的核酸分子,其包括与 SEQ ID NO :2 相同或互补、或包含 SEQ ID NO :2 的任何合适的密码子取代、或包括与 SEQ ID NO :2 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同源性序列的核苷酸序列。

[0095] 仍进一步的方面中,本发明涉及显示为以下的核苷酸序列以及核苷酸序列的用途:

[0096] (a) 以 SEQ ID No. 2 呈现的核苷酸序列,

[0097] (b) 核苷酸序列,其为以 SEQ ID No. 2 呈现的核苷酸序列的变体、同源物、衍生物或片段;

[0098] (c) 核苷酸序列,其为 SEQ ID No. 2 所示的核苷酸序列的补体;

[0099] (d) 核苷酸序列,其为以 SEQ ID No. 2 呈现的核苷酸序列的变体、同源物、衍生物或片段的补体;

[0100] (e) 核苷酸序列,其能与 SEQ ID No. 2 所示的核苷酸序列杂交;

[0101] (f) 核苷酸序列,其能与以 SEQ ID No. 2 呈现的核苷酸序列的变体、同源物、衍生物或片段杂交;

[0102] (g) 核苷酸序列,其与能杂交 SEQ ID No. 2 所示核苷酸序列的核苷酸序列互补;

[0103] (h) 核苷酸序列,其是能与以 SEQ ID No. 2 呈现的核苷酸序列的变体、同源物、衍生物或片段杂交的核苷酸序列的补体;

[0104] (i) 核苷酸序列,其能与 SEQ ID No. 2 所示的核苷酸序列的补体杂交;

[0105] (j) 核苷酸序列,其能与以 SEQ ID No. 2 呈现的核苷酸序列的变体、同源物、衍生物或片段的补体杂交;

[0106] 核苷酸如果能在中等严谨度,更优选高严谨度,更优选很高严谨度条件下杂交,则认为其杂交至上述核苷酸 (e)、(f)、(g)、(h)、(i) 或 (j) 中的一种。

[0107] 为了制备杂交斑点,可利用用于印迹的标准分子生物学方案(例如用于 DNA 杂交的 Southern 印迹)。靶 DNA 的量取决于靶序列的相对丰度。如果利用纯的靶序列,每千碱基对多核苷酸优选 1—5pg 的 DNA。通常,对于具有 10^9 dpm/mg 比活的放射性探针,检测极限为约 0.5pg DNA,相当于复杂基因组(例如人)的 3.3mg 基因组 DNA 中 500bp 长度的单拷贝基因。实际上将利用约 10mg 基因组 DNA—例如为了筛选生物体,如微生物,其包含本发明编码肌醇六磷酸酶的多核苷酸。如果靶 DNA 为细菌的或例如质粒,为了避免过度曝光将因此需稀释 DNA。靶 DNA 例如通过点印迹或经从电泳凝胶印迹而印迹。优选的条件在 Membrane Transfer and Detection Methods, Amersham International plc, UK. -PI/162/85/1 中描述。优选利用 Hybond N⁺ 带阳电荷的尼龙膜 (Amersham Life Science)。优选根据 Pharmacia 的 Ready to Go DNATM 标记试剂盒制备探针以制备 $>1 \times 10^9$ dpm/ μ g 的探针。该探针以每毫升杂交缓冲液 1×10^6 dpm 的浓度用于杂交缓冲液。印迹优选在杂交缓冲液 (6xSSC, 5xDenhardt 溶液和 0.5% SDS, 以及 100mg/ml 缓冲液的变性的鲑精 DNA) 中 65°C 预杂交 1 小时,随后在包含变性的标记探针的杂交缓冲液中在 65°C 振荡杂交 12 小时。随后用在 2xSSC, 0.1% SDS 中的合适体积的洗涤缓冲液(通常 50ml) 在 65°C 洗涤一个或多个印迹 30 分钟,随后为在合适体积的洗涤缓冲液(通常 50ml) 中进行第二次洗涤,所述洗涤缓冲液对于中等严谨度洗涤是相同的洗涤缓冲液 (2xSSC, 0.1% SDS), 或 0.1% xSSC, 0.1% SDS 在 65°C 10 分钟(高严谨度),对于很高的严谨度洗涤,第二次洗涤可在 70°C 重复。

[0108] 本发明的核苷酸序列可包括编码 SEQ ID No. 3 或其有效片段或变体、修饰形式、同源物或其衍生物的序列。

[0109] 尤其,本发明提供包括如本文所述的肌醇六磷酸酶或其同源物或衍生物的质粒或载体系统。优选,该质粒或载体系统包括如 SEQ ID No. :2 所示的核酸序列、或与其至少 75% 同源的序列、或其有效片段。适当地,该质粒或载体系统为用于任何下述酶在微生物中表达的表达载体,所述酶由 SEQ ID No. :2 所示的核酸序列或与其至少 75% 同源的(同一的)序列编码。在此描述了合适的表达载体。此外,本发明提供了用于表达本文所述的任何修饰的酶或变体或功能片段的质粒或载体系统。在此描述了合适的表达载体。

[0110] 肌醇六磷酸酶变体

[0111] 本发明涉及通过亲本肌醇六磷酸酶的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基的修饰对亲本肌醇六磷酸酶的特性的改良。

[0112] 用作本发明亲本酶的肌醇六磷酸酶包括来自细菌的野生型肌醇六磷酸酶,优选获自或源自布丘氏菌属的肌醇六磷酸酶,其具有 Seq ID No. 3 中所给出的氨基酸序列或其有效片段,或与 Seq ID No. 3 具有超过 75%, 优选超过 80%, 更优选超过 90%, 更优选超过 95%、96%、97%、98%, 优选超过 99% 同一性的氨基酸序列(即同源多肽),或其有效片段。

[0113] 本发明改良的肌醇六磷酸酶变体优选具有与 Seq ID No. 3 或其有效片段的同一性或超过 75%、优选超过 80%、更优选超过 90%、更优选超过 95%、96%、97%、98%, 优选超过 99% 的同一性。然而,也可以设想那些变体可以是与 SEQ ID No. 3 异源的(即不同源)。例如通过重组技术(如外介导的重组,或家族改组)产生的变体可产生变体,虽然利用本发明的亲本肌醇六磷酸酶制备的变体也可具有小于 75% 的同源性。

[0114] 序列比对以及序列同一性的测定可通过本领域已知的计算机程序如 GCG 程序包提供的 GAP 而合适地进行 (Needleman, S. B. 和 Wunsch, C. D., (1970), Journal of

Molecular Biology, 48, p. 443-453)。可以利用 GAP 按照下述设置进行多肽序列比较 :3.0 的 GAP 产生罚分和 0.1 的 GAP 延伸罚分。例如利用序列比对测定同源多肽中的相应位点。

[0115] 在一种或多种下列表达宿主中异源表达后, 鉴定肌醇六磷酸酶 : 大肠杆菌 K12 ; 枯草芽孢杆菌 ; 酿酒酵母。也可利用其他的表达宿主。

[0116] 本发明肌醇六磷酸酶特性的改良针对在食物和饲料加工中的用途, 以及用作食物和饲料产品添加剂的用途。尤其, 改良针对在食物和饲料加工条件下的稳定性, 在胃运送期间的稳定性, 和在人或动物胃和 / 或肠道中的活性和稳定性。除其他参数之外, 所述改良包括在提高的温度下稳定性的提高, 优选 65°C 以上的温度, 抗蛋白水解消化的稳定性的提高, 优选消化道的蛋白酶如胃蛋白酶, 在低 pH 下催化活性的提高, 优选 pH 5.5 以下的催化活性, 和从肌醇六磷酸释放磷酸盐 (酯) 基团的总效率。

[0117] 提高的温度下稳定性的提高通过该酶的失活温度定量。失活温度定义为肌醇六磷酸酶在该温度温育一定的持续时间、并且随后冷却至室温后, 残留活性为同样的肌醇六磷酸酶在室温下、在相同的条件温育相同的持续时间后残留活性的 50% 时的温度。热稳定性差异为以 °C 表示的两种酶失活温度之间的差异。

[0118] 通过野生型肌醇六磷酸酶的序列和结构分析以及通过亲本酶的诱变, 尤其通过将突变引入 Seq ID No 3 中所给出的野生型氨基酸序列中, 并且筛选具有改良特性的酶变体, 而找到所要突变以获得改良特性的位点和 / 或区域。因此, 已鉴定了对改良肌醇六磷酸酶特性是重要的亲本酶内的某些区域以及位点。

[0119] 因此, 本发明涉及具有改良特性的肌醇六磷酸酶变体, 其与亲本肌醇六磷酸酶相比, 包括在一个或多个下列位点 (根据 Seq ID No 3 编号的编号) 的突变 :

[0120] 59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336, 351

[0121] 和 / 或在与 Seq ID No 3 的氨基酸序列所示的肌醇六磷酸酶同源的肌醇六磷酸酶中相应位点的突变。这些位点的特征为这些位点的诱变导致酶特性的改良。

[0122] K59E ; T167V ; K240T ; T167I ; K240E ; D244C ; Q289Y ; T209K 和 F197S

[0123] 或每一位点的保守突变。

[0124] 具体的优选突变组合包括 :

[0125] D125E/H193R ;

[0126] A294E/N303K ;

[0127] T167I/K240T ;

[0128] D223E/K240E/N351D ;

[0129] T167I/K240T/A294E/N303K ;

[0130] T167I/K240E/A242S/A294E/N303K ;

[0131] A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K ;

[0132] A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K ;

[0133] A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K ;

[0134] D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K ;

[0135] A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/

N303K/I336F 和

[0136] N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K。

[0137] 制备肌醇六磷酸酶变体的方法

[0138] 本发明广泛的实施方案中提供制备一个或多个肌醇六磷酸酶变体的方法。

[0139] 在一优选的实施方案中制备肌醇六磷酸酶变体的方法包括下列连续的 步骤：

[0140] a) 选择至少一种亲本肌醇六磷酸酶，其中该至少一种亲本肌醇六磷酸酶选自 i) 包括如本文所述的对应于布丘氏菌属肌醇六磷酸酶的氨基酸序列的多肽或其修饰形式、同源多肽、变体、功能等同物或有效片段，或 ii) 如本文所述的至少一种肌醇六磷酸酶变体；

[0141] b) 通过引入所述亲本肌醇六磷酸酶的至少一种改变以获得至少一种肌醇六磷酸酶变体而产生至少一种肌醇六磷酸酶变体，其中所述改变为所述亲本肌醇六磷酸酶氨基酸残基的插入、缺失或取代或其组合；

[0142] c) 筛选所述的至少一种肌醇六磷酸酶变体以鉴定改良的肌醇六磷酸酶变体，其与亲本肌醇六磷酸酶相比具有选自以下的一个或多个改良特性：

[0143] i. 更高的热稳定性和 / 或

[0144] ii. 比活和 / 或

[0145] iii. 蛋白水解的稳定性

[0146] d) 制备所述改良的肌醇六磷酸酶变体，优选产生分离和 / 或纯化的肌醇六磷酸酶变体。

[0147] 在一优选的实施方案中，步骤 b) 期间产生肌醇六磷酸酶变体的群体，并且在步骤 c) 中筛选至少部分所述的肌醇六磷酸酶变体群体。

[0148] 在一优选的实施方案中步骤 a) 包括将权利要求 11 至 13 的编码亲本肌醇六磷酸酶的核苷酸序列进行突变，并且步骤 b) 包括在宿主细胞中表达步骤 (a) 中获得的突变核苷酸序列，以及步骤 c) 包括筛选宿主细胞或其提取物中具有所述一个或多个改良特性的改良的肌醇六磷酸酶变体。

[0149] 另外的实施方案中，步骤 c) 以及可选择的 d) 后，进一步包括步骤 a) 至 c) 以及可选择的 d) 的至少一轮重复，其中优选在所述的随后一个或多个循环中，针对步骤 a) 的至少一种亲本肌醇六磷酸酶选择根据该方法制备的所述至少一种肌醇六磷酸酶变体和 / 或改良的肌醇六磷酸酶变体。

[0150] 在进一步优选的实施方案中，步骤 c) 包括筛选表达改良肌醇六磷酸酶变体的宿主细胞，该变体与 i) 所述亲本肌醇六磷酸酶和 / 或 ii) 包括 SEQ ID No 3 的多肽或其功能片段相比，具有至少 2.5 的热稳定性差异。

[0151] 在另外的实施方案中，步骤 c) 包括筛选表达改良肌醇六磷酸酶变体的宿主细胞，该变体与 i) 所述亲本肌醇六磷酸酶和 / 或 ii) 包括 SEQ ID No 3 的多肽或其功能片段相比，具有至少 30 的胃蛋白酶稳定性。

[0152] 在另外的实施方案中，步骤 c) 包括筛选表达改良的肌醇六磷酸酶变体的宿主细胞，该变体与 i) 所述亲本肌醇六磷酸酶和 / 或 ii) 包括 SEQ ID No 3 的多肽相比，具有与由 SEQ ID No 3 编码的肌醇六磷酸酶相比至少 110 的比活比率。

[0153] 本发明还提供制备肌醇六磷酸酶变体的方法，其包括：

- [0154] a) 选择亲本肌醇六磷酸酶, 其中该亲本肌醇六磷酸酶选自
- [0155] i. 与 SEQ ID No 3 具有至少 75% 同源性的亲本肌醇六磷酸酶或其功能片段
- [0156] ii. 源自布丘氏菌属的亲本肌醇六磷酸酶
- [0157] iii. 至少一种肌醇六磷酸酶变体
- [0158] b) 在亲本肌醇六磷酸酶的氨基酸残基中制造至少一种变化, 所述变化为氨基酸残基插入、缺失或取代, 以获得肌醇六磷酸酶变体
- [0159] c) 筛选肌醇六磷酸酶变体, 其与亲本肌醇六磷酸酶相比具有如本文所述的改良的特性, 优选选自下列一种或多种:
- [0160] i. 更高的热稳定性和 / 或
- [0161] ii. 比活和 / 或
- [0162] iii. 蛋白水解稳定性和 / 或
- [0163] d) 制备肌醇六磷酸酶变体。
- [0164] 任选地, 至少步骤 a) 至 c) 可在一次或多次随后的 (反复的) 循环中重复。因此, 设想亲本肌醇六磷酸酶为通过上述方法 a) 至 c) 的先前循环而制备的肌醇六磷酸酶变体。
- [0165] 在另外的实施方案中, 本发明提供制备肌醇六磷酸酶变体的方法, 包括下列步骤:
- [0166] a) 提供亲本肌醇六磷酸酶, 选自
- [0167] (i) 与 SEQ ID No 3 具有至少 75% 同源性的亲本肌醇六磷酸酶或其功能片段
- [0168] (ii) 源自布丘氏菌属的亲本肌醇六磷酸酶,
- [0169] (iii) 至少一种肌醇六磷酸酶变体
- [0170] b) 通过亲本肌醇六磷酸酶的改变产生肌醇六磷酸酶变体的群体, 优选所述一个或多个改变通过亲本肌醇六磷酸酶中至少一个氨基酸残基的插入、缺失或取代或任何其组合而获得。
- [0171] c) 针对群体筛选肌醇六磷酸酶变体, 其与亲本肌醇六磷酸酶相比具有如本文所述的改良的特性, 优选选自下列中一种或多种:
- [0172] (i) 更高的热稳定性和 / 或
- [0173] (ii) 更高的比活和 / 或
- [0174] (iii) 更高的蛋白水解稳定性,
- [0175] d) 从肌醇六磷酸酶群体选择一种或多种肌醇六磷酸酶变体,
- [0176] e) 任选循环重复步骤 (a) 至 (c), 并且优选其中在一个循环中所选的肌醇六磷酸酶变体用作后面的循环中的起始肌醇六磷酸酶。
- [0177] 在另外的实施方案中, 本发明提供制备肌醇六磷酸酶变体的方法, 其包括:
- [0178] a) 将编码亲本肌醇六磷酸酶的核苷酸序列进行诱变, 其中该亲本肌醇六磷酸酶选自
- [0179] i. 与 SEQ ID No 3 具有至少 75% 同源性的亲本肌醇六磷酸酶或其功能片段
- [0180] ii. 源自布丘氏菌属的亲本肌醇六磷酸酶
- [0181] iii. 至少一种肌醇六磷酸酶变体
- [0182] b) 在宿主细胞中表达步骤 (a) 中获得的突变核苷酸序列, 和
- [0183] c) 筛选表达肌醇六磷酸酶变体的宿主细胞, 所述肌醇六磷酸酶变体与亲本肌醇六磷酸酶相比具有如本文所述的改良的特性, 优选选自下列一种或多种:

- [0184] i) 更高的热稳定性和 / 或
- [0185] ii) 更高的比活和 / 或
- [0186] iii) 更高的蛋白水解稳定性和 / 或
- [0187] d) 制备由宿主细胞表达的肌醇六磷酸酶变体。
- [0188] 任选地, 步骤 a) 至 c), 可选择地包括 d) 可在一次或多次随后的 (反复的) 循环中重复。
- [0189] 在另外的实施方案中, 本发明提供制备肌醇六磷酸酶变体的方法, 包括下列步骤:
- [0190] a) 将编码亲本肌醇六磷酸酶的核苷酸序列进行诱变, 以产生改变的核苷酸变体的群体, 其中优选所述一个或多个改变通过亲本肌醇六磷酸酶中至少一个氨基酸残基的插入、缺失或取代或任何其组合而获得, 并且其中该亲本肌醇六磷酸酶选自
- [0191] (i) 与 SEQ ID No 3 具有至少 75% 同源性的肌醇六磷酸酶或其功能片段
- [0192] (ii) 源自布丘氏菌属的肌醇六磷酸酶,
- [0193] (iii) 至少一种肌醇六磷酸酶变体
- [0194] (b) 在相应的宿主细胞群体中表达步骤 (a) 中获得的核苷酸变体群体, 和
- [0195] (c) 针对群体筛选肌醇六磷酸酶变体, 其与亲本肌醇六磷酸酶相比具有如本文所述的改良的特性, 优选选自一种或多种:
- [0196] (i) 更高的热稳定性和 / 或
- [0197] (ii) 更高的比活和 / 或
- [0198] (iii) 更高的蛋白水解稳定性,
- [0199] (d) 从肌醇六磷酸酶群体选择一种或多种肌醇六磷酸酶变体,
- [0200] (e) 任选循环重复步骤 (a) 至 (b), 并且优选, 其中在一个循环中所选的肌醇六磷酸酶变体用作下一循环的起始肌醇六磷酸酶。
- [0201] 当合适时, 在上述制备肌醇六磷酸酶变体的方法中, 所述核苷酸序列优选为 DNA 序列。
- [0202] 核苷酸序列优选为分离和 / 或纯化的核酸分子或核苷酸序列, 其编码包括如本文所述的对应布丘氏菌属肌醇六磷酸酶的氨基酸序列的酶, 或其同源物。
- [0203] 肌醇六磷酸酶亲本优选选自 SEQ ID No 3 或其功能片段或如本文所述的 SEQ ID No 3 公开的布丘氏菌属肌醇六磷酸酶的同源物。
- [0204] 本发明涉及制备肌醇六磷酸酶变体方法的上述实施方案中, 编码亲本肌醇六磷酸酶 / 核苷酸的亲本肌醇六磷酸酶 / 核苷酸优选为野生型肌醇六磷酸酶。
- [0205] 然而, 另外亲本可以通过先前循环的诱变制备的变体, 即在一个实施方案中, 制备肌醇六磷酸酶变体的方法为反复的, 其中步骤 a) 至 c) (任选包括步骤 d)) 重复至少超过一次。所述实施方案中第一轮诱变所用的诱变方法优选为易错 PCR, 更优选错误阈值 PCR (error threshold PCR)。随后的循环也可以是易错 PCR, 更优选错误阈值 PCR, 但另外可为基于重组的诱变, 其中在第一轮诱变中鉴定的至少两种独立的改良变体的组在第二或随后轮的诱变期间被重组, 以产生至少一种重组变体 (例如利用家族改组或重组酶链式反应方法)。
- [0206] 对技术人员显而易见的是也可利用替代的诱变方法, 包括合理的设计, 位点扫描诱变, 或化学 / 辐射诱导的诱变。

[0207] 本发明涉及制备肌醇六磷酸酶变体方法的上述实施方案中,优选针对更高的热稳定性筛选肌醇六磷酸酶变体。

[0208] 本发明涉及制备肌醇六磷酸酶变体方法的上述实施方案中,优选对至少单个参数筛选肌醇六磷酸酶变体,所述单个参数优选选自更高的热稳定性,更高的蛋白水解稳定性或更高的比活,最优选更高的热稳定性。

[0209] 优选,对所述第一个参数的筛选在至少第一轮诱变中进行,所述诱变包括至少步骤 a) 至 c),其中 c) 包括至少对所述第一个参数的筛选。该第一轮诱变能因此后接进一步的(反复的)的诱变,以及包括步骤 a) 至 c)(任选地包括 d))的选择,其中所述在另外的循环中的选择可选自如所述第一轮的步骤 c)中所用的相同的选择参数,或者可替换地,不同的参数。

[0210] 在制备肌醇六磷酸酶变体的上述方法的反复循环期间,优选所述第一个参数选自更高的热稳定性、更高的蛋白水解稳定性或更高的比活,最优选更高的热稳定性。优选,当进行第一轮诱变以选择具有更高热稳定性的变体时,在包括步骤 a) 至 c)的随后(反复的)一个或多个诱变循环期间,所述参数选自更高的热稳定性,更高的蛋白水解稳定性或更高的比活,最优选更高的蛋白水解稳定性或更高的比活。

[0211] 本发明涉及制备肌醇六磷酸酶变体方法的上述实施方案中,优选在至少一轮诱变(步骤 a 至 c),优选超过一个循环,即反复的选择循环中,针对更高的热稳定性和更高的蛋白水解稳定性以及更高的比活筛选肌醇六磷酸酶变体。

[0212] 亲本肌醇六磷酸酶优选源自布丘氏菌属 P1-29。

[0213] 在制备肌醇六磷酸酶变体的方法中,所述方法包括将编码亲本肌醇六磷酸酶的 DNA 序列诱变,编码亲本肌醇六磷酸酶的 DNA 序列优选经受随机诱变,更优选经受易错 PCR,更优选经受错误阈值 PCR。

[0214] 优选的诱变编码亲本肌醇六磷酸酶的 DNA 序列的方法为易错 PCR,更优选为错误阈值 PCR,其他的诱变方法可代替易错/错误阈值 PCR 或和易错 PCR/错误阈值 PCR 一起使用。参见实施例 12,其提供了合适的易错 PCR 和 错误阈值 PCR 方法的参照。另外合适的诱变 PCR 方法由 Cadwell 和 Joyce(PCR Methods Appl. 3(1994),136-140) 公开。

[0215] 当用在涉及“肌醇六磷酸酶变体制备方法”的实施方案的语境中时,术语“在宿主细胞中表达”优选定义为如本文定义的在活体生物、器官或细胞中生产肌醇六磷酸酶变体。优选的宿主为大肠杆菌 K12 ;枯草芽孢杆菌 ;酿酒酵母。在一种或多种下列表达宿主中异源表达后,鉴定本文详述的肌醇六磷酸酶 :大肠杆菌 K12 ;枯草芽孢杆菌 ;酿酒酵母。

[0216] 不过,考虑到为了选择如本文所述的肌醇六磷酸酶变体的目的,所述方法可应用表达肌醇六磷酸酶变体的体外方法,优选用于所述方法的步骤 (c) 中,其利用分离自一个或多个活体生物或病毒的一个或多个细胞的转录和翻译机制。本发明的变体肌醇六磷酸酶的所述体外生产也可以用于选择优选的变体肌醇六磷酸酶。体外表达可以适当地利用标准技术进行。关于参考文件请参见 Promega 公司的 'In vitro Expression Guide' (部分号 BR053)。

[0217] 变体表型的定义。

[0218] 优选利用实施例 12 中公开的方法来测定具有更高热稳定性(热稳定性差异)的变体。

[0219] 通过制备肌醇六磷酸酶变体的方法制备的变体肌醇六磷酸酶优选具有至少 1.5 的热稳定性差异 (T.D), 更优选 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 最优选至少 20。

[0220] 优选通过实施例 12 中公开的方法测定具有更高蛋白水解稳定性的变体。

[0221] 本发明的肌醇六磷酸酶变体优选具有至少 45%, 优选 50%, 55%, 更优选至少 60% 或 65%, 最优选至少 70% 的蛋白水解稳定性 (残留活性)。

[0222] 本发明的肌醇六磷酸酶变体优选具有 pH 4.0 时大于 100% 野生型活性的比活, 优选大于 105%, 110%, 更优选大于 114%。

[0223] 其他变体实施方案

[0224] 本发明另外的实施方案中提供用于制备包括肌醇六磷酸酶变体的动物饲料的方法, 所述方法包括连续的步骤 i) 进行制备肌醇六磷酸酶变体的一种或多种上述方法, 和 ii) 将制备的肌醇六磷酸酶变体添加至动物饲料。

[0225] 本发明具体的实施方案中提供用于制备包括肌醇六磷酸酶变体的动物饲料的方法, 所述方法包括

[0226] a) 选择亲本肌醇六磷酸酶, 其中该亲本肌醇六磷酸酶选自

[0227] i. 与 SEQ ID No 3 具有至少 75% 同源性的亲本肌醇六磷酸酶或其功能片段

[0228] ii. 源自布丘氏菌属, 优选布丘氏菌属 P1-29 的亲本肌醇六磷酸酶, 和 / 或

[0229] iii. 至少一种肌醇六磷酸酶变体;

[0230] b) 在亲本肌醇六磷酸酶中制造至少一种变化, 所述变化为氨基酸残基的插入、缺失或取代, 以获得肌醇六磷酸酶变体,

[0231] c) 筛选肌醇六磷酸酶变体, 其与亲本肌醇六磷酸酶相比具有如本文所述的改良的特性, 优选选自下列的一种或多种:

[0232] i. 更高的热稳定性和 / 或

[0233] ii. 比活和 / 或

[0234] iii. 蛋白水解稳定性和 / 或

[0235] d) 制备肌醇六磷酸酶变体,

[0236] e) 将制备的肌醇六磷酸酶变体添加至动物饲料。

[0237] 本发明另外的实施方案中提供用于制备包括肌醇六磷酸酶变体的动物饲料的方法, 所述方法包括

[0238] a) 将编码亲本肌醇六磷酸酶的核苷酸 (优选 DNA) 序列进行诱变, 其中所述亲本肌醇六磷酸酶选自编码以下的核苷酸

[0239] i. 与 SEQ ID No 3 具有至少 75% 同源性的亲本肌醇六磷酸酶或其功能片段, 和 / 或

[0240] ii. 源自布丘氏菌属的亲本肌醇六磷酸酶, 优选布丘氏菌属 P1-29,

[0241] b) 将步骤 (a) 中获得的突变核苷酸 (优选 DNA) 序列在宿主细胞中表达, 和

[0242] c) 筛选表达肌醇六磷酸酶变体的宿主细胞, 所述变体与亲本肌醇六磷酸酶相比具有如本文所述的改良的特性, 优选选自下列一种或多种:

[0243] i. 更高的热稳定性和 / 或

[0244] ii. 更高的比活和 / 或

- [0245] iii. 更高的蛋白水解稳定性和 / 或
- [0246] d) 制备由所述宿主细胞表达的肌醇六磷酸酶变体
- [0247] f) 将制备的肌醇六磷酸酶变体添加至动物饲料。
- [0248] 制备肌醇六磷酸酶变体的方法的所述实施方案和优选方面还应用到制备包含肌醇六磷酸酶变体的动物饲料的上述方法中。
- [0249] 本发明的另一方面提供用本文所述的编码肌醇六磷酸酶的核酸转化或转染的宿主细胞。
- [0250] 适当地本发明这方面的宿主细胞包括肌醇六磷酸酶,其包含如 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其功能片段或与其具有至少 75%同源性的序列。
- [0251] 在一优选的实施方案中,所述宿主细胞产生肌醇六磷酸酶。
- [0252] 本发明的另一方面提供用本发明的编码肌醇六磷酸酶的核酸转化或转染的宿主细胞。优选,肌醇六磷酸酶为本文所述的布丘氏菌属肌醇六磷酸酶或其同源物或衍生物。适当地所述肌醇六磷酸酶包括任何如 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其功能片段或与其至少 75%同源(同一)的序列。优选,所述宿主细胞产生肌醇六磷酸酶。
- [0253] 在一个实施方案中,可用于本发明的核苷酸序列可获自(尽管它实际上不一定要获自)布丘氏菌属,尽管将认识到分离和 / 或纯化自等同菌株的酶可以等同地使用。
- [0254] 适当地所述宿主细胞源自微生物,包括细菌和真菌,包括酵母。尤其优选的实施方案中,宿主细胞为原核的细菌细胞。合适的细菌宿主细胞包括来自不同原核分类组的细菌,其包括变形菌门(Proteobacteria),包括 α , β , γ , Δ 和 ϵ 细部的成员,革兰氏阳性细菌如放线菌纲(Actinomycetes),硬壁菌门(Firmicutes),梭菌属(Clostridium)和近缘生物,黄杆菌属(Flavobacteria),蓝细菌(Cyanobacteria),绿色硫细菌(Green sulfur bacteria),绿色无硫细菌(Green non-sulfur bacteria),和 Archaea。特别优选的是肠杆菌科(Enterobacteriaceae),如大肠杆菌,属于 γ 细部和低 GC 革兰氏阳性细菌如杆菌属(Bacillus)的变形菌门。
- [0255] 合适的真菌宿主细胞包括酵母,所述酵母选自下组:子囊菌门(Ascomycota),包括酵母纲(Saccharomycetes),如毕赤酵母属(Pichia),汉森酵母属(Hansenula),和酵母属(Saccharomyces),裂殖酵母纲(Schizosaccharomycetes),如粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe),和变形子囊菌门(anamorphic Ascomycota),包括曲霉属(Aspergillus)。
- [0256] 其它合适的真核宿主细胞包括昆虫细胞,如 SF9, SF21, Trychoplusiani 和 M121 细胞。例如,本发明的多肽可以方便地在昆虫细胞系统中表达。除了在培养的昆虫细胞中表达之外,肌醇六磷酸酶基因还可以在完整的昆虫生物体中表达。病毒载体如杆状病毒可以感染完整的昆虫。大型昆虫,如蚕蛾,提供高产量的异源蛋白。可以根据常规提取技术将蛋白质从昆虫中提取出来。适用于本发明的表达载体包括所有能够在昆虫细胞系中表达外源蛋白的载体。
- [0257] 其它宿主细胞包括选自下组的植物细胞:原生质体、细胞、愈伤组织、组织、器官、种子、胚、胚珠、合子等。本发明还提供已经转化并包含本发明的重组 DNA 的完整植物。
- [0258] 术语“植物”一般包括真核藻类、有胚植物,其包括苔藓植物门(Bryophyta)、蕨类植物门(Pteridophyta)和种子植物门(Spermatophyta),如裸子植物亚门(Gymnospermae)

和被子植物亚门 (Angiospermae)。

[0259] 优选,所述宿主细胞是微生物。优选的微生物包括原核细菌细胞,优选大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草芽孢杆菌 (*B. Subtilis*) 和杆菌属的其它物种,酵母,优选多形汉森氏酵母 (*Hansenula Polymorpha*) 和粟酒裂殖酵母。

[0260] 本发明的另一方面提供了细菌细胞菌株布丘氏菌属 (*Buttiauxella*)P1-29, 由 Danisco Global Innovation, Sokeritehtaantie 20, FIN-02460Kantvik, Finland 在 2004 年 9 月 22 日保藏在国家工业、海洋和食品细菌菌种保藏中心 (NCIMB), 地址为英国苏格兰的弗格森大厦, 克瑞斯通工业区, 巴克斯本, 阿伯丁, AB21 9YA (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland, UK), 保藏号 NCIMB 41248。可将这种细胞直接掺入饲料中。

[0261] 在另一方面,提供了一种生产肌醇六磷酸酶的方法,包括用本发明的表达载体或质粒转染宿主细胞,在肌醇六磷酸酶的表达条件下培养所述宿主细胞,和从宿主细胞培养基中提取所述肌醇六磷酸酶。

[0262] 适当地所述方法是生产肌醇六磷酸酶的方法,包括在宿主细胞中表达如 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或与其具有至少 75%同源性的序列或其有效片段,以及从宿主细胞培养基中提取分泌的蛋白。

[0263] 本发明的另一方面提供一种包含本发明的肌醇六磷酸酶的饲料组合物。优选该饲料组合物包含浓度为 10-10000U/kg 饲料,优选 200-2000U/kg 饲料,更优选 500-1000U/kg 饲料的肌醇六磷酸酶。

[0264] 在一个实施方案中,该饲料组分包含本发明的宿主细胞。

[0265] 在另一方面提供根据本发明的肌醇六磷酸酶在食品或动物饲料中的应用。

[0266] 优选的方面

[0267] 在随附的权利要求书和后面的介绍以及实施例部分中给出优选的方面。

[0268] 其他优点

[0269] 本发明是有益的,因为它提供了具有许多特性的肌醇六磷酸酶,这些特性使得其作为动物饲料的添加剂特别有用。

[0270] 特别地,本发明的肌醇六磷酸酶在低 pH 下具有活性,优选 pH 2-5.5 的范围,活性最大值在 pH 4-4.5 左右。适当地本发明的肌醇六磷酸酶在胃环境的低 pH 下具有活性 (pH 2.5 时保留约 40%的最大活性)。

[0271] 另外,本发明的肌醇六磷酸酶在天然宿主和在异源表达期间都可以有效地分泌,由此导致更加有效的生产和分离,用于添加到饲料中。

[0272] 而且,本发明的肌醇六磷酸酶优选具有宽泛的底物特异性,包括五磷酸酯,四磷酸酯,三磷酸酯和二磷酸酯底物,由此增加了可用于动物吸收的总磷酸酯 (可得到的磷酸酯)。本发明的肌醇六磷酸酶还优选具有 300U/mg+/- 大约 10%的高比活,优选至少 300U/mg。

[0273] 本发明的产物可以用作食品和饲料的添加剂 / 补充物。该产物还可以用于各种肌醇磷酸酯的商业生产。

[0274] 肌醇六磷酸 / 植酸 / 肌醇六磷酸酶

[0275] 植酸 (肌-肌醇六磷酸 (myo-inositol hexakisphosphate)) 是谷类、豆类、油籽

作物中的重要组分。盐的形式,肌醇六磷酸,是磷在这些植物中的主要储存形式。

[0276] 肌醇六磷酸酶催化植酸的磷酸单酯水解,其导致逐步形成肌-肌醇五-,四-,三-,二-和单磷酸酯,以及无机磷酸酯的释放。

[0277] 本文所用的术语“野生型肌醇六磷酸酶”或“野生型”指具有天然发现的氨基酸序列的肌醇六磷酸酶。

[0278] 术语“肌醇六磷酸酶变体”或“变体”或“修饰形式”指具有源自亲本肌醇六磷酸酶氨基酸序列的氨基酸序列的肌醇六磷酸酶,其具有一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失,所述取代、插入和/或缺失总称为“突变”。

[0279] 术语“亲本肌醇六磷酸酶”或“亲本酶”指由其衍生出肌醇六磷酸酶变体的肌醇六磷酸酶。亲本肌醇六磷酸酶可以是野生型肌醇六磷酸酶或另一种肌醇六磷酸酶变体。尤其在本发明中,“亲本肌醇六磷酸酶”可以源自布丘氏菌属。适当地,“亲本肌醇六磷酸酶”源自如本文所述的布丘氏菌属菌株 P1-29,其优选具有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。

[0280] 分离的

[0281] 一方面,优选核苷酸或氨基酸序列为分离的形式。术语“分离的”意指该序列至少基本上不含至少一种其它组分,而这种组分是与该序列天然相关联的,如天然所发现的那样。

[0282] 纯化的

[0283] 一方面,优选核苷酸或氨基酸序列为纯化的形式。术语“纯化的”意指该序列处于相对纯的状态—至少 1%,5%纯的或 10%纯的,更优选至少 20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%纯的。在优选的实施方案中,当涉及多肽时,如上定义的纯度根据通过 SDS-PAGE 电泳从其他多肽纯化而确定。在优选的实施方案中,当涉及多核苷酸时,如上定义的纯度根据从其他多核苷酸纯化而确定。

[0284] 核苷酸序列

[0285] 本发明的范围包括编码具有如本文所定义的特定特性的酶的核苷酸序列。

[0286] 如本文所用的术语“核苷酸序列”指寡核苷酸序列、核酸或多核苷酸序列,及其变体,同源物,片段和衍生物(如其部分)。核苷酸序列可以是基因组或合成或重组起源的,其可以是双链或单链的,不管代表有义链还是反义链。

[0287] 涉及本发明的术语“核苷酸序列”或“核酸分子”包括基因组 DNA, cDNA, 合成 DNA, 和 RNA。优选其指 DNA, 更优选指编码本发明的 cDNA 序列。

[0288] 在优选的实施方案中,当涉及和当被本发明的自身范围所包括时,核苷酸序列并不包括处于天然环境之中、并与其天然相关联的一个或多个序列相连的根据本发明的天然核苷酸序列,而所述天然相关联的序列也处于其天然环境之中。为了方便参考,我们将把这种优选的实施方案称为“非天然核苷酸序列”。在这点上,术语“天然核苷酸序列”意指处于其天然环境之中的完整核苷酸序列,以及当它与天然相关联的完整启动子可操作性连接之时,所述启动子也处于天然环境之中。不过,本发明的范围所包括的氨基酸序列可以是其天然生物中表达后分离和/或纯化的核苷酸序列产物。不过,本发明的范围所包括的氨基酸序列优选可以在其天然生物中由核苷酸序列所表达,但是其中所述核苷酸序列并不在该生物中与所述核苷酸序列天然相关联的启动子的控制之下。

[0289] 核苷酸序列的制备

[0290] 一般,本发明的范围所包括的氨基酸序列或用于本发明的核苷酸序列是利用重组 DNA 技术制备的(即,重组 DNA)。不过,在本发明的备选实施方案中,可以利用本领域公知的化学方法全部或部分地合成核苷酸序列(参见 Caruthers MH(1980)Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 和 Horn T 等,(1980)Nuc Acids Res Symp Ser 225-232)。

[0291] 由产生所述酶的任何细胞或生物可以鉴定和/或分离和/或纯化出编码具有如本文所定义的特定特性的酶或适于修饰的酶的核苷酸序列。本领域已知多种方法来鉴定和/或分离和/或纯化核苷酸序列。举例来说,一旦已经鉴定和/或分离和/或纯化了合适的序列,就可以使用 PCR 扩增技术以制备更多序列。

[0292] 作为进一步的举例,利用来自产生所述酶的生物的染色体 DNA 或信使 RNA 可以构建基因组 DNA 和/或 cDNA 文库。如果已知该酶的氨基酸序列或该酶的部分氨基酸序列,可以合成标记的寡核苷酸探针并用来自基因组文库鉴定编码酶的克隆,所述文库由所述生物制备。或者,可以利用包含与另一种已知酶基因同源的序列的经标记的寡核苷酸探针来鉴定编码酶的克隆。在后一种情况中,利用低严谨度的杂交和洗涤条件。

[0293] 或者,可以通过将基因组 DNA 片段插入表达载体,如质粒中,用得到的基因组 DNA 文库转化酶阴性细菌,随后将转化的细菌铺平板到包含该酶底物(例如对于产葡萄糖苷酶(麦芽糖酶)的酶,底物为麦芽糖)的琼脂板上,由此得以鉴定表达该酶的克隆,来鉴定编码酶的克隆。

[0294] 在又一个备选方案中,可以通过已确立的标准方法合成性制备编码酶的核苷酸序列,例如由 Beucage S.L. 等,(1981)Tetrahedron Letters 22,p1859-1869 所述的氨基磷酸酯(phosphoroamidite)方法,或由 Matthes 等,(1984)EMBO J. 3, p 801-805 所述的方法。在氨基磷酸酯方法中,例如在自动 DNA 合成仪中合成寡核苷酸,纯化,退火并克隆在合适的载体中。

[0295] 核苷酸序列可以是混合的基因组和合成起源的,混合的合成和 cDNA 起源的,或混合的基因组和 cDNA 起源的,通过根据标准技术连接合成的、基因组的或 cDNA 起源(根据需要)的片段而制备。每一个连接的片段都对应于完整核苷酸序列的各部分。还可以通过聚合酶链式反应(PCR)利用特定引物来制备 DNA 序列,例如在 US 4,683,202 或在 Saiki R K 等,(Science(1988)239, pp 487-491)中所述的。

[0296] 由于遗传密码的简并性,可以轻易地生产核苷酸序列,其中对于一些或所有由原始核苷酸序列编码的氨基酸改变了三联体密码子用法,由此产生与原始核苷酸具有低同源性的核苷酸序列,但是其编码与原始核苷酸序列所编码的相同、或变体氨基酸序列。例如,对于大多数氨基酸来说,遗传密码的简并性是在三联体密码子中的第三个位置上(摆动位置)(参考文献见 Stryer, Lubert, Biochemistry, Third Edition, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7),因此,所有三联体密码子都在第三位置上发生“摆动”的核苷酸序列与原始核苷酸序列将具有大约 66% 的同一性,然而,改变的核苷酸序列将与原始核苷酸序列编码相同或变异的一级氨基酸序列。

[0297] 因此,本发明进一步涉及任何核苷酸序列,所述核苷酸序列对于编码氨基酸的至少一个三联体密码子改变了三联体密码子用法,但是其与原始核苷酸序列编码的多肽序列具有相同、或变体多肽序列。

[0298] 另外,具体的生物一般对于用来编码氨基酸的三联体密码子有所偏好。优选的密码子用法表是随处可得的,并且可以用来制备密码子优化基因。常规使用这些密码子优化技术来优化异源宿主中的转基因表达。

[0299] 分子进化

[0300] 一旦分离和 / 或纯化了编码酶的核苷酸序列,或鉴定了推定的编码酶的核苷酸序列,可以希望修饰选定的核苷酸序列,例如希望对序列进行突变从而制备根据本发明的酶。

[0301] 可以利用合成性寡核苷酸引入突变。这些寡核苷酸包含位于所需突变位点侧翼的核苷酸序列。

[0302] 在 Morinaga 等 (Biotechnology (1984) 2, p646-649) 中描述了合适的方法。在 Nelson 和 Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147-151) 中描述了将突变引入编码酶的核苷酸序列的另一种方法。

[0303] 除了诸如上面所述的定点诱变之外,还可以例如利用商业试剂盒如来自 Stratagene 的 GeneMorph PCR 诱变试剂盒,或来自 Clontech 的 Diversify PCR 随机诱变试剂盒随机引入突变。

[0304] 获得新序列的第三种方法是对非同一性的核苷酸序列进行片段化,通过利用任一种限制性酶或酶如 DNA 酶 I,并重新组配编码功能性蛋白质的完整核苷酸序列。或者可以使用一个或多个非同一性核苷酸序列并在完整核苷酸序列的组配过程中引入突变。

[0305] 因而,有可能在体内或体外在核苷酸序列中产生多个定点或随机突变,随后通过各种方法筛选编码多肽的改良的功能性。

[0306] 作为非限制性实例,可以将多核苷酸序列的突变或天然变体与野生型或其它突变或天然变体重组以产生新的变体。也可以针对所编码多肽的改良的功能性筛选这些新的变体。通过本领域公知的各种方法,例如错误阈值诱变 (Error Threshold Mutagenesis) (WO 92/18645),寡核苷酸介导的随机诱变 (US 5,723,323),DNA 改组 (US 5,605,793),外介导的 (exo-mediated) 基因组配 (WO 0058517) 产生新的优选变体。例如在 WO 0134835, W002/097130, WO 03/012100, W003/057247, WO 2004/018674, US 6,303,344 和 US 6,132,970 中描述了其它合适的方法。

[0307] 上述和类似的分子进化方法的应用可以鉴定和选择本发明的酶的变体而无需任何蛋白质结构或功能的现有知识,所述变体具有优选的特性,并且可以生产不可预测但有益的突变或变体。本领域有许多应用分子进化以优化或改变酶活性的实例,所述实例包括,但不限于下列的一种或多种:在宿主细胞中或体外优化的表达和 / 或活性,提高的酶活性,改变的底物和 / 或产物特异性,提高或降低的酶学或结构稳定性,在优选的环境条件,例如,温度、pH、底物中改变的酶活性 / 特异性。

[0308] 上述分子进化方法可用于制备如本文所述的肌醇六磷酸酶变体的方法中。

[0309] 氨基酸序列

[0310] 本发明的范围还包括具有如本文所定义的特异性质的酶的氨基酸序列。

[0311] 如本文所用的,术语“氨基酸序列”与术语“多肽”和 / 或术语“蛋白质”同义。在一些情况下,术语“氨基酸序列”与术语“肽”同义。在一些情况下,术语“氨基酸序列”与术语“酶”同义。

[0312] 氨基酸序列可以由合适的来源制备 / 分离,或者其可以合成制备或者可以通过利

用重组 DNA 技术来制备。

[0313] 本发明所包括的酶可以结合其它酶使用。因而本发明还包括酶的组合,其中所述组合包含本发明的酶和另一种酶,其可以是根据本发明的另一种酶。在后面的部分中对这方面进行讨论。

[0314] 当涉及或者当被本发明的自身范围所包括时,氨基酸序列优选不是天然酶。在这一点上,术语“天然酶”意指在其天然环境下的完整酶,并且当其由天然核苷酸序列表达。

[0315] 变体 / 同源物 / 衍生物

[0316] 本发明还包括酶的任何氨基酸序列或编码这种酶的任何核苷酸序列的变体、同源物和衍生物用途。

[0317] 在这里,术语“同源物”意指与氨基酸序列和核苷酸序列具有一定同源性的实体。在这里,术语“同源性”可以等同于“同一性”。适当地,在本文中“同源的”指在利用下面更加详细介绍的比对算法来比对其序列之后两种酶之间的序列同一性。

[0318] 在本文中,同源的氨基酸序列用来包括可以与序列至少 75,80,81,85 或 90% 同一,优选至少 95,96,97,98 或 99% 同一的氨基酸序列。一般,同源物将例如与目标氨基酸序列包含相同的活性位点。尽管同源性也可以用相似性(即具有类似化学特性/功能的氨基酸残基)来考虑,在本发明的上下文中,优选序列同一性表示同源性。

[0319] “功能片段”意指保留该多肽的特征性特性的多肽片段。在本发明的上下文中,肌醇六磷酸酶的功能片段是保留完整蛋白质的肌醇六磷酸切割能力的片段。

[0320] 在本文中,同源的核苷酸序列用来包括可以与编码本发明的酶的核苷酸序列(目标序列)至少 75,80,81,85 或 90% 同一性,优选至少 95,96,97,98 或 99% 同一的核苷酸序列。一般,同源物将包含与目标核苷酸序列编码相同活性位点等的序列。尽管同源性也可以用相似性(即具有类似化学特性/功能的氨基酸残基)来考虑,在本发明的上下文中,优选序列同一性表示同源性。

[0321] 对于氨基酸序列和核苷酸序列来说,可以通过肉眼,或者更常借助于易于得到的序列比较程序来进行同源性比较。这些商业上现有的计算机程序可以计算两个或多个序列之间的%同源性。

[0322] %同源性可通过毗邻序列来计算,即,将一个序列与另一个序列进行序列对比,并且一个序列中的每个氨基酸直接与另一个序列的相应氨基酸进行每次一个残基的比较。这被称为“无缺口的”序列对比。通常,所述无缺口的对比只在相对少量的残基中进行。

[0323] 尽管这是非常简单且一致的方法,但是它没有考虑到,例如,在序列除此之外相同的列配对中,一个插入或缺失将导致随后的氨基酸残基被逐出序列对比,因此当进行整体排列时,将很可能导致%同源性的大幅度下降。因此,多数序列比较方法被设计成考虑到可能的插入和缺失而不会对整体同源性积分不适当地罚分,从而产生最佳的序列对比。这通过在序列对比中插入“缺口”来试图最大化局部的同源性而实现。

[0324] 但是,这些更复杂的方法对序列对比中出现的每个缺口指定了“缺口罚分”,这样,对于相同数量的相同氨基酸,带有尽可能少的缺口的序列对比——反映两个比较序列之间的更高相关性——将比有较多缺口的序列获得更高的积分。一般用“远交缺口计分(Affine gap costs)”来给缺口的存在扣(charge)较多的计分,给缺口中每个随后的残基扣较少罚分。这是最普遍使用的缺口积分系统。高缺口罚分当然将产生具有较少缺口的最优化的序

列对比。多数序列对比程序允许修改缺口罚分。但是当使用这种软件作序列比较时,优选使用缺省值。例如,当使用 GCG Wisconsin Bestfit 包时,氨基酸序列的缺省缺口罚分是缺口为-12,每个延伸为-4。

[0325] 因此最大%同源性的计算首先需要产生考虑到缺口罚分的最佳序列对比。用于进行这种对比的合适的计算机程序是 GCG Wisconsin Bestfit 软件包 (Devereux 等,1984, *Nucleic Acids Research* 12:387)。可以进行序列比较的其他软件例子包括,但不局限于 BLAST 软件包 (参见 Ausubel 等,1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, 第四版,第 18 章), FASTA (Atschul 等,1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) 和 GENWORKS 比较工具系列。BLAST 和 FASTA 都可得到,用于脱机和联机检索 (参见 Ausubel 等,1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, 第 7-58 到 7-60 页)。

[0326] 不过,对于一些应用,优选使用 GCG Bestfit 程序。一种称作 BLAST2 序列的新工具也可以用于比较蛋白和核苷酸序列 (见 *FEMS Microbiol Lett* 1999174(2):247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999177(1):187-8 和 tatiana@ncbi.nlm.nih.gov)。

[0327] 尽管最终同源性百分比可以根据同一性而测量,对比过程自身一般不以全或无成对比较为基础。相反,通常使用按比例绘制的 (scaled) 相似性评分矩阵将得分分配到每个以化学相似性或进化距离为基础而进行的成对比较。这种常用矩阵的一个例子是 BLOSUM62 矩阵,即 BLAST 程序系列的缺省矩阵。GCG Wisconsin 程序一般用公共默认值或如果已提供,则使用自定义符号比较表 (更详细内容见用户手册)。对于一些应用,优选将公共默认值用于 GCG 软件包,或在使用其它软件的情况下,使用缺省矩阵,如 BLOSUM62。

[0328] 或者,可以利用 DNASIS™ (Hitachi 软件) 中的多重比对特征,基于类似于 CLUSTAL (Higgins DG&Sharp PM(1988), *Gene* 73(1), 237-244) 的算法来计算百分比同源性。

[0329] 一旦软件产生最优对比,就有可能计算%同源性,优选%序列同一性。软件一般作为序列比较的一部分进行此计算并产生以数字表示的结果。

[0330] 本发明优选的方面中利用用于计算百分比序列同源性/同一性的下列软件和设置。对于氨基酸序列的同一性(同源性)或“阳性”百分比,通过 AlignX VectorNTI (来自 Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA. 的 Vector NTI Advance 9.1) 对每一可能的氨基酸序列对计算。设置为缺省参数(缺口开放罚分 -10, 缺口延伸罚分 0.1)。

[0331] 对于核酸序列的同一性(同源性)或“阳性”百分比,通过来自 Informax Inc. (USA) 的 AlignX VectorNTI 程序对每一可能的核酸序列对计算。设置为对 DNA 的默认设置,为:缺口开放罚分:15 和缺口延伸罚分:6.66 (对于多重比对为相同的设置)。

[0332] 优选氨基酸同一性(同源性)跨越全长氨基酸序列计算,或对于核酸为编码相应全长氨基酸序列的对应多核苷酸。

[0333] 序列也可以有氨基酸残基的缺失、插入或取代,其产生沉默改变并导致产生功能等同物。可以根据氨基酸特性(如残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性、和/或双亲性)的相似而进行有意的氨基酸取代,所以将氨基酸以官能团分类在一起是有用的。氨基酸可以仅仅以它们的侧链特性而分类在一起。不过,包括突变数据等更加有用。由此衍生的氨基酸组有可能由于结构的原因而是保守的。这些组能够以 Venn 图表的形式描述 (Livingstone C.D. 和 Barton G.J. (1993) "Protein sequence alignments:a

strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" *Compiit. Appl Biosci.* 9:745-756) (Taylor W. R. (1986) "The classification of amino acid conservation" *J. Theor. Biol.* 119 ;205-218)。例如根据下表可以制备保守性取代, 所述表描述了普遍接受的氨基酸分类的 Venn 图表。

[0334]

组		亚组	
疏水性	FWYHKMI	芳香族	FWYH
	LVAGC	脂肪族	ILV
极性	WYHKRED	带电	HKRED
	CSTNQ	带正电	HKR
		带负电	ED
小	VCAGSPT ND	很小	AGS

[0335] 本发明也包含可以发生的同源取代(这里用到的取代和替代都表示现有氨基酸残基与备选残基的交换), 即相似物取代相似物, 如碱性取代碱性, 酸性取代酸性, 极性取代极性等等。也可发生非同源取代, 即从一类残基取代为另一类, 或者包括引入非天然氨基酸如鸟氨酸(以下简称 Z), 二氨基丁酸鸟氨酸(以下简称 B), 正亮氨酸鸟氨酸(以下简称 O), 吡啶丙氨酸, 噻吩丙氨酸, 萘基丙氨酸和苯基甘氨酸。

[0336] 也可通过非天然氨基酸进行替代。

[0337] 变体氨基酸序列可以包括可以插入序列的任意两个氨基酸残基之间的适当间隔子基团, 包括烷基, 例如甲基、乙基或丙基, 以及氨基酸间隔子, 如甘氨酸或 β 丙氨酸残基。本领域的技术人员将容易理解变异的其它形式, 其包括类肽形式的一种或更多氨基酸残基的存在。为了免除怀疑, "类肽形式" 用来指变体氨基酸残基, 其中 α 碳取代基是在残基的氮原子上, 而不是在 α 碳上。制备类肽形式的肽的方法是本领域中公知的, 如 Simon RJ 等, *PNAS* (1992) 89 (20), 9367-9371 和 Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (1995) 13 (4), 132-134。

[0338] 用于本发明的核苷酸序列可以包括合成或修饰的核苷酸。寡核苷酸的许多不同类型的修饰是本领域已知的。这些包括甲基磷酸酯和硫代磷酸酯主链, 和 / 或在分子的 3' 和 5' 端添加吡啶或多聚赖氨酸链。为了本发明的目的, 要理解在此所描述的核苷酸序列可以通过本领域已有的任何方法进行修饰。可以进行这种修饰以便提高体内活性或本发明的核苷酸序列的寿命。

[0339] 本发明还包括与本文给出的序列互补的核苷酸序列, 或其任何衍生物、片段或其衍生物用途。如果序列与其片段互补那么该序列可以用作探针来在其它生物等中鉴定类似的编码序列。

[0340] 可以以多种方式获得与本发明的序列不具有 100% 同源性但是落在本发明范围内的多核苷酸。可以例如通过探测从许多个体, 例如来自不同种群的个体制备的 DNA 文库, 来

获得本文所述的序列的其它变体。此外,可以获得其它的同源物并且这样的同源物及其片段通常能够任选地与在本文的序列表中显示的序列杂交。这样的序列可以通过探测制备自其它物种的 cDNA 文库或来自其它物种的基因组 DNA 文库,并在中度至高严格条件下,用包含在后附的序列表中的任何一个序列的全部或部分的探针探测这些文库来获得。应用类似的考虑来获得本发明的多肽或核苷酸序列的物种同源物和等位基因变体。

[0341] 还可以使用简并 PCR 来获得变体和菌株 / 物种同源物,所述简并 PCR 使用这样的引物,所述引物被设计以靶向变体和同源物中的序列,所述序列编码本发明的序列中的保守氨基酸序列。保守序列可以例如通过比对来自数种变体 / 同源物的氨基酸序列进行预期。序列比对可以使用本领域已知的计算机软件来进行。例如,广泛使用 GCG Wisconsin PileUp 程序。

[0342] 在简并 PCR 中使用的引物包含一个或多个简并位点并且将在这样的严格条件下使用,所述严格条件低于用针对已知序列的单序列引物克隆序列所使用的那些条件。

[0343] 或者,这些多核苷酸可以通过被表征的序列的定点诱变来获得。这在例如需要沉默密码子序列变化以优化特定宿主细胞的密码子偏好的情况中可以是有益的,在所述特定宿主细胞中多核苷酸序列被表达。可能需要其它的序列变化以引入限制性酶识别位点,或改变由所述多核苷酸编码的多肽的性质或功能。

[0344] 可以使用本发明的多核苷酸(核苷酸序列)来产生引物,例如 PCR 引物,用于选择性扩增反应的引物,探针例如,通过常规方式,使用放射性或非放射性标记以具有显示性的标记,或者可以将所述多核苷酸克隆入载体中。这些引物、探针和其它片段的长度将至少为 15,优选至少 20,例如至少 25,30 或 40 个核苷酸,并且也被本文所用的术语本发明的多核苷酸所包括。

[0345] 可以重组性地,合成性地,或通过本领域技术人员已知的任何方法来生产根据本发明的多核苷酸如 DNA 多核苷酸和探针。其还可以通过标准技术进行克隆。通常,将通过合成方法来生产引物,包括一次一个核苷酸来逐步生产所需的核酸序列。利用自动技术实现此的技术可以轻易在现有技术中获得。

[0346] 一般将利用重组方法来生产较长的多核苷酸,例如利用 PCR(聚合酶链式反应)克隆技术。可以将引物设计成包含合适的限制性酶识别位点从而可以将扩增的 DNA 克隆入合适的克隆载体中。

[0347] 生物学活性

[0348] 优选所述变体序列等与本文所给出的序列至少同样具有生物学活性。

[0349] 如本文所用的“生物学活性”指一种序列,其具有与天然发生的序列相似的结构功能(但不必同等程度),和 / 或相似的调控功能(但不必同等程度),和 / 或相似的生化功能(但不必同等程度)。

[0350] 尤其,变体序列或其修饰形式具有与本文鉴定的肌醇六磷酸酶酶学谱相似的酶学谱。这种谱包括诸如作为分泌蛋白的特征,具有 pH2-5.5 范围的最佳 pH,优选 4.0-4.5,在 pH2-5.5 范围下保留至少 50% 的最大活性,和 / 或具有超过 300U/mg 的比活。

[0351] 杂交

[0352] 本发明还包括与本发明的序列互补的序列或可以与本发明的序列或其互补序列杂交的序列。

[0353] 如本文所用的术语“杂交”应包括“使核酸链通过碱基配对与互补链结合的过程”，以及在聚合酶链式反应 (PCR) 技术中进行的扩增过程。

[0354] 本发明还包含可以与这里所述序列,或其任意衍生物、片段或其衍生物互补的序列杂交的核苷酸序列的用途。

[0355] 术语“变体”还包括可以与这里所述核苷酸序列杂交的序列互补的序列。

[0356] 优选,术语“变体”包括可以在严谨条件下(如 50°C 和 $0.2 \times \text{SSC}$ { $1 \times \text{SSC} = 0.15\text{M NaCl}, 0.015\text{M}$ 柠檬酸钠 pH7.0}) 与此处呈现的核苷酸序列杂交的序列互补的序列。

[0357] 更优选,术语“变体”包括可以在高严谨条件下(如 65°C 和 $0.1 \times \text{SSC}$ { $1 \times \text{SSC} = 0.15\text{M NaCl}, 0.015\text{M}$ 柠檬酸钠 pH7.0}) 与此处呈现的核苷酸序列杂交的序列互补的序列。

[0358] 本发明还涉及可以与本发明的核苷酸序列杂交的核苷酸序列(包括本文给出序列的互补序列)。

[0359] 本发明还涉及与可以与本发明的核苷酸序列杂交的核苷酸序列(包括本文给出序列的互补序列)互补的核苷酸序列。

[0360] 可以在中度到最大严谨度条件下与本文给出的核苷酸序列杂交的多核苷酸序列也包括在本发明的范围内。

[0361] 在一个优选方面,本发明包含可以在严谨条件下(如 50°C 和 $0.2 \times \text{SSC}$) 与本发明的核苷酸序列或其互补序列杂交的核苷酸序列。

[0362] 在一个更优选的方面,本发明包含可以在高严谨条件下(如 65°C 和 $0.1 \times \text{SSC}$) 与本发明的核苷酸序列或其互补序列杂交的核苷酸序列。

[0363] 定点诱变

[0364] 一旦分离和 / 或纯化出编码酶的核苷酸序列,或鉴定出推定的编码酶的核苷酸序列,可以预期使序列突变,从而制备本发明的酶。

[0365] 可以用合成寡核苷酸引入突变。这些寡核苷酸含有所需突变位点的侧翼核苷酸序列。

[0366] 适合的方法公开于 Morinaga 等 (Biotechnology (1984) 2, p646-649) 中。另一种将突变引入编码酶的核苷酸序列中的方法描述于 Nelson 和 Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p147-151)。另一种方法描述于 Sarkar 和 Sommer (Biotechniques (1990), 8, p404-407-“The megaprimer method of site directed mutagenesis”) 中。

[0367] 重组的

[0368] 在一方面,用于本发明的序列是重组序列—即已经利用重组 DNA 技术制备的序列。

[0369] 这些重组 DNA 技术是本领域普通技术人员能力范围内的技术。这些技术在文献,例如, J. Sambrook, E. F. Fritsch, 和 T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 中进行了解释。

[0370] 合成的

[0371] 在一方面,用于本发明的序列是合成的序列—即已经通过体外化学或酶学合成制备的序列。其包括但不限于,用宿主生物偏好的密码子用法制备的序列—所述宿主生物如

甲基营养型酵母毕赤酵母属和汉森酵母属。

[0372] 酶的表达

[0373] 用于本发明的核苷酸序列可以被并入重组可复制载体。该载体可以用于复制、和在相容性宿主中和 / 或由相容性宿主以酶的形式表达该核苷酸序列。

[0374] 可以用控制序列例如调控序列控制表达。

[0375] 通过核苷酸序列表达而由宿主重组细胞产生的酶可以被分泌,或包含在细胞内,这取决于使用的序列和 / 或载体。可以将编码序列设计为具有信号序列,该信号序列增强编码序列通过特定原核或真核细胞膜的直接分泌。

[0376] 有利地,本发明的酶是分泌的。

[0377] 表达载体

[0378] 术语“质粒”、“载体系统”或“表达载体”意指能够体内或体外表达的构建体。在本发明的上下文中,这些构建体可以用来将编码酶的基因导入宿主细胞中。适当地,其表达可被导入的基因可以称作“可表达的转基因”。

[0379] 优选,将表达载体掺入合适的宿主生物体的基因组。术语“掺入”优选包括稳定掺入基因组。

[0380] 本文所述的核苷酸序列,包括本发明的核苷酸序列,可以存在于载体中,其中核苷酸序列被可操作性连接到调控序列上,所述调控序列能够通过适当宿主生物体提供核苷酸序列的表达。

[0381] 用于本发明的载体可以被转化到下面所述的适当宿主细胞中,从而提供本发明多肽的表达。

[0382] 载体例如质粒、粘粒或噬菌体载体的选择通常将取决于其将要导入的宿主细胞。

[0383] 用于本发明的载体可以包含一种或多个可选择的标记基因—如赋予抗生素抗性例如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性的基因。或者,可以通过共转化来实现选择(如 W091/17243 中所述)。

[0384] 可以体外使用载体,例如来生产 RNA,或用来转染、转化、转导或感染宿主细胞。

[0385] 因而,在另一个实施方案中,本发明提供制备本发明的核苷酸序列的方法,该方法是通过将本发明的核苷酸序列导入可复制的载体,将该载体导入相容的宿主细胞中,和在能够带来载体复制的条件下生长所述宿主细胞而进行的。

[0386] 所述载体可以进一步包含能够使载体在所研究的宿主细胞中复制的核苷酸序列。这些序列的实例为质粒 pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, pIJ101、pTZ12 和 pET11 的复制起点。

[0387] 调控序列

[0388] 在一些应用中,用于本发明的核苷酸序列可操作性地连接到调控序列上,所述调控序列能够提供核苷酸序列的表达,如通过选定的宿主细胞的表达。例如,本发明包括这样一种载体,其包含可操作性地连接到这种调控序列上的本发明的核苷酸序列,即所述载体是表达载体。

[0389] 术语“可操作性地连接”指一种毗连,其中所述组分的关系使得其以其所希望的方式发挥作用。以特定的方式连接“可操作性地连接”到编码序列上的调控序列,从而在与控制序列相容的条件下实现编码序列的表达。

[0390] 术语“调控序列”包括启动子和增强子和其它表达调控信号。

[0391] 以本领域正常意义使用术语“启动子”，例如 RNA 聚合酶结合位点。

[0392] 还可以通过选择异源调控区例如启动子、分泌前导区和终止子区域来增加编码本发明的酶的核苷酸序列的表达。

[0393] 优选，根据本发明的核苷酸序列可操纵地与至少一个启动子连接。

[0394] 指导核苷酸序列在细菌、真菌或酵母宿主中转录的合适的启动子的实例是本领域众所周知的。

[0395] 构建体

[0396] 构建体

[0397] 术语“构建体”一其与术语如“缀合物”、“盒”和“杂交体”同义—包括按照本发明使用直接或间接连接于启动子的核苷酸序列。

[0398] 间接连接的实例是在启动子和本发明的核苷酸序列之间提供适合的间隔子基团，如内含子序列，如 Sh1- 内含子或 ADH 内含子。涉及本发明的术语“融合的”也是如此，其包括直接或间接连接。在一些情况中，该术语不包括核苷酸序列的天然组合，所述核苷酸序列编码与野生型基因启动子相关联的蛋白质，并且当它们均处在天然环境中时。

[0399] 所述构建体可以甚至包含或表达容许选择遗传构建体的标记。

[0400] 对于一些应用而言，优选地，本发明的构建体至少包含与启动子可操纵连接的本发明的核苷酸序列。

[0401] 宿主细胞

[0402] 涉及本发明的术语“宿主细胞”包括任何细胞，所述细胞包含如上所述的核苷酸序列或表达载体，并且用于重组生产具有如本文定义的具体的性质的酶，或用于本发明的方法。

[0403] 因此，本发明的另一个实施方案提供用表达本发明所述的酶的核苷酸序列转化或转染的宿主细胞。选择细胞来与所述载体相容并且所述细胞可以例如是原核生物（例如细菌）、真菌、酵母或植物细胞。优选地，所述宿主细胞不是人细胞。

[0404] 合适的细菌宿主生物的实例是革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌物种。

[0405] 在一优选的实施方案中，宿主细胞为大肠杆菌，如已观察到布丘氏菌属 P1-29 肌醇六磷酸酶在大肠杆菌中有效分泌。在一种或多种下列表达宿主中异源表达后，鉴定肌醇六磷酸酶，包括变体：大肠杆菌 K12；枯草芽孢杆菌；酿酒酵母。这些宿主因此也是优选的。

[0406] 根据编码本发明的酶的核苷酸序列的性质和 / 或对于进一步加工表达的蛋白质的需要，可以优选真核宿主，如酵母或其它真菌。通常，酵母细胞优于真菌细胞，因为它们易于操纵。然而，一些蛋白质不易从酵母细胞中分泌，或在一些情况中不能正确加工（例如，在酵母中过度糖基化）。在这些情况中，应该选择不同的真菌宿主生物。

[0407] 使用合适的宿主细胞—如酵母，真菌和植物宿主细胞—可以提供翻译后修饰（例如，十四烷酰化，糖基化，平截，lapidation 和酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸磷酸化），因为可能需要给本发明的重组表达产物赋予优化的生物活性。

[0408] 宿主细胞可以是蛋白酶缺陷或蛋白酶负型菌株。

[0409] 可以修饰宿主细胞的基因型来提高表达。

[0410] 宿主细胞修饰的实例包括蛋白酶缺陷，稀有 tRNA's 的补充，和改变在细胞质中的

还原电势以增加二硫键形成。

[0411] 例如, 宿主细胞大肠杆菌可以过量表达稀有的 tRNA's 以提高异源蛋白质的表达, 如在 Kane(Curr Opin Biotechnol(1995),6,494-500"Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in E.coli" 中例示 / 描述。所述宿主细胞可以缺乏许多还原酶, 因此有利于形成稳定的二硫键, 如在 Bessette(Proc Natl Acad Sci USA(1999),96,13703-13708"Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the Escherichia coli cytoplasm") 中例示 / 描述。

[0412] 在一个实施方案中, 本发明上下文中的宿主细胞包括可以直接添加到动物饲料中的那些细胞。

[0413] 生物体

[0414] 涉及本发明的术语 "生物体" 包括这样的任何生物, 所述生物可以包括编码如在本发明中所述的酶的核苷酸序列和 / 或获自其中产物, 和 / 或其中当本发明的核苷酸序列存在于所述生物中时, 启动子可以容许根据本发明的核苷酸序列的表达。

[0415] 合适的生物体可以包括原核生物、真菌、酵母或植物。

[0416] 涉及本发明的术语 "转基因生物" 可以包括这样的任何生物, 所述生物包括编码如在本发明中所述的酶的核苷酸序列和 / 或获自其中的产物, 和 / 或其中启动子可以容许根据本发明的核苷酸序列在所述生物中的表达的任何生物。优选地, 将所述核苷酸序列掺入所述生物的基因组中。

[0417] 术语 "转基因生物" 不包括当它们在其天然启动子控制下时, 在它们天然环境中的天然核苷酸编码序列, 所述天然启动子也在其天然环境中。

[0418] 因此, 本发明的转基因生物包括这样的生物, 所述生物包含编码如本发明所述的酶的核苷酸序列, 根据本发明的构建体, 根据本发明的载体, 根据本发明的质粒, 根据本发明的细胞, 根据本发明的组织, 或其产物中的任何一种, 或其组合。

[0419] 例如, 所述转基因生物还可以包括在异源启动子控制下编码本发明的酶的核苷酸序列。

[0420] 宿主细胞 / 生物体的转化

[0421] 如前面指出, 宿主生物可以是原核生物体或真核生物体。合适的原核生物宿主的实例包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。

[0422] 关于原核宿主的转化的教导在本领域的文献中有充分记载, 例如见 Sambrook 等 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 第二版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。其它合适的方法在本文实施例中提出。如果使用原核宿主, 那么核苷酸序列可能需要在转化前进行适当地修饰——如通过去除内含子进行修饰。

[0423] 丝状真菌细胞可以使用本领域已知的各种方法进行转化——诸如包括形成原生质体和转化原生质体, 随后以已知方式再生细胞壁的方法。在 EP 0 238 023 中描述了将曲霉属 (*Aspergillus*) 用作宿主微生物。

[0424] 另一种宿主生物体可以是植物。用于转化植物的一般技术的综述可以见于 Potrykus(Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol[1991]42:205-225) 和 Christou(Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 199417-27) 的文章。关于植物转化的另外的教导可以见于 EP-A-0449375。

- [0425] 关于真菌、酵母和植物的转化的一般教导见于下面的部分。
- [0426] 转化的真菌
- [0427] 宿主生物可以是真菌——如丝状真菌。合适的这样的宿主的实例包括属于高湿霉属 (*Thermomyces*), 支顶孢属 (*Acremonium*), 曲霉属, 青霉属 (*Penicillium*), 毛霉属 (*Mucor*), 脉孢菌 (*Neurospora*), 木霉属 (*Trichoderma*) 等属的任何成员。
- [0428] 关于转化丝状真菌的教导综述于 US-A-5741665, 其陈述了转化丝状真菌的的标准技术, 培养所述真菌是本领域众所周知的。用于粗糙链孢霉 (*N. crassa*) 的技术的广泛综述见于例如 Davis 和 de Serres, *Methods Enzymol* (1971) 17A:79-143。
- [0429] 关于转化丝状真菌的另外的教导综述于 US-A-5674707。
- [0430] 在一方面, 宿主生物可以是曲霉菌属生物, 如黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。
- [0431] 还可以按照, 例如 Turner G. 1994 (Vectors for genetic manipulation. In: Martinelli S. D., Kinghorn J. R. (Editors) *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology vol 29. Elsevier Amsterdam 1994. pp. 641-666*) 的教导制备根据本发明的转基因曲霉属。
- [0432] 基因在丝状真菌中的表达已经综述于 Punt 等. (2002) *Trends Biotechnol* 2002 May; 20(5):200-6, Archer & Peberdy *Crit Rev Biotechnol* (1997) 17(4):273-306 中。
- [0433] 转化的酵母
- [0434] 在另一个实施方案中, 转基因生物体可以是酵母。
- [0435] 在例如 *Methods Mol Biol* (1995), 49:341-54, 和 *Curr Opin Biotechnol* (1997) Oct; 8(5):554-60 中提供关于异源基因在酵母中表达的原理的综述。
- [0436] 在该方面, 可以将酵母——诸如物种酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisi*) 或巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) (见 *FEMS Microbiol Rev* (2000) 24(1):45-66) 用作异源基因表达的载体。
- [0437] 在 E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeasts as a vehicle for the expression of heterologous genes", *Yeasts*, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 第二版, Academic Press Ltd.) 中提供在酿酒酵母中异源基因表达和基因产物的分泌的原理的综述。
- [0438] 对于酵母的转化, 已经开发了一些转化方法。例如, 可以按照 Hinnen 等, (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75, 1929); Beggs, J D (1978, *Nature*, London, 275, 104); 和 Ito, H 等 (1983, *J Bacteriology* 153, 163-168) 的教导制备根据本发明的转基因的酵母。
- [0439] 可以使用各种选择标记——如营养缺陷型标记、显性抗生素抗性标记来选择转化的酵母细胞。
- [0440] 转化的植物 / 植物细胞
- [0441] 适合于本发明的宿主生物可以是植物。一般技术的综述可以见于 Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42:205-225) 和 Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech* March/April 1994 17-27) 的文章。
- [0442] 培养和生产

[0443] 用本发明的核苷酸序列转化的宿主细胞可以在有益于编码的酶的产生并有利于酶从所述细胞和 / 或培养基中回收的条件下培养。

[0444] 用于培养所述细胞的培养基可以是适合于培养目的宿主细胞并获得所述酶的表达的任何常用培养基。

[0445] 可以在细胞的表面上呈现由重组细胞产生的蛋白质。

[0446] 酶可以从宿主细胞中分泌并可以方便地使用众所周知的方法从培养基中回收。

[0447] 分泌

[0448] 可以希望使酶从表达宿主中分泌到其中酶可能更易于回收的培养基中。根据本发明,分泌前导序列可以基于期望的表达宿主进行选择。杂交体信号序列也可以用于本发明的背景中。

[0449] 异源分泌前导序列的典型实例是从真菌淀粉葡糖苷酶 (AG) 基因 (glaA - 例如来自曲霉菌的 18 和 24 个氨基酸的形式), α - 因子基因 (酵母, 例如, 酵母属 (Saccharomyces), 克鲁维酵母属 (Kluyveromyces) 和汉森氏酵母属 (Hansenula)) 或 α - 淀粉酶基因 (芽孢杆菌属) 起源的那些。

[0450] 作为实例,在大肠杆菌中的异源蛋白质的分泌在 Methods Enzymol (1990) 182:132-43 中进行综述。

[0451] 检测

[0452] 用于检测和测量氨基酸序列的表达的各种方法是本领域众所周知的。实例包括酶联免疫吸附测定法 (ELISA), 放射免疫测定法 (RIA) 和荧光激活的细胞分选术 (FACS)。

[0453] 广泛种类的标记和缀合技术是本领域那些技术人员已知的并且可以用在多种核酸和氨基酸测试中。

[0454] 许多公司如 Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), 和 US Biochemical Corp (Cleveland, OH) 提供用于这些步骤的商业试剂盒和方法。

[0455] 适合的报告分子或标记包括那些放射性核素, 酶, 荧光, 化学发光, 或显色剂以及底物, 辅因子, 抑制剂, 磁性颗粒等。教导这些标记的应用的专利包括 US-A-3,817,837 ; US-A-3,850,752 ; US-A-3,939,350 ; US-A-3,996,345 ; US-A-4,277,437 ; US-A-4,275,149 和 US-A-4,366,241。

[0456] 此外,可以如在 US-A-4,816,567 中所显示产生重组免疫球蛋白。

[0457] 检测肌醇六磷酸酶活性的其它合适的测试法是本领域已知的并且在本文进行例示。

[0458] 融合蛋白

[0459] 可以将根据本发明使用的氨基酸序列作为融合蛋白进行制备,从而例如有助于提取和纯化。融合蛋白配偶体的实例包括谷胱甘肽-S- 转移酶 (GST), 6xHis, GAL4 (DNA 结合和 / 或转录激活结构域) 和 β - 半乳糖苷酶。在融合蛋白配偶体和目标蛋白序列之间包括蛋白水解剪切位点从而容许去除融合蛋白序列也可以是有利的。

[0460] 优选地,融合蛋白不会干扰蛋白质序列的活性。

[0461] 已经在 Curr Opin Biotechnol (1995) 6 (5) :501-6 中综述了在大肠杆菌中的基因融合表达系统。

[0462] 在本发明的另一个实施方案中,氨基酸序列可以连接于异源序列以编码融合蛋

白。例如,为了筛选能够影响物质活性的试剂的肽库,编码表达由商购抗体识别的异源表位的嵌合物质可以是有用的。

[0463] 其它序列

[0464] 还可以结合一个或多个另外的目标蛋白质 (POI) 或目标核苷酸序列 (NOI) 来使用根据本发明应用的序列。

[0465] POI 的非限制性实例包括:木聚糖酶,脂肪酶,酸性磷酸酶和 / 或其它。这些包括例如调节饲料粘性的酶。所述 NOI 甚至可以是任何那些序列的反义序列。

[0466] POI 甚至可以是融合蛋白,从而例如有助于提取和纯化或有利于增加体内肌醇六磷酸代谢。

[0467] POI 甚至可以与分泌序列融合。

[0468] 其它的序列也可以有利于分泌或增加分泌的 POI 的产率。这些序列可以编码伴侣蛋白,如例如在英国专利申请 9821198.0 中所述的黑曲霉 *cyp B* 基因的产物。

[0469] 可以出于许多原因对编码 POI 的 NOI 进行改造从而改变它们的活性,包括但不限于,改进其表达产物的加工和 / 或表达的改变。作为进一步的实例,还可以修饰 NOI 以优化在特定宿主细胞中的表达。可能需要其它的序列改变从而引入限制性酶识别位点。

[0470] 编码 POI 的 NOI 在其中可以包括合成或修饰的核苷酸——诸如甲基磷酸酯和硫代磷酸酯主链。

[0471] 可以修饰编码 POI 的 NOI 从而增加细胞内的稳定性和半衰期。可能的修饰包括,但不限于,加入分子的 5' 和 / 或 3' 末端的旁侧序列或在所述分子的主链中使用硫代磷酸酯或 2' O- 甲基而不是磷酸二酯键。

[0472] 抗体

[0473] 本发明的一个方面涉及与 SEQ ID No. 3 的氨基酸具有免疫反应性的氨基酸。

[0474] 可以通过标准技术,诸如用本发明的物质进行免疫或通过使用噬菌体展示文库产生抗体。

[0475] 出于本发明的目的,除非相反地指出,术语“抗体”包括,但不限于,多克隆,单克隆,嵌合的,单链,Fab 片段,通过 Fab 表达文库产生的片段及其模拟物。这些片段包括完整抗体的片段,其保留它们对于目标物质,Fv,F(ab') 和 F(ab')₂ 片段,以及单链抗体 (scFv),融合蛋白和包括抗体的抗原结合位点的其它合成蛋白质的结合活性。此外,抗体及其片段可以是人源化抗体。中和抗体,即,抑制物质多肽的生物活性的那些,对于诊断和治疗是尤其优选的。

[0476] 如果需要多克隆抗体,用本发明的序列 (或包含其免疫表位的序列) 免疫选定的哺乳动物 (例如,小鼠,兔,山羊,马等)。根据宿主的物种,可以使用各种佐剂来增加免疫应答。

[0477] 收集来自被免疫的动物的血清,并根据已知的方法对其进行处理。如果包含针对本发明的序列 (或包含其免疫表位的序列) 的多克隆抗体的血清包含针对其它抗原的抗体,可以通过免疫亲和层析来纯化多克隆抗体。用于产生和加工多克隆抗血清的技术是本领域已知的。为了可以制备这些抗体,本发明还提供本发明的多肽或其片段,其半抗原化 (haptense) 成另一种多肽来在动物或人中用作免疫原。

[0478] 针对本发明的序列 (或包含其免疫表位的序列) 的单克隆抗体还可以由本领域

技术人员容易地制备,并且包括,但不限于,杂交瘤技术 Koehler 和 Milstein(1975Nature 256:495-497),人 B- 细胞杂交瘤技术 (Kosbor 等, (1983)Immunol Today 4:72 ;Cote 等, (1983)Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030) 和 EBV- 杂交瘤技术 (Cole 等, (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan Rickman Liss Inc, pp 77-96)。

[0479] 此外,可以使用为产生“嵌合抗体”所开发的技术,剪接小鼠抗体基因与人抗体基因从而获得具有适合的抗原特异性和生物活性的分子 (Morrison 等 (1984)Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855 ;Neuberger 等, (1984)Nature312:604-608 ;Takeda 等, (1985)Nature 314:452-454)。

[0480] 或者,可以将对于生产单链抗体所述的技术 (美国专利号 4,946,779) 进行改进以产生物质特异性单链抗体。

[0481] 还可以产生包含对于所述物质的特异性结合位点的抗体片段。例如,这样的片段包括,但不限于,可以通过用胃蛋白酶消化抗体分子产生的 F(ab')₂ 片段和可以通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫键产生的 Fab 片段。或者,可以构建 Fab 表达文库以容许快速和容易地鉴定具有需要的特异性的单克隆 Fab 片段。(Huse WD 等, (1989)Science 256:1275-1281)。

[0482] 大规模应用

[0483] 在本发明的一个优选实施方案中,将编码布丘氏菌属衍生的肌醇六磷酸酶的氨基酸序列或本发明的方法用于大规模的应用。具体而言,本发明的方法可以用于大规模生产肌醇六磷酸酶以作为食品或饲料组合物的添加剂 / 补充物进行工业应用。

[0484] 优选,在培养宿主生物后,所述氨基酸序列以每升总细胞培养物体积的 5g 到每升约 10g 的量产生。

[0485] 优选,在培养宿主生物体后,所述氨基酸序列以每升总细胞培养物体积 的 100mg 到约每升 900mg 的量产生。

[0486] 优选,在培养宿主生物后,所述氨基酸序列以每升总细胞培养物体积的 250mg 到约每升 500mg 的量产生。

[0487] 肌醇六磷酸酶的应用

[0488] 如上文指出,本发明还涉及如本文所述的肌醇六磷酸酶的生产。

[0489] 具体而言,本发明还涉及将在本文公开的氨基酸序列用于制备有机和无机的磷酸盐 (酯) 化合物。

[0490] 因此,本发明还涉及将编码肌醇六磷酸酶的核苷酸序列用于产生表达所述肌醇六磷酸酶的表达载体或系统。

[0491] 此外,本发明涉及将这些表达载体或系统用于产生表达肌醇六磷酸酶的宿主细胞。

[0492] 本发明还涉及将修饰的宿主细胞用于产生有机和无机磷酸盐 (酯) 化合物的前体或用于产生特定的有机磷酸盐 (酯) 化合物。

[0493] 合适的有机和无机磷酸盐 (酯) 化合物包括肌 - 肌醇五 -, 四 -, 三 -, 二 - 和单磷酸。

[0494] 因此适当地,本发明提供产生有机磷酸盐 (酯) 化合物的方法,所述方法包括用衍生自布丘氏菌属的肌醇六磷酸酶处理肌醇六磷酸。优选地,所述方法的特征在于所述酶包含如 SEQ ID NOs:3 所显示的氨基酸序列,或与其具有至少 75% 同一性 (同源性) 的序列或

有效片段,或其修饰形式。适当地,有机磷酸盐(酯)是肌醇六磷酸或肌-肌醇二-,三-,四-,和五磷酸的所有可能的立体异构体。其它合适的有机磷酸盐(酯)包括肌醇-四磷酸和肌醇-寡磷酸。在优选的实施方案中,所述方法是体内生物技术方法。

[0495] 用于生产有机磷酸盐(酯)化合物的这些方法可以适当地包括下列步骤:

[0496] a) 提供包含可表达的转基因的宿主细胞,所述转基因包含布丘氏菌属肌醇六磷酸酶;

[0497] b) 在适合于表达所述转基因的条件下培养所述转基因生物;和

[0498] c) 从所述培养物中回收有机磷酸盐(酯)化合物。

[0499] 可以将所述化合物用于许多应用,包括用于测试肌醇六磷酸酶的特征。一些肌醇磷酸酯涉及作为在细胞内调节的信号分子,并可以将其用作研究用化学药品。

[0500] 在另一方面,提供生产食品或动物饲料的方法。动物饲料典型地在饲料粉碎机中生产,其中首先将原材料研磨成适合的颗粒大小,接着将其混合以适合的添加剂。接着,可以以醪液或粒状沉淀形式生产饲料;后者典型地包括将温度升高到目标温度,接着将所述饲料通过模具以产生特定大小的粒状沉淀的方法。随后,可以加入液体添加剂如脂肪和酶。在运输之前,使所述粒状沉淀冷却。动物饲料的生产还可以包括另外的步骤,所述另外的步骤包括在粒化之前进行挤压或膨胀。

[0501] 因此,本发明还提供编码肌醇六磷酸酶的氨基酸序列或表达肌醇六磷酸酶的宿主细胞的用途,用于产生肌醇六磷酸酶以制备食品或饲料产品。在一方面,提供了将如本文所述的氨基酸序列用于制备食品或饲料产品的用途。在另一方面,提供了将根据本发明的宿主细胞用于制备食品或饲料产品的用途。在另一方面,提供将根据本发明的表达载体或系统用于制备食品或饲料产品的用途。

[0502] 本发明还包括使用酶作为饲料的组分与其它组分组合递送给动物。

[0503] 与其它组分的组合

[0504] 本发明的酶可以与其它组分或载体组合使用。

[0505] 用于饲料的酶的合适的载体包括小麦(粗研的)。此外,存在许多封装技术,包括基于脂肪/蜡覆盖的那些技术、加入植物树胶等。

[0506] 其它组分的实例包括下列各项的一个或多个:增稠剂,胶凝剂,乳化剂,粘合剂,晶体改性剂,甜味剂(包括人工甜味剂),流变学改性剂,稳定剂,抗氧化剂,染料,酶,载体,媒介物,赋形剂,稀释剂,润滑剂,增香剂,着色物质,悬浮剂,崩解剂,颗粒粘合剂等。这些其它的组分可以是天然的。这些其它的组分可以通过使用化学和/或酶学技术进行制备。

[0507] 用于本文的术语“增稠剂或胶凝剂”用于本文时,指通过延缓或阻止颗粒移动来防止分离的产品,所述颗粒为不可混溶的液体、空气、或不可溶的固体的小滴。

[0508] 将用于本文的术语“稳定剂”定义为防止产品(例如食品)随时间变化的成分或成分的组合。

[0509] 用于本文的术语“乳化剂”指防止乳状液分离的成分(例如食品成分)。

[0510] 用于本文的术语“粘合剂”指通过物理或化学反应将产品粘合在一起的成分(例如,食品成分)。

[0511] 用于本文的术语“晶体改性剂”指影响脂肪或水的结晶作用的成分(例如食品成分)。

[0512] “载体”或“媒介物”指适合于化合物施用的材料并且包括本领域已知的任何这样的材料,诸如例如任何液体,凝胶,溶剂,液体稀释剂,增溶剂等,其是无毒的并且不会以有害的方式与所述组合物的任何组分相互作用。

[0513] 在营养上可接受的载体的实例包括,例如,谷物,水,盐溶液,醇,聚硅氧烷,蜡,矿物脂,植物油等。

[0514] 赋形剂的实例包括下列各项的一个或多个:微晶纤维素和别的纤维素,乳糖,柠檬酸钠,碳酸钙,磷酸氢钙,甘氨酸,淀粉,乳糖和高分子量的聚乙二醇。

[0515] 崩解剂的实例包括下列各项的一个或多个:淀粉(优选地是谷物、马铃薯或木薯淀粉),羟基乙酸淀粉钠,交联羧甲基纤维素钠和某些复杂的硅酸盐。

[0516] 颗粒的粘合剂的实例包括下列各项的一个或多个:聚乙烯吡咯烷酮,羟丙基甲基纤维素(HPMC),羟丙基纤维素(HPC),蔗糖,麦芽糖,明胶和阿拉伯胶。

[0517] 润滑剂的实例包括下列各项的一个或多个:硬脂酸镁,硬脂酸,甘油二十二烷酸酯和滑石。

[0518] 稀释剂的实例包括下列各项的一个或多个:水,乙醇,丙二醇和甘油,及其组合。

[0519] 所述其它的组分可以同时(例如,当它们一起在混合物中时,或甚至当它们以不同的路径递送时)或顺序地(例如它们可以通过不同的路径递送)使用。

[0520] 用于本文的术语“适合于动物或人食用的组分”意指作为添加物被添加或可以添加到本发明的组合物中的化合物,其可以是具有营养益处的、是纤维取代物或通常对于消费者具有有益作用。

[0521] 作为实例,组分可以是益生元如藻酸盐(酯),黄原胶,果胶,槐豆胶(LBG),旋复花粉,瓜尔胶,半乳糖寡糖(GOS),果糖寡糖(FOS),乳蔗糖,大豆寡糖, palatinose, 异麦芽寡糖,葡糖寡糖和木糖寡糖。

[0522] 食品或饲料物质

[0523] 可以将所述化合物用作食品或饲料物质,或用在食品或饲料物质的制备中。在此处,术语“食品”以广泛意义使用,并且包括用于人的食物和食品以及用于动物的食物(即饲料)。关于在牲畜饲养中供应给动物的产品,使用术语“饲料”。在优选的方面,食品或饲料由单胃动物如猪,家禽和鱼食用。

[0524] 根据使用和/或应用的模式和/或施用的模式,食品或饲料可以以溶液的形式或作为固体形式存在。

[0525] 食品和饲料成分和添加物

[0526] 可以将化合物用作食品或饲料成分。

[0527] 用于本文的术语“食品或饲料成分”包括被添加或可以被添加到食品或食料中的制剂,并且包括可以以低水平使用在多种产品中的制剂。

[0528] 根据使用和/或应用的模式和/或施用的模式,食品成分可以以溶液的形式或作为固体形式存在。

[0529] 所述化合物可以是食品添加物或可以被添加到食品添加物中。

[0530] 食品和饲料组合物

[0531] 用于单胃动物的饲料组合物典型地包括包含植物产物的组合物,所述植物产物包含肌醇六磷酸。这些组合物包括基于玉米粉,大豆粉,油菜籽粉,棉籽粉,玉米,小麦,燕麦和

高粱的饲料。

[0532] 本文所述的肌醇六磷酸酶可以是食品或饲料组合物,或可以被添加到食品或饲料组合物中。

[0533] 本发明还提供制备食品或饲料成分或添加物的方法,所述方法包括将由本发明的方法生产的肌醇六磷酸酶或按照本发明的组合物与另一种食品成分混合。制备方法或食品成分也是本发明的另一个方面。在上面提出了制备动物饲料的方法。所述酶还可以以固体制剂的形式或作为饲料添加剂如预混合液进行添加。固体形式典型地在混合步骤之前或其过程中进行添加,液体形式典型地在沉淀步骤后添加。

[0534] 药物

[0535] 还可以将本发明的肌醇六磷酸酶用在药物制剂中或用于组合到粮食中从而提供某些药物作用。例如,EP 1,389,915 描述了将肌醇六磷酸酶用在食品或饮料中以增加用于人的食品或饮料中的钙,铁和 / 或锌的有效性。

[0536] 此外,EP 1,392,353 描述了包含肌醇六磷酸酶的药物或营养添加物,其对于增加生命元素,例如钙和铁的生物利用率和对抗缺陷型疾病是有用的。

[0537] 在此处,术语“药物”以广泛意义应用,并且包括用于人的药物和 / 或营养药以及用于动物的药物和 / 或营养药(即,兽医应用)。在优选的方面,所述药物用于人应用和 / 或用于动物饲养。

[0538] 所述药物可以用于治疗目的,其可以在性质上是治疗性的、缓和性的或预防性的。所述药物甚至可以用于诊断目的。

[0539] 当用作药物,或用在药物的制备中时,本发明的产物和 / 或化合物可以与下列各项的一个或多个结合使用:药用载体,药用稀释剂,药用赋形剂,药用佐剂,药用活性成分。

[0540] 根据使用和 / 或应用模式和 / 或施用模式,药物可以以溶液的形式或作为固体形式存在。

[0541] 药物成分

[0542] 可以将本发明的产物和 / 或化合物用作药物成分。在此处,本发明的产品和 / 或组合物可以是单一的活性成分或其可以是许多(即,2个或更多)活性成分中的至少一种。

[0543] 根据使用和 / 或应用的模式和 / 或施用的模式,药物成分可以以溶液的形式或作为固体形式存在。

[0544] 药物成分可以以泡腾产品的形式存在以提高药物的溶解性质。

[0545] 形式

[0546] 本发明的产品和 / 或化合物可以以任何合适的形式使用——不管是当单独存在时还是以组合物形式存在时。同样地,按照本发明产生的肌醇六磷酸酶(即,成分,诸如食品成分,功能性食品成分或药物成分)可以以任何合适的形式使用。

[0547] 形式的合适的实例包括下列各项的一个或多个:片剂,丸剂,胶囊,ovules,溶液,或混悬液,它们可以包含增香剂或着色剂,用于即刻的,延缓的,改进的,持续的,脉冲式的或受控的释放应用。

[0548] 作为实例,如果所述产品和 / 或组合物以片剂形式使用——如用作功能性成分——所述片剂还可以包含下列各项的一个或多个:赋形剂,崩解剂,颗粒粘合剂,或润滑剂。

[0549] 用在制备所述形式中的在营养上可接受的载体的实例包括,例如,水,盐溶液,醇,聚硅氧烷,蜡,矿脂等。

[0550] 用于所述形式的优选的赋形剂包括乳糖,淀粉,纤维素,乳糖,或高分子量的聚乙二醇。

[0551] 对于水性混悬液和 / 或酞剂,可以将肌醇六磷酸酶裂解化合物组合以各种甜味剂或增香剂,着色物质或染料,组合以乳化剂和 / 或悬浮剂和组合以稀释剂如水,乙醇,丙二醇和甘油及其组合。

[0552] 所述形式还可以包括明胶胶囊;纤维胶囊,纤维片剂等。

[0553] 一般重组 DNA 方法技术

[0554] 除非另外指出,本发明使用常规的化学技术,分子生物学技术,微生物学技术,重组 DNA 技术和免疫学技术,它们都在本领域普通技术人员的能力范围内。这些技术都在文献中有所阐述。见,例如 J. Sambrook, E. F. Fritsch, 和 T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. 等. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, 和 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, 和 A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; 和, D. M. J. Lilley 和 J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press. 将这些一般性文章的每个并入本文作为参考。

实施例

[0555] 现在在下面的非限制性实施例中进一步举例说明本发明。

[0556] 实施例 1. 肌醇六磷酸酶活性测试。

[0557] μl = 微升

[0558] 肌醇六磷酸酶测试在微量滴定板中进行。反应混合物 (100 μl) 包含: 在 200mM 醋酸钠缓冲液, pH 3.5 中的 2mM 肌醇六磷酸和 0.8mM CaCl_2 。使反应在 37°C 进行 1 小时, 随后通过改进的已知方法 (Heinonen J. K., Lahti R. J. *Anal Biochem.* 113(2), 313-317 (1981)) 来测量释放的磷酸盐 (酯)。简言之, 在每个微量滴定板孔中将 200 μl 的新鲜制备的 AMM 溶液 (7.5 NH_2SO_4 , 15mM 钼酸铵和丙酮—1:1:2) 加入 100 μl 的反应混合物中。加入 AMM 试剂后, 在不早于 10 分钟和不晚于 30 分钟的时间内, 测量在 390nm 的吸光度。通过用已知浓度的磷酸盐 (酯) 溶液构建校准曲线来测定磷酸盐 (酯) 的量。为了测试不同 pH 值下的肌醇六磷酸酶活性, 使用下列的 (全部为 200mM) 缓冲液: 介于 pH 2.0 和 3.0 之间的甘氨酸 / HCl, 介于 pH 3.5 和 5.5 之间的乙酸钠 / 乙酸, 介于 pH 6.0 和 7.5 之间的 Tris / 马来酸。

[0559] 实施例 2. 产生肌醇六磷酸酶的菌株 P1-29

[0560] 细菌菌株 P1-29 最初从一堆腐烂的植物材料中分离, 所述植物材料从芬兰南部森林的水坑底部收集。可以在许多简单培养基上在 30°C 需氧培养所述菌株, 所述培养基例如 LB (1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 1% NaCl , pH 7.4) 或低磷酸盐 (酯) 培养基 PP1 (1% 蛋白胨, 1% 牛肉提取物, 0.5% 酵母提取物, CaCl_2 —0.2M)。通过用 NaOH 将 pH 调节到 11 并煮沸

10 分钟制备培养基。通过过滤去除沉淀物,并再次调整 pH 到 5.5,通过在 121℃ 高压灭菌 15 分钟来对所述培养基进行灭菌。

[0561] 在液体 PP1 培养基中生长后,发现所述菌株在 pH 3.5 和 5.5 都显示肌醇六磷酸酶活性(如在实施例 1 中所述测试)。在 3.5 和 5.5 的活性的比率是约 1.3。还在 P1-29 的细胞和培养物上清液中分别测量活性。根据这些测量,大部分肌醇六磷酸酶活性为在细胞培养上清液中发现的细胞结合的 10-20% 活性。

[0562] 所述菌株保藏于 NCIMB, 登录号为 No 41248。

[0563] 实施例 3. 从菌株 P1-29 中分离染色体 DNA

[0564] 基本上用标准方法 (Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York, 1996) 来制备染色体 DNA。将 250ml 在 LB 培养基中 30℃ 过夜培养的培养物在 10,000rpm 离心 30 分钟,用 20ml 的 50mM tris-HCl, 5mM EDTA pH 8 洗涤,并重悬于 10ml 的冷 TES (50mM tris-HCl, 5mM EDTA, 15% 葡萄糖 pH 8) 中。加入溶菌酶至 10mg/ml,并在 37℃ 温育细胞混悬液 30 - 60 分钟,直到裂解发生,所述裂解通过将 100 μl 的反应混合物稀释到 1ml 的 1% SDS 中并检查“粘液 (slimy)”稠度进行确定。在此时,分别将 SDS 和蛋白酶 K (Sigma) 加入到终浓度 1% 和 0.5mg/ml。将反应混合物在 56℃ 温育 30 分钟,随后加入 2ml 的 5M NaCl 和 1.4ml 的 10% 十六烷基三甲基溴化铵 (Sigma)。在 65℃ 持续温育 15 分钟。用氯仿 / 异戊醇 (24:1) 提取溶液 1 次,并用苯酚 / 氯仿提取一次。提取后,将水相与 0.6 体积的异丙醇混合,通过离心 (10,000rpm, 15min) 收集 DNA 沉淀,用 70% 乙醇洗涤,真空干燥并重悬在 2ml 的 10mM tris-HCl, 1mM EDTA pH8, 5 μg/ml RNA 酶中。

[0565] 实施例 4. 细菌菌株 P1-29 的分类学鉴定

[0566] 使用引物 536f (CAGCMGCCGCGTAATWC) 和 1392r (ACGGGCGGTGTGTRC), (Lane, D. J. In Nucleic acid techniques in bacterial systematics, Stackbrandt, E. 和 Goodfellow, M. eds, John Wiley&Sons, New York: pp 115-117 (1991)), 用 Taq DNA 聚合酶 (Roche) 通过聚合酶链式反应 (PCR) 来扩增菌株 P1-29 的 16S rRNA 基因片段。使用下列程序: 1) 在 95℃ 进行 5 分钟的初始 DNA 变性步骤; 2) 在 94℃ 1 分钟, 在 55℃ 1 分钟, 在 72℃ 1 分钟, 进行 30 个循环; 3) 在 70℃ 进行最终的延伸步骤 10 分钟。在 0.8% 琼脂糖凝胶中通过电泳纯化 PCR 产物,所述产物约 900 碱基对大小,并根据生产商的说明书,使用凝胶纯化试剂盒 (Qiagen), 将其从凝胶中提取出来。通过 Medprobe (Norway) 的商业服务对纯化的 PCR 产物进行测序。所测序的区域列于 SEQ ID No 1。将该序列与在 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 中的 DNA 序列进行比较。发现该序列与来自几个布丘氏菌属菌株,如 *B. izardii* DSM 9397, *B. gaviniae* DSM 9393 和 *B. noackiae* ATCC 51607T 的 16S RNA 基因的序列最为匹配 (691 个核苷酸中的 688-689, 99.6-99.7%)。因此,可以在分类学上将菌株 P1-29 分类为布丘氏菌属。

[0567] 实施例 5. 从布丘氏菌属 P1-29 中克隆肌醇六磷酸酶基因

[0568] 将布丘氏菌属菌株 P1-29 的染色体 DNA 用限制性核酸内切酶 *Sau3A* 部分消化,并将所述消化产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行分级。使用凝胶纯化试剂盒 (Qiagen) 从凝胶上分离 3 - 5kb 的 DNA 片段,并将其与 *Bam*HI 消化的去磷酸化的 λ-ZAP 臂 (Stratagene) 连接起来。随后的文库构建步骤按照 Stratagene 的 ZAP Express 预消化的载体 /Gigapack 克隆试剂盒的说明书进行。将文库的噬菌体形式通过生产商 (Stratagene) 所述的“大量

切除”(“mass excision”)方法转化为质粒形式。通过与早期公开的在培养皿上检测肌醇六磷酸酶活性的方法(Howson和Davis, *Enzyme Microb. Technol.* 5, 377-382(1983); Chen J.C. *Biotechnology techniques* 12(10) 751-761(1998); RiccioMX. 等, *J. Appl. Microbiol.* 82, 177-185(1997))类似的方法来进行质粒文库的筛选。通过亚克隆来分离并纯化数个肌醇六磷酸酶阳性克隆。将这些分离物培养在液体培养物(LB培养基, 在30°C和200rpm约24小时)中并在得到的细胞混悬液中测量肌醇六磷酸酶活性(实施例1)。选择具有最高肌醇六磷酸酶活性(在pH 3.5约1.2U/ml)的一个克隆进行随后的表征。将分离自该克隆的质粒DNA命名为pBK(P1-29), 并通过插入DNA的部分DNA测序进行表征(测序服务获自Medprobe(Norway))。将包含肌醇六磷酸酶基因的这一序列列在SEQ ID No:2中。布丘氏菌属肌醇六磷酸酶的推导氨基酸序列列为SEQ ID No:3。使用由NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)提供的BLAST服务对SEQ ID No:3与GenBank中序列进行比较, 该比较鉴定了来自变形肥杆菌(*Obesumbacterium proteus*) (GenBank登录号No AAQ90419)的肌醇六磷酸酶是布丘氏菌属P1-29肌醇六磷酸酶的最接近的已知同源物。然而, 同源性水平很低—在两种蛋白质中仅有约74%的氨基酸残基是相同的。

[0569] 实施例6. 来自布丘氏菌属P1-29的肌醇六磷酸酶基因的扩增和表达

[0570] 通过PCR扩增肌醇六磷酸酶基因。将菌株布丘氏菌属P1-29的染色体DNA用作模板, 并将寡核苷酸o29-5(GGAATTCATATGACGATCTCTGCGTTTAAC)和o29-3(GGAATTCGGATCCTTA-CTGTAGCTGGCAGCCTG)用作引物。使用Expand High Fidelity PCR系统试剂盒(Roche)进行扩增。使用下列程序:1)在94°C进行初始DNA变性3分钟;2)在94°C 45秒, 在55°C 45秒, 在68°C 1分钟, 在72°C 1分钟, 在74°C 1分钟, 进行35个循环;3)在72°C进行最终的延伸步骤10分钟。将得到的PCR产物通过在0.8%的琼脂糖凝胶上电泳, 随后使用凝胶纯化试剂盒(Qiagen)从凝胶上提取DNA来进行纯化。用限制性酶NdeI和BamHI来消化纯化的PCR产物, 并通过PCR纯化试剂盒(Qiagen)将其从反应混合物中分离。将载体质粒pET11a(Novagen)用限制性核酸内切酶NdeI和BamHI进行消化, 使用虾碱性磷酸酶(Roche)进行去磷酸化, 并在0.8%琼脂糖凝胶上通过电泳纯化。从凝胶上切下线性化的质粒DNA条带, 使用凝胶纯化试剂盒(Qiagen)进行纯化。使用T4DNA连接酶(Roche)连接两段纯化的DNA片段。将连接反应物用70%乙醇沉淀, 用乙醇洗涤, 并直接重悬在50 μ l的电感受态大肠杆菌XL1-Blue MRF'细胞中。将所述混悬液转移到0.1cm的电穿孔杯(BioRad)中, 并使用Gene Pulser Xcell(BioRad)装置, 在1800V、25 μ F和200 Ω 进行电穿孔。电穿孔后立即加入1ml的LB培养基, 将细胞混悬液转移到15ml的塑料管(Falcon)中并在37°C温育, 摇动(200rpm)1小时。将转化的细胞在包含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB平板上铺板, 并在37°C过夜温育。将24个转化子培养在液体培养物中, 并使用该培养物测试肌醇六磷酸酶的活性和质粒DNA的分离。选择产生最高肌醇六磷酸酶活性和产生预期限制图谱的质粒DNA的一个克隆。将由该克隆包含的、命名为pET11(P1-29)的质粒用于转化表达宿主菌株BL21(DE3)pLysS(Novagen)。将转化的细胞混悬液在包含2%的葡萄糖的LB中, 于37°C摇动1小时, 并将其接种到包含氨苄青霉素(100 μ g/ml)和葡萄糖(2%)的50ml的LB中, 在30°C, 摇动(200rpm)过夜培养。在600nm测量得到的培养物的OD, 并使用所述培养物接种1升的LB+氨苄青霉素(100 μ g/ml)到OD600为0.04。继续在30°C培养过夜。在这样的培养物中的肌醇六磷酸酶活性典型地是8-12U/ml。约40%的肌醇六磷酸酶活分泌到培养基

中,而剩余的保持与细胞关联。这些观察结果显示布丘氏菌属 P1-29 肌醇六磷酸酶在大肠杆菌中的分泌在一定程度上比在其天然宿主中更有效。在相同的条件下培养的、用 pET11 转化的对照菌株 BL21 (DE3) pLysS 的培养物中的活性低于 0.05U/ml。

[0571] 实施例 7. 来自布丘氏菌属 P1-29 的重组肌醇六磷酸酶的纯化

[0572] 将用 pET11 (P1-29) 转化的 BL21 (DE3) pLysS 的培养物进行离心以去除细菌细胞,使用旋转式汽化器将其浓缩到起始体积的约 1/10 并针对水 进行透析直到溶液的传导性减少到低于 250 μ S/cm。用 tris 碱将溶液的 pH 调节到 8.0,并将其上样到以 25mM tris-HCl, pH 8.0 平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) 的柱 (3x20cm) 上。用平衡缓冲液以 3ml/min 的流速洗涤所述柱 30 分钟,随后用在 25mM tris-HCl, pH 8.0 中的三个连续梯度的 NaCl:0-50mM, 50-150mM 和 150-500mM 进行洗脱。三个梯度的每个梯度设置为进行 1 小时,流速恒定为 3ml/min。收集 9ml 的级分并测试肌醇六磷酸酶活性。检测到一个强的活性峰。使用 Centriplus concentrators (Amicon) 来浓缩在峰级分中的蛋白质,并通过使用 12%凝胶和标准的 Laemmli 缓冲液系统用 SDS PAGE 进行分析。这种分析的结果显示通过 DEAE Sepharose 获得的重组布丘氏菌属 P1-29 肌醇六磷酸酶的制备物包含单一显著的蛋白质组分。基于凝胶的数字图像的扫描 (图 1) 进行的半定量分析显示纯度约 65%。

[0573] 实施例 8. 来自布丘氏菌属 P1-29 的重组肌醇六磷酸酶的 pH 谱

[0574] 在实施例 1 中所述的缓冲液和条件下,研究布丘氏菌属 P1-29 肌醇六磷酸酶 (按照实施例 7 纯化) 的活性对 pH 的依赖性。所述酶在广泛的 pH 区域 (2-5.5) 具有活性,其中在约 pH 4.5 具有最大值,并且在约 pH3 具有曲线的强“肩峰”(图 2)。

[0575] 实施例 9. 来自布丘氏菌属 P1-29 的重组肌醇六磷酸酶的底物特异性

[0576] 通过离子交换层析从用真菌肌醇六磷酸酶 (Natuphos) 处理的肌醇六磷酸的部分水解产物分离肌醇磷酸酯级分,所述肌醇磷酸酯每个肌醇残基包含三个、四个或五个磷酸酯。这些制备物的产生和纯化是 BioChemis Ltd (St. Petersburg, Russia) 提供的商业服务。通过 HPLC 判断 (Sandberg A. S., Ahderinne R. J. Food Sci. 51 (3), 547-550) 具有的不同磷酸化程度的肌醇磷酸酯的每个级分的污染少于 5%。将商购果糖 1,6-二磷酸和果糖 6-磷酸 (Sigma) 用作模型底物来用于评估布丘氏菌属 P1-29 肌醇六磷酸酶对二磷酸酯和单磷酸酯底物的特异性。使用最终反应混合物中 2mM 浓度的底物,在 pH 3.5,通过标准测试法 (实施例 1) 测量按照实施例 7 纯化的布丘氏菌属肌醇六磷酸酶对不同底物的活性。结果 (图 3) 显示所述酶具有极其广泛的底物特异性。其针对五磷酸酯、四磷酸酯和三磷酸酯的活性基本上等于或稍微高于将肌醇六磷酸作为底物时的活性。甚至果糖 1,6-二磷酸 (其对于大部分肌醇六磷酸酶是相当差的底物) 也被布丘氏菌属肌醇六磷酸酶 (尤其是 P1-29 来源的肌醇六磷酸酶) 有效地水解。也可检测到果糖 6-磷酸的水解,虽然其效率比其他受检测底物的水解低得多。

[0577] 实施例 10. 来自布丘氏菌属 P1-29 的重组肌醇六磷酸酶的比活

[0578] 使用按照实施例 7 的纯化制备物来评估布丘氏菌属 P1-29 肌醇六磷酸酶的比活。根据实施例 1 在 pH 3.5 测量肌醇六磷酸酶活性。通过用 BCA 蛋白质测试试剂盒 (Pierce) 测量总蛋白质浓度并通过用 SDS PAGE 估计的肌醇六磷酸酶含量 (实施例 7) 对其进行校正来计算肌醇六磷酸酶浓度。按照这些测量,来自布丘氏菌属 P1-29 的重组肌醇六磷酸酶的

比活在 37℃为约 300U/mg。

[0579] 实施例 11. 肌醇六磷酸酶变体的产生和表征

[0580] 使用如上列出的诱变方法, 诸如在 Morinaga 等中公开的方法 (Biotechnology(1984)2, p646-649), 或在 Nelson 和 Long (Analytical Biochemistry(1989),180, p 147-151) 中公开的方法,或在 W0 92/18645 中所述的错误阈值 (Error Threshold) 诱变方法,通过序列 SEQ ID No. 2 的诱变构建肌醇六磷酸酶变体。用于诱变 PCR 的其他合适的方法由 Cadwell 和 Joyce (PCR Methods Appl. 3(1994),136-140) 公开。

[0581] 在一种或多种下列表达宿主中异源表达后,对肌醇六磷酸酶变体进行表征:大肠杆菌 K12;枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*);酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0582] 肌醇六磷酸酶变体源自 SEQ ID No 3,其在一个或多个氨基酸位点存在不同,包括两个位点,三个位点,四个位点,五个位点,六个位点,七个位点,八个位点,九个位点,十个位点,十一个位点,十二个位点。其中如此处所述进行合适的反复诱变循环。

[0583] 肌醇六磷酸酶变体的表征

[0584] 1. 热稳定性

[0585] 通过酶的失活温度对所述变体的热稳定性进行表征。通过测量在不同的温度下温育 10 分钟,并随后冷却到室温后肌醇六磷酸酶的残留活性来测定失活温度。失活温度是这样的温度,在所述温度下,残余的活性是在相同的条件下在室温温育相同时间后的残留活性的 50%。当适合时,通过从测量的活性数据进行内推和外推法来确定相应于 50%残留活性的温度。通过将两种酶的失活温度彼此扣除来计算以℃表示的热稳定性的差异。

[0586] 表 1 列出了不同变体的热稳定性差异:

[0587] 表 1: 来自以 Seq ID No 3 所示的亲本肌醇六磷酸酶的变体的热稳定性差异 (TD)

[0588]

变体	热稳定性差异
K59E	2.5
T167V	2.5
K240T	2.1
T167I	3.0
K240E	3.3
D244C	4.2
Q289Y	4.4
T209K	1.8
F197S	1.0
D125E/H193R	1.5
A294E/N303K	3.5
T167I/K240T	4.1
D223E/K240E/N351D	2.7
T167I/K240T/A294E/N303K	6.1
T167I/K240E/A242S/A294E/N303K	8.2
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A29	11.5

[0589]

4E/N303K	
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A24 2S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	15.2
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P /S221N/G225A/K240E/A294E/N303K	12.0
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K /A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	16.5
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K /A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F	17.7
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209 K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	20.2

[0590] 2. 其它特征

[0591] 其它特征也被改良。

[0592] 使用如上所述的测试法来比较选定变体的热稳定性、比活和胃蛋白酶稳定性。通过与对照条件相比,在胃蛋白酶温育后,在 pH 3.5, 37°C 测量的残留活性来表征这些变体的胃蛋白酶稳定性(残留活性=在胃蛋白酶温育后的活性/在对照条件下温育后的活性)。在 pH 2.0, 0.25mg/ml 胃蛋白酶, 1mM CaCl₂ 和 5mg/ml BSA 于 37°C 进行胃蛋白酶温育 2 小时。对照条件是在 pH5.0, 1mM CaCl₂ 和 5mg/ml BSA, 在 37°C 2 小时。

[0593] 表 2 显示选定变体的性质(来自根据 Seq ID No. 3 的野生型肌醇六磷酸酶并与其比较)

[0594] 表 2:

[0595] 来自以 Seq ID No. 3 所示的亲本肌醇六磷酸酶的变体的胃蛋白酶稳定性

[0596]

变体	胃蛋白酶稳定性 [% 残留活性]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	63
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S2	72

[0597]

81L/Q289Y/A294E/N303K	
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K	34
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	62
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F	61
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	77

[0598] 表 3:

[0599] 来自以 Seq ID No. 3 所示的亲本肌醇六磷酸酶的变体的比活：

[0600]

变体	比活[pH 4.0 时的野生型活性的%]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	115

[0601] 将在上述说明书中提及的所有的出版物,和在所述出版物中引用的文献都并入本文作为参考。本发明所述方法和系统的各种改进和变化对于本领域技术人员而言是显而易见的,而不背离本发明的范围和精神。尽管本发明已经结合具体的优选实施方案进行描述,应该理解的是要求保护的本发明不应该被局限于这些具体的实施方案。实际上,对于分子生物学或相关领域中的那些技术人员显而易见的用来进行本发明的所述模式的各种改进意图包含在下述权利要求的范围内。

[0001]

序列表

<110> 丹尼斯科公司 (DANISCO A/S)

<120> 酶

<130> P021161W0

<140> PCT/IB2005/003376

<141> 2005-10-17

<150> GB 0423139.5

<151> 2004-10-18

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 691

<212> DNA

<213> 布丘氏菌属 (Buttiauxella)

<400> 1

```

actacgacgc actttatgag gtccgcttgc tctcgcgagg tcgcttctct ttgtatgcgc      60
cattgtagca cgtgtgtage cctactcgta agggccatga tgacttgacg teatccccac      120
cttctccag tttateactg gcagtctct ttgagttecc ggcgaaccg ctggcaacaa      180
aggataaggg ttgcgctcgt tgcgggactt aaccaacat tteacaacac gagctgacga      240
cagccatgca gcacctgtct cacagttccc gaaggcacta agcatctct gccaaattct      300
gtggatgtca agagtaggta aggttcttcg cgttgcateg aattaaacca catgctccac      360
cgcttgtgeg ggcccccgtc aattcatttg agttttaacc ttgeggccgt actccccagg      420
cggtcgaact aacgcgtag ctccggaagc cactcctcaa gggaacaacc tccaagtega      480
categtttac ggcgtggaact accagggtat ctaatctgt ttgetcecca cgctttcgca      540
cetgagcgtc agtctttgtc cagggggccg ccttcgccac cggtatctct ceagatctct      600
acgeatttea ccgctacacc tggaattcta cccccctcta caagactcta geetgccagt      660
ttcgaatgca gtteccaggt tgagcccggg g      691

```

<210> 2

<211> 1534

<212> DNA

<213> 布丘氏菌属 (Buttiauxella)

<400> 2

```

ttcacatag caaacaacaa cgagacgaac tcgacgttac cgetttgett ctggagtata      60
tttatcagac tcaaacacc caaagaaaag aggcgtgtaa tgacgatctc tgcgtttaac      120

```

[0002]

cgcaaaaaac tgacgettea cctggtctg ttcgtagcac tgagegecat attttcatta	180
ggetctacgg cctatgceaa cgacactccc gcttcaggct accagggtga gaaagtggta	240
atactcagcc gccacgggggt gegagcacca accaaaatga cacagaccat gcgcgacgta	300
acacctaata cctggceega atggccagta aaattgggtt atateagcc acgcggtgag	360
catctgatta gcctgatggg cgggttttat cgccagaagt tteaacaaca gggeatttta	420
tegcagggca gttgccccac accaaactea atttatgtet gggcagacgt tgatcagegc	480
acgcttaaaa ctggogaago tttcctggca gggcttgctc cgcaatgtgg tttaactatt	540
caccaccagc agaatcttga aaaagccgat ccgctgttcc atccggtgaa agcgggcacc	600
tgttcaatgg ataaaaactea ggtccaacag gccgttgaaa aagaagetca aacccccatt	660
gataatctga atcageacta tattecttt ctggccttga tgaataegac cctcaacttt	720
tcgacgtcgg cctgggtgta gaaacacagc gcggataaaa gctgtgattt agggctatec	780
atgccgagca agctgtcgat aaaagataat ggcaacaaag tcgetctega cggggccatt	840
ggccttctgt ctacgcttgc tgaatcttcc ctgctggaat atgcgcaagg gatgcccga	900
gcggcgtggg ggaatattca ttcagagcaa gagtgggcgt cgctactgaa actgcataac	960
gtccagtttg atttgatggc acgeaegcet tatatcgcca gacataacgg caegccttta	1020
ttgeaggcca tcagcaacgc gctgaaccgc aatgccaccg aaagcaaac gcctgatatc	1080
tcacctgaca ataagatect gtttattgcc ggacacgata ccaatattge caatatcgea	1140
ggcatgctca acatgcgctg gacgctacct gggcaaccgc ataacacccc tccgggcgce	1200
gcttagctct ttgagegctt ggecgataag tcagggaaac aatatgtag cgtgagcatg	1260
gtgtatcaga ctctegagca gttgcgctcc caaacaccac ttagcettaa tcaacctgcg	1320
ggaagcgtac agctaaaaat tcttggtgtg aacgatcaga cggctgaagg ataactgccc	1380
ctgtcgacgt tcaactcggc ggtagccaa agcgtggaac caggetgcca gctacagtaa	1440
atatcagaca aaaaaaatgc cgetcgcgat taagcgaacg gcattaette etagettecc	1500
agetcggatt agcatggcga gagecgaaaa actt	1534

- <210> 3
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 布丘氏菌属 (Buttiauxella)

<220>

[0003]

- <221> SITE
<222> (59)..(59)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (70)..(70)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (122)..(122)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (125)..(125)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (167)..(167)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (193)..(193)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (197)..(197)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (204)..(204)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (209)..(209)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (211)..(211)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (221)..(221)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (223)..(223)

[0004]

- <223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (225)..(225)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (240)..(240)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (242)..(242)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (244)..(244)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (268)..(268)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (281)..(281)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (289)..(289)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (294)..(294)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (303)..(303)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (336)..(336)
<223> 任何氨基酸
- <220>
<221> SITE
<222> (351)..(351)
<223> 任何氨基酸

[0005]

<400> 3

Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15

Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30

Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60

Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80

Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95

Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110

Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125

Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly
 130 135 140

Leu Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160

His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175

Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190

His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205

Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220

[0006]

Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 225 230 235 240

Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255

Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270

Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285

Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly
 290 295 300

Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320

Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335

Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350

Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365

Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380

Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400

Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415

Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430

Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445

[0007]

<210> 4	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400> 4	
cagcmgccgc ggtaatwc	18
<210> 5	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400> 5	
acgggcggtg tgtrc	15
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400> 6	
ggaattcata tgacgatetc tgcgtttaac	30
<210> 7	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400> 7	
ggaattcgga tccttactgt agctggcagc ctg	33

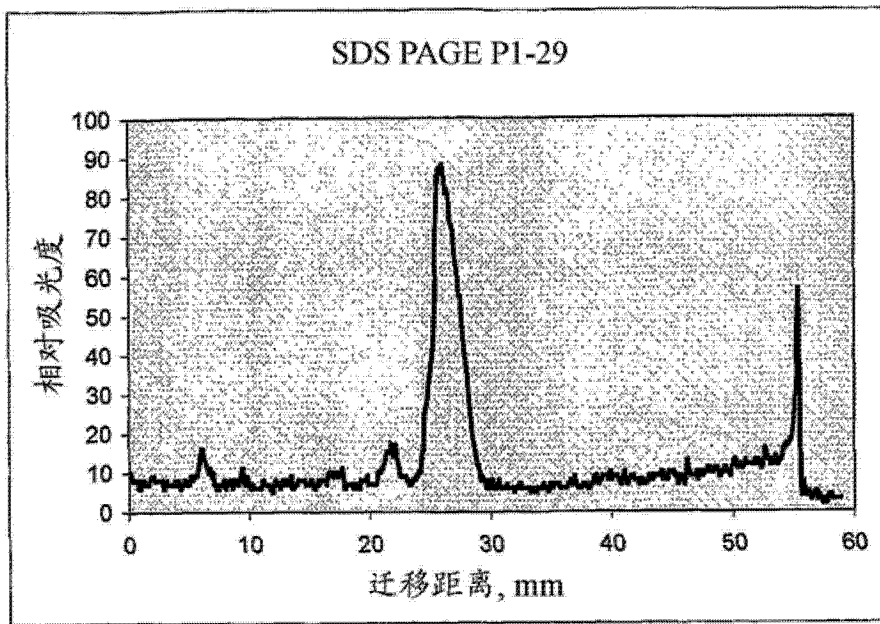


图 1

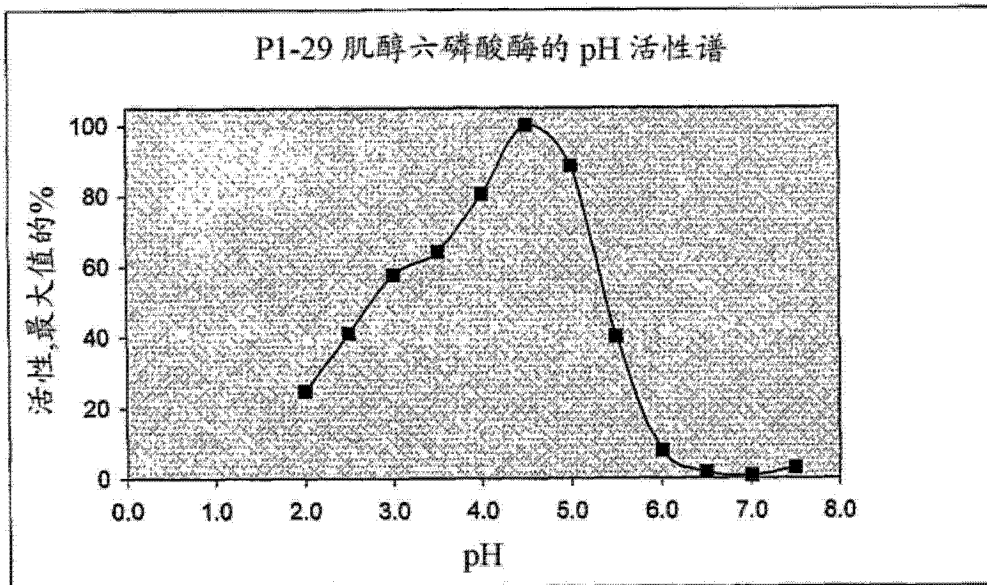


图 2

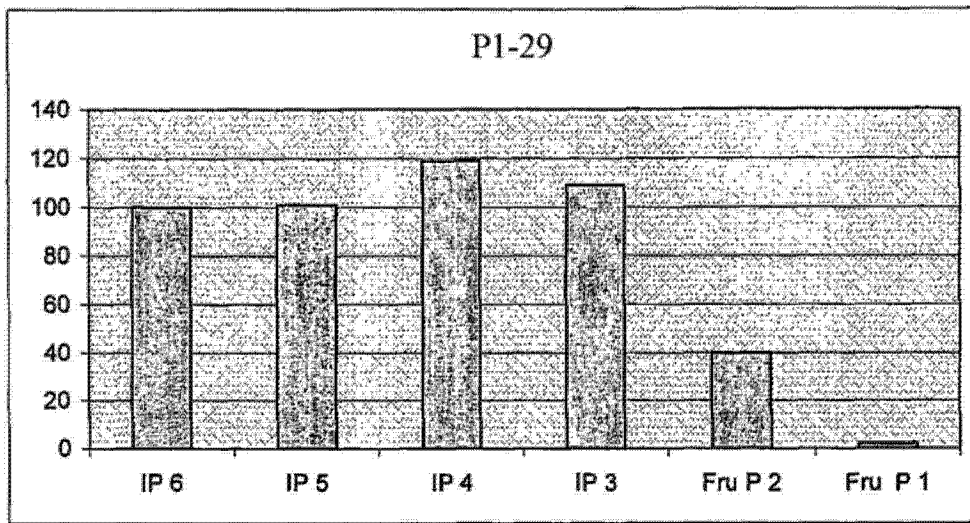


图 3