

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580045910.0

C12P 7/64 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C12N 1/18 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 5 月 20 日

[11] 公开号 CN 101437952A

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200580045910.0

[30] 优先权

[32] 2004.11. 4 [33] US [31] 60/624,812

[86] 国际申请 PCT/US2005/040306 2005.11.3

[87] 国际公布 WO2006/055322 英 2006.5.26

〔85〕 进入国家阶段日期 2007.7.4

[71] 申请人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州

[72] 发明人 H·G·达穆德 P·J·吉利斯

D · J · 马库尔

S · K · 皮卡塔吉奥

D · M · W · 波拉克

J·J·拉希安蒂 薛志雄

N · S · 亚达夫 张宏祥 朱 群

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李 波 黄可峻

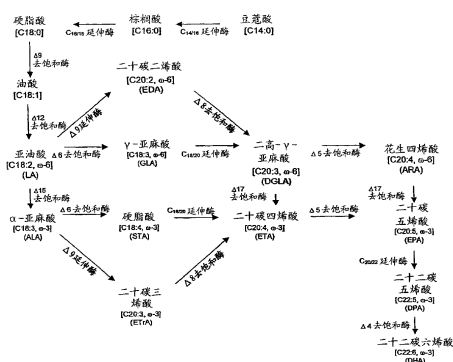
权利要求书 5 页 说明书 187 页 附图 35 页
序列表 (电子公布)

[54] 发明名称

解脂耶氏酵母的高花生四烯酸生产菌株

[57] 摘要

描述了能够生产占总油级分的 10% 以上的花生四烯酸(ARA, 一种 ω -6 多不饱和脂肪酸)的含油酵母解脂耶氏酵母的工程化菌株。这些菌株包含多种表达异源去饱和酶、延伸酶和酰基转移酶的嵌合基因, 任选包含多种天然去饱和酶和酰基转移酶敲除, 从而能够合成和高度积累 ARA。要求保护生产宿主细胞和在所述宿主细胞中生产 ARA 的方法。



1. 用于生产花生四烯酸的重组生产宿主细胞，包括背景耶氏酵母种，其中包含基因集合，所述集合包含 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径的以下基因：

- a) 至少一种编码 Δ 6 去饱和酶的基因；
- b) 至少一种编码 $C_{18/20}$ 延伸酶的基因；和
- c) 至少一种编码 Δ 5 去饱和酶的基因。

2. 用于生产花生四烯酸的重组生产宿主细胞，包括背景耶氏酵母种，其中包含基因集合，所述集合包含 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径的以下基因：

- a) 至少一种编码 Δ 9 延伸酶的基因；
- b) 至少一种编码 Δ 8 去饱和酶的基因；和
- c) 至少一种编码 Δ 5 去饱和酶的基因。

3. 权利要求 1 或 2 的重组生产宿主，其中该基因集合任选包含至少一种编码 Δ 12 去饱和酶的基因。

4. 权利要求 3 的重组生产宿主，其中该背景耶氏酵母种不含任何编码具有 Δ 12 去饱和酶活性的多肽的天然基因。

5. 权利要求 1 或 2 的重组生产宿主，其中所述 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径基因的至少一种基因处于具有选自 SEQ ID NOs: 158-168 和 364 的核酸序列的启动子序列的控制下。

6. 权利要求 3 的重组生产宿主，其中所述 Δ 12 去饱和酶具有选自 SEQ ID NOs: 24、26、28、30、31、32、34、36、38、358、359、361、362 和 363 的氨基酸序列。

7. 权利要求 1 的重组生产宿主细胞，其中所述 Δ 6 去饱和酶具有选自 SEQ ID NOs: 2 和 5 的氨基酸序列；并且其中所述 $C_{18/20}$ 延伸酶具有选自 SEQ ID NOs: 18 和 21 的氨基酸序列。

8. 权利要求 2 的重组生产宿主细胞，其中所述 Δ 9 延伸酶具有选自 SEQ ID NOs: 40 和 18 的氨基酸序列，并且其中所述 Δ 8 去饱和酶具有选自 SEQ ID NOs: 45、47 和 49 的氨基酸序列。

9. 权利要求 1 或 2 的重组生产宿主细胞，其中所述 Δ 5 去饱和酶具有选自 SEQ ID NOs: 7、9 和 12 的氨基酸序列。

10. 权利要求 1 或 2 的重组生产宿主，其中该基因集合任选包含

选自下组的 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径基因:

- a) 至少一种编码 $\Delta 9$ 去饱和酶的基因;
- b) 至少一种编码 $C_{16/18}$ 延伸酶的基因; 和
- c) 至少一种编码 $C_{14/16}$ 延伸酶的基因。

11. 权利要求 10 的重组生产宿主, 其中所述 $C_{16/18}$ 延伸酶具有选自 SEQ ID NOs: 51、54 和 62 的氨基酸序列, 并且其中所述 $C_{14/16}$ 延伸酶具有 SEQ ID NO: 65 所示的氨基酸序列。

12. 权利要求 1 或 2 的重组生产宿主, 其中该基因集合任选包含至少一种编码选自下组的酰基转移酶的基因:

- (1) 二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT1);
- (2) 二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT2);
- (3) 磷脂: 二酰基甘油酰基转移酶 (PDAT);
- (4) 酰基-CoA: 1-酰基溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 (LPCAT);
- (5) 甘油-3-磷酸酰基转移酶 (GPAT); 和
- (6) 溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAAT)。

13. 权利要求 12 的重组生产宿主, 其中所述二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT1) 具有选自 SEQ ID NOs: 82 和 84-88 的氨基酸序列; 其中所述二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT2) 具有选自 SEQ ID NOs: 90、92、94 和 96 的氨基酸序列; 其中所述磷脂: 二酰基甘油酰基转移酶 (PDAT) 具有 SEQ ID NO: 77 所示的氨基酸序列; 其中所述甘油-3-磷酸酰基转移酶 (GPAT) 具有 SEQ ID NO: 98 所示的氨基酸序列; 其中所述溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAAT) 具有选自 SEQ ID NOs: 68、70、72 和 75 的氨基酸序列; 并且其中所述酰基-CoA: 1-酰基溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 (LPCAT) 具有 SEQ ID NO: 80 所示的氨基酸序列。

14. 用于生产花生四烯酸的重组生产宿主细胞, 包括背景耶氏酵母种, 其中包含基因集合, 所述集合包含 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径的以下基因:

- a) 至少一种编码 $\Delta 6$ 去饱和酶的基因;
- b) 至少一种编码 $C_{18/20}$ 延伸酶的基因;
- c) 至少一种编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因;
- d) 至少一种编码 $\Delta 17$ 去饱和酶的基因; 和

e) 至少一种编码 $\Delta 12$ 去饱和酶的基因; 并且

其中所述背景耶氏酵母种不含任何编码苹果酸异丙酯脱氢酶 (Leu2-) 的天然基因。

15. 用于生产花生四烯酸的重组生产宿主细胞, 包括背景耶氏酵母种, 其中包含基因集合, 所述集合包含 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径的以下基因:

f) 至少一种编码 $\Delta 9$ 延伸酶的基因;

g) 至少一种编码 $\Delta 8$ 去饱和酶的基因;

h) 至少一种编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因;

i) 至少一种编码 $\Delta 12$ 去饱和酶的基因; 和

j) 至少一种编码 $C_{16/18}$ 延伸酶的基因; 并且

其中所述背景耶氏酵母种不含任何编码酵母氨酸脱氢酶 (Lys5-) 的天然基因。

16. 用于生产花生四烯酸的重组生产宿主细胞, 包括背景耶氏酵母种, 其中包含基因集合, 所述集合包含 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径的以下基因:

a) 至少一组基因, 选自:

(1) 至少一种编码 $\Delta 6$ 去饱和酶的基因; 至少一种编码 $C_{18/20}$ 延伸酶的基因; 和至少一种编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因;

(2) 至少一种编码 $\Delta 9$ 延伸酶的基因; 至少一种编码 $\Delta 8$ 去饱和酶的基因; 和至少一种编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因;

b) 至少一种编码选自下组的酶的基因:

(1) $\Delta 12$ 去饱和酶;

(2) $\Delta 9$ 去饱和酶;

(3) $C_{14/16}$ 延伸酶;

(4) $C_{16/18}$ 延伸酶; 和

c) 至少一种编码选自下组的酶的基因:

(i) 选自 DGAT1、DGAT2 和 PDAT 的二酰基甘油酰基转移酶;

(ii) 酰基-CoA: 1-酰基溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 (LPCAT);

(iii) 甘油-3-磷酸酰基转移酶 (GPAT);

(iv) 溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAAT);

(v) 磷脂酶 C; 和

(vi) 磷脂酶 A₂;

其中:

(1) 该背景耶氏酵母种不含任何编码具有 $\Delta 12$ 去饱和酶活性的多肽的天然基因,

(2) 该背景耶氏酵母种不含任何编码选自脂肪酶 1 (Lip1-)、过氧化物酶体酰基 CoA 氧化酶 ACO3 (Pox3-)、酰基-CoA 氧化酶 2 (Pox2-)、乳清苷-5'-磷酸脱羧酶 (Ura3-)、酵母氨酸脱氢酶 (Lys5-)、脂肪酶 2 (Lip2-) 和苹果酸异丙酯脱氢酶 (Leu2-) 的酶的天然基因。

17. 权利要求 1 或 2 的重组生产宿主, 其中该宿主生产的微生物油包含占总脂肪酸的至少约 5% 的花生四烯酸。

18. 权利要求 1 或 2 的重组生产宿主, 其中该宿主生产包含花生四烯酸的微生物油, 并且该微生物油不含任何 γ -亚油酸。

19. 生产包含花生四烯酸的微生物油的方法, 包括:

a) 培养权利要求 1 或 2 的宿主, 所述宿主中生产包含花生四烯酸的微生物油; 和

b) 任选回收步骤 (a) 的微生物油。

20. 由权利要求 19 的方法生产的微生物油。

21. 权利要求 20 的微生物油, 其中所述油含有至少约 5% 的花生四烯酸。

22. 权利要求 20 的混合油, 其中所述油包含选自亚油酸、 γ -亚麻酸、二十碳二烯酸、二高- γ -亚油酸、花生四烯酸、 α -亚麻酸、十八碳四烯酸、二十碳三烯酸、二十碳四烯酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸的脂肪酸。

23. 包含有效量的由权利要求 19 的方法生产的微生物油的食物。

24. 权利要求 23 的食物, 选自食物类似物、肉类产品、谷物产品、烘烤食品、快餐和乳制品。

25. 选自医学食品、饮食补充物、婴儿配方和药品的产品, 包含有效量的由权利要求 19 的方法生产的微生物油。

26. 包含有效量的由权利要求 19 的方法生产的微生物油的动物饲料。

27. 权利要求 26 的动物饲料, 其中所述动物饲料选自宠物饲料、反刍动物饲料、禽类动物饲料和水产养殖饲料。

28. 包含有效量的微生物油并且任选包含酵母生物物质的动物饲料，包含权利要求 1 或 2 的重组宿主。

29. 权利要求 28 的动物饲料，其中该酵母生物物质包括选自蛋白、脂质、碳水化合物、维生素、矿物质和核酸的饲料营养物质。

30. 制备补加了花生四烯酸的食品的方法，包括将权利要求 19 的方法生产的微生物油与食品组合。

31. 制备选自医学食品、饮食补充物、婴儿配方和药品的产品的方法，其中该产品补充了花生四烯酸，该方法包括将权利要求 19 的方法生产的微生物油与该产品组合。

32. 制备补充了花生四烯酸的动物饲料的方法，包括将权利要求 19 的方法生产的微生物油与动物饲料组合。

33. 给包含花生四烯酸的动物饲料补充饲料营养物质的方法，包括将权利要求 26 的动物饲料与包含饲料营养物质的酵母生物物质组合。

34. 权利要求 33 的方法，其中该饲料营养物质选自蛋白、脂质、碳水化合物、维生素、矿物质和核酸。

35. 提供富含花生四烯酸的人、动物或水产养殖生物饮食补充物的方法，包括提供权利要求 19 的方法生产的含有花生四烯酸的微生物油，该微生物油是可被人或动物消耗或使用的形式。

36. 用于生产花生四烯酸的重组生产宿主解脂耶氏酵母 Y2047，ATCC 保藏号为 ATCC_____。

解脂耶氏酵母的高花生四烯酸生产菌株

本申请要求 2004 年 11 月 4 日提交的美国临时申请 No. 60/624812 的优先权。

发明领域

本发明涉及生物技术领域。更具体地，本发明涉及含油酵母解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 的工程化菌株，它能够以高浓度有效生产花生四烯酸 (一种 ω -6 多不饱和脂肪酸)。

发明背景

花生四烯酸 (ARA; 顺式-5,8,11,14-二十碳四烯酸; ω -6) 是生产类二十烷酸 (如前列腺素、血栓烷、前列环素和 leukot) 的重要前体。此外, ARA 被认为是: (1) 一种必须的长链多不饱和脂肪酸 (PUFA); (2) 人脑中的主要 ω -6 脂肪酸; (3) 母乳和很多婴儿配方中的重要成分, 这是基于它在早期神经和视觉发育中的作用。尽管成人很容易从食物, 如肉类、蛋和乳中获得 ARA (并且也可以从饮食亚麻酸 (LA) 低效合成 ARA), 但 ARA 油的商业来源典型地由天然植物来源 (如被孢霉 (丝状真菌) 属、虫霉属、腐霉属和 *Porphyridium* (红藻) 的微生物) 生产。最值得注意的是, Martek Biosciences Corporation (Columbia, MD) 生产一种含 ARA 的真菌油 (ARASCO®; U.S. 5,658,767), 其基本不含 EPA, 并且来源于高山被孢霉或 *Pythium insidiosum*。这种油的主要市场之一是婴儿配方; 例如, 含有 Martek 公司的 ARA 油的配方目前在世界范围内的 60 多个国家可以获得。

尽管可以从例如上文描述的天然微生物来源获得 ARA, 预计用重组方法通过微生物生产 ARA 相对于从天然微生物来源生产具有一些优点。例如, 可以使用具有用于生产油的优选特征的重组微生物, 因为通过在宿主中导入新的生物合成途径和/或通过阻抑不需要的途径, 可以改变宿主的天然存在的微生物脂肪酸谱, 从而导致需要的 PUFAs (或其共轭形式) 的生产水平增加和不需要的 PUFAs 的生产减少。其次, 重组微生物可以提供特定形式的 PUFAs, 其可能具有特

定用途。最后，可以通过控制培养条件操作微生物油生产，特别是通过提供微生物表达的酶的特定底物来源，或通过加入化合物/基因工程，以阻抑不需要的生物化学途径。因此，例如，可以改变如此产生的 ω -3 与 ω -6 脂肪酸的比例，或工程生产特定 PUFA（如 ARA），而不显著积累其它 PUFA 下游或上游产物。后一种可能性在本发明的某些实施方案中特别感兴趣，其中需要含有高浓度 ARA 的微生物油的重组来源，该微生物油额外地缺乏 γ -亚麻酸（GLA； γ -亚麻酸；顺式-6,9,12-十八碳三烯酸； ω -6）。

GLA 是从 LA 生物合成具有生物活性的前列腺素的重要中间体。尽管 GLA 也被认为是具有显著临床、生理和药物价值的必需 ω -6 PUFA，存在一些应用，其中 GLA 与 ARA 起相反作用。因此，商业生产包含 ARA 并且不含 GLA 的油将在某些应用中有用。

大多数微生物生产的 ARA 是通过 Δ 6 去饱和酶/ Δ 6 延伸酶途径（其主要存在于藻类、苔藓、真菌、线虫和人类）合成的，并且其中 1.) 通过 Δ 12 去饱和酶的作用，油酸转化为 LA；2.) 通过 Δ 6 去饱和酶的作用，LA 转化为 GLA；3.) 通过 C_{18/20} 延伸酶的作用，GLA 转化为 DGLA；和 4.) 通过 Δ 5 去饱和酶的作用，DGLA 转化为 ARA（图 1）。但是，在一些生物，如类眼虫鞭毛藻物种中，具有用于合成 EPA 的替代的 Δ 9 延伸酶/ Δ 8 去饱和酶途径，它是形成 C₂₀ PUFAs 的主要途径（Wallis, J. G., and Browse, J. Arch. Biochem. Biophys. 365: 307-316 (1999)；WO 00/34439；和 Qi, B. et al. FEBS Letters. 510: 159-165 (2002)）。在此途径中，通过 Δ 9 延伸酶，LA 转化为 EDA，通过 Δ 8 去饱和酶，EDA 转化为 DGLA，DGLA 最终转化为 ARA。

尽管目前已经从多种生物鉴定和表征了编码 Δ 6 去饱和酶/ Δ 6 延伸酶和 Δ 9 延伸酶/ Δ 8 去饱和酶途径的基因，并且其中的一些已经与其它 PUFA 去饱和酶和延伸酶一起异源表达，但这两种途径都还没有导入微生物，如酵母，并且通过复杂代谢工程进行操作，使得能够商业生产商业量的 EPA（即大于总脂肪酸的 10%）。此外，关于这些工程化的宿主生物的最合适的选择，还存在显著的分歧。

最近，Picataggio et al. (WO 2004/101757 和共同未决的美国专利 No.60/624812) 开发了含油酵母，特别是解脂耶氏酵母（以前分类为解脂假丝酵母）作为用于生产 PUFAs 如 ARA 和 EPA 的微生物的优

选类型的用途。含油酵母定义为天然能够合成并积累油的酵母，其中油的积累可以是细胞干重的最多大约 80%。尽管这些生物中 ω -6 和 ω -3 脂肪酸的生产存在天然缺陷（由于天然生产的 PUFAs 限于 18:2 脂肪酸（较不常见是 18:3 脂肪酸）），Picataggio 等人（上文）用相对简单的基因工程方法证明了在解脂耶氏酵母中生产了 1.3% ARA 和 1.9% EPA（占总脂肪酸的比例）。但是，还没有实施更复杂的代谢工程化以便能够在这种特定宿主生物中进行 ARA 的经济的商业化生产。

申请人通过采用 Δ 6 去饱和酶/ Δ 6 延伸酶途径或 Δ 9 延伸酶/ Δ 8 去饱和酶途径，通过对能够生产总油级分的 10-14%的 ARA 的解脂耶氏酵母菌株的工程化菌株解决了指出的问题（从而生产含有 25-29% GLA 的 10-11% ARA 油或不含 GLA 的 10-11% ARA 油）。提供了其它代谢工程化和发酵方法，以便进一步增强这些含油酵母中的 ARA 生产。

发明概述

本发明涉及具有用于生产花生四烯酸的酶途径的耶氏酵母属的重组生产宿主。

因此，本发明提供了用于生产花生四烯酸的重组生产宿主细胞，包括背景耶氏酵母种，其中包含基因集合，所述集合包含 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径的以下基因：

- a) 至少一种编码 Δ 6 去饱和酶的基因；
- b) 至少一种编码 $C_{18/20}$ 延伸酶的基因；和
- c) 至少一种编码 Δ 5 去饱和酶的基因；

其中所述 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径基因中的至少一种基因是超量表达的。

在本发明的另一种实施方案中，本发明提供了用于生产花生四烯酸的重组生产宿主细胞，包括背景耶氏酵母种，其中包含基因集合，所述集合包含 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径的以下基因：

- a) 至少一种编码 Δ 9 延伸酶的基因；
- b) 至少一种编码 Δ 8 去饱和酶的基因；和
- c) 至少一种编码 Δ 5 去饱和酶的基因；

其中所述 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径基因中的至少一种基因是

超量表达的。

在特定实施方案中，本发明的重组生产宿主还包含额外的途径成分，包括但不限于：至少一种编码 $\Delta 12$ 去饱和酶的基因；至少一种编码 $\Delta 9$ 去饱和酶的基因；至少一种编码 $C_{16/18}$ 延伸酶的基因；至少一种编码 $C_{14/16}$ 延伸酶的基因；和至少一种编码酰基转移酶的基因。

在一种特定的实施方案中，本发明提供了用于生产花生四烯酸的重组生产宿主细胞，包括背景耶氏酵母种，其中包含基因集合，所述集合包含 ω -3/ ω -6脂肪酸生物合成途径的以下基因：

- a) 至少一种编码 $\Delta 6$ 去饱和酶的基因；和
- b) 至少一种编码 $C_{18/20}$ 延伸酶的基因；和
- c) 至少一种编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因；和
- d) 至少一种编码 $\Delta 12$ 去饱和酶的基因；

其中该背景耶氏酵母种不含任何编码苹果酸异丙酯脱氢酶 (Leu2-) 的天然基因；并且

其中所述 ω -3/ ω -6脂肪酸生物合成途径基因中的至少一种基因是超量表达的。

在另一种特定的实施方案中，本发明提供了用于生产花生四烯酸的重组生产宿主细胞，包括背景耶氏酵母种，其中包含基因集合，所述集合包含 ω -3/ ω -6脂肪酸生物合成途径的以下基因：

- a) 至少一种编码 $\Delta 9$ 延伸酶的基因；和
- b) 至少一种编码 $\Delta 8$ 去饱和酶的基因；和
- c) 至少一种编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因；和
- d) 至少一种编码 $\Delta 12$ 去饱和酶的基因；和
- e) 至少一种编码 $C_{16/18}$ 延伸酶的基因；

其中该背景耶氏酵母种不含任何编码酵母氨酸脱氢酶 (Lys5-) 的天然基因；并且

其中所述 ω -3/ ω -6脂肪酸生物合成途径基因中的至少一种基因是超量表达的。

在另一种实施方案中，本发明提供了生产包含花生四烯酸的微生物油的方法，包括：

- a) 培养权利要求 1 或 2 的生产宿主，其中生产了包含花生四烯酸的微生物油；和

b) 任选回收步骤 (a) 的微生物油。

在另一种实施方案中, 本发明提供了食品, 其中包含有效量的通过本发明的方法生产的微生物油。

在另一种实施方案中, 本发明提供了选自下组的产品: 医学食物、营养补充物、婴儿配方和药物, 其中包含有效量的通过本发明的方法生产的微生物油。

在另一种实施方案中, 本发明提供了动物饲料, 其中包含有效量的通过本发明的方法生产的微生物油。

本发明还提供了提供制备补充了花生四烯酸的产品、食品或饲料的方法, 包括将本发明的方法生产的微生物油与产品、食品或饲料混合。

在另一种实施方案中, 本发明提供了提供富含花生四烯酸 (ARA) 的人、动物或水产养殖生物饮食补充物的方法, 包括提供通过本发明的方法生产的含花生四烯酸的微生物油, 该微生物油是可被人或动物消耗或使用的形式。

生物保藏

以下生物材料保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, 具有以下名称、保藏号和保藏日。

生物材料	保藏号	保藏日
质粒 pY89-5	ATCC PTA-6048	2004 年 6 月 4 日
解脂耶氏酵母 Y2047	ATCC PTA-____	

附图简述和序列说明

图 1 表示 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径。

图 2 是含油酵母中脂质积累的生化机理的示意图。

图 3 是描述多种酰基转移酶在含油酵母中的脂质积累中的作用的示意图。

图 4 描绘了产生总脂质级分中的多种脂肪酸 (包括 ARA) 的本发明的一些解脂耶氏酵母菌株的开发图。

图 5A 提供了 pY5-30 的质粒图。图 5B 说明了通过组化染色确定

的解脂耶氏酵母 ATCC #76982 菌株中 TEF、GPD、GPM、FBA 和 FBAIN 的相对启动子活性。图 5C 说明了通过组化染色确定的、多种培养基中生长的解脂耶氏酵母中 YAT1、TEF、GPAT 和 FBAIN 的相对启动子活性。

图 6A 是比较解脂耶氏酵母 ATCC #76982 菌株中 GPD、GPM、FBA 和 FBAIN 的启动子活性的图，所述活性是荧光分析确定的。图 6B 图示概括了实时 PCR 相对定量的结果，其中将解脂耶氏酵母 ATCC #76982 菌株（即表达 GPD::GUS、GPDIN::GUS、FBA::GUS 或 FBAIN::GUS 嵌合基因）中的 GUS mRNA 定量到表达 pY5-30（即嵌合 TEF::GUS 基因）的解脂耶氏酵母菌株的 mRNA 水平。

图 7 提供了以下质粒的质粒图：（A）pY57.Y1.AHAS.w497l；（B）pKUNF12T6E；（C）pDMW232；和（D）pDMW271。

图 8 提供了以下质粒的质粒图：（A）pKUNT2；（B）pZUF17；（C）pDMW237；（D）pDMW240；和（E）酵母表达载体 pY89-5。

图 9 显示了纤细眼虫细胞提取物的脂质谱的色谱图。

图 10 显示了多种纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶多肽序列的比对。采用的比对方法相应于“Clustal V 比对法”。

图 11 提供了以下质粒的质粒图：（A）pKUNFmKF2；（B）pDMW277；（C）pZF5T-PPC；（D）pDMW287F；和（E）pDMW297。

图 12 提供了以下质粒的质粒图：（A）pZP2C16M899；（B）pDMW314；（C）pDM322；和（D）pZKL5598。

图 13 提供了以下质粒的质粒图：（A）pZP3L37；（B）pY37/F15；（C）pKO2UF2PE；和（D）pZKUT16。

图 14 提供了以下质粒的质粒图：（A）pKO2UM25E；（B）pZKUGPI5S；（C）pDMW302T16；和（D）pZKUGPE1S。

图 15 提供了以下质粒的质粒图：（A）pKO2UM26E；（B）pZUF-Mod-1；（C）pMDAGAT1-17；和（D）pMGPAT-17。

图 16 图示了 SEQ ID NOs: 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 和 107 之间的关系，其中的每一个序列都与高山被孢霉中的甘油-3-磷酸 o-酰基转移酶（GPAT）相关。

图 17 图示了 SEQ ID NOs: 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 和 60 之间的关系，其中的每一个序列都与高山被孢霉中的 $C_{16/18}$ 脂肪酸延

伸酶 (ELO3) 相关。

图 18 提供了以下质粒的质粒图：(A) pZUF6S；(B) pZUF6S-E3WT；(C) pZKUGPYE1-N；和 (D) pZKUGPYE2。

图 19 提供了以下质粒的质粒图：(A) pZKUGPYE1；(B) pZUF6FYE1；(C) pZP2I7+Ura；(D) pY20；和 (E) pLV13。

通过以下的详细说明和所附的序列说明能够更全面地理解本发明，这些内容构成了本发明的一部分。

以下序列符合 37 C. F. R. §1.821-1.825 的规定(“Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures-the Sequence Rules”)，并且，符合世界知识产权组织 (WIPO) 标准 ST. 25 (1998) 以及 EPO 和 PCT 的序列表要求 (Rules 5.2 and 49.5 (a-bis), and Section 208 and Annex C of the Administrative Instructions)。用于核苷酸和氨基酸序列数据的符号和格式符合 37 C. F. R. §1.822 的规定。

SEQ ID NOs: 1-112, 158-168, 209, 252, 255 和 357-364 是编码表 1 中所列的启动子、基因或蛋白 (或其片段) 的 ORFs。

表 1

基因和蛋白序列号的概括

说明	核酸 SEQ ID NO.	蛋白 SEQ ID NO.
高山被孢霉 $\Delta 6$ 去饱和酶	1 (1374 bp)	2 (457 AA)
合成的 $\Delta 6$ 去饱和酶，来源于高山被孢霉，为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化	3 (1374 bp)	2 (457 AA)
高山被孢霉 $\Delta 6$ 去饱和酶 “B”	4 (1521 bp)	5 (458 AA)
高山被孢霉 $\Delta 5$ 去饱和酶	6 (1341 bp)	7 (446 AA)
球等鞭金藻 (<i>isochrysis galbana</i>) $\Delta 5$ 去饱和酶	8 (1329 bp)	9 (442 AA)
合成的 $\Delta 5$ 去饱和酶，来源于球等鞭金藻，为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化	10 (1329 bp)	9 (442 AA)
人 $\Delta 5$ 去饱和酶	11 (1335 bp)	12 (444 AA)

合成的 $\Delta 5$ 去饱和酶, 来源于人, 为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化	13 (1335 bp)	12 (444 AA)
异丝水霉 $\Delta 17$ 去饱和酶	14 (1077 bp)	15 (358 AA)
合成的 $\Delta 17$ 去饱和酶基因, 来源于异丝水霉, 为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化	16 (1077 bp)	15 (358 AA)
高山被孢霉 $C_{18/20}$ 延伸酶	17 (957 bp)	18 (318 AA)
合成的 $C_{18/20}$ 延伸酶基因, 来源于高山被孢霉, 为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化	19 (957 bp)	18 (318 AA)
金黄色破囊壶菌 $C_{18/20}$ 延伸酶	20 (819 bp)	21 (272 AA)
合成的 $C_{18/20}$ 延伸酶基因, 来源于金黄色破囊壶菌, 为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化	22 (819 bp)	21 (272 AA)
解脂耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶	23 (1936 bp)	24 (419 AA)
深黄被孢霉 $\Delta 12$ 去饱和酶	25 (1203 bp)	26 (400 AA)
串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶	27 (1434 bp)	28 (477 AA)
构巢曲霉 $\Delta 12$ 去饱和酶	29 (1416 bp)	30 (471 AA)
黄曲霉 $\Delta 12$ 去饱和酶	--	31 (466 AA)
烟曲霉 $\Delta 12$ 去饱和酶	--	32 (424 AA)
Magnaporthe grisea $\Delta 12$ 去饱和酶	33 (1656 bp)	34 (551 AA)
粗糙链孢霉 $\Delta 12$ 去饱和酶	35 (1446 bp)	36 (481 AA)
禾谷镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶	37 (1371 bp)	38 (456 AA)
高山被孢霉 $\Delta 12$ 去饱和酶	357 (1403 bp)	358 (400 AA)
Saccharomyces kluyveri $\Delta 12$ 去饱和酶	--	359 (416 AA)
乳克鲁维氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶	360 (1948 bp)	361 (415 AA)
白色假丝酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶	--	362 (436 AA)
汉逊氏德巴利氏酵母 CBS767 $\Delta 12$ 去饱和酶	--	363 (416 AA)
球等鞭金藻 $\Delta 9$ 延伸酶	39 (792 bp)	40 (263 AA)
合成的 $\Delta 9$ 延伸酶基因, 为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化	41 (792 bp)	40 (263 AA)
纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶基因 (非功能性; GenBank 获取号 AAD45877)	42 (1275 bp)	43 (419 AA)

纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶基因 (非功能性; Wallis et al.[Archives of Biochem. Biophys., 365: 307-316 (1999)]; WO 00/34439)	--	252 (422 AA)
合成的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因, 为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化 (D8S-1)	209 (1270 bp)	--
合成的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因, 为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化 (D8S-3)	255 (1269 bp)	--
纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶基因 (Eg5)	44 (1271 bp)	45 (421 AA)
纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶基因 (Eg12)	46 (1271 bp)	47 (421 AA)
合成的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因, 为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化 (D8SF)	48 (1272 bp)	49 (422 AA)
褐家鼠 $C_{16/18}$ 延伸酶	50 (2628 bp)	51 (267 AA)
合成的 $C_{16/18}$ 延伸酶基因, 来源于褐家鼠, 为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化	52 (804 bp)	51 (267 AA)
高山被孢霉 $C_{16/18}$ 延伸酶 (ELO3)	53 (828 bp)	54 (275 AA)
高山被孢霉 ELO3—部分 cDNA 序列	55 (607 bp)	--
高山被孢霉 ELO3—3' 序列, 通过基因组步移获得	56 (1042 bp)	--
高山被孢霉 ELO3—5' 序列, 通过基因组步移获得	57 (2223 bp)	--
高山被孢霉 ELO3—cDNA 重叠群	58 (3557 bp)	--
高山被孢霉 ELO3—内含子	59 (542 bp)	--
高山被孢霉 ELO3—基因组重叠群	60 (4099 bp)	--
解脂耶氏酵母 $C_{16/18}$ 延伸酶基因	61 (915 bp)	62 (304 AA)
白色假丝酵母的可能的脂肪酸延伸酶 (GenBank 获取号 EAL04510)	--	63 (353 AA)
解脂耶氏酵母 $C_{14/16}$ 延伸酶基因	64 (978 bp)	65 (325 AA)
粗糙链孢霉 FEN1 基因 (GenBank 获取号 CAD70918)	--	66 (337 AA)
高山被孢霉溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAAT1)	67 (945 bp)	68 (314 AA)
高山被孢霉溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAAT2)	69 (927 bp)	70 (308 AA)
解脂耶氏酵母溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAAT1)	71 (1549 bp)	72 (282 AA)

解脂耶氏酵母溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAAT2) —包含基因的基因组片段	73 (1495 bp)	--
解脂耶氏酵母溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAAT2)	74 (672 bp)	75 (223 AA)
解脂耶氏酵母磷脂: 二酰基甘油酰基转移酶 (PDAT)	76 (2326 bp)	77 (648 AA)
解脂耶氏酵母酰基-CoA: 固醇-酰基转移酶 (ARE2)	78 (1632 bp)	79 (543 AA)
秀丽新杆线虫酰基-CoA: 1-酰基溶血磷脂酰胆碱 酰基转移酶 (LPCAT)	--	80 (282 AA)
解脂耶氏酵母二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT1)	81 (1578 bp)	82 (526 AA)
高山被孢霉二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT1)	83 (1578 bp)	84 (525 AA)
粗糙链孢霉二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT1)	--	85 (533 AA)
玉蜀黍赤霉 PH-1 二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT1)	--	86 (499 AA)
Magnaporthe grisea 二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT1)	--	87 (503 AA)
构巢曲霉二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT1)	--	88 (458 AA)
解脂耶氏酵母二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT2)	89 (2119 bp) 91 (1380 bp) 93 (1068 bp)	90 (514 AA) 92 (459 AA) 94 (355 AA)
高山被孢霉二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT2)	95 (996 bp)	96 (331 AA)
高山被孢霉甘油-3-磷酸酰基转移酶 (GPAT)	97 (2151 bp)	98 (716 AA)
高山被孢霉 GPAT—部分 cDNA 序列	99 (1212 bp)	--
高山被孢霉 GPAT—包含 1050 bp 至+2886 bp 区 的基因组片段	100 (3935 bp)	--
高山被孢霉 GPAT—3' cDNA 序列, 通过基因组 步移获得	101 (965 bp)	--
高山被孢霉 GPAT—5' 序列, 通过基因组步移获得	102 (1908 bp)	--
高山被孢霉 GPAT—内部序列, 通过基因组步移 获得	103 (966 bp)	--
高山被孢霉 GPAT—内含子#1	104 (275 bp)	--

高山被孢霉 GPAT—内含子#2	105 (255 bp)	--
高山被孢霉 GPAT—内含子#3	106 (83 bp)	--
高山被孢霉 GPAT—内含子#4	107 (99 bp)	--
解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶 (CPT1) —包含基因的基因组片段	108 (2133 bp)	--
解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶 (CPT1)	109 (1185 bp)	110 (394 AA)
啤酒糖酵母肌醇磷酸鞘脂特异性磷脂酶 (ISC1)	111 (1434 bp)	112 (477 AA)
解脂耶氏酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子 (GPD)	158 (971 bp)	--
解脂耶氏酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶+内含子启动子 (GPDIN)	159 (1174 bp)	--
解脂耶氏酵母磷酸甘油变位酶启动子 (GPM)	160 (878 bp)	--
解脂耶氏酵母果糖-二磷酸醛缩酶启动子 (FBA)	161 (1001 bp)	--
解脂耶氏酵母果糖-二磷酸醛缩酶+内含子启动子 (FBAIN)	162 (973 bp)	--
解脂耶氏酵母果糖-二磷酸醛缩酶+修饰的内含子启动子 (FBAINm)	163 (924 bp)	--
解脂耶氏酵母甘油-3-磷酸酰基转移酶启动子 (GPAT)	164 (1130 bp)	--
解脂耶氏酵母铵转运蛋白启动子 (YAT1)	165 (778 bp)	--
解脂耶氏酵母翻译延伸因子 EF1- α 启动子 (TEF)	166 (436 bp)	--
解脂耶氏酵母嵌合 GPM::FBA 内含子启动子 (GPM::FBAIN)	167 (1020 bp)	--
解脂耶氏酵母嵌合 GPM::GPD 内含子启动子 (GPM::GPDIN)	168 (1052 bp)	--
解脂耶氏酵母输出蛋白启动子 (EXP1)	364 (1000 bp)	--

SEQ ID NOs: 113-157 是表 2 中指出的质粒。

表 2
质粒序列号的概括

质粒	相应的附图	SEQ ID NO
pY5-30	5A	113 (8,953 bp)
pKUNF12T6E	7B	114 (12,649 bp)
pDMW232	7C	115 (10,945 bp)
pDMW271	7D	116 (13,034 bp)
pKUNT2	8A	117 (6,457 bp)
pZUF17	8B	118 (8,165 bp)
pDMW237	8C	119 (7,879 bp)
pY54PC	--	120 (8,502 bp)
pKUNFmkF2	11A	121 (7,145 bp)
pZF5T-PPC	11C	122 (5,553 bp)
pDMW297	11E	123 (10,448 bp)
pZP2C16M899	12A	124 (15,543 bp)
pDMW314	12B	125 (13,295 bp)
pDMW322	12C	126 (11,435 bp)
pZKSL5598	12D	127 (16,325 bp)
pZP3L37	13A	128 (12,690 bp)
pY37/F15	13B	129 (8,194 bp)
pKO2UF2PE	13C	130 (10,838 bp)
pZKUT16	13D	131 (5,833 bp)
pKO2UM25E	14A	132 (12,663 bp)
pZKUGPI5S	14B	133 (6,912 bp)
pDMW302T16	14C	134 (14,864 bp)
pZKUGPE1S	14D	135 (6,540 bp)
pKO2UM26E	15A	136 (13,321 bp)
pZKUM	--	137 (4,313 bp)

pMLPAT-17	--	138 (8,015 bp)
pMLPAT-Int	--	139 (8,411 bp)
pZUF-MOD-1	15B	140 (7,323 bp)
pMDGAT1-17	15C	141 (8,666 bp)
pMDGAT2-17	--	142 (8,084 bp)
pMGPAT-17	15D	143 (9,239 bp)
pZF5T-PPC-E3	--	144 (5,031 bp)
pZUF6S	18A	145 (8,462 bp)
pZUF6S-E3WT	18B	146 (11,046 bp)
pZKUGPYE1-N	18C	147 (6,561 bp)
pZKUGPYE2	18D	148 (6,498 bp)
pZUF6TYE2	--	149 (10,195 bp)
pZKUGPYE1	19A	150 (6,561 bp)
pZUF6FYE1	19B	151 (10,809 bp)
pYCPT1-17	--	152 (8,273 bp)
pZP217+Ura	19C	153 (7,822 bp)
pYCPT1-ZP217	--	154 (7,930 bp)
pTEF::ISC1	--	155 (8,179 bp)
pY20	19D	156 (8,196 bp)
pLV13	19E	157 (5,105 bp)

SEQ ID NO: 356 相应于在耶氏酵母种中优化表达的基因的密码子优化的翻译起始位点。

SEQ ID NOs: 169-182 分别相应于用于扩增解脂耶氏酵母启动子区的引物 YL211, YL212, YL376, YL377, YL203, YL204, GPAT-5-1, GPAT-5-2, ODMW314, YL341, ODMW320, ODMW341, 27203-F 和 27203-R。

SEQ ID NOs: 183-186 分别是用于实时分析的寡核苷酸 YL-URA-16F, YL-URA-78R, GUS-767F 和 GUS-891R。

SEQ ID NOs: 187-202 相应于 8 对寡核苷酸, 其一起包括球等鞭金藻 $\Delta 9$ 延伸酶的完整的密码子优化的编码区 (即分别是 IL3-1A,

IL3-1B, IL3-2A, IL3-2B, IL3-3A, IL3-3B, IL3-4A, IL3-4B, IL3-5A, IL3-5B, IL3-6A, IL3-6B, IL3-7A, IL3-7B, IL3-8A 和 IL3-8B)。

SEQ ID NOs: 203-206 分别相应于用于在密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶基因的合成过程中进行 PCR 扩增的引物 IL3-1F, IL3-4R, IL3-5F 和 IL3-8R。

SEQ ID NO: 207 是描述于 pT9 (1-4) 的 417 bp NcoI/PstI 片段, SEQ ID NO: 208 是描述于 pT9 (5-8) 的 377 bp PstI/NotI 片段。

SEQ ID NOs: 210-235 相应于 13 对寡核苷酸, 其一起包括纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶的完整的密码子优化的编码区 (即分别是 D8-1A, D8-1B, D8-2A, D8-2B, D8-3A, D8-3B, D8-4A, D8-4B, D8-5A, D8-5B, D8-6A, D8-6B, D8-7A, D8-7B, D8-8A, D8-8B, D8-9A, D8-9B, D8-10A, D8-10B, D8-11A, D8-11B, D8-12A, D8-12B, D8-13A 和 D8-13B)。

SEQ ID NOs: 236-243 分别相应于用于在密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因的合成过程中进行 PCR 扩增的引物 D8-1F, D8-3R, D8-4F, D8-6R, D8-7F, D8-9R, D8-10F 和 D8-13R。

SEQ ID NO: 244 是描述于 pT8 (1-3) 的 309 bp NcoI/BglII 片段; SEQ ID NO: 245 是描述于 pT8 (4-6) 的 321 bp BglII/XhoI 片段; SEQ ID NO: 246 是描述于 pT8 (7-9) 的 264 bp XhoI/SacI 片段; SEQ ID NO: 247 是描述于 pT8 (10-13) 的 369 bp SacI/NotI 片段。

SEQ ID NOs: 248 和 249 分别相应于在 pDMW255 中合成 D8S-2 的过程中使用的引物 ODMW390 和 ODMW391。

SEQ ID NOs: 250 和 251 是实施例 7 中描述的嵌合 D8S-1::XPR 和 D8S-2::XPR 基因。

SEQ ID NOs: 253 和 254 相应于 D8S-3 的合成过程中使用的引物 ODMW392 和 ODMW393。

SEQ ID NOs: 256 和 257 分别相应于用于扩增纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶的引物 Eg5-1 和 Eg3-3。

SEQ ID NOs: 258-261 相应于用于对 $\Delta 8$ 去饱和酶克隆进行测序的引物 T7, M13-28Rev, Eg3-2 和 Eg5-2。

SEQ ID NO: 262 相应于用于扩增 D8S-3 的引物 ODMW404。

SEQ ID NO: 263 是包含 D8S-3 的 1272 bp 嵌合基因。

SEQ ID NOs: 264 和 265 分别相应于用于在克隆的 D8S-3 基因中建立新的限制酶位点的引物 YL521 和 YL522。

SEQ ID NOs: 266-279 分别相应于用于定点诱变反应中，以产生 D8SF 的引物 YL525, YL526, YL527, YL528, YL529, YL530, YL531, YL532, YL533, YL534, YL535, YL536, YL537 和 YL538。

SEQ ID NO: 280 是突变 AHAS 基因，其包含 W497L 突变。

SEQ ID NOs: 281-283 分别相应于 BD-Clontech Creator Smart[®] cDNA 文库试剂盒引物 SMART IV 寡核苷酸，CDSIII/3' PCR 引物和 5'-PCR 引物。

SEQ ID NO: 284 相应于用于高山被孢霉 cDNA 文库测序的 M13 正向引物。

SEQ ID NOs: 285-288 和 290-291 分别相应于用于克隆高山被孢霉 LPAAT2 ORF 的引物 MLPAT-F, MLPAT-R, LPAT-Re-5-1, LPAT-Re-5-2, LPAT-Re-3-1 和 LPAT-Re-3-2。

SEQ ID NOs: 289 和 292 分别相应于解脂耶氏酵母 LPAAT1 ORF 的 5' (1129 bp) 和 3' (938 bp) 区。

SEQ ID NOs: 293 和 294 分别相应于用于建立 pZUF-MOD-1 “对照”质粒的引物 pzuf-mod1 和 pzuf-mod2。

SEQ ID NOs: 295 和 296 分别相应于用于克隆高山被孢霉 DGAT1 ORF 的引物 MACAT-F1 和 MACAT-R。

SEQ ID NOs: 297 和 298 分别相应于用于克隆高山被孢霉 DGAT2 ORF 的引物 MDGAT-F 和 MDGAT-R1。

SEQ ID NOs: 299 和 300 分别相应于用于简并 PCR 中，以扩增高山被孢霉 GPAT 的引物 MGPAT-N1 和 MGPAT-NR5。

SEQ ID NOs: 301-303 分别相应于用于扩增高山被孢霉 GPAT 的 3'末端的引物 MGPAT-5N1, MGPAT-5N2 和 MGPAT-5N3。

SEQ ID NOs: 304 和 305 相应于用于基因组步移 (genome-walking) 中的、来自 ClonTech 的 Universal GenomeWalker[™] 试剂盒的 Genome Walker 衔接子。

SEQ ID NOs: 306-309 分别相应于用于基因组步移中的 PCR 引物: MGPAT-5-1A, Adaptor-1 (AP1), MGPAT-3N1 和 Nested Adaptor Primer 2 (AP2)。

SEQ ID NOs: 310 和 311 分别相应于用于扩增高山被孢霉 GPAT 的引物 mgpat-cdna-5 和 mgpat-cdna-R。

SEQ ID NOs: 312 和 313 分别相应于用于基因组步移中, 以分离高山被孢霉 ELO3 的 3'末端区的引物 MA Elong 3'1 和 MA elong 3'2。

SEQ ID NOs: 314 和 315 分别相应于用于基因组步移中, 以分离高山被孢霉 ELO3 的 5'末端区的引物 MA Elong 5'1 和 MA elong 5'2。

SEQ ID NOs: 316 和 317 分别相应于用于从高山被孢霉 cDNA 扩增完整 ELO3 的引物 MA ELONG 5' NcoI 3 和 MA ELONG 3' NotI 1。

SEQ ID NOs: 318 和 319 分别相应于用于扩增解脂耶氏酵母 YE2 的编码区的引物 YL597 和 YL598。

SEQ ID NOs: 320-323 分别相应于用于扩增解脂耶氏酵母 YE1 的编码区的引物 YL567, YL568, YL569 和 YL570。

SEQ ID NOs: 324 和 325 分别相应于用于克隆解脂耶氏酵母 YE1 的过程中的定点诱变的引物 YL571 和 YL572。

SEQ ID NOs: 326 和 327 分别相应于用于克隆解脂耶氏酵母 CPT1 ORF 的引物 CPT1-5'-NcoI 和 CPT1-3'-NotI。

SEQ ID NOs: 328 和 329 分别相应于用于克隆啤酒糖酵母 ISC1 ORF 的引物 Isc1F 和 Isc1R。

SEQ ID NOs: 330 和 331 分别相应于用于克隆啤酒糖酵母 PCL1 ORF 的引物 Pcl1F 和 Pcl1R。

SEQ ID NOs: 332-335 分别相应于用于解脂耶氏酵母 DGAT2 基因的靶定破坏的引物 P95, P96, P97 和 P98。

SEQ ID NOs: 336-338 分别相应于用于筛选破坏的解脂耶氏酵母 DGAT2 基因的靶定整合的引物 P115, P116 和 P112。

SEQ ID NOs: 339-342 分别相应于用于解脂耶氏酵母 PDAT 基因的靶定破坏的引物 P39, P41, P40 和 P42。

SEQ ID NOs: 343-346 分别相应于用于筛选破坏的解脂耶氏酵母 PDAT 基因的靶定整合的引物 P51, P52, P37 和 P38。

SEQ ID NOs: 347 和 348 分别是用于分离解脂耶氏酵母 DGAT1 的鉴定为 P201 和 P203 的简并引物。

SEQ ID NOs: 349-353 分别相应于用于建立导向盒的引物 P214, P215, P216, P217 和 P219, 所述导向盒用于解脂耶氏酵母中推定的

DGAT1 基因的靶定破坏。

SEQ ID NOs: 354 和 355 分别相应于用于筛选破坏的解脂耶氏酵母 DGAT1 基因的靶定整合的引物 P226 和 P227。

SEQ ID NOs: 365-370 分别相应于用于合成突变的解脂耶氏酵母 AHAS 基因的引物 410, 411, 412, 413, 414 和 415, 所述突变基因包含 W497L 突变。

SEQ ID NOs: 371 和 372 分别相应于用于扩增包含 Aco 3'终止子的 NotI/PacI 片段的引物 YL325 和 YL326。

SEQ ID NO: 373 相应于存在于真菌 $\Delta 15$ 和 $\Delta 12$ 去饱和酶中的 His Box 1 基序。

SEQ ID NO: 374 相应于表明具有 $\Delta 15$ 去饱和酶活性的真菌蛋白的基序, 而 SEQ ID NO: 406 相应于表明具有 $\Delta 12$ 去饱和酶活性的真菌蛋白的基序。

发明详述

在此全文引入本文引用的所有专利、专利申请和公开文献作为参考。这特别包括了申请人的受让人的以下共同未决的申请:

美国专利申请 No. 10/840478 (2004 年 5 月 6 日提交),

美国专利申请 No. 10/840579 (2004 年 5 月 6 日提交),

美国专利申请 No. 10/840325 (2004 年 5 月 6 日提交)

美国专利申请 No. 10/869630 (2004 年 6 月 16 日提交),

美国专利申请 No. 10/882760 (2004 年 7 月 1 日提交),

美国专利申请 No. 10/985109 (2004 年 11 月 10 日提交),

美国专利申请 No. 10/987548 (2004 年 11 月 12 日提交)

美国专利申请 No. 60/624812 (2004 年 11 月 4 日提交),

美国专利申请 No. 11/024545 和 No. 11/024544 (2004 年 12 月 29 日提交),

美国专利申请 No. 60/689031 (2005 年 6 月 9 日提交),

美国专利申请 No. 11/183664 (2005 年 7 月 18 日提交),

美国专利申请 No. 11/185301 (2005 年 7 月 20 日提交),

美国专利申请 No. 11/190750 (2005 年 7 月 27 日提交),

美国专利申请 No. 11/225354 (2005 年 9 月 13 日提交), CL2823

和 CL3027。

根据本发明，申请人提供了能够生产大于 10%花生四烯酸 (ARA, 20:4, ω -6) 的解脂耶氏酵母的生产宿主菌株。该特定多不饱和脂肪酸 (PUFA) 的积累是通过导入两个不同的功能性 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径中的任意一个而实现的。第一个途径包括将具有 Δ 6 去饱和酶、 $C_{18/20}$ 延伸酶和 Δ 5 去饱和酶活性的蛋白导入含油酵母以进行高水平重组表达，其中所述 ARA 油也包括 GLA；后一个途径包括具有 Δ 9 延伸酶、 Δ 8 去饱和酶和 Δ 5 去饱和酶活性的蛋白，从而使得能够生产不含任何 GLA 的 ARA 油。因此，本公开内容证明了可以对解脂耶氏酵母进行工程化，使得能够商业生产 ARA 及其衍生物。也要求保护生产方法。

本发明具有多种用途。通过本文所描述的方法制备的 PUFAs，或其衍生物可被用作饮食代用品，或补充物，特别是婴儿配方，用于静脉内喂饲的患者或用于预防或治疗营养不良。另外，可以将纯化的 PUFAs (或其衍生物) 掺入烹饪油、脂肪，或配制的人造奶油中，以便在正常使用时，受体能接受到所需数量的饮食补充。还可将 PUFAs 掺入婴儿配方，营养补充物或其他食品中，并且可以用作抗炎剂或降胆固醇剂。可任选将所述组合物用于药理学用途 (人或兽医)。在这种场合下，PUFAs 通常是口服的，不过，可以通过能够成功地吸收它们的任何途径施用，例如，肠胃外 (例如皮下，肌内或静脉内)、直肠内、阴道内或局部 (例如，作为皮肤油膏或洗液)。

给人或动物补充通过重组方法生产的 PUFAs，可以得到水平增加的添加的 PUFAs，以及它们的代谢产物。例如，用 ARA 治疗，不仅能够产生水平增加的 ARA，而且还能产生 ARA 的下游产物，如类二十烷酸。复杂的调节机制，可能需要组合各种 PUFAs，或者添加 PUFAs 的不同的共轭物，以便预防、控制或克服这样的机制，以便在个体内获得理想水平的特定的 PUFAs。

在其它实施方案中，通过本文公开的方法制备的 PUFAs 或其衍生物可以用于合成水产养殖饲料 (即干饲料、半湿饲料和湿饲料)，因为这些配方通常需要至少 1-2% 的营养组分是 ω -3 和/或 ω -6 PUFAs。

定义

在本说明书中，使用了多种术语和缩写。提供了以下定义。

“可读框”缩写为 ORF。

“聚合酶链反应”缩写为 PCR。

“美国典型培养物保藏中心”缩写为 ATCC。

“多不饱和脂肪酸”缩写为 PUFA (s)。

“二酰基甘油酰基转移酶”缩写为 DAG AT 或 DGAT。

“磷脂：二酰基甘油酰基转移酶”缩写为 PDAT。

“甘油-3-磷酸酰基转移酶”缩写为 GPAT。

“溶血磷脂酸酰基转移酶”缩写为 LPAAT。

“酰基-CoA：1-酰基溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶”缩写为“LPCAT”。

“酰基-CoA：固醇-酰基转移酶”缩写为 ARE2。

“二酰基甘油”缩写为 DAG。

“三酰基甘油”缩写为 TAGs。

“辅酶 A”缩写为 CoA。

“磷脂酰胆碱”缩写为 PC。

术语“串珠镰孢 (*Fusarium moniliforme*)”与“*Fusarium verticillioides*”同义。

术语“食品”是指任何通常适于人类消耗的食物。典型的食品包括但不限于，肉产品、谷物产品、烘烤食品、快餐、乳制品等。

术语“功能性食品”是指包括可能有益健康的产品的食品，包括任何改良的食品或成分，其可提供超过它所包含的常规营养物质的健康益处。功能性食品可以包括诸如谷物、面包和饮料的食品，其可以用维生素、草药和营养品进行强化。功能性食品含有提供超过其营养价值的健康益处的物质，其中所述物质天然存在于食品中或是有意添加的。

此处用到的术语“医学食品”是指经过配制，以便在医生的监督下食用或施用的食品，其意欲用于具有独特营养需要的疾病或状况的特殊饮食控制，所述食用或施用是基于例如医学评估确立的公知科学原理[参见 Orphan Drug Act (21 U.S.C. 360ee (b) (3)) 的 5 (b) 部分]。仅仅当满足以下条件时，食品是“医学食品”：(i) 它是特殊配制并且加工的产品（与以天然状态使用的天然食料不同），用于通过口服或通过胃管进行的肠道喂饲对患者进行部分或全面喂饲；

(ii) 它意欲用于患者的营养控制, 所述患者由于治疗或长期医学需要, 摄取、消化、吸收或代谢常规食料或某些营养物质的能力受限或受损, 或具有其它特殊的医学决定的营养需要, 所述患者的营养控制可以通过对单独的正常饮食的改变而实现; (iii) 它提供营养支持, 所述营养支持针对独特营养需要的控制进行了特殊改变, 所述独特的营养需要是通过医学评估确定的特定疾病或状况导致的; (iv) 它意欲在医学监督下使用; 和 (v) 它仅仅意欲用于接受活跃和进行中的医学监督的患者, 其中所述患者需要反复的医学监督, 包括但不限于对医学食品使用的说明。因此, 与饮食补充物或常规食品不同, 医学食品意欲用于对疾病或状况进行特殊的饮食控制, 对所述疾病或状况建立了独特的营养需要, 所述医学食品可能满足与给特定疾病或状况提供独特营养支持相关的科学上有效的要求。通过医学食品在医学监督下使用的要求, 医学食品可以与广泛类别的特定饮食用途的食品(如低变应原性食品)和满足健康要求的食品(如营养补充物)区别。

术语“医学营养品”是指本文所定义的医学食品, 典型地是指特别设计用于特定饮食需要的强化饮料。医学营养品通常包含针对特定医学或营养状况的饮食组分。商购的医学营养品的实例包括但不限于 Ensure®和 Boost®。

本文用到的术语“药物”是指一种化合物或物质, 如果在美国出售, 必须受到联邦食品、药品和化妆品法案的 505 或 505 部分的控制。

术语“婴儿配方”是指一种食品, 它专门设计用于经过刺激人类母乳而被人类婴儿摄取。婴儿配方的典型商购实例包括但不限于 Similac®和 Isomil®。

术语“饮食补充物”是指一种产品, 它: (i) 意欲用于对饮食进行补充, 因此不用作常规食品或作为膳食或饮食的唯一项目; (ii) 含有一种或多种饮食成分(包括例如微生物、矿物质、草药或其它植物物质、氨基酸、酶和腺体)或其它组成成分; (iii) 意欲作为丸剂、胶囊、片剂或液体通过口服摄取; 和 (iv) 标为饮食补充物。

术语“临床状况”表示人类或动物中的状况, 它损害健康和人类或动物的状态, 并且通过补充 PUFAs, 特别是 w-3 和 w-6 脂肪酸可以纠正。临床状况可以是明确记载的疾病状态形式, 如冠心病或由营养调节不良导致的不良健康的一般状况。

“食物类似物”是制造用于模拟其食品对应物（肉类、奶酪、乳等）的食品样产品，意欲具有食品对应物的外观、味道和质地。因此，此处用到的术语“食品”也包括食物类似物。

术语“水产养殖饲料”是指用于补充或替代水产养殖业中的天然饲料的制造的或人工的饮食（配制的饲料）。因此，水产养殖饲料是指用于饲养的有鳍鱼类和甲壳动物（即较低价值的食品鱼物种[如淡水有鳍鱼，如鲤鱼、罗非鱼和鲶鱼]和用于奢侈品或壁龛市场的较高价值的商品物种如虾、鲑鱼、鳟鱼、石首鱼、浅海石斑鱼（seebass）、海鲤（seebream）和石斑鱼]）的人工配制的饲料。这些配制饲料包含彼此补充的各种比例的一些成分，形成用于水产养殖物种的营养补充食品。

术语“动物饲料”是指意欲专门用于动物，包括家养动物（宠物、畜牧业动物等）或用于生产食品的动物如饲养鱼类的饲料。

术语“饲料营养物”是指诸如蛋白、脂质、碳水化合物、维生素、矿物质和核酸的营养物质，它们可以来源于酵母生物物质，包括本发明的重组生产宿主。

本文用到的术语“生物物质”特别是指来自重组生产宿主的发酵的、消耗的或使用的酵母细胞材料，所述宿主以商业显著量生产ARA。

术语“脂肪酸”表示具有各种链长的长链脂族酸（链烷酸），从大约 C_{12} - C_{22} （不过已知可以采用更长和更短链长的酸）。主要的链长为 C_{16} 至 C_{22} 。脂肪酸的结构是通过简单的符号系统“X: Y”表示的，其中，X是在特定脂肪酸中的碳（C）原子的总数，而Y是双键的数量。关于“饱和脂肪酸”与“不饱和脂肪酸”、“单不饱和脂肪酸”与“多不饱和脂肪酸”（或“PUFAs”），以及“ ω -6 脂肪酸（ ω -6 或 n-6）与“ ω -3 脂肪酸（ ω -3 或 n-3）的区分的其它细节提供于 WO 2004/101757。

在下面的表 3 中示出了用于描述本公开内容中的 PUFAs 的命名。在标题为“简化符号”的栏目中，利用 ω -参考系统表示碳原子的编号，双键的编号，和最接近 ω 碳原子的双键的位置，从 ω 碳原子开始计数（它是用于这种目的的第 1 号）。该表的其余部分归纳了 ω -3 和 ω -6 脂肪酸的常用名，在说明书中将要使用的缩写，以及每一种化合物的化学名称。

表 3
多不饱和脂肪酸的命名

通用名	缩写词	化学名称	简化符号
豆蔻酸	--	十四烷酸	14:0
棕榈酸	Palmitate	十六烷酸	16:0
棕榈油酸	--	9-十六烷酸	16:1
硬脂酸	--	十八烷酸	18:0
油酸	--	顺式-9-十八烷酸	18:1
亚油酸	LA	顺式-9,12-十八碳二烯酸	18:2 ω -6
γ -亚油酸	GLA	顺式-6,9,12-十八碳三烯酸	18:3 ω -6
二十碳二烯酸	EDA	顺式-11,14-二十碳二烯酸	20:2 ω -6
二高- γ -亚油酸	DGLA	顺式-8,11,14-二十碳三烯酸	20:3 ω -6
花生四烯酸	ARA	顺式-5,8,11,14-二十碳四烯酸	20:4 ω -6
α -亚麻酸	ALA	顺式-9,12,15-十八碳三烯酸	18:3 ω -3
十八碳四烯酸	STA	顺式-6,9,12,15-十八碳四烯酸	18:4 ω -3
二十碳三烯酸	ETrA	顺式-11,14,17-二十碳三烯酸	20:3 ω -3
二十碳四烯酸	ETA	顺式-8,11,14,17-二十碳四烯酸	20:4 ω -3
二十碳-五烯酸	EPA	顺式-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸	20:5 ω -3
二十二碳-五烯酸	DPA	顺式-7,10,13,16,19-二十二碳五烯酸	22:5 ω -3
二十二碳-六烯酸	DHA	顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸	22:6 ω -3

术语“高水平 ARA 生产”是指生产微生物宿主的总脂质的至少约 5% 的 ARA，优选总脂质的至少约 10% 的 ARA，更优选总脂质的至少约 15% 的 ARA，更优选总脂质的至少约 20% 的 ARA，最优选总脂质的至少约 25-30% 的 ARA。ARA 的结构形式是不限的；因此，例如，ARA 可以作为游离脂肪酸或以酯化形式，如酰基甘油、磷脂、硫苷脂的形式存在于总脂质中。

术语“不含任何 GLA”是指当采用具有最低至大约 0.1% 的可检测水平的装置通过 GC 分析测量时，微生物宿主的总脂质中缺乏任何可检测的 GLA。

术语“必需脂肪酸”表示生物为了生存必须摄入的 PUFA，所述生物不能从头合成所述特定必需脂肪酸。例如，哺乳动物不能合成必需脂肪酸亚油酸 (18: 2, ω -6)。其他必需脂肪酸包括 GLA (ω -6)，DGLA (ω -6)，ARA (ω -6)，EPA (ω -3) 和 DHA (ω -3)。

“微生物油”或“单细胞油”是由微生物在它们的生命过程中天然产生的油。这种油可能包括长链 PUFAs。术语“油”表示在 25℃ 下是液体并且通常是多不饱和的脂类。想法，术语“脂肪”表示脂类物质，它在 25℃ 下是固体，并且通常是饱和的。

“脂质体”是指脂质小滴，其通常由特定蛋白和磷脂单层围绕。这些细胞器是大多数微生物转运/储存中性脂质的位点。认为脂质体来源于含有 TAG 生物合成酶的内质网的微结构域，并且，它们的合成和大小似乎由特定的蛋白成分控制。

“中性脂质”是指通常作为储存脂肪和油存在于脂质体中的那些脂质，如此命名是因为在细胞 pH，这些脂质不具有带电基团。通常，它们完全是非极性的，对水没有亲和力。中性脂质通常是指甘油的脂肪酸一、二和/或三酯，分别也称作一酰基甘油、二酰基甘油或 TAG（或统称为酰基甘油）。必须发生水解反应，以便从酰基甘油释放脂肪酸。

术语“三酰基甘油”、“油”和“TAGs”是指中性脂质，包含酯化于甘油分子的三个脂肪酰基（所述术语在本发明中可互换使用）。所述油可以包括长链 PUFAs、较短的饱和和不饱和脂肪酸，以及较长链的饱和脂肪酸。因此，“油生物合成”通常是指细胞中 TAGs 的合成。

术语“酰基转移酶”是指负责转转移氨基-酰基以外的基团的酶(EC 2.3.1.-)。

术语“DAG AT”是指二酰基甘油酰基转移酶(也称作酰基-CoA-二酰基甘油酰基转移酶或二酰基甘油 O-酰基转移酶) (EC 2.3.1.20)。这种酶负责将酰基-CoA 和 1,2-二酰基甘油转化为 TAG 和 CoA (从而包括在 TAG 生物合成的终末步骤中)。存在两个家族的 DAG AT 酶: DGAT1 和 DGAT2。前一个家族与酰基-CoA: 胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 基因家族具有同源性, 而后一个家族是不相关的 (Lardizabal et al., J. Biol. Chem. 276 (42) : 38862-38869 (2001))。

术语“PDAT”是指磷脂: 二酰基甘油酰基转移酶 (EC 2.3.1.158)。这种酶负责将酰基从磷脂的 sn-2 位置转移到 1,2-二酰基甘油的 sn-3 位置, 从而得到溶血磷脂和 TAG (从而包括在 TAG 生物合成的终末步骤中)。这种酶与 DGAT (EC 2.3.1.20) 的差异在于通过不依赖于酰基-CoA 的机制合成 TAG。

术语“ARE2”是指酰基-CoA: 固醇-酰基转移酶 (EC 2.3.1.26; 也称作固醇-酯合酶 2), 其催化以下反应: 酰基-CoA+固醇=CoA+固醇酯。

术语“GPAT”是指由 gpat 基因编码的甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶 (E.C. 2.3.1.15), 其将酰基-CoA 和 sn 甘油 3-磷酸转化为 1-酰基-sn-甘油 3-磷酸 (磷脂生物合成的第一步)。

术语“LPAAT”是指溶血磷脂酸-酰基转移酶 (EC 2.3.1.51)。该酶负责将酰基-CoA 基团转移到 1-酰基-sn-甘油 3-磷酸 (即溶血磷脂酸) 上, 得到 CoA 和 1,2-二酰基-sn-甘油 3-磷酸 (磷脂酸)。文献中也将 LPAAT 称作酰基-CoA: 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸 2-O-酰基转移酶、1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶和/或 1-酰基甘油磷酸酰基转移酶 (缩写为 AGAT)。

术语“LPCAT”是指酰基-CoA: 1-酰基溶血磷脂酰-胆碱酰基转移酶。这种酶负责在 CoA 和磷脂酰胆碱 (PC) 之间交换酰基。因此, 它也称作参与 CoA 和其它磷脂, 包括溶血磷脂酸 (LPA) 之间的酰基交换的酶。

“总脂质和油级分中的 PUFAs 百分比 (%)”是指这些级分中 PUFAs 相对于总脂肪酸的百分比。术语“总脂质级分”或“脂质级分”

都指含油生物内的所有脂质的总和（即中性和极性），由此包括位于磷脂酰胆碱（PC）级分、磷脂酰乙醇胺（PE）级分和三酰基甘油（TAG或油）级分中的脂质。但是，该术语“脂质”和“油”在说明书中可以互换使用。

术语“磷脂酰胆碱”或“PC”是指作为细胞膜的主要组成部分的磷脂。PC的化学结构可以通常描述为包含以下成分：胆碱分子、磷酸基团和甘油，其中脂肪酰基链作为R基团连接在甘油分子的sn-1和sn-2位置上。

术语“PUFA生物合成途径酶”表示与PUFA的生物合成相关的以下任何酶（以及编码所述酶的基因），包括： $\Delta 4$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶、 $\Delta 6$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶、 $\Delta 15$ 去饱和酶、 $\Delta 17$ 去饱和酶、 $\Delta 9$ 去饱和酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶、 $\Delta 9$ 延伸酶、 $C_{14/16}$ 延伸酶、 $C_{16/18}$ 延伸酶、 $C_{18/20}$ 延伸酶和/或 $C_{20/22}$ 延伸酶。

术语“ ω -3/ ω -6脂肪酸生物合成途径”表示一组基因，当它们在合适的条件下表达时，编码能催化 ω -3和/或 ω -6脂肪酸生产的酶。通常，参与 ω -3/ ω -6脂肪酸生物合成途径的基因编码某些或所有以下的酶： $\Delta 12$ 去饱和酶、 $\Delta 6$ 去饱和酶、 $C_{18/20}$ 延伸酶、 $C_{20/22}$ 延伸酶、 $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶、 $\Delta 17$ 去饱和酶、 $\Delta 15$ 去饱和酶、 $\Delta 9$ 去饱和酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶、 $\Delta 9$ 延伸酶和 $\Delta 4$ 去饱和酶。在图1中示出了典型的途径，它可以经各种中间体将油酸转化成DHA，并且证实了如何由普通来源生产 ω -3和 ω -6脂肪酸。该途径天然分成两个部分，其中一个部分产生 ω -3脂肪酸，另一个部分仅仅产生 ω -6脂肪酸。仅仅产生 ω -3脂肪酸的部分在此称作 ω -3脂肪酸生物合成途径，而仅仅产生 ω -6脂肪酸的部分在此称作 ω -6脂肪酸生物合成途径。

在 ω -3/ ω -6脂肪酸生物合成途径的范围中使用的术语“功能性”表示途径中的一些（或所有）基因表达活性酶，导致体内催化或底物转化。应该理解，“ ω -3/ ω -6脂肪酸生物合成途径”或“功能性 ω -3/ ω -6脂肪酸生物合成途径”不表示需要前面段落中列出的所有基因，因为很多脂肪酸产物仅仅需要表达该途径的一个亚组的基因。

术语“ $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径”是指最少包括以下基因的ARA脂肪酸生物合成途径： $\Delta 6$ 去饱和酶、 $C_{18/20}$ 延伸酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶。在一种相关方式中，术语“ $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径”是指最少包括

以下基因的 ARA 脂肪酸生物合成途径： $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶。

术语“去饱和酶”表示能够对一种或多种脂肪酸去饱和，即，导入双键，以便产生脂肪酸或感兴趣的前体的多肽。尽管在本说明书中 ω -参考系统被用于表示特定的脂肪酸，更方便的是，利用 Δ -系统从底物的羧基末端开始计数以表示去饱和酶的活性。本发明特别感兴趣的是：1.) $\Delta 8$ 去饱和酶，它使脂肪酸的位于从该分子的羧基末端开始计数的第 8 和第 9 个碳原子之间去饱和，例如，催化 EDA 转化成 DGLA 和/或 EtrA 转化成 ETA；2.) $\Delta 6$ 去饱和酶，它能催化 LA 转化成 GLA 和/或 ALA 转化成 STA；3.) $\Delta 5$ 去饱和酶，它能催化 DGLA 转化成 ARA 和/或 ETA 转化成 EPA；4.) $\Delta 4$ 去饱和酶，它能催化 DPA 转化成 DHA；5.) $\Delta 12$ 去饱和酶，它能催化油酸转化成 LA；6.) $\Delta 15$ 去饱和酶，它能催化 LA 转化成 ALA 和/或 GLA 转化成 STA；7.) $\Delta 17$ 去饱和酶，它能催化 ARA 转化成 EPA 和/或 DGLA 转化成 ETA；和 8.) $\Delta 9$ 去饱和酶，它能催化棕榈酸转化成棕榈油酸 (16:1) 和/或硬脂酸转化成油酸 (18:1)。

针对本发明 $\Delta 15$ 去饱和酶提到的术语“双功能”表示该多肽具有用油酸和亚油酸作为酶底物的能力。“酶底物”表示该多肽在活性位点与底物结合，并且以反应性方式作用于该底物。

术语“延伸酶系统”表示负责延伸脂肪酸碳链，以便产生比延伸酶作用的脂肪酸底物长 2 个碳原子的脂肪酸的一组四种酶。更具体地，这种延伸过程是与脂肪酸合酶相关发生的，其中，CoA 是酰基载体 (Lassner et al., The Plant Cell 8: 281-292 (1996))。在第一步中 (其是底物特异性和限速的)，丙二酰-CoA 与长链酰基-CoA 缩合，产生 CO_2 和 β -酮酰基-CoA (其中，酰基部分延长了两个碳原子)。随后的反应包括还原成 β -羟酰基-CoA，脱水形成烯酰基-CoA，并且第二次还原，产生延长的酰基-CoA。由延伸酶催化的反应的例子是将 GLA 转化成 DGLA，STA 转化成 ETA 和将 EPA 转化成 DPA。

为了本发明的目的，催化第一个缩合反应 (即丙二酰-CoA 转化为 β -酮酰基-CoA) 的酶统称为“延伸酶”。概言之，延伸酶的底物特异性一定程度是宽范围的，但是由于链长度和不饱和化的程度和类型而不同。因此，延伸酶可以具有不同的特异性。例如， $\text{C}_{14/16}$ 延伸酶

利用 C₁₄ 底物（如豆蔻酸），C_{16/18} 延伸酶利用 C₁₆ 底物（如棕榈酸），C_{18/20} 延伸酶利用 C₁₈ 底物（如 GLA、STA），C_{20/22} 延伸酶利用 C₂₀ 底物（如 EPA）。以相似的方式， Δ^9 延伸酶能够催化 LA 和 ALA 分别转化为 EDA 和 EtrA。重要的是注意，一些延伸酶具有广泛特异性，因此，单个酶可能能够催化一些延伸酶反应（例如，由此既作为 C_{16/18} 延伸酶，也作为 C_{18/20} 延伸酶）。在一种优选的实施方案中，最理想的是经验确定脂肪酸延伸酶的特异性，该确定是通过用脂肪酸延伸酶的基因转化合适的宿主，并且确定其对宿主的脂肪酸谱的影响。

术语“高亲和力延伸酶”或“EL1S”或“ELO1”是指底物特异性优先针对 GLA 的 C_{18/20} 延伸酶（DGLA 是延伸酶反应的产物[即 Δ^6 延伸酶]）。一种这样的延伸酶描述于 WO 00/12720，在此提供为 SEQ ID NOs: 17 和 18。但是，申请人已经证明了该酶也对 18:2（LA）和 18:3（ALA）具有一些活性。因此，SEQ ID NO: 18 显示出 Δ^9 延伸酶活性（以及其 Δ^6 延伸酶活性）。因此，概括出此处提供为 SEQ ID NO: 18 的 C_{18/20} 延伸酶可以在本发明中描述的 Δ^6 去饱和酶/ Δ^6 延伸酶途径中和 Δ^9 延伸酶/ Δ^8 去饱和酶途径中起作用，作为例如球等鞭金藻 Δ^9 延伸酶（SEQ ID NO: 40）的替代物。

术语“EL2S”或“ELO2”是指底物特异性优先针对 GLA（DGLA 是延伸酶反应的产物）和/或 STA（STA 是延伸酶反应的底物）的 C_{18/20} 延伸酶。一种这样的延伸酶描述于 U.S. 6,677,145，在此提供为 SEQ ID NOs: 20 和 21。

术语“ELO3”是指由 elo3 基因（SEQ ID NO: 53）编码的高山被孢霉 C_{16/18} 脂肪酸延伸酶（在此提供为 SEQ ID NO: 54）。术语“YE2”是指由此处提供为 SEQ ID NO: 61 的基因编码的解脂耶氏酵母 C_{16/18} 脂肪酸延伸酶（在此提供为 SEQ ID NO: 62）。基于此处报道的数据，ELO3 和 YE2 都优先催化棕榈酸（16:0）转化为硬脂酸（18:0）。

术语“YE1”是指由此处提供为 SEQ ID NO: 64 的基因编码的解脂耶氏酵母 C_{14/16} 脂肪酸延伸酶（此处提供为 SEQ ID NO: 65）。基于此处报道的数据，YE2 优先催化豆蔻酸（14:0）转化为棕榈酸（16:0）。

术语“转化效率”和“底物转化百分比”表示特定的酶（例如，

去饱和酶或延伸酶)可以将底物转化成产物的效率。转化效率是按照以下公式计算的： $([\text{产物}]/[\text{底物}+\text{产物}]) \times 100$ ，其中‘产物’包括中间产物和衍生自中间产物的所有产物。

术语“含油的”表示倾向于以脂质形式储存它们的能源的生物(Weete, In: *Fungal Lipid Biochemistry*, 2nd ed., Plenum, 1980)。通常，所述微生物的细胞油含量遵循 S 形曲线，其中，脂质的浓度增加，直到在晚对数期或早期静止生长期的最大值，然后在晚期静止期和死亡期逐渐减少(Yongmanitchai and Ward, *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 419-25 (1991))。

术语“含油酵母”表示被分类为酵母的微生物，它们能够产生油。通常，含油微生物的细胞油或三酰基甘油含量遵循 S 形曲线，其中，脂质的浓度增加，直到在晚对数期或早期静止生长期的最大值，然后在晚期静止期和死亡期逐渐减少(Yongmanitchai and Ward, *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 419-25 (1991))。含油微生物积累占干细胞重量的大约 25%以上的油并非是不常见的。含油酵母的例子包括，但不局限于以下属：耶氏酵母属，假丝酵母属，红酵母属，红冬孢属，隐球酵母属，丝孢酵母属和油脂酵母属。

术语“可发酵的碳源”表示微生物能够代谢以便产生能量的碳源。本发明的典型的碳源包括，但不局限于：单糖，寡糖，多糖，链烷，脂肪酸，脂肪酸酯，甘油一酯，甘油二酯，甘油三酯，二氧化碳，甲醇，甲醛，甲酸盐或酯以及含碳的胺。

在本文中，“分离的核酸片段”是单链或双链 RNA 或 DNA 的聚合物，它任选包括合成的，非天然的或改变了的核酸碱基。DNA 聚合物形式的分离的核酸片段可能包含一个或多个 cDNA、基因组 DNA 或合成 DNA 的片段。

氨基酸或核苷酸序列的“主要部分”是包括多肽的一定数目的氨基酸序列或基因的核苷酸序列的部分，所述数目足够通过本领域技术人员对所述序列进行的人工评估，或通过计算机自动化的序列比较，以及使用诸如 BLAST 的算法的鉴定(Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1993))而推测性地鉴定该多肽或基因。一般地，为了推测性地鉴定一种多肽或核酸序列与已知的蛋白或基因同源，具有 10 个或更多个连续氨基酸

或 30 个或更多个核苷酸的序列是必须的。此外，对于核苷酸序列，可以将包含 20-30 个连续核苷酸的基因特异性寡核苷酸探针用于基因鉴定（如 Southern 杂交）和分离（如细菌菌落或噬菌体斑的原位杂交）的序列依赖性方法中。此外，可以将 12-15 个碱基组成的短寡核苷酸用作 PCR 中的扩增引物，以获得包括引物的特定核酸片段。因此，核苷酸序列的“主要部分”包括足够的序列，以便特异性地鉴定和/或分离包括所述序列的核酸片段。

术语“互补的”被用于表示能够彼此杂交的核苷酸碱基之间的相互关系。例如，对于 DNA 来说，腺嘌呤互补于胸腺嘧啶，而胞嘧啶互补于鸟嘌呤。

“密码子简并性”表示遗传密码的性质，它允许改变核苷酸序列，而又不影响所编码的多肽的氨基酸序列。技术人员在用核苷酸密码子表示特定氨基酸时充分理解由特定宿主细胞所表现出来的“密码子偏倚”。因此，在合成用于改善在宿主细胞中的表达的基因时，需要设计所述基因，以便它的密码子选择的频率接近宿主细胞的优选密码子选择的频率。

表示 DNA 序列的“化学合成的”表示组成核苷酸是在体外组装的。DNA 的人工化学合成，可以通过使用业已建立的方法完成；或可以利用多种商业化仪器中的一种进行自动化的化学合成。“合成基因”可以由寡核苷酸基本单位组装，它们是利用本领域技术人员所公知的方法化学合成的。将这些基本单位连接在一起并且退火，以便形成基因片段，然后酶促组装，以便构建完整的基因。因此，可以对基因进行修饰，以便根据核苷酸序列的优化优化基因表达，以便体现宿主细胞的密码子偏倚。如果密码子选择偏向宿主优选的密码子，技术人员可以理解成功的基因表达的可能性。优选密码子的确定可以根据对来自宿主细胞的基因的检查，其中，可以获得序列信息。

“基因”表示能表达特定蛋白的核酸片段，其可以表示单独的编码序列，或可以包括位于编码序列前面（5'非编码序列）和后面（3'非编码序列）的调节序列。“天然基因”表示天然与它自身的调节序列一起存在的基因。“嵌合基因”表示不是天然基因的任何基因，包括不是天然一起存在的调节和编码序列。因此，嵌合基因可以包括来自不同来源的调节序列和编码序列，或来自相同的来源，但是以不同

于天然存在的方式排列的调节序列和编码序列。“内源基因”表示存在于生物基因组中的天然位置上的天然基因。“外源”基因表示通过基因转移导入所述宿主生物的基因。外源基因可以包括插入非天然生物的天然基因，或嵌合基因。“转基因”是业已通过转化方法导入所述基因组的基因。“密码子优化的基因”是具有经过设计以便模拟宿主细胞的优选的密码子选择频率的密码子选择频率的基因。

“编码序列”表示编码特定氨基酸序列的 DNA 序列。“合适的调节序列”表示位于编码序列上游（5'非编码序列），序列内，或下游（3'非编码序列）的核苷酸序列，并且，它能影响相关编码序列的转录、RNA 加工或稳定性、或翻译。调节序列可以包括启动子、翻译前导序列、内含子、聚腺苷酸化识别序列、RNA 加工位点、效应物结合位点和茎-环结构。

“启动子”表示能够控制编码序列或功能性 RNA 表达的 DNA 序列。一般，编码序列位于启动子序列的 3'。启动子可能完全来自天然基因，或者包括来自天然存在的不同启动子的不同元件，或者甚至包括合成的 DNA 片段。本领域技术人员可以理解的是，不同的启动子能够指导基因在不同的组织或细胞类型中的表达，或者在发育的不同阶段的表达，或者对不同的环境或生理学条件作出反应的表达。能导致基因在大多数细胞类型中在大多数时间表达的启动子通常被称作“组成型启动子”。还应当理解的是，由于在大多数场合下，调节序列的确切边界未能完全确定，不同长度的 DNA 片段可能具有相同的启动子活性。

术语“GPAT 启动子”或“GPAT 启动子区”是指在 gpat 基因编码的甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶（E.C. 2.3.1.15）的‘ATG’翻译起始密码子前面，并且对于表达是必须的 5'上游非翻译区。合适的解脂耶氏酵母 GPAT 启动子区的实例描述于美国专利申请 No. 11/225354。

术语“GPD 启动子”或“GPD 启动子区”是指在 gpd 基因编码的甘油醛-3-磷酸脱氢酶（E.C. 1.2.1.12）的‘ATG’翻译起始密码子前面，并且对于表达是必须的 5'上游非翻译区。合适的解脂耶氏酵母 GPD 启动子区的实例描述于 WO 2005/003310。

术语“GPM 启动子”或“GPM 启动子区”是指在 gpm 基因编码的磷酸甘油变位酶（EC 5.4.2.1）的‘ATG’翻译起始密码子前面，并

且对于表达是必须的 5'上游非翻译区。合适的解脂耶氏酵母 GPM 启动子区的实例描述于 WO 2005/003310。

术语“FBA 启动子”或“FBA 启动子区”是指在 fba1 基因编码的果糖-二磷酸醛缩酶 (E.C. 4.1.2.13) 的‘ATG’翻译起始密码子前面, 并且对于表达是必须的 5'上游非翻译区。合适的解脂耶氏酵母 FBA 启动子区的实例描述于 WO 2005/049805。

术语“FBAIN 启动子”或“FBAIN 启动子区”是指在 fba1 基因的‘ATG’翻译起始密码子前面并且对于表达是必须的 5'上游非翻译区, 加上具有 fba1 基因的内含子的 5'编码区的一部分。合适的解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子区的实例描述于 WO 2005/049805。

术语“GPDIN 启动子”或“GPDIN 启动子区”是指在 gpd 基因的‘ATG’翻译起始密码子前面并且对于表达是必须的 5'上游非翻译区, 加上具有 gpd 基因的内含子的 5'编码区的一部分。合适的解脂耶氏酵母 GPDIN 启动子区的实例描述于美国专利申请 No. 11/183664。

术语“YAT1 启动子”或“YAT1 启动子区”是指在 yat1 基因编码的铵转运蛋白酶 (TC 2.A.49; GenBank 获取号 XM_504457) 的‘ATG’翻译起始密码子前面, 并且对于表达是必须的 5'上游非翻译区。合适的解脂耶氏酵母 YAT1 启动子区的实例描述于美国专利申请 No. 11/185301。

术语“EXP1 启动子”或“EXP1 启动子区”是指在解脂耶氏酵母“YALI0C12034g”基因 (GenBank 获取号 XM_501745) 编码的蛋白的‘ATG’翻译起始密码子前面, 并且对于表达是必须的 5'上游非翻译区。基于“YALI0C12034g”与 sp|Q12207 啤酒糖酵母非经典输出蛋白 2 (其功能涉及缺乏可切割的信号序列的蛋白的输出的新途径) 的显著同源性, 该基因在此命名为 exp1 基因, 其编码命名为 EXP1 的蛋白。合适的解脂耶氏酵母 EXP1 启动子区的实例描述为 SEQ ID NO: 364, 但不意欲限制其性质。本领域技术人员可以理解, 由于 EXP1 启动子的精确边界未能完全确定, 具有增加或减少的长度的 DNA 片段可能具有相同的启动子活性。

术语“启动子活性”表示对启动子的转录效力的评估。例如, 这可以通过测量从启动子转录的 mRNA 的量而直接测定 (例如通过 Northern 印迹或引物延伸法) 或通过测量从启动子表达的基因产物的

量而检测测定。

“内含子”是大多数真核生物的基因序列（编码区、5'非编码区或3'非编码区）中存在的非编码 DNA 的序列。它们的完整功能还未知，但是，一些增强子位于内含子中（Giacopelli F. et al., Gene Expr. 11: 95-104 (2003)）。这些内含子序列是转录的，但是在 mRNA 翻译为蛋白之前，从前 mRNA 转录物中除去。内含子除去的这一过程是通过内含子的任一侧上的序列（外显子）的自我剪接发生的。

术语“增强子”是指能提高邻近的真核启动子的转录水平，从而增加基因转录的顺式调节序列。增强子可以作用于超过数万碱基的 DNA 上的启动子，并且可以在它们调节的启动子的 5'或 3'。增强子也可以位于内含子中。

术语“3'非编码序列”和“转录终止子”表示位于编码序列下游的 DNA 序列。它包括聚腺苷酸化识别序列以及编码能够影响 mRNA 加工或基因表达的调节信号的其他序列。聚腺苷酸化信号通常以影响聚腺苷酸添加在 mRNA 前体的 3'末端为特征。所述 3'区能够影响相关编码序列的转录、RNA 加工或稳定性，或翻译。

“RNA 转录物”表示由 RNA 聚合酶催化的 DNA 序列转录而得到的产物。当 RNA 转录物是所述 DNA 序列的完全互补的拷贝时，它被称作初级转录物，或者它可以是来自初级转录物的转录后加工的 RNA 序列，并且被称作成熟 RNA。“信使 RNA”或“mRNA”表示没有内含子，并且能够由细胞翻译成蛋白的 RNA。“cDNA”表示双链 DNA，它是互补于 mRNA 并且由 mRNA 衍生的。“有义”RNA 表示包括 mRNA，并能够由细胞翻译成蛋白的 RNA 转录物。“反义”RNA 表示互补于靶初级转录物或 mRNA 的全部或部分的 RNA，并且它能抑制靶基因的表达（U.S. 5,107,065; WO 99/28508）。反义 RNA 的互补性可以是与特定基因转录物的任何部分，即，在 5'非编码序列、3'非编码序列或编码序列处互补的。“功能性 RNA”表示反义 RNA、核酶 RNA、或不能翻译，但仍然能影响细胞加工的其他 RNA。

术语“可操作地连接的”表示核酸序列缔合在单个核酸片段上，以便其中一个的功能受到另一个的影响。例如，当启动子能够影响编码序列的表达时，它就是与该编码序列可操作地连接的（即，所述编码序列受所述启动子的转录控制）。编码序列能够沿有义或反义方向

可操作地与调节序列连接。

在本文中，术语“表达”表示来自本发明的核酸片段的有义（mRNA）或反义 RNA 的转录和稳定积累。表达还可以表示 mRNA 翻译成多肽。

“成熟”蛋白表示翻译后加工的多肽；即，业已除去了存在于初级翻译产物中的所有前肽或原肽的蛋白。“前体”蛋白表示 mRNA 翻译的初级产物；即，仍然存在前肽和原肽。前肽和原肽可以是（但不局限于）细胞内定位信号。

术语“重组酶”表示进行位点特异性重组，以改变 DNA 结构的酶，包括转座酶、 λ 整合/切割酶，以及位点特异性重组酶。

“重组酶位点”或“位点特异性重组酶序列”表示一种 DNA 序列，它能够被重组酶识别和结合。可以理解，其可以是野生型或突变的重组酶位点，只要保持了功能性，并且重组酶仍然可以识别该位点、结合于 DNA 序列，并且催化两个相邻重组酶位点之间的重组。

“转化”表示将核酸分子转入宿主生物，导致了遗传学稳定的遗传性。例如，核酸分子可以是能自主复制的质粒；或者它可以整合到宿主生物的基因组中。包括转化的核酸片段的宿主生物被称作“转基因”或“重组”或“转化的”生物。

术语“质粒”，“载体”和“盒”表示染色体外元件，它通常携带有不作为细胞的中心代谢部分的基因，并且通常是环状双链 DNA 片段形式的。所述元件可以是自主复制的序列、基因组整合序列、噬菌体或核苷酸序列、线性或环状的单或双链 DNA 或 RNA，可以来自任何来源，其中，多个核苷酸序列业已连接或重组成独特的结构，该结构能够将启动子片段和选定的基因产物的 DNA 序列，以及合适的 3'非翻译序列导入细胞。“表达盒”表示包括外源基因，并且除了外源基因之外，还具有能够增强基因在外源宿主中表达的元件的特定载体。

术语“同源重组”表示两个 DNA 分子之间的 DNA 片段的交换（在交换过程中）。交换的片段的侧翼是两个 DNA 分子之间的相同核苷酸序列的位点（即“同源区”）。术语“同源区”是指核酸片段上参与同源重组的、彼此具有同源性的核苷酸序列段。当这些同源区的长度为至少约 10 bp，优选长度为至少约 50 bp 时，通常发生有效同源

重组。典型地，意欲用于重组的片段含有至少两个同源区，其中需要靶定的基因破坏或替代。

术语“序列分析软件”表示可用于分析核苷酸或氨基酸序列的任何计算机算法或软件程序。“序列分析软件”可以通过商业渠道获得的或者独立开发的。典型的序列分析软件包括，但不局限于：1.) GCG 程序组 (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); 2.) BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)); 3.) DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI); 和 4.) 采用了 Smith-Waterman 算法的 FASTA 程序 (W. R. Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor (s): Suhai, Sandor. Plenum: New York, NY)。在本申请的范围内应当理解的是，在将序列分析软件用于分析时，分析的结果是基于有关程序的“缺省值”的，除非另有说明。在本文中，“缺省值”表示在初次初始化时最初随所述软件加载的任何组的值或参数。

术语“保守结构域”或“基序”表示在沿着进行比对的进化上相关的蛋白的序列的特定位置上保守的一组氨基酸。尽管其它位置的氨基酸在同源蛋白之间可以不同，但在特定位置高度保守的氨基酸表明这些氨基酸是蛋白的结构、稳定性或活性必须的。由于它们是通过在比对的蛋白同源物家族的序列中的高保守程度鉴定的，它们可以用作标识物，或“信号”，来确定具有新确定的序列的蛋白是否属于以前鉴定的蛋白家族。表明具有 $\Delta 15$ 去饱和酶活性的真菌蛋白的基序提供为 SEQ ID NO: 374，而表明具有 $\Delta 12$ 去饱和酶活性的真菌蛋白的基序提供为 SEQ ID NO: 375。

本发明所使用的标准重组 DNA 和分子克隆技术是本领域众所周知的，并且描述于以下文献中：Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (下文称作“Maniatis”); Silhavy, T. J., Bennis, M. L. and Enquist, L. W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984); 和 Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) 出版的 Ausubel, F. M. et al.,

Current Protocols in Molecular Biology.

用于生产 ARA 的优选微生物宿主：解脂耶氏酵母

在申请人的工作之前（参见 Picataggio et al., WO2004/101757），以前还没有将含油酵母检验为适于用作 PUFAs 的生产平台的一类微生物。通常鉴定为含油酵母的属包括但不限于：但不局限于：耶氏酵母属、假丝酵母属、红酵母属、红冬孢属、隐球酵母属、丝孢酵母属和油脂酵母属。更具体地讲，典型的油合成酵母包括：类酵母红冬孢、斯达氏油脂酵母、产油油脂酵母、拉可夫氏假丝酵母、铁红假丝酵母、热带假丝酵母、产朊假丝酵母、茁芽丝孢酵母、皮状丝孢酵母、胶粘红酵母、禾木科红酵母和解脂耶氏酵母（以前被划分为解脂假丝酵母）。

认为含油酵母具有一些性质，能够促进它们用作 ARA 的经济、商业生产的宿主生物。首先，这些生物定义为天然能够合成和积累油的那些，其中油可以占细胞干重的大约 25% 以上，更优选占细胞干重的大约 30% 以上，最优选占细胞干重的大约 40% 以上。其次，已经充分开发了培养具有高油含量的含油酵母的技术（例如，参见 EP 0 005 277B1; Ratledge, C., Prog. Ind. Microbiol. 16: 119-206 (1982)）。这些生物过去已经在商业上用于多种目的。例如，已经将解脂耶氏酵母的多种菌株用于制造和生产以下物质：异柠檬酸裂解酶（DD259637）；酯酶（SU1454852, WO2001083773, DD279267）；多羟基链烷酸（WO2001088144）；柠檬酸（RU2096461, RU2090611, DD285372, DD285370, DD275480, DD227448, PL160027）；赤藓糖醇（EP770683）；2-氧戊二酸（DD267999）； γ -癸内酯（U.S. 6,451,565, FR2734843）； γ -十二内酯（EP578388）；和丙酮酸（JP09252790）。

在分类为含油酵母的生物中，为了此处的目的，将解脂耶氏酵母选作优选的微生物宿主。这种选择基于以下知识，即含油菌株能够将 ω -3 脂肪酸级分掺入 TAG 级分中，该生物易于进行遗传操作，和以前将该物种作为食品级柠檬酸的通常认识到的安全（“GRAS”，根据美国食品和药品监督管理局）来源。在进一步的实施方案中，根据针对具有高脂质含量（测量为干重的百分比）和高体积产率（测量为 g/L h^{-1} ）的野生型菌株的鉴定的初步研究，最优选的是命名为 ATCC #20362、ATCC #8862、ATCC #18944、ATCC #76982 和/或 LGAM S

(7) 1 的解脂耶氏酵母菌株 (Papanikolaou S., and Aggelis G., Bioresour. Technol. 82 (1): 43-9 (2002))。

如 WO 2004/101757 中的描述, 以前通过导入和表达编码 ω -3/ ω -6 生物合成途径的基因, 对解脂耶氏酵母进行基因工程化, 以分别生产 1.3% ARA 和 1.9% EPA。更具体地, 分别转化两种不同的 DNA 表达构建体 (包含用于合成 ARA 的 Δ 6 去饱和酶、 Δ 5 去饱和酶和高亲和力 PUFA C18/20 延伸酶或用于合成 EPA 的 Δ 6 去饱和酶、 Δ 5 去饱和酶、高亲和力 PUFA C18/20 延伸酶和密码子优化的 Δ 17 去饱和酶), 并且整合到编码乳清苷-5'-磷酸脱羧酶 (EC 4.1.1.23) 的解脂耶氏酵母染色体 URA3 基因中。用合适的底物饲养的宿主细胞的 GC 分析检测到了 ARA 和 EPA 的生产。尽管适于证明进行基因工程化以生产 ω -6 和 ω -3 脂肪酸的含油宿主的能力, 但该工作没有进行复杂的代谢工程化, 所述代谢工程化是合成占总油级分的 5%以上的 ARA, 或更优选占总油级分的 10%以上的 ARA, 或甚至更优选占总油级分的 15-20% 以上的 ARA, 或最优选占总油级分的 25-30%以上的 ARA 所需要的。

在共同未决的美国专利申请 No. 60/624812 中, 进行了解脂耶氏酵母中的复杂的代谢工程化, 以便: (1) 鉴定允许合成和大量积累 EPA 的优选去饱和酶和延伸酶; (2) 操作酰基转移酶的活性, 所述酰基转移酶使得能够将 ω 脂肪酸转移到存储脂质库中; (3) 通过使用强启动子、以多拷贝表达和/或密码子优化, 超量表达去饱和酶、延伸酶和酰基转移酶; (4) 下调 PUFA 生物合成中减少 EPA 的总积累的特定基因的表达; 和 (5) 操作影响 EPA 生产的途径和总体调节剂。这导致在解脂耶氏酵母的一个特定重组菌株中生产了最高达 28% 的 EPA。

在本申请中, 进行了类似的复杂代谢工程化, 导致在解脂耶氏酵母的重组菌株中生产了占总油级分的 10-14% 的 ARA。更具体地, 对菌株 Y2034 和 Y2047 进行基因工程化, 以便利用 Δ 6 去饱和酶/ Δ 6 延伸酶途径, 并且生产分别包含 10% ARA 和 11% ARA 的油; 对菌株 Y2214 进行基因工程化, 以便利用 Δ 9 延伸酶/ Δ 8 去饱和酶途径, 从而生产包含 12% ARA 并且不含 GLA 的油。下文将讨论代谢工程化的方面, 并且将讨论发酵方法, 以进一步增强该含油酵母中的 ARA 生产能力。

概述：脂肪酸和甘油三酯的微生物生物合成

一般地，含油微生物中的脂质积累是反应于生长培养基中存在的总体碳氮比而引发的。导致游离棕榈酸（16:0）在含油微生物中从头合成的该过程详细描述于 2004/101757。棕榈酸是长链饱和和不饱和脂肪酸衍生物的前体，其通过延伸酶和去饱和酶的作用形成。例如，通过 $\Delta 9$ 去饱和酶的作用，棕榈酸转化为其不饱和衍生物[棕榈油酸（16:1）]。类似地，棕榈酸由 $C_{16/18}$ 脂肪酸延伸酶延伸形成硬脂酸（18:0），其可以通过 $\Delta 9$ 去饱和酶转化为其不饱和衍生物，从而产生油酸（18:1）。

通过一系列反应形成 TAGs（脂肪酸的主要存储单位），所述一系列反应包括：1.) 一个分子的酰基-CoA 通过酰基转移酶酯化为甘油-3-磷酸，以产生溶血磷脂酸；2.) 第二个分子的酰基-CoA 通过酰基转移酶酯化，产生 1,2-二酰基甘油磷酸（通常鉴定为磷脂酸）；3.) 由磷脂酸磷酸酶除去一个磷酸，产生 1,2-二酰基甘油（DAG）；和 4.) 通过酰基转移酶的作用加入第三个脂肪酸，以形成 TAG（图 2）。

可以将广泛的脂肪酸掺入 TAGs，包括饱和和不饱和脂肪酸，以及短链和长链脂肪酸。可以通过酰基转移酶掺入 TAGs 的脂肪酸的一些非限定性实例包括：癸酸（10:0）、月桂酸（12:0）、豆蔻酸（14:0）、棕榈酸（16:0）、棕榈油酸（16:1）、硬脂酸（18:0）、油酸（18:1）、11-十八碳酸烯酸（18:1）、LA、桐酸（18:3）、ALA、GLA、花生酸（20:0）、EDA、EtrA、DGLA、ETA、ARA、EPA、山俞酸（22:0）、DPA、DHA、二十四酸（24:0）、神经酸（24:1）、蜡酸（26:0）和褐煤酸（28:0）脂肪酸。在本发明的一种优选实施方案中，最理想的是将 EPA 掺入 TAG。

ARA，即一种 ω -3 脂肪酸的生物合成

将油酸转化为 ARA 的代谢过程包括通过加入碳原子而进行的碳链延伸和通过加入双键使分子去饱和。这需要内质网膜中存在一系列的去饱和酶和延伸酶。但是，如图 1 所示和下文的描述，ARA 生产存在两种替代途径。

具体地，所有途径都需要通过 $\Delta 12$ 去饱和酶的作用最初将油酸转化为 LA（18:2），即 ω -6 脂肪酸的第一个。然后，利用 ARA 生物合成的“ ω -6 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径”，PUFAs 通过如下过程形成：

(1) 通过 $\Delta 6$ 去饱和酶的作用，LA 转化为 GLA；(2) 通过 $C_{18/20}$ 延伸酶的作用，GLA 转化为 DGLA；和 (3) 通过 $\Delta 5$ 去饱和酶的作用，DGLA 转化为 ARA。

或者，通过“ ω -6 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径”，LA 通过 $\Delta 9$ 延伸酶的作用转化为 EDA。然后， $\Delta 8$ 去饱和酶将 EDA 转化为 DGLA。随后，如上文所述，DGLA 随后通过 $\Delta 5$ 去饱和酶的作用去饱和，产生 ARA。

为了清楚，在下表中概括了这些途径的每一个，以及它们的区别特征：

表 4
ARA 生物合成的替代生物合成途径

名称	合成ARA最少需要的 基因*	途径
$\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径	$\Delta 6D$, $C_{18/20}$ ELO, $\Delta 5D$	---
$\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径	$\Delta 9$ ELO, $\Delta 8D$, $\Delta 5D$	生产不含GLA的油
组合 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径和 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径	$\Delta 6D$, $C_{18/20}$ ELO, $\Delta 9$ ELO, $\Delta 8D$, $\Delta 5D$	---

*缩写：“D”=去饱和酶；“ELO”=延伸酶。

如果需要，可以用 ARA 作为底物，生产一些其它的 PUFAs。例如，通过 $\Delta 17$ 去饱和酶的作用，ARA 可以进一步去饱和为 EPA，随后通过 $C_{20/22}$ 延伸酶和 $\Delta 4$ 去饱和酶的作用，转化为 DHA。

选择用于合成 ARA 的微生物基因

需要导入解脂耶氏酵母以生产 ARA 的特定功能性将依赖于宿主细胞（及其天然 PUFA 谱和/或去饱和酶/延伸酶谱）、底物的可获得性和需要的终产物。至于天然宿主细胞，已知解脂耶氏酵母可以天然产生 18:2 脂肪酸，因此具有天然 $\Delta 12$ 去饱和酶（SEQ ID NOs: 23 和

24; 参见 WO 2004/104167)。至于需要的终产物, 上文已经在如此产生的油的最终脂肪酸谱(即最终的高 ARA 油组合物中的%GLA)方面描述了与 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径表达不同的 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径表达的结果。

因此, 在一些实施方案中, 需要通过 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径生产 ARA。因此, 为了进行 ARA 生物合成, 最少必须将以下基因导入宿主生物并表达: $\Delta 6$ 去饱和酶、 $C_{18/20}$ 延伸酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶。在进一步优选的实施方案中, 宿主菌株还包含下组的至少一种: $\Delta 9$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶、 $C_{14/16}$ 延伸酶和 $C_{16/18}$ 延伸酶。

在一种替代的实施方案中, 需要生产 ARA, 而不共同合成 GLA (因此需要表达 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径)。因此, 为了进行 ARA 生物合成, 该策略最少必须将以下基因导入宿主生物并表达: $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶。在进一步优选的实施方案中, 宿主菌株还包含下组的至少一种: $\Delta 9$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶、 $C_{14/16}$ 延伸酶和 $C_{16/18}$ 延伸酶。

本领域技术人员将能够鉴定编码 ARA 生物合成所需的每一种酶的多种候选基因。有用的去饱和酶和延伸酶序列可以来源于任何来源, 如分离自天然来源(如细菌、藻类、真菌、植物、动物等), 通过半合成途径产生或从头合成。尽管导入宿主中的去饱和酶和延伸酶基因的特定来源对于本发明不是关键的, 但用于选择具有去饱和酶或延伸酶活性的特定多肽的考虑包括: 1) 多肽的底物特异性; 2) 多肽或其成分是否是限速酶; 3.) 去饱和酶或延伸酶对于需要的 PUFA 的合成是否是必须的; 和/或 4.) 多肽需要的辅因子。表达的多肽优选具有与其在宿主细胞中的位置的生化环境相容的参数。例如, 多肽可能必须与宿主细胞中的其它酶竞争底物。因此, 在确定特定多肽对于改变特定宿主细胞中的 PUFA 生产的合适性中, 可能需要考虑多肽的 K_M 分析和比活性。用于特定宿主细胞中的多肽是可以在目的宿主细胞中存在的生化条件下起作用的多肽, 但也可以是具有能够改变需要的 PUFA 的去饱和酶或延伸酶活性的任何多肽。

在其它实施方案中, 考虑每种特定去饱和酶和/或延伸酶的转化效率也是有用的。更具体地, 由于每种酶很少以 100%的效率将底物转化为产物, 在宿主细胞中生产的未纯化油的最终脂质谱将典型是多种

PUFAs 的混合物, 其由需要的 ARA 和多种上游中间体 PUFAs 组成 (例如, 与 100% ARA 油不同)。因此, 当对 ARA 的生物合成进行优化时, 考虑每种酶的转化效率也是重要的, 必须根据产物的最终需要的脂质谱进行考虑。

根据上述每一种考虑, 可以根据公众可获得的文献 (如 GenBank)、专利文献和具有生产 PUFAs 的能力的微生物的实验分析, 鉴定具有合适去饱和酶和延伸酶活性的候选基因。例如, 以下 GenBank 获取号表示公众可获得的用于 ARA 生物合成的基因的实例: AY131238, Y055118, AY055117, AF296076, AF007561, L11421, NM_031344, AF465283, AF465281, AF110510, AF465282, AF419296, AB052086, AJ250735, AF126799, AF126798 ($\Delta 6$ 去饱和酶); AF199596, AF226273, AF320509, AB072976, AF489588, AJ510244, AF419297, AF07879, AF067654, AB022097 ($\Delta 5$ 去饱和酶); AAG36933, AF110509, AB020033, AAL13300, AF417244, AF161219, AY332747, AAG36933, AF110509, AB020033, AAL13300, AF417244, AF161219, X86736, AF240777, AB007640, AB075526, AP002063 ($\Delta 12$ 去饱和酶); NP_441622, BAA18302, BAA02924, AAL36934 ($\Delta 15$ 去饱和酶); AF338466, AF438199, E11368, E11367, D83185, U90417, AF085500, AY504633, NM_069854, AF230693 ($\Delta 9$ 去饱和酶); AF390174 ($\Delta 9$ 延伸酶); AF139720 ($\Delta 8$ 去饱和酶); 和 NP_012339, NP_009963, NP_013476, NP_599209, BAB69888, AF244356, AAF70417, AAF71789, AF390174, AF428243, NP_955826, AF206662, AF268031, AY591335, AY591336, AY591337, AY591338, AY605098, AY605100, AY630573 ($C_{14/16}$, $C_{16/18}$ 和 $C_{18/20}$ 延伸酶)。类似地, 专利文献提供了很多参与 PUFA 生产的基因的额外 DNA 序列 (和/或关于上述一些基因和它们的分离方法的细节) [例如, WO 02/077213 ($\Delta 9$ 延伸酶); WO 00/34439 和 WO 04/057001 ($\Delta 8$ 去饱和酶); U.S. 5,968,809 ($\Delta 6$ 去饱和酶); U.S. 5,972,664 和 U.S. 6,075,183 ($\Delta 5$ 去饱和酶); WO 94/11516, U.S. 5,443,974, WO 03/099216 和 WO 05/047485 ($\Delta 12$ 去饱和酶); WO 93/11245 ($\Delta 15$ 去饱和酶); WO 91/13972 和 U.S. 5,057,419 ($\Delta 9$ 去饱和酶); U.S. 2003/0196217 A1 ($\Delta 17$ 去饱和酶); 以及 WO 00/12720, U.S. 6,403,349, U.S. 6,677,145,

U.S. 2002/0139974A1, U.S. 2004/0111763 ($C_{14/16}$, $C_{16/18}$ 和 $C_{18/20}$ 延伸酶)]。在此全文引入这些专利和申请作为参考。

上文的实例不是限制性的, 来源于不同来源的许多其它基因也适于导入解脂耶氏酵母, 所述其它基因编码 (1) $\Delta 6$ 去饱和酶、 $C_{18/20}$ 延伸酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶 (和任选的其它编码 $\Delta 9$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶、 $C_{14/16}$ 延伸酶和/或 $C_{16/18}$ 延伸酶的基因); 或 (2) $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶 (和任选的其它编码 $\Delta 9$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶、 $C_{14/16}$ 延伸酶和/或 $C_{16/18}$ 延伸酶的基因)。

用于 ARA 合成的优选基因

尽管可以广泛选自能够适于在解脂耶氏酵母中表达的去饱和酶和延伸酶, 但是, 在本发明的优选实施方案中, 去饱和酶和延伸酶选自以下这些 (或其衍生物):

表 5

用于在解脂耶氏酵母中进行 ARA 生物合成的优选去饱和酶和延伸酶

ORF	生物	参考文献	SEQ ID NOs
$\Delta 6$ 去饱和酶	高山被孢霉	GenBank 获取号 AF465281; U.S. 5,968,809	1, 2
$\Delta 6$ 去饱和酶	高山被孢霉	GenBank 获取号 AB070555	4, 5
$C_{18/20}$ 延伸酶 ("ELO1")	高山被孢霉	GenBank 获取号 AX464731; WO 00/12720	17, 18
$C_{18/20}$ 延伸酶 ("ELO2")	金黄色破囊壶菌	U.S. 6,677,145	20, 21
$\Delta 9$ 延伸酶	球等鞭金藻	GenBank 获取号 AF390174	39, 40
$\Delta 8$ 去饱和酶	纤细眼虫	共同未决的美国专利申请 11/166993	44, 45
$\Delta 5$ 去饱和酶	高山被孢霉	GenBank 获取号 AF067654; U.S. 6,075,183	6, 7
$\Delta 5$ 去饱和酶	球等鞭金藻	WO 02/081668 A2	8, 9
$\Delta 5$ 去饱和酶	人	GenBank 获取号 NP_037534	11, 12

C_{16/18} 延伸酶 (“YE2”)	解脂耶氏酵母	--	61, 62
C_{16/18} 延伸酶 (“ELO3”)	高山被孢霉	-	53, 54
C_{16/18} 延伸酶 (rELO2)	褐家鼠	GenBank 获取号 AB071986	50, 51
C_{14/16} 延伸酶 (“YE1”)	解脂耶氏酵母	--	64, 65
Δ12 去饱和酶	解脂耶氏酵母	WO 2004/104167	23, 24
Δ12 去饱和酶	深黄被孢霉	GenBank 获取号 AF417245	25, 26
Δ12 去饱和酶 (Fm d12)	串珠镰孢	WO 2005/047485	27, 28
Δ12 去饱和酶 (An d12)	构巢曲霉	构巢曲霉基因组项目中的重 叠群 1.15 (支架 1) ; AAG36933; WO 2005/047485	29, 30
Δ12 去饱和酶	黄曲霉	GenBank 获取号 AY280867 (VERSION AY280867.1; gi: 30721844) ; WO 2005/047485	31
Δ12 去饱和酶 (Afd12p)	烟曲霉	烟曲霉基因组项目中的反向 AFA.133c 344248:345586 (AfA5C5.001c) ; WO 2005/047485	32
Δ12 去饱和酶 (Mg d12)	Magnaporthe grisea	M. grisea 基因组项目中的重 叠群 2.375 中的基因座 MG01985.1; WO 2005/047485	33, 34
Δ12 去饱和酶 (Nc d12)	粗糙链孢霉	GenBank 获取号 AABX01000374; WO2005/047485	35, 36
Δ12 去饱和酶 (Fg d12)	禾谷镰孢	禾谷镰孢基因组项目中的重 叠群 1.233; WO 2005/047485	37, 38
Δ12 去饱和酶 (Mad12)	高山被孢霉	GenBank 获取号 AB020033	357, 358

$\Delta 12$ 去饱和酶 (Skd12)	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	GenBank 获取号 BAD08375	359
$\Delta 12$ 去饱和酶 (Kld12p)	乳克鲁维氏酵母	来自 “Yeast project Genolevures” 的乳克鲁维氏酵母数据库的反义 <u>Klla0B:35614..36861 (m)</u> 的 gnl GLV KLLA0B00473g ORF (Center for Bioinformatics, LaBRI, Talence Cedex, France)	360, 361
$\Delta 12$ 去饱和酶 (Cad12p)	白色假丝酵母	GenBank 获取号 EAK94955	362
$\Delta 12$ 去饱和酶 (Dhd12p)	汉逊氏德巴利氏酵母 CBS767	GenBank 获取号 CAG90237	363

*注：烟曲霉基因组项目由 Sanger Institute、University of Manchester 的合作者和 The Institute of Genome Research (TIGR) 资助；构巢曲霉基因组项目由 Center for Genome Research (CGR) ， Cambridge, MA 资助；M. grisea 基因组项目由 CGR 和 International Rice Blast Genome Consortium 资助；禾谷镰孢基因组项目由 CGR 和 the International *Gibberella zeae* Genomics Consortium (IGGR) 资助。

申请人进行了关于多种延伸酶的大量分析，以确定或证实在解脂耶氏酵母中表达时每种酶的底物特异性和/或底物选择性。例如，尽管两种解脂耶氏酵母延伸酶的编码序列都是公众可获得的，并且每种蛋白被注释为推定的长链脂肪酰基延伸酶或与其它脂肪酸延伸酶具有显著的同源性，但还没有确定这些酶的底物特异性。基于此处进行的分析，YE1 被肯定地确定为优先利用 C_{14} 脂肪酸作为底物制备 C_{16} 脂肪酸的脂肪酸延伸酶（即 $C_{14/16}$ 延伸酶），YE2 确定为优先利用 C_{16} 脂肪酸作为底物制备 C_{18} 脂肪酸的脂肪酸延伸酶（即 $C_{16/18}$ 延伸酶）。相关地，当鉴定出新的高山被孢霉 ELO3 基因时，该序列表征为与其它脂肪酸延伸酶同源。但是，需要进行脂质谱分析，以证实 ELO3 作为 $C_{16/18}$ 延伸酶的特异性。

对于 $\Delta 12$ 去饱和酶, 申请人得到了出乎意料的发现, 即串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶(由 SEQ ID NO: 27 编码)以比天然解脂耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶更高的效率起作用, 在解脂耶氏酵母中生产 18:2 (参见 WO 2005/047485)。具体地, 确定解脂耶氏酵母中 TEF 启动子控制下的串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶的表达, 以产生比以前通过表达 TEF 启动子控制下的编码解脂耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶的嵌合基因可获得的水平(59% 的 LA 产物积累)更高水平的 18:2 (68% 的 LA 产物积累)。这相应于底物转化百分比的差异(计算为 $([18:2+18:3]/[18:1+18:2+18:3]) \times 100$), 分别是 85% 和 74%)。在这些结果的基础上, 相对于其它已知 $\Delta 12$ 去饱和酶, 作为对解脂耶氏酵母的高 ARA 生产菌株进行工程化的一种手段的本发明的真菌串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶的表达是优选的(但是, 本领域技术人员可以预期, 串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶的活性可以在解脂耶氏酵母中增强, 然后进行例如密码子优化)。

尽管目前将串珠镰孢 $\Delta 12$ 酶鉴定为优选的 $\Delta 12$ 去饱和酶, 最近已经鉴定了五种新的 $\Delta 12$ 去饱和酶, 它们可能能够在解脂耶氏酵母中以改进的效率起作用。具体地, *Saccharomyces kluyveri* $\Delta 12$ 去饱和酶 (GenBank 获取号 BAD08375) 描述于 Watanabe et al. (Biosci. Biotech. Biocheml. 68 (3): 721-727 (2004)), 而来自高山被孢霉的 $\Delta 12$ 去饱和酶 (GenBank 获取号 AB182163) 描述于 Sakuradani et al. (Eur. J. Biochem. 261 (3): 812-820 (1999))。由于随后用这两种序列鉴定 *S. Kluyveri* 和高山被孢霉 $\Delta 15$ 去饱和酶(分别是 GenBank 获取号 BAD11952 和 AB182163), 这两对蛋白提供了与串珠镰孢、构巢曲霉、*Magnaporthe grisea*、粗糙链孢霉和禾谷镰孢的 $\Delta 12$ 和 $\Delta 15$ 去饱和酶相似的密切相关的真菌 $\Delta 12$ 和 $\Delta 15$ 去饱和酶的额外实例(参见 WO 2005/047480 和 WO 2005/047485)。这一发现提供了额外的支持, 证明申请人以前的假设, 即, “成对的”真菌 $\Delta 12$ 去饱和酶样序列很可能包含一种具有 $\Delta 15$ 去饱和酶活性的蛋白和一种具有 $\Delta 12$ 去饱和酶活性的蛋白。因此, 本文中在乳克鲁维氏酵母、白色假丝酵母、汉逊氏德巴利氏酵母 CBS767 和烟曲霉中鉴定了相似的“成对的” $\Delta 12$ 去饱和酶样蛋白; 并且, 如预测的, 比对的每对蛋白中的一个成员与以前鉴定的 *S. kluyveri* $\Delta 12$ 去饱和酶(即乳克鲁维氏酵母 gnl|GLV|KLLA0B00473g ORF, 白色假丝酵母 GenBank 获取号

EAK94955 和汉逊氏德巴利氏酵母 CBS767 GenBank 获取号 CAG90237) 关系更密切, 而另一个成员与 *S. kluyveri* $\Delta 15$ 去饱和酶 (乳克鲁维氏酵母 GenBank 获取号 XM_451551, 汉逊氏德巴利氏酵母 CBS767 GenBank 获取号 CAG88182, 白色假丝酵母 GenBank 获取号 EAL03493) 关系更密切。因此, 基于这一分析, 申请人鉴定了在此表示为 SEQ ID Nos: 358、359、361、362 和 363 的去饱和酶为推定的真菌 $\Delta 12$ 去饱和酶, 它们在解脂耶氏酵母中的超量表达可以用于增加 ω -6 脂肪酸的生产。

在额外的实施方案中, 申请人鉴定了容易区分具有 $\Delta 15$ 去饱和酶活性与 $\Delta 12$ 去饱和酶活性的真菌序列的手段。具体地, 当分析包含 $\Delta 12$ 去饱和酶 (即 Mad12, Skd12, Nc d12, Fm d12, Mg d12, An d12, Fg d12, Dhd12p, Kld12p, Cad12p, Afd12p, Mad15, Skd15, Nc d15, Fm d15, Mg d15, An d15, Fg d15, Dhd15p, Kld15p, Cad15p 和 Afd15p (参见上文的表)) 以及 $\Delta 15$ 去饱和酶 (即来自串珠镰孢、构巢曲霉、*Magnaporthe grisea*、粗糙链孢霉、禾谷镰孢、高山被孢霉、乳克鲁维氏酵母、白色假丝酵母、*Saccharomyces kluyveri*、汉逊氏德巴利氏酵母 CBS767 和烟曲霉) 的氨基酸序列比对时, 很明显的是所有真菌 $\Delta 15$ 或 $\Delta 12$ 去饱和酶分别在相应于串珠镰孢 $\Delta 15$ 去饱和酶 (WO 2005/047479 中的 SEQ ID NO: 2) 的 102 位并且与高度保守的 His Box 1 (“HECGH”; SEQ ID NO: 373) 仅仅间隔三个氨基酸残基的位置含有 Ile 或 Val 氨基酸残基 (表 6)。

表 6

在真菌 $\Delta 12$ 和 $\Delta 15$ 去饱和酶的保守 His Box 1 附近的氨基酸比对

相应的氨基酸残基	基序	去饱和酶
SEQ ID NO: 358 的 107-118	WVLAHECGHQSF	Mad12
SEQ ID NO: 359 的 116-127	WVLAHECGHQAF	Skd12
SEQ ID NO: 36 的 153-164	WVLAHECGHQAF	Nc d12
SEQ ID NO: 28 的 149-160	WVIAHECGHGAF	Fm d12
SEQ ID NO: 34 的 160-171	WVLAHECGHQAF	Mg d12
SEQ ID NO: 30 的 143-154	WVLAHECGHQAF	An d12
SEQ ID NO: 38 的 130-141	WVIAHECGHGAF	Fg d12
SEQ ID NO: 361 的 106-117	WVLAHECGHQAF	Kld12p
SEQ ID NO: 362 的 135-146	WVLAHECGHQAF	Cad12p
SEQ ID NO: 363 的 120-131	WVLAHECGHQAF	Dhd12p
SEQ ID NO: 32 的 142-153	WVLAHECGHQAF	Afd12p
GenBank 获取号 AB182163 的 105-116	WILAHCECGHGAF	高山被孢霉 $\Delta 15$
GenBank 获取号 BAD11952 的 117-128	WILAHCECGHS AF	<i>S. kluyveri</i> $\Delta 15$
WO 2005/047479 中 SEQ ID NO: 14 的 119-130	WILAHCECGHGAF	粗糙链孢霉 $\Delta 15$
WO 2005/047479 中 SEQ ID NO: 2 的 101-112	WILGHECGHGAF	串珠镰孢 $\Delta 15$
WO 2005/047479 中 SEQ ID NO: 12 的 95-106	WILAHCECGHGAF	<i>M. grisea</i> $\Delta 15$
WO 2005/047479 中 SEQ ID NO: 6 的 88-99	WILAHCECGHGAF	构巢曲霉 $\Delta 15$
WO 2005/047479 中 SEQ ID NO: 18 的 101-112	WILGHECGHGAF	禾谷镰孢 $\Delta 15$
GenBank 获取号 XM_451551 的 117-128	WILAHCECGHGAF	乳克鲁维氏 酵母 $\Delta 15$
GenBank 获取号 EAL03493 的 130-141	WILAHCECGHGAF	白色假丝酵 母 $\Delta 15$
GenBank 获取号 CAG88182 的 132-143	WILAHCECGHGAF	汉逊氏德巴 利氏酵母 <i>CBS767</i> $\Delta 15$
GenBank 获取号 EAL85733 的 94-105	WILAHCECGHGAF	烟曲霉 $\Delta 15$

申请人概括出此位置的 Ile 和 Val 分别是真菌去饱和酶中 $\Delta 15$ 和 $\Delta 12$ 去饱和酶特异性的决定簇。更具体地, 申请人认为在相应残基具有 Ile (即, 或基序 IXXHECGH[SEQ ID NO: 374]) 的任何真菌 $\Delta 12$ 去饱和酶样蛋白将是 $\Delta 15$ 去饱和酶, 在相应残基具有 Val (即, 或基序 VXXHECGH[SEQ ID NO: 375]) 的任何真菌 $\Delta 12$ 去饱和酶样蛋白将是 $\Delta 12$ 去饱和酶。因此, 这一单个的亮氨酸/缬氨酸将是未来鉴定和注释真菌去饱和酶时考虑的重要残基。此外, 申请人认为在编码真菌 $\Delta 12$ 去饱和酶样蛋白(如 WO 2005/047479 中描述为 SEQ ID NO: 2 的串珠镰孢去饱和酶)的基因中, 在此位置导致 Ile 改变为 Val 的突变将改变酶特异性, 例如对 $\Delta 12$ 去饱和酶的特异性; 并且, 相反, 在此位置的导致 Val 改变为 Ile 的突变将改变酶特异性, 例如对 $\Delta 15$ 去饱和酶的特异性。

当然, 在本发明的替代实施方案中, 也可以用与 SEQ ID NOs: 2, 5, 7, 9, 12, 18, 21, 24, 26, 28, 30-32, 34, 36, 38, 40, 45, 51, 54, 62, 65, 358, 359 和 361-363 编码的去饱和酶和延伸酶基本相同的其它 DNAs 在解脂耶氏酵母中生产 ARA。“基本相同”表示以优选性增加的顺序与选定的多肽或编码氨基酸序列的核酸序列表现出至少 80%、90%或 95%同源性的氨基酸序列或核酸序列。对于多肽, 比较序列的长度通常是至少 16 个氨基酸, 优选至少 20 个氨基酸, 或最优选 35 个氨基酸。对于核酸, 比较序列的长度通常是至少 50 个核苷酸, 优选至少 60 个核苷酸, 更优选至少 75 个核苷酸, 最优选 110 个核苷酸。

同源性典型地是用序列分析软件测量的, 其中术语“序列分析软件”表示可用于分析核苷酸或氨基酸序列的任何计算机算法或软件程序。“序列分析软件”可以通过商业渠道获得的或者独立开发的。典型的序列分析软件包括, 但不局限于: 1.) GCG 程序组 (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); 2.) BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)); 3.) DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI); 和 4.) 采用了 Smith-Waterman 算法的 FASTA 程序 (W. R. Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor (s): Suhai, Sandor. Plenum:

New York, NY)。在本申请的范围内应当理解的是，在将序列分析软件用于分析时，分析的结果是基于有关程序的“缺省值”的，除非另有说明。在本文中，“缺省值”表示在初次初始化时最初随所述软件加载的任何组的值或参数。一般地，所述计算机软件通过给多个取代、缺失和其它修饰赋予同源性程度而匹配相似的序列。

在更优选的实施方案中，利用了编码与 SEQ ID NOs: 2、9、12、18、21、40、45 和 51 描述的序列基本相同的去饱和酶和延伸酶的密码子优化的基因。具体地，如本领域技术人员公知的，可以通过增加编码的 mRNAs 的翻译效率，增加异源基因的表达，所述翻译效率的增加是通过用选择的宿主微生物中进行最优基因表达的密码子替代天然基因中的密码子而实现的。因此，修饰要是在外源宿主中表达的编码特定多肽的密码子的一部分通常是有用的，这样，修饰的多肽利用替代宿主优选的密码子，并且，宿主优选的密码子的利用可以显著增强编码多肽的外源基因的表达。

一般地，通过检验蛋白（优选以最大量表达的那些）中的密码子选择和确定哪些以最高的频率使用，可以在特定感兴趣的宿主物种中确定宿主优选的密码子。然后，可以用宿主物种中优选的密码子全部或部分地合成感兴趣的多肽（如去饱和酶、延伸酶、酰基转移酶）的编码序列。也可以合成 DNA 的全部（或部分），以除去转录的 mRNA 中存在的任何二级结构去稳定序列或区域。也可以合成 DNA 的全部（或部分），以将碱基组成改变成在需要的宿主细胞中更优选的组成。

此外，已经发现翻译起始密码子‘ATG’附近的核苷酸序列影响酵母细胞中的表达。如果需要多肽在酵母中的表达不良，可以修饰外源基因的核苷酸序列，以引入有效的酵母翻译起始序列，获得最优的基因表达。为了在酵母中表达，可以通过对效率不佳地表达的基因的定点诱变而实现，所述诱变是通过将其与内源酵母基因，优选高表达的基因符合读框地融合而实现的。或者，如此处对于解脂耶氏酵母所证明的，可以确定宿主中的共有翻译起始序列，并且将该序列工程化为异源序列，以便它们在感兴趣的宿主中最优表达。

在本发明中，表 5 的一些去饱和酶和延伸酶基因为了解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化，该优化是基于上文描述的宿主优先性。这可能是通过首先确定解脂耶氏酵母密码子选择谱（参见 WO

04/101757) 并且鉴定优选的密码子。然后, 为了进一步优化解脂耶氏酵母中的基因表达, 确定‘ATG’起始密码子附近的共有序列 (即 ‘MAMMATGNHS’ (SEQ ID NO: 356), 其中使用的核酸简并密码如下: M=A/C; S=C/G; H=A/C/T; 和 N=A/C/G/T)。下文的表 7 比较了在解脂耶氏酵母中表达时天然和密码子优化的基因的活性, 并且提供了关于每种密码子优化的基因的细节。% Sub. Conv.是“底物转化百分比”的缩写, Codon-Opt.是“密码子优化的”的缩写。

表 7

对于在解脂耶氏酵母中进行 ARA 生物合成最优选的密码子优化的去饱和酶和延伸酶

天然基因	天然 基因 %Sub. Conv.	Codon-Opt.基因 中的修饰的总碱 基数	Codon- Opt.基因 %Sub. Conv.	参考文献	Codon- Opt. SEQ ID NO
高山被孢霉 $\Delta 6$ 去饱和酶 (GenBank 获取号 AF465281)	30%	1374 bp 的 152bp (相应于 144 个密码子)	42%	WO 04/101753	3
高山被孢霉高亲和力 $C_{18/20}$ 延伸酶 (GenBank 获取号 AX464731)	30%	957 bp 的 94bp (相应于 85 个 密码子)	47%	WO 04/101753	19
金黄色破囊壶菌 $C_{18/20}$ 延伸酶 (“ELO2”)	33%	817 bp 的 114bp (相应于 108 个 密码子)	46%	---	22
异丝水酶 $\Delta 17$ 去饱和 酶 (US 2003/0196217 A1)	23%	1077 bp 的 127bp (相应于 117 个 密码子)	45%	共同未决的美 国专利申请 No. 10/840478	16
球等鞭金藻 $\Delta 9$ 延伸 酶	---	789 bp 的 126bp (相应于 123 个 密码子)	30%	---	41
纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和 酶	---	1263 bp 的 207bp (相应于 192 个 密码子)	75%	共同未决的美 国专利申请 No. 11/166993	48
球等鞭金藻 $\Delta 5$ 去饱和 酶	7%	1323 bp 的 203 bp (相应于 193 个密码子)	32%	---	10
人 $\Delta 5$ 去饱和酶 (GenBank 获取号 NP_037534)	---	1335 bp 的 227bp (相应于 207 个 密码子)	30%	---	13
褐家鼠 $C_{16/18}$ 延伸酶 (GenBank 获取号 AB071986)	---	792 bp 的 127bp (相应于 125 个 密码子)	43%	---	52

在本发明的额外的替代方案中，尽管其它一些 DNAs 不是与 SEQ ID NOs: 3、10、13、16、19、22、41、48 和 52 所示的优选去饱和酶和延伸酶基本相同，也可以用于此处的目的。例如，可以用于根据本发明的教导导入解脂耶氏酵母中的编码 $\Delta 6$ 去饱和酶多肽的 DNA 序列可以获自具有生产 GLA 或 STA 的能力的微生物。所述微生物包括例如属于以下属的微生物：被孢霉属、耳霉属、腐霉属、疫霉属、青霉属、紫球藻属、Coidosporium、毛霉属、镰孢属、曲霉属、红酵母属和虫霉属。在紫球藻属中，特别感兴趣的是 *P. Cruentum*。在被孢霉属中，特别感兴趣的是长形被孢霉、微小被孢霉、喜湿被孢霉、拉曼被孢霉 *angulispora* 变种和高山被孢霉。在毛霉属中，特别感兴趣的是卷枝毛霉和爪哇毛霉。

或者，例如，一种相关的去饱和酶不是与高山被孢霉 $\Delta 6$ 去饱和酶基本相同，但可以在距离分子的羧基末端的第 6 个碳的位置对脂肪酸分子去饱和，该去饱和酶也可以用于本发明中作为 $\Delta 6$ 去饱和酶，认为该去饱和酶仍然可以有效将 LA 转化为 GLA 和/或将 ALA 转化为 STA。因此，通过与此处公开的去饱和酶和延伸酶起基本相同的作用的能力，可以鉴定（或制备）相关的去饱和酶和延伸酶。

如上文所提示的，在另一实施方案中，本领域技术人员可以制备具有适于此处目的的 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $\Delta 6$ 去饱和酶活性的融合蛋白。通过将 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $\Delta 6$ 去饱和酶与连接的接头融合在一起，这是可能的。 $\Delta 12$ 去饱和酶或 $\Delta 6$ 去饱和酶可以位于融合蛋白的 N 末端部分。本领域技术人员很容易了解设计和合成合适的接头分子的方法，例如，接头可以是一段丙氨酸或赖氨酸，并且不影响融合酶的活性。

最后，本领域公知，文献中充分记载了合成序列和将序列连接在一起的方法。因此，可以用体外诱变和选择、定点诱变、化学诱变、“基因改组”方法或其它方法，获得天然存在的去饱和酶和/或延伸酶基因的突变。这使得能够在体内生产分别具有去饱和酶或延伸酶活性的多肽，其具有在宿主细胞中起作用的理想的物理和动力学参数（如更长的半衰期或生产需要的 PUFA 的更高速度）。

总之，尽管提出了编码适于在解脂耶氏酵母中生产 ARA 的 PUFA 生物合成途径酶的优选去饱和酶和延伸酶基因的序列，这些基因不意欲限制本发明。可以从多种来源（如具有合适去饱和酶或延伸酶活性

的野生型、密码子优化的、合成的和/或突变的酶)分离适于此处目的的许多其它编码 PUFA 生物合成途径酶的基因。这些替代去饱和酶的特征可以在于以下能力: 1.) 在从分子的羧基末端开始计数的第 8 和 9 个碳原子之间对脂肪酸去饱和, 并且催化 EDA 转化为 DGLA ($\Delta 8$ 去饱和酶); 2.) 催化 LA 转化为 GLA ($\Delta 6$ 去饱和酶); 3.) 催化 DGLA 转化为 ARA ($\Delta 5$ 去饱和酶); 4.) 催化油酸转化为 LA ($\Delta 12$ 去饱和酶); 和/或 5.) 催化棕榈酸转化为棕榈油酸和/或硬脂酸转化为油酸 ($\Delta 9$ 去饱和酶)。以相似的方式, 用于此处目的合适延伸酶不限于来自特定来源的那些。相反, 具有适于此处目的的用途的酶的特征在于它们将脂肪酸碳链相对于延伸酶作用的底物延长 2 个碳, 从而生产单或多不饱和脂肪酸的能力。更特别地, 这些酶的特征在于以下能力: 1.) 将 LA 延伸为 EDA ($\Delta 9$ 延伸酶); 2.) 延伸 C18 底物, 以生产 C20 产物 (C18/20 延伸酶); 3.) 延伸 C14 底物, 以生产 C16 产物 (C14/16 延伸酶); 和/或 4.) 延伸 C16 底物, 以生产 C18 产物 (C16/18 延伸酶)。重要的是注意一些延伸酶能够催化一些延伸酶反应, 作为广泛底物特异性的结果。

酰基转移酶及其在 TAG 生物合成的终末步骤中的作用

酰基转移酶密切参与 TAGs 的生物合成。关于酵母中的 TAG 生物合成, 包括参与的基因的细节和导致 TAG 合成的代谢中间体的两篇全面的短综述是: D. Sorger and G. Daum, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 289-299 (2003); 和 H. Müllner and G. Daum, *Acta Biochimica Polonica*, 51 (2): 323-347 (2004)。尽管这些综述的作者明确概括了真核动物酰基转移酶基因家族的不同种类 (下文), 但他们也承认 TAG 合成的调节方面和脂质颗粒中中性脂质的形成仍然还不清楚。

已经鉴定了四种真核动物酰基转移酶基因家族, 它们参与酰基-CoA 依赖性或非依赖性酯化反应, 导致中性脂质合成:

(1) 酰基-CoA: 胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 家族, EC 2.3.1.26 (通常称作固醇酰基转移酶)。这个基因家族包括负责将酰基-CoA 和固醇转化为 CoA 和固醇酯的酶。这个家族也包括参与 TAG 生物合成的终末步骤的 DGAT1。

(2) 卵磷脂: 胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 家族, EC 2.3.1.43。

这个基因家族负责将磷脂酰胆碱和固醇转化为固醇酯和 1-酰基甘油磷酸胆碱。这个家族也包括参与将酰基从磷脂的 sn-2 位置转移到 1,2-二酰基甘油的 sn-3 位置, 导致 TAG 生物合成的磷脂: 二酰基甘油酰基转移酶 (PDAT)。

(3) 二酰基甘油酰基转移酶 (DAG AT) 家族, EC 2.3.1.20。这个基因家族 (包括 DGAT2) 参与 TAG 生物合成的终末步骤。

(4) 甘油-3-磷酸酰基转移酶和酰基-CoA 溶血磷脂酰基转移酶 (GPAT/LPAAT) 家族。GPAT (E.C. 2.3.1.15) 蛋白负责 TAG 生物合成的第一步, 而 LPAAT (E.C. 2.3.1.51) 参与 TAG 生物合成的第二步。这个家族也包括催化磷脂和 CoA 之间的酰基交换的溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 (LPCAT)。

这 4 个酰基转移酶基因家族一起代表用于中性脂质形成的重叠生物合成系统, 并且似乎是差异调节、可变定位和不同底物特异性的结果 (H. Müllner and G. Daum, *supra*)。在此将基于它们对解脂耶氏酵母中的代谢工程化的重要性对这 4 个基因家族进行讨论, 以使得能够合成高于 10-30% 的 ARA。

多种酰基转移酶的功能性

图 4 中概括了解脂耶氏酵母中很多所述酰基转移酶之间的相互作用。最初注意 TAG 生物合成的直接机理, 该过程的第一步是一个分子的酰基-CoA 经 GPAT 酯化为 sn-甘油-3-磷酸, 以生产溶血磷脂酸 (LPA) (CoA 作为副产物)。然后, 通过第二个分子的酰基-CoA 的酯化, 溶血磷脂酸转化为磷脂酸 (PA) (CoA 作为副产物), 该反应是 LPAAT 催化的。然后, 磷脂酸磷脂酶负责从磷脂酸除去磷酸基团, 产生 1,2-二酰基甘油 (DAG)。随后, 通过 DAG AT (如 DGAT1、DGAT2 或 PDAT) 将第三个脂肪酸加入 DAG 的 sn-3 位置, 形成 TAG。

以前, 认为 DGAT1 是唯一专门参与 TAG 合成的酶, 催化负责将酰基-CoA 和 DAG 转为为 TAG 和 CoA 的反应, 其中酰基-CoA 基团转移到 DAG, 形成 TAG。已知 DGAT1 与 ACATs 同源; 但是, 最近的研究鉴定了新的 DAG AT 酶家族, 它们与 ACAT 基因家族无关。因此, 现在的命名区分了与 ACAT 基因家族相关的 DAG AT 酶 (DGAT1 家族) 和不相关的 DAG AT 酶 (DGAT2 家族) (Lardizabal et al., J. Biol. Chem. 276 (42): 38862-38869 (2001))。在真核生

物的所有主要门(真菌、植物、动物和基础真核生物)中鉴定了 DGAT2 家族的成员。

最近, Dahlqvist 等人 (Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 97: 6487-6492 (2000)) 和 Oelkers 等人 (J. Biol. Chem. 275: 15609-15612 (2000)) 发现了在不存在酰基-CoA 的条件下, 通过酰基-CoA 非依赖性机理, 也可以发生 TAG 合成。具体地, PDAT 除去磷脂酰胆碱底物 sn-2 位置的酰基, 转移到 DAG, 以生产 TAG。该酶与 LCAT 家族结构上相关; 尽管 PDAT 的功能不像 DGAT2 那样充分表征, 已经推测 PDAT 在从一些油籽植物中的磷脂除去“不常见”脂肪酸中起主要作用 (Banas, A. et al., Biochem. Soc. Trans. 28 (6): 703-705 (2000))。

对于啤酒糖酵母中的 TAG 合成, 描述了三种途径 (Sandager, L. et al., J. Biol. Chem. 277 (8): 6478-6482 (2002))。首先, 主要通过 DGAT2 活性 (由 DGA1 基因编码), 从 DAG 和酰基-CoAs 合成 TAGs。但是, 更近年来, 也鉴定了 PDAT (由 LRO1 基因编码)。最后, 已知两种酰基-CoA: 固醇-酰基转移酶 (由 ARE1 和 ARE2 基因编码) 利用酰基-CoAs 和固醇生产固醇酯 (和低量 TAGs; 参见 Sandager et al., Biochem. Soc. Trans. 28 (6): 700-702 (2000))。PDAT 和 DGAT2 一起负责啤酒糖酵母中的大约 95% 的油生物合成。

基于一些公众可得到的编码 DGAT1s、DGAT2s、PDATs 和 ARE2s 的序列 (参见下文), 申请人在解脂耶氏酵母中分离和表征了编码 DGAT1 (SEQ ID NO: 81)、DGAT2 (SEQ ID NOs: 89、91 和 93 [其中 SEQ ID NO: 89 含有至少两个额外的嵌套 ORFs, 如 SEQ ID NOs: 91 和 93 中提供的; SEQ ID NO: 93 编码的 ORF 与其它已知 DGAT 酶具有高度的相似程度, SEQ ID NO: 93 中的破坏消除了天然基因的 DGAT 功能, 从而证明了 SEQ ID NO: 94 的多肽具有 DGAT 功能])、PDAT (SEQ ID NO: 76) 和 ARE2 (SEQ ID NO: 78) 的基因。但是, 与在啤酒糖酵母中开发的模型 (其中 PDAT 和 DGAT2 负责大约 95% 的油生物合成) 相反, 发现解脂耶氏酵母的 PDAT、DGAT2 和 DGAT1 负责最高达大约 95% 的油生物合成 (而 ARE2 可能额外是油生物合成的次要决定因素)。

功能对于解脂耶氏酵母的 TAG 级分中的 ARA 聚集重要的最后一种酰基转移酶是 LPCAT。如图 4 所示, 该酶 (EC 2.3.1.23) 被假定

为负责 sn-磷脂酰胆碱的 sn-2 位置上的双向酰基交换,以增强 ω -6 和 ω -3 PUFA 生物合成。这种假定基于以下研究: (1) Stymne S. and A.K. Stobart (Biochem J. 223 (2): 305-14 (1984)), 他们假定 LPCAT 影响酰基-CoA 集合和磷脂酰胆碱(PC)集合之间的交换; (2) Domergue, F. et al. (J. Bio. Chem 278: 35115 (2003)), 它们提示 PC 的 sn-2 位置上 GLA 的积累和不能在酵母中有效合成 ARA, 是参与酰基-CoA 集合中发生的 PUFA 生物合成的延伸步骤的结果,而 Δ 5 和 Δ 6 去饱和步骤主要发生在 PC 的 sn-2 位置; (3) Abbadi, A. et al. (The Plant Cell, 16: 2734-2748 (2004)), 他们基于对转基因油籽植物中 PUFA 积累的约束的分析,提示 LPCAT 在 Δ 6 去饱和酶/ Δ 6 延伸酶途径的成功重建中起关键作用; 和 (4) WO 2004/076617 A2 (Renz, A. et al.), 他们提供了编码来自秀丽杆线虫的 LPCAT (T06E8.1) 的基因,该 LPCAT 显著改进了啤酒糖酵母中遗传学导入的 Δ 6 去饱和酶/ Δ 6 延伸酶途径中的延伸效率。本发明人概括出 LPCAT 使得能够在磷脂和酰基-CoA 集合之间有效和连续交换新合成的脂肪酸,因为去饱和酶催化脂质偶联的脂肪酸(sn-2 酰基 PC)中双键的导入,而延伸酶专门催化 CoA 酯化的脂肪酸(酰基-CoAs)的延伸。

用于 ARA 合成的异源酰基转移酶基因的选择

由于解脂耶氏酵母中天然生产的 PUFAs 限于 18:2 脂肪酸(较不常见的是 18:3 脂肪酸),很可能宿主生物中编码 GPAT、LPAAT(即 LPAAT1 或 LPAAT2)、DGAT1、DGAT2、PDAT 和 LPCAT 的天然基因难以有效合成包含 18:3 和更长(如 ARA)的脂肪酸的 TAGs。因此,在某些情况下,异源(或“外源”)酰基转移酶比天然酶优选。

在多种生物中鉴定了许多酰基转移酶基因,并且公开于公共和专利文献中。例如,以下 GenBank 获取号表示公众可得到的、用于脂质生物合成中的酰基转移酶基因: CQ891256, AY441057, AY360170, AY318749, AY093169, AJ422054, AJ311354, AF251795, Y00771, M77003 (GPATs); Q93841, Q22267, Q99943, O15120, Q9NRZ7, Q9NRZ5, Q9NUQ2, O35083, Q9D1E8, Q924S1, Q59188, Q42670, P26647, P44848, Q9ZJN8, O25903 Q42868, Q42870, P26974, P33333, Q9XFW4, CQ891252, CQ891250, CQ891260, CQ891258, CQ891248,

CQ891245, CQ891241, CQ891238, CQ891254, CQ891235(LPAATs); AY445635, BC003717, NM_010046, NM_053437, NM_174693, AY116586, AY327327, AY327326, AF298815 和 AF164434 (DGAT1s); 以及 NC_001147[基因座 NP_014888], NM_012079, NM_127503, AF051849, AJ238008, NM_026384, NM_010046, AB057816, AY093657, AB062762, AF221132, AF391089, AF391090, AF129003, AF251794 and AF164434 (DGAT2s); P40345, O94680, NP_596330, NP_190069 和 AB006704[gi:2351069] (PDATs)。类似地, 专利文献提供了很多参与 TAG 生产的基因的额外 DNA 序列(和/或关于上文的一些基因及其分离方法的细节)[例如 U.S. 5,210,189, WO 2003/025165 (GPATs); EP1144649 A2, EP1131438, U.S. 5,968,791, U.S. 6,093,568, WO 2000/049156 和 WO 2004/087902 (LPAATs); U.S. 6,100,077, U.S. 6,552,250, U.S. 6,344,548, US 2004/0088759A1 和 US 20040078836A1 (DGAT1s); US 2003/124126, WO 2001/034814, US 2003/115632, US 2003/0028923 和 US 2004/0107459 (DGAT2s); WO 2000/060095 (PDATs); 以及 WO 2004/076617 A2 (LPCATs)。

上文的实例不是限制性的, 来源于不同来源的许多其它编码 DGAT1、DGAT2、PDAT、GPAT、LPCAT 和 LPAAT 的基因也适于导入解脂耶氏酵母中。例如, 申请人从高山被孢霉 (SEQ ID NOs: 83 和 84)、粗糙链孢霉 (SEQ ID NO: 85)、玉蜀黍赤霉 PH-1 (SEQ ID NO: 86)、Magnaporthe grisea (SEQ ID NO: 87) 以及构巢曲霉 (SEQ ID NO: 88) 鉴定了新的 DGAT1; 并且从高山被孢霉鉴定了新的 DGAT2 (SEQ ID NOs: 95 和 96)、GPAT (SEQ ID NOs: 97 和 98)、LPAAT1 (SEQ ID NOs: 67 和 68) 以及 LPAAT2 (SEQ ID NOs: 69 和 70)。

用于 ARA 合成的优选酰基转移酶基因

尽管可以适于在解脂耶氏酵母中表达的酰基转移酶有广泛的选择, 但是, 在本发明的优选实施方案中, DGAT1、DGAT2、PDAT、GPAT、LPAAT 和 LPCAT 选自生产大量较长链 ω -6 (如 ARA) 和/或 ω -3 (如 EPA、DHA) PUFAs 的生物。因此, 特别优选的是以下酶(或其衍生物):

表 8

用于在解脂耶氏酵母的高 ARA 生产菌株中表达的优选异源酰基转移酶

ORF	生物	参考文献	SEQ ID NOs
DGAT1	高山被孢霉	共同未决的美国专利申请 11/024544	83, 84
DGAT2	高山被孢霉	共同未决的美国专利申请 11/024545	95, 96
GPAT	高山被孢霉	-	97, 98
LPAAT1	高山被孢霉	--	67, 68
LPAAT2	高山被孢霉	共同未决的美国专利申请 60/689031	69, 70
LPCAT	秀丽新杆线虫	克隆 T06E8.1; WO 2004/076617 A2	80

尽管不意欲限制本发明, 选择高山被孢霉作为异源酰基转移酶的优选来源, 因为该天然生物能够合成浓度高于总脂肪酸(TFAs)的 50% 的 ARA。以相似的方式, 秀丽新杆线虫能够生产最高达其 TFAs 的 20-30% 的 EPA。

当然, 在本发明的替代实施方案中, 也可以将与 SEQ ID NOs: 67, 68, 69, 70, 80, 83, 84, 95, 96, 97 和 98 编码的酰基转移酶基本相同的其它 DNAs 用于在解脂耶氏酵母中进行异源表达, 以促进 TAG 级分中 ARA 的生产和积累。在更优选的实施方案中, 利用了编码与 SEQ ID NOs: 67-70, 80, 83, 84 和 95-98 基本相同的酰基转移酶的密码子优化的基因。

用于表达外源基因的通用表达系统、盒、载体和转化

含有指导外源蛋白的高水平表达的调节序列, 如导致高水平生产 ARA 的调节序列的微生物表达系统和表达载体是本领域技术人员公知的。上述任何载体都可以用于构建编码优选的去饱和酶、延伸酶和酰基转移酶的嵌合基因。然后可以用标准转化方法将这些嵌合基因导入解脂耶氏酵母中, 以提供编码的酶的高水平表达。

用于转化宿主细胞的载体或 DNA 盒是本领域公知的。构建体中存在的序列的特定选择依赖于需要的表达产物、宿主细胞的性质和提出的分离转化的细胞与未转化细胞的方法。但是，典型地，载体或盒含有指导相关基因转录和翻译的序列、选择标记和使得能够进行自主复制和染色体整合的序列。合适的载体包含控制转录起始的基因的 5' 的区域（如启动子）和控制转录终止的 DNA 片段 3' 的区域（如终止子）。当两个控制区都来自转化的宿主细胞的基因时是最优选的，但是，应该理解，所述控制区不一定必须来自选作生产宿主的特定物种的天然基因。

当从分开的复制载体表达两种或更多种基因时，理想的是每种载体具有不同的选择方法，并且应该缺乏与其它构建体的同源性，以维持稳定的表达并且防止构建体之间元件的重新分配。调节区的明智选择、选择方法和导入的构建体的增殖方法可以实验确定，由此以必须的水平表达所有导入的基因，并且提供需要的产物的合成。

可以通过任何标准技术将包含感兴趣的基因的构建体导入宿主细胞。这些技术包括转化（如醋酸锂转化[Methods in Enzymology, 194: 186-187 (1991)]）、原生质体融合、bolistic impact、电穿孔、微注射或任何其它将感兴趣的基因导入宿主细胞的方法。适用于解脂耶氏酵母的更特别的教导包括美国专利 No. 4,880,741 和 No. 5,071,764 以及 Chen, D. C. et al. (Appl Microbiol Biotechnol. 48 (2): 232-235 (1997))。

为了方便起见，业已通过任何方法操作以摄入 DNA 序列（例如，表达盒）的宿主细胞在本文中被称作“转化的”或“重组的”。转化的宿主具有至少一个拷贝的表达构建体，并且可以具有两个或两个以上拷贝，这取决于所述基因是整合在所述基因组上、扩增的、或者存在于具有多个拷贝的染色体外元件上。可以通过多种选择技术鉴定转化的宿主细胞，如 WO 2004/101757 和 WO 2005/003310 中的描述。

此处使用的优选选择方法是对卡那霉素、潮霉素和氨基糖苷 G418 的抗性以及在缺少尿嘧啶、亮氨酸、赖氨酸、色氨酸或组氨酸的培养基上生长的能力。在替代的实施方案中，为了选择酵母 Ura⁻转化体，使用 5'-氟乳清酸（5-氟尿嘧啶-6-羧酸一水合物；“5-FOA”）。该化合物对具有起作用的编码乳清苷 5'-一磷酸脱羧酶（OMP 脱羧酶）

的 URA3 基因的酵母细胞具有毒性；因此，基于该毒性，5-FOA 对于 Ura⁻突变酵母株的选择和鉴定特别有用（Bartel, P.L. and Fields, S., *Yeast 2-Hybrid System*, Oxford University: New York, v. 7, pp 109-147, 1997）。

此处用到的一种替代的优选选择方法依赖于解脂耶氏酵母的显性、非抗生素标记，该标记基于磺酰脲抗性。该技术通常也适用于其它可能是单倍、二倍、非整倍或杂合的工业酵母株。预计它克服了对开发工业酵母株的遗传转化系统的两个主要限制，这两个限制是：

（1）几乎不存在天然营养缺陷株，并且由于这些株的倍性阻碍了自发或诱导的营养缺陷突变体的分离；和（2）抗生素抗性标记的利用可能限制了菌株的商业用途，这是因为对携带抗生素抗性基因的遗传修饰的生物的释放的限制。尽管 Puig 等人（*J. Agric. Food Chem.* 46: 1689-1693（1998））开发了基于靶菌株的基因工程的、克服这些限制的方法以使其对于尿苷是营养缺陷的，并且随后利用了 URA3 标记以诱导感兴趣的形状，但该策略仍然被认为对于常规工作来说过于费力。

此处公开的用于转化解脂耶氏酵母的新的磺酰脲抗性选择标记不仅仅依赖于外源基因，也依赖于突变的天然基因。因此，它不需要营养缺陷，也不导致营养缺陷，并且允许转化野生型菌株。更具体地，标记基因（SEQ ID NO: 280）是一种天然的乙酰羟酸合酶（AHAS 或乙酰乳酸合酶；E.C. 4.1.3.18），其具有赋予磺酰脲除草剂抗性的单个氨基酸改变（W497L）。AHAS 是支链氨基酸的生物合成途径中的第一种常见酶，它是磺酰脲和咪唑烷酮除草剂的靶。在啤酒糖酵母中报道了 W497L 突变（Falco, S. C., et al., *Dev. Ind. Microbiol.* 30: 187-194（1989）；Duggleby, R.G., et. al. *Eur. J. Biochem.* 270: 2895（2003））。初步的测试确定了耶氏酵母细胞对于除草剂不是天然具有抗性的，这是因为 1.) 对除草剂的摄取不良或不摄取；2.) 存在天然的除草剂抗性形式的 AHAS；和/或 3.) 利用了除草剂灭活机制。因此，这使得能够合成和利用突变的 AHAS 基因（SEQ ID NO: 280）作为选择转化体的手段。

一种再循环选择标记的额外方法依赖于位点特异性重组酶系统。简言之，该位点特异性重组系统由两个元件组成：（1）具有特征性

DNA 序列[如 LoxP]的重组位点；和（2）当两个或多个重组位点在相同 DNA 分子[如 Cre]上以特定间隔按相同方向定位时特异性结合于 DNA 序列并且催化 DNA 序列之间的重组（即切割）的重组酶。该方法具有作为选择工具的用途，因为它可以“再循环”一对优选的选择标记，用于它们在多次连续转化中的用途。

更具体地，建立了整合构建体，其包含需要插入宿主基因组的靶基因（如去饱和酶、延伸酶、酰基转移酶）以及侧翼于重组位点的第一选择标记（如 Ura3、潮霉素磷酸转移酶[HPT]）。在转化体的转化和选择后，通过导入携带第二选择标记（如磺酰脲抗性[AHAS]）和适于识别导入基因组中的位点特异性重组位点的重组酶的复制质粒，从染色体切下第一选择标记。选择携带第二标记的转化体和证明第一选择标记从宿主基因组切下后，在无选择的条件下从宿主收获复制的质粒。这产生了既不存在第一标记也不存在第二标记的转化体，因此，经过消除的菌株可以用于另一轮转化。本领域技术人员可以意识到，该方法不限于用于本发明的特定选择标记或位点特异性重组系统。

外源基因在解脂耶氏酵母中的超量表达

正如技术人员所了解的，仅仅将基因（如去饱和酶）插入克隆载体，不能确保它能够在需要的水平上成功地表达。可能需要操纵多种不同的遗传元件，这些遗传元件控制转录，翻译，蛋白稳定性，含氧极限，以及从宿主细胞的分泌。更具体地讲，可以通过改变以下方面控制基因表达：相关转录启动子和终止子序列的性质；克隆基因的拷贝数量；基因是质粒携带的或者是整合到宿主细胞的基因组上；合成的外源蛋白的最终细胞定位；宿主生物的翻译效率；克隆的基因蛋白在宿主细胞中的内在稳定性；和克隆的基因内的密码子选择，这样它的频率接近宿主细胞的优选密码子使用频率。下文将讨论这些超量表达方法中的一些，并且用于本发明中作为在解脂耶氏酵母中超量表达例如去饱和酶、延伸酶和酰基转移酶的手段。

通过使用较强的启动子（如调节型或组成型）导致表达增加、通过从 mRNA 或编码的蛋白除去/缺失去稳定序列、或通过给 mRNA 增加稳定序列（U.S. 4,910,141），可以在转录水平增加需要的基因的表达。

可用于在需要的宿主细胞中驱动去饱和酶、延伸酶和酰基转移酶

基因表达的起始控制区或启动子是多种多样的，并且为本领域技术人员所熟知。实际上，能够指导这些基因在解脂耶氏酵母中表达的任何启动子都适合本发明。在宿主细胞中的表达能够以瞬时或稳定的方式进行。瞬时表达可以通过诱导可操作地连接在感兴趣的基因上的可调节启动子的活性而实现；或者稳定表达可以通过使用可操作地与感兴趣的基因连接的组成型启动子而实现。例如，当宿主细胞是酵母时，提供能够在酵母细胞中起作用的转录和翻译区，特别是来自宿主物种的那些。例如，转录起始调节区可以从以下渠道获得：1.) 糖酵解途径中的基因，如醇脱氢酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、磷酸甘油变位酶、果糖二磷酸醛缩酶、磷酸葡萄糖异构酶、磷酸甘油酸激酶、甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶等；或 2.) 可调节的基因，如酸性磷酸酶、乳糖酶、金属硫蛋白、葡糖淀粉酶、翻译延伸因子 EF1- α (TEF) 蛋白 (U.S. 6,265,185)、核糖体蛋白 S7 (U.S. 6,265,185) 等。可以使用多种调节序列中的任意一种，这取决于是需要组成型转录还是诱导型转录、启动子在表达感兴趣的 ORF 方面的效率、构建的方便性等。上面提供的实例不意欲限制本发明。

本领域技术人员了解，可以用多种方法比较多种启动子的活性。这种类型的比较可以用于促进确定用于将来的应用中的每种启动子的强度，其中一组启动子对于构建用于生产 ω -6 和 ω -3 脂肪酸的嵌合基因是必要的。因此，可能有用的是基于报道基因表达（即编码 β -葡萄糖醛酸酶 (GUS) 的大肠杆菌基因）而对启动子活性进行间接定量的方法。在替代的实施方案中，有时用更定量性的方法对启动子活性进行定量可能是有用的。一种合适的方法是使用实时 PCR（对于实时 PCR 应用的一般综述，参见 Ginzinger, D. J., *Experimental Hematology*, 30: 503-512 (2002)）。实时 PCR 基于荧光报道分子的检测和定量。信号的增加与反应中 PCR 产物的量成正比。通过记录每个循环的荧光发射量，可以在指数期监测 PCR 反应，其中 PCR 产物量的第一次显著增加与靶模板的起始量相关。存在两种用于定量检测扩增子的通用方法：(1) 使用荧光探针；或 (2) 使用 DNA 结合剂（如 SYBR-green I、溴化乙锭）。对于相对基因表达比较，有必要使用内源对照作为内部参照（如染色体编码的 16S rRNA 基因），从而对加入每个实时 PCR 反应中的总 DNA 量的差异进行标准化。用于实时 PCR 的

具体方法在本领域有充分记载。参见例如 the Real Time PCR Special Issue (Methods, 25 (4): 383-481 (2001))。

在实时 PCR 反应后,用记录的荧光强度对模板的量进行定量,这是通过采用:1.)绝对标准物方法(其中使用已知量的标准物,如体外翻译的 RNA (cRNA));2.)相对标准物方法(其中在每一轮的测定设计中都包括已知量的靶核酸);或3.)用于对基因表达进行相对定量的比较性 C_T 法 ($\Delta\Delta C_T$) (其中将靶序列的相对量与选择的任何参照值进行比较,结果相对于参照值给出)。比较性 C_T 法需要确定靶和标准化物的 C_T 值之间的差异 (ΔC_T),其中: $\Delta C_T = C_T$ (靶) - C_T (标准化物)。对要定量的每个样品计算该值,并且必须选择一种样品作为进行每次比较的参照。比较性 $\Delta\Delta C_T$ 计算包括发现每个样品的 ΔC_T 和基线的 ΔC_T 之间的差异,然后根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 将这些值转化为绝对值。

尽管可以适于在解脂耶氏酵母中表达的启动子有广泛选择,但是,在本发明的优选实施方案中,启动子选自表9所示的那些(或其衍生物)。

表 9

优选用于在解脂耶氏酵母中超量表达的天然启动子

启动子名称	位置*	天然基因	活性“等级”	参考文献	SEQ ID NO
TEF	---	翻译延伸因子 EF1- α	1	U.S. 6,265,185 (Muller et al.) ; GenBank 获取号 AF054508	166
GPD	-968 bp 至 +3 bp	甘油醛-3-磷酸-脱氢酶	2	WO 2005/003310	158
GPM	-875 bp 至 +3 bp	磷酸甘油变位酶	1	WO 2005/003310	160
FBA	-1001 bp 至 -1 bp	果糖-二磷酸醛缩酶	4	WO 2005/049805	161
FBAIN	-804 bp 至 +169 bp (包括 102 bp 内含子 [+64 至 +165])	果糖-二磷酸醛缩酶	7	WO 2005/049805	162
FBAINm	-804 bp 至 +169 bp 具有修饰 ***	果糖-二磷酸醛缩酶	5	WO 2005/049805	163
GPDIN	-973 bp 至 +201 bp (包括 146 bp 内含子 [+49 至 +194])	甘油醛-3-磷酸-脱氢酶	3	共同未决的美国专利申请 No. 11/183664	159
GPAT	-1130 至 +3 bp	甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶	5	共同未决的美国专利申请 No. 11/225354	164
YAT1	-778 至 -1 bp	铍转运蛋白酶	6	共同未决的美国专利申请 No. 11/185301	165
EXPI	-1000 至 -1 bp	输出蛋白	6	----	364

* 位置是相对于天然基因，其中‘ATG’翻译起始密码子的‘A’位置表示为+1。

*** FBAINm 启动子是修饰形式的 FBAIN 启动子，其中 FBAINm 在 ATG 翻译起始密码子和 FBAIN 启动子的内含子之间具有 52bp 缺失（从而仅仅包括 N-末端的 22 个氨基酸）并且具有内含子后的新的翻译共有序列基序。此外，尽管当与要表达的基因的编码区融合时 FBAIN 启动子产生融合蛋白，但 FBAINm 启动子不产生这样的融合蛋白。

GPM 的活性大约与 TEF 相同,而 GPD、FBA、FBAIN、FBAINm、GPDIN、GPAT、YAT1 和 EXP1 的活性都大于 TEF (活性是在标题为“活性等级”的列中以相对方式定量的,其中“1”相应于具有最低活性的启动子,而“7”相应于具有最高活性的启动子)。这种定量是基于比较性研究,其中将每种启动子用于建立嵌合基因,该嵌合基因具有编码作为报道分子的 β -葡萄糖醛酸酶(GUS)的大肠杆菌基因(Jefferson, R.A. Nature. 14; 342: 837-838 (1989))和耶氏酵母 Xpr 基因的 3'区的约 100bp。通过组织化学和/或荧光测量分析(Jefferson, R. A. Plant Mol. Biol. Reporter 5: 387-405 (1987))和/或采用实时 PCR,测量每个表达的构建体中的 GUS 活性。

YAT1 启动子是独特的,因为申请人将其表征为在耶氏酵母中鉴定的第一种在含油条件(即氮限制)下可诱导的启动子。具体地,尽管 YAT1 启动子在含氮(如最多约 0.5%硫酸铵)的培养基中有活性,但当宿主细胞在氮限制条件下(如在含有非常低水平的铵或缺乏铵的培养基中)生长时,启动子的活性增加。因此,优选的培养基将是含有少于约 0.1%硫酸铵或其它合适的铵盐的培养基。在一种更优选的实施方案中,当宿主细胞在具有高碳氮比(即 C:N)的培养基,如含有大约 8-12%葡萄糖和大约 0.1%或更少硫酸铵的高葡萄糖培养基(HGM)中生长时,YAT1 启动子被诱导。这些条件也足够诱导那些含油酵母(如解脂耶氏酵母)中的含油性。基于细胞提取物的 GUS 活性,当细胞从基本培养基转移到 HGM 中并生长 24 小时后,YAT1 启动子的活性增加约 73 倍;在 HGM 中生长 120 小时后,活性某种程度降低,当仍然比含氮的基本培养基中的活性高 25 倍(实施例 1)。

当然,在本发明的替代实施方案中,其它衍生自上文表 9 中描述的启动子区的其它启动子也可以用于在解脂耶氏酵母中异源表达,以促进 TAG 级分中 ARA 的生产和积累。具体地,上文描述的任何启动子的长度的改变可以导致具有相同活性的突变启动子,因为还没有完全确定这些调节序列的精确边界。在替代实施方案中,位于 FBAIN 和 GPDIN 启动子的内含子内的增强子可以用于建立嵌合启动子,其相对于天然耶氏酵母启动子具有增加的活性(例如,当驱动 GUS 报道基因与耶氏酵母 Xpr 基因的 3'区的约 100 bp 一起表达时,嵌合 GPM::FBAIN 和 GPM::GPDIN 启动子 (SEQ ID NOs: 182 和 183))

相对于单独的 GPM 启动子具有增加的活性)。

终止区可源于基因的 3'区(起始区是从该区获得的)或者从不同的基因获得。大量终止区是已知的,并且能在多种宿主(当在与产生它们的相同和不同的属和种中使用)中发挥令人满意的作用。终止区通常在更大程度上是根据方便性选择的,而不是因为任何特殊特性。优选的是,终止区源于酵母基因,特别是糖酵母属、裂殖酵母属、假丝酵母属、耶氏酵母属或克鲁维酵母属。同样已知编码 γ -干扰素和 α -2 干扰素的哺乳动物基因的 3'-区在酵母中起作用。终止控制区还可以来自优选宿主天然具有的各种基因。终止位点可以任选是必需的;不过,如果具有,则是最优选的。尽管不意欲限制,本发明公开中使用的终止区包括:解脂耶氏酵母胞外蛋白酶的 3'区的约 100bp (XPR; GenBank 获取号 M17741);酰基-coA 氧化酶(Aco3; GenBank 获取号 AJ001301 和 No. CAA04661; Pox3: GenBank 获取号 XP_503244)终止子;Pex20 (GenBank 获取号 AF054613)终止子;Pex16 (GenBank 获取号 U75433)终止子;Lip1 (GenBank 获取号 Z50020)终止子;Lip2 (GenBank 获取号 AJ012632)终止子;和 3-氧酰基-coA 硫解酶(OCT; GenBank 获取号 X69988)终止子。

可以将上文描述的额外拷贝(即一个拷贝以上)的去饱和酶、延伸酶和/或酰基转移酶基因导入解脂耶氏酵母,从而增加 ARA 生产和积累。具体地,可以在单个表达构建体中克隆额外拷贝的基因;和/或可以通过增加质粒拷贝数或通过将克隆的基因多次整合到基因组中将额外拷贝的克隆的基因导入宿主细胞(参见下文)。例如,在一种实施方案中,对解脂耶氏酵母的菌株(即菌株 Y2214)进行工程化,以通过将嵌合基因导入和整合到耶氏酵母基因组中而生产大于 14%的 ARA,所述嵌合基因包含:5 个拷贝的 Δ 9 延伸酶、3 个拷贝的 Δ 8 去饱和酶、4 个拷贝的 Δ 5 去饱和酶、1 个拷贝的 Δ 12 去饱和酶和 1 个拷贝的 $C_{16/18}$ 延伸酶。类似地,在一种替代实施方案中,对解脂耶氏酵母的 Y2047 株进行工程化,以通过将嵌合基因导入和整合到耶氏酵母基因组中而生产大于 11%的 ARA,所述嵌合基因包含:1 个拷贝的 Δ 6 去饱和酶、2 个拷贝的 $C_{18/20}$ 延伸酶、3 个拷贝的 Δ 5 去饱和酶和 1 个拷贝的 Δ 12 去饱和酶。

一般地,一旦获得了适合在含油酵母中表达的 DNA(如包含启

动子、ORF 和终止子的嵌合基因)，将它放入能够在宿主细胞中自主复制的质粒载体上，或者将它直接整合到宿主细胞的基因组中。表达盒的整合可以在宿主基因组中随机地进行，或者可以通过使用含有与宿主基因组具有足够同源性以靶定宿主基因座内的重组的区域的结构体靶定。尽管本发明不完全基于此，当所述构建体被靶定于内源基因座时，转录和翻译调节区的全部或某些可以通过内源基因座提供。

在本发明中，在解脂耶氏酵母中表达基因的优选方法是通过将线性 DNA 整合到宿主的基因组中；并且，当需要基因的高水平表达时，整合到基因组中的多个位置是特别有用的。为此，需要鉴定基因组中以多个拷贝存在的序列。

Schmid-Berger 等 (J. Bact. 176 (9): 2477-2482 (1994)) 发现了解脂耶氏酵母中的第一个反转录转座子样元件 Ylt1。该反转录转座子的特征在于存在长的末端重复序列 (LTRs; 每一个的长度是大约 700 bp)，其称作 ζ 区。Ylt1 和单独的 ζ 元件分别以至少 35 个拷贝/基因组和 50-60 个拷贝/基因组，以分散的方式存在于基因组中；确定这两个元件都作为同源重组位点起作用。此外，Juretzek 等 (Yeast 18: 97-113 (2001)) 的研究证明了通过将质粒靶定到酵母基因组的重复区中 (用两端都具有 LTR ζ 区的线性 DNA)，与用低拷贝质粒转化体获得的表达相比，可以显著增加基因表达。因此，定位于 ζ 的整合作为确保将多个质粒 DNA 整合到解脂耶氏酵母中的手段是理想的，从而允许高水平基因表达。然而，不幸的是，并不是解脂耶氏酵母的所有菌株都具有 ζ 区 (如鉴定为 ATCC #20362 的菌株)。当菌株缺乏所述区域时，也可以将包含表达盒的质粒 DNA 整合到替代的基因座中，以达到表达盒的需要的拷贝数。例如，优选的替代基因座包括：Ura3 基因座 (GenBank 获取号 AJ306421)、Leu2 基因座 (GenBank 获取号 AF260230)、Lys5 基因 (GenBank 获取号 M34929)、Aco2 基因座 (GenBank 获取号 AJ001300)、Pox3 基因座 (Pox3: GenBank 获取号 XP_503244; 或 Aco3: GenBank 获取号 AJ001301)、 $\Delta 12$ 去饱和酶基因座 (SEQ ID NO: 23)、Lip1 基因座 (GenBank 获取号 Z50020) 和/或 Lip2 基因座 (GenBank 获取号 AJ012632)。

有利的是，Ura3 基因可以与 5-FOA 选择组合，重复使用 (参见

上文)。更具体地,可以首先敲除天然 Ura3 基因,生产具有 Ura 表型的菌株,其中选择是基于 5-FOA 抗性发生的。然后,可以将一簇多个嵌合基因和新的 Ura3 基因整合到耶氏酵母基因组的不同基因座中,从而产生具有 Ura⁺表型的新菌株。当敲除导入的 Ura3 基因时,随后的整合将产生新的 Ura3-菌株(再次用 5-FOA 选择进行鉴定)。这样,可以将 Ura3 基因(与 5-FOA 选择组合)用作多轮转化中的选择标记,从而容易地使基因修饰以容易的方式整合到耶氏酵母基因组中。

对于一些应用,将本发明的蛋白导向于不同的细胞腔室(如酰基-CoA 集合与磷脂酰胆碱集合)将是有用的。为了此处描述的目的,ARA 可以以游离脂肪酸或酯化形式如酰基甘油、磷脂、硫脂或糖脂形式存在。预计可以将上文描述的编码允许 ARA 生物合成的多肽的嵌合基因进一步工程化,以包括合适的细胞内靶定序列。

Juretzek 等(Yeast, 18: 97-113 (2001))注意到解脂耶氏酵母中整合的质粒拷贝数的稳定性依赖于各个转化体,即受体株和使用的靶定平台。因此,技术人员将理解,必须筛选多个转化体,以获得展示需要的表达水平和模式的菌株。所述筛选可以通过 DNA 印迹的 Southern 分析(Southern, J. Mol. Biol. 98: 503 (1975))、mRNA 表达的 Northern 分析(Kroczeck, J. Chromatogr. Biomed. Appl., 618 (1-2): 133-145 (1993))、蛋白表达的 Western 分析、表型分析或 PUFA 产物的 GC 分析实现。

总之,可以将上文描述的每一种方法用于增加解脂耶氏酵母中特定基因产物(如去饱和酶、延伸酶、酰基转移酶)的表达;并且,生物技术领域的技术人员能够容易地选择允许 ARA 的高水平生产的合适方法组合。

用于增加 ARA 生产的途径工程化

尽管上文描述的方法可以用于上调各个异源基因的表达,但增加解脂耶氏酵母中的 ARA 生产的挑战更复杂,并且可能需要多个代谢途径的协调操作。首先将解决 PUFA 生物合成途径的操作,然后是 TAG 生物合成途径和 TAG 降解途径的理想操作。

如上文描述的,生产占总油级分的 5%以上的 ARA,或更优选占总油级分的 10%以上的 ARA,或甚至更优选占总油级分的 15-20%以

上的 ARA, 或最优选占总油级分的 25-30%以上的 ARA 的解脂耶氏酵母株的构建至少需要以下用于表达 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径的基因: $\Delta 6$ 去饱和酶、 $C_{18/20}$ 延伸酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶; 或至少需要以下用于表达 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径的基因: $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶。但是, 在任意一种实施方案中, 可能需要在宿主菌株中额外包括 $\Delta 9$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶、 $C_{14/16}$ 延伸酶和/或 $C_{16/18}$ 延伸酶。

在一些情况下, 用串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶代替天然解脂耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶可能证明是有利的, 因为串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶增加底物转化百分比 (WO 2005/047485)。更具体地, 尽管这两种 $\Delta 12$ 去饱和酶都催化油酸转化为 LA, 这两种酶的总体特异性不同 (从而影响酶的底物转化百分比)。申请人确定了串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶比解脂耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶具有更高的将 LA 加载到磷脂酰胆碱底物的 sn-2 位置上的能力 (从而促进随后通过 $\Delta 6$ 去饱和酶进行的反应)。基于此, 串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶的超量表达和解脂耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶敲除的组合可能导致产物增加, 用于随后转化为 ARA。

在一些实施方案中, 调节宿主基因组的天然 DAG ATs 活性可能是有用的, 从而使得能够操纵解脂耶氏酵母宿主中脂质和油中 PUFAs 的百分比。具体地, 由于预计油合成竞争含油性的多不饱和化, 可能减少或灭活生物的一种或多种酰基转移酶 (如 PDAT 和/或 DGAT1 和/或 DGAT2) 的活性, 从而减少油生物合成的总体速度, 而同时增加掺入脂质和油级分中的 PUFAs 百分比 (相对于总脂肪酸)。这是由于允许多不饱和化更有效性进行; 或者, 也就是说, 通过下调特定 DAG ATs 的活性, 油生物合成和多不饱和化之间的底物竞争减少, 有利于含油性的多不饱和化。

本领域技术人员将具有阐释下调的最优水平所必须的技术和获得所述抑制需要的方法。例如, 在一些优选实施方案中, 可能需要操纵单个 DAG AT 的活性 (如建立 DGAT1 敲除, 而不改变 PDAT 和 DGAT2 的活性)。在替代实施方案中, 含油生物包含总共 “n” 种天然 DAG ATs, 修饰总共 “n-1” 种酰基转移酶的活性, 导致油生物合成的速度降低, 而剩余的酰基转移酶保留其野生型活性。在一些情况下, 可能需要操纵一些优选的含油生物中的所有天然 DAG ATs 的活性, 从而

在多不饱和化速度方面实现油生物合成的最优速度。

以相似的方式，申请人假定异源酰基转移酶的表达与相应的天然解脂耶氏酵母酰基转移酶的敲除的组合能够显著增加宿主细胞中生产的总 ARA。具体地，如上文所提示的，对 C20 和更高级的脂肪酸具有特异性的异源 GPAT、LPAAT、DGAT1、DGAT2、PDAT 和 LPCAT 酰基转移酶比天然酶优选，因为解脂耶氏酵母中天然生产的 PUFAs 限于 18:2 脂肪酸，并且天然酶可能不能有效催化与更长链脂肪酸的反应。基于该结论，申请人鉴定了编码高山被孢霉中的 GPAT、LPAAT、DGAT1 和 DGAT2 的基因，并且在生产 EPA 的工程化耶氏酵母宿主中表达了这些基因，导致 PUFA 生物合成的增加（本文的实施例 14-17）。随后，减少或敲除了解脂耶氏酵母中一些天然酰基转移酶（如 DGAT1 和 DGAT2）的活性，作为减少天然和异源酰基转移酶之间的底物竞争的手段。在生产 ARA 的工程化耶氏酵母宿主中可以预期相似的结果。

也必须考虑途径的操纵和影响 ARA 生产的总体调节剂。例如，通过增加长链饱和和不饱和脂肪酸如棕榈酸（16:0）和硬脂酸（18:0）的前体的可获得性而增加碳流入 PUFA 生物合成途径是有用的。前者的合成依赖于 $C_{14/16}$ 延伸酶的活性，而后者的合成依赖于 $C_{16/18}$ 延伸酶的活性。因此，天然解脂耶氏酵母 $C_{14/16}$ 延伸酶（SEQ ID NOs: 64 和 65）的超量表达显著增加了 16:0 和 16:1 脂肪酸的生产（相对于对照菌株增加 22%）；类似地，天然解脂耶氏酵母 $C_{16/18}$ 延伸酶（SEQ ID NOs: 61 和 62）的超量表达增加了 18:0、18:1、18:2 和 18:3 脂肪酸的生产（相对于对照菌株增加 18%）并减少了 C_{16} 脂肪酸的积累（相对于对照菌株减少 22%）。当然，如此处证明和 Inagaki, K.等（*Biosci. Biotech. Biochem.* 66（3）：613-621（2002））的研究证明的，在本发明的某些实施方案中，共表达异源 $C_{16/18}$ 延伸酶（如来自褐家鼠 [GenBank 获取号 AB071986；此处是 SEQ ID NOs: 50 和 51]和/或来自高山被孢霉 [SEQ ID NO: 53 和 54]可能是有用的。因此，尽管必须最小操纵解脂耶氏酵母宿主菌株表达： $\Delta 6$ 去饱和酶、 $C_{18/20}$ 延伸酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶；或 $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶用于 ARA 的生物合成，但在进一步优选的实施方案中，宿主菌株额外包括以下至少一种： $\Delta 9$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶、 $C_{14/16}$ 延伸酶和/或 $C_{16/18}$ 延伸

酶。

在另一种优选实施方案中，在本发明的解脂耶氏酵母中修饰影响脂肪酸降解和 TAG 降解的途径，使在细胞中的酰基-CoA 集合或 TAG 级分中积累的 ARA 的降解最少。这些途径分别由酰基-CoA 氧化酶和脂肪酶基因代表。更具体地，酰基-CoA 氧化酶 (EC 1.3.3.6) 催化过氧化物酶体 β -氧化反应，其中每个循环的降解都产生酰基-CoA 分子和比脂肪酸底物短两个碳原子的脂肪酸。解脂耶氏酵母中存在 5 种酰基-CoA 氧化酶同工酶，由 POX1、POX2、POX3、POX4 和 POX5 基因（也称作 Aco1、Aco2、Aco3、Aco4 和 Aco5 基因）编码，所述基因分别相应于 GenBank 获取号 AJ001299-AJ001303（也参见相应的 GenBank 获取号 XP_504703、XP_505264、XP_503244、XP_504475 和 XP_502199）。每种同工酶具有不同的底物特异性；例如，POX3 基因编码对短链脂肪酸具有活性的酰基-CoA 氧化酶，而 POX2 基因编码对长链脂肪酸具有活性的酰基-CoA 氧化酶 (Wang H.J., et al. J. Bacteriol., 181: 5140-5148 (1999))。认为任何上述基因的活性都可以被减少或消除，从而以对此处的目的有利的方式修饰本发明的宿主细胞中的过氧化物酶体 β -氧化。最后，为了避免混淆，申请人将上文描述的酰基-CoA 氧化酶称作 POX 基因，但根据一些公开文献，该术语可以与 Aco 基因命名互换使用。

类似地，已经在解脂耶氏酵母中检测到了一些脂肪酶 (EC 3.1.1.3)，包括细胞内、膜结合的和细胞外酶 (Choupina, A., et al. Curr. Genet. 35: 297 (1999); Pignede, G., et al. J. Bacteriol. 182: 2802-2810 (2000))。例如，Lip1 (GenBank 获取号 Z50020) 和 Lip3 (GenBank 获取号 AJ249751) 是细胞内或膜结合的，而 Lip2 (GenBank 获取号 AJ012632) 编码细胞外脂肪酶。这些脂肪酶中的每一种都是破坏的靶，因为这些酶催化反应，所述反应中 TAG 和水直接降解为 DAG 和脂肪酸阴离子。

在其它替代实施方案中，可以在解脂耶氏酵母的优选宿主菌株中操纵一些脂肪酶的活性。磷脂酶在膜脂质的生物合成和降解中起关键作用。更具体地，术语“磷脂酶”是指具有水解甘油磷脂中的一个或多个酯键的能力的一组异源酶。尽管所有的磷脂酶都靶定磷脂作为底物，每一种酶都具有切割特定酯键的能力。因此，磷脂酶命名区分了

各个磷脂酶，并且表明了磷脂分子中靶定的特定键。例如，磷脂酶 A₁ (PLA₁) 水解甘油部分 sn-1 位置上的脂肪酰基酯键，而磷脂酶 A₂ (PLA₂) 除去该分子 sn-2 位置上的脂肪酸。PLA₁ (EC 3.1.1.32) 和 PLA₂ (EC 3.1.1.4) 的作用分别导致游离脂肪酸和 2-酰基溶血磷脂或 1-酰基溶血磷脂的积累。磷脂酶 C (PLC) (EC 3.1.4.3) 水解磷脂主链中的磷酸二酯键，并且依赖于涉及的特定磷脂种类，即，磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺等（如 PLC₁ 负责以下反应：1-磷脂酰-1D-肌醇 4,5-二磷酸+H₂O=1D-肌醇 1,4,5-三磷酸+DAG；ISC1 编码肌醇鞘磷脂特异性磷脂酶 C[Sawai, H., et al. J. Biol. Chem. 275, 39793-39798 (2000)]）。磷脂酶 D (PLD) (EC 3.1.4.4) 切割第二个磷酸二酯键，产生磷脂酸和胆碱或乙醇胺，再次依赖于涉及的磷脂类型。磷脂酶 B (PLB) 具有除去 sn-1 和 sn-2 脂肪酸的能力，并且在具有水解酶（其中该酶从磷脂[PLB 活性]和溶血磷脂[溶血磷脂酶活性]切割脂肪酸，以释放脂肪酸）和溶血磷脂酶-转酰基酶（其中该酶能够通过将游离脂肪酸转移到溶血磷脂上而产生磷脂）活性方面是独特的。超量表达一种或多种所述磷脂酶可能是有用的，以增加在转化的耶氏酵母宿主细胞的总油级分中积累的 ARA 浓度。假定观察到该影响，因为磷脂酶将酰基从 PC 释放到 CoA 集合中，以延伸或掺入到甘油三酯中。

在另一种替代实施方案中，也可以在解脂耶氏酵母的优选宿主菌株中操纵 CDP-胆碱途径中负责磷脂酰胆碱 (PC) 生物合成的酶，作为增加总 ARA 生物合成的手段。通过编码二酰基甘油胆碱磷酸转移酶 (EC 2.7.8.2) 的解脂耶氏酵母 CPT1 基因的超量表达证明了该技术的用途，从而导致工程化的解脂耶氏酵母菌株的 EPA 生物合成增加。本领域技术人员熟悉 PC 生物合成途径，并且了解其它合适的候选酶。

尽管操纵诸如上文描述的生物化学途径的方法是本领域技术人员公知的，下文将简述用于减少或消除天然基因活性的一些技术的综述。这些技术可以用于下调上文描述的天然解脂耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶、GPAT、LPAAT、DGAT1、DGAT2、PDAT、LPCAT、酰基-CoA 氧化酶 2 (Aco2 或 Pox2)、酰基-CoA 氧化酶 3 (Aco3 或 Pox3) 和/或脂肪酶基因的表达。

尽管本领域技术人员很容易确定用于减少或消除天然基因活性的最合适的技术，但一般地，可以通过例如以下方法减少或消除特定基因的内源活性：1.) 通过插入、取代和/或缺失靶基因的全部或部分而破坏基因；2.) 提供用于将反义序列转录为基因的转录产物的盒；3.) 使用天然具有很少或不具有[或经过突变而具有很少或不具有]特定基因的活性的宿主细胞；4.) 超量表达诱变的遗传亚单位 (hereosubunit) (即，在包含两个或多个遗传亚单位的酶中)，从而由于“显性失活作用”减少酶活性；和 5.) 采用 iRNA 技术。在某些情况下，也可以通过利用特定抑制剂 (如去饱和酶抑制剂，如 U.S. 4,778,630 中描述的那些) 实现不需要的基因途径的抑制。

为了进行基因破坏，将外源 DNA 片段 (通常是选择标记基因，但任选是在表达时赋予需要的表型的嵌合基因或嵌合基因簇) 插入要破坏的结构基因，以便破坏它的编码序列，并因此功能性灭活所述基因。将所述破坏盒转化入宿主细胞，导致了非通过同源重组用无功能的破坏的基因替代功能性天然基因 (例如，参见：Hamilton et al. *J. Bacteriol.* 171: 4617-4622 (1989)；Balbas et al. *Gene* 136: 211-213 (1993)；Gueldener et al. *Nucleic Acids Res.* 24: 2519-2524 (1996)；和 Smith et al. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 270-277 (1996))。

当靶基因的序列已知时，反义技术是下调基因的另一种方法。为了实现这一目的，克隆来自所需基因的核酸片段，并且可操作地与启动子连接，以便 RNA 的反义链能够转录。然后将该构建体导入宿主细胞，并且生产 RNA 的反义链。反义 RNA 能通过阻止编码感兴趣的蛋白的 mRNA 的积累，抑制基因表达。本领域技术人员可以理解的是，特殊考虑与使用反义技术相关，以便减少特定基因的表达。例如，反义基因的适当水平的表达可能需要使用不同的嵌合基因，其中采用本领域技术人员所公知的不同的调节元件。

尽管当序列已知时，靶定的基因破坏和反义技术提供了下调基因的有效方法，业已开发了不是基于序列的其他特异性更低的方法 (例如通过 UV 辐射/化学试剂进行诱变，或使用可转座元件/转座子；参见 WO 04/101757)。

在替代的实施方案中，可以通过操纵控制蛋白表达的调节序列减少特定基因的内源活性。如本领域公知的，与编码序列相关的调节序

列包括转录和翻译“控制”核苷酸序列，其位于编码序列上游（5'非编码序列）、序列内、或下游（3'非编码序列），并且，影响相关编码序列的转录、RNA 加工或稳定性、或翻译。因此，特定基因的调节序列的操纵可以表示基因启动子、翻译前导序列、内含子、增强子、起始控制区、聚腺苷酸化识别序列、RNA 加工位点、效应物结合位点和茎-环结构的操纵。因此，例如，可以去除或破坏 DAG AT 的启动子，以下调 DAG AT 的表达，从而实现脂质和油生物合成的速度降低。或者，可以用启动子活性比天然启动子低的异源启动子取代驱动 DAG AT 表达的天然启动子。用于操纵调节序列的方法是本领域技术人员公知的。

总之，采用此处提供的教导，转化的含油微生物宿主将生产占微生物宿主的总脂质的至少约 5% 的 ARA，优选占总脂质的至少约 10% 的 ARA，更优选占总脂质的至少约 15% 的 ARA，更优选占总脂质的至少约 20% 的 ARA，最优选占总脂质的至少约 25-30% 的 ARA。

用于生产 ARA 的发酵过程

转化的微生物宿主细胞是在优化嵌合基因（如编码去饱和酶、延伸酶、酰基转移酶等）的表达，并且产生最大和最经济的 ARA 产率的条件下生长的。一般，可以优化的培养基条件包括碳源的类型和用量、氮源的类型和用量、碳氮比、氧水平、生长温度、pH、生物量生产期的长度、油积累期的长度，以及细胞收获时间。解脂耶氏酵母在复杂培养基（例如，酵母提取物-蛋白胨-右旋糖培养液（YPD））或缺少生长所必需的成分，以便强制选择需要的表达盒的限定基本培养基（例如，Yeast Nitrogen Base（DIFCO Laboratories, Detroit, MI））中生长。

本发明的发酵培养基必须包括合适的碳源。合适的碳源包括，但不局限于：单糖（例如，葡萄糖、果糖）、二糖（例如，乳糖、蔗糖）、寡糖、多糖（例如，淀粉、纤维素或它们的混合物）、糖醇（例如，甘油）或可更新饲料（例如，干酪乳清渗透物、玉米浆、甜菜糖浆、大麦芽）的混合物。另外，碳源可以包括链烷、脂肪酸、脂肪酸酯、甘油一酯、甘油二酯、甘油三酯、磷脂，和脂肪酸的各种商业来源，包括植物油（例如，大豆油）和动物脂肪。另外，碳源可以包括一碳源（例如，二氧化碳、甲醇、甲醛、甲酸和含碳的胺），业已证实了

其转化成关键生物化学中间体的代谢转化。因此, 预计, 用于本发明的碳源包括可以包括多种含碳的来源。尽管上述所有碳源及其混合物预计都适合本发明, 优选的碳源是糖和/或脂肪酸。最优选的是葡萄糖和/或含有 10-22 个碳的脂肪酸。

氮可以由无机(例如, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)或有机来源(例如, 尿素或谷氨酸)提供。除了合适的碳和氮源之外, 发酵培养基还必须还包括合适的矿物质、盐、辅因子、缓冲液、维生素, 和本领域技术人员已知的适合含油酵母生长, 并且促进 ARA 生产所需要的酶途径的其他成分。特别关注若干金属离子(例如, Mn^{+2} 、 Co^{+2} 、 Zn^{+2} 、 Mg^{+2}), 它们能促进脂质和 PUFAs 的合成(Nakahara, T. et al., Ind. Appl. Single Cell Oils, D. J. Kyle and R. Colin, eds. pp 61-97 (1992))。

本发明的优选的生长培养基是常见的商业制备的培养基, 如 Yeast Nitrogen Base (DIFCO Laboratories, Detroit, MI)。其他确定的或合成的生长培养基也可以使用, 并且适合特定解脂耶氏酵母生长的培养基是微生物学或发酵科学领域的技术人员所公知的。用于发酵的合适的 pH 范围通常为大约 pH 4.0-pH 8.0, 其中 pH 5.5-pH 7.0 是起始生长条件的优选范围。发酵可以在需氧或厌氧条件下进行, 其中, 微需氧条件是优选的。

通常, 高水平 PUFAs 在含油酵母细胞中的积累, 需要两个阶段的过程, 因为在脂肪的生长和合成/储存之间的代谢状态必须是“平衡的”。因此, 最优选的是, 需要两个阶段的发酵过程在解脂耶氏酵母中生产 ARA。该方法描述于 WO 2004/101757, 在生长过程中具有多个合适的发酵过程设计(即分批、补料分批和连续)和考虑。

ARA 的纯化和加工

PUFAs, 包括 ARA, 可以作为游离脂肪酸形式出现在宿主微生物中, 或者以诸如酰基甘油、磷脂、硫脂或糖脂的脂化形式出现在宿主微生物中, 并且可以通过本领域所熟知的多种方法从宿主细胞中提取。酵母脂质的提取技术、品质分析和可接受性标准的一篇综述是: Z. Jacobs (Critical Reviews in Biotechnology 12 (5/6): 463-491 (1992))。有关下游加工的简单综述还可以参见 A. Singh 和 O. Ward (Adv. Appl. Microbiol. 45: 271-312 (1997))。

一般地, 纯化 ARA 和其它 PUFAs 的方法可以包括用有机溶剂萃

取、超声波处理、超临界流体萃取（例如，使用二氧化碳）、皂化和物理方法，如压力，或它们的组合。其它细节可参考 WO 2004/101757 的教导。

可以氢化含有已经精制和/或纯化的 ARA 的油，从而得到具有多种熔解特性和质地的脂肪。很多经过加工的脂肪，包括糊、甜食脂肪、硬质脂肪、人造黄油、烘烤起酥等，需要室温下的各种程度的固化，并且仅仅可以通过改变原料油的物理特性而制备。这最常见是通过催化氢化实现的。

氢化是一种化学反应，其中在诸如镍的催化剂辅助下将氢加入不饱和脂肪酸双键。氢化具有两个主要作用。首先，由于不饱和脂肪酸含量的减少，油的氧化稳定性增加。其次，油的物理性质改变，这是因为脂肪酸修饰增加了熔点，在室温下得到半液体或固体脂肪。

存在许多影响氢化反应的变量，其随后改变终产物的组成。包括压力、温度、催化剂类型和浓度、搅拌和反应器设计的操作条件是可以控制的较重要的参数中的一些。选择性氢化条件可以相对于较不饱和的脂肪酸而言优先用于氢化更饱和的脂肪酸。通常用非常轻的或刷洗氢化来增加液体油的稳定性。进一步的氢化将液体油转化为物理固体的脂肪。氢化的程度依赖于针对特定终产物设计的所需性能和熔解特征。用于制备烘烤产品的液体起酥、用于商业煎炸和烘烤操作的固体脂肪和起酥，以及用于制造人造黄油的碱原料是通过氢化得到的多种可能的油和脂肪产品中的一些。氢化和氢化产物的更详细描述可以参见 Patterson, H. B. W., *Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice*. The American Oil Chemists' Society, 1994.

用于食料中的生产 ARA 的解脂耶氏酵母菌株

目前的市场需要大量掺入 ω -3 和/或 ω -6 脂肪酸（特别是 ARA、EPA 和 DHA）的食品和饲料产品。考虑本发明的包含 ARA 的酵母微生物油将在食品和饲料产品中起作用，赋予本发明的制剂的健康益处。

由此处描述的酵母宿主生产的含 ω -3 和/或 ω -6 脂肪酸的微生物油将适用于多种食品和饲料产品中，包括但不限于食物类似物、肉类产品、谷物产品、烘烤食品、快餐和乳制品。此外，本发明的微生物油可以用于制剂中，在包括医学营养品、饮食补充物、婴儿配方和药品的医学食品中赋予健康益处。食品加工和食品制剂领域的技术人员将

理解微生物油的量和组成如何添加到食物或食品中。所述量在此称作“有效”量，并且依赖于食品或饲料产品、该产品意欲补充的饮食或该医学食品或医学营养品意欲矫正或治疗的医学状况。

可以用本领域技术人员公知的方法制备食物类似物。可以提到的是肉类似物、苜蓿类似物、乳类似物等。从大豆制备的肉类似物含大豆蛋白或豆腐和其它混合在一起的成分，以模拟各种肉类。这些肉替代品以冷冻、罐装或干燥食品出售。通常，它们可以以它们所替代的食品相同的方式使用。肉类似物的实例包括但不限于：火腿类似物、香肠类似物、咸肉类似物等。

根据功能和组成特征，可以将食物类似物分类为模拟物或替代物。例如，模拟干酪仅仅需要模拟其设计用于替代的干酪。然而，只有当一种产品在营养上等同于它所替代的干酪和满足该干酪的最小组成需要，才能将其称作替代干酪。因此，替代干酪通常比模拟干酪具有更高的蛋白水平，并且可以用维生素和矿物质进行强化。

乳类似物和非乳制食品包括但不限于：模拟乳和非乳制甜点（如从大豆和/或大豆蛋白产品制备的那些）。

肉产品包括广泛的产品。在美国，“肉”包括从牛、狗和羊生产的“红肉”。除了红肉外，还有禽类，包括鸡、火鸡、鹅、珍珠鸡、鸭，以及鱼类和甲壳类动物。存在各种类型的调味和加工的肉类产品：新鲜的、熟化和煎炸的、以及熟化和蒸煮的。香肠和热狗是加工的肉产品的实例。因此，此处用到的“肉产品”包括但不限于加工的肉产品。

谷物食品是来源于谷物加工的食品。谷物包括来自产生可食用谷物（籽粒）的草本科植物的任何植物。最常见的谷物是大麦、玉米、小米、燕麦、奎藜、稻、黑麦、高粱、黑小麦、小麦和野生稻。谷物食品的实例包括但不限于：全谷、全谷粗粉、粗谷粉、面粉、麸、胚芽、早餐谷物、寄出食品、意大利面食等。

烘烤食品包括上文描述的任何谷物食品，并且以能够烘烤，即通过热干燥或硬化的方式烘烤或加工过。烘烤食品的实例包括但不限于：面包、蛋糕、炸面圈、面包条、意大利面食、面包屑、烘烤的快餐、小饼干、小薄脆饼干、小甜饼和小脆饼干。如上文提到的，本发明的油可以用作一种成分。

快餐食品包括上文或下文描述的任何食品。

煎炸食品包括经过煎炸的上文或下文描述的任何食品。

饮料可以是液体或干粉形式。

例如，可以提到的是非碳酸饮料；果汁、新鲜的、冷冻的、罐装的或浓缩饮料；调味的或普通的乳饮料等。成人和婴儿营养配方是本领域公知的并且可以商购（如来自 Ross Products Division, Abbott Laboratories 的 Similac®、Ensure®、Jevity®和 Alimentum®）。婴儿配方是给婴儿或幼儿喂食的液体或重配粉末。它们作为母乳的替代品。婴儿配方在婴儿饮食中起作特殊作用，因为它们通常是婴儿营养物质的唯一来源；并且尽管母乳喂养是婴儿的最佳营养，但婴儿配方足够接近，因此婴儿不仅存活，还茁壮成长。婴儿配方正在变得越来越接近于母乳。

乳制品是来源于乳的产品。乳类似物或非乳制品来源于除乳以外的来源，例如，上文讨论的大豆乳。这些产品包括但不限于：全乳、脱脂乳、发酵乳产品如酸奶酪或酸奶、乳酪、黄油、炼乳、脱水乳、调咖啡用白油、咖啡伴侣、冰激凌、干酪等。

可以掺入本发明的含 ARA 的油的其它食品包括，例如：口香糖、糖果和糖霜、明胶和布丁、硬糖和软糖、果酱和果冻、白砂糖、糖替代品、甜调料、糕点装饰物和糖浆，以及干粉混合物。

健康食品和药品

健康食品是赋予健康益处的任何食品，包括功能性食品、医学食品、医学营养品和饮食补充物。此外，本发明的微生物油可以用于标准药物组合物中。包含 ARA 的本发明的工程化的解脂耶氏酵母菌株或由其制备的微生物油可以容易地掺入上述任何食品中，从而生产例如功能性或医学食品。例如，包含 ARA 的更浓缩的制剂包括胶囊、粉末、片剂、软凝胶、凝胶帽、液体浓缩物和乳状液，它们可以用作人或人以外的其它动物的营养补充物。

用于饮食补充物中

更浓缩的含 ARA 的制剂包括胶囊、粉末、片剂、软凝胶、凝胶帽、液体浓缩物和乳状液，它们可以用作人或人以外的其它动物的营养补充物。特别地，本发明的 ARA 油特别适于掺入饮食补充物，如婴儿配方或婴儿食物。

婴儿配方是给婴儿或幼儿喂食的液体或重配粉末。此处将“婴儿配方”定义为肠道营养品，其可以在哺乳期婴儿中代替母乳，并且通常包含与在水溶液中与所需百分比的碳水化合物和蛋白混合的所需百分比的脂肪（例如参见 U.S. 4,670,285）。基于世界范围的组成研究以及专家组规定的水平，平均母乳典型地含约 0.20%-0.40%的总脂肪酸（假定大约 50%的热卡来自脂肪）；并且，DHA 与 ARA 的比例通常是大约 1:1-1:2（参见例如 Enfamil LIPIL™[Mead Johnson & Company] 和 Similac Advance™[Ross Products Division, Abbott Laboratories] 的配方）。婴儿配方在婴儿饮食中起作特殊作用，因为它们通常是婴儿营养物质的唯一来源；并且尽管母乳喂养是婴儿的最佳营养，但婴儿配方足够接近，因此婴儿不仅存活，还茁壮成长。

用于动物饲料中

动物饲料在此一般定义为意欲用作除人之外的动物的饲料或混合于饲料中的产品。并且，如上文提到的，本发明的包含 ARA 的油可以用作各种动物饲料中的成分。

更具体地，尽管不进行限制，预计本发明的油可以用于宠物食品中、反刍动物和禽类动物食品中以及水产养殖食品中。宠物食品是意欲喂饲宠物[如狗、猫、鸟类、爬行动物、啮齿类动物]的产品；这些产品包括上文所述的谷物和健康食品，以及肉和肉副产品、大豆蛋白产品、草和干草产品（如紫花苜蓿、梯牧草、燕麦或雀麦草、蔬菜）。反刍动物和禽类动物食品是意欲喂饲给例如火鸡、鸡、牛和猪的食品。至于上文所述的宠物食品，这些食品包括谷物和上文列出的健康食品、大豆蛋白产品、肉和肉副产品、以及草和干草产品。水产养殖食品（或“水产养殖饲料”）是意欲用于水产养殖的产品，所述水产养殖涉及淡水或海水中水生生物和/或动物的繁殖、培养和饲养。

认为本发明的生产高浓度 ARA、EPA 和/或 DHA 的工程化的解脂耶氏酵母菌株特别可以用于掺入大多数动物饲料配方中。除了提供必要的 ω -3 和/或 ω -6 PUFAs，酵母本身是一种有用的蛋白和其它营养物质（如维生素、矿物质、核酸、复杂碳水化合物等）的来源，其能够有利于总体动物健康和营养，并且增加配方的美味性。因此，认为加入包含本发明的重组生产宿主的酵母生物量，将是动物饲料配方中的极佳的额外饲料营养物质来源。更具体地，解脂耶氏酵母（ATCC

#20362) 具有以下大约的化学组成 (相对于干细胞总量的百分比): 35%蛋白、40%脂质、10%碳水化合物、5%核酸、5%灰分和 5%水。此外, 在碳水化合物级分中, β -葡聚糖占大约 45.6 mg/g, 甘露聚糖占大约 11.4 mg/g, 几丁质占大约 52.6 mg/g (而海藻糖是最少的成分[大约 0.7 mg/g])。

大量的文献检验了 β -葡聚糖、甘露聚糖和几丁质的免疫调节作用。最充分地研究了细菌和真菌细胞壁的主要成分 β -葡聚糖刺激非特异性免疫 (即“免疫刺激作用”) 从而改进水产养殖物种、宠物和畜牧动物以及人的健康的方式, 类似地, 也发现几丁质和甘露聚糖是有用的免疫刺激剂。具体地, 使用 β -葡聚糖可以获得免疫应答的总体增强, 因为这些 β -1,3-D-聚葡萄糖分子以非特异性方式刺激白细胞 (如巨噬细胞、中性粒细胞和单核细胞) 的产生, 从而增加抗多种致病抗原或环境刺激物的敏感性和防御能力。更具体地, 许多研究证明了 β -葡聚糖能够: 赋予增强的抗病毒、细菌、真菌和寄生虫感染的保护作用; 当与抗生素和疫苗联合使用时, 施加佐剂作用; 增强伤口愈合; 抵抗自由基导致的破坏; 增强肿瘤消退; 调节细菌内毒素的毒性; 和增强粘膜免疫 (综述于 Raa, J. et al., Norwegian Beta Glucan Research, Clinical Applications of Natural Medicine. Immune: Depressions Dysfunction & Deficiency (1990))。记载了酵母 β -葡聚糖、甘露聚糖和几丁质在传统动物饲养和水产养殖中的作用的现有文献的例子包括: L.A. White et al. (J. Anim. Sci. 80: 2619-2628 (2002)), supplementation in weanling pigs; K.S. Swanson et al. (J. Nutr. 132: 980-989 (2002)), supplementation in dogs; J. Ortuño et al. (Vet. Immunol. Immunopath. 85: 41-50 (2002)), whole *Saccharomyces cerevisiae* administered to gilthead seabream; A. Rodríguez et al. (Fish Shell. Immuno. 16: 241-249 (2004)), whole *Mucor circinelloides* administered to gilthead seabream; M. Bagni et al. (Fish Shell. Immuno. 18: 311-325 (2005)), supplementation of sea bass with a yeast extract containing β -glucans; J. Raa (In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22

Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico), a review of the use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds.

基于解脂耶氏酵母的独特蛋白:脂质:碳水化合物组成,以及独特的复杂碳水化合物谱(包括甘露聚糖:β-葡聚糖:几丁质的大约 1:4:4.6 的比例),认为本发明的基因工程化的酵母细胞(或其部分)是动物饲料配方的有用添加剂(例如作为完整的[冻干的]酵母细胞、作为纯化的细胞壁、作为纯化的酵母碳水化合物或在多种其它分级分离形式内)。

在水产养殖业方面,对各种鱼类物种的营养需要的了解增加和饲料制造的技术进步,使得制造的或人工饲料(配方饲料)的开发和使用能够补充或代替水产养殖业的天然饲料。但是,一般地,包含在鱼类的水产养殖饲料中的各种营养物质的一般比例包括(以干饲料的百分比表示): 32-45%蛋白、4-28%脂肪(其中至少 1-2%是 ω -3 和/或 ω -6 PUFAs)、10-30%碳水化合物、1.0-2.5%矿物质和 1.0-2.5%维生素。可以任选将大量其它成分加入配方中。这些其它成分包括:(1)类胡萝卜素,特别是用于鲑鱼类和观赏性的“水族馆”鱼类,以分别增强新鲜感和皮肤颜色;(2)结合剂,给饲料团提供稳定性,并且减少营养物质泄露到水中(如牛心、淀粉、纤维素、果胶、明胶、阿拉伯树胶、洋槐豆、琼脂、鹿角菜胶和其它藻酸盐);(3)防腐剂,如抗微生物剂和抗氧化剂,以延长鱼饲料的保质期,并且减少脂肪的腐臭(如维生素 E、丁基化的羟基苯甲醚、丁基化的羟基甲苯、乙氧基喹、和丙酸、苯甲酸或山梨酸的钠盐和钾盐);(4)化学引诱物和调味剂,以增强饲料的美味性及其摄食;和(5)其它饲料。所述其它饲料可以包括诸如纤维和灰分的材料(分别用作填料以及钙和磷的来源)和植物物质和/或鱼或鱿鱼食物(如活的、冷冻的或干燥的藻类、海虾、轮虫或其它浮游动物),以增强饲料的营养价值并增加鱼类对它的接受性。Nutrient Requirements of Fish (National Research Council, National Academy: Washington D.C., 1993) 提供了鱼类的必须营养物质和各种成分的营养含量的详细描述。

制造水产养殖配方需要考虑大量因素,因为完整的饲料必须是营养平衡的、美味的、在水中稳定的,并且具有合适的大小和质地。关于水产养殖饲料的营养组成,可以参考 Handbook on Ingredients for

Aquaculture Feeds (Hertrampf, J. W. and F. Piedad-Pascual. Kluwer Academic; Dordrecht, The Netherlands, 2000) 和 Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp (Tacon, A. G. J. Argent Laboratories; Redmond, 1990)。一般地, 饲料配制为干的(即最终水含量是 6-10%)、半湿的(即水含量是 35-40%)或湿的(即水含量是 50-70%)。干饲料包括以下这些: 干成分的简单疏松的混合物(即“浆”或“粗粉”); 压实的小团、碎屑或颗粒; 以及薄片。根据鱼类的饲养需要, 可以制备沉入水中或漂浮的小团。半湿和湿饲料是从单个或混合的成分(如无价值的鱼类或煮熟的豆类)制备, 并且可以成形为饼状或球状。

认为本发明的生产高浓度 ARA 的工程化的解脂耶氏酵母菌株特别可以用于包括在大多数水产养殖饲料中。除了提供必要的 ω -6 PUFAs, 酵母自身是可以增加配方的美味性的有用蛋白来源。在替代的实施方案中, 由本发明的解脂耶氏酵母菌株生产的油可以在从细胞团提取和纯化后, 直接加入水产养殖饲料配方中。

优选实施方案的描述

本发明证明了占含油酵母解脂耶氏酵母的总脂质比例的最多 10-14% 的 ARA 的合成。如图 4 所示, 通过将多个基因整合到野生型 ATCC #20362 解脂耶氏酵母中, 建立了许多解脂耶氏酵母菌株, 其中每种转化菌株都能够生产不同量的 PUFAs(包括 ARA)。菌株 Y2034 和 Y2047(表达 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径)和菌株 Y2214(表达 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径)的完整脂质谱示于下表 10。脂肪酸鉴定为 16:0、16:1、18:0、18:1(油酸)、18:2(LA)、GLA、DGLA 和 ARA; 并且每一种所述脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。“脂质% dcw”表示通过细胞干重测量的细胞中脂质的百分比。

表 10

解脂耶氏酵母菌株 Y2034、Y2047 和 Y2214 的脂质谱

菌株	脂肪酸含量							
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA
Y2034	13.1	8.1	1.7	7.4	14.8	25.2	8.3	11.2
Y2047	15.9	6.6	0.7	8.9	16.6	29.7	0.0	10.9
Y2214	7.9	15.3	0.0	13.7	37.5	0.0	7.9	14.0

下文描述了菌株 Y2047 中包含的基因修饰的更详细概括（其中完整的细节提供于实施例中的）：

（1）1 个拷贝的串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶的表达，在 FBA::F. $\Delta 12$::LIP2 嵌合基因中；

（2）来源于高山被孢霉 $\Delta 6$ 去饱和酶的 1 个拷贝的合成 $\Delta 6$ 去饱和酶基因（为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化）的表达，在 FBAIN:: $\Delta 6$ S::LIP1 嵌合基因中；

（3）来源于人 $\Delta 5$ 去饱和酶的 1 个拷贝的合成 $\Delta 5$ 去饱和酶基因（为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化）的表达，在 TEF::H.D5S::PEX16 嵌合基因中；

（4）来源于高山被孢霉高亲和力 $C_{18/20}$ 延伸酶的 1 个拷贝的合成的亲和力 $C_{18/20}$ 延伸酶基因（为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化）的表达，在 FBAIN::EL1S::PEX20 嵌合基因中；

（5）来源于金黄色破囊壶菌 $C_{18/20}$ 延伸酶的 1 个拷贝的合成 $C_{18/20}$ 延伸酶基因（为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化）的表达，在 TEF::EL2S::XPR 嵌合基因中；

（6）编码编码苹果酸异丙酯脱氢酶的天然解脂耶氏酵母 Leu2 基因的破坏。

相似地，下文描述了菌株 Y2214 内包含的基因修饰的更详细概括（其中完整的细节提供于实施例中的）：

（1）来源于球等鞭金藻 $\Delta 9$ 延伸酶基因的 5 个拷贝的合成 $\Delta 9$ 延伸酶基因（为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化）的表达，在 GPAT::IgD9e::PEX20、TEF::IgD9e::LIP1 和 FBAINm::IgD9e::OCT

嵌合基因中;

(2) 来源于纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶基因的 3 个拷贝的合成 $\Delta 8$ 去饱和酶基因 (为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化) 的表达, 在 FBAIN::D8SF::PEX16 和 GPD::D8SF::PEX16 嵌合基因中;

(3) 2 个拷贝的高山被孢霉 $\Delta 5$ 去饱和酶的表达, 在 FBAIN::MA $\Delta 5$::PEX20 和 GPAT::MA $\Delta 5$::PEX20 嵌合基因中;

(4) 来源于球等鞭金藻 $\Delta 5$ 去饱和酶的 2 个拷贝的合成 $\Delta 5$ 去饱和酶基因 (为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化) 的表达, 在 YAT1::I.D5S::LIP1 和 GPM/FBAIN::I.D5S::OCT 嵌合基因中;

(5) 1 个拷贝的串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶的表达, 在 FBAIN::F.D12S::PEX20 嵌合基因中;

(6) 来源于褐家鼠 rELO 基因的 1 个拷贝的合成 $C_{16/18}$ 延伸酶基因 (为在解脂耶氏酵母中表达进行了密码子优化) 的表达, 在 GPM/FBAintron::rELO2S::OCT 嵌合基因中; 和

(7) 编码酵母氨酸脱氢酶的天然解脂耶氏酵母 Lys5 基因的破坏。

尽管申请人分别证明了在这些特定的解脂耶氏酵母重组菌株中生产了 11% 和 14% ARA, 但根据此处公开的本发明, 宿主细胞中 EPA 的浓度可以通过额外的基因修饰显著增加。此外, 基于此处描述的教导和结果可以预见到本领域技术人员采用 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径和/或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径, 采用含油酵母作为合成多种 ω -3 和/或 ω -6 PUFAs 的平台建立的可行性和商业用途。

实施例

在以下实施例中进一步限定本发明。应当理解的是, 在这些实施方案中, 尽管指明了是本发明的优选实施方案, 但是, 是以说明形式提供的。通过上文的讨论和这些实施例, 本领域技术人员可以确定本发明的实质性特征, 并且, 在不超出本发明的构思和范围的前提下, 可以对本发明进行各种改变和改进, 以便适应各种用途和条件。

一般方法

用于实施例中的标准重组 DNA 和分子克隆技术为本领域所熟知的, 并且披露于以下文献中 1.) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring

Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (Maniatis); 2.) T. J. Silhavy, M. L. Bannan, and L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984); 和 3.) Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, 由 Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) 出版。

适合微生物培养物维持和生长的材料和方法为本领域所公知。适合在以下实施例中使用的使用的技术可以参见以下文献: Manual of Methods for General Bacteriology (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Phillips, Eds), American Society for Microbiology: Washington, D.C. (1994); 或参见 Thomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 2nd ed., Sinauer Associates: Sunderland, MA (1989)。用于生长和维持微生物细胞的所有试剂, 限制酶和材料都是从 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD), 或 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) 获得的, 除非另有说明。

大肠杆菌 (XL1-Blue) 感受态细胞是从 Stratagene 公司 (San Diego, CA) 购买的。大肠杆菌菌株通常是在 37℃ 下在 Luria Bertani (LB) 平板上生长的。

按照标准方法 (Sambrook 等, 同上) 进行一般分子克隆。寡核苷酸是由 Sigma-Genosys (Spring, TX) 合成的。在 50 µl 总体积中进行各个 PCR 扩增反应, 其中包括: PCR 缓冲液 (含 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 8.75), 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100), 100 µg/mL BSA (终浓度)、每种三磷酸脱氧核糖核苷酸各 200 µM、每种引物各 10 pmole 和 1 µl Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene, San Diego, CA), 除非另有说明。用 Stratagene's QuickChange™ 定点诱变试剂盒, 按照生产商的说明进行定点诱变。当 PCR 或定点诱变参与亚克隆时, 对所述构建体进行测序, 以便证实没有将误差导入所述序列。将 PCR 产物克隆到 Promega's pGEM-T-easy 载体 (Madison, WI) 中。

用载体和插入片段特异性引物的组合,采用染料终止子技术(U.S. 5,366,860; EP 272,007)在 ABI 自动测序仪上产生 DNA 序列。在测序仪(Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI)上进行序列编辑。所有序列代表每个方向覆盖至少两次。用 DNASTAR 软件(DNA Star, Inc.)完成基因序列的比较。或者,基因序列的操作使用可以从 Genetics Computer Group Inc. (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI)获得的程序组进行。使用了所述 GCG 程序“Pileup”,空位形成缺省值为 12,空位延伸缺省值为 4。使用了 GCG “Gap”或“Bestfit”程序,缺省的空位形成罚分为 50,缺省的空位延伸罚分为 3。除非另有说明,在所有其他场合下,都使用 GCG 程序的缺省参数。

进行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1993) 和 Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)) 检索,以鉴定与包含在 BLAST “nr”数据库中的序列(包括所有非冗余的 GenBank CDS 翻译、来源于三维结构 Brookhaven Protein 数据库的序列、SWISS-PROT 蛋白序列数据库、EMBL 和 DDBJ 数据库)具有相似性的分离的序列。按照所有可读框翻译序列,并且采用 NCBI 提供的 BLASTX 算法(Gish, W. and States, D. J. Nature Genetics 3: 266-272 (1993))比较与“nr”数据库中包含的所有公众可获得的蛋白序列的相似性。

根据同一性百分比、相似性百分比和预期值报告了 BLAST 比较的结果,该结果概括了与询问序列具有最多相似性的序列。“同一性百分比”定义为在两种蛋白之间相同的氨基酸的百分比。“相似性百分比”定义为在两种蛋白之间相同或保守的氨基酸的百分比。“预期值”估计了匹配的统计学显著性,该显著性用特定评分指出匹配数目,该评分是在对该大小的数据库进行检索而预期的,这种预期完全是随机的。

缩写的含义如下:“sec”表示秒,“min”表示分钟,“h”表示小时,“d”表示天,“ μ L”表示微升,“mL”表示毫升,“L”表示升,“ μ M”表示微摩尔浓度,“mM”表示毫摩尔浓度,“M”表示摩尔浓度,“mmol”毫摩尔,“ μ mole”表示微摩尔,“g”表示克,“ μ g”表示微克,“ng”表示纳克,“U”表示单位,“bp”

表示碱基对，而“kB”表示千碱基。

解脂耶氏酵母的转化和培养

从美国典型培养物保藏中心（Rockville, MD）购买解脂耶氏酵母菌株 ATCC #20362、#76982 和#90812。解脂耶氏酵母菌株在 28℃ 下在 YPD 琼脂（1%酵母提取物，2%细菌用蛋白胨，2%葡萄糖，2%琼脂）上生长。或者，“SD”培养基包含：含有硫酸铵而不含氨基酸的 0.67%的酵母氮基和 2%葡萄糖。

根据 Chen, D. C. et al. (Appl. Microbiol Biotechnol. 48 (2) : 232-235 (1997)) 的方法进行解脂耶氏酵母的转化，除非另外指明。简言之，将耶氏酵母划线到 YPD 平板上，在 30℃ 下生长大约 18 小时。从平板上刮下几个大满环的细胞，重悬于 1 ml 转化缓冲液中，该缓冲液含有：2.25 mL 50% PEG，平均分子量 3350；0.125 mL 2 M 醋酸锂，pH 6.0；0.125 mL 2 M DTT；和 50 µg 剪切的鲑鱼精子 DNA。然后，将大约 500 ng 线性化的质粒 DNA 在 100 µl 重悬的细胞中温育，以 15 分钟间隔涡旋下在 39℃ 维持 1 小时。将细胞铺板到选择培养基板上，在 30℃ 下维持 2-3 天。

为了选择转化体，一般使用 SD 培养基或基本培养基（“MM”）；MM 的组成如下：不含硫酸铵或氨基酸的 0.17%酵母氮基（DIFCO Laboratories, Detroit, MI）、2%葡萄糖、0.1%脯氨酸，pH 6.1。合适的情况下加入腺嘌呤、亮氨酸、赖氨酸和/或尿嘧啶补充物，达到 0.01%的终浓度（从而得到“MMA”、“MMLe”、“MMLy”和“MMU”选择培养基，每种都是用 20 g/L 琼脂制备的）。

或者，在 5-氟乳清酸（“FOA”；也称作 5-氟尿嘧啶-6 羧酸一水合物）选择培养基上选择转化体，该培养基包含：不含硫酸铵或氨基酸的 0.17%酵母氮基（DIFCO Laboratories）、2%葡萄糖、0.1%脯氨酸、75 mg/L 尿嘧啶、75 mg/L 尿苷、900 mg/L FOA (Zymo Research Corp., Orange, CA) 和 20 g/L 琼脂。

最后，对于设计用于促进含油性的条件的“两阶段生长条件”，按照如下制备高葡萄糖培养基（“HGM”）：14 g/L KH_2PO_4 、4 g/L K_2HPO_4 、2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、80 g/L 葡萄糖（pH 6.5）。根据以下方案，在“两阶段生长条件”下培养菌株：首先，30℃ 下 250 rpm/min 振荡条件下将三份细胞在液体 MM 中生长 48 小时。通过离心收集细

胞,提取上清液。将沉淀的细胞重悬于 HGM 中,30℃下 250 rpm/min 振荡条件下生长 72 小时或 96 小时。通过离心再次收集细胞,提取上清液。

解脂耶氏酵母的脂肪酸分析

为了进行脂肪酸分析,通过离心收集细胞,并且按照披露于以下文献中的方法提取脂质: Bligh, E.G.& Dyer, W. J. (Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917 (1959))。脂肪酸甲酯是通过脂质提取物与甲醇钠的脂交换反应制备的(Roughan, G., and Nishida I. Arch Biochem Biophys. 276 (1): 38-46 (1990)),并且随后用装有 30-m X 0.25 mm (内径)HP-INNOWAX(Hewlett-Packard)柱的 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。烘箱温度以 3.5℃/分钟的速度从 170℃(25 分钟保持时间)提高到 185℃。

为了进行直接的碱酯交换,收获耶氏酵母培养物(3 mL),在蒸馏水中洗涤一次,在 Speed-Vac 中真空干燥 5-10 分钟。将甲醇钠(100 μ l, 1%)加入样品,然后涡旋并摇动样品 20 分钟。加入 3 滴 1M NaCl 和 400 μ l 己烷后,涡旋和离心样品。取出上层,按照上文的描述通过 GC 进行分析。

实施例 1

鉴定用于在解脂耶氏酵母中高表达的启动子

进行了比较研究,研究 TEF、GPD、GPDIN、GPM、GPAT、FBA、FBAIN 和 YAT1 启动子的启动子活性,该研究是通过合成包含每种启动子和作为报道基因的编码葡萄糖醛酸酶(GUS)的大肠杆菌基因的构建体而进行的(Jefferson, R.A. Nature. 14(342): 837-838(1989))。然后,通过组织化学和荧光测定(Jefferson, R. A. Plant Mol. Biol. Reporter 5: 387-405 (1987))和/或通过使用实时 PCR 进行 mRNA 定量而测量 GUS 活性。

构建包含嵌合启动子::GUS::XPR 基因的质粒

质粒 pY5-30(图 5A; SEQ ID NO: 113)包含:耶氏酵母自主复制序列(ARS18);ColE1 质粒复制起点;用于在大肠杆菌中进行选择的氨苄青霉素抗性基因(Amp^R);用于在耶氏酵母中进行选择的耶氏酵母 LEU2 基因;和嵌合 TEF::GUS::XPR 基因。基于该质粒,

建立了一系列质粒，其中用多种其它天然解脂耶氏酵母启动子代替 TEF 启动子。

通过 PCR 扩增推定的启动子区，扩增中采用下表 11 所示引物和基因组解脂耶氏酵母 DNA 作为模板，或含有克隆到 pGEM-T-easy vector (Promega, Madison, WI) 载体中的合适 DNA 区的基因组 DNA 的片段。

表 11

包含嵌合启动子::GUS::XPR 基因的质粒的构建

启动子	引物	位置	RE 位点	质粒名称
GPD	YL211, YL212 (SEQ ID NOs: 169 和 170)	gpd 基因的‘ATG’翻译起始 位点-968 bp (SEQ ID NO: 158)	SalI 和 NcoI	pYZGDG
GPDIN	YL376, YL377 (SEQ ID NOs: 171 和 172)	gpd 基因周围的 -973 bp 至+201 bp (从而包括 146 bp 内含子, 其中该内含子 位于+49 bp 至+194 bp 的位置) (SEQ ID NO: 159)	PstI/NcoI (用于 启动子) 和 PstI/ SalI (用于 载体)	pDMW222
GPM	YL203, YL204 (SEQ ID NOs: 173 和 174)	gpm 基因的‘ATG’翻译起始 位点-875 bp (SEQ ID NO: 160)	NcoI 和 SalI	pYZGMG
GPAT	GPAT-5-1, GPAT-5-2 (SEQ ID NOs: 175 和 176)	gpat 基因的‘ATG’翻译起始 位点-1130 bp (SEQ ID NO: 164)	SalI 和 NcoI	pYGPAT -GUS
FBA	ODMW314, YL341 (SEQ ID NOs: 177 和 178)	Fba 基因周围的 -1001 bp 至-1 bp (SEQ ID NO: 161)	NcoI 和 SalI	pDMW212
FBAIN	ODMW320, ODMW341 (SEQ ID NOs: 179 和 180)	Fba 基因周围的 -804 bp 至+169 bp (从而包括 102 bp 内含子 其中内含子位于 +62 bp 至+165 bp 的位置) (SEQ ID NO: 162)	NcoI 和 SalI	pDMW214
YAT1	27203-F, 27203-R (SEQ ID NOs: 181 和 182)	yat1 基因周围的 -778 bp 至-1 bp (SEQ ID NO: 165)	HindIII 和 SalI; 也是 NcoI 和 HindIII	pYAT- GUS

注: ‘ATG’翻译起始密码子的‘A’核苷酸称作+1

按照一般方法中的描述, 在 50 μ l 总体积中进行 GPD、GPDIN、GPM、FBA 和 FBAIN 的各个 PCR 扩增反应。热循环仪条件设置为 35 个循环的 95 $^{\circ}$ C 下 1 分钟、56 $^{\circ}$ C 下 30 秒和 72 $^{\circ}$ C 下 1 分钟, 最后, 72 $^{\circ}$ C 下进行最终延伸 10 分钟。

用预先混合的 2X PCR 溶液 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, 520-2193, Japan) 的 1:1 稀释液, 在 50 μ l 总体积中进行 GPAT 启动子的 PCR 扩增。最终的组合物含有 25 mM TAPS (pH 9.3)、50 mM KCl、2 mM $MgCl_2$ 、1 mM 2-巯基乙醇、每种三磷酸脱氧核糖核苷酸各 200 μ M、每种引物各 10 pmole、50 ng 模板和 1.25 U TaKaRa Ex TaqTM DNA 聚合酶 (Takara Mirus Bio, Madison, WI)。热循环仪条件设置为 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 下 2.5 分钟、55 $^{\circ}$ C 下 30 秒和 72 $^{\circ}$ C 下 2.5 分钟, 最后, 72 $^{\circ}$ C 下进行最终延伸 6 分钟。

在与上文对 GPAT 描述的相似组合物中进行 YAT1 启动子的 PCR 扩增。首先将反应混合物加热到 94 $^{\circ}$ C 持续 150 秒。扩增进行 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 下 30 秒、55 $^{\circ}$ C 下 30 秒和 72 $^{\circ}$ C 下 1 分钟, 最后, 72 $^{\circ}$ C 下进行最终延伸 7 分钟。

用 Qiagen PCR 纯化试剂盒纯化每种 PCR 产物, 然后用限制酶消化 (根据上表, 用标准条件), 在 1% (w/v) 琼脂糖中进行凝胶电泳后纯化消化的产物。然后将消化的 PCR 产物 (除来自 YAT1 的那些) 连接到相似消化的 pY5-30 载体中。然后将来自每个反应的连接的 DNA 用于分别转化大肠杆菌 Top10、大肠杆菌 DH10B 或大肠杆菌 DH5 α 。在含有氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 琼脂上选择转化体。

YAT1 在克隆到 pY5-30 中之前, 需要额外的操作。具体地, 用 HindIII 和 SalI 消化 YAT1 PCR 产物后, 得到了约 600 bp 的片段; 用 NcoI 和 HindIII 消化后, 得到了约 200 bp 的片段。分离和纯化这两种产物。然后, 用 SalI 和 NcoI 消化质粒 pYGPAT-GUS, 分离和纯化约 9.5 kb 的片段。将三种 DNA 片段连接在一起, 得到 pYAT-GUS。

分析来自每个转化反应的质粒, 证明了预期的质粒的存在。这些质粒命名如下: pYZGDG (包含 GPD::GUS::XPR 嵌合基因), pDMW222 (包含 GPDIN::GUS::XPR 嵌合基因), pYZGMG (包含 GPM::GUS::XPR 嵌合基因), pYGPAT-GUS (包含 GPAT::GUS::XPR

嵌合基因), pDMW212(包含 FBA::GUS::XPR 嵌合基因), pDMW214 (包含 FBAIN::GUS::XPR 嵌合基因) 和 pYAT-GUS (包含 YAT1::GUS::XPR 嵌合基因)。

按照一般方法中的描述, 将上述质粒, 以及额外的质粒 pY5-30 (包含 TEF::GUS::XPR 嵌合基因) 分别转化到解脂耶氏酵母中。解脂耶氏酵母宿主是解脂耶氏酵母 ATCC #76982 或解脂耶氏酵母 ATCC #20362, 菌株 Y2034 (下文[实施例 4], 能够通过去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径生产 10% ARA)。将所有转化的细胞铺板到缺乏亮氨酸的基本培养基中, 在 30℃ 下维持 2-3 天。

通过 GUS 表达的组织化学分析对耶氏酵母启动子进行的比较分析

使含有质粒 pY5-30、pYZGDG、pYZGMG、pDMW212 和 pDMW214 的解脂耶氏酵母 ATCC #76982 菌株 30℃ 下在 3 mL MM 中从单菌落生长到 OD₆₀₀ 为约 1.0。然后, 通过离心收集 100 μ l 细胞, 重悬于 100 μ l 组织化学染色缓冲液中, 30℃ 下温育。将 5 mg 5-溴-4-氯-3-吡啶基葡萄糖苷酸 (X-Gluc) 溶解于 50 μ l 二甲基甲酰胺中, 然后加入 5 mL 50 mM NaPO₄, pH 7.0, 以制备染色缓冲液。组织化学染色的结果 (图 5B) 表明, 构建体 pY5-30 中的 TEF 启动子、构建体 pYZGDG 中的 GDP 启动子、构建体 pYZGMG 中的 GPM 启动子、构建体 pDMW212 中的 FBA 启动子、构建体 pDMW214 中的 FBAIN 启动子都是有活性的。FBA 和 FBAIN 启动子似乎都比其它启动子强得多, FBAIN 启动子具有最强的启动子活性。

在一个独立的实验中, 使含有质粒 pY5-30、pYGPAT-GUS、pYAT-GUS 和 pDMW214 的解脂耶氏酵母 Y2034 菌株 30℃ 下在 5 mL SD 培养基中从单菌落生长到 OD₆₀₀ 为约 8.0。然后, 通过离心收集 1 mL 细胞。离心剩余的培养物, 用 HGM 洗涤两次, 分别重悬于 5 mL HGM 中, 在 30℃ 下进一步生长。24 和 120 小时后, 离心约 0.25 mL 的每种培养物, 收集细胞。将细胞样品分别重悬于 100 μ l 组织化学染色缓冲液 (参见上文) 中。在每个样品中加入消解酶 20T (5 μ l, 1 mg/mL; ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA), 30℃ 下温育混合物。

组织化学染色的结果显示, 当在 SD 培养基中生长 24 小时, 构建体 pYGPAT-GUS 中的 GPAT 启动子是有活性的, 构建体 pYAT-GUS

中的 YAT1 启动子也是有活性的（图 5C，“在 SD 培养中 24 hr”）。比较而言，GPAT 启动子似乎比 TEF 启动子强得多，并且相对于 FBAIN 启动子的活性减少。同样，当细胞在 SD 培养基中生长 24 小时，YAT1 启动子似乎比 TEF 启动子强得多，但比 FBAIN 启动子和 GPAT 启动子明显更弱。然而，更有趣的是，发现在 HGM 中生长 24 小时的细胞中，YAT1 启动子比 GPAT 启动子强，并且与 FBAIN 启动子相似（图 5C，“在 HG 培养基中 24 小时”）。在 HGM 中 120 小时后依然如此（图 5C，“在 HG 培养基中 120 小时”）。因此，YAT1 启动子在 HGM 中似乎被诱导，HGM 是由于氮限制而促进含油生长条件的培养基。

通过 GUS 表达的荧光测定对解脂耶氏酵母启动子进行的比较分析

通过荧光测定相应的底物 β -葡糖苷酸对 4-甲基伞形酮（4-MU）的生产（Jefferson, R. A. *Plant Mol. Biol. Reporter* 5: 387-405 (1987)），也测定了 GUS 活性。

使含有质粒 pY5-30、pYZGDG、pYZGMG、pDMW212 和 pDMW214 的解脂耶氏酵母 ATCC #76982 菌株 30℃下在 3 mL MM 中从单菌落生长到 OD₆₀₀ 为约 1.0（按照上文的描述）。然后，将各 3 mL 培养物加入含有 50 mL MM 的 500 mL 烧瓶中，在振荡孵育器中 30℃下生长约 24 小时。通过离心收集细胞，重悬于 Promega 细胞裂解缓冲液中，用 BIO 101 Biopulverizer system (Vista, CA) 裂解。离心后，除去上清液，放置在冰上。

类似地，将含有质粒 pY5-30、pYAT-GUS、pYGPAT-GUS 和 pDMW214 构建体的解脂耶氏酵母菌株 Y2034 30℃下在 10 mL SD 培养基中生长 48 小时，从单菌落生长到 OD₆₀₀ 为约 5.0。收集每种培养物各 2 mL，用于按照下文所述进行 GUS 活性测定，而将每种培养物各 5 mL 转换到 HGM 中。

具体地，通过离心收集来自 5 mL 等分物的细胞，用 5 mL HGM 洗涤一次，重悬于 HGM 中。然后，将 HGM 中的培养物在振荡孵育器中 30℃下生长 24 小时。收集每种 HGM 培养物各 2 mL 用于 GUS 活性测定，而使剩余的培养物再生长额外的 96 小时，然后收集每种培养物的额外的 2 mL 用于测定。

将每份 2 mL SD 培养基中的培养样品重悬于 1 ML 0.5X 细胞培养物裂解试剂 (Promega) 中。将重悬的细胞在配备橡胶 O 形环的 2.0 mL 螺帽试管中与 0.6 mL 玻璃珠 (0.5 mm 直径) 混合。然后在 Biospec mini beadbeater (Bartlesville, OK) 中, 以最高的设置将细胞匀浆 90 秒。14,000 rpm 下将匀浆混合物在 Eppendof 离心管中离心 2 分钟, 以除去细胞碎屑和珠子。将上清液用于 GUS 测定和蛋白测定。

为了进行每个荧光测定, 将 100 μ l 提取物加入 700 μ l GUS 测定缓冲液 (2 mM 4-甲基伞形酮基- β -D-葡萄糖苷酸 (“MUG”), 溶于提取缓冲液中) 或将 200 μ l 提取物加入 800 μ l GUS 测定缓冲液中。将混合物置于 37°C 下。然后在 0、30 和 60 分钟的时间点取出 100 μ l 的等分物, 加入 900 μ l 终止缓冲液 (1 M Na₂CO₃)。用 CytoFluor Series 4000 Fluorescence Multi-Well 平板读数器 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) 对每个时间点进行读数, 所述读数器设置为激发波长是 360 nm, 而发射波长是 455 nm。用 10 μ l 提取物和 200 μ l BioRad Bradford 试剂或 20 μ l 提取物和 980 μ l BioRad Bradford 试剂确定每个样品的总蛋白浓度 (Bradford, M. M. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976))。GUS 活性表示为每分钟每 mg 蛋白的 4-MU 纳摩尔数。

设计将这些荧光测定的结果用于比较解脂耶氏酵母 ATCC #76982 菌株中的 TEF、GPD、GPM、FBA 和 FBAIN 启动子, 如图 6A 所示。具体地, FBA 启动子在解脂耶氏酵母中比 GPD 强 2.2 倍。此外, FBAIN 启动子的 GUS 活性比 GPD 启动子强约 6.6 倍。

这些设计用于比较解脂耶氏酵母菌株 Y2034 中的 TEF、GPAT、YAT1 和 FBAIN 启动子的荧光测定的结果如下表所示。

表 12

各种生长条件下 TEF、FBAIN、YAT1 和 GPAT 启动子活性的比较

培养条件	启动子			
	TEF	FBAIN	YAT1	GPAT
48 hr, SD	0.401	43.333	0.536	5.252
24 hr, HGM	0.942	30.694	19.154	2.969
120 hr HGM	0.466	17.200	13.400	3.050

基于上述数据（其中对 YAT1 启动子活性的定量是基于细胞提取物的 GUS 活性），当细胞从 SD 培养基转换到 HGM 中并且生长 24 小时后，YAT1 启动子的活性增加约 37 倍。在 HGM 中 120 小时后，活性一定程度地减少，但仍然比在 SD 培养基中的活性高 25 倍。相反，当从 SD 培养基转换到 HGM 中 24 小时后，FBAIN 启动子和 GPAT 启动子的活性分别减少 30% 和 40%。TEF 启动子的活性在 HGM 中 24 小时后增加 2.3 倍。因此，YAT1 启动子在含油条件下是可诱导的。

通过 GUS 表达的定量 PCR 分析对耶氏酵母启动子进行的比较分析

通过定量 PCR 分析，确定含有 pY5-30、pYZGDG、pDMW222、pDMW212 和 pDMW214 构建体的解脂耶氏酵母中 TEF、GPD、GPDIN、FBA 和 FBAIN 启动子的转录活性。这要求分离 RNA 和实时 RT-PCR。

更具体地，使含有 pY5-30、pYZGDG、pDMW222、pDMW212 和 pDMW214 构建体的解脂耶氏酵母 ATCC #76982 菌株在 25 mL Erlenmeyer 烧瓶中的 6 mL MM 中 30℃ 下从单菌落生长 16 小时。然后，将每种各 6 mL 的起始培养物加入各个含有 140 mL HGM 的 500 mL 烧瓶中，30℃ 下温育 4 天。以 24 小时的每个间隔，从每个烧瓶取出每种培养物各 1 mL，以测量光密度，取出 27 mL，用于进行荧光测定（如上文的描述），取出两个 1.5 mL 的等分物，进行 RNA 分离。对 RNA 分离的培养物进行离心，产生细胞沉淀。

根据改进的 Qiagen RNeasy mini 方案（Qiagen, San Diego, CA），从耶氏酵母菌株分离 RNA。简言之，在每个样品的每个时间点，用 340 μ L Qiagen's 缓冲液 RLT 重悬两种细胞沉淀的每一种。将来自两个试管的每一个试管的缓冲液 RLT/细胞悬浮液混合物在珠子搅拌试管（Bio101, San Diego, CA）中混合。将 0.5 mL 玻璃珠中的大约 500 μ L 加入试管中，通过在设置 5（BioPulverizer, Bio101 Company, San Diego, CA）进行珠子搅拌 2 分钟，破碎细胞。然后通过 14,000 rpm 离心 1 分钟而沉淀破碎的细胞，将 350 μ L 上清液转移到新的微量离心管中。将乙醇（350 μ L 70%）加入每种匀浆的裂解物。轻柔搅拌后，将整个样品加入 2 mL 收集管中的 Rneasy 微型柱。将样品以 10,000 rpm 离心 15 秒。将缓冲液 RW1（350 μ L）加入 Rneasy 微型柱，将柱子

以 10,000 rpm 离心 15 秒,以洗涤细胞。弃去洗脱液。将 Qiagen's DNase1 储液 (10 μ L) 加入 70 μ L 缓冲液 RDD, 轻柔混合。将完整的 DNA 酶溶液加入 Rneasy 微型柱, 室温下温育 15 分钟。温育步骤后, 将 350 μ L 缓冲液 RW1 加入微型柱, 将柱子以 10,000 rpm 离心 15 秒。将柱子用 700 μ L 缓冲液 RW1 洗涤两次。将不含 RNA 酶的水 (50 μ L) 加入柱子。以 10,000 rpm 将柱子离心 1 分钟, 以洗脱 RNA。

采用两步 RT-PCR 方案, 其中首先将耶氏酵母总 RNA 转化为 cDNA, 然后用实时 PCR 分析 cDNA。用 Applied Biosystems' High Capacity cDNA Archive 试剂盒 (PN#4322171; Foster City, CA) 和来自 MediaTech, Inc. (PN# 46-000-Con; Holly Hill, FL) 的分子生物级水进行向 cDNA 的转化。通过与 10 μ L RT 缓冲液、4 μ L 25X dNTPs、10 μ L 10X Random Hexamer 引物、5 μ L Multiscribe 逆转录酶和 0.005 μ L RNA 酶混合, 并且用水将中反应体积补充为 100 μ L, 将来自耶氏酵母的总 RNA (100 ng) 转化为 cDNA。在热循环仪中温育反应, 25 $^{\circ}$ C 下 10 分钟, 然后是 37 $^{\circ}$ C 下 2 小时。将 cDNA 在 -20 $^{\circ}$ C 储存, 然后进行实时分析。

用来自 Applied Biosystems (PN# 4309155) 的 SYBR Green PCR 主混合物进行实时分析。将逆转录反应物 (2 μ L) 加入 10 μ L 2X SYBR PCR 混合物、0.2 μ L 100 μ M 针对 URA (即引物 YL-URA-16F 和 YL-URA-78R[SEQ ID NOs: 198 和 199]) 或 GUS (即引物 GUS-767F 和 GUS-891R[SEQ ID NO: 200 和 201]) 的正向和反向引物和 7.2 μ L 水。使反应在 95 $^{\circ}$ C 下热循环 10 分钟, 然后在 ABI 7900 Sequence Detection System 仪器中进行 40 个循环的 95 $^{\circ}$ C 下 5 秒和 60 $^{\circ}$ C 下 1 分钟。在每个周期, 在 60 $^{\circ}$ C 延伸过程中收集实时荧光数据。

按照用户手册#2: "Relative Quantitation of Gene Expression", Applied Biosystems, 2001 年 10 月, 用 $\Delta\Delta$ CT 方法进行相对定量。将 URA 基因用于对 GUS 表达进行标准化。为了证实将 URA 用作标准化基因, 比较 GUS 和 URA 的 PCR 效率, 发现它们分别是 1.04 和 0.99 (其中 1.00 等于 100%效率)。由于 PCR 效率都接近于 100%, 证实了将 URA 作为 GUS 表达的标准物, 以及将 $\Delta\Delta$ CT 方法用于表达定量。标准化的量称作 Δ CT。

将每种不同菌株 (即含有 pYZGDG、pDMW222、pDMW212 和

pDMW214 构建体的解脂耶氏酵母 ATCC #76982 菌株) 中的 GUS mRNA 定量到含有 pY5-30 (TEF::GUS) 的菌株的 mRNA 水平。因此, 用含有 TEF::GUS 的菌株的 mRNA 水平作为参照样品, 计算表达的相对定量。将 GPD::GUS、GPDIN::GUS、FBA::GUS 和 FBAIN::GUS 的标准化的值与 TEF::GUS 参照的标准化值进行比较。这种量称作 $\Delta\Delta CT$ 。然后利用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$, 将 $\Delta\Delta CT$ 值转化为绝对值。这些值表示包含嵌合 GPD::GUS、GPDIN::GUS、FBA::GUS 和 FBAIN::GUS 基因的菌株相对于包含嵌合 TEF::GUS 基因的菌株中的 GUS 的 mRNA 水平的增加倍数。采用该方法, 可以比较 TEF 启动子的活性与 GPD、GPDIN、FBA 和 FBAIN 启动子的活性。

每种 GUS 嵌合基因的 mRNA 的相对定量结果示于图 6B。更具体地, 该测定显示, 在 HGM 中 24 小时后, FBA 和 FBAIN 启动子的转录活性分别比 TEF 启动子强大约 3.3 和 6 倍。类似地, GPD 和 GPDIN 启动子的转录活性分别比 TEF 启动子强大约 2 和 4.4 倍。尽管 FBA::GUS、FBAIN::GUS、GPD::GUS 和 GPDIN::GUS 基因融合体的转录活性在 4 天的实验期中减少, FBAIN 和 GPDIN 启动子的转录活性在实验的最后一天仍然比 TEF 启动子强大约 3 和 2.6 倍。

实施例 2

鉴定用于增加解脂耶氏酵母中的基因转录的增强子

基于 FBAIN 和 GPDIN 的强启动子活性 (其中活性分别大于 FBA 和 GPD 启动子的活性) 和每个启动子区内的内含子的鉴定, 进行了目前的工作, 以确定每个内含子中是否存在增强子。

具体地, 制备了由 GPM::FBAIN 启动子融合体和 GPM::GPDIN 启动子融合体组成的两个嵌合启动子, 以驱动 GUS 报道基因的表达。嵌合启动子 (包含 “成分 1” 和 “成分 2”) 描述于下表 13。

表 13

包含嵌合启动子::GUS::XPR 基因内的嵌合启动子的质粒的构建

嵌合启动子	成分 1	成分 2	质粒名称
GPM::FBAIN (SEQ ID NO: 167)	GPM 的 -1 bp 至 -843 bp 区	FBAIN 的+1 bp 至+171 bp 区 其中内含子位于 +62 bp 至+165 bp 的位置	pDMW224
GPM::GPDIN (SEQ ID NO: 168)	GPM 的 -1 bp 至 -843 bp 区	GPDIN 的+1 bp 至+198 bp 区 其中内含子位于 +49 bp 至+194 bp 的位置	pDMW225

嵌合启动子的位置使每一种嵌合启动子都驱动质粒 pDMW224 和 pDMW225 中的 GUS 报道基因的表达。

通过基于组织化学测定(如实施例 1 的描述)比较包含 pDMW224 和 pDMW225 的解脂耶氏酵母菌株中的 GUS 活性与包含 pY5-30、pYZGDG、pYZGMG 和 pDMW214 构建体的解脂耶氏酵母菌株中的 GUS 活性,将 GPM::FBAIN 启动子和 GPM::GPDIN 启动子的活性与 TEF、FBAIN、GPDIN 和 GPM 启动子的活性进行比较。如上文所确定的,FBAIN 启动子是最强的启动子。但是,嵌合 GPM::FBAIN 启动子和嵌合 GPM::GPDIN 启动子都比 GPM 启动子强得多,并且似乎活性与 GPDIN 启动子相同。因此,证明了在 GPDIN 和 FBAIN 启动子中都存在增强子。

本领域技术人员能够容易地用 GPDIN 内含子或 FBAIN 内含子构建相似的嵌合启动子。

实施例 3

磺酰脲选择

由于缺乏合适的非抗生素选择转化标记,阻碍了耶氏酵母的遗传改进。本实施例描述了基于磺酰脲抗性开发显性的、解脂耶氏酵母非抗生素标记,其也可以遗传上用于工业酵母菌株,这些菌株可以是单

倍体、二倍体、非整倍体或杂合的。

理论和最初的敏感性筛选

乙酰羟酸合酶 (AHAS) 是生物合成支链氨基酸的途径中最常见的酶。它是磺酰脲和咪唑烷酮除草剂的靶。因此, 在微生物和植物中都报道了磺酰脲除草剂抗性。例如, 在啤酒糖酵母中, AHAS 中的单个 W586L 突变赋予对磺酰脲除草剂的抗性 (Falco, S. C., et al., Dev. Ind. Microbiol. 30: 187-194 (1989); Duggleby, R.G., et. al. Eur. J. Biochem. 270: 2895 (2003))。

当对野生型 AHAS 解脂耶氏酵母 (GenBank 获取号 XP_501277) 和啤酒糖酵母 (GenBank 获取号 P07342) 酶的氨基酸序列进行比对时, 啤酒糖酵母酶的 586 位的 Trp 氨基酸残基与解脂耶氏酵母酶的 497 位的 Trp 残基相同。因此, 如果野生型细胞自身对磺酰脲敏感, 则认为解脂耶氏酵母酶中的 W497L 突变可能赋予磺酰脲除草剂抗性。采用本领域技术人员公知的方法, 确定基本培养基中浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的磺酰脲 (chlorimuron ethyl) 足够抑制野生型解脂耶氏酵母菌株 ATCC #20362 和 ATCC #90812 的生长。

突变的 W497L AHAS 基因的合成

在两步反应中从基因组 DNA 建立包含 W497L 突变的解脂耶氏酵母 AHAS 基因 (SEQ ID NO: 280)。首先, 用 Pfu Ultra™ High-Fidelity DNA 聚合酶 (Stratagene, 目录号 600380) 和引物 410 和 411 [SEQ ID NOs: 365 和 366] 从基因组 DNA 扩增 AHAS 基因的 5' 部分; 类似地用引物 412 和 413 [SEQ ID NOs: 367 和 368] 扩增基因的 3' 部分。两对引物是重叠的, 使得重叠区含有 W497L 突变 (其中该突变是 'CT' 改变为 'TG')。

对大小正确的 5' 和 3' PCR 产物进行凝胶纯化, 并且用作第二轮 PCR 的模板, 其中用引物 414 和 415 (SEQ ID NOs: 369 和 370) 以及来自两个主要 PCR 反应的产物的混合物扩增完整的突变基因。这种突变的基因携带其自身的天然启动子和终止子序列。凝胶纯化具有正确大小的第二轮 PCR 产物, 用酶 SalI/BsiWI 消化后, 通过框内融合技术克隆到质粒 pY35 [含有嵌合 TEF::串珠镰孢 $\Delta 12$ 去饱和酶 (Fm2) 基因、大肠杆菌复制起点、细菌氨苄青霉素抗性基因、耶氏酵母 Leu2 基因和耶氏酵母自主复制序列 (ARS)]; 其它细节参见 WO

2005/047485]的载体主链中。框内融合反应混合物转化到 TOP10 感受态细胞 (Invitrogen, 目录号 C4040-10) 中。在 LB/Amp 平板上选择 1 天后, 通过 DNA 微量制备分析八 (8) 个菌落。通过限制酶消化, 证明 7 个克隆是正确的。其中一个含有磺酰脲抗性基因和 LEU 基因的克隆命名为 “pY57” (或 “pY57.Yl.AHAS.w497l” ; 图 7A)。

通过标准醋酸锂方法用 pY57 和 ‘空’ LEU 转化野生型解脂耶氏酵母菌株 ATCC #90812 和 #20362。也利用了包含 ‘No-DNA’ 的转化对照。将转化体铺板到 MM+磺酰脲 (SU; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 琼脂平板上, 生长 4 天后评估菌落是否存在。

表 14

解脂耶氏酵母中的 AHAS 选择

质粒	ATCC #90812		ATCC #20362	
	MM	MM+SU (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	MM	MM+SU (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
pY57	菌落	菌落	菌落	菌落
Leu 载体对照	菌落	无菌落	菌落	无菌落
No DNA 对照	无菌落	无菌落	无菌落	无菌落

基于上述结果, AHAS W497L 是解脂耶氏酵母 ATCC #90812 和 #20362 中的良好非抗生素选择标记。随后, 申请人采用了 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的磺酰脲浓度。这种新的标记对于转化解脂耶氏酵母是有利的, 因为它不依赖于外源基因, 而是依赖于突变的天然基因, 并且它不需要营养缺陷, 也不导致营养缺陷。除草剂对于人和动物无毒。

如果以类似此处所述的方法建立突变的 AHAS 酶, 预期该选择方法可以普遍适用于其它工业酵母菌株, 它们可能是单倍体、二倍体、非整倍体或杂合的。

实施例 4

$\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径: 制备生产占总脂质的约 10-11% 的 ARA 的 Y2034 和 Y2047 菌株

本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的 Y2034 和 Y2047 菌株的构建，所述菌株分别能够生产占总脂质的约 10 和 11% 的 ARA (图 4)。这些菌株经过工程化，表达 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径。因此，预期菌株 Y2034 和 Y2047 的完整脂质谱表明共合成大约 25-29%GLA。

菌株 Y2034 和 Y2047 的开发首先需要构建菌株 M4 (生产 8% DGLA)。

制备生产占总脂质的约 8%的 DGLA 的 M4 菌株

制备构建体 pKUNF12T6E (图 7B; SEQ ID NO: 114)，将 4 种嵌合基因 (包含 $\Delta 12$ 去饱和酶、 $\Delta 6$ 去饱和酶和两种 $C_{18/20}$ 延伸酶) 整合到野生型耶氏酵母菌株 ATCC #20362 的 Ura3 基因座，从而能够生产 DGLA。pKUNF12T6E 质粒含有以下成分：

表 15

质粒 pKUNF12T6E (SEQ ID NO: 114) 的说明

SEQ ID NO: 114 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
AscI/BsiWI (9420-8629)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 784 bp 5'部分
SphI/PacI (12128-1)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 516 bp 3'部分
SwaI/BsiWI (6380-8629)	FBAIN::EL1S::Pex20, 包含: • FBAIN: FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) • EL1S: 密码子优化的延伸酶 1 基因 (SEQ ID NO: 19), 来源于高山被孢霉 (GenBank 获取号 AX464731) • Pex20: Pex20 终止子序列, 来源于耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613)
BglII/SwaI (4221-6380)	TEF::Δ6S::Lip1, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • Δ6S: 密码子优化的Δ6 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 3), 来源于高山被孢霉 (GenBank 获取号 AF465281) • Lip1: Lip1 终止子序列, 来源于耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 获取号 Z50020)
PmeI/ClaI (4207-1459)	FBA::F.Δ12::Lip2, 包含: • FBA: FBA 启动子 (SEQ ID NO: 161) • F.Δ12: 串珠镰孢Δ12 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 27) • Lip2: Lip2 终止子序列, 来源于耶氏酵母 Lip2 基因 (GenBank 获取号 AJ012632)
ClaI/PacI (1459-1)	TEF::EL2S::XPR, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • EL2S: 密码子优化的延伸酶基因 (SEQ ID NO: 22), 来源于金黄色破囊壶菌 (U.S. 6,677,145) • XPR: 耶氏酵母 Xpr 基因 (GenBank 获取号 M17741) 的 3'区的约 100 bp

用 AscI/SphI 消化 pKUNF12T6E 质粒, 然后用于根据一般方法转化野生型解脂耶氏酵母 ATCC #20362。将转化的细胞铺板到 FOA 选择培养基平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选 FOA 抗性菌落, 划线到 MM 和 MMU 选择平板上。能够在 MMU 平板上生长但是不能在 MM 平板上生长的菌落选为 Ura-菌株。然后 30℃ 下将 Ura-菌株的单菌落接种到液体 MMU 中, 以 250 rpm/min 振荡 2 天。

通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示 DGLA 存在于含有 pKUNF12T6E 的 4 种嵌合基因的转化体中, 但是不存在于野生型耶氏酵母对照菌株中。选择的 32 个 Ura-菌株中的大多数产生占总脂质的约 6% 的 DGLA。存在两种产生占总脂质的约 8% 的 DGLA 的菌株 (即菌株 M4 和 13-8)。

制备生产占总脂质的约 10% 的 ARA 的 Y2034 和 Y2047 菌株

制备构建体 pDMW232 (图 7C; SEQ ID NO: 115) 和 pDMW271 (图 7D; SEQ ID NO: 116), 分别将两种 $\Delta 5$ 嵌合基因整合到耶氏酵母菌株 M4 的 Leu2 基因。质粒 pDMW232 和 pDMW271 分别含有以下成分, 如表 16 和 17 的描述:

表 16

质粒 pDMW232 (SEQ ID NO: 115) 的说明

SEQ ID NO: 115 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
AscI/BsiWI (5550-4755)	耶氏酵母 Leu2 基因 (GenBank 获取号 AF260230) 的 788 bp 5' 部分
SphI/PacI (8258-8967)	耶氏酵母 Leu2 基因 (GenBank 获取号 AF260230) 的 703 bp 3' 部分
SwaI/BsiWI (2114-4755)	FBAIN::MA Δ 5::Pex20, 包含: • FBAIN: FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) • MAΔ5: 高山被孢霉Δ5 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 6) (GenBank 获取号 AF067654) • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
SwaI/ClaI (2114-17)	TEF::MA Δ 5::Lip1, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • MAΔ5: SEQ ID NO: 6 (参见上文) • Lip1: 耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 获取号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
PmeI/ClaI (5550-4755)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421)

表 17

质粒 pDMW271 (SEQ ID NO: 116) 的说明

SEQ ID NO: 116 内的 RE 位点和 核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
AscI/BsiWI (5520-6315)	耶氏酵母 Leu2 基因 (GenBank 获取号 AF260230) 的 788 bp 5'部分
SphI/PacI (2820-2109)	耶氏酵母 Leu2 基因 (GenBank 获取号 AF260230) 的 703 bp 3'部分
SwaI/BsiWI (8960-6315)	• FBAIN::MAΔ5::Pex20, 如对 pDMW232 的描述 (上文)
SwaI/ClaI (8960-11055)	• TEF::MAΔ5::Lip1, 如对 pDMW232 的描述 (上文)
PmeI/ClaI (12690-11055)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421)
ClaI/PacI (1-2109)	TEF::H Δ 5S::Pex16, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • HΔ5S: 密码子优化的Δ5 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 13), 来源于人 (GenBank 获取号 NP_037534) • Pex16: 耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 获取号 U75433) 的 Pex16 终止子序列

用 AscI/SphI 消化质粒 pDMW232 和 pDMW271, 然后用于根据一般方法转化菌株 M4。转化后, 将细胞铺板到 MMLe 平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选在 MMLe 平板上生长的来自每次转化的各个菌落, 划线到 MM 和 MMLe 平板上。能够在 MMLe 平板上生长但是不能在 MM 平板上生长的菌落选为 Leu2⁻菌株。然后 30℃ 下将 Leu2⁻菌株的单菌落接种到液体 MMLe 中, 以 250 rpm/min 振荡 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-

Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示 pDMW232 和 pDMW271 转化体中存在 ARA，但亲本 M4 菌株中不存在。具体地，在 48 个选择的具有 pDMW232 的 Leu2 转化体中，34 个菌株生产占工程化的耶氏酵母中的总脂质的 5% 以下的 ARA，11 个菌株生产 6-8% 的 ARA，3 个菌株生产约 10% 的 ARA。生产 10% ARA 的菌株之一命名为“Y2034”。

同时，在 48 个选择的具有 pDMW271 的 Leu2 转化体中，35 个菌株生产占工程化的耶氏酵母中的总脂质的 5% 以下的 ARA，12 个菌株生产 6-8% 的 ARA，1 个菌株生产约 11% 的 ARA。生产 11% ARA 的菌株命名为“Y2047”。

实施例 5

制备具有 Ura-基因型并且生产占总脂质的 45% 的 LA 的中间菌株 Y2031

通过将质粒 pKUNT2 (图 8A) 的 TEF::Y.Δ12::Pex20 嵌合基因整合到野生型耶氏酵母菌株 ATCC #20362 的 Ura3 基因座中，制备菌株 Y2031，从而产生 Ura-基因型。

具体地，质粒 pKUNT2 含有以下成分：

表 18

质粒 pKUNT2 的说明 (SEQ ID NO: 117)

SEQ ID NO: 117 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
AscI/BsiWI (3225-3015)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 784 bp 5' 部分
SphI/PacI (5933-13)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 516 bp 3' 部分
EcoRI/BsiWI (6380-8629)	TEF::Y. Δ 12::Pex20, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • Y.Δ12: 耶氏酵母 Δ12 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 23) • Pex20: 来自耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子

根据一般方法, 用 AscI/SphI 消化质粒 pZKUT2, 然后用于转化野生型解脂耶氏酵母 ATCC #20362。将转化的细胞铺板到 FOA 选择培养基平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选了 FOA 抗性菌落, 划线到 MM 和 MMU 选择平板上。能够在 MMU 平板上生长, 但是不能在 MM 平板上生长的菌株选作 Ura-菌株。然后 30℃ 下将 Ura-菌株的单菌落 (5 个) 单独接种到液体 MMU 中, 以 250 rpm/min 振荡 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示在两个 Ura-菌株 (即 2 号和 3 号菌株) 中含有约 45% LA, 而野生型 ATCC #20362 中含有约 20% LA。2 号转化菌株称作菌株 “Y2031”。

实施例 6

密码子优化的 Δ 9 延伸酶基因在解脂耶氏酵母中的合成和功能性表达

对球等鞭金藻的 $\Delta 9$ 延伸酶基因 (GenBank 获取号 AF390174) 的密码子选择进行优化, 以便在解脂耶氏酵母中表达, 该优化的方式类似于 WO 2004/101753 中的描述。具体地, 根据耶氏酵母密码子使用模式、ATG 翻译起始密码子周围的共有序列和 RNA 稳定性的一般规则 (Guhaniyogi, G. and J. Brewer, Gene 265 (1-2): 11-23 (2001)), 基于球等鞭金藻基因的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 39), 设计了密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶基因 (SEQ ID NO: 41)。除了修饰翻译起始位点, 还修饰了 792 bp 编码区的 126 bp, 优化了 123 个密码子。密码子优化的基因中的修饰都没有改变编码的蛋白的氨基酸序列 (GenBank 获取号 AF390174; SEQ ID NO: 40)。

用于耶氏酵母的密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶基因的体外合成

按照下文合成了密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶基因。首先, 设计了 8 对寡核苷酸, 以延伸密码子优化的球等鞭金藻 $\Delta 9$ 延伸酶基因的编码区的全长 (如 IL3-1A、IL3-1B、IL3-2A、IL3-2B、IL3-3A、IL3-3B、IL3-4A、IL3-4B、IL3-5A、IL3-5B、IL3-6A、IL3-6B、IL3-7A、IL3-7B、IL3-8A 和 IL3-8B、相应于 SEQ ID NOs: 187-202)。每对有义 (A) 和反义 (B) 寡核苷酸都是互补的, 例外的是每个 5' 末端的 4 bp 突出端。此外, 分别在引物 IL3-1F、IL3-4R、IL3-5F 和 IL3-8R (SEQ ID NOs: 203-206) 中引入了 NcoI、PstI、PstI 和 NotI 限制位点, 用于随后进行亚克隆。

37℃ 下在含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、0.5 mM 亚精胺、0.5 mM ATP 和 10 U T4 多核苷酸激酶的 20 μ l 体积中对每种寡核苷酸 (100 ng) 进行磷酸化。混合每对有义和反义寡核苷酸, 采用以下参数在热循环仪中退火: 95℃ (2 min), 85℃ (2 min), 65℃ (15 min), 37℃ (15 min), 24℃ (15 min) 和 4℃ (15 min)。因此, 将 IL3-1A (SEQ ID NO: 187) 与 IL3-1B (SEQ ID NO: 188) 退火, 产生双链产物 “IL3-1AB”。类似地, 将 IL3-2A (SEQ ID NO: 189) 与 IL3-2B (SEQ ID NO: 190) 退火, 产生双链产物 “IL3-2AB” 等。

然后将退火的双链寡核苷酸的两个独立的集合连接到一起, 如下所示: 集合 1 (包含 IL3-1AB、IL3-2AB、IL3-3AB 和 IL3-4AB); 和集合 2 (包含 IL3-5AB、IL3-6AB、IL3-7AB 和 IL3-8AB)。在 20 μ l

的体积中将每个退火的寡核苷酸的集合与 10 U 的 T4 DNA 连接酶混合, 16℃ 下温育连接反应。

然后将每个连接反应的产物用作模板, 通过 PCR 扩增设计的 DNA 片段。具体地, 采用连接的“集合 1”混合物 (即 IL3-1AB、IL3-2AB、IL3-3AB 和 IL3-4AB) 作为模板, 寡核苷酸 IL3-1F 和 IL3-4R (SEQ ID NOs: 203 和 204) 作为引物, 通过 PCR 扩增密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶基因的第一部分。按照一般方法的描述, 在 50 μ l 总体积中进行 PCR 扩增。按照如下方法进行扩增: 最初在 95℃ 变性 3 分钟, 然后进行 35 个循环的以下反应: 95℃ 1 分钟, 56℃ 30 秒, 72℃ 40 秒。72℃ 进行最终的延伸循环 10 分钟, 然后在 4℃ 终止反应。将 417 bp PCR 片段亚克隆到 pGEM-T easy 载体 (Promega) 中, 得到 pT9 (1-4)。

采用连接的“集合 2”混合物 (即 IL3-5AB、IL3-6AB、IL3-7AB 和 IL3-8AB) 作为模板, 寡核苷酸 IL3-5F 和 IL3-8R (SEQ ID NOs: 205 和 206) 作为引物, 通过 PCR 类似地扩增密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶基因的第二部分, 克隆到 pGEM-T-easy 载体中, 得到 pT9 (5-8)。

分别用 pT9 (1-4) 和 pT9 (5-8) 转化大肠杆菌, 从氨苄青霉素抗体转化体中分离质粒 DNA。纯化质粒 DNA, 用合适的限制内切酶消化, 以释放 pT9 (1-4) 的 417 bp NcoI/PstI 片段 (SEQ ID NO: 207) 和 pT9 (5-8) 的 377 bp PstI/NotI 片段 (SEQ ID NO: 208)。然后混合这两个片段, 按照方向与 NcoI/NotI 消化的 pZUF17 (SEQ ID NO: 118; 图 8B) 连接在一起, 得到 pDMW237 (图 8C; SEQ ID NO: 119)。pDMW237 中得到的合成 $\Delta 9$ 延伸酶基因 (“IgD9e”) 的 DNA 序列与最初针对耶氏酵母设计的密码子优化的基因 (即 SEQ ID NO: 41) 完全相同。

密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶基因在解脂耶氏酵母中的表达

按照一般方法, 将构建体 pDMW237 (图 8C) 转化到解脂耶氏酵母 Y2031 菌株中 (实施例 4), pDMW237 是一种包含 FBAIN::IgD9e::Pex20 嵌合基因的自主复制质粒。使具有 pDMW237 的三种 Y2031 转化体单独在 MM 培养基中生长 2 天, 通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示在具有 pDMW237 的这些转化体中分别生产了

7.1%、7.3%和 7.4% EDA。这些数据证明合成的、密码子优化的 IgD9e 能够将 C18: 2 转化为 EDA。密码子优化的基因的“底物转化百分比”确定为大约 13%。

实施例 7

在解脂耶氏酵母中合成密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因

按照与 WO 2004/101753 和实施例 6 (上文) 描述的相似方式, 对纤细眼虫的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因 (GenBank 获取号 AAD45877) 的密码子选择进行了优化, 以便在耶氏酵母中表达。尽管合成了三种不同的密码子优化的基因 (即 “D8S-1”、“D8S-2” 和 “D8S-3”), 这些基因都不能将 EDA 去饱和为 DGLA。因此, 假定以前公开的 $\Delta 8$ 去饱和酶序列都不正确, 必须按照 mRNA 分离、cDNA 合成和 PCR 直接从纤细眼虫分离 $\Delta 8$ 去饱和酶。这得到了两个相似的序列, 在此鉴定为 Eg5 (SEQ ID NOs: 44 和 45) 和 Eg12 (SEQ ID NOs: 46 和 47)。

通过将基因克隆到啤酒糖酵母酵母表达载体并进行底物补料试验而进行每种基因序列的功能分析。尽管 Eg5 和 Eg12 都能够使 EDA 和 EtrA 去饱和, 分别得到 DGLA 和 ETA, 但 Eg5 相对于 Eg12 具有显著更高的活性。

基于证实的 Eg5 的 $\Delta 8$ 去饱和酶活性, 为在解脂耶氏酵母中表达而对序列进行了密码子优化, 从而导致合成了合成的功能性的密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶, 命名为 “D8SF” (SEQ ID NOs: 48 和 49)。

密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因的初步体外合成

根据耶氏酵母密码子使用模式、“ATG” 翻译起始密码子周围的共有序列和 RNA 稳定性的一般规则 (Guhaniyogi, G. and J. Brewer, Gene 265 (1-2): 11-23 (2001)), 基于公开的纤细眼虫的序列 (SEQ ID NOs: 42 和 43), 设计了密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因 (命名为 “D8S-1”; SEQ ID NO: 209)。除了修饰翻译起始位点, 还修饰了 1260 bp 编码区的 200 bp (15.9%)。除了第二个氨基酸从 “K” 变为 “E”, 从而在翻译起始密码子周围添加了 NcoI 位点, 密码子优化的基因中的修饰都没有改变编码的蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 43)。

具体地, 按照下文合成了密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因。首先,

设计了 13 对寡核苷酸, 以延伸密码子优化的纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶基因的编码区的全长(如 D8-1A、D8-1B、D8-2A、D8-2B、D8-3A、D8-3B、D8-4A、D8-4B、D8-5A、D8-5B、D8-6A、D8-6B、D8-7A、D8-7B、D8-8A、D8-8B、D8-9A、D8-9B、D8-10A、D8-10B、D8-11A、D8-11B、D8-12A、D8-12B、D8-13A 和 D8-13B、相应于 SEQ ID NOs: 210-235)。每对有义(A)和反义(B)寡核苷酸都是互补的, 例外的是每个 5'末端的 4 bp 突出端。此外, 分别在引物 D8-1A、D8-3B、D8-7A、D8-9B 和 D8-13B (SEQ ID NOs: 210、215、222、227 和 235) 中引入了 NcoI、BglII、XhoI、SacI 和 NotI 限制位点, 用于随后进行亚克隆。

按照实施例 6 的描述对寡核苷酸(每种 100 ng)进行磷酸化, 然后混合每对有义和反义寡核苷酸, 并且退火到一起[如 D8-1A (SEQ ID NO: 210) 退火于 D8-1B (SEQ ID NO: 211), 得到双链产物“D8-1AB”和 D8-2A, (SEQ ID NO: 212) 退火于 D8-2B (SEQ ID NO: 213), 得到双链产物“D8-2AB”等]。

然后将退火的双链寡核苷酸的 4 个独立的集合连接到一起, 如下所示: 集合 1 (包含 D8-1AB、D8-2AB 和 D8-3AB); 集合 2 (包含 D8-4AB、D8-5AB 和 D8-6AB); 集合 3 (包含 D8-7AB、D8-8AB 和 D8-9AB); 和集合 4 (包含 D8-10AB、D8-11AB、D8-12AB 和 D8-13AB)。在 20 μ l 的体积中将每个退火的寡核苷酸的集合与 10 U 的 T4 DNA 连接酶混合, 16 $^{\circ}$ C 下温育连接反应。

然后将每个连接反应的产物用作模板, 通过 PCR 扩增设计的 DNA 片段。具体地, 采用连接的“集合 1”混合物(即 D8-1AB、D8-2AB 和 D8-3AB)作为模板, 寡核苷酸 D8-1F 和 D8-3R (SEQ ID NOs: 236 和 237) 作为引物, 通过 PCR 扩增密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因的第一部分。按照实施例 6 的描述, 在 50 μ l 总体积中进行 PCR 扩增。将 309 bp PCR 片段亚克隆到 pGEM-T easy 载体 (Promega) 中, 得到 pT8 (1-3)。

采用连接的“集合 2”混合物(即 D8-4AB、D8-5AB 和 D8-6AB)作为模板, 寡核苷酸 D8-4F 和 D8-6R (SEQ ID NOs: 238 和 239) 作为引物, 通过 PCR 类似地扩增密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因的第二部分, 克隆到 pGEM-T-easy 载体中, 得到 pT8 (4-6)。采用连接的“集合 3”混合物(即 D8-7AB、D8-8AB 和 D8-9AB)作为模板, 寡

核苷酸 D8-7F 和 D8-9R (SEQ ID NOs: 240 和 241) 作为引物, 通过 PCR 类似地扩增密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因的第三部分, 克隆到 pGEM-T-easy 载体中, 得到 pT8 (7-9)。最后, 采用“集合 4”连接混合物 (即 D8-10AB、D8-11AB、D8-12AB 和 D8-13AB 作为模板, 寡核苷酸 D8-10F 和 D8-13R (SEQ ID NOs: 242 和 243) 作为引物, 通过 PCR 类似地扩增密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因的第四部分, 克隆到 pGEM-T-easy 载体中, 得到 pT8 (10-13)。

分别用 pT8 (1-3)、pT8 (4-6)、pT8 (7-9) 和 pT8 (10-13) 转化大肠杆菌, 从氨苄青霉素抗体转化体中分离质粒 DNA。纯化质粒 DNA, 用合适的限制内切酶消化, 以释放 pT8 (1-3) 的 309 bp NcoI/BglII 片段 (SEQ ID NO: 244)、pT8 (4-6) 的 321 bp BglII/XhoI 片段 (SEQ ID NO: 245)、pT8 (7-9) 的 264 bp XhoI/SacI 片段 (SEQ ID NO: 246) 和 pT8 (10-13) 的 369 bp SacI/NotI 片段 (SEQ ID NO: 247)。然后组合这些片段, 按照方向与 NcoI/NotI 消化的 pY54PC (SEQ ID NO: 120; WO2004/101757) 连接在一起, 得到 pDMW240 (图 8D)。这在 pDMW240 中得到了合成的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因 (“D8S-1”, SEQ ID NO: 209)。

与公开的纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶氨基酸序列 (SEQ ID NO: 43) 相比, D8S-1 的第二个氨基酸从‘K’改变为‘E’, 以便在翻译起始密码子周围添加 NcoI 位点。采用 pDMW240 作为模板以及寡核苷酸 ODMW390 和 ODMW391 (SEQ ID NOs: 248 和 249) 作为引物, 通过体外诱变 (Stratagene, San Diego, CA) 构建了具有公开的纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶序列 (SEQ ID NO: 43) 的准确氨基酸序列的另一种形式的合成基因。得到的质粒命名为 pDMW255。pDMW255 中的合成 $\Delta 8$ 去饱和酶基因命名为 “D8S-2”, 其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 43 中描述的序列完全相同。

非功能性的密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因

按照一般方法中的描述, 分别用 pDMW240 (图 8D) 和 pDMW255 转化解脂耶氏酵母菌株 ATCC #76982 (Leu-)。含有重组构建体的酵母在补加了 EDA[20:2 (11,14)] 的 MM 中生长。具体地, 使含有 pDMW240 (含 D8S-1) 或 pDMW255 (含 D8S-2) 的转化解脂耶氏酵母的单菌落 30℃ 下在 3 mL MM 生长至 OD₆₀₀ 为约 1.0。为了进行底

物补料,随后将 100 μ l 细胞 30℃ 下在含有 10 μ g EDA 底物的 3 mL MM 中传代培养约 24 小时。通过离心收集细胞,提取脂质,通过酯交换制备脂肪酸甲酯,随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

两种转化体都没有从 EDA 生产 DGLA,因此, D8S-1 和 D8S-2 都不是功能性的,并且不能使 EDA 去饱和。嵌合 D8S-1::XPR 和 D8S-2::XPR 基因分别示于 SEQ ID NOs: 250 和 251。

发现 GenBank 中保藏的 Δ 8 去饱和酶(获取号 AAD45877[SEQ ID NO: 43])与 WO 00/34439 或 Wallis et al. (Archives of Biochem. Biophys, 365: 307-316 (1999)) (本文的 SEQ ID NO: 252) 描述的 Δ 8 去饱和酶的蛋白序列之间存在 3 个氨基酸的差异。具体地,发现 GenBank 获取号 AAD45877 缺少 3 个氨基酸。采用 pDMW255 作为模板, ODMW392 和 ODMW393 (SEQ ID NOs: 253 和 254) 作为引物,通过体外诱变(Stratagene, San Diego, CA)在合成的 D8S-2 基因中加入了 9 bp,由此产生了与 WO 00/34439 和 Wallis et al. (上文) (SEQ ID NO: 252) 中描述的序列相同的蛋白。得到的质粒命名为“D8S-3” (SEQ ID NO: 255)。将 pDMW261 转化到耶氏酵母中之后,按照上文进行了采用 EDA 的补料实验。用 D8S-3 没有观察到 EDA 去饱和为 DGLA。

分离纤细眼虫 Δ 8 去饱和酶基因

纤细眼虫获自密西根州立大学(East Lansing, MI)的 Richard Triemer 博士的实验室。从 10 mL 活跃生长的培养物中将 1 mL 等分物转移到 500 mL 玻璃瓶中的 250 mL 纤细眼虫(Eg)培养基中。Eg 培养基是通过在 970 mL 水中混合以下成分而制备的: 1 g 醋酸钠、1 g 牛肉提取物(目录号 U126-01, Difco Laboratories, Detroit, MI)、2 g Bacto[®]胰蛋白胨(目录号 0123-17-3, Difco Laboratories)和 2 g Bacto[®]酵母提取物(目录号 0127-17-9, Difco Laboratories)。过滤灭菌后,无菌加入 30 mL 土壤-水上清液(目录号 15-3790, Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC),得到最终的 Eg 培养基。使纤细眼虫培养物在 23℃, 16 小时光、8 小时暗周期中无搅拌条件下生长 2 周。

2 周后,取出 10 mL 培养物进行脂质分析,并且在 1,800 x g 离心 5 分钟。用水洗涤沉淀物一次,重新离心。真空中将得到的沉淀物干

燥 5 分钟, 重悬于 100 μ L 三甲基氢氧化铈 (TMSH), 振荡下在室温中温育 15 分钟。此后, 加入 0.5 mL 己烷, 振荡下将管形瓶室温下温育 15 分钟。分离脂肪酸甲酯 (从己烷层注射的 5 μ L), 用装有 Omegawax 320 熔融二氧化硅毛细管柱 (目录号 24152, Supelco Inc.) 的 Hewlett-Packard 6890 气相色谱进行定量。对烤箱温度进行程序化, 在 220 $^{\circ}$ C 保持 2.7 分钟, 以 20 $^{\circ}$ C/min 增加到 240 $^{\circ}$ C, 然后再保持 2.3 分钟。通过 Whatman 氢发生器提供载体气体。将保留时间与商购的标准物 (目录号 U-99-A, Nu-Chek Prep, Inc.) 的甲酯进行比较, 得到的色谱图示于图 9。

通过 1,800 x g 离心 10 分钟, 沉淀剩余的 2 周培养物 (240 mL), 用水洗涤 1 次, 再次离心。采用 RNA STAT-60TM 试剂 (TEL-TEST, Inc., Friendswood, TX), 根据提供的制造商的方案 (采用 5 mL 试剂, 0.5 mL 水中的溶解的 RNA) 提取总 RNA。以此方式, 从沉淀物获得了 1 mg 总 RNA (2 mg/mL)。用 mRNA 纯化试剂盒 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 按照提供的制造商的方案从 1 mg 总 RNA 分离 mRNA。以此方式, 获得了 85 μ g mRNA。

根据制造商的方案, 采用用于 cDNA 合成的 SuperScriptTM Choice 系统 (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA), 用提供的寡聚 (dT) 引物, 从 765 ng mRNA 合成 cDNA。将合成的 cDNA 溶解于 20 μ L 水中。

采用下文所述条件, 用寡核苷酸引物 Eg5-1 和 Eg3-3 (SEQ ID NOs: 256 和 257) 从 cDNA 扩增纤细眼虫 Δ 8 去饱和酶。具体地, 将 cDNA (1 μ L) 与 50 pmol Eg5-1、50 pmol Eg3-3、1 μ L PCR 核苷酸混合物 (10 mM, Promega, Madison, WI)、5 μ L 10X PCR 缓冲液 (Invitrogen)、1.5 μ L MgCl₂ (50 mM, Invitrogen)、0.5 μ Taq 聚合酶 (Invitrogen) 和水混合到 50 μ L。反应条件是 94 $^{\circ}$ C 3 分钟, 然后是 35 个循环的 94 $^{\circ}$ C 45 秒, 55 $^{\circ}$ C 45 秒和 72 $^{\circ}$ C 1 分钟。72 $^{\circ}$ C 下使 PCR 终止 7 分钟, 然后保持在 4 $^{\circ}$ C。用 5 μ L 通过琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 反应, 观察到分子量为大约 1.3 kB 的 DNA 条带。通过琼脂糖凝胶电泳分离剩余的 45 μ L 产物, 按照制造商的方案, 用 ZymocleanTM Gel DNA Recovery 试剂盒 (Zymo Research, Orange, CA) 纯化 DNA 条带。按照制造商的方案将得到的 DNA 克隆到

pGEM[®]-T Easy 载体 (Promega) 中。用 T7、M13-28Rev、Eg3-2 和 Eg5-2 (分别是 SEQ ID NOS: 258-261) 对多个克隆进行测序。

由此获得了两类 DNA 序列, 即 Eg5 (SEQ ID NO: 44) 和 Eg12 (SEQ ID NO: 46), 它们的差别仅仅是几个 bp。Eg5 和 Eg12 的翻译得到了差别仅仅是 1 个氨基酸的蛋白序列 SEQ ID NO: 45 和 47。因此, Eg5 的 DNA 和蛋白序列分别示于 SEQ ID NO: 44 和 SEQ ID NO: 45; Eg12 的 DNA 和蛋白序列分别示于 SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 47。

分离的纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶序列与公开的纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶序列的比较

图 10 中示出了 SEQ ID NO: 45 (Eg5) 和 SEQ ID NO: 47 (Eg12) 中所示蛋白序列与 GenBank 获取号 AAD45877 的蛋白序列 (gi: 5639724; 本文的 SEQ ID NO: 43) 以及与 Wallis et al. (Archives of Biochem. Biophys., 365: 307-316 (1999); WO 00/34439) 公开的蛋白序列[本文的 SEQ ID NO: 252]的比对。在所有 4 个序列中保守的氨基酸用星号 (*) 表示。程序中用虚线使序列的比对最大化。推定的细胞色素 b_5 结构域加下划线。推定的 His 盒用粗体表示。同一性百分比计算发现 Eg5 $\Delta 8$ 去饱和酶蛋白与 SEQ ID NO: 43 具有 95.5% 同一性, 与 SEQ ID NO: 252 具有 96.2% 同一性, 其中“同一性百分比”定义为两种蛋白之间相同的氨基酸的百分比。用 LASERGENE 生物信息学计算程序组 (DNASTAR Inc., Madison, WI) 的 Megalign 程序进行序列比对和同一性百分比计算。用具有缺省参数 (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10) 的 Clustal 比对法 (Higgins and Sharp, CABIOS. 5: 151-153 (1989)) 进行序列的多重比对。采用 Clustal 方法的逐对比对的缺省参数是 KTUPLE 1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 和 DIAGONALS SAVED=5。对于各种纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶序列之间的差异的更复杂分析, 参见共同未决的美国专利申请 No. 11/166993。

在啤酒糖酵母中进行的纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶序列的功能分析

酵母附加体质粒 (YEp) 型载体 pRS425 (Christianson et al., Gene, 110: 119-22 (1992)) 含有来自啤酒糖酵母 2μ 内源质粒的序列、LEU2 选择标记和基于多功能噬菌粒 pBluescript II SK+ 的主链的

序列。按照与 Jia et al. (Physiological Genomics, 3: 83-92 (2000)) 中描述的相同方法在 pRS425 的 SacII 和 SpeI 位点之间克隆啤酒糖酵母的强组成型甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GPD) 启动子, 以制备 pGPD-425。将 NotI 位点导入 pGPD-425 的 BamHI 位点 (由此产生侧翼于 BamHI 位点的 NotI 位点), 从而得到质粒 pY-75。按照上文的描述用 NotI 消化, 从 pGEM[®]-T Easy 载体释放 Eg5 (SEQ ID NO: 44) 和 Eg12 (SEQ ID NO: 46), 并且克隆到 pY-75 的 NotI 位点, 以分别制备 pY89-5 (保藏为 ATCC #PTA-6048) 和 pY89-12。以此方式, 将 $\Delta 8$ 去饱和酶 (即 Eg5[SEQ ID NO: 44]和 Eg12[SEQ ID NO: 46]) 克隆在强启动子后面, 以便在啤酒糖酵母中表达。pY89-5 的图谱示于图 8E。

用标准醋酸锂转化程序将质粒 pY89-5、pY89-12 和 pY-75 转化到啤酒糖酵母 BY4741(ATCC #201388)中。在补加了 CSM-leu 的 DOBA 培养基 (Qbiogene, Carlsbad, CA) 上选择转化体。将来自每个平板的转化体接种到 2 mL 补加了 CSM-leu 的 DOB 培养基 (Qbiogene) 上, 30℃ 下生长 1 天, 此后将 0.5 mL 转移到补加了 EDA 或 EtrA 到 1 mM 的相同培养基中。将它们在 30℃, 250 rpm 温育过夜, 通过离心获得沉淀物并且真空下干燥。用 50 μ L TMSH 对沉淀物进行酯交换, 按照一般方法中的描述通过 GC 进行分析。分析了 pY-75 (即克隆 75-1 和 75-2) 和 pY89-5 (即克隆 5-6-1 和 5-6-2) 的两个克隆, 同时分析了来自两个独立转化体的两组 pY89-12 的克隆 (即克隆 12-8-1、12-8-2、12-9-1 和 12-9-2)。

通过 EDA 补料的克隆的 GC 分析获得的脂质谱示于表 19; 通过 EtrA 补料的克隆的 GC 分析获得的脂质谱示于表 20。脂肪酸鉴定为 16:0 (棕榈酸)、16:1 (棕榈油酸)、18:0、18:1 (油酸)、20:2[EDA]、20:3 (8,11,14) [DGLA]、20:3 (11,14,17) [ETrA]和 20:4 (8,11,14,17) [ETA]; 每一种的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 19

超量表达纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶的转化啤酒糖酵母的脂质分析:
EDA 底物补料

克隆	16:0	16:1	18:0	18:1	20:2	20:3 (8,11, 14)	% 20:2 转化
75-1 (对照)	14	32	5	38	10	0	0
75-2 (对照)	14	31	5	41	9	0	0
5-6-1 (Eg5)	14	32	6	40	6	2	24
5-6-2 (Eg5)	14	30	6	41	7	2	19
12-8-1 (Eg12)	14	30	6	41	9	1	7
12-8-2 (Eg12)	14	32	5	41	8	1	8
12-9-1 (Eg12)	14	31	5	40	9	1	8
12-9-2 (Eg12)	14	32	5	41	8	1	7

表 20

超量表达纤细眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶的转化啤酒糖酵母的脂质分析:
ETrA 底物补料

克隆	16:0	16:1	18:0	18:1	20:3 (11, 14,17)	20:4 (8,11, 14,17)	% 20:3 转化
75-1 (对照)	12	25	5	33	24	0	0
75-2 (对照)	12	24	5	36	22	1	5
5-6-1 (Eg5)	13	25	6	34	15	7	32
5-6-2 (Eg5)	13	24	6	34	17	6	27
12-8-1 (Eg12)	12	24	5	34	22	2	8
12-8-2 (Eg12)	12	25	5	35	20	2	9
12-9-1 (Eg12)	12	24	5	34	22	2	9
12-9-2 (Eg12)	12	25	6	35	20	2	9

表 19 和 20 中的数据表明克隆的眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶能够使 EDA 和 EtrA 去饱和。SEQ ID NO: 47 所示序列与 SEQ ID NO: 45 所示序列相比具有一个氨基酸的改变, 并且 $\Delta 8$ 去饱和酶活性降低。

表 30 中的克隆 75-2 产生的小量 20:4 (8,11,14,17) 与 20:4 (8,11,14,17) 的标准相比具有略微不同的保留时间。这个峰更有可能是该实验中野生型酵母产生的小量的不同脂肪酸。

为解脂耶氏酵母进行密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因的进一步修饰

根据有功能的眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NOs: 44 和 45) 的氨基酸序列校正 pDMW261 中的合成 D8S-3 基因的氨基酸序列。采用作为模板的 pDMW261 并且采用核苷酸 ODMW404 (SEQ ID NO: 262) 和 D8-13R (SEQ ID NO: 243), 扩增了编码合成的 D8S-3 去饱和酶基因的 DNA 片段。用 Bio101 的 GeneClean 试剂盒纯化得到的片段, 随后用 KpnI 和 NotI 消化 (引物 ODMW404 导入 KpnI 位点, 而引物 D8-13R 导入 NotI 位点)。将 KpnI/NotI 片段 (SEQ ID NO: 263) 克隆到 KpnI/NotI 消化的 pKUNFmKF2 (图 11A; SEQ ID NO: 121) 中, 得到 pDMW277 (图 11B)。

将设计用于扩增和校正 D8S-3 基因的 5'末端的寡核苷酸 YL521 和 YL522 (SEQ ID NOs: 264 和 265) 用作另一个 PCR 中的引物, 所述另一个 PCR 反应中将 pDMW277 用作模板。引物分别在 PCR 片段的 5'和 3'末端导入 NcoI 位点和 BglII 位点。用 Bio101 的 GeneClean 试剂盒纯化 318 bp PCR 产物, 随后用 NcoI 和 BglII 消化。将消化的片段和来自 pDMW277 的 954 bp BglII/NotI 片段一起用于交换 pZF5T-PPC 的 NcoI/NotI 片段 (图 11C; SEQ ID NO: 122), 形成 pDMW287。除了校正合成 D8S-3 基因的 5'末端, 该克隆反应也将合成的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因置于解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) 的控制下。

然后在 pDMW287 上进行最后一系列定点诱变反应中的第一个反应。设计第一组引物 YL525 和 YL526 (SEQ ID NOs: 266 和 267), 以便将 pDMW287 中的合成 D8S-3 基因的氨基酸从 F 校正到 S (50 号位置)。然后, 该诱变反应得到的质粒成为下一次定点诱变反应的模板, 引物是 YL527 和 YL528 (SEQ ID NOs: 268 和 269)。这些

引物设计用于将 D8S-3 基因的氨基酸从 F 校正到 S (67 号位置), 导致产生质粒 pDMW287/YL527。

为了完成基因的第二个四分之一中的序列校正, 与基因的第一个四分之一上的突变同时进行以下反应。采用 pDMW287 作为模板, 并且采用寡核苷酸 YL529 和 YL530 (SEQ ID NOs: 270 和 271) 作为引物, 进行体外诱变反应, 将合成 D8S-3 基因的氨基酸从 C 校正到 W (177 号位置)。将该诱变反应的产物 (即 pDMW287/YL529) 用作随后反应的模板, 该反应用引物 YL531 和 YL532 (SEQ ID NOs: 272 和 273) 将氨基酸从 P 校正为 L (213 号位置)。该反应的产物称作 pDMW287/YL529-31。

与基因的第一个和第二个四分之一上的突变同时, 类似地在基因的 3' 末端上进行反应。每个随后的诱变反应都采用来自前一个反应的质粒产物。在 pDMW287 上用引物 YL533 和 YL534 (SEQ ID NOs: 274 和 275) 将氨基酸从 C 校正为 S (244 号位置), 得到 pDMW287/YL533。用引物 YL535 和 YL536 (SEQ ID NOs: 276 和 277) 将 pDMW287/YL533 的合成 D8S-3 基因中的氨基酸从 A 校正为 T (280 号位置), 形成 pDMW287/YL533-5。最后, 采用 pDMW287/YL533-5 作为模板, YL537 和 YL538 (SEQ ID NOs: 278 和 279) 作为引物, 将合成 D8S-3 基因中 333 号位置的氨基酸 P 校正为 S。得到的质粒称作 pDMW287/YL533-5-7。

用 pDMW287/YL529-31 的 BglII/XhoI 片段和 pDMW287/YL533-5-7 的 XhoI/NotI 片段改变 pDMW287/YL257 的 BglII/NotI 片段, 得到 pDMW287F (图 11D)。SEQ ID NO: 49 示出了 SEQ ID NO: 48 的核苷酸 2-1270 编码的氨基酸序列, 其与 SEQ ID NO: 45 所示序列基本相同, 仅仅是在起始甲硫氨酸后有一个额外的缬氨酸。

实施例 8

密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶基因和密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶在解脂耶氏酵母中的功能性表达

本实施例描述了经过转化而共表达来自实施例 6 和 7 的密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶和密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶的解脂耶氏酵母中的 DGLA 生物合成。本实施例从而证实了两种基因的活性和解脂耶氏酵

母表达 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径的能力。

具体地，将包含构建体 pDMW287F（实施例 7）的嵌合 FBAIN::D8SF::Pex16 基因的 ClaI/PacI 片段插入 pDMW237（实施例 6）的 ClaI/PacI 位点，得到构建体 pDMW297（图 11E；SEQ ID NO: 123）。

质粒 pDMW297 含有以下成分：

表 21

质粒 pDMW297（SEQ ID NO: 123）的说明

SEQ ID NO: 123 内的 RE 位 点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
EcoRI/ClaI (9053-10448)	ARS18 序列（GenBank 获取号 A17608）
ClaI/PacI (1-2590)	FBAIN::D8SF::Pex16，包含： • FBAIN: FBAIN 启动子（SEQ ID NO: 162） • D8SF: 密码子优化的$\Delta 8$去饱和酶基因（SEQ ID NO: 48），来源于纤细眼虫（GenBank 获取号 AF139720） • Pex16: 耶氏酵母 Pex16 基因（GenBank 获取号 U75433）的 Pex16 终止子序列
PacI/SalI (2590-4082)	耶氏酵母 Ura3 基因（GenBank 获取号 AJ306421）
SalI/BsiWI (4082-6257)	FBAIN::IgD9e::Pex20，包含： • FBAIN: FBAIN 启动子（SEQ ID NO: 162） • IgD9e: 密码子优化的$\Delta 9$延伸酶基因（SEQ ID NO: 41），来源于球等鞭金藻（GenBank 获取号 390174） • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因（GenBank 获取号 AF054613）的 Pex20 终止子序列

然后用构建体 pDMW297 根据一般方法转化菌株 Y2031 (实施例 5)。将转化的细胞铺板到 MM 平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选了总共 8 个在 MM 平板上生长的转化体, 重新划线到新的 MM 平板上。一旦生长, 30℃ 下将这些菌株单独接种到液体 MM 中, 以 250 rpm/min 振荡 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 进行分析显示在所有分析的转化体中都生产 DGLA。1 个菌株生产约 3.2%, 4 个菌株生产 4.3-4.5%, 2 个菌株生产 5.5-5.8%, 1 个菌株生产 6.4% DGLA (在此命名为菌株 “Y0489”)。菌株 Y0489 中密码子优化的 D8SF 基因的 “底物转化百分比” 是 75%。

实施例 9

$\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径: 制备生产占总脂质的约 14% 的 ARA 的 Y2214 菌株

本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y2214 的构建, 所述菌株能够生产占总脂质的 14% 的 ARA (图 4)。该菌株经过工程化, 表达 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径; 因此, 预期菌株 Y2214 的完整脂质谱分析表明最终的含 ARA 的油中没有共合成 GLA。

此处菌株 Y2214 的开发需要构建菌株 Y2152 和 Y2153 (生产约 3.5% DGLA)、菌株 Y2173 和 Y2175 (生产 14-16% DGLA) 和菌株 Y2183 和 Y2184 (生产 5% ARA)。

制备生产占总脂质的约 3.5% 的 DGLA 的菌株 Y2152 和 Y2153

用构建体 pZP2C16M899 (图 12A, SEQ ID NO: 124) 整合含有四种嵌合基因 (包括两种 $\Delta 9$ 延伸酶、合成的 $C_{16/18}$ 脂肪酸延伸酶和 $\Delta 8$ 去饱和酶) 和含有单个氨基酸突变的耶氏酵母 AHAS 基因 (乙酰羟酸合酶) 的簇。耶氏酵母中的突变的 AHAS 酶赋予对磺酰脲的抗性, 其用作阳性筛选标记。质粒 pZP2C16M899 设计用于整合到耶氏酵母菌株 ATCC #20362 的 Pox2 基因位点中, 从而含有以下成分:

表 22

质粒 pZP2C16M899 (SEQ ID NO: 124) 的说明

SEQ ID NO: 124 内的 RE 位点和 核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
BsiWI/AscI (6152-6962)	耶氏酵母 Aco2 基因 (GenBank 获取号 AJ001300) 的 810 bp 5' 部分
SphI/EcoRI (9670-10325)	耶氏酵母 Aco2 基因 (GenBank 获取号 AJ001300) 的 655 bp 3' 部分
BsiWI/PmeI 和 EcoRV (929-3195)	GPM/FBA 内含子::rELO2S::Oct, 包含: • GPM/FBAIN: GPM::FBAIN 嵌合启动子 (SEQ ID NO: 167) • rELO2S: 密码子优化的 rELO2 延伸酶基因 (SEQ ID NO: 52), 来源于大鼠 (GenBank 获取号 AB071986) • OCT: 耶氏酵母 OCT 基因 (GenBank 获取号 X69988) 的 OCT 终止子序列
BsiWI/EcoRI (929-14447, 反向)	GPAT::IgD9e::Pex20, 包含: • GPAT: GPAT 启动子 (SEQ ID NO: 164) • IgD9e: 密码子优化的$\Delta 9$ 延伸酶基因 (SEQ ID NO: 41), 来源于球等鞭金藻 ▪ Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
EcoRI/SwaI (14447-12912)	TEF::IgD9e::Lip1, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • IgD9e: SEQ ID NO: 41, 来源于球等鞭金藻 • Lip1: 耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 获取号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
SwaI/PacI (12912-10325)	FBAIN::D8SF::Pex16, 包含: • FBAIN: FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) • D8SF: 密码子优化的$\Delta 8$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 48), 来源于纤细眼虫 (GenBank 获取号 AF139720) • Pex16: 耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 获取号 U75433) 的 Pex16 终止子序列
PmeI 和 EcoRV/BsiWI (3195-6152)	包含 W497L 突变的解脂耶氏酵母 AHAS 基因 (SEQ ID NO: 280)

用 SphI/AscI 消化质粒 pZP2C16M899, 然后用于根据一般方法转化 ATCC #20362。转化后, 将细胞铺板到含有 150 mg 磺酰脲的 MM 平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选磺酰脲抗性菌落, 划线到磺酰脲选择平板的 MM 上。然后 30℃ 下将总共 96 个转化体接种到具有磺酰脲的液体 MM 中, 250 rpm/min 振荡 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示在含有 pZP2C16M899 的 4 种嵌合基因的转化体中存在 DGLA, 但在野生型耶氏酵母对照菌株中不存在。选择的 96 个菌株中的大多数生产占总脂质的 2% 以下的 DGLA。28 个菌株生产占总脂质的 2-2.9% 的 DGLA。2 个菌株生产占总脂质的 3.5% 的 DGLA。65 号和 73 号菌株在此分别称作菌株 “Y2152” 和 “Y2153”。

制备生产占总脂质的约 14-16% 的 DGLA 的菌株 Y2173 和 Y2175

用构建体 pDMW314 (图 12B, SEQ ID NO: 125) 将含有四种嵌合基因 (包括两种 $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶和 $\Delta 12$ 去饱和酶) 的簇整合到耶氏酵母菌株 Y2152 和 Y2153 的 Ura3 基因位点, 从而增强 DGLA 的生产。质粒 pDMW314 含有以下成分:

表 23

质粒 pDMW314 (SEQ ID NO: 125) 的说明

SEQ ID NO: 125 内的 RE 位 点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
AscI/BsiWI (10066-9275)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 784 bp 5' 部分
SphI/PacI (12774-1)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 516 bp 3' 部分
SwaI/BsiWI (6582-9275)	FBAIN::F.D12S::Pex20, 包含: • FBAIN: FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) • F.Δ12: 串珠镰孢Δ12 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 27) • Pex20: 来自耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
ClaI/EcoRI (6199-4123)	GPAT::IgD9E::Pex20: 如对 pZP2C16M899 的描述 (上文)
EcoRI/SwaI (4123-2588)	TEF::IgD9E::Lip1: 如对 pZP2C16M899 的描述 (上文)
SwaI/PacI (2588-1)	FBAIN::D8SF::Pex16: 如对 pZP2C16M899 的描述 (上文)

用 AscI/SphI 消化质粒 pDMW314, 然后用于根据一般方法转化解脂耶氏酵母菌株 Y2152 和 Y2153。将转化的细胞铺板到 FOA 选择培养基平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选 FOA 抗性菌落, 划线到 MM 和 MMU 选择平板上。能够在 MMU 平板上生长但是不能在 MM 平板上生长的菌落选为 Ura-菌株。然后 30℃ 下将 Ura-菌株的单菌落接种到液体 MMU 中, 以 250 rpm/min 振荡 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示几乎所有含有 pDMW314 的 4 种嵌合基因的转化体

的 DGLA 生产都增加。选择的具有 pDMW314 的 Y2152 的 48 个 Ura⁻菌株的大多数都生产占总脂质的约 6-8% 的 DGLA。一个菌株（即 47 号，在此称作“Y2173”）生产占总脂质的约 13.9% 的 DGLA。

类似地，选择的具有 pDMW314 的 Y2153 的 24 个 Ura⁻菌株中的大多数生产占总脂质的约 6-8% 的 DGLA。两个菌株（即 6 号和 11 号，在此命名为菌株“Y2175”和“Y2176”）分别生产占总脂质的约 16.3% 和 17.2% 的 DGLA。

制备生产占总脂质的约 5% 的 ARA 的菌株 Y2183 和 Y2184

用制备构建体 pDMW322（图 12C；SEQ ID NO: 126）将两种 $\Delta 5$ 嵌合基因整合到耶氏酵母 Y2173 和 2175 菌株的 Leu2 基因位点。质粒 pDMW322 含有以下成分：

表 24

质粒 pDMW232 (SEQ ID NO: 126) 的说明

SEQ ID NO: 126 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
AscI/BsiWI (3437-2642)	耶氏酵母 Leu2 基因 (GenBank 获取号 AF260230) 的 788 bp 5' 部分
SphI/PacI (6854-6145)	耶氏酵母 Leu2 基因 (GenBank 获取号 AF260230) 的 703 bp 3' 部分
SwaI 和 PmeI/BsiWI (1-2642)	FBAIN::MA Δ 5::Pex20, 包含: • FBAIN: FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) • MAΔ5: 高山被孢霉Δ5 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 6) (GenBank 获取号 AF067654) • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
EcoRI/SwaI with PmeI (8833-1)	GPM/FBAIN::I. Δ 5S::Oct, 包含: • GPM/FBAIN: GPM::FBAIN 嵌合启动子 (SEQ ID NO: 167) • I.Δ5S: 密码子优化的Δ5 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 10), 来源于球等鞭金藻 (WO 2002/081668) • 耶氏酵母 OCT 基因 (GenBank 获取号 X69988) 的 OCT: OCT 终止子序列
EcoRI/PmeI (8833-7216)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421)

用 AscI/SphI 消化质粒 pDMW322, 然后用于根据一般方法转化菌株 Y2173 和 Y2175。转化后, 将细胞铺板到 MMLe 平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选在 MMLe 平板上生长的各个菌落, 划线到 MM 和 MMLe 平板上。能够在 MMLe 平板上生长但是不能在 MM 平板上生长的菌落选为 Leu2⁻菌株。然后 30℃ 下将 Leu2⁻菌株的单菌落接种到液体 MMLe 中, 以 250 rpm/min 振荡的条件下培养 2 天。通过离

心收集细胞，提取脂质，通过酯交换制备脂肪酸甲酯，随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示 pDMW322 转化体中存在 ARA，但亲本 Y2173 和 Y2175 菌株中不存在。具体地，在 48 个选择的具有 pDMW322 的 Y2173 的 Leu2 转化体中，大多数菌株生产占总脂质的 4.4% 以下的 ARA；但是，有两个菌株（即 1 号和 42 号，在此称作菌株“Y2181”和“Y2182”）分别生产占总脂质的约 4.5% 和 5.8% 的 ARA。

平行地，在 48 个选择的具有 pDMW322 的 Y2175 的 Leu2 转化体中，大多数菌株生产占总脂质的 4.5% 以下的 ARA。有 3 个菌株（即 22 号、42 号和 47 号，在此称作菌株“Y2183”、“Y2184”和“Y2185”）分别生产占工程化的耶氏酵母中总脂质的约 4.9%、4.6% 和 4.7% 的 ARA。

制备生产占总脂质的约 14% 的 ARA 的菌株 Y2214

用构建体 pZKSL5598（图 12D，SEQ ID NO: 127）将含有四种嵌合基因（包括 $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶和两种 $\Delta 5$ 去饱和酶）的簇整合到耶氏酵母 Y2183 和 Y2185 菌株的 Lys5 基因（GenBank 获取号 M34929）位点，从而增强 ARA 的生产。质粒 pZKSL5598 含有以下成分：

表 25

质粒 pZKSL5598 (SEQ ID NO: 127) 的说明

SEQ ID NO: 127 内的 RE 位点和 核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
AscI/BsiWI (10409-9573)	耶氏酵母 Lys5 基因 (GenBank 获取号 M34929) 的 794 bp 5' 部分
SphI/PacI (13804-13117)	耶氏酵母 Lys5 基因 (GenBank 获取号 M34929) 的 687 bp 3' 部分
BsiWI/SwaI (7150-9573)	NT::I.D5S::Lip1, 包含: • NT: YAT1 启动子 (SEQ ID NO: 165) • I.Δ5S: 密码子优化的Δ5 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 10), 来源于球等鞭金藻 (WO 2002/081668) • Lip1: 耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 获取号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
SalI/BsiWI (4537-7150)	GPAT::MAΔ5::Pex20, 包含: • GPAT: GPAT 启动子 (SEQ ID NO: 164) • MAΔ5: 高山被孢霉Δ5 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 6) (GenBank 获取号 AF067654) • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
SwaI/PmeI (2381-348)	FBAINm::IgD9e::OCT, 包含: • FBAINm: FBAINm 启动子 (SEQ ID NO: 163) • IgD9e: 密码子优化的Δ9 延伸酶基因 (SEQ ID NO: 41), 来源于球等鞭金藻 • OCT: 耶氏酵母 OCT 基因 (GenBank 获取号 X69988) 的 OCT 终止子序列
ClaI/PacI (1-13804)	GPD::D8SF::Pex16, 包含: • GPD: GPD 启动子 (SEQ ID NO: 158) • D8SF: 密码子优化的Δ8 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 48), 来源于纤细眼虫 (GenBank 获取号 AF139720) • Pex16: 耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 获取号 U75433) 的 Pex16 终止子序列
SalII/PmeI (4537-2417)	耶氏酵母 Leu2 基因 (GenBank 获取号 AF260230)

用 *AscI*/*SphI* 消化质粒 pZKSL5598, 然后用于根据一般方法分别转化菌株 Y2183 和 Y2184。转化后, 将细胞铺板到 MMLys 平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选在 MMLys 平板上生长的来自每次转化的各个菌落, 划线到 MM 和 MMLys 平板上。能够在 MMLys 平板上生长但是不能在 MM 平板上生长的菌落选为 Lys⁻菌株。然后 30℃ 下将 Lys⁻菌株的单菌落接种到液体 MMLy 中, 以 250 rpm/min 振荡 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示 pZKSL5598 转化体中的 ARA 生产增加。在 48 个选择的具有 pZKSL5598 的 Y2183 的 Lys-转化体中, 大多数菌株生产占总脂质的 4-9.5% 的 ARA。3 个菌株 (即 7 号、12 号和 37 号, 在此命名为 “Y2209”、“Y2210” 和 “Y2211”) 分别生产占总脂质的约 9.9%、10.3% 和 9.6% 的 ARA。

在 48 个选择的具有 pZKSL5598 的 Y2184 的 Lys-转化体中, 大多数菌株生产占总脂质的 4-11% 的 ARA。2 个菌株 (即 3 号和 22 号, 在此命名为 “Y2213” 和 “Y2214”) 分别生产占总脂质的约 11.9% 和 14% 的 ARA。

实施例 10

制备生产占总脂质的 14% 的 EPA 的中间菌株 2067U

本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y2067U 的构建, 该菌株能够生产占总脂质的显著浓度的 EPA (图 4)。在这种生产 EPA 的菌株中, 基于 TAG 含量和/或组成的分析, 检验了高山被孢霉 LPAAT2、DGAT1 和 DGAT2 以及解脂耶氏酵母 CPT1 基因超量表达的作用, 分别如实施例 14、15、16 和 21 的描述 (参见下文)。

菌株 Y2067U (生产 14% EPA) 的开发需要构建菌株 M4 (生产 8% DGLA, 描述于实施例 4)、菌株 Y2034 (生产 10% ARA, 描述于实施例 4)、菌株 E (生产 10% EPA)、菌株 EU (生产 10% EPA) 和菌株 Y2067 (生产 15% EPA)。

制备生产占总脂质的约 10% 的 EPA 的 E 菌株

制备构建体 pZP3L37 (图 13A; SEQ ID NO: 128), 将三种合

成的 $\Delta 17$ 去饱和酶嵌合基因整合到 Y2034 菌株的酰基-CoA 氧化酶 3 基因，如实施例 4 的描述。质粒 pZP3L37 含有以下成分：

表 26

质粒 pZP3L37 (SEQ ID NO: 128) 的说明

SEQ ID NO: 128 内的 RE 位 点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
AscI/BsiWI (6813-6043)	耶氏酵母 Pox3 基因 (GenBank 获取号 AJ001301) 的 763 bp 5' 部分
SphI/PacI (9521-10345)	耶氏酵母 Pox3 基因 (GenBank 获取号 AJ001301) 的 818 bp 3' 部分
ClaI/BsiWI (4233-6043)	TEF:: $\Delta 17$ S::Pex20, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • $\Delta 17$S: 密码子优化的$\Delta 17$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 16), 来源于异丝水酶 (US 2003/0196217 A1) • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
ClaI/PmeI (4233-1811)	FBAIN:: $\Delta 17$ S::Lip2, 包含: • FBAIN: FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) • $\Delta 17$S: SEQ ID NO: 16 (参见上文) • Lip2: 耶氏酵母 Lip2 基因 (GenBank 获取号 AJ012632) 的 Lip2 终止子序列
PmeI/SwaI (1811-1)	耶氏酵母 Leu2 基因 (GenBank 获取号 AF260230)
PacI/SwaI (10345-1)	FBAINm:: $\Delta 17$ S::Pex16, 包含: • FBAINm: FBAINm 启动子 (SEQ ID NO: 163) • $\Delta 17$S: SEQ ID NO: 16 (参见上文) • Pex16: 耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 获取号 U75433) 的 Pex16 终止子序列

用 *AscI*/*SphI* 消化质粒 pZP3L37, 然后用于根据一般方法转化菌株 Y2034。转化后, 将细胞铺板到 MM 平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选在 MM 平板上生长的总共 48 个转化体, 重新划线到新的 MM 平板上。一旦生长, 30℃ 下将这些菌株单独接种到液体 MM 中, 以 250 rpm/min 振荡的条件下培养 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示大多数具有 pZP3L37 的转化体中存在 EPA, 但亲本菌株 (即 Y2034) 中不存在。在 48 个选择的具有 pZP3L37 的转化体中, 18 个菌株生产占工程化的耶氏酵母中总脂质的 2% 以下的 EPA, 14 个菌株生产 2-3% 的 EPA, 1 个菌株生产约 7% 的 EPA。

在按照一般方法中的描述用 “两阶段生长条件 (即 48 hrs MM, 72 hrs HGM)” 培养生产 7% EPA 的菌株后, 进一步分析该菌株。GC 分析显示工程化的菌株在两阶段生长后生产占总脂质的约 10% 的 EPA。该菌株命名为 “E” 菌株。

制备具有 Ura⁻表型的生产占总脂质的约 10% 的 EPA 的 EU 菌株

通过鉴定具有 5-FOA 抗性的菌株 E 的突变细胞, 制备了菌株 EU (Ura⁻)。具体地, 将 1 环的耶氏酵母 E 菌株细胞接种到 3 mL YPD 培养基中, 30℃ 下以 250 rpm 振荡的条件下生长 24 小时。用 YPD 将培养物稀释到 OD₆₀₀ 为 0.4, 然后再温育 4 小时。将培养物铺板 (100 μl/平板) 到 MM+FOA 平板上, 30℃ 下维持 2-3 天。总共挑选了 16 个 FOA 抗性菌落, 划线到 MM 和 MM+FOA 选择平板上。从中挑选出 10 个在 FOA 选择平板上生长, 但是不在 MM 平板上生长的菌落, 选作可能的 Ura⁻菌株。

将这些菌株之一用作 pY37/F15 转化的宿主, pY37/F15 包含嵌合 GPD::串珠镰孢Δ15::XPR2 基因和作为选择标记的 Ura3 基因 (图 13B; SEQ ID NO: 129)。在 MM 平板上选择 3 天后, 数百个菌落在平板上生长, 不携带质粒的转化对照没有菌落生长。这种 5-FOA 抗性菌株命名为 “EU”。

然后将 EU 菌株的单菌落接种到额外含有 0.1 g/L 尿苷的液体 MMU 中, 30℃ 下以 250 rpm 振荡的条件下生长 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。GC 分析显示 EU 菌株生产占总脂质的约 10% 的

EPA.

制备生产占总脂质的约 15%的 EPA 的 Y2067 菌株

制备质粒 pKO2UF2PE (图 13C; SEQ ID NO: 130), 将含有两种嵌合基因 (包括异源 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $C_{18/20}$ 延伸酶) 和 Ura3 基因的簇整合到菌株 EU 的天然耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶基因中。质粒 pKO2UF2PE 含有以下成分:

表 27

质粒 pKO2UF2PE (SEQ ID NO: 130) 的说明

SEQ ID NO: 130 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
AscI/BsiWI (3382-2645)	耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 23) 的 730 bp 5'部分
SphI/EcoRI (6090-6646)	耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 23) 的 556 bp 3'部分
SwaI/BsiWI/ (1-2645)	FBAINm::F. $\Delta 12$ DS::Pex20, 包含: • FBAINm: FBAINm 启动子 (SEQ ID NO: 163) • F.$\Delta 12$: 串珠镰孢$\Delta 12$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 27) • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
SwaI/PmeI (1-8525)	GPAT::EL1S::OCT, 包含: • GPAT: GPAT 启动子 (SEQ ID NO: 164) • EL1S: 密码子优化的延伸酶 1 基因 (SEQ ID NO: 19), 来源于高山被孢霉 (GenBank 获取号 AX464731) • OCT: 耶氏酵母 OCT 基因 (GenBank 获取号 X69988) 的 OCT 终止子序列
EcoRI/PacI (6646-8163)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421)

用 *AscI*/*SphI* 消化质粒 pKO2UF2PE, 然后用于根据一般方法转化菌株 EU(但将菌株 EU 划线到 YPD 平板上并且生长大约 36 小时[而不是 18 小时], 然后悬浮在转化缓冲液中)。转化后, 将细胞铺板到 MM 平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选在 MM 平板上生长的总共 72 个转化体, 独立地重新划线到新的 MM 平板上。一旦生长, 30℃ 下将这些菌株单独接种到液体 MM 中, 以 250 rpm/min 振荡的条件下培养 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示几乎所有的具有 pKO2UF2PE 的转化体中都存在 EPA。更具体地, 在 72 个选择的转化体中, 17 个菌株生产占工程化的耶氏酵母中总脂质的 8-9.9% 的 EPA, 27 个菌株生产 10-10.9% EPA, 16 个菌株生产 11-11.9% EPA, 7 个菌株生产 12-12.7% EPA。按照一般方法中的描述, 用“两阶段生长条件(即 48 hrs MM, 72 hrs HGM)”进一步分析生产 12.7% EPA 的菌株。GC 分析显示工程化的菌株在两阶段生长后生产占总脂质的约 15% 的 EPA。该菌株命名为“Y2067”菌株。

制备具有 Ura-表型的生产占总脂质的约 14% 的 EPA 的 Y2067U 菌株

为了破坏 Y2067 菌株中的 *Ura3* 基因, 制备了构建体 pZKUT16 (图 13D; SEQ ID NO: 131), 将 *TEF::rELO2S::Pex20* 嵌合基因整合到菌株 Y2067 的 *Ura3* 基因中。*rELO2S* 是密码子优化的 *rELO* 基因, 其编码将 16:0 延伸为 18:0 的大鼠肝酶(即 $C_{16/18}$ 延伸酶)。质粒 pZKUT16 含有以下成分:

表 28

质粒 pZKUT16 (SEQ ID NO: 131) 的说明

SEQ ID NO: 131 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
BsiWI/PacI (1-721)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 721 bp 5' 部分
Sall/ClaI (3565-4289)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 724 bp 3' 部分
ClaI/BsiWI (4289-1)	TEF::rELO2S::Pex20, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • rELO2S: 密码子优化的 rELO2 延伸酶基因 (SEQ ID NO: 52), 来源于大鼠 (GenBank 获取号 AB071986) • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列

用 Sall/PacI 消化质粒 pZKUT16, 然后用于根据一般方法转化 Y2067 菌株。转化后, 将细胞铺板到 MM+5-FOA 选择平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。

挑选了总共 24 个在 MM+5-FOA 平板上生长的转化体, 分别重新划线到 MM 平板和 MM+5-FOA 平板上。能够在 MM+5-FOA 平板上生长, 但是不能在 MM 平板上生长的菌株选作 Ura-菌株。30℃ 下将总共 10 个 Ura-菌株单独接种到液体 MMU 培养基中, 在 250 rpm/min 振荡的条件下生长 1 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示在 MMU 培养基中生长 1 天后, 所有具有 pZKUT16 的转化体中都存在 5-7% EPA。用两阶段生长条件 (即 48 hrs MM, 96 hrs HGM) 进一步分析生产 6.2% EPA 的菌株。GC 分析显示工程化的菌株生产占总脂质的约 14% 的 EPA。该菌株命名为菌株 “Y2067U”。

该菌株相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的最终基因型

是 Ura3-, Pox3-, Y.Δ12-, FBA::F.Δ12::Lip2, FBAINm::F. Δ12::Pex20, TEF::Δ6S::Lip1 , FBAIN::E1S::Pex20 , GPAT::E1S::Oct , TEF::E2S::Xpr , FBAIN::Δ5::Pex20 , TEF::Δ5::Lip1 , FBAIN::Δ17S::Lip2 , FBAINm::Δ17S::Pex16 , TEF::Δ17S 和 TEF::rELO2S::Pex20.

实施例 11

本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y2107U1 的构建,该菌株能够生产占总脂质的显著浓度的 EPA(图 4)。基于 TAG 含量和/或组成的分析,在这种生产 EPA 的菌株中检验高山被孢霉 GPAT 基因超量表达的影响,如实施例 17 的描述(下文)。

菌株 Y2107U1 (生产 16% EPA, 并且具有 Ura-表型) 的开发需要构建菌株 M4 (生产 8% DGLA, 并且描述于实施例 4)、菌株 2047 (生产 11% ARA, 并且描述于实施例 4)、菌株 Y2048 (生产 11% EPA)、菌株 Y2060 (生产 13% EPA)、菌株 Y2072 (生产 15% EPA)、菌株 Y2072U1 (生产 14% EPA) 和菌株 Y2089 (生产 18% EP)。

制备生产占总脂质的约 11% 的 EPA 的 Y2048 菌株

制备构建体 pZP3L37 (图 13A; SEQ ID NO: 128; 实施例 10), 将三种合成的 Δ17 去饱和酶嵌合基因整合到 Y2047 菌株 (实施例 4) 的酰基-CoA 氧化酶 3 基因。具体地, 用 SphI/AscI 消化质粒 pZP3L37, 然后用于根据一般方法转化菌株 Y2047。转化后, 将细胞铺板到 MM 平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。挑选了总共 96 个在 MM 平板上生长的转化体, 重新划线到新的 MM 平板上。一旦生长, 30℃ 下将这些菌株单独接种到液体 MM 中, 以 250 rpm/min 振荡的条件下培养 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示大多数具有 pZP3L37 的转化体中存在 EPA, 但亲本 Y2047 菌株中不存在。在 96 个选择的具有 pZP3L37 的转化体中, 20 个菌株生产占工程化的耶氏酵母中总脂质的 2% 以下的 EPA, 23 个菌株生产 2-3% 的 EPA, 5 个菌株生产 3-4% 的 EPA, 2 个菌株 (即 71 号菌株和 94 号菌株) 生产约 6% 的 EPA。

选择 71 号菌株 (生产 6% EPA), 通过以两阶段生长条件 (即 48

hrs MM, 72 hrs HGM) 培养而进一步分析。GC 分析显示 71 号菌株生产占总脂质的约 11% 的 EPA。该菌株命名为菌株 “Y2048”。

制备具有 Ura-表型的生产占总脂质的约 13% 的 EPA 的 Y2060 菌株

为了破坏菌株 Y2048 中的 Ura3 基因, 将构建体 pZKUT16 (图 13D; SEQ ID NO: 131, 参见实施例 10) 用于将 TEF::rELO2S::Pex20 嵌合基因整合到 Y2048 菌株的 Ura3 基因中。具体地, 用 SalI/PacI 消化质粒 pZKUT16, 然后用于根据一般方法转化菌株 Y2048。转化后, 将细胞铺板到 MM+5-FOA 选择平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。

挑选了总共 40 个在 MM+5-FOA 平板上生长的转化体, 分别重新划线到 MM 平板和 MM+5-FOA 平板上。能够在 MM+5-FOA 平板上生长, 但是不能在 MM 平板上生长的菌株选作 Ura-菌株。30℃ 下将这 40 个 Ura-菌株的每一个单独接种到液体 MMU 培养基中, 在 250 rpm/min 振荡的条件下生长 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示在 MMU 培养基中生长 2 天后, 14 个菌株生产占总脂质的 5% 以下的 EPA, 9 个菌株生产 5-5.9% 的 EPA, 15 个菌株生产 6-6.9% 的 EPA, 7 个菌株生产 7-8% 的 EPA。用两阶段生长条件 (即 48 hrs MM, 96 hrs HGM) 进一步分析生产 7-8% EPA 的菌株。GC 分析显示所有这些菌株都生产占总脂质的 10% 以上的 EPA; 其中之一生产约 13% 的 EPA。该菌株命名为菌株 “Y2060”。

制备生产占总脂质的约 15% 的 EPA 的 Y2072 菌株

用构建体 pKO2UM25E (图 14A; SEQ ID NO: 132) 将含有三种嵌合基因 (包括 C_{18/20} 延伸酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶) 和 Ura3 基因的簇整合到菌株 Y2060 的天然耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶基因中。质粒 pKO2UM25E 含有以下成分:

表 29

质粒 pKO2UM25E (SEQ ID NO: 132) 的说明

SEQ ID NO: 132 内的 RE 位 点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
HindIII/AscI (1-728)	耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 23) 的 728 bp 5'部分
SphI/EcoRI (3436-3992)	耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 23) 的 556 bp 3'部分
BsiWI/HindIII (10437-1)	GPAT::EL1S::XPR, 包含: • GPAT: GPAT 启动子 (SEQ ID NO: 164) • EL1S: 密码子优化的延伸酶 1 基因 (SEQ ID NO: 19), 来源于高山被孢霉 (GenBank 获取号 AX464731) • XPR: 耶氏酵母 Xpr 基因 (GenBank 获取号 M17741) 的 3'区的约 100 bp
BglII/BsiWI (7920-10437)	FBAIN::M. $\Delta 12$::Pex20, 包含: • FBAIN: FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) • M.$\Delta 12$: 深黄被孢霉 $\Delta 12$ 去饱和酶基因 (GenBank 获取号 AF417245; SEQ ID NO: 25) ▪ Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
Sall/PacI (6046-7544)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GeneBank 获取号 AJ306421)
EcoRI/Sall (3992-6046)	TEF::I. $\Delta 5$ S::Pex20, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • I.$\Delta 5$S: 密码子优化的$\Delta 5$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 10), 来源于球等鞭金藻 (WO 2002/081668) • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列

用 *SphI/AscI* 消化质粒 pKO2UM25E, 然后用于根据一般方法转化菌株 Y2060。转化后, 将细胞铺板到 MM 平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。

挑选了总共 63 个在 MM 平板上生长的转化体, 重新划线到新的 MM 平板上。一旦生长, 30℃ 下将这些菌株单独接种到液体 MM 中, 以 250 rpm/min 振荡的条件下培养 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示在 MM 培养基中生长 2 天后, 几乎所有的具有 pKO2UM25E 的转化体中都存在 EPA。在 63 个选择的转化体中, 26 个菌株生产 6-8.9% 的 EPA, 46 个菌株生产 9% 以上的 EPA。选择生产 9% 以上的 EPA 的菌株, 用于用两阶段生长程序 (即 48 hrs MM, 96 hrs HGM) 进一步分析。GC 分析显示在两阶段生长后, 46 个选择的菌株中的 45 个菌株生产占总脂质的 11-14.5% 的 EPA, 而 2 号培养物生产 15.1% 的 EPA。该菌株 (即 2 号) 命名为菌株 “Y2072”。

制备具有 Ura-表型的生产占总脂质的约 14% 的 EPA 的 Y2072U1 菌株

建立构建体 pZKUGPI5S (图 14B; SEQ ID NO: 133), 用于将 GPAT::*LΔ5S*::Pex20 嵌合基因整合到 Y2072 菌株的 Ura3 基因中。更具体地, 质粒 pZKUGPI5S 包含以下成分:

表 30

质粒 pZKUGPI5S (SEQ ID NO: 133) 的说明

SEQ ID NO: 133 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
BsiWI/PacI (318-1038)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 721 bp 5' 部分
Sall/ClaI (3882-4606)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 724 bp 3' 部分
ClaI/BsiWI (4606-318)	GPAT:: Δ 5S:: Δ Pex20, 包含: • GPAT: GPAT 启动子 (SEQ ID NO: 164) • Δ5S: 密码子优化的 Δ5 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 10), 来源于球等鞭金藻 (WO 2002/081668) • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列

用 Sall/PacI 消化质粒 pZKUGPI5S, 然后用于根据一般方法转化菌株 Y2072。转化后, 将细胞铺板到 MM+5-FOA 选择平板上, 在 30℃ 维持 3-4 天。

挑选了总共 24 个在 MM+5-FOA 平板上生长的转化体, 分别重新划线到 MM 平板和 MM+5-FOA 平板上。能够在 MM+5-FOA 平板上生长, 但是不能在 MM 平板上生长的菌株选作 Ura-菌株。将这 24 个 Ura-菌株的每一个单独接种到液体 MMU 培养基中, 30℃ 下在 250 rpm/min 振荡的条件下生长 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示在 MMU 中生长 2 天后, 8 个菌株生产占总脂质的 7.3-8.9% 的 EPA, 14 个菌株生产 9-9.9% 的 EPA, 1 个菌株生产 10.5% 的 EPA (即 1 号), 1 个菌株生产 10.7% 的 EPA (即 23 号)。用两阶段生长条件 (即 48 hrs MM, 96 hrs HGM) 进一步分析 1 号和 23 号菌株。GC 分析显示在两阶段生长后这两个菌株都生产占总脂质的

约 14% 的 EPA。1 号菌株命名为菌株 “Y2072U1”。

制备生产占总脂质的约 18% 的 EPA 的 Y2089 菌株

用构建体 pDMW302T16 (图 14C; SEQ ID NO: 134) 将含有四种嵌合基因 (包括 $C_{16/18}$ 延伸酶、 $C_{18/20}$ 延伸酶、 $\Delta 6$ 去饱和酶和 $\Delta 12$ 去饱和酶) 和 Ura3 基因的簇整合到 Y2072U1 菌株的耶氏酵母脂肪酶 1 基因位点中。质粒 pDMW302T16 含有以下成分:

表 31

质粒 pDMW302T16 (SEQ ID NO: 134) 的说明

SEQ ID NO: 134 内的 RE 位点和 核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
BsiWI/AscI (1-817)	耶氏酵母脂肪酶 1 基因 (GenBank 获取号 Z50020) 的 817 bp 5' 部分
SphI/PacI 3525-4294	耶氏酵母脂肪酶 1 基因 (GenBank 获取号 Z50020) 的 769 bp 3' 部分
EcoRI/BsiWI (13328-1)	TEF::rELO2S::Pex20, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • rELO2S: 密码子优化的 rELO2 延伸酶基因 (SEQ ID NO: 52), 来源于大鼠 (GenBank 获取号 AB071986) • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
BglII/EcoRI (10599-13306)	FBAIN::D6S::Lip1, 包含: • FBAIN: FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) • Δ6S: 密码子优化的 Δ6 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 3), 来源于高山被孢霉 (GenBank 获取号 AF465281) ▪ Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 获取号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
ClaI/PmeI (8078-10555)	GPDIN::EL1S::Lip2, 包含: ▪ GPDIN: GPDIN 启动子 (SEQ ID NO: 159) • EL1S: 密码子优化的延伸酶 1 基因 (SEQ ID NO: 19), 来源于高山被孢霉 (GenBank 获取号 AX464731) • Lip2: 耶氏酵母脂肪酶 2 基因 (GenBank 获取号 AJ012632) 的 Lip2 终止子
EcoRI/ClaI (6450-8078)	耶氏酵母 Ura 3 基因 (GeneBank 获取号 AJ306421)
PacI/EcoRI (4294-6450)	TEF::F.Δ12::Pex16, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • F.Δ12: 串珠镰孢 Δ12 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 27) ▪ Pex16: 耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 获取号 U75433) 的 Pex16 终止子

用 SphI/AscI 消化质粒 pDMW302T16, 然后用于根据一般方法转化菌株 Y2072U1。转化后, 将细胞铺板到 MM 平板上, 在 30℃ 维持 3-4 天。挑选了总共 48 个在 MM 平板上生长的转化体, 重新划线到新的 MM 平板上。一旦生长, 将这些菌株单独接种到液体 MM 中, 30℃ 下在 250 rpm/min 振荡的条件下生长 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示在 MM 培养基中生长 2 天后, 几乎所有的具有 pDMW302T16 的 Y2072U1 的转化体都生产 EPA。在 48 个选择的转化体中, 27 个菌株生产 10% 以下的 EPA, 14 个菌株生产 10-12.9% 的 EPA, 5 个菌株生产 13-13.9% 的 EPA。选择 34 号菌株 (生产 13.9% EPA) 用于用两阶段生长程序 (即 48 hrs MM, 96 hrs HGM) 进一步分析。GC 分析显示 34 号菌株生产占总脂质的大约 18% 的 EPA。34 号菌株命名为菌株 “Y2089”。

该菌株相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的最终基因型是: Pox3-, LIP1-, Y.Δ12-, FBA::F.Δ12::Lip2, TEF::F.Δ12::Pex16, FBAIN::MΔ12::Pex20, TEF::Δ6S::Lip1, FBAIN::Δ6S::Lip1, FBAIN::E1S::Pex20, GPAT::E1S::Oct, GPDIN::E1S::Lip2, TEF::E2S::Xpr, FBAIN::MAΔ5::Pex20, TEF::MAΔ5::Lip1, TEF::HΔ5S::Pex16, TEF::IΔ5S::Pex20, GPAT::IΔ5S::Pex20, FBAIN::Δ17S::Lip2, FBAINm::Δ17S::Pex16, TEF::Δ17S::Pex16 和 2X TEF::rELO2S::Pex20。

制备具有 Ura-表型的生产占总脂质的约 16% 的 EPA 的 Y2107U1 菌株

建立构建体 pZKUGPE1S (图 14D; SEQ ID NO: 135), 用于将 GPAT::EL1S::Pex20 嵌合基因整合到菌株 Y2089 的 Ura3 基因中。更具体地, 质粒 pZKUGPE1S 包含以下成分:

表 32

质粒 pZKUGPE1S (SEQ ID NO: 135) 的说明

SEQ ID NO: 135 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
BsiWI/PacI (318-1038)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 721 bp 5' 部分
SalI/ClaI (3882-4606)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421) 的 724 bp 3' 部分
ClaI/BsiWI (4606-318)	GPAT::E1S::Pex20, 包含: • GPAT: GPAT 启动子 (SEQ ID NO: 164) • EL1S: 密码子优化的延伸酶 1 基因 (SEQ ID NO: 19), 来源于高山被孢霉 (GenBank 获取号 AX464731) • Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列

用 SalI/PacI 消化质粒 pZKUGPE1S, 然后用于根据一般方法转化菌株 Y2089。转化后, 将细胞铺板到 MM+5-FOA 选择平板上, 在 30℃ 维持 3-4 天。

挑选了总共 8 个在 MM+5-FOA 平板上生长的转化体, 分别重新划线到 MM 平板和 MM+5-FOA 平板上。能够在 MM+5-FOA 平板上生长, 但是不能在 MM 平板上生长的菌株选作 Ura-菌株。将这 8 个 Ura-菌株的每一个单独接种到液体 MMU 中, 30℃ 下在 250 rpm/min 振荡的条件下生长 2 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示在 MMU 中生长 2 天后, 6 个菌株生产占总脂质的 6.6-8.7% 的 EPA, 2 个菌株生产 9.4-10% 的 EPA (即 4 号和 5 号)。用两阶段生长条件 (即 48 hrs MM, 96 hrs HGM) 进一步分析 4 号和 5 号菌株。GC 分析显示这两个菌株在两阶段生长后生产占总脂质的约 16% 的 EPA。4 号菌株命名为菌株 “Y2107U1”。

实施例 12

制备生产占总脂质的 9-12% 的 EPA 的中间菌株 MU

本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 MU 的构建，该菌株能够生产占总脂质的显著浓度的 EPA（图 4）。基于 TAG 含量和/或组成的分析，在这种生产 EPA 的菌株中检验多个天然解脂耶氏酵母酰基转移酶敲除的影响，如实施例 24 的描述（下文）。

菌株 MU（生产 9-12% EPA）的开发需要构建菌株 M4（生产 8% DGLA，并且描述于实施例 4）、菌株 Y2034（生产 10% ARA，并且描述于实施例 4）、菌株 E（生产 10% EPA，并且描述于实施例 10）、菌株 EU（生产 10% EPA，并且描述于实施例 10）和菌株 M26（生产 14% EPA）。

制备生产占总脂质的 14% 的 EPA 的 M26 菌株

用构建体 pZKO2UM26E（SEQ ID NO: 136；图 15A）将含有三种嵌合基因（包括 $C_{18/20}$ 延伸酶、 $\Delta 6$ 去饱和酶和 $\Delta 12$ 去饱和酶）和 Ura3 基因的簇整合到 EU 菌株（实施例 10）的耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶基因位点中。质粒 pKO2UM26E 含有以下成分：

表 33

质粒 pKO2UM26E (SEQ ID NO: 136) 的说明

SEQ ID NO: 136 内的 RE 位 点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
HindIII/AscI (1-728)	耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 23) 的 728 bp 5' 部分
SphI/EcoRI (3436-3992)	耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO: 23) 的 556 bp 3' 部分
BsiWI/HindIII (11095-1)	GPAT::EL1S::XPR, 包含: GPAT: GPAT 启动子 (SEQ ID NO: 164) EL1S: 密码子优化的延伸酶 1 基因 (SEQ ID NO: 19), 来源于高山被孢霉 (GenBank 获取号 AX464731) XPR: 耶氏酵母 Xpr 基因 (GenBank 获取号 M17741) 的 3' 区的约 100 bp
BglII/BsiWI (8578-11095)	FBAIN::M. $\Delta 12$::Pex20, 包含: FBAIN: FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) M. $\Delta 12$: 深黄被孢霉 $\Delta 12$ 去饱和酶基因 (GenBank 获取号 AF417245; SEQ ID NO: 25) Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
SalI/PacI (6704-8202)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421)
EcoRI/SalI (3992-6704)	FBAIN::M. $\Delta 6B$::Pex20, 包含: TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) M. $\Delta 6B$: 高山被孢霉 $\Delta 6$ 去饱和酶基因 "B" (GenBank 获取号 AB070555; SEQ ID NO: 4) Pex20: 耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 获取号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列

用 SphI/AscI 消化质粒 pKO2UM26E, 然后用于根据一般方法转化 EU 菌株 (实施例 10)。转化后, 将细胞铺板到 MM 平板上, 在 30℃ 维持 2-3 天。

挑选了总共 48 个在 MM 平板上生长的转化体, 重新划线到新的 MM 平板上。一旦生长, 30℃ 下将这些菌株单独接种到液体 MM 中, 以 250 rpm/min 振荡的条件下生长 1 天。通过离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换制备脂肪酸甲酯, 随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

GC 分析显示在 MM 培养基中生长 1 天后, 几乎所有的具有 pKO2UM26E 的转化体中都存在 EPA。在 48 个选择的转化体中, 5 个菌株生产占工程化的耶氏酵母中的总脂质的 4% 以下的 EPA, 23 个菌株生产 4-5.9% EPA, 9 个菌株生产 6-6.9% EPA, 11 个菌株生产 7-8.2% EPA。选择生产 8.2% EPA 的菌株用于通过两阶段生长程序 (即 48 hrs MM, 96 hrs HGM) 进一步分析。GC 分析显示工程化的菌株生产占总脂质的约 14% 的 EPA。该菌株称作菌株 “M26”。

菌株 M26 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的最终基因型是: Pox3-, Y.Δ12-, FBA::F.Δ12::Lip2, FBAIN::MΔ12::Pex20, TEF::Δ6S::Lip1, FBAIN::Δ6B::Pex20, FBAIN::E1S::Pex20, GPAT::E1S::Xpr, TEF::E2S::Xpr, FBAIN::MAΔ5::Pex20, TEF::MAΔ5::Lip1, TEF::HΔ5S::Pex16, FBAIN::Δ17S::Lip2, FBAINm::Δ17S::Pex16, TEF::Δ17S::Pex16 和 TEF::rELO2S::Pex20。

制备生产占总脂质的约 14% 的 EPA 的 MU 菌株

菌株 MU 是菌株 M26 的 Ura 营养缺陷型。该菌株是通过用 PacI 和 HincII 消化过的 5 μg 质粒 pZKUM (SEQ ID NO: 137) 转化菌株 M26 而制备的。用 Frozen-EZ 酵母转化试剂盒 (Zymo Research Corporation, Orange, CA) 进行转化, 通过将 100 μl 转化的细胞混合物在以下培养基中铺板在琼脂板上, 选择转化体: 6.7 g/L 酵母氮基 (DIFCO Laboratories, Detroit, MI)、20 g/右旋糖、50 mg/L 尿嘧啶和 800 mg/L FOA。7 天后, 将出现的小菌落铺板在 MM 和 MMU 琼脂板上。所有都是 URA 营养缺陷型。菌株之一命名为 “MU”。

实施例 13

高山被孢霉基因组 DNA 和 cDNA 的制备

本实施例描述了高山被孢霉 (ATCC #16266) 的基因组 DNA 和 cDNA 的制备。这使得能够分别按照实施例 14、15、16、17 和 18 的描述分离高山被孢霉 LPAAT2、DGAT1、DGAT2、GPAT 和 ELO3。

制备高山被孢霉基因组 DNA

使用 QiaPrep Spin 微量制备试剂盒 (Qiagen, 目录号 627106), 从高山被孢霉 (ATCC #16266) 分离基因组 DNA。刮下在 YPD 琼脂平板 (2% 细菌用酵母提取物, 3% 细菌用肽胨, 2% 葡萄糖, 2% 细菌用琼脂) 上生长的细胞, 重新悬浮于 1.2 mL 试剂盒缓冲液 P1。将重新悬浮的细胞置于 2 个 2.0 mL 螺旋帽试管中, 每个试管装有 0.6 mL 玻璃珠 (0.5 mm 直径)。在 Biospec (Bartlesville, OK) 微珠搅拌机上, 在 HOMOGENIZE 设置, 匀浆细胞 2 min。然后在 Eppendorf 微量离心机中在 14,000 rpm 离心试管 2 min。将上清液 (0.75 mL) 转移至 3 个 1.5 mL 微量离心试管。向每个试管中加入等体积的试剂盒缓冲液 P2。通过反转混合试管 3 次后, 将 0.35 mL 缓冲液 N3 加入每个试管。通过反转混合试管 5 次, 再次混合物内容物。在 Eppendorf 微量离心机中在 14,000 rpm 离心混合物 5 min。将每个试管的上清液转移进分开的试剂盒离心柱中。然后对柱子进行以下步骤: 离心 (14,000 rpm 1 min), 用缓冲液 PE 洗涤一次, 离心 (14,000 rpm 1 min), 然后最后离心 (14,000 rpm 1 min)。将缓冲液 EB (50 μ L) 加入每个柱中, 静置 1 min。然后通过 14,000 rpm 离心 1 min, 洗脱基因组 DNA。

制备高山被孢霉 cDNA

根据制造商的方案, 使用 BD-Clontech Creator Smart[®] cDNA 文库试剂盒 (Mississauga, ON, Canada), 制备了高山被孢霉 cDNA。具体地, 在 23 $^{\circ}$ C, 将高山被孢霉菌株 ATCC #16266 在 60 mL YPD 培养基 (2% 细菌用酵母提取物, 3% 细菌用肽胨, 2% 葡萄糖) 中培养 3 天。通过在 Beckman GH3.8 转子中 3750 rpm 离心 10 min, 沉淀细胞, 并重新悬浮于 6X 0.6 mL Trizole 试剂 (Invitrogen)。将重新悬浮的细胞转移到 6 个 2 mL 螺旋帽试管中, 每个试管装有 0.6 mL 0.5 mm 玻璃珠。在 Biospec (Bartlesville, OK) 微珠搅拌机上, 在 HOMOGENIZE 设置, 匀浆细胞 2 min。短时间离心试管, 沉淀珠子。

将液体转移至 4 个新的 1.5 mL 微量离心试管，向每个试管中加入 0.2 mL 氯仿/异戊醇 (24:1)。用手摇动试管 1 min，静置 3 min。然后在 4℃，在 14,000 rpm 离心试管 10 min。将上层转移至 4 个新试管。将异丙醇 (0.5 mL) 加入每个试管中。在室温温育试管 15 min，然后在 14,000 rpm、4℃离心 10 min。各用 1 mL 75%乙醇 (由无 RNA 酶的水制备) 洗涤沉淀，并在空气中干燥。然后，将总 RNA 样品重新溶于 500 μ l 水，使用 1:50 稀释的 RNA 样品，在 A260 nm 测量 RNA 的量。得到共计 3.14 mg RNA。

根据制造商的方案，用 Qiagen Rneasy 总 RNA Midi 试剂盒进一步纯化该总 RNA 样品。从而，将总 RNA 样品稀释至 2 mL，并与含有 80 μ l β -巯基乙醇和 5.6 mL 100%乙醇的 8 mL 缓冲液 RLT 相混合。将样品分成 4 份，装载 4 RNeasy midid 柱。然后，在 4500Xg 离心柱 5 min。为了洗涤柱，装载 2 mL 缓冲液 RPE，在 4500Xg 离心柱 2 min。重复洗涤步骤 1 次，例外是，将离心延长至 5 min。如下洗脱总 RNA：向每个柱中应用 250 μ l 无 RNA 酶的水，等待 1 min，在 4500Xg 离心 3 min。

按照 Pharmacia 的试剂盒手册，从上面的总 RNA 样品分离聚 A (+) RNA。简而言之，使用 2 个寡-dT-纤维素柱。各用 1 mL 高盐缓冲液，洗涤柱 2 次。将来自前一步骤的总 RNA 样品稀释至 2 mL 总体积，并调节至 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA。在 65℃加热样品 5 min，然后置于冰上。加入样品缓冲液 (0.4 mL)，然后在重力进料下，将样品装载到 2 个寡-dT-纤维素柱上。在 350Xg 离心柱 2 min，各用 0.25 mL 高盐缓冲液洗涤 2 次，每次洗涤后在 350Xg 离心 2 min。在相同的离心程序后，再用低盐缓冲液洗涤柱 3 次。通过各用 0.25 mL 预热至 65℃的洗脱缓冲液洗涤柱 4 次，洗脱聚 (A) +RNA，随后进行相同的离心程序。重复整个纯化过程一遍。得到的纯化的聚 (A) +RNA 的浓度为 30.4 ng/ μ l。

使用 BD-Clontech 描述的 LD-PCR 方法和 0.1 μ g 聚 A (+) RNA 样品，制备 cDNA。更具体地，就第 1 链 cDNA 合成而言，将 3 μ l 聚 (A) +RNA 样品与 1 μ l SMART IV 寡核苷酸 (SEQ ID NO: 281) 和 1 μ l CDSIII/3' PCR 引物 (SEQ ID NO: 282) 相混合。在 72℃加热混合物 2 min，在冰上冷却 2 min。向试管中加入下述物质：2 μ l 第

1 链缓冲液, 1 μl 20 mM DTT, 1 μl 10 mM dNTP 混合物和 1 μl Powerscript 逆转录酶。在 42 $^{\circ}\text{C}$ 温育混合物 1 小时, 然后在冰上冷却。

将第 1 链 cDNA 合成混合物用作 PCR 反应的模板。更具体地, 反应混合物含有下述物质: 2 μl 第 1 链 cDNA 混合物, 2 μl 5'-PCR 引物 (SEQ ID NO: 283), 2 μl CDSIII/3'-PCR 引物 (SEQ ID NO: 282), 80 μl 水, 10 μl 10X Advantage 2 PCR 缓冲液, 2 μl 50X dNTP 混合物和 2 μl 50X Advantage 2 聚合酶混合物。将热循环仪条件设定为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 sec, 然后是在 GenAmp 9600 仪器上的 14 个 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 sec 和 68 $^{\circ}\text{C}$ 6 min 的循环。通过琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色, 定量 PCR 产物。

将 75 μl 上述 PCR 产物 (cDNA) 与 3 μl 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 蛋白酶 K (与试剂盒一起提供) 相混合。在 45 $^{\circ}\text{C}$ 温育混合物 20 min, 然后加入 75 μl 水, 用 150 μl 苯酚:氯仿:异戊醇混合物 (25:24:1) 提取混合物。用 150 μl 氯仿:异戊醇 (25:1) 进一步提取水相。然后, 将水相与 15 μl 3 M 醋酸钠, 2 μl 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 糖原和 400 μl 100%乙醇相混合。立即在离心机中在室温在 14000 rpm 离心混合物 20 min。用 150 μl 80%乙醇洗涤沉淀一次, 在空气中干燥, 溶于 79 μl 水。

随后用 *Sfi*I 消化溶解的 cDNA (将 79 μl cDNA 与 10 μl 10X *Sfi*I 缓冲液, 10 μl *Sfi*I 酶和 1 μl 100X BSA 相混合, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育混合物 2 小时)。加入二甲苯蓝染料 (2 μl 1%)。然后完全按照制造商的方案, 在与试剂盒一起提供的 Chroma Spin-400 柱上分离混合物。通过琼脂糖凝胶电泳, 分析从柱收集的级分。合并含有 cDNA 的前 3 个级分, 并用乙醇沉淀 cDNA。将沉淀的 cDNA 重新溶于 7 μl 水, 并连接进试剂盒-提供的 pDNR-LIB。

文库测序

将连接产物用于转化大肠杆菌 XL-1 Blue 电穿孔感受态细胞 (Stratagene)。得到估计共 2×10^6 菌落。使用 M13 正向引物 (SEQ ID NO: 284), 通过 Agencourt Bioscience Corporation (Beverly, MA), 进行 cDNA 文库的测序。

实施例 14

高山被孢霉 LPAAT2 表达增加 PUFAs 百分比

本实施例描述经过转化而共表达高山被孢霉 LPAAT2 (SEQ ID NOs: 69 和 70) 的解脂耶氏酵母菌株 Y2067U (实施例 10) 中 EPA 生物合成和积累的增加。认为如果类似地共表达高山被孢霉 LPAAT2 (如在菌株 Y2034、Y2047 和/或 Y2214 中), 则经过工程化以通过 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径生产 ARA 的解脂耶氏酵母宿主菌株能够证明 ARA 生物合成和积累的增加。

按照如下方法克隆高山被孢霉 LPAAT2 ORF。通过 PCR, 用引物 MLPAT-F 和 MLPAT-R (SEQ ID NOs: 285 和 286) 扩增来自高山被孢霉的 cDNA (实施例 13) 的 LPAAT2 ORF。反应混合物含有 1 μ l cDNA、每种引物各 1 μ l、22 μ l 水和 25 μ l ExTaq 预混合 2X Taq PCR 溶液 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, 520-2193, Japan)。按照如下方法进行扩增: 最初在 94 $^{\circ}$ C 变性 150 sec, 然后是 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 下变性 30 sec、55 $^{\circ}$ C 下退火 30 sec 和 72 $^{\circ}$ C 下延伸 90 sec。72 $^{\circ}$ C 进行最终的延伸循环 10 分钟, 然后在 4 $^{\circ}$ C 终止反应。从 PCR 反应获得了约 950 bp DNA 片段。根据制造商的方案, 用 Qiagen (Valencia, CA) PCR 纯化试剂盒对其进行纯化。用 NcoI 和 NotI 消化纯化的 PCR 产物, 克隆到 Nco I-Not I 切割的 pZUF17 载体 (SEQ ID NO: 118; 图 8B) 中, 使得基因处于自主复制的载体中的解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子和 PEX20-3' 终止子区控制下, 以便在解脂耶氏酵母中表达。通过微量制备 DNA 的限制分析证实正确的转化体, 得到的质粒命名为 “pMLPAT-17” (SEQ ID NO: 138)。

为了将高山被孢霉 LPAAT2 整合到解脂耶氏酵母的基因组中, 建立了质粒 pMLPAT-Int。用引物 LPAT-Re-5-1 和 LPAT-Re-5-2 (SEQ ID NOs: 287 和 288) 扩增 1129 bp DNA 片段 YLPAT-5' (SEQ ID NO: 289), 该片段含有解脂耶氏酵母 LPAAT1 (SEQ ID NO: 71) 的 AUG 上游紧邻的解脂耶氏酵母基因组 1103 bp 片段。反应混合物含有 1 μ l 解脂耶氏酵母基因组 DNA、每种引物各 1 μ l、22 μ l 水和 25 μ l ExTaq 预混合 2X Taq PCR 溶液 (TaKaRa)。按照上文进行扩增。从 PCR 反应获得了约 1130 bp DNA 片段。根据制造商的方案, 用 Qiagen 的 PCR 纯化试剂盒对其进行纯化。用 SalI 和 ClaI 消化纯化的 PCR 产物, 克隆到 SalI-ClaI 切割的 pBluescript SK (-) 载体中, 得到质粒 “pYLPAT-5'”。

然后用引物 LPAT-Re-3-1 和 LPAT-Re-3-2 (SEQ ID NOs: 290 和 291) 扩增 938 bp 片段 YLPAT-3' (SEQ ID NO: 292), 该片段含有解脂耶氏酵母 LPAAT1 的终止密码子后紧邻的解脂耶氏酵母基因组 903 bp 片段。用 ClaI 和 XhoI 消化纯化的 PCR 产物, 克隆到 ClaI-XhoI 消化的 pYLPAT-5' 中。通过微量制备分析证实正确的转化体, 得到的质粒命名为 “pYLPAT-5'-3'”。

然后用 ClaI 和 NotI 消化 pMLPAT-17 (SEQ ID NO: 138), 根据制造商的方案, 用 Qiagen QiaexII 凝胶纯化试剂盒分离含有解脂耶氏酵母 Ura3 基因的约 3.5 kb 片段、解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子和高山被孢霉 LPAAT2 基因。将该片段克隆到 ClaI-NotI 消化的 pYLPAT-5'-3' 中。通过微量制备和限制分析证实正确的转化体。得到的质粒命名为 “pMLPAT-Int” (SEQ ID NO: 139)。

如下制备“对照”载体 pZUF-MOD-1 (SEQ ID NO: 140; 图 15B)。首先, 用引物 pzuf-mod1 和 pzuf-mod2 (SEQ ID NOs: 293 和 294) 扩增 252 bp “填充” DNA 片段。用 Qiagen QiaQuick PCR 纯化试剂盒纯化扩增的片段, 使用标准条件, 用 NcoI 和 NotI 消化, 然后再用 QiaQuick PCR 纯化试剂盒进行纯化。将该片段连接进类似地消化的 NcoI-/NotI-切割的 pZUF17 载体 (SEQ ID NO: 118; 图 8B), 并将得到的连接混合物用于转化大肠杆菌 Top10 细胞 (Invitrogen)。使用 Qiagen QiaPrep Spin 微量制备试剂盒, 从 4 个得到的菌落纯化质粒 DNA。用 NcoI 和 NotI 消化纯化的质粒, 证实约 250 bp 片段的存在。得到的质粒称作 “pZUF-MOD-1” (SEQ ID NO: 140)。

根据一般方法, 分别用质粒 pMLPAT-17、质粒 pZUF-MOD-1 (对照) 和 SpeI/XbaI 消化的质粒 pMLPAT-Int 转化解脂耶氏酵母菌株 Y2067U (来自实施例 10, 生产占总脂质的 14% 的 EPA)。使转化体在添加了氨基酸的合成 MM 中生长 2 天, 然后在 HGM 中生长 4 天。基于 GC 分析 (如一般方法中所述), 在下表中示出了两个含有 pZUF-MOD-1 的转化体、两个含有 pMLPAT-17 的转化体, 和两个具有整合到基因组中的 pMLPAT-Int 的转化体的脂肪酸谱。脂肪酸鉴定为 18:0、18:1 (油酸)、18:2 (LA)、GLA、DGLA、ARA、ETA 和 EPA; 每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 34

经过工程化而超量表达高山被孢霉 LPAAT2 的耶氏酵母菌株 Y2067U 中的脂质组成

菌株	总脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.1	4.7	10.9	19.4	6.3	0.9	3.9	13.8
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	0.9	4.4	9.5	19.3	6.6	0.9	4.0	14.1
Y2067U+pMLPAT-17 #1	1.0	4.4	9.8	18.6	5.9	0.8	3.4	15.5
Y2067U+pMLPAT-17 #2	0.7	3.5	8.4	16.7	6.2	1.0	2.9	16.0
Y2067U+pMLPAT-Int #1	1.9	4.9	13.9	21.1	4.8	1.1	2.7	16.6
Y2067U+pMLPAT-Int #2	1.7	4.2	12.1	21.3	5.2	1.2	2.9	17.3

如上文所证明的，从 pMLPAT-17 表达高山被孢霉 LPAAT2，使“对照”菌株中的 EPA 百分比从约 14% 增加到 15.5-16%。当用 pMLPAT-Int 将高山被孢霉 LPAAT2 整合到基因组中时，EPA 额外增加到 16.6-17.3%。如果天然解脂耶氏酵母 LPAAT1 (SEQ ID NOs: 71 和 72) 和/或 LPAAT2 (SEQ ID NOs: 74 和 75) 从例如菌株 Y2067U+pMLPAT-Int 中敲除，可以预期进一步的增加。

实施例 15

高山被孢霉 DGAT1 表达增加 PUFAs 百分比

本实施例描述经过转化而共表达高山被孢霉 DGAT1 cDNA (SEQ ID NO: 83) 的解脂耶氏酵母菌株 Y2067U (实施例 10) 中 EPA 生物合成和积累的增加。认为如果类似地共表达高山被孢霉 DGAT1 (如在菌株 Y2034、Y2047 和/或 Y2214 中)，则经过工程化以通过 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径生产 ARA 的解脂耶氏酵母宿主菌株能够证明 ARA 生物合成和积累的增加。

如下克隆高山被孢霉 DGAT1 ORF。首先，为了辅助克隆 cDNA，将 DGAT1 的第 2 个密码子的序列从‘ACA’改变成‘GCA’，导致从苏氨酸至丙氨酸的氨基酸改变。这通过用引物 MACAT-F1 和 MACAT-R (SEQ ID NO: 295 和 296) 扩增高山被孢霉 DGAT1 ORF 的完整

编码区来实现。更具体地, PCR 反应混合物含有 1 μ l 各 20 μ M 引物 MACAT-F1 和 MACAT-R 溶液, 1 μ l 高山被孢霉 cDNA (同上, 实施例 13), 22 μ l 水和 25 μ l ExTaq 预混合 2X Taq PCR 溶液 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, 520-2193, Japan)。如下进行扩增: 在 94 $^{\circ}$ C 初步变性 150 sec, 随后 30 个下述循环: 在 94 $^{\circ}$ C 变性 30 sec, 在 55 $^{\circ}$ C 退火 30 sec, 在 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 sec。进行在 72 $^{\circ}$ C 10 min 的最终延伸循环, 然后在 4 $^{\circ}$ C 终止反应。从 PCR 反应得到约 1600 bp DNA 片段。根据制造商的方案, 使用 Qiagen 的 PCR 纯化试剂盒, 进行纯化。

将高山被孢霉 DGAT1 ORF 插入 *Nco I*-和 *Not I*-消化的质粒 pZUF17 (SEQ ID NO: 118; 图 8B), 使得 ORF 克隆在 FBAIN 启动子和 PEX20-3'终止子区域控制下。但是, 由于 DGAT1 ORF 含有内部 *Nco I* 位点, 克隆必需进行 2 个分开的限制酶消化。首先, 用 *Bam HI* 和 *Nco I* 消化约 2 μ g 纯化的 PCR 产物。反应混合物含有 20 U 每种酶 (Promega) 和 6 μ l 限制缓冲液 D, 总体积为 60 μ l。在 37 $^{\circ}$ C 温育混合物 2 小时。通过琼脂糖凝胶电泳分离约 320 bp 片段, 并使用 Qiagen Qiaex II 凝胶纯化试剂盒进行纯化。单独地, 使用与上面相同的反应条件, 例外是用 *Not I* 替代 *Nco I*, 用 *Bam HI* 和 *Not I* 消化约 2 μ g 纯化的 PCR 产物, 如上分离和纯化约 1280 bp 片段。最后, 用 *Nco I* 和 *Not I* 消化约 3 μ g pZUF17, 并如上纯化, 制备约 7 kb 片段。

在三向连接中, 将约 7 kb *Nco I/Not I* pZUF17 片段、约 320 bp *Nco I/Bam HI* DGAT1 片段和约 1280 bp *Bam HI/Not I* DGAT1 片段连接到一起, 在室温温育过夜。连接混合物含有 100 ng 7 kb 片段以及 320 bp 和 1280 bp 片段各 200 ng、2 μ l 连接酶缓冲液和 2 U T4 DNA 连接酶 (Promega), 总体积为 20 μ l。根据制造商的方案, 将连接产物用于转化大肠杆菌 Top10 化学感受态细胞 (Invitrogen)。

将转化的单个菌落 (共 12 个) 用于接种培养物, 用于微量制备分析。限制图谱和测序证实, 12 个菌落中的 5 个菌落携带需要的质粒, 其称作 “pMDGAT1-17” (图 15C; SEQ ID NO: 141)。

根据一般方法, 分别用 pMDGAT1-17 和 pZUF-MOD-1 (上文, 实施例 14) 转化解脂耶氏酵母菌株 Y2067U (来自实施例 10)。使转化体在添加了氨基酸的合成 MM 中生长 2 天, 然后在 HGM 中生长 4 天。基于 GC 分析 (如一般方法中所述), 在下表 35 中示出了两个

含有 pMDGAT1-17 的转化体和两个含有 pZUF-MOD-1 的转化体的脂肪酸谱。脂肪酸鉴定为 18:0、18:1 (油酸)、18:2 (LA)、GLA、DGLA、ARA、ETA 和 EPA；每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 35

经过工程化而超量表达高山被孢霉 DGAT1 的耶氏酵母菌株 Y2067U 中的脂质组成

菌株	总脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.31	6.92	12.03	23.11	5.72	1.05	3.80	13.20
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	1.39	6.83	12.15	21.99	5.83	1.07	3.82	13.47
Y2067U+pMDGAT1-17 #1	0.89	7.13	10.87	24.88	5.82	1.19	3.97	14.09
Y2067U+pMDGAT1-17 #2	0.86	7.20	10.25	22.42	6.35	1.26	4.38	15.07

如上文证明的，从质粒 pMDGAT1-17 表达高山被孢霉 DGAT1，分别使“对照”菌株中的 EPA 百分比从约 13.3% 增加到约 14% (“Y2067U+pMDGAT1-17 #1”) 和约 15.1% (“Y2067U+pMDGAT1-17 #2”)。如果天然解脂耶氏酵母 DGAT1 (SEQ ID NOs: 81 和 82) 从例如菌株 Y2067U+pMDGAT1-17 中敲除，可以预期 EPA 的进一步增加。

实施例 16

高山被孢霉 DGAT2 增加 PUFAs 百分比

本实施例描述经过转化而共表达高山被孢霉 DGAT2 cDNA (SEQ ID NO: 95) 的解脂耶氏酵母菌株 Y2067U (实施例 10) 中 EPA 生物合成和积累的增加。认为如果类似地共表达高山被孢霉 DGAT2 (如在菌株 Y2034、Y2047 和/或 Y2214 中)，则经过工程化以通过 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径生产 ARA 的解脂耶氏酵母宿主菌株能够证明 ARA 生物合成和积累的增加。

如下将高山被孢霉 DGAT2 ORF 克隆到质粒 pZUF17 中。首先，用来自高山被孢霉 cDNA (上文实施例 13) 的引物 MDGAT-F 和

MDGAT-R1 (SEQ ID NOs: 297 和 298) PCR 扩增 ORF。分离预期的 1015 bp 片段，纯化，用 Nco I 和 Not I 消化，克隆到 Nco I-Not I 切割的 pZUF17 载体 (SEQ ID NO: 118; 图 8B) 中，使得基因在解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子和 PEX20-3'终止子区域控制下。通过微量制备 DNA 的限制分析证实正确的转化体，得到的质粒命名为 “pMDGAT2-17” (SEQ ID NO: 142)。

根据一般方法，分别用 pMDGAT2-17 和 pZUF-MOD-1 (上文，实施例 14) 转化解脂耶氏酵母菌株 Y2067U (来自实施例 10)。使转化体在添加了氨基酸的合成 MM 中生长 2 天，然后在 HGM 中生长 4 天。基于 GC 分析 (如一般方法中所述)，下文示出了两个含有 pMDGAT2-17 的转化体和两个含有 pZUF-MOD-1 的转化体的脂肪酸谱。脂肪酸鉴定为 18:0、18:1 (油酸)、18:2 (LA)、GLA、DGLA、ARA、ETA 和 EPA；每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 36

经过工程化而超量表达高山被孢霉 DGAT2 的耶氏酵母菌株 Y2067U 中的脂质组成

菌株	总脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.31	6.92	12.03	23.11	5.72	1.05	3.80	13.20
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	1.39	6.83	12.15	21.99	5.83	1.07	3.82	13.47
Y2067U+pMDGAT2-17 #1	0.00	7.47	10.77	25.30	5.70	1.43	3.45	15.12
Y2067U+pMDGAT2-17 #2	1.45	7.79	9.96	25.16	6.06	1.25	3.99	15.37

如上文证明的，从质粒 pMDGAT2-17 表达高山被孢霉 DGAT2，使“对照”菌株中的 EPA 百分比从约 13.3% 增加到约 15.25% (“Y2067U+pMDGAT2-17”)。如果天然解脂耶氏酵母 DGAT2 (SEQ ID NOs: 89-94) 从例如菌株 Y2067U+pMDGAT2-17 中敲除，可以预期 EPA 的进一步增加。

实施例 17

高山被孢霉 GPAT 增加 PUFAs 百分比

本实施例描述经过转化而共表达高山被孢霉 GPAT ORF (SEQ ID NO: 97) 的解脂耶氏酵母菌株 Y2107U1 (实施例 11) 中 DGLA 生物合成和积累的增加 (以及 18:1 的量减少)。认为如果类似地共表达高山被孢霉 GPAT (如在菌株 Y2034、Y2047 和/或 Y2214 中), 则经过工程化以通过 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径生产 ARA 的解脂耶氏酵母宿主菌株能够证明 ARA 生物合成和积累的增加。

基于来自构巢曲霉 (GenBank 获取号 EAA62242) 和粗糙链孢霉 (GenBank 获取号 XP_325840) 的 GPAT 的序列, 设计了以下引物进行简并 PCR:

MGPAT-N1 (SEQ ID NO: 299) CCNCA YGCNAA YCARTTYGT

MGPAT-NR5 (SEQ ID NO: 300) TTCCANGTNGCCATNTTCRTC

[注: 用于 SEQ ID NOs: 299 和 300 的核酸简并密码如下:

R=A/G; Y=C/T; 并且 N=A/C/T/G。]

用 TaKaRa ExTaq 预混合 Taq 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan), 在 Perkin Elmer GeneAmp 9600 PCR 仪中进行 PCR 扩增。扩增如下进行: 30 个循环的 94℃ 下变性 30 sec、55℃ 下退火 30 sec 和 72℃ 下延伸 90 sec。然后 72℃ 进行最终的延伸循环 7 分钟。

获得了约 1.2 kB 的片段 (SEQ ID NO: 99)。用 Qiagen QiaQuick PCR 纯化试剂盒纯化该片段, 克隆到 TOPO[®] 克隆载体 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 中, 并且测序。得到的序列翻译后基于 BLAST 程序分析与已知的 GPATs 具有同源性。

基于 1212 bp cDNA 片段的序列, 通过 PCR 扩增和基因组步移技术克隆了高山被孢霉 GPAT 的 5' 和 3' 区。这使得能够组装相应于高山被孢霉 GPAT (SEQ ID NO: 100) 的 -1050 bp 至 +2885 bp 区的重叠群。该重叠群包括 GPAT 的整个编码区和四个内含子 (SEQ ID NOs: 104, 105, 106 和 107)。

具体地, 将描述于实施例 13 (1 μ l) 的高山被孢霉 cDNA 样品用作扩增 GPAT 的 3' 末端的模板。MGPAT-5N1 (SEQ ID NO: 301)

和 CDSIII/3' (SEQ ID NO: 282) 用作模板。用 TaKaRa ExTaq 预混合 Taq 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan), 在 Perkin Elmer GeneAmp 9600 PCR 仪中进行 PCR 扩增。扩增如下进行: 30 个循环的 94℃ 下变性 30 sec、55℃ 下退火 30 sec 和 72℃ 下延伸 90 sec。然后 72℃ 进行最终的延伸循环 7 分钟。

1:10 稀释 PCR 产物, 将 1 µl 稀释的 PCR 产物用作第二轮扩增的模板, 该第二轮扩增采用 MGPAT-5N2 (SEQ ID NO: 302) 和 CDSIII/3' 作为引物。条件与上文描述的完全相同。再次将第二轮 PCR 产物 1:10 稀释, 将 1 µl 稀释的 PCR 产物用作第三轮 PCR 的模板, 该第三轮 PCR 采用 MGPAT-5N3 (SEQ ID NO: 303) 和 CDSIII/3' 作为引物。PCR 条件再次相同。

第三轮 PCR 产生约 1kB 的片段。用 Qiagen QiaQuick PCR 纯化试剂盒纯化该片段, 克隆到 pCR2.1-TOPO 载体中, 进行序列分析。序列分析结果表明该 965 bp 片段 (SEQ ID NO: 101) 相应于 GPAT 基因的 3' 末端。

用 Clontech Universal GenomeWalker™ 试剂盒获得一段相应于高山被孢霉 GPAT 的 5' 末端区的基因组 DNA。简言之, 用 *DraI*、*EcoRV*、*PvuII* 或 *StuI* 单独地消化 2.5 µg 每个高山被孢霉基因组 DNA, 使用 Qiagen Qiaquick PCR 纯化试剂盒, 纯化消化的 DNA 样品, 并用每种试剂盒缓冲液 EB 各 30 µl 洗脱, 并用如下所示的基因组步移接头 (SEQ ID NO: 304[上链]和 305[下链]), 连接纯化的样品:

5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT-3'
3'-H2N-CCCGACCA-5'

每种连接反应混合物含有 1.9 µl 25 µM 基因组步移接头, 1.6 µl 10X 连接缓冲液, 0.5 µl T4 DNA 连接酶和 4 µl 纯化的消化的基因组 DNA 样品之一。在 16℃ 温育反应混合物过夜。通过在 70℃ 温育 5 min, 终止反应。然后, 将 72 µl 10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 缓冲液加入每种连接反应混合物。

进行了四个独立的 PCR 反应, 每个反应采用四种连接混合物之一作为模板。PCR 反应混合物含有 1 µl 连接混合物, 0.5 µl 20 µM

MGPAT-5-1A (SEQ ID NO: 306), 1 μ l 10 μ M 试剂盒引物 AP1 (SEQ ID NO: 307), 22.5 μ l 水和 25 μ l ExTaq 预混合 Taq 2X PCR 溶液 (TaKaRa)。采用以下条件进行 32 轮 PCR 扩增: 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 30 sec、55 $^{\circ}$ C 退火 30 sec 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 180 sec。72 $^{\circ}$ C 最终延伸 7 min, 随后在 4 $^{\circ}$ C 终止反应。

分别以 1:50 稀释每个 PCR 反应的产物, 用作第二轮 PCR 的模板。每个反应混合物含有 1 μ l 稀释的 PCR 产物之一作为模板, 0.5 μ l 20 μ M MGPAT-3N1 (SEQ ID NO: 308), 21 μ l 10 μ M 试剂盒引物 AP2 (SEQ ID NO: 309), 22.5 μ l 水和 25 μ l of ExTaq 预混合 Taq 2X PCR 溶液 (TaKaRa)。用与上文所述相同的热循环条件进行 32 轮 PCR 反应。

从第二轮 PCR 获得 DNA 片段。纯化该片段, 克隆到 pCR2.1-TOPO 中并测序。测序分析显示 1908 bp 片段 (SEQ ID NO: 102) 是高山被孢霉 GPAT 基因的 5' 末端。

类似地, 按照上文所述, 通过两轮基因组步移获得 966 bp 片段 (SEQ ID NO: 103), 不同的是采用引物 MGPAT-5N1 作为基因特异性引物进行第一轮 PCR, 用引物 MGPAT-5N2 作为基因特异性引物进行第二轮。也纯化该片段, 克隆到 pCR2.1-TOPO 中并测序。序列分析显示它含有 GPAT 基因的一部分; 但是, 该片段的长度不足以延伸基因的任何一个末端。与 3' cDNA 序列 (SEQ ID NO: 101) 的比较显示没有包括 ORF 的最后 171 bp。

组装来自高山被孢霉的全长 GPAT 序列

从上文描述的最初的部分 cDNA 片段 (SEQ ID NO: 99)、3' cDNA 片段 (SEQ ID NO: 101)、内部基因组片段 (SEQ ID NO: 103) 和 5' 基因组片段 (SEQ ID NO: 102) 组装含有完整 GPAT 基因 (包括在 GPAT 翻译起始 'ATG' 密码子上游延伸 1050 个碱基, 并且延伸超过 GPAT 终止密码子 22 个碱基的区域) 的 3935 bp 序列 (SEQ ID NO: 100) (图示于图 16)。该区域中包括了 2151 bp GPAT ORF。从 'ATG' 到终止密码子 'TAG' 的高山被孢霉 GPAT ORF 的完整核苷酸序列提供为 SEQ ID NO: 97 (相应于 SEQ ID NO: 100 的碱基 1050-2863, 排除 4 个内含子 (即内含子 1 [SEQ ID NO: 104], 相应于 SEQ ID NO: 100 的碱基 1195-1469; 内含子 2 [SEQ ID NO: 105], 相应于 SEQ ID

NO: 100 的碱基 1585-1839; 内含子 3[SEQ ID NO: 106], 相应于 SEQ ID NO: 100 的碱基 2795-2877 和内含子 4[SEQ ID NO: 107], 相应于 SEQ ID NO: 100 的碱基 2940-3038)。翻译的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 98) 显示出与许多真菌、植物和动物 GPATs 的同源性。

更具体地, 通过进行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1993)) 检索确定序列同一性。此处描述为 SEQ ID NO: 98 的氨基酸片段与推定的玉蜀黍黑粉菌的 GPAT (GenBank 获取号 EAK84237) 的蛋白序列具有 47% 同一性和 65% 相似性, 预期值是 $1e-152$; 此外, SEQ ID NO: 111 与烟曲霉的 GPAT (GenBank 获取号 EAL20089) 具有 47% 同一性和 62% 相似性, 预期值是 $1e-142$ 。

构建包含 FBAIN::MGPAT::PEX20-3' 嵌合基因的质粒 pMGPAT-17

如下克隆高山被孢霉 GPAT ORF。用引物 MGPAT-cDNA-5 和 MGPAT-cDNA-R (SEQ ID NOs: 310 和 311) 通过 PCR 从 cDNA 扩增 GPAT ORF。反应混合物包含 1 μ l cDNA、每种引物各 1 μ l、22 μ l 水和 25 μ l ExTaq 预混合 2X Taq PCR 溶液 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, 520-2193, Japan)。如下进行扩增: 在 94 $^{\circ}$ C 初步变性 150 sec, 随后 30 个下述循环: 在 94 $^{\circ}$ C 变性 30 sec, 在 55 $^{\circ}$ C 退火 30 sec, 在 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 sec。进行在 72 $^{\circ}$ C 10 min 的最终延伸循环, 然后在 4 $^{\circ}$ C 终止反应。从 PCR 反应得到约 2.2 kb DNA 片段。根据制造商的说明, 用 Qiagen PCR 纯化试剂盒纯化该片段。

用 BamHI 和 EcoRI 消化纯化的 PCR 产物, 通过凝胶琼脂糖电泳分离约 470 bp 的片段, 用 Qiagen 凝胶纯化试剂盒纯化。独立地, 也用 EcoRI 和 NotI 切割 PCR 产物, 按照上文分离和纯化 1.69 kb 片段。将两个片段连接到 BamHI 和 NotI 切割的 pZUF-MOD-1 载体 (SEQ ID NO: 140; 图 15B) 中, 使得基因处于自主复制的载体中解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子和 PEX20-3' 终止子区的控制下, 以便在解脂耶氏酵母中表达。通过微量制备 DNA 的限制分析证实正确的转化体, 得到的质粒命名为 “pMGPAT-17” (SEQ ID NO: 143; 图 15D)。

分析超量表达高山被孢霉 GPAT 的转化的解脂耶氏酵母中的脂质组成

根据一般方法, 分别用质粒 pMGPAT-17 和 pZUF-MOD-1 (上

文, 实施例 14) 转化解脂耶氏酵母菌株 Y 2107U1 (来自实施例 11)。使转化体在添加了氨基酸的合成 MM 中生长 2 天, 然后在 HGM 中生长 4 天。基于 GC 分析 (如一般方法中所述), 下文示出了两个含有 pZUF-MOD-1 的转化体和两个含有 pMGPAT-17 的转化体的脂肪酸谱。脂肪酸鉴定为 18:0、18:1 (油酸)、18:2 (LA)、GLA、DGLA、ARA、ETA 和 EPA; 每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 37

经过工程化而超量表达高山被孢霉 GPAT 的耶氏酵母菌株 Y2107U1 中的脂质组成

菌株	总脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2107U1+pZUF-MOD-1 #1	2.8	22.7	9.8	28.5	2.7	1.7	0.4	17.4
Y2107U1+pZUF-MOD-1 #2	2.5	23.4	10.3	28.7	2.5	1.5	0.3	16.8
Y2107U1+pMGPAT-17 #1	3.2	14.8	11.7	29.8	5.6	2.0	0.3	18.4
Y2107U1+pMGPAT-17 #2	2.9	16.3	11.7	28.3	6.1	1.8	0.4	16.9
Y2107U1+pMGPAT-17 #3	2.1	14.3	10.8	27.5	7.2	1.4	0.4	17.4
Y2107U1+pMGPAT-17 #4	2.7	15.7	11.5	29.1	6.3	1.7	0.4	17.3

如上文证明的, 从 pMGPAT-17 表达高山被孢霉 GPAT, 使“对照”菌株中的 DGLA 百分比从约 2.5%增加到约 6.5%。18:1 的水平从约 23%减少到约 16%。如果天然解脂耶氏酵母 GPAT 从表达 pMGPAT-17 的转化菌株中敲除, 可以预期 DGLA (或任何其它下游 PUFAs) 的进一步增加。

实施例 18

高山被孢霉脂肪酸延伸酶“ELO3”增加 PUFAs 百分比

本实施例描述经过转化而共表达高山被孢霉 C_{16/18} 脂肪酸延伸酶 (“ELO3”; SEQ ID NOs: 53 和 54) 的解脂耶氏酵母菌株 Y2031 (实施例 5) 中生产 35%以上的 C18 脂肪酸(18:0、18:1、18:2 和 GLA) 和 31%以下的 C16 脂肪酸。认为 ELO3 (其可以任选是密码子优化的,

以便增加表达)可以促使碳流入工程化的 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径,作为增加需要的 PUFA 即 ARA 的生产的手段。例如,包含该 $C_{16/18}$ 脂肪酸延伸酶的嵌合基因可以容易地导入例如菌株 Y2034、Y2047 或 Y2214 中。

高山被孢霉 $C_{16/18}$ 脂肪酸延伸酶的序列鉴定

从 9,984 种高山被孢霉 cDNA 序列(实施例 13)鉴定编码一部分高山被孢霉脂肪酸延伸酶的 cDNA 片段(SEQ ID NO: 55)。该 cDNA 片段与许多脂肪酸延伸酶具有显著同源性,从而鉴定为延伸酶。

根据同一性百分比、相似性百分比和预期值报道了概括与 SEQ ID NO: 55 具有最多相似性的序列的 BLAST 比较的结果。具体地,SEQ ID NO: 55 的翻译的氨基酸序列与来自白色假丝酵母 SC5314 的可能的脂肪酸延伸酶(GenBank 获取号 EAL04510.1,其中标注为与啤酒糖酵母 EUR4、FEN1 和 ELO1 相似的三种可能的脂肪酸延伸酶基因之一)的蛋白序列具有 32%同一性和 46%相似性,预期值是 $4e-13$ 。此外,SEQ ID NO: 55 与来自啤酒糖酵母的 ELO1(GenBank 获取号 NC_001142,X 染色体的碱基 67849-68781)具有 35%同一性和 53%相似性。啤酒糖酵母 ELO1 描述为中等链酰基延伸酶,其催化不饱和 C_{12} - C_{16} 脂肪酰基-CoAs 在羧基末端延伸为 C_{16} - C_{18} 脂肪酸。

基于上文报道的同源性,SEQ ID NO: 55 的解脂耶氏酵母基因产物在此命名为“延伸酶 3”或“ELO3”。

分析部分脂肪酸延伸酶 cDNA 序列(SEQ ID NO: 55)表明,5'和 3'末端都是不完整的。为了获得缺失的高山被孢霉 ELO3 的 3'区,采用了 Clontech Universal GenomeWalker™ 试剂盒(如实施例 17 的描述)。具体地,在第一轮 PCR 中采用了与上文所述相同的一组四种连接混合物,采用了相同的成分和条件,不同之处是将 MA Elong 3'1(SEQ ID NO: 312)和 AP1 用作引物(即代替引物 MGPAT-5-1A 和 AP1)。第二轮 PCR 采用 MA Elong 3'2(SEQ ID NO: 313)和 AP2 作为引物。从第二轮 PCR 获得了 1042 bp DNA 片段(SEQ ID NO: 56)。纯化该片段,克隆到 pCR2.1-TOPO 中并测序。序列分析表明该片段含有 ELO3 的 3'末端,包括基因的'TAA'终止密码子下游的约 640 bp。

也采用与用于 Clontech 3'-末端 RACE(上文)中相同的一组四

种连接混合物获得了高山被孢霉 ELO3 的 5'末端区。具体地,进行了采用与上文所述相同的成分和条件的第一轮 PCR,不同之处是将 MA Elong 5'1 (SEQ ID NO: 314, 在 5'末端嵌套)和 AP1 用作引物(即代替引物 MA Elong 3'1 和 AP1)。第二轮 PCR 采用 MA Elong 5'2(SEQ ID NO: 315, 在 5'末端嵌套)和 AP2 作为引物。获得了 2223 bp DNA 片段(SEQ ID NO: 57)。对其进行纯化,克隆到 pCR2.1-TOPO 中并测序。序列分析显示它含有 ELO3 基因的 5'区。

这样,通过组合最初的部分 cDNA 序列(SEQ ID NO: 55)和通过基因组步移获得的 5'和 3'序列(分别是 SEQ ID NOs: 57 和 56, 图示于图 17),获得了高山被孢霉 ELO3 (SEQ ID NO: 53)的完整 cDNA 序列。这产生了 3557 bp 的序列,在此鉴定为 SEQ ID NO: 58, 其包含 ELO3 的推定的'ATG'翻译起始密码子上游的 2091 bp; 828 bp ELO3 ORF (即 SEQ ID NO: 53, 相应于 SEQ ID NO: 58 的碱基 2092-2919); 和 ELO3 终止密码子的下游的 638 bp (相应于 SEQ ID NO: 58 的碱基 2920-3557)。

高山被孢霉 ELO3 的相应基因组序列比 SEQ ID NO: 58 中提供的 cDNA 片段长。具体地,发现在 ORF 的 318 bp 处含有 ELO3 基因的基因组 DNA 中存在 542 bp 内含子(SEQ ID NO: 59); 因此,在此提供于 SEQ ID NO: 60 中的基因组 DNA 片段是 4,099 bp (图 17)。

基于 BLAST 程序分析,翻译的 ELO3 蛋白序列(SEQ ID NO: 54)具有以下同源性:与来自白色假丝酵母 SC5314 的可能的脂肪酸延伸酶(GenBank 获取号 EAL04510.1)具有 37%同一性和 51%相似性,预期值是 $4e-43$ 。此外,翻译的 ELO3 与来自粗糙链孢霉的 XP_331368 (在此标注为“假定蛋白”)的蛋白序列具有 33%同一性和 44%相似性,预期值是 $3e-44$ 。

构建包含 FBAIN::ELO3::PEX16-3'嵌合基因的质粒 pZUF6S-E3WT

如下克隆高山被孢霉脂肪酸 ELO3 ORF。用引物 MA Elong 5' NcoI 3 和 MA Elong 3' NotI (SEQ ID NOs: 316 和 317)通过 PCR 从高山被孢霉 cDNA (实施例 13)扩增 ELO3 ORF。反应混合物包含 1 μ l cDNA、每种引物各 1 μ l、22 μ l 水和 25 μ l ExTaq 预混合 2X Taq PCR 溶液(TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, 520-2193, Japan)。

如下进行扩增：在 94℃ 初步变性 30 sec，随后 32 个下述循环：在 94℃ 变性 30 sec，在 55℃ 退火 30 sec，在 72℃ 延伸 120 sec。进行在 72℃ 10 min 的最终延伸循环，然后在 4℃ 终止反应。从 PCR 反应得到约 830 bp DNA 片段。根据制造商的说明，用 Qiagen (Valencia, CA) PCR 纯化试剂盒纯化该片段。将纯化的 PCR 产物分成两个等分物，用 NcoI 和 NspI 消化一个等分物，用 NspI 和 NotI 消化另一个等分物。通过三段连接，将约 270 bp NcoI-NspI 和约 560 bp NspI-NotI 片段克隆到 Nco I-Not I 切割的 pZF5T-PPC 载体 (图 11C; SEQ ID NO: 122) 中，使得基因处于自主复制的载体中解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子和 PEX16-3' 终止子区 (GenBank 获取号 U75433) 的控制下，以便在解脂耶氏酵母中表达。通过微量制备物分析证实正确的转化体，得到的质粒命名为 “pZF5T-PPC-E3” (SEQ ID NO: 144)。

用 ClaI 和 PacI 消化质粒 pZF5T-PPC-E3，用 Qiagen 凝胶提取试剂盒从琼脂糖凝胶纯化约 2.2 kB 的条带 (即 FBAIN::ELO 3::PEX16-3' 片段)。将该片段克隆到 ClaI-PacI 切割的 pZUF6S (图 18A; SEQ ID NO: 145) 中，其是一种自主复制的质粒，含有 FBAIN 启动子和 Pex20-3' 终止子 (即 FBAIN::D6S::Pex20 嵌合基因) 控制下的高山被孢霉 $\Delta 6$ 去饱和酶 ORF (“D6S”; GenBank 获取号 AF465281) 和 Ura3 基因。通过微量制备物分析证实正确的转化体，得到的质粒命名为 “pZUF6S-E3WT” (图 18B; SEQ ID NO: 146)。

分析超量表达高山被孢霉 ELO3 的转化的解脂耶氏酵母中的脂质组成

根据一般方法，用质粒 pZUF6S (对照，包含 FBAIN::D6S::Pex20 嵌合基因) 和质粒 pZUF6S-E3WT (包含 FBAIN::D6S::Pex20 嵌合基因和 FBAIN::ELO 3::PEX16 嵌合基因) 转化解脂耶氏酵母菌株 Y2031 (实施例 53)。使转化体在添加了氨基酸的合成 MM 中生长 2 天，然后在 HGM 中生长 4 天。基于 GC 分析 (如一般方法中所述)，下表 38 示出了 6 个含有 pZUF6S 的克隆 (1-6 号克隆，来自单次转化) 和 22 个含有 pZUF6S-E3WT 的克隆 (来自 4 次不同的转化 [即 3、5、6 和 7 号]) 的脂肪酸谱。脂肪酸鉴定为 16:0 (棕榈酸)、16:1 (棕榈油酸)、18:0、18:1 (油酸)、18:2 (LA) 和 GLA；每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 38

经过工程化而超量表达高山被孢霉 ELO3 的耶氏酵母菌株 Y2031 中的脂质组成

解脂耶氏酵母菌株 Y2031 转化体和/或克隆编号	脂肪酸 (占总脂肪酸的百分比)					
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA
pZUF6S #1 (对照)	9.0	23.2	1.2	38.2	19.8	6.9
pZUF6S #2 (对照)	10.1	23.4	1.4	39.0	17.5	7.1
pZUF6S #3 (对照)	9.7	22.7	1.4	39.0	20.2	7.0
pZUF6S #4 (对照)	8.5	24.1	0.0	40.8	19.8	6.9
pZUF6S #5 (对照)	9.8	22.4	1.7	39.1	20.2	6.8
pZUF6S #6 (对照)	9.1	22.7	1.9	39.9	19.7	6.6
pZUF6S-E3WT #3-1	8.9	17.3	4.1	36.5	21.6	11.6
pZUF6S-E3WT #3-2	8.8	17.8	3.7	36.9	21.3	11.5
pZUF6S-E3WT #3-3	8.9	18.3	3.5	33.8	35.4	0.0
pZUF6S-E3WT #3-6	8.5	19.9	4.4	37.8	17.1	12.3
pZUF6S-E3WT #5-1	8.6	17.6	4.0	37.6	21.1	11.1
pZUF6S-E3WT #5-2	8.8	17.1	3.9	37.6	21.3	11.2
pZUF6S-E3WT #5-3	9.1	17.1	3.5	37.6	21.5	11.1
pZUF6S-E3WT #5-4	8.8	17.9	4.3	38.0	19.3	11.7
pZUF6S-E3WT #5-5	9.2	16.1	4.4	37.0	21.6	11.7
pZUF6S-E3WT #5-6	8.7	21.5	4.2	30.3	35.3	0.0
pZUF6S-E3WT #6-1	9.4	16.9	4.6	36.6	21.5	11.0
pZUF6S-E3WT #6-2	9.8	16.2	4.1	36.5	21.9	11.6
pZUF6S-E3WT #6-3	9.4	17.0	4.4	36.2	21.8	11.3
pZUF6S-E3WT #6-4	8.3	16.6	4.2	36.9	21.9	12.2
pZUF6S-E3WT #6-5	8.8	18.5	5.5	36.0	17.8	13.4
pZUF6S-E3WT #6-6	8.7	19.5	5.2	35.4	18.1	13.2
pZUF6S-E3WT #7-1	0.0	30.6	0.0	35.5	18.2	15.8
pZUF6S-E3WT #7-2	8.0	17.7	4.0	37.7	20.9	11.7
pZUF6S-E3WT #7-3	0.0	26.7	4.2	36.0	21.4	11.7
pZUF6S-E3WT #7-4	0.0	28.1	4.3	37.0	16.9	13.6
pZUF6S-E3WT #7-5	8.3	17.0	4.7	36.7	21.2	12.1
pZUF6S-E3WT #7-6	8.0	18.0	4.8	36.3	20.8	12.1

一些样品（以粗体和斜体标出）偏离预期读数。具体地，Y2031+pZUF6S-E3WT #3-3 和 Y2031+pZUF6S-E3WT #5-6 都不生产 GLA。类似地，Y2031+pZUF6S-E3WT #7-1、#7-3 和#7-4 具有 GC 误差，其中 GC 读出的 16:0 和 16:1 峰是单峰。由于这些变异结果，表 39 报道了对照和表达 ELO3 的转化菌株中的平均脂质。具体地，表 39 示出了表 38 中的脂肪酸谱的平均值，当计算这些平均值时，没有包括表 38 中用粗体和斜体表示的有错误的行。“总 C16”表示 16:0 和 16:1 的平均值的和，而“总 C18”表示 18:0、18:1、18:2 和 GLA 的平均值的和。

表 39

经过工程化而超量表达高山被孢霉 ELO3 的耶氏酵母菌株 Y2031 中的脂质组成

解脂耶氏酵母菌株 Y2031 转化体	脂肪酸（占总脂肪酸的百分比）						总	总
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA	C16	C18
pZUF6S（对照）	9.4	23.1	1.3	39.3	19.5	6.9	32.4	67.1
pZUF6S-E3WT #3	8.7	18.3	4.1	37.1	20.0	11.8	27.0	73.0
pZUF6S-E3WT #5	8.9	17.2	4.0	37.6	21.0	11.4	26.1	73.9
pZUF6S-E3WT #6	9.1	17.5	4.6	36.3	20.5	12.1	26.5	73.5
pZUF6S-E3WT #7	8.1	17.6	4.5	36.9	21.0	12.0	25.6	74.4

基于上面报道的数据，当与解脂耶氏酵母菌株 Y2031 中的高山被孢霉 Δ6 去饱和酶共表达时，相对于仅仅超量表达高山被孢霉 Δ6 去饱和酶的 Y2031 的对照菌株，高山被孢霉 ELO3 的超量表达导致 C18 的百分比增加，C16 的百分比减少。这表明高山被孢霉 ELO3 实际上是 C_{16/18} 脂肪酸延伸酶。

实施例 19

耶氏酵母 C_{16/18} 脂肪酸延伸酶 “YE2” 增加 PUFAs 百分比

本实施例描述经过转化而共表达解脂耶氏酵母 C_{16/18} 脂肪酸延伸酶（“YE2”；SEQ ID NO: 62）的解脂耶氏酵母菌株 Y2031（实施

例 5) 中 GLA 生物合成和积累的增加。认为 YE2 延伸酶可以促使碳流入工程化的 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径, 作为增加需要的 PUFA 即 ARA 的生产的手段。例如, 包含该 $C_{16/18}$ 脂肪酸延伸酶的嵌合基因可以容易地导入例如菌株 Y2034、Y2047 或 Y2214 中。

解脂耶氏酵母 $C_{16/18}$ 脂肪酸延伸酶的序列鉴定

采用大鼠 Elo2 $C_{16/18}$ 脂肪酸延伸酶蛋白序列 (GenBank 获取号 AB071986; SEQ ID NO: 51) 作为询问序列, 通过序列比较鉴定了来自解脂耶氏酵母的新的脂肪酸延伸酶候选物。具体地, 用这种 rElo2 询问序列检索 GenBank 和 “Yeast project Genolevures” 的公共解脂耶氏酵母蛋白数据库 (Center for Bioinformatics, LaBRI, Talence Cedex, France) (也参见 Dujon, B. et al., Nature 430 (6995): 35-44 (2004))。这导致鉴定了标注为 “未命名蛋白产物” 的同源序列, 即 GenBank 获取号 CAG77901 (SEQ ID NOs: 61 和 62)。该基因命名为 YE2。

用 BLAST 算法 (Altschul, S. F., et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)) 比较耶氏酵母 YE2 氨基酸序列与公共数据库, 发现最相似的已知氨基酸序列是来自白色假丝酵母 SC5314 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 63, GenBank 获取号 EAL04510), 其标注为可能的脂肪酸延伸酶。这种蛋白具有约 40% 同一性, 评分为 236, E 值为 $7e-61$ 。

分离耶氏酵母 YE2 基因

采用耶氏酵母基因组 DNA 作为模板, 寡核苷酸 YL597 和 YL598 (SEQ ID NOs: 318 和 319) 作为引物, 通过 PCR 扩增 YE2 基因的编码区。按照一般方法的描述, 在 50 μ l 总体积中进行 PCR 反应。热循环仪条件设定为 35 个循环的 95 $^{\circ}$ C 1 min、56 $^{\circ}$ C 30 sec、72 $^{\circ}$ C 1 min, 然后 72 $^{\circ}$ C 下最终延伸 10 min。纯化 YE2 编码区的 PCR 产物, 用 NcoI/NotI 消化, 然后与 NcoI/NotI 消化的 pZKUGPYE1-N (下文实施例 20; 也参见图 18C, SEQ ID NO: 147) 连接在一起, 得到 pZKUGPYE2 (图 18D, SEQ ID NO: 148)。在 “ATG” 翻译起始密码子周围加入 NcoI 位点, 使 YE2 的第二个氨基酸从 L 改变为 V。

按照方向将 pZKUGPYE2 (含有 GPAT 启动子和 YE2 编码区)

的 ClaI/NotI 片段和含有 Aco 终止子的 NotI/PacI 片段（通过用引物 YL325 和 YL326[SEQ ID NOs: 371 和 372]对 ACO 3'终止子进行 PCR 扩增，然后用 NotI/PacI 消化而制备）与 ClaI/PacI 消化的载体 pZUF6S 连接在一起，得到 pZUF6YE2。随后将 pZKUT16 的 ClaI/NcoI 片段（含有 TEF 启动子）和 pZUF6YE2 的 NcoI/PacI 片段（含有 YE2 的编码区和 Aco 终止子）按照方向与 ClaI/PacI 消化的载体 pZUF6S 连接在一起，得到 pZUF6TYE2（SEQ ID NO: 149）。

分析超量表达 YE2 的转化的解脂耶氏酵母中的脂质组成

分别用质粒 pZUF6S（图 18A，SEQ ID NO: 145）和 pZUF6TYE2（SEQ ID NO: 149）转化耶氏酵母菌株 Y2031。这两种质粒的成分描述于表 40 和 41。

表 40
质粒 pZUF6S（SEQ ID NO: 145）的说明

SEQ ID NO: 145 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
EcoRI/ClaI (3114-4510)	耶氏酵母自主复制序列 18（ARS18；GenBank 获取号 M91600）
SalI/PacI (6022-4530)	耶氏酵母 Ura3 基因（GenBank 获取号 AJ306421）
EcoRI/BsiWI (6063-318)	FBAIN:: <u>Δ</u> 6S::Pex20，包含： • FBAIN: FBAIN 启动子（SEQ ID NO: 162） • Δ6S: 密码子优化的Δ6 去饱和酶基因（SEQ ID NO: 3），来源于高山被孢霉（GenBank 获取号 AF465281） • Pex20: 来自耶氏酵母 Pex20 基因（GenBank 获取号 AF054613）的 Pex20 终止子序列

表 41

质粒 pZUF6TYE2 (SEQ ID NO: 149) 的说明

SEQ ID NO: 149 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
EcoRI/ClaI (7461-8857)	耶氏酵母自主复制序列 18 (ARS18; GenBank 获取号 M91600)
Sall/PacI (1907-415)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421)
EcoRI/BsiWI (1948-4665)	FBAIN:: Δ 6S::Pex20: 如对 pZUF6 的描述 (上文)
ClaI/PacI (8857-415)	TEF::YE2::Aco, 包含: • TEF: TEF 启动子 (GenBank 获取号 AF054508) • YE2: 耶氏酵母 YE2 基因 (SEQ ID NO: 61; GenBank 获取号 CAG77901) 的编码区 • Aco: 耶氏酵母 Aco3 基因 (GenBank 获取号 AJ001301) 的 Aco3 终止子序列

根据一般方法, 用质粒 pZUF6S (对照) 和质粒 pZUF6TYE2 转化解脂耶氏酵母菌株 2031 (实施例 5)。转化体在液体 MM 中生长 2 天。基于 GC 分析 (如一般方法的描述), 8 个均含有 pZUF6S 或 pZUF6YE2 的菌落的脂肪酸谱示于下表 42。脂肪酸鉴定为 16:0 (棕榈酸)、16:1 (棕榈油酸)、18:0、18:1 (油酸)、18:2 (LA) 和 GLA; 每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 42

用 pZUF6S 和 pZUF6TYE2 转化的耶氏酵母菌株 Y2031 中的脂肪酸组成的比较

解脂耶氏酵母菌株 Y2031 转化体	脂肪酸 (占总脂肪酸的百分比)					
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA
pZUF6S #1 (对照)	15.4	13.8	2.5	34.1	16.8	8.3
pZUF6S #2 (对照)	15.2	12.8	3.0	36.5	16.4	8.3
pZUF6S #3 (对照)	15.1	12.2	3.2	36.5	17.1	8.5
pZUF6S #4 (对照)	15.2	12.8	3.1	36.3	16.6	8.4
pZUF6S #5 (对照)	14.9	10.9	3.6	37.4	18.0	8.7
pZUF6S #6 (对照)	14.8	10.1	4.2	37.6	18.7	8.6
pZUF6S #7 (对照)	14.7	11.9	3.0	36.0	17.8	9.1
pZUF6S #8 (对照)	14.9	12.6	2.9	35.9	17.3	8.8
平均值	15.0	12.1	3.2	36.3	17.3	8.6
pZUF6TYE2 #1	13.1	8.4	4.4	42.4	16.8	9.7
pZUF6TYE2 #2	13.1	7.6	5.3	40.8	18.6	9.8
pZUF6TYE2 #3	13.5	8.1	4.6	39.2	19.0	10.6
pZUF6TYE2 #4	13.4	7.4	5.7	39.9	18.7	9.8
pZUF6TYE2 #5	13.4	8.4	5.5	45.2	14.3	7.6
pZUF6TYE2 #6	13.4	7.4	5.5	39.3	19.2	10.5
pZUF6TYE2 #7	13.4	8.6	4.4	40.6	17.9	9.9
pZUF6TYE2 #8	13.2	7.5	5.4	41.2	18.0	9.7
平均值	13.3	8.0	5.0	41.1	17.8	9.7

GC 分析显示在具有 pZUF6S 的 Y2031 转化体中生产了占总脂质的约 27.1% 的 C16 (C16:0 和 C16:1) 和 62.2% 的 C18 (C18:0、C18:1、C18:2 和 GLA); 在具有 pZUF6TYE2 的 Y2031 转化体中生产约 21.3% 的 C16 和 73.6% 的 C18。因此, 在 pZUF6TYE2 转化体中, C16 的总量减少了约 21.4%, C18 的总量增加了约 18% (与具有 pZUF6S 的转

化体相比)。这些数据证明了 TE2 作为 $C_{16/18}$ 脂肪酸延伸酶起作用, 在耶氏酵母中生产 C18 脂肪酸。此外, 相对于在 pZUF6S 转化体中生产的 GLA, 在 pZUF6TYE2 转化体中生产多大约 12.8% 的 GLA。这些数据表明 YE2 延伸酶能够促进碳流入工程化 PUFA 途径, 生产更多的终产物 (即 GLA)。

实施例 20

耶氏酵母 $C_{14/16}$ 脂肪酸延伸酶 “YE1” 增加 PUFAs 百分比

本实施例描述经过转化而共表达解脂耶氏酵母 $C_{14/16}$ 脂肪酸延伸酶 (“YE1”; SEQ ID NO: 65) 的解脂耶氏酵母菌株 Y2031 (实施例 5) 中 GLA 生物合成和积累的增加。认为 YE1 延伸酶可以促使碳流入工程化的 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径, 作为增加需要的 PUFA 即 ARA 的生产的手段。具体地, 包含该 $C_{14/16}$ 脂肪酸延伸酶的嵌合基因可以容易地导入例如菌株 Y2034、Y2047 或 Y2214 中。

解脂耶氏酵母 $C_{14/16}$ 脂肪酸延伸酶的序列鉴定

采用大鼠 Elo2 $C_{16/18}$ 脂肪酸延伸酶蛋白序列 (GenBank 获取号 AB071986; SEQ ID NO: 51) 作为询问序列, 按照类似于实施例 19 的方法鉴定了来自解脂耶氏酵母的新的脂肪酸延伸酶候选物。这导致鉴定了标注为“未命名蛋白产物”的同源序列, 即 GenBank 获取号 CAG83378 (SEQ ID NOs: 64 和 65)。该基因命名为 “YE1”。

用 BLAST 算法 (Altschul, S. F., et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)) 比较耶氏酵母 YE1 氨基酸序列与公共数据库, 发现最相似的已知序列是来自粗糙链孢霉的 FEN1 (GenBank 获取号 CAD70918; SEQ ID NO: 66), 它是一种与 YE1 具有约 60% 同一性的可能的脂肪酸延伸酶。

YE1 基因的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 64) 具有内部 NcoI 位点。为了在 YE1 基因的 “ATG” 翻译起始密码子周围掺入耶氏酵母翻译基序, 采用了两步策略对耶氏酵母的完整 YE1 基因进行 PCR。具体地, 采用耶氏酵母基因组 DNA 作为模板, 采用寡核苷酸 YL567 和 YL568 (SEQ ID NOs: 320 和 321) 作为引物, 通过 PCR 扩增 YE1 的前一半, 而用寡核苷酸 YL569 和 YL570 (SEQ ID NOs: 322 和 323)

作为引物类似地扩增 YE1 基因的后一半。按照一般方法的描述, 在 50 μ l 总体积中进行 PCR 反应。热循环仪条件设定为 35 个循环的 95 $^{\circ}$ C 1 min、56 $^{\circ}$ C 30 sec、72 $^{\circ}$ C 1 min, 然后 72 $^{\circ}$ C 下最终延伸 10 min。纯化相应于 YE1 的 5'部分的 PCR 产物, 然后用 NcoI 和 SacI 消化, 得到 YE1-1 片段, 同时纯化 YE1 的 3'部分的 PCR 产物, 用 SacI 和 NotI 消化, 得到 YE1-2 片段。直接将 YE1-1 和 YE1-2 片段连接于 NcoI/NotI 消化的 pZKUGPE1S(上文, 实施例 11), 得到 pZKUGPYE1(图 19A, SEQ ID NO: 150)。然后用 pZKUGPYE1 作为模板, 寡核苷酸 YL571 和 YL572 (SEQ ID NOs: 324 和 325) 作为引物, 通过定点诱变对 YE1 的内部 NcoI 位点进行突变, 得到 pZKUGPYE1-N (SEQ ID NO: 147)。序列分析显示该突变没有改变 YE1 的氨基酸序列。在 ATG 翻译起始密码子周围加入 NcoI 位点, 使 YE1 的第二个氨基酸从 S 改变为 A。

将 pZF5T-PPC 的 ClaI/NcoI 片段 (含有 FBAIN 启动子) 和 pZKUGPYE1-N 的 NcoI/PacI 片段 (含有 YE1 的编码区和 Aco 终止子) 按照方向与 ClaI/PacI 消化的载体 pZUF6S 连接在一起, 得到 pZUF6FYE1 (SEQ ID NO: 151)。

分析超量表达 YE1 的转化的解脂耶氏酵母中的脂质组成

将包含解脂耶氏酵母 YE1 ORF 的嵌合基因克隆到质粒 pZUF6 中, 使得可以通过转化的耶氏酵母菌株中脂肪酸组成的 GC 分析确定基因超量表达的作用。具体地, 对照质粒 pZUF6S (图 18A; SEQ ID NO: 145; 包含 FBAIN::D6S::Pex20 嵌合基因) 的成分描述于实施例 19; 而 pZUF6FYE1 (图 19B; SEQ ID NO: 151, 包含 FBAIN::D6S::Pex20 嵌合基因和 FBAIN::YE1::Aco 嵌合基因) 的成分描述于下表 43。

表 43

质粒 pZUF6FYE1 (SEQ ID NO: 151) 的说明

SEQ ID NO: 151 内的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因成分的说明
EcoRI/ClaI (7047-8445)	耶氏酵母自主复制序列 18 (ARS18; GenBank 获取号 M91600)
Sall/PacI (1493-1)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 获取号 AJ306421)
EcoRI/BsiWI (1534-4251)	FBAIN:: Δ 6S::Pex20: 如对 pZUF6 的描述 (上文实施例 25)
ClaI/PacI (8443-1)	FBAIN::YE1::Aco, 包含: • FBAIN: FBAIN 启动子 (SEQ ID NO: 162) • YE1: 耶氏酵母 YE1 基因 (SEQ ID NO: 64; GenBank 获取号 CAG83378) 的编码区 • Aco: 来自耶氏酵母 Aco3 基因的 (GenBank 获取号 AJ001301) Aco3 终止子

转化后, 使转化体在添加了氨基酸的合成 MM 中生长 2 天, 然后在 HGM 中生长 4 天。基于 GC 分析 (如一般方法中所述), 下表 55 示出了 6 个含有 pZUF6S 的克隆和 5 个含有 pZUF6FYE1 的克隆的脂肪酸谱。脂肪酸鉴定为 16:0 (棕榈酸)、16:1 (棕榈油酸)、18:0、18:1 (油酸)、18:2 (LA) 和 GLA; 每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 44

用 pZUF6S 和 pZUF6FYE1 转化的耶氏酵母菌株 Y2031 中的脂肪酸组成的比较

转化体	脂肪酸（占总脂肪酸的百分比）				
	16:0	16:1	18:1	18:2	GLA
pZUF6S #1（对照）	12.9	18.2	29.6	23.5	10.7
pZUF6S #2（对照）	12.6	18.6	29.6	23.8	10.3
pZUF6S #3（对照）	13.0	17.8	29.8	23.9	10.6
pZUF6S #4（对照）	13.1	18.9	30.1	22.3	10.3
pZUF6S #5（对照）	13.0	17.8	29.6	23.4	10.9
pZUF6S #6（对照）	12.0	18.7	30.4	23.2	10.4
平均值	12.8	18.3	29.9	23.4	10.5
pZUF6FYE1 #1	17.4	21.9	20.4	19.2	16.9
pZUF6FYE1 #2	16.7	22.8	21.1	19.1	16.1
pZUF6FYE1 #3	19.8	20.7	22.8	17.0	15.8
pZUF6FYE1 #4	16.8	22.4	23.7	16.1	16.8
pZUF6FYE1 #5	17.7	21.6	21.2	18.0	17.2
平均值	17.7	21.9	21.9	17.9	16.5

GC 分析测量出在具有 pZUF6S 的 Y2031 转化体中生产占总脂质的约 31.1% 的 C16 (C16:0+C16:1)，而在具有 pZUF6FYE1 的 Y2031 转化体中生产约 39.6% 的 C16。与具有 pZUF6S 的转化体相比，在 pZUF6FYE1 转化体中的 C16 总量增加约 26.7%。因此，这些数据证明 YE1 作为 C_{14/16} 脂肪酸延伸酶起作用，在耶氏酵母中生产 C16 脂肪酸。此外，在 pZUF6FYE1 转化体中生产的 GLA 比在 pZUF6S 转化体中多 57%，表明 YE1 延伸酶能够促使碳流入工程化的途径，以生产更多的终产物（即 GLA）。

实施例 21

解脂耶氏酵母 CPT1 超量表达增加 PUFAs 的百分比

本实施例描述经过转化而超量表达解脂耶氏酵母 CPT1 cDNA (SEQ ID NO: 109) 的解脂耶氏酵母菌株 Y2067U (实施例 10) 中 EPA 生物合成和积累的增加。也增加了导致 EPA 合成的 PUFAs。认为如果类似地共表达解脂耶氏酵母 CPT1 (如在菌株 Y2034、Y2047 或 Y2214 中), 则经过工程化以通过 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径生产 ARA 的解脂耶氏酵母宿主菌株能够证明 ARA 生物合成和积累的增加。

用以下程序制备解脂耶氏酵母菌株 ATCC #20326 cDNA。在 30 °C, 使细胞在 200 mL YPD 培养基 (2% 细菌用酵母提取物, 3% 细菌用肽胨, 2% 葡萄糖) 中生长 1 天, 然后通过 Beckman GH3.8 转子中 3750 rpm 离心 10 min 而沉淀细胞, 并用 HGM 洗涤两次。将洗涤的细胞重悬于 200 mL HGM 中, 30 °C 下再生长 4 hrs。然后通过 4 x 50 mL 试管中 3750 rpm 离心 10 min, 收获细胞。

用 Qiagen Rneasy 总 RNA Midi 试剂盒分离总 RNA。为了破碎细胞, 将收获的细胞重悬于 4X600 μ l 试剂盒缓冲液 RLT (按照制造商的规定, 补加了 β -巯基乙醇) 中, 与等体积的 0.5 mm 玻璃珠在 4 个 2 mL 螺帽试管中混合。用 Biospec 微珠搅拌机在匀浆设置下将细胞破碎 2 min。加入额外的 4x600 μ l 缓冲液 RLT。通过离心除去玻璃珠和细胞碎屑, 根据制造商的方案用上清液分离总 RNA。

按照制造商的方案, 用 Qiagen Oligotex mRNA 纯化试剂盒从上面的总 RNA 样品分离聚 A (+) RNA。用相同的试剂盒对分离的聚 A (+) RNA 再进行一轮纯化, 以确保 mRNA 样品的纯度。最终的纯化的聚 (A) +RNA 的浓度为 30.4 ng/ μ l。

按照实施例 13 的描述用 BD-Clontech 规定的 LD-PCR 法和 0.1 μ g 聚 A (+) RNA 样品制备 cDNA, 不同之处是用于第一链 cDNA 合成的 PCR 热循环仪条件设定为 95 °C 20 sec, 然后是 20 个循环的 95 °C 5 sec 和 68 °C 6 min。通过琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭对 PCR 产物进行定量。

如下克隆解脂耶氏酵母 CPT1 cDNA。用引物 CPT1-5'-NcoI 和 CPT1-3'-NotI (SEQ ID NOs: 326 和 327) 通过 PCR 从解脂耶氏酵母的 cDNA 扩增解脂耶氏酵母 ORF。反应混合物含有 0.5 μ l cDNA、每种引物各 0.5 μ l、11 μ l 水和 12.5 μ l ExTaq 预混合 2X Taq PCR 溶

液 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, 520-2193, Japan)。按照如下方法进行扩增: 最初在 94℃ 变性 300 sec, 然后是 30 个循环的 94℃ 下变性 30 sec、55℃ 下退火 30 sec 和 72℃ 下延伸 60 sec。72℃ 进行最终的延伸循环 10 分钟, 然后在 4℃ 终止反应。从 PCR 反应获得了约 1190 bp DNA 片段。根据制造商的方案, 用 Qiagen 的 PCR 纯化试剂盒对其进行纯化。用 NcoI 和 NotI 消化纯化的 PCR 产物, 克隆到 Nco I-Not I 切割的 pZUF17 载体 (SEQ ID NO: 118; 图 8B) 中, 使得基因处于解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子和 PEX20-3' 终止子区控制下。通过微量制备物分析证实正确的转化体, 得到的质粒命名为 “pYCPT1-17” (SEQ ID NO: 152)。

为了将嵌合 FBAIN::CPT1::PEX20 基因整合到解脂耶氏酵母的基因组中, 通过用 NcoI 和 NotI 消化 pYCPT1-17, 并且分离含有 CPT1 ORF 的约 1190 bp 片段而建立质粒 pYCPT1-ZP2I7。然后将该片段克隆到 NcoI 和 NotI 消化的 pZP2I7+Ura (SEQ ID NO: 153) 中。如图 19C 所示, 质粒 pZP2I7+Ura 是一种解脂耶氏酵母整合质粒, 包含嵌合的 TEF::合成 $\Delta 17$ 去饱和酶 (针对解脂耶氏酵母进行了密码子优化)::Pex20-3' 基因和用作选择标记的 Ura3 基因。通过微量制备物分析证实正确的转化体, 得到的质粒命名为 “pYCPT1-ZP2I7” (SEQ ID NO: 154)。

根据一般方法, 分别用 BssHII/BbuI 消化的 pYCPT1-ZP2I7 和 pZUF-MOD-1 (上文实施例 14) 转化解脂耶氏酵母菌株 Y2067U (来自实施例 10)。使转化体在添加了氨基酸的合成 MM 中生长 2 天, 然后在 HGM 中生长 4 天。基于 GC 分析 (如一般方法中所述), 下表示出了两个含有 pZUF-MOD-1 的转化体和基因组中整合了 pYCPT1-ZP2I7 的 4 个转化体的脂肪酸谱。脂肪酸鉴定为 18:0、18:1 (油酸)、18:2 (LA)、GLA、DGLA、ARA、ETA 和 EPA; 每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 45

经过工程化而超量表达解脂耶氏酵母 CPT1 的耶氏酵母菌株 Y2067U 中的脂质组成

菌株	总脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.3	6.9	12.0	23.1	5.7	1.1	3.8	13.2
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	1.4	6.8	12.1	22.0	5.8	1.1	3.8	13.5
Y2067U+pYCPT1-ZP2I7 #1	0.6	8.0	8.2	27.4	7.1	1.6	4.1	15.7
Y2067U+pYCPT1-ZP2I7 #2	0.6	8.1	8.2	27.2	7.0	1.6	4.0	15.7
Y2067U+pYCPT1-ZP2I7 #3	1.0	7.9	8.0	24.7	6.1	1.6	3.2	15.5
Y2067U+pYCPT1-ZP2I7 #4	0.6	7.1	8.6	25.5	6.9	1.8	4.0	16.0

如上所示，通过基因组整合，强 FBAIN 启动子控制下的解脂耶氏酵母 CPT1 的表达使 EPA 百分比从“对照”菌株中的 13.4%增加到 15.7-16%。此外，也增加了 GLA、DGLA 和 ARA 水平。

实施例 22

啤酒糖酵母 ISC1 增加 PUFAs 百分比

本实施例描述经过转化而共表达啤酒糖酵母 ISC1 基因 (SEQ ID NO: 111) 的解脂耶氏酵母菌株 M4 (实施例 4) 中 EPA 生物合成和积累的增加。认为如果类似地共表达啤酒糖酵母 ISC1 (如在菌株 Y2034、Y2047 或 Y2214 中)，则经过工程化以通过 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径生产 EPA 的解脂耶氏酵母宿主菌株能够证明 EPA 生物合成和积累的增加。

如下将啤酒糖酵母 ISC1 ORF 克隆到质粒 pZP2I7+Ura 中。首先，用来自啤酒糖酵母菌株 S288C (Promega, Madison, WI) 的基因组 DNA 以及引物对 Isc1F 和 Isc1R (SEQ ID NOs: 328 和 329) PCR 扩增 ORF。引物 Isc1F 将扩增的 ORF 中的 ISC1 的野生型 5'序列从 'ATGTACAA' 修饰为 'ATGGACAA'，因为必需掺入 NcoI 位点从而使 ISC1 符合读码框。按照如下方法进行扩增：最初在 94℃ 变性 120 sec，然后是 35 个循环的 94℃ 下变性 30 sec、50℃ 下退火 30 sec 和 68℃ 下

延伸 120 sec。68℃进行最终的延伸循环 10 分钟，然后在 4℃终止反应。从 ISC1 的 PCR 反应获得了 1455 bp DNA 片段，用 1%琼脂糖凝胶（120 V，30 min）和来自 Invitrogen（Carlsbad, CA）的 1 kB DNA 标准物通过电泳证实了 PCR 产物大小。

根据制造商的说明，用来自 Zymo Research Corporation（Orange, CA）的 DNA Clean & Concentrator-5 试剂盒纯化 DNA。然后将 ISC1 片段分别克隆到 NcoI 和 NotI 消化的 pZP217+Ura（SEQ ID NO: 153；图 19C）中。通过凝胶电泳证实正确的转化体，得到的质粒命名为“pTEF::ISC1”（SEQ ID NO: 155）。因此，该质粒包含 DNA 盒，该 DNA 盒包含 3'-POX2、URA3、TEF::ISC1::Pex20 和 POX2 启动子区。

如下制备“对照”载体。首先，用来自啤酒糖酵母菌株 S288C 的基因组 DNA 和引物对 Pcl1F 和 Pcl1R（SEQ ID NOs: 330 和 331）PCR 扩增啤酒糖酵母 pcl1 ORF（编码参与进入有丝分裂细胞周期和调节形态发生的蛋白）。按照上文的描述进行扩增。从 pcl1 的 PCR 反应获得 861 bp DNA 片段（通过上文描述的电泳证实）。用 DNA Clean & Concentrator-5 试剂盒纯化 DNA，然后用 NcoI/NotI 消化。然后将片段克隆到相似消化的 pZP217+Ura 中。通过凝胶电泳证实正确的转化体，得到的质粒命名为“pTEF::pcl1”。然后用 HincII 消化质粒 pTEF::pcl1，除去 pcl1 ORF。重新连接得到的质粒，使得用 AscI/SphI 消化后得到包含 3'-POX2、URA3、TEF::Pex20 和 POX2 启动子区的线性 DNA 盒。

分别用 AscI/SphI 消化的 pTEF::ISC1 和“对照”转化感受态解脂耶氏酵母菌株 M4 细胞（来自实施例 4）（其中每种质粒各 5 μg 进行了消化）。用 Frozen EZ Yeast Transformation II 试剂盒（Zymo Research）完成转化，在包含不含氨基酸的 YNB（6.7 g/L；Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD[目录号 291940]）、葡萄糖（20 g/L）和琼脂（20 g/L）的平板上选择转化体。获得了几百个转化的菌落。采用来自 ISC1 的 5 个独立转化体的基因组 DNA，通过 PCR 证实了每个 DNA 盒整合到解脂耶氏酵母 POX2 基因座中。

使转化体在不含氨基酸、含有 2%葡萄糖的 YNB 中生长。通过离心收集细胞，重悬于包含 100 g/L 右旋糖、2 g/L MgSO₄ 和 50 mM pH 6.5

的磷酸缓冲液的培养基中，再生长 5 天。通过离心收集来自 0.75 mL 每种培养物的细胞，分析它们的脂肪酸组成。基于 GC 分析（如一般方法中所述），下文示出了 3 个含有“对照”载体的转化体和 5 个含有 pTEF::ISC1 的转化体的脂肪酸谱。脂肪酸鉴定为 16:0、16:1、18:0、18:1（油酸）、18:2（LA）、GLA、DGLA、ARA、ETA 和 EPA；每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 46

经过工程化而超量表达啤酒糖酵母 ISC1 的耶氏酵母菌株 M4 中的脂质组成

菌株	总脂肪酸									
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
M4+ “对照”	14.7	7.2	2.1	13.5	8.7	21.8	8.9	0.9	4.1	9.3
M4+pTEF::ISC1	13.5	8.5	1.7	15.6	8.1	21.3	7.5	0.7	3.9	10.7

啤酒糖酵母 ISC1 基因的表达使 EPA 的百分比从“对照”菌株中的 9.3% 增加到 10.7%（“M4+pTEF::ISC1”），代表增加了 14.5%。

实施例 23

制备解脂耶氏酵母酰基转移酶敲除体

本实施例描述了建立解脂耶氏酵母的单、双和三敲除菌株，所述菌株中破坏了 PDAT、DGAT2、DGAT1、PDAT 和 DGAT2、PDAT 和 DGAT1、DGAT1 和 DGAT2，或 PDAT、DGAT1 和 DGAT2 基因。证实了每个敲除菌株中基因的破坏，通过实施例 24 中的总脂质的 GC 分析确定了每个破坏对脂肪酸含量和组成的影响。

靶向破坏解脂耶氏酵母 DGAT2 基因

通过用称作质粒 pY21DGAT2 的靶向盒对内源 DGAT2 基因的同源重组-介导的替换，进行解脂耶氏酵母 ATCC #90812 中的 DGAT2 基因的靶向破坏。pY21DGAT2 源自质粒 pY20（图 19D；SEQ ID NO: 156）。具体地，通过将 570 bp *Hind III/Eco RI* 片段插入类似地线性化的 pY20，制备 pY21DGAT2。570 bp DNA 片段含有（按 5'至 3'方

向)：3'同源序列位置+1090 至+1464 (SEQ ID NO: 89 的编码序列 (ORF))，*Bgl II* 限制位点和 5'同源序列位置+906 至+1089 (SEQ ID NO: 89 所示的编码序列 (ORF))。分别使用两对 PCR 引物 P95 和 P96 (SEQ ID NO: 332 和 333) 和 P97 和 P98 (SEQ ID NO: 334 和 335)，通过 PCR 扩增制备片段。

通过 *Bgl II* 限制消化，将 pY21DGAT2 线性化，并转化进对数中期解脂耶氏酵母 ATCC #90812 细胞，如一般方法中所述。将细胞铺板到 YPD 潮霉素选择平板，并在 30℃ 维持 2-3 天。

分离 14 个解脂耶氏酵母 ATCC #90812 潮霉素-抗性菌落，通过 PCR 筛选靶向破坏。一组 PCR 引物 (P115 和 P116[分别是 SEQ ID NO: 336 和 337]) 用于在同源重组后扩增特异性的连接片段。另一对 PCR 引物 (P115 和 P112[SEQ ID NO: 338]) 用于检测天然基因。

ATCC #90812 菌株的 14 个潮霉素-抗性菌落中的 2 个是对连接片段阳性的，且对天然片段阴性的。因而，在这 2 个菌株中证实了靶向整合，其中之一命名为“S-D2”。

靶向破坏解脂耶氏酵母 PDAT 基因

通过用称作 pLV13 (图 19E; SEQ ID NO: 157) 的靶向盒对内源 PDAT 基因的同源重组-介导的替换，进行解脂耶氏酵母 ATCC #90812 中的 PDAT 基因的靶向破坏。pLV13 源自质粒 pY20 (图 19D; SEQ ID NO: 156)。具体地，通过将 992 bp *Bam HI/Eco RI* 片段插入类似地线性化的 pLV5，制备 pLV13。992 bp DNA 片段含有 (按 5' 至 3' 方向)：3'同源序列位置+877 至+1371 (SEQ ID NO: 76 的编码序列 (ORF))，*Bgl II* 限制位点和 5'同源序列位置+390 至+876 (SEQ ID NO: 76 的编码序列 (ORF))。分别使用 PCR 引物 P39 和 P41 (SEQ ID NO: 339 和 340) 和 P40 和 P42 (SEQ ID NO: 341 和 342)，通过 PCR 扩增制备片段。

通过 *Bgl II* 限制消化，将 pLV13 线性化，并根据一般方法转化进对数中期解脂耶氏酵母 ATCC #90812 细胞。将细胞铺板到 Bio101 DOB/CSM-Ura 选择平板，并在 30℃ 维持 2-3 天。

分离 10 个解脂耶氏酵母 ATCC #90812 菌落，通过 PCR 筛选靶向破坏。一组 PCR 引物 (P51 和 P52[分别是 SEQ ID NO: 343 和 344]) 设计用于扩增靶向盒。另一组 PCR 引物 (P37 和 P38[分别是 SEQ ID

NO: 345 和 346]) 设计用于检测天然基因。10 个菌株中的 10 个都是对连接片段阳性的, 且 10 个菌株中的 3 个是对天然片段阴性的, 因而, 在这 3 个菌株中证实了成功的靶向整合。这些菌株之一命名为“S-P”。

解脂耶氏酵母 DGAT1 基因的靶向破坏

使用简并 PCR 引物 P201 和 P203(分别是 SEQ ID NO: 347 和 348) 和解脂耶氏酵母 ATCC #76982 基因组 DNA 作为模板, 通过 PCR 克隆全长 Y1 DGAT1 ORF。需要简并引物, 因为不知道编码 Y1 DGAT1 的核苷酸序列。

在 RoboCycler Gradient 40 PCR 仪中进行 PCR, 按照如下进行扩增: 95℃ 下初步变性 1 min, 然后是 30 个循环的 95℃ 下变性 30 sec、55℃ 下退火 1 min 和 72℃ 下延伸 1 min。72℃ 进行最终的延伸循环 10 分钟, 然后在 4℃ 终止反应。通过琼脂糖凝胶电泳检测预期的 PCR 产物(约 1.6 kB), 分离, 纯化, 克隆进 TOPO[®]克隆载体 (Invitrogen), 并部分地测序, 以证实它的身份。

通过靶向盒对内源 DGAT1 基因的同源重组-介导的替换, 进行解脂耶氏酵母 ATCC #90812 中的推定 DGAT1 基因的靶向破坏(采用上文对 DGAT2 描述的方法)。具体地, 将 1.6 kB 分离的 Y1 DGAT1 ORF (SEQ ID NO: 81) 用作 PCR 模板分子, 构建由下述组分组成的 Y1 DGAT1 靶向盒: 5'同源 Y1 DGAT1 序列(用引物 P214 和 P215 (SEQ ID NOs: 349 和 350) 扩增)、耶氏酵母亮氨酸 2 (Leu2; GenBank 获取号 AAA35244) 基因, 和 3'同源 Y1 DGAT1 序列(用引物 P216 和 P217 (SEQ ID NOs: 351 和 352) 扩增)。用 Pfu Ultra 聚合酶 (Stratagene, 目录号 600630) 和上文所述热循环仪条件扩增靶向盒的每个单独部分后, 纯化每个片段。将 3 个正确大小的、纯化的片段混合到一起, 作为使用 PCR 引物 P214 和 P219 (SEQ ID NO: 353) 的第二个 PCR 反应的模板分子, 得到 Y1 DGAT1 破坏盒。

凝胶纯化靶向盒, 并用于转化对数中期野生型解脂耶氏酵母 (ATCC #90812)。如一般方法中所述进行转化。将转化体铺板到 Bio101 DOB/CSM-Leu 选择平板上, 并在 30℃ 维持 2-3 天。通过 PCR 筛选几种亮氨酸原养型, 以证实靶向的 DGAT1 破坏。具体地, 一组 PCR 引物 (P226 和 P227[SEQ ID NO: 354 和 355]) 用于扩增破坏盒

和天然靶基因之间的连接。另一组 PCR 引物 (P214 和 P217[SEQ ID NO: 349 和 352]) 用于检测天然基因。

所有亮氨酸原养型菌落都是对连接片段阳性的, 且是对天然片段阴性的, 因而, 在这些菌株中证实了靶向整合, 其中之一命名为 “S-D1”。

建立含有 PDAT 和/或 DGAT2 和/或 DGAT1 基因破坏的解脂耶氏酵母双敲除和三敲除菌株

用质粒 pLV13(含有 PDAT 破坏)转化解脂耶氏酵母 ATCC #90812 潮霉素抗性 “S-D2” 突变体 (含有 DGAT2 破坏), 按照对单个 PDAT 破坏的描述, 通过 PCR 筛选转化体。证明 12 个转化体中的两个在 DGAT2 和 PDAT 基因中都有破坏。这些菌株之一命名为 “S-D2-P”。

类似地, 制备了在 DGAT1 和 PDAT (“S-D1-P”) 中、在 DGAT2 和 DGAT1 (“S-D2-D1”) 中具有双敲除、以及在 DGAT2、DGAT1 和 PDAT 中具有三敲除的菌株 (“S-D2-D1-P”)。

实施例 24

解脂耶氏酵母酰基转移酶敲除减少脂质含量并增加 PUFAs 百分比

本实施例分析了酰基转移酶的单和/或双和/或三敲除在野生型解脂耶氏酵母和以前经过工程化而生产 EPA 的解脂耶氏酵母菌株中的影响, 这是通过脂肪酸含量和组成而测量的。认为如果类似地操作宿主的天然酰基转移酶 (如在菌株 Y2034、Y2047 或 Y2214 中), 则经过工程化以通过 $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径或 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径生产 ARA 的解脂耶氏酵母宿主菌株能够证明 ARA 生物合成和积累的增加。

具有酰基转移酶破坏的解脂耶氏酵母 ATCC #90812 中的 TAG 含量减少

首先, 比较了野生型和突变的解脂耶氏酵母 ATCC #90812 中的 TAG 含量, 所述突变的解脂耶氏酵母 ATCC #90812 含有: (1)PDAT、DGAT2 和 DGAT1 中的单个破坏; (2) PDAT 和 DGAT2、DGAT1 和 PDAT, 以及 DGAT1 和 DGAT2 中的双破坏; 和 (3)PDAT、DGAT2 和 DGAT1 的三破坏。

具体地, 分别将来自含有野生型和突变的解脂耶氏酵母 ATCC #90812 (即 S-D1、S-D2、S-P、S-D1-D2、S-D1-P、S-D2-P 和 S-D1-D2-P) 的一环细胞接种在 3 mL YPD 培养基中, 30℃下在摇床 (300 rpm) 上生长过夜。收获细胞, 在 0.9% NaCl 中洗涤一次, 重悬于 50 mL HGM 中。然后使细胞在摇床上生长 48 小时。在水中洗涤细胞, 冻干细胞沉淀。将二十 (20) mg 干细胞量用于通过 GC 分析总脂肪酸和 TLC (下文) 和 GC 分析后的油级分。

在下面的 5 个步骤中, 描述了 TLC 使用的方法: (1) 将内部标准品 15:0 脂肪酸 (10 µl 10 mg/mL) 加入 2-3 mg 干细胞团, 然后使用甲醇/氯仿方法提取总脂质。(2) 使用 25-50 µl 微量吸管, 将提取的脂 (50 µl) 印迹到绘在离 5 x 20 cm 硅胶 60 平板底部约 1 英寸的光束线上。(3) 然后在 N₂ 下干燥 TLC 平板, 并插入含有约 100 mL 80:20:1 己烷:乙醚:醋酸溶剂的罐中。(4) 分离带后, 将碘蒸汽吹过平板的一侧, 以鉴别带。这使得能够使用剃刀刀片刮掉在平板的另一侧上的样品, 用于进一步分析。(5) 如一般方法中所述, 进行刮掉的样品的基础酯交换和 GC 分析。

GC 结果示于下表 47。将培养物描述为 “S” 菌株 (野生型), “S-P” (PDAT 敲除), “S-D1” (DGAT1 敲除), “S-D2” (DGAT2 敲除), “S-D1-D2” (DGAT1 和 DGAT2 敲除), “S-P-D1” (PDAT 和 DGAT1 敲除), “S-P-D2” (PDAT 和 DGAT2 敲除) 和 “S-P-D1-D2” (PDAT, DGAT1 和 DGAT2 敲除)。使用的缩写是: “WT” = 野生型; “FAs” = 脂肪酸; “dcw” = 干细胞重量; 并且, “FAs% dcw, % WT” = 相对于野生型中的 % 的 FAs% dcw, 其中 “S” 菌株是野生型。

表 47

在 PDAT、DGAT2 和 DGAT1 中具有单个、两个或三个破坏的
耶氏酵母 ATCC #90812 菌株的脂含量

菌株	残留 DAG AT	dcw, mg	总脂肪酸			TAG 级分		
			FAs, μg	FAs% dcw	FAs% dcw, % WT	FAs, μg	FAs% dcw	FAs% dcw, % WT
S	D1, D2, P	32.0	797	15.9	100	697	13.9	100
S-D1	D2, P	78.8	723	13.6	86	617	11.6	83
S-D2	D1, P	37.5	329	6.4	40	227	4.4	32
S-P	D1, D2	28.8	318	6.0	38	212	4.0	29
S-D1-D2	P	64.6	219	4.1	26	113	2.1	15
S-D1-P	D2	76.2	778	13.4	84	662	11.4	82
S-D2-P	D1	31.2	228	4.3	27	122	2.3	17
S-D1-D2-P	无	52.2	139	2.4	15	25	0.4	3

表 47 的结果表明 3 种 DAG AT 对油生物合成的相对贡献。DGAT2 的贡献最大，而 PDAT 和 DGAT1 的贡献相等，但是小于 DGAT2。三敲除菌株脂的约 3% 残留油含量可能是 ARE2 (SEQ ID NOs: 78 和 79) 编码的解脂耶氏酵母的酰基-CoA: 甾醇-酰基转移酶的贡献。

具有破坏的 DGAT2 基因的菌株 EU 中的 TAG 含量减少，EPA 百分比增加

检验野生型解脂耶氏酵母 ATCC #90812 中的多种酰基转移酶敲除 (上文) 的影响后，在 EU 菌株 (即，经过工程化而生产 10% EPA; 参见实施例 10) 的 DGAT2 敲除菌株中检验 TAG 含量和脂肪酸组成。

具体地，按照实施例 23 中对 S 菌株 (ATCC #90812) 的描述，破坏菌株 EU 中的 DGAT2 基因。DGAT2 破坏的菌株命名为 EU-D2。收获 EU 和 EU-D2 菌株，在根据两种不同条件生长后进行分析。在下表中称作 “3 mL” 的条件下，使细胞在 3 mL MM 培养基中生长 1 天，洗涤，然后在 3 mL HGM 中生长 3 天。或者，在下表中称作 “51 mL” 的条件下，使细胞在 51 mL MM 培养基中生长 1 天，洗涤，然后在 51

mL HGM 中生长 3 天。在 TLC 分离后的 51 mL 培养物的提取物（“级分”）中确定磷脂酰胆碱（PC）、磷脂酰乙醇胺（PE）和三酰基甘油（TAG 或油）的脂肪酸组成。

GC 结果示于下表 48。培养物描述为“EU”菌株（野生型）和“EU-D2”菌株（DGAT2 敲除）。脂肪酸鉴定为 16:0、16:1、18:0、18:1（油酸）、18:2（LA）、GLA、DGLA、ARA、ETA 和 EPA；每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 48
具有 DGAT2 破坏的耶氏酵母菌株 EU 的脂质含量和组成

菌株和生长	级分	TFAs% dcw	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% GLA	% DGLA	% ARA	% ETA	% EPA
EU, 3 mL	总		19	10	2	16	12	19	6	0	3	10
EU-D2, 3 mL	总		17	10	1	6	7	24	5	0	6	19
EU, 51 mL	总	37	18	11	3	19	31	5	1		1	4
	PC	2	12	9	1	8	43	7	3		5	4
	PE	1	24	14	0	14	37	5	0		0	1
	TAG	34	18	12	3	21	29	5	1		1	4
EU-D2, 51 mL	总	18	18	8	1	5	7	25	5		5	20
	PC	1	18	6	1	2	4	26	5		11	22
	PE	1	25	7	0	2	5	14	2		3	8
	TAG	15	16	9	1	6	5	26	6		5	21

结果表明 DGAT2 敲除导致 % EPA（占总脂肪酸的百分比）的加倍和脂质含量的减半（表示为 % dcw）。此外，脂含量中观察到的几乎所有改变都是由于 TAG 级分的改变。菌株 EU 的 51 mL 培养物中的 % EPA 比预期的少，可能是由于不稳定性。

具有破坏的酰基转移酶基因的解脂耶氏酵母菌株中 MU 中 TAG

含量增加, EPA 百分比减少

最后, 基于菌株 EU-D2 中单个 DGAT2 敲除导致的 EPA 百分比增加和脂质含量减少, 在菌株 MU (经过工程化而生产 14% EPA, 参见实施例 12) 的多个酰基转移酶敲除菌株中研究了 TAG 含量和脂肪酸组成。具体地, 在菌株 MU 中, 建立了在 PDAT、DGAT2 和 DGAT1 中的单个破坏, 和在 PDAT 和 DGAT2 中的双破坏。在 4 种不同生长条件下生长后, 比较每个这样的菌株的脂含量和组成。

更具体地, 使用实施例 23 的方法 (不同之处是, DGAT1 破坏的选择依赖于 URA3 基因), 在菌株 MU 中建立 PDAT、DGAT2、DGAT1 中的单个破坏。这会产生单敲除菌株, 分别称作 “MU-D1” (破坏 DGAT1)、“MU-D2” (破坏 DGAT2) 和 “MU-P” (破坏 PDAT)。通过 PCR 证实各个敲除菌株。另外, 通过相同方法破坏 MU-D2 菌株的 PDAT 基因, 并通过 PCR 证实破坏。得到的双敲除菌株称作 “MU-D2-P”。

分析 MU-D1、MU-D2、MU-P 和 M-D2-P 敲除菌株, 以确定每个敲除对脂含量和组成的影响, 如下所述。而且, 还使用促进含油性的生长条件, 来确定它们对总脂含量的影响。因而, 共进行了 4 个不同的实验, 分别称作 “实验 A”、“实验 B”、“实验 C” 和 “实验 E”。更具体地, 将 3 环来自含有上述每种菌株的平板的细胞接种进 MMU [实验 B 和 C 是 3 mL; 实验 A 和 E 是 50 mL], 并在 30℃ 摇床中生长 24 小时 (实验 A, B 和 C) 或 48 小时 (实验 E)。收获细胞, 在 HGM 中洗涤一次, 重新悬浮于 HGM (实验 A 和 E 是 50 mL; 且实验 B 是 3 mL) 或含有尿嘧啶的 HGM (“HGMU”) (实验 C 是 3 mL), 并如上培养 4 天。将一份等分物 (1 mL) 用于根据一般方法所述的 GC 脂分析, 第二份等分物用于测定培养物在 600 nm 的 OD。收获实验 A 和 E 的剩余培养物, 在水中洗涤一次, 冻干, 用于干细胞重量 (dcw) 测定。相反地, 使用显示它们的关系的方程, 从它们的 OD₆₀₀, 确定实验 B 和 C 的 dcw。还测定了实验 A, B, C 和 E 中的不同菌株各自的脂肪酸组成。

在下面的表 49 中显示了结果。将培养物描述为 “MU” 菌株 (亲本 EPA 生产菌株), “MU-P” (PDAT 敲除), “MU-D1” (DGAT1 敲除), “MU-D2” (DGAT2 敲除) 和 “MU-D2-P” (DGAT2 和 PDAT

敲除)。使用的缩写是：“WT”=野生型（即，MU）；“OD”=光密度；“dcw”=干细胞重量；“TFAs”=总脂肪酸；和，“TFAs% dcw, % WT”=相对于野生型（“MU”）菌株的 TFAs% dcw。脂肪酸鉴定为 16:0、16:1、18:0、18:1（油酸）、18:2（LA）、GLA、DGLA、ARA、ETA 和 EPA；每种脂肪酸的组成表示为总脂肪酸的百分比。

表 49
具有多种酰基转移酶破坏的耶氏酵母菌株 MU 中的脂类和 EPA 含量

实验	菌株	残余 DAG AT	第 1 阶段 生长 条件	第 2 阶段 生长 条件	OD	dcw (mg)	TFAs (μg)	TFAs % dcw	TFAs % dcw, % WT	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% GLA	% DGLA	% ARA	% ETA	% EPA
A	MU	D1, D2, P	1 天, 50 mL MMU	4 天, 50 mL HGM	4.0	91	374	20.1	100	17	10	2	18	10	22	7	1	3	9.7
A	MU-D2	D1, P			3.1	75	160	10.4	52	16	12	0	8	9	23	7	0	8	17.4
A	MU-D1	D2, P			4.3	104	217	10.2	51	15	10	2	11	10	22	7	0	7	17.4
A	MU-P	D1, D2			4.4	100	238	11.7	58	16	9	2	11	7	24	7	1	6	17.5
B	MU	D1, D2, P	1 天, 3 mL MMU	4 天, 3 mL HGM	5.9	118	581	24.1	100	17	9	3	18	10	22	8	1	3	9.1
B	MU-D2	D1, P			4.6	102	248	11.9	50	16	10	0	7	10	24	7	1	7	17.8
B	MU-D1	D2, P			6.1	120	369	15.0	62	18	9	3	14	11	20	7	1	5	12.0
B	MU-P	D1, D2			6.4	124	443	17.5	72	15	8	3	16	10	25	6	1	4	11.9
C	MU	D1, D2, P	1 天, 3 mL MMU	4 天, 3 mL HGM	6.8	129	522	19.9	100	16	10	2	13	11	21	10	1	4	12.6
C	MU-D2	D1, P			5.6	115	239	10.2	51	17	9	1	6	11	21	8	1	7	18.9
C	MU-D1	D2, P			6.9	129	395	15.0	75	15	9	2	12	12	20	10	1	5	13.5
C	MU-P	D1, D2			7.1	131	448	16.8	84	17	8	3	14	11	20	10	1	4	11.3
E	MU	D1, D2, P	2 天, 50 mL MM	4 天, 50 mL HGM	4.6	89	314	17.3	100	16	12	2	18	9	22	7	1	4	11.2
E	MU-D2	D1, P			2.8	62	109	8.5	49	14	12	1	6	8	25	6	0	7	20.0
E	MU-P	D2, P			5.0	99	232	11.5	66	16	10	2	14	7	24	7	1	5	15.8
E	MU-D2-P	D1			4.2	98	98	4.9	28	18	10	0	7	12	20	5	0	6	22.5

数据证实，转化细胞中的脂质含量随生长条件而变化。而且，每种酰基转移酶对脂质含量的贡献也变化。具体地，在实验 B、C 和 E 中，DGAT2 对油生物合成的贡献大于 PDAT 或 DGAT1。相反地，如实验 A 所证实的，在 DGAT2、DGAT1 和 PDAT 中的单敲除会导致大约相同的脂质含量减少（即，分别是减少 48%、49%和 42%[参见“TFAs% dcw, % WT”]）。

至于脂肪酸组成，数据表明每个 DAG AT 基因的敲除导致油含量降低和 EPA 百分比增加。例如，DGAT2 敲除导致大约一半的脂质含量以及 EPA 占脂肪酸的百分比大约加倍（类似于上文菌株 EU-D2 中观察到的结果）。DAGAT2 和 PDAT 都敲除，导致最少的油和最多的 EPA 百分比。

基于此处报道的结果，认为天然 DGAT2 和/或 DGAT1 和/或 PDAT 的破坏是显著降低经过工程化而生产高浓度的 PUFAs，包括 ARA 的解脂耶氏酵母菌株（如在菌株 Y2034、Y2047 或 Y2214 中）的 PUFAs 百分比的有用手段。实际上，菌株 Y2214 中天然 DGAT2 的破坏导致 ARA 的百分比增加 1.7 倍（数据未示出）。

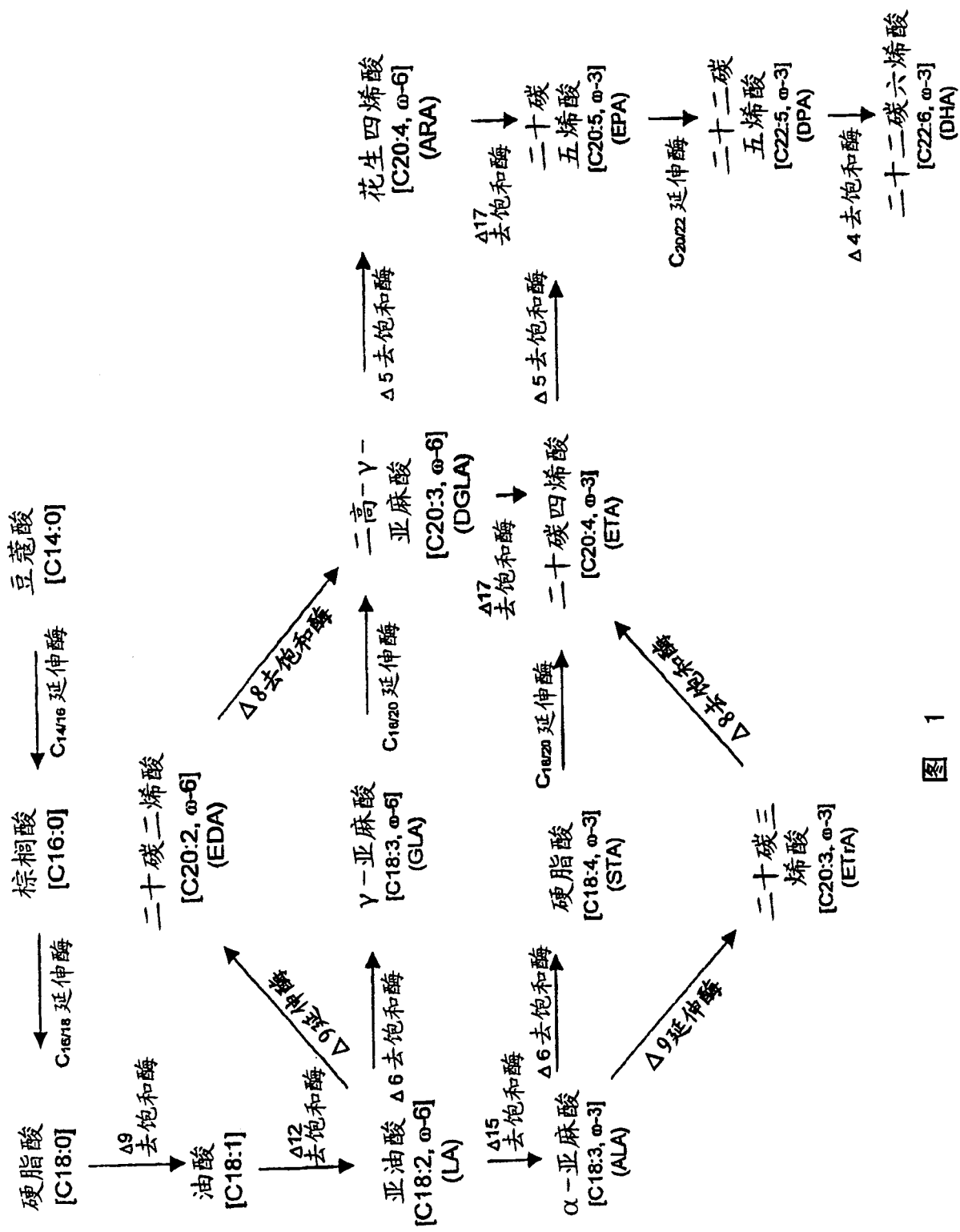


图 1

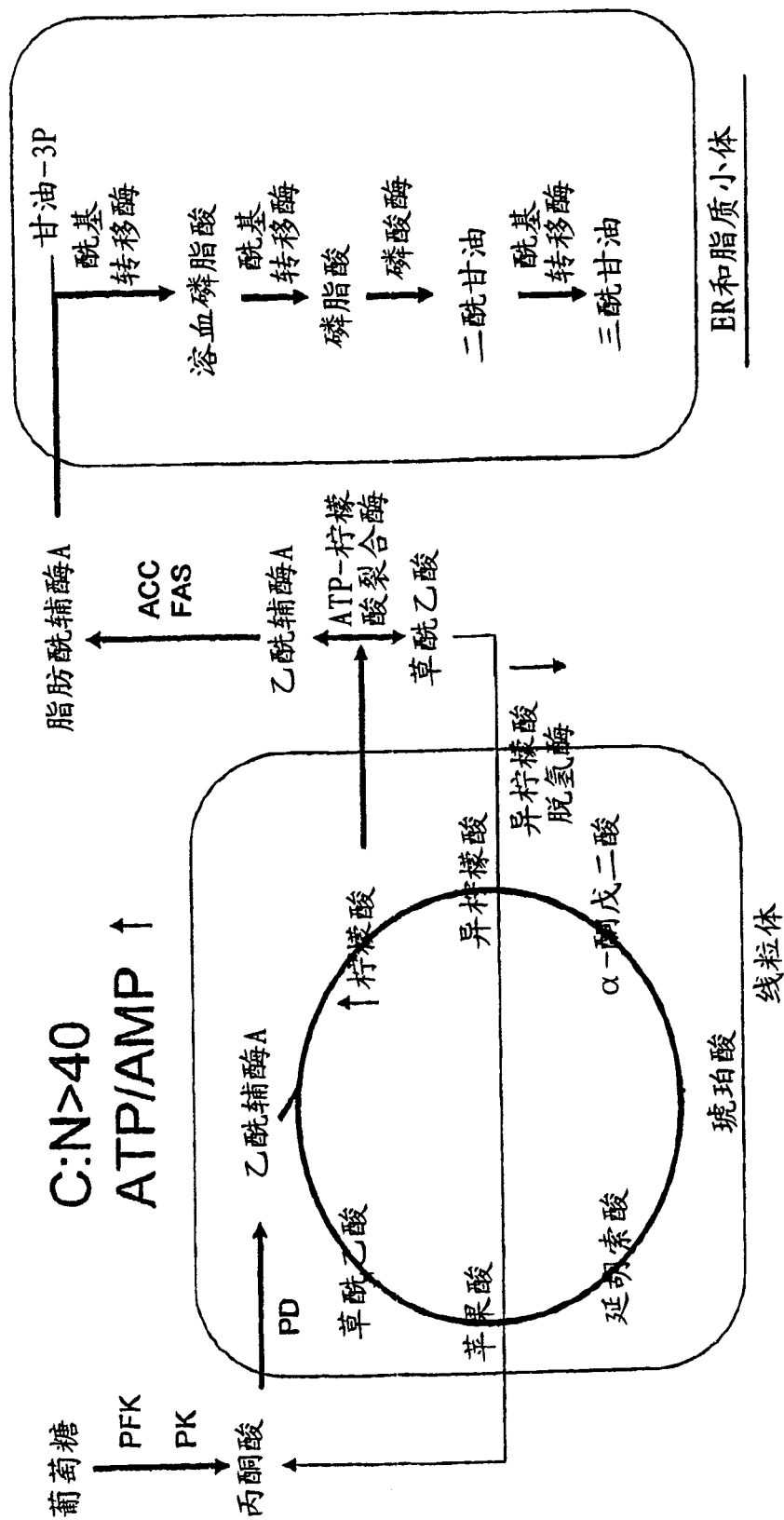


图 2

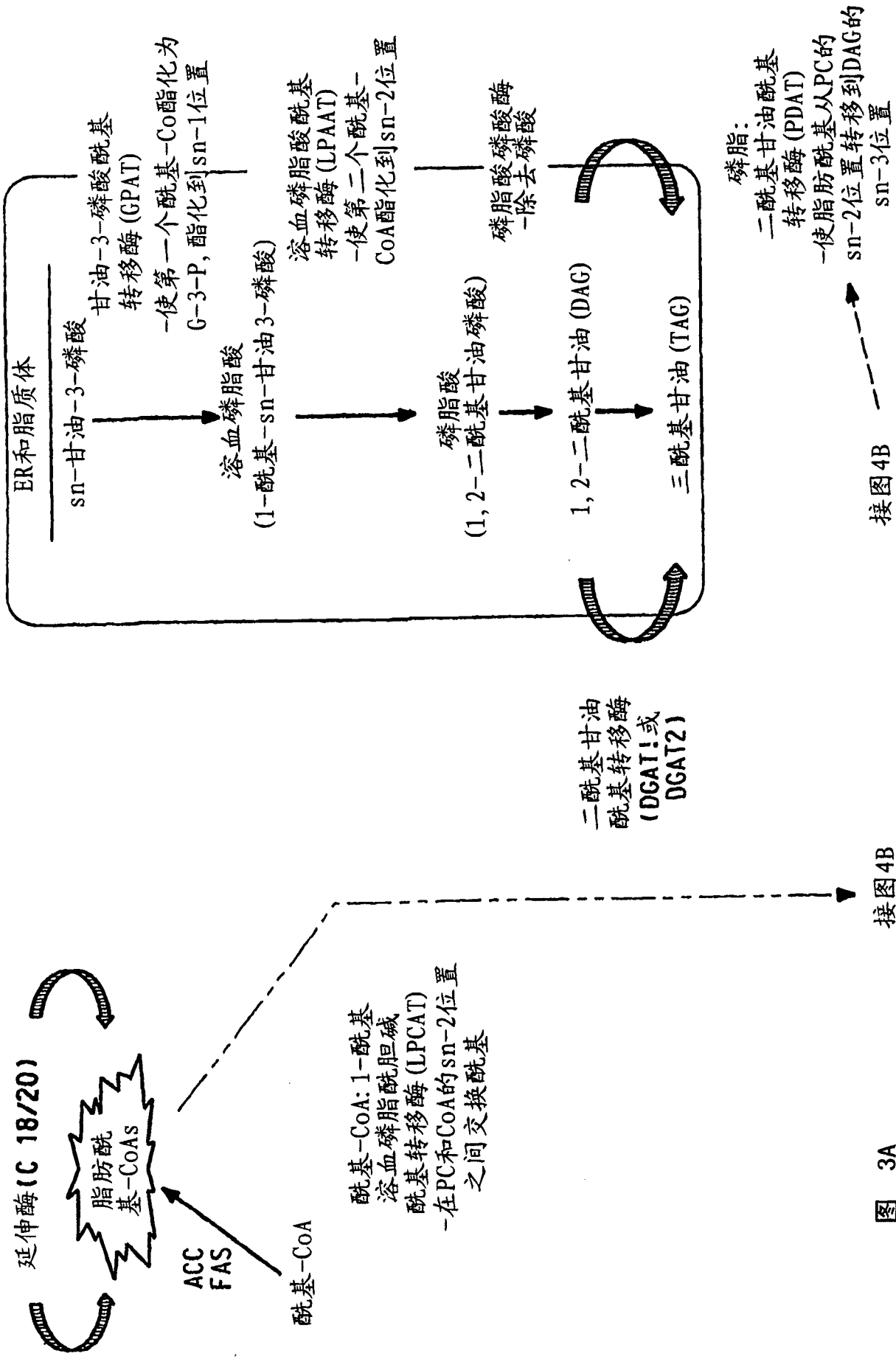


图 3A

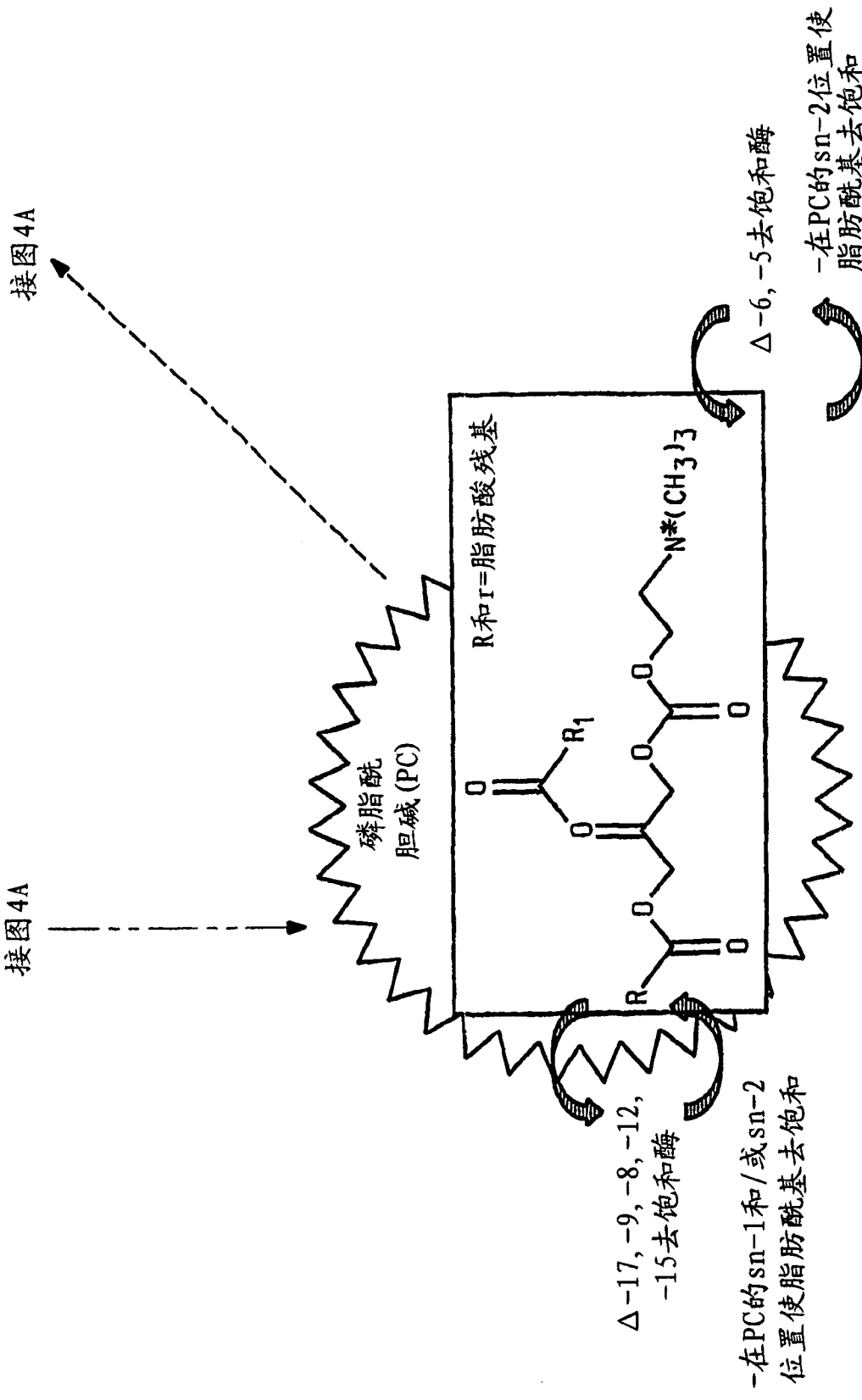


图 3B

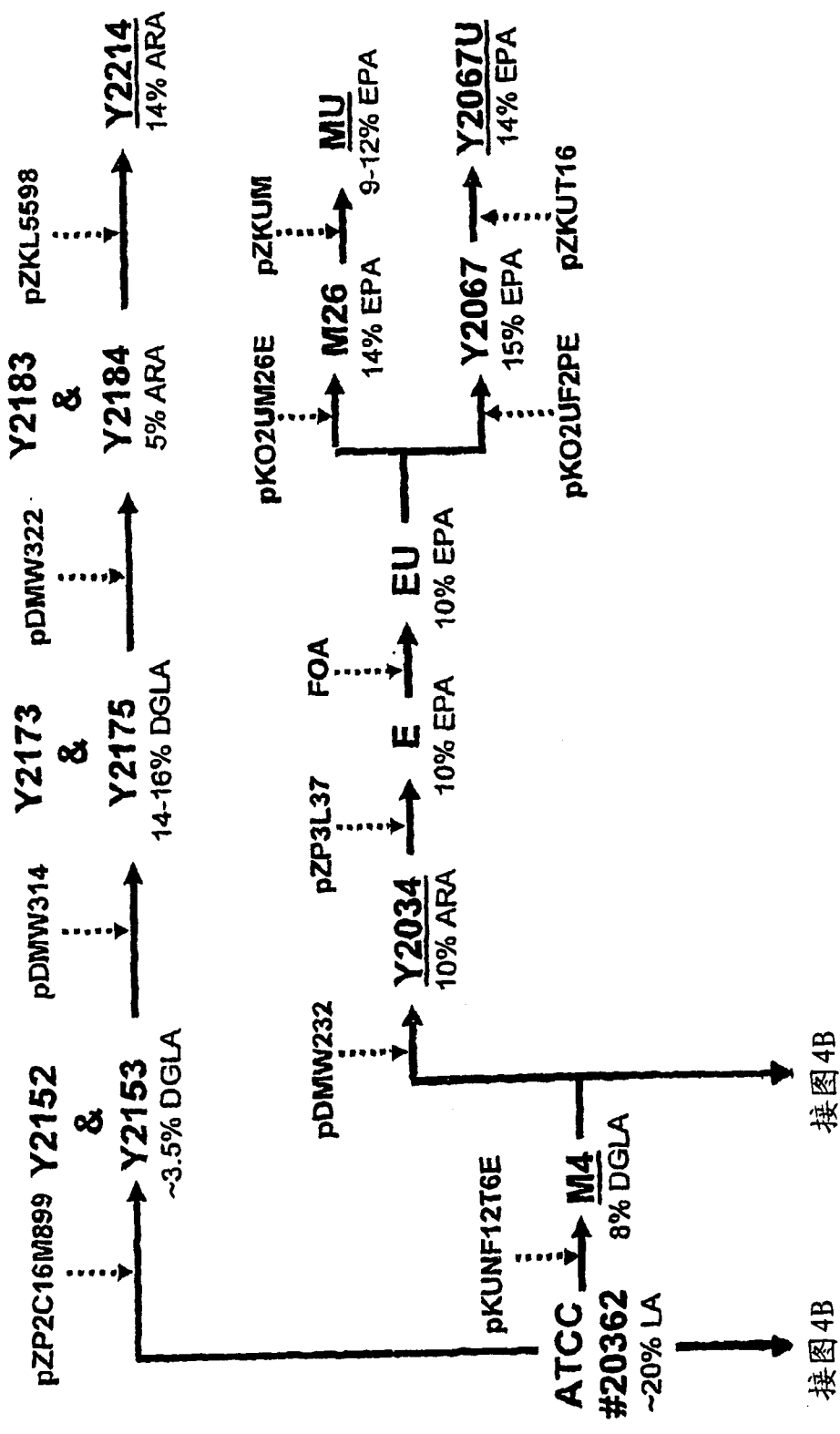


图 4A

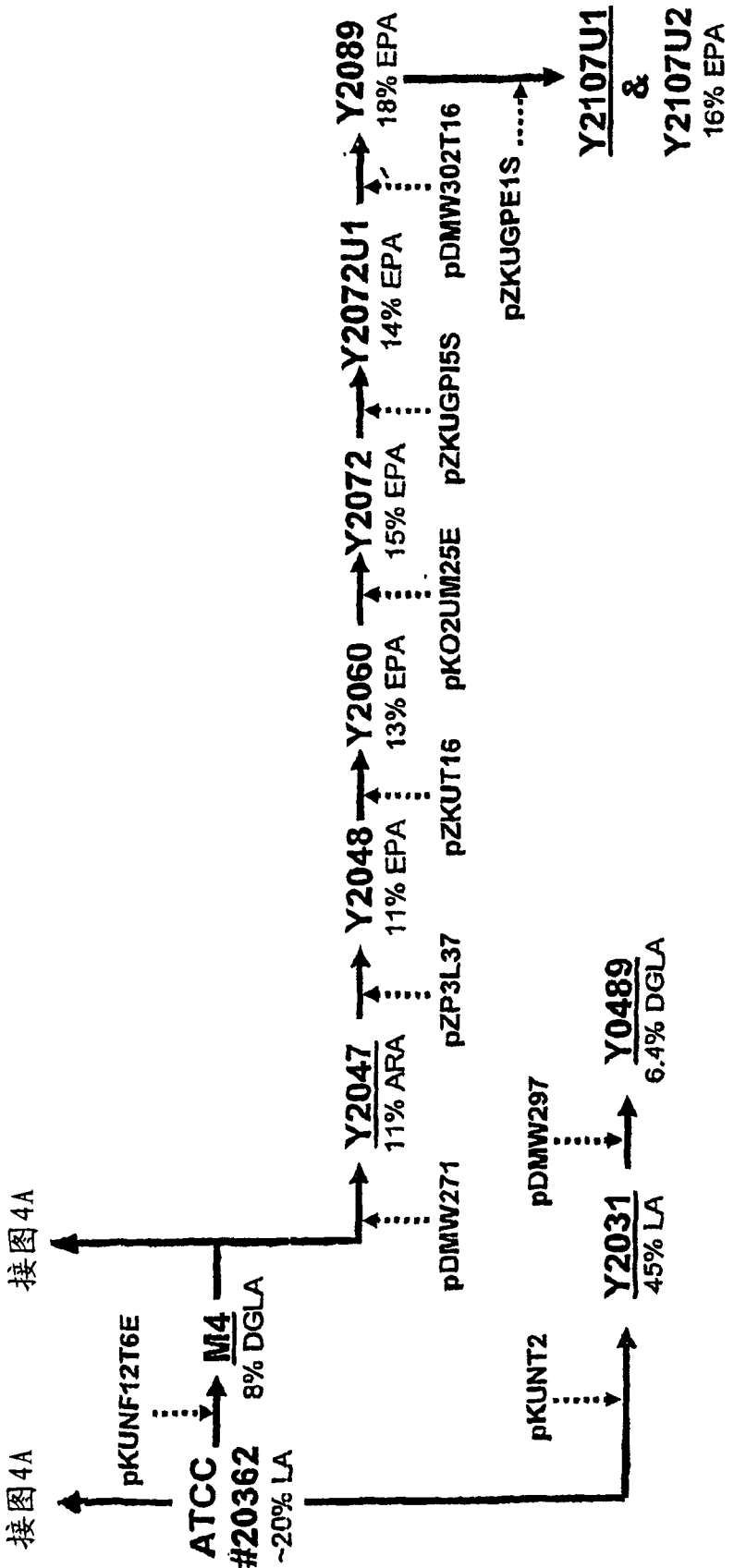


图 4B

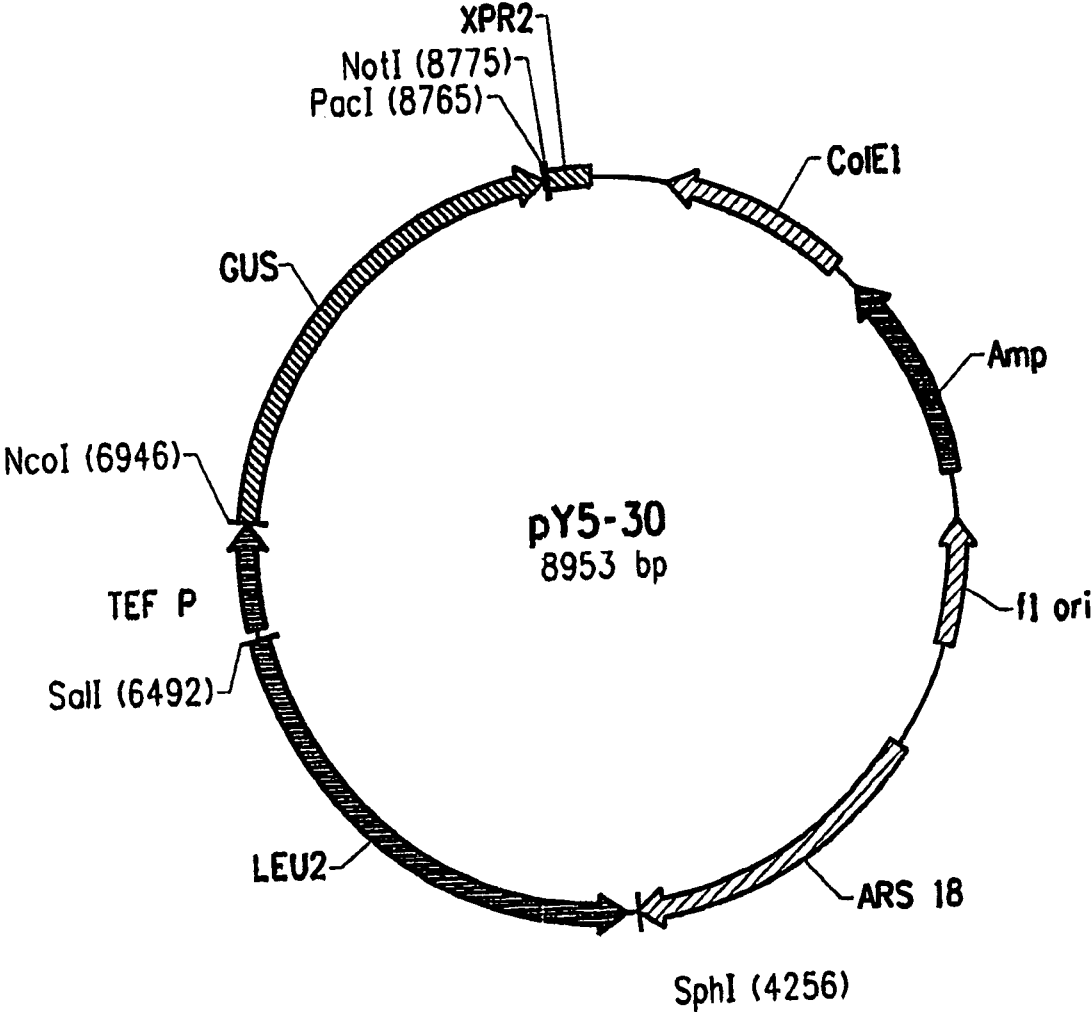


图 5A



FBAIN::GUS

FBA::GUS

GPD::GUS

GPM::GUS

TEF::GUS

图 5B

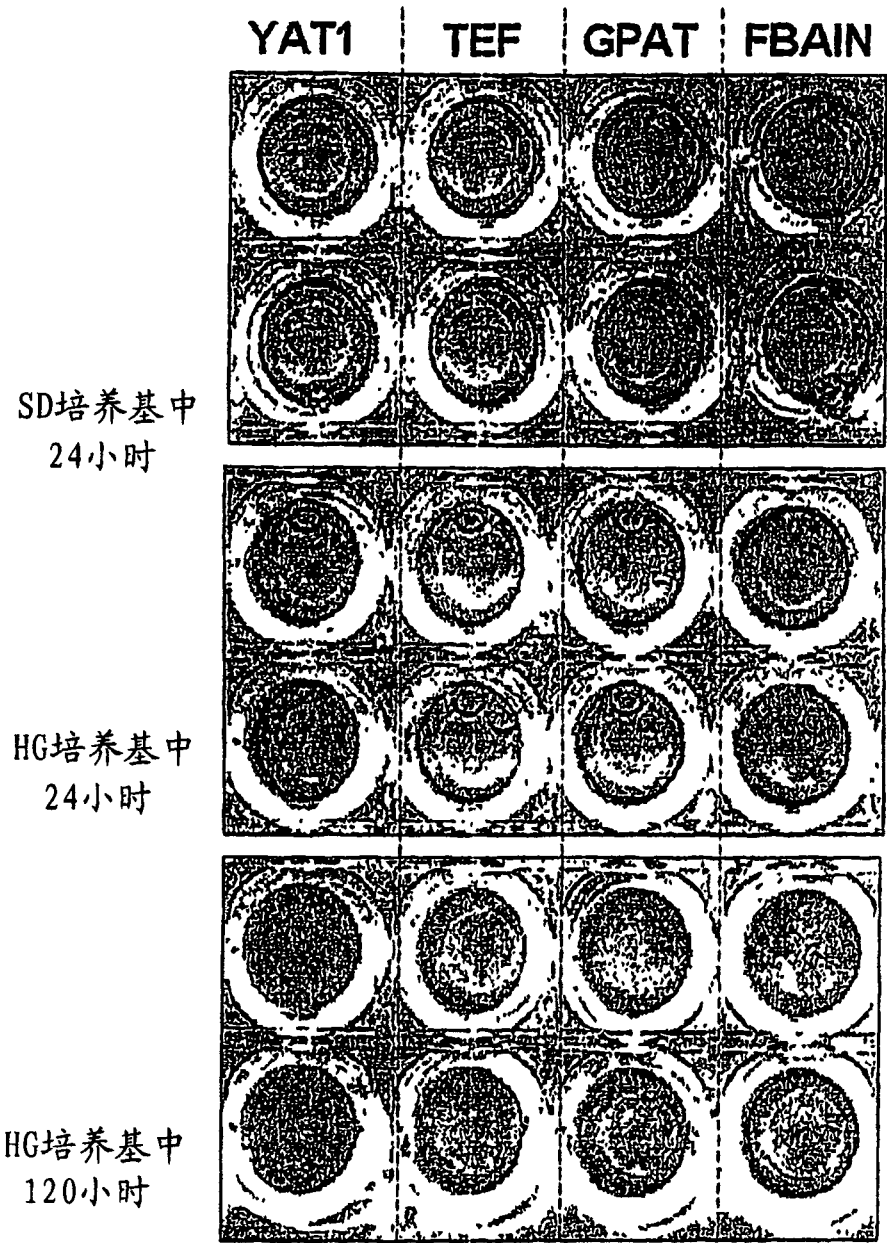


图 5C

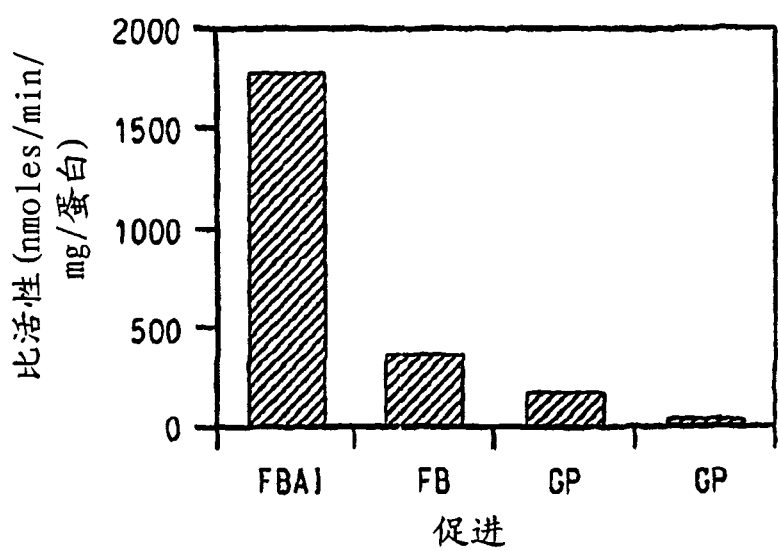


图 6A

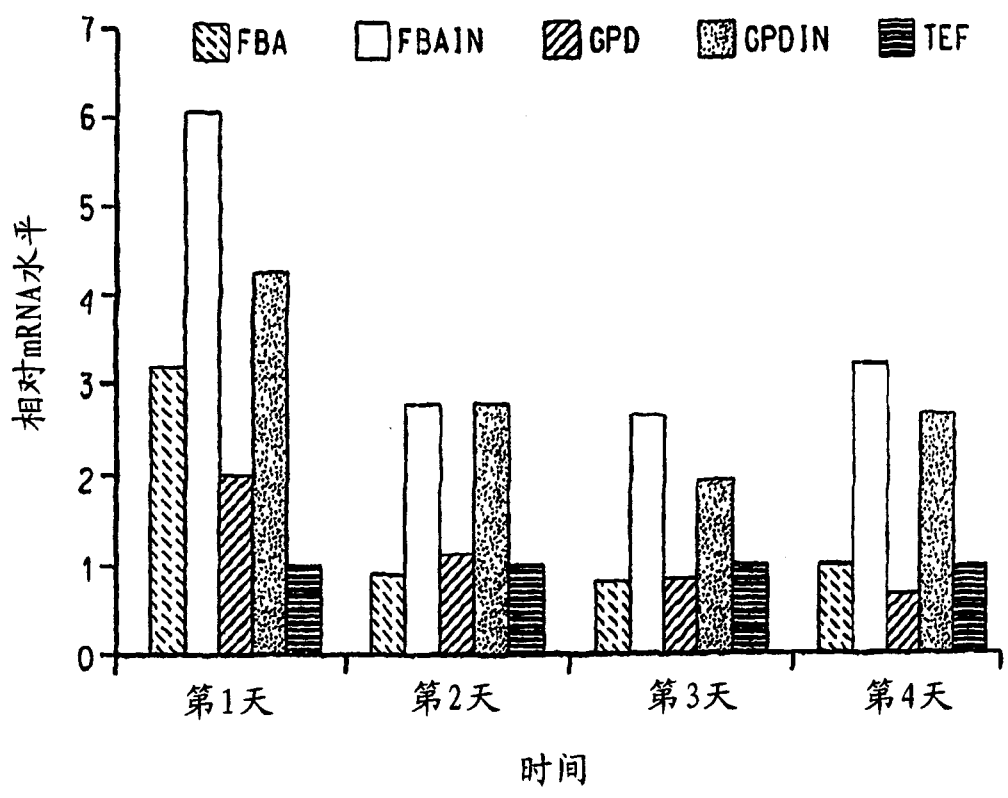


图 6B

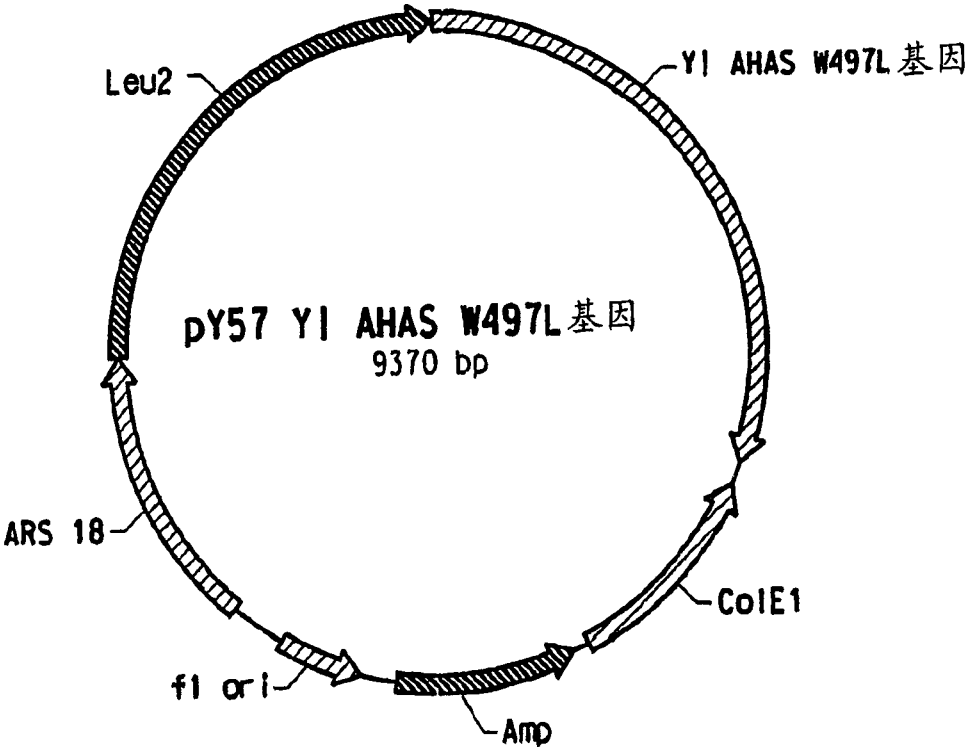


图 7A

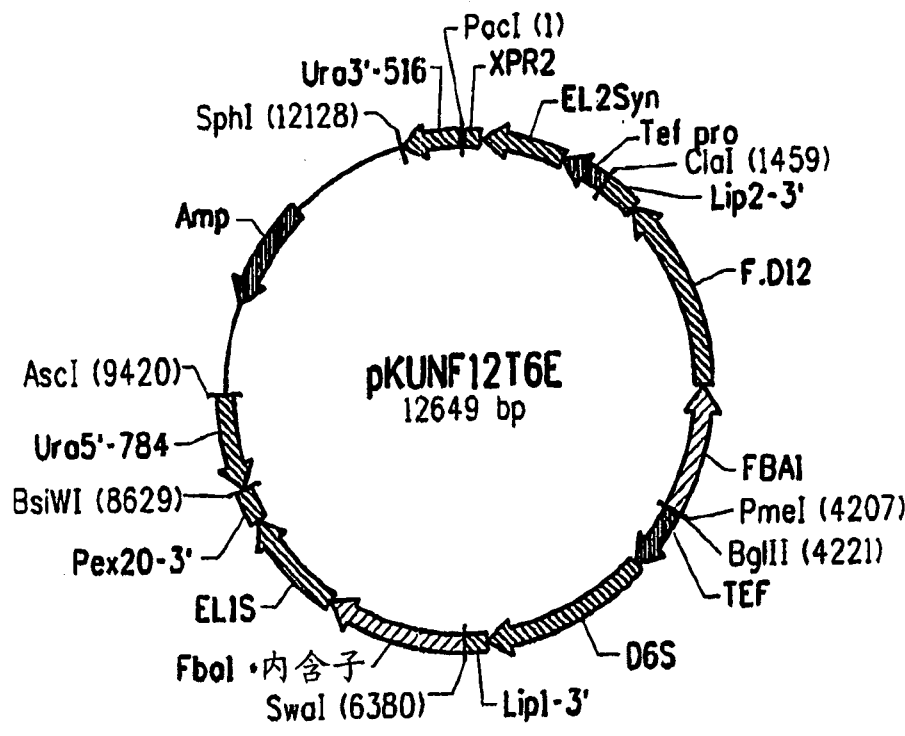


图 7B

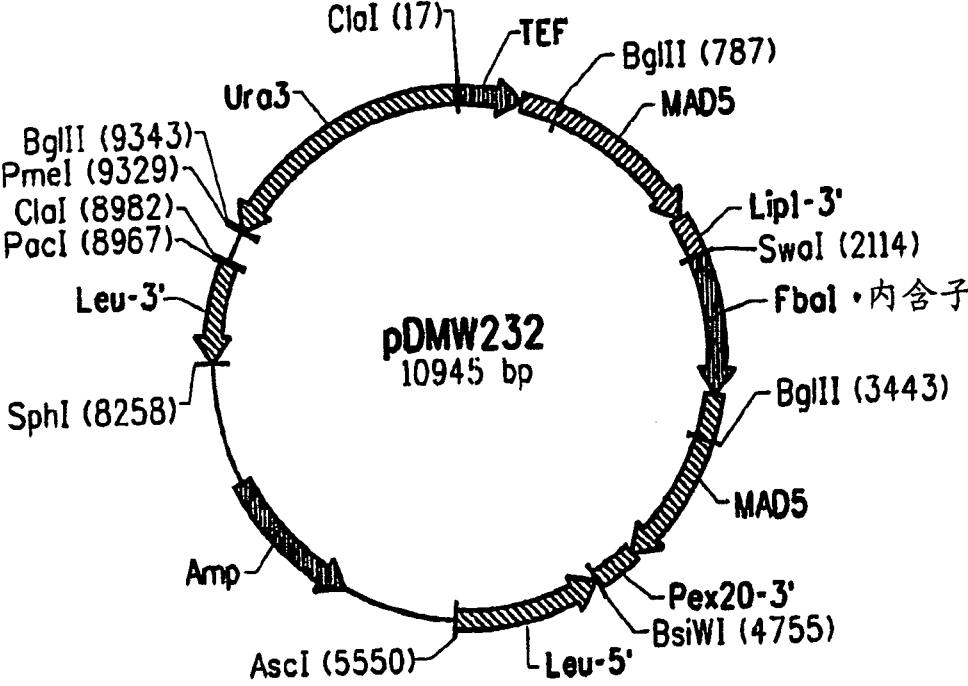


图 7C

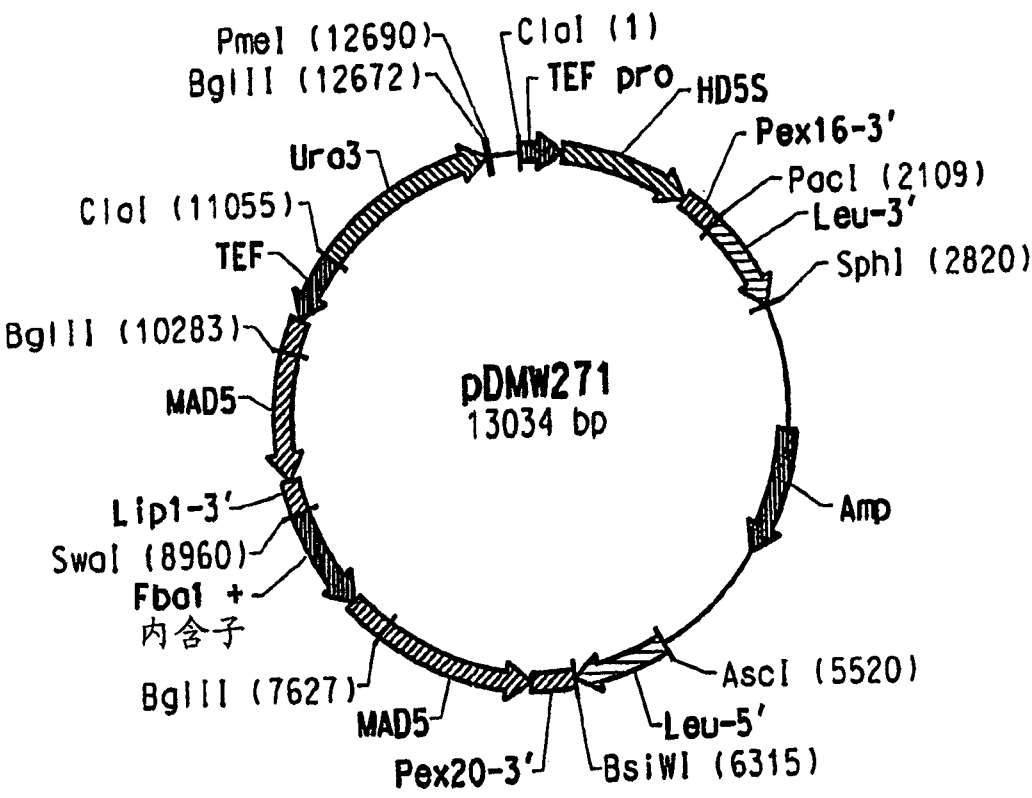


图 7D

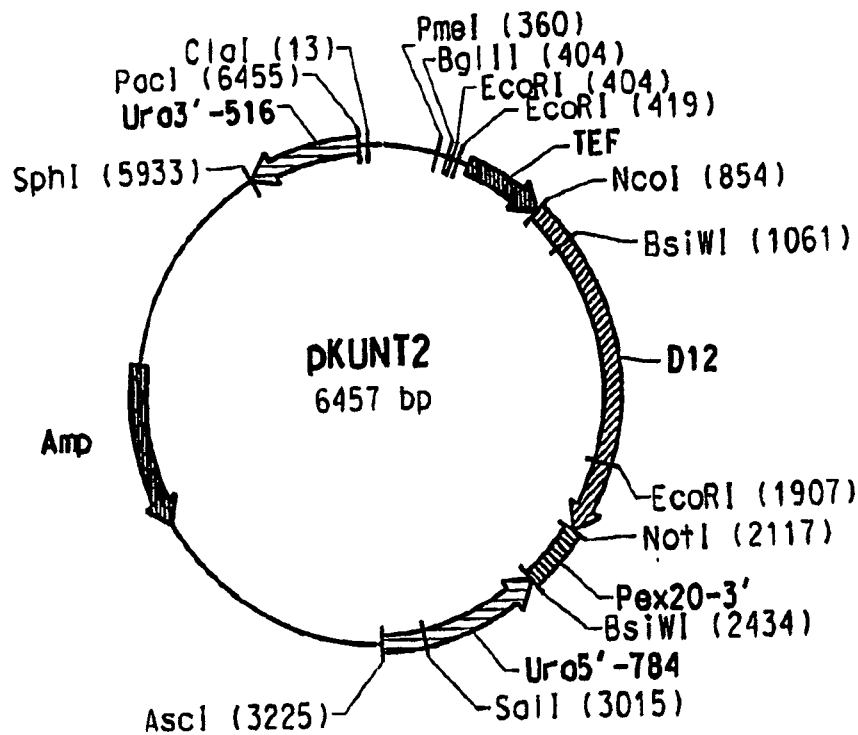


图 8A

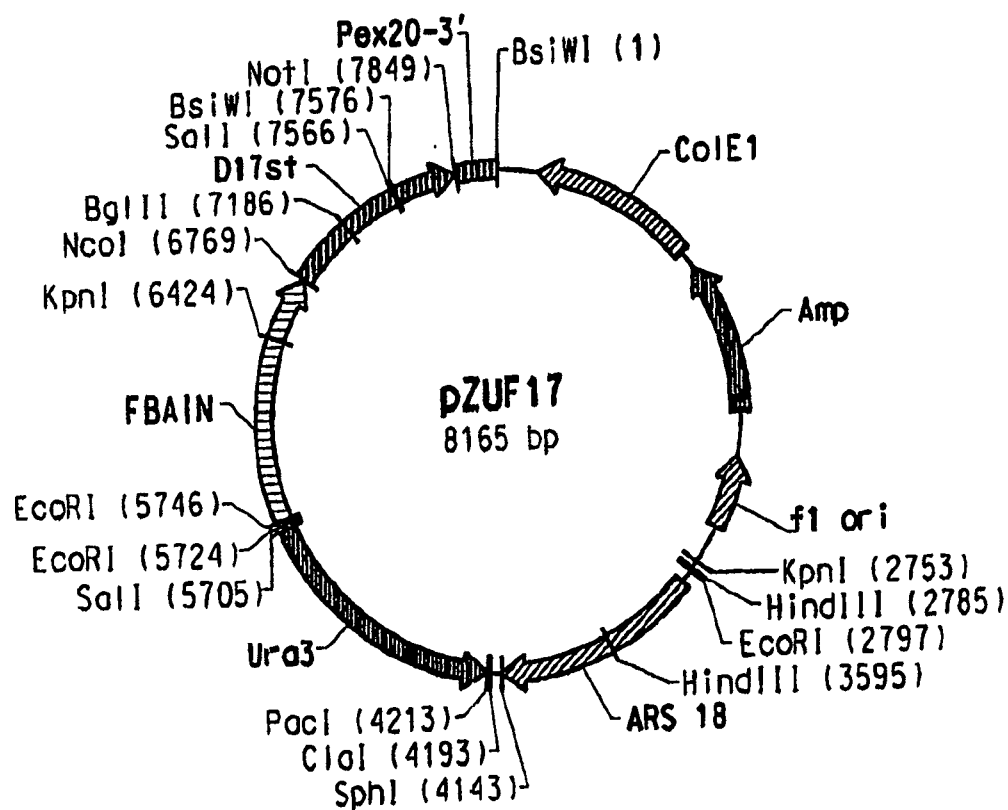


图 8B

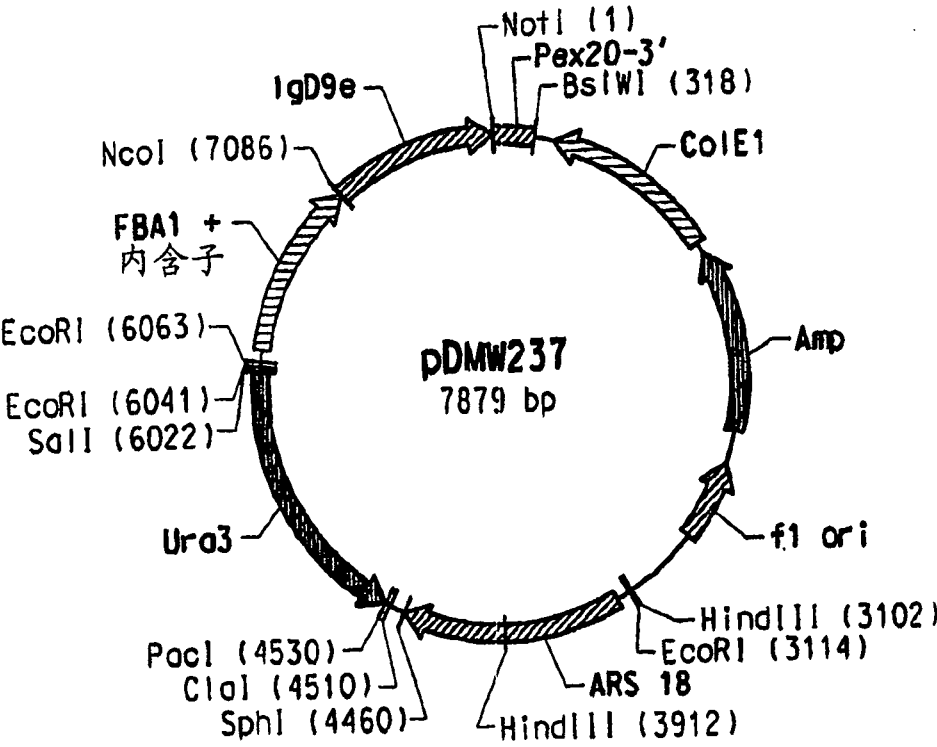


图 8C

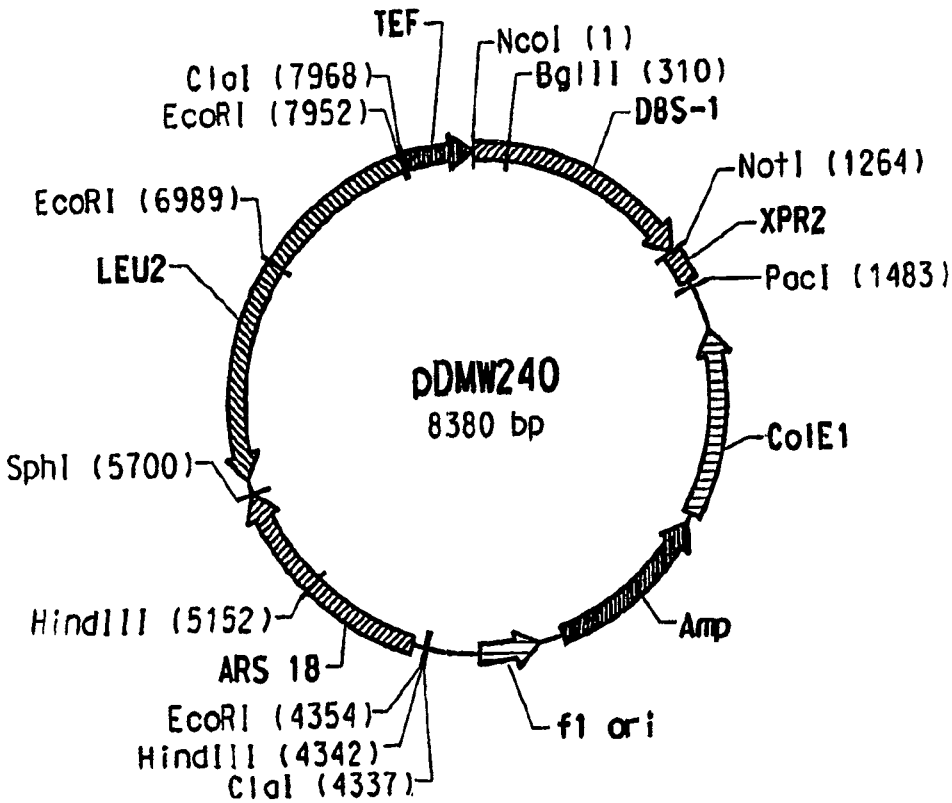


图 8D

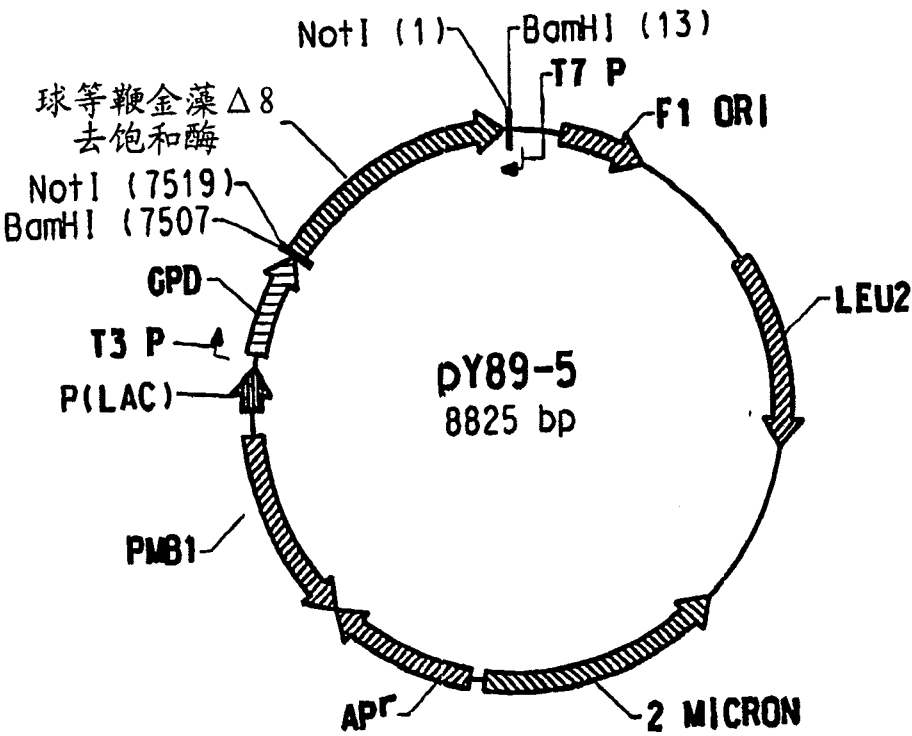


图 8E

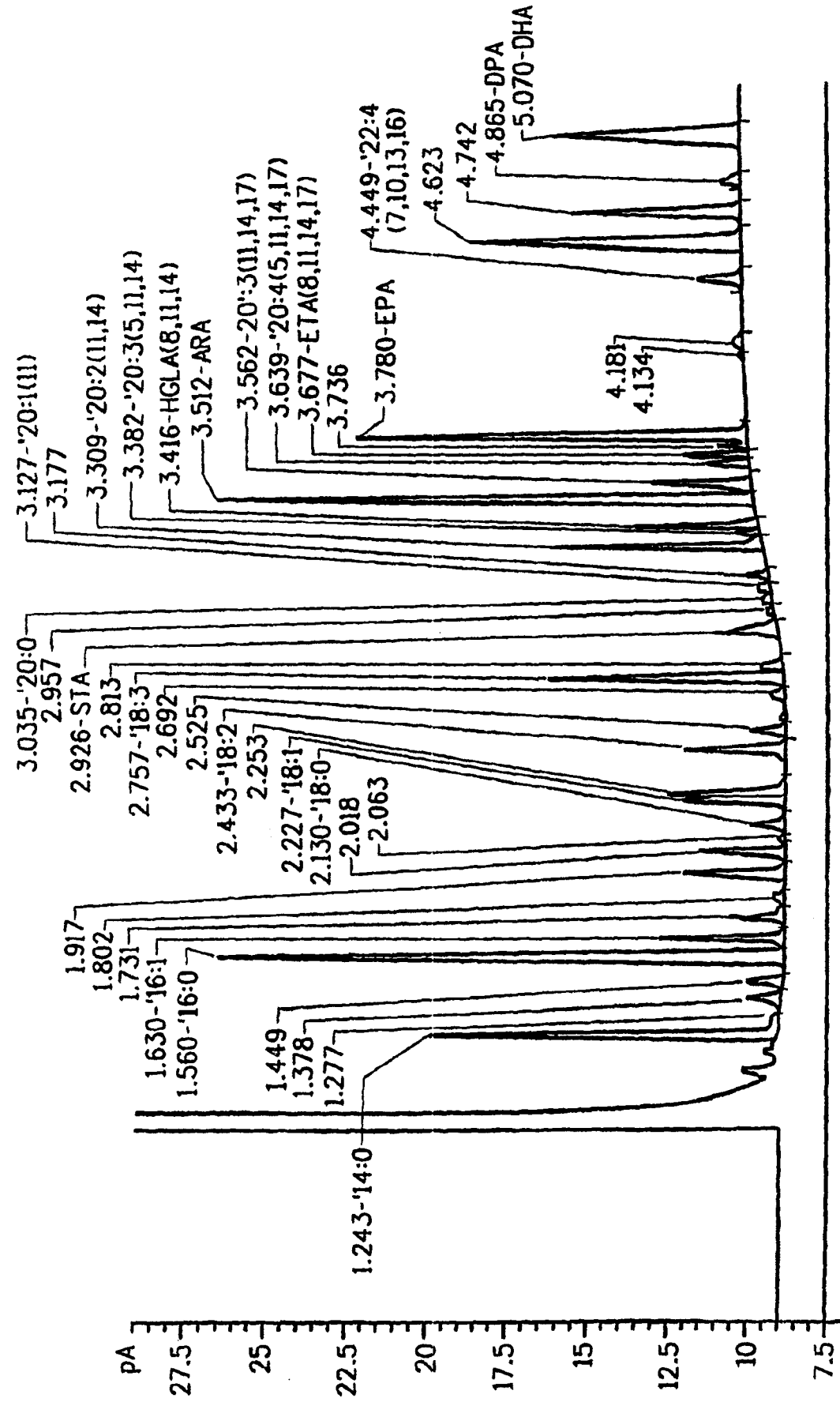


图 9

```

***** **
SEQ ID NO: 45 MKSKRQAL-PLTIDGTTYDVSAWVNFHPGGAEIENYQGRDATDAFMVMHSQEAFDKLKR
SEQ ID NO: 47 MKSKRQAL-PLTIDGTTYDVSAWVNFHPGGAEIENYQGRDATDAFMVMHSQEAFDKLKR
SEQ ID NO: 43 MKSKRQALSPLQLMEQTYDV---VNFHPGGAEIENYQGRDATDAFMVMHFEAFDKLKR
SEQ ID NO:252 MKSKRQALSPLQLMEQTYDVSAWVNFHPGGAEIENYQGRDATDAFMVMHFEAFDKLKR

*****
SEQ ID NO: 45 MPKINPSSELPPQAAVNEAQEDFRKLREELIATGMFDASPLWYSYKISTTLGLGLVLYFL
SEQ ID NO: 47 MPKINPSSELPPQAAVNEAQEDFRKLREELIATGMFDASPLWYSYKISTTLGLGLVLYFL
SEQ ID NO: 43 MPKINPSFELPPQAAVNEAQEDFRKLREELIATGMFDASPLWYSYKISTTLGLGLVLYFL
SEQ ID NO:252 MPKINPSFELPPQAAVNEAQEDFRKLREELIATGMFDASPLWYSYKISTTLGLGLVLYFL

***** **
SEQ ID NO: 45 MVQYQMYFIGAVLLGMHYQQMGWLSHDICHHTQTFKNRNWNNLVGLVFGNGLQGFSVTVWK
SEQ ID NO: 47 MVQYQMYFIGAVLLGMHYQQMGWLSHDICHHTQTFKNRNWNNLVGLVFGNGLQGFSVTVWK
SEQ ID NO: 43 MVQYQMYFIGAVLLGMHYQQMGWLSHDICHHTQTFKNRNWNNLVGLVFGNGLQGFSVTCWK
SEQ ID NO:252 MVQYQMYFIGAVLLGMHYQQMGWLSHDICHHTQTFKNRNWNNLVGLVFGNGLQGFSVTCWK

*****
SEQ ID NO: 45 DRHNAHHSATNVQGHDPDIDNLPPLAWSEDDVTRASPISRKLIQFQQYYFLVICILLRFI
SEQ ID NO: 47 DRHNAHHSATNVQGHDPDIDNLPPLAWSEDDVTRASPISRKLIQFQQYYFLVICILLRFI
SEQ ID NO: 43 DRHNAHHSATNVQGHDPDIDNLPPLAWSEDDVTRASPISRKLIQFQQYYFLVICILLRFI
SEQ ID NO:252 DRHNAHHSATNVQGHDPDIDNLPPLAWSEDDVTRASPISRKLIQFQQYYFLVICILLRFI

*****
SEQ ID NO: 45 WCFQSVLTVRSLKDRDNQFYRSQYKKEAIGLALHWTCLKLFFLFFMPSILTSLLVFFVSE
SEQ ID NO: 47 WCFQSVLTVRSLKDRDNQFYRSQYKKEAIGLALHWTCLKLFFLFFMPSILTSLLVFFVSE
SEQ ID NO: 43 WCFQCVLTVRSLKDRDNQFYRSQYKKEAIGLALHWTCLKLFFLFFMPSILTSLLVFFVSE
SEQ ID NO:252 WCFQCVLTVRSLKDRDNQFYRSQYKKEAIGLALHWTCLKLFFLFFMPSILTSLLVFFVSE

*****
SEQ ID NO: 45 LVGGFGIAIVFMNHYPLEKIGDSVWDGHGFSVGQIHETMNIRRGII TDWFFGGLNYQIE
SEQ ID NO: 47 LVGGFGIAIVFMNHYPLEKIGDSVWDGHGFSVGQIHETMNIRRGII TDWFFGGLNYQIE
SEQ ID NO: 43 LVGGFGIAIVFMNHYPLEKIGDPVWDGHGFSVGQIHETMNIRRGII TDWFFGGLNYQIE
SEQ ID NO:252 LVGGFGIAIVFMNHYPLEKIGDPVWDGHGFSVGQIHETMNIRRGII TDWFFGGLNYQIE

*****
SEQ ID NO: 45 HHLWPTLPRHNLTAVSQVEQLCQKHNLPYRNPLPHEGLVILLRYLAVFARMAEKQPAGK
SEQ ID NO: 47 HHLWPTLPRHNLTAVSQVEQLCQKHNLPYRNPLPHEGLVILLRYLAVFARMAEKQPAGK
SEQ ID NO: 43 HHLWPTLPRHNLTAVSQVEQLCQKHNLPYRNPLPHEGLVILLRYLAVFARMAEKQPAGK
SEQ ID NO:252 HHLWPTLPRHNLTAVSQVEQLCQKHNLPYRNPLPHEGLVILLRYLAVFARMAEKQPAGK

*
SEQ ID NO: 45 AL.
SEQ ID NO: 47 AL.
SEQ ID NO: 43 A-L
SEQ ID NO:252 A-L

```

图 10

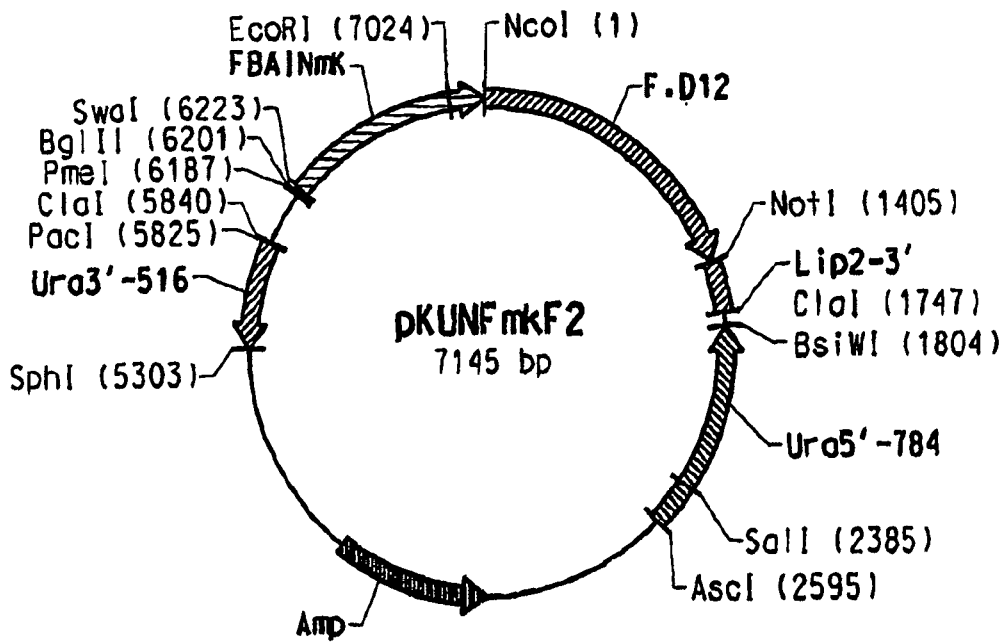


图 11A

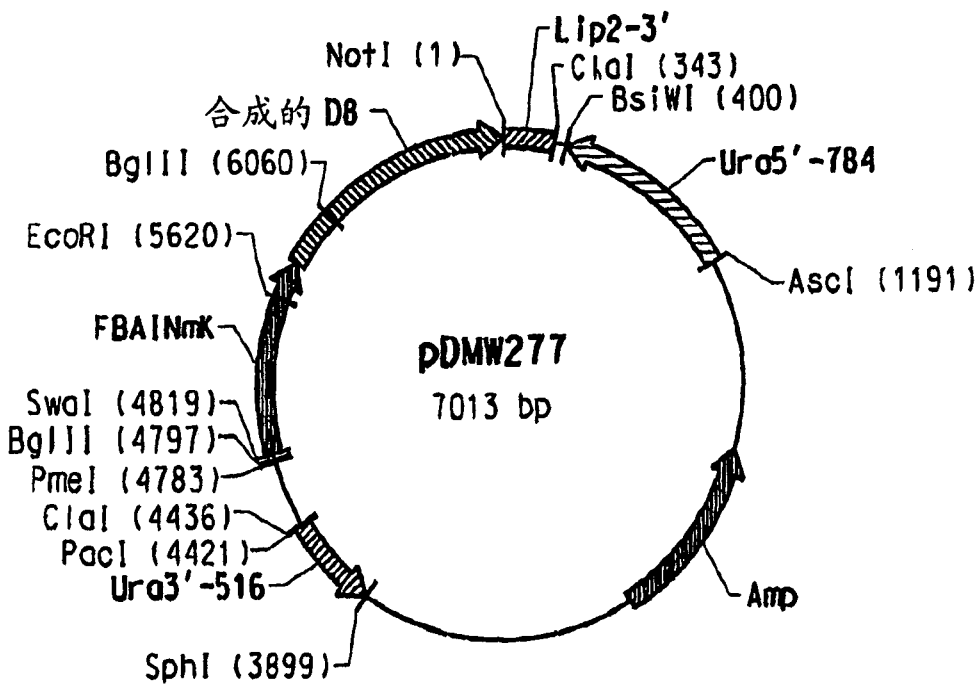


图 11B

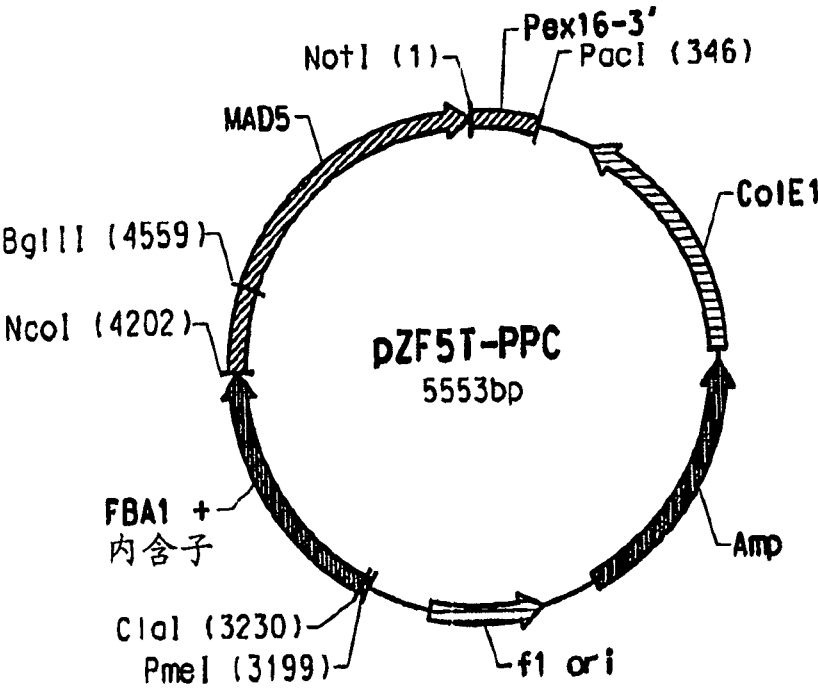


图 11C

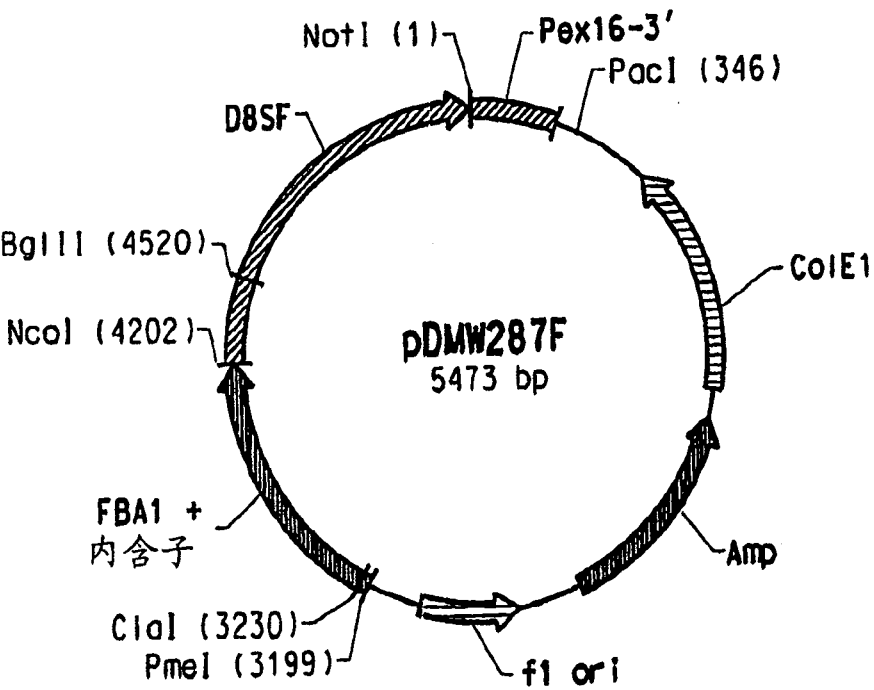


图 11D

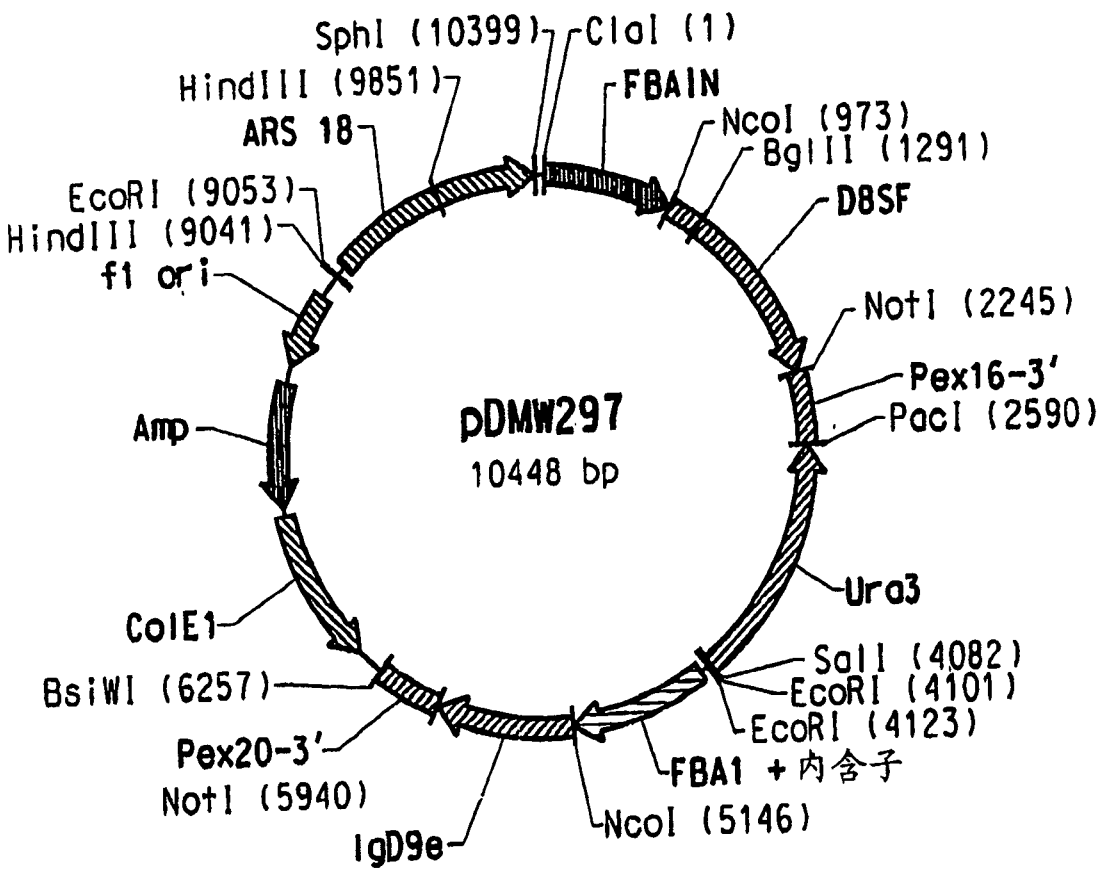


图 11E

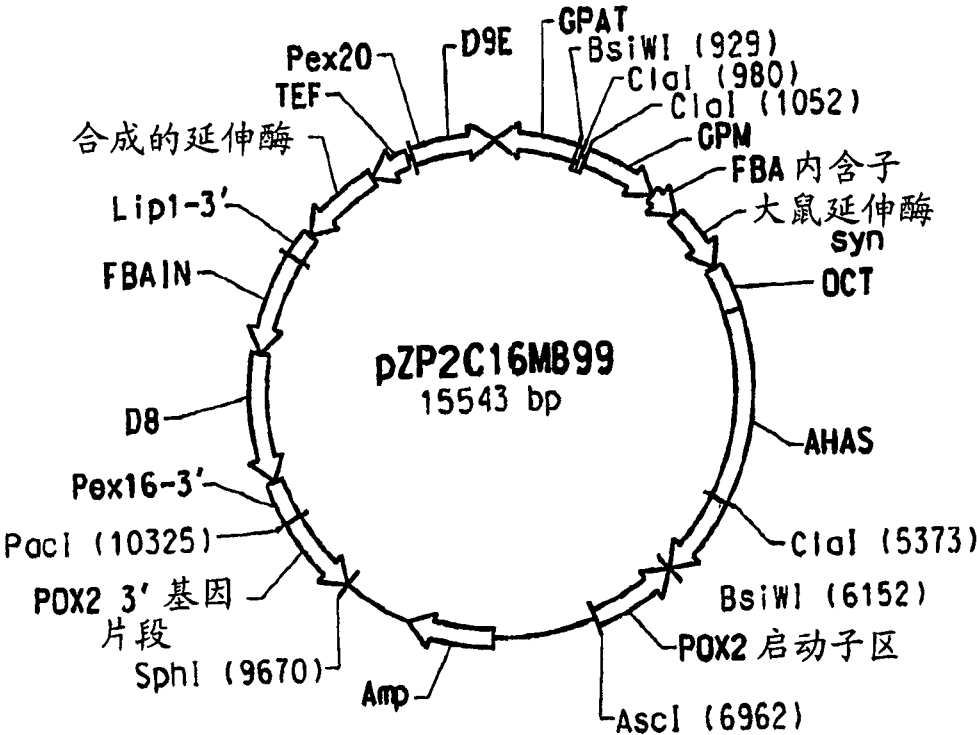


图 12A

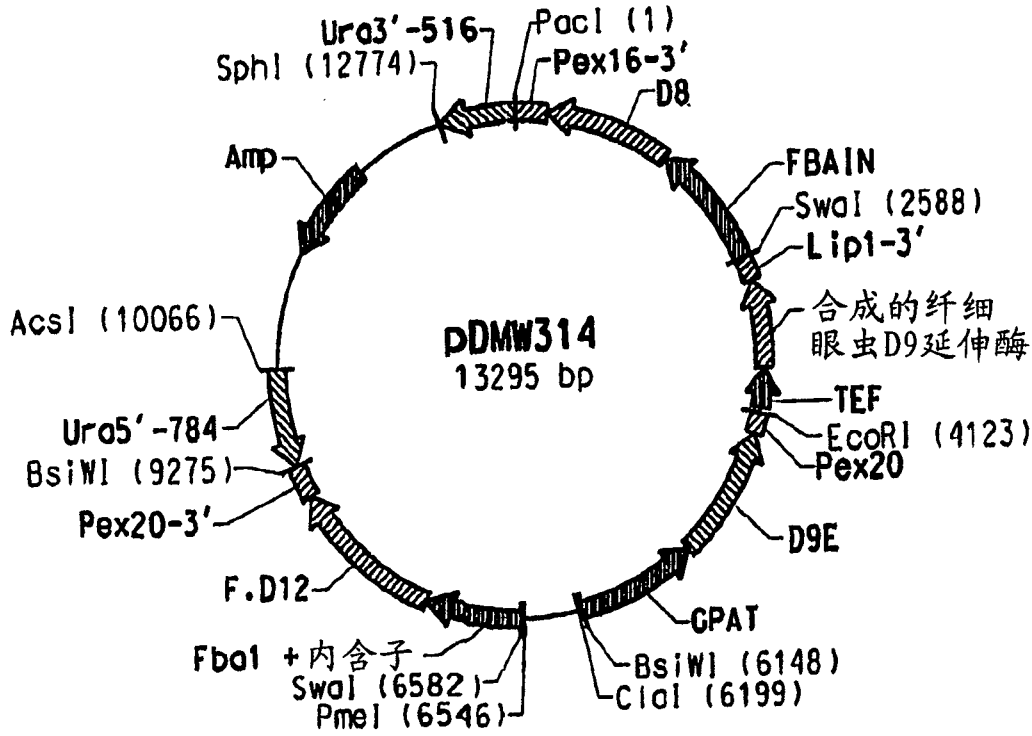


图 12B

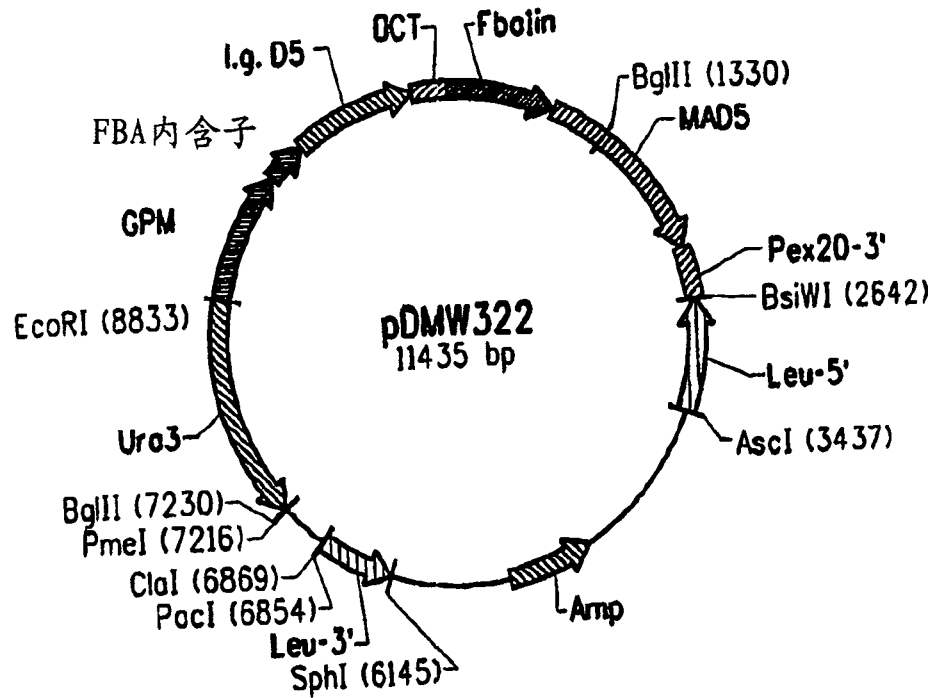


图 12C

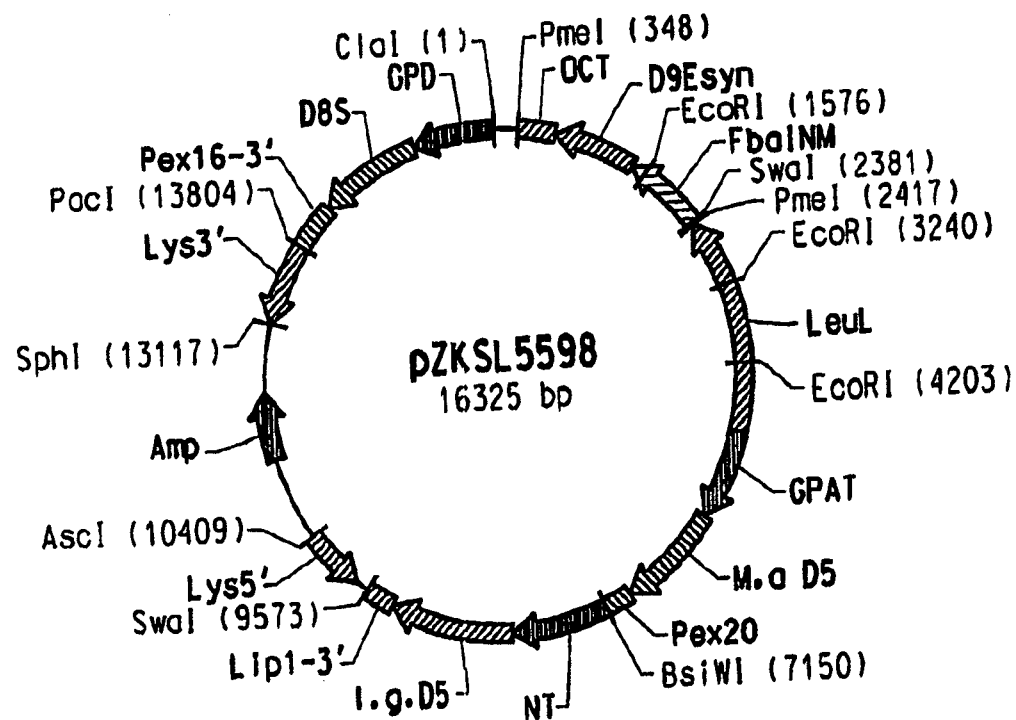


图 12D

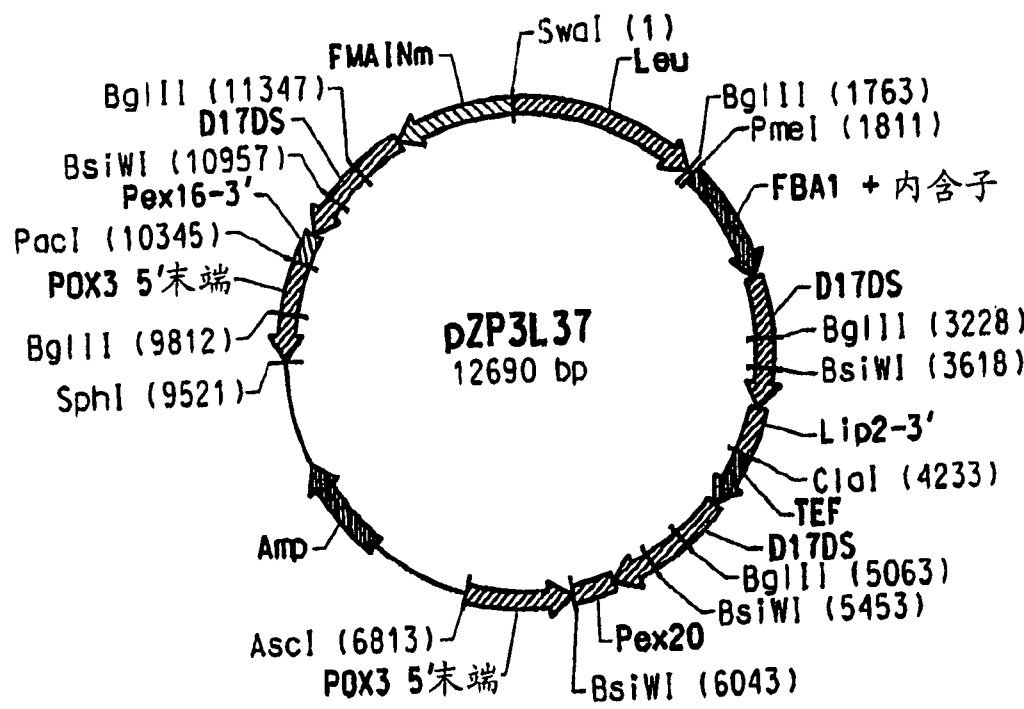


图 13A

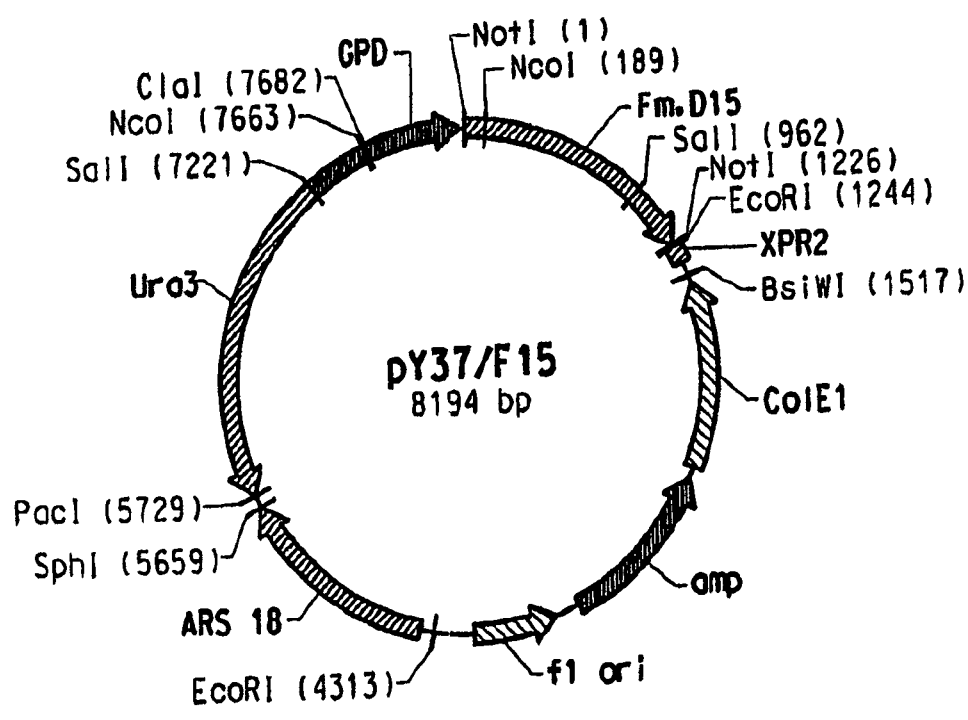


图 13B

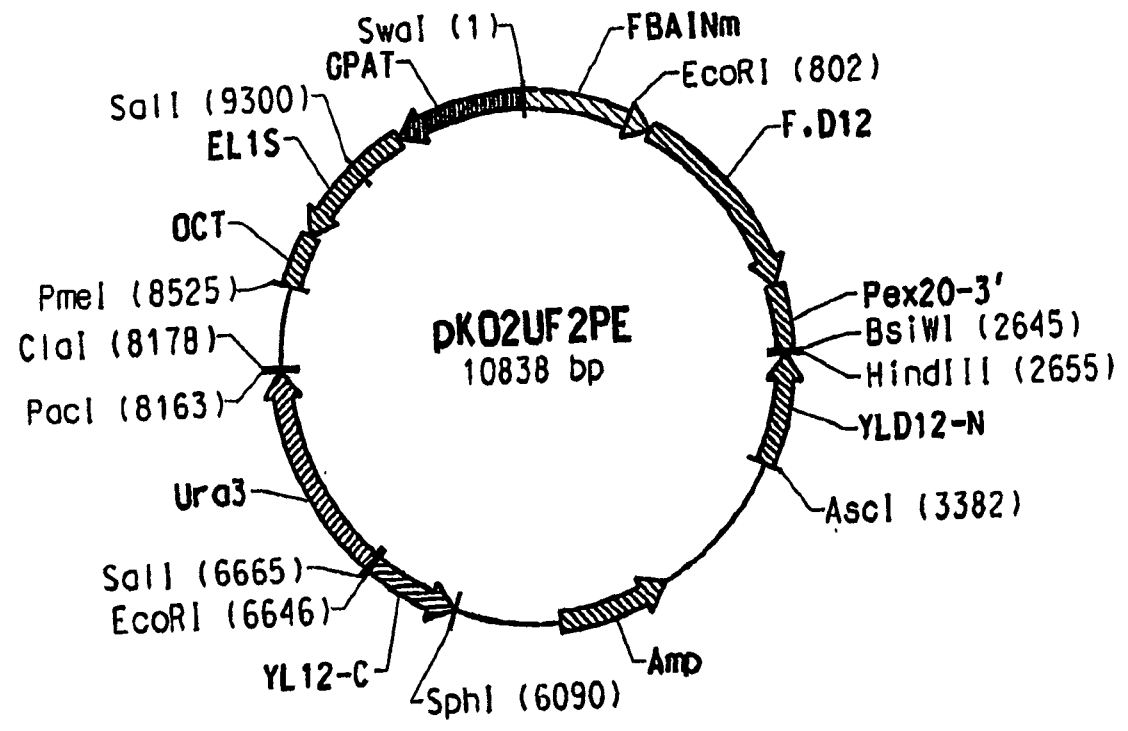


图 13C

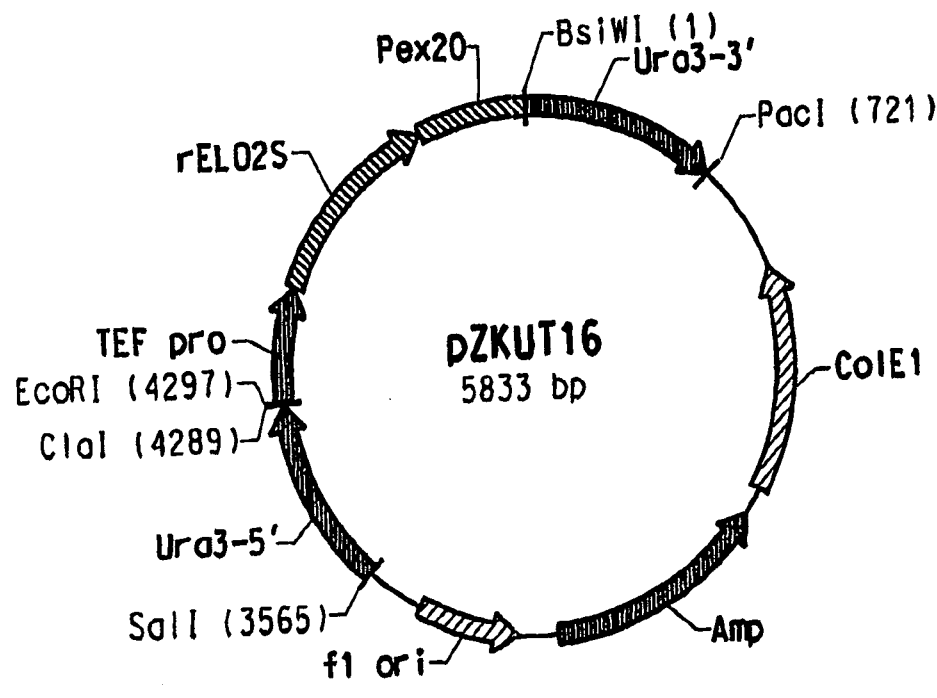


图 13D

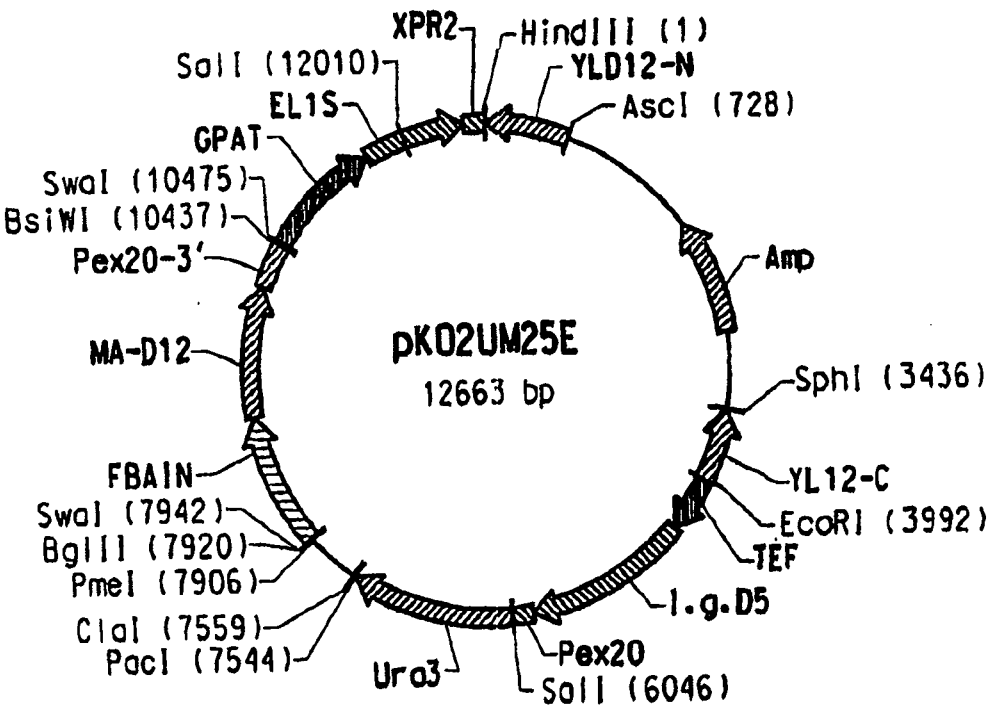


图 14A

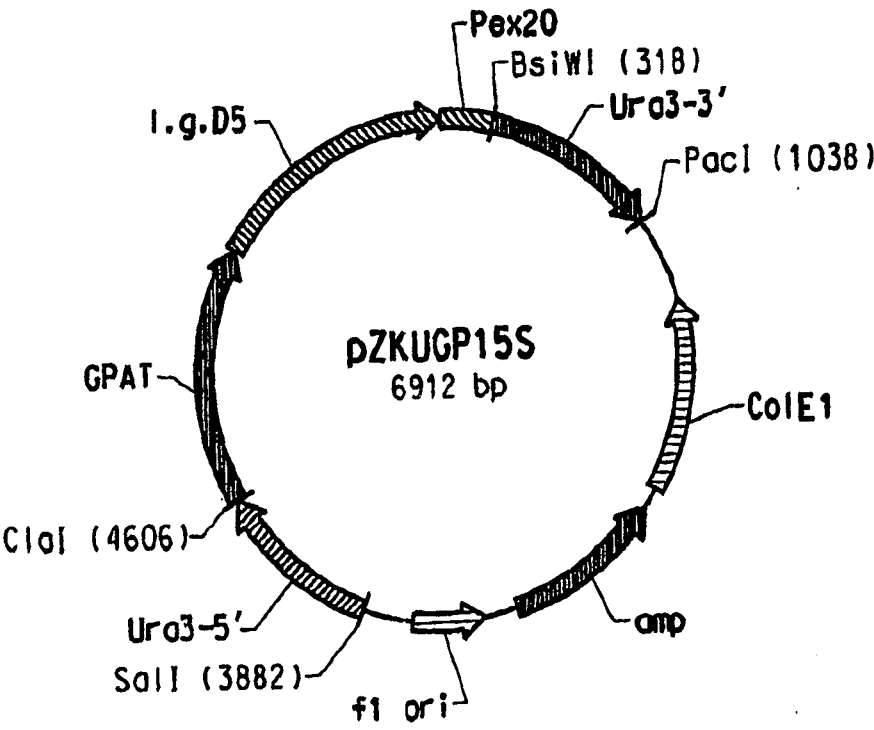


图 14B

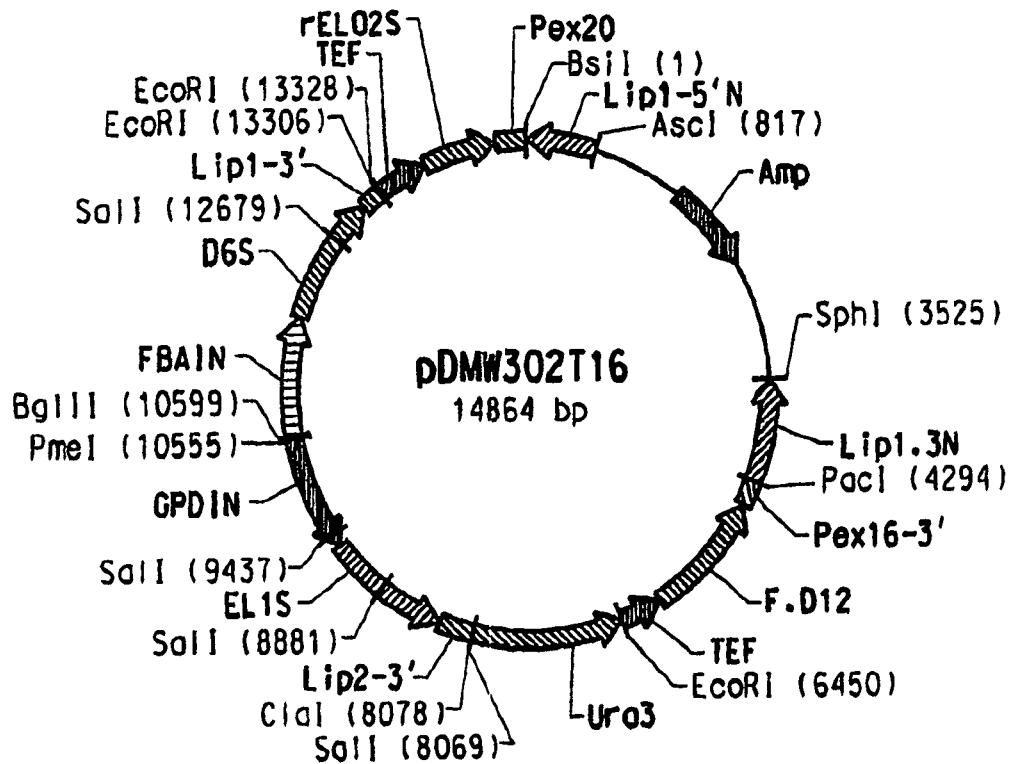


图 14C

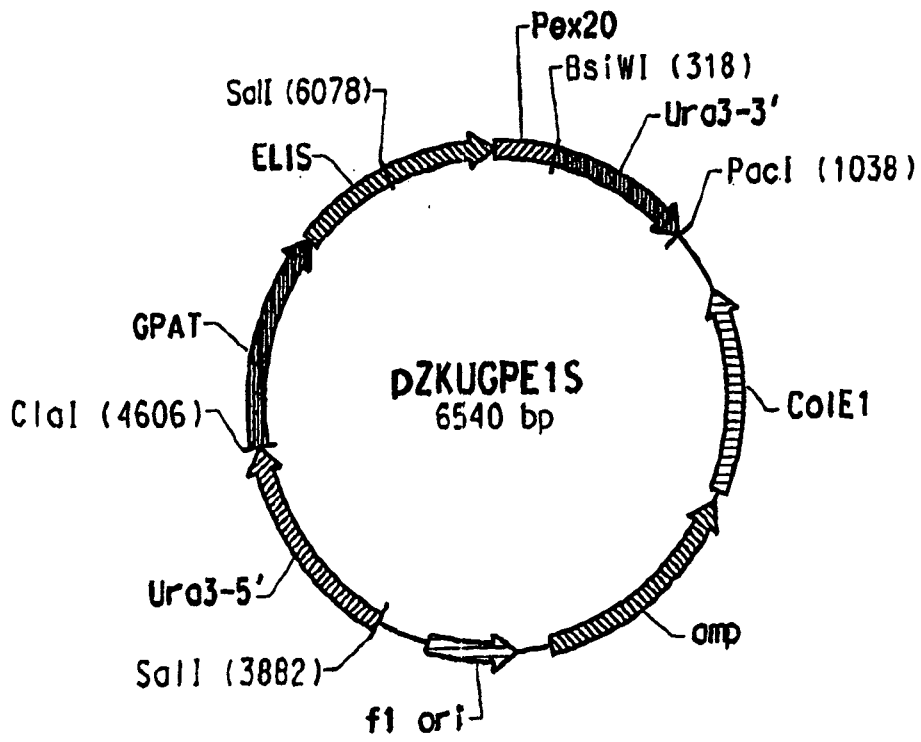


图 14D

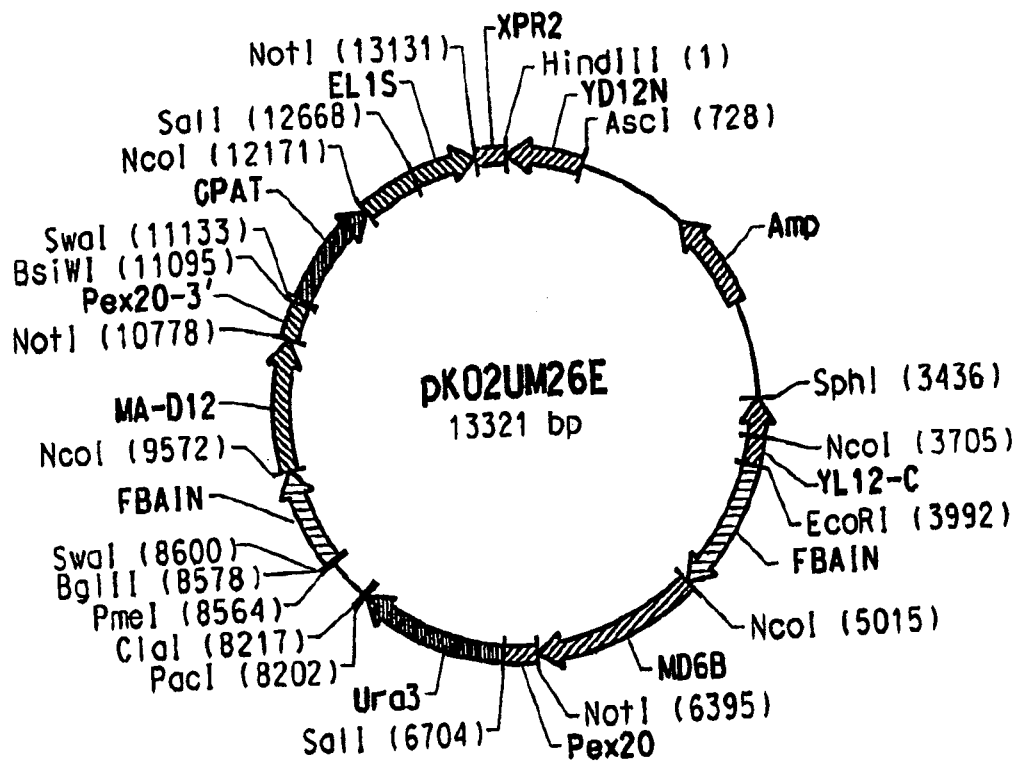


图 15A

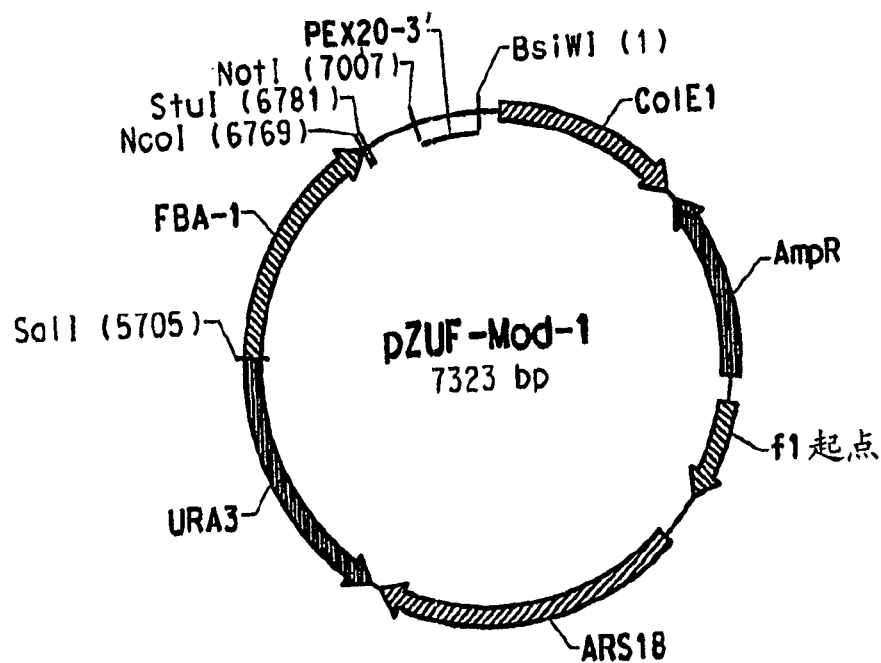


图 15B

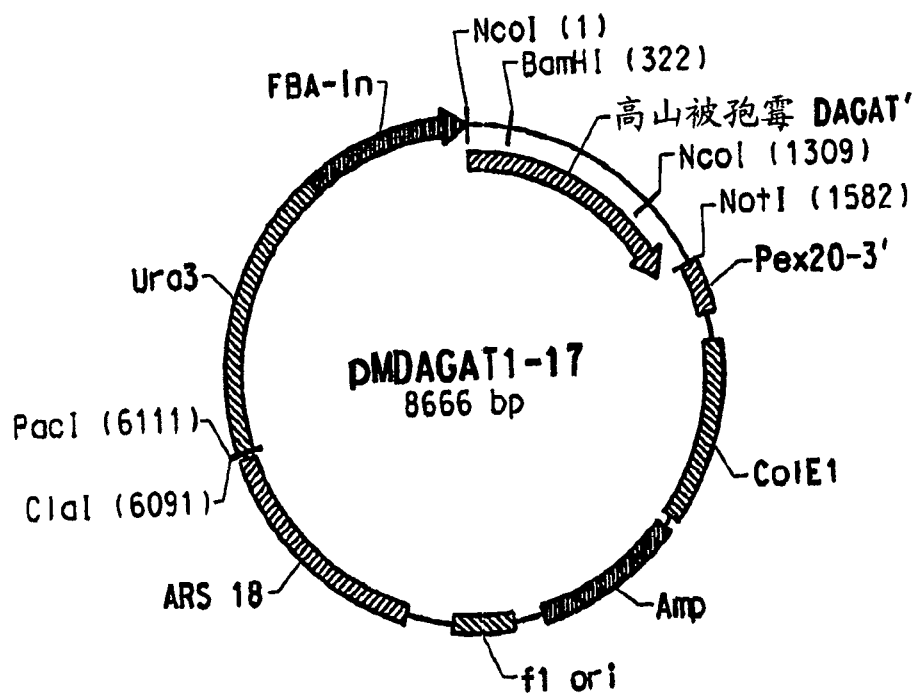


图 15C

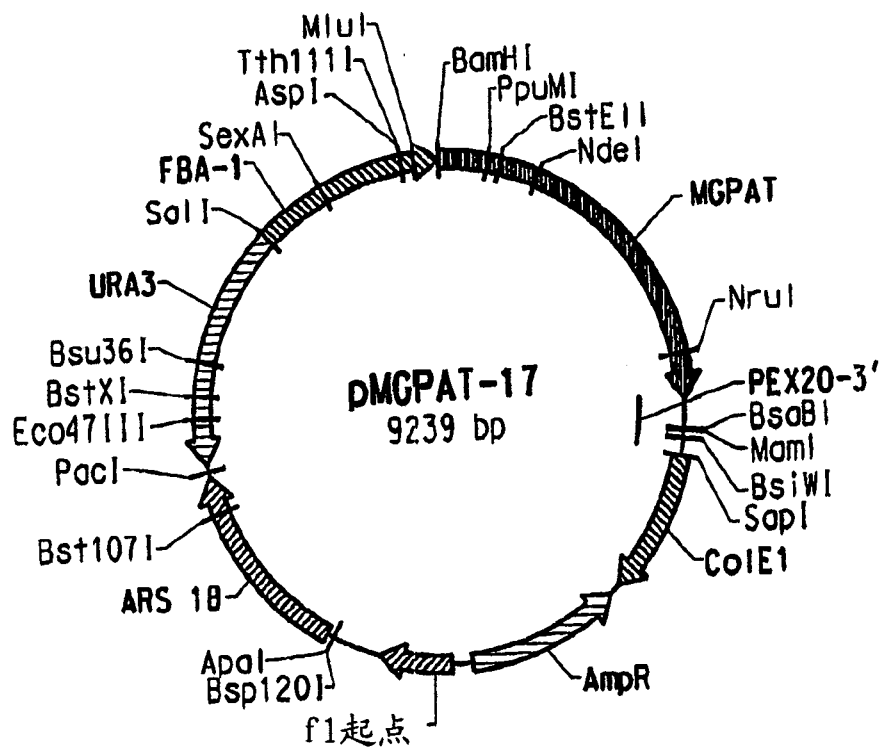


图 15D

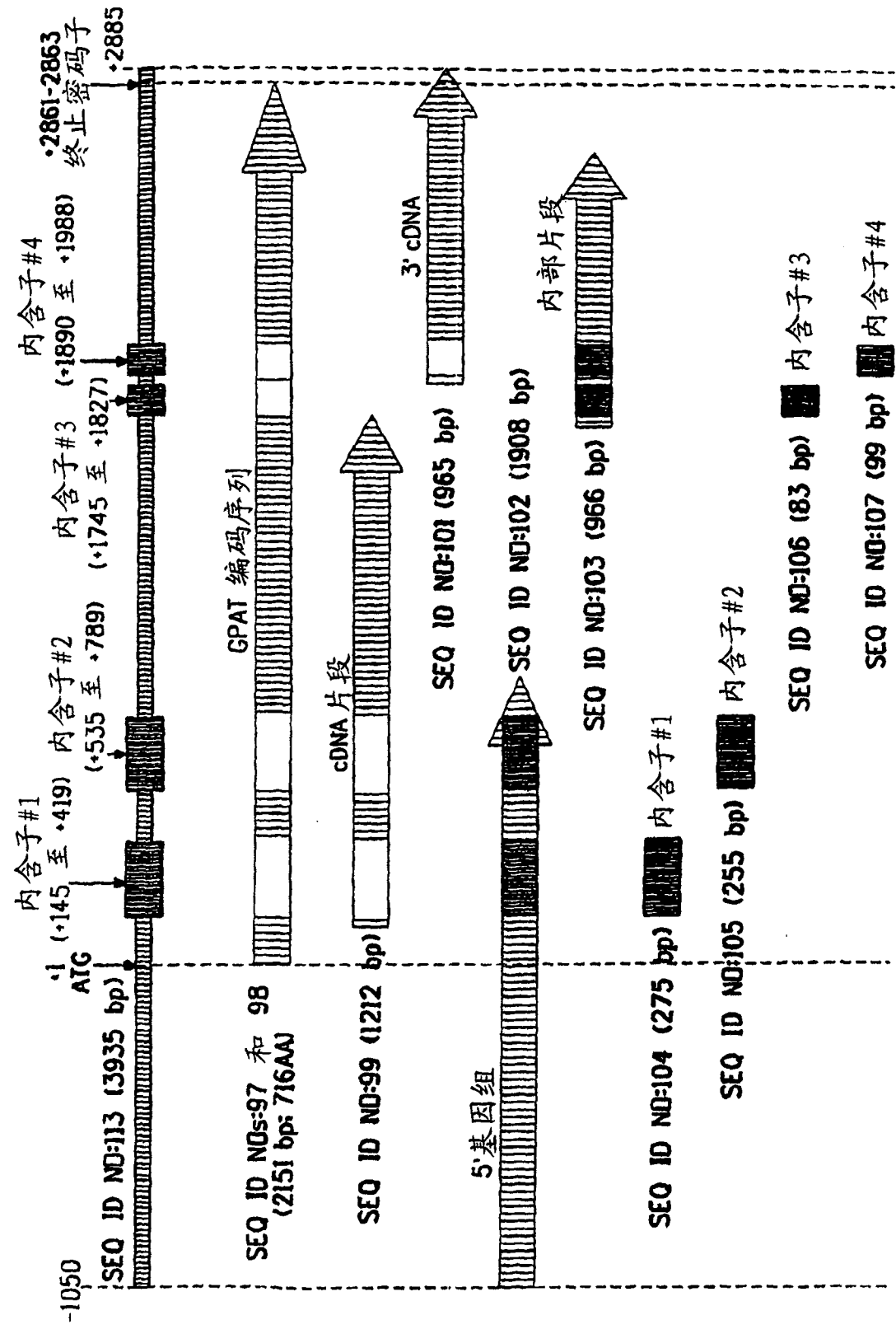
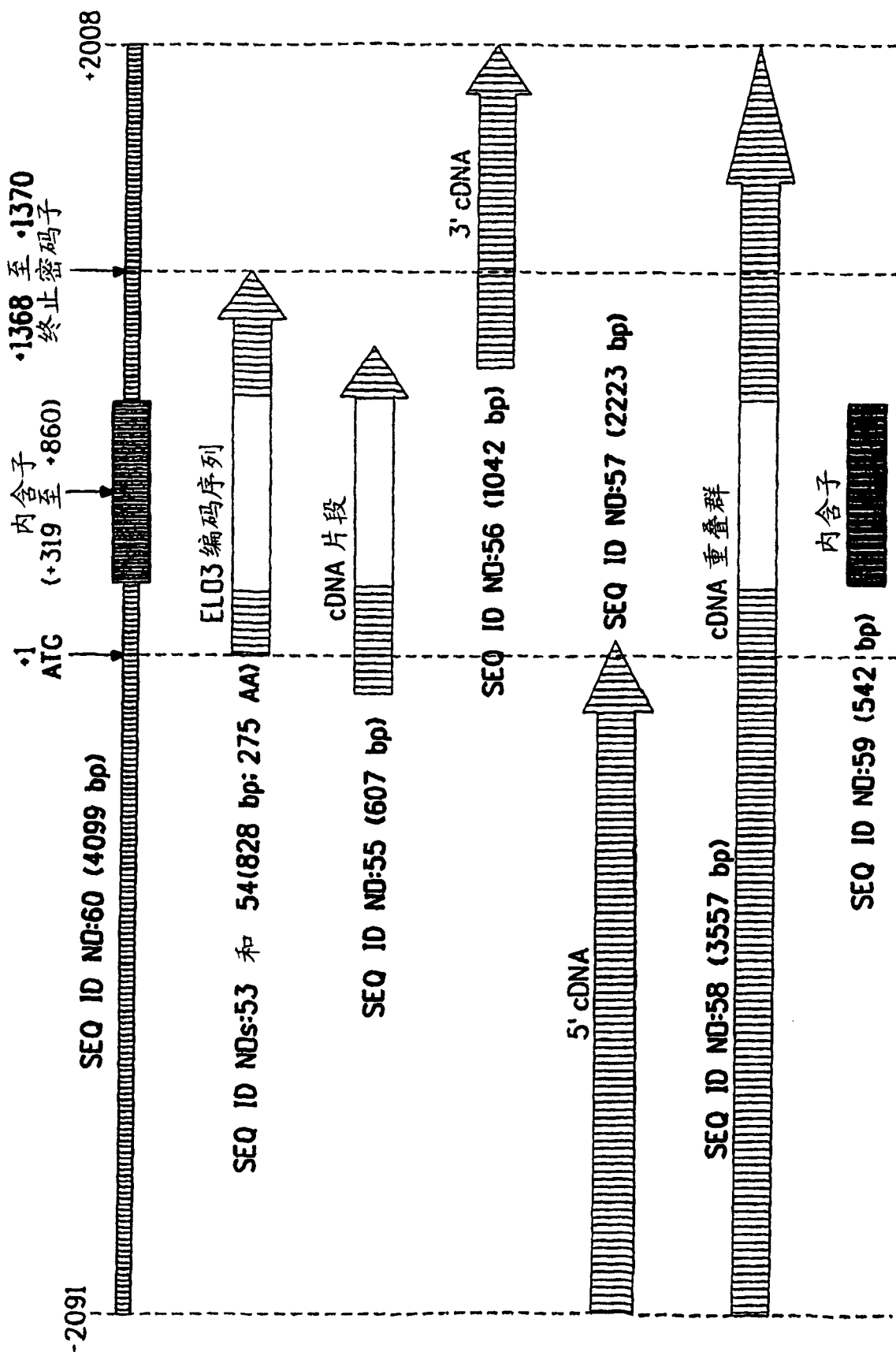


图 16



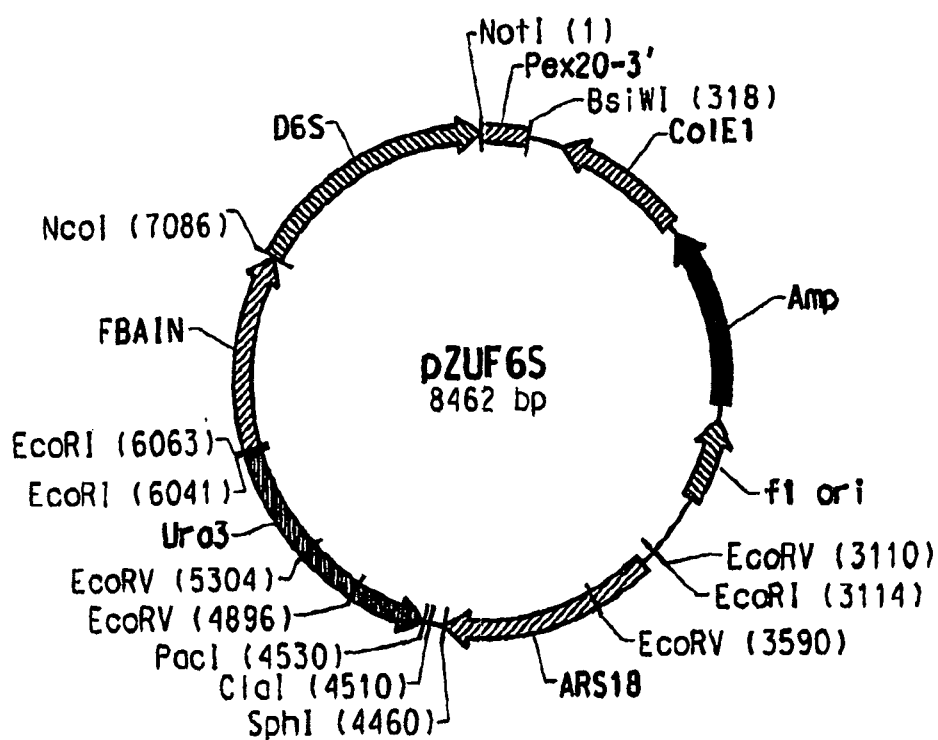


图 18A

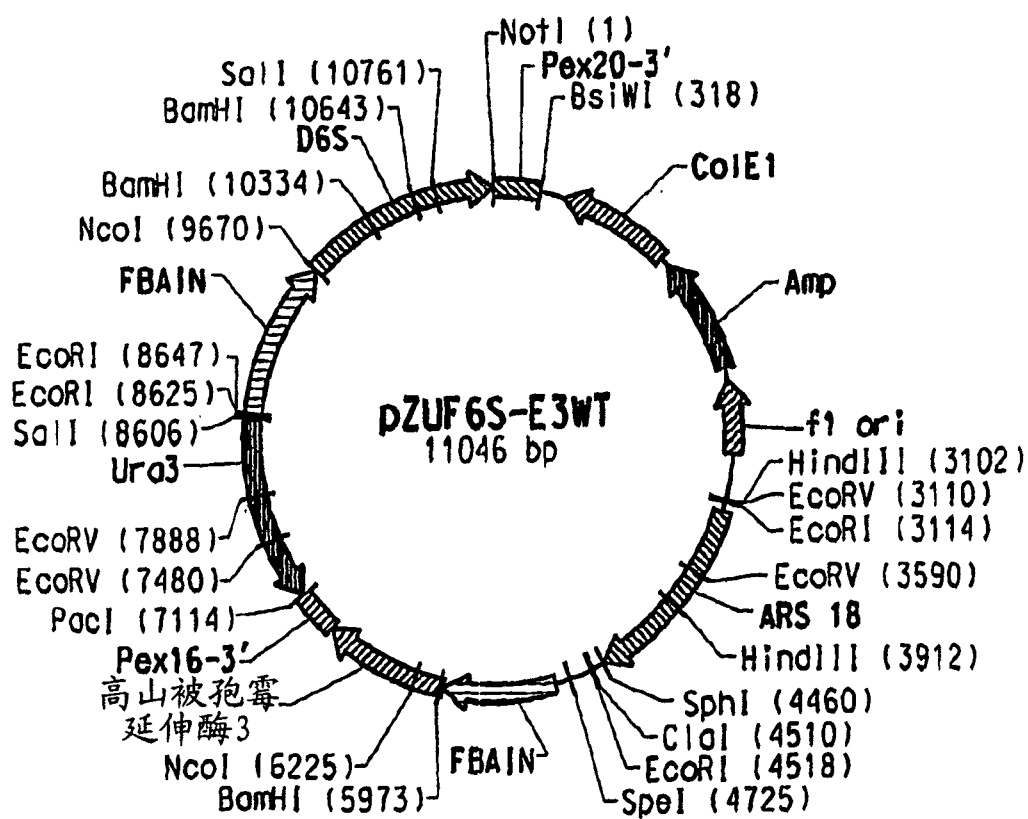


图 18B

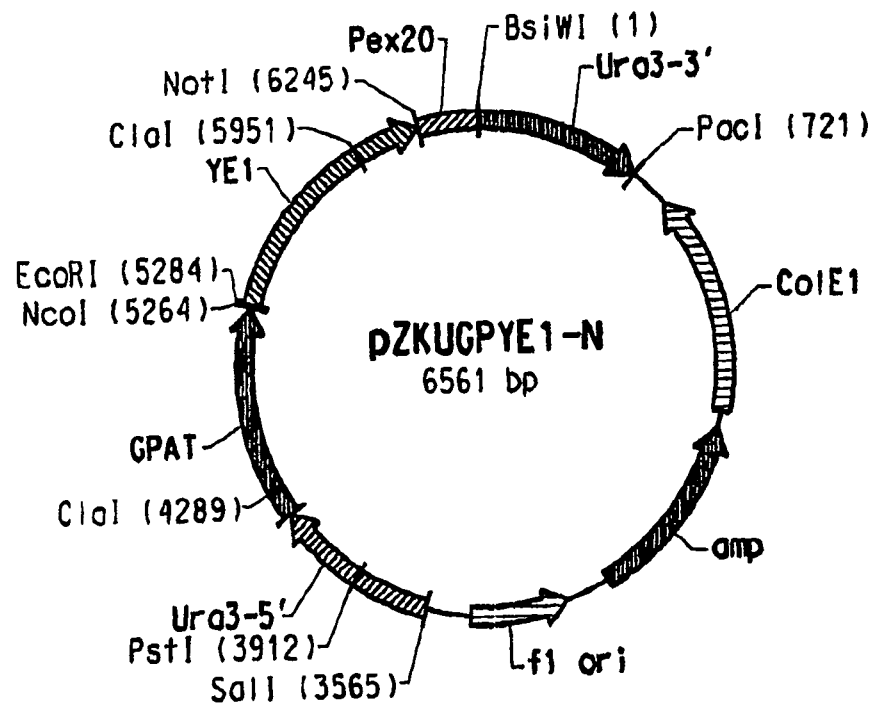


图 18C

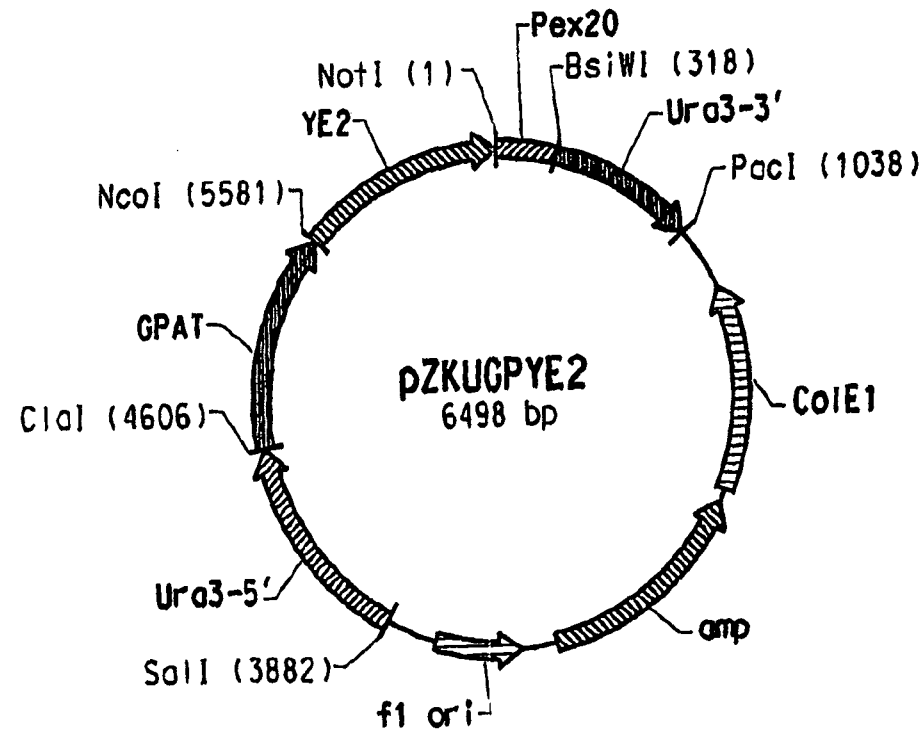


图 18D

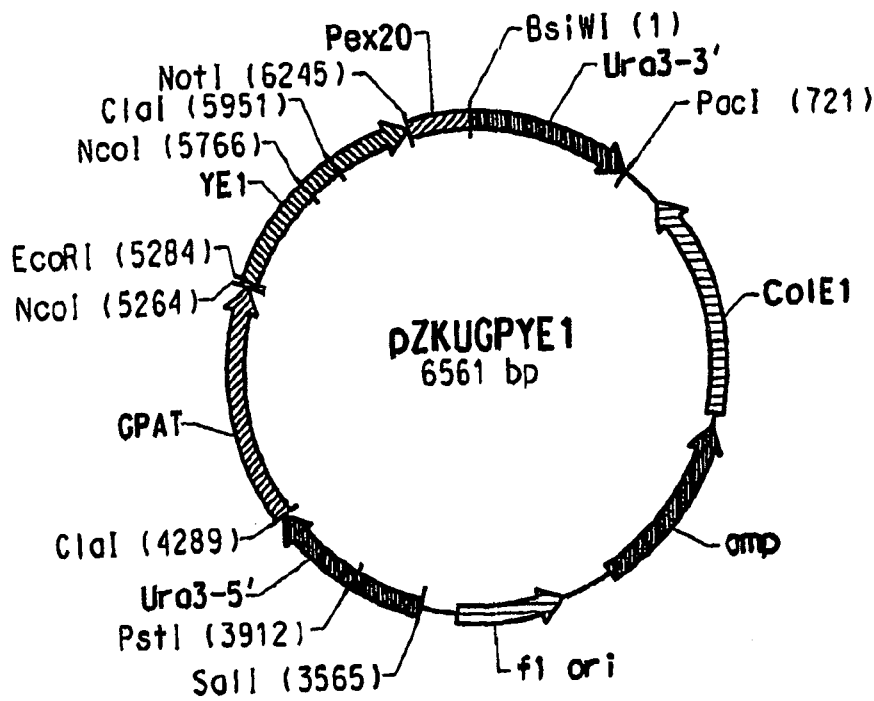


图 19A

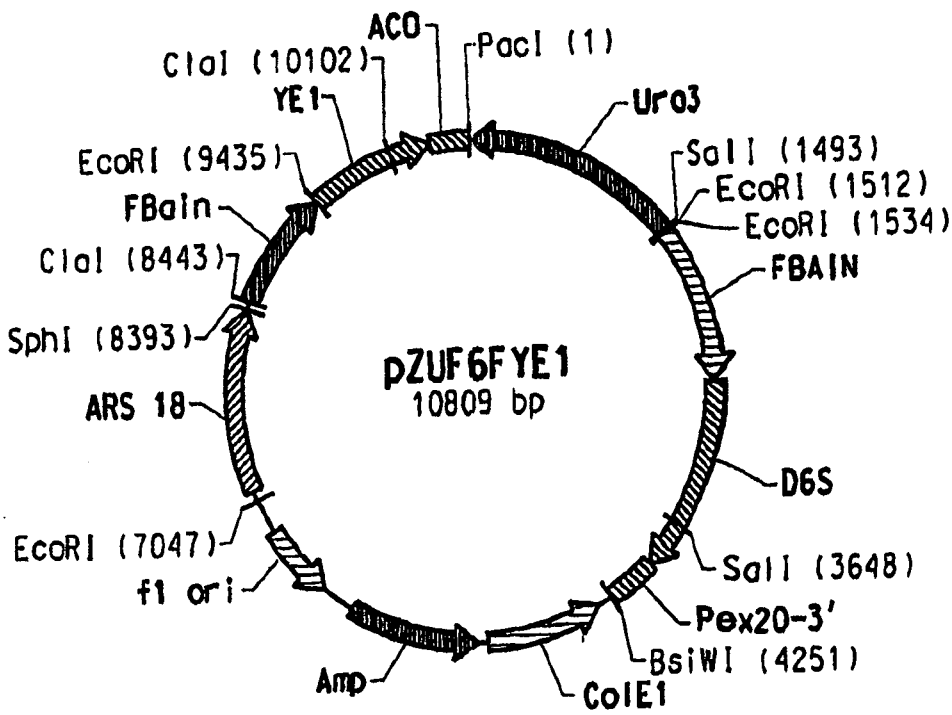


图 19B

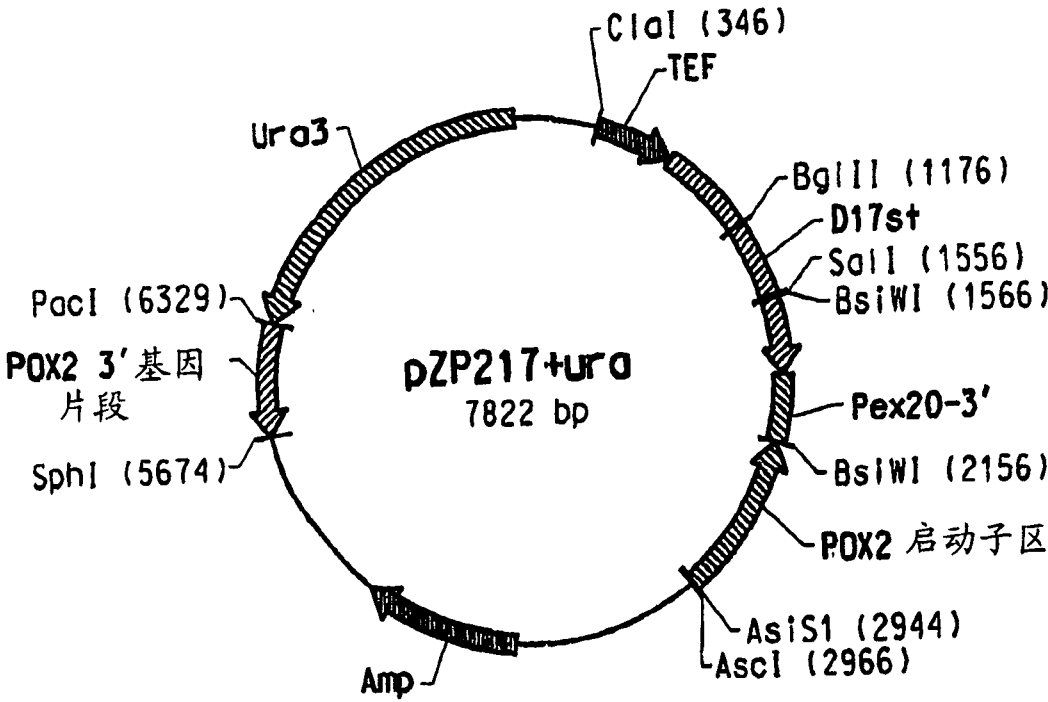


图 19C

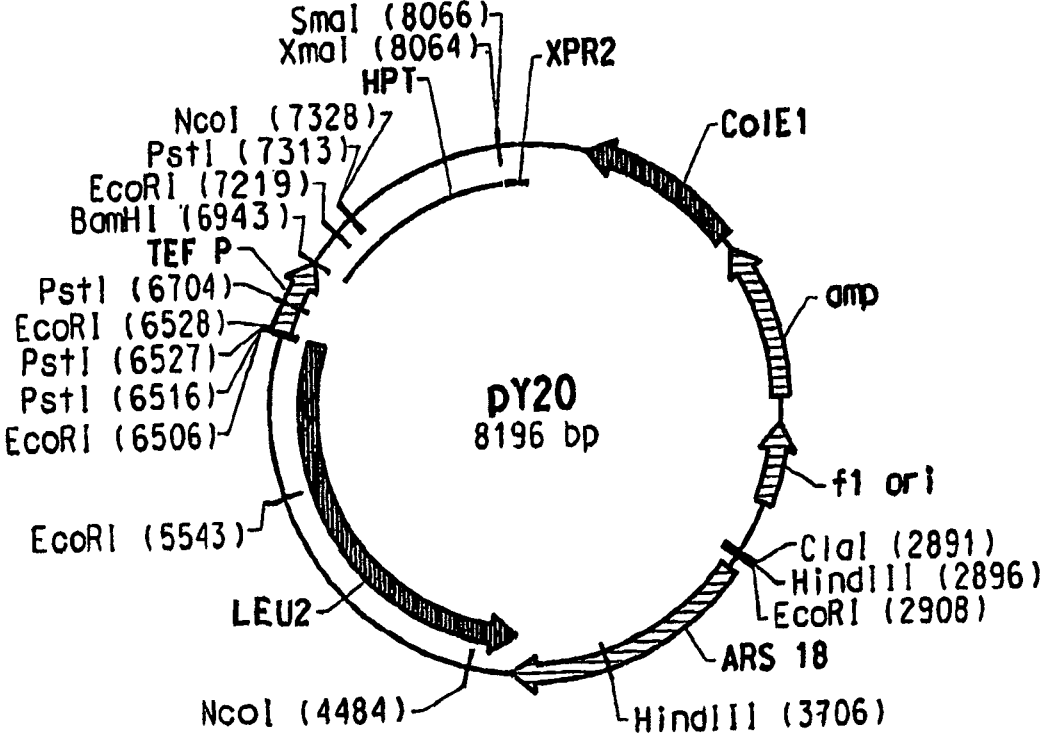


图 19D

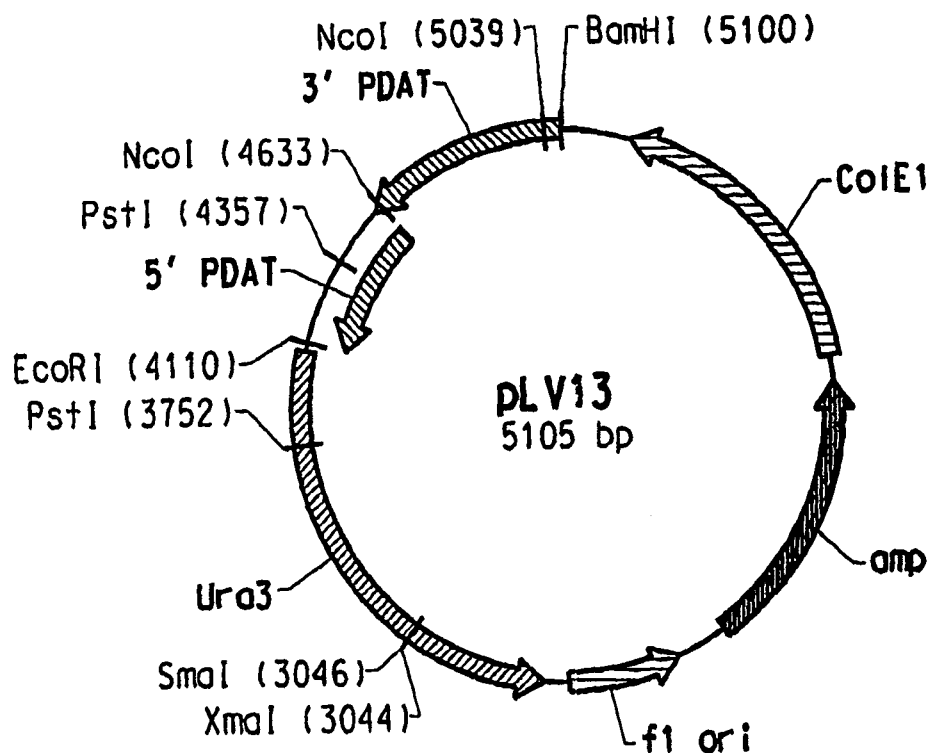


图 19E