

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 6 月 15 日 (15.06.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/097218 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/53 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12R 1/865* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/108983
- (22) 国际申请日: 2016 年 12 月 8 日 (08.12.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510902579.5 2015 年 12 月 9 日 (09.12.2015) CN
201610184669.X 2016 年 3 月 28 日 (28.03.2016) CN
- (71) 申请人: 江南大学 (JIANGNAN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 陈海琴 (CHEN, Haiqin); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 陈永泉 (CHEN, Yongquan); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800

号, Jiangsu 214122 (CN)。 陈卫 (CHEN, Wei); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 梅甜甜 (MEI, Tiantian); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 顾震南 (GU, Zhen-nan); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 张灏 (ZHANG, Hao); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 北京君智知识产权代理事务所 (普通合伙) (BEIJING JUNZHI INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY (G. P.)); 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号科技综合楼 212#, Beijing 100081 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,

[见续页]

(54) Title: PARASITIC PHYTOPHTHORA-DERIVED Ω -3 FATTY ACID DESATURASE FOR SYNTHESIZING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, CARRIER CONTAINING FATTY ACID DESATURASE, RECOMBINANT MICROORGANISMS, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 来源于寄生疫霉的用于合成多不饱和脂肪酸的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶、含所述脂肪酸脱饱和酶的载体、重组微生物及其应用

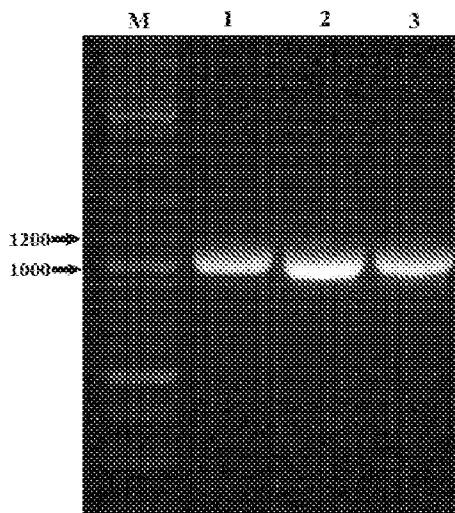


图 1

(57) Abstract: A recombinant nucleic acid sequence, as shown in SEQ ID NO.3, of parasitic phytophthora-encoded ω -3 fatty acid desaturase, a carrier containing ω -3 fatty acid desaturase, recombinant *saccharomyces cerevisiae* and recombinant *mortierella alpina* which contain the carrier, and a construction method of a recombinant engineering strain. According to the use of the recombinant *saccharomyces cerevisiae* in the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids, the recombinant *saccharomyces cerevisiae* can catalyze C20:4 Δ 5,8,11,14 into C20:5 Δ 5,8,11,14,17 at room temperature, and the catalytic efficiency reaches 65%. The content of EPA in a fermentation product of the recombinant *mortierella alpina* reaches 31.5% of the total amount of fatty acids.

(57) 摘要: 如 SEQ ID NO.3 的编码寄生疫霉 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的重组核酸序列、含所述 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的载体、含有所述载体的重组酿酒酵母和重组高山被孢霉, 所述重组工程菌株的构建方法。所述重组酿酒酵母在多不饱和脂肪酸生物合成中的用途, 其在常温下能够将 C20:4 Δ 5,8,11,14 催化为 C20:5 Δ 5,8,11,14,17, 催化效率达到 65%。所述重组高山被孢霉发酵产物中的 EPA 含量达到脂肪酸总量的 31.5%。



SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)。

- (84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则 13 之二.4(d)(i) 和 48.2(a)(viii))。
- 包括说明书序列列表部分(细则 5.2(a))。

来源于寄生疫霉的用于合成多不饱和脂肪酸的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶、含所述脂肪酸脱饱和酶的载体、重组微生物及其应用

本发明请求申请日为 2015 年 12 月 9 日、申请号为 2015109025795 的中国发明专利申请，及申请日为 2016 年 3 月 28 日、申请号为 201610184669X 的中国发明专利申请为优先权。

【技术领域】

本发明属于生物工程技术领域，涉及利用微生物合成多不饱和脂肪酸，具体涉及一种用于合成多不饱和脂肪酸的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶、含所述 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的载体、含有所述载体的重组微生物及其应用。

【背景技术】

长链多不饱和脂肪酸（LC-PUFAs）是指含有 20 个或 20 个以上碳原子的多不饱和脂肪酸，按照第一个双键距离 C 端的位置可以分为 ω -6 和 ω -3 两类。 ω -3 LC-PUFAs 在人体内无法自行合成，需要从饮食中获取，属于必需脂肪酸，如 EPA 和 DHA。研究发现，以 EPA 和 DHA 为代表的 ω -3 LC-PUFAs 可以作为合成某些激素的前体物质，具有多重生理功能和潜在的药用价值。迄今为止， ω -3 LC-PUFAs 的来源以深海鱼类为主，然而从中提取的 LC-PUFAs 却存在稳定性差、纯化工艺复杂、易氧化等缺点。近年来，微生物作为一种新的 LC-PUFAs 来源正受到越来越广泛的关注：海洋藻类通过自养、异养和混合营养的方式生长，生长周期短，是 EPA 和 DHA 的初级生产者，也是 ω -3 LC-PUFAs 最有潜力的来源之一；酵母菌、霉菌等研究成本低、适合大规模生产且遗传背景明细，拥有生产多种 LC-PUFAs 的潜力。随着分子生物学和生物技术的飞速发展，人们将越来越多的目光投向了产油真菌，以期通过基因工程改造菌体脂肪酸合成路径来生产

EPA、DHA，但由于效率低下等原因，至今仍未实现商业化。

自然界中 ω -3 LC-PUFAs 通常由 LA 和 ALA 起始合成，经过一系列去饱和酶和延长酶催化，最终形成 EPA 和 DHA。其中， ω -3 脂肪酸脱饱和酶是 ω -3 LC-PUFAs 合成过程中的关键酶之一，具有三个富含组氨酸的结构域，能将 ω -6 多不饱和脂肪酸如 LA (C18:2)、GLA (C18:3)、DGLA (C20:3) 和 ARA (Arachidonic acid, C20:4，或写为 AA) 分别催化生成对应的 ω -3 多不饱和脂肪酸 ALA (C18:3)、SDA (C18:4)、ETA (C20:4) 和 EPA (C20:5)。

研究发现，不同来源的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶对不同碳链长度的脂肪酸具有不同的催化效率。目前，已知的来源于藻类和植物的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶只能催化 18C 的 ω -6 多不饱和脂肪酸如 LA 和 GLA。而来源于秀丽隐杆线虫的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 FAT 1 则能同时以 18C 和 20C 的多不饱和脂肪酸为底物，但其中对 20C 底物的催化活性很低。随后，Pereira 等人发现来源于异枝水霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 sdd17 对 18C 的多不饱和脂肪酸没有催化活性，却能将 20C 的 ARA 催化为 EPA，转化率为 25.9%。同样的，来源于致病疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 OPIN 17 也不能以 18C 的多不饱和脂肪酸为底物，但是对 ARA 的转化率达到 30.94%。

近年来，Xue 等人从瓜果腐霉、大豆疫霉菌、栎树猝死病菌中分离出三种 ω -3 脂肪酸脱饱和酶——PaD 17、PsD 17 和 PrD 17 并在重组解脂酵母菌中实现异源表达 (Identification and characterization of new Δ -17 fatty acid desaturases, Appl Microbiol Biotechnol (2013) 97:1973–1985)。这三种酶既能催化 18C 又能催化 20C 的多不饱和脂肪酸，但偏好催化 20C 底物 ARA。通过对这些偏好催化 20C 脂肪酸脱饱和酶的进一步研究发现，其在常温下对 ARA 有较高的转化率，实现了常温下生物积累 EPA。这一类偏好以 20C ω -6 LC-PUFAs 为底物催化合成 ω -3 LC-PUFAs 的脂肪酸脱饱和酶可以直接、高效地催化

ARA 生成 EPA，为通过延长酶催化合成 DHA 提供了底物，对于生物合成法生产 ω -3 LC-PUFAs 具有十分重要的意义。为了提高生产效率，筛选此种高效催化 ARA 合成 EPA 的脂肪酸脱饱和酶显得尤为重要。这将为构建高产 ω -3 LC-PUFAs 的工程菌，常温发酵生产 EPA、DHA，打下坚实的基础。

另一方面，高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 是一种脂质积累可以达到细胞干重 50% 的产油真菌，是脂质生物化学基础研究的重要模式生物。高山被孢霉已经被应用于工业化生产花生四烯酸 (Arachidonic acid, AA, C20:4)，其生产的食用油脂已经通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 的安全性评估。除了合成 AA 之外，高山被孢霉也具有一定的合成二十碳五烯酸 (Eicosapentanoic acid, EPA, C20:5) 的能力。EPA 属于 ω -3 长链多不饱和脂肪酸 (LC-PUFAs)，具有重要的生理功能，如：促进哺乳动物大脑发育以及神经组织形成和修复的能力，预防哮喘、癌症、抑郁、肥胖、免疫紊乱以及心血管疾病等。但是人体自身不能合成这些脂肪酸，需要从富含 ω -3 LC-PUFAs 的食物 (如深海鱼油) 中摄取。由于大肆捕捞和环境污染破坏，深海鱼类提供的 ω -3 LC-PUFAs 已无法满足日益增长的市场需求，所以利用微生物生产 ω -3 LCPUFAs 已经成为当前的研究热点。

然而，获得具有更优秀的 EPA 产率的产油真菌特别是高山被孢霉依然是本领域技术人员的期望。

【发明内容】

本发明的目的是利用生物信息学的方法，获得一些常温偏好 20C 的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 (或简称 ω -3 脱饱和酶)，通过构建重组酵母菌和高山被孢霉，对每一种 ω -3 脂肪酸脱饱和酶催化 ARA 生成 EPA 的能力进行了鉴定，以获得最具有重要应用潜力的高效催化 20C ω -6 LC-PUFAs 合成 ω -3 LC-PUFAs 的脂肪酸脱饱和酶。

本发明的思路是将 5 种已知的常温偏好 20C 的 ω -3 脂肪酸脱饱和

酶序列进行比对, 根据序列相似度及同源性分析, 筛选出与已知序列相似度高、亲缘性近的来自寄生疫霉的基因序列如 SEQ ID NO. 1 和来自真菌媒介丝囊菌的基因序列 SEQ ID NO. 7。利用 Clustal W2 软件将其氨基酸序列与多种已知的常温偏好 20C 的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶序列进行比对, 发现天然的来自寄生疫霉的基因序列如 SEQ ID NO. 1 和来自真菌媒介丝囊菌的基因序列 SEQ ID NO. 7 拥有与已知序列相似的 3 个 His-box 区。通过 TMHMM 软件分析结果显示所选序列具有与已知序列相似的跨膜域, 随后进行活性验证。

进一步, 本发明利用全基因合成技术构建了两段针对酿酒酵母经过优化的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶序列: 如 SEQ ID NO. 3 的 *oPpFADS17y* (即 CN 2015109025795 中的 *oPpFADS17*, 其序列区别于 CN 201610184669X 中的针对高山被孢霉进行优化的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17*, 在本发明中分别增加后缀“y”或“m”以示区别) 和如 SEQ ID NO. 9 的 *oAiFADS17y* (同理, 即 CN 2015109025795 中的 *oAiFADS17*, 其序列区别于 CN 201610184669X 中的针对高山被孢霉进行优化的 *oAiFADS17*, 在本发明中分别增加后缀“y”或“m”以示区别)。使用 PCR 技术扩增出目的基因片段, 插入 pYES 2/NT C (在 CN 2015109025795 中写作 PYES 2/NT C) 表达载体得到 pYES2/NT C-*oPpFADS17* (在 CN 2015109025795 中写作 PYES2/NT C-*oPpFADS17*) 和 pYES2/NT C-*oAiFADS17* (在 CN 2015109025795 中写作 PYES2/NT C-*oAiFADS17*) 并完成测序验证, 进而用化学法转化入酿酒酵母 INVSc 1, 得到的重组酿酒酵母菌株能顺利表达两段基因编码的蛋白。最后通过外源添加不同碳链长度的多不饱和脂肪酸底物进行活性验证, 确定筛选的 *oPpFADS17y*、*oAiFADS17y* 序列具有 ω -3 脂肪酸脱饱和酶活性。

本发明提供具有特异性催化 20C 能力的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的编码序列, 其核酸序列分别如 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 9。

本发明还提供分别含有 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 9 核酸序列的表达载体 pUC57-*oPpFADS17* 和 pUC57-*oAiFADS17*, 能够分别表达寄生疫霉和真菌媒介丝囊菌的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶。

本发明还提供能够分别表达寄生疫霉和真菌媒介丝囊菌的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的重组微生物。优选地, 所述重组微生物是酿酒酵母。

本发明成功表达了来源于寄生疫霉和真菌媒介丝囊菌、在多不饱和脂肪酸生物合成途径中起关键作用的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17* 和 *oAiFADS17*, 其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO. 4 和 SEQ ID NO. 10。

本发明还涉及上述 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17y* (即 CN 2015109025795 中的 *oPpFADS17*) 和 *oAiFADS17y* (即 CN 2015109025795 中的 *oAiFADS17*) 在多不饱和脂肪酸生物合成中的用途, 特别是在常温下将 C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ 催化为 C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ 。

本发明通过实验方法获得两种 ω -3 脂肪酸脱饱和酶既能催化 18C 又能催化 20C 的多不饱和脂肪酸, 但偏好于将 20C 的 ARA 转化为 EPA, 催化效率达到 65%。用此基因构建基因工程菌株为后续工业化生产 EPA、DHA 奠定了应用基础。

此外, 本发明还提供一株能在常温环境下高产 EPA 的重组高山被孢霉工程菌株, 借助根瘤土壤杆菌介导的方法、通过过表达 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* (即 CN 201610184669X 中的 *oPpFADS17*, 其序列区别于 CN 2015109025795 中的 *oPpFADS17*, 故在本发明中增加后缀“m”以示区别) 基因得到一株重组高山被孢霉, 还涉及将所述重组高山被孢霉工程菌株用于工业生产脂肪酸、特别是生产 EPA。

经过上述研究, 申请人期望验证在高山被孢霉中过表达来源于寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶能够提高高山被孢霉的 EPA 产量, 并期望从中获得一株产量突出的工程菌株。

为此, 本发明将针对高山被孢霉经过优化的来自于寄生疫霉的 *oPpFADS17m* 转化入高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株, 构建一株常

温下 EPA 产量更高的高山被孢霉。

具体地，本发明提供一株过表达来源于寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m*（即 CN 201610184669X 中的 *oPpFADS17*）基因的重组高山被孢霉（*Mortierella alpina*）MA-*oPpFADS17*-4，该菌株于 2016 年 1 月 18 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，地址北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所，保藏编号为 CGMCC No. 11820。

在本发明中，所述 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* 基因是针对高山被孢霉经过优化的来源于寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因，其核酸序列如 SEQ ID NO.5（Genbank accession No: KT372001）所示，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

在本发明中，所述高山被孢霉菌株是用含有 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* 基因的重组质粒 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 转化根瘤土壤杆菌后，再以含转化质粒 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 的根瘤土壤杆菌转化高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株构建而成的。

根据一种优选的实施方式，所述高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株是一株使高山被孢霉 ATCC32222 基因组中编码乳清酸磷酸核糖转移酶 OPRtase 的 *ura5* 基因失活的高山被孢霉菌株。更优选地，所述高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株是中国发明专利申请 CN 201310347934.8 中公开的高山被孢霉 MAU1，该菌株于 2013 年 11 月 01 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC No. 8414。该菌株也保存于江南大学的实验室，被命名为 CCFM501。

为了获得上述重组高山被孢霉，本发明还提供所述菌株的构建方法，包括以下步骤：

- a) 根据天然的来源于寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶序列（Genbank accession No: XM_008906963），根据高山被孢霉密码子使用偏好性，人工合成优化后的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因 *oPpFADS17m*（即 CN 201610184669.X 中的

oPpFADS17), 如 SEQ ID NO.5 (Genbank accession No: KT372001) 所示;

- b) 构建重组质粒 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17*;
- c) 用构建获得的重组质粒 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 转化根瘤土壤杆菌;
- d) 用含重组质粒 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 的根瘤土壤杆菌转化高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株;
- e) 筛选鉴定转化菌株, 获得一株特别高产 EPA 的过表达 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* 基因的重组高山被孢霉菌株 MA-*oPpFADS17*-4。

其中, 步骤 c) 的根瘤土壤杆菌为根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) C58C1。

步骤 d) 的高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株是重组高山被孢霉 MAU1 (CGMCC No. 8414), 或按照江南大学的实验室的命名称为 CCFM501。

其中, 步骤 e) 中筛选鉴定转化菌株的方法包括以下步骤:

- 1) 用 3 mL 生理盐水冲刷 GY 表面, 收集液体于一个无菌 1.5 mL 离心管中, 过 25 μ m 滤膜;
- 2) 用血球计数器计数, 调整为三种孢子浓度梯度 10^8 个每 100 μ L、 10^6 个每 100 μ L、 10^4 个每 100 μ L, 各取 200 μ L 涂布于含有 100 μ g/mL 壮观霉素, 100 μ g/mL 头孢噻肟的 GY-CS 平板上, 25°C 避光培养 2-3 d;
- 3) 随时用无菌镊子挑出生长的真菌菌丝于含有 100 μ g/mL 壮观霉素, 100 μ g/mL 头孢噻肟的 SC-CS 平板上, 25°C 培养 2-3 d;
- 4) 观察高山被孢霉在平板上的生长情况, 挑出在 SC-CS 平板上生长的菌丝接种于 GY 斜面上;
- 5) 将上述步骤 4) 中平板上的高山被孢霉菌株孢子在 GY 斜面上传代三次;
- 6) 将稳定遗传的菌株鉴定为过表达 ω -3 脂肪酸脱饱和酶

oPpFADS17m 基因的重组高山被孢霉菌株，保藏于 GY 斜面上；

7) 提取含有 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* 基因的重组高山被孢霉菌株的基因组 DNA，设计一对与启动子和终止子特异性结合的引物进行 PCR 验证：

P1(sense): CACACACAAACCTCTCTCCCACT

P2(antisense): CAAATGAACGTATCTTATCGAGATCC;

8) 所述重组菌株保藏于 GY 斜面上。

本发明还提供上述重组高山被孢霉菌株或根据上述方法得到的重组高山被孢霉在生产脂肪酸、特别是 EPA 中的用途。

在本发明中，重组质粒 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 的构建可参考中国专利申请 CN201310524221.4 中公开的内容。根据该申请的记载，首先用 PCR 的方法从 pD4 质粒上获得 HPH 表达单元，将 HPH 表达单元用限制性内切酶 EcoR I 和 Xba I 酶切，插入到 EcoR I 和 Xba I 酶切过的 pET28a (+) 的多克隆位点 (MCS) 中，得到质粒 pET28a-HPHs。利用 PCR 从高山被孢霉 cDNA 中获得 ura5 (乳清酸磷酸核糖转移酶；OPRTase) 基因，并利用限制性内切酶 BspH I 和 BamH I 酶切 ura5 基因，将酶切过的 ura5 基因插入到 Nco I 和 BamH I 酶切过的质粒 pET28a-HPHs 中，以替换 hpt 基因，构建质粒 pET28a-ura5s。用限制性内切酶 EcoR I 和 Xba I 酶切质粒 pET28a-ura5s 得到 ura5s 表达单元。将 ura5s 表达单元替换质粒 pBIG2RHPH2 中的 HPH 表达单元，进一步构建质粒转化质粒 pBIG2-ura5s。更进一步地在质粒 pBIG2-ura5s 和质粒 pET28a-HPHs 的基础上，构建高山被孢霉基因操作通用载体。用 PCR 的方法从高山被孢霉基因组中获得非编码的内含子 DNA 片段 IT。用限制性内切酶 Nco I 和 BamH I 分别对 IT 基因片段和质粒 pET28a-HPHs 进行酶切，并通过连接反应将 IT 片段取代质粒 pET28a-HPHs 的 hpt 基因，得到质粒 pET28a-ITs。用限制性内切酶 Spe I 和 Xba I 双酶切质粒 pET28a-ITs 得到 ITs 表达单元。将 ITs 表达单元插入到 Xba I 酶切过的质粒 pBIG2-ura5s 中，得到高山被孢霉基因操作通用载体 pBIG2-ura5s-ITs。然后通过基因工程技术

将 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因插入高山被孢霉通用载体 pBIG2-ura5s-ITs 中，构建二元表达载体 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17*。

在本发明中，所述高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株是已公开的重组高山被孢霉 MAU1 (CCFM501)，其保藏编号为 CGMCC No. 8414，该菌株已在中国专利申请 CN 201310347934.8 中公开。

根据 CN 201310347934.8 说明书记载，重组高山被孢霉 CCFM501 是通过失活高山被孢霉 ATCC32222 基因组中编码乳清酸磷酸核糖转移酶 OPRtase 的 *ura5* 基因构建而成的。其中，*ura5* 基因的失活是通过缺失 654 bp 的 *ura5* 基因中的 213 bp-230 bp 共 18 bp 的序列而实现的，所使用的同源臂分别是 *ura5* 基因上游-1180 至+212 的 1393 bp 和下游+231 至+1592 的 1362 bp 的片段，具体步骤为：首先获得 *ura5* 敲除基因片段，并进一步构建敲除质粒 pBIG4KO_{ura5}，然后用重组质粒 pBIG4KO_{ura5} 转化根癌农杆菌，最后用经转化的含质粒 pBIG4KO_{ura5} 的根癌土壤杆菌转化高山被孢霉并对转化后的高山被孢霉进行筛选和鉴定，获得尿嘧啶营养缺陷型高山被孢霉 MAU1 (CCFM501) 菌株。

在本发明中，应用于转化高山被孢霉的根瘤土壤杆菌为：根瘤土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Tsuji G, Fujii S, Fujihara N, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*[J]. Journal of General Plant Pathology, 2003, 69(4): 230-239.)，为本领域技术人员可以公开获得的菌株，在某些文献中，它也可能被称为根癌农杆菌。

本发明在现有的高山被孢霉转化系统的基础上，采用根瘤土壤杆菌介导的基因转化方法，构建了在高山被孢霉中过表达来源于寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因 *oPpFADS17m* 的高山被孢霉菌株。获得的重组高山被孢霉经过多次传代，经鉴定 *oPpFADS17m* 片段仍稳定存在基因组中，且菌株的生长特性与原养型菌株无明显差别，但重组菌的 EPA 产量达到总脂肪酸的 31.5%，对 AA 的转化率高达 77.6%，而原始菌株几乎检测不到 EPA，较其他异源表达 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基

因的重组高山被孢霉、甚至在先申请记载的过表达来源于瓜果腐霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因的高山被孢霉 MA-*oPaFADS17*-3 菌株在 EPA 产量上均得到了显著提高,进一步推动了产油真菌产业进步和 EPA 的工业化生产。

本发明的重组高山被孢霉菌株 MA-*oPpFADS17*-4 于 2016 年 1 月 18 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,保藏编号为 CGMCC No. 11820。

【附图说明】

图 1 为 PCR 扩增的目的基因片段图;

其中 M 为核酸 Marker;泳道 1 为 *oPaFADS17* 基因片段(1080 bp);泳道 2 为 *oPpFADS17y* 基因片段(1086 bp);泳道 3 为 *oAiFADS17y* 基因片段(1095 bp);

图 2 为酿酒酵母重组转化子 PCR 鉴定的琼脂糖凝胶电泳图;

其中 M 为核酸 Marker;泳道 1 为含空质粒的载体;泳道 2-4 为 INVSc 1-*oPaFADS17* 的 1、2、3 号转化子;泳道 5-7 为 INVSc 1-*oPpFADS17* 的 1、2、3 号转化子;泳道 8-10 为 INVSc 1-*oAiFADS17* 的 1、2、3 号转化子;

图 3 为各 ω -3 脂肪酸脱饱和酶酿酒酵母转化子的转录水平;1 为含空质粒的载体;2-4 为 INVSc 1-*oPpFADS17* 的 1、2、3 号转化子;5-7 为 INVSc 1-*oAiFADS17* 的 1、2、3 号转化子;8-10 为 INVSc 1-*oPaFADS17* 的 1、2、3 号转化子;

图 4 为各 ω -3 脂肪酸脱饱和酶酿酒酵母转化子气相检测图;

A 为 INVSc 1-*oPpFADS17* 气相检测图;

B 为 INVSc 1-*oAiFADS17* 气相检测图;

C 为 INVSc 1-*oPaFADS17* 气相检测图;

图 5 为二元表达载体 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 的构建示意图;

图6为过表达 *oPpFADS17m* 基因的高山被孢霉重组菌株鉴定的琼脂糖凝胶电泳图;

其中, M 为 marker; 1: 代表阴性对照; 2-6: 代表 1-5 号转化子;

图7为高山被孢霉野生型菌株与5株重组高山被孢霉菌株 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因 (*oPpFADS17m*) RT-qPCR 的结果分析图;

其中, *M. alpina* 为高山被孢霉野生型对照; 1-5 代表重组高山被孢霉菌株 MA-*oPpFADS17-1*, MA-*oPpFADS17-2*, MA-*oPpFADS17-3*, MA-*oPpFADS17-4*, MA-*oPpFADS17-5*。

【具体实施方式】

以下实施例用于非限制性地解释本发明的技术方案。

本发明所涉及以下培养基:

Broth 培养基的组成为: 20 g/L 葡萄糖, 5 g/L 酵母提取物, 1 g/L 磷酸二氢钾, 0.25 g/L 七水硫酸镁, 10 g/L 硝酸钾, 余量为水, pH 6.0。

本发明所涉及的 MM 固体培养基的组成为: 1.74 g/L 磷酸氢二钾, 1.37 g/L 磷酸二氢钾, 0.146 g/L 氯化钠, 0.49 g/L 七水硫酸镁, 0.078 g/L 氯化钙, 0.0025 g/L 七水硫酸亚铁, 0.53 g/L 硫酸铵, 1.8 g/L 葡萄糖, 0.5 % 甘油, 20 g/L 琼脂, 余量为水, pH 6.8。

IM 培养基是在 MM 培养基的基础上添加了 200 μ M 的乙酰丁香酮 (AS) 构成的。

SC 固体培养基组成为: 20 g/L 葡萄糖, 5 g/L 酵母氮源无氨基酸和硫酸铵, 1.7 g/L 硫酸铵, 60 mg/L 异亮氨酸, 60 mg/L 亮氨酸, 60 mg/L 苯丙氨酸, 50 mg/L 苏氨酸, 40 mg/L 赖氨酸, 30 mg/L 酪氨酸, 20 mg/L 腺嘌呤, 20 mg/L 精氨酸, 20 mg/L 组氨酸, 10 mg/L 甲硫氨酸, 20 g/L 琼脂, 余量为水, pH 6.8。

SC-CS 培养基是添加了浓度为 100 μ g/mL 壮观霉素奇霉素 (Spectinomycin) 和浓度为 100 μ g/mL 头孢噻肟抗生素 (Cefotaxime Sodium) 的 SC 固体培养基。

SC 选择培养基为: 6.7 g/L 酵母氮源(无氨基酸有硫酸铵), 20 g/L

葡萄糖, 0.1 g/L (分别为腺嘌呤, 精氨酸, 半胱氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 苏氨酸, 色氨酸), 0.05 g/L (分别为天冬氨酸, 组氨酸, 异亮氨酸, 甲硫氨酸, 苯丙氨酸, 脯氨酸, 丝氨酸, 酪氨酸和缬氨酸), 20 g/L 琼脂粉。

GY 固体培养基组成为: 20 g/L 葡萄糖, 10 g/L 酵母提取物, 2 g/L 硝酸钾, 1 g/L 磷酸二氢钠, 3 g/L 七水硫酸镁, 20 g/L 琼脂, 余量为水, pH 6.8。

GY-CS 培养基是添加了浓度为 100 μ g/mL 壮观霉素奇霉素和浓度为 100 μ g/mL 头孢噻肟抗生素的 GY 固体培养基。

SOC 复苏培养基的组成为: 20 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 0.5 g/L 氯化钠, 2.5 mM 氯化钾, 10 mM 氯化镁, 20 mM 葡萄糖。

LB 固体培养基的组成是: 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 氯化钠, 20 g/L 琼脂。

YPD 培养基组成为: 10 g/L 酵母抽提物, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖。涉及到固体培养基时添加 20 g/L 琼脂。

一、表达寄生疫霉菌的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的重组酿酒酵母菌

实施例 1: 常温偏好 20C 的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的确定

将 5 种已知的常温偏好 20C 的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 (或简称 ω -3 脱饱和酶) 序列 (基因 OPIN 17、sdd 17、PsD 17、PrD 17 和 PaD 17) 在 NCBI 文库中进行比对, 根据序列相似度及同源性分析, 筛选出两种与已知序列相似度高、亲缘性近的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因序列, 分别来自于寄生疫霉、真菌媒介丝囊菌, 其对应的基因编号分别为 XM_008906963、XM_008870610。NCBI 文库对这两段序列的注释均属于脂肪酸脱饱和酶家族, 但并未对其具体功能做详细的注释。

通过 Clustal W2 软件将以上两段基因的编码区序列与前述 5 种已知的偏好 20C 的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶序列进行蛋白比对, 发现以上两

段序列具有与已知序列相似的 3 个 His-box 区，即所有 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的共同点，其相似的 His-box 区蛋白序列见表 1。通过 TMHMM 软件分析发现以上两段序列具有与已知序列相似的跨膜域。

表 1 常温下偏好 20C 的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的 3 个 His-box 氨基酸序列

物种	基因名称	基因编号	His-box I	His-box II	His-box III
<i>Phytophthora infestans</i> 致病疫霉	OPIN 17	CAJ30870	HDAGH	HRHHH	HQIHH
<i>Saprolegnia diclina</i> 异枝水霉	sdd 17	AY373823	HDCGH	HRHHH	HQVHH
<i>Phytophthora sojae</i> 大豆疫霉菌	PsD 17	FW362214.1	HDAGH	HRHHH	HQIHH
<i>Phytophthora ramorum</i> 栎树猝死病菌	PrD 17	FW362213.1	HDAGH	HRHHH	HQIHH
<i>Pythium aphanidermatum</i> 瓜果腐霉	PaD 17	FW362186.1	HDCGH	HRHHH	HQIHH
<i>Phytophthora parasitica</i> 寄生疫霉	Hypothetical protein	XM_008906963	HDAGH	HEHHH	HQIHH
<i>Aphanomyces invadans</i> 真菌媒介丝囊菌	Hypothetical protein	XM_008870610	HDCGH	HRHHH	HQVHH

实施例 2：重组表达载体的构建

1、获得目的基因

由于来源于寄生疫霉、真菌媒介丝囊菌和瓜果腐霉的基因序列密码子使用偏好性不同于宿主酿酒酵母，所以根据真核生物的密码子使用偏好性，利用 Genscript OptimumGene™ system 对其核酸序列进行密码子优化，分别人工合成了优化后的基因 *oPpFADS17y*（即 CN 2015109025795 中的 *oPpFADS17*）、*oAiFADS17y*（即 CN 2015109025795 中的 *oAiFADS17*）和 *oPaFADS17*（作为阳性对照），其序列如 SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 9 和 SEQ ID NO. 11，然后分别与 pUC57-simple（在 CN 2015109025795 中写作 PUC57-simple）载体连接得 pUC57-*oPpFADS17*、pUC57-*oAiFADS17* 和 pUC57-*oPaFADS17*，保存在大肠杆菌 Top10 中（购买自中国南京金

斯瑞公司)。

根据 *oPpFADS17y*、*oAiFADS17y* 和 *oPaFADS17*，序列设计引物，每对引物添加酶切位点 EcoR I 和 Xho I (下划线处)。以分别含有以上优化基因的质粒 pUC57-*oPpFADS17*、pUC57-*oAiFADS17* 和 pUC57-*oPaFADS17* 为模板，用每种基因对应引物，KOD 高保真聚合酶，通过 PCR 扩增得到目的基因片段。PCR 程序为：94℃ 30 s，55℃ 30 s，68℃ 1.5 min，30 个循环，68℃ 10 min，并对 PCR 产物进行纯化，纯化产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳验证。结果如图 1。

用于扩增目的基因的引物序列如下：

<i>oPpFADS17y</i> F	ctaattgaattcATGGCAACCAAGCAAGC
<i>oPpFADS17y</i> R	cgattctcgagTTAAGTTGACTTGGTTTTTAACAGCG
<i>oAiFADS17y</i> F	acaatggaattcATGCCATCCCCTAAAGCCAC
<i>oAiFADS17y</i> R	cctgatctcgagTTATAAGGTCTTTTTTAACTGAGTTTGCTCT
<i>oPaFADS17</i> F	catgtagaattcATGGCTTCGTCCACCGTTG
<i>oPaFADS17</i> R	ttacgactcgagTTAGTTAGCCTTGGTCTTGGCAG

2、酶切反应：

在 37℃ 条件下，用限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 双酶切目的基因片段和载体 pYES2/NT C (在 CN 2015109025795 中写作 PYES2/NT C) 进行酶切反应，酶切体系 (100 μL) 为：2 μL EcoR I，2 μL Xho I，30 μL 目的基因/载体，10 μL cutsmart Buffer，56 μL 去离子水，37℃ 孵育 12 h。酶切产物用 Thermo Scientific GeneJET gel extraction kit 试剂盒进行胶回收后，存于 -20℃ 待用。

其中，内切酶缓冲液 10×cutsmart Buffer：500 mM 乙酸钾，200mM Tris-醋酸盐缓冲液，100 mM 醋酸镁，1000 μg/mL 牛血清白蛋白，pH 7.9。

3、连接反应：

用 T4 连接酶分别连接纯化后的目的基因 *oPpFADS17y*、*oAiFADS17y* 和 *oPaFADS17* 和载体 pYES2/NT C，4℃ 孵育 12 h，连

接体系为： pYES2/NT C 载体(50 ng/ μ L) 1 μ L， 基因片段 75-150 ng， buffer 1 μ L， T4 连接酶 1 μ L， 补水至 10 μ L。

其中， 10 $\times$ 连接酶 buffer： 660 mM Tris-盐酸缓冲液（pH 7.6）， 66 mM 氯化镁， 100 mM 二硫苏糖， 1 mM 三磷酸腺苷。

4、转化大肠杆菌 TOP 10 感受态细胞：

转化方法如下：

1)无菌状态下取 100 μ L 感受态细胞， 加入 1-2 μ L 连接产物， 吹吸混匀。

2)将上述步骤中的感受态细胞移入电转杯中， 避免产生气泡。

3)将电转杯放入 Bio-Rad 电转仪， 调到合适预设程序档位， 根据仪器使用操作说明进行电转化， 电压条件为 1.8 kv。

4)将转化后的感受态细胞移至含有 1 mL SOC 复苏培养基的离心管中， 37 $^{\circ}$ C， 150 rpm 孵育 1 h。

5)取 200 μ L 涂布于含有 100 μ g/mL 氨苄霉素的 LB 固体培养基平板。倒置 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

挑取阳性转化子， 提取质粒并测序， 测序结果与基因序列完全匹配， 表明连接成功， 获得表达载体， 分别命名为 pYES2/NT C-*oPpFADS17*、 pYES2/NT C-*oAiFADS17*、 pYES2/NT C-*oPpFADS17*。

挑取一个酿酒酵母 INVSc 1（购自美国英杰公司）克隆于 10 mL YPD 培养基中， 30 $^{\circ}$ C 过夜培养。测 OD₆₀₀， 转接一定量菌液于 50 mL 培养基使 OD 值为 0.4， 继续培养 2-4 h。2500 rpm 离心 3 min， 40mL 1 $\times$ TE 重悬。2500 rpm 离心 3 min， 2 mL 1 $\times$ LiAc/0.5X TE 重悬， 室温孵育 10 min。

对实施例 2 的每个转化子取 100 μ l 上一步的酵母悬液， 加入 1 μ g 重组表达载体质粒 DNA 和 100 μ g 鲑鱼精担体 DNA。为了获得最佳的转化效率， 每次转化前重复对载体 DNA 进行变性处理， 沸水浴 2 min， 冰浴 2 min， 反复四次。加入 700 μ l 1 $\times$ LiAc/40wt%

PEG-3350/1×TE, 混匀。30℃孵育 30 min。补加 88 μl DMSO, 混匀, 42℃休克 7 min。离心 10s, 去上清。加入 1 mL 1×TE 重悬, 再次离心。50-100 μl 1×TE 重悬菌体, 涂于 SC 选择培养基平板上。30℃培养 2-5 d。

其中 1×TE: 10 mM Tris-盐酸缓冲液 (PH=8.0), 1 mM 乙二胺四乙醇胺 (PH=8.0); 1×LiAc: 10 mM 醋酸锂。

实验例 4、酿酒酵母转化子的 PCR 验证

从平板上挑取生长状态良好的菌落接种到 5 mL 含氨苄抗性的 YPD 培养基中, 30℃ 200 rpm 培养 48 h, 用质粒抽提试剂盒 (购自天根公司) 抽提质粒, 测量 A 260 nm 和 A 280 nm 值, 计算质粒的浓度, 低温保存。

用相应引物进行 PCR 鉴定。引物如下:

T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	TCGGTTAGAGCGGATGTG

PCR 反应体系如下: dd H₂O 7 μL, 10×Taq MIX 10 μL, 通用引物 T7 1 μL, 通用引物 T7 terminator 1 μL, 模板(质粒) 1 μL。PCR 反应条件: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1.5 min, 30 个循环, 72℃ 7 min。扩增反应结束后取 3 μL PCR 产物进行 1wt%琼脂糖凝胶电泳, 检测 PCR 产物条带大小, 如图 2 所示。

由图 2 可见各基因分别得到 3 个转化子。重组转化子分别命名为 INVSc 1-*oPpFADS17-1*、INVSc 1-*oAiFADS17-2* 和 INVSc 1-*oPaFADS17-3*, 于 30wt%甘油管保藏。未插入基因片段的 PYES2/NT C 空载体作为阴性对照组。

实验例 5: 酿酒酵母转化子诱导培养

挑取酿酒酵母转化子平板上的单菌落接种于种子培养基 SC-U, 28℃培养 48 h, 测量 OD₆₀₀ 值。转接入诱导培养基, 使 OD 值达到 0.4, 同时外源添加不同碳链长度的多不饱和脂肪酸底物。28℃培养 48 h,

收集菌体。

其中种子培养基 SC-U 为：6.7 g/L 酵母氮源（无氨基酸有硫酸铵），20 g/L 葡萄糖，0.1 g/L（分别有腺嘌呤，精氨酸，半胱氨酸，亮氨酸，赖氨酸，苏氨酸，色氨酸和尿嘧啶），0.05 g/L（分别有天冬氨酸，组氨酸，异亮氨酸，甲硫氨酸，苯丙氨酸，脯氨酸，丝氨酸，酪氨酸和缬氨酸）。

诱导培养基是将种子培养基的碳源更换为 10 g/L 棉籽糖，并添加 20 g/L 诱导剂半乳糖。

实验例 6：酿酒酵母转化子的转录水平测定

提取酿酒酵母转化子总 RNA，具体步骤为：

1)取出适量在液氮中冻存的菌体，于预冷的无菌无酶研钵中加入液氮充分研磨。

2)加入 1 mL TRIzol (购买自美国 Invitrogen 公司)继续研磨至粉末，室温放置至溶解。

3)用无酶枪头吸取 1 mL 上述液体于无酶离心管中，加入 200 μ L 三氯甲烷混匀。

4)12000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min，吸上清于新的无酶离心管中。

5)加入 200 μ L 三氯甲烷混匀，12000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min，吸上清于新的无酶离心管中。

6)加入等体积的异丙醇，静置 15 min，12000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。弃上清，室温晾干。

7)加入 1 mL 70vol%乙醇，12000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。用无酶枪头吸去乙醇，室温放置干燥。

8)加入 50 μ L 无酶水溶解 RNA，-80 $^{\circ}$ C 储存。

9)浓度测定：取 1 μ L RNA 用 NaNodrop 2000 测定浓度。

10)变性胶电泳检测 RNA 完整性：取 1 μ g RNA 在 1.2wt% 的变性胶中电泳，观察 RNA 完整性。

根据 *oPpFADS17y*、*oAiFADS17y* 和 *oPaFADS17* 基因序列和酿酒酵母内参 18S rDNA 序列设计 qRT-PCR 引物：

q- <i>oPpFADS17y</i> F	GGCAACCAAGCAAGCCTATGTA
q- <i>oPpFADS17y</i> R	GCTAAGGCAACTGCAATTACCAAAC
q- <i>oAiFADS17y</i> F	TACTACTTCGCTCCATTGTTCGTTT
q- <i>oAiFADS17y</i> R	CAACCGTAGGATCTATCAACTGAAG
q- <i>oPaFADS17</i> F	CTTCGTCCACCGTTGCTG
q- <i>oPaFADS17</i> R	AGCCAGCGATTCCGAGA
18S-F	AATCATCAAAGAGTCCGAAGACATTG
18S-R	CCTTTACTACATGGTATAACTGTGG

取 0.5-1 μ g 总 RNA 为模板，根据 PrimeScript RT reagent kit（购自日本 TaKaRa 公司）试剂盒说明进行操作，获得重组菌株的 cDNA。使用 ABI-Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, CA) 按照 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA) 的说明进行 RT-qPCR 反应。

反应体系为：10 μ l SYBR Green PCR Master Mix，各基因上下游引物各 0.5 μ l，8 μ l 无酶水，1 μ l 模板。PCR 循环设置为 50 $^{\circ}$ C 2 min，95 $^{\circ}$ C 10 min，95 $^{\circ}$ C 15s，60 $^{\circ}$ C 30s，40 个循环。酿酒酵母的 18S rRNA 作为内参基因。

根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对转录水平，其中所有样品测三个重复，其中： $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{样品}) - \Delta Ct(\text{对照})$

结果如图 3 所示。分析发现，各基因转化子较对照组， $\Delta\Delta Ct$ 值均达到 10 左右，证明此基因的表达量发生了从无到有的变化，表明在宿主菌株中均成功转录。

实验例 7：酿酒酵母的蛋白表达测定

以相同的条件，对不同基因的不同转化子分别诱导后，用 0.5 mm 酸洗玻璃珠破碎菌体提取细胞总蛋白。

用 BSA 法测定蛋白浓度后，以 100 μ g 总蛋白的上样量进行 SDS-PAGE 电泳，至 Marker 完全分离。

于 Bio-Rad 电泳仪中将蛋白凝胶中的蛋白转移到 PVDF 膜上。转

膜条件为 20 mA，过夜。

转膜完成后，将 PVDF 膜浸泡在 TBST 缓冲液中，于水平摇床上室温孵育 10 min。重复三次。

将 PVDF 膜浸泡在含 5wt%脱脂乳的 TBST 缓冲液中，于水平摇床上室温孵育 90 min。

将 PVDF 膜浸泡在 TBST 缓冲液中于水平摇床上室温孵育 10 min。重复三次。

将抗 His 一抗以 1:5000 的比例溶于含有 5wt%脱脂乳的 TBST 缓冲液中于水平摇床孵育 1 h。

将 PVDF 膜浸泡在 TBST 缓冲液中于水平摇床上室温孵育 10 min。重复三次。

将羊抗鼠二抗以 1:10000 的比例溶于含有 5wt%脱脂乳的 TBST 缓冲液中于水平摇床孵育 1 h。

将 PVDF 膜浸泡在 TBST 缓冲液中于水平摇床上室温孵育 10 min。重复三次。

将 PVDF 膜用 ECL 法显影。在 western 成像仪中曝光拍照。

结果表明，不同基因的不同转化子蛋白均得到表达，且不同转化子蛋白表达量几乎一致。

其中 TBST 缓冲液(1L)组成为：8.8 g 氯化钠；20 mL 1 M Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0；0.5 mL 吐温 20。

实施例 8：酿酒酵母脂肪酸的提取

包括以下步骤：

收集诱导后菌体，真空冷冻干燥。

充分研磨粉碎，称取 10 mg 加入 1 mL 10wt%盐酸甲醇溶液（即含有 10wt% HCl 的甲醇），内标(C15:0, C21:0 各 100 μ l)，振荡混匀。60℃水浴 3 h，每隔 0.5 h 震荡一次。

加入 1 mL 正己烷和 1 mL 饱和氯化钠振荡混匀，4000 rpm 离心 5 min。取上清至干净的瓶中。

取 1 mL 正己烷加于原瓶，4000 rpm 离心 5 min，取上清于上述新瓶中。

新瓶中的液体用 N₂ 吹干。加入 1 mL 正己烷，旋紧盖子，振荡溶解，得到脂肪酸甲酯溶液。

所得脂肪酸甲酯分析采用 GC-MS (Shimadzu Co., Japan)，色谱柱为 Rtx-Wax (30 m×0.25 mm, 0.25 μm)。进行质谱检测器检测，汽化室和检测器温度分别为 240℃ 和 250℃，分流方式进样 1 μL，分流比 10:1，载气为氦气。

程序升温：初始温度 40℃ 保持 5 min，以 20℃/min 升到 150℃，再以 5℃/min 升到 190℃，保持 5 min，最后以 5℃/min 升到 220℃，保持 17 min。通过与脂肪酸甲酯标准品 (C15:0) 保留时间，峰面积比对以及质谱分析结果，定性、定量样品中脂肪酸组分。

实施例 9：常温偏好 20C 的 ω-3 脂肪酸脱饱和酶活性鉴定

在诱导培养基中添加三个浓度梯度 0.05 mM、0.1 mM、0.2 mM 的 ARA 作为底物进行诱导，收集菌体，提取脂肪酸，GC-MS 脂肪酸测定结果如图 4 所示。

与 Ctrl 组相比，INVSc 1-*oPpFADS17*、INVSc 1-*oAiFADS17*、INVSc 1-*oPaFADS17* 在 37.5 min 中出现新峰，通过与脂肪酸甲酯标准品比对以及质谱分析，判定此峰为 EPA。具体分析结果见表 2。

重组转化子 (INVSc 1-)	0.05mM ARA		0.1mM ARA		0.2mM ARA	
	EPA 产量 (mg/g)	EPA 转化率 (100%)	EPA 产量 (mg/g)	EPA 转化率 (100%)	EPA 产量 (mg/g)	EPA 转化率 (100%)
<i>oPpFADS17-1</i>	9.0±0.3	71.3±3.5	6.6±0.9	44.5±3.7	5.6±0.2	34.5±1.2
<i>oPpFADS17-2</i>	9.0±0.1	63.3±2.3	8.7±1.0	48.7±3.7	4.5±0.5	28.0±2.4
<i>oPpFADS17-3</i>	9.4±0.5	64.8±3.3	7.8±3.4	49.0±2.3	3.3±0.5	43.8±2.5
<i>oAiFADS17-1</i>	5.7±0.4	41.4±2.4	3.8±0.7	26.1±1.0	3.7±0.7	27.0±1.0
<i>oAiFADS17-2</i>	6.7±0.3	36.5±3.0	6.2±0.4	34.8±0.8	3.3±0.2	23.5±2.3
<i>oAiFADS17-3</i>	7.6±0.6	46.3±3.5	5.1±0.7	33.5±3.0	4.0±0.2	23.9±0.9
<i>oPaFADS17-1</i>	8.5±0.3	69.7±1.7	6.3±0.8	48.4±2.9	3.1±0.2	39.5±2.8
<i>oPaFADS17-2</i>	6.6±0.4	67.9±2.8	7.1±0.7	46.8±1.8	5.6±0.6	23.1±1.9
<i>oPaFADS17-3</i>	6.2±0.5	66.3±3.3	6.7±0.6	44.4±2.7	4.1±0.4	28.7±0.8

Ctrl	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

表 2 不同 ω -3 脂肪酸脱饱和酶酿酒酵母重组转化子对 ARA 的催化效率

INVSc 1-*oPpFADS17* 的三个转化子对 ARA 的催化效率最高，其中 INVSc 1-*oPpFADS17-3* 在三个浓度梯度下分别达到 64.8%、49.0%、43.8%，与阳性对照 INVSc 1-*oPaFADS17* 在三个浓度下的催化效率 69.7%，48.4%，39.5%几乎没有差别，而绝对产量进一步优于阳性对照的各个转化子。

特别地，与现有技术<Identification and characterization of new Δ -17 fatty acid desaturases>中记载的重组解脂酵母相比，本发明的 INVSc 1- *oPpFADS17* 转化子在实现相当的催化转化率时，其所需的诱导培养基中的底物 ARA 浓度显著降低，特别是在 0.05 mM 下实现最高转化率，且 EPA 产量也进一步提高，显示出更好的 EPA 转化能力。另外，本发明使用的表达载体酿酒酵母中仅含有 Δ 9 脂肪酸脱氢酶，即酿酒酵母中仅有亚油酸和棕榈油酸两种单不饱和脂肪酸，与现有的重组解脂酵母相比，本发明的重组酿酒酵母不会干扰要利用的多不饱和脂肪酸合成途径，且本发明的重组载体上带有 His 标签，更有利于后续蛋白的纯化和鉴定。

此外，以上数据看出，来自真菌媒介丝囊菌的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因 (*oAiFADS17y*) 序列尽管与来自寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因 (*oPpFADS17y*) 序列具有相似度高、亲缘性近的特点，但通过相同技术手段获得的重组酿酒酵母菌却不能起到相同的效果。来自真菌媒介丝囊菌的转化子 INVSc 1- *oAiFADS17* 的催化效率相对较低，分别为 46.3%，33.5%，23.9%。为了进一步验证这几段基因是否偏好催化 20C 的底物，选取 INVSc 1-*oPpFADS17-3*、INVSc 1-*oAiFADS17-3* 和 INVSc 1- *oPaFADS17-1* 三株重组转化子，分别在诱导培养基中添加 0.2 mM LA、GLA、DGLA、ARA 以及同时添加 0.1mM LA 和 0.1mM ARA 分别进行诱导，结果如表 3。

表 3 28℃不同 ω -3 脱饱和酿酒酵母重组转化子对不同底物的催化效率

重组转化子	0.2mM LA		0.2mM GLA		0.2mM DGLA		0.2mM ARA	
(INVSc 1-)	ALA 产量 (mg/g)	ALA 转化 率 (100%)	SDA 产量 (mg/g)	SDA 转化 率 (100%)	ETA 产量 (mg/g)	ETA 转化 率 (100%)	EPA 产量 (mg/g)	EPA 转化 率 (100%)
<i>oPpFADS17-3</i>	1.2±0.1	7.1±0.7	1.0±0.1	4.7±0.7	4.2±0.2	25.6±0.3	6.1±0.6	45.3±1.3
<i>oAiFADS17-3</i>	0.5±0.1	2.9±0.4	0.3±0.1	1.6±0.3	3.0±0.2	18.3±0.4	3.8±0.1	27.1±1.1
<i>oPaFADS17-1</i>	0.6±0.1	3.4±0.3	0.5±0.1	3.0±0.5	1.9±0.3	13.4±1.7	5.2±0.5	49.5±1.1
Ctrl	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

重组转化子	0.1mM LA+0.1mM ARA			
(INVSc 1-)	ALA 产量 (mg/g)	ALA 转化率 (100%)	EPA 产量 (mg/g)	EPA 转化率 (100%)
<i>oPpFADS17-3</i>	0.6±0.1	6.6±0.6	3.8±0.1	51.5±0.8
<i>oAiFADS17-3</i>	0.5±0.1	4.1±1.2	3.4±0.3	37.3±0.7
<i>oPaFADS17-1</i>	0.4±0.1	3.6±1.0	3.3±0.1	47.0±0.9
Ctrl	0±0	0±0	0±0	0±0

分析可知，重组转化子 INVSc 1-*oPpFADS17-3* 和 INVSc 1-*oAiFADS17-3*、INVSc 1-*oPaFADS17-1* 对 20C 底物的转化率显著高于 18C 底物，其中对 ARA 的转化效率尤为明显。INVSc 1-*oPpFADS17-3* 对 ARA 的转化率最高，与阳性对照 INVSc 1-*oPaFADS17-1* 的转化率相当，产量则高于阳性对照；此外，INVSc 1-*oPpFADS17-3* 对 ARA 以外的 ω -6 PUFAs 的转化率是阳性对照的两倍左右，说明本发明的重组菌合成 ω -3 PUFAs 的效率明显高于阳性对照。

为了证明达寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶在常温和较低温下催化活性均较高，在诱导培养基添加 0.2 mM LA、GLA、DGLA、ARA 以及同时添加 0.1 mM LA 和 0.1 mM ARA，12℃条件下进行诱导，结果如表 4。

表 4 12℃不同 ω -3 脱饱和酿酒酵母重组转化子对不同底物的催化效率

重组转化子	0.2mM LA		0.2mM GLA		0.2mM DGLA		0.2mM ARA	
(INVSc 1-)	ALA 产量 (mg/g)	ALA 转化 率 (100%)	SDA 产量 (mg/g)	SDA 转化 率 (100%)	ETA 产量 (mg/g)	ETA 转化 率 (100%)	EPA 产量 (mg/g)	EPA 转化 率 (100%)
<i>oPpFADS17-3</i>	1.3±0.1	4.7±0.2	0.7±0.1	3.1±0.7	3.2±0.3	17.7±1.1	3.9±0.3	30.9±2.8
<i>oAiFADS17-3</i>	0.5±0.1	1.9±0.2	0.2±0.1	1.2±0.4	1.4±0.2	8.4±0.4	1.6±0.2	15.0±0.9

<i>oPaFADS171</i>	0.8±0.1	3.5±0.5	0.4±0.1	2.1±0.3	2.0±0.1	12.4±1.4	3.4±0.1	26.0±1.4
Ctrl	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
重组转化子	0.1mM LA+0.1mM ARA							
(INVSc1-)	ALA 产量 (mg/g)	ALA 转化率 (100%)		EPA 产量 (mg/g)		EPA 转化率 (100%)		
<i>oPpFADS17-3</i>	0.8±0.1	5.9±0.7		3.9±0.1		33.2±1.6		
<i>oAiFADS17-3</i>	0.5±0.1	4.1±1.2		3.4±0.3		37.3±0.7		
<i>oPaFADS171</i>	0.2±0.1	2.1±0.4		2.3±0.3		25.9±0.9		
Ctrl	0±0	0±0		0±0		0±0		

从表 4 的脂肪酸测定结果表明,不同的重组菌低温下的转化率均有所降低。然而,本发明中能够表达寄生疫霉 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的重组酿酒酵母菌在较低温下具有显著高于能够表达真菌媒介丝囊菌的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的重组酿酒酵母菌的 EPA 转化率和 EPA 产量,也优于能够表达瓜果腐霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的重组酿酒酵母菌的 EPA 转化率和 EPA 产量。

二、表达寄生疫霉菌的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的重组高山被孢霉菌

实施例 10: 构建表达载体 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17*

对来自寄生疫霉菌的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶按高山被孢霉特性进行优化,将人工合成的优化后的基因序列 *oPpFADS17m* (如 SEQ ID No.5 所示) 与 pUC57 载体连接得 pUC57-*oPpFADS17* (在 CN 201610184669.X 中写作 PUC57-*oPpFADS17*)。

在 37℃ 条件下,先用限制性内切酶 Hind III 过夜酶切质粒 pUC57-*oPpFADS17* 及载体 pBIG2-ura5s-ITs 片段, Hind III 酶切体系 (100 μ L) 为: 2 μ L Hind III-HF, 30 μ L 质粒或载体, 10 μ L Cutsmart Buffer, 58 μ L 去离子水, 37℃ 孵育 12 h。

其中,载体 pBIG2-ura5s-Its 是根据中国专利申请 CN201310524221.4 直接获得的。

通过 PCR 的方法从 pD4 质粒上获得 HPH 表达单元, 将 HPH 表达单元用限制性内切酶 EcoR I 和 Xba I 酶切, 插入到 EcoR I 和 Xba I 酶切过的 pET28a (+) 的多克隆位点 (MCS) 中, 得到质粒 pET28a-HPHs。利用 PCR 从高山被孢霉 cDNA 中获得 *ura5* (乳清酸磷酸核糖转移酶; OPRtase) 基因, 并利用限制性内切酶 BspH I 和 BamH I 酶切 *ura5* 基因, 将酶切过的 *ura5* 基因插入到 Nco I 和 BamH I 酶切过的质粒 pET28a-HPHs 中, 以替换 *hpt* 基因, 构建质粒 pET28a-*ura5s*。用限制性内切酶 EcoR I 和 Xba I 酶切质粒 pET28a-*ura5s* 得到 *ura5s* 表达单元。将 *ura5s* 表达单元替换质粒 pBIG2RHPH2 中的 HPH 表达单元, 进一步构建质粒转化质粒 pBIG2-*ura5s*。更进一步地在质粒 pBIG2-*ura5s* 和质粒 pET28a-HPHs 的基础上, 构建高山被孢霉基因操作通用载体。用 PCR 的方法从高山被孢霉基因组中获得非编码的内含子 DNA 片段 IT。用限制性内切酶 NcoI 和 BamHI 分别对 IT 基因片段和质粒 pET28a-HPHs 进行酶切, 并通过连接反应将 IT 片段取代质粒 pET28a-HPHs 的 *hpt* 基因, 得到质粒 pET28a-ITs。用限制性内切酶 Spe I 和 Xba I 双酶切质粒 pET28a-ITs 得到 ITs 表达单元。将 ITs 表达单元插入到 Xba I 酶切过的质粒 pBIG2-*ura5s* 中得到高山被孢霉基因操作通用载体 pBIG2-*ura5s*-ITs。

回收酶切产物, 进一步使用限制性内切酶 Xho I 单酶切, 切胶纯化回收目的基因(针对高山被孢霉进行优化的、来自寄生疫霉菌的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因片段 *oPpFADS17m*, 在 CN 201610184669X 中写作 *oPpFADS17*) 和载体 pBIG2-*ura5s*-ITs 片段。酶切体系为 (100 μ L):

2 μL Xho I, 30 μL 质粒或载体 pBIG2-ura5s-ITs 片段, 10 μL cutsmart Buffer, 58 μL 去离子水, 37°C 水浴酶切 12 h。

其中, 内切酶缓冲液 Cutsmart buffer: 50 mM 乙酸, 20 mM Tris-乙酸, 10 M 乙酸镁, 100 $\mu\text{g/mL}$ 牛血清白蛋白, pH 7.9。

然后, 用 T4 连接酶将酶切纯化后的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因片段 *oPpFADS17m* 与载体 pBIG2-ura5s-ITs 连接, 4°C 连接 12 h, 得到重组表达载体 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17*。连接体系为 (10 μL): 2 μL 目的基因酶切后片段, 3 μL 载体酶切后片段, 1 μL 连接酶 buffer, 1 μL T4 连接酶, 3 μL 无菌水, 4°C 连接 12 h。

连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 转化方法如下:

(1) 无菌状态下取 100 μL 感受态细胞, 加入 1-2 μL 连接产物, 吹吸混匀。

(2) 将混匀的感受态细胞移入预冷过的电转杯中, 避免产生气泡。

(3) 将电转杯放入 Bio-Rad 电转仪, 调到合适预设程序档位, 电转。电压条件为 1.8 kv。

(4) 加入 1 mL SOC 复苏培养基于电转后的感受态细胞中, 混匀转移至 1.5 mL 离心管中, 37°C, 150 rpm 孵育 1 h。

(5) 取 200 μL 涂布含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 固体培养基平板。倒置 37°C 培养过夜。

挑取阳性转化子, 提取质粒, 测序验证结果表明连接成功, 获得二元表达载体 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17*。

二元表达载体 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 电击转化根瘤土壤杆菌的方法参照转化大肠杆菌 TOP10 的方法。得到含有质粒

pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 的根瘤土壤杆菌 C58C1。

实施例 11：根瘤土壤杆菌介导转化高山被孢霉

在已有的国内外文献有关根瘤农杆菌转化方法报道的基础上，做了适当的优化调整，具体如下：

(1)取保存于-80℃的含有质粒 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 的根瘤农杆菌 C58C1 于含有 100 µg/mL 利福平和 100 µg/mL 卡那霉素的 YEP 固体培养基平板划线。28℃倒置避光培养 48 h。

(2)挑取单克隆接种至 20 mL 含有 100 µg/mL 利福平和 100 µg/mL 卡那霉素的液体 YEP 培养基中 28℃，200 rpm 避光培养 24-48 h。

(3)4000 × g 离心 5 min 收集菌体，倒掉上清。加 5 mL IM 培养基重悬菌体，4000 × g 离心 5 min，倒掉上清。加 2 mL IM 培养基重悬菌体。

(4)用 IM 培养基调整菌浓度至 OD_{600} 为 0.3。置于 28℃，200 rpm 摇床避光培养至 OD_{600} 到 1.0。

(5)用 500 µL 灭菌的生理盐水冲刷在 GY-U 斜面培养 1 个月以上的高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷性菌株 CCFM501（即 CN 201310347934.8 公开的尿嘧啶营养缺陷型菌株 MAU1），收集孢子，用血球计数器计数，调整孢子浓度到 10^7 个每 100 µL。

(6)取 100 µL 根瘤土壤杆菌与 100 µL 孢子混合，均匀涂布于铺有玻璃纸的 IM 固体培养基上。23℃避光培养 36-48 h。

(7)将玻璃纸转移到含有 100 µg/mL 壮观霉素和 100 µg/mL 头孢噻肟抗生素的 SC 平板（SC-CS）上。18℃避光培养 12 h，随后转移至 25℃培养。

(8)持续观察菌落在 SC-CS 平板上的生长情况，若长出明显菌落，及时用尖头镊子将菌落外沿挖出，接种于 SC-CS 平板上，继续正置

于 25℃ 培养箱中培养。

(9)待 SC-CS 平板上的转化子长出后,挑菌丝转接于 SC-CS 平板,重复筛选 3 次,排除阴性转化子。

(10)将筛选 3 次后生长的菌落接种至 GY 平板,28℃ 培养至产生大量孢子,保藏在 4℃。

实施例 12: 高山被孢霉过表达 *oPpFADS17m* 工程菌株筛选和鉴定

1)用 3 mL 生理盐水冲刷 GY 表面,收集液体于一个无菌 1.5 mL 离心管中。过 25 μ m 滤膜;

2)用血球计数器计数,调整为三种孢子浓度梯度 10^8 个每 100 μ L、 10^6 个每 100 μ L、 10^4 个每 100 μ L,分别取 200 μ L 涂布于含有 100 μ g/mL 壮观霉素和 100 μ g/mL 头孢噻肟的 GY-CS 平板上,25℃ 避光培养 2-3 d;

3)随时用无菌镊子挑出生长的真菌菌丝 SC-CS 平板上,25℃ 培养 2-3 d;

4)观察高山被孢霉在平板上的生长情况,挑出在 SC-CS 平板上生长的菌丝接种于 GY 斜面上;

5)将上述步骤 4) 中平板上的高山被孢霉菌株孢子在 GY 斜面上传代三次;

6)将稳定遗传的菌株鉴定为异源表达 *oPpFADS17m* 基因的重组高山被孢霉菌株,保藏于 GY 斜面上;

7)提取鉴定正确的重组高山被孢霉菌株的基因组 DNA,用一对与启动子和终止子特异性结合的引物进行 PCR 验证:

P1(sense): CACACACAAACCTCTCTCCCACT

P2(antisense): CAAATGAACGTATCTTATCGAGATCC;

重组菌株鉴定的琼脂糖凝胶电泳分析结果见图 6，M 为 marker；泳道 1 为阴性对照；泳道 2-6 为 1-5 号 MA-*oPpFADS17* 重组菌株。结果可见，5 株阳性转化子均可扩增出两条大小分别为 818 bp 和 1086 bp 的产物条带，电泳结果说明 1-5 号转化子均为二元表达载体成功整合到高山被孢霉基因组中的阳性转化子。

8) 所得重组菌株分别保藏于 GY 斜面上。

实施例 13：阳性转化子 MA-*oPpFADS17* 总 RNA 提取

1. 取出适量在液氮中冻存的菌体，于预冷的无菌无酶研钵中加入液氮充分研磨。
2. 加入 1 mL TRIzol (购自 Invitrogen 公司, Carlsbad, CA, USA) 继续研磨至粉末，室温放置至溶解。
3. 用无酶枪头吸取 1 mL 上述步骤中液体于无酶离心管中，加入 200 μ L 三氯甲烷混匀。
4. $13200 \times g$ ， 4°C ，离心 15 min 吸上清于新的无酶离心管中。
5. 加入 200 μ L 三氯甲烷混匀， $13200 \times g$ ， 4°C ，离心 15 min 吸上清于新的无酶离心管中。
6. 加入等体积的异丙醇，静置 15 min， $13200 \times g$ ， 4°C ，离心 15 min。弃上清，室温晾干。
7. 加入 1 mL 的 70vol%乙醇， $13200 \times g$ ， 4°C ，离心 15 min。用无酶枪头吸去乙醇，室温放置干燥。
8. 加入 50 μ L 无酶水溶解 RNA， -80°C 储存。
9. 浓度测定：取 1 μ L RNA 用 Nanodrop 2000 测定浓度。
10. 变性胶电泳检测 RNA 完整性：取 1 μ g RNA 在 1.2vol% 的变性胶中电泳，观察 RNA 完整性。
11. 取 1 μ g 总 RNA 为模板，根据 PrimeScript RT reagent kit

(TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan) 试剂盒说明进行操作, 获得重组菌株的 cDNA。

实施例 14: 阳性转化子 MA-*oPpFADS17* 转录水平的 RT-qPCR 检测

根据 *oPpFADS17* 序列和内参 18SrRNA 序列设计引物:

q-*oPpFADS17m* F: TCTTCCCCACCCTCACCG

(在 CN 201610184669.X 中写作 q-*oPpFADS17* F)

q-*oPpFADS17m* R: CAAGCCACGAGCGTAGTTCA

(在 CN 201610184669.X 中写作 q-*oPpFADS17* R)

18SRTF: CGTACTACCGATTGAATGGCTTAG

18SRTR: CCTACGGAAACCTTGTTACGACT

取 0.5-1 μ g cDNA 为模板, 使用 Bio-Rad CFX Connect™ system 按照 iTaq Universal SYBR Green Supermix 的说明进行 RT-qPCR 反应。反应体系为: 8 μ L 无酶水, 10 μ L iTaq Universal SYBR Green Supermix, 0.5 μ L q-*oPpFADS17m* F, 0.5 μ L q-*oPpFADS17m* R, 1 μ L 模板, 总体积 20 μ L。PCR 循环设置为 50°C 2 min, 95°C 10 min, 95°C 15 s, 60°C 30 s, 30 个循环。以高山被孢霉的 18S rRNA 作为内参基因, 各转化子取三个平行。结果如图 7 所示, 高山被孢霉野生型对照 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因 (*oPpFADS17m*) 无转录, 而 5 株基因工程菌 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因 (*oPpFADS17m*) 的转录量有显著提高。这说明使用农杆菌介导的方法能够使外源 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因 (针对高山被孢霉进行优化的、来自寄生疫霉菌的 *oPpFADS17m*) 在高山被孢霉中转录和表达。

实施例 15: 阳性转化子脂肪酸提取

(1)将高山被孢霉原养型菌株与实施例 3 筛选获得的高山被孢霉过表达 *oPpFADS17m* 工程菌株接种于 Broth 培养基中, 28℃, 200 rpm 摇床培养 7 d。

(2)收集菌体, 真空冷冻干燥至恒重, 称量菌体重量, 计算生物量。

(3)将菌体研磨成粉末, 称取 50 mg, 加入 2 mL 4 M 盐酸。

(4)80℃水浴 1 h, -80℃放置 15 min。重复一次。80℃水浴 1 h。

(5)冷却至室温, 加入 1 mL 甲醇, 混匀。

(6)加入 1 mL 氯仿, 震荡 10 min。3000 × g 离心 3 min。收集氯仿。

(7)重复(6)两次。

(8)合并氯仿 (3 mL), 加入 1 mL 饱和氯化钠, 混匀, 3000 × g 离心 3 min。收集氯仿层于新瓶。剩余液体继续加入 1 mL 氯仿, 3000 × g 离心 3 min。合并氯仿 (4 mL)。

(9)氮吹干燥, 加入 1 mL 乙醚, 转移至洁净的已经称重的瓶中。氮吹干燥。

实施例 16: 阳性转化子脂肪酸检测

脂肪酸组成及含量的测定方法: ①向上述粗脂中分别加入 100μL 2.02 mg/mL 内标 C15:0 和 1 mL 10 wt%的盐酸甲醇, 60℃水浴 3 h, 每隔 30 min 振荡 1 min; ②冷却至室温后加入 1 mL 正己烷和 1 mL 饱和氯化钠溶液, 震荡混匀, 3000 × g 离心 3 min, 吸出正己烷层, 再加入 1 mL 正己烷, 震荡混匀, 3000 × g 离心 3 min, 吸出并合并正己烷; ③37℃氮气吹干后, 加入 1 mL 正己烷, 混匀, 转入气相瓶, 得到脂肪酸甲酯溶液; ④脂肪酸甲酯分析采用 GC-2010(Shimadzu Co., Japan), 色谱柱为 DB-Waxetr (30 m × 0.32 mm, 0.22 μm)。氢火焰离子检测器检测, 汽化室和检测器温度分别为 240℃和 260℃, 分流方式进样 1 μL, 分流比 10:1, 载气为氮气。程序升温: 初始温度 120℃

保持 3 min, 以 5°C/min 升到 190°C, 再以 4°C/min 升到 220°C, 保持 20 min。通过与商业化的脂肪酸甲酯标准品 (37 种脂肪酸甲酯混标, Supelco, USA) 和加入内标 C15:0 的质量比较, 定性、定量分析样品中脂肪酸组分, 其中总脂肪酸含量用单位菌体中总脂肪酸的质量表示。

表 5 是高山被孢霉野生型 (原养型) 菌株与五株表达寄生疫霉菌的 *oPpFADS17m* 基因的高山被孢霉菌株脂肪酸产量的比较, 表 6 是高山被孢霉野生型菌株与五株表达寄生疫霉菌的 *oPpFADS17m* 基因的高山被孢霉菌株脂肪酸组成的比较。由表 5 和表 6 的结果可以看出五株基因工程菌株与野生型菌株生物量没有显著差异, 而脂肪酸组成却发生了明显变化。其中, 5 株重组菌株中 AA (C20:4) 的产量较野生型有不同程度的减少, 且有大量 EPA (C20:5) 产生, 且 AA 的减产与 EPA 的增产有明显的规律, 而其余各种脂肪酸 (C16:0、C18:0、C18:1、C18:2、C18:3) 的产量没有显著变化, 这说明 5 株重组菌株都能不同程度地将 AA 催化为 EPA。其中, MA-*oPpFADS17-4* 表现出特别优秀的 EPA 产量, 其 EPA 的产量达到 1197.3 mg/L, 占总脂肪酸 (TFA) 含量的 31.5%, 同时其 AA 产量仅为 326.8 mg/L, 表示能够将大部分 AA 催化转化为 EPA, 对 AA 的转化率达 77.6% (转化率 = $\text{EPA}/(\text{AA} + \text{EPA}) \times 100\%$), 此外其总脂肪酸绝对值也有一定幅度提高。

此外, 其余四株重组菌株 (MA-*oPpFADS17-1*、2、3 和 5) 也表现出不同程度的 EPA 产量的提高, 以明显区别于野生型菌株。这表明异源表达来自寄生疫霉菌的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因 *oPpFADS17m* 在高山被孢霉中能够成功表达, 通过本发明的构建方法得到的重组菌能够将 AA 转化为 EPA 并具有相当转化率。其中, 以 MA-*oPpFADS17-4* 效果最为明显, 较其他 MA-*oPpFADS17* 转化子菌株有意想不到的提

高，也显著高于其他现有技术的记载。

表 5 高山被孢霉野生型菌株与五株基因工程菌株脂肪酸产量比较

菌株	生物量(g/L)	AA(mg/L)	EPA(mg/L)	TFA(g/L)
<i>M. alpina</i>	11.1±0.2	1264.8±33.6	0.0±0.0	3.1±0.1
MA- <i>oPpFADS17-1</i>	11.2±0.3	1174.8±19.7	105.6±13.7	3.3±0.1
MA- <i>oPpFADS17-2</i>	10.9±0.1	1094.4±26.1	195.2±14.5	3.2±0.1
MA- <i>oPpFADS17-3</i>	11.1±0.3	682.0±17.3	558.2±31.7	3.1±0.1
MA- <i>oPpFADS17-4</i>	11.6±0.1	326.8±11.4	1197.3±21.8	3.8±0.1
MA- <i>oPpFADS17-5</i>	11.1±0.1	682.5±17.7	819.4±13.4	3.5±0.1

表 6 高山被孢霉野生型菌株与五株基因工程菌株脂肪组成比较

菌株	各种脂肪酸含量(%TFA)						
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (n-6)	C20:4 (n-6)	C20:5
<i>M. alpina</i>	11.3±0.4	10.4±0.3	17.2±1.4	8.8±0.1	5.2±0.1	40.8±3.1	0±0
MA- <i>oPpFADS17-1</i>	12.6±0.4	11.4±0.4	16.7±0.5	9.1±0.1	5.4±0.1	35.6±2.3	3.2±0.1
MA- <i>oPpFADS17-2</i>	11.6±0.7	11.4±0.3	15.9±0.4	9.2±0.1	5.6±0.1	34.2±1.2	6.1±0.1
MA- <i>oPpFADS17-3</i>	12.9±0.8	11.7±0.6	16.2±0.1	9.6±0.3	5.1±0.1	22.0±1.1	18.0±1.0
MA- <i>oPpFADS17-4</i>	13.3±0.4	10.4±0.4	18.0±0.9	10.5±0.2	5.3±0.1	8.6±0.4	31.5±2.7
MA- <i>oPpFADS17-5</i>	11.5±0.5	10.9±0.4	16.3±0.9	9.5±0.1	5.2±0.1	19.5±2.0	23.4±1.0

结果表明，通过本发明的方法获得的过表达来自寄生疫霉菌的ω-3 脂肪酸脱饱和酶基因（*oPpFADS17m*）的重组高山被孢霉具有多次传代的遗传稳定性，且通过常温培养获得的产物中，其脂肪酸分析结果与野生型菌株无明显差别，所得菌株中 EPA 产量均有提高，其中菌株 MA-*oPpFADS17-4* 中 EPA 含量达到脂肪酸总量的 31.5%，相比于野生型菌株 EPA 产量显著提高，优于经过相同方法得到的其他重组菌株，也显著高于其他已知的过表达ω-3 脂肪酸脱饱和酶基因的重组高山被孢霉通过常温培养工艺得到的 EPA 产量。用此方法构建的基因工程菌株及构建方法为后续工业化奠定了理论及应用基础。

综上所述，通过本发明获得的ω-3 脂肪酸脱饱和酶既能催化 18C，又能催化 20C 的多不饱和脂肪酸，但偏好将 20C 的 ARA 转化为 EPA，且在常温下转化效率明显高于提高，此外合成ω-3 PUFAs 的效率进一步优于现有技术。用此基因构建基因工程菌株为后续工业化生产

EPA、DHA 奠定了应用基础。

虽然本发明专利已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明。任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种改动与修饰。因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权利要求书

1、如 SEQ ID NO. 3 的编码寄生疫霉 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的重组核酸序列。

2、含有权利要求 1 所述核酸的表达载体，其特征在于能够表达寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶。

3、根据权利要求 2 所述的 1 表达载体，其特征在于所述载体是 pYES2/NT C-*oPpFADS17*。

4、根据权利要求 3 所述的表达载体，其特征在于扩增目的基因的引物为：

oPpFADS17y F: ctaattgaattcATGGCAACCAAGCAAGC
oPpFADS17y R :
 cgattctcgagTTAAGTTGACTTGGTTTAAACAGCG 。

5、含有权利要求 2 或 3 所述表达载体的重组微生物，其特征在于所述重组微生物能够表达寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶。

6、根据权利要求 5 所述的重组微生物，其特征在于所述重组微生物是重组酿酒酵母菌。

7、权利要求 6 所述的重组酿酒酵母菌的构建方法，包括以下步骤：

(1) 根据酿酒酵母的密码子使用偏好性，对寄生疫霉的核酸序列进行密码子优化，人工合成如 SEQ ID NO. 3 的优化后的基因序列 *oPpFADS17y*，然后与 pUC57-simple 载体连接得重组质粒 pUC57-*oPpFADS17*，保存在大肠杆菌 Top10 中；

(2) 根据 *oPpFADS17y* 序列设计引物：

oPpFADS17y F: ctaattgaattcATGGCAACCAAGCAAGC
oPpFADS17y R :
 cgattctcgagTTAAGTTGACTTGGTTTAAACAGCG

以质粒 pUC57-*oPpFADS17* 为模板，PCR 扩增得到目的基因片段；

(3) 用限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 双酶切目的基因片段和载体 pYES2/NT C，酶切产物用 Thermo Scientific GeneJET gel extraction

kit 试剂盒进行胶回收后，存于-20℃待用；用 T4 连接酶连接纯化后的目的基因片段 *oPpFADS17y* 和载体 pYES2/NT C，4℃孵育 12 h，得到重组表达载体质粒 pYES2/NT C-*oPpFADS17*；

(4) 转化酿酒酵母 INVSc 1 得到重组酿酒酵母菌。

8、根据权利要求 7 所述的构建方法，其特征在于步骤 (2) 中 PCR 扩增的反应条件为：94℃ 30 s，55℃ 30 s，68℃ 1.5 min，30 个循环，68℃ 10 min，并对 PCR 产物进行纯化，纯化产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳验证。

9、如 SEQ ID NO. 4 的编码寄生疫霉 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的重组氨基酸序列。

10、权利要求 1 所述的脂肪酸脱饱和酶在多不饱和脂肪酸生物合成中的用途，其特征在于在常温下将 C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ 催化为 C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ ，催化效率达到 65%。

11、一株过表达来源于寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* 基因的重组高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) MA-*oPpFADS17*-4，该菌株于 2016 年 1 月 18 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，地址北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所，保藏编号为 CGMCC No. 11820。

12、根据权利要求 11 所述的重组高山被孢霉，其特征在于所述 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* 基因是根据高山被孢霉密码子使用偏好性优化的，来源于寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因，其核酸序列如 SEQ ID NO.5 所示。

13、根据权利要求 11 所述的重组高山被孢霉，其特征在于该菌株是用含有 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* 基因的重组质粒 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 转化根瘤土壤杆菌后，再以含转化质粒 pBIG2-ura5s-*oPpFADS17* 的根瘤土壤杆菌转化高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株构建而成的。

14、根据权利要求 13 所述的重组高山被孢霉，其特征在于所述高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株是一株使高山被孢霉 ATCC32222

基因组中编码乳清酸磷酸核糖转移酶 OPRase 的 *ura5* 基因失活的高山被孢霉菌株。

15、构建权利要求 11 所述的重组高山被孢霉菌株的方法，包括以下步骤：

- a) 根据天然的来源于寄生疫霉的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶序列，根据高山被孢霉密码子使用偏好性进行优化，人工合成优化后的 ω -3 脂肪酸脱饱和酶基因 *oPpFADS17m*，如 SEQ ID NO.5 所示；
- b) 构建重组质粒 pBIG2-*ura5s-oPpFADS17*；
- c) 用构建获得的重组质粒 pBIG2-*ura5s-oPpFADS17* 转化根瘤土壤杆菌；
- d) 用含重组质粒 pBIG2-*ura5s-oPpFADS17* 的根瘤土壤杆菌转化高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株；
- e) 筛选鉴定转化菌株，获得一株特别高产 EPA 的过表达 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* 基因的重组高山被孢霉菌株 MA-*oPpFADS17-4*。

16、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于所述步骤 c) 的根瘤土壤杆菌为根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) C58C1。

17、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于所述步骤 d) 的高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株是重组高山被孢霉 MAU1，该菌株于 2013 年 11 月 01 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC No. 8414。

18、根据权利要求 14 所述的构建重组高山被孢霉菌株的方法，其特征在于所述步骤 e) 中筛选鉴定转化菌株的方法包括以下步骤：

- 1) 用 3 mL 生理盐水冲刷 GY 表面，收集液体于一个无菌 1.5 mL 离心管中，过 25 μ m 滤膜；
- 2) 用血球计数器计数，调整为三种孢子浓度梯度 10^8 个每 100 μ L、 10^6 个每 100 μ L、 10^4 个每 100 μ L，各取 200 μ L 涂布于含有 100 μ g/mL 壮观霉素，100 μ g/mL 头孢噻肟的 GY-CS 平板上，25℃避光培养 2-3 d；

3)随时用无菌镊子挑出生长的真菌菌丝于含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 壮观霉素, 100 $\mu\text{g/mL}$ 头孢噻肟的 SC-CS 平板上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2-3 d;

4)观察高山被孢霉在平板上的生长情况, 挑出在 SC-CS 平板上生长的菌丝接种于 GY 斜面上;

5)将上述步骤 4) 中平板上的高山被孢霉菌株孢子在 GY 斜面上传代三次;

6)将稳定遗传的菌株鉴定为过表达 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* 基因的重组高山被孢霉菌株, 保藏于 GY 斜面上;

7)提取含有 ω -3 脂肪酸脱饱和酶 *oPpFADS17m* 基因的重组高山被孢霉菌株的基因组 DNA, 设计一对与启动子和终止子特异性结合的引物进行 PCR 验证:

P1(sense): CACACACAAACCTCTCTCCCACT

P2(antisense): CAAATGAACGTATCTTATCGAGATCC;

8)所述重组菌株保藏于 GY 斜面上。

19、权利要求 11-14 中任一项权利要求所述的重组高山被孢霉菌株 MA-*oPpFADS17-4* 或根据权利要求 5-8 中任一项权利要求所述的方法得到的重组高山被孢霉在生产脂肪酸中的用途。

20、权利要求 11-14 中任一项权利要求所述的重组高山被孢霉菌株 MA-*oPpFADS17-4* 或根据权利要求 15-19 中任一项权利要求所述的方法得到的重组高山被孢霉在生产 EPA 方面的用途。

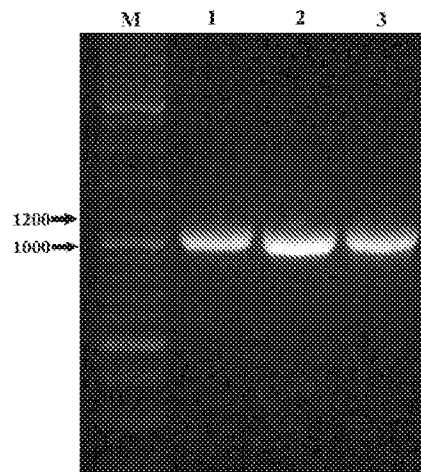


图 1

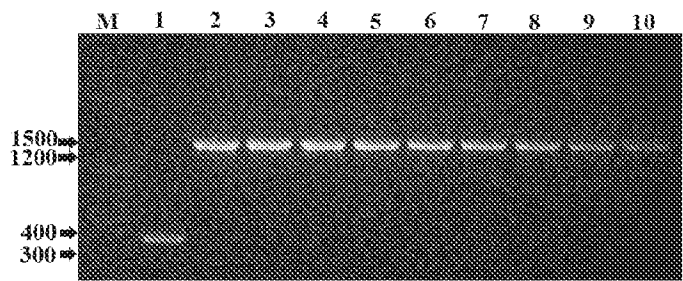


图 2

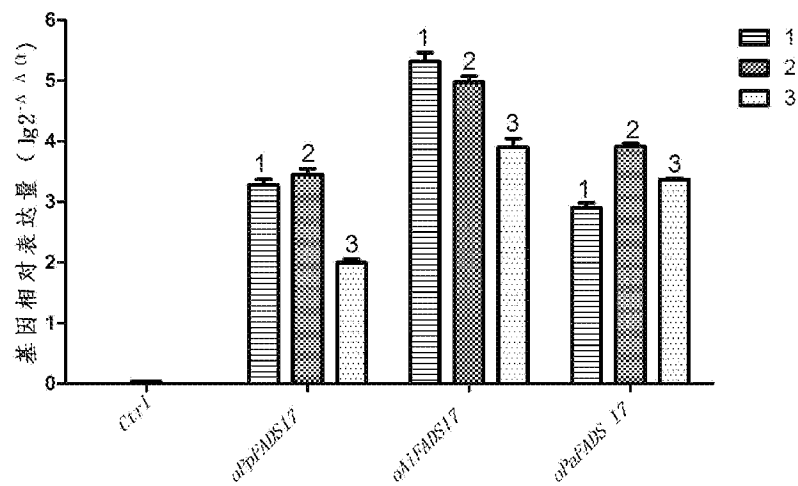
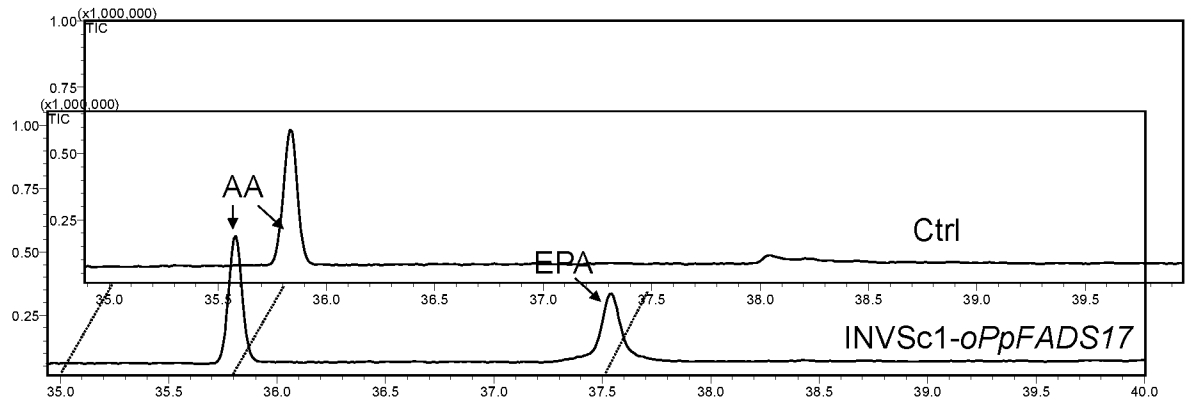
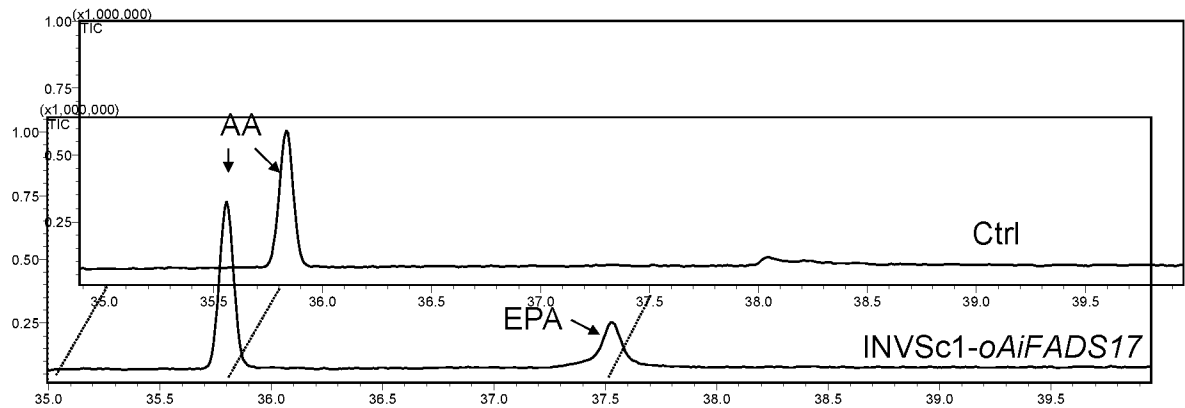


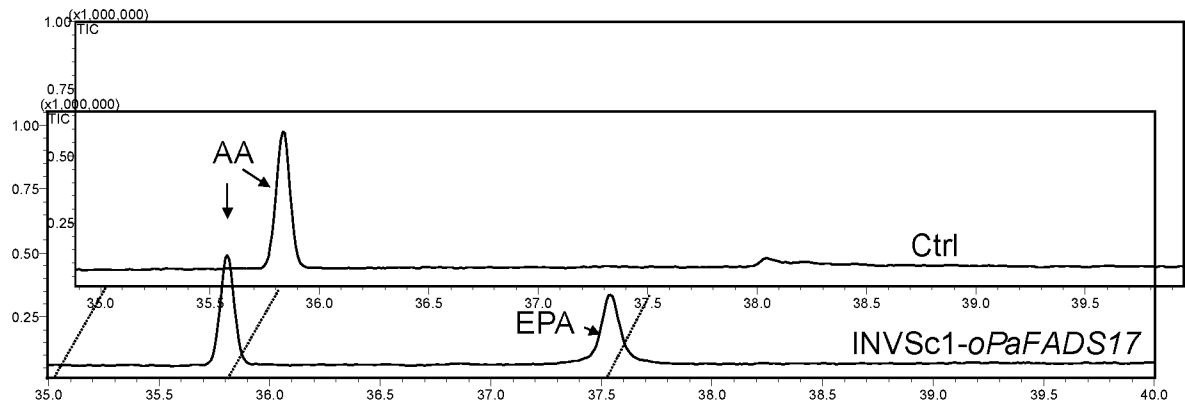
图 3



A



B



C

图 4

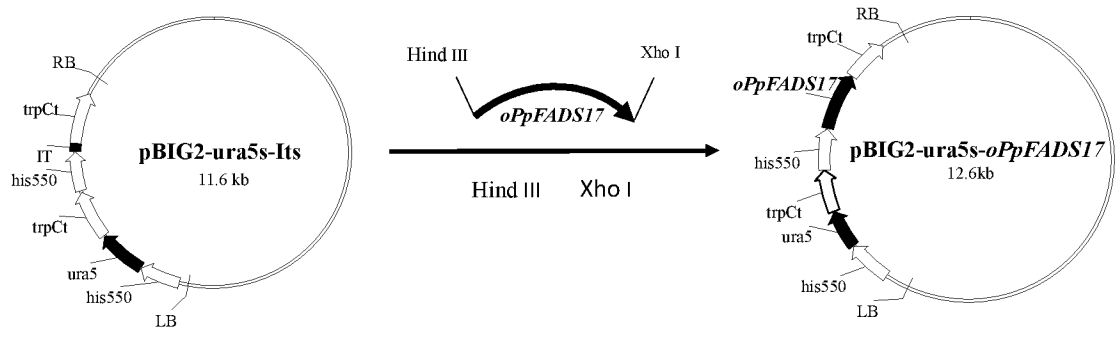


图 5

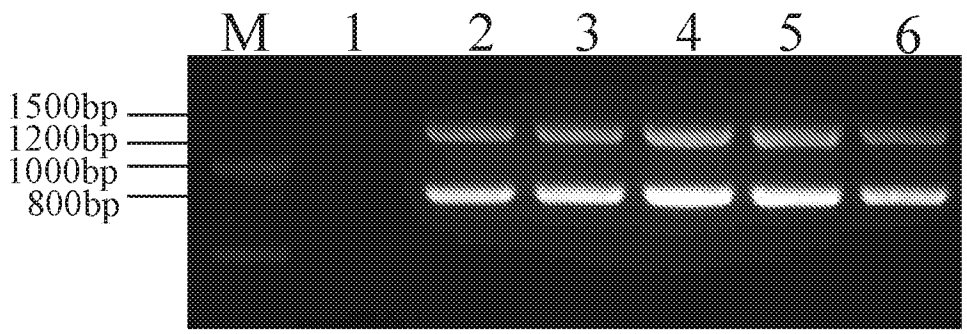


图 6

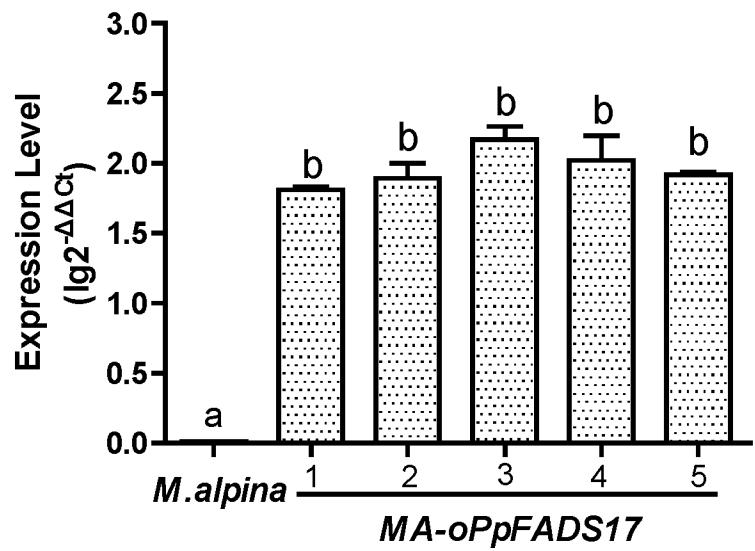


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/108983

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/53 (2006.01) i; C12N 15/81 (2006.01) i; C12N 1/19 (2006.01) i; C12N 9/02 (2006.01) i; C12P 7/64 (2006.01) i; C12R 1/865 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12P; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CPRSABS; CPEA; DWPI; SIPOABS; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; GENBANK; EMBL-EBI; CNKI; GOOGLE; PubMed; ISI Web of Knowledge; JIANGNAN UNIVERSITY; CHEN, Yongquan; CHEN, Wei; MEI, Tiantian; CHEN, Haiqin; GU, Zhennan; ZHANG, Hao; phytophthora, yeast, distiller's yeast, mortierella alpina, codon optimization, desaturase, phytophthora parasitica, omega³, ω³, delta17, Δ17

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105368851 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 02 March 2016 (02.03.2016), claims 1-10	1-10
PX	CN 105647822 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 08 June 2016 (08.06.2016), claims 1-10	11-20
Y	XUE, Zhixiong et al., "Identification and Characterization of New Δ-17 Fatty Acid Desaturases", APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL, volume 97, 27 May 2012 (27.05.2012), pages 1973-1985	1-20
Y	CN 101646766 A (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY), 10 February 2010 (10.02.2010), claims 1-7	1-20
Y	RUSS, C. et al., "Phytophthora Parasitica INRA-310 Hypothetical Protein mRNA", NCBI Reference Sequence: XM_008906963.1, 27 August 2014 (27.08.2014), the whole document	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 11 January 2017 (11.01.2017)	Date of mailing of the international search report 08 March 2017 (08.03.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, Ying Telephone No.: (86-10) 62413889

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/108983

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103820335 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 28 May 2014 (28.05.2014), claims 1-6	11-20
Y	CN 102776213 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 14 November 2012 (14.11.2012), claims 1-10	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/108983

Box No. **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☒ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/108983

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105368851 A	02 March 2016	None	
CN 105647822 A	08 June 2016	None	
CN 101646766 A	10 February 2010	EP 2010648 B1	25 January 2012
		AU 2007240741 B2	31 January 2013
		DK 2010648 T3	21 May 2012
		AT 542892 T	15 February 2012
		JP 2009534032 A	24 September 2009
		US 2007249026 A1	25 October 2007
		WO 2007123999 A2	01 November 2007
		MX 2008013306 A	27 October 2008
		WO 2007123999 A3	24 April 2008
		US 7465793 B2	16 December 2008
		EP 2010648 A2	07 January 2009
		CN 101646766 B	27 March 2013
		AU 2007240741 A1	01 November 2007
CN 103820335 A	28 May 2014	None	
CN 102776213 A	14 November 2012	CN 102776213 B	30 July 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/108983

A. 主题的分类

C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 9/02(2006.01)i; C12P 7/64(2006.01)i; C12R 1/865(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C12P; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS; CPRSABS; CPEA; DWPI; SIPOABS; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; GENBANK; EMBL-EBI; CNKI; GOOGLE; PubMed; ISI Web of Knowledge; 江南大学, 陈永泉, 陈卫, 梅甜甜, 陈海琴, 顾震南, 张灏, 寄生疫霉, 疫霉, 去饱和酶, 脱饱和酶, 酵母, 酿酒酵母, 高山被孢霉, 密码子优化, desaturase, phytophthora parasitica, omega³, ω³, delta 17, Δ17

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 105368851 A (江南大学) 2016年 3月 2日 (2016 - 03 - 02) 权利要求1-10	1-10
PX	CN 105647822 A (江南大学) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 权利要求1-10	11-20
Y	XUE, Zhixiong等. "Identification and characterization of new Δ-17 fatty acid desaturases" Appl. Microbiol. Biotechnol., 第97卷, 2012年 5月 27日 (2012 - 05 - 27), 第1973-1985页	1-20
Y	CN 101646766 A (纳幕尔杜邦公司) 2010年 2月 10日 (2010 - 02 - 10) 权利要求1-7	1-20
Y	RUSS, C. 等. "Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein mRNA" NCBI Reference Sequence: XM_008906963.1, 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27), 全文	1-20

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 1月 11日

国际检索报告邮寄日期

2017年 3月 8日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10) 62019451

受权官员

陈莹

电话号码 (86-10) 62413889

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 103820335 A (江南大学) 2014年 5月 28日 (2014 - 05 - 28) 权利要求1-6	11-20
Y	CN 102776213 A (江南大学) 2012年 11月 14日 (2012 - 11 - 14) 权利要求1-10	1-20

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☐ 含在申请提交时的国际申请中
- ☐ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☒ 为检索之用随后提交本单位
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/108983

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105368851	A	2016年 3月 2日	无			
CN	105647822	A	2016年 6月 8日	无			
CN	101646766	A	2010年 2月 10日	EP	2010648	B1	2012年 1月 25日
				AU	2007240741	B2	2013年 1月 31日
				DK	2010648	T3	2012年 5月 21日
				AT	542892	T	2012年 2月 15日
				JP	2009534032	A	2009年 9月 24日
				US	2007249026	A1	2007年 10月 25日
				WO	2007123999	A2	2007年 11月 1日
				MX	2008013306	A	2008年 10月 27日
				WO	2007123999	A3	2008年 4月 24日
				US	7465793	B2	2008年 12月 16日
				EP	2010648	A2	2009年 1月 7日
				CN	101646766	B	2013年 3月 27日
				AU	2007240741	A1	2007年 11月 1日
CN	103820335	A	2014年 5月 28日	无			
CN	102776213	A	2012年 11月 14日	CN	102776213	B	2014年 7月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)