

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 9/02

C12N 15/53

C12N 15/82

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 92102206.9

[45] 授权公告日 2001 年 3 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1062902C

[22] 申请日 1992.2.22 [24] 颁证日 2000.11.25

[21] 申请号 92102206.9

[30] 优先权

[32] 1991.2.22 [33] US [31] 659,975

[32] 1991.11.20 [33] US [31] 796,256

[32] 1991.9.27 [33] US [31] 767,251

[73] 专利权人 加利福尼亚基因公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 J·G·梅茨 M·R·波拉德

[56] 参考文献

THE BITCHISTRY OF PLANTD VOL.4 1980. 1. 1 p.

e. kolattudy "cutin subein and waxes"

THE JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTY

SOCIETY VOL. 52 1975. 1. 1 d. m. yemanos compot-

ion of jojoba seed dumig development

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪 洋

审查员 孙广秀

权利要求书 1 页 说明书 48 页 附图页数 6 页

[54] 发明名称 在宿主细胞中生产酯酰还原酶的方法

[57] 摘要

本发明提供了在宿主细胞中生产脂酰还原酶的方法。所述脂酰还原酶在从脂酰 基底物形成脂肪族醇的过程中具有活性。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种在植物细胞中生产希蒙德木脂酰还原酶的方法，它包括：

培养含有重组构建体的植物细胞，

所说的重组构建体含有如图 1 所示的编码希蒙德木脂酰还原酶的核苷酸序列，其中的还原酶在从脂酰基底物形成脂肪族醇的过程中具有活性，其中所说的还原酶编码序列是由在植物细胞中起作用的调节因子控制的，

培养是在允许所说还原酶序列表达的条件下进行的。

2. 权利要求 1 的方法，其中所说的植物细胞是种子植物胚细胞。

3. 权利要求 1 的方法，所说的植物细胞是芸苔属。

4. 权利要求 1 的方法，所说的核苷酸序列可从种子植物获得。

99 03 16

说明书

在宿主细胞中生产脂酰还原酶的方法

本申请是U S S N 07/796,256(1991年11月20日申请)和U S S N 07/767,251(1991年9月27日申请)的部分后续申请,而上述后一申请又是U S S N 07/659,975(1991年2月22日)的部分后续申请。

本发明涉及植物酶,纯化及获得这些酶和与其相关的氨基酸和核酸序列的方法,以及使用这些组合物的方法。

脂肪酸是具有约4-24个碳原子的碳烃链的有机酸。已知许多不同种类的脂肪酸其链的长度以及是否存在双键,其数量和位置不同。在细胞中,脂肪酸通常以共价键形式存在,羧基部分被称作脂酰基。这些分子的链长度与饱和度经常以通式 $C_X:Y$ 表示,其中X是指碳原子,Y是指双键数。由于脂酰分子的碳链总是含有偶数碳原子,所以也可以用通式“ C_{2x} ”表示碳链长度。

脂酰基是很多脂的主要成分,其长的、非极性烃链造成了这些脂分子的水不溶性。脂酰基与其他因子共价键合的类型是可以变化的。例如,在生物合成反应中它们可以通过硫酯键,按照特定的酶促反应与酰基载体蛋白(ACP)或者与辅酶A(CoA)共价键合。在蜡中,脂酰基通过酯键与脂肪醇连接,而三酰基甘油具有三个脂酰基,它们通过酯键与甘油分子连接。

我们已经对很多能贮存脂例如主要由长链(具有16或18个碳)

脂酰基构成的三酰基甘油的植物进行了研究。特定长链的（具有 20—24 个碳）单不饱和脂酰基是通过酰基辅酶 A 的延长作用从 C₁₈:1 形成的，并且在很多植物种子，特别是十字花科成员中发现了它们。沙漠灌木，*Simmondsia chinensis*，更好称为希蒙德木，是较高级植物（产生种子的植物）中唯一能够产生并贮存大量液体蜡的，这些液体蜡是其种子贮存脂的主要成分。这些简单的蜡化合物是特殊长链单烯脂酰基与醇的氧酯。

其他类型的蜡可以由某些种的植物形成。植物合成的表皮或上皮蜡，以及由细菌例如不动细胞属（Fixter et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3147-3157）和微球菌属（Lloyd (1987) Microbios 52:29-37），以及由单细胞绿藻，眼虫属合成的蜡是众所周知的。但是，这些蜡的组成及生物合成途径不同于希蒙德木种子蜡。

例如在眼虫属贮存蜡的形成中，已经证实醇部分是由脂酰辅酶 A 还原酶催化脂酰化合物的依赖于 NADH 的还原反应形成的。在希蒙德木种子中，该反应是依赖于 NADH 的。可以假定特殊长链的脂酰辅酶 A 还原成相应的醇依赖于一种单一的酶，其活性已经在发育中的希蒙德木种子的粗提取物中发现（Pollard 等人 (1979) Lipids 14:651-662；Wu 等人 (1981) Lipids 16:897-902）。通过对植物上皮蜡的形成进行比较，还报道了一种两步法（Kolattukudy (1980), The Biochemistry of plants (Stumpf, P.K. 和 Conn, E. E. eds) 第 4 卷第 571-645 页）。通过 NADH 依赖性还原酶作用，脂酰辅酶 A 转化成为游离的醛，随后通过 NADPH 依赖性脂肪醛还原酶作用形成醇。

由于缺乏识别与酶活性有关的多肽的方案，因而阻碍了对形成植

物中蜡酯的酶的进一步表征。因此需要进一步研究植物脂酰还原酶蛋白以设计一种纯化方案，从而可以识别还原酶多肽。通过建立这些方法，可以得到足量的植物脂酰还原酶蛋白，并可以测定该蛋白质的氨基酸序列和/或可以得到脂酰还原酶的特异性抗体。所得到的氨基酸序列可以用于聚合酶链反应（PCR）技术或用于筛选cDNA或基因库。或者，抗体可用于筛选表达基因库以识别表达脂酰还原酶蛋白的克隆。可以对以此方式获得的克隆进行分析以识别出与植物脂酰还原酶相对应的核酸序列。

已有报道，发育中的希蒙德木胚胎的无细胞匀浆具有NADPH依赖性脂酰辅酶A还原酶活性。其活性物结合到差速离心所形成的浮动的蜡垫中（Pollard等人（1979）上文；Wu等人（1981）上文）。

Karplus 等人描述了在已知的结合了二核苷酸的几倍数种还原酶蛋白中保存的功能性残基（Science（1991）251:60-66）。

Wildner和Hallick报道了Euglena gracilis中具有脂酰辅酶A还原酶活性的多酶复合物的增溶作用（摘自The Southwest Consortium Fifth Annual Meeting, April 22-24, 1990, Las Cruces, NM）。

Pushnik等人报道了纯化3000倍的希蒙德木还原酶蛋白（摘自The Southwest Consortium Fourth Annual Meeting, 1989年2月7日, Riverside, Ca.）。

图1提供了希蒙德木脂酰还原酶的核酸序列和转译的氨基酸序列。

通过本发明，提供了部分纯化的脂酰还原酶蛋白，其中所述蛋白在从脂酰底物形成脂肪醇中是有活性的。本发明的还原酶对于各种脂

酰底物包括酰基辅酶A和酰基-ACPs是有活性的。尽管所给出的还原酶优选作用特定链长度的酰基底物或者它可以对具有很宽范围碳链长度的酰基底物具有活性，这些底物的碳链长度仍是可以改变的。

尽管可以对其他酰基底物进行实验并进一步发现活性，但是通常本发明还原酶至少对具有16-24碳链长度的那些酰基底物具有活性，该碳链长度可以用通式“C_{2x}”表示，其中，“X”是8-12的数。另外，由于获得了本发明的还原酶蛋白，可以使用如下文中进一步详述的其它的操作方法。利用这些操作可以产生或发现其他有关的还原酶。

因此，第一方面，本发明涉及证明脂酰还原酶酶促活性的蛋白质制剂，并且以种子植物的蛋白质制剂举例说明。通过分离希蒙德木胚芽以产生微粒体膜制剂、使该膜制剂中的还原酶蛋白质溶解并通过色谱法进一步纯化得到上述制剂。尽管希蒙德木还原酶对其他酰基底物也具有活性，但是优先作用于特定长链的酰基辅酶A底物，并且已证实它是NADPH依赖性的。

通过这些方法，得到含有两种重要多肽的部分纯化的还原酶制剂，这两种多肽在聚丙烯酰胺凝胶上迁移成双带，其表观分子量约为54和52KD。因此提供了通过从种子植物源纯化获得酰基还原酶蛋白的方法，以及获得这些还原酶蛋白的氨基酸序列的方法。

本发明的另一方面是考虑与本发明还原酶有关的核酸序列。我们将描述这些方法，以识别这些序列，并从本发明还原酶蛋白的氨基酸序列得到这些核酸序列。本文描述了使用该结构基因序列分离其他还原酶序列，以及构建于重组构件中以在宿主细胞中转录还原酶核酸序列和/或表达还原酶蛋白。本发明还考虑了使用其它与还原酶蛋白

有关的核酸序列，例如使用 5' 和 3' 非编码区。

本发明的再一个方面是考虑含有本发明重组构件的细胞。尤其是考虑那些含有优选的希蒙德木还原酶底物的细胞，例如在芸苔属植物胚胎中的细胞。

另外，本发明考虑了由本发明重组构件表达的含有本发明还原酶蛋白的细胞。因此，本发明中也考虑了在宿主细胞中表达这种蛋白，回收而得到的还原酶蛋白。进一步可以认识到本发明的还原酶可用于在这些宿主细胞中生产脂肪醇。

本发明的脂酰还原酶包括任何能催化脂酰基还原成相应的醇的氨基酸序列，例如蛋白质，多肽或肽片段。脂酰基是指任何与载体例如 ACP 或辅酶 A 共价结合的脂酰基。

由于该酶促反应包括可通过两步进行的 4 个电子还原过程，所以脂酰基还原成醇可以需要或不需要其他的酶。第一步可以将酰基转化成醛，然后将醛还原成相应的醇。因此，本发明的还原酶可以在从脂酰基至醇的整个 4 电子还原中具有活性，或者可以催化还原反应形成醛，然后由第二种酶将醛进一步还原成为醇。所得到的证据进一步表明，由单一的酶进行了酰基辅酶 A 至醇的整个还原过程。本发明的脂酰还原酶在下文中又称作“酰基还原酶”或“还原酶”。

因此，本发明涉及能使脂酰基转化成为醇的种子植物脂酰还原酶。更具体地说，本发明涉及 NADPH 依赖性还原酶。另外，值得注意的是，本发明的植物脂酰还原酶对脂酰辅酶 A 或脂酰-ACP 两种分子都具有活性，并且发现其活性依赖于所用的底物。但是，我们希望对于脂肪酸合成酶 (FAS) 酰基辅酶 A 延长途径的操作，该活性对特殊长链酰基辅酶 A 底物是优先的。

通过本发明测定了种子植物脂酰还原酶蛋白是完整的膜蛋白。通常与膜有关的蛋白是难于纯化的，因为将它们溶解时即从其具有正常功能的膜环境中分离时，它们会失去酶促活性。但是，所获得的仍然保留其酶促活性的种子植物脂酰还原酶可以进行各种应用，而使用膜结合蛋白不可能具有这些用途。

例如，一旦获得纯化的或部分纯化的酰基还原酶蛋白，可以将其固定，并且在还原的吡啶核苷酸再生体系存在下用于反应器系统以制备脂肪醇。进一步说，对还原酶蛋白的研究导致对进一步特征的位点特异性诱变研究，以改善其催化性质或改变其酰基底物特异性。我们发现具有改变了底物特异性的还原酶可以与其他FAS酶结合使用。例如，优选的中等链长（C12—C14）的硫酯酶（见共同申请的美国专利申请07/662,007）和合适的酰基转移酶可以与改变的还原酶结合使用，以产生中等链醇，然后将其酯化成脂肪酸以产生酯。

当使用膜结合蛋白时需要考虑的一个重要因素是蛋白与膜结合的程度。外周及完整膜蛋白都是已知的。外周蛋白在自然状态下是典型的微亲水性，它们与膜只是松散地结合，并且容易被溶解。完整蛋白则与此相反，它们具有包埋在脂膜中的高度疏水区，并且如果要保留其酶促活性，通常需要将它们与脂结合。

已经用于溶解完整膜蛋白的技术包括将去污剂或有机溶剂加入到一种合适的膜成分制剂中。然后可以使用常规的纯化技术，例如沉淀、离子交换、凝胶过滤和亲和层析，假定所需蛋白仍然保留了功能活性，该活性可以用特定的酶促分析法测定。

为了获得溶解的蛋白制剂，通常第一步需要具有脂酰还原酶活性

的种子植物组织的微粒体膜制剂。标准的微粒体膜制剂利用无细胞匀浆 (CFH) 的差速离心得到不含完整细胞、胞核及可溶性蛋白的膜成分。(参见例如Moore等人, (1987) Biological Membranes: A Practical Approach, 第37-72页, eds. Finalay and Evans.) 对于油籽, 开始的离心步骤通常产生团块, 上清液和浮动的脂垫, 然后通过对上清液进一步离心可以回收微粒体部分。

在共同申请的US SN 07/659,975 (1991年2月22日申请) 中描述了一种方案, 通过该方案获得了含有活性脂酰还原酶蛋白的膜成分, 与CFH中成分相比, 该膜成分具有良好复原的还原酶活性。在此方法中关键的步骤是除去希蒙德木胚芽上的种子表皮, 因为我们发现该表皮中含有干扰酶学测量的因子。该方法在开始的部分方案中使用了高盐溶液, 下面还将描述该步骤, 并且在下面的实施例中将进行更详细的描述。

制备希蒙德木胚芽样品粉末, 将粉末在高盐 (3 M NaCl) 蔗糖 (0.3 M) 溶液中、以80 ml溶液/20 gm胚芽的比率进行均化, 制备匀浆。然后将匀浆过滤并以100,000 Xg的速度离心约1小时, 得到团块、上清液和浮动的脂垫。除去脂垫, 收集上清液, 并在含有100 mM HEPES (pH 7.5)、2 mM DTT和0.5 mM EDTA的1 M NaCl溶液中透析。然后将透析液以100,000 Xg的速度, 优选以200,000 Xg的速度离心约1小时, 得到团块DP2, 其中含有具有脂酰辅酶A还原酶活性的微粒体膜。

通过设计一种脂酰还原酶的最佳特定分析方法, 可以有利于发现微粒体膜制剂中和进一步纯化过程中脂酰还原酶活性的进一步特征。例如, 对于希蒙德木使用这样一种分析法, 该方法利用特定长链脂酰

辅酶A分子作底物，在高盐（0.2 M至0.5 M NaCl）条件下进行。已经发现高盐能显著增加脂酰辅酶A还原酶的可测活性。该分析方法将在实施例中进行详细描述。

酶的其他特征及纯化所需的另一重要步骤是获得溶解的还原酶蛋白，该蛋白是从其天然脂双层膜环境中分离出来，但是保留了足够量的可测还原酶酶促活性。通常使用两亲洗涤剂的水溶液将完整膜蛋白从脂双层中除去，尽管在某些情况下也使用有机溶剂。市售的洗涤剂有很多不同的种类，包括离子型的和非离子型的，它们的离解效应，临界胶束浓度（CMC），对酶促活性和进一步纯化的影响以及从溶液中除去的难易程度不同。对于本领域的专业人员来说，许多不同的洗涤剂和膜蛋白溶解方法是已知的，这些方法已经由 Neugebauer (Methods Enzymol. (1990) 182:239-253)和 Hjelmiland (Methods Enzymol. (1990) 182:253-264)综述。

经常发现，用于使膜蛋白增溶的洗涤剂会抑制所需蛋白的酶促活性。用代表很宽范围特征的几种洗涤剂测试其对希蒙德木脂酰还原酶的溶解性，发现所有洗涤剂都具有抑制作用。但是，由于还原酶活性的表观洗涤剂抑制作用可以归因于除不可逆性酶抑制作用外的某些效应，所以对CHAPS引起的可逆性抑制作用进行测定。

尽管洗涤剂CHAPS（3-[(3-乙醇酰氨基丙基)-二甲基-氨]-1-丙磺酸）在高于CMC的浓度时具有很强的抑制作用，我们仍然发现，如果将酶暴露于冰上的CHAPS中，然后恢复至CMC值或低于CMC值的CHAPS浓度，那么还原酶活性可以完全恢复。因此，还原酶不是被洗涤剂CHAPS不可逆地抑制。已经设计出利用洗涤剂CHAPS使希蒙德木脂酰还原酶活性溶解的方案，

通过该方法从微粒体膜制剂中产生约 85% 的还原酶活性。在实施例 2 中将详细讨论该方法。同样可以对其他洗涤剂引起的可逆性表观还原酶抑制作用进行研究，以识别能够使希蒙德木或其他候选还原酶的脂酰还原酶活性溶解的其他有用的洗涤剂。

由于获得了溶解的脂酰还原酶蛋白，因此，目前可以对酶的对底物特异性，对辅助因子的要求以及可能的活性抑制剂这些特性进行进一步试验。例如已经发现，本发明的希蒙德木脂酰还原酶具有很宽范围的底物，包括 ACP 和辅酶 A 底物。例如已经发现对具有至少 16 个碳的脂酰-ACP 底物具有活性，并且对具有至少 18 个碳的脂酰辅酶 A 底物具有活性。优选的是对 [C 15]-15-二十四碳烯酰基辅酶 A (C 24:1) 具有活性。

对于候选的植物脂酰还原酶蛋白，还可以进一步浓缩蛋白制剂，例如采用在固定的反应染料上进行的层析。许多这样的反应染料基质是已知的，包括用于本发明的 Cibacron Blue F3GA (Blue A)。通过本发明证明了当用含有约 0.2 M NaCl、优选的是 0.5 M NaCl 或优选 0.4 M NaCl 的缓冲液载样时，希蒙德木脂酰还原酶活性结合在柱子上，而同时大于约 85% 的其他蛋白通过柱子或者被随后冲洗掉。还证明，通过用含有约 1.0 M NaCl 的缓冲液洗脱 Blue A 柱，可以回收希蒙德木脂酰还原酶活性物。

通过将 Blue A 柱浓缩的蛋白制剂加到填有大小筛析材料的柱（有时也称凝胶过滤柱）上，对脂酰还原酶活性进一步纯化。利用该大小筛析柱还可以估算天然还原酶的大小。尤其是，使用很窄范围尺寸的柱材料例如 Ultragel AcA54 或 Sephacryl S 100 可以获得进一步纯化的希蒙德木脂酰还原酶成分。特别令人感兴趣的是这样的方法

和缓冲液，利用这些方法和缓冲液可以在一个主峰中回收由大小筛析柱负载的大于约 40 - 60 % 的还原酶活性物或其等同物。

将大小筛析柱中的还原酶活性物加至亲合柱上，可以进一步纯化还原酶蛋白。例如，可以将活性成分加至在约 0.1 M NaCl 中的棕榈酰辅酶 A 琼脂糖柱上。然后用含有 1.5 mM NADPH 和希蒙德木还原酶辅助因子的缓冲液将约 70 % 的还原酶活性物洗脱。

在纯化过程中，还可以对含有本发明脂酰还原酶活性的成分使用其他技术，例如 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳以及随后染色。用这种方法可以识别具有还原酶活性的这些成分中显著的多肽带。例如，在由棕榈酰辅酶 A 琼脂糖柱部分纯化的希蒙德木还原制剂中，可以识别出两条带，它们代表约 5.3 KD 的多肽，特别是代表具有 5.4 和 5.2 KD 表观分子量的多肽，它们占制剂中蛋白的 95 % 以上。使用不同的标记进行进一步的 SDS - PAGE 分析表明，这些还原酶蛋白的表观分子量可以更准确地确定为 5.4 和 5.6 KD，或者约 5.5 KD。

正如本文的大小筛析色谱法所证实的，由于天然还原酶的表观粒度约为 4.9 KD，所以这些带不能代表一种还原酶的两个不同的亚单位。更确切地说，还原酶活性是与这些多肽中的一种相关，或者与两者相关。这些实验，包括阴离子交换，染料柱，已酰辅酶 A 亲合柱，凝胶过滤，肝素柱以及疏醇相互作用色谱，都没有获得其他资料。

由于用于该纯化过程的希蒙德木种子是从不同的希蒙德木植物群收集的，因此这些多肽可以代表同一酶的密切相关的变异体，即同工酶。如上所述，利用对两种多肽的 Tryptic 消化及氨基酸序列分析，可以使 5.4 和 5.2 KD 带更具特征性。

现在使用各种方法都可以回收基本纯化的还原酶蛋白。例如，可

以进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，并将蛋白转移至膜支持物上，例如硝基纤维素或聚亚乙烯基二氟（PVDF）。然后可以得到含有被识别蛋白的这些膜的切片，这样所识别的蛋白就基本上不含其他蛋白。利用本领域已知的和下面实施例所描述的技术，可以将此蛋白从膜上分离，并进行进一步操作，以测定其氨基酸序列。

例如，可以通过下列方法测定氨基酸序列：对完整蛋白的N-末端氨基酸区域进行序列分析，或者通过用化学溴化氰消化制备所需蛋白的片段，或者使用蛋白酶通过酶促裂解制备所需蛋白的片段。有用的蛋白酶的例子包括胰蛋白酶，lysC、gluC、AspN和胰凝乳蛋白酶。然后可以按照本领域专业人员熟悉的方法，对由此方式得到的片段进行纯化并进行序列分析。

5.4和5.2KD候选多肽的进一步特征是可以利用的，例如，在大肠杆菌中表达各种蛋白，随后验证还原酶活性。其他实验可以包括免疫分析法，从而制备候选蛋白的特异性抗体，并发现其可以抑制蛋白制剂中的还原酶活性。

此外，需要从所测定的与脂酰还原酶活性相关的蛋白的氨基酸序列中分离核酸序列，以证实识别了脂酰还原酶蛋白，并在宿主细胞（原核或真核）中转录该序列和/或表达该蛋白。对于在细胞中表达还原酶需要进行各种操作。例如，如果在原核生物（例如大肠杆菌）中产生高浓度的该蛋白，那么它就是破坏性的甚至有毒的，因为它嵌入了细胞膜中。因此需要使用弱启动子低水平表达。或者，如果发现了能够引起膜嵌入的引导肽，就可以制备只含有能编码成熟还原酶蛋白的那些核酸序列的构件。以这种方式，可以在大肠杆菌中产生还原酶蛋白。如果大肠杆菌中的还原酶活性不能测定，例如蛋白可能没有

嵌入膜双层中，那么可以通过其他方法，例如使用抗体制剂来证实大肠杆菌细胞中存在还原酶蛋白。

由于脂酰还原酶是膜结合蛋白，所以需要在植物细胞中表达候选蛋白以验证还原酶活性。

利用对植物组织进行电击穿或轰击试验可以完成瞬间表达，从而达到此目的。但是最终需要在植物（例如能产生被该酶识别的底物的芸苔属成员）中稳定地表达还原酶蛋白。按照这种方法，可以得到脂酰醇产物，它们用于药物，化妆品、洗涤剂、塑料和润滑油中。

本发明的还原酶核酸可以是基因组或cDNA，它们可以从cDNA或基因组库中分离，或者直接从植物DNA中分离。一旦分离出蛋白和/或得到该蛋白的氨基酸序列，那么基因序列的分离方法就是本领域专业人员已知的。

例如，可以制备分离到的蛋白的抗体，并用于筛选表达文库，从而识别产生植物脂酰还原酶蛋白或其抗原片段的克隆。或者，可以从氨基酸序列合成寡核苷酸，并用于分离核酸序列。寡核苷酸可适用于PCR以产生核酸片段，然后该核酸片段可用于筛选cDNA或基因组文库。按照不同的途径，寡核苷酸可直接用于分析Northern或印迹，以识别有用的探针和杂交条件，在此杂交条件下，这些寡核苷酸可用于筛选cDNA或基因组文库。

本发明的脂酰还原酶核酸序列包括那些与希蒙德木脂酰辅酶A还原酶蛋白相应的序列，以及能够从希蒙德木蛋白或核酸序列获得的序列。“相应的”是指核酸序列，可以是DNA，也可以是RNA，包括编码希蒙德木脂酰还原酶蛋白或其一部分的核酸序列，存在于所述编码序列的5'或3'端的调节基因序列[它能指导希蒙德木胚芽中

还原酶的转录或转录和转译（表达）]，cDNA中不存在的内含子序列，以及编码任何前体还原酶蛋白的引导或信号肽的序列，该前体还原酶蛋白对于嵌入内质网膜是需要的，但是在成熟的或加工过的脂酰还原酶中没有发现。

从希蒙德木序列或蛋白“可以获得的”序列是指与所需脂肪酸还原酶蛋白相关的核酸序列，它可以从希蒙德木脂酰还原酶氨基酸序列合成，或者在不同的生物体中识别，并且用希蒙德木还原酶核酸序列或所制备的抗希蒙德木还原酶蛋白的抗体作探针进行分离。按照这种方法，可以看出，通过核酸杂交或抗原方法利用希蒙德木序列从所需生物体分离的其他脂酰还原酶序列同样可以用于分离其他脂酰还原酶。这些通过借助于希蒙德木还原酶分离种子植物还原酶获得的还原酶在本发明中也认为是“可获得的”。

为了分离核酸序列，可以使用质粒或病毒载体以及本领域专业人员众所周知的技术制备cDNA或基因组库。用于筛选所需序列的有用的核酸杂交及免疫方法也是本领域专业人员众所周知的，并且已经由例如 Maniatis 等人描述（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York）。

通常，利用核酸探针获得的序列将显示出在靶序列和所给出的编码令人感兴趣的脂酰还原酶的序列之间具有60—70%序列同一性。当然也可以获得只有50—60%序列同一性的过长的序列。核酸探针可以是核酸序列过长的片段，也可以是较短的寡核苷酸探针。当使用较长的核酸片段作探针（大于约100bp）时，可以在不太严格的条件下进行筛选以从靶样品获得这样的序列，该序列有20—50%

不同于（即 50—80% 序列同源）用作探针的序列。寡核苷酸探针可以比编码脂酰还原酶的完整核酸序列短，但是它至少应该是约 10 个，优选至少约 15 个、更优选至少约 20 个核苷酸。当使用较短的区域作为较长区域的相对链时，需要高度的序列同一性。因此需要识别氨基酸序列高度同一的酶活性位点以设计寡核苷酸探针来检测同源基因。

为了测定是否可以通过与所给出的序列杂交来分离有关的基因，可以对该序列进行标记以使其可以检测，通常使用放射性标记，也可以使用其他方法。将标记的探针加至杂交溶液中，用含有所需核酸的滤膜，可以是 Northern 印迹或 Southern 印迹，进行培养（以筛选所需的同种来源），或者用含有 cDNA 或基因组克隆的滤膜进行培养，以进行筛选。杂交与洗涤条件可以改变，以使探针与所需序列的杂交最佳化。对于相关更远的序列（不太严格的），可以使用较低温度或较高盐浓度的条件进行杂交。如果在不太严格的条件存在背景杂交的问题，可以在杂交或洗涤步骤中升高温度，和/或降低盐含量，以提高对特定杂交序列的测定。按照 Beltz 等人讨论的方法 (Methods in Enzymology (1983) 100:266-285)，杂交和洗涤温度可以根据估计的探针熔化温度进行调节。

如上所述已经识别出有用的探针和合适的杂交与洗涤条件后，使用标记的序列和最佳的条件对 cDNA 或基因组库进行筛选。首先将此基因组库接种到固体琼脂基质平板上，并将 DNA 结合到合适的膜上，通常是硝基纤维素或尼龙滤膜。然后，用标记的探针与这些滤膜进行杂交，并按照上面描述的方法进行洗涤，以识别含有相关序列的克隆。

为了进行免疫筛选，可以通过用纯化的蛋白对兔或鼠注射来制备希蒙德木脂酰还原酶的抗体，这些制备抗体的方法是本领域专业人员

众所周知的。尽管通常多克隆抗体更有利于基因分离，但是可以制备单克隆抗体，也可以制备描述多克隆抗体。

为了筛选所需的植物品种，进行 Western 分析，测定存在于所需植物的粗提取物中的相关蛋白，这些蛋白与希蒙德木还原酶的抗体进行交叉反应。通过将植物提取物蛋白固定于膜上，通常为硝基纤维素，然后进行电泳，并用抗体进行培养，来完成此分析。为了检测硝基纤维素滤膜上的抗体/蛋白复合物，可以使用很多不同的体系，包括放射标记的抗体和第二抗体/酶共轭物体系。Oberfelder 描述了一些可用的体系 (Focus (1989) BRL/Life Technologies, Inc. 11:1-5)。如果发生交叉反应，可以通过筛选代表所需植物品种的表达文库来分离编码相关蛋白的基因。如 Maniatis 等人所述 (见上文)，可以用各种市售载体包括 λ gt11 构建表达文库。

然后使用已知技术，将上述利用 DNA 杂交或免疫筛选技术识别的克隆进行纯化，分离 DNA 并进行分析。在此方法中，已证实这些克隆编码相关的脂酰还原酶蛋白。按照与使用希蒙德木还原酶相同的方法，通过使用这些还原酶可以得到其他种子植物的脂酰还原酶。

本领域内任一普通专业人员将会认识到，使用位点特异性突变或 PCR 这些标准技术，可以对本发明的脂酰还原酶核酸序列进行修饰，或者在产生合成核酸序列的过程中修饰此序列。这些修饰的序列也可以认为是本发明的脂酰还原酶核酸序列。例如，可以改变密码子中不稳定的位置，以使该核酸序列能编码同样的氨基酸序列，或者可以改变密码子，以使氨基酸被永久替代。在这两种情况下，肽或蛋白都保持了所需的酶促活性，因此可认为是本发明的一部分。

本发明脂酰还原酶的核酸序列可以是 DNA 或 RNA 序列，它们

可以从基因组DNA、cDNA、mRNA获得,也可以全部合成或部分合成。可将该基因序列进行克隆,例如通过从合适的来源中分离基因组DNA,以及利用聚合酶链反应(PCR)对所需序列进行扩增和克隆。或者,基因序列可以全部合成或部分合成,特别是当需要提供优选的植物序列时。因此利用所选择的宿主的优选密码子可以合成所需结构基因的全部或部分(能编码还原酶蛋白的基因部分)。宿主优选的密码子可以从例如最频繁地用于所需宿主中表达的蛋白中的密码子测定。

我们将发现与脂酰还原酶蛋白有关的核酸序列有许多用途。例如,可用于制备重组构件该构件可用作探针,或者在宿主细胞中表达脂酰还原酶蛋白。根据其应用,这些构件可以含有编码整个还原酶或其一部分的序列。例如,可以识别还原酶的重要区域,如活性位点。因此可用于制备只含有部分还原酶序列的进一步的构件,这部分还原酶序列能编码对所需还原酶活性必需的氨基酸。

为了从相应的脂酰基底物制备脂肪醇,可以在优选含有脂酰还原酶蛋白底物的宿主细胞中表达。表达还原酶蛋白所用的体系包括原核细胞例如大肠杆菌、酵母细胞、以及植物细胞包括存在于所需宿主中的维管和非维管植物细胞。在此方法中,可以产生还原酶蛋白。此外,对编码序列进行位点特异性诱变可用于研究特异性突变对还原酶蛋白反应性质的影响。

因此可以制备反意义构件,用于转录脂酰还原酶编码序列或其片段的互补序列。在此方法靶宿主生物体中所产生的还原酶蛋白的量可以降低。

本发明编码脂酰还原酶的DNA序列可以以各种方式与外源DNA序列结合。“外源”DNA序列是指任何非天然存在的与还原酶连接

的DNA序列，包括非天然存在的连接在一起的、来自同一生物体的DNA序列的结合物。例如可以将编码运输肽的序列与本发明的还原酶序列连接。在此方法中，以还原酶作为叶绿体上的靶，可以利用叶绿体中的脂酰底物、特别是脂酰-ACPs。

可以将本发明的编码脂酰还原酶的DNA序列与正常情况下与还原酶相关的全部或部分基因序列相结合。在其组成部分中，编码还原酶的DNA序列结合到一个重组构件中，该重组构件在5'→3'的转录方向上含有能够在一个宿主细胞中启动转录和转译的转录起始控制区，编码还原酶的核酸序列以及一个转录终止区域。

调节区将根据宿主而改变，它们包括来自病毒，质粒或染色体基因等的区域。对于在原核或真核微生物、特别是单细胞宿主中表达，可以使用各种组成的或可调节的启动子。在微生物中表达可以提供现成的植物酶来源。所描述的转录起始区是来自细菌和酵母宿主例如大肠杆菌、枯草杆菌、酿酒酵母，包括基因，例如 β -半乳糖苷酶、T7聚合酶和色氨酸E等的区域。

对于大多数情况来说，重组构件包括在产生脂酰还原酶的植物中具有功能的调节区域。编码植物还原酶或其功能片段的开放阅读框架在其5'末端与转录起始调节区连接。转译起始区也是需要的，它可以由还原酶cDNA序列的5'非编码区提供，或者由与该结构的转录起始区天然结合的转译起始区提供。通常，转录与转译调节区的结合物被称为是启动子。许多启动子区是可以得到的，它们能够在植物中进行各种组成型的或可调节的例如可诱导的结构基因表达。

已知可用于在植物中进行组成型基因表达的序列是与土壤农杆菌基因如胭脂碱合成酶(Nos)，Mannopine合成酶(Mas)，或章鱼碱合

成酶(Ocs)相关的调节区,以及编码病毒基因表达的区域,例如,菜花镶嵌病毒(CaMV)的3'5'S和1'9'S区域。本文所用的术语“组成型的”不一定是指在所有细胞类型中以同一水平表达的基因,而是指在很宽范围的细胞类型中表达基因,尽管经常可以测到许多变化。其他有用的转录起始区优先在某些组织或在某些生长条件下转录,例如来源于napin、种子或叶ACP以及RUBISCO的小亚单位等的转录起始区。

在需要在植物宿主中表达脂酰还原酶蛋白的具体例子中,可以使用全部或部分完整植物脂酰还原酶基因,即将5'上游的非编码区(启动子)与结构基因序列以及3'下游的非编码区一起使用。如果需要不同的启动子,例如令人感兴趣的植物宿主的天然启动子或修饰过的启动子,即具有从一个基因源获得的转录起始区和从一个不同的基因源获得的转录起始区的启动子,或强化的启动子如双倍35S CaMV启动子,则这些序列可以利用标准技术连接在一起。

对于应用,如果5'上游的非编码区是由在种子成熟过程中调节过的其他基因获得,则需要那些优先在植物胚芽组织中表达的调节区,例如产生ACP和napin的转录起始控制区。按照1988年1月25日申请的美国专利申请07/147,781(现在为US 07/742,834,1991年8月8日申请)以及美国专利申请07/494,722(大约在1990年3月16日申请,题为“优先在早期种子萌发中表达的新的序列以及它所涉及的方法”)指导的方法,可以获得并使用这种“种子特异性启动子”,上述所有未决申请均引入本文作为参考。对于脂肪醇的生产,需要优先在种子组织中表达的转录起始区,以使在其他植物部分中基因产物的任何破坏性或副作用降至最

小。

本发明的重组构件也可以包括调节转录终止区。转录终止区可以由编码植物脂酰还原酶的DNA序列提供，或者是由来自不同基因源的合适的转录终止区提供，特别是该转录终止区与转录起始区自然结合。该转录终止区通常含有至少约0.5 kb、优选约1—3 kb的从3'端到结构基因的序列，由该结构基因衍生出该终止区。

具有植物脂酰还原酶如以表达它的令人感兴趣的DNA序列存在的植物表达构件可以与各种植物一起使用，特别是产生特长链脂酰辅酶A分子的植物，例如芸苔属，以及特别是在油菜籽的高芥酸变化阶段。其他令人感兴趣的植物产生所需底物例如基质或长链脂酰分子，这些植物包括但不限于油菜籽（Canola变种）、向日葵、红花、棉花、Cupher、大豆、花生、椰子和油棕榈以及玉米。根据将DNA表达构件导入宿主细胞中的方法的不同，需要不同的DNA序列。重要的是，本发明可用于双子叶植物和单子叶植物其类似种，并且可容易地用于新的和/或改进的转化与再生技术。

转化方法对于本发明不是重要的；各种植物转化方法目前都是可行的。作为转化作物的较新的可行方法，它们在下面可直接使用。例如，许多对土壤杆菌感染天然敏感的植物可以通过土壤杆菌介导的三个成分交配或双载体转化的方法成功地转化。可用于将核酸序列转移至宿主植物细胞中的其他序列可以从植物病原病毒或植物转位因子得到。另外，已经发展的微注射，DNA粒子轰击，电击穿技术能够转化各种单子叶和双子叶植物。

在制备重组构件时，通常将该构件或其片段的各种成分插入合适的克隆载体中，该载体能够在细菌宿主例如大肠杆菌中复制。在文献

中已经描述了存在的许多载体。每次克隆后，可以将质粒分离并进行进一步操作，例如限制、插入新的片段、连接、缺失、插入及切除等，以制作所需序列的成份。一旦该构件制作完成，就可以根据宿主细胞转化的方法将该构件转移至合适的载体中以进行进一步的操作。

通常，重组结构中包含具有在宿主中表达所必需的调节区并且提供对转化细胞选择的结构基因。该基因能提供对细胞毒性剂例如抗菌素、重金属和毒素等产生抗性，还能够为营养缺陷型宿主补充养分使之成为原养型，以及提供病毒免疫性等。同样，也可以使用编码能产生通过颜色变化而识别的化合物如GUS的酶或编码能发光物质的酶如荧光素酶的基因。根据引入表达构件的宿主种类的不同，可以使用一个或多个标记以对转化组织进行选择或检测，此时对于不同宿主使用不同的选择条件。

如果用土壤农杆菌进行植物转化，要求在核酸序列的一个或两个末端加上T-DNA作边缘，具体地说是左和右边缘区，尤其是至少有右边缘区。如果使用其他的转化方法，也可以使用这些边缘区。

如果将土壤农杆菌或Rhizogenes序列用于转化植物，可以利用这样的载体，该载体引入土壤杆菌宿主后能与宿主中存在的Ti-或Ri-质粒上的T-DNA进行同源重组。可以将含有重组所需的T-DNA的Ti-或Ri-进行装配（能够使半乳糖苷酶形成），也可以去除装配物（不能使半乳糖苷酶形成），后者只有当其在转化的土壤农杆菌宿主中能补充vir基因的功能时才是允许的，其中vir基因编码将DNA转移至植物宿主中所必需的转移作用因子。利用装配的土壤农杆菌菌株可以产生正常植物细胞的混和物，其中的一些含有所需的核苷酸序列，在肿瘤形成基因存在下植物细胞可以形成半乳糖苷酶。可以从混

合物中筛选出含有所需核酸序列，但缺失肿瘤基因的细胞以获得正常的转基因植物。

在优选的方法中，以土壤农杆菌作为转化植物细胞的载体，将连接有 T-DNA 边缘区的表达或转录构建体插入到能在大肠杆菌和土壤农杆菌中复制的宽宿主范围载体中，这里所说的宽宿主范围载体描述于文献中。通常使用的 pRK2 或其衍生物。参见，例如 Ditta 等人 (Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. (1980) 77:7347-7351) 和 EPA0120515，这些都引入本文作参考文献。或者可以将此在植物细胞中表达的序列插入到含有独立复制序列的载体中，这些结构之一可以使 E.coli 中的载体稳定，而另一个可以使载体在土壤农杆菌中稳定。参见，例如，McBride 和 Summerfelt (Plant Mol. Biol. (1990) 14:269-276)，其中利用了 pRiHRI (Jouanin 等人, Mol. Gen. Genet. (1985) 201:370-374) 的复制原点，并且能够为土壤农杆菌宿主细胞提供增加稳定性的植物表达载体。

优选使用能够在土壤杆菌中复制的如上所述的载体。在此方法中，不需要进行质粒重组，并且宿主土壤农杆菌 vir 区域可以提供将序列的 T-DNA 边缘区转移到植物宿主细胞所需的转移作用因子。

对于芸苔属细胞的转化，例如，可以使用土壤农杆菌转化方法。Radke 等人描述了其中的一种方法 (Theor. Appl. Genet. (1988) 75:685-694)。

现在已大体上对本发明进行了描述，通过参照下面的实施例将更加容易理解本发明，除非特别说明，这些实施例仅用于说明本发明而不是对本发明的限制。

实施例 1 酰基辅酶 A 还原酶的测定

本实施例描述了测定微粒体膜制剂中或加溶蛋白质制剂中酰基辅酶A还原酶活性的方法。

A. 放射性标记物

用 14 碳氰化钾和相应的烷基甲磺酰化反应，然后碱解所得的烷腈生成游离脂肪酸制得比活为 $5.1-5.6\text{ Ci/mol}$ 的(1- 14 碳)长链脂肪酸，即11-顺-二十烷酸，13-顺-二十二烯酸和15-顺-二十四碳烯酸。用醚制重氮甲烷将游离脂肪酸转化为其甲基酯，然后用制备性硝酸银薄层层析(TLC)纯化。将脂肪酸甲酯水解重新生成游离脂肪酸。用正常相硅胶TLC、硝酸银TLC和C18反相TLC三种方法评估放射化学纯度。由上述方法测得的放射化学纯度是92-98%。用Young和Lynen的方法(J.Bio.Chem.244:377,1969)从相应的[1- 14 碳]长链游离脂肪酸制备[1- 14 碳]长链酰基辅酶A(比活为 10 Ci/mol)。其它的[1- 14 碳]酰基辅酶A，如[1- 14 碳]二十四碳烯基辅酶A购自Amersham(Arlington Heights, IL)。应用经稍微修改的Pletcher和Tate的方法(Tet.Lett.1601-1602,1978)对[1- 14 碳]十六烷醇进行重铬酸盐氧化制备[1- 14 碳]十六烷-1-醇。所得产物经制备性硅胶TLC纯化。贮存于已烷溶液中置-70℃备用。

B. 测定微粒体膜制剂中还原酶活性

1. 测定1：微粒体膜制剂中的还原酶活性，是将 $2.0\text{ }\mu\text{m}$ [1- 14 碳]酰基辅酶A(通常是二十四碳烯基辅酶A，比活为 $2-5\text{ Ci/mol}$)与要检测的样本和 2 mM NADPH 于 0.25 ml 的总体积中一起保温测得。保温混合物还含有10%w/v甘油， 1 mM DTT ，并经 50 mM HEPES (4-[2-羟乙基]-1哌嗪乙烷磺酸)缓冲(这里或

下文所指的 HEPES 是从其 pH 7.5 的 1 M 贮存液中取用的)。

测定是从加入酰基辅酶 A 底物开始, 于 30 °C 保温一小时。然后把测定管置于冰上中止测定, 并马上加入 0.25 ml 异丙醇: 乙酸 (5:1 v/v)。再加入 0.1 mg 未标记的蜡酯和 0.1 mg 油醇作为载体。用经按比例缩小的 Hara 和 Radin 方案 (Anal. Biochem. 90:420, 1978) 提取 [¹⁴碳] 脂类。向中止测定的管中加入 6 ml 已烷/异丙醇 (3:2, v/v)。旋转混合样本后加入 2 ml 硫酸钠水溶液 (5.5 % w/v), 再次旋转混合样本。

2. 测定 2: 微粒体膜制剂中还原酶活性的测定, 是将 20 μm [1-¹⁴碳] 酰基辅酶 A (通常是二十四碳烯基辅酶 A, 比活为 2-5 Ci/mol) 与待检样本及 2 mM NADPH 于 0.25 ml 的总体积中一起保温。保温混合物还含有 10 % w/v 甘油, 1 mM DTT, 并用 50 mM HEPES (4-[2-羟乙基]-1-哌嗪乙烷磺酸) 缓冲 (这里或下文指的 HEPES 是从其 pH 7.5 的 1 M 贮存液中取用的)。如果需要抑制同时存在于膜制剂中酰基辅酶 A: 乙醇酰基转移酶活性 (该酶消耗还原酶反应的产物), 可以在测定混合物中含有 0.3 % w/v CHAPS。该浓度的 CHAPS 对还原酶的影响最小但能完全抑制酰基转移酶反应, 从而简化对还原酶活性的定量测定。

测定从酰基辅酶 A 底物的加入开始, 于 30 °C 保温 1 小时, 然后将测定管置于冰上中止测定, 随后加入 0.25 ml 异丙醇: 乙酸 (4:1 v/v)。加入 25 μg 未标记的蜡酯, 50 μg 油醇和 50 μg 油酸作为载体。用按比例缩减的 Hara 和 Radin 方案 (Anal. Biochem. 90:420, 1978) 提取 [¹⁴碳] 脂类。向中止测定的管中加入 4 ml 已烷/异丙醇 (3:2, v/v), 旋转混合样本后加入 2 ml 硫酸钠水溶液 (6.7 % w/v),

再次旋转混合样本。

C. 测定溶解还原酶活性

为了测定溶解还原酶活性，需要进行包括添加使酶激活的盐在内的几种变化。在溶解还原酶测定中所用的测定缓冲液就是上述微粒体膜制剂测定中的缓冲液，但作如下的改变：

- a. 加入终浓度为 0.3 – 0.5 M 的 NaCl；
- b. 包含 ~1 mM EDTA；
- c. 将一般含 0.75% CHAPS 的待测酶样本稀释到 $\leq 0.3\%$ (CHAPS 的 CMC 是 $\sim 0.5\%$)。

D. 测定产物的分析

为了分析微粒体膜制剂还原酶测定中或溶解还原酶测定中的产物，提出了两种方案。一种是在下文被称作“广泛测定”的方案，它较为费时，但能获得更高产量，另一种方案在下文称为“快速检测”，它也是对还原酶活性的测定，但更为快速，方便，产量较少。

1. 广泛分析：向样本中加入硫酸钠并旋转混合样本，然后移出上层有机相，用 4 ml 已烷/异丙醇 (7:2 v/v) 洗涤下层水相。收集有机相并在氮气中蒸发中至干燥。脂质残余物重新悬浮于小体积的庚烷中，取一份等量试样经液体闪烁计数测定放射活性，样本的剩余部分或者用于进行标记物种类的 TLC 分析，或者用于裂解蜡酯的衍生过程，从而检测所产生的醇总量。

对于脂类分析而言，向硅胶 TLC 板上样，把该板铺展于已烷/二乙基醚/乙酸 (80:20:1 或 70:30:1 v/v/v) 中。用 AMBIS 放射分析显影系统 (AMBIS Systems Inc., San Diego, CA) 检测放射性在脂类，主要是蜡酯 (当有连接酶存在的情况下，如同在微粒体膜制

剂测定中)，游离脂肪酸，脂肪醇和起始时的极性脂之间的分布。如果需要，可以从TLC板上回收单一脂类作进一步分析。

对于蜡脂的裂解，可应用基于对Pina等人的(Lipids 22:358-361, 1987) Grignard衍生方法按比例缩减进行。在固定了衬聚四氟乙烯螺丝帽的小玻璃管中干燥加有200 μ g 蜡酯载体的样本。然后依次加入0.4 ml 干二乙基醚，3 μ l 乙酸乙酯和溶于0.1 ml 二乙基醚中的3 M 溴化乙基镁。旋转混合样本后，静置于室温下至少2小时，然后小心加入经水饱和的二乙基醚以除去过剩的试剂。加入2 ml 1 M HCl 和2 ml 己烷，旋转试管。上层有机相用水洗涤(2 $\times$ 2 ml)，在50 - 100 μ l 乙醇存在下蒸发至干燥。

将样本重新悬浮于50 - 100 μ l 己烷中，向TLC板上样。正常相和反相TLC系统两者都用于样本分析。正常相TLC用硅胶TLC板，并铺展于己烷/二乙基醚/乙酸(70:30:2 v/v/v)中。反相系统用C18板，铺展于甲醇中。

2. 快速分析：在向样本中加入硫酸钠并旋转混合后，取出已知百分比的有机相，用液体闪烁计数。这一计算值用于评估有机相中的总数。然后取出有机相的其余部分，通氮气干燥，重新溶解于庚烷中，如在具体测定中描述的方法于TLC板上点样和铺展，扫描。用这种方式即可确定掺入到醇类中总数的百分比。

实施例2 希蒙德木属中酰基辅酶A还原酶的定性

本实施例描述了获得具还原酶活性的希蒙德木蛋白制剂的方法和有关酶活性研究结果。

A. 种子发育和酰基辅酶A还原酶活性

对 Davis, CA的5种植物的胚发育追踪了两个夏季，发现胚鲜重和

干重从约 80 天到约 130 天以相当稳定的速度增加。脂质提取物显示出当胚鲜重达约 300 mg (约第 80 天) 时, 脂质重与干重的比达最大值的 50%。

发育胚中酰基辅酶A还原酶活性的测定如实施例1所述。由于所测定的希蒙德木种子表皮是某种抑制因子的来源, 所以在于液氮-70℃冻存植物胚之前去掉种子表皮。

对无细胞匀浆或是膜部分中酰基辅酶A还原酶活性的发育全貌的检定都表明还原酶活性的很大诱导作用, 其峰值在开花期之后约115天。收集开花期后约90-110天的胚用于酶学研究, 如果该时期还原酶活性高, 其脂沉积未达到最高水平, 且种子表皮易于剥除。观察到还原酶的最大增长率是在花开期后80-90天。因此收集开花期后80-90天的胚用于构建cDNA文库, 推定这一时期还原酶蛋白合成速率将达到最大。并推测出编码酰基辅酶A还原酶的mRNA水平在这一时期也达到最高。

B. 分离研究

早期用于分离希蒙德木属胚胎样品的方法导致在离心后的脂肪垫, 上清液及特定馏分中还原酶活性的可变性分布。进行了许多可能对活性分布具有效影响的处理试验, 如超声波处理, 浮选梯度法以及向提取缓冲液中添加各种试剂。在提取缓冲液中包含盐类可以使以

100,000Xg离心1小时所得的上清部分中回收的活性连接酶得到最大改善。提取缓冲液含有3M NaCl、0.3M蔗糖、100mM HEPES、2mM DTT和蛋白酶抑制剂, 1mM EDTA、0.7 μg/ml、抑蛋白酶肽、0.5 μg/ml抑胃肽和17 μg/ml苯甲磺酰氟(PMSF)。

C. 微粒体膜制剂

含高水平还原酶活性的颗粒可得自上述经透析后离心(100,000Xg)的上清部分或经硫酸铵分离的上清部分。透析方法的详细描述见实施例3。对这些具有还原酶活性颗粒进行诸如密度梯度离心、凝胶渗透层析和蛋白/磷脂分析的进一步分析表明,这些颗粒是一个膜部分。该膜制剂还具有高细胞色素C还原酶活性,该活性作为内质网(ER)膜的标志。这些研究表明该还原酶活性是与膜相关的。

对于硫酸铵分离法,100,000Xg离心上清得自基本如实施例3所述的希蒙德木属胚。将等体积的硫酸铵溶液(33.2g/100ml)缓慢加到上清部分(同时不断搅拌),使硫酸铵浓度达到30%,该浓度将有效地沉淀还原酶。再搅拌30分钟后将悬液离心(26,000Xg)30分钟,所得沉淀重新悬浮于含25mM HEPES、1M NaCl、1mM DTT和0.1mM PMSF溶液中,其体积是第一次上清部分(S₁)的1/10。悬液再离心(100,000Xg)1小时,所得沉淀再悬浮于25mM HEPES,10%甘油中(体积为1/10的S₁体积)。离心(100,000Xg)该悬液产生洗涤过的微粒体P₄,将P₄再悬浮于1/20S₁体积的25mM HEPES,10%甘油中,使蛋白浓度达到约3-4mg/ml。分等量试样冻存于-70℃备用。

D. 膜相关性还原酶活性的研究

应用Bordier描述的Triton X114相分离方法(J. Biol. Chem. 256: 1604-1607, 1981)测定希蒙德木属还原酶是否是一种完整的膜蛋白,或者是更紧密地与膜层(亲水性更高的蛋白)相联。该技术一般包括将膜与1% Triton X114一起于冰上温育,然后在这些条件下将混和物温度升至去垢剂的浊点以上(浊点是指较大的胶粒开始自发形成的

温度，1% Triton X114的浊点是 -20°C ）。通过离心，可以观察到两个不同的相：下层相富含去垢剂，上层相缺乏去垢剂（这里指的是水相）。已经表明完整的膜蛋白优先分配到富含去垢剂相而亲水性更高的蛋白质可从水相中回收。当希蒙德木属膜制剂用这一Triton X114相分离方法处理时，还原酶活性是与富含去垢剂相有关而在水相中检测不到还原酶活性。这一事实证明该还原酶是一种完整膜蛋白。

E. 还原酶更进一步的特征

上述微粒体膜制剂用于进一步鉴定还原酶的特征。还原酶显示出活性的pH值范围是5—9。确定还原酶特征的实验是在pH7.5中进行，该pH值接近所推测的胞浆生理pH值。

1. 盐效应：用0.5 M标准浓度的一元碱盐检测各种盐对还原酶活性的影响。含二价阳离子或阴离子的盐用0.167 M浓度（与0.5 M一元碱盐产生相同的离子强度）也可以在0.5 M进行检测，加入0.5 M NaCl后观察到产生了1.5倍的刺激作用。尽管单价或双价的其它盐类（如LiCl、KCl、 MgCl_2 、 CaCl_2 和 Na_2SO_4 ）与NaCl的刺激作用相比一般说来程度较低，但它们都显示出了对还原酶活性的刺激作用。强的离液序列高的盐，如KSCN和NaSCN对还原酶活性不产生刺激作用或产生勉强的刺激作用。

2. 其它效应物：已发现二硫苏糖醇（DTT）对还原酶活性有刺激性，但不是专性的，而乙二胺四乙酸（EDTA）产生一定刺激作用的合适浓度是2.5 mM。在0.02—0.075 mg/ml低浓度BSA（牛血清白蛋白）中观察到弱的刺激活性，而BSA在浓度为或大于0.2 mg/ml时产生抑制活性。

早期观察到酰基辅酶A还原酶具NADPH特异性的结果(Pollard et

al., 同上文) 得以证实。在上述背景下 ($< 2\%$ 的 NADPH 依赖性活性) 可检测出非 NADH 依赖性活性。而且, 还原酶反应的水溶性终产物辅酶 A 和 NADP^+ 在毫摩尔浓度产生明显的抑制活性, 而 NADH 和 NAD^+ 对还原酶活性只有勉强的影响。

3. 底物特异性: 把不同链长的脂肪酸的硫酯、酰基脂酰载体蛋白 (acyl-ACPS) 和酰基辅酶 A 作为还原酶的底物。由于二十四碳烯基辅酶 A (24:1 辅酶 A) 底物在较高的浓度时显示了强的底物抑制作用, 所以试验在底物浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 条件下进行。在这些测定中 NaCl 浓度为 $0.5\ \text{M}$ 。底物特异性实验结果示于下文表 1 中。

表 1: 还原酶的乙酰特异性

Acyl 基	还原酶活性	
	(Pmol/min/ μl)	
	Acyl-ACP ($10\ \mu\text{M}$)	Acyl-CoA ($10\ \mu\text{M}$)
12:0	<0.01	<0.15
16:0	2.9	<0.4
18:0	-	1.4
18:1	1.05	0.75
20:1	-	1.0
22:1	-	1.0
24:1	-	19.9

二十四碳烯基辅酶 A 在这些试验物中具有最高的底物活性, 因此它被用于酶的进一步纯化和确定特征的实验中进行还原酶测定。令人

感兴趣的是，棕榈酰辅酶A (C16:0-CoA)和棕榈酰-ACP (C16:0-ACP)可直接当作底物。还原酶对棕榈酰辅酶A的活性仅仅勉强高于其背景活性，而还原酶对棕榈酰-ACP的活性却很高。以前的研究还表明硬脂酰-ACP (C18:0-ACP)底物活性(Pollard et al., 同上文)。

还值得感兴趣的是，尽管棕榈酰辅酶A对于还原酶似不是很好的底物，但在用未标记的棕榈酰辅酶A ($0 - 30 \mu\text{M}$)和[1- ^{14}C]二十四碳烯基辅酶A ($20 \mu\text{M}$)进行的竞争性抑制实验中，在 $5 \mu\text{M}$ 棕榈酰辅酶A时对还原酶还原二十四碳烯基辅酶A的活性产生了50%的抑制作用。因此，虽然棕榈酰辅酶A在所用的测定条件下不是很好的酶作用底物，但它是一种有效的抑制剂。

4. 还原酶抑制剂测定：检测了几种已知的其它类型还原酶蛋白的抑制剂对希蒙德木酰基辅酶A还原酶活性的影响。HMG-CoA还原酶(3-羟-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶)的强抑制剂，Mevinolin仅在比抑制HMG-CoA还原酶时的浓度(K_i 约 1nM)相对高的浓度($100 \mu\text{M}$)时才对希蒙德木酰基辅酶A还原酶有影响。已经熟知Cerulinen共价结合于 β -酮脂酰基硫酯合成酶，但它对希蒙德木酰基辅酶A还原酶不具有强的抑制作用。

筛选测定Sulphydryl阻断剂对还原酶活性的影响。N-乙基马来酰亚胺显示出了强的抑制活性，对一羟汞苯甲酸酯也有一定的抑制作用，而碘乙酰胺没有抑制作用。据这一事实得出的结论是酰基辅酶A还原酶含有对各种Sulphydryl阻断剂显示出相当的选择性的必要Sulphydryl基团。

实施例3 酰基辅酶A还原酶的纯化

本实施例描述了用于分离具有还原酶活性的希蒙德木膜制剂，增殖还原酶活性和进一步纯化还原酶蛋白质的方法。

A. 微粒体膜制剂

在开花后约90—110天收集希蒙德木属胚，这可以通过检测胚的水含量(45—70%)来确定。去掉外壳和种子表皮，将猪耳草于液氮中快速冷冻，并贮存于-70℃备用。对于初蛋白制剂，在液氮温度下于钢研钵和研杵中将冷冻胚捣成粉末状。在一般的实验中经处理的胚为70克。

将所得粉末以每280ml溶液中含70克胚的比例加入到下列高盐溶液中：3M NaCl、0.3M蔗糖、100mM HEPES、2mM DTT和蛋白酶抑制剂，1mM EDTA、0.7μg/ml抑蛋白酶肽、0.5μg/ml抑胃肽和17μg/mlPMSF。将粉末胚分散于存在于Polytron组织匀浆器中的缓冲液中，约30秒后形成无细胞匀浆(CFH)。再将匀浆通过有三层结构的Miracloth(CalBioChem, LaJolla, CA)滤器进行过滤，所得滤液离心(100,000Xg)1小时。

离心所得样本包括沉淀、上清液和漂浮的脂肪块。去掉脂肪块，收集上清部分并相对含1M NaCl、100mM HEPES、2mM DTT和1mM EDTA的溶液进行透析过夜(更换缓冲液3次)。将透析液离心(200,000Xg)1小时产生沉淀DP₂。将DP₂悬浮于相当于初始CFH体积约1/20的25mM HEPES(pH7.5)，10%(w/v)甘油，1mM EDTA和0.5M NaCl中产生微粒体膜制剂。

如实施例 1 所述进行活性测定。检测到回收的酰基辅酶 A 还原酶活性是无细胞匀浆中原始活性的约 30%。当膜制剂贮存于 -70℃ 时其中的酰基辅酶 A 还原酶活性是稳定的。

B. 还原酶蛋白质的溶解

将固体 CHAPS (3-[(3-胆酰胺丙基)-二甲基-ammonio] 1-丙磺酸盐) 加到微粒体膜制剂中使终浓度达到 2% (w/v)。样本于冰上缓慢摇动温育约 1 小时, 然后用 25 mM HEPES (pH 7.5), 10% 甘油, 1 mM EDTA, 0.34 M NaCl 稀释样本使其中 CHAPS 浓度降低至 0.75%, NaCl 浓度约为 0.4 M。再将样本离心 (200,000 Xg) 1 小时, 上清的回收和还原酶活性的测定如实施例 1 所示。一般情况下, 可从上清部分回收来自微粒体膜制剂还原酶活性的 85%。当样本贮存于 -70℃ 时, 溶解的还原酶活性是稳定的。

C. Blue A 柱层析

制备柱床体积约 25 ml 并含有 Blue A (Cibacron Blue F3GA; Amicon Division, W.R. Grace & Co.) 的柱 (1.8 × ~10 cm), 用含 0.4 M NaCl 的缓冲液 A (25 mM HEPES (pH 7.5), 20% (w/v) 甘油, 0.75% CHAPS, 1 mM EDTA) 对柱进行平衡处理。将上述溶解的还原酶制剂上样到 Blue A 柱上。

用几倍于柱体积的含 0.4 M NaCl 的缓冲液 A 冲洗层析柱, 然后再用含 0.5 M NaCl 的缓冲液 A 冲洗。90% 以上的还原酶活性结合至层析柱上, 而 85% 以上的其它蛋白质从柱中冲走。用含 1.0 M NaCl 的缓冲液 A 从柱中洗脱还原酶活性物, 如实施例 1 所述收集馏份并对还原酶活性进行测定。收集到的含还原酶活性的馏分贮存于 -70℃。

一般情况下，用含 1.0 M NaCl 的缓冲液洗脱能回收上样还原酶活性的 30 - 50 %。

D. 大小筛析层析(Size Exclusion Chromatography)

将从 Blue A 柱收集的活性馏份在固定有 YM 30 膜 (Amicon Division, W.R. Grace) 的压力槽中通过超滤而浓缩 10 倍。一般说来，从 Blue A 柱流出的含还原酶活性的洗脱液为 ~ 90 ml，经浓缩后为 ~ 8 ml，然后上样到下述两个 Sephacryl S100 柱。该两个层析柱 (2.5 × 7.5 cm) 用 S100 HR 介质 (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) 填充，并用含 0.5 M NaCl 的缓冲液 A 平衡。用下列蛋白标准物校准层析柱体积：牛血清白蛋白 (66 KD)、碳酸酐酶 (29 KD)、细胞色素 C (12.4 KD) 和蓝葡聚糖 (Blue dextran) (用于确定空隙体积)。将浓缩样本的 4 ml 等份试样上样于每一个 S100 柱，它们以约 1.7 厘米/小时的线性流速展开。收集 ~ 4 小时内流出的馏份，用实施例 1 所述方法检测馏份中的还原酶活性。

在洗脱出的表观分子质量约为 49 KD 的一条主峰中回收的活性大于上样活性的 60 %。收集的活性馏份的体积是 ~ 30 - 35 ml/柱。

E. 亲和层析

用棕榈酰辅酶 A 琼脂糖 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 填充层析柱，并用缓冲液 B (含 0.1 M NaCl 的缓冲液 A) 进行平衡。从凝胶过滤柱收集的活性馏份通过上述超滤处理浓缩 ~ 16 倍。浓缩样本经用缓冲液 A 稀释其中的 NaCl 水平从 0.5 M 降至 ~ 0.1 M。将稀释样品上柱，然后用几倍于柱体积的缓冲液 B 冲洗层析柱。再用 10 ml 含 1.5 mM NADH 的缓冲液 B 冲洗柱，接着用缓冲液 B 作进一步冲洗。

用 1.5 ml 含 1.5 mM NADPH 的缓冲液 B 流过层析柱而洗脱还原酶活性。一般情况下,在一定时间从一个凝胶过滤柱收集的物质再经亲和柱处理,经 NADPH 洗脱回收的活性大于样品上柱时活性的 70%。收集活性馏份进行还原酶活性,蛋白质浓度和多肽成份分析。根据 Bradford 描述的染料结合法 (Analy. Biochem. 72:248-254, 1978) 用商售药盒 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) 估测蛋白质浓度。BSA 用作参照蛋白质。

F. SDS-PAGE 分析

样本的多肽成分用 SDS-PAGE 分析 (Laemmli, U.K. (1970) Nature London) 227:680-685)。通过加入 SDS 和二硫苏糖醇贮存液至终浓度分别为 2% 和 30 mM 而制备样品用于电泳。将约 50 μ l 的样品上样到含有 12% 分离胶 (NOVEX, San Diego, CA) 的丙烯酰胺凝胶样孔中。分子量标准物购自 Bio-Rad Laboratories。通过银染法 (Blum et al., Electrophoresis 8:93-99, 1987) 检测蛋白质。

在来自亲和柱的活性样本中检测到表观分子量约 52 KD 和 54 KD 的两条主要多肽带,它们一起代表了该制剂中 95% 以上的蛋白质。因为在自然状态下还原酶的表现大小约为 49 KD (由如上文所述和大小筛析层析法确定),所以这些条带很可能表示还原酶的相关形式而不是一种酶的两个不同亚单位。

G. 蛋白质吸印到膜上

为了进行氨基酸测序,在 SDS-PAGE 电泳后将上述还原酶多肽转移到硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上,或转移到 Immobilon-P 膜 (Millipore; Bedford, MA) 或 ProBlott 膜 (Applied Biosystems; Foster City, CA) 上以进一步分离蛋白质。如果要对蛋白质按顺序地酶解时最

好选用硝酸纤维素膜，而PVDF对N-末端测序法和来自溴化氰消化的肽的测序有用。

1. 吸印至硝酸纤维素膜：如果蛋白质经电转印转至硝酸纤维素膜上时，则于5-20%甲醇中含25mM Tris、192mM甘氨酸的缓冲液中转印的时间一般是1-5小时。电转印后，将膜在存在于1%(v/v)乙酸中的0.1%(w/v)丽春红S中染色2分钟，在0.1%(v/v)乙酸中脱色，更换脱色液2-3次，每次持续2分钟。然后将膜湿润着于-20℃存于热封闭的塑料袋中。如果时间允许的话，吸印膜不必冷冻而马上进行消化以产生如下文所述确定的氨基酸序列的肽。

2. 转印至PVDF：当蛋白质经电转印转移到Immobilon P PVDF上时，在溶于10%(v/v)甲醇的12.5mM Tris/5mM甘氨酸的缓冲液中的转印时间一般约1-2小时。电转印之后，将膜在溶于50%(v/v)甲醇/10%(v/v)乙酸的0.1%(w/v)考马斯兰中染色5分钟，再于50%(v/v)甲醇/10%(v/v)乙酸中脱色，更换脱色液2-3次，每次脱色持续2分钟。然后将PVDF膜于空气中干燥30分钟，再将干燥的膜置入热封口的塑料袋中贮于-20℃。吸印到PVDF膜，如ProBlott上的蛋白质可直接用于完整蛋白质的N-末端序列测定。在下文的实施例4A中描述了电转印蛋白质至ProBlott上的方法。

实施例4 氨基酸序列的测定

本实施例描述了测定与酰基辅酶A还原酶活性相关的植物蛋白质的氨基酸序列的方法。

A. 用溴化氰裂解蛋白质和肽的分离

用在《探针设计肽分离系统技术手册》(Probe-Design Peptide

Separation System Technical Manual) (Promega, Inc. Madison, WI) 中描述的方法对感兴趣的蛋白质进行溴化氰裂解。如上所述将还原酶蛋白吸印到 P V D F 膜上。从吸印膜上剪下蛋白质条带, 放入溶于 70% (v/v) 甲酸的溴化氰溶液中, 一起于室温下温育过夜。温育之后去除溴化氰溶液, 收集, 并用 Reacti-Vap 蒸发器 (Pierce, Rockford, IL) 于连续氮气流下进行干燥处理。用肽洗脱溶剂, 如 70% (v/v) 异丙醇, 0.2% (v/v) 三氟乙酸, 0.1 mM 赖氨酸和 0.1 mM 巯基乙酸对溴化氰肽进行再次洗脱以保证溴化氰完全去除, 去除洗脱液, 加到含干燥过的溴化氰的试管中按上述方法干燥。可以用新鲜洗脱溶剂重复洗脱过程。加 50 μ l HPLC 级的水到干燥肽中, 再经 Speed-Vac (Savant, Inc., Farmingdale, NY) 蒸发去掉水份。

用类似于 Schagger 和 von Jagow 描述的方法 (Anal. Biochem. 166:368-379, 1987) 借助于 Tris/N-三羟甲基甘氨酸 SDS-PAGE 系统分离肽。在 125-150 V 的恒压下进行凝胶电泳约 1 小时或电泳至指示染料跑出凝胶的底边为止。转移前, 先将凝胶浸泡在转移缓冲液中 (125 mM Tris、50 mM 甘氨酸、10% (v/v) 甲醇) 15-30 分钟。在 50 V 恒压下将凝胶转印到 ProBlott 测序膜 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 上, 转印 2 小时, 将转印膜在考马斯兰 (0.1% 溶于 50% (v/v) 甲醇/10% (v/v) 乙酸) 中染色, 再于 50% (v/v) 甲醇/10% (v/v) 乙酸中脱色 3 次, 每次 2 分钟。膜在空气中干燥 30-45 分钟, 然后贮存于 -20 $^{\circ}$ C。

吸印到 ProBlott 上的肽可直接上样到蛋白质测序仪的筒 (cartridge) 上而不需加入包被 Polybrene 的玻璃纤维滤器。用经细微改动的反应循环 BLOT-1 (由 Applied Biosystems 提供) 对肽测序。另外,

溶液S₃（丁基氯化物）也用50:50的S₁和S₂（正庚烷和乙酸乙酯）的混合物代替。当对吸印到ProBlotI上的样本测序时都用到了这两处变动。

B. 蛋白酶消化和肽的分离

吸印到硝酸纤维素膜上的蛋白质可以用蛋白酶进行消化而获得用以测序的肽。所用的方法是Aebersold等人描述的(PNAS 84:6970, 1987)。从硝酸纤维素膜上取下还原酶蛋白条带，同时取等量空白硝酸纤维素膜用作对照，用HPLC级的水对获取的膜冲洗数次以去掉丽春红S。冲洗后，将1.0 ml溶于0.5%乙酸中的0.5%聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40, Aldrich, Milwaukee, WI)加到膜条带中，并于37℃温育30分钟。为了彻底去除PVP-40，用大体积的HPLC级水(8×5 ml)冲洗硝酸纤维素条块，并用分光光度计检测洗出液在214 nm的吸光度。而且，如果硝酸纤维素条带在PVP-40处理和冲洗两个步骤之后才切割成小片，PVP-40就更容易去掉。这两处改动消除了PVP-40干扰的问题。

将处理后的小片然后悬浮于适宜的消化缓冲液中，例如胰蛋白酶消化缓冲液，100 mM碳酸氢钠pH 8.2，或蛋白内切酶gluC缓冲液，25 mM碳酸铵/1 mM EDTA，pH 7.8。向消化混合物中加入乙腈使其浓度为5-10% (v/v)。用消化缓冲液稀释蛋白酶，然后加到消化混合物中，一般情况下，蛋白酶与所消化蛋白质之比为1:10 (w/w)。温育18-24小时进行消化。例如，胰蛋白酶消化于37℃温育，而蛋白内切酶gluC消化要在室温下温育。同样地，其它蛋白酶，包括lysC和aspN可以用于消化还原酶蛋白。尽管单个的消化缓冲液条件可以不同，但消化、肽分离、纯化和测序过程基本与上述用gluC和

胰蛋白酶消化的相应程序相同。

温育过夜后，加入 $10\ \mu\text{l}$ (v/v) 三氟乙酸 (TFA) 或 $1\ \mu\text{l}$ 100% TFA 中止消化反应。从硝酸纤维素片块上除去消化混合物，用 $1-5\ 100\ \mu\text{l}$ 体积的含 $5-10\%$ 乙腈的消化缓冲液冲洗硝酸纤维素片块，并且将该体积溶液于 Speed-Vac 中浓缩至小于 $100\ \mu\text{l}$ 。用安装于应用生物系统 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 130 一型高效液相色谱 (HPLC) 上的 Vydac 反相 C18 柱 ($2.1\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$) 分离肽，用于洗脱肽的移动相是：缓冲液 A： $0.1\ \text{mM}$ 磷酸钠 pH 2.2；缓冲液 B：溶于 $0.1\ \text{mM}$ 磷酸钠中的 70% 乙腈 (pH 2.2)。所应用的流速为 $50\ \mu\text{l}/\text{分}$ 的三步梯度洗脱是 $10-55\%$ 缓冲液 B 二小时， $55-75\%$ 缓冲液 B 5 分钟和 75% 缓冲液 B 常液洗脱 15 分钟。于 $214\ \text{nm}$ 检测肽，由专人收集后贮存于 -20°C 。

C. 蛋白质和肽的 N-末端测序

应用在 Applied Biosystems 477A 液相脉动蛋白测序仪进行 Edman 降解而进行所有测序步骤；由测序仪产生的乙内酰苯硫脲 (PTH) 氨基酸是用相联的应用生物系统 120A PTH 分析仪进行分析。借助用于 Apple Macintosh 的应用生物系统 610A 型数据分析系统和用来自 PE NELSON, Inc. (Cupertino, CA) 的 ACCESS* CHROM 软件的数字微型 Vax 计算机收集和贮存数据。从经 PTH 分析仪接收输入的图型记录仪阅读到测序数据，并用得自 610A 型软件的定量数据证实读到的测序数据。所有测序数据由两个操作人员借助于数据分析系统各自读出。

对于得自 HPLC 峰图的肽样本，可上样于已在测序仪中经过 3 次预循环的包被 Polybrene 的玻璃纤维滤器 (Applied Biosystems,

Foster City, CA) 上。对于已经还原和碱解的肽，用液体闪烁计数器对每次测序仪循环所产生的 P T H - 氨基酸产物的一部分进行计数。对于已经电转印转移到 Immobilon-P 上的蛋白样本，切出感兴趣的条带，然后置于如上所述经预循环的包被 Polybrene 玻璃纤维滤器上，根据制造商的指示安装反应筒。对于经电转印转移到 ProBlott 上的蛋白样本，不需要玻璃纤维滤器。

为了从小量样本 (5 - 30 pmol) 中获得蛋白质序列，应用如 Tempst 和 Riviere (Anal. Biochem. 183:290 1989) 描述的 477 A 转换循环和 120 A 分析仪。

D. 还原酶肽的氨基酸序列

应用 SDS - PAGE 分离纯化还原酶制剂，分离出 5.4 和 5.6 K D 蛋白质，将分离出的物质转移到硝酸纤维素型膜 (Immobilon N) 上，用丽春红 R 染色对条带进行定位。用胰蛋白酶处理从吸印膜上切割下来含 5.6 或 5.4 K D 蛋白质的部分，再经反相 HPLC 分离胰蛋白酶肽。从每一个还原酶的蛋白的几个肽获取的序列信息示于下列表 2 中。

表 2: 5.4 K D 和 5.6 K D 还原酶蛋白质的肽序列

5.6 K D 还原酶肽	5.4 K D 还原酶肽
1) AILVTGATGSLAK	1) AILVTGATGSLAK
2) LQNE χ FGKELFK	2) LGLDINVEK
3) VTVVPGDITGEDL	3) TIDNVPVYYG
4) LGLDINVEK	4) YVEPVTY χ VGSSAAN
5) TIDNVPVYYGK	5) LVDIYK _p
6) YVEPVTYHVGSSAANPM	6) EGIVEADMFYF

7) LSALPEMAHR

7) AINWEDYFL

8) LVDIYK

8) THFPGVVEHVL

9) EGIVEADMFYFD

10) AINWEDYFLKT_XFPGVVEHVL

表中所列出的肽序列应用的是代表氨基酸的标准一字母密码。“X”表示该位置上的氨基酸还未鉴定出。以小写字母出现的氨基酸标示表示对该氨基酸的鉴定是不确定的。

从上述肽序列可以看到两种还原酶蛋白质相似性这一事实。从54KD蛋白质得到的所有肽序列也见于被测序的56KD肽中。在被测定的氨基酸序列与从编码56KD还原酶的cDNA(图1)推导出的相应还原酶氨基酸序列之间有一处不相符合,根据cDNA序列资料氨基酸460是丝氨酸,而分别来自54KD和56KD肽6和9的信息表明这一位置是甘氨酸。

对用4种不同的限制性酶消化的希蒙德木属基因组DNA进行的Southern吸印分析测出了与还原酶cDNA探针杂交的一条主带和一条次带。

实施例5 希蒙德木属cDNA文库

本实施例描述了从收集于开花期后80-90天的希蒙德木属胚中分离poly(A)⁺RNA,然后构建希蒙德木属胚cDNA文库的方法。

A. 希蒙德木属RNA的分离

用Jackson和larkins最早提出(Plant physiol.57:5-10,1976)经由Goldberg等人改良的方法(Developmental Biol.83:201-217,1981)从多核糖体中分离RNA。除非有特别说明,提取过程的所有步骤都在4℃下进行。将10mg组织在液氮中于Waring捣合器里磨碎直到所有

组织都变成细粉为止。蒸发掉液氮后，加入170ml 提取缓冲液(200mM Tris pH9.0、160mM KCl、25mM EDTA、70mM MgCl₂、1%Triton X-100、0.5%脱氧胆酸钠，1 mM亚精胺，10 mMβ-巯基乙醇和500 mM蔗糖)，并将组织匀浆化约2分钟。匀浆经无菌的(miracloth) 过滤，再离心(12,000 Xg) 20分钟。将上清液轻轻倒入500 ml 无菌烧瓶中，并于室温下加入1/19体积的20%去垢剂溶液(20%Brij 35, 20%吐温40, 20%Noidet p-40 w/v)。用中速在4℃下搅拌所得溶液30分钟，再将上清离心(12,000 Xg) 30分钟。

约30 ml上清被等分后加入到已放有7 ml溶液(40 mM Tris pH 9.0、5 mM EDTA、200 mM KCl、30 mM MgCl₂，1.8 M蔗糖，5 mMβ-巯基乙醇)的无菌Ti60离心管中。用提取缓冲液将离心管充满，用Ti60转子于4℃离心(60,000 rpm) 4小时。离心后，吸掉上清，向每只离心管中加入0.5 ml重悬浮缓冲液(40mM Tris pH9.0、5 mM EDTA、200 mM KCl、30 mM MgCl₂，5 mMβ-巯基乙醇)。将离心管置于冰上10分钟，到沉淀团丸彻底重新悬浮后贮存。然后将上清再离心(120Xg) 10分钟以去掉不溶性物质。将1体积的溶于20 mM Tris pH7.6、200 mM EDTA，2%N-月桂基-肌氨酸中的自消化性蛋白酶K(1 mg/ml)加到上清中，混合物于室温下温育30分钟。

加入1/10体积乙酸钠和2体积乙醇沉淀RNA于-20℃下沉淀数小时后，经于4℃下离心(12,000 Xg) 30分钟沉淀RNA。将团丸重新悬浮于10 ml TE缓冲液(10 mM Tris, 1 mM EDTA)中，并用等体积的Tris pH7.5饱和酚提取。于4℃下离心(10,000 Xg) 20分钟进行相分离，移去水相，用1体积TE缓

冲液重新抽提有机相。然后收集水相，用1体积氯仿提取。经离心再次分相，如前所述用乙醇沉淀水相获得多核糖体RNA。

多核糖体RNA制剂中的多糖杂质是通过把RNA于高盐缓冲液（0.5M NaCl、20mM Tris pH7.5、1mM EDTA、0.1% SDS）过纤维素柱（Sigma-cell 50）来去除。杂质结合于柱上而从洗出液中收集RNA。收集洗出液馏份并用乙醇沉淀RNA。沉淀得到的总RNA重新悬浮于一小体积溶液中，应用寡聚-dT纤维素柱分离多腺苷酸化的RNA。

B. 用质粒载体构建cDNA文库

用多腺苷酸化的RNA在质粒克隆载体 pCGN 1703 中构建cDNA文库，pCGN 1703 是从商售克隆载体 Blue-cribe M13 - (Stratagene Cloning Systems; San Diego, CA) 衍生而来，具体做法如下。通过用BamHI消化，用绿豆核酸内切酶处理，而改变Bluescribe M13的多接头，连接平齐末端构建成缺失BamHI的质粒pCGN 1700。用EcoRI和SstI（毗邻的限制性位点）消化pCGN 1700，用具有BamHI, PstI, XbaI, ApaI和SmaI限制性位点，5' A A T T延伸物，3' T C G A延伸物的合成接头进行退火。接头插入到pCGN 1700中消除了EcoRI位点，重新构成了见于Bluescribe中的SstI（有时也称为“SacI”）位点，增添了包含于接头中的新限制性位点。用HindIII消化所得的质粒pCGN 1702，并用Klenow酶进行钝端化处理；用PvuII对线性DNA进行部分消化，并在稀释液中用T₄ DNA连接酶进行连接。筛选缺失lac启动子区域的转化体（pCGN 1703）用作质粒克隆载体。

用于cDNA合成的克隆方法简要说明如下。用SstI消化质粒克隆载体，用末端脱氧核苷酸转移酶作用于所得的3'延伸粘末端产生同聚物

T-尾。用 oligo(dA)纤维素层析从未消化的质粒或未加尾的质粒中分离出加尾质粒。所得的载体充当合成共价结合于载体质粒任一端的 cDNA 第一条链的引物。在鸟苷三磷酸存在下用末端转移酶处理 cDNA-mRNA-载体复合物,于 cDNA 链末端产生 G-尾。经 BamHI 消化去除邻近 BamHI 位点的其它 cDNA-mRNA 复合物,剩下在一端为 BamHI 粘末端而另一端为 G-尾的 cDNA-mRNA-载体复合物。

用一退火合成的环化连接使上述复合物环化,该连接子具有 5' BamHI 粘性末端、限制性酶 NotI、EcoRI 和 SstI 的识别序列及 3' C-尾端。在连接和修复之后,将环化复合物转化入大肠杆菌 DH 5 α 株 (BRL, Gaithersburg, MD) 形成 cDNA 文库。希蒙德木胚 cDNA 库含有约 1.5×10^6 克隆,平均 cDNA 插入量约 500 bp。

C. 用 λ 载体构建 cDNA 文库

希蒙德木多腺苷酸化 RNA 也用于在克隆载体 λ ZAP II/EcoRI (Stratagene, San Diego, CA) 中构建 cDNA 文库。构建文库所用的方案, DNA 和菌株由制造商提供。同样,根据制造商的说明用 Gigapack Gold 包装提取物 (Stratagene) 包装克隆。

以上述方式构建的 cDNA 文库含有约 1×10^6 克隆,其平均 cDNA 插入量约 400 bp。

D. 还原酶 cDNA 的分离

用根据还原酶肽序列设计引物和 PCR 技术生产还原酶核苷酸序列的约 1 Kb 部分,用于筛选 pCGN 1703 细菌性载体中的希蒙德木文库。

应用现有技术中的已知技术,例如 Manistis 等人所述 (见上文) 对文库进行筛选。获得了含 56 KD 还原酶蛋白质的克隆 pCGN 7571,

并测定了其DNA序列。pCGN 7 5 7 1的核苷酸序列和推测出的其氨基酸序列示于图1中。

实施例6 用还原酶构建体转化植物

A. Napin/还原酶表达构建体

用Napin基因的5'和3'调节区制备在植物细胞中表达还原酶的构建体的方法如下：

在未决的美国专利申请中（申请号：07/550,804）描述了Napin表达盒pCGN1808，该专利申请引入本文作参考文献。pCGN1808经修饰后含有位于两侧的限制性位点，仅允许表达序列而不允许抗生素耐性标记向双载体如pCGN1557(McBride and Summerfelt, 同上文)移动。将含KpnI、NotI和HindIII限制性位点的合成寡核苷酸进行退火，与pCGN1808唯一的HindIII位点连接，于是便恢复了唯一的HindIII位点。序列分析证实了所得的质粒pCGN3200在napin3'调节序列的3'端含有唯一的HindIII、NotI和KpnI限制性位点。

用HindIII和SacI消化pCGN3200并与用HindIII和SacI消化的pIC19R(Marsh, et al. Gene 32:481-485, 1984)相连接而将napin表达盒中的主要部分进行亚克隆以形成pCGN3212。借助于利用pCGN3200作模板以及位于SacI位点两侧的二条引物的PCR技术并与napin5'启动子和来自pCGN1808构建体的pCGN3200的pUC主要成分相连接重新构建napin启动子区的5'端最大序列。向前的引物含有ClaI、HindIII、NotI和KpnI限制性位点及napin 5'序列的408-423核苷酸（从EcoRV位点计数），反向引物含有与包括5'启动子中唯一的SacI位点的napin序列718-739互补的序列。根据制造商的说明，用Perkin Elmer/Cetus热循环仪进行PCR。PCR片段作为平齐末端片段亚

克隆到经HincII消化的pUC8 (Vieira and Messing Gene.19:259-268, 1982)中形成 pCGN3217。对 pCGN3217 上的napin插入序列进行测序证实, 通过PCR未引入不正确的核苷酸。pCGN3217中的napin 5'序列连接到经ClaI和SacI酶解并连接于经ClaI和 SacI消化的 pCGN3212上的napin表达盒的剩余部分。所得的表达盒pCGN3221 用HindIII酶解, 经凝胶纯化napin表达序列, 连接到用HindIII酶解的pIC20H (Marsh, 同前文。)最终的表达盒是pCGN3223, 它含有一氨苄青霉素抗性遗传背景, 基本上同于pCGN1808中的1.725 napin 5'和1.265 3'调节序列。调节区位于 HindIII、NotI和 KpnI限制性位点的侧端, 唯一的SalI、BglII, PstI和XhoI克隆位点位于5'和3'非编码区之间。

还原酶 cDNA pCGN7571 用SphI (该位点在3'未转译序列的1594-1599 碱基处) 酶解, 并于该位点处插入SalI连接子。用BamHI和SalI酶解所得质粒, 经凝胶电泳纯化含还原酶cDNA的片段, 并克隆到BglII/XhoI消化的pCGN3223 (即上文所述的napin盒) 中产生pCGN7585。

含有napin 5' / 还原酶 / napin 3'构建体的pCGN7586的HindIII酶解片段克隆到经HindIII酶解的pCGN1578(McBride and Summerfelt, 同上文) 中形成一种用于植物转化的双向载体pCGN7586。应用Holsters等人的方法 (Mol.Gen.Genet.163:181-187, 1978) 和下文描述的植物转化方法将pCGN7586转化到土壤杆菌属细胞中, 如EHA 101株 (Hood et al., J.Bacteriol 168:1291-1301, 1986)。

B. 植物转化

将高芥酸种子, 例如Reston栽培变种和油菜的Canola型变种的种子在95%的乙醇中浸泡2分钟, 于含1滴吐温20的1.0%次氯酸钠溶液中进行表面消毒约30分钟, 然后用无菌蒸馏水漂洗3次。

将种子平铺于Magenta盒中,该盒装有1/10浓度的Murashige基本有机培养基(Gibco; Grand Island, NY),培养基中补充了吡哆素(pyridoxine, 50 $\mu\text{g/L}$)、烟酸(50 $\mu\text{g/L}$),甘氨酸(200 $\mu\text{g/L}$)和0.6%Phytagar (Gibco) pH5.8。种子在细胞培养室中于22-24℃光照16小时发芽,其中冷荧光和红光的强度约45-50微爱因斯坦/米²/秒($\mu\text{Em}^2\text{S}^{-1}$)。

切除6-7天老秧苗中的下胚轴,切成2-4mm长的小片,平铺于饲养盘中(Horsh et al., Science 227:1229-1231, 1985)。饲养盘在用前一天制备:在含约30mM S盐基质(Carolina Biological, Burlington, NC) 100mg/L肌醇, 1.3mg/L盐酸硫胺素、200mgKH₂PO₄ (含3%蔗糖)、2,4-D (1.0mg/L)、0.6% w/v Phytagar (高压灭菌前调pH至5.8) (MS0/1/0培养基)的培养皿(100×25mm)中铺入1.0ml马铃薯培养物。使用前在饲养层的上面放一张无菌滤纸片(Whatman 3mm)。通过将10ml培养物转移到100ml上述用于饲养盘中并含2,4-D (0.2mg/L)和激动素(0.1mg/L)的新鲜MS培养基中对马铃薯悬浮培养物进行再次培养一周,在未用饲养细胞的实验中,将胚轴组织移植块切下后放到MS0/1/0培养基上部的滤纸片上。所有的胚轴组织移植块在22-24℃,连续光照强度30-65 $\mu\text{Em}^2\text{S}^{-1}$ 条件下于饲养盘中预培养24小时。

将含有双向载体的根癌土壤杆菌株EHA101的单个克隆转移到5mM G/L肉汤中于30℃过夜生长。胚轴组织移植块浸入到其中细菌稀释到 1×10^8 细菌/毫升的约10mM G/L肉汤中,约10分钟后再放入饲养盘中。每升M G/L肉汤含有5g甘露糖醇、

1g L-谷氨酸或1.15g谷氨酸钠, 0.25g KH_2PO_4 、0.10g NaCl、0.10g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1mg生物素, 5g胰化胨和2.5g酵母提取物。将肉汤pH值调至7.0。与土壤杆菌共培养48小时后, 将胚轴组织移块转移到含过滤除菌的羧苄青霉素(500mg/L, 高压灭菌后加入)和25mg/L硫酸卡那霉素(Boehringer Mannheim; Indianapolis, IN)的B₅ 0/1/0愈伤组织诱导培养基中(B₅盐和和维生素并补充1mg/L 2, 4-D; 0.6%Phytagar)。

在约85 $\mu\text{Em}^{-2} \text{S}^{-1}$ 连续光照培养3-7天后, 在切割表面可见愈伤组织, 将胚轴组织移植块转移到芽诱导培养基B₅BZ中(B₅盐和和维生素、还补充了3mg/L苯氨基嘌呤, 1mg/L玉米素, 1%蔗糖、0.6%Phytagar调pH值至5.8)。该培养基还含有羧苄青霉素(500mg/L)和硫酸卡那霉素(25mg/L)。每两周将胚轴组织移植块转至新鲜芽诱导培养基中进行亚培养。

1-3月后胚轴愈伤组织再生出芽。从愈伤组织切除至少1cm高的绿芽, 放入含B₅盐和和维生素, 1%蔗糖、羧苄青霉素(300mg/L), 硫酸卡那霉素(50mg/L)和0.6%w/vPhytagar的培养基中。2-4周后, 从基底部切除保持绿色的绿芽, 转移到含根诱生培养基(B₅盐和和维生素、1%蔗糖、2mg/L吲哚丁酸、50mg/L硫酸卡那霉素和0.6%Phytagar)的Magenta箱中。

拟南芥属植物的转化

转基因*Arabidopsis thaliana*植物可以通过Valverkens等人描述的经土壤农杆菌介导的转化(Proc.Nat.Acad.Sci.85:5536-5540,1988)而获得。用Holsters等人的方法(Mol.Gen.Genet.163:181-187,1978)将构建体转化到土壤农杆菌细胞, 如EHA101株中(Hood et al.,

J.Bacterial.168:1291-1301,1986)。

上述结果显示了获得在脂肪族醇形成中有活性的增溶性种子植物脂酰还原酶蛋白质的能力。本发明提供了获得酰基还原酶蛋白及其氨基酸序列的方法。此外，还提供了还原酶核苷酸序列。可以加工处理这些核苷酸序列使之在宿主细胞中转录和／或在宿主细胞中表达还原酶蛋白，该蛋白质具有广泛的用途。

本说明书引证的所有出版物和专利申请都引入本文作参考文献，就象每一出版物或专利申请被特别和逐一指明引为参考文献一样。

为了清楚和理解起见，尽管说明书用说明和例证对前述发明进行了详细地描述，但根据本发明的教导在不违背所附权利要求精神或范围的前提下对本发明进行某种改动和修饰是本领域技术人员显而易见的。

说明书附图

AAATCCTCCA CTCATACACT CCACTTCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCTGA AACAAATTGA 60
 GTAGCAAACT TAAAGAAA ATG GAG GAA ATG GGA AGC ATT TTA GAG TTT CTT 112
 Met Glu Glu Met Gly Ser Ile Leu Glu Phe Leu 10
 1
 GAT AAC AAA GCC ATT TTG GTC ACT GGT GCT ACT GGC TCC TTA GCA AAA 160
 Asp Asn Lys Ala Ile Leu Val Thr Gly Ala Thr Gly Ser Leu Ala Lys 25
 15 20
 ATT TTT GTG GAG AAG GTA CTG AGG AGT CAA CCG AAT GTG AAG AAA CTC 208
 Ile Phe Val Glu Lys Val Leu Arg Ser Gln Pro Asn Val Lys Lys Leu 40
 30
 TAT CTT CTT TTG AGA GCA ACC GAT GAC GAG ACA GCT GCT CTA CGC TTG 256
 Tyr Leu Leu Leu Arg Ala Thr Asp Asp Glu Thr Ala Ala Leu Arg Leu 60
 45 50
 CAA AAT GAG GTT TTT GGA AAA GAG TTG TTC AAA GTT CTG AAA CAA AAT 304
 Gln Asn Glu Val Phe Gly Lys Glu Leu Phe Lys Val Leu Lys Gln Asn 70
 65 75

图 1-1

TTA GGT GCA AAT TTC TAT TAT TCC TTT GTA TCA GAA AAA GTG ACT GTA GTA	352
Leu Gly Ala Asn Phe Tyr Ser Phe Val Ser Glu Lys Val Thr Val Val	
	80
	85
	90
CCC GGT GAT ATT ACT GGT GAA GAC TTG TGT CTC AAA GAC GTC AAT TTG	400
Pro Gly Asp Ile Thr Gly Glu Asp Leu Cys Leu Lys Asp Val Asn Leu	
	95
	100
	105
AAG GAA GAA ATG TGG AGG GAA ATC GAT GTT GTT GTC AAT AAT GCT GCT	448
Lys Glu Glu Met Trp Arg Glu Ile Asp Val Val Asn Leu Ala Ala	
	110
	115
	120
ACA ATC AAC TTC ATT GAA AGG TAC GAC GTG TCT CTG CTT ATC AAC ACA	496
Thr Ile Asn Phe Ile Glu Arg Tyr Asp Val Ser Leu Leu Ile Asn Thr	
	125
	130
	135
	140
TAT GGA GCC AAG TAT GTT TTG GAC TTC GCG AAG AAG TGC AAC AAA TTA	544
Tyr Gly Ala Lys Tyr Val Leu Asp Phe Ala Lys Lys Cys Asn Lys Leu	
	145
	150
	155
AAG ATA TTT GTT CAT GTA TCT ACT GCT TAT GTA TCT GGA GAG AAA AAT	592
Lys Ile Phe Val His Val Ser Thr Ala Tyr Val Ser Gly Glu Lys Asn	
	160
	165
	170

1-2

AGC ACT TTT AAA GAG CCC TTT CCT GGT TGG GTT GAA GGT GTC AGG ACC 928
 Ser Thr Phe Lys Glu Pro Phe Pro Gly Trp Val Glu Gly Val Arg Thr
 270 275 280

ATC GAT AAT GTA CCT GTA TAT TAT GGT AAA GGG AGA TTG AGG TGT ATG 976
 Ile Asp Asn Val Pro Val Tyr Tyr Gly Lys Gly Arg Leu Arg Cys Met
 285 290 295 300

CTT TGC GGA CCC AGC ACA ATA ATT GAC CTG ATA CCG GCA GAT ATG GTC 1024
 Leu Cys Gly Pro Ser Thr Ile Ile Asp Leu Ile Pro Ala Asp Met Val
 305 310 315

GTG AAT GCA ACG ATA GTA GCC ATG GTG CAC GCG AAC GCA AAC AGA TAC 1072
 Val Asn Ala Thr Ile Val Val Ala Met Val Ala His Ala Asn Gln Arg Tyr
 320 325 330

GTA GAG CCG GTG ACA TAC CAT GTG GGA TCT TCA GCG GCG AAT CCA ATG 1120
 Val Glu Pro Val Thr Tyr His Val Gly Ser Ser Ala Ala Asn Pro Met
 335 340 345

AAA CTG AGT GCA TTA CCA GAG ATG GCA CAC CGT TAC TTC ACC AAG AAT 1168
 Lys Leu Ser Ala Leu Pro Glu Met Ala His Arg Tyr Phe Thr Lys Asn
 350 355 360

CCA TGG ATC AAC CCG GAT CGC AAC CCA GTA CAT GTG GGT CGG GCT ATG	1216
Pro Trp Ile Asn Pro Asp Arg Asn Pro Val His Val Gly Arg Ala Met	365 370 375 380
GTC TTC TCC TCC TTC TCC ACC TTC CAC CTT TAT CTC ACC CTT AAT TTC	1264
Val Phe Ser Ser Phe Ser Thr Phe His Leu Tyr Leu Thr Leu Asn Phe	385 390 395
CTC CTT CCT TTG AAG GTA CTG GAG ATA GCA AAT ACA ATA TTC TGC CAA	1312
Ileu Leu Pro Pro Leu Lys Val Leu Glu Ile Ala Asn Thr Ile Phe Cys Gln	400 405 410
TGG TTC AAG GGT AAG TAC ATG GAT CTT AAA AGG AAG ACG AGG TTG TTG	1360
Trp Phe Lys Gly Lys Tyr Met Asp Leu Lys Arg Lys Thr Arg Leu Leu	415 420 425
TTG CGT TTA GTA GAC ATT TAT AAA CCC TAC CTC TTC TTC CAA GGC ATC	1408
Ileu Arg Leu Val Asp Ile Tyr Lys Pro Tyr Leu Phe Phe Gln Gly Ile	430 435 440
TTT GAT GAC ATG AAC ACT GAG AAG TTG CGG ATT GCT GCA AAA GAA AGC	1456
Phe Asp Asp Met Asn Thr Glu Lys Leu Arg Ile Ala Ala Lys Glu Ser	445 450 455 460

图 1-5

ATA GTT GAA GCT GAT ATG TTT TAC TTT GAT CCC AGG GCA ATT AAC TGG	1504
Ile Val Glu Ala Asp Met Phe Tyr Phe Asp Pro Arg Ala Ile Asn Trp	
465	470
475	
GAA GAT TAC TTC TTG AAA ACT CAT TTC CCA GGN GTC GTA GAG CAC GTT	1552
Glu Asp Tyr Phe Leu Lys Thr His Phe Pro Gly Val Glu His Val	
480	485
490	
CTT AAC TAAAAGTTAC GGTACGAAAA TGAGAAGATT GGAATGCATG CACCGAAAGN	1608
Leu Asn	
NCAACATAAA AGACGTGGTT AAAGTCATGG TCAAAAAAGA AATAAAATGC AGTTAGGTTT	1668
GTGTTGCAGT TTTGATTCCCT TGTATTGTTA CTTGTACTTT TGATCTTTT CTTTTTAAAT	1728
GAAATTCTC TCTTTGTTTT GTGAAAAAAA AAAAAAAAAA GAGCTCCTGC AGAAGCTT	1786