

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号

WO 2020/186593 A1

(43) 国际公布日
2020 年 9 月 24 日 (24.09.2020)

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/10 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/083866

(22) 国际申请日: 2019 年 4 月 23 日 (23.04.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910216803.3 2019 年 3 月 21 日 (21.03.2019) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号
张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

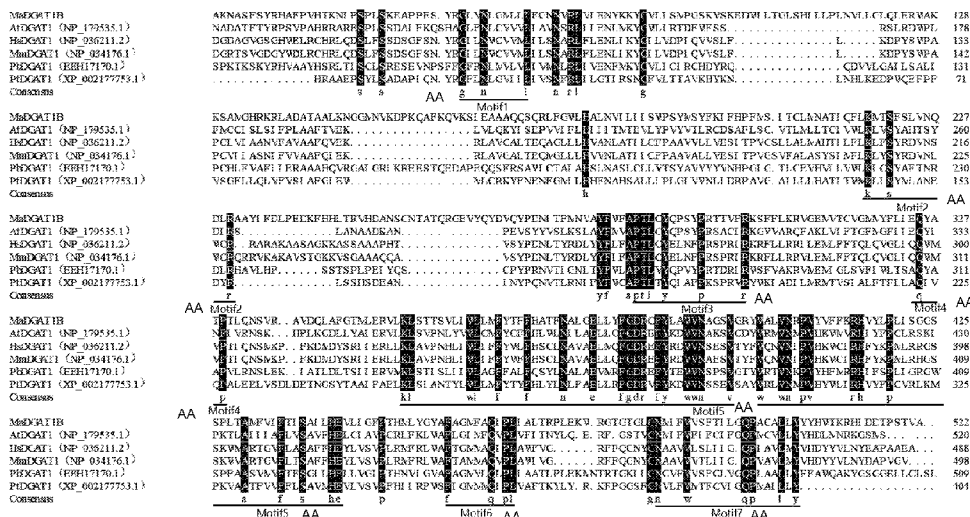
(72) 发明人: 陈海琴(CHEN, Haiqin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。
陈卫(CHEN, Wei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 唐鑫(TANG, Xin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 曹琨(CAO, Jun); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 赵建新(ZHAO, Jianxin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。
陈永泉(CHEN, Yongquan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 张灏(ZHANG, Hao); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省

(54) Title: DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE 1 AND USE THEREOF IN PRODUCTION OF TRIGLYCERIDE

(54) 发明名称: 一种二酰甘油酰基转移酶 1 及其在生产甘油三酯中的应用

图 1



AA Motif

(57) Abstract: Disclosed are a diacylglycerol acyltransferase 1 and the use thereof in the production of triglyceride, which fall within the technical fields of genetic engineering and microorganism engineering. The diacylglycerol acyltransferase 1 has the function of catalyzing the synthesis of triglyceride (TAG). After a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing the diacylglycerol acyltransferase 1 is subjected to induction culture for 48 h, the total fatty acid content and the triglyceride content in the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing the diacylglycerol acyltransferase 1 are respectively 1.94 times and 12.09 times higher than those in

哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E501
张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

Saccharomyces cerevisiae containing no diacylglycerol acyltransferase 1. The result provides a substantial theoretical support for further improving the capability of oil-producing microorganisms such as *Mortierella alpina* to produce triglyceride (TAG) by means of a genetic engineering means, thereby improving the capability of the microorganisms to produce polyunsaturated fatty acids (PUFAs).

(57) 摘要: 一种二酰甘油酰基转移酶1及其在生产甘油三酯中的应用, 属于基因工程以及微生物工程技术领域。所述二酰甘油酰基转移酶1具有催化甘油三酯(TAG)合成的功能, 将含有二酰甘油酰基转移酶1的重组酿酒酵母诱导培养48h, 可使含有二酰甘油酰基转移酶1的重组酿酒酵母中的总脂肪酸含量以及甘油三酯含量分别较不含二酰甘油酰基转移酶1的酿酒酵母提升1.94倍以及12.09倍, 该结果为通过基因工程手段进一步提升高山被孢霉等产油微生物产甘油三酯(TAG)的能力, 进而提高微生物产多不饱和脂肪酸(PUFAs)的能力提供了充实的理论支持。

一种二酰甘油酰基转移酶 1 及其在生产甘油三酯中的应用

技术领域

本发明涉及一种二酰甘油酰基转移酶 1 及其在生产甘油三酯中的应用，属于酶工程和生物工程技术领域。

背景技术

多不饱和脂肪酸（PUFAs）是指含有两个或两个以上双键且碳链长度为 18~22 个碳原子的直链脂肪酸。由于其具有降低心脑血管疾病的功能且在维持身体健康和预防疾病等方面发挥着十分重要的作用，因此，多不饱和脂肪酸（PUFAs）作为一种保健品，在国内、国际均拥有巨大的市场。

目前，市场上售卖的多不饱和脂肪酸（PUFAs）多来源于水生浮游植物，食此类植物为生的野鲮鱼、鲱鱼、鲑鱼等深海鱼类的内脏中也富含多不饱和脂肪酸（PUFAs）。但是，由于动植物的生长周期过于长且动植物的培育成本相对高，仅靠从这些动、植物中提取获得多不饱和脂肪酸（PUFAs）已无法满足日益增长的市场需求，因此，急需找到可以提升多不饱和脂肪酸（PUFAs）产量的方法。

研究表明，有些细菌、真菌等微生物也具有生产脂质的功能，并且，这些细菌、真菌等微生物均具有生长周期短、繁殖快、培养成本低、不受地理环境及气候条件影响、环境友好等诸多优势，另外，这些细菌、真菌等微生物还具有油脂产量高、产得的油脂种类丰富等特点，因此，通过微生物产油脂提升多不饱和脂肪酸（PUFAs）的产量是一种极具潜力的方法。

微生物来源的脂质包括甘油酯、类脂（磷脂、固醇等）和游离脂肪酸，其中，甘油三酯（TAG）是微生物脂质最主要的储存形式。而微生物中的甘油三酯（TAG）主要通过内质网上的肯尼迪途径合成，酰基辅酶 A：二酰甘油酰基转移酶（DGAT，EC 2.3.1.20）则是肯尼迪途径的关键限速酶，可催化在二酰甘油 sn-3 位置上加一个脂肪酸酰基的过程。

现在，已经被报道的 DGAT 分为四种类型：DGAT1、DGAT2、DGAT3 和 DGAT/WS，其中，DGAT1 和 DGAT2 在真核生物中普遍存在，二者虽然在 DNA 层面同源性低，是两种不同的酶，但均对生物体中 TAG 的合成有重要作用，例如，Bouvier-Navé P 等在酵母中表达拟南芥 *dgat* 基因，使得重组酵母菌中 DGAT 活性增加 200~600 倍，TAG 积累量增加 3~9 倍；并且，二者虽然具有广泛的脂肪酸底物偏好性，但在某些情况下也会优先选择特定的脂肪酸底物，例如，Taylor D C 等发现甘蓝型油菜的 DGAT1 偏好棕榈酸，Shockey, J. M 等发现油桐的 DGAT2 优先选择 α -桐酸。

鉴于 DGAT 在脂肪酸合成过程中的重要调控作用，进一步研究其功能对定向强化产油微生物脂质积累，进而提升产油微生物多不饱和脂肪酸（PUFAs）的产量具有重要指导意义。

但是，并非所有 DGAT 都能对产油微生物的脂质积累起到促进作用，例如，文章《卷枝毛霉二酰甘油酰基转移酶的基因鉴定与功能分析》中将卷枝毛霉的 *dgat1* 基因通过载体 pYES2 在酿酒酵母中异源表达，结果表明两种 DGAT1 酶均没有表现出合成 TAG 的能力（参考文献：张鲁宁.卷枝毛霉二酰甘油酰基转移酶的基因鉴定与功能分析.江南大学,2015）；文章《蒺藜苜蓿 DGAT1 基因的克隆和功能鉴定》中将蒺藜苜蓿的 *dgat1* 基因在酿酒酵母中异源表达，发现其 MtDGAT1-1 没有表现出合成 TAG 的能力（参考文献：徐荣华,崔涛,王建才.蒺藜苜蓿 DGAT1 基因的克隆和功能鉴定.西北植物学报,2016,36(10):1941-1947）；文章《产油酵母圆红冬孢酵母二酰甘油酰基转移酶的鉴定和性质研究》中将圆红冬孢酵母中的 *dgat1* 通过载体 pYES2 在酿酒酵母中异源表达，结果表明其 DGAT1 酶没有表现出合成 TAG 的能力（参考文献：王珍.产油酵母圆红冬孢酵母二酰甘油酰基转移酶的鉴定和性质研究.江南大学,2016）。因此，选择合适的 DGAT 格外重要。

高山被孢霉（*Mortierella alpina*, *M. alpina*）是一种具有强脂质合成能力的产油丝状真菌，其总脂含量可达菌体干重的 50% 以上，其中， ω -6 多不饱和脂肪酸：花生四烯酸（ARA）的含量占总脂的 30%~40%，因此，高山被孢霉（*Mortierella alpina*, *M. alpina*）可以说是一种非常优质的 ARA 生产菌，高山被孢霉（*Mortierella alpina*, *M. alpina*）来源的 DGAT 也相对更具对产油微生物的脂质积累起到促进作用的潜力。

然而，目前，关于 *M. alpina* 中 DGAT 的研究报道很少，且这些报道集中于对 DGAT2 的研究，例如，Jeennor S、Luo X A 等发现 *M. alpina* 中 DGAT2 能提高 TAG 含量并具有特定的脂肪酸偏好性，至今为止，还未有关于 *M. alpina* 中 DGAT1 的相关研究报道。

若能够成功获取 *M. alpina* 中的 DGAT1，并对其进行生物信息学分析并在微生物中表达以研究该酶的功能，一定能够为进一步提高微生物中 TAG 和特定的 PUFAs 的产量提供更充实的理论依据。

发明内容

[技术问题]

本发明要解决的技术问题是提供一种高山被孢霉（*Mortierella alpina*, *M. alpina*）来源的二酰甘油酰基转移酶 1（DGAT1）以提高微生物产甘油三酯（TAG）的能力。

[技术方案]

为解决上述问题，本发明提供了一种二酰甘油酰基转移酶 1（Diacylglycerol

acyltransferase,DGAT;EC2.3.1.20), 所述二酰甘油酰基转移酶 1 的氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示。

本发明还提供了编码上述二酰甘油酰基转移酶 1 的基因。

在本发明的一种实施方式中, 所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID No.2 所示。

本发明还提供了携带上述基因的重组质粒。

在本发明的一种实施方式中, 所述重组质粒的载体为 pYES2 载体。

本发明还提供了携带上述基因或上述重组质粒的宿主细胞。

在本发明的一种实施方式中, 所述宿主细胞为酿酒酵母或大肠杆菌。

在本发明的一种实施方式中, 所述宿主细胞为酿酒酵母。

本发明还提供了上述二酰甘油酰基转移酶 1 的制备方法, 所述方法为使用上述宿主细胞, 将上述宿主细胞加入到不含尿嘧啶的培养基中培养 36~48 h 后收集菌体, 将收集的菌体加入到不含葡萄糖而含有半乳糖的培养基中至 $OD_{600}=0.3\sim0.5$ 后继续诱导培养 48~96 h, 得到二酰甘油酰基转移酶 1。

在本发明的一种实施方式中, 所述培养基包含为 SC-U 培养基。

在本发明的一种实施方式中, 所述培养的温度为 28~30℃、转速为 200~250 rpm。

本发明还提供了应用上述方法制备得到的二酰甘油酰基转移酶 1。

本发明还提供了上述二酰甘油酰基转移酶 1 或上述基因或上述重组质粒或上述宿主细胞或上述制备方法或上述制备得到的二酰甘油酰基转移酶 1 在生产甘油三酯方面的应用。

本发明还提供了一种生产甘油三酯的方法, 所述方法为使用上述宿主细胞, 将上述宿主细胞加入到不含尿嘧啶的培养基中培养 36~48 h 后收集菌体, 将收集的菌体加入到不含葡萄糖而含有半乳糖的培养基中至 $OD_{600}=0.3\sim0.5$ 后继续诱导培养 48~96 h, 得到甘油三酯。

在本发明的一种实施方式中, 所述培养基包含为 SC-U 培养基。

在本发明的一种实施方式中, 所述培养的温度为 28~30℃、转速为 200~250 rpm。

[有益效果]

本发明的二酰甘油酰基转移酶 1 具有催化甘油三酯 (TAG) 合成的功能, 将含有本发明二酰甘油酰基转移酶 1 的重组酿酒酵母诱导培养 48 h, 可使含有本发明二酰甘油酰基转移酶 1 的重组酿酒酵母中的总脂肪酸含量以及甘油三酯含量分别较不含本发明二酰甘油酰基转移酶 1 的酿酒酵母提升 1.94 倍以及 12.09 倍, 甘油三酯中的单不饱和脂肪酸 16:1、18:1 的含量较不含本发明二酰甘油酰基转移酶 1 的酿酒酵母分别提升 10.36、9.14 倍, 该结果为通过基因工程手段进一步提升高山被孢霉等产油微生物产甘油三酯 (TAG) 的能力, 进而提高微生物

产多不饱和脂肪酸（PUFAs）的能力提供了充实的理论支持。

附图说明

图 1: MaDGAT1B 与已知二酰甘油酰基转移酶 1 的氨基酸序列比对结果图。

图 2: MaDGAT1B 的跨膜结构预测图。

图 3: 重组大肠杆菌 *E.coli*-pYES2-*Madgat1b* 的阳性转化子验证图; 其中, M 表示 marker, 1~20 分别表示转化子编号。

图 4: 重组酿酒酵母 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 的阳性转化子验证图; 其中, M 表示 marker, 1~9 分别表示转化子编号。

图 5: 重组酿酒酵母 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 的目的蛋白 MaDGAT1B 的表达情况验证图; 其中, M 表示 marker, “-”表示阴性对照 (含空载体的 *INVSc1*), “+”表示阳性对照 (其他带 his 标签蛋白的 *INVSc1*), 1 表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b*。

图 6: 重组酿酒酵母 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 全细胞蛋白和全细胞蛋白沉淀物中的目的蛋白 MaDGAT1B 的表达情况的 Western Blot 结果; 其中, M 表示 marker, “-”表示阴性对照 (含空载体的 *INVSc1*), “+”表示阳性对照 (其他带 his 标签蛋白的 *INVSc1*), 1a 表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 全细胞蛋白, 1b 表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 全细胞蛋白沉淀物。

图 7: 重组酿酒酵母 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 全细胞蛋白和全细胞蛋白沉淀物中的目的蛋白 MaDGAT1B 的表达情况的灰度分析估算结果; 其中, 1a 表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 全细胞蛋白, 1b 表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 全细胞蛋白沉淀物。

图 8: 重组酿酒酵母 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 的总脂质薄层色谱图; 其中, C 表示 *INVSc1*-pYES2, 1①、1②表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 的两个平行组, Sta 表示三软脂酸甘油三酯标准品。

图 9: 重组酿酒酵母 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 的总脂 (TFA) 中 TAG 的含量; 其中, C 表示 *INVSc1*-pYES2, 1 表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b*。

图 10: 重组酿酒酵母 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 的 TAG 中脂肪酸的组成和含量; 其中, C 表示 *INVSc1*-pYES2, 1 表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b*, other 表示 C16:0、C16:1、C18:0、C18:1 外的脂肪酸含量之和。

图 11: 重组酿酒酵母 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 的 TAG 中主要脂肪酸的含量变化; 其中, 纵坐标表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 与 *INVSc1*-pYES2 的比值。

图 12: 重组酿酒酵母 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 的总脂肪酸含量; 其中, C 表示 *INVSc1*-pYES2, 1 表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b*。

图 13: 重组酿酒酵母 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 的生物量 (菌体干重); 其中, C 表示 *INVSc1*-pYES2, 1 表示 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b*, DCW 表示菌体干重。

具体实施方式

下面结合具体实施例, 对本发明进行进一步的阐述。

下述实施例中涉及的高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) ATCC 32222 购自美国标准生物品收藏中心 (ATCC); 大肠杆菌 (*E.coli*) DH5 α 、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, *S.cerevisiae*) 营养缺陷型菌株 *INVSc1*、表达载体 pYES2/NT C 购自 Invitrogen 公司; KOD plus 高保真 DNA 聚合酶购自日本 Toyobo 公司; Taq DNA 聚合酶购自 CWBIO 公司; 反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser RR047A&R6110A) 购自日本 Takara 公司; 质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 真菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 BioFlux 公司; 限制性内切酶 (*EcoR* I、*Xba* I)、T₄ 连接酶、Trizol、PCR 产物纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒、GeneRuler DNA Ladder Mix、PageRuler Prestained Protein Ladder、抗体 (6 $\times$ His-Tag Monoclonal Antibody、Peroxidase AffiniPure Mouse Anti-Goat IgG [H+L]) 购自 Thermo 公司; 正十五烷酸 (C15:0)、三软脂酸甘油酯、20% (w/w) 盐酸甲醇、酸洗玻璃珠、鲑鱼精购自 Sigma 公司; 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 40% 溶液 (29:1)、TEMED、DEPC 水、氨苄 (Ampicillin) 抗生素、无氨基酵母氮源 (YNB) 和各类氨基酸购自上海生物工程有限公司; 酵母提取物、胰蛋白胨购自 Oxoid 公司; 薄层层析硅胶板购自乳山太阳干燥剂有限公司; 牛血清蛋白购自麦克林公司; 低吸附型无酶枪头、无酶离心管、无酶 PCR 管、2 mL 棕色气相瓶及瓶盖购自苏州科晴生物公司; BCA 蛋白测定试剂盒购于上海碧云天公司; 玻璃点样毛细管购自上海申迪玻璃仪器有限公司; 脱脂乳粉购自美国 BD 公司; PVDF 膜、Plus ECL 显影液购自 MILLIPORE 公司; 其他试剂购自国药集团。

下述实施例中涉及的酿酒酵母转化相关实验用到的试剂及配方均参考 Invitrogen 公司的 pYES2 质粒表达手册, 其中, 将 PEG-3350 替换为 PEG-4000。

下述实施例中涉及的引物由上海桑尼公司合成, 测序工作由上海华大基因公司完成。

(高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) ATCC 32222、大肠杆菌 (*E.coli*) DH5 α 、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, *S.cerevisiae*) 营养缺陷型菌株 *INVSc1* 均可以购买得到, 不需要进行用于专利程序的保藏)

下述实施例中涉及的培养基如下:

LB 液体培养基: 10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L NaCl。

LB 固体培养基: 10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L NaCl、20 g/L 琼脂。

SOC 复苏培养基: 20 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、0.5 g/L NaCl、0.186 g/L KCl、0.95 g/L MgCl₂、3.6 g/L 葡萄糖。

YPD 液体培养基: 10 g/L 酵母提取物、20 g/L 胰蛋白胨、20 g/L 葡萄糖。

YPD 固体培养基: 10 g/L 酵母提取物、20 g/L 胰蛋白胨、20 g/L 葡萄糖、20 g/L 琼脂。

SC-U 液体培养基: 20 g/L 葡萄糖、6.7 g/L YNB、各 0.1 g/L 的氨基酸(腺嘌呤、精氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、色氨酸), 各 0.05 g/L 的氨基酸(天冬氨酸、组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸)。

SC-U 固体培养基: 20 g/L 葡萄糖、6.7 g/L YNB、各 0.1 g/L 的氨基酸(腺嘌呤、精氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、色氨酸), 各 0.05 g/L 的氨基酸(天冬氨酸、组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸)、20 g/L 琼脂。

SC-U 诱导培养基: 10 g/L 棉籽糖、6.7 g/L YNB、各 0.1 g/L 的氨基酸(腺嘌呤、精氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、色氨酸), 各 0.05 g/L 的氨基酸(天冬氨酸、组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸)、20 g/L 半乳糖。

实施例 1: 编码本发明二酰甘油酰基转移酶 1 的基因的筛选与生物信息学分析

具体步骤如下:

在 NCBI 中选择不同物种中已鉴定功能的 *dgat1* 基因序列为模板(表 1), 在已完成测序的 *M. alpina* ATCC 3222 菌株的基因库中进行 BLAST 比对, 获得备选的目的基因; 然后将备选基因在 NCBI 库中进行二次比对筛选, 将最终得到的目的基因命名为 *Madgat1b*, 对应蛋白命名为 MaDGAT1B。

为了判断筛选出的 MaDGAT1B 是否属于 DGAT1 类酶, 将其与表 1 的 5 种来自动物、高等植物、微生物、微藻中典型 DGAT1 的氨基酸序列进行比对, 通过 DNAMAN 软件进行氨基酸同源性和保守结构分析, 结果见图 1(黑色标注部分表示相似度 100%的氨基酸); 通过在线网站 TMHMM 预测 MaDGAT1B 的跨膜结构, 结果见图 2; 并且, 通过在线网站 ExPASy-ProtParam tool 预测 MaDGAT1B 的蛋白大小和等电点。

研究表明, 通常情况下, DGAT1 中有 7 个保守区域, 分别标记为 Motif1-7, 对应的保守区域如下: Motif1 (GL 区段)、Motif2 (KS 区段)、Motif3 (PTR 区段)、Motif4 (QP 区段)、Motif5 (LWLFFEFDRFYWWNWNPPFSHP 区段)、Motif6 (FQL 区段) 和 Motif7 (NGQPY 区段), 并且, 一般而言, DGAT1 包含 500 多个氨基酸残基, 分子量为 50~60 kD, 蛋白三维结构中包含 6~9 个假定的跨膜区域。

由图 1 可知, MaDGAT1B 中含有 DGAT1 酶通常应有的 7 个 Motif 保守结构(划线部分),

并且, MaDGAT1B 与表 1 中 5 种不同来源的 DGAT1 蛋白比较发现相似度为 37.48%, MaDGAT1B 对应 cDNA 的全长为 1569 bp, 编码 522 个氨基酸; 由图 2 可知, MaDGAT1B 含有 7 个跨膜结构; 并且, 由 ExPASy-ProtParam tool 预测结果可知, MaDGAT1B 蛋白大小约为 59.49 kD, 等电点为 9.43, 可见, MaDGAT1B 具有 DGAT1 蛋白结构的基本特征。

综合以上结果, MaDGAT1B 与不同物种的 DGAT1 氨基酸序列相似性具有生物学意义, 基因长度、氨基酸个数、保守区域和跨膜结构均符合 DGAT1 酶的特征, 由此认为筛选得到的 MaDGAT1B 具有 DGAT1 蛋白的功能。

表 1 比对模板 *dgat1* 基因的相关信息

类型	物种	缩写	编号
<i>dgat1</i>	智人	<i>Hsdgat1</i>	NM_012079.6
	小鼠	<i>Mmdgat1</i>	NM_010046.3
	拟南芥	<i>Atdgat1</i>	NM_127503.3
	三角褐指藻	<i>Ptdgat1</i>	XM_002177717.1
	巴西芽生菌	<i>Pbdgat1</i>	KN305546.1

实施例 2: *Madgat1b* 的克隆

具体步骤如下:

使用 Trizol 法提取高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) ATCC 32222 的总 RNA, 按照 Takara 反转录试剂盒说明书进行反转录获得 cDNA, 在高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) ATCC 32222 的 cDNA 文库中通过 PCR 反应扩增 *Madgat1b*, 扩增 *Madgat1b* 所用引物见表 2。

所用 PCR 仪为 BIO-RAD T100 Thermal Cycler, 使用 KOD plus 高保真 DNA 聚合酶, 反应体系为 50 μ L, 体系内容按照该 DNA 聚合酶说明书内容进行; 反应过程如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 100 s, 重复上述三步骤 30 次, 然后 68 $^{\circ}$ C 充分延伸 7 min, 最后降到 12 $^{\circ}$ C 保持 5 min 后停止。

反应结束后, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物条带大小正确后, 对该 PCR 产物进行纯化, 获得 *Madgat1b*。

表 2 引物序列及其用途

引物名称	引物序列 (5'-3')	用途
<i>Madgat1b</i> F	SEQ ID No.3: CCGGAATTCATGACCAAGAACGAGCCC	用于 <i>Madgat1b</i> 基因扩增
<i>Madgat1b</i> R	SEQ ID No.4: CTAGTCTAGATCAGGCTACTGTCGAGGG	

注: 酶切位点用下划线标出。

实施例 3: *Madgat1b* 在酿酒酵母中的表达

具体步骤如下:

(1) 酵母表达载体的构建

使用限制性内切酶 *EcoR* I、*Xba* I 对 *Madgat1b* 进行酶切后, 利用 T₄ 连接酶将酶切产物连接到 pYES2/NT C 表达载体中 β -半乳糖苷酶 (GAL1) 启动子下游的对应多克隆位点中, 通过化学转化法 (42°C、90 s 转化条件) 将连接产物 (不超过 5%) 导入大肠杆菌 (*E.coli*) DH5 α 中, 通过添加有 0.1 g/L Ampicillin 的 LB 固体培养基平板初步筛选得到大肠杆菌阳性转化子, 然后提取质粒作为模板, 通过使用表 3 的通用引物 T7/T7 terminator 进行 PCR 扩增, 将产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证, 初步筛选出条带大小正确的大肠杆菌阳性转化子并进行测序分析, 测序成功即获得重组质粒, 命名为 pYES2-*Madgat1b* (*E.coli* DH5 α 阳性转化子筛选验证的结果见图 3 所示, 用通用引物扩增后的 *Madgat1b* 由于从 pYES2 载体上开始复制, 因而长度应为 1917 bp, 图 3 中显示 *E.coli*-pYES2-*Madgat1b* 的转化子 5、12 在约 2000 bp 处有目的条带, 将转化子 *E.coli*-pYES2-*Madgat1b*-12 进一步测序验证, 测序结果与理论一致)。

(2) 酿酒酵母的转化筛选

根据 Invitrogen 公司的 pYES2 质粒手册内容, 通过 PEG/LiAc 方法将 (1) 中获得的测序正确的重组质粒 pYES2-*Madgat1b* 和空载体 pYES2/NT C (用作阴性对照) 分别转化到酿酒酵母菌株 INVSc1 中, 通过不含尿嘧啶 (ura⁻) 的 SC-U 固体培养基平板初步筛选得到酿酒酵母阳性转化子, 然后提取酵母基因组作为模板, 使用表 3 的 T7 / T7 terminator 通用引物进行 PCR 扩增, 将产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证, 初步筛选出条带大小正确的阳性转化子并进行测序分析, 得到重组酿酒酵母 INVSc1-pYES2-*Madgat1b* 以及重组酿酒酵母 INVSc1-pYES2 (酿酒酵母阳性转化子筛选验证结果见图 4, 由图 4 可知, INVSc1-pYES2-*Madgat1b* 的 1~9 号转化子 PCR 验证结果与理论值一致, 在约 2000 bp 附近有目的条带, 将 INVSc1-pYES2-*Madgat1b* 的 1~9 号转化子进一步测序验证, 测序结果与理论一致)。

(3) 诱导培养

将重组酿酒酵母 INVSc1-pYES2-*Madgat1b* 以及重组酿酒酵母 INVSc1-pYES2 在 SC-U 液体培养基中培养 48 小时, 培养条件为 28°C、200 r/min, 然后 6000 rpm 离心 5 min 后弃去培养基, 接入 SC-U 诱导培养基 (起始 OD₆₀₀ = 0.4) 中使 *Madgat1b* 被半乳糖诱导表达, 在同样条件下培养 48 小时, 得到发酵液, 将发酵液在 12000 rpm、1 min 条件下离心收集菌体, 取部分湿菌体用于蛋白表达分析, 将其余菌体冷冻干燥后测定生物量以及脂质组分与含量。

(4) 目的蛋白表达水平测定

收集诱导 48 h 后的发酵液 2 mL，在 12000 rpm、4℃ 条件下离心 1 min 收集菌体，基于 Invitrogen 公司的 pYES2 质粒手册内容提取酿酒酵母的全细胞蛋白质，在菌体中加入裂解液使 OD₆₀₀ 值达到 50~100，然后加入与裂解液等体积的 0.5 mm 酸洗玻璃珠，置于漩涡振荡器振荡 30 s 后置于冰上 30 s，重复 4 次后，通过 BCA 试剂盒测定全细胞蛋白质的浓度，通过 SDS-PAGE (10%分离胶) 分离样品，电转移 (200mA、1h) 到 PVDF 膜上，使用稀释度 1:2000 的 his 抗体作为第一抗体，以稀释度 1:5000 鼠二抗与之结合，然后与化学发光溶液反应并在成像仪上显影拍照。

利用 Western Blot 对酵母重组菌株中目的蛋白 MaDGAT1B 的表达情况进行分析，选用 pYES2/NT C 载体 N 端 6×his 标签作为抗原，使用在线软件 ExPASy-ProtParam tool 预测带有 6×his 标签的 MaDGAT1B 蛋白质的分子量约为 64 kD，Western Blot 结果见图 5 所示。

由图 5 可知，*INVSc1-pYES2-Madgat1b* 的全蛋白提取物中有与 his 抗体结合并且大小在 55~72 kD 之间的蛋白，与目的蛋白的预期大小 64 kD 基本一致，因而该条带为带有 6×his 标签的 MaDGAT1B，表明外源蛋白 MaDGAT1B 在酿酒酵母中能正常表达。

将 *INVSc1-pYES2-Madgat1b* 的全细胞蛋白提取液在 20000 g 条件下离心 15 min 后取上清液和沉淀测定蛋白浓度，最终分别取 20 μg 的全细胞蛋白样品和沉淀样品以进行 Western Blot 实验（上清液蛋白浓度较低不进行实验），通过 Image J 软件进行蛋白表达量估算，结果如图 6~图 7 所示。

由图 6~图 7 可知，在沉淀物中检测到较强的蛋白信号，而等质量的菌体全细胞蛋白样品中 MaDGAT1B 表达量明显降低，相差 11 倍左右，推测该现象可能是由于 MaDGAT1B 为内质网上膜蛋白，在离心时与细胞器碎片一同沉淀。

(5) 甘油三酯中脂肪酸组成及含量测定

薄层色谱法 (TLC) 是一种基于混合物组分在固定相和流动相之间的不均匀分配或保留而将其分离的方法，组分经展开、显色，形成色谱谱带，可以通过适当技术对谱带进行处理得到定性和定量的检测结果，因此，用薄层色谱从 (3) 获得的菌体的总脂质中分离 TAG，利用 GC-MS 技术检测其 TAG 部分的脂肪酸组成及含量，具体步骤如下：

称取 20 mg 菌体于提脂玻璃瓶中，用氯仿:甲醇:水=2:2:1 (v/v/v) 的混合有机试剂提取总脂质，以正己烷:乙醚:乙酸=80:20:1 (v/v/v) 的混合溶剂作为展开剂在薄层色谱板上分离各个脂质，碘蒸气熏染使各个斑点可视化，并使用 Image J 软件进行灰度分析估算 TAG 在总脂中的比例，随后，立即刮下 TAG 部分的斑点置于提脂玻璃瓶中并加入十五烷酸标品作为内标，使用盐酸:甲醇=1:9 (w/w) 溶剂在 60℃ 水浴条件下甲酯化 3 小时，用正己烷提取脂肪酸甲酯，

通过岛津公司单四级杆气相色谱质谱联用仪 GC MS-QP2010 Ultra 进行分析 TAG 中的脂肪酸成分和含量；

操作条件如下：使用 RESTEK 的 Rtx-Wax 气相色谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），氮气用作载气，进样口温度为 240℃，进样量为 1 μL，分流比为 10；柱温箱温度从 150℃开始，保持 2 min，然后以 10 °C/min 的速率升温至 190℃，保持 5 min，后以 5 °C/min 速率升温至 220℃，保持 16 min。质谱扫描范围为 50~550 m/z；离子源和传输线接口温度分别为 220℃和 250℃。

利用 TLC 对重组菌中总脂进行分离的展开图及分析结果如图 8~图 9 所示。

由图 8~图 9 可知，对照组 *INVSc1*-pYES2 中 TAG 含量占总脂的 42%；与对照组相比，*INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 中 TAG/TFA 比例显著变化（ $p<0.05$ ），比对照组高 19.63%。可见，*Madgat1b* 表现出较强的提高 TAG 在总脂质中的含量的能力。

刮取 TLC 板上 TAG 部分的样品并通过 GC-MS 对脂肪酸进行定性、定量分析后，TAG 中脂肪酸的组成和含量结果见图 10。

由图 10 可知，酿酒酵母中 TAG 的主要脂肪酸成分为十六烷酸（C16:0）、十六碳烯酸（C16:1）、十八烷酸（C18:0）、十八碳烯酸（C18:1），且与对照组相比，转化子中各脂肪酸成分间比例无明显变化。

将 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 转化子的 TAG 中的 4 种主要脂肪酸与对照组相比，探究含量的变化情况，结果见图 11。

由图 11 可知，与对照组相比，*INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 的 TAG 中 4 种主要脂肪酸含量均有较大提升，C16:0、C16:1、C18:0、C18:1 含量的提升倍数分别为 15.24、10.36、15.21、9.14 倍，导致 TAG 总提升量为对照组的 12.09 倍。可见，*Madgat1b* 在增加 TAG 含量方面有明显效果，在提升产油微生物的脂质含量方面有巨大潜力。

（6）菌体总脂肪酸的组成及含量测定

分别称取 20 mg 冻干的 *INVSc1*-pYES2、*INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 菌体于提脂玻璃瓶中，加入 2 mL 浓度为 4 mol/L 的盐酸，于 80℃条件下水浴 1 h 后，充分振荡，然后在 -80℃冰箱中静置 15 min，重复上述反复冻融操作 3 次，然后加入 100 μL 2.096 mg/mL 的十五烷酸标准品作为内标，1 mL 氯仿、1 mL 甲醇提取脂质，旋转振荡 1 h 后 2000 rpm 离心吸取下层氯仿层到新瓶，补加 1 mL 氯仿并充分振荡后，同上操作，混合两次的氯仿层并氮吹吹干，后续甲酯化和测定方法同（5）中所述。

重组酵母菌株中总脂肪酸含量如图 12 所示，菌体的生物量（每升培养基中的菌体干重）

如图 13 所示，总脂肪酸的组成和含量如表 4 所示。

由图 12~图 13 可知，与对照组 *INVSc1*-pYES2 相比，在酿酒酵母中表达外源 MaDGAT1B 对菌体生长无显著影响，对照组酿酒酵母中总脂含量为菌体干重的 7.79%，*INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 中总脂含量为菌体干重的 15.15%，与对照组相比显著增加 1.94 倍 ($p<0.05$)。

由表 4 可知，*INVSc1*-pYES2-*Madgat1b* 中各脂肪酸的含量均有大幅度提升，其中 C14:0 提升最大，为 5.79 倍，但含量较低，对总脂含量影响较小；C16:0、C16:1、C18:0、C18:1 的含量分别提升 2.40、1.61、2.91、1.63 倍，分别占总脂的 25.33%、31.55%、13.50%、23.58%，是导致总脂含量提高的主要脂肪酸成分。

可见，*Madgat1b* 在提升总脂含量方面有明显的优势，说明高山被孢霉来源的 DGAT1 蛋白可以更好地促进脂质积累，具有很好的应用价值。

表 3 引物序列及其用途

引物名称	引物序列 (5'-3')	用途
T7	SEQ ID No.5: TAATACGACTCACTATAGGG	验证利用 pYES2/NT C 载体构建的重组质粒
T7 terminator	SEQ ID No.6: TCGGTTAGAGCGGATGTG	

表 4 酿酒酵母总脂肪酸的组成和含量

菌株	各种脂肪酸含量 (%，w/w，菌体干重)							
	C12:0	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C26:0
C	0.04±0.00	0.06±0.00	0.02±0.00	1.60±0.02	2.97±0.04	0.70±0.02	2.19±0.03	0.20±0.15
1	0.12±0.00	0.36±0.00	0.07±0.00	3.84±0.16	4.77±0.02	2.05±0.14	3.57±0.08	0.36±0.11

注：C 为 *INVSc1*-pYES2，1 为 *INVSc1*-pYES2-*Madgat1b*。

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

- 1.一种二酰甘油酰基转移酶 1，其特征在于，所述二酰甘油酰基转移酶 1 为：
 - (a) 由 SEQ ID No.1 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；或者，
 - (b) 在 (a) 中的氨基酸序列经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有二酰甘油酰基转移酶 1 活性的由 (a) 衍生的蛋白质。
- 2.编码权利要求 1 所述二酰甘油酰基转移酶 1 的基因。
- 3.如权利要求 2 所述的基因，其特征在于，所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID No.2 所示。
- 4.携带权利要求 2 或 3 所述基因的重组质粒。
- 5.如权利要求 4 所述的重组质粒，其特征在于，所述重组质粒的载体为 pYES2 载体。
- 6.携带权利要求 2 或 3 所述基因或权利要求 4 或 5 所述重组质粒的宿主细胞。
- 7.如权利要求 6 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞为酿酒酵母或大肠杆菌。
- 8.权利要求 1 所述二酰甘油酰基转移酶 1 的制备方法，其特征在于，所述方法为使用权利要求 6 或 7 所述宿主细胞，将权利要求 6 或 7 所述宿主细胞加入到不含尿嘧啶的培养基中培养 36~48 h 后收集菌体，将收集的菌体加入到不含葡萄糖而含有半乳糖的培养基中至 $OD_{600}=0.3\sim0.5$ 后继续诱导培养 48~96 h，得到二酰甘油酰基转移酶 1。
- 9.如权利要求 8 所述的制备方法，其特征在于，所述培养基为 SC-U 培养基。
- 10.如权利要求 8 或 9 所述的制备方法，其特征在于，所述培养的温度为 28~30℃、转速为 200~250 rpm。
- 11.应用权利要求 8-10 任一所述的制备方法制备得到的二酰甘油酰基转移酶 1。
- 12.权利要求 1 所述二酰甘油酰基转移酶 1 或权利要求 2 或 3 所述基因或权利要求 4 或 5 所述重组质粒或权利要求 6 或 7 所述宿主细胞或权利要求 8-10 任一所述制备方法或权利要求 11 所述制备得到的二酰甘油酰基转移酶 1 在生产甘油三酯方面的应用。
- 13.一种生产甘油三酯的方法，其特征在于，所述方法为使用权利要求 6 或 7 所述宿主细胞，将权利要求 6 或 7 所述宿主细胞加入到不含尿嘧啶的培养基中培养 36~48 h 后收集菌体，将收集的菌体加入到不含葡萄糖而含有半乳糖的培养基中至 $OD_{600}=0.3\sim0.5$ 后继续诱导培养 48~96 h，得到甘油三酯。
- 14.如权利要求 13 所述的一种生产甘油三酯的方法，其特征在于，所述培养基包含为 SC-U 培养基；所述培养的温度为 28~30℃、转速为 200~250 rpm。

MdDQAT1B	AKNASFSYRHAEPVHIKNI PSLKEAPPES. YKELVNLGLMLLFCNVRVI ENYKYNVLI SMPGSKVSKEDW LIGLSHI LLPNLVLLGLQLERVAK	128
AHDQAT1 (NP_179535.1)	NADATFTYRPSYPAHRRARRSPSLSDAI FKQSHAGLFLNLCVVAEAVNSRI I ENLAKYVWLI KIDFVESS. RSLRDWPL	178
HSDQAT1 (NP_036211.2)	DGDAGVSGHVELRCHRLQSLFSDSGFSN. YRGI LKVCVMA LSSARFLENI KYGI LVRPI QVVSLEF. L. KDPYSWPA	133
MmdDQAT1 (NP_034176.1)	DCRTSGDGYWELRCHRLQSLFSDSGFSN. YRGI LKVCVMA LSSARFLENI KYGI LVRPI QVVSLEF. L. KDPYSWPA	142
PHDQAT1 (EEH17170.1)	SPKTSKYRHYAAVHSRLTI CLSRESENPSPFGEFNLAVLVI VANLRL VENEKYNVLI CIRCHDYRQ. QDVILGALSLALI	131
PHDQAT1 (XP_002177753.1)	 HRAAEPSTYADAPIQN. YRGI LKVCVMA LSSARFLENI KYGI LVRPI QVVSLEF. LNLKEDPWQEFF	71
Consensus	g s g z n i a z i	
MdDQAT1B	KSAMGHRKRLADATAALNKGCMNVKDKPKAFKQVKSIEAAACQSCRLFCWIEALNVLII SVPSYVNSYFKI FHEPFS. I TCLANATHI CFLKMTSPSLVNQ	227
AHDQAT1 (NP_179535.1)	FMCCI SL SI FPLAAFTVEK. LVLKYI SEPVI FII I I TNEVL YPVVITL RCDSEFLSC. VTLMLTICI VWL LVSVAHYSY	260
HSDQAT1 (NP_036211.2)	PCI VI AANVFAVAAPQVEK. RLAVGAL IEACGLIEVANLATHI LCPTAAVLLVESI TPVCSLLALMAHTI LFLDLFSYRDVNS	216
MmdDQAT1 (NP_034176.1)	PCVI I ASNI FVVAAPQIEK. RLAVGAL IEACGLIEVANLATHI I CPTAAVALLVESI TPVCSVFAALASYSI MFL LVSYRDVNL	225
PHDQAT1 (EEH17170.1)	PCHLFVAFI I ERAAAHQVRCAI GRI KREESICEAPEQCQSFSAVI CTAI AFSINASI CLLVSYAVVYVNHPCGI C. TLCEVHVI LVWLR CSYAFINR	230
PHDQAT1 (XP_002177753.1)	VSGFLGLQVFSI APCHI EV. MLCRYFNENFGMI I EHENAHSAALLI PLGI VVNLIDRPVAG. ALLLHATHI TWGLI SYWLANE	153
Consensus	k s k yf a p l i y p i	
MdDQAT1B	DLRAAYI FDLPEIKFHHI TRVHDANSCNTATQRCGEVYQYDVQYVPEI TFANVAI VFAPELQCPSYERTYVPRKSFFLKRVGEAVTCVGMVFLI EYVA	327
AHDQAT1 (NP_179535.1)	DI ES. LANAAEKAN. PEVSYYVLSLAKSLAVENAPTELQCPSYERTYVPRKSFFLKRVGEAVTCVGMVFLI EYVA	333
HSDQAT1 (NP_036211.2)	WCS. BARAKAASACNKKASSAAAPHI. VSYFENLT YRDLVYFI FAPTELQELNFPESPRI KRFLLRRI LEMLPFYQLQVGLI QVWM	360
MmdDQAT1 (NP_034176.1)	WCPQRRYKAKAVSICKKYSCAAQCA. VSYFENLT YRDLVYFI FAPTELQELNFPESPRI KRFLLRRI LEMLPFYQLQVGLI QVWM	311
PHDQAT1 (EEH17170.1)	DLRHAULHP. SSTSPLEPI YQS. CYPENVTII CNL IYVWLAPELQCPVYERTDRI RVSFVARVAMEM GLSVFI WLISAQYA	311
PHDQAT1 (XP_002177753.1)	DYE. LSSHSDEAN. I NYPQNVTLRNI FFWCAPELQCPVYERTDRI RVSFVARVAMEM GLSVFI WLISAQYA	225
Consensus	f i f a p l i y p i	
MdDQAT1B	TEITLQNSVR. AVDQLAPGTMLEVMKESTISVLLI VLLMAYTFHATFALCELLMRCDCQLAWVACSQRYALPRPYYVFPREVVLELISCCS	425
AHDQAT1 (NP_179535.1)	NEI VRNSK. HPLAKGELLVAI ERVIRI SVPNLYVMGAVCFPHLWNI LAELLCFCHPEFKIWWAKSGDYRRMPPKFAHKWVVRHI YTFCLRSKI	430
HSDQAT1 (NP_036211.2)	VPTI QNSMKP. FKMDYSRI I ERLI ALAVPNHLI VLI FVLEHSCILAVALEACQDREERDWSSES IYVQNI PPHKWCIRFYKMLRPGS	398
MmdDQAT1 (NP_034176.1)	VPTI QNSMKP. FKMDYSRI I ERLI ALAVPNHLI VLI FVWFHSCILAVALEACQDREERDWSSES IYVQNI PPHKWCIRFYKMLRPGS	409
PHDQAT1 (EEH17170.1)	APVLRNSLEK. I AILELTSI I ERVMASTH SLII WAGRALFQSYINALAVAREGDEEETERWSPSCITVARTKSPZYHEMPEEIPSPILIRPGW	409
PHDQAT1 (XP_002177753.1)	QIALEELVSDILDEINGSYTAI FAEILKISILANTYLVLLMAYTFHATFALCELLMRCDCQLAWVACSQRYALPRPYYVFPREVVLELISCCS	325
Consensus	p ki wl f f n e f g d r i y waa v w na pv i h p	
MdDQAT1B	SPLTADPFVI EHI SAIEHEVLI GETHM YGVAF AGNFAR EHI ALTRPLEKA KGTGTGEGM FVVSFTI LQFACAEI VYVHWIKBHI DDTPTSYA. .	522
AHDQAT1 (NP_179535.1)	PKTLII I AELVSAVEEELCI AVGCRIFKLWALGIMFOE E VFI TNYLQ. E. RF. GSTVGMIFPFI FCI FCGECVAFI YHELNKRGCSN.	520
HSDQAT1 (NP_036211.2)	SKWMRTGVTLASAFETVLYSVLRMFLWATIGMAAGI ELAVFG. RFFCQNGSAAVVSLI I G. GELAVAVVHDYVVLNYPEAPAEA. .	488
MmdDQAT1 (NP_034176.1)	SKWMRTGVTLASAFETVLYSVLRMFLWATIGMAAGI ELAVFG. RFFCQNGSAAVVSLI I G. GELAVAVVHDYVVLNYPEAPAEA. .	498
PHDQAT1 (EEH17170.1)	SPPASVMAVFTSGI I EHI LLVGI THNVI GVAF AGNVI EPHI AATPLERKANTIRTKI I GNCVFTVSPCLVCGELAAEIEFFAWQAKYCSGCELLCLSL	509
PHDQAT1 (XP_002177753.1)	PKVADITPVAFETLAVVSEVLSVSEPHI I RPVSFI GNAMG EPI VAFIKYLY. R. KFPGCSFGMLFNTFCVI GEMAI I	404
Consensus	s f s h e p f g n a m g e p i v a f i k y l y r k f p g c s f g m l f n t f c v i g e m a i i	
MdDQAT1B	PKTLII I AELVSAVEEELCI AVGCRIFKLWALGIMFOE E VFI TNYLQ. E. RF. GSTVGMIFPFI FCI FCGECVAFI YHELNKRGCSN.	520
AHDQAT1 (NP_179535.1)	SKWMRTGVTLASAFETVLYSVLRMFLWATIGMAAGI ELAVFG. RFFCQNGSAAVVSLI I G. GELAVAVVHDYVVLNYPEAPAEA. .	488
HSDQAT1 (NP_036211.2)	SKWMRTGVTLASAFETVLYSVLRMFLWATIGMAAGI ELAVFG. RFFCQNGSAAVVSLI I G. GELAVAVVHDYVVLNYPEAPAEA. .	498
MmdDQAT1 (NP_034176.1)	SKWMRTGVTLASAFETVLYSVLRMFLWATIGMAAGI ELAVFG. RFFCQNGSAAVVSLI I G. GELAVAVVHDYVVLNYPEAPAEA. .	498
PHDQAT1 (EEH17170.1)	SPPASVMAVFTSGI I EHI LLVGI THNVI GVAF AGNVI EPHI AATPLERKANTIRTKI I GNCVFTVSPCLVCGELAAEIEFFAWQAKYCSGCELLCLSL	509
PHDQAT1 (XP_002177753.1)	PKVADITPVAFETLAVVSEVLSVSEPHI I RPVSFI GNAMG EPI VAFIKYLY. R. KFPGCSFGMLFNTFCVI GEMAI I	404
Consensus	s f s h e p f g n a m g e p i v a f i k y l y r k f p g c s f g m l f n t f c v i g e m a i i	

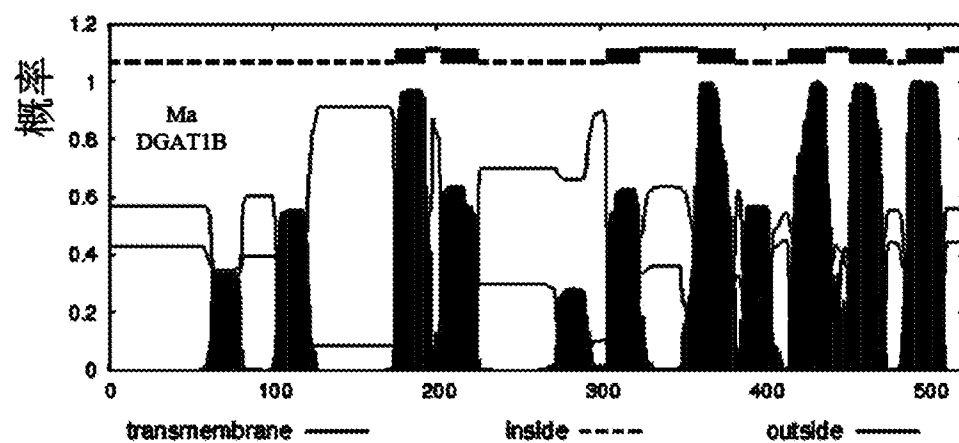


图 2

E.coli-pYES2-*Madgat1b*

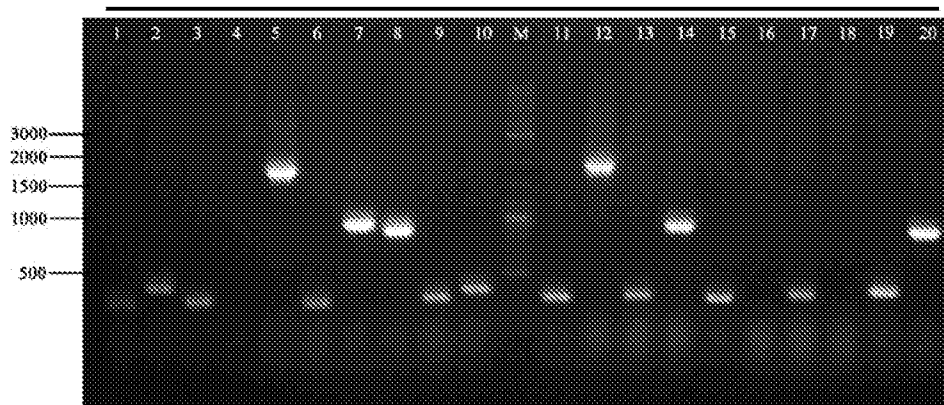


图 3

INVSc1-pYES2-*Madgat1b*

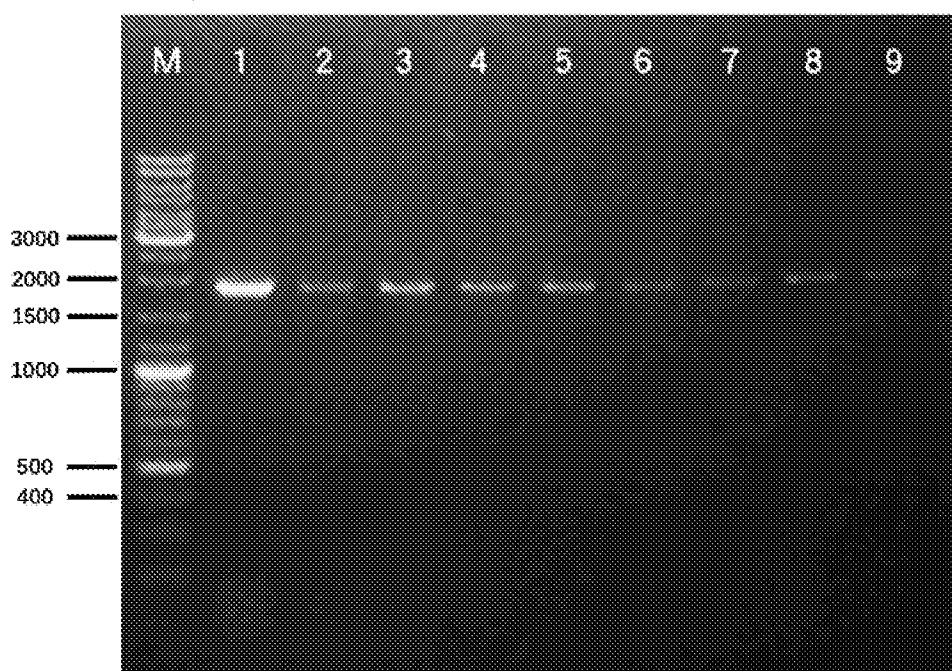


图 4

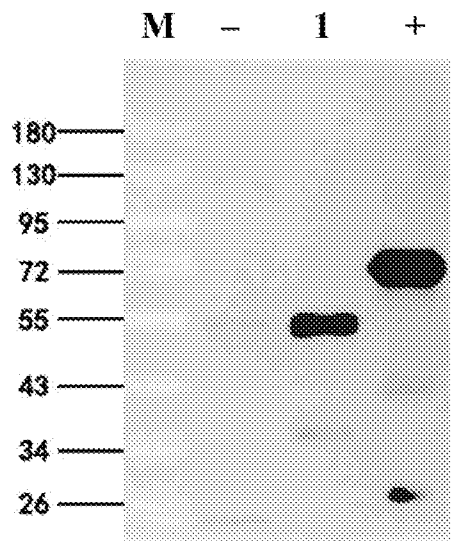


图 5

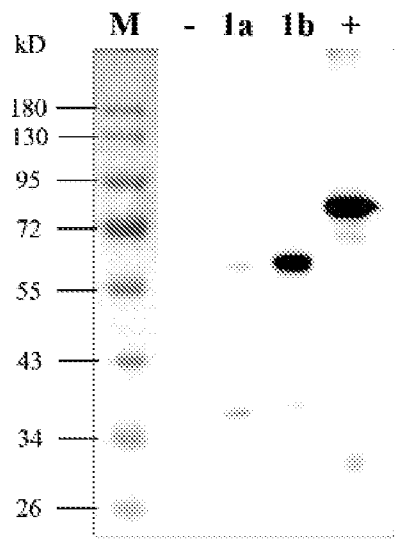


图 6

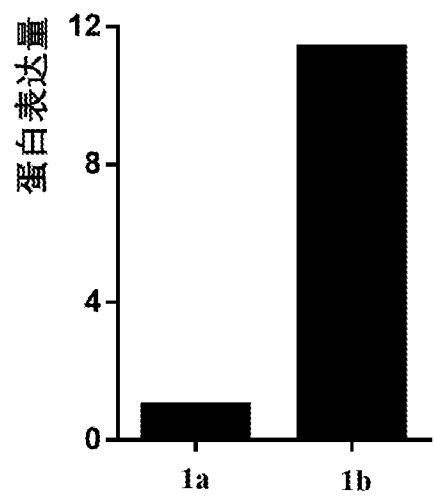


图 7

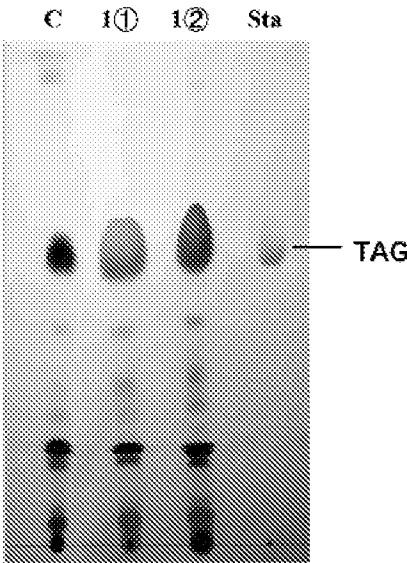


图 8

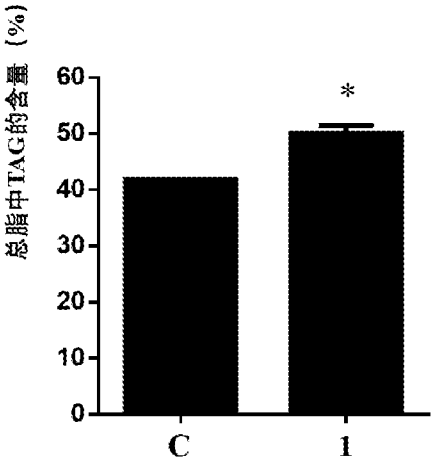


图 9

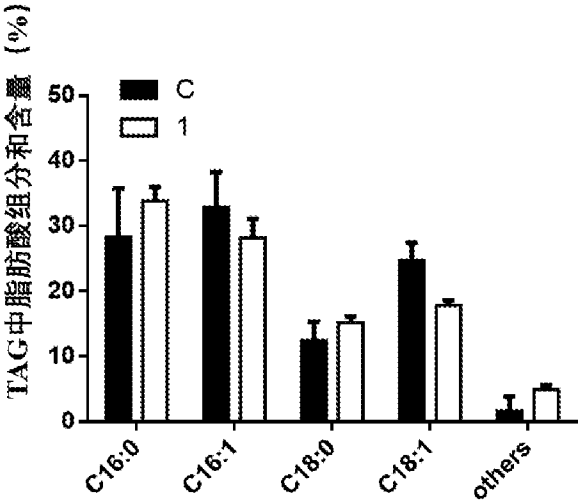


图 10

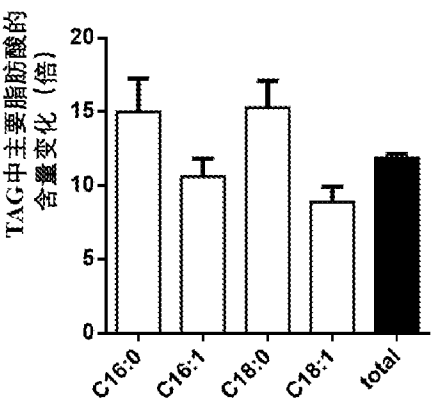


图 11

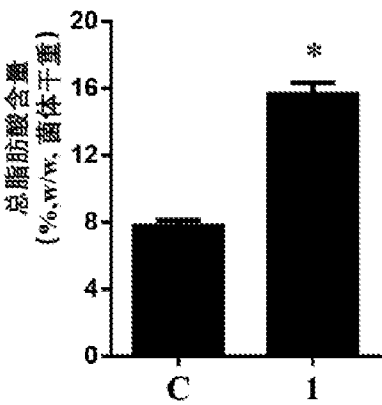


图 12

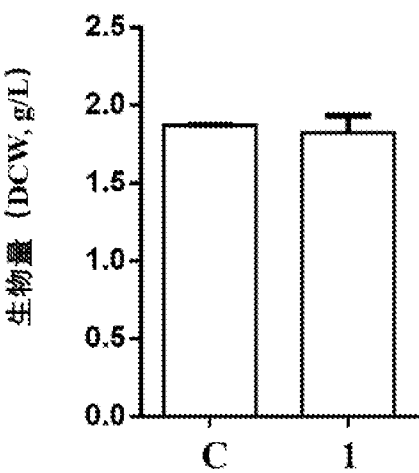


图 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/083866

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12P 7/64(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C12P

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

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

DWPI; VEN; CNABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; 万方; GENBANK; EMBL; 中国专利生物序列检索系统, CHINA PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE SEARCH SYSTEM; BAIDU学术, BAIDU SCHOLAR; NCBI PUBMED; Diacylglycerol acyltransferase, DGAT1, DGAT, MaDGAT1B, EC 2.3.1.20, SEQ ID NO: 1/2, Triglyceride, TAG, 甘油三酯, 多不饱和脂肪酸, polyunsaturated fatty acids, PUFAs, 高山被孢霉, Mortierella alpina, M.alpina, ATCC 32222, invSC1, 江南大学, 陈海琴, 陈卫, 唐鑫, 曹瑀, 赵建新, 陈永泉, 张灏

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101437953 A (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPAN) 20 May 2009 (2009-05-20) claims 1-4, 6, 13-16, 19, 21 and 24-25, description, pages 2-3, page 15, lines 7-14, page 34, lines 9-29, embodiments 13-15, table 1, and SEQ ID NO:17/18	1-14
X	曹瑀 等, (CAO, Jun et al.). "高山被孢霉二酰甘油酰基转移酶1的鉴定和功能表征, (Non-official translation: Identification and Functional Characterization of Mortierella Alpine Diacylglycerol Acyltransferase 1)" 中国科技论文在线, (Sciencepaper Online), 06 February 2019 (2019-02-06), pages 2-10, and figure 1	1-14
A	WO 2006/052814 A2 (E.I. DUPONT DE NEMOURS AND COMPANY) 18 May 2006 (2006-05-18) entire document	1-14
A	WANG, L. et al., "Genome Characterization of the Oleaginous Fungus Mortierella alpina," <i>Plos One</i> , Vol. 6, No. (12), 08 December 2011 (2011-12-08), e28319, pages 1-16	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 December 2019

Date of mailing of the international search report

19 December 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
 100088
 China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/083866**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 2518147 A1 (SUNTORY HOLDINGS LIMITED) 31 October 2012 (2012-10-31) entire document	1-14
A	LUO, X.A. et al., "Identification and Characterization of a Novel Diacylglycerol Acyltransferase Gene from <i>Mortierella Alpina</i> ," <i>Biotechnol. Lett.</i> , Vol. vol. 39, 28 February 2017 (2017-02-28), pages 883-888	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/083866

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/083866

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101437953	A	20 May 2009	EP	1809756	A4	27 October 2010
				EP	1807527	A4	19 August 2009
				WO	2006055322	A2	26 May 2006
				CA	2585178	A1	26 May 2006
				EP	2649887	A2	16 October 2013
				US	2006094092	A1	04 May 2006
				US	2010022647	A1	28 January 2010
				NO	20072517	L	24 July 2007
				EP	1807526	A4	29 April 2009
				KR	20070085669	A	27 August 2007
				CA	2584719	C	07 January 2014
				EP	2458000	B1	24 July 2013
				CA	2585235	C	16 September 2014
				DK	2458000	T3	28 October 2013
				EP	2649887	A3	30 October 2013
				NO	20072517	A	24 July 2007
				EP	1807527	A2	18 July 2007
				US	2013123361	A1	16 May 2013
				JP	2008518627	A	05 June 2008
				EP	1809756	A2	25 July 2007
				JP	5139806	B2	06 February 2013
				EP	1807526	A2	18 July 2007
				CN	101111601	A	23 January 2008
				US	2014030772	A1	30 January 2014
				CN	101437952	A	20 May 2009
				NO	20072575	L	01 August 2007
				WO	2006052871	A3	09 April 2009
				JP	2008520193	A	19 June 2008
				US	7550286	B2	23 June 2009
				US	8518674	B2	27 August 2013
				US	8685682	B2	01 April 2014
				CN	101111601	B	20 May 2015
				NO	20072516	L	03 August 2007
				NO	20072575	A	01 August 2007
				DK	2649887	T3	18 July 2016
				EP	2649887	B1	13 April 2016
				CA	2584719	A1	18 May 2006
				CA	2585235	A1	18 May 2006
				WO	2006052871	A2	18 May 2006
				WO	2006052870	A3	09 August 2007
				NO	20072516	A	03 August 2007
				WO	2006052870	A2	18 May 2006
				CA	2585178	C	06 January 2015
				JP	5129574	B2	30 January 2013
				US	7932077	B2	26 April 2011
				US	8815566	B2	26 August 2014
				US	2009311380	A1	17 December 2009
				CN	101437953	B	29 August 2012
				EP	1809756	B1	06 May 2015
				DK	1807527	T3	14 October 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/083866

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2006/052814	A2	18 May 2006	WO	2006052814	A3	16 April 2009
				US	2006094087	A1	04 May 2006
				US	7198937	B2	03 April 2007
EP	2518147	A1	31 October 2012	CN	102844431	B	08 October 2014
				JP	WO2011078134	A1	09 May 2013
				KR	20120091226	A	17 August 2012
				EP	2518147	A4	19 June 2013
				RU	2514655	C2	27 April 2014
				EP	2518147	B1	11 October 2017
				DK	2518147	T3	02 January 2018
				AU	2010336630	B2	10 April 2014
				WO	2011078134	A1	30 June 2011
				RU	2012131283	A	27 January 2014
				US	8765423	B2	01 July 2014
				CA	2783543	C	26 January 2016
				US	2012277451	A1	01 November 2012
				JP	5475011	B2	16 April 2014
				BR	112012015410	A2	29 November 2016
				CA	2783543	A1	30 June 2011
				AU	2010336630	A1	21 June 2012
				CN	102844431	A	26 December 2012
				KR	101438981	B1	11 September 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/083866

A. 主题的分类

C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12P 7/64(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI; VEN; CNABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; 万方; GENBANK; EMBL; 中国专利生物序列检索系统; BAIDU学术; NCBI
 PUBMED: Diacylglycerol acyltransferase, DGAT1, DGAT, MaDGAT1B, EC 2.3.1.20, SEQ ID NO:1/2, Triglyceride, TAG, 甘油三酯, 多不饱和脂肪酸, polyunsaturated fatty acids, PUFAs, 高山被孢霉, Mortierella alpina, M. alpina, ATCC 32222, invSCI, 江南大学, 陈海琴, 陈卫, 唐鑫, 曹珺, 赵建新, 陈永泉, 张灏

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101437953 A (纳幕尔杜邦公司) 2009年 5月 20日 (2009 - 05 - 20) 权利要求1-4, 6, 13-16, 19, 21, 24-25, 说明书第2-3页, 第15页第7-14行, 第34页第9-29行, 实施例13-15, 表1, SEQ ID NO:17/18	1-14
X	曹珺 等, . "高山被孢霉二酰甘油酰基转移酶1的鉴定和功能表征, " 中国科技论文在线, , 2019年 2月 6日 (2019 - 02 - 06), 第2-10页, 图1	1-14
A	WO 2006/052814 A2 (E. I. DUPONT DE NEMOURS AND COMPANY) 2006年 5月 18日 (2006 - 05 - 18) 全文	1-14
A	WANG, L. 等, . "Genome Characterization of the Oleaginous Fungus Mortierella alpina, " PLOS ONE, , 第6卷, 第12期, 2011年 12月 8日 (2011 - 12 - 08), e28319之第1-16页	1-14



其余文件在C栏的续页中列出。



见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 12月 4日

国际检索报告邮寄日期

2019年 12月 19日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

郝佳

电话号码 86-(10)-53961967

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	EP 2518147 A1 (SUNTORY HOLDINGS LIMITED) 2012年 10月 31日 (2012 - 10 - 31) 全文	1-14
A	LU0, X.A. 等, . "Identification and characterization of a novel diacylglycerol acyltransferase gene from Mortierella alpina, " Biotechnol. Lett., , 第39卷, 2017年 2月 28日 (2017 - 02 - 28), 第883-888页	1-14

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/083866

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 101437953 A	2009年 5月 20日	EP 1809756 A4	2010年 10月 27日
		EP 1807527 A4	2009年 8月 19日
		WO 2006055322 A2	2006年 5月 26日
		CA 2585178 A1	2006年 5月 26日
		EP 2649887 A2	2013年 10月 16日
		US 2006094092 A1	2006年 5月 4日
		US 2010022647 A1	2010年 1月 28日
		NO 20072517 L	2007年 7月 24日
		EP 1807526 A4	2009年 4月 29日
		KR 20070085669 A	2007年 8月 27日
		CA 2584719 C	2014年 1月 7日
		EP 2458000 B1	2013年 7月 24日
		CA 2585235 C	2014年 9月 16日
		DK 2458000 T3	2013年 10月 28日
		EP 2649887 A3	2013年 10月 30日
		NO 20072517 A	2007年 7月 24日
		EP 1807527 A2	2007年 7月 18日
		US 2013123361 A1	2013年 5月 16日
		JP 2008518627 A	2008年 6月 5日
		EP 1809756 A2	2007年 7月 25日
		JP 5139806 B2	2013年 2月 6日
		EP 1807526 A2	2007年 7月 18日
		CN 101111601 A	2008年 1月 23日
		US 2014030772 A1	2014年 1月 30日
		CN 101437952 A	2009年 5月 20日
		NO 20072575 L	2007年 8月 1日
		WO 2006052871 A3	2009年 4月 9日
		JP 2008520193 A	2008年 6月 19日
		US 7550286 B2	2009年 6月 23日
		US 8518674 B2	2013年 8月 27日
		US 8685682 B2	2014年 4月 1日
		CN 101111601 B	2015年 5月 20日
		NO 20072516 L	2007年 8月 3日
		NO 20072575 A	2007年 8月 1日
		DK 2649887 T3	2016年 7月 18日
		EP 2649887 B1	2016年 4月 13日
		CA 2584719 A1	2006年 5月 18日
		CA 2585235 A1	2006年 5月 18日
		WO 2006052871 A2	2006年 5月 18日
		WO 2006052870 A3	2007年 8月 9日
		NO 20072516 A	2007年 8月 3日
		WO 2006052870 A2	2006年 5月 18日
		CA 2585178 C	2015年 1月 6日
		JP 5129574 B2	2013年 1月 30日
		US 7932077 B2	2011年 4月 26日
		US 8815566 B2	2014年 8月 26日
		US 2009311380 A1	2009年 12月 17日
		CN 101437953 B	2012年 8月 29日
		EP 1809756 B1	2015年 5月 6日
		DK 1807527 T3	2013年 10月 14日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/083866

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2006/052814	A2	2006年 5月 18日	WO	2006052814	A3	2009年 4月 16日
				US	2006094087	A1	2006年 5月 4日
				US	7198937	B2	2007年 4月 3日
EP	2518147	A1	2012年 10月 31日	CN	102844431	B	2014年 10月 8日
				JP	W02011078134	A1	2013年 5月 9日
				KR	20120091226	A	2012年 8月 17日
				EP	2518147	A4	2013年 6月 19日
				RU	2514655	C2	2014年 4月 27日
				EP	2518147	B1	2017年 10月 11日
				DK	2518147	T3	2018年 1月 2日
				AU	2010336630	B2	2014年 4月 10日
				WO	2011078134	A1	2011年 6月 30日
				RU	2012131283	A	2014年 1月 27日
				US	8765423	B2	2014年 7月 1日
				CA	2783543	C	2016年 1月 26日
				US	2012277451	A1	2012年 11月 1日
				JP	5475011	B2	2014年 4月 16日
				BR	112012015410	A2	2016年 11月 29日
				CA	2783543	A1	2011年 6月 30日
				AU	2010336630	A1	2012年 6月 21日
				CN	102844431	A	2012年 12月 26日
				KR	101438981	B1	2014年 9月 11日