



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1592791 B

(45) 授权公告日 2012.09.05

(21) 申请号 02810327.0

(22) 申请日 2002.05.24

(30) 优先权数据

09/866,379 2001.05.24 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2003.11.21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2002/016482 2002.05.24

(87) PCT申请的公布数据

W02002/095003 EN 2002.11.28

(73) 专利权人 维莱尼姆公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·M·肖特 K·克雷茨

K·A·格雷 N·R·巴顿

J·B·加勒特 E·奥多诺休

E·J·马瑟

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民

(51) Int. Cl.

C12N 15/52 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 0064247 A1, 2000.11.02, 全文.

审查员 赵彦豪

权利要求书 12 页 说明书 111 页

序列表 6 页 附图 16 页

(54) 发明名称

肌醇六磷酸酶, 其编码核酸及其制造和使用方法

(57) 摘要

本发明提供了分离的和重组的肌醇六磷酸酶。在一个方面, 肌醇六磷酸酶通过修饰大肠杆菌的野生型 appA 而产生。此酶可以产生自重组的宿主细胞。本发明的肌醇六磷酸酶可用于在需要时帮助肌醇六磷酸的消化。特别地, 本发明的肌醇六磷酸酶可被用在食品中以改善富肌醇六磷酸配料的饲养价值。本发明的肌醇六磷酸酶可以是耐热的和/或热稳定的。还提供了获得编码肌醇六磷酸酶的变异体多核苷酸的方法和获得在高或低温下具有热稳定性或耐热的肌醇六磷酸酶的方法。

1. 一种分离的或重组的核酸,包括
 - (a). 核酸序列,其 (i) 在 1200 个连续核苷酸残基到全长的范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 98.5% 的序列同一性,或 (ii) 在 800 到 1200 个核苷酸残基的范围内与 SEQ ID NO :1 具有 99% 的序列同一性,或 (iii) 具有 SEQ ID NO :1 所示的序列,
其中所述的核酸编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,
 - (b). (a) 中的编码肌醇六磷酸酶的核酸序列但缺乏信号序列,
 - (c). (a) 中的编码肌醇六磷酸酶的核酸序列,其包含同源信号序列或者包含替代了同源信号序列的异源信号序列。
2. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中所述的核酸序列在至少 1200 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 98.5% 的序列同一性。
3. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中所述的核酸序列在至少 1200 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 99% 的序列同一性。
4. 根据权利要求 3 的分离或重组的核酸,其中所述的核酸序列在至少 1200 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 99.5% 的序列同一性。
5. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中所述的核酸序列与 SEQ ID NO :1 具有至少 99% 的序列同一性。
6. 根据权利要求 5 的分离或重组的核酸,其中所述的核酸序列与 SEQ ID NO :1 具有至少 99.5% 的序列同一性。
7. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中所述的核酸序列与 SEQ ID NO :1 的 800 个到 1000 个核苷酸残基具有至少 99.5% 的序列同一性。
8. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中所述的核酸序列编码具有 SEQ ID NO :2 所示序列的多肽。
9. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中序列同一性是用 BLAST 2.2.2 版算法来确定,其筛选设置设为 blastall-p blastp-d" nr pataa" -F F,其它所有选择设为默认值。
10. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中所述的肌醇六磷酸酶活性包括肌醇六磷酸或肌 - 肌醇 - 六磷酸盐转化成肌醇和无机磷酸盐的催化作用。
11. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中所述的肌醇六磷酸酶活性包括水解肌醇六磷酸盐或肌 - 肌醇 - 六磷酸盐。
12. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中所述的肌醇六磷酸酶活性是耐热的。
13. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中所述的多肽在 40℃ 至 70℃ 的温度范围的条件下保留了肌醇六磷酸酶活性。
14. 根据权利要求 1 的分离或重组的核酸,其中所述的多肽在暴露于超过 37℃ 至 90℃ 之间的范围内的温度之后保留了肌醇六磷酸酶活性。
15. 根据权利要求 14 的分离或重组的核酸,其中所述的多肽在暴露于超过 37℃ 至 50℃ 之间的范围内的温度之后保留了肌醇六磷酸酶活性。
16. 一种核酸探针,用于鉴定编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的核酸,其中所述的探针含有权利要求 1 所述的核酸。
17. 根据权利要求 16 的核酸探针,其中所述的探针包括含 SEQ ID NO :1 所示序列中的

10 至 50、20 至 60、30 至 70、40 至 80 或 60 至 100 个连续碱基的寡核苷酸。

18. 一种核酸探针,用于鉴定具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的编码核酸,其中所述的探针含有在至少 100 个连续残基范围内与权利要求 1 所述的核酸具有至少 98.5% 序列同一性的核酸序列,其中序列同一性是用序列比较运算法则进行分析或通过视觉观察而确定的。

19. 根据权利要求 18 的核酸探针,其中所述的探针包括含 SEQ ID NO:1 所示核酸序列中的 10 至 50、20 至 60、30 至 70、40 至 80 或 60 至 100 个连续碱基的寡核苷酸。

20. 根据权利要求 18 的核酸探针,其中所述的探针含与 SEQ ID NO:1 所示核酸序列具有至少 99% 序列同一性的核酸序列。

21. 根据权利要求 20 的核酸探针,其中所述的探针包括 SEQ ID NO:1 中所示序列。

22. 一种扩增编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的核酸的扩增引物序列对,其中所述的引物对能够扩增 SEQ ID NO:1 中所示的核酸序列,并且所述的扩增引物序列对的每一个成员包含权利要求 1 所述的核酸。

23. 根据权利要求 22 的扩增引物序列对,其中所述的扩增引物序列对的每一个成员含有包括 SEQ ID NO:1 的 10 至 50 个连续碱基的寡核苷酸。

24. 一种扩增具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的编码核酸的方法,包括用能够扩增 SEQ ID NO:1 中所示核酸序列的扩增引物序列对扩增模板核酸,并且所述的扩增引物序列对的每一个成员包含权利要求 1 所述的核酸。

25. 一种含核酸的表达基因盒,所述核酸包含在权利要求 1 中所述的核酸序列。

26. 一种含核酸的载体,所述核酸包含在权利要求 1 中所述的核酸序列。

27. 一种克隆运载体,包括根据权利要求 26 所述的载体,其中所述的克隆运载体包括病毒载体、质粒、噬菌体、噬菌粒、粘粒、fosmid、细菌噬菌体或人工染色体。

28. 根据权利要求 27 中的克隆运载体,其中所述的病毒载体包括腺病毒载体、逆转录酶病毒载体或腺伴随病毒载体。

29. 根据权利要求 27 中的克隆运载体,包括细菌人工染色体 (BAC)、质粒、细菌噬菌体 P1- 来源的载体 (PAC)、酵母人工染色体 (YAC)、哺乳动物人工染色体 (MAC)。

30. 一种包含载体的转化细胞,其中所述载体含有权利要求 1 中所述的核酸序列。

31. 一种包含核酸的转化细胞,该核酸包括权利要求 1 中所述的核酸序列。

32. 根据权利要求 31 的转化细胞,其中所述的细胞是细菌细胞、哺乳动物细胞、真菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。

33. 一种反义寡核苷酸,包括与权利要求 1 中或 SEQ ID NO:1 所示核酸序列互补的核酸序列。

34. 根据权利要求 33 的反义寡核苷酸,其中所述的反义寡核苷酸长度在 10 至 50、20 至 60、30 至 70、40 至 80 或 60 至 100 个碱基之间。

35. 一种抑制肌醇六磷酸酶信使在细胞中翻译的方法,包括给予细胞或在细胞中表达反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸含有与权利要求 1 中或 SEQ ID NO:1 所示核酸序列互补的核酸序列。

36. 一种分离的或重组的具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,包括下列氨基酸序列:

(a). (i) 在 400 个连续氨基酸至全长的范围内与 SEQ ID NO:2 具有至少 98.5% 序列同一性的氨基酸序列,或, (ii) 由含权利要求 1 所示的序列的核酸编码的多肽;

(b). (a) 中的肌醇六磷酸酶但缺乏信号序列；

(c). (a) 中的肌醇六磷酸酶，其包含同源信号序列或者包含替代了同源信号序列的异源信号序列。

37. 根据权利要求 36 的分离或重组的多肽，其中所述的肌醇六磷酸酶活性包括水解肌醇六磷酸或肌 - 肌醇 - 六磷酸盐。

38. 根据权利要求 36 的分离或重组的多肽，其中所述的肌醇六磷酸酶活性是耐热的。

39. 根据权利要求 36 的分离或重组的多肽，其中所述的肌醇六磷酸酶活性是热稳定的。

40. 根据权利要求 36 的分离或重组的多肽，其中所述的多肽序列在至少 400 个残基范围内与 SEQ ID NO :2 具有至少 99% 的序列同一性。

41. 根据权利要求 36 的分离或重组的多肽，其中所述的多肽序列在至少 400 个残基范围内与 SEQ ID NO :2 具有至少 99.5% 的序列同一性。

42. 根据权利要求 36 的分离或重组的多肽，其中所述的氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 具有至少 99% 的序列同一性。

43. 根据权利要求 42 的分离或重组的多肽，其中所述的氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 具有至少 99.5% 的序列同一性。

44. 根据权利要求 36 的分离或重组的多肽，其中所述的氨基酸序列具有 SEQ ID NO :2 中所示的序列。

45. 一种分离或重组的多肽，其中的多肽具有肌醇六磷酸酶活性但缺少信号序列，并含有权利要求 1 中所示的氨基酸序列。

46. 根据权利要求 39 的分离或重组的多肽，其中所述的肌醇六磷酸酶活性包括在加热到 37℃ 至 50℃、50℃ 至 70℃ 或 70℃ 至 90℃ 的范围内的温度时的热稳定性。

47. 根据权利要求 46 的分离或重组的多肽，其中所述的热稳定的肌醇六磷酸酶活性包括在 37℃ 下，每毫克蛋白的比活性在 100 至 1000 单位的范围内。

48. 根据权利要求 47 的分离或重组的多肽，其中所述的热稳定的肌醇六磷酸酶活性包括每毫克蛋白从 500 至 750 单位的比活性。

49. 根据权利要求 39 的分离或重组的多肽，其中所述的热稳定的肌醇六磷酸酶活性包括 37℃ 下每毫克蛋白 500 至 1200 单位范围内的比活性。

50. 根据权利要求 49 的分离或重组的多肽，其中所述的热稳定的肌醇六磷酸酶活性包括 37℃ 下每毫克蛋白 750 至 1000 单位范围内的比活性。

51. 根据权利要求 38 的分离或重组的多肽，其中所述的多肽在被加热至 37℃ 至 70℃ 的范围内的温度后具有耐热性。

52. 根据权利要求 51 的分离或重组的多肽，其中所述的多肽在被加热至 50℃ 至 70℃ 的范围内的温度后具有耐热性。

53. 根据权利要求 38 的分离或重组的多肽，其中所述的多肽在被加热至 37℃ 至 90℃ 范围的温度后，37℃ 下保持其比活性的至少一半。

54. 根据权利要求 38 的分离或重组的多肽，其中所述的多肽在被加热至 37℃ 至 90℃ 范围的温度后，37℃ 下保持在每毫克蛋白 500 至 1200 单位范围内的比活性。

55. 根据权利要求 36 的分离或重组的多肽，其中所述的肌醇六磷酸酶含有一个或多个

糖基化位点。

56. 根据权利要求 55 的分离或重组的多肽,其中所述的糖基化是 N- 连接的糖基化。

57. 根据权利要求 55 的分离或重组的多肽,其中所述的肌醇六磷酸酶是在毕赤酵母或酿酒酵母中被表达之后进行糖基化的。

58. 根据权利要求 36 的分离或重组的多肽,其中所述的肌醇六磷酸酶在包括 pH 5 的条件下是有活性的。

59. 根据权利要求 36 的分离或重组的多肽,其中所述的肌醇六磷酸酶在包括 pH 4.5 的条件下是有活性的。

60. 一种蛋白制剂,包括根据权利要求 36 所示的多肽,其中所述蛋白制剂包括液体、固体或凝胶。

61. 一种杂二聚体,含权利要求 36 所示的多肽和第二种结构域。

62. 根据权利要求 61 的杂二聚体,其中所述的第二种结构域是多肽,且所述杂二聚体是融合蛋白。

63. 根据权利要求 62 的杂二聚体,其中所述的第二种结构域是抗原决定簇。

64. 根据权利要求 61 的杂二聚体,其中所述的第二种结构域是标记物。

65. 一种固定化多肽,具有肌醇六磷酸酶活性,其中所述多肽包括权利要求 36 或权利要求 61 中所示的序列。

66. 根据权利要求 65 的固定化多肽,其中所述的肌醇六磷酸酶被固定在细胞、金属、树脂、聚合物、陶瓷、玻璃、微电极、石墨颗粒、珠、凝胶、板、阵列或毛细管上。

67. 一种阵列,包含权利要求 36 或权利要求 61 中所示固定化多肽。

68. 一种阵列,包含权利要求 1 中所示固定化核酸。

69. 一种分离或重组的抗体,与权利要求 36 中所示的多肽、或由权利要求 1 中所示核酸编码的多肽特异地结合。

70. 根据权利要求 69 的分离或重组的抗体,其中所述的抗体是单克隆或多克隆抗体。

71. 一种包含抗体的杂交瘤,该抗体与权利要求 36 中所示的多肽、或由权利要求 1 中所示核酸编码的多肽特异地结合。

72. 一种用于动物的食品添加剂,含有权利要求 36 中所示的多肽,或由权利要求 1 中所示核酸编码的多肽。

73. 根据权利要求 72 的食品添加剂,其中所述的多肽是糖基化的。

74. 一种可食用酶传递基质,包括权利要求 36 中所示的多肽、或由权利要求 1 中所示核酸编码的多肽,其中所述多肽具有肌醇六磷酸酶活性。

75. 根据权利要求 74 的可食用酶传递基质,其中所述的传递介质包括小球。

76. 根据权利要求 74 的可食用酶传递基质,其中所述的多肽是糖基化的。

77. 根据权利要求 74 的可食用酶传递基质,其中所述的肌醇六磷酸酶活性是耐热的。

78. 根据权利要求 74 的可食用酶传递基质,其中所述的肌醇六磷酸酶活性是热稳定的。

79. 一种可食用的小球,含有成颗粒状的可食用载体和权利要求 36 中所示的多肽、或由权利要求 1 中所示核酸编码的多肽,其中所述多肽具有肌醇六磷酸酶活性。

80. 一种饲料组合物,包括含有重组的肌醇六磷酸酶蛋白的食品,所述重组的肌醇六磷

酸酶蛋白具有权利要求 36 或 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列或由权利要求 1 的核酸编码的氨基酸序列。

81. 根据权利要求 80 的饲料组合物,其中所述的肌醇六磷酸酶蛋白是糖基化的。

82. 根据权利要求 81 的饲料组合物,其中所述的肌醇六磷酸酶蛋白是耐热的或热稳定的。

83. 根据权利要求 80 的饲料组合物,其中所述的食物被制成小球、丸或片形。

84. 根据权利要求 80 的饲料组合物,其中所述的食物是使用聚合物包被的添加剂生产的。

85. 根据权利要求 80 的饲料组合物,其中所述的食物被制成颗粒状。

86. 根据权利要求 80 的饲料组合物,其中所述的食物是通过喷雾干燥生产的。

87. 一种大豆粉,包括权利要求 36 中所示的多肽、或由权利要求 1 中所示核酸编码的多肽,其中的多肽具有肌醇六磷酸酶活性。

88. 一种分离或鉴定具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的方法,包括以下步骤:

(a) 提供权利要求 69 中所示的抗体;

(b) 提供含多肽的样品;和

(c) 在抗体能够与多肽特异结合的条件下将步骤 (b) 的样品与步骤 (a) 的抗体接触,从而分离或鉴定肌醇六磷酸酶。

89. 一种制备抗肌醇六磷酸酶抗体的方法,包括给予非人类动物权利要求 1 中所示的核酸、或权利要求 36 中所示的多肽,从而制备抗肌醇六磷酸酶的抗体。

90. 一种产生重组的多肽的方法,包括以下步骤:

(a) 提供可操作地连接启动子的核酸;其中所述核酸包括权利要求 1 中所示的序列;和

(b) 在允许该多肽表达的条件下,表达步骤 (a) 的核酸,从而产生重组的多肽。

91. 根据权利要求 90 的方法,进一步包括用步骤 (a) 的核酸转化宿主细胞,随后表达步骤 (a) 的核酸,从而在转化细胞中产生重组多肽。

92. 一种鉴定具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的方法,包括以下步骤:

(a) 提供权利要求 36 中所示的多肽、或由具有权利要求 1 中所示序列的核酸编码的多肽;

(b) 提供肌醇六磷酸酶底物;和

(c) 将步骤 (a) 的多肽或片段或其变异体与步骤 (b) 的底物接触,并检测底物量的增加或反应产物量的下降,其中底物量的下降或反应产物量的增加检测出具有肌醇六磷酸酶活性的多肽。

93. 一种鉴定肌醇六磷酸酶的底物的方法,包括以下步骤:

(a) 提供权利要求 36 中所示的多肽、或由具有权利要求 1 中所示序列的核酸编码的多肽;

(b) 提供受试底物;和

(c) 将步骤 (a) 的多肽与步骤 (b) 的受试底物接触,并检测底物量的增加或反应产物量的下降,其中底物量的下降或反应产物量的增加确证该受试底物为肌醇六磷酸酶底物。

94. 一种检测化合物是否与多肽特异结合的方法,包括以下步骤:

(a) 在允许核酸翻译成多肽的条件下,表达该核酸或含该核酸的载体,其中所述核酸具

有权利要求 1 中所示的序列,或者,提供权利要求 36 中所示的多肽;

(b) 将多肽与受试化合物接触;和

(c) 检测受试化合物是否特异地与该多肽结合,从而确证该化合物与多肽特异地结合。

95. 一种鉴定肌醇六磷酸酶活性的调节剂的方法,包括以下步骤:

(a) 提供权利要求 36 中所示的肌醇六磷酸酶多肽、或由权利要求 1 中所示核酸编码的肌醇六磷酸酶多肽;

(b) 提供受试化合物;

(c) 将步骤 (a) 的多肽与步骤 (b) 的受试化合物接触,并测定肌醇六磷酸酶的活性,其中存在受试化合物与没有受试化合物相比,测定的肌醇六磷酸酶活性有改变,从而确定受试化合物调节肌醇六磷酸酶活性。

96. 根据权利要求 95 的方法,其中所述的肌醇六磷酸酶活性是通过提供肌醇六磷酸酶底物并检测底物量的增加或反应产物量的下降来测定的。

97. 根据权利要求 96 的方法,其中同没有受试化合物的底物或反应产物量相比,有受试化合物的底物量下降或反应产物量增加证实受试化合物是肌醇六磷酸酶活性的活化剂。

98. 根据权利要求 96 的方法,其中同没有受试化合物的底物或反应产物量相比,有受试化合物的底物量增加或反应产物量下降证实受试化合物是肌醇六磷酸酶活性的抑制剂。

99. 一种鉴定序列中的特征的方法,包括以下步骤:

(a) 用鉴定序列中一个或多个特征的计算机程序阅读序列,其中的序列包括多肽序列或核酸序列,其中多肽序列包括权利要求 36 中所示的序列,核酸包括权利要求 1 中所示的序列;和

(b) 用计算机程序鉴定序列中的一个或多个特征。

100. 一种用于将第一条序列同第二条序列进行比较的方法,包括以下步骤:

(a) 通过使用比较序列的计算机程序阅读第一条序列和第二条序列,其中第一条序列包括多肽序列或核酸序列,其中多肽序列包括权利要求 36 中所示的序列,核酸包括权利要求 1 中所示的序列;和

(b) 用计算机程序检测第一条序列和第二条序列间的差异。

101. 根据权利要求 100 的方法,其中所述的检测第一条序列和第二条序列间差异的步骤进一步包括确定多形性的步骤。

102. 根据权利要求 100 的方法,进一步包括鉴定序列中一个或多个特征的标识符。

103. 根据权利要求 100 的方法,包括用计算机程序阅读第一条序列并鉴定序列中的一个或多个特征。

104. 一种从环境样品中分离或回收编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的核酸的方法,包括以下步骤:

(a) 提供扩增编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的核酸的扩增引物序列对,其中所述扩增引物对能够扩增 SEQ ID NO:1 所示的核酸,并且所述的扩增引物对的每一个成员包含权利要求 1 所述的核酸;

(b) 从环境样品中分离核酸或处理环境样品使样品中的核酸易于与扩增引物对杂交或结合;和

(c) 组合步骤 (b) 的核酸和步骤 (a) 的扩增引物对并从环境样品中扩增核酸,从而从环

境样品中分离或回收编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的核酸。

105. 根据权利要求 104 的方法,其中所述的扩增引物序列对的每一个成员包括含有权利要求 1 或 SEQ ID NO:1 所示序列的 10 至 50 个连续碱基的寡核苷酸。

106. 一种从环境样品中分离或回收编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的核酸的方法,包括以下步骤:

(a) 提供包含权利要求 1 中所示序列的多核苷酸探针;

(b) 从环境样品中分离核酸或处理环境样品使样品中的核酸易于与步骤 (a) 的多核苷酸探针杂交或结合;

(c) 将步骤 (b) 的分离的核酸或处理的环境样品与步骤 (a) 的多核苷酸探针组合;和

(d) 分离与步骤 (a) 的可与多核苷酸探针特异杂交或结合的核酸,从而从土壤样品中分离或回收编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的核酸。

107. 根据权利要求 104 或权利要求 106 的方法,其中所述的环境样品包括水样品、液体样品、土壤样品、空气样品或生物学样品。

108. 根据权利要求 107 的方法,其中所述的生物学样品来自细菌细胞、原生动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞、植物细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

109. 一种产生编码肌醇六磷酸酶的核酸的变异体的方法,包括以下步骤:

(a) 提供含权利要求 1 中所示序列的模板核酸;和

(b) 在模板序列中修饰、删除或添加一个或多个核苷酸,或它们的组合,以产生模板核酸的变异体。

110. 根据权利要求 109 的方法,进一步包括表达变异体核酸以产生变异体肌醇六磷酸酶多肽。

111. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过选自以下的方法导入的:易错 PCR、改组、寡核苷酸定向诱变、集合 PCR、有性 PCR 诱变、体内诱变、盒式诱变、递归整体诱变、指数整体诱变、位点特异的诱变、基因重新组装、基因位点饱和诱变 (GSSM)、合成的连接重新组装 (SLR) 和 / 或它们的组合。

112. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过选自以下的方法导入的:重组、递归序列重组、磷硫酸盐修饰的 DNA 诱变、含尿嘧啶的模板诱变、缺口双重诱变、点错配修复诱变、修复缺陷的宿主菌株诱变、化学诱变、放射产生的诱变、删除诱变、限制性选择诱变、限制性纯化诱变、人造基因合成、整体诱变、嵌合的核酸多聚体创建和 / 或它们的组合。

113. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过易错 PCR 导入的。

114. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过改组导入的。

115. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过寡核苷酸定向诱变导入的。

116. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过集合 PCR 导入的。

117. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过有性 PCR 诱变导入的。

118. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过体内诱变导入的。

119. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过盒式诱变导入的。

120. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过递归整体诱变导入的。

121. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过指数整体诱变导入的。

122. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过位点特异的诱变导入的。

123. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过基因重新组装导入的。

124. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过合成的连接重新组装 (SLR) 导入的。

125. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的修饰、添加或删除是通过基因位点饱和的诱变 (GSSM) 导入的。

126. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的方法被反复地重复直到产生与模板核酸编码的肌醇六磷酸酶具有改变的或不同的活性,或改变的或不同的稳定性的肌醇六磷酸酶。

127. 根据权利要求 110 的方法,其中所述的变异体肌醇六磷酸酶是耐热的或热稳定的。

128. 根据权利要求 110 的方法,其中所述的变异体肌醇六磷酸酶多肽同模板核酸编码的肌醇六磷酸酶相比具有增多的糖基化。

129. 根据权利要求 110 的方法,其中所述的变异体肌醇六磷酸酶多肽在由模板核酸编码的肌醇六磷酸酶无活性的温度下具有肌醇六磷酸酶活性。

130. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的方法被反复地重复直到产生具有与模板核酸的密码子选择不同的密码子选择的肌醇六磷酸酶编码序列。

131. 根据权利要求 109 的方法,其中所述的方法被反复地重复直到产生信使表达或稳定性水平与模板核酸不同的肌醇六磷酸酶基因。

132. 一种在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子,以增加其在宿主细胞中表达的方法,该方法包括:

(a) 提供包括权利要求 1 中所示序列的编码肌醇六磷酸酶的核酸;和

(b) 在步骤 (a) 的核酸中鉴定非优选的密码子,并用编码相同氨基酸的优选或中性使用的密码子作为替代密码子替代之,其中优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中反复出现的密码子,非优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中出现较少的密码子,从而修饰核酸以增加其在宿主细胞中的表达。

133. 一种在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子的方法,该方法包括:

(a) 提供包括权利要求 1 中所示序列的编码肌醇六磷酸酶的核酸;和

(b) 在步骤 (a) 的核酸中鉴定密码子,并用编码相同氨基酸的不同密码子作为替代密码子替代之,从而在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子。

134. 一种在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子以增加其在宿主细胞中表达的方法,该方法包括:

(a) 提供包括权利要求 1 中所示序列的编码肌醇六磷酸酶的核酸;和

(b) 在步骤 (a) 的核酸中鉴定非优选的密码子,并用编码相同氨基酸的优选或中性使

用的密码子作为替代密码子替代之,其中优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中反复出现的密码子,非优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中出现较少的密码子,从而修饰核酸以增加其在宿主细胞中的表达。

135. 一种在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子以减少其在宿主细胞中表达的方法,该方法包括:

(a) 提供包括权利要求 1 中所示序列的编码肌醇六磷酸酶的核酸;和

(b) 在步骤 (a) 的核酸中鉴定一个或多个优选的密码子,并用编码相同氨基酸的非优选的密码子作为替代密码子替代之,其中优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中反复出现的密码子,非优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中出现较少的密码子,从而修饰核酸以减少其在宿主细胞中的表达。

136. 根据权利要求 134 或 135 的方法,其中所述的宿主细胞是细菌细胞、真菌细胞、昆虫细胞、酵母细胞、植物细胞或哺乳动物细胞。

137. 一种产生编码多个修饰的肌醇六磷酸酶活性位点或底物结合位点的核酸文库的方法,其中修饰活性位点或底物结合位点来自于含第一个活性位点或第一个底物结合位点编码序列的第一个核酸,该方法包括:

(a) 提供编码第一个活性位点或第一个底物结合位点的第一个核酸,其中第一个核酸的序列包括权利要求 1 或 SEQ ID NO:1 所示序列,并且该核酸编码肌醇六磷酸酶活性位点或肌醇六磷酸酶底物结合位点;

(b) 提供一组在第一个核酸的多个靶密码子上编码天然存在的氨基酸变异体的诱变寡核苷酸;和

(c) 使用该组诱变寡核苷酸以产生一组编码活性位点或编码底物结合位点的变异体核酸,其在每一个被诱变的氨基酸密码子上编码一系列氨基酸变异,从而产生编码众多修饰的肌醇六磷酸酶活性位点或底物结合位点的核酸文库。

138. 根据权利要求 137 的方法,包括通过包含所有优化定向进化系统的方法诱变步骤 (a) 的第一个核酸。

139. 根据权利要求 137 的方法,包括通过包含基因位点饱和诱变 (GSSM) 的方法诱变步骤 (a) 的第一个核酸。

140. 根据权利要求 137 的方法,包括通过包含合成的连接重新组装 (SLR) 的方法诱变步骤 (a) 的第一个核酸。

141. 根据权利要求 137 的方法,进一步包括通过以下方法诱变步骤 (a) 的第一个核酸或变异体:易错 PCR、改组、寡核苷酸定向诱变、集合 PCR、有性的 PCR 诱变、体内诱变、盒式诱变、递归整体诱变、指数整体诱变、位点特异的诱变、基因重新组装、基因位点饱和诱变 (GSSM)、合成的连接重新组装 (SLR) 及它们的组合。

142. 根据权利要求 137 的方法,进一步包括通过以下方法诱变步骤 (a) 的第一个核酸或变异体:重组、递归序列重组、磷硫酸盐修饰的 DNA 诱变、含尿嘧啶的模板诱变、缺口双重诱变、点错配修复诱变、修复缺陷的宿主菌株诱变、化学诱变、放射产生的诱变、删除诱变、限制性选择诱变、限制性纯化诱变、人造基因合成、整体诱变、嵌合的核酸多聚体创建和它们的组合。

143. 一种制造小分子的方法,包括以下步骤:

(a) 提供能够合成或修饰小分子的多个生物合成的酶,其中的一个酶包括由含有权利要求 1 中所示序列的核酸序列编码的肌醇六磷酸酶;

(b) 提供步骤 (a) 中一个或多个酶的底物;和

(c) 在促进多个生物催化反应的条件下,使步骤 (b) 的底物与酶反应,以通过一系列生物催化反应产生小分子。

144. 一种修饰小分子的方法,包括以下步骤:

(a) 提供由含有权利要求 1 中所示序列的核酸序列编码的肌醇六磷酸酶;

(b) 提供小分子;和

(c) 在促进肌醇六磷酸酶催化的酶反应的条件下,使步骤 (a) 的酶与步骤 (b) 的小分子进行反应,从而通过肌醇六磷酸酶反应修饰小分子。

145. 根据权利要求 144 的方法,包括步骤 (a) 的酶的多个小分子底物,从而形成由肌醇六磷酸酶催化的一个或多个酶反应产生的修饰小分子文库。

146. 根据权利要求 144 的方法,进一步包括多个另外的酶,在促进通过酶的多个生物催化反应的条件下形成由多个酶反应产生的修饰小分子文库。

147. 根据权利要求 144 的方法,进一步包括测试文库以确定具有所需活性的特定修饰小分子是否存在于文库中的步骤。

148. 根据权利要求 147 的方法,其中所述的测试文库的步骤进一步包括,通过检测修饰的小分子部分有或没有具有所需活性的特定修饰小分子,除用于产生文库中众多修饰小分子的该部分的一个生物催化反应之外,系统地排除所有的反应,并确定一个或多个产生所需活性的特定修饰小分子的特异生物催化反应。

149. 一种检测肌醇六磷酸酶的功能片段的方法,包括以下步骤:

(a) 提供肌醇六磷酸酶,其中所述酶含有权利要求 36 中所示的氨基酸序列,或由具有权利要求 1 中所示序列的核酸编码;和

(b) 从步骤 (a) 的序列中删除多个氨基酸残基并测试残余酶片段的肌醇六磷酸酶活性,从而检测肌醇六磷酸酶的功能片段。

150. 根据权利要求 149 的方法,其中所述的肌醇六磷酸酶活性是通过提供肌醇六磷酸酶底物,并检测底物量的增加或反应产物量的减少而测定的。

151. 根据权利要求 150 的方法,其中同没有受试化合物的底物或反应产物量相比,有受试化合物的酶底物量减少或反应产物量增加确证受试化合物是肌醇六磷酸酶活性的活化剂。

152. 一种使用实时代谢流量分析的新表现型或修饰表现型的全细胞工程的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 通过修饰细胞的遗传成分制造修饰的细胞,其中遗传成分通过添加含权利要求 1 中所示序列的核酸到细胞中而被修饰;

(b) 培养修饰的细胞以产生多个修饰细胞;

(c) 通过实时监测步骤 (b) 的细胞培养检测细胞的一个或多个代谢参数;和

(d) 分析步骤 (c) 的数据以确定检测到的参数是否不同于在相似条件下未修饰细胞的类似检测,从而在使用实时代谢流量分析的细胞中鉴定工程改造的表现型。

153. 根据权利要求 152 的方法,其中所述的细胞遗传成分通过以下方法被修饰:包括

在细胞中删除序列或修饰序列,或敲除基因的表达。

154. 根据权利要求 152 的方法,进一步包括选择含新改造表现型的细胞。

155. 根据权利要求 154 的方法,进一步包括培养选择的细胞,从而产生含改造的新表现型的新细胞菌株。

156. 一种水解肌醇-六磷酸盐为肌醇和无机磷酸盐的方法,包括以下步骤:

(a) 提供具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,其中多肽包括权利要求 36 中所示的氨基酸序列,或由具有权利要求 1 中所示序列的核酸编码的多肽;

(b) 提供含肌醇-六磷酸盐的组合物;和

(c) 在其中多肽水解肌醇-六磷酸盐以产生肌醇和无机磷酸盐的条件下,将步骤(a)的多肽与步骤(b)的组合物接触。

157. 根据权利要求 156 的方法,其中所述的条件包括 37℃和 70℃之间的温度。

158. 根据权利要求 156 的方法,其中所述的组合物包括肌醇六磷酸。

159. 一种油脱胶的方法,包括以下步骤:

(a) 提供具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,其中的多肽包括权利要求 36 中所示的氨基酸序列,或由具有权利要求 1 中所示序列的核酸编码的多肽;

(b) 提供包括植物油的组合物;和

(c) 在其中多肽能够裂解肌醇-无机磷酸盐连接的条件下,将步骤(a)的多肽与步骤(b)的植物油接触,从而使油脱胶。

160. 一种生产动物饲料的方法,包括以下步骤:

(a) 用编码肌醇六磷酸酶多肽的多核苷酸转化植物、植物部分或植物细胞,其中肌醇六磷酸酶包括权利要求 36 中所示的序列,或由具有权利要求 1 所示序列的核酸编码的多肽,或具有 SEQ ID NO:2 所示序列的多肽;

(b) 在其中表达肌醇六磷酸酶的条件下培养植物、植物部分或植物细胞;和

(c) 将植物、植物部分或植物细胞转变成适合于动物饲料的组合物,或将培养的植物、植物部分或植物细胞添加到动物饲料中,从而产生动物饲料。

161. 根据权利要求 160 的方法,其中所述的多核苷酸包括表达载体,其中载体含有使核酸能够在植物细胞中表达的表达调控序列。

162. 根据权利要求 160 的方法,其中所述的动物是单胃动物。

163. 根据权利要求 160 的方法,其中所述的动物是反刍动物。

164. 一种给动物投放肌醇六磷酸酶添加剂的方法,所述的方法包括:

(a) 制备可食用的含有可食用载体和肌醇六磷酸酶的传递基质,其中当置于水介质中时,所述基质容易分散并释放肌醇六磷酸酶,其中所述肌醇六磷酸酶包括权利要求 1 的酶,和

(b) 给予动物可食用的酶传递基质。

165. 根据权利要求 164 的方法,其中所述的可食用传递基质包括成颗粒状的可食用载体。

166. 根据权利要求 164 的方法,其中所述的可食用传递基质是小球形。

167. 根据权利要求 164 的方法,其中所述的可食用载体包括:谷物种子、干草、紫花苜蓿、梯牧草、豆壳、向日葵种子粉和小麦粉。

168. 根据权利要求 167 的方法,其中所述的可食用载体包括榨干油的谷物种子。

169. 根据权利要求 164 的方法,其中所述的肌醇六磷酸酶包括权利要求 36 中所示的序列,或由具有权利要求 1 中所示序列的核酸编码的多肽,或具有 SEQ ID NO :2 所示序列的多肽。

170. 根据权利要求 164 的方法,其中所述的肌醇六磷酸酶是糖基化的以在造粒条件下提供耐热性或热稳定性。

171. 根据权利要求 164 的方法,其中所述的传递基质是通过含谷物种子和肌醇六磷酸酶的混合物的造粒产生颗粒而形成。

172. 根据权利要求 166 的方法,其中所述的小球是在包括使用蒸气的条件下制造的。

173. 根据权利要求 172 的方法,其中所述的小球是在包括应用超过 80℃ 的温度 5 分钟的条件制造。

174. 根据权利要求 173 的方法,其中所述的小球含有比活性为至少 350 至 900 单位每毫克酶的肌醇六磷酸酶。

175. 一种提高肌醇六磷酸酶多肽对动物消化系统中的酶灭活作用耐受性的方法,该方法包括使肌醇六磷酸酶多肽糖基化,其中肌醇六磷酸酶包括权利要求 36 中所示的序列,或由具有权利要求 1 中所示序列的核酸编码的多肽,或具有 SEQ ID NO :2 所示序列的多肽,从而提高肌醇六磷酸酶多肽对动物消化系统中的酶灭活作用的耐受性。

176. 根据权利要求 175 的方法,其中所述的糖基化是 N- 连接的糖基化。

177. 根据权利要求 176 的方法,其中所述的肌醇六磷酸酶多肽的糖基化是编码肌醇六磷酸酶的多核苷酸在细胞内体内表达的结果。

178. 根据权利要求 177 的方法,其中所述的细胞是真核细胞。

179. 根据权利要求 178 的方法,其中所述的真核细胞是真菌细胞。

180. 根据权利要求 178 的方法,其中所述的真核细胞是植物细胞。

181. 根据权利要求 178 的方法,其中所述的真核细胞是哺乳动物细胞。

182. 一种提高肌醇六磷酸酶多肽耐热性或热稳定性的方法,该方法包括使肌醇六磷酸酶多肽糖基化,其中肌醇六磷酸酶包括权利要求 36 中所示序列,或由具有权利要求 1 中所示序列的核酸编码的多肽,或具有 SEQ ID NO :2 所示序列的多肽,从而提高了肌醇六磷酸酶多肽的耐热性或热稳定性。

183. 根据权利要求 182 的方法,其中所述的肌醇六磷酸酶比活性在 37℃ 至 90℃ 之间的温度范围内是热稳定的,或在暴露于 37℃ 至 90℃ 之间的温度范围后是耐热的。

184. 一种加工玉米和高粱粒的方法,包括以下步骤:

(a) 提供具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,其中多肽包括权利要求 36 中所示的氨基酸序列,或由具有权利要求 1 中所示序列的核酸编码的多肽;

(b) 提供包括玉米浸液或高粱浸液的组合物;和

(c) 在其中多肽可以裂解肌醇-无机磷酸盐连接的条件接触步骤 (a) 的多肽和步骤 (b) 的组合物。

185. 一种在细胞中过度表达重组的肌醇六磷酸酶的方法,包括载体的表达,载体含有包括权利要求 1 或 SEQ ID NO :1 所示的核酸序列的核酸,其中过度表达受使用的高活性启动子、双顺反子载体或载体基因扩增的影响。

肌醇六磷酸酶, 其编码核酸及其制造和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] [0001] 此申请是美国专利申请号 No. (USSN) 09/866, 379, 申请日 2001 年 5 月 24 日, 的续案申请。

技术领域

[0003] [0002] 本发明涉及新制备的多核苷酸, 由这种多核苷酸编码的多肽, 这种多核苷酸和多肽的应用, 以及这种多核苷酸和多肽的产生和分离。特别是, 本发明提供了具有肌醇六磷酸酶活性的多肽, 如 SEQ ID NO:1。本发明提供了分离的和重组的肌醇六磷酸酶。肌醇六磷酸酶可以通过修饰大肠杆菌 (E. coli) 野生型 appA 而产生或从重组的宿主细胞中产生。本发明的肌醇六磷酸酶能用于帮助肌醇六磷酸的消化。本发明的肌醇六磷酸酶可被用在食品中以改善富肌醇六磷酸配料的饲养价值。本发明的肌醇六磷酸酶可以是耐热的和 / 或热稳定的。还提供了获得编码肌醇六磷酸酶的变异体的多核苷酸的方法和获得在高或低温下具有热稳定性或耐热的肌醇六磷酸酶的方法。

背景技术

[0004] [0003] 矿物质是所有生物体生长的基本元素。饮食矿物质可来自许多原料, 包括植物。例如, 植物种子是矿物质的丰富来源, 因为它们含有与肌醇六磷酸分子的磷酸盐基团络合的离子。这些与肌醇六磷酸结合的矿物质在某些情况下可满足一些饲养生物体种属的饮食需求, 如多胃的反刍动物。因此, 在某些情况下反刍动物不需要有无机磷酸盐和矿物质的饮食添加剂, 因为瘤胃中的微生物产生催化肌醇六磷酸 (肌 - 肌醇 - 六磷酸) 转化成肌醇和无机磷酸的酶。在加工过程中, 已与肌醇六磷酸络合的矿物质被释放。但是, 多数饲养的生物体种属不能有效地利用与肌醇六磷酸根结合的矿物质。因此, 例如, 在单胃动物家畜的生产中 (如, 猪、鸟和鱼), 饲料通常添加有矿物质和 / 或改变摄入其的生物体的消化性菌群环境的抗生素物质, 以提高生长率。

[0005] [0004] 同样地, 会产生许多问题——涉及营养、离体加工步骤、健康和医药、环境保护和资源管理, 这都与许多应用中肌醇六磷酸盐水解不充分有关。以下是这些问题的非限制性实例:

[0006] 1) 有无机矿物质的食品添加剂费用昂贵。

[0007] 2) 在许多离体应用中存在未水解的肌醇六磷酸盐是不希望的和成问题的 (如导致有害沉淀的出现)。

[0008] 3) 有抗生素的食品添加剂通过增加大量的耐抗生素病原体而对人类和动物等造成医学威胁。

[0009] 4) 未被吸收的粪便矿物质排入到环境中全面地破坏和损害周围土壤、养鱼场水和地表水的生态系统。

[0010] 5) 许多潜在食品中提供的有营养价值的成分未被充分应用而被浪费。

[0011] [0005] 许多潜在的有营养的植物, 尤其包括它们的种子, 含有可观数量的营养素

如磷酸盐,它们与肌醇六磷酸盐以某种方式连接伴随的方式使这些营养素在摄入时不能被自由地利用。一些生物体至少部分利用了这些营养素,包括牛和其它反刍动物,它们具有足够的消化能力以水解肌醇六磷酸盐并释放有关的营养素,其消化能力主要地来自它们的消化道中存在的共生生命形式。但是,多数的饲养动物种属包括猪、鱼、鸡、火鸡,以及其它非反刍动物生物体包括人,不能在摄取后有效地释放这些营养素。

[0012] [0006] 因此,为了提高营养素在被绝大多数的生物种属摄入后的供给水平,含肌醇六磷酸盐的食品中需要添加外源性营养素和 / 或具有肌醇六磷酸酶活性的添加剂。

[0013] [0007] 然而另一方面,在离体加工中,包括但不限于食品加工,未水解的肌醇六磷酸盐的存在导致了成问题的后果。而仅仅在一个例证中,如 EP0321004-B1 (Vaara 等人) 中所述,在玉米和高粱粒加工中有一个将硬仁浸在水以使其软化的步骤。在此步骤中滤出的水溶性物质成为玉米浸液的一部分,它被蒸发浓缩。玉米浸液中的未水解的肌醇六磷酸,主要地以钙和镁盐形式存在,与磷结合并沉积成有蛋白和金属离子的没有用的沉淀。此沉淀在玉米浸液的蒸发、运输和贮藏中都是难题。

[0014] [0008] 含有抗生素物质的食品添加剂在家畜生产中有许多有利的效果。例如,除了它作为避免疾病的预防性作用外,给予外源性抗生素已显示提高 3-5% 的生长率。这种作用的机理也可能部分地涉及改变饲养动物消化性菌群的环境,形成营养素吸收最佳的微生物群平衡。

[0015] [0009] 但是,抗生素过度使用带来的突出的副作用是产生病原性的耐抗生素的微生物菌株储备的危险。这种危险是迫切的,在人类中出现耐药病原体已经与家畜中使用抗生素相联系了。例如,在动物饲料中使用的抗生素阿伏霉素 (Avoparcin) 于 1997 年在许多地方被取缔,现在给予动物另外一种抗生素维及尼霉素 (virginiamycin),它与人类中用来代替万古霉素的新药 Synercid (达福普汀加奎奴普丁) 很相似。但是,研究已经显示家畜中的一些肠道球菌对 Synercid 耐药。因此,无论任何新抗生素被用作饲养动物的一般预防,如那些已经在阿伏霉素和万古霉素上见到的不需要的耐药后果很可能会再发生。因此,研究者们呼吁严格控制药物在工业中的应用。

[0016] [0010] 用添加了本发明即将公开的肌醇六磷酸酶分子的食品饲养动物获得的生长率增加,与使用抗生素例如阿伏霉素相比,即使不超过,也是相当的。因此,即将公开的肌醇六磷酸酶分子,单独或与其它试剂 (包括但不限于酶,包括蛋白酶) 组合,不仅在此应用 (如,增加饲养动物的生长率) 中是有用的,而且在其它需要肌醇六磷酸盐水解的应用中也是有用的。

[0017] [0011] 环境后果是,任何肌醇六磷酸酶缺陷的生物体种属食用含肌醇六磷酸盐的食品,无论食品是否添加矿物质,都因排泄未吸收的矿物质而导致粪便污染。这种污染不仅对直接的生活环境,而且因此对周围水源也具有负面影响。环境改变作用主要发生在食物链底部,因此具有向上渗透并贯穿生态系统以引起持久和灾难性损害的潜在危险,特别在数年连续污染后。此问题可能在任何发生浓缩肌醇六磷酸盐加工的地方表现出来,包括体内 (如通过家畜生产、动物园、野生动植物保护区、等地区的动物) 和体外 (如商业玉米湿磨法、cereal 浸泡加工、和类似方法) 加工步骤。

[0018] [0012] 使用外源添加的肌醇六磷酸酶分子的决定,是完全代替还是加大使用外源给予的矿物质和 / 或抗生素,最终需要使用者经过财务可行性和成本效率合算测试,这些

法的成本效率已经成为这种和其它商业应用的主要局限性。因此极需要改良的肌醇六磷酸酶分子。

[0027] [0021] 也有报道,微生物肌醇六磷酸酶被用于从某些工业加工如小麦和玉米加工废品中产生的动物饲料中。一方面,玉米湿磨法加工产生的麸质作为动物饲料出售。据报道,添加肌醇六磷酸酶可提高饲料产品的营养价值。例如,真菌肌醇六磷酸酶的应用和加工条件($t=50^{\circ}\text{C}$ 和 $\text{pH} \sim 5.5$)以前已经报道过(如 EP0 321 004)。简要地,在使用传统的浸泡方法加工大豆粉中,即不添加外源肌醇六磷酸酶的方法,未水解的肌醇六磷酸盐的存在据报道使粉和废物不适合用作饲养鱼、家禽和其它非反刍动物以及吃奶小牛的饲料。据报道肌醇六磷酸酶用于提高高蛋白大豆原料的营养价值和商业价值(见 Alko, Rajamäki, Finland 的 FinaseEnzymes)。真菌肌醇六磷酸酶和最适 $\text{pH} 2.5$ 的黑曲霉 (*A. niger*) 酸性磷酸酶的组合,已经被 Alko, Ltd 在其肌醇六磷酸降解产品 Finas F 和 Finase S 中用作动物饲料添加剂。但是,此方法的成本效率仍然是限制其广泛使用的主要因素。因此,节约成本的肌醇六磷酸酶的原料会大大提高大豆粉作为动物饲料的价值(Shieh 等人,1969)。

[0028] [0022] 为解决所提到的问题,已经建议用外源肌醇六磷酸酶处理食品,但此方法尚未被充分最优化,特别是关于可行性和成本效率。此最优化需要考虑大范围的应用,特别是大规模生产。例如,丰富的食品种类,其生产方法,以及食用这些食品的生物体的种属。

[0029] [0023] 在一个具体的实例中,需要考虑,鱼饲料丸的制造生产需要将成分暴露于高温和/或加压下,以生成在接触水时不过早地(如食用前)溶解和/或降解的小丸。于是就需要得到在高温和/或加压条件下稳定的添加剂酶的生产过程。因此可以理解,不同肌醇六磷酸酶对于不同的应用可有不同的优选或最佳条件。

[0030] [0024] 此外进一步认识到,使酶加工最优化的重要方式是通过对关键催化酶的修饰和改良。例如,可以形成具有表达肌醇六磷酸酶分子的表达系统的转基因植物。可以理解,通过适当地改进不直接涉及表达分子活性的因子,可以最大限度地获得如表达水平的最优化,该表达水平仅仅是有限的和潜在地不足水平的优化。因此,还需要获得具有改良特征的分子。

发明内容

[0031] [0025] 本发明提供了一种分离的或重组的核酸,该核酸包括一核酸序列,该序列与 SEQ ID NO:1 具有至少 98% 的序列同一性,含有至少大约 100 个残基区域,其中核酸编码至少一条具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,序列同一性是用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定的。在另一个实施例中,核酸序列与 SEQ ID NO:1 具有至少 98% 的序列同一性,在至少大约 50 个残基、100 个残基、150 个残基、200 个残基、250 个残基、300 个残基、350 个残基、400 个残基、450 个残基、500 个残基、550 个残基、600 个残基、700 个残基、800 个残基、900 个残基、1000 个残基、1200 个残基或 1300 个残基范围内。

[0032] [0026] 在其它的实施例中,核酸序列与 SEQ ID NO:1 具有至少 98%、98.5%、99% 或 99.5% 的序列同一性,在至少大约 50 个残基、100 个残基、150 个残基、200 个残基、250 个残基、300 个残基、350 个残基、400 个残基、450 个残基、500 个残基、550 个残基、600 个残基、700 个残基、800 个残基、900 个残基、1000 个残基、1200 个残基或 1300 个残基范围内。该核酸序列可以具有 SEQ ID NO:1 所示的序列。该核酸序列可编码具有 SEQ ID NO:2

中所示序列的多肽。

[0033] [0027] 一方面, 序列比较算法是 BLAST 2.2.2 版算法。筛选设置可设为 blastall-p blastp-d" nr pataa" -F F, 其它所有选项均设为默认值。

[0034] [0028] 一方面, 肌醇六磷酸酶活性包括肌醇六磷酸盐 (肌-肌醇-六磷酸盐) 转化成肌醇和无机磷酸盐的催化作用, 或相当的作用。肌醇六磷酸酶活性可包括水解肌醇六磷酸盐 (肌-肌醇-六磷酸盐)。

[0035] [0029] 一方面, 肌醇六磷酸酶活性可以是热稳定的或耐热的。多肽可以在大约 40℃ 至大约 70℃ 温度范围条件下保持肌醇六磷酸酶活性。多肽可以在暴露于超过 37℃ 至大约 90℃ 温度范围之后保持肌醇六磷酸酶活性。多肽可以在暴露于超过 37℃ 至大约 50℃ 温度范围之后保持肌醇六磷酸酶活性。

[0036] [0030] 本发明提供了一种分离的或重组的核酸, 该核酸包括在严格条件下与 SEQ ID NO:1 所示的核酸序列杂交的序列, 其中该核酸编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽。核酸长度至少大约 50 个残基、100 个残基、150 个残基、200 个残基、250 个残基、300 个残基、350 个残基、400 个残基、450 个残基、500 个残基、550 个残基、600 个残基、700 个残基、800 个残基、900 个残基、1000 个残基、1200 个残基或 1300 个残基。其中一, 该严格条件包括在大约 65℃ 温度下在 0.2X SSC 中洗涤大约 15 分钟的洗涤步骤。

[0037] [0031] 本发明提供了用于鉴定编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的核酸的核酸探针, 其中探针包括选自于构成 SEQ ID NO:1 中所示的序列中的一组序列中至少 10 个连续的碱基, 其中探针通过连接或杂交鉴定核酸。探针可包括寡核苷酸, 该寡核苷酸包括 SEQ ID NO:1 所示序列中的至少大约 10 至 50、大约 20 至 60、大约 30 至 70、大约 40 至 80 或大约 60 至 100 个连续的碱基。

[0038] [0032] 本发明提供了用于鉴定编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的核酸的核酸探针, 其中探针的核酸序列与 SEQ ID NO:1 具有至少 98% 的序列同一性, 包含至少大约 100 个残基区域, 其中序列同一性是用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定的。探针可包括寡核苷酸, 包括 SEQ ID NO:1 所示核酸序列中的至少大约 10 至 50、大约 20 至 60、大约 30 至 70、大约 40 至 80 或大约 60 至 100 个连续的碱基。探针可包括与 SEQ ID NO:1 中所示的核酸序列具有至少 99% 序列同一性的核酸序列。探针可以包括 SEQ ID NO:1 中所示序列的一部分。

[0039] [0033] 本发明提供了扩增核酸的扩增引物序列对, 该核酸编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽, 其中该引物对能够扩增 SEQ ID NO:1 中列出的核酸序列。一方面, 每一个扩增引物序列对含有至少由大约 10 至 50 个连续碱基序列组成的寡核苷酸。

[0040] [0034] 本发明提供了扩增核酸的方法, 该核酸编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽, 该法包括用能够扩增 SEQ ID NO:1 中所示核酸序列的扩增引物序列对扩增模板核酸。

[0041] [0035] 发明提供了表达盒, 该表达盒包括本发明的核酸, 如, 在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO:1 具有至少 98% 序列同一性的核酸序列, 其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定, 或者是, 与 SEQ ID NO:1 所示核酸序列在严格条件下杂交的核酸, 或其子序列。

[0042] [0036] 本发明提供了包含本发明核酸的载体, 如, 在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO:1 具有至少 98% 序列同一性的核酸序列, 其中序列同一性用序列比较算法进

行分析或通过视觉观察而确定,或者是,与 SEQ ID NO :1 所示核酸序列在严格条件下杂交的核酸,或其子序列。

[0043] [0037] 本发明提供了克隆运载体,包括本发明的载体或本发明的核酸,其中克隆媒介包括病毒载体、质粒、噬菌体、噬菌粒、粘粒、fosmid、细菌噬菌体或人工染色体。病毒载体可包括腺病毒载体、逆转录病毒载体或与腺相关的病毒载体。病毒载体可包括细菌人工染色体 (BAC)、质粒、细菌噬菌体 P1-来源的载体 (PAC)、酵母人工染色体 (YAC)、哺乳动物人工染色体 (MAC)。

[0044] [0038] 本发明提供了包含本发明的载体或本发明的核酸的转化细胞。载体可包括在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 98% 序列同一性的核酸序列,其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定,或者,与 SEQ ID NO :1 所示核酸序列在严格条件下杂交的核酸,或其子序列。

[0045] [0039] 发明提供了包含本发明的载体或本发明的核酸的转化细胞。核酸可包括在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 98% 序列同一性的核酸序列,其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定,或者,与 SEQ ID NO :1 所示核酸序列在严格条件下杂交的核酸,或其子序列。另一方面,细胞是细菌细胞、哺乳动物细胞、真菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。

[0046] [0040] 本发明提供了包含本发明的载体或本发明的核酸的转基因非人动物。一方面,核酸在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 98% 序列同一性,其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定,或者,包括与 SEQ ID NO :1 所示核酸序列在严格条件下杂交的核酸,或其子序列。另一方面,转基因非人动物是小鼠、山羊或猪。

[0047] [0041] 本发明提供了包含本发明的载体或本发明的核酸的转基因植物。一方面,核酸序列在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 98% 序列同一性,其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定,或者,核酸在严格条件下与 SEQ ID NO :1 所示的核酸序列杂交,或其子序列。另一方面,该植物是玉米、马铃薯、番茄、小麦、油料种子植物、油菜籽植物、大豆或烟草。

[0048] [0042] 本发明提供了包含本发明的载体或本发明的核酸的转基因种子。一方面,核酸序列在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 98% 序列同一性,其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定,或者,核酸在严格条件下与 SEQ ID NO :1 所示的核酸序列杂交,或其子序列。另一方面,种子是玉米种子、小麦粒、油料种子、油菜籽、大豆种子、棕榈粒、向日葵种子、芝麻种子、花生或烟草植物种子。

[0049] [0043] 本发明提供了反义寡核苷酸,含有与在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 98% 序列同一性的核酸序列互补或能够在严格条件下与之杂交的核酸序列,其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定,或者,在严格条件下与 SEQ ID NO :1 所示核酸序列杂交的核酸,或其子序列,或者 SEQ ID NO :1 所示的核酸序列。反义寡核苷酸长度可以在大约 10 至 50、大约 20 至 60、大约 30 至 70、大约 40 至 80 或大约 60 至 100 个碱基之间。

[0050] [0044] 本发明提供了抑制肌醇六磷酸酶信使在细胞中翻译的方法,包括给予细胞或在细胞中表达反义寡核苷酸,后者含有与在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :1

具有至少 98% 序列同一性的核酸序列互补或能够在严格条件下与之杂交的核酸序列, 其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定, 或者, 在严格条件下与 SEQ ID NO :1 所示核酸序列杂交的核酸, 或其子序列。

[0051] [0045] 本发明提供了分离的或重组的多肽, 含有在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :2 具有至少 98% 序列同一性的氨基酸序列, 或由以下核酸序列编码的多肽 : (i) 在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 98% 序列同一性, 其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定, 或者, (ii) 在严格条件下与 SEQ ID NO :1 所示的核酸序列杂交。一方面, 多肽具有肌醇六磷酸酶活性。肌醇六磷酸酶活性可包括水解肌醇六磷酸盐 (肌 - 肌醇 - 六磷酸盐)。

[0052] [0046] 一方面, 该分离的或重组的多肽具有耐热表现型, 即, 其肌醇六磷酸酶活性是耐热的。另一方面, 该分离的或重组的多肽具有热稳定表现型, 即, 其肌醇六磷酸酶活性是热稳定的。

[0053] [0047] 另一方面, 本发明的分离或重组的多肽 (氨基酸序列) 在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :2 具有至少 98% 的序列同一性, 其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定。在多个实施例中, 氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 具有至少 98% 的序列同一性, 含有至少大约 50 个残基、100 个残基、150 个残基、200 个残基、250 个残基、300 个残基、350 个残基、400 个残基或 435 个残基区域。

[0054] [0048] 另一方面, 本发明的分离或重组的多肽 (氨基酸序列) 与 SEQ ID NO :2 具有至少 98%、98.5%、99% 或 99.5% 的序列同一性, 包含至少大约 50 个残基、100 个残基、150 个残基、200 个残基、250 个残基、300 个残基、350 个残基、400 个残基或 435 个残基区域。本发明的分离或重组的多肽 (氨基酸序列) 可具有 SEQ ID NO :2 中所示的序列。多肽可以由具有 SEQ ID NO :1 中所示序列的核酸编码。一方面, 序列比较算法是 BLAST 2.2.2 版运算法。筛选设置可设为 blastall-p blastp-d " nrpataa" -F F, 其它所有选择设为默认值。

[0055] [0049] 本发明的分离或重组的多肽 (氨基酸序列) 具有肌醇六磷酸酶活性。一方面, 肌醇六磷酸酶活性包括肌醇六磷酸盐 (肌 - 肌醇 - 六磷酸盐) 转化成肌醇和无机磷酸盐的催化作用, 或相当的作用。肌醇六磷酸酶活性包括水解肌醇六磷酸盐 (肌 - 肌醇 - 六磷酸盐)。

[0056] 本发明提供了分离的或重组的多肽, 其中该多肽具有肌醇六磷酸酶活性但缺少信号序列, 并含有本发明的氨基酸序列, 如, 在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :2 具有至少 98% 序列同一性的序列, 或由以下核酸序列编码的多肽 : (i) 在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO :1 具有至少 98% 序列同一性, 其中序列同一性用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定, 或者, (ii) 在严格条件下与 SEQ ID NO :1 中所示的核酸杂交。另一方面, 肌醇六磷酸酶活性在加热至以下温度范围时具有热稳定性 : 大约 37°C 至 50°C、大约 50°C 至 70°C 或大约 70°C 至 90°C。热稳定的肌醇六磷酸酶活性包括在大约 37°C 下大约 100 至大约 1000U/ 毫克蛋白的比活性。热稳定的肌醇六磷酸酶活性包括大约 500 至大约 750U/ 毫克蛋白的比活性。热稳定的肌醇六磷酸酶活性包括 37°C 下大约 500 至大约 1200U/ 毫克蛋白范围的比活性。热稳定的肌醇六磷酸酶活性包括 37°C 下大约 750 至大约 1000U/ 位每毫克蛋白范围的比活性。肌醇六磷酸酶活性可以在被加热至以下升高的温度范围后具

有耐热性：从大约 37℃ 至约 90℃，或从大约 37℃ 至约 70℃。耐热性包括在被加热至升高的温度后，37℃ 下保持肌醇六磷酸酶比活性的至少一半。耐热性可包括在被加热至升高的温度后，37℃ 下保持比活性在大约 500 至 1200U/毫克蛋白范围内。肌醇六磷酸酶含有至少一个糖基化位点。糖基化可以是一个或多个 N-连接的糖基化或一个或多个 N-连接的糖基化或其组合。肌醇六磷酸酶可以在体外或体内糖基化，如，在细胞中被表达以后，如真核细胞如，酵母细胞如毕赤酵母 (*P. pastoris*) 或酿酒酵母 (*S. pombe*)、或昆虫细胞、或哺乳动物细胞如人细胞。一方面，多肽在酸性条件下保留了肌醇六磷酸酶活性，如，大约 pH 5 的条件或大约 pH 4.5 的条件下。

[0057] [0051] 本发明提供了包含本发明的多肽的蛋白制剂，其中该蛋白制剂包括液体、固体或凝胶。

[0058] [0052] 本发明提供了包括由本发明的多肽和另一个结构域组成的杂二聚体，一方面，该另一个结构域是多肽，该杂二聚体是融合蛋白。该另一个结构域可以是抗原决定簇或标记或它们的组合。

[0059] [0053] 本发明提供了具有肌醇六磷酸酶活性的固定化多肽，其中该多肽包括本发明的多肽（氨基酸）序列或本发明的杂二聚体或融合蛋白。一方面，肌醇六磷酸酶固定在细胞、金属、树脂、聚合体、陶瓷、玻璃、微电极、石墨颗粒、珠、凝胶、板、阵列或毛细管上。

[0060] [0054] 本发明提供了一个阵列，含本发明的固定化多肽或本发明的杂二聚体或融合蛋白、或本发明的核酸。

[0061] [0055] 本发明提供了分离的或重组的抗体，它与本发明的多肽或由本发明的核酸编码的多肽能特异结合。抗体可以是单克隆或多克隆抗体。本发明提供了含抗体的杂交瘤，该抗体能与本发明的多肽或与由本发明的核酸编码的多肽特异地结合。

[0062] [0056] 本发明提供了给动物的食品添加剂，含有本发明的多肽或由本发明的核酸编码的多肽。在食品添加剂中的该多肽糖基化。

[0063] 本发明提供了可食用的酶传递基质，含有本发明的多肽或由本发明的核酸编码的多肽，其中该多肽具有肌醇六磷酸酶活性。可食用的酶传递基质可以包括小球、片或丸。在可食用的酶传递基质中的本发明的多肽糖基化。在可食用的酶传递基质中的本发明的多肽是耐热的和 / 或热稳定的。

[0064] [0058] 本发明提供了可食用的小球，含有颗粒状的可食用的载体和本发明的多肽或由本发明的核酸编码的多肽，其中多肽具有肌醇六磷酸酶活性。

[0065] [0059] 本发明提供了包括食品和可食用的载体的饲料组合物，该饲料组合物含具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列或其保守变异体的至少 30 个连续的氨基酸的重组的肌醇六磷酸酶蛋白，食品中的肌醇六磷酸酶蛋白糖基化。食品中的肌醇六磷酸酶蛋白是耐热的和 / 或热稳定的。食品可被制成小球，丸或片形。可以用聚合体包被的添加剂生产食品。食品可被制成颗粒状的形式。食品可以通过喷雾干燥生产。

[0066] [0060] 本发明提供了含有本发明的多肽或由本发明的核酸编码的多肽的大豆粉，其中多肽具有肌醇六磷酸酶活性。

[0067] 本发明提供了分离或鉴定具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的方法，包括以下步骤：(a) 提供本发明的抗体；(b) 提供含多肽的标本（样品，sample）；和 (c) 在抗体能够与多肽特异结合的条件下将步骤 (b) 的标本与步骤 (a) 的抗体接触，从而分离或鉴定肌醇六磷酸

酶。

[0068] [0062] 本发明提供了制备抗肌醇六磷酸酶抗体的方法,包括以足以产生体液免疫反应的量给予非人类动物本发明的核酸、或本发明的多肽,从而制备抗肌醇六磷酸酶的抗体。

[0069] [0063] 本发明提供了产生重组的多肽的方法,包括以下步骤:(a) 提供可操作地连接启动子的核酸;其中核酸包括本发明的序列;和(b) 在允许多肽表达的条件下表达步骤(a)的核酸,从而产生重组的多肽。该方法可进一步包括用步骤(a)的核酸转化宿主细胞,随后表达步骤(a)的核酸,从而在转化的细胞中产生重组的多肽。

[0070] [0064] 本发明提供了鉴定具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的方法,包括以下步骤:(a) 提供本发明的多肽或由具有本发明序列的核酸编码的多肽;(b) 提供肌醇六磷酸酶底物;和(c) 将步骤(a)的多肽或片段或其变异体与步骤(b)的底物接触,并检测底物量的增加或反应产物量的下降,其中底物量的下降或反应产物量的增加确证该多肽具有肌醇六磷酸酶活性。

[0071] [0065] 发明提供了鉴定肌醇六磷酸酶底物的方法,包括以下步骤:(a) 提供发明的多肽或由具有发明序列的核酸编码的多肽;(b) 提供受试底物;和(c) 将步骤(a)的多肽与步骤(b)的受试底物接触,并检测底物量的增加或反应产物量的下降,其中底物量的下降或反应产物量的增加确证该受试底物为肌醇六磷酸酶底物。

[0072] [0066] 发明提供了检测化合物是否与多肽特异结合的方法,包括以下步骤:(a) 在允许核酸翻译成多肽的条件下,表达核酸或含该核酸的载体,其中核酸具有发明的序列,或者,提供发明的多肽;(b) 将多肽与受试化合物接触;和(c) 检测受试化合物是否特异地与多肽结合,从而确证该化合物与多肽特异地结合。

[0073] [0067] 发明提供了鉴定肌醇六磷酸酶活性调节剂的方法,包括以下步骤:(a) 提供发明的肌醇六磷酸酶多肽或由发明核酸编码的肌醇六磷酸酶多肽;(b) 提供受试化合物;(c) 将步骤(a)的多肽与步骤(b)的受试化合物接触,并测定肌醇六磷酸酶的活性,其中存在受试化合物与没有受试化合物时测定的肌醇六磷酸酶活性相比有改变,产生了受试化合物调节肌醇六磷酸酶活性的结论。在一个方面,通过提供肌醇六磷酸酶底物并检测底物量的增加或反应产物量的下降来测定肌醇六磷酸酶活性。在一个方面,同没有受试化合物的底物或反应产物量相比,有受试化合物的底物量下降或反应产物量增加证实受试化合物是肌醇六磷酸酶活性的活化剂。在一个方面,同没有受试化合物的底物或反应产物量相比,有受试化合物的底物量增加或反应产物量下降证实受试化合物是肌醇六磷酸酶活性的抑制剂。

[0074] [0068] 发明提供了由处理器和数据存储装置组成的计算机系统,其中所述的数据存储装置上储存了多肽序列或核酸序列,其中多肽序列包括发明的多肽序列或其子序列,核酸包括发明的核酸序列或其子序列。计算机系统可进一步包括序列比较运算法则和其上至少储存了一个参考序列的数据存储装置。序列比较运算法则可包括说明多形性的计算机程序。计算机系统可进一步包括识别所述序列中一个或多个特征的标识符。

[0075] [0069] 发明提供了其上存储有多肽序列或核酸序列的计算机可读介质,其中多肽序列包括发明的多肽序列或其子序列,核酸包括发明的核酸序列或其子序列。

[0076] [0070] 发明提供了识别序列特征的方法,包括以下步骤:(a) 用识别序列中一个

或多个特征的计算机程序阅读序列,其中的序列包括多肽序列或核酸序列,其中多肽序列包括发明的序列或其子序列,核酸包括发明的序列或其子序列;和(b)用计算机程序识别序列中的一个或多个特征。

[0077] [0071] 发明提供了将第一条序列同第二条序列比较的方法,包括以下步骤:(a)通过使用比较序列的计算机程序阅读第一条序列和第二条序列,其中第一条序列包括多肽序列或核酸序列,其中多肽序列包括发明的序列或其子序列,核酸包括发明的序列或其子序列;和(b)用计算机程序检测第一条序列和第二条序列间的差异。在一个方面,检测第一条序列和第二条序列间差异的步骤可进一步包括识别多形性的步骤。该方法可进一步包含识别序列中一个或多个特征的标识符。该方法可进一步包括用计算机程序阅读第一条序列并识别序列中的一个或多个特征。

[0078] [0072] 发明提供了从环境标本中分离或回收核酸的方法,核酸编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,包括以下步骤:(a)提供扩增核酸的扩增引物序列对,核酸编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,其中引物对能够扩增 SEQ ID NO:1 或其子序列;(b)从环境标本中分离核酸或处理环境标本使标本中的核酸易于与扩增引物对杂交;和(c)结合步骤(b)的核酸和步骤(a)的扩增引物对并从环境标本中扩增核酸,从而从环境标本中分离或回收具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的编码核酸。在一个方面,扩增引物序列对的每一个成员可以包括由 SEQ ID NO:1 所示序列的至少大约 10 至 50 个连续碱基组成的寡核苷酸。发明提供了从环境标本中分离或回收核酸的方法,核酸编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,包括以下步骤:(a)提供由发明序列组成的多核苷酸探针或其子序列;(b)从环境标本中分离核酸或处理环境标本使标本中的核酸易于与步骤(a)的多核苷酸探针杂交;(c)将分离的核酸或步骤(b)处理的环境标本与步骤(a)的多核苷酸探针结合;和(d)分离与步骤(a)的与多核苷酸探针特异杂交的核酸,从而从土壤标本中分离或回收具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的编码核酸。环境标本可包括水标本、液体标本、土壤标本、空气标本或生物学标本。生物学标本可以来自细菌细胞、原生动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞、植物细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

[0079] 发明提供了产生肌醇六磷酸酶编码核酸变异体的方法,包括以下步骤:(a)提供由发明核酸序列组成的模板核酸;和(b)在模板序列中修饰、删除或添加一个或多个核苷酸,或它们的组合,以产生模板核酸的变异体。方法可进一步包括表达变异体核酸以产生变异体肌醇六磷酸酶多肽。修饰、添加或删除可以通过以下方法引导,易错 PCR、改组、寡核苷酸定向诱变、集合 PCR、有性的 PCR 诱变、体内诱变、盒式诱变、递归整体诱变、指数整体诱变、位点特异的诱变、基因重新组装、基因位点饱和诱变(GSSM)、合成的连接重新组装(SLR)和/或它们的组合。修饰、添加或删除可以通过以下方法引导,重组、递归序列重组、磷硫酸盐修饰的 DNA 诱变、含尿嘧啶的模板诱变、缺口双重诱变、点错配修复诱变、修复缺陷的宿主菌株诱变、化学诱变、放射产生的诱变、删除诱变、限制性选择诱变、限制性纯化诱变、人工基因合成、整体诱变、嵌合的核酸多聚体创建和/或它们的组合。在可选择的方面,修饰、添加或删除是由以下方法引导的,易错 PCR、改组、寡核苷酸定向诱变、集合 PCR、有性的 PCR 诱变、体内诱变、盒式诱变、递归整体诱变、指数整体诱变、位点特异的诱变、基因重新组装、合成的连接重新组装(SLR)和/或基因位点饱和诱变(GSSM)。

[0080] [0074] 在一个方面,方法被反复地重复直到产生与模板核酸编码的肌醇六磷酸酶

具有改变的或不同的活性,或改变的或不同的稳定性的肌醇六磷酸酶。变异体肌醇六磷酸酶多肽可以是耐热的,在暴露于升高的温度后,肌醇六磷酸酶保留了一些活性。变异体肌醇六磷酸酶多肽同模板核酸编码的肌醇六磷酸酶相比,糖基化可以增多。变异体肌醇六磷酸酶多肽可在高温下具有肌醇六磷酸酶活性,而模板核酸编码的肌醇六磷酸酶在高温下是无活性的。在一个方面,方法被反复地重复直到从模板核酸产生密码子选择改变的肌醇六磷酸酶编码序列。在一个方面,方法被反复地重复直到从模板核酸产生信使表达或稳定性水平较高或较低的肌醇六磷酸酶基因。

[0081] [0075] 发明提供了在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子的方法,以增加其在宿主细胞中的表达,该方法包括 (a) 提供由发明核酸序列组成的编码肌醇六磷酸酶的核酸;和 (b) 在步骤 (a) 的核酸中鉴定非优选的或较少优选的密码子,并用编码相同氨基酸的优选或中性使用的密码子作为替代密码子替代之,其中优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中反复出现的密码子,非优选或较少优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中出现较少的密码子,从而修饰核酸以增加其在宿主细胞中的表达。

[0082] [0076] 发明提供了在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子的方法,该方法包括 (a) 提供由发明核酸序列组成的编码肌醇六磷酸酶的核酸;和 (b) 在步骤 (a) 的核酸中鉴定密码子,并用编码相同氨基酸的不同密码子作为替代密码子替代之,从而在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子。

[0083] [0077] 发明提供了在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子的方法,以增加其在宿主细胞中的表达,该方法包括 (a) 提供由发明核酸序列组成的编码肌醇六磷酸酶的核酸;和 (b) 在步骤 (a) 的核酸中鉴定非优选的或较少优选的密码子,并用编码相同氨基酸的优选或中性使用的密码子作为替代密码子替代之,其中优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中反复出现的密码子,非优选或较少优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中出现较少的密码子,从而修饰核酸以增加其在宿主细胞中的表达。

[0084] [0078] 发明提供了在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子的方法,以减少其在宿主细胞中的表达,该方法包括 (a) 提供编码含发明序列的肌醇六磷酸酶的核酸;和 (b) 在步骤 (a) 的核酸中鉴定至少一个优选的密码子,并用编码相同氨基酸的非优选的或较少优选的密码子作为替代密码子替代之,其中优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中反复出现的密码子,非优选或较少优选的密码子是宿主细胞基因编码序列中出现较少的密码子,从而修饰核酸以减少其在宿主细胞中的表达。在可选择的方面,宿主细胞是细菌细胞、真菌细胞、昆虫细胞、酵母细胞、植物细胞或哺乳动物细胞,如人类细胞。

[0085] [0079] 发明提供了产生核酸文库的方法,核酸编码多个修饰的肌醇六磷酸酶活性位点或底物结合位点,其中修饰活性位点或底物结合位点来自于含第一个活性位点或第一个底物结合位点编码序列的第一个核酸,该方法包括:(a) 提供编码第一个活性位点或第一个底物结合位点的第一个核酸,其中第一个核酸序列包括在严格条件下与 SEQ ID NO: 1 所示序列杂交的序列,和编码肌醇六磷酸酶活性位点或肌醇六磷酸酶底物结合位点的核酸;(b) 提供一组诱变寡核苷酸,在第一个核酸的多个靶密码子上编码天然存在的氨基酸变异体;和 (c) 使用该组诱变寡核苷酸以产生一组编码活性位点或编码底物结合位点的变异体核酸,在每一个被诱变的氨基酸密码子上编码一系列氨基酸变异,从而产生编码众多修饰的肌醇六磷酸酶活性位点或底物结合位点的核酸文库。在一个方面,该方法包括诱变

步骤 (a) 的第一个核酸,通过:最优化的定向的进化系统方法,或基因位点-饱和诱变法 (GSSM),或合成的连接重新组装法 (SLR)。方法可进一步包括诱变步骤 (a) 的第一个核酸或变异体,通过以下方法:易错 PCR、改组、寡核苷酸定向诱变、集合 PCR、有性的 PCR 诱变、体内诱变、盒式诱变、递归整体诱变、指数整体诱变、位点特异的诱变、基因重新组装、基因位点饱和诱变 (GSSM)、合成的连接重新组装 (SLR) 及它们的组合。该方法可进一步包括诱变步骤 (a) 的第一个核酸或变异体,通过以下方法:重组、递归序列重组、磷硫酸盐修饰的 DNA 诱变、含尿嘧啶的模板诱变、缺口双重诱变、点错配修复诱变、修复缺陷的宿主菌株诱变、化学诱变、放射产生的诱变、删除诱变、限制性选择诱变、限制性纯化诱变、人工基因合成、整体诱变、嵌合的核酸多聚体创建和它们的组合。

[0086] [0080] 发明提供了制造小分子的方法,包括以下步骤:(a) 提供能够合成或修饰小分子的多个生物合成的酶,其中的一个酶包括含发明序列的核酸编码的肌醇六磷酸酶;(b) 提供步骤 (a) 中至少一个酶的底物;和 (c) 在促进多个生物催化反应的条件下,步骤 (b) 的反应底物与酶反应,以通过一系列生物催化反应产生小分子。

[0087] [0081] 发明提供了修饰小分子的方法,包括以下步骤:(a) 提供由含发明序列的核酸编码的肌醇六磷酸酶;(b) 提供一个小分子;和 (c) 在促进肌醇六磷酸酶催化的酶反应的条件下,步骤 (a) 的酶与步骤 (b) 的小分子进行反应,从而通过肌醇六磷酸酶反应修饰小分子。该方法可包括步骤 (a) 的酶的众多小分子底物,从而形成由肌醇六磷酸酶催化的至少一个酶反应产生的修饰小分子文库。在促进通过酶的多个生物催化反应的条件下,该方法可包括多个另外的酶以形成由多个酶反应产生的修饰小分子文库。该方法可进一步包括测试文库的步骤,以确定具有所需活性的特定修饰小分子是否存在于文库中。

[0088] [0082] 在一个方面,方法包括测试文库步骤,这些步骤进一步包括,通过检测修饰的小分子部分有或没有具有所需活性的特定修饰小分子,除用于产生文库中多个修饰小分子之一部分的生物催化反应之外,系统地排除所有的反应,并确定至少一个产生所需活性的特定修饰小分子的特异生物催化反应。

[0089] [0083] 发明提供了检测肌醇六磷酸酶功能片段的方法,包括以下步骤:(a) 提供肌醇六磷酸酶,其中的酶含有发明的氨基酸序列,或由具有发明序列的核酸编码;和 (b) 从步骤 (a) 的序列中删除多个氨基酸残基并测试残余子序列的肌醇六磷酸酶活性,从而检测肌醇六磷酸酶的功能片段。可以通过提供肌醇六磷酸酶底物,并探测底物量的增加或反应产物量的减少而检测肌醇六磷酸酶的活性。在一个方面,将有受试化合物的酶底物量减少或反应产物量增加与没有受试化合物的底物或反应产物量比较,以确定受试化合物是肌醇六磷酸酶活性的活化剂。

[0090] [0084] 发明提供了通过使用实时代谢流量分析实施新表现型或修饰表现型的全细胞工程的方法,该方法包括以下步骤:(a) 通过修饰细胞的遗传成分制造修饰的细胞,其中遗传成分通过添加含发明序列的核酸到细胞中而被修饰;(b) 培养修饰的细胞以产生多个修饰细胞;(c) 通过实时监测步骤 (b) 的细胞培养检测细胞的至少一个代谢参数;和 (d) 分析步骤 (c) 的数据以确定检测到的参数是否不同于在相似条件下未修饰细胞的类似检测,从而在使用实时代谢流量分析的细胞中鉴定工程改造的表现型。细胞的遗传成分可以通过这些方法被修饰;在细胞中删除序列或修饰序列,或敲除基因的表达。该方法可进一步包括选择含新的工程改造表现型的细胞。方法可进一步包括培养选择的细胞,从而产生含

新的工程改造表现型的新细胞菌株。

[0091] [0085] 发明提供了水解肌醇-六磷酸盐为肌醇和无机磷酸盐的方法,包括以下步骤:(a) 提供具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,其中多肽包括发明的氨基酸序列,或由具有发明序列的核酸编码的多肽;(b) 提供含肌醇-六磷酸盐的组合物;和(c) 在多肽水解肌醇-六磷酸盐以产生肌醇和无机磷酸盐的条件下,将步骤(a)的多肽与步骤(b)的组合物接触。该条件可包括大约 37°C 和大约 70°C 之间的温度。该组合物可包括肌醇六磷酸。

[0092] 发明提供了油脱胶方法,包括以下步骤:(a) 提供具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,其中的多肽包括发明的氨基酸序列,或由具有发明序列的核酸编码的多肽;(b) 提供包括植物油的组合物;和(c) 在多肽能够裂解肌醇-无机磷酸盐连接的条件下,将步骤(a)的多肽与步骤(b)的植物油接触,从而使油脱胶。

[0093] [0087] 发明提供了生产动物饲料的方法,包括以下步骤:(a) 用编码肌醇六磷酸酶多肽的多核苷酸转化植物、植物部分或植物细胞,其中肌醇-六磷酸酶包括以下序列的至少 30 个连续的氨基酸:发明的序列,或由具有发明序列的核酸编码的多肽,或具有 SEQ ED NO:2 所示序列的多肽;(b) 在表达肌醇六磷酸酶的条件下培养植物、植物部分或植物细胞;和(c) 将植物、植物部分或植物细胞转变成适合于动物饲料的组合物,或将培养的植物、植物部分或植物细胞添加到动物饲料中,从而产生动物饲料。多核苷酸可包括表达载体,其中载体含有使核酸能够在植物细胞中表达的表达调控序列。动物可以是单胃动物,如反刍动物。

[0094] 发明提供了给动物投放肌醇六磷酸酶添加剂的方法,所述的方法包括:(a) 制备可食用的传递介质,含有可食用的载体和肌醇六磷酸酶,其中当置于水媒中时,介质稳定地分散并释放肌醇六磷酸酶,和(b) 给予动物可食用的酶传递基质。可食用的传递介质可包括成颗粒状的可食用载体。可食用的传递介质可以是小球、丸、片形和类似形状。可食用的载体可包括:谷物种子、干草、紫花苜蓿、梯牧草、豆壳、向日葵种子粉和小麦粉。可食用的载体可包括榨干油的谷物种子。肌醇六磷酸酶可包括以下序列的至少 30 个连续的氨基酸:发明的序列,或由具有发明序列的核酸编码的多肽,或具有 SEQ ED NO:2 所示序列的多肽。肌醇六磷酸酶可以是糖基化的以在各种条件下提供耐热性或热稳定性,如造球作业条件。通过造球作业含谷物种子和肌醇六磷酸酶的混合物产生颗粒可以形成传递介质。小球可以在包括使用蒸气的条件下制造。小球可以在包括应用超过 80°C 大约 5 分钟的条件制造。小球可以含有比活性为至少 350 至大约 900 单位每毫克酶的肌醇六磷酸酶。

[0095] [0089] 发明提供了提高肌醇六磷酸酶多肽对动物消化系统中的酶灭活作用耐受性的方法,该方法包括使肌醇六磷酸酶多肽糖基化,其中肌醇六磷酸酶包括以下序列的至少 30 个连续的氨基酸:发明的序列,或由具有发明序列的核酸编码的多肽,或具有 SEQ ED NO:2 所示序列的多肽,从而提高肌醇六磷酸酶多肽对动物消化系统中的酶灭活作用的耐受性。糖基化可以是 N-连接的糖基化和/或 O-连接的糖基化。肌醇六磷酸酶多肽的糖基化可以是体外表达的结果,或体内表达细胞内编码肌醇六磷酸酶的多核苷酸。细胞可以是真核细胞,如真菌细胞、植物细胞。昆虫细胞或哺乳动物细胞。

[0096] 发明提供了产生或提高肌醇六磷酸酶多肽耐热性或热稳定性的方法,该方法包括使肌醇六磷酸酶多肽糖基化,其中肌醇六磷酸酶包括以下序列的至少 30 个连续的氨基酸:发明的序列,或由具有发明序列的核酸编码的多肽,或具有 SEQ ED NO:2 所示序列的多肽,

从而提高肌醇六磷酸酶多肽的耐热性或热稳定性。肌醇六磷酸酶的比活性在超过大约 37℃ 至大约 90℃ 的温度范围内可以是热稳定的或耐热的。

[0097] [0091] 发明提供了加工玉米和高粱粒的方法,包括以下步骤:(a) 提供具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,其中多肽包括发明的氨基酸序列,或由具有发明序列的核酸编码的多肽;(b) 提供包括玉米浸液或高粱浸液的组合物;和(c) 在多肽可以裂解肌醇-无机磷酸盐连接条件下接触步骤(a)的多肽和步骤(b)的组合物。

[0098] [0092] 发明提供了在细胞中过度表达重组的肌醇六磷酸酶的方法,包括表达含发明核酸的载体,如在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO:1 具有至少 98% 序列同一性的核酸序列,其中序列同一性用序列比较运算法则进行分析或通过视觉观察而确定,或者,与 SEQ ID NO:1 所示核酸序列在严格条件下杂交的核酸,或其子序列。过度表达可以被任何方法影响,如使用高活性启动子、双顺反子载体或通过载体的基因扩增。

[0099] [0093] 发明提供了产生具有所需活性的变异体肌醇六磷酸酶的方法,通过获得以下多核苷酸序列的核酸:编码肌醇六磷酸酶的序列,与其实质上相同的序列,与其互补的序列,和至少含有其 30 个连续核苷酸的片段;在所述序列中修改一个或多个核苷酸成为另一个核苷酸,删除所述序列中的一个或多个核苷酸,或在所述序列上添加一个或多个核苷酸。通过这种方法,获得了编码具有所需活性的修饰的肌醇六磷酸酶的变异体多核苷酸,所需活性如提高的热稳定性或耐热性。

[0100] 还在另一个方面,发明提供了给动物投放肌醇六磷酸酶添加剂的方法,通过制备可食用的小球形酶传递基质,含有成颗粒状的可食用的载体和耐热的重组的肌醇六磷酸酶,其中的颗粒稳定地将含有的肌醇六磷酸酶分散进水媒中;和给予动物可食用的酶传递基质。

[0101] [0095] 仍在另一个方面,发明提供了提高肌醇六磷酸酶多肽对动物消化系统中酶灭活作用抵抗性的方法,包括使具有 SEQ ID NO:2 所示序列或其保守性改变的肌醇六磷酸酶多肽糖基化,从而提高肌醇六磷酸酶多肽对动物消化系统中酶灭活作用的耐受性。

[0102] [0096] 在另一个方面,发明提供了应用肌醇六磷酸酶作为动物饮食中营养添加剂的方法,通过制备包括 SEQ ID NO:2 的至少 30 个连续氨基酸的重组的肌醇六磷酸酶的营养添加剂,并给予动物该营养添加剂以增加被动物摄取的食物中含有的肌醇六磷酸的利用度。

[0103] [0097] 仍在另一个方面,发明提供了提高肌醇六磷酸酶多肽耐热性的方法,该方法包括使肌醇六磷酸酶多肽或其保守性变异体糖基化,以便提高肌醇六磷酸酶多肽的耐热性。

[0104] 还在另一个方面,发明提供了热稳定的肌醇六磷酸酶多肽,所述耐热的肌醇六磷酸酶多肽被糖基化,使得同相应的实质上非糖基化的肌醇六磷酸酶多肽相比,在暴露于超过 37℃ 至大约 90℃ 温度范围后肌醇六磷酸酶多肽的比活性增加。

[0105] [0099] 仍在另一个方面,本发明含重组的肌醇六磷酸酶蛋白的饲料组合物和含肌醇六磷酸的食品,该蛋白具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的至少 30 个连续的氨基酸或其保守性变异体。

[0106] [00100] 发明的一个或多个方面的细节在附图中列出并在下面描述。发明的其它特点、目的和优势会从描述和附图以及权利要求中显现。

[0107] [00101] 这里引用的所有公开物、专利、专利申请、GenBank 序列和 ATCC 保管物,均在此全部特别地合并为参考文献。

附图说明

[0108] [00102] 以下绘图是本发明方面的说明,并不限制发明的范围,如权利要求所包括的内容。

[0109] [00103] 图 1A 显示修饰的肌醇六磷酸酶的核苷酸序列 (SEQ IDNO:1)。

[0110] [00104] 图 1B 显示修饰的肌醇六磷酸酶的氨基酸序列 (SEQ IDNO:2)。

[0111] [00105] 图 2A 和 2B 显示本发明肌醇六磷酸酶的 pH 和温度特征及稳定性数据 (SEQ ID NO:2)。700nm 处的 OD 值指示在图 2 曲线的 Y- 轴上。 温度或 pH 指示在曲线的 X- 轴上。

[0112] [00106] 图 3 显示 SEQ ID NO:4(野生型肌醇六磷酸酶)和 SEQIDNO:2(修饰的肌醇六磷酸酶)的耐热性试验结果曲线。曲线显示在有胃蛋白酶的模拟胃肠液 (SGF) 中的残余肌醇六磷酸酶活性。在各种表达宿主中表达的本发明重组的肌醇六磷酸酶 (SEQ ID NO:2),在体外消化的残余活性百分比 (基于初始率) 被按时间绘图。在大肠杆菌 (非糖基化的) 中以及在酿酒酵母和毕赤酵母 (糖基化的) 中表达的肌醇六磷酸酶。

[0113] [00107] 图 4 显示 K12SGF 肌醇六磷酸酶和 SEQ ID NO:2 肌醇六磷酸酶 (非糖基化) 在使用胃蛋白酶模拟胃肠液的模拟消化条件下,残余活性百分比的曲线。

[0114] [00108] 图 5 是实验数据表,用来测定大肠杆菌、毕赤酵母和酿酒酵母的肌醇六磷酸酶在暴露于作为模拟胃肠液的胃蛋白酶后的相对半衰期。

[0115] [00109] 图 6 呈现肌醇六磷酸酶的氨基酸序列,预期的糖基化位点为粗体。

[0116] [00110] 图 7 呈现的表格结果获取自 0- 糖苷酶和 Endo H 消化的毕赤酵母和酿酒酵母肌醇六磷酸酶蛋白在 12% Tris- 氨基乙酸凝胶上的分析。

[0117] [00111] 图 8A 呈现描述最大肽图谱步骤的示意图。

[0118] [00112] 图 8B 呈现描述糖基化肽图谱的示意图。

[0119] [00113] 图 9A 呈现毕赤酵母中表达的 SEQ ID NO:2 肌醇六磷酸酶氨基酸序列,其糖基化残基如在试验测定的 SEQ ID NO:4 的部分序列中以粗体所示。

[0120] [00114] 图 9B 呈现酿酒酵母中表达的 SEQ ID NO:2 肌醇六磷酸酶氨基酸序列,其糖基化残基如在试验测定的 SEQ ID NO:4 的部分序列中以粗体所示。

[0121] [00115] 图 10 呈现图 9A 和 9B 的具有 SEQ ID NO:4 部分序列的肌醇六磷酸酶糖基化图谱的总结果。

[0122] [00116] 图 11 显示各种宿主细胞表达的修饰的肌醇六磷酸酶 (SEQ IDNO:2) 耐热性试验结果的曲线。

[0123] [00117] 图 12 是显示 SEQ ID NO:2 肌醇六磷酸酶在使用有胃蛋白酶的 模拟胃肠液 (SGF) 中进行体外消化试验的残余活性曲线。显示在大肠杆菌 (非糖基化) 以及毕赤酵母和酿酒酵母 (糖基化) 中表达的残余活性百分比 (基于初始率)。

[0124] [00118] 图 13 显示编码野生型大肠杆菌 appA 肌醇六磷酸酶 (SEQ IDNO:3) 的核苷酸序列。

[0125] [00119] 图 14 显示野生型大肠杆菌 appA 肌醇六磷酸酶多肽 (SEQ IDNO:4) 的氨

基酸序列。

[0126] [00120] 图 15 是计算机系统框图,如下面详细描述。

[0127] [00121] 图 16 是图解程序 200 的一个方面的流程图,将新的核苷酸或蛋白序列与数据库序列进行比较以确定新序列和数据库序列间的同源性水平,如下面详细描述。

[0128] [00122] 图 17 是图解计算机程序的一个实施例的流程图,以检测两个序列是否同源,如下面详细描述。

[0129] [00123] 图 18 是图解标示符程序一个方面的流程图,以探测序列中存在某种特征,如下面详细描述。

具体实施方式

[0130] [00124] 本发明涉及肌醇六磷酸酶多肽(如,SEQ ID NO:2)及编码这些肌醇六磷酸酶多肽的多核苷酸(如,SEQ ID NO:1)以及使用该多核苷酸和多肽的方法。术语“肌醇六磷酸酶”包括具有任何肌醇六磷酸酶活性的酶,例如,能够催化肌醇六磷酸盐降解的酶,如,催化肌醇六磷酸盐(肌-肌醇-六磷酸盐)转化为肌醇和无机磷酸盐的作用。本发明的肌醇六磷酸酶包括耐热和抗热的酶。

[0131] [00125] 本发明的肌醇六磷酸酶和编码该肌醇六磷酸酶的多核苷酸被用于许多加工、方法和组合物中。例如,如上讨论的,肌醇六磷酸酶可被用在动物饲料、饲料添加剂以及从环境或标本中降解或去除过量肌醇六磷酸盐的处理中。其它的应用根据这里提供的指导,以及上面的讨论,对于本领域技术人员是显见的。

[0132] [00126] 一方面,本发明的肌醇六磷酸酶分子,单独地或与其它试剂(包括但不限于酶,包括蛋白酶)结合,可被用在如食品加工中以防止不需要的玉米残渣产生,以及用在其它需要水解肌醇六磷酸盐的地方。一方面,本发明的肌醇六磷酸酶分子被用来消除或减少未水解肌醇六磷酸盐,特别是未水解的肌醇六磷酸盐在离体加工,包括但不限于食品加工中,导致问题性后果时。一方面,本发明的肌醇六磷酸酶分子被用在EP0321004-B1(Vaara等人)描述的方法中,包括在玉米和高粱粒加工步骤中,其中硬仁被浸在水中以使其软化。在此过程中滤出的水溶性物质成为玉米浸液的一部分,通过蒸发被浓缩。玉米浸液中的未水解肌醇六磷酸与磷结合并堆积成含有蛋白和金属离子的无用的残渣,主要地以钙和镁盐形式存在,。此残渣在玉米浸液的蒸发、运输和贮藏中是有问题的。本发明的肌醇六磷酸酶分子被用来水解此残渣。

[0133] [00127] 本发明的肌醇六磷酸酶分子的工业性能实质上好于以前鉴定的肌醇六磷酸酶分子,如真菌来源的肌醇六磷酸酶分子。

[0134] [00128] 本发明的酶的肌醇六磷酸酶活性大约是 4400U/mg。这相当于以前报道的微生物酶活性的 40 倍或更高,后者的活性大约在 50-100U/mg 蛋白范围内。

[0135] [00129] 本发明还提供了通过诱变和其它方法改变本发明的肌醇六磷酸酶特征的方法,包括定向的进化,如 Diversa 公司专利的方法(如 DirectEvolution™)。这些方法在美国专利 No. 5,830,696 中被进一步详细描述。简言之,DirectEvolution™ 包括:a) 应用一个或多个分子模板如,本发明的肌醇六磷酸酶核酸,进行诱变以产生新的分子,和 b) 在这些新分子子代种中选择具有更多的所需要的特征子代种。

[0136] [00130] 定向进化的动力依赖于起始模板的初始选择(如 SEQ IDNO:1),以及依

赖于所选择的诱变过程和所用的筛选过程。所以,本发明提供的新的肌醇六磷酸酶活性更高、生理学上更有效和来源更经济,包括新颖的肌醇六磷酸酶:a) 在一个或多个特殊的应用中具有较高的活性,如食品的高温生产,因此可用于使这些特殊的应用最优化;b) 被用作定向进化的模板以获得更进一步改善的新分子;和 c) 被用作鉴定其他的相关分子的工具,如通过以杂交为基础的方法。

[0137] 定义

[0138] [00131] 术语“抗体”包括来自、模仿或实质上由一个免疫球蛋白基因或多个免疫球蛋白基因编码的一种肽或多肽或其片段,能够特异地结合抗原或抗原决定簇,见,如基础免疫学,(Fundamental Immunology) 第三版,W.E. Paul 主编,Raven Press, N. Y. (1993); Wilson(1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush(1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97。该术语抗体包括保留结合抗原能力的抗原结合部分,即“抗原结合位点”(如片段、亚序列、互补的决定区(CDRs)),包括(i) Fab 片段、由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂ 片段,包括两个通过二硫键在铰链区连接的 Fab 片段的二价片段;(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段,(v) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段(Ward 等人,(1989) Nature 341:544-546);和(vi) 游离的互补决定区(CDR)。根据参考文献单链抗体也包括在术语“抗体”中。

[0139] [00132] 如这里所用的术语“阵列”或“微阵列”或“生物芯片”或“芯片”是众多的靶单元,每一个靶单元包括固定在限定的底物表面区上的限定量的一个或多个多肽(包括抗体)或核酸,如下面进一步详细讨论的。

[0140] [00133] 如这里所用的,术语“计算机”、“计算机程序”和“处理器”使用的是其广泛的一般概念并合并所有这种装置,如下面详细描述。

[0141] [00134] “编码序列”或“序列编码”一条特定多肽或蛋白指的是当置于适当的调控序列控制之下时,被转录和被翻译成多肽或蛋白的核酸序列。

[0142] [00135] 如这里所用的术语“表达基因盒”是指能够影响结构基因(即,蛋白编码序列,如本发明的肌醇六磷酸酶)在适合该序列的宿主中表达的核苷酸序列。表达基因盒至少包括可操作地与多肽编码序列连接的启动子;和可选择地,具有其它序列,如转录终止信号。影响表达的其它必要或有用的因子也可以使用,如增强子。如这里所用的“可操作地连接”是指启动子连接在 DNA 序列上游,以便于启动子介导 DNA 序列的转录。因而,表达基因盒还包括质粒、表达载体、重组体病毒、任何形式的重组体“裸 DNA”载体,和类似物。“载体”含有能够感染、转染、暂时地或持久地转导细胞的核酸。应当认识到,载体可以是裸核酸、或与蛋白或脂质结合的核酸。载体任选地包含病毒或细菌核酸和/或蛋白,和/或膜(如细胞膜、病毒脂质包膜,等)。载体包括但不限于复制子(如 RNA 复制子,细菌噬菌体),其上可连接 DNA 片段并使其成为可复制的。因此载体包括但不限于 RNA、自发自我复制的环形或线形 DNA 或 RNA(如质粒、病毒,和类似物,见,如,美国专利 No. 5, 217, 879),并包括表达和非表达质粒。在重组体微生物或细胞培养被描述接受“表达载体”的情况下,它包括染色体外的环形和线形 DNA 以及已并入宿主染色体的 DNA。在载体被宿主细胞保存的情况下,该载体可以在有丝分裂期间作为自发的结构被细胞稳定地复制,或者被并入宿主基因组中。

[0143] [00136] 如这里所用的短语“核酸”或“核酸序列”是指寡核苷酸、核苷酸、多

核苷酸或它们的任何片段,指基因组或合成来源的 DNA 或 RNA (如 mRNA、rRNA、tRNA),它们可以是单链或双链的并可表现为正义或反义链,指天然或合成来源的肽核酸 (PNA) 或任何 DNA 样或 RNA 样的物质,包括如 iRNA、核蛋白 (如 iRNPs)。该术语涵盖含有已知天然核苷酸类似物的核酸,即寡核苷酸。该术语也包含具有合成主链的核酸样结构,见如, Mata(1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144 :189-197 ;Strauss-Soukup(1997) Biochemistry 36 : 8692-8698 ;Samstag(1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6 :153-156。

[0144] [00137] 如这里所用的“氨基酸”或“氨基酸序列”是指寡肽、肽、多肽或蛋白序列,或指它们中任何的片段、部分或亚单位,以及指天然存在的或合成的分子。

[0145] [00138] 如这里所用的,术语“分离的”是指离开其来源环境(如,天然环境,假如它是天然存在的)的物质。例如,存在于活动物中的天然存在的多核苷酸或多肽不是分离的,但从天然系统中一些或所有共存物质中分离的同样的多核苷酸或多肽是分离的。这种多核苷酸可以是载体的一部分,和/或这种多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分,它们仍然是分离的,因为这种载体或组合物不是其天然环境的一部分。如这里所用的,分离的物质或组合物也可以是“纯化的”组合物,即,它不需要绝对的纯度;相反,而是要作为相对的定义。从文库中获得的独立核酸可以被常规地纯化以得到电泳均一性。在另一方面,本发明提供了已经从基因组 DNA 或文库中其它序列或其它环境中以至少一个、两个、三个、四个、五个或更多个数量级被纯化的核酸。

[0146] [00139] 如这里所用的,术语“重组体”是指核酸邻近在其天然环境中并不邻近的“主链”核酸,一方面,在总体核酸“主链分子”中,核酸呈现 5%或更多数量的核酸插入物。按照本发明,“主链分子”包括核酸如表达载体,自我复制核酸,病毒,整合的核酸,和用于维持或操控目的核酸插入物的其它载体或核酸。一方面,富集的核酸在重组体主链分子总体中呈现 15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多数量的核酸插入物。“重组体”多肽或蛋白是指通过重组 DNA 技术产生的多肽或蛋白;如,从用编码所需多肽或蛋白的外源 DNA 构建物转化的细胞中产生。“合成的”多肽或蛋白是通过化学合成制备的,如下面进一步详细描述。

[0147] [00140] 当在启动子上启动转录的 RNA 聚合酶要转录编码序列成为 mRNA 时,启动子序列“可操作地连接”编码序列,如下面进一步讨论的。

[0148] [00141] “寡核苷酸”是指单链的聚脱氧核苷酸或两个互补的聚脱氧核苷酸链,它们可以是化学合成的。这种合成的寡核苷酸没有 5' 磷酸盐,因而不在于激酶存在情况下用 ATP 添加磷酸盐就不会与另一个寡核苷酸连接。合成的寡核苷酸会连接到没有被脱磷酸化的片段上。

[0149] [00142] 在上下文中的两个核酸或多肽中所使用的短语“实质上一致的”,是指当最大一致性被比较和被排列时,两个或更多序列具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或 99%的核苷酸或氨基酸残基(序列)同一性,如下面详细讨论的,使用一个任何已知的序列比较算法测定,或通过观察检测。另一方面,在至少大约 100 个残基、150 个残基、200 个残基、300 个残基、400 个残基或从大约 50 个残基至全长核酸或多肽范围内,本发明提供了与本发明的实例的序列如 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2,具有实质上同一性的核酸和多肽序列。本发明的核酸序列可以在多肽编码区的整个长度范围内是实质上一致的。

[0150] [00143] 此外, “实质上一致的”氨基酸序列是通过一个或多个保守的或非保守的氨基酸取代、删除或插入而不同于参考序列的序列,特别是当这种取代发生在不是分子活性位点的位点上,并假使多肽基本地保留其功能特性时。保守的氨基酸取代,例如取代一个氨基酸为另一个同族的氨基酸(如,取代一个疏水的氨基酸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸为另一个,或取代一个极性氨基酸为另一个,如取代精氨酸为赖氨酸、谷氨酸为天冬氨酸或谷氨酸为天门冬氨酸)。例如,可以从肌醇六磷酸酶多肽中删除一个或多个氨基酸,导致多肽结构的修饰而不显著地改变其生物学活性。例如,可以去除对肌醇六磷酸酶生物学活性是不需要的氨基-或羧基-末端氨基酸。本发明修饰的多肽序列可以通过许多方法检测肌醇六磷酸酶生物学活性,包括将修饰的多肽序列与肌醇六磷酸酶底物接触,并检测修饰的多肽是否减少测定中特异底物的量或增加功能性肌醇六磷酸酶与底物的酶反应的生物产物,如下面进一步讨论的。

[0151] [00144] “杂交”是指核酸链经碱基配对与互补链结合的过程。杂交反应可以是灵敏的和选择性的,以便于即使在其低浓度存在的标本中可以鉴定特定的目的序列。适合的严格条件可以通过以下条件限定,例如,预杂交和杂交溶液中盐或甲酰胺的浓度,或杂交温度,是本领域所熟知的。例如,通过降低盐浓度、增加甲酰胺浓度或升高杂交温度、改变杂交时间而提高严格度,如下面详细描述。另一方面,本发明的核酸通过其在各种严格条件下(如,高、中和低)的杂交能力而限定,如这里列出的。

[0152] [00145] 术语“变异体”是指在一个或多个碱基对、密码子、内含子、外显子或氨基酸残基上(分别地)被修饰,但仍保留本发明的肌醇六磷酸酶生物学活性的本发明多核苷酸或多肽。变异体可以通过许多方法产生包括,例如,易错 PCR、改组、寡核苷酸-定向诱变、集合 PCR、有性的 PCR 诱变、体内诱变、盒式诱变、递归整体诱变、指数整体诱变、位点-特异诱变、基因重新组装、GSSM 及其任意组合。产生变异体肌醇六磷酸酶的技术包括在此,例如该酶具有活性的 pH 或温度不同于野生型肌醇六磷酸酶。

[0153] [00146] 术语“饱和诱变”或“GSSM”包括使用变性的寡核苷酸引物在多核苷酸中导入点突变的方法,如下面详细描述。

[0154] [00147] 术语“使定向的进化系统最优化”或“使定向的进化最优化”包括重新组装相关核酸序列片段,如相关基因,的方法,在下面详细解释。

[0155] [00148] 术语“合成的连接重新组装”或“SLR”包括以非随机方式连接寡核苷酸片段的方法,在下面详细解释。

[0156] [00149] 如这里所用的短语“核酸”或“核酸序列”是指寡核苷酸、核苷酸、多核苷酸或它们的任何片段,指基因组或合成来源的 DNA 或 RNA,它们可以是单链或双链的并可表现为正义或反义链,指天然或合成来源的肽核酸(PNA)或任何 DNA 样或 RNA 样的物质。一方面,本发明的“核酸序列”包括,例如编码 SEQ ID NO:2 所示的多肽及其变异体的序列。另一方面,本发明的“核酸序列”包括,例如,SEQ ID NO:1 所示的序列、与其互补的序列、前体序列及其变异体的片段。

[0157] [00150] “编码序列”或“核苷酸序列编码”特定多肽或蛋白是指当置于适当调控序列控制之下时,被转录和被翻译成多肽或蛋白的核酸序列。

[0158] [00151] 术语“基因”是指涉及产生多肽链的 DNA 片段;它包括前导区和后面的编码区(引导区和非转录尾区),以及在应用的情况下,单个编码片段(外显子)之间的插

入序列（内含子）。

[0159] [00152] 如这里所用的“氨基酸”或“氨基酸序列”是指寡肽、肽、多肽或蛋白序列，或指它们中任何的片段、部分或亚单位，以及指天然存在的或合成的分子。一方面，本发明的“氨基酸序列”或“多肽序列”包括例如 SEQ ID NO :2 所示的序列、前体序列的片段及其变异体。另一方面，本发明的“氨基酸序列”包括，例如，由具有 SEQ ID NO :1 所示序列的多核苷酸编码的序列、与其互补的序列、前体序列的片段及其变异体。

[0160] [00153] 如这里所用的术语“多肽”，是指氨基酸通过肽键或修饰的肽键相互连接，即，肽等排体，可含有除 20 个基因编码的氨基酸以外的修饰的氨基酸。多肽可以通过天然加工如翻译后加工，或本领域熟知的化学修饰技术而被修饰。修饰可以发生在多肽的任何地方，包括肽主链、氨基酸侧链和氨或羧基末端。可以理解，相同类型的修饰可以相同或不同程度地出现在指定多肽的几个位点上。此外，指定的多肽可有许多类型的修饰。修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、核黄素的共价附着、亚铁血红素部分的共价附着、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附着、脂质或脂质衍生物的共价附着、磷脂酰肌醇的共价附着、交叉连接的环化作用、二硫键形成、脱甲基、共价交叉连接的形成、半胱氨酸形成、焦谷氨酸盐形成、甲酰化、 γ -羧基化、糖基化、GPI 锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻化、氧化、pegylation、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋作用、selenoylation、硫酸盐化和转运 -RNA 介导的添加氨基酸到蛋白上如精氨酸化。（见蛋白——结构和分子特性第二版，T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993)；蛋白的翻译后共价修饰，(Posttranslation Covalent Modification of Protein) B. C. Johnson, 主编，Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983)）。

[0161] [00154] 如这里所用的，术语“分离的”是指离开其来源环境（如，天然环境，假如它是天然存在的）的物质。例如，存在于活动物中的天然存在的多核苷酸或多肽不是分离的，但从天然系统中一些或所有共存物质中分离的同样的多核苷酸或多肽是分离的。这种多核苷酸可以是载体的一部分，和 / 或这种多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分，它们仍然是分离的，因为这种载体或组合物不是其天然环境的一部分。

[0162] [00155] 如这里所用的，术语“纯化”不需要绝对的纯度；相反而是要作为相对的定义。从文库中获得的独立核酸可以常规地被纯化以得到电泳均一性。从这些克隆获得的序列不能直接地从文库或人类总 DNA 中获得。本发明的纯化核酸在生物体中已经从残余的基因组 DNA 中被纯化至少 10^4 - 10^6 倍。但是，术语“纯化”还包括已经从残余基因组 DNA 或文库中的其它序列或其它环境中被纯化的核酸，至少纯化一个数量级，典型地两或三个数量级，更典型地四或五个数量级。

[0163] [00156] 如这里所用的，术语“重组体”是指核酸邻近在其天然环境中并不邻近的“主链”核酸。此外，要“富集的核酸在核酸主链分子总体中呈现 5% 或更多数量的核酸插入物。按照本发明，主链分子包括，核酸如表达载体，自我复制核酸，病毒，整合的核酸，和用于维持或操控目的核酸插入物的其它载体或核酸。典型地，富集的核酸在重组体主链分子总体中呈现 15% 或更多数量的核酸插入物。更典型地，富集的核酸在重组体主链分子总体中呈现 50% 或更多数量的核酸插入物。一方面，富集的核酸在重组体主链分子总体中呈现 90% 或更多数量的核酸插入物。

[0164] [00157] “重组体”多肽或蛋白是指通过重组 DNA 技术产生的多肽或蛋白；也

就是,从用编码所需多肽或蛋白的外源 DNA 构建物转化的细胞中产生。”合成的”多肽或蛋白是通过化学合成制备的。固相化学肽合成方法也可用于合成本发明的多肽或片段。这种方法已经自 1960 年代早期为本领域所知 (Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963) (也见 Stewart, J. M. 和 Young, J. D., 固相肽合成, (Solid Phase Peptide Synthesis) 第二版. Pierce Chemical Co., Rockford, III., pp. 11-12)), 且最近已被用在可从商业渠道获得的实验室肽设计和合成试剂盒中 (Cambridge Research Biochemicals)。这种可从商业渠道获得的实验室试剂盒已普遍地应用 H. M. Geysen 等人的指导中, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3998 (1984), 并在全部连接在单板上的许多”棒”或”插针”的顶端提供肽的合成。当应用这种系统时,棒或插针板被倒转并插入含有溶液的第二个板的相应孔或池中以附着或锚着适当的氨基酸到棒或针顶上。通过重复此处理步骤,即倒转和插入棒和针顶到适当的溶液中,氨基酸被构成所需的肽。另外,许多可获得的 Fmoc 肽合成系统是可用的。例如,多肽或片段可以在固体支持物上使用 Applied Biosystems, Inc. Model 431A 型自动肽合成仪进行组装。这种设备提供了本发明肽的简便通路,通过直接合成或通过合成一系列可以使用其它已知技术连结的片段。

[0165] [00158] 当在启动子上启动转录的 RNA 聚合酶要转录编码序列为 mRNA 时,启动子序列”可操作地连接”编码序列。

[0166] [00159] ”质粒”通过前面的小写字母 p 和 / 或后接大写字母和 / 或数字来命名。这里的起始质粒可从商业渠道在无限制的基础上公开地获得,或者可以按照公布的方法从可获得的质粒构建。另外,与这里描述的质粒相当的质粒是本领域已知的,对普通技术人员会是显见的。

[0167] [00160] DNA 的”消化”是指用仅在 DNA 的某个序列上起作用的限制性酶催化裂解 DNA。这里所用的各种限制性酶可从商业渠道获得,其反应条件、辅因子和其它必要条件如普通技术人员已知的那样使用。为了分析,典型地在大约 20 μ l 缓冲溶液中使用 1 μ g 质粒或 DNA 片段与大约 2 单位酶。为分离 DNA 片段以构建质粒,典型地在较大容积中用 20 至 250 单位的酶消化 5 至 50 μ g DNA。特定限制性酶适合的缓冲液和底物量是生产者设定的。通常在 37°C 使用大约 1 小时的孵育时间,但可按照厂商的使用说明书改变。消化后可进行凝胶电泳以分离所需的片段。

[0168] [00161] ”寡核苷酸”是指单链的聚脱氧核苷酸或两个互补的聚脱氧核苷酸链,它们可以是化学合成的。这种合成的寡核苷酸没有 5' 磷酸盐,因而不在于激酶存在情况下用 ATP 添加磷酸盐就不会与另一个寡核苷酸连接。合成的寡核苷酸会连接到没有被脱磷酸化的片段上。

[0169] [00162] 在两个核酸序列或多肽的上下文中,短语”实质上一致的”是指当最大一致性比较和排列时,两个或更多序列具有至少 60%、70%、80%,在某些方面 90-95% 的核苷酸或氨基酸残基同一性,如使用一个任何已知的序列比较算法所测定的,或通过视觉观察。典型地,实质上同一性存在于至少大约 100 个残基范围内,更常见地,序列在至少大约 150-200 个残基范围内实质上一致。在某些方面,序列在编码区的整个长度范围内是实质上一致的。

[0170] [00163] 这里所用的术语”大约”是指”大约”或”粗略地”或”周围”或”范围内”。当术语”大约”与数字范围联合使用时,它通过延伸所列数值的上下界限而修改

范围。一般地,这里用术语“大约”来规定所述值上下 20%变异量的数值。

[0171] [00164] 此外,“实质上一致的”氨基酸序列是通过一个或多个保守的或非保守的氨基酸取代、删除或插入而不同于参考序列的序列,特别是当这种取代发生在不是分子活性位点的位点上并假使多肽基本地保留其功能特性时。保守的氨基酸取代,例如取代一个氨基酸为另一个同族的氨基酸(如,取代一个疏水的氨基酸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸为另一个,或取代一个极性氨基酸为另一个,如取代精氨酸为赖氨酸、谷氨酸为天冬氨酸或谷氨酰胺为天冬酰胺)。例如,可以从肌醇六磷酸酶多肽中删除一个或多个氨基酸,导致多肽结构被修饰而不显著地改变其生物学活性。例如,可以去除对肌醇六磷酸酶生物学活性是不需要的氨-或羧基-末端氨基酸。修饰的本发明多肽序列可以通过许多方法检测肌醇六磷酸酶生物学活性,包括将修饰的多肽序列与肌醇六磷酸酶底物接触,并检测修饰的多肽是否减少检验中特异底物的量或增加功能性肌醇六磷酸酶与底物的酶反应的生物产物。

[0172] [00165] 如这里所用的“片段”是能够以至少两个不同构象存在的天然存在的或重组蛋白的一部分。片段可以同天然存在的蛋白具有相同的或实质上相同的氨基酸序列。“实质上相同”是指氨基酸序列主要地但不是完全地相同,而保留了序列的至少一个相关的功能活性。一般地,如果两个氨基酸序列至少大约 70%、但更典型地大约 85%或以上一致,它们是“实质上相同的”或“实质上类似的”。也包括与天然存在的蛋白具有不同三维结构的片段。其一个实例是“原型”分子,如低活性蛋白原,它可以通过裂解被修饰而产生具有显著高活性的成熟酶。

[0173] [00166] “杂交”是指核酸链经碱基配对与互补链结合的过程。杂交反应可以是灵敏的和选择性的,使得即使在其低浓度存在的标本中可以鉴定特定的目的序列。适合的严格条件可以通过以下条件限定,例如,预杂交和杂交溶液中盐或甲酰胺的浓度,或杂交温度,是本领域所熟知的。特别地,通过降低盐浓度、增加甲酰胺浓度或升高杂交温度可以提高严格度。

[0174] [00167] 例如,高度严格条件下的杂交可发生在大约 50%甲酰胺约 37℃至 42℃中。减低严格条件下的杂交可发生在大约 35%至 25%甲酰胺约 30℃至 35℃中。特别地,杂交可发生在如下高度严格条件下:42℃,在 50%甲酰胺、5X SSPE、0.3% SDS 和 200ng/ml 剪切和变性的鲑精 DNA 中。杂交可发生在如上描述的减低的严格条件下,但是在 35%甲酰胺中减低温度为 35℃。相应于特定严格水平的温度范围可以进一步通过计算目的核酸的嘌呤/嘧啶比而缩小,并相应地调节温度。上述范围和条件的变化是本领域熟知的。

[0175] [00168] 术语“变异体”是指在一个或多个碱基对、密码子、内含子、外显子或氨基酸残基上(分别地)被修饰,但仍保留本发明的肌醇六磷酸酶生物学活性的本发明多核苷酸或多肽。变异体可以通过许多方法产生包括,例如,易错 PCR、改组、寡核苷酸-定向诱变、集合 PCR、有性的 PCR 诱变、体内诱变、盒式诱变、递归整体诱变、指数整体诱变、位点-特异的诱变、连接重新组装、GSSM 及其任何的组合。

[0176] 如这里所用的术语“热稳定的”和“热稳定性”就酶而言是指酶在升高的温度下发挥功能的能力,例如在 70℃和 85℃普通 pH 下具有类似的比活性。“热稳定的”酶在升高的温度下会保持其多数或所有的活性,或可在升高的温度下比其正常温度(如室温)或诱变前的最适温度下活性更高,以获得提高的热稳定性。

[0177] [00170] 如这里所用的术语“耐热的”和“耐热性”就酶而言是指酶在暴露于高温后正常发挥功能的能力,尽管高温可暂时地使酶失活。

[0178] 核酸的产生和操作

[0179] [00171] 本发明提供了核酸,包括表达基因盒如编码本发明多肽和肌醇六磷酸酶的表达载体。本发明还包括使用本发明的核酸发现新肌醇六磷酸酶序列的方法。也提供了用于修饰本发明核酸的方法,如通过合成的连接重新组装、使定向的进化系统最优化和/或饱和诱变。

[0180] [00172] 本发明的核酸可以通过以下方法制备、分离和/或操控,如 cDNA 文库的克隆和表达,信使或基因组 DNA 通过 PCR 的扩增,和类似方法。在实施本发明的方法中,同源基因可以通过操控模板核酸而被修饰,如这里描述的。本发明可以与任何本领域已知的方法或方案或装置联合一起实施,它们在学术和专利文献中被很好地描述。

[0181] 一般技术

[0182] [00173] 用于实施本发明的核酸,无论是 RNA、iRNA、反义核酸、cDNA、基因组 DNA、载体、病毒或其杂交物,可以从多种来源被分离得到,基因工程的、扩增的、和/或重组表达/产生的。从这些核酸产生的重组体多肽可以是单独地被分离或被克隆,并检测所需的活性。可以使用任何重组体表达系统,包括细菌、哺乳动物、酵母、昆虫或植物细胞表达系统。

[0183] [00174] 另一方面,这些核酸可以通过熟知的化学合成技术在体外合成,如以下文献中描述的:如,Adams(1983)J. Am. Chem. Soc. 105:661;Belousov(1997)Nucleic Acids Res. 25:3440-3444;Frenkel(1995)FreeRadic. Biol. Med. 19:373-380;Blommers(1994)Biochemistry33:7886-7896;Narang(1979)Meth. Enzymol. 68:90;Brown(1979)Meth. Enzymol. 68:109;Beaucage(1981)Tetra. Lett. 22:1859;美国专利 No. 4,458,066。

[0184] [00175] 操控核酸的技术,如亚克隆、标记探针(如,使用 Klenow 聚合酶标记随机引物、缺口翻译、扩增)、测序、杂交和类似技术在学术和专利文献中被很好地描述,见,如,Sambrook 主编,分子克隆(MOLECULAR CLONING:a LABORATORY MANUAL):实验室手册(第二版),Vols.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory,(1989);分子生物学现代方法,(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)Ausubel 主编,John Wiley & Sons, Inc., New York(1997);生物化学和分子生物学实验室技术(LABORATORY TECHNIQUES INBIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY:HYBRIDIZATIONWITH NUCLEIC ACID PROBES):用核酸探针杂交,第一部分.理论和核酸制备(Theory and Nucleic Acid Preparation),Tijssen 主编,Elsevier, N.Y. (1993)。

[0185] [00176] 另一个用于实施本发明方法的获得和操控核酸的有用方法是从基因组标本中克隆,并且如果需要,筛选和再克隆从如基因组克隆或 cDNA 克隆中分离或扩增的插入物。本发明方法中使用的核酸源包括在以下物质中含有的基因组或 cDNA 文库:如,哺乳动物人工染色体(MACs)见如美国专利 No. 5,721,118;6,025,155;人类人工染色体见如 Rosenfeld(1997)Nat. Genet. 15:333-335;酵母人工染色体(YAC);细菌人工染色体(BAC);P1 人工染色体见如 Woon(1998)Genomics50:306-316;P1-来源的载体(PACs)见如, Kern(1997)Biotechniques23:120-124;粘粒,重组体病毒,噬菌体或质粒。

[0186] [00177] 一方面,编码本发明多肽的核酸是在适当的状态下用能够引导分泌翻译多肽或其片段的引导区序列装配的。

[0187] [00178] 本发明提供了融合蛋白及编码融合蛋白核酸。本发明的多肽可以与异种的肽或多肽融合,如给予所需特征的 N- 末端鉴定肽,所需特征如稳定性提高或使纯化作用简化。本发明的肽和多肽也可以与一个或多个另外结构域连接作为融合蛋白被合成和表达,例如以产生更具免疫原性的肽,以便更稳定地分离重组地合成的肽、鉴定和分离抗体及表达抗体的 B 细胞,等。帮助检测和纯化的结构域包括如,使纯化在固定的金属上进行的整合金属的肽如聚组氨酸区域和组氨酸-色氨酸组件,使纯化在固定的免疫球蛋白上进行的蛋白 A 结构域,和在 FLAGS 延伸 / 亲和纯化系统 (Immunex Corp, Seattle WA) 中使用的结构域。在纯化结构域和含基序的肽或多肽之间包含可裂解的连接子序列如 Xa 因子或肠激酶 (Invitrogen, San Diego CA) 以促进纯化。例如,表达载体可包括编码抗原决定簇的核酸序列,与 6 个组氨酸残基连接,后接硫氧还蛋白和肠激酶裂解位点 (见如, Williams (1995) Biochemistry 34 :1787-1797 ;Dobeli (1998) Protein Expr. Purif. 12 :404-414)。组氨酸残基促进检测和纯化而肠激酶裂解位点提供了从残余的融合蛋白中纯化抗原决定簇的手段。与编码融合蛋白的载体及应用融合蛋白有关的技术在学术和专利文献中被很好地描述,见如, Kroll (1993) DNA Cell. Biol. , 12 :441-53。

[0188] 转录和翻译调控序列

[0189] [00179] 本发明提供了可操作地连接到表达 (如转录或翻译) 调控序列如启动子或增强子上的本发明的核酸 (如 DNA) 序列,以引导或调节 RNA 合成 / 表达。表达调控序列可以在表达载体中。实例的细菌启动子包括 lacI、lacZ、T3、T7、gpt、λ PR、PL 和 trp。实例的真核细胞启动子包括 CMV 直接早期、HSV 胸苷激酶、早期和晚期 SV40、来自逆转录病毒的 LTRs 和小鼠金属硫蛋白 I。

[0190] [00180] 适于在细菌中表达或过度表达多肽的启动子包括大肠杆菌 (E. coli) lac 或 trp 启动子、lacI 启动子、lacZ 启动子、T3 启动子、T7 启动子、gpt 启动子、λ PR 启动子、λ PL 启动子、来自编码糖解酶如 3- 磷酸甘油酸酯激酶 (PGK) 的操纵子的启动子和酸性磷酸酶启动子。真核细胞启动子包括 CMV 直接早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、热休克启动子、早期和晚期 SV40 启动子、来自逆转录病毒的 LTRs 和小鼠金属硫蛋白 I 启动子。也可以使用其它已知的控制基因在原核细胞或真核细胞中表达的启动子或其病毒。

[0191] 表达载体和克隆运载工具

[0192] [00181] 本发明提供了含本发明核酸的表达载体和克隆媒介物,如编码本发明的肌醇六磷酸酶的序列,,以表达和过度表达本发明多肽 (和核酸,如反义核酸)。本发明的表达载体和克隆运载工具可包括病毒颗粒、杆状病毒、噬菌体、质粒、phagemids、粘粒、fosmids、细菌性人造染色体、病毒 DNA (如牛痘、腺病毒、禽痘病毒、伪狂犬病和 SV40 衍生物),P1- 为基础的人工染色体、酵母质粒、酵母人工染色体和其它任何对特定目的宿主 (如杆菌、曲霉菌和酵母) 特异的载体。本发明的载体可包括染色体的、非染色体外的和合成的 DNA 序列。大量适合的载体为本领域技术人员已知并可从商业渠道获得。实例的载体包括:细菌的:pQE 载体 (Qiagen),pBluescript 质粒,pNH 载体,(λ -ZAP 载体 (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); 真核细胞的:pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia)。但是,可使用任何其它的质粒或其它的载体,只要它们 是可复制的并在宿主中是有活力的。低拷贝量或高拷贝量载体可与本发明一起使用。

[0193] [00182] 表达载体可包含启动子、翻译起始的核糖体结合位点和转录终止子。载体也可以包含用于扩增表达的适当序列。哺乳动物表达载体可包含复制起始、任何必要的核糖体结合位点、聚腺苷化位点、剪接供体和受体位点、转录终止序列和 5' 侧向非转录序列。在某些方面,来自 SV40 接合和聚腺苷化位点的 DNA 序列可用于提供需要的非转录基因元件。

[0194] [00183] 一方面,表达载体含有一个或多个可选择的标记基因以能够选择含载体的宿主细胞。这种可选择的标记包括编码二氢叶酸还原酶的基因,或赋予对真核细胞培养的新霉素耐受的基因,赋予大肠杆菌对四环素或氨比西林耐受的基因,和酿酒酵母 TRP1 基因。启动子区可选自使用氯霉素转移酶 (CAT) 载体或其它有可选择标记载体所需的任何基因。

[0195] [00184] 在真核细胞中表达多肽或其片段的载体也可含有增强子以提高表达水平。增强子是 DNA 的顺式作用元件,通常的长度从大约 10 至大约 300bp,作用在启动子上以增加其转录。实例包括在复制起始 bp100 至 270 后侧上的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起始后侧上的多瘤病毒增强子和腺病毒增强子。

[0196] [00185] DNA 序列可通过多种方法被插入载体中。一般地, DNA 序列在用适当的限制性核酸内切酶消化插入物和载体后被连接在所需的位置。一方面,插入物和载体中的平端可被连接。多种克隆技术在本领域中是已知的,如 Ausubel 和 Sambrook 所描述的。这种方法和其它方法相信在本领域技术人员知识范围内。

[0197] [00186] 载体的形式可能是质粒、病毒颗粒或噬菌体。其它载体包括染色体、非染色体和合成的 DNA 序列,SV40 衍生物;细菌质粒,噬菌体 DNA,杆状病毒,酵母质粒,来自质粒和噬菌体 DNA 组合的载体,病毒 DNA 如牛痘、腺病毒、禽痘病毒和伪狂犬病。原核细胞和真核细胞宿主使用的多种克隆和表达载体被如 Sambrook 所描述。

[0198] [00187] 可以使用的特殊细菌载体包括可从商业渠道获得的质粒,含有以下熟知的克隆载体基因元件:pBR322(ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, psiX174pBluescript II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3. pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 and pCM7。特殊的真核细胞载体包括 pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, and pSVL (Pharmacia)。但是,可使用任何其它的载体,只要它们是可复制的并在宿主细胞中是有活力的。

[0199] 宿主细胞和转化的细胞

[0200] [00188] 本发明还提供了含本发明核酸序列的转化细胞,编码本发明肌醇六磷酸酶的序列,本发明的载体。宿主细胞可以是本领域技术人员熟悉的任何宿主细胞,包括原核细胞,真核细胞如细菌细胞、真菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞或植物细胞。实例的细菌细胞包括大肠杆菌 (*E. coli*)、链霉菌 (*Streptomyces*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 和在假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌 (*Streptomyces*) 和葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 中的各种种属。实例的昆虫细胞包括果蝇 S2 (*Drosophila S2*) 和 *Spodoptera Sf9*。实例的动物细胞包括 CHO、COS 或鲍文氏黑素瘤或任何小鼠或人类细胞系。适当宿主的选择在本领域技术人员的能力范围内。

[0201] [00189] 可以使用任何的多种技术将载体导入宿主细胞,包括转化、转染、转导、病毒感染、基因枪或 Ti- 介导的基因传递。特殊的方法包括钙磷酸盐转染、DEAE- 葡聚糖介导的转染、脂转染或电穿孔 (Davis, L, Digner, M., Battey, I., 分子生物学基本方法 (Mbasic Methods inMolecular Biology), (1986))。

[0202] [00190] 在适当的情况下,基因工程的宿主细胞可以在常规的营养培养基中培养,培养基被改良以适合激活启动子、选择转化体或扩增本发明的基因。在转化适合的宿主菌株并培养宿主菌株至适当的细胞密度后,可以用适当的方法(如,温度漂移或化学诱导)诱导所选择的启动子,并可另外培养细胞一段时间以使其产生所需的多肽或其片段。

[0203] [00191] 可以通过离心收获细胞,用物理的或化学的方法使之破碎,并保留得到的粗提取液以进一步纯化。可以用任何方便的方法破碎用于表达蛋白的微生物细胞,包括冻融循环、超声波、机械破碎或使用细胞溶解剂。这些方法是本领域技术人员熟知的。表达的多肽或其片段可以从重组体细胞培养物中回收和纯化,采用的方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、亲和层析、羟磷灰石层析和植物血凝素层析。如必要,可以使用蛋白重折叠步骤来完成多肽的构建。如果需要,可以采用高压液相色谱 (HPLC) 作为最终的纯化步骤。

[0204] [00192] 各种哺乳动物细胞培养系统也可以用来表达或过度表达重组蛋白。哺乳动物表达系统的实例包括猴肾纤维母细胞的 COS-7 细胞系,和其它能够从相容的载体中表达蛋白的细胞系,如 C127、3T3、CHO、HeLa 和 BHK 细胞系。

[0205] [00193] 宿主细胞中的构建物可以被用来以常规的方式产生由重组体序列编码的基因产物。根据重组体产生过程中所用的宿主,由含有载体的宿主细胞产生的多肽可以是糖基化的或非糖基化的。本发明的多肽可能包括或也可能不包括初始的蛋氨酸氨基酸残基。

[0206] [00194] 无细胞翻译系统也可以用来产生本发明的多肽。无细胞翻译系统可以使用从 DNA 构建物转录的 mRNAs, DNA 构建物含有可操作地与编码多肽或其片段的核酸连接的启动子,在某些方面, DNA 构建物在进行体外转录反应之前可能是线性化的。然后,转录的 mRNA 与适当的无细胞翻译提取物如兔网织红细胞提取物一起孵育,以产生所需的多肽或其片段。

[0207] [00195] 表达载体可以含有一个或多个可选择的标记基因以提供选择转化的宿主细胞的表现型特征,如真核细胞培养的二氢叶酸还原酶或新霉素耐受性,或大肠杆菌的四环素或氨比西林耐受性。

[0208] 核酸的扩增

[0209] [00196] 在实施本发明中,编码本发明多肽的核酸,或修饰的核酸可以通过如扩增而复制。本发明提供了扩增编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的核酸的扩增引物序列对,其中引物对能够扩增包括实例的 SEQ ID NO:1 的核酸序列或其亚序列。本领域的技术人员之一能够设计这些序列的任何部分或全长的扩增引物序列对;例如:

[0210] [00197] 实例的 SEQ ID NO:1 是

[0211] ATGAAAGCGATCTTAATCCCATTTTTATCTCTTCTGATTCCGTTAAC

[0212] CCCGCAATCTGCATTCGCTCAGAGTGAGCCGGAGCTGAAGCTGG

[0213] AAAGTGTGGTGATTGTCAGTCGTCATGGTGTGCGTGCTCCAACCA

[0214] AGGCCACGCAACTGATGCAGGATGTCACCCCAGACGCATGGCCA
[0215] ACCTGGCCGGTAAAACTGGGTGAGCTGACACCGCGCGGTGGTGA
[0216] GCTAATCGCCTATCTCGGACATTACTGGCGTCAGCGTCTGGTAGC
[0217] CGACGGATTGCTGCCTAAATGTGGCTGCCCGCAGTCTGGTCAGGT
[0218] CGCGATTATTGCTGATGTGACGAGCGTACCCGTAAAAACAGGCGA
[0219] AGCCTTCGCCGCCGGGTGGCACCTGACTGTGCAATAACCGTACA
[0220] TACCCAGGCAGATACGTCCAGTCCCGATCCGTTATTTAATCCTCTA
[0221] AAAACTGGCGTTTGCCAACTGGATAACGCGAACGTGACTGACGC
[0222] GATCCTCGAGAGGGCAGGAGGGTCAATTGCTGACTTTACCGGGC
[0223] ATTATCAAACGGCGTTTCGCGAACTGGAACGGGTGCTTAATTTTC
[0224] CGCAATCAAACCTTGTGCCTTAAACGTGAGAAACAGGACGAAAGC
[0225] TGTTTCATTAACGCAGGCATTACCATCGGAACTCAAGGTGAGCGCC
[0226] GACTGTGTCTCATTAACCGGTGCGGTAAGCCTCGCATCAATGCTG
[0227] ACGGAGATATTTCTCCTGCAACAAGCACAGGGAATGCCGGAGCC
[0228] GGGGTGGGAAGGATCACCGATTACACCAAGTGAACACCTTGC
[0229] TAAGTTTGCATAACGCGCAATTTGATTTGCTACAACGCACGCCAG
[0230] AGGTTGCCCGCAGCCGCGCCACCCCGTTATTAGATTTGATCAAGA
[0231] CAGCGTTGACGCCCCATCCACCGCAAAAACAGGCGTATGGTGTG
[0232] ACATTACCCACTTCAGTGCTGTTTATCGCCGGACACGATACTAATC
[0233] TGGCAAATCTCGGCGGCGCACTGGAGCTCAACTGGACGCTTCCC
[0234] GGTCAGCCGGATAACACGCCGCCAGGTGGTGAACCTGGTGTTTGA
[0235] ACGCTGGCGTCGGCTAAGCGATAACAGCCAGTGGATTCAGGTTT
[0236] CGCTGGTCTTCCAGACTTTACAGCAGATGCGTGATAAAACGCCGC
[0237] TGTCATTAAATACGCCGCCCGGAGAGGTGAACTGACCCTGGCA
[0238] GGATGTGAAGAGCGAAATGCGCAGGGCATGTGTTCGTTGGCAGG
[0239] TTTTACGCAAATCGTGAATGAAGCACGCATACCGGCGTGAGTTT
[0240] GAGATCTCATCTA

[0241] [00198] 因此,实例的扩增引物序列对是 SEQ ID NO:1 的 1 至 21 残基(即,ATGAAAGCGATCTTAATCCCA)和 SEQ ID NO:1 最后 21 个残基的互补链(即,TGCAGTTTGAGATCTCATCTA 的互补链)。

[0242] [00199] 扩增反应也可用于量化标本中核酸的量(如细胞标本中信使的量)、标记核酸(如,在阵列或印迹上应用)、探测核酸或量化标本中特异核酸的量。在本发明的一个方面,从细胞或 cDNA 文库中分离的信使被扩增。专业技术人员能够选择和设计适合的寡核苷酸扩增引物。扩增的方法是本领域熟知的,包括如聚合酶链反应 PCR(见,如,PCR 方案,方法和应用指南,(PCR PROTOCOLS,AGUIDE TOMETHODSAND APPLICATIONS)ed. Innis,Academic Press, N. Y. (1990) 和 PCR 策略 (PCR STRATEGIES) (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N. Y.), 连接酶链反应 (LCR)(见,如 Wu(1989)Genomics 4:560;Landegren(1988)Science 241:1077;Barringer(1990)Gene 89:117);转录扩增(见,如 Kwoh(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173);和自我延续的序列复制(见,如 Guatelli(1990)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874); Q β 复制酶扩增 (见, 如 Smith(1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491), 自动的 Q- β 复制酶扩增试验 (见, 如 Burg(1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271) 和其它 RNA 聚合酶介导的技术 (如, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); 也见 Berger(1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; 美国专利 No. 4,683,195 和 4,683,202; Sooknanan(1995) Biotechnology 13:563-564。

[0243] 检测序列同一性的程度

[0244] [00200] 本发明提供了分离或重组核酸, 含有在至少大约 100 个残基范围内与 SEQ ID NO:1 具有至少 98% 序列同一性的核酸序列, 其中的核酸编码至少一个具有肌醇六磷酸酶活性的多肽, 序列同一性是用序列比较算法进行分析或通过视觉观察而确定的。在具体实施例中, 核酸序列与 SEQ ID NO:1 具有至少 98%、98.5%、99% 或 99.5% 的序列同一性, 在至少大约 50 个残基、100 个残基、150 个残基、200 个残基、250 个残基、300 个残基、350 个残基、400 个残基、450 个残基、500 个残基、550 个残基、600 个残基、700 个残基、800 个残基、900 个残基、1000 个残基、1200 个残基或 1300 个残基范围内。核酸序列可以具有 SEQ ID NO:1 中所列的序列。一方面, 序列同一性 (同源) 的程度可使用任何计算机程序和关联的参数来测定, 包括这里所描述的如 BLAST 2.2.2 或 FASTA 3.0t78 版, 及默认值参数。

[0245] [00201] 类似的序列还包括 RNA 序列, 其核酸序列中尿嘧啶核苷代替了胸腺嘧啶。类似的序列可用这里描述的任何方法获得, 或可来自序列错误的修正。可以理解, 这里列出的核酸序列可表现为传统的单字符格式 (见, 如 Stryer, Lubert. 生物化学 (Biochemistry), 第三版, W. H. Freeman & Co., New York) 或以记录序列中核苷酸同一性的任何其它格式。

[0246] [00202] 这里确定的各种序列比较程序可用于本发明的这一方面。蛋白和 / 或核酸序列的同一性 (同源) 可使用任何本领域已知的各种序列比较算法和程序来评估。这些算法和程序包括但不限于, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, 和 CLUSTALW (Pearson 和 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson 等人, Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins 等人, Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul 等人, Nature Genetics 3:266-272, 1993)。

[0247] [00203] 同源或同一性可以使用序列分析软件检测 (如, 遗传学计算机工作组的序列分析软件包, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705)。这些软件通过对各种删除、取代和其它修饰进行同源程度赋值来匹配相似的序列。在两个或多个核酸或多肽序列上下文中所用术语 "同源" 和 "同一性" 是指当在比较窗或指定区域内进行最大一致性比较和排列时, 两个或更多序列或亚序列是相同的或具有特定百分比的氨基酸残基或核苷酸是相同的, 如使用许多序列比较算法或通过手工排列或视觉观察测定的。对于序列比较, 一条序列可作为与待测序列进行比较的参考序列 (实例的序列 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2)。当使用序列比较算法时, 待测和参考序列被输入计算机, 指定亚序列同等物, 如果必要, 指定序列算法程序参数。可以使用缺省的程序参数, 或可以指定可选择的参数。然后, 序列比较算法根据程序参数计算待测序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0248] [00204] 如这里所用的 "比较窗", 包括指任何数目的连续残基片段。例如, 在本

发明的一个方面,两个序列被最佳排列后,实例序列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 的大概 20 至全长之间范围的连续残基与相同数目的连续位置参考序列比较。如果参考序列与 SEQ ID NO:1、SEQ IDNO:2 具有必需的序列同一性,如与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:298%序列同一性那么序列在本发明的范围内。在具体实施例中,两个序列被最佳排列后,大约 20 至 600、大约 50 至 200 和大约 100 至 150 范围内的亚序列与相同数目的连续位置参考序列比较。为比较进行序列排列的方法是本领域熟知的。为进行比较序列的最佳排列可通过以下方法进行,如:Smith & Waterman 的局部同源算法,Adv. Appl. Math. 2:482,1981, Needleman & Wunsch 的同源排列算法, J. Mol. Biol. 48:443,1970, person & Lipman 的搜索相似性方法, Proc. Nat' l, Acad. Sci. USA 85:2444,1988,这些算法的计算机化工具 (GAP, BESTFIT, FASTA 和 Wisconsin 遗传学软件包中的 TFASTA,遗传学计算机工作组,575Science Dr., Madison, WI),或通过手工排列和视觉观察。其它检测同源或同一性的算法包括,例如,除 BLAST 程序 (Basic Local Alignment Search Tool) (在国家生物学信息中心的基本的局部排列研究工具) 以外,还有 ALIGN, AMAS (Analysis of Multiple Aligned Sequences) (多排列序列分析), AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment) (蛋白多序列排列), ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool) (排列片段统计评估工具), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node) (生物学序列比较分析节点), BLIMPS (BLOCKS IMPROVED Searcher), FASTA, Intervals & Points. BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, Smith-Waterman 算法则, DARWIN, Las Vegas 算法, FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool) (强制的核苷酸排列工具), 帧排列, 帧搜索, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package), GAP (Global Alignment Programme), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Sensitive Sequence Comparison) 敏感性序列比较, LALIGN (Local Sequence Alignment) 局部序列排列, LCP (Local Content Program) 局部含量程序, MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench) (多排列构建和分析工作台), MAP (Multiple Alignment Program) (多排列程序), MBLKP, MBLKN, PIMA (Pattern-Induced Multi-sequence Alignment) (晶格诱导的多序列排列), SAGA (Sequence Alignment by genetic Algorithm) (通过遗传运算法则进行的序列排列) 和 WHAT-IF。这些排列程序也可用于筛选基因组数据库以鉴定具有实质上一致序列的多核苷酸序列。许多基因组数据库是可获得的,例如,人类基因组的很大部分可作为人类基因组测序计划 (Gibbs, 1995) 的一部分而获得的。若干基因组已经被测序,如 *M. genitalium* (Fraser 等人, 1995), *M. jannaschii* (Bult 等人, 1996), *H. influenzae* (Fleischmann 等人, 1995), 大肠杆菌 (Blattner 等人, 1997) 和酵母 (酿酒酵母) (Mewes 等人, 1997), 及 *D. melanogaster* (Adams 等人, 2000)。在模型生物体的基因组测序已经取得了显著的进步,如小鼠、*C. elegans* 和 *Arabidopsis* sp. 含有基因组信息的数据库注有一些功能信息,被不同的团体所持有,可通过互联网获得。

[0249] [00205] BLAST、BLAST2.0 和 BLAST2.2 算法也用于实施本发明。它们被描述于,如 Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410。进行 BLAST 分析的软件可经国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 公开地获得。此算法涉及,首先通过识别询问序列中长度 W 的短字符串而确定高分值序列对 (HSPs),当与数据库序列中相同长度的字符串排列时,

HSPs 匹配或满足某正值极限计分 T 。 T 是指相邻的字符串计分阈值 (Altschul (1990) 见上)。这些最初的相邻字符串命中作为启动搜索的开端以发现含有它们的较长的 HSPs。字符串命中沿每一条序列向两个方向延长直到累积排列计分能够增加。对于核苷酸序列, 累积计分采用参数 M 计算 (匹配残基对的奖励计分; 总是 >0)。对于氨基酸序列, 用计分矩阵来计算累积计分。在以下情况下, 字符串命中在每个方向的延长中止: 累积排列计分通过参量 X 从其最大获得值降低; 由于一个或多个负分残基排列的累加, 累积计分到 0 或以下; 或到达任一序列的末端。BLAST 算法参数 W 、 T 和 X 决定着排列的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (对核苷酸序列) 使用默认值为: 字符串长度 (W) 11、期望值 (E) 10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 和两链都比较。对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用默认值为: 字符串长度 3, 期望值 (E) 10 和 BLOSUM62 计分矩阵 (见 Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :10915) 排列 (B) 50, 期望值 (E) 10, $M = 5$, $N = -4$, 和两链都比较。BLAST 运算法则还进行两个序列间相似性的统计分析 (见, 如 Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :5873)。BLAST 算法提供的一个相似性测量方法是最小总概率 ($P(N)$), 它提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间的匹配会偶然地发生的概率指标。例如, 在待测核酸与参考核酸的比较中, 如果最小总概率小于大约 0.2、小于大约 0.01 或小于大约 0.001, 则核酸被考虑为与参考序列相似。在一个方面, 蛋白和核酸序列的同源评估使用基本局部排列搜索工具 ("BLAST")。例如, 5 个特殊的 BLAST 程序可用于执行下面的任务: (1) BLASTP 和 BLAST3 比较氨基酸询问序列与蛋白序列数据库; (2) BLASTN 比较核苷酸询问序列与核苷酸序列数据库; (3) BLASTX 比较询问核苷酸序列的六-框概念性翻译产物 (两个链) 与蛋白序列数据库; (4) TBLASTN 比较询问蛋白序列与在所有六阅读框中翻译 (两个链) 的核苷酸序列数据库; 和 (5) TBLASTX 比较核苷酸询问序列的六-框翻译与核苷酸序列数据库的六-框翻译。BLAST 程序通过识别相似片段鉴定类似的序列, 在这里被称作询问氨基酸或核酸序列与待测序列间的 "高分值片段对", 待测序列可以从蛋白或核酸序列数据库中获得。高分值片段对可以依靠计分矩阵鉴别 (即被排列), 它们的许多在本领域是已知的。所用的实例计分矩阵是 BLOSUM62 矩阵 (Gonnet 等人. Science 256 :1443-1445, 1992; Henikoff 和 Henikoff, Proteins 17 :49-61, 1993)。另一方面, 可以使用 PAM 或 PAM250 矩阵 (见, 如 Schwartz 和 Dayhoff 主编, 1978, 探测距离关系的矩阵: 蛋白序列和结构图集 (matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure), Washington: National Biomedical Research Foundation)。

[0250] [00206] 在本发明的一个方面, 为确定具有必需序列同一性的核酸是否在发明的范围内, 使用 NCBI BLAST 2.2.2 程序。默认值选择为 blastp。在 BLAST 2.2.2 程序中有大约 38 个设置选择。在本发明的这个实例方面, 除默认过滤设置以外, 使用所有的默认值 (即, 除过滤设为 OFF 外, 所有参数设为默认值); 在此地使用 "-FF" 设置, 使不能筛选。由于序列长度短, 使用默认值筛选常常导致 Karlin-Altschul 扰乱。

[0251] [00207] 在本发明的这个实例方面中使用的默认值包括:

[0252] [00208] " Filter for low complexity :ON " 低复杂性筛选器 :ON

[0253] >Word Size :3 > 字符串大小 :3

[0254] >Matrix :Blosum62 > 矩阵 :Blosum62

[0255] >Gap Costs :Existence :11 > 缺口值 :存在 :11

[0256] >Extension:1" > 延长:1"

[0257] [00209]" 低复杂性筛选器:ON

[0258] [00210] 其它默认设置为:低复杂性筛选器 OFF,蛋白的字符串大小 3,BLOSUM62 矩阵,缺口存在罚分 -11 和缺口延长罚分 -1。

[0259] [00211] 实例的 NCBI BLAST 2.2.2 程序设置列在下面的实施例 1 中。注意"-w" 选项默认为 0。这意味着,如果没有设置,字符串大小默认为对蛋白 3 和对核苷酸为 11。

[0260] 计算机系统和计算机程序产物

[0261] [00212] 为确定和识别序列同一性、结构同源、基序、和类似物 insilico,本发明的序列可以在能够由计算机阅读和获取的任何介质上存储、记录和处理。因此,本发明提供了计算机、计算机系统、计算机可读介质、计算机程序产品等,其上记录或存储着本发明的核酸和多肽序列,如实例的序列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2。如这里所用的,词语"记录"和"存储"是指在计算机媒体上存储信息的程序。专业技术人员能够容易地采用任何已知的方法来记录计算机可读介质上的信息以产生含一个或多个本发明核酸和/或多肽序列的产品。

[0262] [00213] 本发明的另一个方面是其上记录了至少一个本发明的核酸和/或多肽序列的计算机可读媒体。计算机可读介质包括磁性的可读介质、光学可读介质、电子可读介质和磁/光学介质。例如,计算机可读介质可以是硬盘、软盘、磁带、CD-ROM、数字通用光盘(DVD)、随机存取存储器(RAM)或只读存储器(ROM)以及本领域技术人员已知的其它类型的介质。

[0263] [00214] 本发明的方面包括系统(如,互联网为基础的系统),特别是储存和处理这里描述的序列和序列信息的计算机系统。一个举例的计算机系统 100 以框图形式图解在图 15 中。如这里所用的"计算机系统"是指硬件部分、软件部分和用于分析发明的核苷酸或多肽序列的数据存储部分。计算机系统 100 可包括处理、访问和处理序列数据的处理器。处理器 105 可以是任何熟知类型的中央处理器,例如 Intel 公司的 Pentium III,或 Sun、Motorola、Compaq、AMD 或国际商用机器公司的相似处理器。计算机系统 100 是一般用途系统,包括处理器 105 和储存数据的一个或多个内部数据存储部分 110,以及获取数据存储部分上的存储数据的一个或多个数据获取装置。专业技术人员可容易地理解,当前可获得的计算机系统的任何之一都是适合的。

[0264] [00215] 在一个方面,计算机系统 100 包括与总线相连的处理器 105,总线连接于主存储器 115(可作为 RAM 运行)和一个或多个内部数据存储装置 110,如硬盘驱动器和/或其它有数据记录其上的计算机可读介质。计算机系统 100 可进一步包括一个或多个数据获取装置 118 以读取内部数据存储装置 110 上储存的数据。

[0265] [00216] 数据获取装置 118 可表现为,例如软盘驱动器、光盘驱动器、磁带驱动器或能够连接远程数据存储系统(如,经互联网)的调制解调器,等。在某些实施例中,内部数据存储装置 110 是其上含有控制逻辑和/或记录数据的可移动计算机可读介质如软盘、光盘、磁带,等。计算机系统 100 可方便地包括适当的软件或通过其编程,数据存储元件一旦被插入数据获取装置中便从中读取控制逻辑和/或数据。

[0266] [00217] 计算机系统 100 包括用于显示计算结果给计算机使用者的显示器 120。还应当注意到,计算机系统 100 可以连接到网络或宽域网中的其它计算机系统 125a-c 上,以

提供给计算机系统 100 的集中化存取。访问和处理本发明核苷酸或氨基酸序列的软件可以在运行期间留在主存储器 115 中。

[0267] [00218] 在某些方面,计算机系统 100 可进一步包括比较本发明核酸序列的序列比较算法。算法和序列可以存储在计算机可读介质上。“序列比较算法”是指一个或多个程序,在计算机系统 100 上运行(本地地或远程地)以比较核苷酸序列与存储在数据存储工具上的另一个核苷酸序列和/或化合物。例如,序列比较算法可将存储在计算机可读介质上的实例序列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 的核苷酸序列与存储在计算机可读介质上的参考序列比较以鉴定同源或结构基序。

[0268] [00219] 上面算法所用的参数可根据所研究的序列长度和同源程度而调整。在某些方面,在没有使用者使用说明书的情况下,参数可以是运算法则所用的默认参数。图 16 是图解程序 200 一个方面的流程图,用于比较新的核苷酸或蛋白序列与数据库的序列,以确定新序列和数据库序列间的同源性水平。数据库序列可以是计算机系统 100 中存储的个人数据库,或可经互联网获得的公共数据库如 GENBANK。程序 200 开始于起始状态 201,然后运行到状态 202,在此要比较的新序列储存到计算机系统 100 的存储器中。如上面讨论的,存储器可以是任何类型的存储器包括 RAM 或内部存储装置。

[0269] [00220] 然后程序 200 运行到状态 204,在此数据库序列被打开以分析和比较。然后程序 200 运行到状态 206,在此储存在数据库中的第一条序列被读进计算机上的存储器中。然后在状态 210 进行比较以确定第一条序列是否与第二条序列相同。重要的是注意到,此步骤并不限于进行新序列和数据库中第一条序列间的精确比较。比较两个核苷酸或蛋白序列的方法,即使它们是不同的,也是本领域技术人员熟知的。例如,为了提高两个待测序列间的同源水平,可以在一条序列中导入缺口。在比较过程中控制缺口或其它特征是否导入序列中的参数通常由计算机系统使用者输入。

[0270] [00221] 一旦在状态 210 对两个序列已经进行比较,它们是否相同的判定会在决定状态 210 做出。当然,术语“相同”并不限于序列绝对地一样。在使用者输入的同源性参数范围内的序列会在程序 200 中被标记为“相同”。如果做出两个序列相同的判定,程序 200 运行到状态 214,在此序列的名字从数据库显示给使用者。此状态通报使用者,显示名字的序列满足输入的同源性限制条件。一旦存储序列的名字显示给使用者,程序 200 运行到决定状态 218,在此无论数据库中是否存在更多的序列都做出判定。如果数据库中没有更多的序列存在,那么程序 200 终止于结束状态 220。但是,如果数据库中有更多的序列存在,那么程序 200 运行到状态 224,在此指示器移动到数据库中的下一条序列使之能够与新序列比较。以此方式,新序列被排列并与数据库中的全部序列比较。

[0271] [00222] 应当注意到,如果在决定状态 212 做出序列不一致的判定,那么程序 200 会立即运行到决定状态 218 以确定在数据库中是否可获得任何其它的序列来比较。因此,本发明的一个方面是计算机系统,包含处理器、其上已储存了本发明核酸序列的数据存储装置和进行比较的序列比较器。序列比较器可指示被比较的序列之间的同源性水平或鉴定结构基序,或可鉴定与这些核酸密码和多肽密码比较的序列中的结构基序。

[0272] [00223] 图 17 是图解计算机中一个程序 250 实施例的流程图,用于检测两个序列是否一致。程序 250 开始于起始状态 252,然后运行到状态 254,在此要比较的第一条序列储存到存储器中。然后要比较的第二条序列在状态 256 储存到存储器上。然后程序 250 运

行到状态 260, 在此读取第一条序列中的第一个字符, 然后在状态 262 读取第二条序列中的第一个字符。应当清楚, 如果序列是核苷酸序列, 那么字符一般会是 A、T、C、G 或 U。如果序列是蛋白序列, 那么它可以是单字母氨基酸代码, 使之能够容易地比较第一和第二条序列。然后两个字符是否相同在决定状态 264 做出判定。如果它们是相同的, 那么程序 250 运行到状态 268, 在此读取第一和第二条序列的下一个字符。然后做出下一个字符是否相同的判定。如果它们是相同的, 然后程序 250 继续此循环直到两个字符不同为止。如果做出两个字符不同的判定, 程序 250 运行到决定状态 274 以确定任一序列是否还有字符要读。如果再没有字符要读, 那么程序 250 运行到状态 276, 在此第一和第二条序列间的同源性水平被显示给使用者。同源性水平通过计算序列间相同字符在第一条序列总字符中所占的比例而确定。因此, 如果第一条 100 核苷酸序列的所有字符对准第二条序列的所有字符, 同源性水平将为 100%。

[0273] [00224] 可选择地, 计算机程序可以比较参考序列与本发明的序列以确定序列是否在一个或多个位置上不同。就参考或发明的序列, 程序可以记录插入、删除或取代的核苷酸或氨基酸残基的长度和同一性。计算机程序可以是鉴定参考序列是否含有本发明序列的单核苷酸多态性 (SNP) 的程序, 或者是, 鉴定发明的序列是否含有已知序列 SNP 的程序。因此, 在某些方面, 计算机程序是识别 SNPs 的程序。该方法可以通过上面描述的计算机系统来完成, 并图解于图 17 中。该方法可以通过以下步骤完成: 通过使用计算机程序读取发明的序列和参考序列, 用计算机程序鉴定差异。

[0274] [00225] 另一方面, 以计算机为基础的系统包括鉴别本发明核酸或多肽中特征的鉴别器。"鉴别器" 是指识别核酸序列中某些特征的一个或多个程序。例如, 鉴别器可包含识别核酸序列中开放阅读框 (ORF) 的程序。图 18 是图解鉴别器程序 300 的一个方面的流程图, 用于探测序列中存在的特征。程序 300 开始于起始状态 302, 然后运行到状态 304, 在此要检验特征的第一条序列储存在计算机系统 100 的存储器 115 中。然后程序 300 运行到状态 306, 在此打开序列特征数据库。这种数据库会包括每一个特征的属性标志以及特征名字的清单。例如, 特征名字可能是 "起始密码子", 其属性标志将是 "ATG"。另一个例子是特征名 "TAATAA 盒", 特征属性标志将是 "TAATAA"。这种数据库的一个例子是由 Wisconsin 大学遗传学计算机工作组制造的。另外, 特征可能是结构性多肽基序如 α 螺旋、 β 片层, 或是功能性多肽基序如酶的活性位点、螺旋-转角-螺旋单位或其它本领域技术人员已知的基序。一旦特征数据库在状态 306 被打开, 程序 300 运行到状态 308, 在此从数据库中读取第一个特征。然后在状态 310 进行第一条序列第一个特征的属性标志的比较。然后在决定状态 316 做出第一条序列中是否发现该特征属性标志的判定。如果发现属性标志, 那么程序 300 运行到状态 318, 在此被发现特征的名字显示给使用者。然后程序 300 运行到决定状态 320, 在此做出数据库中是否存在更多特征的判定。如果没有更多特征存在, 那么程序 300 终止于结束状态 324。但是, 如果数据库中有更多特征存在, 那么程序 300 在状态 326 读取下一个序列特征, 并返回状态 310, 在此下一个特征的属性标志针对第一条序列被比较。如果在决定状态 316 没有发现第一条序列中的特征属性标志, 程序 300 直接运行到决定状态 320 以确定是否还有特征存在于数据库中。因此, 一方面, 本发明提供了识别开放阅读框 (ORFs) 的计算机程序。

[0275] [00226] 本发明的多肽或核酸序列可在多种版本的多种数据处理器程序中存储

和处理。例如,序列可以存储为字处理文件的文本,如 MicrosoftWORD 或 WORDPERFECT,或作为 ASCII 文件,在多种数据库程序中为本领域技术人员所熟悉,如 DB2、SYBASE 或 ORACLE。另外,许多计算机程序和数据库可被用作序列比较算法、鉴别器或要与本发明核酸序列比较的参考核苷酸序列或多肽序列源。用于实施本发明的程序和数据库包括但不限于:MacPattem(EMBL)、DiscoveryBase (Molecular Applications Group)(分子应用软件集团)、GeneMine(分子应用软件集团)、Look(分子应用软件集团)、MacLook(分子应用软件集团)、BLAST 和 BLAST2(NCBI)、BLASTN 和 BLASTX(Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215:403, 1990)、FASTA(Pearson 和 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444, 1988)、FASTDB(Brutlag 等人, Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990)、Catalyst(Molecular Simulations Inc.)、Catalyst/SHAPE(Molecular Simulations Inc.)、Cerius2、DBAccess(Molecular Simulations Inc.)、HypoGen(Molecular Simulations Inc.)、Insight II, (Molecular Simulations Inc.)、Discover(Molecular Simulations Inc.)、CHARMm(Molecular Simulations Inc.)、Felix(Molecular Simulations Inc.)、Delphi(Molecular Simulations Inc.)、QuanteMM(Molecular Simulations Inc.)、Homology(Molecular Simulations Inc.)、Modeler(Molecular Simulations Inc.)、ISIS(Molecular Simulations Inc.)、Quanta/Protein Design(Molecular Simulations Inc.)、WebLab(Molecular Simulations Inc.)、WebLabDiversity Explorer(Molecular Simulations Inc.)、Gene Explorer(Molecular Simulations Inc.)、SeqFold(Molecular Simulations Inc.)、MDL Available Chemicals Directory 数据库、MDL Drug Data Report 数据库、Comprehensive Medicinal Chemistry 数据库、Derwent's World Drug Index 数据库、BioByteMasterFile 数据库、Genbank 数据库和 Genseqn 数据库。许多其它的程序和数据库对本公开物指定领域的技术人员之一是显见的。

[0276] [00227] 可使用上述程序探测的基序包括编码以下结构的序列:亮氨酸拉链、螺旋-转角-螺旋基序、糖基化位点、泛素化作用位点、 α 螺旋和 β 片层,引导被编码的蛋白分泌的编码信号肽的信号序列、涉及转录调节的序列如同源异型框、酸性分支、酶活性位点、底物结合位点和酶裂解位点。

[0277] 核酸的杂交

[0278] [00228] 本发明提供了与本发明的实例序列,如 SEQ ID NO:1 中所示的序列或包括 SEQ ID NO:2 中所示序列的编码多肽的核酸,在严格条件下杂交的分离或重组核酸。严格条件可以是高度严格条件、中度严格条件、低严格条件,包括这里描述的高度和降低的严格条件。在具体实施例中,以其在严格条件下的杂交能力被判定的本发明核酸可以在大约 5 个残基和 SEQ ID NO:1 分子全长之间;如它们的长度可以至少为 5、10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200、250、300、350、400 个残基。也包括短于全长的核酸。这些核酸被用作如,杂交探针、标记探针、PCR 寡核苷酸探针、iRNA、反义或编码抗体结合肽(抗原决定簇)、基序、活性位点和类似结构的序列。

[0279] [00229] 一方面,本发明的核酸以其在高度严格条件下的杂交能力而被判定,高度严格条件包括大约 50% 甲酰胺,大约 37°C 至 42°C。一方面,本发明的核酸以其在降低的严格条件下的杂交能力而被判定,降低的严格条件包括大约 35% 至 25% 甲酰胺,大约 30°C 至 35°C。或者,本发明的核酸以其在高度严格条件下的杂交能力而被判定,高度严格条件包括

42℃在 50% 甲酰胺、5X SSPE、0.3% SDS 和重复顺序封闭核酸如 cot-1 或鲑精 DNA (如 200n/ml 剪切的和变性的鲑精 DNA) 中。一方面, 本发明的核酸以其在降低的严格条件下的杂交能力而被判定, 减低的严格条件包括 35% 甲酰胺, 在 35℃降低的温度下。

[0280] [00230] 杂交后, 可用 6X SSC、0.5% SDS 在 50℃洗涤过滤器。这些条件超过 25% 甲酰胺被认为是“中度”条件, 低于 25% 甲酰胺被认为是“低”条件。“中度”杂交条件的特殊实例是上述杂交在 30% 甲酰胺中进行。“低严格”杂交条件的特殊实例是上述杂交在 10% 甲酰胺中进行。

[0281] [00231] 相应于特定严格水平的温度范围可以通过计算目的核酸的嘌呤 / 嘧啶比而进一步变窄, 并因此调节温度。本发明的核酸也以其在高度、中度和低严格条件下的杂交能力而被判定, 如 Ausubel 和 Sambrook 中阐明的。上述范围和条件的变化是本领域熟知的。杂交条件在下面进一步讨论。

[0282] 寡核苷酸探针及其使用方法

[0283] [00232] 本发明还提供了鉴定核酸的核酸探针, 该核酸编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽。一方面, 探针含有 SEQ ID NO:1 中所示序列的至少 10 个连续的碱基。或者, 本发明的探针可以是 SEQ ID NO:1 中所示序列的至少大约 5、6、7、8 或 9 至大约 40、大约 10 至 50、大约 20 至 60、大约 30 至 70 个连续的碱基。探针通过结合或杂交鉴定核酸。探针可被用在本发明的阵列上, 见下面的讨论, 包括如毛细管阵列。本发明的探针还可以用于分离其它的核酸或多肽。

[0284] [00233] 本发明的探针可用于检测生物学标本如土壤标本是否含有具有本发明核酸序列的生物体, 或从中获得该核酸的生物体。在这种过程中, 获得了潜在地藏有从中分离该核酸的生物体的生物学标本, 并从标本中获得核酸。核酸与探针在允许探针与标本中存在的任何互补序列特异杂交的条件下接触。在必要情况下, 通过将探针与已知含有互补序列的标本中的互补序列、以及不含互补序列的调控序列接触, 确定允许探针与互补序列特异杂交的条件。杂交条件如杂交缓冲液的盐浓度、杂交缓冲液的甲酰胺浓度或杂交温度, 可被改变以确定允许探针与互补核酸特异杂交的条件 (见对特异杂交条件的讨论)。

[0285] [00234] 如果标本含有从中获得核酸的生物体, 就探测到探针的特异杂交。通过用可检测试剂标记探针可探测杂交, 如放射活性同位素、荧光染料或能够催化可探测产物形成的酶。使用标记探针探测标本中存在的互补核酸的许多方法是本领域技术人员熟悉的。这些包括 Southern 印迹、Northern 印迹、集落杂交方法和点印迹。每一个这些方法的方案在 Ausubel 和 Sambrook 中提供。

[0286] [00235] 或者, 多于一个探针 (至少其中之一能够与核酸标本中存在的任何互补序列特异地杂交) 可被用在扩增反应中以确定标本中是否含有含本发明核酸序列的生物体 (如从中分离核酸的生物体)。在一方面, 探针包括寡核苷酸。一方面, 扩增反应可包括 PCR 反应。PCR 的方案被描述在 Ausubel 和 Sambrook 中 (见对扩增反应的讨论)。在这个过程中, 标本中的核酸与探针接触, 进行扩增反应, 并检测得到的任何扩增产物。可通过对反应产物进行凝胶电泳并用插入剂如溴化乙锭着色凝胶来检测扩增产物。或者, 一个或多个探针可用放射活性同位素标记, 放射活性扩增产物的存在可通过凝胶电泳后的放射自显影探测。

[0287] [00236] 来自接近本发明核酸序列 3' 或 5' 末端序列的探针也可被用于染色体

移行法以鉴定含其他序列如基因组序列的克隆。这种方法可以从宿主生物体中分离编码其他目的蛋白的基因。

[0288] [00237] 一方面,本发明的核酸序列被用作探针来鉴定和分离相关的核酸。在某些方面,除了首先从中分离本发明核酸的核酸以外,如此鉴定的相关核酸可以是来自生物体的 cDNA 或基因组 DNA。在这个过程中,核酸标本与探针在允许探针与相关序列特异杂交的条件下接触。然后用上面描述的任何方法检测探针与来自相关生物体的核酸的杂交。

[0289] 在核酸杂交反应中,用来获得特定严格水平的条件将依被杂交的核酸的性质而改变。例如,核酸的长度、互补程度、核苷酸序列组成(如,GC 对 AT 含量)和核酸杂交区的核酸类型(如,RNA 对 DNA)可在选择杂交条件中被考虑。另外的考虑是核酸之一是否是固定化的,例如在滤膜上。杂交可在低严格、中度严格或高度严格条件下进行。作为核酸杂交的实例,含固定化的变性核酸的聚合物膜首先在 45℃ 溶液中预杂交 30 分钟,溶液组成:0.9M NaCl,50mM NaH₂PO₄, pH 7.0,5.0mM Na₂EDTA,0.5% SDS,10X Denhardt' s 和 0.5mg/ml 聚核糖腺苷酸。然后在溶液中加入大约 2×10^7 cpm(比活性 4-9X 10⁸cpm/ug)³²P 末端-标记的寡核苷酸探针。孵育 12-16 小时后,膜在含 1X SET(150mM NaCl,20mM Tris 盐酸,pH 7.8,1mM Na₂EDTA)的 0.5% SDS 中被室温(RT)洗涤 30 分钟,然后在新鲜的 1X SET 中 T_m-10℃ 30 分钟洗涤寡核苷酸探针。然后膜暴露于放射自显影胶片以探测杂交信号。

[0290] [00239] 通过改变杂交条件的严格度可以鉴定和分离与探针具有不同同源性水平的核酸,杂交反应用于鉴定与可探测探针杂交的核酸如 cDNA 或基因组 DNA。通过在低于探针解链温度的不同温度下进行杂交可以改变严格度。解链温度, T_m, 是 50% 靶序列与完全互补的探针杂交的温度(在限定的离子强度和 pH 下)。对于特定的探针,选择等于或比 T_m 大约低 5℃ 的非常严格条件。探针的解链温度可以用下面代表性的公式计算。对于长度为 14 和 70 个核苷酸之间的探针,计算解链温度(T_m)所用的公式为: $T_m = 81.5 + 16.6(\log[Na^+]) + 0.41(\text{分数 G+C}) - (600/N)$, 其中 N 是探针的长度。如果杂交在含甲酰胺的溶液中进行,计算解链温度可使用方程式: $T_m = 81.5 + 16.6(\log[Na^+]) + 0.41(\text{分数 G+C}) - (0.63\% \text{甲酰胺}) - (600/N)$, 其中 N 是探针的长度。可以在 6X SSC, 5X Denhardt' s 试剂, 0.5% SDS, 100 μg 变性的成碎片的鲑精 DNA 或 6XSSC, 5X Denhardt' s 试剂, 0.5% SDS, 100 μg 变性的成碎片的鲑精 DNA, 50% 甲酰胺中进行预杂交。SSC、Denhardt' s 和其它溶液的配方被列在如 Sambrook 中。

[0291] [00240] 通过在上面所列的预杂交溶液中加入可探测的探针进行杂交。在探针包括双链 DNA 时,它在加入杂交溶液前变性。滤膜与杂交溶液接触充足的时间以使探针与含其互补序列或其类似序列的 cDNA 或基因组 DNA 杂交。对于长度超过 200 个核苷酸的探针,杂交可在低于 T_m 的 15-25℃ 下进行。对于较短的探针如寡核苷酸探针,杂交可在低于 T_m 的 5-10℃ 下进行。一方面,杂交在 6X SSC 中大约 68℃ 下进行。一方面,杂交在含 50% 甲酰胺的溶液中大约 42℃ 下进行。所有前述的杂交会考虑为在高度严格条件下。

[0292] [00241] 杂交后,滤膜被洗涤以去除任何非特异结合的可探测探针。用于洗涤滤膜的严格度也可以依被杂交的核酸性质、被杂交的核酸长度、互补程度、核苷酸序列组成(如,GC 对 AT 含量)和核酸类型(如,RNA 对 DNA)而改变。逐渐升高严格条件的洗涤实例如下:2X SSC,0.1% SDS,室温 15 分钟(低严格);0.1X SSC,0.5% SDS,室温 30 分钟至 1 小时(中度严格);0.1X SSC,0.5% SDS,在杂交温度和 68℃ 之间 15 至 30 分钟(高度严格);

和 0.15M NaCl, 72°C 15 分钟 (非常高度严格)。最终低严格洗涤可以在 0.1X SSC 中室温进行。上面的实例仅仅是可以用于洗涤滤膜的一组条件的说明。本领域的一个技术人员会知道对于不同严格的洗涤有大量的方案。

[0293] [00242] 已经与探针杂交的核酸可以通过放射自显影或其它常规的技术来确定。上面的步骤可被修改以鉴定与探针序列同源水平下降的核酸。例如, 为获得与可探测探针同源性下降的核酸, 可使用较少严格的条件。例如, 在 Na⁺ 浓度大约为 1M 的杂交缓冲液中, 杂交温度可以 5°C 的增量从 68°C 降至 42°C。杂交后, 可用 2X SSC, 0.5% SDS 在杂交温度下洗涤滤膜。这些条件超过 50°C 被认为是 "中度" 条件, 低于 50°C 是 "低" 条件。"中度" 杂交条件的实例是上述杂交在 55°C 进行。"低严格" 杂交条件的实例是上述杂交在 45°C 进行。

[0294] [00243] 或者, 杂交可在如含甲酰胺的 6X SSC 缓冲液中 42°C 温度下进行。在此情况下, 杂交缓冲液中甲酰胺的浓度可以 5% 的增量从 50% 降至 0% 以鉴定与探针同源水平下降的克隆。杂交后, 可用 6X SSC, 0.5% SDS 在 50°C 下洗涤过滤器。这些条件超过 25% 甲酰胺被认为是 "中度" 条件, 低于 25% 甲酰胺是 "低" 条件。"中度" 杂交条件的特定实例是上述杂交在 30% 甲酰胺中进行。"低严格" 杂交条件的特定实例是上述杂交在 10% 甲酰胺中进行。

[0295] [00244] 本发明的这些探针和方法可以用于分离与本发明的核酸序列具有至少大约 99%、98%、97%、至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 65%、至少 60%、至少 55% 或至少 50% 同源性的核酸, 本发明的核酸序列含有其至少大约 10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400 或 500 个连续碱基以及其互补序列。同源性可以如这里讨论的采用排列算法来测定。例如, 同源的多核苷酸可具有编码序列, 它是这里描述的编码序列之一的天然存在的等位基因变异体。与本发明的核酸比较, 这种等位基因变异体可具有一个或多个核苷酸的取代、删除或添加。

[0296] [00245] 此外, 本发明的探针和方法可用于分离编码多肽的核酸, 多肽与本发明的多肽具有至少大约 99%、至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 65%、至少 60%、至少 55% 或至少 50% 的序列同一性 (同源), 本发明的多肽含有其至少 5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100 或 150 个连续的氨基酸, 使用序列排列算法 (如, PASTA 3.0t78 版算法及默认参数, 或 BLAST 2.2.2 程序及这里列出的实例设置) 所测定。

[0297] 抑制肌醇六磷酸酶的表达

[0298] [00246] 本发明进一步提供了与本发明的核酸序列互补的核酸 (如反义序列)。反义序列能够抑制肌醇六磷酸酶 - 编码基因的运送、剪接或转录。抑制作用可以通过靶向基因组 DNA 或信使 RNA 而实现。通过例如杂交和 / 或裂解, 可以被抑制靶向核酸的转录或功能。本发明提供的特别有用的一组抑制剂包括能够结合肌醇六磷酸酶基因或信使的寡核苷酸, 在任一情况下阻止或抑制肌醇六磷酸酶的产生或功能。可以经序列特异的杂交联合。另一类有用的抑制剂包括导致肌醇六磷酸酶信使失活或裂解的寡核苷酸。寡核苷酸可以具有导致这种裂解的酶活性, 如核糖酶。寡核苷酸可被化学修饰或与能够裂解互补核酸的酶或组合物共扼连接。可以筛选具有所需活性的许多不同的这种寡核苷酸组合。

[0299] 反义寡核苷酸

[0300] [00247] 本发明提供了能够结合肌醇六磷酸酶信使的反义寡核苷酸，它可以通过靶向 mRNA 抑制肌醇六磷酸酶的活性。设计反义寡核苷酸的策略被很好地描述在学术和专利文献中，专业技术人员能够使用本发明的新试剂设计这种肌醇六磷酸酶寡核苷酸。例如，基因移行 /RNA 基因定位法筛选有效的反义寡核苷酸是本领域熟知的，见，如 Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314 :168-183，描述了 RNA 基因定位试验，它依据标准的分子技术提供容易的和可靠的选择有效反义序列的方法。也见 Smith (2000) *Euro. J. Pharm. Sci.* 11 : 191-198。

[0301] [00248] 天然存在的核酸被用作反义寡核苷酸。反义寡核苷酸可以是任何长度；例如，一方面，反义寡核苷酸在大约 5 至 100、大约 10 至 80、大约 15 至 60、大约 18 至 40 之间。最佳长度可以通过常规筛选来确定。反义寡核苷酸可以呈现任何的浓度。最佳浓度可以通过常规筛选来确定。各种广泛的合成的、非天然存在的核苷酸和核酸类似物是已知的，可以解决此潜在的问题。例如，可以使用含非离子主链如 N-(2- 氨乙酸) 氨基乙酸单位的肽核酸 (PNAs)。也可以使用具有硫代磷酸连接的反义寡核苷酸，如以下文献中描述的：WO 97/03211；WO 96/39154；Mata (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 144 :189-197；反义治疗学 (Antisense Therapeutics)，ed. Agarwal (Humana Press, Totowa, N. J., 1996)。本发明提供的具有合成 DNA 主链类似物的反义寡核苷酸还可以包括二硫代磷 - 酸盐、磷酸甲酯、氨基磷酸酯、烷基磷酸三酯、氨基磺酸盐、3' - 硫缩醛、亚甲基 (甲基亚氨基)、3' -N- 氨基甲酸盐和吗啉代氨基甲酸盐核酸，如上面描述的。

[0302] [00249] 组合化学方法可用于创造大量数目的寡核苷酸，能够迅速地筛选对任何靶标具有适当的结合亲和力和特异性的特殊寡核苷酸，如本发明的正义和反义肌醇六磷酸酶序列 (见，如 Gold (1995) *J. of Biol. Chem.* 270 :13581-13584)。

[0303] 抑制性核糖酶

[0304] [00250] 本发明提供了能够结合肌醇六磷酸酶信使的核糖酶，它可以通过靶向 mRNA 抑制肌醇六磷酸酶的活性。设计核糖酶和选择靶向的肌醇六磷酸酶 - 特异的反义序列的策略被很好地描述在学术和专利文献中，专业技术人员能够使用本发明的新试剂设计这种核糖酶。核糖酶经它的靶 RNA 结合部分通过结合靶 RNA 而起作用，靶 RNA 结合部分 极靠近裂解靶 RNA 的 RNA 酶部分。因此，核糖酶经互补碱基对识别和结合靶 RNA，一旦连接到恰当的位点，酶促地起作用以裂解和失活靶 RNA。如果裂解发生在编码序列中，这种方式的靶 RNA 裂解会破坏其引导编码蛋白合成的能力。在核糖酶已结合和裂解其 RNA 靶以后，它典型地从 RNA 上释放，因此可以重复地结合和裂解新靶。

[0305] [00251] 在一些情况下，核糖酶的酶性质对于其它技术可能是有利的，如反义技术 (其中核酸分子简单地结合到核酸靶上以阻止其转录、翻译或与另一个分子联合)，由于影响治疗性处置所必需的核糖酶有效浓度可以低于反义寡核苷酸所需的浓度。此潜在优势反映了核糖酶酶促地起作用的能力。因此，单一的核糖酶分子能够裂解许多靶 RNA。另外，核糖酶是典型的高度特异的抑制剂，其抑制特异性不仅依赖于结合的碱基配对机制，而且依赖于分子抑制其结合的 RNA 表达的机制。即，抑制作用因 RNA 靶裂解所致，如此特异性被定义为靶向 RNA 的裂解速率与非靶向 RNA 裂解速率的比值。此裂解机理依赖于涉及碱基配对以外的因素。因此，核糖酶作用的特异性可以大于反义寡核苷酸结合相同 RNA 位点的特异性。酶促的核糖酶 RNA 分子可以形成锤头形，但也可形成发夹单位形、肝炎 δ

病毒、基团 I 内含子或核糖核酸酶 P- 样 RNA (与 RNA 引导序列联合)。这种锤头形的实例被 Rossi (1992) 描述, Aids Research and Human Retroviruses 8:183; 发夹单位被描述于 Hampel (1989), Biochemistry 28:4929 和 Hampel (1990) Nuc. Acids Res. 18:299; 肝炎 δ 病毒单位被 Perrotta (1992) 描述, Biochemistry 31:16; 核糖核酸酶 P (RnaseP) 单位被 Guerrier-Takada (1983) 描述, Cell 35:849; 和基团 I 内含子被 Cech 描述, 美国专利 No. 4, 987, 071。这些特殊单位的叙述并非要限制; 本领域专业技术人员会认识到, 本发明的酶性 RNA 分子具有与一个或多个靶基因 RNA 区互补的特异底物结合位点, 以及具有在底物结合位点内或周围的核苷酸序列, 使分子具有 RNA 裂解活性。

[0306] 核酸的修饰

[0307] [00252] 本发明提供了产生本发明核酸变异体的方法, 如编码肌醇六磷酸酶的核酸变异体,。这些方法可以是重复的或以各种组合用于产生肌醇六磷酸酶, 其活性或稳定性改变或不同于的模板核酸编码的肌醇六磷酸酶。这些方法也可以重复或以各种组合使用以产生以下方面的变化, 如, 基因 / 信使表达、信使翻译或信使稳定性。另一方面, 细胞的基因组物被改变, 通过例如, 离体修饰类似的基因, 然后再将其插入细胞。

[0308] [00253] 本发明的核酸可以通过任何方法被改变。例如, 任意或随机的方法, 或者非随机, 或 " 定向的进化 " 方法。

[0309] [00254] 基因随机突变的方法是本领域熟知的, 见, 如美国专利 No. 5, 830, 696。例如, 可以使用诱变剂随机地改变基因。诱变剂包括, 如紫外光或 γ 照射, 或化学诱变剂如丝裂霉素、亚硝酸、光敏化的补骨脂素, 单独或联合地诱导易被重组修复的 DNA 断裂。其它化学诱变剂包括, 例如亚硫酸氢钠、亚硝酸、羟胺、肼或蚁酸。其它诱变剂是核苷酸前体类似物, 如亚硝基胍、5- 溴尿嘧啶、2- 氨基嘌呤或吡啶。这些物质可以被加入 PCR 反应中代替核苷酸前体从而使序列变异。还可以使用插入剂如硫酸原黄素、吡啶黄、奎纳克林和类似物质。

[0310] [00255] 可以使用分子生物学的任何技术, 如, 随机 PCR 诱变, 见如, Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471; 或组合的多盒式诱变, 见如, Cramer (1995) Biotechniques 18:194-196。或者, 核酸如基因可以在任意、或 " 随机 " 分割后被重新装配, 见如, 美国专利 No. 6, 291, 242; 6, 287, 862; 6, 287, 861; 5, 955, 358; 5, 830, 721; 5, 824, 514; 5, 811, 238; 5, 605, 793。一方面, 修饰、添加或删除通过以下方法诱导: 易错 PCR、改组、寡核苷酸定向的诱变、集合 PCR、有性的 PCR 诱变、体内诱变、盒式诱变、递归整体诱变、指数整体诱变、位点特异的诱变、基因重新组装、基因位点饱和的诱变 (GSSM)、合成的连接重新组装 (SLR)、重组、递归序列重组、磷硫 - 修饰的 DNA 诱变、含尿嘧啶的模板诱变、缺口双重诱变、点错配修复诱变、修复缺陷的宿主菌株诱变、化学诱变、放射产生的诱变、删除诱变、限制性选择诱变、限制性纯化诱变、人工基因合成、整体诱变、形成嵌合的核酸多聚体, 和 / 或这些和其它方法的组合。

[0311] [00256] 下面的公开物描述多种递归重组步骤和 / 或可以并入本发明方法的方法: Stemmer (1999) " 靶向病毒的分子繁殖和其它临床特性 " Tumor Targeting 4:1-4; Ness (1999) Nature Biotechnology 17:893-896; Chang (1999) " 使用 DNA 族改组的细胞因子演化 " Nature Biotechnology 17:793-797; Minshull (1999) " 通过分子繁殖进化蛋白 " Current Opinion in Chemical Biology 3:284-290; Christians (1999) " 使用 DNA 族改组定向进化 AZT 磷酸化的胸苷激酶 " Nature Biotechnology 17:259-264;

Cramer(1998) "来自不同种类的基因家族的DNA改组加速定向进化" *Nature* 391:288-291;Cramer(1997) "通过DNA改组的神酸盐解毒通路的分子进化" *Nature Biotechnology* 15:436-438;Zhang(1997) "来自半乳糖苷的有效岩藻糖苷酶通过DNA改组和筛选的定向进化" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509;Patten等人(1997) "DNA改组在药物和疫苗中的应用" *Current Opinion in Biotechnology* 8:724-733;Cramer等人(1996) "通过DNA改组构建和发展抗体-噬菌体文库" *Nature Medicine* 2:100-103;Cramer等人(1996) "通过使用DNA改组的分子进化改善绿荧光蛋白" *Nature Biotechnology* 14:315-319;Gates等人(1996) "通过在lac抑制剂'头盔二聚体'上显示,从肽文库中亲合选择性分离配体" *Journal of Molecular Biology* 255:373-386;Stemmer(1996) "有性的PCR和集合PCR" 见:分子生物学百科全书(The Encyclopedia of Molecular biology). VCH Publishers, New York. pp. 447-457;Cramer和Stemmer(1995) "组合的多盒式诱变创造突变体和野生型基因盒的所有改变" *Biotechnology* 18:194-195;Stemmer等人(1995) "基因和整个质粒单步骤组合形成大量的寡脱氧核糖核苷酸" *Gene*, 164:49-53;Stemmer(1995) "分子测定的进展" *Science* 270:1510;Stemmer(1995) "搜索序列空间" *Bio/Technology* 13:549-553;Stemmer(1994) "蛋白在体外通过DNA改组的快速进化" *Nature* 370:389-391;和Stemmer(1994) "通过随机分割和重新组装的DNA改组:体外重组以进行分子进化" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751。

[0312] [00257] 产生差异的突变方法包括,例如,位点定向的诱变(Ling等人(1997) "DNA诱变手段:综述" *Anal. Biochem.* 254(2):157-178;Dale等人(1996) "使用硫代磷酸盐方法的寡核苷酸定向的随机诱变" *Mol. Biol.* 57:369-374;Smith(1985) "体外诱变" *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462;Botstein & Shortle(1985) "体外诱变的策略和应用" *Science* 229:1193-1201;Carter(1986) "位点定向的诱变" *Biochem. J.* 237:1-7;和Kunkel(1987) "寡核苷酸定向诱变的效率" 见核酸&分子生物学(Nucleic Acid & Molecular Biology)(Eckstein, F. 和 Lilley, D. M. J. 主编. Springer Verlag, Berlin));使用含尿嘧啶的模板诱变(Kunkel(1985) "快速和高效的位点特异的诱变而没有表现型选择" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492;Kunkel等人(1987) "快速和高效的位点特异的诱变而没有表现型选择" *Methods in Enzymol.* 154,367-382;和Bass等人(1988) "具有新DNA-结合特异性的突变体Trp抑制剂" *Science* 242:240-245);寡核苷酸定向的诱变(*Methods in Enzymol.* 100:468-500(1983);*Methods in Enzymol.* 154:329-350(1987);Zoller & Smith(1982) "使用M13-来源载体的寡核苷酸定向诱变:在任何DNA片段中产生点突变的高效和普通的方法" *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500;Zoller & Smith(1983) "克隆进M13载体的DNA片段的寡核苷酸定向诱变" *Methods in Enzymol.* 100:468-500;和Zoller & Smith(1987) "寡核苷酸定向的诱变:使用两个寡核苷酸引物和单链DNA模板的简单方法" *Methods in Enzymol.* 154:329-350);硫代磷酸盐-修饰的DNA诱变(Taylor等人(1985) "在限制性酶反应中使用硫代磷酸盐-修饰的DNA以制备缺口DNA" *Nucl. Acids Res.* 13:8749-8764;Taylor等人(1985) "在高频使用硫代磷酸盐-修饰的DNA下快速产生寡核苷酸定向的突变" *Nucl. Acids Res.* 13:8765-8787(1985);Nakamaye(1986) "硫代磷酸盐基团裂解限制性核酸内切酶Nci I的

抑制及其在寡核苷酸定向诱变中的应用" Nucl.Acids Res.14:9679-9698;Sayers 等人 (1988) " Y-T 核酸外切酶在硫代磷酸盐 - 为基础的寡核苷酸定向诱变中" Nucl.Acids Res.16:791-802;和 Sayers 等人 (1988) " 含硫代磷酸盐的 DNA 通过与限制性核酸内切酶反应,在存在溴化乙锭情况下的链特异裂解" Nucl.Acids Res.16:803-814);使用缺口双链 DNA 的诱变 (Kramer 等人 (1984) " 寡核苷酸定向的突变构建物的缺口双链体 DNA 方法" Nucl.Acids Res.12:9441-9456;Kramer & Fritz(1987)Methods in Enzymol." 经缺口双链体 DNA 的寡核苷酸定向的突变构建" 154:350-367;Kramer 等人 (1988) " 在寡核苷酸定向的突变构建缺口双链体 DNA 方法中改善的体外酶反应" Nucl.Acids Res.16:7207;和 Fritz 等人 (1988) " 寡核苷酸定向的突变构建:无体外酶反应的缺口双链体 DNA 法" Nucl.Acids Res.16:6987-6999)。

[0313] [00258] 用在本发明方法中的另外方案包括点错配修复 (Kramer(1984) " 点错配修复" Cell 38:879-887)、使用修复缺陷的宿主菌株诱变 (Carter 等人 (1985) " 使用 M13 载体的改良寡核苷酸位点定向的诱变" NucleicAcids Res.13:4431-4443;和 Carter(1987) " 使用 M13 载体的改良寡核苷酸定向的诱变" Methods in Enzymol.154:382-403)、删除诱变 (Eghtedarzadeh(1986) " 使用寡核苷酸产生大片段删除" Nucleic AcidsRes.14:5115)、限制性选择和限制性选择和限制性纯化 (Wells 等人 (1986) " 在枯草杆菌蛋白酶稳定转变态过程中氢键形成的重要性" Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317:415-423)、通过总基因合成的诱变 (Nambiar 等人 (1984) " 核糖核酸酶 S 蛋白编码基因的总合成和克隆" Science 223:1299-1301;Sakamar 和 Khorana(1988) " 牛柱状外侧片段鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 (转导蛋白) α 亚单位基因的总合成和表达" Nucl.Acids Res.14:6361-6372;Wells 等人 (1985) " 盒式诱变:在限定位点产生多突变的高效方法" Gene 34:315-323;和 Grundstrom 等人 (1985) " 通过微小规模'鸟枪'基因合成进行寡核苷酸定向的诱变" Nucl.Acids Res.13:3305-3316)、双链断裂修复 (Mandecki(1986);Arnold(1993) " 异常环境的蛋白工程" Current Opinion in Biotechnology 4:450-455. " 埃希氏大肠杆菌质粒中寡核苷酸定向的双链断裂修复:位点特异的诱变方法" Proc.Natl.Acad.Sci.USA,83:7177-7181)。上述许多方法的其他细节可以在 Methods inEnzymology 154 卷中发现,它也描述了用各种诱变方法对消除故障问题的有效控制。也见,美国专利 No. 5,605,793, Stemmer(Feb. 25,1997), " 体外重组方法";美国专利第 No. 5,811,238, Stemmer 等人 (Sep. 22,1998) " 通过重复选择和重组产生具有所需特征的多核苷酸的方法";美国专利 No. 5,830,721, Stemmer 等人 (Nov. 3,1998), " 通过随机分割和重新组装的 DNA 诱变";美国专利 No. 5,834,252, Stemmer 等人 (Nov. 10,1998) " 末端互补聚合酶反应";美国专利 No. 5,837,458, Minshull 等人 (Nov. 17,1998), " 细胞和代谢工程的方法和组合物";WO 95/22625, Stemmer 和 Cramer, " 通过随机分割和重新组装的诱变";Stemmer 和 Lipschutz 的 WO 96/33207 " 末端互补聚合酶链反应";Stemmer 和 Cramer 的 WO97/20078 " 通过重复选择和重组产生具有所需特征的多核苷酸的方法";Minshull 和 Stemmer 的 WO 97/35966, " 细胞和代谢工程的方法和组合物";Punnonen 等人的 WO 99/41402 " 基因疫苗载体的靶向";Punnonen 等人的 WO 99/41383 " 抗原文库 Immunization";Punnonen 等人的 WO99/41369 " 基因疫苗载体工程";Punnonen 等人的 WO 99/41368 " 基因疫苗免疫调节特性的最优化";Stemmer 和 Cramer 的 EP 752008, "

通过随机分割和重新组装的 DNA 诱变” ;Stemmer 的 EP 0932670” 通过递归序列重组进化细胞 DNA 摄取” ;Stemmer 等人的 WO 99/23107, ” 通过病毒基因组改组改变病毒的趋化运动和宿主范围” ;Apt 等人的 WO 99/21979, ” 人类乳头瘤病毒载体” ;del Cardayre 等人的 WO 98/31837” 通过递归序列重组进化全细胞和生物体” ;Patten 和 Stemmer 的 WO 98/27230, ” 多肽工程的方法和组合物” ;Stemmer 等人的 WO 98/27230, ” 通过递归序列改组和选择最优化基因治疗的方法”, WO 00/00632, ” 产生高度多样化文库的方法”, WO 00/09679, ” 获得体外重组的多核苷酸序列库并得到序列的方法”, Arnold 等人的 WO 98/42832, ” 使用随机或指定引物重组多核苷酸序列”, Arnold 等人的 WO 99/29902, ” 产生多核苷酸和多肽序列的方法”, Vind 的 WO 98/41653, ” 构建 DNA 文库的体外方法”, Borchert 等人的 WO 98/41622, ” 使用 DNA 改组构建文库的方法” 及 Pati 和 Zariing 的 WO 98/42727, ” 使用同源重组改变序列”。

[0314] [00259] 某些美国申请提供了有关各种差异产生方法的其他细节,包括 Patten 等人的” 密码子改组改变基因”, 于 1999 年 9 月 28 日提交(美国系列号 No. 09/407, 800); del Cardayre 等人的” 通过递归序列重组进化全细胞和生物体”, 于 1998 年 7 月 15 日(美国系列号第 09/166, 188) 和 1999 年 7 月 15 日(美国系列号第 09/354, 922) 提交; Cramer 等人的” 寡核苷酸介导的核酸重组”, 于 1999 年 9 月 28 日提交(美国系列号 No. 09/408, 392), 和 Cramer 等人的” 寡核苷酸介导的核酸重组”, 于 2000 年 1 月 18 日归档(PCT/US00/01203); Welch 等人的” 使用密码子改变的寡核苷酸合成合成的改组”, 于 1999 年 9 月 28 日提交(美国系列号 No. 09/408, 393); Selifonov 等人的” 制造字符串、多核苷酸和具有所需特征的多肽的方法”, 于 2000 年 1 月 18 日提交(PCT/US00/01202) 和, 例如 Selifonov 等人的” 制造字符串、多核苷酸和具有所需特征的多肽的方法”, 于 2000 年 1 月 18 日提交(美国系列号第 09/618, 579); Selifonov 和 Stemmer 的” 构成用于模拟进化的数据结构的方法”, 于 2000 年 1 月 18 日提交(PCT/US00/01138); 和 Affholter 的” 单链核酸模板介导的重组和核酸片段分离”, 于 2000 年 9 月 6 日提交(美国系列号 No. 09/656, 549)。

[0315] [00260] 非随机或” 定向的进化” 方法包括, 如, 饱和诱变(GSSM)、合成的连接重新组装(SLR), 或它们的组合, 它们被用于修饰本发明的核酸以产生新的或改变特性(如, 在高度酸性或碱性条件下、高温下的活性, 和类似活性)的肌醇六磷酸酶。被修饰核酸编码的多肽可以在测试前筛选肌醇六磷酸酶活性或其它活性。可以使用任何检测形式或方案, 如使用毛细管阵列平台。见, 如, 美国专利第 6, 280, 926 ;5, 939, 250。

[0316] 饱和诱变或 GSSM

[0317] [00261] 在本发明的一个方面, 非随机基因修饰、” 定向的进化加工” 被用来产生具有新的或改变的特性的肌醇六磷酸酶。此方法的变化被称作” 基因位点饱和诱变”、” 位点饱和诱变”、” 饱和诱变” 或简单地” GSSM”。它可以与其它诱变过程一起使用。见, 如美国专利 No. 6, 171, 820 ;6, 238, 884。一方面 GSSM 包括: 提供模板多核苷酸和多个寡核苷酸, 其中每一个寡核苷酸含有与模板多核苷酸类似的序列, 从而靶向模板多核苷酸的特定序列和同源基因变异体的序列; 通过用寡核苷酸复制模板多核苷酸产生含有非随机序列变化的子代多核苷酸, 从而产生含类似基因序列变化的多核苷酸。

[0318] 合成的连接重新组装(SLR)

[0319] [00262] 本发明提供了非随机基因修饰系统,称作“合成的连接重新组装”或简称“SLR”,“定向的进化加工”以产生具有新的或改变的特性的肌醇六磷酸酶。SLR是非随机地将寡核苷酸片段连接在一起的方法。此方法不同于随机寡核苷酸改组,因为核酸构件不是随机地改组、连接或嵌合化,而是非随机地装配。见,如美国专利申请序列No. (USSN) 09/332,835 名为“定向进化中合成的连接重新组装”,在1999年6月14日提交(“USSN 09/332,835”)。在一个方面,SLR包括以下步骤:(a) 提供模板多核苷酸,其中模板多核苷酸含有编码同源基因的序列;(b) 提供多量构件模块多核苷酸,其中构件模块多核苷酸被设计在预先确定的序列上与模板多核苷酸交叉地重新组装,且构件模块多核苷酸含有同源基因变异体的序列和与模板多核苷酸侧向变异体序列类似的序列;(c) 结合构件模块多核苷酸与模板多核苷酸,使构件模块多核苷酸与模板多核苷酸交叉地重新组装,以产生含类似基因序列变化的多核苷酸。

[0320] [00263] SLR不依赖于要重新排列的多核苷酸间存在高水平的同源性。因此,此方法可用来非随机地产生由超过 10^{100} 的不同嵌合体组成的子代分子文库(或系列)。SLR可用于产生由超过 10^{1000} 的不同子代嵌合体组成的文库。因此,本发明的方面包括产生一组最终嵌合的核酸分子的非随机方法,核酸分子具有通过设计选择的总体组合顺序。此方法包括以下步骤:通过设计产生多个特异的核酸构件模块,具有有用的相互兼容的可连接末端,和装配这些核酸构件模块获得设计的总体组合顺序。要装配的核酸构件的相互兼容可连接末端被认为对此型已安排的装配是“有用的”,如果它们不能以预先确定顺序连接构件模块。因此,核酸构件模块被连接的总体组合顺序是通过设计可连接末端而指定的。如果要使用超过一个的组合步骤,那么核酸构件模块被连接的总体组合顺序也是由组合步骤的连续顺序指定的。在一个方面,用酶如连接酶(如T4DNA连接酶)处理退火的构件以获得构件的共价连接。在一个方面,称作合成的连接重新组装(SLR)的非随机方法多少涉及随机改组,只是核酸构件模块不是随机地滑行或连接或嵌合化,而是非随机地装配,可以用来创造变异体。

[0321] [00264] SLR方法不依赖于要改组的多核苷酸间存在高水平的同源性。本发明可用来非随机地产生由超过 10^{100} 的不同嵌合体组成的子代分子文库(或系列)。令人信服地,SLR甚至可以用来产生由超过 10^{1000} 的不同子代嵌合体组成的文库。

[0322] [00265] 因此,在一个方面,本发明提供了产生一组具有通过设计选择的总体组合顺序的最终嵌合的核酸分子的非随机方法,核酸分子具有通过设计选择的总体组合顺序,该方法的步骤如下:通过设计产生多个特异的核酸构件模块,具有有用的相互兼容的可连接末端,和装配这些核酸构件模块获得设计的总体组合顺序。

[0323] [00266] 要装配的核酸构件模块的相互兼容可连接末端被认为对此型已安排的装配是“有用的”,如果它们不能以预先确定的顺序连接构件模块。因此,一方面,核酸构件模块被连接的总体组合顺序是通过设计可连接末端而指定的,如果要使用超过一个的组合步骤,那么核酸构件被连接的总体组合顺序也是由组合步骤的连续顺序指定的。一方面,用酶如连接酶(如T4DNA连接酶)处理退火的构件以获得构件的共价连接。

[0324] [00267] 另一方面,核酸构件模块的设计是通过分析一组原始核酸模板的序列而获得的,核酸模板是产生最终嵌合的一组子代核酸分子的基础。因此这些原始核酸模板作为序列信息的来源帮助设计要被诱变即嵌合化或改组的核酸构件模块。

[0325] [00268] 在一个范例中,本发明提供了相关基因家族的嵌合作用及其编码的相关产物家族。在特定的范例中,编码的产物是酶。用于本发明中的酶和多肽可以按照这里描述的方法被诱变。

[0326] [00269] 因此按照本发明的一个方面,众多原始核酸模板的序列被排列以选择一个或多个划分点,该划分点可以位于同源区。划分点可用来描绘要产生的核酸构件模块的边界。因此,在原始分子中确定和选择的划分点作为子代分子装配中潜在的嵌合作用点。

[0327] [00270] 典型地,有用的划分点是至少由两个原始模板共享的同源区(包括至少一个同源的核苷酸碱基),但划分点可以是至少由一半原始模板、至少三分之二原始模板、至少四分之三原始模板或几乎所有的原始模板共享的同源区。在一个方面,有用的划分点是被所有原始模板共享的同源区。

[0328] [00271] 一方面,为产生详尽的文库彻底地进行连接重新组装过程。换句话说,核酸构件模块所有可能的顺序组合都呈现在最终嵌合的一组核酸分子中。同时,每一个组合中的组装顺序(即每一个构件模块以每个最终嵌合的核酸的5'至3'的组装顺序)是被设计的(或非随机的)。由于方法的非随机性质,多余副产物的可能性大大减低了。

[0329] [00272] 另一方面,方法规定,例如为了产生系统划分的文库,可系统的执行连接重新组装过程,使用系统被筛选的单元,如逐个地。换句话说本发明规定,经选择性和理智的使用特定的核酸构件模块,联合选择性和理智的使用连续步骤的组合反应,可以获得实验设计,其中在数个反应瓶的每一个中制造了特定系列的子代产物。这可以系统地检查和筛选要进行的方法。因此,它使潜在地非常大量的子代分子可以在较小的集团内被系统地检验。

[0330] [00273] 由于其具有高度灵活而详尽及系统的方式进行嵌合作用的能力,特别是当原始分子间的同源水平较低时,本发明提供产生含大量子代分子的文库(或集合)。由于本发明的连接重新组装的非随机性,产生的子代分子可以包括具有通过设计选择的总体组合顺序的最终嵌合的核酸分子文库。在特别地方面,这样产生的文库含有超过 10^3 至超过 10^{1000} 的不同子代分子种类。

[0331] [00274] 一方面,一组如所述产生的最终嵌合核酸分子包括编码多肽的多核苷酸。按照一个方面,此多核苷酸是基因,它可以是人造的基因。按照另一个方面,此多核苷酸是基因通路,它可以是人造的基因通路。本发明规定,一个或多个本发明产生的人造基因可并入人造的基因通路,如在真核细胞生物体(包括植物)中可操作的通路。

[0332] [00275] 在另一个范例中,产生构件模块步骤的合成特性可以设计和引导核苷酸(如,一个或多个核苷酸,其可以是例如密码子或内含子或调控序列),它可以在以后任选地移到体外过程(如,通过诱变)或体内过程(如,通过应用宿主生物体的基因剪接能力)。可以理解,在许多情况下,为了许多其它的原因,诱导这些核苷酸可能也是需要的,除了潜在的产生有用划分点的益处以外。

[0333] [00276] 因此,按照另一个方面,本发明规定核酸构件模块可以用于引导内含子。于是,本发明规定功能性内含子可被导入本发明的人造基因中。被发明还规定,功能性内含子可被导入发明的人造基因通路中。因此,本发明提供产生嵌合的多核苷酸,它是含一个(或以上)人为引导的内含子的人造基因。

[0334] [00277] 因此,本发明还提供产生嵌合的多核苷酸,它是含一个(或以上)人为引

导的内含子的人造基因通路。在一个方面,人工诱导的内含子在一个或多个宿主细胞中的基因剪接中是有功能的,大多是以天然存在的内含子在基因剪接中起作用的方式。本发明提供了产生人造的含内含子的多核苷酸的过程,多核苷酸被导入宿主生物体以重组和/或剪接。

[0335] [00278] 用本发明产生的人造基因也可作为与另一个核酸重组的底物。同样地,用本发明产生的人造基因通路也可作为与另一个核酸重组的底物。在一个方面,重组被促进,或发生在人造的含内含子基因和作为重组伴侣的核酸之间的同源区。在一个方面,重组伴侣也可以是发明产生的核酸,包括人造基因或人造的基因通路。重组可被促进或可发生在同源区,后者存在于人造基因中一个(或更多)人为引导的内含子上。

[0336] [00279] 本发明的合成的连接重新组装方法使用多个核酸构件模块,其中每一个可有二个可连接末端。每一个核酸构件模块上的二个可连接末端可以是二个平末端(即每一个的突出核苷酸为0),或一个平末端和一个突出端,或二个突出端。

[0337] [00280] 为此目的有用的突出可以是3'突出或5'突出。因此,核酸构件模块可以有3'突出端、或可选择地5'突出端、或可选择地二个3'突出端、或可选择地二个5'突出端。核酸构件模块被组装形成最终嵌合核酸分子的总体顺序是由有目的的实验设计确定的,而不是随机的。

[0338] [00281] 一方面,核酸构件模块是两个单链核酸(也称作单链寡体)通过化学合成产生的,并接触它们以令其退火形成双链的核酸构件模块。

[0339] [00282] 双链的核酸构件模块的大小可以是可变的。这些构件模块的大小可以是小的或大的。实例的构件模块大小范围从1个碱基对(不包括任何突出)至100,000个碱基对(不包括任何突出)。也提供了其它大小范围,其低限从1bp至10,000bp(包括中间所有的整数值),上限从2bp至100,000bp(包括中间所有的整数值)。

[0340] [00283] 存在许多可以产生双链的核酸构件模块的方法,对本发明是有用的;这些在本领域是已知的且可容易地被专业技术人员执行。

[0341] [00284] 按照一个方面,双链的核酸构件模块通过下面的步骤产生,首先产生两个单链的核酸,并使它们退火形成双链的核酸构件模块。双链核酸构件模块的两个链可以在所有核苷酸上是互补的,除形成突出的任何核苷酸以外;因此除任何突出外不含错配。按照另一个方面,双链核酸构件的两个链可以在少于所有核苷酸上是互补的,除形成突出的任何核苷酸以外。因此,按照此方面,双链的核酸构件模块可用于导入密码子简并。在一个方面,使用这里描述的位点饱和诱变,用一个或多个N, N, G/T盒或可选择地用一个或多个N, N, N盒诱导密码子的简并。

[0342] [00285] 本发明的体内重组方法可以在未知杂交物或特定多核苷酸的等位基因或序列池上盲目地进行。但是,不必要知道特定多核苷酸的实际DNA或RNA序列。

[0343] [00286] 在混合的基因总体中使用重组的方法可用于产生任何有用的蛋白,例如白介素I、抗体、tPA和生长激素。此方法可用于产生具有改变的特异性或活性的蛋白。此方法还可用于产生杂交的核酸序列,例如启动子区、内含子、外显子、增强子序列、基因的3'非翻译区或5'非翻译区。因此,此方法可用于产生表达率增高的基因。此方法还可用于研究DNA序列的重复性。最后,此方法可用于改变核糖酶或相似法则。

[0344] [00287] 一方面,这里描述的多核苷酸变异体和多肽通过使用重复循环的还原重

排、重组和选择而获得,它使高度复杂的线形序列如经过重组的 DNA、RNA 或蛋白定向的分子进化。

[0345] [00288] 分子在体内的改组被用来提供变异体,并能够应用细胞的天然特性进行以重组多聚体。虽然重组已在体内提供了分子差异的主要天然路径,但基因重组仍然是相对复杂的过程,涉及 1) 识别同源性;2) 裂解链、侵入链、和引起重组体交叉产生的代谢步骤;和最后 3) 将交叉溶入离散的重组分子中。交叉的形成需要识别类似的序列。

[0346] [00289] 另一方面,本发明包括从至少第一个多核苷酸和第二个多核苷酸中产生杂交多核苷酸的方法。本发明可用于通过引导至少第一个多核苷酸和第二个多核苷酸进入适合的宿主细胞而产生杂交的多核苷酸,第一和第二个多核苷酸具有至少一个部分序列同源区(如,SEQ IDNO:1)。部分序列同源区可促进引起产生杂交多核苷酸的序列重新排列的过程。如这里所用的术语“杂交的多核苷酸”,是来自本发明方法的任何核苷酸序列,含有来自至少两个原始多核苷酸序列的序列。这种杂交的多核苷酸可来自促进 DNA 分子间序列整合的分子间重组事件,另外,这种杂交的多核苷酸可来自应用重复序列的分子内还原重排处理,以改变 DNA 分子中的核苷酸序列。

[0347] [00290] 本发明提供了产生杂交多核苷酸的方法,它可编码生物学活性的杂合多肽(如,杂交的肌醇六磷酸酶)。一方面,原始的多核苷酸编码生物学活性的多肽。本发明的方法通过应用细胞加工产生新的杂合多肽,细胞加工整合原始多核苷酸的序列,使得到的杂交多核苷酸编码的多肽显示来自原始生物学活性多肽的活性。例如,原始的多核苷酸可编码来自不同微生物的特定的酶。被来自一个生物体或变异体的第一个多核苷酸编码的酶,例如,可在特定的环境条件如高盐度下有效地起作用。被来自不同生物体或变异体的第二个多核苷酸编码的酶,可在不同的环境条件如极高温度下有效地起作用。含有来自第一和第二个原始多核苷酸序列的杂交多核苷酸可编码酶,具有由原始多核苷酸编码的两个酶的特征。因此,由杂交多核苷酸编码的酶可在第一和第二个多核苷酸编码的每一个酶所具有的环境条件下有效地起作用,如,高盐度和极度温度下。

[0348] [00291] 除了上面描述的各种方法,各种方法为本领域所知,可用于获得增加了酶特性的杂交多核苷酸。下面的实例举例说明应用这些方法通过诱变编码目的野生型酶的多核苷酸获得热稳定的或耐热的酶。

[0349] [00292] 例如, M. Lehmann 等人(在 *Biochimica et Biophysica Acta* 1543: 408-415, 2000 中)描述了“一致性方法”,其中同源的真菌肌醇六磷酸酶序列排列被用来计算一致的肌醇六磷酸酶氨基酸序列。在构建相应的一致基因、重组体表达和纯化的过程中,获得了重组的肌醇六磷酸酶显示伸展温度(T_m)为 15-22°C,高于设计中使用的所有亲代肌醇六磷酸酶。编码重组体蛋白的基因的位点定向的诱变被用来进一步提高 T_m 值至 90.4°C。热稳定作用是由于分布于整个蛋白序列的多氨基酸交换的组合,并主要地影响表面暴露的残基。

[0350] [00293] 另一个获得具有提高热特性的酶的方法被 L. Jermutus 等人(*J. of Biotechnology* 85:15-24, 2001)描述。在此方法中,土曲霉(*Aspergillus terreus*)肌醇六磷酸酶表面上的离子相互作用和氢键被首先被恢复,相当于来自黑曲霉的类似但更热稳定的酶中存在的相互作用和氢键。然后在同一区内替换整个二级结构单元,并根据黑曲霉肌醇六磷酸酶的晶体结构。用相应的黑曲霉肌醇六磷酸酶延伸体置换土曲霉菌属肌醇六磷

酸酶表面上的一个 α -螺旋,得到以结构为基础的嵌合酶(融合蛋白),其热稳定性改善而酶活性不改变。

[0351] [00294] 而另一个方法被 L.Giver 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :12809-12813,1998) 图解,其中在编码枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)p- 硝基苄基酯酶的多核苷酸的诱变 PCR 中,随机诱变诱导六代,然后根据 Stemmer 的方法通过体外重组得到了重组体酯酶,其热稳定性增加 (T_m 升高超过 14°C) 而在较低温度下不损害催化活性。

[0352] [00295] C. Vetriani 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :12300-12305,1998) 描述了一种方法,其中以同源性为基础的建模方法和来自嗜嗜热菌 (*Pyrococcus furiosus*) 和 (*Thermococcus litoralis*) 的六谷氨酸酯脱氢酶的直接结构比较用来确定关键的热稳定化特性,两种细菌的最佳生长温度分别为 100°C 和 88°C 。在较不稳定的酶中观察到实质上被还原的亚单位间离子对网格通过诱变其中的两个残基而被改变,以恢复更稳定的酶中发现的相互作用。尽管任何单一的突变对热稳定性具有不利的影响,但具有适当位置上的两个突变,可观察到在 104°C 超过野生型酶 4 倍的稳定性改善。

[0353] A. Tomschy 等人 (Protein Science 9 :1304-1311,2000) 描述了使用黑曲霉肌醇六磷酸酶 (2.5 埃德分辨率) 的晶体结构来表示酶的所有活性位点的方法。然后使用多个氨基酸序列的排列来表示非保守活性残基,该残基可能与指定的目标有利的特性有关。使用这种方法,烟曲霉肌醇六磷酸酶的 Gln27,不同于黑曲霉的 Leu27,被鉴定认为可能参与底物结合和 / 或释放,并是引起烟曲霉肌醇六磷酸酶较低的比活性的原因 (26.5 比 1966U/mg 蛋白, pH 5.0)。烟曲霉肌醇六磷酸酶的 Gln27 向 Leu 的位点定向诱变可将突变酶的比活性增加至 92.1U/mg 蛋白。

[0354] [00297] 一方面,本发明提供了产生稳定的具有肌醇六磷酸酶活性的水溶液制剂的方法 (及其产物),该制剂对酶活性的热灭活具有较高的抵抗性,并可在延长的储存期间保留其肌醇六磷酸酶活性。液体制剂可通过加入尿素和 / 或多元醇如山梨醇和甘油作为稳定剂被稳定。也提供了对单胃动物的喂养制剂及其产生方法,它们是使用这样稳定的水溶液制剂获得的。关于这样的方法的其他细节可见公开发表的文献和 / 或是专业技术人员已知的。在一个非限制的实例中,这种公开可获得的文献包括 EP 0626010 (WO 9316175A1) (Barendse 等人),尽管公开可获得的文献中的参考文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0355] [00298] 原始多核苷酸编码的酶包括,但不限于水解酶和肌醇六磷酸酶。可从本发明的方法中获得的杂合多肽具有在原始酶中不显示的特殊酶活性。例如,在编码水解酶活性的多核苷酸重组和 / 或还原重排后,得到的由杂合多核苷酸编码的杂合多肽被筛选来自每个原始酶的特殊水解酶活性,即水解酶作用的键的类型和水解酶发挥功能的温度。因此,例如,水解酶可被筛选以明确那些可区分杂合水解酶与原始水解酶的化学功能基,如: (a) 酰胺 (肽键),即蛋白酶; (b) 酯键,即酯酶和脂肪酶; (c) 乙缩醛,即糖苷酶和例如,杂合多肽作用的温度, pH 或盐浓度。

[0356] [00299] 原始多核苷酸的来源可分离自个别生物体 ("分离物"),已经生长在限定培养基中的生物体集合 ("富集培养物"),或未处理的生物体 ("环境样品")。应用非培养的方法从环境样品中获得新生物活性的编码多核苷酸,如耐稳定性或耐热性,可用来获得未破坏的生物多样性资源。

[0357] [00300] "环境文库" 是从环境样品中产生的,代表天然产生的生物体的基因组

集合,这些生物体被归入可在合适的原核生物宿主中增殖的克隆载体中。因为被克隆的 DNA 最初直接从环境样品中提取,文库不限制于可在纯培养物中生长的小部分原核生物。另外,存在这些样品中的环境 DNA 的标准化可更等同的代表原始样品中存在的所有种属的 DNA。这可极大程度地增加从样品的最小组分中发现目的基因的效率,与优势种属相比该组分的出现小几个数量级。

[0358] [00301] 例如,从一个或多个未处理的微生物体产生的基因文库被筛选目标的活性。首先在真核细胞中以基因表达文库的形式俘获编码生物活性目标分子的潜在通路。编码目标活性的多核苷酸从这些文库中分离,并导入至一个宿主细胞中。宿主细胞生长在可促进重组和 / 或还原重排的条件下,可产生具有新的或增强活性的潜在活性生物分子。

[0359] [00302] 可从中制备多核苷酸的微生物包括原核生物微生物,如 *Xanthobacter*, 真细菌 *Eubacteria* 和古细菌 *Archaeobacteria*, 和更低等的真核生物微生物如真菌,一些藻类和原生动物。多核苷酸可从环境样品中被分离,其中可收获核酸而不需培养生物体或从一个或多个培养的生物体中收获。在一个方面,这种微生物可以是嗜极性微生物,如嗜热微生物、嗜寒微生物、psychrotrophs、嗜盐菌、嗜压微生物和嗜酸菌。可使用从嗜极性微生物中分离的编码酶的多核苷酸。这些酶可在陆地上的温泉和深海的热喷发口中在大约 100°C 以上的温度下,在北极水域中 0°C 以下的温度,在死海的饱和盐环境中,在煤炭沉积物和富硫的地热温泉中 0 左右的 pH 值下,或在污泥中大于 11 的 pH 值下起作用。例如,从嗜极性微生物中克隆和表达的几种酯酶和脂肪酶显示在很宽的温度和 pH 范围中具有很高的活性。

[0360] [00303] 如上所述选择和分离的多核苷酸被导入至一个合适的宿主细胞中。合适的宿主细胞可以是任何能够促进重组和 / 或还原重排的细胞。选择的多核苷酸可在包含适当控制序列的载体中。宿主细胞可以是一个高等的真核细胞,如哺乳动物细胞,或低等的真核细胞,如酵母细胞,或宿主细胞可以是真核细胞,如细菌细胞。将构建物导入至宿主细胞中可通过磷酸钙转染,DEAE-葡聚糖介导的转染,或电穿孔来作用 (Davis 等人,1986)。

[0361] [00304] 作为适当宿主的代表性实例,可以提及:细菌细胞,如大肠杆菌,链霉菌,鼠伤寒沙门氏菌;真菌细胞,如酵母;昆虫如果蝇 S2 和 *Spodoptera Sf9*;动物细胞如 CHO, COS 或 Bowes 黑色素瘤;腺病毒;和植物细胞。合适宿主的选择被认为通过在此的讲授可处在本领域专业技术人员的范围内。

[0362] [00305] 现在使用的大多数生物活性化合物来自土壤微生物。居住在土壤中的许多微生物和其他复杂的生态群落产生了大量的可增加其生存和增殖能力的化合物。这些化合物通常被认为是微生物生长非必须的,并可在参与中间产物新陈代谢的基因的辅助下被合成,因此它们的名称是—“第二代谢物”。第二代谢物通常是复杂的生物合成通路的产物,经常来自普通的细胞前体。影响其他生物体的生长或生存的第二代谢物被认为是“生物活性”化合物,并作为微小和巨大生物体的化学防御工厂的关键组分。人类可将这些化合物开发成抗生素,康感染和具有对抗很宽范围的原核生物和真核生物病原体活性的其他生物活性化合物。大约 6,000 个微生物来源的生物活性化合物已经被定性,大约 60% 以上从链菌属的革兰氏阳性土壤细菌产生的。(Bames 等人,Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 91, 1994)。

[0363] [00306] 采用高密度滤膜或生物淘选的杂交筛选已经证明了一种检测含目的基因通路的同源性的有效方法,以发现没有已知对应物的新的生物活性分子。一旦目的多核苷酸在克隆的文库中被富集,就需要筛选活性。例如,需要筛选小分子环状结构或“主链”的

表达。由于编码这些多环结构的基因经常可以在大肠杆菌中被表达,因此小分子主链可以被制造,即使以无活性的形式。通过将分子或通路传递至合适的宿主中赋予其生物活性,该宿主表达必需的可修饰或“装饰”结构成为其活性形式的糖基化和甲基化基因。因此,即使是无活性的环状化合物,其在大肠杆菌中的重组表达被检测以鉴别克隆,然后传送至代谢充足的宿主如链霉菌属(如,diversae 链霉菌或委内瑞拉链霉菌)以随后产生生物活性分子。应该理解的是大肠杆菌可产生活性的小分子,在某种情况下可能需要将克隆传送至代谢充足的宿主中以装饰结构,但不是必需的。使用高通量自动系统可在微量滴定板的多路阵列中筛选几十万个克隆。

[0364] [00307] 发明的核酸可在任何体外或体内表达系统中被表达,或过度表达。任何细胞培养系统都可被应用来表达或过度表达,重组蛋白,包括细菌,昆虫,酵母,真菌或哺乳动物培养物。过度表达可受适当选择启动子,增强子,载体(如,使用复制子载体, dicistronic 载体(如,见 Gurtu(1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229 :295-8)),培养基,培养系统和类似物而受影响。在一个方面,可采用在细胞系统中使用选择标记物,如谷氨酰胺合成酶(如,见 Sanders(1987) *Dev. Biol. Stand.* 66 :55-63)的基因扩增来过度表达发明的多肽。

[0365] [00308] 多种哺乳动物细胞培养系统可用来表达重组蛋白,哺乳动物表达系统的实例包括猴肾成纤维细胞的 COS-7 系,其描述见“SV40-转化的猿细胞支持早期 SV40 突变体的复制”(Gluzman,1981),和其他能够表达相容性载体的细胞系,例如, C127, 3T3, CHO, HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体将包含一个复制起始点,合适的启动子和增强子,也包含任何必需的核糖体结合位点,多聚腺苷化位点,剪接供体和受体位点,转录终止序列, 5' 侧向非转录序列。来自 SV40 剪接的 DNA 序列,和多聚腺苷化位点可用来提供所需的非转录基因元件。

[0366] [00309] 含有目的多核苷酸的宿主细胞可培养在常规的营养培养基中,该培养基被修饰以适合激活启动子,选择转化体或扩增基因。培养条件,如温度,pH 和其他条件是以前用于选择宿主表达的条件,对普通的技术人员是很明显的。被鉴定具有特异酶活性的克隆然后被测序以鉴定编码具有增强活性的酶的多核苷酸序列。

[0367] [00310] 本发明的酶和多核苷酸以分离的形式提供或被纯化为均一物质。发明的肌醇六磷酸酶多肽可采用几种标准方法中的任何一种来获得。例如,肌醇六磷酸酶多肽可在一个标准的重组表达系统中产生(如在此所述),化学合成(尽管有点限制于小肌醇六磷酸酶肽片段),或从它们天然表达的生物体中纯化。可使用的重组表达方法包括哺乳动物宿主和微生物宿主和植物宿主。

[0368] [00311] 发明肌醇六磷酸酶分子的重组表达,或过度表达可与一种或多种其他的分子,如例如其他酶一起来获得。这种方法可用于产生重组产物,如含有此肌醇六磷酸酶分子的植物或部分植物以及一个或多个其他分子——肌醇六磷酸酶分子和其他分子用于组合的处理中。得到的重组表达分子可以均一化和/或纯化的形式或可选择的相对未纯化形式来使用(如,当与其他食品混合以催化肌醇六磷酸盐的降解时,可作为可食用的植物部分)。

[0369] [00312] 本发明提供了一种在宿主中表达的重组酶。本发明提供了一种实质上纯的肌醇六磷酸酶。因此,本发明的酶可以是一种重组酶,天然酶或一种合成酶,或一种重组

酶。

[0370] [00313] 在一个特殊的方面,本发明提供了在转基因植物或植物器官中的表达和产生它的方法。在能够引导肌醇六磷酸酶表达的调控序列的控制下,含有肌醇六磷酸酶编码基因的 DNA 表达构建物被提供用于植物的转化。这些调控序列包括能够引导植物中转录的序列,可以是结构性的,或是以阶段和 / 或组织特异性的方式。

[0371] [00314] 表达的方式部分依赖于使用植物或其部分。本发明提供的转基因植物和植物器官可用于多种工业过程,可直接的,如用于动物饲养中或可选择地,表达的肌醇六磷酸酶被提取,如果需要,在应用前纯化。可选择地,重组的宿主植物或部分植物可直接使用。在一个特殊的方面,本发明提供了使用含有增加量肌醇六磷酸酶的种子来催化肌醇六磷酸盐水解反应的方法。本方法涉及用含肌醇六磷酸盐底物接触转基因的非野生型种子,如以基本形式或嚼碎的形式,并使种子中的酶增加反应的速率。通过直接将种子加入至含肌醇六磷酸盐的底物中,发明对提取和纯化酶的昂贵的和有问题的过程提供了一种溶液。在一个实例中,本发明提供了处理的方法,其中以含增加量酶的种子的形式将酶给予缺乏足够供应量酶的生物体。在一个方面,将酶给予生物体的时间与含肌醇六磷酸盐食物的摄取协调起来。

[0372] [00315] 植物中肌醇六磷酸酶的表达可通过多种方法来达到。特殊地,例如有多种技术可转化大量的植物种属,包括双子叶类(如烟草,马铃薯,番茄,矮牵牛花,芸苔)。另外,例如有许多在植物中表达外源基因的策略。另外,仍然从植物基因中鉴定了许多调控序列,它们用于构建在植物和植物细胞中表达作用的嵌合基因(如 Klee 等人,1987 ;dark 等人,1990 ;Smith 等人,1990)。

[0373] [00316] 可采用几种技术将基因构建物导入植物中,包括用根癌土壤杆菌或生根土壤杆菌转化。可以被如此转化的植物组织的非限制实例包括原生质体、小孢子或花粉、和外植体如叶、茎、根、胚轴和子叶(cotyls)。而且,通过微注射、电穿孔、微粒轰击和直接 DNA 摄取可以直接将 DNA 导入原生质体和植物细胞或组织中。

[0374] [00317] 蛋白可通过多种表达系统被导入至植物中。例如,使用结构性启动子如花椰菜嵌合体病毒的 35S 启动子(Guilley 等人,1982) 可用来在实质上转基因植物的所有器官中积累表达的蛋白。可选择地,使用高度组织特异性和 / 或阶段特异性的启动子可用于本发明(Higgins,1984 ;Shotwell,1989) 使表达朝向所需的组织和 / 或发育的所需阶段。公开了关于植物中表达本发明肌醇六磷酸酶分子的进一步细节,例如,见美国专利第 5,770,413(Van Ooijen 等人) 和美国专利第 5,593,963(VanOoijen 等人),尽管这些文献不能讲授本应用中的发明分子,而代替的是讲授真菌肌醇六磷酸酶的使用。

[0375] [00318] 总之,与本发明有关的是可使用多种方法来在转基因植物或植物部分中完成肌醇六磷酸酶的重组表达。这样的转基因植物和植物部分可作为重组表达肌醇六磷酸酶的来源,它们可直接加入至含肌醇六磷酸盐的来源中。可选择地,重组植物表达的肌醇六磷酸酶可从植物来源中被提取,如果需要在接触肌醇六磷酸酶底物之前被纯化。

[0376] [00319] 在本发明的情况下,被选择的植物包括但不限于产生可食用花的作物如花椰菜(甘蓝),朝鲜蓟(Cynara scolymus),水果如苹果(苹果属,如 domesticus),香蕉(芭蕉属,如 acwninatd),浆果(如黑醋栗,虎耳草库栗属,如 rubrum),樱桃(如甜樱桃,Primus,如 avium),黄瓜(香瓜属,如 sativus),葡萄(葡萄属,如 viniferd),柠檬(柠

檬),甜瓜 (*Cucumis melo*),坚果 (如核桃,胡桃属,如 *regia*;花生,地下落花生 (*Arachis hypogaeae*)),桔 (柑桔属,如 *maxima*),桃 (李属,如桃属),梨 (*Pyra*,如 *communis*),李子 (李属,如 *domestica*),草莓 (草莓属,如 *moschata*),番茄 (番茄属,如 *esculentum*),叶,如紫花苜蓿 (苜蓿属,如 *sativa*),甘蓝 (如,*Brassica oleracea*),菊苣 (*Cichoreum*,如 *endivia*),韭菜 (葱属,如 *porrum*),莴苣属 (莴苣属,如 *sativa*),菠菜 (菠菜,如 *oleraceae*),烟草 (烟草,如烟叶),根,如竹芋 (竹芋,如 *arundinacea*),甜菜 (甜菜属,如 *vulgaris*),胡萝卜 (胡萝卜属,如 *carotd*),木薯 (木薯,如 *esculenta*),芜菁 (芸苔,如 *rapa*),萝卜属 (萝卜属,如 *sativus*),薯蓣属 (薯蓣属,如 *esculenta*),甘薯 (番薯属甘薯)和种子,如菜豆 (菜豆属,如 *vulgaris*),豌豆 (*Pisum*,如 *sativum*),大豆 (甘氨酸,如玉米),小麦 (小麦属,如 *aestivum*),大麦 (大麦属,如 *vulgare*),谷类 (玉蜀黍属,如玉米),大米 (*Oryza*,如 *sativa*),油菜籽 (*Brassica napus*),小米 (黍),向日葵 (*Helianthus annuus*),燕麦 (燕麦属 *sativa*),块茎类,如甘蓝 (芸苔,如 *oleraceae*),马铃薯 (茄属,如 *tuberosum*)和类似物。

[0377] [00320] 可以理解的是其他植物以及非植物表达系统可用于本发明的范围内。植物种属的选择主要是根据所要使用的植物或其部分和植物种属对转化的顺应性来确定。

[0378] [00321] 几种技术可用来将含有肌醇六磷酸酶编码 DNA 序列的表达构建物导入至靶植物中。这种技术包括但不限于使用钙 / 聚乙二醇方法,电穿孔和微注射或 (包被的) 微粒轰击 (Potrykus, 1990) 来转化原生质体。除了这些所谓的直接 DNA 转化方法,涉及载体的转化系统可广泛的获得,如病毒载体 (如,来自花椰菜嵌合体病毒 (CaMV) 和细菌载体 (如,来自土壤杆菌属) (Potrykus, 1990)。在选择和 / 或筛选后,已经被转化的原生质体,细胞或植物部分使用本领域中已知的方法 (Horsch 等人; 1985) 被再生入整个植物中。转化和 / 或再生技术的选择对本发明并不是很重要的。

[0379] [00322] 对于双子叶植物,可使用双载体系统 (Hoekema 等人, 1983; EP0120516 Schilperoort 等人)。例如,可使用的土壤杆菌株含有具有致病基因的 *vir* 质粒和含要被传递的基因构建物的相容质粒。这个载体可在大肠杆菌中和土壤杆菌中复制,并可产生自双载体 Bin19 (Bevan, 1984),该双载体可被改变,其细节与本发明无关。在此实例中使用的双载体 包含在 T-DNA 的左边界和右边界序列之间,相同的编码卡那霉素抗性的 NPTII 基因 (Bevan, 1984) 和在所需基因构建物中克隆的多个克隆位点。

[0380] [00323] 单子叶作物的转化和再生不是标准的方法。但最近的科学进展显示原则上单子叶植物能够经受转化作用,有果实的转基因植物可从转化的细胞再生。可再生这些作物的组织培养系统的研制以及将遗传物质导入至植物细胞中的有效方法可促进转化作用。目前选择转化单子叶植物的方法是外植体或悬浮细胞的微导弹轰击,和直接 DNA 摄取或原生质体的电穿孔。例如,采用编码潮霉素抗性的细菌 *hph* 基因作为选择标记物,已经成功地获得了转基因的稻米植物。基因通过电穿孔被导入 (Shimamoto 等人, 1993)。通过将编码 phosphinothricin 乙酰基转移酶 (灭活除草剂 phosphinothricin 的一种酶) 的吸湿链霉菌阻滞基因 (*bar gene*) 通过微颗粒轰击导入玉米悬浮培养物的成胚细胞中,已经获得了转基因玉米植物 (Gordon-Kamm 等人, 1990)。已经有报道,将遗传物质导入至其他单子叶作物的糊粉原生质体中,如小麦和大麦 (Lee 等人, 1989)。通过仅选择老化的致密和结节胚胛胛体组织,建立胚悬浮培养,从胚悬浮培养物中已再生出小麦植物 (Vasil 等人, 1972; Vasil 等人, 1974)。与这些作物的转化系统组合能使本发明应用于单子叶植物。这些方法

也可用于双子叶植物的转化和再生。

[0381] [00324] 肌醇六磷酸酶构建物的表达涉及的细节如通过植物聚合酶转录基因,翻译 mRNA 等,这些对于重组 DNA 技术领域的专业技术人员是已知的。下面仅描述与正确理解本发明的相关细节。已知的或发现可引起肌醇六磷酸酶表达的调控序列可在本发明中使用。所用的调控序列的选择依赖于目标的靶作物和 / 或靶器官。这种调控序列可从植物或植物病毒中获得,或可化学合成。这些调控序列是一些启动子,在引导植物中的转录中是有活性的,根据使用的植物或其部分可以是结构性的或阶段和 / 或组织特异的。这些启动子包括但不限于,显示结构性表达的启动子如花椰菜嵌合体病毒 (CaMV) (Guilley 等人;1982) 的 35S 启动子,叶特异性表达的启动子如核酮糖二磷酸盐羧化酶小亚单位基因的启动子 (Coruzzi 等人,1984),根特异表达的启动子如来自谷氨酰胺合成酶基因的启动子 (Tingey 等人,1987),种子特异表达的启动子如来自 *napus* 芸苔属的 *cruciferin A* 启动子 (Ryan 等人,1989),块茎特异表达的启动子如马铃薯的 I 型 *patatin* 启动子 (Koster-Topfer 等人,1989;Wenzler 等人,1989),或果实特异表达的启动子如番茄的多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 启动子 (Bird 等人,1988)。

[0382] [00325] 其他的调控序列如终止子序列和多聚腺苷化信号包括任何在植物中如此作用的这种序列,其选择包含在专业技术人员的水平范围内。这种序列的一个实例是根癌土壤杆菌的胭脂碱合成酶 (*nos*) 基因的 3' 侧向区 (Bevan, 见前)。调控序列也包括增强子序列,如在 CaMV 的 35S 启动子中所见的,和 mRNA 稳定序列如紫花苜蓿嵌合体病毒 (A1MV) RNA4 的引导序列 (Brederode 等人,1980) 或以类似方式作用的其他任何序列。

[0383] [00326] 肌醇六磷酸酶应该在可使表达蛋白稳定的环境中表达。根据肌醇六磷酸酶的生物物理参数选择细胞区室,如胞液、内质网、空泡、蛋白体或胞浆周围空间可在本发明中用来建立稳定的环境。这种参数包括但不限于最适 pH、对蛋白酶的敏感性或对优选区室摩尔浓度的敏感性。

[0384] [00327] 为了在细胞胞浆中获得表达,表达的酶不应该含有分泌性信号肽或任何其他靶序列。为了在叶绿体和线粒体中表达,表达的酶将含有特异的所谓的转运肽以进入这些细胞器中。为了达到这种目的,已知有可附着在目标酶上的靶序列 (Smeekens 等人,1990;van denBroeck 等人,1985;Wolter 等人,1988)。如果需要在空泡中有酶活性,必须要在分泌性信号肽,以及可引导酶进入这些空泡中的特异靶序列 (Tague 等人,1990)。对于种子中的蛋白体也是这样。编码目标酶的 DNA 序列应该以下述的方法修饰,即该酶可在细胞中所需的地点发挥作用。

[0385] [00328] 为了在细胞外表达肌醇六磷酸酶,本发明的表达构建物应用了一种分泌性信号序列。尽管优选与植物宿主种属同源 (天然的) 的信号序列,但也可使用异源的信号序列,即那些来自其他植物种属或微生物来源的序列。这种信号序列对本领域的那些专业技术人员是已知的。在本发明的范围之内可使用的适当的信号序列公开于 Blobel 等人,1979;Von Heijne,1986;Garcia 等人,1987;Sijmons 等人,1990;Ng 等人,1994;和 Powers 等人,1996)。

[0386] [00329] 本发明的相关 DNA 构建物的所有部分 (启动子,调控序列,分泌性序列,稳定序列,靶序列或终止序列) 可被修饰,如果需要,可采用本领域专业技术人员已知的方法来影响它们的控制特性。要指出的是通过本发明,可使用已获得的含有肌醇六磷酸酶的植

物来获得具有更高肌醇六磷酸酶水平的植物或植物器官。例如,可能通过使用 somoclonal 变异技术或通过杂交育种技术来获得这种植物或植物器官。这种技术为本领域的专业技术人员熟知。

[0387] [00330] 在一个方面,本发明提供了获得肌醇六磷酸酶和其他分子的高效过度表达系统的一种方法(及其产物)。在一个方面,发明提供了获得木霉属肌醇六磷酸酶和 pH2.5 的酸性磷酸酶的高效过度表达系统的方法(及其产物)。这个系统可产生在动物饲料工业中具有特殊效用的酶组合物。关于这种方法的其他细节可见于公开发表的文献中和/或是专业技术人员已知的。在一个非限制性的实例中,这种公开可获得的文献包括 EP 0659215(WO 9403612 A1)(Nevalainen 等人),尽管这些文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0388] [00331] 在另一个方面,可使用这些方法来从一个或多个操纵子或基因簇或其部分产生新的编码生物化学通路的多核苷酸。例如,细菌和许多真核生物具有一致的调控基因机制,其产物参与了相关的过程中。基因被群集在单个染色体上或立即互相邻接,并在单个调控序列,包括启动整个簇转录的单个启动子的控制下一起被转录,在结构上称为“基因簇”。因此,基因簇是一组邻接的基因,这些基因如其功能一样通常是相同的或相关的。由基因簇编码的生物化学通路的实例是聚酮化合物。聚酮化合物是生物活性极端丰富的来源分子,这些生物活性包括抗生素(如四环素和红霉素),抗癌剂(柔红霉素),免疫抑制剂(FK506 和雷帕霉素),和兽医制品(莫能菌素)。许多聚酮化合物(由多聚乙酰合成酶产生)被评价为治疗药物。多聚乙酰合成酶是多功能酶,可催化相当多种长度和功能基特性不同的碳链的生物合成和环化。多聚乙酰合成酶基因形成基因簇,至少一个类型的(指定为 I 型)多聚乙酰聚合酶具有大尺寸的基因和酶,复杂的遗传操作和这些基因/蛋白的体外研究。

[0389] [00332] 基因簇 DNA 可从不同的生物体中分离,并连接进载体中,特别是含有表达调控序列的载体,其中这些序列可控制和调节可检测蛋白的产生或已连接的基因簇的蛋白相关阵列的活性。使用具有格外大的外源 DNA 导入容量的载体特别适合用于这种基因簇,通过在此的实例来描述,包括大肠杆菌的 f- 因子(或致育因子)。大肠杆菌的 f- 因子是一种在交联过程中可影响其本身高频率传递的质粒,理想地可获得和稳定地传播大的 DNA 片段,如来自混合微生物标本的基因簇。一旦被连接进一个合适的载体中,含有不同肌醇六磷酸酶基因簇的两个或多个载体可被导入进一个合适的宿主细胞中。基因簇共有的部分同源序列区域将促进导致序列重组的过程,所述的重组可产生一个杂合基因簇。然后新的杂合基因簇可被筛选原始基因簇中未发现的增强活性。

[0390] [00333] 因此,在一个方面,发明涉及产生一种生物学活性杂合多肽和筛选这样一种多肽的增强活性的方法,通过:

[0391] [00334] (1) 至少导入可操作连接中的第一个多核苷酸和可操作连接中的第二个多核苷酸进入一个合适的宿主细胞中,所述的第一个多核苷酸和第二个多核苷酸至少共享部分同源序列的一个区域;

[0392] [00335] (2) 在可促进序列重组的条件下培养宿主细胞,该重组作用可在可操作的连接中产生一个杂合多核苷酸;

[0393] [00336] (3) 表达杂合多核苷酸编码的杂合多肽;

[0394] [00337] (4) 在可促进增强的生物学活性鉴定的条件下筛选杂合多肽 ;和

[0395] [00338] (5) 分离编码杂合多肽的多核苷酸。

[0396] [00339] 筛选多种酶活性的方法是本领域专业技术人员已知的,并通过本应用实例进行讨论。当分离本发明的多肽和多核苷酸时可使用这种方法。

[0397] [00340] 就可使用的表达载体的代表性实例而言,可提到病毒颗粒,杆状病毒,噬菌体,质粒,噬菌粒,粘粒, fosmids, 细菌人工染色体,病毒 DNA (如,牛痘病毒,腺病毒,禽痘病毒,伪狂犬病病毒和 SV40 的衍生体), P1 为基础的人工染色体,酵母质粒,酵母人工染色体,和任何其他特殊目的宿主特异的载体 (如杆菌,曲霉菌和酵母)。因此,例如 DNA 可包含在表达一种多肽的多种表达载体的任何一个中。这种载体包括染色体的,非染色体的和合成的 DNA 序列。大量的合适载体是本领域中专业技术人员已知的,是商业渠道可获得的。下面的载体以实例的方式被提供 ;细菌 :pQE 载体 (Qiagen), pBluescript 质粒, pNH 载体, (λ -ZAP 载体 (Stratagene) ;ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia) ;真核生物 :pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia)。但只要可在宿主中复制和有活力的,可使用任何其他质粒或其他载体。低拷贝或高拷贝数的载体可用于本发明。

[0398] [00341] 用于本发明的一个实例载体含有 f-因子复制起始点。大肠杆菌中的 f-因子 (或致育因子) 是一个质粒,可在交联过程中导致其本身高频率传递和细菌染色体本身低频率传递。一个方面使用克隆载体,称为“fosmids”或细菌人工染色体 (BAC) 载体。这些来自大肠杆菌 f-因子,它能稳定的整合基因组 DNA 的大片段。当用混合的未培养环境标本 DNA 整合时,可能以稳定的“环境 DNA 文库”形式获得大的基因组片段。

[0399] [00342] 用于本发明的另一类型载体是一个粘粒载体。粘粒最初设计用来克隆和传播基因组 DNA 的大片段。粘粒载体中的克隆详细的描述于“分子克隆 :实验室手册” (Sambrook 等人,1989)。

[0400] [00343] 表达载体的 DNA 序列可操作性的连接于合适的表达控制序列 (启动子) 以引导 RNA 合成。特殊命名的细菌启动子包括 lacI, lacZ, T3, T7, gpt, λ P_R, P_L 和 trp。真核细胞启动子包括 CMV 极早期, HSV 胸苷激酶,早期和晚期 SV40,来自腺病毒的 LTRs,和小鼠金属硫因 -I。合适载体和启动子的选择也很好的包括在本领域普通专业技术人员的水平范围内。表达载体也含有一个翻译起始的核糖体结合位点和转录终止子。载体也包括放大表达的合适序列。启动子区可采用 CAT (氯霉素转移酶) 载体或具有选择性标记物的载体从任何所需的基因中选择。另外,表达载体可含有一个或多个选择性标记物基因为转化宿主细胞的选择提供表型特征,如为真核细胞培养提供二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,或在大肠杆菌中提供四环素或氨比西林抗性。

[0401] [00344] 体内重排集中于总体称为“重组”的“分子间”过程,在细菌中一般认为是“RecA 依赖的”现象。发明可依赖于宿主细胞的重组过程以重组和重排序列,或依赖细胞介导还原性过程的能力以通过删除作用降低细胞中准重复序列的复杂性。此“还原重排”通过“分子内的”, RecA 不依赖的过程发生。

[0402] [00345] 因此,在发明的另一个方面,通过还原重排过程可以产生变异的多核苷酸。该方法涉及产生含有连续序列 (原始的编码序列) 的构建物,它们插入进一个合适的载体中,以及随后它们被导入进一个合适的宿主细胞中。通过具有同源区的构建物中的连

续序列之间或准重复序列之间的组合过程,可发生单个分子特性的重排。重排过程可重组和 / 或减少重复序列的复杂性和程度,并导致新的分子种类的产生。可应用多种处理方法来增加重排的速率。这些可包括用以下方法处理:紫外线、或损害 DNA 的化学药品,和 / 或使用显示“基因不稳定性”水平增加的宿主细胞系。因此重排过程可涉及准重复序列的同源重组作用或天然特性,以引导其本身的进化。

[0403] [00346] 重复或“准重复”序列在遗传不稳定性中具有重要的地位。在本发明中,“准重复区”并不限制于其原始单位结构的重复区。准重复单位在一个构建物中表现为一条序列的阵列;相似序列的连续单位。一旦连接,连续序列之间的连接成为本质上看不见的,得到的构建物的准重复特性目前在分子水平是连续的。细胞为了减少得到的构建物的复杂性而进行的删除过程在准重复序列之间进行。在发生滑动事件的过程中,准重复单位实际上提供了无限的模板的组成部分。因此含有准重复序列的构建物可有效地提供足够的分子弹性,即删除作用(和潜在的插入作用)事件实际上可发生在准重复单位内的任何地点。

[0404] [00347] 当准重复序列都在相同的方向上被连接,例如头尾相接或相反方向,细胞不能区分单个的单位。因此,还原过程可发生在序列全长。相对比的,例如当单位表现为头对头,而不是头对尾,倒位决定了邻近单位的终点,因此删除作用的形成将促进不连续单位的丢失。因此,在本发明的一个方面,序列处于同一方向。准重复序列的随机方向将导致重排效率丧失,而序列方向一致将提供最高的效率。但,虽然在同一方向中具有较少的邻接序列降低效率,仍可对新分子的有效回收提供足够的弹性范围。可在同一方向中用准重复序列制备构建物以提供较高的效率。

[0405] [00348] 可采用包括下列方法的多种方法以头对尾的方向组装序列:

[0406] [00349] (a) 当制成的单链提供方向时,可使用包括多聚-A 头和多聚-T 尾的引物。可通过含有从 RNA 制备的引物最初的少量碱基而达到此目的,并因此很容易的去掉 RNase H。

[0407] [00350] (b) 可使用包括独特限制性裂解位点的引物。将需要多个位点,一组独特的序列和重复的合成和连接步骤。

[0408] [00351] (c) 引物内部的少数碱基可被硫化,核酸外切酶用来产生正确的尾部分子。

[0409] [00352] 重排序列的回收依赖于鉴别具有还原 RI 的克隆载体。重排的编码序列然后可通过扩增被回收。产物被再克隆和表达。具有还原 RI 的克隆载体的回收可受以下因素影响:

[0410] [00353] 1) 当构建物的复杂性被降低时,使用仅稳定保留的载体;

[0411] [00354] 2) 通过物理方法物理性回收缩短的载体。在这种情况下,克隆载体使用标准的质粒分离方法和在琼脂糖凝胶或具有小分子量截留的柱上使用标准方法的粒度分馏;

[0412] [00355] 3) 当插入的大小减小时回收含有被选择的断裂基因的载体;和

[0413] [00356] 4) 应用使用表达载体和适当选择方法的直接选择技术。

[0414] [00357] 来自相关生物体的编码序列(例如,基因)可显示高度的同源性,并编码完全不同的产物。这些类型的序列在本发明中可特别的用作准重复区。但虽然下面图解的实例显示了几乎相同的原始编码序列(准重复区)的重排,但这个过程并不限于这种几乎

相同的重复区。

[0415] [00358] 下面的实例显示了发明的一种方法。描绘了来自三条独立种属的编码核酸序列（准重复区）。每条序列编码具有不同组特性的蛋白。每条序列在序列中的独特位置上单个或几个碱基对不同，称为“A”，“B”和“C”。准重复序列被单独地或总体地扩增和连接进随机的组装物中，这样在连接分子的群体中具有所有可能的排列和组合。准重复单位的数量可被组装的条件所控制。在一个构建物中准重复单位的平均数量被指定为重复指数（RT）。

[0416] [00359] 一旦形成，根据已发表的数据，构建物可以或不能在琼脂糖凝胶上被粒度分馏，插入进一个克隆载体中，并传递至一个合适的宿主细胞中。然后细胞被繁殖，且“还原重排”起作用。如果需要，还原重排过程的速率可通过诱导 DNA 损害来激发。RI 减少是否由重复序列间通过“分子内的”机制形成的删除作用介导，或由重组样事件通过“分子内的”机制介导并不重要。最终的结果是分子重排进入所有可能的组合物中。

[0417] [00360] 任意地，该方法包括筛选滑动库中的文库成员的其他步骤，以鉴定具有结合或相互作用或催化一个特殊反应（如，催化肌醇六磷酸盐的水解）能力的单个滑动文库成员。

[0418] [00361] 从这些文库中鉴定的多肽可用于治疗，诊断，研究和相关的目的（如，催化剂，克分子渗透压浓度不断增加的水溶液的溶质，或类似物），和/或被提交给滑动和/或选择的一个或多个其他的循环中。

[0419] [00362] 在另一个方面，在重组或重排之前或之间，发明的多核苷酸或通过在此描述的方法产生的多核苷酸可接受促进突变体导入原始多核苷酸的试剂或处理。导入这些突变体将增加获得的杂合多核苷酸和它们编码的多肽的多样性。这些可促进诱变的试剂或处理包括但不限于：(+)-CC-1065，或合成的类似物如 (+)-CC-1065-(N3-腺嘌呤，见 Sun 和 Hurley, 1992)；能够抑制 DNA 合成的 N-乙酰化或去乙酰化 4'-氟-4-氨基联苯加合物（例如，见 van de Pol 等人, 1992）；或能够抑制 DNA 合成的 N-乙酰化或去乙酰化的 4-氨基联苯加合物（也见，van de Pol 等人, 1992, 751-758 页）；三价铬，三价铬盐，能够抑制 DNA 复制的多环芳烃（“PAH”）DNA 加合物，如 7-溴甲基-苯[α]蒽（“BMA”），Tris(2,3-二溴丙烷基)磷酸盐（“Tris-BP”），1,2-二溴-3-氯丙烷（“DBCP”），2-溴丙烯醛（2BA），苯并[α]芘-7,8-二氢二醇-9,10-环氧化物（“BPDE”），卤化铂(II)盐，N-羟基-2-氨基-3-甲基咪唑[4,5-f]-喹啉（“N-羟基-IQ”），和 N-羟基-2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑[4,5-f]-吡啶（“N-羟基-PhIP”）。减缓或中止 PCR 扩增的实例手段包括紫外光(+)-CC-1065 和 (+)-CC-1065-(N3-腺嘌呤)。特别包括的手段是 DNA 加合物或包含来自多核苷酸或多核苷酸库中的加合物的多核苷酸，它们在进一步处理之前通过包括加热含多核苷酸溶液的过程而被释放或去除。

[0420] [00363] 在另一个方面，发明关注于一种方法，它可在根据发明产生杂合或重排多核苷酸的条件下，通过处理标本产生具有生物学活性的重组蛋白，标本含有编码野生型蛋白的双链模板多核苷酸。

[0421] [00364] 发明也提供了应用专利的密码子引物（含有简并的 N, N, G/T 序列）以将点突变导入至多核苷酸中，以产生一组子代多肽，其中单个氨基酸取代的全部范围在每个氨基酸位点上被表示出来（基因位点饱和诱变（GSSM））。使用的寡链连续地包括第一条同

源序列,简并的 N,N,G/T 序列,和任选地第二条同源序列。使用这种寡链得到的下游子代翻译产物包括沿多肽每个氨基酸位点上的所有可能的氨基酸改变,因为 N,N,G/T 序列的简并性包括所有 20 个氨基酸的密码子。

[0422] [00365] 在一个方面,一个这样的简并寡链(包括一个简并的 N,N,G/T 基因盒)用于将亲代多核苷酸模板中的每个原始密码子进行全范围的密码子取代。在另一个方面,使用至少两个简并的 N,N,G/T 基因盒—或是在同样的寡链中或不在其中,将至少亲代多核苷酸模板中的两个原始密码子进行全范围的密码子取代。因此,超过一个 N,N,G/T 序列可包含在一个寡链中以便在超过一个位点上导入氨基酸突变。这种多个 N,N,G/T 序列是直接连续性的,或被一个或多个其他的核苷酸序列分离。在另一个方面,用于导入添加和删除的寡链可单独使用或与含有 N,N,G/T 序列的密码子一起使用,以导入任何组合或排列的氨基酸添加,删除和/或取代。

[0423] [00366] 在一个方面,可能同时使用一条含有 N,N,G/T 三联体,即简并的 (N,N,G/T)_n 序列的寡链来诱变两个或更多的连续氨基酸位置。

[0424] [00367] 在另一个方面,本发明提供了应用具有较 N,N,G/T 序列较少简并性的简并基因盒。例如,期望在一些情况下使用(如在一条寡链中)仅含有一个 N 的简并三联体序列,其中所述的 N 可以是位于三联体的第一个,第二个或第三个位置上。包括其任何组合和排列的任何其他碱基可用于三联体的剩余两个位置上。可选择地,期望在一些情况下使用(如在一条寡链中)一条简并的 N,N,N 三联体序列,或一条 N,N,G/C 三联体序列。

[0425] [00368] 但应该理解的是如在本发明中公开的使用简并的三联体(如 N,N,G/T 或 N,N,G/C 三联体序列对几种原因是有利的。在一个方面,本发明提供了一种手段,可系统地和非常简单地多肽中每个和任一个氨基酸位置上产生全部范围的可能氨基酸的取代(取代所有 20 种氨基酸)。因此,对于 100 种氨基酸多肽,发明提供了一种方法,可系统地和非常简单地产生 2000 个不同的种类(即,每个位置 20 个可能的氨基酸乘 100 个氨基酸位置)。可以理解的是通过使用含有一条简并的 N,N,G/T 或 N,N,G/C 三联体序列的寡链,提供了 32 个编码 20 种可能氨基酸的单独序列。因此,在一个反应容器中,其中亲代多核苷酸序列使用这样一条寡链被进行饱和诱变,产生了编码 20 种不同多肽的 32 个不同的子代多核苷酸。相比之下,在位点定向诱变中使用非简并的寡链仅在每个反应容器中产生一个子代多肽产物。

[0426] [00369] 这个发明也提供了非简并寡链的应用,可选择性的与公开的简并引物一起使用。可以理解的是在一些情况下,使用非简并寡链在操作的多核苷酸中产生特异的点突变是有利的。它可提供一种手段,产生特异的沉默点突变,可导致相应的氨基酸改变的点突变,可产生终止密码子和多肽片段的相应表达的点突变。

[0427] [00370] 因此,在一个方面,每个饱和诱变反应容器中含有编码至少 20 种子代多肽分子的多核苷酸,这样所有 20 种氨基酸在一个对应于亲代多核苷酸中被诱变的密码子位置的特异氨基酸位置上被表示出来。从每个饱和诱变反应容器中产生的 32 倍简并子代多肽被进行克隆扩增(如,采用一个表达载体克隆进一个合适的大肠杆菌宿主中),并进行表达筛选。当通过筛选鉴定一个子代多肽以显示特性中的有益变化时(当与亲代多肽比较时),多肽被测序以鉴定包含在其中的相应的有益氨基酸取代。

[0428] [00371] 可以理解的是使用在此公开的饱和诱变来诱变亲代多肽中的每个和任一

个氨基酸位置过程中,有益的氨基酸改变可在超过一个氨基酸位置上被鉴定。可产生一个或多个新的子代分子,它们含有这些有益氨基酸取代的部分或所有的组合。例如,如果在多肽的 3 个氨基酸位置的每一个都鉴定有 2 个特殊的有益氨基酸改变,在每个位置上的排列包括 3 种可能性(原始氨基酸没有变化,两种有益改变中的任一种)和 3 个位置。因此,有 $3 \times 3 \times 3$ 或总共 27 种可能性,包括 7 种以前已经被检测到的 -6 个单一点突变(即,在三个位置的每一个上有 2 个)和在任何一个位置上没有变化。

[0429] [00372] 也在另一个方面,位点饱和诱变可与滑动、嵌合、重组和其他的诱变过程一起与筛选共同应用。本发明提供了任何诱变过程的应用,包括以循环方式的饱和诱变。在一个实例中,任何诱变过程的循环应用可与筛选一起使用。

[0430] [00373] 因此,在一个非限制性的实例中,发明的多核苷酸(如,SEQ ID NO:1)和多肽(如,SEQ ID NO:2)可来自与其他诱变过程一起应用的饱和诱变过程中,如这样的过程,两个或多个相关的多核苷酸被导入适合的宿主细胞中以便通过重组和重排产生杂合的多核苷酸。

[0431] [00374] 除了沿着基因的整个序列进行诱变,可使用诱变来替代多核苷酸序列中的任何数目碱基的每一个,其中被突变的碱基数目可以是 15 至 100,000 之间的任意整数。因此,除了沿着分子突变每一个位置以外,可将每一个或个别数量的碱基(可以是一组,总计为 15 至 100,000)进行诱变。一个单独的核苷酸可用来沿着多核苷酸序列突变每一个位置或一组位置。一组被突变的 3 个位置是一个密码子。可采用一个致突变引物来导入突变,该引物含有一个异源性基因盒,也称为一个致突变基因盒。实例的基因盒含有 1 至 500 个碱基。在这样的异源性基因盒中的每个核苷酸位置是 N, A, C, G, T, A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T, C/G/T, A/G/T, A/C/T, A/C/G, 或 E, 其中 E 是非 A, C, G, 或 T 的任何碱基(E 可被归为设计者寡链)。

[0432] [00375] 在通常的意义上,饱和诱变包括在要被突变的指定多核苷酸序列中(其中被突变的序列长度为大约 15 至 100,000 个碱基)突变一组完全的致突变基因盒(其中每一个基因盒长度为大约 1-500 个碱基)。因此,一组突变(范围是从 1 至 100 个突变)被导入进要被突变的每一个基因盒中。在进行一轮饱和诱变的过程中,要被导入进一个基因盒中的一组突变与要被引入进第二个基因盒中的第二组突变是不同的或相同的。这样的组别的例证是通过删除作用,添加作用的特殊密码子的组别和特殊核苷酸基因盒的组别。

[0433] [00376] 被突变的指定序列包括整条基因,通路, cDNA, 全部的开放可读框(ORF), 和整个启动子, 增强子, 阻遏物/反式激活, 复制起始点, 内含子, 操纵子, 或任何多核苷酸功能基团。通常,此种目的的“指定序列”可以下列中的任何多核苷酸, 15 碱基的多核苷酸序列, 和长度在 15 个碱基和 15,000 碱基之间的多核苷酸序列(本发明特别称为两者之间的任意整数)。选择密码子组别的考虑因素包括由简并的致突变基因盒编码的氨基酸类型。

[0434] [00377] 在一个方面,被导入至一个致突变基因盒中的一组突变,本发明特别地提供了可在每个位置上编码 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 和 20 个氨基酸的简并密码子取代(使用简并寡链)和它们编码的多肽文库。

[0435] [00378] 发明的一个方面是一种分离的核酸,包括与其实质上相同的 SEQ ID NO:1 序列,与其互补的序列,或含有 SEQ ID NO:1 的一种序列中的至少 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 或 500 个连续碱基的片段。分离的核酸含有 DNA, 包括 cDNA,

基因组 cDNA, 和合成 DNA。DNA 可以是双链或单链的, 如果单链是编码链或非编码 (反义) 链。可选择地, 分离的核酸含有 RNA。

[0436] [00379] 如在下面详细讨论的, 本发明的分离核酸可用于制备 SEQ ID NO:2 的多肽, 与其实质上相同的序列, 或含有 SEQ ID NO:2 的一种多肽中至少 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 或 150 个连续氨基酸的片段, 和与其实质上相同的序列。

[0437] [00380] 因此, 发明的另一个方面是一个编码 SEQ ID NO:2 的一种多肽的核酸序列, 与其实质上相同的序列, 或含有 SEQ ID NO:2 的一种多肽中至少 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 或 150 个连续氨基酸的片段。这些核酸的编码序列与 SEQ ID NO:1 的一种编码序列, 或其片段是相同的, 或是编码 SEQ ID NO:2 的一种多肽的不同编码序列, 和与其实质上相同的序列, 和具有 SEQ ID NO:2 的一种多肽中的至少 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 或 150 个连续氨基酸的片段, 这是基因代码冗余或简并的结果。基因代码是本领域专业技术人员所熟知的, 例如可从 B. Lewin, Genes VI. Oxford University Press, 1997 的 214 页上获得。

[0438] [00381] 编码 SEQ ID NO:2 的一种多肽的分离核酸序列和与其实质上相同的序列包括但不限于, 仅 SEQ ID NO:1 之一的编码序列, 和与其实质上相同的序列, 和其他的编码序列如引导序列或前体蛋白序列和非编码序列, 如内含子或非编码序列 5' 和 / 或编码序列的 3'。因此, 如在此所使用的, 术语“编码多肽的多核苷酸”所包含的多核苷酸仅包括多肽的编码序列以及含有其他编码和 / 或非编码序列的多核苷酸。

[0439] [00382] 可选择地, 发明的核酸序列可采用常规的技术被突变, 如位点 定向诱变, 或其他本领域专业技术人员熟悉的技术, 以将沉默的改变导入进 SEQ ID NO:1 的多核苷酸, 和与其实质上相同的序列中。如在此所使用的, “沉默的改变”包括, 例如不改变多核苷酸编码的氨基酸序列的改变。需要这些变化以增加宿主细胞所产生的多肽的水平, 通过导入经常在宿主生物体内发生的密码子或密码子对, 宿主细胞含有编码多肽的载体。

[0440] [00383] 发明也涉及具有核苷酸改变的多核苷酸, 这些改变引起发明多肽中的取代, 添加, 删除, 融合和截断 (如 SEQ ID NO:2)。这种核苷酸改变可采用一些技术导入, 如位点定向诱变, 随机化学诱变, 核酸外切酶 III 删除, 和其他重组 DNA 技术。可选择地, 这种核苷酸改变可以是天然发生的等位基因变异体, 其分离可通过鉴定与探针特异杂交的核酸序列, 该探针含有 SEQ ID NO:1 的一种序列中至少 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 或 500 个连续碱基, 和与其实质上相同的序列, (或与其互补的序列), 在如在此提供的高, 中或低严格性条件下。

[0441] [00384] SEQ ID NO:1 的分离核酸, 与其实质上相同的序列, 互补序列或含有前述序列其中之一的至少 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 或 500 个连续碱基的片段, 也可用作探针来确定是否一个生物学标本, 如一种土壤标本中含有具有本发明的一种核酸序列的生物体或获得核酸的生物体。在这样的方法中, 可获得潜在地包含可分离出核酸的生物体, 核酸可从标本中获得。在可允许探针特异与在此提到的任何互补序列杂交的条件下核酸与探针接触。

[0442] [00385] 当需要时, 允许探针特异与互补序列杂交的条件可通过以下步骤进行, 将探针与已知含有互补序列的样品中的互补序列以及不含有互补序列的对照序列接触。杂交条件, 如杂交缓冲液的盐浓度, 杂交缓冲液的甲酰胺浓度, 或杂交温度, 可发生改变

以鉴定使探针与互补核酸特异杂交的条件。

[0443] [00386] 如果样品含有可分离出核酸的生物体,然后检测探针的特异杂交。可通过用可检测的试剂如放射活性同位素,荧光染料或能催化可检测产物形成的酶,标记探针来检测杂交。

[0444] [00387] 使用标记探针在标本中检测互补核酸存在的许多方法是本领域的专业技术人员所熟悉的。这些方法包括 Southern 印迹法, Northern 印迹法, 菌落杂交法和点印迹法。这些方法的每一种步骤见 Ausubel 等人, 分子生物学现代方法, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997 和 Sambrook 等人, 分子克隆:实验室手册, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。

[0445] [00388] 可选择地,超过一种的探针(至少其中之一能特异杂交存在于核酸标本中的任何互补序列),可用于扩增反应中以确定是否标本含有一种生物体,它含有发明的一种核酸序列(如,可分离出核酸的生物体)。典型地,探针包含寡核苷酸。在一个方面,扩增反应包括 PCR 反应。PCR 方法的描述见 Ausubel 和 Sambrook, 见前。可选择地,扩增可包括连接酶链式反应, 3SR, 或链置换反应。(见 Barany, F., “PCR 领域中的连接酶链式反应”, PCR Methods and Applications 1:5-16, 1991; E. Fahy 等人, “自持序列复制 (3SR): 一种可替代 PCR 的等温转录为基础的扩增系统”, PCR Methods and Applications 1:25-33, 1991; 和 Walker G. T. 等人, “链置换扩增——一种体外等温 DNA 扩增技术”, Nucleic Acid Research 20:1691-1696, 1992)。在这种方法中,标本中的核酸与探针接触,执行扩增反应,检测得到的扩增产物。扩增产物的检测是通过在反应产物上进行凝胶电泳,用插入剂溴乙锭染色凝胶。可选择地,一种或多种探针可用放射性同位素标记,在凝胶电泳后通过放射自显影检测放射性扩增产物的存在。

[0446] [00389] 在序列末端附近序列和与其实质上相同的序列产生的探针如 SEQ ID NO: 1 所示,也可用于染色体步查法中以鉴定含有位于如上所示核酸序列附近的基因组序列的克隆。这种方法可从宿主生物体中分离编码其他蛋白的基因。

[0447] [00390] SEQ ID NO: 1 中所示的分离核酸序列,与其实质上相同的序列,其互补序列或含有前述序列其中之一的至少 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 或 500 个连续碱基的片段可用作探针以鉴定和分离相关的核酸。在一些方面,相关的核酸是来自生物体的 cDNA 或基因组 DNA 而不是来自分离出核酸的生物体。例如,其他的生物体可以是相关的生物体。在这种方法中,核酸标本与探针在可允许探针与相关序列特异杂交的条件下接触。然后采用任何上述的方法检测探针与来自相关生物体的核酸的杂交作用。

[0448] [00391] 在核酸杂交反应中,用来达到特殊水平严格性的条件将根据被杂交的核酸的特性而变化。例如,核酸杂交区的长度,互补程度,核酸序列的组成(如,GC 对 AT 的含量),和核酸类型(如, RNA 对 DNA) 可在选择杂交条件中被考虑。另外一个考虑是一种核酸是否被固定,例如在一个滤膜上。

[0449] 在低,中或高的严格性条件下进行杂交。作为核酸杂交的一个实例,含有固定的变性核酸的聚合体膜首先在含有 0.9M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 5.0mM Na₂EDTA, 0.5% SDS, 10X Denhardt's, 和 0.5mg/ml 多聚核糖腺苷酸的溶液中 45°C 预杂交 30 分钟。大约 2×10⁷cpm(比活性 4-9×10⁸cpm/ug) 的 ³²P 末端标记的寡核苷酸探针然后加入至溶液中。在孵育 12-16 小时后,在含有 0.5% SDS 的 1X SET(150mM NaCl, 20mM Tris 氯化钠, pH 7.8,

1mM Na₂EDTA) 室温下冲洗膜 30 分钟,然后在新鲜的 1XSET 中在 T_m-10℃冲洗寡核苷酸探针 30 分钟。然后将膜接触放射自显影胶片以检测杂交信号。

[0450] [00393] 通过改变用于鉴定与可检测探针杂交的核酸如 cDNA 或基因组 DNA 的杂交条件严格性,可鉴定和分离具有与探针不同同源性水平的核酸。通过在低于探针解链温度的变化的温度下进行杂交可改变严格性。解链温度, T_m 是 50% 靶序列与完全互补的探针杂交时的温度 (在指定的离子强度和 pH 下)。选择的非常严格条件等同于特殊探针的 T_m 或大约低 5℃。探针的解链温度可采用下面的公式计算: 对于长度在 14 至 70 个核苷酸的探针, 解链温度 (T_m) 可采用以下公式计算: $T_m = 81.5 + 16.6 (\log [Na^+]) + 0.41 (\text{分数 } G+C) - (600/N)$, 其中 N 是探针的长度。如果杂交是在含有甲酰胺的溶液中进行的, 解链温度采用下面的方程计算: $T_m = 81.5 + 16.6 (\log [Na^+]) + 0.41 (\text{分数 } G+C) - (0.63\% \text{ 甲酰胺}) - (600/N)$, 其中 N 是探针的长度。可在 6X SSC, 5X Denhardt' s 试剂, 0.5% SDS, 100 μg 变性的碎片鲑鱼精子 DNA 或 6X SSC, 5X Denhardt' s 试剂, 0.5% SDS, 100 μg 变性的碎片鲑鱼精子 DNA, 50% 甲酰胺中进行预杂交。SSC 和 Denhardt' s 溶液的配方可见, 如 Sambrook 等人, 见前。

[0451] [00394] 通过向前所列的预杂交溶液中加入可检测探针进行杂交。当探针含有双链 DNA 时, 在加入至杂交溶液前它被变性。滤膜与杂交溶液接触足够的时间以使探针与 cDNA 或含有其互补序列或其同源序列的基因组 DNA。对于长度在 200 个核苷酸以上的探针, 杂交在 T_m 以下 15-25℃进行。对于更短的探针, 如寡核苷酸探针, 杂交可在 T_m 下 5-10℃进行。典型地, 对于在 6X SSC 中的杂交, 杂交作用在大约 68℃进行。通常, 对于在含有 50% 甲酰胺的溶液中的杂交作用, 杂交在大约 42℃进行。所有前面的杂交作用被认为是在高的严格性条件下。

[0452] [00395] 在杂交后, 冲洗滤膜以去掉非特异结合的可检测探针。用来冲洗滤膜的严格性也可根据被杂交的核酸的特性, 被杂交的核酸的长度, 互补程度, 核酸序列的组成 (如, GC 对 AT 的含量), 和核酸类型 (如, RNA 对 DNA) 而改变。逐渐增加的更高严格性冲洗条件如下: 2X SSC, 0.1% SDS 室温 15 分钟 (低严格性); 0.1X SSC, 0.5% SDS 室温 30 分钟至 1 小时 (中严格性); 0.1X SSC, 0.5% SDS 15 至 30 分钟在杂交温度和 68℃之间 (高严格性); 和 0.15M NaCl 15 分钟在 72℃ (非常高的严格性)。最终的低严格性冲洗在室温下 0.1X SSC 中进行。上述的实例仅说明可用于冲洗滤膜的一组条件。本领域中的专业技术人员将了解对于不同严格性的冲洗有大量的方案。

[0453] [00396] 已与探针杂交的核酸可通过放射自显影或其他常规的技术鉴定。

[0454] [00397] 上述的方法可被修饰以鉴定与探针序列同源性水平降低的核酸。例如, 为获得与可检测探针同源性降低的核酸, 使用较低的严格性条件。例如, 在 Na⁺ 浓度大约为 1M 的杂交缓冲液中, 杂交温度可从 68℃至 42℃以 5℃递减。在杂交后, 滤膜用 2X SSC, 0.5% SDS 在杂交的温度下冲洗。这些条件被认为 50℃以上为“中等的”, 50℃以下为“低等的”。“中等”杂交条件的一个特殊实例是当上述杂交在 55℃进行。“低等严格性”杂交条件的一个特殊实例是当上述杂交在 45℃进行。

[0455] [00398] 可选择地, 杂交在缓冲液中进行, 如 6X SSC, 含有甲酰胺, 在 42℃的温度下。在这种情况下, 杂交缓冲液中甲酰胺的浓度可从 50%至 0%以 5%的量递减以鉴定与探针的同源性水平降低的克隆。这些条件被认为在 25%甲酰胺以上为“中等”条件, 在 25%甲酰胺以下为“低等”条件。“中等”杂交条件的一个特殊实例是当上述杂交在 30%甲酰胺

中进行。“低等严格性”杂交条件的一个特殊实例是当上述杂交在 10% 甲酰胺中进行。

[0456] [00399] 例如,前面的方法可用来分离具有与 SEQ ID NO:1 中所示的核酸序列至少大约 99%,至少 98%,至少 97%,至少 95%,至少 90%,或至少 80% 同源的序列,与其实质上相同的序列,或含有其至少大约 10,15,20,25,30 35 40 50,75,100,150,200,300,400,或 500 个连续碱基的片段,和与前面任何一条序列互补的序列。可采用排列算法来测定同源性。例如,同源的多核苷酸具有的编码序列是在此所述的其中一条编码序列的天然发生的等位基因变异体。当与 SEQ ID NO:1 中所示的核酸序列或其互补序列相比时,这种等位基因变异体具有一个或多个核苷酸的取代,删除或添加。

[0457] [00400] 可选择地,上述的方法可用来分离一些核酸,它们编码的多肽与具有 SEQ ID NO:2 中所示序列,与其实质上相同的序列的多肽具有至少大约 99%,至少 95%,至少 90%,至少 85%,至少 80% 或至少 70% 同源性,或含有其至少 5,10,15,20,25,30,35,40,50,75,100,或 150 个连续氨基酸的片段,如采用序列排列算法测定(如 FASTA 3.0t78 版算法,使用默认参数)。

[0458] [00401] 发明的另一个方面是一种分离的或纯化的多肽,含有 SEQ IDNO:1 中所示的序列,与其实质上相同的序列,或含有其至少大约 5,10,15,20,25,30,35,40,50,75,100,或 150 个连续氨基酸的片段。如上所述,这种多肽可通过将编码多肽的核酸插入至一个载体中而获得,这样编码序列可操作地连接于一条能够在一个合适的宿主细胞中驱动编码多肽表达的序列上。例如,表达载体可含有一个启动子,一个翻译起始的核糖体结合位点和转录终止子。载体也可包括放大表达的合适序列。

[0459] [00402] 适合在细菌中表达多肽或其片段的启动子包括大肠杆菌 lac 或 trp 启动子, lacI 启动子, lacZ 启动子, T3 启动子, T7 启动子, gpt 启动子, λP_R 启动子, λP_L 启动子, 编码糖酵解酶如 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)的操纵子的启动子,和酸性磷酸酶启动子。真菌启动子包括 α 因子启动子。真核启动子包括 CMV 极早期启动子,HSV 胸腺嘧啶激酶启动子,热休克启动子,早期和晚期 SV40 启动子,逆转录病毒的 LTR,和小鼠金属硫因-I 启动子。也可以使用在原核细胞或真核细胞或其他病毒中已知可控制基因表达的其他启动子。

[0460] [00403] 哺乳动物表达载体也包含复制起始点,任何需要的核糖体结合位点,一个多聚腺苷化位点,剪接供给和接受位点,转录终止序列,和 5' 侧向非转录序列。在一些方面,来自 SV40 剪接的 DNA 序列和一个多聚腺苷酰位点可用来提供所需的非转录遗传元件。

[0461] [00404] 在真核细胞中表达多肽或其片段的载体也可含有增强子以增加表达水平。增强子是 DNA 的顺式作用元件,通常的长度从大约 10 至大约 300bp,可作用于启动子以增强其转录。实例包括在复制起始点 bp100 至 270 侧面的 SV40 增强子,巨细胞病毒早期启动子增强子,复制起始点侧面上的多瘤病毒增强子,和腺病毒增强子。

[0462] [00405] 另外,表达载体典型地含有一个或多个选择性标记物基因使能够选择含有载体的宿主细胞。这样的选择性标记物包括编码二氢叶酸还原酶的基因或赋予真核细胞培养物以新霉素抗性的基因,在大肠杆菌中赋予四环素或氨比西林抗性的基因,和酿酒酵母 TRP1 基因。

[0463] [00406] 在表达文库产生后,可以在通过细胞分选的筛选之前包括“生物淘选”这种文库的另外步骤。“生物淘选”步骤是指通过在克隆文库中筛选序列同源性来鉴定具有特定生物学活性的克隆,该文库的制备通过 (i) 选择性地从来自至少一个微生物体的 DNA 中

分离靶 DNA,使用至少含有编码具有特异生物学活性的生物样品的 DNA 序列一部分的探针 DNA ;和 (ii) 任选地使用分离的靶 DNA 转化一个宿主,产生一个被筛选特异生物学活性的克隆文库。

[0464] [00407] 用来从至少一个微生物体中获得的 DNA 中选择性分离目标靶 DNA 的探针是一条已知活性的酶 DNA 的全长编码区序列或部分编码区序列。原始的 DNA 文库可采用探针的混合物来探测,混合物中含有至少一部分编码具有特异酶活性的酶的 DNA 序列。这些探针或探针文库是单链的,被探测的微生物 DNA 被转变为单链形式。适合的探针来自编码与被筛选的特异酶活性相似或等同的活性的酶的 DNA。

[0465] [00408] 探针至少为大约 10 个碱基或至少 15 个碱基。在一个方面,整个编码区可用作一个探针。杂交条件可被设计为提供至少大约 50% 序列一致性的杂交严格性条件,更特别的是提供至少大约 70% 序列一致性的严格性条件,其中通过使用至少一种 DNA 探针选择性的分离靶 DNA。

[0466] [00409] 在核酸杂交反应中,用来达到特殊水平严格性的条件将根据被杂交的核酸的特性而变化。例如,核酸杂交区的长度,互补程度,核酸序列组成(如,GC 对 AT 的含量),和核酸类型(如, RNA 对 DNA)可在选择杂交条件时被考虑。其他要考虑的是其中一种核酸是否被固定,如在滤膜上。

[0467] [00410] 逐渐增加的更高严格性条件的实例如下:在大约室温时 2XSSC/0.1% (杂交条件);在室温下 0.2X SSC/0.1% (低严格性条件);在大约 42°C 下 0.2X SSC/0.1% SDS (中严格性条件);和在大约 68°C 下 0.1XSSC (高严格性条件)。仅使用这些条件中的一种来进行冲洗,如高严格性条件,或使用每一种条件,如以上面列举的顺序每种 10-15 分钟,重复任一个或所有列举的步骤。但如上所述,最佳的条件将根据所涉及的特殊杂交反应来变化,可通过经验确定。

[0468] [00411] 探测一个微生物 DNA 文库以分离潜在的目标靶 DNA 的杂交技术在本领域中是为人熟知的,任何在文献中描述的技术都适合在此使用,特别是便于在微生物体 DNA 的剩余物中分离中使用固相结合,直接地或间接结合的探针 DNA 的那些技术。

[0469] [00412] 探针 DNA 可被特异结合对中的一个伴侣(即一种配基)“标记”,对中的另一个伴侣结合在一个固相基质上以便于从其来源物中分离靶标。配基和特异的结合伴侣以任意的方向选自下列:(1) 抗原或半抗原和抗体或其特异结合片段;(2) 生物素或亚胺基生物素和亲和素或抗生蛋白链菌素;(3) 糖和其特异的凝集素;(4) 酶和其抑制剂;(5) 脱辅基酶蛋白和辅因子;(6) 互补的均聚合寡核苷酸;和(7) 激素和其受体。固相可选自:(1) 玻璃或聚合物表面;(2) 填满聚合微珠的柱子;和(3) 磁性或常磁性颗粒。

[0470] [00413] 进一步,可以选择但期望能对已经分离的靶 DNA 进行扩增。在这个方面,靶 DNA 是在分离后从探针 DNA 中分开。然后它在被用于转化宿主前被扩增。选择包含预先确定 DNA 序列一部分的双链 DNA 被处理为单链,进行扩增并再退火,提供扩大量的选择双链 DNA。大量的扩增方法现在是本领域中熟知的。

[0471] [00414] 然后选择的 DNA 通过转化一个合适的生物体被用来制备筛选的文库。如在此特别鉴定的那些宿主,在适合这种转化的条件下通过接种人工导入含有靶 DNA 的载体而被转化。得到的转化克隆的文库然后筛选显示具有目标酶活性的克隆。

[0472] [00415] 从生物体中选择性分离的 DNA 中已经制备了多种克隆后,这些克隆被筛

选一种特异的酶活性,并鉴定具有特异酶特性的克隆。

[0473] [00416] 酶活性的筛选可作用于单个表达克隆或最初作用于表达克隆的混合物以明确是否混合物具有一种或多种特异的酶活性。如果混合物具有一种特殊的酶活性,然后单个克隆采用 FACS 仪器重新筛选这种酶活性或更特异的活性。可选择地,包裹技术如凝胶微滴,可用来将多个克隆定位在一个位置上在 FACS 仪器上被筛选一组克隆中的阳性表达克隆,该组克隆然后被分开为单个克隆,再次在 FACS 仪器上被筛选,鉴定阳性的单个克隆。因此,例如,如果一个克隆混合物具有水解酶活性,然后单个克隆被回收,并采用 FACS 仪器筛选以确定这些克隆中的那一个具有水解酶活性。如在此所使用的“小插入片段文库”的含义是含有最大至近似 5000 个碱基对的随机的较小尺寸核酸插入片段的克隆的一个基因文库。如在此所使用的,“大插入片段文库”的含义是含有近似 5000,最大至几十万个碱基对或更大的随机的较大尺寸核酸插入片段的克隆的一个基因文库。

[0474] 根据上述方面的其中之一,发明提供了筛选含有选择的微生物体 DNA 的克隆的酶活性的一个过程,其中该过程包括:筛选文库中特异的酶活性,所述的文库包括多个克隆,所述的克隆已经从微生物体的基因组 DNA 中回收选择的 DNA 而被制备,其中 DNA 通过与至少一个 DNA 序列杂交而被选择,所述的序列是编码具有比活性的酶的 DNA 序列的所有或一部分;用选择的 DNA 转化一个宿主产生被筛选酶活性的一些克隆。

[0475] [00418] 在一个方面,来自微生物体的以 DNA 文库进行选择步骤,选择其中的能与一条或多条探针 DNA 序列杂交的 DNA,所述的 DNA 序列是编码具有特异酶活性的酶的 DNA 序列的所有或一部分,方法是:(a) 使双链的基因组 DNA 总体成为单链的 DNA 总体;(b) 将(a)的单链 DNA 总体与结合于一个配基的 DNA 探针在允许杂交的条件下接触,以便产生探针和与其杂交的基因组 DNA 总体的双链复合体;(c) 将(b)的双链复合体与所述配基的一个固相特异结合伴侣接触以产生一个固相复合体;(d) 从(b)的单链 DNA 总体中分离固相复合体;(e) 从探针中释放已经与固相结合探针结合的基因组总体的成员;(f) 从(e)的基因组总体成员形成双链 DNA;(g) 将(f)的双链 DNA 导入至一个合适的宿主中以形成一个包含多个克隆的文库,所述的克隆含有选择的 DNA;和(h) 筛选文库中的特异酶活性。

[0476] [00419] 在另一个方面,该过程包括一个预选过程,回收包括信号或分泌序列的 DNA。以这种方式,可能从基因组 DNA 总体中通过如上所述的杂交作用仅选择包括一条信号或分泌序列的 DNA。下面的段落描述了发明的这个方面的方法,通常分泌信号序列的特性和功能和应用这种序列在一个检测中或选择过程中的特殊应用实例。

[0477] [00420] 这个方面的其中之一进一步包括,在(a)之后但在上述的(b)之前的下列步骤:(ai) 将(a)的单链 DNA 总体与一个配基结合的寡核苷酸探针在允许杂交的条件下接触形成双链复合体,所述的探针与对指定类型的蛋白所特有的分泌信号序列是互补的;(aii) 将(ai)的双链复合体与所述配基的一个固相特异结合伴侣接触产生一个固相复合体;(aiii) 从(a)的单链 DNA 总体中分离固相复合体;(aiv) 释放与所述固相结合探针结合的基因组总体成员;和(av) 将固相结合探针从结合它的基因组总体成员中分离出来。

[0478] [00421] 已经被选择和分离,含有一条信号新的 DNA 然后进行上述的选择步骤以从中选择和分离与一条或更多的探针 DNA 序列结合的 DNA,该探针 DNA 序列来自编码具有特异酶活性的酶的 DNA。可用于实施本发明的这种和其他步骤的描述见如美国专利第 6,368,798 和 6,054,267。

[0479] [00422] 在体内,可采用一种以 FACS 为基础的和非光学(如磁性)为基础的仪器进行生物淘选。复合体基因文库用含有稳定已转录 RNA 的元件的载体构建。例如,可产生二级结构如发卡结构的序列的纳入作用是增强其稳定性,并因此增加了其在细胞内的半衰期,所述发卡结构被设计为侧向 RNA 的已转录区。用于生物淘选过程的探针分子包括用报告自分子标记的寡核苷酸,仅在探针与靶分子结合的过程中发荧光。这些探针采用几种转化方法中的一种从文库中被导入进重组细胞中。探针分子与已转录的靶 mRNA 结合后产生 DNA/RNA 异源双链分子。探针与靶标的结合将产生一种荧光信号,可通过 FACS 仪器在筛选过程中检测和分选。

[0480] [00423] 在一些方面,编码 SEQ ID NO:2 的一种多肽,与其实质上相同的序列,或含有其至少大约 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 或 150 个连续氨基酸的片段的核酸与一条能够引导已翻译多肽或其片段分泌的引导序列在合适的时期装配在一起。可选择地,核酸编码一个融合多肽,其中 SEQ ID NO:2 的其中一种多肽,与其实质上相同的序列或含有其至少 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 或 150 个连续氨基酸的片段,与异源肽或多肽如 N-末端标识肽融合,该标识肽可赋予所需的一些特性,如增加的稳定性或简化的纯化。

[0481] [00424] 合适的 DNA 序列通过多种方法被插入至载体中。通常,在用合适的限制性核酸内切酶消化插入物和载体后 DNA 序列被连接于载体内所需的位置上。可选择地,插入物和载体的钝端被连接。多种克隆技术被公开于 Ausubel 等人,分子生物学现代方法 John Wiley 503Sons, Inc. 1997 和 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册,第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。这些和其他方法被认为处于本领域专业技术人员的范围内。

[0482] [00425] 例如载体可以质粒,病毒颗粒或噬菌体的形式。其他的载体包括染色体和非染色体和合成 DNA 序列,SV40 的衍生物;细菌质粒,噬菌体 DNA,杆状病毒,酵母质粒,来自质粒和噬菌体 DNA 组合体的载体,病毒 DNA 如牛痘,腺病毒,禽痘病毒和伪狂犬病毒。多种使用原核和真核宿主的克隆和表达载体的描述见 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册,第二版, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989)。

[0483] [00426] 可使用的特殊细菌载体包括商业上可获得的质粒,含有以下熟知的下列克隆载体的遗传元件,如 pBR322(ATCC 37017), pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), GEM1(Promega Biotec, Madison, WI, USA) pQE70, pQE60, pQE-9(Qiagen), pD10, psiX174pBluescript II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A(Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5(Pharmacia), pKK232-8 和 pCM7。特殊的真核载体包括 pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG(Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, 和 pSVL(Pharmacia)。但只要在宿主细胞中是可复制的和由活力的,可使用任何其他载体。

[0484] [00427] 宿主细胞可以是本领域专业技术人员熟悉的宿主细胞中的任何一种,包括原核细胞,真核细胞,哺乳动物细胞,昆虫细胞,或植物细胞。作为合适宿主的代表性实例,可提到:细菌细胞,如大肠杆菌,链霉菌,枯草芽孢杆菌,鼠伤寒沙门氏菌和假单胞菌属中的各种种属,链霉菌和葡萄球菌属,真菌细胞,如酵母,昆虫细胞如果蝇 S2 和 Spodoptera Sf9,动物细胞如 CHO, COS 或 Bowes 黑色素瘤和腺病毒。合适宿主的选择是本领域专业技术人员能力范围内的。

[0485] [00428] 可采用多种技术将载体导入进宿主细胞中,包括转化,转染,转导,病毒感染,基因枪或 Ti- 介导的基因传递。特殊的方法包括磷酸钙转染,DEAE- 葡聚糖介导的转染, lipofection, 或电穿孔 (Davis, L., Dibner, M. Battey, I., 分子生物学基本方法, (1986))。

[0486] [00429] 适当时,基因工程改造的宿主细胞培养在常规的营养基中,该营养基被修饰以适合激活启动子,选择转化体或扩增发明的基因。在转化适当的宿主株和将宿主株生长到适当的细胞密度后,选择的启动子用适当的手段诱导(如,温度转变或化学诱导),细胞被培养另外一段时间,使其产生所需的多肽或其片段。

[0487] [00430] 细胞典型地通过离心收获,物理或化学手段破坏,得到的粗提物被保留以进一步纯化。用于表达蛋白的微生物细胞通过任何方便的方法破坏,包括冷冻-融化循环,超声,机械破坏,或使用细胞裂解剂。这些方法是本领域专业技术人员熟知的。表达的多肽或其片段通过多种方法从重组细胞培养物中回收和纯化,这些方法包括硫酸铵或乙醇沉淀,酸提取,阴离子或阳离子交换色谱,磷酸纤维素色谱,疏水作用色谱,亲和色谱,羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。如果需要,在完成多肽的构型过程中可使用蛋白重折叠步骤。如果需要,在最后的纯化步骤可使用高效液相色谱(HPLC)。

[0488] [00431] 也可使用多种哺乳动物细胞培养系统来表达重组蛋白。哺乳动物表达系统的实例包括猴肾成纤维细胞的 COS-7 细胞系(其描述见 Gluzman, Cell, 23:175, 1981), 和其他能够从相容的载体中表达蛋白的细胞系,如 C127, 3T3, CHO, HeLa 和 BHK 细胞系。

[0489] [00432] 宿主细胞中的构建物可以常规的方式用来产生重组序列编码的基因产物。根据重组产生步骤中使用的宿主,由含有载体的宿主细胞产生的多肽被糖基化或非糖基化。发明的多肽可包括或不包括初始的蛋氨酸氨基酸残基。关于重组表达蛋白的其他细节是本领域专业技术人员可获得的。例如,蛋白表达:实用方法(实用方法系列由 S. J. Higgins(主编), B. D. Hames(主编)(July 1999) 牛津大学出版社;ISBN:0199636249 对本领域的专业技术人员在很宽范围的生物体中表达蛋白提供了详细的指导。

[0490] [00433] 可选择地, SEQ ID NO:2 的多肽,与其实质上相同的序列,或含有其至少 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 或 150 个连续氨基酸的片段,可通过常规的肽合成仪被合成。在另一个方面,片段或多肽的部分可用来通过肽合成产生相应的全长多肽;因此,可使用片段作为中间体来产生全长多肽。

[0491] [00434] 如在本领域的技术人员所了解的,为了在多种生物体中表达发明的核酸序列可被优化。在一个方面,发明的序列被优化以在目标生物体中进行密码子选择,如一种真菌如酿酒酵母或一种细菌如大肠杆菌。为了密码子选择进行的核酸序列优化在本领域中是很好理解的,是指选择生物体优选的特殊密码子以编码特殊的氨基酸。优化的密码子选择标对许多生物体是已知的。例如,见在蛋白合成中传递 RNA,由 Dolph L Hatfield, Byeong J. Lee, Robert M. Pirtle(主编)(1992 年 7 月)CRC Press;ISBN:0849356989。因此,发明也包括适合生物体的密码子选择的发明核酸。

[0492] [00435] 发明的核酸序列的优化表达也指定向或随机的诱变核酸以影响编码蛋白的表达增强。发明的核酸的诱变可直接或间接的提供表达蛋白增加的产量。通过非限制性实例,在此描述的诱变技术可用来影响核酸的 5' 非翻译区, 3' 非翻译区, 或编码区的突变,其突变可在 RNA 或蛋白水平产生增强的稳定性,因此引起增加的蛋白产量。

[0493] [00436] 无细胞翻译系统也可用来产生 SEQ ID NO:2 的多肽之一,与其实质上相

同的序列,含有其至少 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 或 150 个连续氨基酸的片段,使用一种 DNA 构建物转录的 mRNA,该 构建物含有与编码多肽或其片段的核酸可操作性连接的一个启动子。在一个方面, DNA 构建物在被进行体外转录反应之前被线性化。然后转录的 mRNA 用合适的无细胞翻译提取物孵育,如兔网织红细胞提取物,产生所需的多肽或其片段。

[0494] [00437] 发明也涉及 SEQ ID NO :2 的多肽的变异体,与其实质上相同的序列,或含有其至少 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 和 150 个连续氨基酸的片段。术语“变异体”包括这些多肽的衍生物或类似物。特别的是,变异体在氨基酸序列上与 SEQ ID NO :2 的多肽,与其实质上相同的序列的差异为一个或多个取代,添加,删除,融合和截断,可以任何组合形式存在。

[0495] [00438] 变异体可天然发生或在体外建立。特别的是,这种变异体可采用基因工程技术如位点定向诱变,随机化学诱变,核酸外切酶 III 删除法和标准的克隆技术来建立。可选择地,这些变异体,片段,类似物,或衍生物可采用化学合成或修饰方法来建立。

[0496] [00439] 制备变异体的其他方法也是本领域专业技术人员所熟悉的。这些方法包括从天然分离物中获得的核酸序列被修饰产生编码多肽的核酸,所述多肽具有的特性可增强其在工业或实验室应用中的价值。在这些方法中,大量的与从天然分离物中获得的序列具有一个或多个核苷酸差异的变异体序列可被产生和定性。典型地,与天然分离物的核酸编码的多肽相比,这些核苷酸差异引起了氨基酸变化。

[0497] [00440] 例如,变异体可采用易错 PCR 来建立。在易错 PCR 中, PCR 在 DNA 聚合酶拷贝精度较低的条件下进行,这样在 PCR 产物的全长上获得较高的点突变率。易错 PCR 的描述见 Leung, D. W. 等人, *Technique*, 1 :11-15, 1989 和 Caldwell, R. C. 和 Joyce G. F., *PCR Methods Applic.*, 2 :28-33, 1992。简言之,在这些方法中被突变的核酸与 PCR 引物,反应缓冲液, MgCl₂, MnCl₂, Taq 聚合酶和合适浓度的 dNTP 混合,在全长的 PCR 产物上产生高比例的点突变。例如,反应的进行可使用 20fmole 被突变的核酸, 30pmole 每种 PCR 引物,含有 50mMKCl, 10mM Tris HCl (pH8.3) 和 0.01% 明胶, 7mM MgCl₂, 0.5mM MnCl₂, 5 单位 Taq 聚合酶, 0.2mM dGTP, 0.2mM dATP, 1mM dCTP, 和 1mMdTTP。PCR 的进行可在 94℃ 1min, 45℃ 1min, 和 72℃ 1min 进行 30 循环。但要理解的是,这些参数可适当的改变。被突变的核酸被克隆进合适的载体中,评价被突变核酸编码的多肽的活性。

[0498] [00441] 变异体的建立也可采用寡核苷酸定向诱变在任何目标的克隆 DNA 中产生位点特异的突变。寡核苷酸诱变的描述见 Reidhaar-Olson, J. F. 和 Sauer, R. T. 等人, *Science*, 241 :53-57, 1988。简言之,在这种方法中被导入进克隆 DNA 的携带一个或多个突变的多个双链寡核苷酸被合成,并插入至被突变的克隆 DNA 中。含有被突变的 DNA 的克隆被回收,并评价它们编码的多肽的活性。

[0499] [00442] 产生变异体的另一个方法是集合 PCR。组装 PCR 涉及从小 DNA 片段的混合物中组装 PCR 产物。大量的不同 PCR 产物在同一个容器中同时产生,一个反应的产物可激发另一个反应的产物。组装 PCR 的描述见美国专利申请系列号第 08/677, 112, 归档于 1996 年 7 月 9 日,题目为,“使用阻断或中断合成或扩增过程产生的多核苷酸的 DNA 滑动”法。

[0500] [00443] 产生变异体还有另一个方法是有性 PCR 诱变。在有性 PCR 诱变中,在体外含有不同但高度相关的 DNA 序列的 DNA 分子之间强制发生同源重组,是在序列同源性的基

础上 DNA 分子的随机断裂造成的,然后通过 PCR 反应中的引物延伸来固定交换体。性别 PCR 诱变的描述见 Stemmer, W. P., PNAS, USA, 91:10747-10751, 1994。简言之,在这种方法中,被重组的多个核酸被 Dnase 消化产生平均大小为 50-200 个核苷酸的片段。所需大小的片段被纯化,重新悬浮在 PCR 混合物中。在可促进核酸片段之间重组的条件下进行 PCR。例如,PCR 的进行可通过重新将纯化的片段以 10-30ng/ μ l 的浓度悬浮在 0.2mM 每种 dNTP, 2.2mM $MgCl_2$, 50mM KCl, 10mM Tris HCl, pH9.0 和 0.1% TritonX-100 的溶液中。每 100 μ l 反应溶液中加入 2.5 单位 Taq 聚合酶,PCR 以下列方案进行:94°C 60 秒,94°C 30 秒,50-55°C 30 秒,72°C 30 秒 (30-45 次) 和 72°C 5 分钟。但,要理解的是这些参数可适当改变。在一些方面,寡核苷酸被包含在 PCR 反应中。在其他的方面,DNA 聚合酶 I 的克列诺片段可用在第一组 PCR 反应中,Taq 聚合酶可用在随后的一组 PCR 反应中。重组的序列被分离,并评价它们编码的多肽的活性。

[0501] [00444] 变异体也可在体内诱变建立。在一些方面,在目标序列中的随机突变的产生可通过将目标序列传播至一个细菌菌株中,如大肠杆菌菌株,它携带了一个或多个 DNA 修复通路中的突变。这种“突变基因”株较野生型亲代具有更高的随机突变率。在这些菌株其中一个中传递 DNA 将最后在 DNA 中产生随机的突变。适合用于体内诱变的突变基因菌株的描述见 PCT 申请第 WO 91/16427,公开于 1991 年 10 月 31 日,题目为“从多个基因群中建立表型的方法”。

[0502] [00445] 变异体也可使用基因盒诱变来产生。在基因盒诱变中,双链 DNA 的小区域被与天然序列不同的合成寡核苷酸“基因盒”置换。寡核苷酸经常含有全部和 / 或部分随机化天然序列。

[0503] [00446] 递归整体诱变也可用来产生变异体。递归整体诱变是蛋白工程 (蛋白诱变) 的一种算法,开发用来产生基因表型相关的突变体的不同群体,其成员在氨基酸序列上有差异。这种方法使用了一种反馈机制来控制组合的基因盒诱变的连续循环。递归整体诱变的描述见 Arkin, A. P. 和 Youvan, D. C., PNAS, USA, 89:7811-7815, 1992。

[0504] [00447] 在一些方面,可采用指数整体诱变来产生变异体。指数整体诱变是产生具有较高百分比的独特和功能性突变体的组合文库的一个过程,其中小组别的残基被随机化,同时每个改变的位置上鉴定产生功能蛋白的氨基酸。指数整体诱变的描述见 Delegrave, S. 和 Youvan, D. C., Biotechnol. Res., 11:1548-1552, 1993。随机和位点定向诱变的描述见 Arnold, F. H., Current Opinion in Biotechnology, 4:450-455, 1993。

[0505] [00448] 在一些方面,可采用滑动技术来产生变异体,其中编码不同多肽的多个核酸的部分融合在一起产生编码嵌合多肽的嵌合核酸序列,其描述见美国专利申请系列号第 08/677,112,归档于 1996 年 7 月 9 日,题目为“使用阻断或中断合成或扩增过程产生的多核苷酸的 DNA 滑动法”,和美国专利申请系列号第 08/651,568,归档于 1996 年 5 月 22 日,题目为“组合酶的进展”。

[0506] [00449] SEQ ID NO:2 的多肽的变异体是 SEQ ID NO:2 多肽的一个或多个氨基酸残基被一个保守的或非保守的氨基酸残基 (如一个保守的氨基酸残基) 取代的变异体,这些取代的氨基酸残基可被或不被遗传代码编码。

[0507] [00450] 保守的取代是在一个多肽中一个指定氨基酸被另一个相似特性的氨基酸取代。典型地可见到的是如下置换的保守取代作用:一个脂肪族氨基酸如 Ala, Val, Leu 和

Ile 被另一种脂肪族氨基酸置换 ;Ser 被 Thr 或置换或反之 ;酸性残基如 Asp 和 Glu 被另一个酸性残基置换 ;携带酰胺基的残基如 Asn 和 Gln 被另一个携带酰胺基的残基置换 ;碱性残基如 Lys 和 Arg 被另一个碱性残基交换 ;和一个芳香族残基如 Phe, Tyr 被另一个芳香族残基置换。

[0508] [00451] 另一种变异体是 SEQ ID NO :2 多肽的一个或多个氨基酸残基含有一个取代基的变异体。

[0509] [00452] 还有另一个变异体是其中多肽与另一个化合物结合的变异体,如可增加多肽半衰期的化合物(例如,聚乙二醇)。

[0510] [00453] 其他的变异体是其中其他的氨基酸与多肽融合的变异体,如引导序列,分泌序列,前体蛋白序列或促进多肽的纯化,富集,或稳定的序列。在一些方面,片段,衍生体和类似物保留了与 SEQ ID NO :2 的多肽,和与其实质上相同的序列相同的生物学功能或活性。在另外一些方面,片段,衍生体或类似物包括前体蛋白,这样片段,衍生体或类似物可被前体蛋白的断裂所活化,产生活性多肽。

[0511] 优化密码子在宿主细胞中形成高水平的蛋白表达

[0512] [00454] 发明提供了修饰编码肌醇六磷酸酶核酸以修饰密码子选择的方法。在一个方面,本发明提供了在编码肌醇六磷酸酶的核酸中修饰密码子以增加或减少其在宿主细胞中表达的方法。发明也提供了被修饰以增加其在宿主细胞中表达的编码肌醇六磷酸酶的核酸,如此修饰的肌醇六磷酸酶,和制备修饰肌醇六磷酸酶的方法。该法包括在编码肌醇六磷酸酶的核酸中鉴定“非优选的”或“不太优选的”密码子,并用编码相同氨基酸的“优选的密码子”置换一个或多个这些非优选的或不太优选的密码子,作为置换的密码子,核酸中至少一个非优选的或不太优选的密码子被编码相同氨基酸的优选密码子置换。一个优选的密码子是在宿主细胞基因中编码序列中反复出现的密码子,非优选或不太优选的密码子是宿主细胞基因中的编码序列中较少出现的密码子。

[0513] [00455] 表达本发明的核酸,表达基因盒和载体的宿主细胞包括细菌,酵母,真菌,植物细胞,昆虫细胞和哺乳动物细胞。因此,发明提供了在所有这些细胞,密码子改变的核酸和密码子改变的核酸制备的多肽中优化密码子选择的方法。实例的宿主细胞包括革兰氏阴性细菌,如埃希氏菌属和荧光假单胞菌,革兰氏阳性细菌如多形链霉菌,乳酸乳球菌,枯草芽孢杆菌。实例的宿主细胞也包括真核生物,如多种酵母,如酵母属如酿酒酵母, *Schizosaccharomyces pombe*, 毕赤酵母属,和乳糖克鲁维酵母属,多形汉森酵母,黑曲霉和哺乳动物细胞和细胞系和昆虫细胞和细胞系。因此,发明也包括在这些生物体和种属中为表达而优化的核酸和多肽。

[0514] [00456] 例如,编码从细菌细胞中分离的编码肌醇六磷酸酶的核酸的密码子被修饰,这样核酸最佳地表达在不同于肌醇六磷酸酶来源细菌的细菌细胞,酵母,真菌,植物细胞,昆虫细胞或哺乳动物细胞中。优化密码子的方法在本领域中是熟知的,见如美国专利第 5,795,737 ;Baca(2000) *Int. J. Parasitol.* 30 :113-118 ;Hale(1998) *Protein Expr. Purif.* 12 :185-188 ;Narum(2001) *Infect. Immun.* 69 :7250-7253。也见 Narum(2001) *Infect. Immun.* 69 :7250-7253,描述了在鼠系统中优化密码子 ;Outchkourov(2002) *Protein Expr. Purif.* 24 :18-24,描述了在酵母中优化密码子 ;Feng(2000) *Biochemistry* 39 :15399-15409,描述了在大肠杆菌中优化密码子 ;Humphreys(2000) *Protein Expr.*

Purif. 20 :252-264, 描述了在大肠杆菌中优化影响分泌的密码子选择。

[0515] 转基因的非人动物

[0516] [00457] 发明提供了含有本发明的核酸, 多肽, 表达基因盒或载体或转染或转化细胞的转基因非人动物。转基因非人动物是, 如山羊, 兔, 绵羊, 猪, 牛, 大鼠和小鼠, 含有本发明的核酸。这些动物可被用作, 如体内模型来研究肌醇六磷酸酶活性, 或作为模型筛选体内肌醇六磷酸酶活性的调节物。在转基因非人动物中被表达的多肽的编码序列被设计为结构性的或在组织特异性, 发育特异性或诱导性转录调节因子的控制下。转基因非人动物可采用本领域任何已知的方法来设计和产生; 见, 如美国专利第 6, 211, 428 ; 6, 187, 992 ; 6, 156, 952 ; 6, 118, 044 ; 6, 111, 166 ; 6, 107, 541 ; 5, 959, 171 ; 5, 922, 854 ; 5, 892, 070 ; 5, 880, 327 ; 5, 891, 698 ; 5, 639, 940 ; 5, 573, 933 ; 5, 387, 742 ; 5, 087, 571, 描述了制备和使用转化细胞和卵和转基因小鼠, 兔, 绵羊, 猪和牛。也见如 Pollock(1999) J. Immunol. Methods 231 :147-157, 描述了在转基因产奶动物的奶中产生重组蛋白; Baguisi(1999) Nat. Biotechnol. 17 :456-461, 描述了转基因山羊的产生。美国专利第 6, 211, 428 描述了制备和使用转基因非人哺乳动物, 在其脑中表达了含有一种 DNA 序列的核酸构建物。美国专利第 5, 387, 742 描述了将克隆的重组或合成 DNA 序列注射进受精的鼠卵中, 将被注射的卵植入至假孕的雌鼠中, 生长为足月转基因小鼠, 其细胞表达了与阿尔兹海默病的病理学相关的蛋白。美国专利第 6, 187, 992 描述了制备和使用转基因小鼠, 其基因组含有编码淀粉样前体蛋白 (APP) 基因的破坏。

[0517] [00458] “基因敲除小鼠”也可用于实施本发明的方法。例如, 在一个方面, 本发明的转基因或修饰的动物含有“基因敲除动物”, 如“基因敲除小鼠”, 它被基因工程改造不表达或不能表达肌醇六磷酸酶。

[0518] 筛选方法学和“实时”监测装置

[0519] [00459] 在实施本发明的方法中, 多种仪器和方法可与本发明的多肽和核酸一起使用, 如筛选多肽的肌醇六磷酸酶活性, 筛选作为活性潜在调节物的化合物 (如酶活性的增强或抑制), 为获得与本发明的多肽结合的抗体, 与本发明的核酸杂交的核酸等。

[0520] 固定的酶固体支持物

[0521] [00460] 肌醇六磷酸酶, 其偏酸和编码酶的黑酸和片段被附着在一个固体支持物上。这在工业过程中使用肌醇六磷酸酶时经常是经济和有效的。例如, 肌醇六磷酸酶的聚生体或夹心体 (或其活性片段), 被用于特殊的化学反应中, 可被附着于一个固体支持物上, 并浸入一个加工桶中。发生酶学反应。然后固体支持物被拿出桶中, 酶固定在上面供重复使用。在本发明的一个实施例中, 发明的分离核酸被固定在一个固体支持物上。在发明的另一个实施例中, 固体支持物选自凝胶, 树脂, 聚合物, 陶瓷, 玻璃, 微电极和其任何组合。

[0522] [00461] 例如, 用于本发明固体支持物包括凝胶。凝胶的一些实例包括琼脂糖, 明胶, 戊二醛, 壳聚糖处理的戊二醛, 白蛋白-戊二醛, 壳聚糖-黄原胶, toyopearl gel (聚合物凝胶), 藻酸盐, 藻酸盐-多熔素, 角叉菜胶, 琼脂糖, 乙醛酞琼脂糖, 磁性琼脂糖, 葡聚糖-琼脂糖, 聚 (氨基甲酰磺酸盐) 水凝胶, BSA-PEG 水凝胶, 磷酸化聚乙烯醇 (PVA), 单氨乙酰-N-氨乙酸 (MANA), 氨基, 或其任何组合。

[0523] [00462] 用于本发明的其他固体支持物是树脂或聚合物。树脂或聚合物的一些实例包括纤维素, 丙烯酰胺, 尼龙, 人造纤维, 聚脂, 阴离子交换树脂, AMBERLITE™ XAD-7,

AMBERLITE™ XAD-8, AMBERLITE™ IRA-94, AMBERLITE™ IRC-50, 聚乙烯, 聚丙烯酸, 聚甲基丙烯酸酯, 或其任何组合。用于本发明的另一类型固体支持物是陶瓷。一些实例包括非多孔陶瓷, 多孔陶瓷, SiO_2 , Al_2O_3 。用于本发明的另一类型固体支持物是玻璃。一些实例包括非多孔玻璃, 多孔玻璃, 氨丙基胺或其任何组合。另一类可使用的固体支持物是微电极。一个实例是聚乙烯亚胺包被的磁石。石墨颗粒可用作固体支持物。固体支持物的另一个实例是细胞, 如红血细胞。

[0524] [00463] 固定的方法

[0525] [00464] 在本领域的专业技术人员了解的许多方法可固定酶或其片段, 或核酸在一个固体支持物上。这些方法的一些实例包括, 如静电飞沫产生, 电化学手段, 采用吸收, 共价结合, 经交联, 经化学反应或加工, 经包裹, 经包载, 经藻酸钙, 或经聚(2-羟乙基甲基丙烯酸盐)。类似的方面描述于酶学方法, 固定的酶和细胞, C 部分, 1987. Academic Press. S. P. Colowick 和 N. O. Kaplan 主编, 136 卷; 和酶和细胞的固定, 1997. Humana Press. G. F. Bickerstaff 主编。系列: 生物技术方法 J. M. Walker 主编。

[0526] [00465] 毛细管阵列

[0527] [00466] 毛细管阵列, 如 GIGAMATRDC™, Diversa Corporation, San Diego, CA, 可用于发明的方法中。发明的核酸或多肽被固定或应用于一个阵列上, 包括毛细管阵列。阵列可被用来筛选或监测组合物的文库(如小分子, 抗体, 核酸等)其结合本发明的核酸或多肽或调节其活性的能力。毛细管阵列提供了另一个系统来固定和筛选标本。例如, 一个标本筛选仪器包括进入相互邻接毛细管阵列的多个毛细管, 其中每个毛细管包含至少一个为保留标本而限定管腔的壁。仪器进一步包括排列在阵列邻接毛细管之间的间隙材料, 和一个或多个在间隙材料中形成的参考标记。筛选标本的毛细管, 其中毛细管适合在毛细管的阵列中被结合, 可包括为保留标本限定管腔的第一个壁, 为滤光激发能量形成滤光材料的第二个壁, 该能量施加至管腔使标本感光。

[0528] [00467] 多肽或核酸, 如一种配基, 可被导入至第一个组分中, 进入至少毛细管阵列的一个毛细管的一部分。毛细管阵列的每一个毛细管包括至少为保留第一个组分而限定管腔的一个壁。一个气泡被导入至毛细管中位于第一个组分后。第二个组分被导入至毛细管中, 其中第二个组分与第一个组分通过气泡被分开。目标标本被作为第一种液体, 用可检测的微粒标记, 被导入至毛细管阵列的一个毛细管中, 其中毛细管阵列的每个毛细管含有为保留第一种液体和可检测微粒而限定管腔的至少一个壁, 其中为了可检测微粒与至少的一个壁结合, 至少的一个壁被结合材料覆盖。该法进一步包括从毛细管上去掉第一种液体, 其中结合的可检测微粒仍然保留在毛细管中, 并将第二种液体导入至毛细管中。

[0529] [00468] 毛细管阵列包括多个单个毛细管, 它含有限定管腔的至少一个外侧壁。毛细管的外侧壁可以是一个或多个互相融合的壁。相似地, 只要这些壁为了保留液体或标本而形成管腔, 它们可将管腔限定为圆柱形, 正方形, 六角形或其他任何的几何形状。毛细管阵列的毛细管可相互被固定接近以形成成面构造。毛细管可相互结合, 通过被融合(如, 其中毛细管由玻璃制成), 粘合, 焊接或并排夹紧。毛细管阵列可以任何数目的单个毛细管形成, 例如从 100 至 4,000,000 个毛细管的范围。毛细管阵列可形成具有大约 100,000 或更多个单个毛细管互相结合的微滴定板。

[0530] [00469] 阵列, 或“生物芯片”

[0531] [00470] 发明的核酸或多肽被固定或应用于一个阵列上。阵列可被用来筛选或监测组合物的文库（如小分子，抗体，核酸等）其结合本发明的核酸或多肽或调节其活性的能力。例如，在本发明的一个方面，一个监测参数是肌醇六磷酸酶基因的转录表达。细胞的一个或多个或所有的 转录物的检测通过将含有细胞的转录物，或代表细胞转录物或其互补的核酸的标本与固定在一个阵列或“生物芯片”上的核酸杂交。采用微芯片上核酸的“阵列”，一些或所有细胞的转录物被同时定量。可选择地，含有基因组核酸的阵列也可用来确定由本发明方法制备的新基因工程菌株的基因型。“多肽阵列”也可用来同时定量多个蛋白。

[0532] [00471] 本发明可用任何已知的“阵列”来实施，“阵列”也称为“微阵列”或“核酸阵列”或“多肽阵列”或“抗体阵列”或“生物芯片”，或其变异体。阵列从属类上是多个“斑点”或“靶元件”，每个靶元件含有特定量的一个或多个生物分子，如寡核苷酸，它们被固定在底物表面的特定区域上以特异地结合于标本分子，如 mRNA 转录物。

[0533] [00472] 在实施本发明的方法中，任何已知的阵列和 / 或制备方法和应用阵列可以整体或部分，或其变化形式被合并在一起，其描述，例如见美国专利第 6,277,628 ; 6,277,489 ;6,261,776 ;6,258,606 ;6,054,270 ;6,048,695 ;6,045,996 ;6,022,963 ; 6,013,440 ;5,965,452 ;5,959,098 ;5,856,174 ;5,830,645 ;5,770,456 ;5,632,957 ; 5,556,752 ;5,143,854 ;5,807,522 ;5,800,992 ;5,744,305 ;5,700,637 ;5,556,752 ; 5,434,049 ; 也 见，如 WO 99/51773 ;WO 99/09217 ;WO 97/46313 ;WO 96/17958 ; 也 见，如 Johnston(1998)Curr. Biol. 8 :R171-R174 ;Schummer(1997)Biotechniques 23 : 1087-1092 ;Kern(1997)Biotechniques 23 :120-124 ;Solinas-Toldo(1997)Genes, Chromosomes & Cancer 20 :399-407 ;Bowtell(1999)Nature Genetics Supp. 21 :25-32。也见已公开的美国专利申请第 20010018642 ;20010019827 ;20010016322 ;20010014449 ; 20010014448 ;20010012537 ;20010008765。

[0534] 多肽和肽

[0535] [00473] 发明提供了与发明的实例序列，如 SEQ ID NO :2 具有一致序列的分离的或重组的多肽。如上所述，一致性可覆盖多肽的全长，或一致性覆盖的区域为至少大约 50, 77, 100, 150, 200, 250, 300 或更多的残基（至多肽的全长）。发明的多肽也可比实例多肽的全长短（如 SEQ IDNO :2）。在可选择的实施例中，发明提供了大小范围在大约 5 和多肽全长之间的多肽（肽，片段），如肌醇六磷酸酶；实例的大小范围是大约 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400 或更多的残基，如 SEQ IDNO :2 的实例肌醇六磷酸酶的连续残基。发明的多肽可用于，例如标记探针，抗原，toleragens，基序，肌醇六磷酸酶活性位点。

[0536] [00474] 发明的多肽和肽可从天然来源分离的，是合成的，或重组产生的多肽。多肽和蛋白可在体外或体内被重组表达。本发明的肽和多肽可采用本领域任何已知的方法制备和分离。发明的多肽和肽也可采用本领域熟知的化学方法被合成，全部或部分。见如，Caruthers(1980)Nucleic Acids Res. Symp, Ser. 215-223 ;Horn(1980)Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232 ;Banga, A. K., 治疗性肽和蛋白，剂型，加工和输送系统 (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA。例如，肽合成可采用多种固相技术来进行（见如，Roberge(1995)Science 269 :202 ;Merrifield(1997)Methods Enzymol. 289 :3-13），自

动的合成可采用如 ABI 431A 肽合成仪 (Perkin Elmer) 根据厂商提供的说明书来完成。

[0537] [00475] 发明的肽和多肽也可被糖基化。糖基化可在翻译后被化学性或通过细胞生物合成机制被加入,其中后者合并使用了已知的糖基化基序,基序可以是序列所天然具有的或作为一个肽加入或添加在核酸编码序列中。糖基化可以是 O- 连接或 N- 连接的,或其组合。

[0538] [00476] 发明的肽和多肽,如上所定义的,包括所有“拟态的”和“肽拟态的”形式。术语“拟态的”和“肽拟态的”是指具有与发明多肽实质上相同的结构和 / 或功能特性的合成化学化合物。拟态物是完全由合成,氨基酸的非天然同功异质体组成,或是部分天然肽氨基酸和氨基酸的部分非天然同功异质体的嵌合分子。拟态物也可合并任何量的天然氨基酸保守取代,只要这些取代实质上不改变拟态结构和 / 或活性。与是保守变异体的发明的多肽一样,常规的实验将确定是否拟态物是否在本发明的范围内,即其结构和 / 或功能实质上未改变。因此,在一个方面,如果具有肌醇六磷酸酶活性,拟态组合物在本发明的范围内。

[0539] [00477] 发明的多肽拟态组合物可含有非天然结构组分的任何组合。在可选择的方面,发明的拟态组合物包括以下三个结构基团的一个或全部:a) 不是天然的酰胺键(“肽键”)连接的残基连接基团;b) 替代天然存在的氨基酸残基的非天然残基;或 c) 诱导二级结构拟态,即诱导或稳定二级结构如 β 反转, γ 反转, β 片层, α 螺旋构型和类似结构的残基。例如,当其所有或一些残基通过化学方法而不是天然肽键加入时,发明的一种多肽被定性为一种拟态物。单个肽拟态残基可通过肽键而不是化学键或耦合的方式被加入,如戊二醛, N- 羟基琥珀酸亚胺酯,双功能马来酰亚胺, N, N'- 二环己基碳二亚胺 (DCC) 或 N, N'- 二异丙基碳二亚胺 (DIC)。可替代传统酰胺键(“肽键”)连接的连接基团包括,如南五味子酮(如, $-C(=O)-CH_2\text{-for-}C(=O)-NH-$), 氨亚甲基 (CH_2-NH), 乙烯, 烯烃 ($CH=CH$), 乙醚 (CH_2-O), 硫醚 (CH_2-S), 四唑 (CN_4-), 噻唑, retroamide, 硫代酰胺, 或酯(见如, Spatola (1983) 氨基酸, 肽和蛋白质化学和生物化学, 第 7 卷, 267-357 页, “蛋白主链修饰” Marcell Dekker, NY)。

[0540] [00478] 发明的多肽也可通过含有替代天然存在的氨基酸残基的所有或部分非结构残基而被定性为拟态物。非结构残基较详细的描述于科学可专利文献中;用作天然氨基酸残基的拟态物的少量实例的非天然组合物和指导方针如下所述。芳香族氨基酸的拟态物可通过被下列物质取代而产生,如 D- 或 L-naphylalanine; D- 或 L- 苯基甘氨酸; D- 或 L-2 噻吩丙氨酸; D- 或 L-1-, 2-, 3-, 或 4- 苊基丙氨酸 (pyrenylalanine); D- 或 L-3 噻吩丙氨酸; D- 或 L-(2-吡啶基 pyridinyl)- 丙氨酸; D- 或 L-(3-吡啶基 pyridinyl)- 丙氨酸; D- 或 L-(2-吡嗪基)- 丙氨酸; D- 或 L-(4-异丙基)- 苯基甘氨酸; D-(三氟甲基)- 苯基甘氨酸; D-(三氟甲基)- 苯丙氨酸; D-p- 氟- 苯丙氨酸; D- 或 L-p- 联苯基苯丙氨酸; K- 或 L-p- 甲氧基- 联苯基苯丙氨酸; D- 或 L-2- 吡啶 (烷基) 丙氨酸; 和 D- 或 L-alkylainines, 其中烷基是被取代的或未被取代的甲基, 乙基, 丙基, 己基, 丁基, 戊基, 异丙基, 异丁基, 仲-isotyl, 异戊基, 或非酸性氨基酸。非天然氨基酸的芳香环包括, 如噻唑基, 苯硫基, 吡唑基, 苯并咪唑基, 萘基, 呋喃基, 吡咯基, 和吡啶基芳香环。

[0541] [00479] 酸性氨基酸的拟态物可通过下列的物质取代而产生, 如非羧酸盐氨基酸但保留了负电荷; (膦酰基) 丙氨酸; 硫酸化苏氨酸。羧基侧基(如天冬氨酰或谷氨酰基)也可选择性地通过与碳化二亚胺 ($R'-N-C-N-R'$) 如 1- 环己基-3(2-吗啉基)-(4-乙基)

碳化二乙胺或 1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲戊基)碳化二甲胺反应而被修饰。天冬氨酰或谷氨酰基也可通过与铵离子反应被转变为天冬酰胺酰和谷酰胺基残基。碱性氨基酸的拟态物可通过用下列物质取代而产生,如(除了赖氨酸和精氨酸)氨基酸鸟氨酸,瓜氨酸,或(胍基)-乙酸,或(胍基)烷乙酸,其中烷基如上定义。亚硝酸盐衍生物(如,含有替代COOH的CN部分)被取代为天冬酰胺或谷氨酰胺。天冬酰胺酰和谷酰胺残基被去氨基成为相应的天冬氨酰或谷氨酰残基。精氨酸残基拟态物可通过精氨酰基与下列物质反应而产生,如一个或多个常规试剂,包括如苯甲酰甲醛,2,3-丁二酮,1,2-环-己二酮,或茚三酮,优选在碱性条件下。酪氨酸残基拟态物可通过酪氨酰基与下列基团反应而产生,如芳香重盐化合物或四硝基甲烷。N-乙酰咪唑和四硝基甲烷被用于分别形成O-乙酰酪氨酰类和3-硝基衍生物。半胱氨酸残基拟态物通过半胱氨酰基与下列物质反应而产生,如 α -卤代乙酸盐如2-氯乙酸或氯乙酰胺和相应的胺;产生羧甲基或羧酰胺甲基衍生物。半胱氨酸残基拟态物也可通过半胱氨酰基与下列物质反应而产生,如溴-三氟丙酮, α -溴- β -(5-咪唑基(imidazolyl))丙酸;氯乙酰磷酸盐,N-烷基马来酰亚胺(alkylmaleimides),3-硝基-2-吡啶二硫化物;甲基2-吡啶二硫化物;p-氯汞基苯甲酸盐;2-氯汞基-4硝基苯酚;或氯-7-硝基苯并-oxa-1,3-二唑。赖氨酸拟态物可通过赖氨酰基与下列物质反应而产生(和氨基末端残基被改变),如琥珀酸或其他羧酸酐。赖氨酸和其他含有 α -氨基的残基拟态物也通过与酰亚胺酯反应而产生,如甲基picolinimide,吡哆醛磷酸盐,吡哆醛,氯氢硼化物(chloroborohydride),三硝基-苯磺酸,O-甲基异脲,2,4,戊二酮,和转酰氨基酶催化的与乙醛酸的反应。蛋氨酸的拟态物可通过与下列物质反应而产生,如蛋氨酸亚砷。脯氨酸的拟态物包括,如哌啶酸,噻唑烷羧酸,3-或4-羟基脯氨酸,脱氢脯氨酸,3-或4-甲基脯氨酸,或3,3,-二甲基脯氨酸。组氨酸残基拟态物可通过组氨酰基与下列物质的反应而产生,如diethylprocarbonate或对-溴化溴苯甲酰甲基。其他的拟态物包括,如通过脯氨酸和赖氨酸羟基化作用;丝氨酰或苏氨酰残基的羟基磷酸化;赖氨酸,精氨酸和组氨酸 α -氨基的甲基化;N-末端胺的乙酰化;主链酰胺残基的甲基化或使用N-甲基氨基酸的取代;或C-末端羧基的酰胺化产生的物质。

[0542] [00480] 本发明多肽的一种残基,如氨基酸也可被相反手性的氨基酸(或肽拟态残基)置换。因此,任何天然存在的L-构型氨基酸(根据化学实体的结构也被称为R或S)可被相同化学结构型的氨基酸或肽拟态物置换,而相反手性的氨基酸,它们称为D-氨基酸,也称为R-或S-形。

[0543] [00481] 发明也提供了通过天然的过程,如翻译后加工(如磷酸化,酰化作用等)或通过化学修饰技术修饰发明的多肽的方法,和得到的修饰多肽。修饰可发生在多肽内的任何位置,包括肽主链,氨基酸侧链和氨基或羧基末端。要理解的是相同类型的修饰可以相同或不同的程度存在于指定多肽的几个位置上。指定的多肽也可具有许多类型的修饰。修饰包括乙酰化,酰化,ADP-核糖基化,酰胺化,核黄素的共价附着,血红素部分的共价附着,核苷酸或核苷酸衍生体的共价附着,脂质或脂质衍生物的共价附着,磷脂酰肌醇的共价附着,交联环化,二硫键形成,脱甲基化,共价交叉联接的形成,半胱氨酸的形成,焦谷氨酸形成,甲酰化, γ -羧化作用,糖基化,GPI锚着形成,羟基化,碘化,甲基化,肉豆蔻酰化,氧化,pegylation,蛋白水解加工,磷酸化,异戊烯化,外消旋化,selenoylation,硫酸化和传递RNA介导的添加氨基酸至蛋白上,如精氨酰化。见如,Creighton, T. E., 蛋白质—结构和

分子特性,第二版,W.H.Freeman and Company, New York(1993);蛋白的翻译后共价修饰,B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1-12 页(1983)。

[0544] [00482] 固相化学肽合成方法也可用来合成本发明的多肽或片断。这种方法在本领域中自 20 世纪 60 年代初期就已经被了解了(Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963)(也见 Stewart, J. M. 和 Young, J. D., 固相肽合成, 第二版, Pierce Chemical Co., Rockford, III, 11-12 页)),最近它被用于市售的实验室肽设计和合成试剂盒(Cambridge Research Biochemicals)。这种市售的实验室试剂盒通常使用 H. M. Geysen 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3998(1984) 的讲授,并能提供在所有都连接于一个单板的大量“棒”或“针”的顶端上合成肽。当使用这样一种系统时,一板棒或针被倒置并插入至第二板相应的孔中或容器内,它们含有可将合适的氨基酸附着或锚着在棒或针的尖端上的溶液。通过重复这样一种加工步骤,即将棒和针的尖端倒置并插入合适的溶液中,氨基酸被组合成所需的肽。另外,还有许多可用的 FMOC 肽合成系统。例如,多肽或片段的组装可采用 Applied Biosystems, Inc. 431A™ 型自动肽合成仪在固体支持物上进行。这种设备提供了获得本发明多肽的简易途径,可通过直接合成或合成可采用其他已知的技术偶联的一系列片段。

[0545] [00483] 发明的另一个方面是与 SEQ ID NO:2 的其中一个多肽具有至少大约 70%,至少大约 80%,至少大约 85%,至少大约 90%,至少大约 95%,或超过大约 95%同源性的多肽或其片段,与其实质上相同的序列,或含有其至少 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 或 150 个连续氨基酸的片段。可采用上述的任何程序来确定同源性,该程序可排列被比较的多肽和片段,并确定它们之间氨基酸一致性或相似性的程度。将要理解的是氨基酸“同源性”包括如上述的那些保守的氨基酸取代。

[0546] [00484] 与 SEQ ID NO:2 的其中一个多肽具有同源性的多肽或片段,与其实质上相同的序列,或含有其至少大约 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 或 150 个连续氨基酸的片段,可采用上述的技术分离编码它们的核酸而获得。

[0547] [00485] 可选择地,可通过生物化学富集或纯化方法获得同源的多肽或片段。潜在的同源多肽或片断的序列可通过蛋白水解消化,凝胶电泳和/或微测序来测定。预测的同源多肽或片段的序列可采用在此所述的任何一个程序与 SEQ ID NO:2 的其中一个多肽,与其实质上相同的序列,或含有其至少大约 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 或 150 个连续氨基酸的片段比较。

[0548] [00486] 发明的另一个方面是鉴定 SEQ ID NO:2 的片段或变异体,与其实质上相同的序列的测定方法,这些片保留了 SEQ ID NO:2 的多肽和与其实质上相同的序列的酶功能。例如,多肽的片段或变异体可用来催化生物化学反应,该反应可显示所述的片段或变异体保留了 SEQ ID NO:2 中多肽的酶活性。

[0549] [00487] 测定变异体的片段是否保留了 SEQ ID NO:2 的多肽,和与其实质上相同的序列的酶活性的检测方法包括以下的步骤:将多肽片段或变异体与底物分子在允许多肽片段或变异体发挥功能的条件下接触,并检测底物水平的减少或多肽和底物之间反应的特定反应产物水平的增加。

[0550] [00487] 测定变异体的片段是否保留了 SEQ ID NO:2 的多肽,和与其实质上相同的序列的酶活性的检测方法,包括以下的步骤:将多肽片段或变异体与底物分子在允许多

肽片段或变异体发挥功能的条件下接触,并检测底物水平的减少或多肽和底物之间反应的特异反应产物水平的增加。

[0551] [00488]SEQ ID NO:2 的多肽,与其实质上相同序列,或含有其至少 5,10,15,20,25,30,35,40,50,75,100,或 150 个连续氨基酸的片段可用于多种应用中。例如,多肽或其片段可用来催化生物化学反应。根据本发明的一个方面,提供了使用具有 SEQ ID NO:2 的多肽,和与其实质上相同的序列,或编码这种多肽的多核苷酸来水解卤代烷烃的过程。在这个方法中,含有卤代烷烃化合物的物质与 SEQ ID NO:2 的其中一个多肽,与其实质上相同的序列在可促进化合物水解的条件下接触。

[0552] [00489] 抗体和抗体为基础的筛选方法

[0553] [00490] 发明提供了可特异结合发明的肌醇六磷酸酶的分离或重组抗体。这些抗体可用来分离,鉴定或定量发明的肌醇六磷酸酶或相关的多肽。这些抗体可用来抑制发明的一种酶的活性。这些抗体可用于与发明的多肽相关的分离多肽,如相关的肌醇六磷酸酶。

[0554] [00491] 抗体可用于免疫沉淀,染色(如 FACS),免疫亲和柱等。如果需要,编码特异抗原的核酸序列可通过免疫作用而产生,然后分离多肽或核酸,扩增或克隆,将多肽固定在发明的一个阵列上。可选择地,发明的方法可用来修饰抗体的结构,如抗体的亲合性被增加或降低,该抗体由要被修饰的细胞产生。而且,制备或修饰抗体的能力是一种基因显型,它已通过发明的方法被改造进入细胞中。

[0555] [00492] 免疫,产生和分离抗体(多克隆和单克隆)的方法是本领域的专业技术人员所了解的,并描述在科学和专利文献中,参见如 Coligan,现代免疫学方法, Wiley/Greene, NY(1991); Stites(主编)基础和临床免疫学(第 7 版) Lange Medical Publications, Los Altos, CA(“Stites”); Coding,单克隆抗体:原理和实践(第二版) Academic Press, New York, NY(1986); Kohler(1975) Nature 256:495; Harlow(1988) 抗体,实验室手册, Cold Spring Harbor Publications, New York。抗体也可在体外产生,除了使用动物的传统体内方法以外,如采用表达噬菌体排列文库的重组抗体结合位点。参见如 Hoogenboom(1997) Trends Biotechnol. 15:62-70; Katz(1997) Amu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45。

[0556] [00493] 多肽可用来产生与发明的多肽特异结合的抗体。得到的抗体可用在免疫亲和色谱法中分离或纯化多肽或确定多肽是否存在于一个生物标本中。在这种方法中,蛋白制剂,如一种提取物或一个生物标本与能够与发明的其中一个多肽特异结合的抗体接触。

[0557] [00494] 在免疫亲合法中,抗体与一个固体支持物附着,如一个微珠或其他柱基质。蛋白制剂在抗体与发明的其中一个多肽特异结合的条件下被放置与抗体接触。在冲洗去除非特异结合的蛋白后,洗脱特异结合的多肽。

[0558] [00495] 生物标本中的蛋白与抗体结合的能力可采用本领域中专业技术人员所熟悉的多种方法来测定。例如,通过用可检测的标记如一种荧光剂,一个酶学标记,或一种放射性同位素标记抗体可测定结合作用。可选择地,抗体与标本的结合可采用具有这样一种可检测标记的二抗来检测。特殊的测定法包括 ELISA 测定,夹心测定,放射免疫测定和 Western 印迹。

[0559] [00496] 针对发明多肽产生的多克隆抗体可通过将多肽直接注射进一个动物体内

或通过多肽给予动物,例如非人的动物而获得。然后如此获得的抗体可与多肽本身结合。以这种方式,即使仅编码多肽的一个片段的序列也可用来产生可与整个天然多肽结合的抗体。这种多肽然后用来从表达该多肽的细胞中分离多肽。

[0560] [00497] 为了制备单克隆抗体,可使用任何从连续细胞系培养中产生抗体的技术。实例包括杂交瘤技术,三系杂交瘤 (trioma) 技术,人 B 细胞杂交瘤技术和 EBV 杂交瘤技术 (参见,如, Cole (1985) 单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, Inc., 77-96 页)。

[0561] [00498] 描述产生单链抗体的技术 (见如,美国专利第 4,946,778) 适合产生发明多肽的单链抗体。可选择地,转基因小鼠可用来表达这些多肽或其片段的人源化抗体。

[0562] [00499] 针对发明多肽的抗体可用来从其他生物体和标本中筛选相似的多肽。在这种技术中,来自生物体的多肽与抗体接触,特异结合抗体的那些多肽被检测。任何上述的方法可用来检测抗体结合。

[0563] [00500] 试剂盒

[0564] [00501] 发明提供了含有组合物,如核酸,表达盒,载体,细胞,多肽 (如,肌醇六磷酸酶) 和 / 或发明的抗体的试剂盒。如在此所述,试剂盒也含有讲授本发明的方法学和工业应用的说明材料。

[0565] [00502] SEQ ID NO :2 的多肽,其实质上相同的序列或含有其至少 5,10,15,20,25,30,35,40,50,75,100,或 150 个连续氨基酸的片段,也可用来产生与酶多肽或片段特异结合的抗体。得到的抗体可用于免疫亲和色谱法中分离或纯化多肽或确定多肽是否存在于一个生物标本中。在这个方法中,蛋白制剂,如一种提取物,或一种生物标本接触能特异结合 SEQ ID NO :2 的其中一种多肽,其实质上相同的序列,或前述序列片段的抗体。

[0566] [00503] 在免疫亲合法中,抗体附着在一个固体支持物上,如一个微珠或其他柱基质。蛋白制剂在抗体与 SEQ ID NO :2 的其中一个多肽,其实质上相同的序列或其片段特异结合的条件下被放置与抗体接触。在冲洗去除非特异结合的蛋白后,洗脱特异结合的多肽。

[0567] [00504] 生物标本中的蛋白结合抗体的能力可采用本领域中专业技术人员所熟悉的任何一种方法来测定。例如,可通过使用一个可检测的标记如一种荧光剂,一种酶标记,或一种放射性同位素标记抗体来测定结合作用。可选择地,抗体与标本的结合可采用具有这样一种可检测标记的二抗来检测。特殊的测定法包括 ELISA 测定法,夹心测定法,放射免疫测定法,和 Western 印迹。

[0568] [00505] 针对 SEQ ID NO :2 的多肽和与其实质上相同的序列,或含有其至少 5,10,15,20,25,30,35,40,50,75,100,或 150 个连续氨基酸的片段产生的多克隆抗体,可通过直接将多肽注射进一个动物中,或通过多肽给予一个动物,如非人动物而获得。这样获得的抗体然后与多肽本身结合。以这种方式,即使仅编码多肽的一个片段也可用来产生与整个天然多肽结合的抗体。然后这个抗体用来从表达该多肽的细胞中分离多肽。

[0569] [00506] 为了制备单克隆抗体,可使用任何从连续细胞系培养中产生抗体的技术。实例包括杂交瘤技术 (Kohler 和 Milstein, Nature, 256 :495-497, 1975), 三系杂交瘤技术,人 B- 细胞杂交瘤技术 (Kozbor 等人, Immunol. Today 4 :72, 1983), 和 EBV- 杂交瘤技术 (Cole 等人, 1985, 单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, Inc., 77-96 页)。

[0570] [00507] 描述产生单链抗体的技术 (美国专利第 4,946,778) 适合产生例如 SEQ ID NO :2 的多肽和其片段的单链抗体。可选择地,转基因小鼠可用来表达这些多肽或片段的人

源化抗体。

[0571] [00508] 针对 SEQ ID NO :2 的多肽,与其实质上相同的序列或含有其至少 5,10,15,20,25,30,35,40,50,75,100,或 150 个连续氨基酸的片段产生的抗体可用来从其他生物体和标本中筛选相似的多肽。在这种技术中,来自生物体的多肽与抗体接触,并检测与抗体特异结合的这些多肽。任何上述的方法可用来检测抗体结合。这样一种筛选测定法的描述见“测定纤维素酶活性的方法”,Methods in Enzymology,卷 160,87-116 页。

[0572] [00509] 如在此使用的,术语“SEQ ID NO :1 中所示的核酸序列”包括 SEQ ID NO :1 中所示的核酸序列,与其实质上相同的序列,任何一种或多种前述序列的片段,与 SEQ ID NO :1 同源,或与 SEQ ID NO :1 的片段同源的核酸序列和与所有前述序列互补的序列。该片段包括 SEQ ID NO :1 的一部分,后者含有 SEQ ID NO :1 的至少 10,15,20,25,30,35,40,50,75,100,150,200,300,400 或 500 个连续核苷酸,和与其实质上相同的序列,是指与这些序列具有至少 99%,98%,97%,96%,95%,90%,85% 80% 75% 或 70% 同源性的序列。同源性可采用在此描述的任何一种计算机程序和参数来测定,包括默认参数的 FASTA 3.0t78 版。同源序列也包括 RNA 序列,其中在 SEQ ID NO :1 中所示的核酸序列中尿嘧啶替代了胸腺嘧啶。同源序列可采用在此所述的任何方法获得,或通过校正测序的错误而获得。将要理解的是发明的核酸序列可以传统的单个字符的格式来表示(见 Starrier, Lubert. 生物化学,第三版,W.H Freeman and Co.,New York 的封底内侧。)或以任何可在序列中记录核苷酸的一致性的格式。

[0573] [00510] 如在此所使用的,术语“在 SEQ ID NO :2 中所示的多肽序列”包括在 SEQ ID NO :2 中所示的多肽序列,与其实质上相同的序列,它们由 SEQ ID NO :1 中所示的序列编码,与 SEQ ID NO :2 中的多肽同源的多肽序列,或任何前述序列的片段。同源多肽序列是指具有与发明的其中一个多肽序列具有至少 99%,98%,97%,96%,95%,90%,85%, 80%,75% 或 70% 同源性的多肽序列。同源性可采用在此所述的任何计算机程序和参数来测定,包括默认参数或任何变更参数的 FASTA 3.0t78 版。同源序列可采用在此所述的任何方法来获得或通过校正测序的错误而获得。多肽片段含有 SEQ ID NO :2 的多肽的至少 5,10,15,20,25,30,35,40,50,75,100,或 150 个连续氨基酸,和与其实质上相同的序列。要理解的是发明的多肽可以传统的单个字符的格式或三个字母的格式来表示(见 Starrier, Lubert. 生物化学,第三版,W.H Freeman and Co.,New York 的封底内侧。)或以任何可在序列中表示多肽的一致性的格式。

[0574] 可采用上述程序检测的基序包括编码亮氨酸拉链的序列,螺旋-转角-螺旋基序,糖基化位点,泛素化位点, α 螺旋,和 β 片层,编码可引导编码蛋白分泌的信号肽的信号序列,在转录调节中起作用的序列如同源框,酸性序列,酶活性位点,底物结合位点和酶断裂位点。

[0575] [00512] 分离的多核苷酸序列,多肽序列,其变异体和突变体被测定保留了本发明酶的生物学活性特性,例如在检测酶的肌醇六磷酸酶活性的测定中(Food Chemicals Codex,第四版)。这种酶包括肌醇六磷酸酶的截断形式,和变异体如 SEQ ID NO :2 中所示的多肽序列的删除和插入变异体。也就是,肌醇六磷酸酶在 70℃ 处理 30 分钟残留的特异活性大约为 90%,在 75℃ 时处理 30 分钟大约为 50%。发明的肌醇六磷酸酶的耐热性在使用酶作为饲料添加剂时是有利的,因为饲料在高温下可发霉,成颗粒状,或成丸状。

[0576] [00513] 例如,在一个方面,发明提供了可食用的丸状酶输送基质和用来输送肌醇六磷酸酶至动物体内的方法,例如作为一种营养添加剂。酶输送基质很容易的释放一种肌醇六磷酸酶,如具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列或其至少 30 个连续氨基酸,在水相介质中,如动物的消化液中。发明的酶输送基质可从颗粒状的可食用载体中制备,载体选自下列的这些成分,如被耗干油的谷物种子,甘草,苜蓿,梯牧草,大豆壳,向日葵籽粉,小麦粉和类似物,它可很容易的将含在其中的重组酶分散至水相介质中。在使用中,可食用的酶输送基质被给予一种动物,将肌醇六磷酸酶输送至动物体内。合适的谷物为基础的底物包含或来自任何合适的可食用谷物,如小麦,玉米,大豆,高粱,苜蓿,大麦和类似物。一种实例的以谷物为基础的底物是玉米为基础的底物。底物可来自谷物的任何合适的部分,例如被批准用于动物饲料的谷物种子,如在湿的或干的研磨过程中获得的玉米种子。谷物种子包含被榨干的种子,它是已被排除油的谷物种子,如通过挤压或己烷或其他溶剂提取。可选择地,谷物种子是被螺旋压榨器提取的,即油通过挤压被去除。

[0577] [00514] 发明的酶输送基质是分散的多个微粒,丸状或颗粒的形状。“颗粒”的含义是被压缩或压紧的微粒,如通过制丸,挤压或相似的压制作用从基质中去除水。这种微粒的压缩或压紧也可促进微粒的粒子内粘合。例如,颗粒可通过在制片机中将以谷物为基础的底物制丸而制备。由此制备的丸被磨碎或粉碎成颗粒,其大小适合用作动物饲料中的一种添加剂。由于基质本身被批准用于动物饲料,它也可被用作将酶输送至动物饲料中的稀释剂。

[0578] [00515] 酶输送基质可以是颗粒的形状,其大小的范围是从大约 4 至大约 400 筛目(美国工业标准(USS));或大约 8 至大约 80 筛目;或大约 14 至大约 20 筛目。如果谷物种子经溶剂提取被榨干,在制片机中需要使用一种润滑剂如玉米油,但如果种子是被螺旋压榨器提取的,这种润滑剂通常是不需要的。在发明的另一个方面,基质通过其他的压制或压缩过程来制备,例如挤压谷物为基础的底物通过一个冲模和研磨挤出物成为合适的颗粒大小。

[0579] [00516] 酶输送基质进一步包括一个多糖成分作为粘合剂来增强基质颗粒的粘聚性。粘合剂被认为提供了额外的羟基基团,可增强基质颗粒内谷物蛋白之间的键。可进一步认为其他的羟基也可通过增强蛋白与淀粉和其他蛋白的羟基键来起作用。粘合剂可以任何适合增强酶输送基质颗粒的粘聚性的量存在。合适的粘合剂包括一种或多种葡聚糖,糊精-麦芽糖复合剂,淀粉,如玉米淀粉,面粉,纤维素,半纤维素和类似物。例如,基质中谷物种子和粘合剂的百分比(不包括酶)是 78%玉米种子粉和 20%重量的玉米淀粉。

[0580] [00517] 因为发明的酶释放基质由生物可降解材料制成,因此基质可遭受酸败,如在发霉过程中。为了防止或抑制这种发霉,基质可包括一种霉菌抑制剂,如丙酸盐,可以任何足以抑制酶释放基质发霉的量存在,因此为输送基质提供了稳定的剂型,不需冷藏。

[0581] [00518] 包含在发明的酶输送基质和方法中的肌醇六磷酸酶在一个方面上是一种耐热肌醇六磷酸酶,如在此所述,是为了在制造过程中抵抗肌醇六磷酸酶的失活,其中使用升高的温度和/或蒸汽来制备丸状的酶输送基质。在消化含有发明的酶输送基质的饲料过程中,水相的消化液将使活性酶释放。其他类型的耐热酶和耐热的营养添加剂也可加入至输送基质中以便在任何水相条件下释放。

[0582] [00519] 为了多种不同的目的一种涂料可用于发明的酶基质微粒,如为了相动物

饲料中加入一种香料或营养添加剂以延缓动物饲料添加剂和酶在胃内的释放,和类似情况。或涂料可用于达到一种功能性目的,例如不管何时需要从基质微粒中缓慢的释放酶或控制酶要被释放的条件。涂料材料的组合物可以是这样的,即可选择性地被它所敏感的一种试剂破坏(如热,酸或碱,酶或其他化学制品)。可选择地,对不同的这种破坏剂敏感的一种或多种涂料可连续的用于基质微粒。

[0583] [00520] 发明也可针对制备一种酶释放基质的过程。根据本发明,该过程提供了以谷物为基础的底物的分散的多个微粒,其微粒大小适合用作一种酶释放基质,其中微粒含有由 SEQ ID NO:2 编码的肌醇六磷酸酶或其中至少 30 个连续的氨基酸。该过程包括压紧或压缩酶释放基质的微粒成为颗粒,它可通过微粒化形成。霉菌抑制剂和粘聚剂,当使用时,可在任何合适的时间加入,可在谷物为基础的底物的微粒化之前以所需的比例与谷物为基础的底物混合。在制片机饲料中的湿量在上面所示的根据最后产物中的湿量范围内,优选为大约 14-15%。水份可以酶的水相制剂形式加入到原料中,使原料达到这种湿量。在制片机中的温度使用蒸汽可达到大约 82°C。制片机可在对原料施加足够操作以形成丸的任何条件下运转。粒化过程本身是从含酶组合物中去除水份的经济成本合算的过程。

[0584] [00521] 在一个方面,制片机在 100lb./min 压力下使用 1/8 英寸 X2 英寸的模子在 82°C 运转以制成丸,然后它在一个制粒粉碎机中被粉碎形成分散的多个微粒,其微粒大小能够通过 8 筛目的筛子但被保留在 20 筛目的筛子上。

[0585] [00522] 在此所述的耐热肌醇六磷酸酶具有较高的最适温度,较高的热抵抗性或耐热性。因此发明的肌醇六磷酸酶通常考虑在最适温度以上的温度下进行酶反应。发明的肌醇六磷酸酶也在接触高温后进行酶反应(耐热性是在一定温度下保持酶活性的能力,其中野生型肌醇六磷酸酶在前面接触高温后是活性的,即使高温能灭活或减小酶活性,也见上面对耐热性的定义)。根据本发明编码肌醇六磷酸酶的基因(如,在 SEQ ID NO:1 中所示的)可用于制备肌醇六磷酸酶(如采用在此所述的 GSSM),它具有的特性与 SEQ ID NO:2 的肌醇六磷酸酶不同(就最适 pH,最适温度,热抵抗性,对溶剂的稳定性,特异怀尔,对底物的亲合性,分泌能力,翻译率,转录控制和类似特性而言)。而且,SEQ ID NO:1 的多核苷酸可用来筛选在此所述的方法制备的肌醇六磷酸酶变体以确定含有所需活性,如改善的或修饰的热稳定性或耐热性。例如,美国专利第 5,830,732,描述肌醇六磷酸酶耐热性的筛选测定方法。

[0586] 这种筛选测定法的体外实例是随后检测肌醇六磷酸酶活性的测定法。肌醇六磷酸酶活性的测定可通过将 150 μ l 酶制剂与 600 μ l 2mM 肌醇六磷酸钠在 100mM Tris HCl 缓冲液, pH 7.5, 添加 1mM CaCl_2 37°C 孵育 30 分钟。在孵育后,添加 750 μ l 5% 三氯乙酸中止反应。在添加 1500 μ l 显色试剂后在分光光度计 700nm 上对应磷酸盐标准品测定释放的磷酸盐(4 体积 5.5% 硫酸中的 1.5% 钼酸铵和 1 体积 2.7% 硫酸亚铁; Shimizu, 1992)。一单位的酶活性被定义为在检测条件下每分钟释放 1 μ mol Pi 所需要酶的量。比活性可表示为每 mg 蛋白酶活性的单位数。本发明的酶具有水解肌醇六磷酸盐为肌醇和游离磷酸的酶活性。

[0587] [00524] 在一个方面,本发明提供了水解肌醇六磷酸盐的方法,包括将肌醇六磷酸盐与在此公开的一个或多个新的肌醇六磷酸酶分子接触(如 SEQ ID NO:2)。相应地,发明提供了催化肌醇六磷酸盐水解为肌醇和游离磷酸盐,从肌醇六磷酸盐复合体中释放矿物质的

方法。方法包括将肌醇六磷酸盐底物与产生降解的有效量发明酶接触,如在 SEQ ID NO:2 中所示的酶。术语“产生降解的有效”量是指与不接触酶的肌醇六磷酸盐相比,需要降解至少 50% 肌醇六磷酸盐的酶的量。80% 的肌醇六磷酸盐被降解。

[0588] [00525] 在另一个方面,发明提供了水解肌醇六磷酸盐中磷酸单酯键的方法。该法包括应用有效量的发明肌醇六磷酸酶分子(如 SEQ IDNO:2),产生肌醇和游离磷酸盐。“有效”量是指与不与酶接触的肌醇六磷酸盐相比,需要水解至少 50% 磷酸单酯键的酶的量。在一个方面,至少 80% 的键被水解。

[0589] [00526] 在一个特殊的方面,当需要时,肌醇六磷酸酶分子与其他试剂如其他催化剂组合使用;为了在肌醇六磷酸盐分子和/或底物来源的其他分子中形成化学变化(如,水解)。根据这个方面,肌醇六磷酸酶分子和其他的试剂将不能互相抑制。肌醇六磷酸酶分子和其他的试剂总体具有相加效应,或可选择地,肌醇六磷酸酶分子和其他试剂总体上具有协同效应。

[0590] [00527] 底物肌醇六磷酸盐分子的相关来源包括食品,有潜力的食品,食品的副产品(体外和体内的副产品,如离体反应产物和动物排泄的产物),食品的前体和任何肌醇六磷酸盐的其他原料来源。

[0591] [00528] 在一个非限制性的方面,重组肌醇六磷酸酶可被生物体摄取,在摄取过程中保留活性。在另一个例证中,转基因方法可用来完成重组肌醇六磷酸酶的表达一如,以可控制的方式(这些方法用来以时间特异性和组织特异性的方式控制转基因分子的表达)。

[0592] [00529] 在一个方面,在来源原料(如,转基因植物来源或重组原核生物宿主)中肌醇六磷酸酶活性可在摄取的过程中增加;这种活性的增加可发生在,例如原-形式的前体肌醇六磷酸酶分子转变为明显更高活性酶的更成熟形式的过程中,其中所述的转变例如可来自肌醇六磷酸酶来源的摄入和消化。肌醇六磷酸酶底物的水解可发生在肌醇六磷酸酶与肌醇六磷酸盐接触过程中的任何时间;例如可发生在摄入前或消化后或摄入底物或酶或两者的之前或之后。另外要理解的是肌醇六磷酸盐底物除了与肌醇六磷酸酶以外,可与一个或多个其他的试剂接触,如其他的酶,也可直接应用或在从其来源原料中纯化后应用。

[0593] [00530] 可理解的是肌醇六磷酸酶来源原料可直接与肌醇六磷酸盐来源原料接触;如在体外或体内研磨或咀嚼肌醇六磷酸酶来源和肌醇六磷酸盐来源之一或两种的过程中。可选择地在肌醇六磷酸酶和肌醇六磷酸盐底物接触之前,肌醇六磷酸酶可从来源原料中被纯化,或肌醇六磷酸盐底物从来源原料中被纯化,或肌醇六磷酸酶和肌醇六磷酸盐底物都从来源原料中被纯化。可以理解的是可使用纯化和未纯化的试剂的组合-包括酶或底物或两种都包括。

[0594] [00531] 可理解的是超过一种以上的来源原料可作为肌醇六磷酸酶活性的来源。这可用作从来源原料形成试剂的定时释放的一种方法,其中不同的试剂从其来源原料中分别释放,例如象被摄入的来源原料在体内被消化或来源原料在体外应用中被加工。超过一种的肌醇六磷酸酶活性的来源原料也可在一定范围的条件及其波动范围内获得肌醇六磷酸酶活性,可遇到的条件如 pH 值的范围,温度,盐度和时间间隔,例如在应用的不同加工步骤中。不同来源原料的应用也可用来获得不同的药剂,如通过肌醇六磷酸酶的一种或多种形式或同分异构体和/或肌醇六磷酸和/或其他原料为例证。

[0595] [00532] 要理解的是单个来源原料,如一种转基因植物种属(或其植物部分),可

以是肌醇六磷酸酶和肌醇六磷酸的来源原料；酶和底物可在所述的单个原料内有差别的被区分开一如分泌与不分泌的，在不同的植物部分或器官或组织内，或在同种植物部分或器官或组织内的亚细胞区室内有差别的表达和/或具有不同的丰度。其中含有的肌醇六磷酸酶分子的纯化包括分离和/或进一步加工一种或多种所需的植物部分或器官或组织或亚细胞区室。

[0596] [00533] 在一个特殊的方面，本发明提供了采用含有增加量酶的种子催化体内和/或体外反应的一种方法。该法包括以基本形式加入转基因，非野生型种子，至反应混合物中，使种子中的酶增加反应率。通过将种子直接加入至反应混合物中，该法向提取和纯化酶的更昂贵和繁琐过程提供了一种溶液。也提供了处理的方法，其中来自一种或多种植物种属，如转基因植物种属以种子的形式将酶给予缺乏酶足够供应的生物体中，该种属含有增加量的酶。关于这种方法的其他细节可见公共文献和/或是专业技术人员所了解的。在一个非限制性的例证中，这些公开可获得的文献包括美国专利第 5,543,576 (Van Ooijen 等人) 和美国专利第 5,714,474 (Van Ooijen 等人)，尽管这些文献不能讲授本应用中的发明分子和代替讲授真菌肌醇六磷酸酶的应用。

[0597] [00534] 在一个特殊的非限制性方面，本肌醇六磷酸酶分子可用来产生重组的消化系统生活型（或微生物或菌群）和用来将所述的重组消化系统生活型给予动物。给药可选择地单独进行或与其他酶和/或其他生活型一起给予，可在消化系统中提供酶活性，其中所述的酶和所述的生活型可以是重组的或其他的类型。例如，给药可与分解木聚糖细菌一起进行。

[0598] [00535] 在一个非限制性的方面，本发明提供了一种方法，将谷粒或高粱粒在存在酶制剂的情况下浸入含有二氧化硫的温水中，所述的酶制剂含有一种或多种降解肌醇六磷酸镁钙的酶，如以存在于谷物或高粱中的肌醇六磷酸镁钙大体上被降解的量。酶制剂含有肌醇六磷酸酶和/或酸性磷酸酶和选择性的其他植物原料降解酶。浸泡时间为 12 至 18 小时。通过中间的研磨步骤可中断浸泡，减少浸泡时间。在一个方面，谷粒或高粱粒在存在酶制剂的情况下被浸泡在含有二氧化硫的温水中，所述的酶制剂包括一种或多种肌醇六磷酸镁钙降解酶，如肌醇六磷酸酶和酸性磷酸酶以消除或大幅度减少肌醇六磷酸和肌醇六磷酸盐。关于这种方法的其他细节可见公共文献和/或是专业技术人员了解的。在一个例证中，这种公开可获得的文献包括美国专利第 4,914,029, (Caransa 等人) 和 EP 0321004 (Vaara 等人)。尽管这些文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0599] [00536] 在一个非限制性的方面，本发明提供了一种方法，获得具有所需物理特性如无粘性和弹性的发酵面团和优良特性如特殊体积的面包产品，包括将肌醇六磷酸酶分子加入至发酵面团中。在一个方面，本发明的肌醇六磷酸酶分子加入至正在加工的发酵面团制品中，该制品随后成形并被烘烤。关于这种方法的其他细节可见公共的文献和/或是专业技术人员了解的。在一个例证中，这种公开可获得的文献包括 JP03076529 (Hara 等人)，尽管本文献不能讲授本应用的发明肌醇六磷酸酶分子。

[0600] [00537] 在一个非限制性的方面，本发明提供了一种产生改良大豆食品的方法。大豆与本发明的肌醇六磷酸酶分子混合在一起，从大豆中去除肌醇六磷酸，因此产生了大豆食品，这些食品在为食用的生物体供应痕量基本营养物和对蛋白的消化性方面是有改善的。在一个方面，在产生豆奶的过程中，本发明的肌醇六磷酸酶分子可被加入或带入与大豆

接触,以便减少肌醇六磷酸的含量。在一个非限制性的例证中,应用过程的加速可通过将豆奶与酶在加热的条件下振摇或通过在一个振摇容器中使用固化的酶进行混合型反应。关于这种方法的其他细节可见公共文献和/或是专业技术人员已知的。在一个特殊的非限制性例证中,这种公共可获得的文献包括 JP 59166049 (Kamikubo 等人),尽管此文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0601] [00538] 在一个方面,本发明提供了产生饮用水或液体形式动物饲料的一种混合物产品的一种方法,其中它包括使用矿物质昆河务和维生素混合无,也包括本发明的新的肌醇六磷酸酶分子。在一个方面为食用的生物体获得正确剂量和混合物成分的必须营养素,而没有重要矿物质/维生素沉淀和破坏的任何危险,而同时最佳的利用是由在饲料中肌醇六磷酸钙镁结合的磷酸盐形成的。关于这种方法的其他细节可见公共文献和/或是专业技术人员已知的。在一个例证中,这种公共可获得的文献包括 EP 0772978 (Bendixen 等人),尽管此文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0602] [00539] 可以理解的是根据霉菌和/或谷粒和/或其他植物的应用,本发明的肌醇六磷酸酶分子也可用于产生其他乙醇和非乙醇的可饮用食品(或饮料)。这些可饮用的食品包括白酒,葡萄酒,混合酒精饮料(如,冷酒器,其他酒精咖啡如爱尔兰咖啡等),啤酒,淡啤酒,果汁,榨汁,匀浆和浓汤。在一个方面,在此公开的肌醇六磷酸酶分子被用来产生转基因的霉菌和/或谷粒和/或其他植物,可用来产生这种可饮用的食品。在另一个方面,在此公开的肌醇六磷酸酶分子被用作这种可饮用食品制造过程中和/或最终含量中的附加成分。关于这种方法的其他细节可见公共文献和/或是专业技术人员已知的。但由于本发明的新颖性,在公共可获得的文献中参考文献不能讲授在此公开的发明分子。

[0603] [00540] 在另一个非限制性的例证中,本发明提供了获得精制米酒的一种手段,该米酒中含有的肌醇六磷酸钙镁的量减少,肌醇的量增加。这样的一种米酒可通过直接和/或心理的效应-对肝脏疾病,动脉硬化和其他疾病具有一种预防作用。在一个方面,从大米日本酒曲中产生米酒,通过繁殖具有高肌醇六磷酸酶活性的一种大米日本酒曲霉菌为原料。可以理解的是本发明的肌醇六磷酸酶分子可用来产生一种具有增强活性的适用霉菌(如转基因霉菌)和/或外源性的加入以增加日本酒曲霉菌的作用。菌株被加入至煮沸的大米中,通过常规的步骤产生日本酒曲。在一个例证中,使用已制备的日本酒曲,全部大米在两个阶段中被制备,在持续不变的米酒温度 15°C 下生产米酒,得到目的精制米酒,其含有的肌醇六磷酸钙镁的量减少,肌醇的量增加。关于这种方法的其他细节可见公共文献和/或是专业技术人员已知的。在一个例证中,这种公共可获得的文献包括 JP 06153896 (Soga 等人)和 JP 06070749 (Soga 等人),尽管这些文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0604] [00541] 在一个非限制性的方面,本发明提供了获得能够促进矿物质吸收的吸收剂的方法,矿物质包括没有被胃液或肠液低成本消化的摄入的钙。在一个方面,矿物质吸收剂含有肌醇六磷酸的部分水解产物作为活性成分。肌醇六磷酸的部分水解产物可采用本发明的新肌醇六磷酸酶分子水解肌醇六磷酸或其盐而产生。使用肌醇六磷酸酶分子的处理可单独进行和/或组合进行(抑制或增强最终的效果),然后在一定范围内抑制水解以便不释放所有的磷酸根。关于这种方法的其他细节可见公共文献和/或是专业技术人员已知的。在一个特殊的非限制性例证中,这种公开可获得的文献包括 JP 04270296 (Hoshino),尽管在公共可获得的文献中的参考文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0605] [0100] 在一个非限制性的方面,本发明提供了产生一种酶组合物的一种方法(及其产物),该组合物含有一种附加的,或优选协同的肌醇六磷酸盐水解活性;所述的组合物含有本发明的新的肌醇六磷酸酶分子和一种或多种其他的试剂以形成可用来联合处理的一种组合物。在一个方面,本发明的联合处理可使用至少两种不同位置特异性的肌醇六磷酸酶来完成,即 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 和 6- 肌醇六磷酸酶的任意组合。通过组合不同位置特异性的肌醇六磷酸酶,获得了一种附加的或协同的效应。如食品和饲料的组合或食品和含有这种肌醇六磷酸酶的饲料添加剂的组合物,以及其制备过程也包含在本发明中。关于这种方法的其他细节可见公共文献和/或是专业技术人员已知的。在一个例证中,这种公开可获得的文献包括 W09 830681 (Ohmann 等人),尽管在公共可获得的文献中的参考文献不能讲授本应用中发明分子的使用。

[0606] [0101] 在另一个方面,本发明的联合处理可使用一种酸性磷酸酶来完成,它在 pH2.5 具有肌醇六磷酸盐的水解活性,对应 pH2.5 : 5.0 活性曲线的比例较低,从大约 0.1 : 1.0 至 10 : 1,优选从大约 0.5 : 1.0 至 5 : 1,或从大约 0.8 : 1.0 至 3 : 1,或从大约 0.8 : 1.0 至 2 : 1。酶组合物优选在热处理过程中显示更高的肌醇六磷酸盐协同水解效率。酶组合物可用在食品的处理过程中(可饮用的和固体食品,饲料和草料产品)以改善肌醇六磷酸盐的水解。关于这种方法的其他细节可见公共文献和/或是专业技术人员已知的。在一个特殊的非限制性例证中,这种公开的可获得的文献包括美国专利第 5,554,399 (Vanderbeke 等人) 和美国专利第 5,443,979 (Vanderbeke 等人),但不能讲授真菌(特别是曲霉菌属)肌醇六磷酸酶的应用。

[0607] [0102] 在一个非限制性的方面,本发明提供了产生一种组合物的一种方法(及其产物),该组合物含有本发明新的肌醇六磷酸盐作用酶,组合了一种或多种其他作用于多糖的酶。这种多糖选自阿聚糖,果聚糖,脱氧半乳聚糖,半乳聚糖,半乳醛糖(galacturonans),葡聚糖,甘露聚糖,木聚糖,果聚糖,岩藻依聚糖,角叉胶,半乳卡罗聚糖,果胶,果胶酸,直链淀粉,支链淀粉,动物淀粉,胶淀粉,纤维素,羧甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素,右旋糖酐,石脐素,几丁质,琼脂糖,角质素,软骨素,皮肤素(dermatan),透明质酸,褐藻酸,和含有至少一个醛糖,酮糖酸或胺的多糖,选自赤癣糖,苏阿糖,核糖,阿拉伯糖,木糖,来苏糖,阿洛糖,阿卓糖,葡萄糖,甘露糖,古洛糖,艾杜糖,半乳糖,塔罗糖,赤癣酮糖,核酮糖,木酮糖,阿洛酮糖,果糖,山梨糖,塔格糖,葡萄糖醛酸,葡萄糖酸,葡糖二酸,半乳糖醛酸,甘露糖醛酸,氨基葡萄糖,氨基半乳糖和神经氨酸。

[0608] [0103] 在一个特殊的方面,本发明提供了产生一种具有协同的肌醇六磷酸盐水解活性组合物的方法(及其产物),该组合物含有一种或多种本发明新的肌醇六磷酸酶分子,纤维素酶(也包括木聚糖酶),可选择地一种蛋白酶,和可选择地一种或多种其他的试剂。在可选择的方面,这种联合的处理可用于处理食品,木材制品如纸制品和作为清洁溶液和固体。

[0609] [0104] 在一个非限制性的例证中,本发明的肌醇六磷酸酶分子可与纤维素酶成分一起组合使用。已知许多可加水分解纤维素的细菌的纤维素酶可组合成散在的多酶复合体,称为纤维素酶小体(cellulosomes)。纤维素酶小体的多个亚单位由大量的功能结构区组成,它们相互作用,并和纤维质底物作用。这些亚单位的其中一个包括一种独特的新类型的非催化性骨架多肽,它可选择性地将多个纤维素酶和木聚糖酶整合成内聚复合体。纤维

素酶小体杂合物和纤维素小体结构区的嵌合构建物的灵活应用应该能够更好的应用纤维素的生物资源量,并为研究,医学和工业中新的应用提供了广阔的范围。

[0610] [0105] 在另一个非限制性的例证中,本发明的肌醇六磷酸酶分子可单独或以组合处理的方式用于生物制浆和生物漂白的领域,其中需要减少在制浆和漂白工业中传统使用的对环境有危害的化学制品的应用。污水处理代表了另一个巨大的应用领域,其中生物酶已经显示不仅在除色,而且在将潜在有害物质生物转变为有用的生物产品方面均是有作用的。

[0611] [0106] 在另一个非限制性的例证中,本发明的肌醇六磷酸酶分子可用来产生生活型,它可提供至少一种酶活性—单独或组合处理的形式—用在生物体消化系统的处理过程中。要被处理的特别相关的生物体包括非反刍类生物体,尽管反刍类生物体也可得益于这种处理。特殊的是,可以理解这种方法可单独进行或与其他生物分子组合进行(例如,木聚糖酶)产生表达多个生物学分子的重组宿主。也可理解的是本发明肌醇六磷酸酶分子和/或表达本发明肌醇六磷酸酶分子的重组宿主的给药可单独进行或与其他生物学分子,和/或可在消化系统中提供酶活性的生活型组合应用—其中所述的其他酶和所述的生活型可以是重组的或其他形式的。例如,给药也可与木聚糖裂解(xylanolytic)细菌一起进行。

[0612] [0107] 例如,除了肌醇六磷酸盐,许多生物体也不能充分地消化半纤维素。半纤维素或木聚糖是植物原料的主要成分(35%)。对于反刍类动物,大约50%的饮食木聚糖被降解,但在非反刍类动物和人类的下段肠道中仅有小量的木聚糖酶降解。在瘤胃中,主要的分解木聚糖的菌属是溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)和栖瘤胃拟杆菌(*Bacteroids ruminicola*)。在人结肠中,卵形拟杆菌(*Bacteroids ovatus*)和脆弱拟杆菌亚种“a”(*Bacteroides fragilis* subspecies “a”)是主要的分解木聚糖的细菌。木聚糖是化学复合体,其降解需要多种酶。这些酶在肠道细菌上的表达在种属间变化很大。溶纤维丁酸弧菌可制造细胞外木聚糖酶,但拟杆菌种属具有细胞结合的木聚糖酶活性。来自肠道细菌的分解木聚糖的酶的生化特性并没有完全明确。一种木糖苷酶基因已经从溶纤维丁酸弧菌113中被克隆。使用从溶纤维丁酸弧菌49中克隆的木聚糖酶基因进行的DNA杂交数据表明这种基因可存在于其他溶纤维丁酸弧菌菌株中。从栖瘤胃拟杆菌中克隆的木聚糖酶被传递至,并高度表达在脆弱拟杆菌和均一拟杆菌(*Bact. Uniformis*)中。来自卵形拟杆菌的阿拉伯糖苷酶和木糖苷酶已经被克隆,两种活性似乎都可被新的,单一的,双功能酶催化。

[0613] [0108] 因此,可以理解本发明的肌醇六磷酸酶分子可用来1)传递至一个合适的宿主中(如脆弱拟杆菌或均一拟杆菌);2)在得到的宿主中获得充分的表达;和3)将所述的宿主给予生物体以改善被处置生物体降解肌醇六磷酸盐的能力。在遗传学和生物化学领域的继续研究将为在肠道水平调控消化作用提供知识和思路,并提高对结肠纤维消化作用的理解。

[0614] [0109] 关于这种方法的其他细节可见公共文献和/或是专业技术人员已知的。在一个特殊的非限制性例证中,这种公开可获得的文献包括美国专利第5,624,678(Bedford等人),美国专利第5,683,911(Bodie等人),美国专利第5,720,971(Beauchemin等人),美国专利第5,759,840(Sung等人),美国专利第5,770,012(Cooper),美国专利第5,786,316(Baek等人),美国专利第5,817,500(Hansen等人),和期刊(Jeffries,1996;

Prade, 1996 ;Bayer 等人, 1994 ;Duarte 等人, 1994 ;Hespell 和 Whitehead, 1990 ;Wong 等人, 1988), 尽管这些参考文献不能讲授本应用的发明肌醇六磷酸酶分子, 也不能全部讲授在生产食品, 木材制品如纸制品过程中添加肌醇六磷酸酶分子和用作清洁溶液和固体。相对比的是本发明讲授了肌醇六磷酸酶分子, 如本发明的肌醇六磷酸酶分子可加入至已公开的试剂中以便获得具有附加的肌醇六磷酸酶活性的制剂。试剂和添加的肌醇六磷酸酶分子不能互相抑制。试剂和添加的肌醇六磷酸酶分子总体上具有相加效应。试剂和添加的肌醇六磷酸酶分子总体上具有协同效应。

[0615] [0110] 在一个非限制性的方面, 本发明提供了一种方法 (及其产物), 增强肌醇六磷酸盐的磷的利用, 治疗和预防动物中的胫软骨发育不良, 特别是家禽, 通过给予动物一种含有羟基化维生素 D₃ 衍生物的饲料组合物。维生素 D₃ 衍生物包含在含有降低水平的钙和磷的饲料中, 给予动物以增强肌醇六磷酸盐的磷的利用。因此, 维生素 D₃ 衍生物可与本发明的新的肌醇六磷酸酶分子一起组合给药, 以进一步增强肌醇六磷酸盐的磷的利用。关于这种方法的其他细节可见公共文献和 / 或是专业技术人员已知的。在一个特殊的非限制性例证中, 这种公开的可获得的文献包括美国专利第 5, 516, 525 (Edwards 等人) 和美国专利第 5, 366, 736 (Edwards 等人), 美国专利第 5, 316, 770 (Edwards 等人), 尽管这些文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0616] [0111] 在一个非限制性的方面, 本发明提供了一种方法 (及其产物) 以获得食品 1) 含有在生物体的机体内很容易被吸收, 以肌醇形式利用的肌醇六磷酸钙镁; 2) 能够以排泄物的方式减少磷, 和 3) 因此可用于改善环境污染。所述的食物由含有肌醇六磷酸钙镁的谷粒, 产生乳酸的微生物和本发明的一种新的肌醇六磷酸酶分子的混合物组成。在一个方面, 所述的食物生产通过将含有肌醇六磷酸钙镁的谷粒 (优选, 如米糠) 和一种具有嗜酸特性的, 产生乳酸而不产生丁酸的, 去除了致病性的有效的微生物群, 和肌醇六磷酸酶混合在一起。有效的微生物基团的实例包括如属于放线菌属菌群的链霉菌 (*Streptomyces* sp.) (美国模式微生物保藏所编号 ATCC 3004 (American Type Culture Collection No. ATCC 3004)) 和属于乳酸杆菌菌群的乳酸菌 (*Lactobacillus* sp.) (IF03070)。进一步, 优选的有效微生物菌群的添加量根据谷物原料的量以细菌体重量计算为 0.2wt%。进一步, 肌醇六磷酸酶的添加量根据谷物原料中肌醇六磷酸钙镁的量优选为 1-2wt. %。关于这种方法的其他细节可见公共文献和 / 或是专业技术人员已知的。在一个特殊的非限制性例证中, 这种公开可获得的文献包括 JP 08205785 (Akahori 等人), 尽管这些公开获得的文献中的参考文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0617] [0112] 在一个非限制性的方面, 本发明提供了一种方法, 以改善植物蛋白的溶解性。更特殊的是, 发明涉及在植物蛋白来源中溶解蛋白的方法, 其中该法包括用有效量的一种或多种肌醇六磷酸酶—包括本发明的肌醇六磷酸酶分子来处理植物蛋白来源, 并用有效量的一种或多种蛋白水解酶来处理植物蛋白来源。在另一个方面, 发明提供了动物饲料添加剂, 包括一种肌醇六磷酸酶和一种或多种蛋白水解酶。关于这种方法的其他细节可见公共文献和 / 或是专业技术人员已知的。在一个特殊的非限制性例证中, 这种公开可获得的文献包括 EP0756457 (WO 9528850 A1) (Nielsen 和 Knap), 尽管在公开可获得的文献中的参考文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0618] [0113] 在一个非限制性的方面, 本发明提供了一种可产生一种植物蛋白制剂的方

法,该制剂包括在水中分散植物蛋白来源原料,其 pH 范围是 2 至 6,并与这里的本发明的肌醇六磷酸酶分子混合。含有可溶性蛋白的酸性提取物被分离和干燥产生所需特性的固体蛋白。一种或多种蛋白酶也可用来改善蛋白的特性。关于这种方法的其他细节可见公共文献和 / 或是专业技术人员已知的。在一个特殊的非限制性例证中,这种公开可获得的文献包括美国专利第 3,966,971 (Morehouse 等人),尽管这些公共可获得的文献中的参考文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0619] [0114] 在一个非限制性的方面,本发明提供了一种方法(及其产物),来活化土壤和 / 或混合肥料中的无机磷,以改善氮化合物的利用率,通过向混合肥料中添加三种试剂,肌醇六磷酸酶,皂角苷和壳聚糖来抑制致病性霉菌的繁殖。在一个非限制性的方面,该法包括通过以下方式处理混合肥料:1) 加入在培养基中含有肌醇六磷酸酶的微生物—优选过度表达本发明新的肌醇六磷酸酶分子的重组宿主—如以 100ml 培养基 / 100kg 湿的混合肥料;2) 可选择地也加入含有肌醇六磷酸酶的植物来源—如麦麸—如以 0.2 至 1kg/100kg 湿的混合肥料;3) 加入一种含有皂角苷的来源—如泥炭,艾属植物和丝兰植物—如以 0.5 至 3.0g/kg;4) 加入含有壳聚糖的原料—如虾,蟹的壳粉等—如以 100 至 300g/kg 湿的混合肥料。在另一个非限制性的方面,可使用三种试剂,肌醇六磷酸酶,皂角苷和壳聚糖的重组来源。关于这种方法的其他细节可见公共文献和 / 或是专业技术人员已知的。在一个特殊的非限制性例证中,这种公开可获得的文献包括 JP 07277865 (Toya Taisuke),尽管这些公共可获得的文献中的参考文献不能讲授本应用中的发明分子。

[0620] [0115] 本发明的全长基因的片段可用作 cDNA 或基因组文库的一种 杂交探针以分离全长的 DNA,分离与基因具有较高的序列相似性或相似的生物学活性的其他 DNA。这种类型的探针具有至少 10 个,优选至少 15 个,更优选至少 30 个碱基,可含有,例如至少 50 个或更多的碱基。探针也可用来鉴定对应于全长转录物的 DNA 克隆,基因组克隆或含有包括调控和启动子区,外显子和内含子的全长基因的克隆。

[0621] [0116] 在另一个方面,提供了转基因非人生物体,它含有编码发明的肌醇六磷酸酶(如,SEQ ID NO:2)的异源序列。多种方法可用来制备此发明的转基因动物。在一个这样的方法中,前核期的胚胎(一个“单细胞胚胎”)从雌性动物中收获,转基因被微注射进胚胎中,其中转基因将被整合至生殖细胞和获得的成熟动物体细胞的染色体上。在另一个方法中,分离胚胎干细胞,在此转基因通过电穿孔,质粒转染或微注射被导入,然后将干细胞再导入至胚胎中,在此它们定植并发育成生殖系。哺乳动物微注射的方法的描述可见美国专利第 4,873,191。仍然在另一种方法中,胚胎细胞被含有转基因的逆转录病毒感染,其中胚胎的生殖细胞已经将转基因整合在其染色体上。当被制成转基因的动物为禽类时,因为禽类的受精卵通常第一个 20 小时在输卵管中经历细胞分裂,微注射进受精卵的前核是有问题的,因为这时前核是难以进入的。因此,上面一般描述的制备转基因动物的方法中,逆转录病毒感染优选用于禽类,例如其描述可见美国专利第 5,162,215。但如果微注射用于禽类,可应用 Love 等人公开发表的方法 (Biotechnol., 12, 1994 年 1 月),其中胚胎得是在产下前次卵后大约两个半小时从处死的母鸡中获得,转基因被微注射进胚盘的胞浆内,胚胎在蛋壳内培养至成熟。当被制成转基因的动物是牛或猪时,由于卵的不透明性而妨碍微注射,因此使核很难由传统的差示干涉显微镜来鉴别。为了克服这种问题,卵首先被离心隔离前核以便更好的观察。

[0622] [0117] 本发明的“非人动物”是牛,猪,绵羊和禽类动物(如,母牛,猪,绵羊,小鸡)。本发明的“转基因非人动物”是通过将“转基因”导入至非人动物的生殖系中产生的。在多种发育期内的胚胎靶细胞可用来导入转基因。根据胚胎靶细胞的发育阶段可使用不同的方法。受精卵是微注射最佳的靶标。受精卵用作基因传递的靶标,其主要的优势是在大多数情况下,注射的 DNA 将在第一次分裂前被导入进宿主基因中 (Brinster 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442, 1985)。结果,转基因非人动物的所有细胞将携带被导入的转基因。通常这也将反映在转基因向创建体子代的有效传递中,因为 50% 的生殖细胞将携带转基因。

[0623] [0118] 术语“转基因”用来描述一种在其所有细胞中含有外源遗传物质的动物。“转基因”动物可通过两种嵌合动物的杂交繁育来产生,其中这两种动物在用来繁殖的细胞中均含有外源性遗传物质。得到的子代中 25% 将是转基因的,即所有细胞内在两种等位基因中都含有外源性遗传物质的动物,50% 得到的动物将在一个等位基因中含有外源性遗传物质,25% 将不含有外源性遗传物质。

[0624] [0119] 在用于实践发明主题的微注射法中,转基因被消化和纯化,从任何载体 DNA 中分离,例如通过凝胶电泳。优选转基因含有一个可操作的相关启动子,它可与参与转录的细胞蛋白相互作用,最终形成组成型表达。用于这方面的启动子包括巨细胞病毒 (CMV) 启动子,莫洛尼氏白雪病毒 (MLV) 启动子,和疱疹病毒启动子,以及来自金属硫蛋白,骨骼肌动蛋白, P- 烯醇丙酮酸羧化酶 (PEPCK), 磷酸甘油酸激酶 (PGK), 二氢叶酸还原酶 (DHFR) 和胸苷激酶的编码基因的启动子。也可使用病毒长末端重复区 (LTRs) 的启动子如罗斯肉瘤病毒。当被制成转基因的动物是禽类,优选的启动子包括鸡 β - 球蛋白基因,鸡溶菌酶基因,和鸟白血病毒启动子。用于胚胎干细胞质粒转染的构建物将使用本领域中熟知的其他调控元件,如刺激转录的增强子元件,剪接受体,中止和多腺苷酸化信号,和允许翻译的核糖体结合位点。

[0625] [0120] 如上所述,逆转录病毒感染也可用来将转基因导入至非人动物中。发育的非人胚胎可在体外培养至胚泡期。在这个时间内,分裂球是逆转录病毒感染的靶标 (Jaenich, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260-1264, 1976)。分裂球的有效感染可通过酶处理去除透明带而获得 (Hogan 等人, (1986) 鼠胚操作 (Manipulating the Mouse Embryo), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.)。用来导入转基因的病毒载体系统典型地是携带转基因的复制缺陷逆转录病毒 (Jahner, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6927-6931, 1985; Van der Putten 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152, 1985)。可通过在产生病毒的细胞单层上培养分裂球而很容易和有效的获得转染 (Vander Putten, 见前; Stewart 等人, EMBOJ. 6:383-388, 1987)。可选择地,注射可在较后期进行。病毒或产生病毒的细胞可被注射进囊胚腔中 (D. Jahner 等人, Nature 298:623-628, 1982)。大多数创建体将是转基因的嵌合体,因为导入仅发生在形成转基因非人动物的细胞亚群中。进一步,创建体在基因组的不同位置上含有转基因的多个逆转录病毒插入物,它们通常将在子代中传播。另外,也可能将转基因通过子宫内逆转录病毒感染中期妊娠胚胎,而导入进生殖系中,尽管效率较低 (D. Jahner 等人, 见前)。

[0626] [0121] 转基因导入的第三种类型靶细胞是胚胎干细胞 (ES)。ES 细胞可从体外培养的植入前胚胎获得,并与胚胎融合 (M. J. Evans 等人, Nature 292:154-156, 1981;

M. O. Bradlev 等人, Nature 309 :255-258, 1984 ;Gossler 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 :9065-9069, 1986 ;和 Robertson 等人, Nature 322 :445-448, 1986)。转基因可有效地通过 DNA 转染或通过逆转录病毒介导的转染被导入至 ES 细胞中。这种转化的 ES 细胞此后与来自非人动物的胚胎组合在一起。此后 ES 细胞定植在胚胎中,产生得到的嵌合动物的生殖系。(综述见 Jaenisch, R., Science 240 :1468-1474, 1988)。

[0627] [0122] “转化”是指通过重组核酸技术已经被导入(或导入进其亲代)了一种异源核酸分子的细胞。“异源”是指从其他种属来源或从其来源形式或在细胞中的基本表达形式修饰的核酸序列。

[0628] [0123] “转基因”是指通过各种手段被插入至细胞中,并成为可从该细胞发育形成的生物体基因组一部分的任何 DNA(即,可稳定被整合或作为稳定的染色体外元件)。这样一种转基因包括与转基因生物体部分或完全异源的(即外源的)基因,或代表与生物体的一条内源基因同源的基因。包括在这个定义内的还有由被提供的一条 RNA 序列建立的转基因,该 RNA 序列被转录成 DNA,然后导入进基因组中。发明的转基因包括编码肌醇六磷酸酶的 DNA 序列或具有肌醇六磷酸酶活性的多肽,并包括在转基因非人动物中表达的多核苷酸。在此使用的术语“转基因”另外还包括通过体外处置早期胚胎或受精卵或通过任何转基因技术诱导特异的基因敲除而被改变基因组的任何生物体。在此所使用的术语“基因敲除”是指体内一条基因被靶向的破坏,其功能完全丧失,可通过本领域中熟悉的任何转基因技术来完成。在一个方面,含有基因敲除的转基因动物中,靶基因通过插入作用转变为无功能,该插入作用靶向通过同源重组转变为无功能的基因。如在此所使用的,术语“转基因”包括本领域中熟悉的任何转基因技术,它可产生携带导入转基因的生物体或其中一条内源基因已经被变为无功能或“敲除”的生物体。

[0629] [0124] 用于实施此发明的转基因是 DNA 序列,它含有肌醇六磷酸酶的编码序列或具有肌醇六磷酸酶活性的多肽。在一个方面,具有 SEQ ID NO :1 中所示的序列的多核苷酸或编码 SEQ ID NO :2 中所示序列的多肽的序列是转基因,如在此所定义的术语一样。在合适时,编码具有肌醇六磷酸酶活性但由于遗传密码的简并性而在核酸序列上有差异的 DNA 序列在此也可使用,可以是截断形式,等位基因变异体和种间同源物。

[0630] [0125] 在胚胎被微注射,转染的胚胎干细胞定植,或用含有转基因的逆转录病毒感染后(除了在这里其他地方提到的禽类中实施此发明),胚胎被植入进一个假孕雌性动物的输卵管中。随后得到的子代通过使用转基因特异探针 Southern 印迹分析血或组织标本被检测转基因的导入。PCR 在这个方面是特别有用的。阳性子代(G0)被杂交产生子代(G1),通过 Northern 印迹分析组织标本来分析其转基因的表达。

[0631] [0126] 因此,本发明包括增加转基因动物磷摄取和/或减少转基因生物肥料中污染物的量大约 15%,大约 20%,或大约 20%,至大约 50%的方法。

[0632] [0127] 考虑用于实施发明主题的动物通常被认为是家养动物,包括宠物(如,犬,猫,禽类等)和用于加工食品的动物,即,禽类如肉食和产卵的鸡和火鸡,绵羊如羔羊,牛如肉牛和奶牛,鱼和猪。为了发明的主题内容,这些动物被称为“转基因”,当这些动物已经具有一条异源 DNA 序列,或一条或多条正常时是动物内源的,已被整合进入动物的生殖细胞染色体中的其他 DNA 序列(总体上在此称为“转基因”)。转基因动物(包括其子代)也将含有偶然被整合进体细胞染色体中的转基因。

[0633] [0128] 在一些情况下,局部传递和表达发明的肌醇六磷酸酶序列是有益的(如,在特殊的组织或细胞类型中)。例如,在动物的肠道中局部表达肌醇六磷酸酶或消化酶有助于分别消化和摄取,例如肌醇六磷酸盐和磷。核酸序列可直接被输送至唾液腺,组织和细胞和/或至例如肠道的上皮细胞连接。这种输送方法是本领域中已知的,包括电穿孔,病毒载体和直接 DNA 摄取。具有肌醇六磷酸酶活性的任何多肽可用于本发明的方法中(如,特别描述在 6.3.18 章节部分,以及描述在发明的其他章节)。

[0634] [0129] 例如,本发明的一种核酸构建物含有适合被宿主组织内的靶细胞摄取的形式核酸分子。核酸可以是裸露的 DNA 或 RNA 分子,其中分子可含有一条或多条结构基因,一条或多条调控基因,反义链,形成三联体的链或类似物。一般,核酸构建物在合适的调控区的转录和翻译控制下将含有至少一条结构基因。更普遍的是,本发明的核酸构建物将包含导入进输送囊泡以改善转染效率的核酸,其中输送囊泡将被分散在含有干燥的亲水赋形剂材料的大微粒中。

[0635] [0130] 一种这样的输送囊泡包括病毒载体,如逆转录病毒,腺病毒,和腺伴随病毒,它们被灭活以防止自我复制,但保留了结合靶宿主细胞的天然病毒能力,传递遗传物质至靶宿主细胞胞浆内,并促进已经被导入进微粒中的结构性或其他基因的表达。介导基因传递的合适的逆转录病毒载体的描述见 Kahn 等人,(1992)Circ. Res. 71:1508-1517。合适的腺病毒基因传递的描述见 Rosenfeld 等人,(1991)Science 252:431-434。逆转录病毒和腺病毒传递系统的描述都可见 Friedman(1989)Science 244:1275-1281。

[0636] [0131] 第二种类型的核酸输送囊泡含有脂质体转染囊泡,包括阴离子和阳离子脂质体构建物。使用阴离子脂质体需要核酸被包裹在脂质体内。阳离子脂质体不需要核酸的包裹,相反可简单的通过核酸和脂质体的混合就可形成。阳离子脂质体与负电荷的核酸分子紧密结合,产生在许多细胞类型中获得理想转染效率的复合体,所述核酸分子包括 DNA 和 RNA。见 Farhood 等人,(1992)Biochem. Biophys. Acta. 1111:239-246。形成脂质体囊泡的实例材料是 lipofectin,它由二油醇磷酸酯酰乙醇胺(DOPE)(dioleoylphosphatidyl)和二油醇丙氧基三乙铵(DOTMA)(dioleoyloxypropyl-triethylammonium)的等克分子混合物组成,其描述见 Feigner 和 Ringold(1989)Nature 331:387-388。

[0637] [0132] 也可能组合这两种类型的输送系统。例如,Kahn 等人,(1992),见前,讲授了逆转录病毒可被组合进一个阳离子 DEAE-右旋糖苷囊泡中以进一步增强转化效率。也可能将核蛋白导入进病毒和/或脂质体输送囊泡中以进一步改善转染的效率。见 Kaneda 等人,(1989)Science 243:375-378。

[0638] [0133] 在另一个方面,提供了含有酶的消化助剂,酶作为单一的活性成分或与一种或多种其他的药剂和/或酶组合在一起。在家畜或家养动物的消化助剂中使用酶和其他药剂不仅改善了动物的健康和寿命预期,也协助增加了家畜的健康和家畜产生的食品产量。

[0639] [0134] 目前,一些类型的家畜饲料(如,某种家禽饲料)被高度地补充了大量的矿物质(如,无机磷),酶,生长因子,药物和其他输送给家畜的药剂。例如,这些添加物替代了谷物中存在的许多卡路里和天然营养素。

[0640] [0135] 通过从饲料本身减少或消除无机磷的补充或其他补充物(如,微量矿物质盐类,生长因子,酶,抗生素),饲料能够携带更多的营养素和能量。因此,剩余的食物将含有

更可利用的能量。例如,谷粒-含油种子粗粉食品通常含有大约 3,200kcal 代谢能每千克食品,矿物质盐类不供应代谢能。去掉不需要的矿物质,并代替以谷粒,因此增加了食物中可利用的能量。因此,发明区别于普通使用的含肌醇六磷酸酶饲料。例如,在一个方面,使用的一种生物相容性材料对生物体的胃肠道消化具有抵抗力。

[0641] [0136] 在许多生物体中,包括例如,家禽或鸟类,例如鸡,火鸡,鹅,鸭,鸚鵡,孔雀,鸵鸟,雉,鹌鹑,鸽子,鹁鹑,几维,潜鸟,澳洲鸚鵡,美冠鸚鵡,金丝雀,企鹅,红鹳和鸽子,消化道包括储存和使用硬的生物相容性物体(如,岩石和贝壳鱼的壳)的砂囊以辅助消化鸟类摄入的种子或其他饲料。通常这类生物体家族的典型消化道包括含有囊的食道,称为嗉囊,其中食物可储存很短的一段时间。从嗉囊,食物向下移动至真胃,或前胃,其中盐酸和胃蛋白酶开始消化的过程。下一步,食物移动进入砂囊,它是卵圆形的,薄壁,具有强有力的肌肉。砂囊的主要功能是研磨和磨碎食物微粒—该过程可由鸟类吞咽小量的细砂砾或粗砂而辅助。从砂囊,食物移动进入十二指肠。鸟类的小肠类似于哺乳动物。有两个盲袋或盲肠,长度大约为 4-6 英寸,位于小肠和大肠的连接处。大肠较短,主要由长度为大约 3-4 英寸的直肠组成。直肠排空至泄殖腔内,粪便通过排泄口被排出。

[0642] [0137] 在砂囊内被摄入和带来的硬的生物相容性物体(或被导入的)可为多种酶,化学性,治疗性和抗生素药剂的输送提供了有用的载体。这些硬的物质的半衰期为几小时至几天,经过一段时间后才消失。因此,发明提供了包被的,受精的(如,受精的基质和膜)被改良的饮食助剂以便将有用的消化或治疗性药剂输送给生物体。这种饮食助剂包括典型地被生物体摄取以辅助砂囊内消化的物体(如,岩石或粗砂)。发明提供了生物相容性物体,可被包被或充满药剂,该药剂可被用作生物体的一种消化助剂或输送一种治疗性或医药试剂或化学物质。

[0643] [0138] 在一个方面,发明提供了一种饮食助剂,含有设计用来释放辅助消化的药剂的生物相容性组合物,其中生物相容性组合物设计用来口服摄入和在生物体消化道中释放(如,砂囊)。“生物相容性”的含义是在与宿主生物体(如,一种鸟类)接触的过程中,该物质不会产生一种有害的反应足以导致该物质的排斥或使该物质不能作用。这样的不可作用性的发生例如,可通过在该物质周围形成纤维化结构,限制充满的药剂在宿主生物体内的扩散或一种由于毒性或感染可导致生物体死亡率或发病率增加的物质。生物相容性物质可以是非生物可降解性的或生物可降解性的。在一个方面,生物相容性组合物对降解作用或胃肠道的消化作用是有抵抗性的。在另一个方面,生物相容性组合物具有岩石或石头的硬度。

[0644] [0139] 用于发明的一种非生物可降解材料是一种可允许饮食药剂附着或注入的材料。这种非限制性的非生物可降解材料包括,例如热塑性塑料,如丙烯酸,变性聚丙烯腈,聚酰胺,聚碳酸酯,聚酯,聚乙烯,聚丙烯,聚苯乙烯,聚砒,聚醚砒和聚偏二氟乙烯。弹性体也是可用的材料,包括例如,聚酰胺,聚酯,聚乙烯,聚丙烯,聚苯乙烯,聚亚胺酯,聚乙烯醇和硅酮(如,硅酮为基础的或含硅的)。发明提供的生物相容性组合物可含有多种这样的材料,例如,可被混合或分层形成混合物,共聚物,或其组合形式。

[0645] [0140] 如在此所使用的,“生物可降解的”材料是指在体内将腐蚀或降解形成更小的化学物类的组合物。例如,降解可通过酶学,化学或物理过程而发生。考虑用于发明中的合适的生物可降解材料包括,但不限于,聚(丙交酯),聚(乙交酯),聚(乳酸),聚(羟基

乙酸), 聚酸酐, 聚原酸酯, 聚醚酯, 聚己酸内酯, 聚酰胺酯, 聚碳酸酯, 聚氰丙烯酸酯, 聚亚胺酯, 聚丙烯酸酯和类似物。这种物质可被混合或分层形成混合物, 共聚物或其组合形式。

[0646] [0141] 要考虑的是许多不同的生物相容性物质可被摄取或同时被提供给相同的生物体, 或以多种组合形式(如, 一种材料在另一种之前)。另外, 生物相容性物质可被设计缓慢的经过消化道。例如, 大的或脂肪物质趋向于更缓慢的通过消化道移动, 因此可使用具有较大体积的生物相容性材料, 可防止迅速通过消化道。这种大的物质可以是非生物可降解和生物可降解物质的组合。例如, 一个小的非生物可降解物质被一个生物可降解物质包裹, 这样在一段时间内生物可降解部分被降解, 使非生物可降解部分通过消化道。另外, 可以认识到许多调味剂可提供给生物相容性物质以辅助摄入。

[0647] [0142] 单独或与其他药剂组合应用的任何数目的药剂可被包被在生物相容性物质上包括例如, 多肽(如, 酶, 抗体, 细胞因子或治疗性小分子), 和抗生素。特别有用的药剂列于下面的表 1 和 2 中。也要考虑的是细胞可被包裹在发明的生物相容材料中, 用来输送酶或治疗药物。例如, 可设计多孔物质, 其具有的孔的大小足以使细胞长入和穿过, 这些多孔的材料然后被摄入消化道。例如, 生物相容物质可由多种微生物区系环境组成(如, 多孔型差异, pH 等)可提供对多种细胞类型的支持。细胞可被基因工程改造以输送特殊的药物, 酶或化学制品给生物体。细胞是真核细胞或原核细胞。

[0648] 表 1

[0649]

治疗类型	化学物质	描述
------	------	----

[0650] [0650]

抗生素	阿莫西林和其组合物 Mastox 注射液(阿莫西林和氯唑西林)	治疗由革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌引起的细菌性疾病
	氨苄西林和其组合物 Biolox 注射液(氨苄西林和氯唑西林)	治疗由革兰氏阳性和阴性细菌引起的细菌性疾病
	呋喃西林 + 尿素 Nefrea 丸剂	治疗生殖器感染
	甲氧苄啶 + 磺胺甲基异恶唑 Trizol 丸剂	治疗呼吸道感染, 胃肠道感染, 泌尿生殖器感染
	甲硝哒唑和呋喃唑酮 Metofur 丸剂	治疗细菌和原动物疾病
	邻苯二甲酰基磺胺噻唑, 果胶和高岭土 Pectolin	治疗细菌和非特异性腹泻, 杆菌性痢疾和小牛腹泻
驱虫剂 Anthelmintics	Ectoparasiticide Gennex 油膏(γ 六氯化苯, 二氨基吡啶半硫酸盐 Hemisulphate 和西曲溴铵)	Ectoparasiticide 和防腐剂

[0651] [0651]

Endoparasitocides>阿苯达唑和其组合物 Alben(阿苯达唑) 悬液(阿苯达唑 2.5%) 加悬液(阿苯达唑 5%) Forte 丸剂(阿苯达唑 1.5Gm.) 片剂(阿苯达唑 600Mg.) 粉剂(阿苯达唑 5%,15%)	预防和治疗蛔虫,绦虫和血吸虫感染
Alpraz(阿苯达唑和吡喹酮) 片剂	在犬和猫中预防和治疗蛔虫和绦虫感染
羟氯扎胺和其组合物 Clozan(羟氯扎胺) 丸剂,悬液	预防和治疗血吸虫感染
Tetzan(羟氯扎胺和四咪唑 Hcl) 丸剂,悬液	预防和治疗蛔虫和血吸虫感染
Fluzan(羟氯扎胺和左旋咪唑 Hcl) 丸剂,悬液	预防和治疗蛔虫感染和增加免疫力
左旋咪唑 Nemasol 注射液 Wormnil 粉剂	预防和治疗蛔虫感染和增加免疫力

[0652] [0652]

治疗类型	化学物质	描述
	芬苯达唑 Fenazole 片剂(芬苯达唑 150Mg.) 丸剂(芬苯达唑 1.5Gm.) 粉剂(芬苯达唑 2.5% W/W)	预防和治疗蛔虫和绦虫感染
滋补剂	维生素 B 复合物,氨基酸和肝精 Heptogen 注射液	治疗厌食,肝炎,衰弱,神经痛惊厥消瘦和生长萎缩
	含有 VitB ₁₂ 和 VitD ₃ 的乙酰丙酸钙 Hylactin 注射液	预防和治疗低钙血症,在患病状态下的支持治疗(特别是体温过低)和治疗早期佝偻病。
动物饲料添加剂	基本矿物质,硒和维生素 EGynolactin 丸剂	治疗产奶动物和马非发情期间引起的不孕和反复出血
	基本矿物质,维生素 E,和碘 Hylactin 粉剂	不孕,非正常哺乳,降低的免疫力,生长萎缩和衰弱
	含有维生素 C 的基本电解质 Electra-C 粉剂	腹泻,脱水,在运输之前和之后,在极端的温度(高或低)和其他应激状态
	Pyrenox 加(双氯芬酸钠+对乙酰氨基酚) 丸剂,注射液	治疗乳腺炎,手术后发热疼痛和炎症,子宫脱垂,跛和关节炎

[0653] [0653] 表 2. 治疗性制剂

[0654]

产品	描述
Acutrim® (苯丙醇胺)	一天一次食欲抑制片剂
The Baxter® Infusor	用于抗凝血剂, 抗生素, 化疗剂和其他广泛使用药物的可控静脉输送。
Catapres-TTS® (可乐定透皮治疗系统)	每周一次治疗高血压的透皮系统
Covera HS™ (盐酸异搏定)	一天一次治疗高血压和心绞痛的控制发作延长释放(COER-24)片剂
DynaCirc CR® (依拉地平)	一天一次治疗高血压长期释放片剂
Efidac 24® (扑尔敏)	一天一次缓解变态反应症状的长期释放片剂
Estraderm® (雌二醇透皮系统)	每周两次治疗某些绝经后症状和预防骨质疏松症
Glucotrol XL® (吡磺环己脲)	一天一次用作饮食附加剂的长期释放片剂以控制非胰岛素依赖性糖尿病病人的高血糖症
IVOMECSR® 丸剂 (依维菌素)	季节性长期控制牲畜的主要体内和体外寄生虫的瘤胃输送系统
Minipress XL® (哌唑嗪)	一天一次治疗高血压的长期释放片剂
NicoDerm® CQ™ (尼古丁透皮系统)	一天一次的透皮系统用作辅助戒烟以缓解尼古丁戒断症状
Procardia XL® (硝苯地平)	一天一次治疗绞痛和高血压的长期释放片剂
Sudafed®24Hour (伪麻黄碱)	一天一次缓解感冒, 鼻窦炎, 枯草热和其他呼吸道变态反应的鼻解充血药
Transderm-Nitro® (硝化甘油透皮系统)	一天一次预防由冠状动脉疾病引起的心绞痛的透皮系统
Transderm Scop® (东莨菪碱透皮系统)	预防与运动病有关的恶心和呕吐

[0655]

Volmax (舒喘灵)	在可逆的气道阻塞性疾病患者中缓解支气管痉挛的长期释放片剂
Actisite®	(盐酸四环素) 牙周纤维用作齿根刮除和根面平整术的附加剂以在探测成人牙周炎患者过程中减少袋的深度和出血
ALZET®	实验室研究用的渗透泵
Amphotec® (注射用的两性霉素 B 胆固醇硫酸盐复合体)	AMPHOTEC® 是一种侵袭性曲霉病在肾衰或无法接受的毒性预先排除了应用有效剂量的两性霉素的患者和以前两性霉素治疗失败的侵袭性曲霉病患者中用来对侵袭性曲霉病进行的杀真菌治疗
BiCitra® (枸橼酸钠和柠檬酸)	用于需要长期维持碱性尿的那些状态中的碱化剂
Ditropan® (氯化奥昔布宁)	缓解与神经性无抑制膀胱或反射性神经性膀胱有关的膀胱不稳定症状(即, 尿急, 尿频, 尿漏, 尿失禁, 排尿困难)。
Ditropan® XL (氯化奥昔布宁)	是一种一天一次的可控释放片剂, 标明可治疗具有急迫性尿失禁, 尿急和尿频症状的过度反应性膀胱。
DOXIL® (阿霉素 HCl 脂质体注射液)	
Duragesic® (芬太尼透皮系统) CII	72-小时 透皮系统用于在对较少次数难以处理的疼痛需要连续阿片样物质止痛剂的患者中处理慢性疼痛, 如对乙酰氨基酚-阿片样物质组合物, 非甾体止痛剂或短期作用阿片样物质的 PRN 给药

[0656]

产品	描述
Elmiron® (戊聚糖聚硫酸钠)	标明缓解与间质性膀胱炎有关的膀胱疼痛或不适
ENACT AirWatch™	哮喘监测和处置系统
Ethyol® (氨磷汀)	标明减少晚期卵巢癌或非小细胞肺癌患者反复应用顺铂有关的累积性肾毒性。 标明减少经受头颈部癌症手术后放疗的患者中度至严重口干干燥症的发生率，其中放射部位包括腮腺的实质部分。
Mycelex® Troche (克霉唑)	局部治疗口咽念珠菌病。也标明在包括用于治疗白血病，实体肿瘤或肾移植的化疗，放疗或类固醇治疗状态下引起的免疫缺失患者中预防性的减少口咽念珠菌病的发生率
Neutra-Phos® (磷酸钾和磷酸钠)	饮食/营养添加剂
PolyCitra® -K Oral Solution and PolyCitra® -K Crystals (枸橼酸钾和柠檬酸)	用于需要长期维持碱性尿的状态中的碱化剂，如在尿路尿酸和胱氨酸结石的患者中，特别是当不需要或禁忌使用钠盐时
PolyCitra® -K Syrup and LC (三柠檬酸盐)	用于需要长期维持碱性尿的状态中的碱化剂，如在尿路尿酸和胱氨酸结石的患者中
Progestasert® (孕酮)	子宫内孕酮避孕系统
Testoderm® 含有粘合剂的 Testoderm® 和 Testoderm® TTS CHH	睾丸激素透皮系统 Testoderm®产品标明用于男性的替代治疗，用于内源性睾丸激素缺陷或缺乏有关的状态：(1)原发性性腺功能减退(先天性或获得性)或(2)促性腺激素分泌不足的性腺功能减退（先天性或获得性）

[0657]

Viadur™(亮丙瑞林醋酸盐植入体)	一年一次的植入体用于前列腺癌的姑息治疗
----------------------------	----------------------------

[0658] [0143] 某些药剂可被设计在某些状态下变成有活性的或失活的(如,在某种 pH 下,存在活化剂的情况下等)。另外,在发明的组合物中使用酶原是有益的。例如,酶原可被蛋白酶活化(如,存在于消化道或人工导入生物体消化道的唾液蛋白酶)。要考虑的是由发明的生物相容组合物输送的药剂加入活化剂可被活化或灭活,该活化剂是由生物体消化的或反之输送至生物体的。在消化道中控制药剂的另一个机制是环境敏感的药剂,它在特有的消化腔内被活化。例如,在低 pH 下是无活性的或在中性 pH 下是有活性的。因此,药剂在胃内无活性,但在肠道内是有活性的。可选择地,药剂对微生物特异因子的存在反应而变为有活性的(如,存在于肠内的微生物)。

[0659] [0144] 相应地,本发明的潜在益处包括,例如,(1) 减少或可能消除从每天的饲料或谷物中获得矿物质添加剂(如,无机磷添加剂),酶,或动物(包括鱼)的治疗药物的需求,因此增加了饲料中存在的热量和营养剂的量,和(2) 增进家养和非家养动物的健康和生长,这些动物包括,例如家禽,猪,牛,马,犬和猫科动物。

[0660] [0145] 除了发明的肌醇六磷酸酶以外大量数目的酶可用于本发明的方法和组合物中。这些酶包括需要被消耗食物的特有消化,或特有代谢,化学物质的活化或衍化,药物前体或其他试剂或化合物,它们经消化道被输送至动物体内。可被输送或掺入至发明的组合物中的酶的实例包括,例如增强选自下列的酶的饲料,这些酶如 α -半乳糖苷酶, β -半乳糖苷酶,特别是乳糖酶,肌醇六磷酸酶, β -葡聚糖酶,特别是内- β -1,4-葡聚糖酶和内- β -1,3(4)-葡聚糖酶,纤维素酶,木糖苷酶,半乳聚糖酶,特别是阿拉伯半乳聚糖内-1,4- β -半乳糖苷酶和阿拉伯半乳聚糖内-1,3- β -半乳糖苷酶,内葡聚糖酶,特别是内-1,2- β -葡聚糖酶,内-1,3- α -葡聚糖酶和内-1,3- β -葡聚糖酶,果胶降解酶,特别是果胶酶,果胶酯酶,果胶裂解酶,多聚半乳糖醛酸酶,阿拉伯糖胶酶,鼠李糖半乳糖醛酸酶,鼠李糖半乳糖醛酸乙酰酯酶,鼠李糖半乳糖醛酸- α -鼠李糖甙酶,果胶裂解酶,和 α -galacturonisidases,甘露糖酶, β -甘露糖苷酶,甘露聚糖乙酰酯酶,木聚糖乙酰酯酶,蛋白酶,木聚糖酶,树胶醛木聚糖酶(arabinoxylanases)和脂肪分解酶如脂肪酶,肌醇六磷酸酶和角质酶(cutinase)。除了具有如 SEQ ID NO:2 中所示的氨基酸序列的肌醇六磷酸酶以外的肌醇六磷酸酶可用于本发明的方法和组合物中。

[0661] [0146] 在一个方面,用于本发明的组合物(如,饮食助剂)中的酶是肌醇六磷酸酶,它对热稳定,是热抵抗性的,可催化肌醇六磷酸盐的酶性水解,即酶能在接触 50℃ 以上的温度短暂的(即 5 至 30 秒)或更长的时间后,例如几分钟或几小时复性和保留活性。

[0662] [0147] “饲料”和“食物”分别表示任何天然的,或人造的饮食,膳食或类似物,或需要或适合分别被人和动物吃掉,摄入,消化的这些膳食的成分。“饮食助剂”在此所使用的,例如是表示含有可对动物或生物体提供治疗或消化剂的一种成分。“饮食助剂”典型地不是生物体摄取热量的来源,用其他话来说,饮食助剂典型地不是生物体的能量来源,但是除“饲料”或“食物”以外被摄取的组合物。

[0663] [0148] 在发明的多个方面,被提供的饲料组合物包括一种重组的肌醇六磷酸酶蛋白,它具有含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的蛋白的至少 30 个连续氨基酸,和一种含有肌醇

六磷酸盐的食物。如本领域专业技术人员将了解的,这种组合物可以多种方法来制备,包括但不限于具有或不具有聚合物包被添加剂的丸状形式,颗粒形式,和通过喷射干燥。通过非限制性的实例,在本领域中针对饲料的制备的讲授文献包括 International Publication 第 W00070034 A1, W00100042 A1, W00104279A1, W00125411 A1, W00125412 A1, 和 EP 1073342A。

[0664] [0149] 一种药剂或酶(如,肌醇六磷酸酶)可在体外或体内发挥其效应,即分别在摄入前或在生物体的胃内或砂囊内。也可能是组合的作用。

[0665] [0150] 尽管任何酶可被掺进一种饮食助剂中,在此对肌醇六磷酸酶的参考文献可作为发明方法和组合物的一个例证。发明的一种饮食助剂包括一种酶(如,肌醇六磷酸酶)。通常,含有肌醇六磷酸酶组合物的一种饮食助剂是液态或干燥的。

[0666] [0151] 液体组合物不需要含有酶(如肌醇六磷酸酶)以外的任何物质,优选以高度纯化的形式。但通常也可加入一种稳定剂如甘油,山梨醇或单丙二醇。液体组合物也可含有其他添加剂,如盐类,糖类,防腐剂,pH 调节剂,蛋白质,肌醇六磷酸盐(肌醇六磷酸酶底物)。典型地液体组合物是水基或油基的混悬液。液体组合物可被加入至一种生物相容性组合物中以缓慢释放。优选地酶被加入至一种饮食助剂组合物中,该组合物是一种生物相容性材料(如生物可降解的或非生物可降解的),并包括将重组细胞加入至例如多孔的微珠中。

[0667] [0152] 干燥的组合物可以是喷射干燥的组合物,其中组合物不需要含有干燥形式的酶之外的任何物质。但通常,干燥组合物是所谓的颗粒,可很容易的与食物或饲料成分混合,或更优选地,形成预混合的一种成分。酶颗粒的微粒大小优选与混合无的其他成分是一致的。这为将酶掺入至动物饲料中提供了一种安全和便利的方法。优选地颗粒是生物相容性的,更优选地这些生物相容性颗粒是非生物可降解的。

[0668] [0153] 由酶包被的凝聚颗粒可采用团聚技术在高切变混合器中进行制备。吸收颗粒可通过具有载体物质核心被制备以吸收酶/被酶包被。优选地载体材料是一种生物相容性的非生物降解性材料,可模拟动物砂囊内的结石或砂粒的作用。用在团聚技术中的装填材料包括盐类,如磷酸氢二钠硫酸盐。其他的装填物是高岭土,滑石,硅酸镁铝和纤维素纤维。可选择地,粘合剂如糊精也可包含在凝聚颗粒中。载体材料可以是任何的生物相容性材料包括生物可降解的和非生物可降解的材料(如,岩石,石块,陶瓷和多种聚合物)。可选择地,颗粒可用一种包被混合无包被。这种混合无包括包被剂,优选是疏水的包被剂,如氢化棕榈油和牛油,如果需要,其他添加剂如碳酸钙或高岭土。

[0669] [0154] 可选择地,饮食助剂组合物(如,肌醇六磷酸酶饮食助剂组合物)可含有其他的替代物如着色剂,芳香化合物,稳定剂,维生素,矿物质,其他饲料或食物加强酶等。典型的添加剂通常含有一种或多种化合物如维生素,矿物质或饲料加强酶和适当的载体和/或赋形剂。

[0670] [0155] 在一个方面,发明的饮食助剂组合物又含有有效量的一种或多种饲料加强酶,特别是选自以下的饲料加强酶,包括 α -半乳糖苷酶, β -半乳糖苷酶,特别是乳糖酶,其他肌醇六磷酸酶, β -葡聚糖酶,特别是内- β -1,4-葡聚糖酶和内- β -1,3(4)-葡聚糖酶,纤维素酶, xylosidases, 半乳聚糖酶,特别是阿拉伯半乳聚糖内-1,4- β -半乳糖苷酶和阿拉伯半乳聚糖内-1,3- β -半乳糖苷酶,内葡聚糖酶,特别是内-1,2- β -葡聚糖酶,

内-1,3- α -葡聚糖酶,和内-1,3- β -葡聚糖酶,果胶降解酶,特别是果胶酶,果胶酯酶,果胶裂解酶,多聚半乳糖醛酸酶,阿拉伯糖胶酶,鼠李糖半乳糖醛酸酶,鼠李糖半乳糖醛酸乙酰酯酶,鼠李糖半乳糖醛酸- α -鼠李糖甙酶,果胶裂解酶,和 α -galacturonisidases,,甘露糖酶, β -甘露糖苷酶,甘露聚糖乙酰酯酶,木聚糖乙酰酯酶,蛋白酶,木聚糖酶,树胶醛木聚糖酶(arabinoxylanases)和脂肪分解酶如脂肪酶,肌醇六磷酸酶和角质酶。

[0671] [0156] 发明的动物饮食助剂可在饮食之前或同时补充给单胃动物。在一个方面,饮食助剂以颗粒或稳定的液体的形式加入至饮食中。

[0672] [0157] 在发明的饮食助剂中酶有效量的范围是大约 10-20,000;大约 10 至 15,000,大约 10 至 10,000,大约 100 至 5,000,或大约 100 至大约 2,000FYT/kg 饮食助剂。

[0673] [0158] 发明的肌醇六磷酸酶的其他特殊应用的非限制性实例是在大豆的加工过程中和在制造肌醇及其衍生物过程中。

[0674] [0159] 发明也涉及了在动物肥料中减少肌醇六磷酸盐水平的一种方法,其中动物被喂食以含有本发明肌醇六磷酸酶有效量的饮食助剂。如在本应用开始所说明的,其一个重要的效应是减少环境的磷酸盐污染。

[0675] [0160] 在另一个方面,饮食助剂是一个磁性载体。例如,一种含有酶(如肌醇六磷酸酶)磁性载体分布在肌醇六磷酸盐含量较高的区域上,并在一段时间后通过磁铁收集,所述的酶分布在磁性载体(如,一种多孔磁珠)之内、之上或贯通其中。这种珠的分布和再收集减少了其他的污染,并可再使用这些珠子。另外,在体内使用这些磁珠可将饮食助剂定位在消化道的一个点上,例如在该部位可实现肌醇六磷酸酶活性。例如,含有消化酶的发明饮食助剂(如,肌醇六磷酸酶)在动物食用了磁性载体的饮食助剂后通过将磁铁与动物的砂囊并排放置而被定位在动物的砂囊内。在经过一段时间饮食助剂通过消化道后去掉磁铁。另外,磁性载体适合用来在处死动物后从生物体中去掉,或辅助收集作用。

[0676] [0161] 当饮食助剂是多孔微粒时,这种微粒典型地被一种物质充满,需要使用这种物质来缓慢释放形成一个缓释的微粒。这种缓释的微粒的制备不仅可通过用需要被释放的物质充满多孔微粒,而且可首先通过在第一个分粉剂中溶解所需的物质。在这种情况下,由本方法制备的缓释微粒也包括在本发明的范围和精神内,其中要被释放的物质首先溶解在第一个分粉剂中。多孔的中空微粒,例如可充满一种缓释的物质,如药物,农业化学药品或酶。特别是当充满酶的多孔中空微粒由一种生物可降解聚合物制成时,微粒本身可用作一种农业化学药品或肥料,它们对环境没有任何副作用。在一个方面,多孔微粒实际上是磁性的。

[0677] [0162] 多孔中空微粒可用作一种生物反应器支持物,特别是酶支持物。因此,采用一种缓释的方法制备饮食助剂是有益的,例如通过将酶试剂包裹在一种微泡中,如脂质体,从中药物可被释放几天的时间,优选在大约 3 至 20 天。可选择地,药剂(如,一种酶)可被配制为缓释的,如掺入至一个缓释聚合物中,从中药剂(如,酶)的剂量在几天的时间内,例如从 2 至 20 天,可至动物寿命的时间范围内被缓慢释放。

[0678] [0163] 如在本领域中已知的,脂质体通常来自磷脂或其他脂类物质。脂质体可由分散在水介质中的单或多层含水液晶形成。可使用任何的形成脂质体的非毒性,生理可接受的和代谢的液体。以脂质体形成的本组合物可含有稳定剂,防腐剂,赋形剂和除了药剂以外的类似物质。一些优选的脂类是磷脂和磷脂酰胆碱(卵磷脂),可以是天然的和合成

的。形成脂质体的方法是本领域已知的。例如见 Prescott 主编, 细胞生物学方法, XIV 卷, Academic Press, New York, N. Y. (1976), 3 页以及下列等等。

[0679] [0164] 也包含在发明的范围内的是在制备食品或饲料制剂或添加物的过程中使用发明的肌醇六磷酸酶, 即仅在制造的过程中肌醇六磷酸酶发挥其肌醇六磷酸酶活性, 在最终的食品或饲料产品中是无活性的。例如与这个方面有关系的可见和面和烘烤的过程中。相应地, 肌醇六磷酸酶或重组酵母表达肌醇六磷酸酶被注入一个磁性载体之中, 之上或贯通其中, 分布在生面团中或食品介质中, 和由磁铁回收。

[0680] [0165] 发明的饮食助剂可单独给予动物, 以生物相容性 (如, 生物可降解或非生物可降解的) 载体的形式或与其他消化添加剂一起。发明的饮食助剂可很容易的作为顶肥使用或将其直接混合进动物的饲料中或倘若从饲料中分开, 则通过单独口服, 注射或头皮的方式或与其他生长相关的食用化合物一起应用, 组合中每种化合物的比例依赖于特殊的生物体或要解决的问题和反应所需的程度。应该理解的是在任何指定的情况下应用的特殊饮食用量将根据要被应用的特殊化合物, 要处理的问题, 受者的条件和其他相关实际因素来调整, 这些实际因素可修饰有效成分的活性或受者的反应, 这对于本领域专业技术人员是熟知的。通常, 如本领域所熟知的, 可使用每天单次用药或每天多次用药。

[0681] [0166] 如果与动物饲料分别给予, 饮食助剂的形式可将其与非毒性药学可接受的食用载体组合在一起形成立即释放或缓释的剂型而被制备, 如本领域熟知的。这种可食用的载体可以是固体的或液体的, 如玉米淀粉, 乳糖, 蔗糖, 大豆片, 花生油, 橄榄油, 芝麻油和丙二醇。如果使用固体载体, 化合物的剂型可以是片剂, 胶囊, 粉剂, 锭剂或菱形锭剂或微分散形式的顶肥。如果使用液体载体, 剂型可以是软明胶胶囊, 或糖浆或液体悬液, 乳剂或溶液。剂型也可含有佐剂, 如防腐, 稳定, 润湿或乳化剂, 溶解促进剂等。它们也可含有其他有治疗价值的物质。在高温下制备颗粒状可食用载体以便当被摄取时可释放酶的过程, 其描述见共同审理的美国专利申请系列号第 09/910. 579, 归档于 2001 年 7 月 20 日。

[0682] [0167] 因此, 发明的明显优势包括, 例如 1) 便于制造装有活性成分的生物相容性组合物; 具有多功能性, 因为它涉及被应用的聚合物和 / 或活性成分的类型; 3) 高产量和负载效率; 和 4) 提供了持续释放的剂型, 它可在体内释放活性的, 完整的活性剂, 因此可在长期的时间内提供活性剂的可控释放。另外, 另一个优势是因为药剂在生物体的消化道 (如, 砂囊) 内的局部输送。如在此使用的术语“包含在内”是表示将一种药剂配制进一种组合物中的方法, 该组合物用于在长期的时间内可控释放药剂。

[0683] [0168] 在发明的持续释放或缓释组合物中, 将使用有效量的药剂 (如, 酶或抗生素)。如在此所使用的, 持续的释放或缓释是指药剂从生物相容材料中在长期的时间内逐渐释放。持续的释放可以是连续的或不连续的, 线性的或非线性的, 可采用一种或多种生物可降解的或非生物可降解的组合物, 药物装填, 选择赋形剂或其他修饰作用来完成此目的。但是, 要认识到需要一种提供“快速”释放的组合物, 一旦生物体食用后就可提供迅速释放。也要理解的是“释放”并不一定表示药剂从生物相容载体中释放。而在一个方面, 缓释包括存在于生物相容组合物上的药剂的缓慢活化或连续活化。例如, 肌醇六磷酸酶不需要从将发生作用的生物相容组合物中释放。在这个方面, 肌醇六磷酸酶固定在生物相容组合物上。

[0684] [0169] 动物饲料可以是含有任何蛋白的有机粉, 通常用来满足动物的饮食需求。许多这样的含蛋白粉典型地基本由谷粒, 大豆粉或谷粒 / 大豆粉混合物。例如, 典型的市售

饲养家禽的产品包括 Egg Maker Complete, Land O' Lakes AG Services 的一种家禽饲料产品, 以及 CountryGame and Turkey Grower, Agwa, Inc. 的一种产品 (也见 Emu 农民手册, Phillip Minnaar 和 Maria Minnaar)。这些市售的产品都是动物饲料的典型实例, 其中本饮食助剂和 / 或肌醇六磷酸酶被掺入以减少或消除这种组合物中所需的补充磷, 锌, 锰和铁的摄取量。

[0685] [0170] 本发明用于大量动物的食物, 其中在此动物限定为包括哺乳动物 (包括人), 禽类和鱼类。特别的是, 食物可用于市售的主要哺乳动物如猪, 牛, 绵羊, 山羊, 实验室啮齿动物 (大鼠, 小鼠, 仓鼠和沙鼠), 毛皮动物如貂和狐狸, 和动物园动物如猴和猿, 以及家养动物如猫和狗。典型地市售主要禽类包括鸡, 火鸡, 鸭, 鹅, 雉, 鹌鹑, 鸵鸟, 潜鸟, 几维, 鸽, 鸚鵡, 澳洲鸚鵡, 美冠鸚鵡, 金丝雀, 企鵝, 红鸚鵡和鹌鹑。市售的有翼鱼如鳟鱼也将从在此公开的饮食助剂中受益。其他的受益鱼类包括, 例如鱼 (特别是在鱼缸或水产环境中, 如热带鱼), 金鱼和其他的观赏鲤鱼, 鲶鱼, 鳊鱼, 鲑鱼, 鲨鱼, 鳐, 比目鱼, 鲽鱼, 罗非鱼, 鳊, 虹鳟, 帆鳍鲈, 新月鱼, 剑尾鱼, 斑马鱼和泥鳅。

[0686] 测定代谢参数

[0687] [0171] 发明的方法涉及细胞的全细胞进化, 或全细胞工程以开发一种新的细胞株, 通过修饰细胞的遗传成分而具有新的表现型, 其中遗传成分通过向细胞添加一种发明的核酸而被修饰。为了检测新的表现型, 在细胞中以“实时”或“在线”时帧来监测被修饰细胞的至少一个代谢参数。在一个方面, 多个细胞, 如细胞培养物, 以“实时”或“在线”监测。在一个方面, 多个代谢参数被“实时”或“在线”监测。

[0688] [0172] 代谢通量分析 (MFA) 是基于一个已知的生化框架结构。线性的非依赖性代谢矩阵的构建是遵循质量守恒定律和对细胞内代谢物的假横稳态假设 (PSSH)。在实施发明的过程中, 建立了代谢网络, 包括:

- [0689] • 鉴定所有的通路底物, 产物和中间代谢物
- [0690] • 鉴定通路代谢物相互转变中的所有化学反应, 通路反应的化学计算,
- [0691] • 鉴定所有催化反应的酶, 酶反应动力学,
- [0692] • 通路成分之间的调控相互作用, 如变构相互作用, 酶 - 酶相互作用等,
- [0693] • 酶的细胞内区室化或酶的任何其他超分子结构, 和,
- [0694] • 任何浓度梯度的代谢物, 酶或效应器分子或其运动扩散屏障的存在。

[0695] [0173] 一旦指定株的代谢网络被建立, 如果可获得在线的代谢物数据, 可引入矩阵概念的数学表达式来估计细胞内的代谢通量。

[0696] [0174] 代谢表现型依赖于细胞内的全代谢网络的变化。代谢表现型依赖于利用通路的变化, 根据环境条件, 遗传调控, 发育状态和基因型等。在发明方法的一个方面, 在线 MFA 计算后, 细胞的动力学行为, 表现型和其他特性可通过研究利用通路而被分析。例如, 如果在酵母发酵过程中葡萄糖供应增加, 氧减少, 呼吸通路的利用将减少和 / 或中止, 发酵通路的利用将占优势。在通路分析后细胞培养物生理状态的控制将成为可能。发明的方法将帮助确定如何调控发酵, 通过确定如何改变底物供应, 温度, 使用诱导剂来控制细胞的生理状态以便沿所需的方向运动。在实施发明方法的过程中, MFA 的结果也要与转录代谢和蛋白代谢的数据比较以设计代谢工程或基因滑动的试验和步骤等。

[0697] [0175] 在实施发明方法的过程中, 可赋予和检测任何修饰的或新的表现型, 包括

细胞中新的或改良的特性。可监测代谢或生长的任何方面。

[0698] 监测 mRNA 转录物的表达

[0699] [0176] 在发明的一个方面,工程改造的表现型包括在细胞内增加或减少一种 mRNA 转录物的表达或产生新的转录物。mRNA 转录物,或信使可通过本领域已知的任何方法检测和定量,如 Northern 印迹,定量 扩增反应,杂交阵列,和类似方法。定量扩增反应包括定量 PCR,包括如定量逆转录聚合酶链式反应,或 RT-PCR;定量实时 RT-PCR,或“实时动力学 RT-PCR”(见如 Kreuzer (2001) Br. J. Haematol. 114 :313-318; Xia (2001) Transplantation 72 :907-914)。

[0700] [0177] 在发明的一个方面,工程改造的表现型通过敲除一条同源基因而产生。基因的编码序列或一个或多个转录控制元件被敲除,如启动子增强子。因此,转录物的表达可被完全消除或降低。

[0701] [0178] 在发明的一个方面,工程改造的表现型包括增加一条同源基因的表达。这可以通过敲除一个负调控元件来起作用,包括以顺式或反式作用的转录调控元件或诱变一个正调控元件。

[0702] [0179] 如在下面所详述的,一个或多个或所有细胞的转录物通过与一个标本杂交而被测定,该标本中含有细胞的转录物,或代表细胞转录物或其互补的核酸,与固定在阵列上的核酸杂交。

[0703] 监测多肽,肽类和氨基酸的表达

[0704] [0180] 在发明的一个方面,工程改造的表现型包括在细胞中增加或减少多肽的表达或产生新的多肽。多肽,肽类和氨基酸可通过本领域已知的任何方法检测和定量,包括如核磁共振 (NMR),分光光度测定法,X 线摄像术(蛋白放射标记),电泳,毛细电泳,高效液相色谱 (HPLC),薄层色谱 (TLC),超扩散色谱,多种免疫学方法,如免疫沉淀,免疫扩散,免疫电泳,放射免疫测定 (RIAs),酶联免疫吸附测定 (ELISAs),免疫荧光测定,凝胶电泳(如, SDS-PAGE),抗体染色,荧光活化的细胞分选仪 (FACS),高温分解质谱测定法,傅立叶转换红外光谱测定法,喇曼光谱测定法,GC-MS,和 LC- 电喷射和 cap-LC- 串联电喷射质谱测定法和类似方法。新的生物活性也可使用描述在美国专利第 6,057,103 中的方法或其变化的方法来筛选。而且,如下面所详述的,细胞的一种或多种或所有的多肽可采用蛋白阵列来测定。

[0705] [0181] 生物合成的定向片段 ^{13}C 标记的产生蛋白的氨基酸的监测可通过将均一 ^{13}C 标记的和未标记的碳源化合物的混合物输送至一个生物反应网络中。得到的标记图谱的分析可描绘出网络拓扑学的综合特性,并确定氨基酸的代谢通量比例;见如 Szyperski (1999) Metab. Eng. 1 :189-197。

[0706] [0182] 下面实例的目的是举例说明,但不是限制本发明,在实例中所描述的步骤是用来执行发明的某些方面的典型实例,也可使用本领域专业技术人员已知的其他步骤。

[0707] 实施例 1

[0708] [0183] 来自大肠杆菌 (K12 株) (SEQ ID NO :3) (图 13) 的野生型肌醇六磷酸酶 appA 基因,它编码一种野生型肌醇六磷酸酶 (SEQ ID NO :4) (图 14),用来制备 GSSM 修饰的多核苷酸。修饰的多核苷酸具有 SEQ IDNO :1 (图 1A) 中所示的序列,它编码一个非糖基化的肌醇六磷酸酶 (SEQID NO :2) (图 1B)。特别是 GSSM 用来寻找可增强大肠杆菌 K12

appA 耐热性的单个点突变。八个含有可增强耐热性的点突变的变异体多核苷酸被鉴定。这八个突变被合并并在图 8A 和 8B 中所显示的一个蛋白中。[0184] 野生型和被诱变的多核苷酸被表达在大肠杆菌中,并纯化为均一物质。在热耐受性的测定中,100mM MOPS/pH7.0 中的 100 μ L 0.01mg/mL 蛋白质在 RJ 研究热循环仪中被加热至 37°C,50°C,60°C,70°C,80°C 或 90°C。在达到某个温度 5 分钟后,标本被冷却至 4°C,在冰上孵育。活性测定使用 1.5mL 100mM NaOAc/4mM 肌醇六磷酸盐 /pH4.5 中的 40 μ L 酶溶液在 37°C 下进行。60 μ L 的等份样本以 2 分钟的间隔内被取出,并加入 60 μ L 的用于 TNO 测定的显色剂 / 中止溶液,在本领域中,它是已知的检测溶液中的磷酸盐的工业标准,其描述见 A. J. Engelen 等人, (“肌醇六磷酸酶活性的简单和迅速测定的相关文章”J. AOAC Int. 1994 May-Jun 77(3) :760-4)。很明显,修饰酶 SEQ ID NO :2,与大肠杆菌的野生型 appA 酶相比含有 8 个氨基酸改变,对温度的耐受性大于野生型酶 (见图 3)。

[0709] 实施例 2

[0710] 在模拟的消化性条件下肌醇六磷酸酶的稳定性

[0711] [0184] 本实施例显示了模拟的胃肠液对 SEQ ID NO :2 的糖基化和非糖基化肌醇六磷酸酶的消化作用的影响。用体外消化的大肠杆菌 K12 和 SEQ ID NO :2 的非糖基化肌醇六磷酸酶的残余活性的百分比 (根据初始的速率) 与时间进行作图。如所述方法制备标准浓度的模拟胃肠液 (SGIF),该胃肠液含有 2mg/mL NaCl,6M HCl 和 3.2mg/mL 胃蛋白酶。溶液的 pH 为大约 1.4,不要调整。体外消化性测定的进行通过加入 1 : 4 (体积 : 体积) 的肌醇六磷酸酶至消化液中,立即在 37°C 孵育以启动消化反应。在不同的时间间隔下取出等份的消化反应混合物,采用 TNO 测定检测残余的肌醇六磷酸酶活性。每个测定进行至少两次。对数据用方程 $y = Ae^{-kt}$ 拟合成指数曲线。蛋白质的半衰期采用方程 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 来测定。大肠杆菌 K12 肌醇六磷酸酶的半衰期仅为 2.7 ± 0.2 分钟,而 SEQ ID NO :2 的未糖基化肌醇六磷酸酶的半衰期为 8.4 ± 1.1 分钟。因此,野生型大肠杆菌 K12 肌醇六磷酸酶的突变在模拟的体外消化性条件下可增强酶的稳定性,见图 4。

[0712] 实施例 3

[0713] 糖基化可稳定肌醇六磷酸酶对胃蛋白酶的消化

[0714] [0185] 试验的进行是评价糖基化对与胃蛋白酶接触的肌醇六磷酸酶活性半衰期的影响,胃蛋白酶被用作一种模拟的胃肠液,因为胃蛋白酶是胃肠液的一种主要成分。检测与胃蛋白酶接触的肌醇六磷酸酶的半衰期的研究结果在图 5 中显示。这些结果表明肌醇六磷酸酶的糖基化形式较酶的未糖基化形式具有更长的半衰期。

[0715] [0186] 计算机分析提供了预测翻译后糖基化修饰的假设氨基酸残基的一种手段。预测肌醇六磷酸酶的糖基化位点可采用翻译后修饰预测程序来完成,该程序在世界互联网的地址 expasy.ch 中。糖基化肽鉴定可通过同一网址上 PeptideMass 程序来作图。预测的肌醇六磷酸酶的糖基化位点在图 6 中显示。

[0716] [0187] 然后进行研究以测定在毕赤酵母和酿酒酵母中表达的肌醇六磷酸酶上糖基化的类型。在分别从生物体中进行蛋白纯化后,通过向 50 μ g 肌醇六磷酸酶的含有 20mM Tris, pH7.5 的缓冲液中加入 1mU O-糖苷酶 (Roche Molecular Biochemicals, Germany) 在 37°C 孵育过夜,将假定的 O-糖基化侧链从蛋白上去掉。向 50 μ g 肌醇六磷酸酶的含有 50mM 磷酸钠, pH6.5 的缓冲液中加入 50mU 糖苷内切酶 H (Roche Molecular Biochemicals,

Germany) 在 37℃ 孵育过夜, 将 N-糖基化链去掉。消化后, 1 μg 蛋白在 12% Tris-甘氨酸凝胶 (Invitrogen, San Diego, CA) 上分析。结果以图表的格式总结在图 7 中。

[0717] [0188] 然后蛋白通过质谱分析法分析最大的肽图作图 (图 8A) 和糖基化图作图 (图 8B) (数据未显示)。对于这个实验, 所有蛋白需要被变性, 还原和烷基化。简言之, 等量体积的 8M 尿素 (Sigma, MI) 被加入至肌醇六磷酸酶溶液中, 在 37℃ 孵育 30 分钟。为了还原蛋白, 将新鲜制备的 DTT (10mg/mL) (Sigma, MI) 加入至此该混合物中, 终浓度为 0.04mg/mL, 然后 37℃ 孵育 30 分钟。下一步, 20mg/mL 碘乙酰胺 (Sigma, MI) 加入至被还原的蛋白混合物中, 终浓度为 20 μg/mL, 并在 37℃ 孵育 30 分钟进行烷基化作用。

[0718] [0189] 肌醇六磷酸酶被变性, 还原和烷基化后, 蛋白在含有 34mM NaCl 和 0.08N HCl 的缓冲液中被透析。加入胃蛋白酶 (5-20mg/mL) 37℃ 过夜消化肌醇六磷酸酶。完成消化的蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDA-PAGE) 分析。

[0719] [0190] 胃蛋白酶消化的肌醇六磷酸酶片段装载在含有 20mM Tris, pH7.4, 0.5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂, 和 1mM MgCl₂ 缓冲液的刀豆凝集素 A 柱 (Phannacia Biotech, Piscataway, NJ) 上。该柱用相同的缓冲液大量的冲洗。糖基化的肽用含有 0.5M D-甲基甘露糖苷的 20mM Tris 缓冲液 pH7.5 洗脱。

[0720] [0191] 为了进行 MALDI 质谱分析, 在这些实验中使用两类基质用于肽或蛋白分析。溶解在 49.9% 水, 50% 甲醇和 0.1% TFA 中的 3,5-二甲氧-4-羟基苯丙烯酸 (10mg/ml) 用于蛋白分析。溶解在 50% 甲醇, 49.9% 乙醇和 0.1% TFA 中的 α-氰基-4-羟基苯丙烯酸 (10mg/ml) 用于肽分析。

[0721] [0192] 为了用于钢探针头上, 1 μL 标本与 1 μL 基质溶液充分混合。与基质混合的标本在探针上风干, 在 Voyager-DE STR 仪 (PE Biosystems, Foster City, CA) 上分析。

[0722] [0193] 来自酿酒酵母和毕赤酵母的肌醇六磷酸酶的糖基化位点在图 9A 和 9B 中显示。这些研究的结果总结在图 10 中。

[0723] 实施例 4

[0724] 表达宿主的比较

[0725] [0194] 来自 SEQ ID NO:1 的 GSSM DNA 构建物被插入至大肠杆菌, 毕赤酵母和酿酒酵母中进行表达。表达的蛋白被纯化为均一物质。在热耐受性测定中, 100mM MOPS, pH7.0 中的 100 μL 0.01mg/mL 蛋白在 RJ 研究热循环仪中如图 11 显示被加热至指定的孵育温度 5 分钟。在达到该温度的 5 分钟后, 标本被冷却至 4℃ 并在冰上孵育。活性测定使用 1.46mL 100mM NaOAc/4mM 肌醇六磷酸盐 /pH4.5 中的 40 μL 酶溶液在 37℃ 进行。60 μL 的等份物以 2 分钟的间隔内被取出, 并加入 60 μL 的用于 TNO 测定的显色剂/中止溶液。(见图 11)。

[0726] 实施例 5

[0727] 在大肠杆菌 (非糖基化) 以及酿酒酵母和毕赤酵母 (糖基化) 中表达的体外消化的重组肌醇六磷酸酶 (SEQ ID NO:2) 残余活性的百分比 (根据初始的速率) 与时间进行作图。如在 S.O.P. 中所述, 制备标准浓度的模拟胃液, 含有 2mg/ml NaCl, 6M HCl 和 3.2mg/mL 胃蛋白酶。溶液的 pH 为大约 1.4, 不要调整。体外消化性测定的进行通过加入 1:4 (体积: 体积) 的肌醇六磷酸酶至消化液中, 立即在 37℃ 孵育以启动消化反应。在不同的时间间隔下取出等份的消化反应混合物, 采用 TNO 测定检测残余的肌醇六磷酸酶活性。每个测

定进行至少三次。对数据使用方程 $y = Ae^{-kt}$ 拟合成指数曲线。蛋白质的半衰期采用方程 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 来测定。在大肠杆菌中表达的 SEQ ID NO:2 的非糖基化肌醇六磷酸酶的半衰期为 8.4 ± 1.1 分钟,而在酿酒酵母中表达的糖基化肌醇六磷酸酶的半衰期为 10.4 ± 0.9 分钟,在毕赤酵母中表达的相同的肌醇六磷酸酶的半衰期为 29.2 ± 6.7 分钟。因此,SEQ ID NO:2 肌醇六磷酸酶的糖基化在模拟的体外消化性条件下可增强酶的稳定性。(见图 12)。

[0728] 实施例 5 当表达在大肠杆菌,毕赤酵母和酿酒酵母中时,为了检测发明的 GSSM 修饰肌醇六磷酸酶 (SEQ ID NO:2) 的热耐受性,标本被加热至 37°C , 50°C , 60°C , 70°C , 80°C 和 90°C 5 分钟,然后进行比活性测定。表达在大肠杆菌中的野生型 K12 肌醇六磷酸酶 (SEQ ID NO:3) 用作对照。在 37°C 下比活性的范围,以每毫克酶的单位数来测定,根据上述的 TNO 程序在 pH4.5 下测定。下面的表 3 总结了热耐受性 / 比活性检测的结果。表 3 表达在大肠杆菌和酵母中的 SEQ ID NO:2 肌醇六磷酸酶的热耐受性和比活性的比较

[0729]

温度范围	37°C 时特异活性的范围 (单位每毫克蛋白)			
	野生型 K12 肌醇六磷酸酶	SEQ ID NO: 2 肌醇六磷酸酶表达在		
		大肠杆菌	毕赤酵母	酿酒酵母
37°C-50°C	1000-1200	1200	1200	1200
50°C-70°C	0-1000	525-1200	750-1200	1000-1200
70°C-90°C	0	100-500	350-750	610-1000

[0730] 这些检测的结果显示通过在毕赤酵母和酿酒酵母中表达获得的糖基化肌醇六磷酸酶显示与野生型酶相比,对接触 37°C 以上的温度有较高的耐受性,与 GSSM 修饰但非糖基化的肌醇六磷酸酶相比有增强的热耐受性。而且,在酿酒酵母中酶的表达赋予了最大的热耐受性,在接触从 70°C 至 90°C 的温度后保留了至少一半的特异酶 (610-100 单位每毫克蛋白) 活性。相比之下,在这种温度范围内野生型酶保留的比活性为 0,即使大肠杆菌表达 (非糖基化) 的 GSSM 修饰的肌醇六磷酸酶 (SEQ ID NO:2) 在接触 70°C 至 90°C 范围内的温度 5 分钟后,仅保留了 100-500 单位酶活性每毫克酶。因此,SEQ ID NO:2 的肌醇六磷酸酶的糖基化在接触升高的温度后进一步增强了酶的热耐受性和比活性。

[0731] 引用的文献

[0732] [0198] (如果没有特别指明,在此应用中引用的所有文献所讲授的内容在此整体合并为参考文献。)

[0733] [0199] Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC., 1970.

[0734] [0200] Ausubel FM 等人, Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Assoc., Media, PA. ©1987, ©1989, ©1992.

[0735] [0201] Barnes WM: PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. Proceedings of the National

Academy of Sciences, USA 91(6) :2216-2220, 1994.

[0736] [0202]Bayer EA, Morag E, Lamed R :The cellulosome-a treasure-trove for biotechnology. Trends Biotechnol 12(9) :379-86, (Sep) 1994.

[0737] [0203]Bevan M :Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucleic Acids Research 12(22) :8711-21, 1984.

[0738] [0204]Bird 等人, Plant Mol Biol 11 :651, 1988.

[0739] [0205]Blobel G, Walter P, Chang CN, Goldman BM, Erickson AH, Lingappa VR : Translocation of proteins across membranes :the signalhypothesis and beyond. Symp Soc ExpBiol 33 :9-36. 1979.

[0740] [0206]Brederode FT, Koper-Zawrthoff EC, Bol JF :Completenucleotide sequence of alfalfa mosaic virus RNA 4. Nucleic Acids Research 8(10) :2213-23, 1980.

[0741] [0207]Clark WG, Register JC 3d, Nejdat A, Eichholtz DA, Sanders PR, Fraley RT, BeachyRN :Tissue-specific expression of the TMV coat proteinin transgenic tobacco plants affects the level of coat protein-mediated virusprotection. Virology 179(2) :640-7, (December) 1990.

[0742] [0208]Cole 等人 :Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. A. R. Liss, New York. ©1985.

[0743] [0209]Coligan JE 等人 :Current Protocols in Immunology. J. Wiley and Sons, New York. ©1996.

[0744] [0210]Coruzzi G, Broglie R, Edwards C, Chua NH :Tissue-specific andlight-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunitof ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. EMBO J 3(8) :1671-9, 1984.

[0745] [0211]Cosgrove DJ :Inositol phosphate phosphatases of microbiologicalorigin. Inositol phosphate intermediates in the dephosphorylation of thehexaphosphates of myo-inositol, scyllo-inositol, and D-chiro-inositol by abacterial(Pseudomonas sp.) phytase. Aust J Biol Sci 23(6) : 1207-1220, 1970.

[0746] [0212]Dassa E, Cahu M, Desjoyaux-Cherel B, Boquet PL :The acidphosphatase with optimum pH of 2.5 of Escherichia coli. Physiological andBiochemical study. J Biol Chem 257(12) :6669-76, (Jun 25) 1982.

[0747] [0213]Davis LG 等人, Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier, New York, ©1986.

[0748] [0214]Duarte JC, Costa-Ferreira M :Aspergilli and lignocellulosics : enzymology and biotechnological applications. FEMS Microbiol Rev 13(2-3) : 377-86, (Mar) 1994.

[0749] [0215]Food Chemicals Codex, 4th Edition. Committee on Food Chemicals Codex, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. Published :National Academy Press, Washington, DC, ©1996.

- [0750] [0216]Garcia PD,Ghrayeb J,Inouye M,Walter P:Wild type and mutantsignal peptides of Escherichia coli outer membrane lipoprotein interactwith equal efficiency with mammalian signal recognition particle.J BiolChem 262(20) ; 9463-8, (July 15)1987.
- [0751] [0217]Gluzman Y:SV40-transformed simian cells support thereplication of early SV40mutants. Cell 23(1) :175-182,1981.
- [0752] [0218]Goeddel DV, Shepard HM, Yelverton E, Leung D, Crea R, SlomaA, Pestka S:Synthesis of human fibroblast interferon by E.coli.NucleicAcids Research 8(18) :4057-4074,1980.
- [0753] [0219]Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O' Brien JV, Chambers SA, Adams Jr. WR, WilletsNG, Rice TB, Mackey CJ, Krueger RW, Kausch AP, Lemaux PG. Plant Cell2 :603,1990.
- [0754] [0220]Graf E:Phytic Acid:Chemistry and Applications.Pilatus Press, Minneapolis.1986.
- [0755] [0221]Greiner R, Haller E, Konietzny U, Jany KD:Purification andcharacterization of a phytase from Klebsiella terrigena. Arch BiochemBiophys 341(2) :201-6, (May15)1997.
- [0756] [0222]Greiner R, Konietzny U:Construction of a bioreactor to producespecial breakdown products of phytate.J Biotechnol 48(1-2) :153-9, (July18)1996.
- [0757] [0223]Greiner R, Konietzny U, Jany KD:Purification andcharacterization of two phytases from Escherichia coli. Arch BiochemBiophys 303(1) :107-13, (May 15)1993.
- [0758] [0224]Guilley H,Dudley RK,Jonard G,Balazs E,Richards KE:Transcription of Cauliflower mosaic virus DNA:detection of promotersequences, and characterization of transcripts. Cell 30(3) :763-73,1982.
- [0759] [0225]Hespell RB, Whitehead TR:Physiology and genetics of xylandegradation by gastrointestinal tract bacteria. J Dairy Sci 73(10) : 3013-22, (Oct)1990.
- [0760] [0226]Hoekema A,Hirsch PR,Hooykaas PJJ,Schilperoort RA. Nature303 :179, 1983.
- [0761] [0227]Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, FraleyRT. Science 227 :1229,1985.
- [0762] [0228]Igarashi M, Hollander VP:Acid phosphatase from rat liver. Purification, crystallization, and properties. J Biol Chem 243(23) :6084-9, (Dec. 10)1968.
- [0763] [0229]International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Nomenclature Committee:Enzyme nomenclature 1992:recommendationsof the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistryand Molecular

Biology on the nomenclature and classification of enzymes/prepared for NC-IUBMB by Edwin C. Webb. Academic Press, c1992。

[0764] [0230] Jeffries TW :Biochemistry and genetics of microbial xylanases. Curr Opin Biotechnol 7(3) :337-42, (Jun.) 1996。

[0765] [0231] Jermutus L, Tessier M, Pasamontes L, van Loon APGM, Lehmann M : Structure-based chimeric enzymes as an alternative to directed enzyme evolution; phytase as a test case. J. Biotechnology 85 :15-24, 2001。

[0766] [0232] Klee HJ, Muskopf YM, Gasser CS :Cloning of an Arabidopsis thaliana gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase :sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. Mol Gen Genet 210(3) : 437-42, (Dec) 1987。

[0767] [0233] Kohler G, Milstein C :Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256(5517) :495-497, 1975。

[0768] [0234] Koster-Topfer M, Frommer WB, Rocha-Sosa M, Rosahl S, Schell J, Willmitzer L :A class II patatin promoter is under developmental control in both transgenic potato and tobacco plants. Mol Gen Genet 219(3) :390-6, (Nov) 1989。

[0769] [0235] Kozbor. Immunology Today 4 :72, 1983。

[0770] [0236] Lee B 等 人 :Transient gene expression in aleurone protoplasts isolated from developing caryopses of barley and wheat. Plant Mol Biol 13(1) :21-9, 1989。

[0771] [0237] Lehmann M, Lopez-Ulibarri R, Loch C, Viarouge C, Wyss M and van Loon, APGM. Protein Science 9 :1866-1872, 2000。

[0772] [0238] National Research Council :Nutrient Requirements of Poultry (9th Revised ed.). National Academy Press, Washington, DC, 1994。

[0773] [0239] Nayini NR 等 人 :Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 17 : 24-26, 1984。

[0774] [0240] NCBI, National Library of Medicine. National Institutes of Health : BLAST Sequence Similarity Searching (web site = [website address ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))。

[0775] [0241] Nelson TS, Shieh TR, Wodzinski RJ, Wwere JH :Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. J Nutr 101(10) : 1289-1293, 1971。

[0776] [0242] Ng DT, Walter P :Protein translocation across the endoplasmic reticulum. Curr Opin Cell Biol 6(4) :510-6, (Aug), 1994。

[0777] [0243] Potrykus I :Gene transfer methods for plants and cell cultures. Ciba Found Symp 154 :198-208 ;discussion 208-12, 1990。

[0778] [0244] Powar VK 等 人 :Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 151(3) : 1102-1108, 1982。

- [0779] [0245] Powers T 等人 : The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome. *Curr Bio* 16(3) : 331-8, (March 1), 1996。
- [0780] [0246] Prade RA : Xylanases : from biology to biotechnology. *Biotechnol Genet Eng Rev* ;13 : 101-31, 1996。
- [0781] [0247] Ryan AJ 等人 : Genomic sequence of a 12S seed storage protein from oilseed rape (*Brassica napus* s. v. *jetneuf*). *Nucl Acids Res* 17(9) : 3584, 1989。
- [0782] [0248] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839) : 487-491, 1988。
- [0783] [0249] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T : *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, ©1989。
- [0784] [0250] SAS : *Statistics In : SAS User ' s Guide* (1984 ed.). SAS Institute, Cary, NC, 1984。
- [0785] [0251] Schoner FJ, Hope PP, Schwarz G, Wiese H : Comparative effects of microbial phytase and inorganic phosphorus on performance and retention of phosphorus, calcium, and crude ash in broilers. *J Anim Physiol Anim Nutr* 66 : 248, 1991。
- [0786] [0252] Schoner FJ, Hope PP, Schwarz G, Wiese H : Effects of microbial phytase and inorganic phosphate in broiler chicken : Performance and mineral retention at various calcium levels. *J Anim Physiol Anim Nutr* 69 : 235, 1993。
- [0787] [0253] Shieh TR 等人 : Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *J Bacteriol* 100(3) : 1161-5, (Dec) 1969。
- [0788] [0254] Shimamoto K, Miyazaki C, Hashimoto H, Izawa T, Itoh K, Terada R, Inagaki Y, Iida S : Trans-activation and stable integration of the maize transposable element Ds cotransfected with the Ac transposase gene into transgenic rice plants. *Mol Gen Genet* 239(3) : 354-60, (June) 1993。
- [0789] [0255] Shimizu M : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56 : 1266-1269, 1992。
- [0790] [0256] Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ, Hoekema A : Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology (NY)* 8(3) : 217-21, 1990。
- [0791] [0257] Simons PC, Versteegh HA, Jongbloed AW, Kemme PA, Slump P, Bos KD, Wolters MG, Beudeker RF, Verschoor GJ : Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br J Nutr* 64(2) : 525-540, 1990。
- [0792] [0258] Smeekeens S, Weisbeek P, Robinson C : Protein transport into and within chloroplasts : , *Trends Biochem Sci* 15(2) : 73-6, 1990。

- [0793] [0259]Smith AG 等人:Identification and characterization of stamen-and tapetum-specific genes;from tomato.Mol Gen Genet 222(1):9-16, (June)1990。
- [0794] [0260]Tague BW 等 人:A short domain of the plant vacuolar proteinphytohemagglutinin targets invertase to the yeast vacuole.Plant Cell12(6):533-46, (June)1990。
- [0795] [0261]Tingey SV 等人:Glutamine synthetase genes of pea encodedistinct polypeptides which were differentially expressed in leaves, rootsand nodules. EMBO J6(1):1-9,1987。
- [0796] [0262]Tomschy A 等 人, Optimization of the catalytic properties ofAspergillus Fumigatus phytase based on the three-dimensional structure. Protein Science 9:1304-1311,2000。
- [0797] [0263]Ullah AH:Production, rapid purification and catalyticcharacterization of extracellular phytase from Aspergillus ficuum. PrepBiochem 18(4):443-458,1988。
- [0798] [0264]Ullah AH, Gibson DM:Extracellular phytase(E.C.3.1.3.8) fromAspergillus ficuum NRRL 3135:purification and characterization. PrepBiochem 17(1):63-91,1987
- [0799] [0265]Van den Broeck G 等 人:Targeting of a foreign protein tochloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit ofribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. Nature 313(6001):358-63,1985。
- [0800] [0266]Vasil IK, Vasil V:Totipotency and embryogenesis in plant celland tissue cultures. In Vitro 8(3):117-27, (Nov-Dec)1972。
- [0801] [0267]Vasil V, Vasil IK:Regeneration of tobacco and petunia plantsfrom protoplasts and culture of corn protoplasts. In Vitro 10:83-96, (Jul-Aug)1974。
- [0802] [0268]Von Heijne G:Towards a comparative anatomy of N-terminaltopogenic protein sequences. J Mol Biol 189(1):239-42,1986。
- [0803] [0269]*Walter P, Blobel G. Biochem Soc Symp 47:183,1986。
- [0804] [0270]Wenzler H 等人:Sucrose-regulated expression of a chimericpotato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. Plant Mol Biol13(4):347-54, 1989。
- [0805] [0271]Wolter FP 等人, rbcS genes in Solanum tuberosum:conservationof transit peptide and exon shuffling during evolution. Proc Nati Acad SciUSA 85(3):846-50, (Feb.)1988。
- [0806] [0272]Wong KK, et al.:Multiplicity ofbeta-1,4-xylanase inmicroorganisms:functions
- [0807] and applications. Microbiol Rev 52(3):305-17, (Sept.)1988。
- [0808] [0273]Wyss M 等 人, Biochemical Characterization of Fungal Phytases(myo-inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases):Catalytic Properties. Applied and Environmental Microbiology Feb 1999:367-373。

- [0809] [0274]Yamada K等人 :Agricultural and Biological Chemistry32 :1275-1282, 1968。
- [0810] [0275]U. S. Patent No. 3, 297, 548 ;Filed July 28, 1964 ;Issued Jan. 10, 1967. Wwere JH, Bluff L, Shieh TK ;Preparation of acid phytase.
- [0811] [0276]U. S. Patent No. 4, 946, 778 ;Filed Jan. 19, 1989 ;Issued Aug. 7, 1990. Ladner RC, Bird RE, Hardman K ;Single polypeptide chain bindingmolecules.
- [0812] [0277]U. S. Patent No. 5, 830, 732, Filed July 3, 1995, Issued Nov. 3, 1998. Mochizuki D, Tokuda J, Shimada M and Tawaki S. Phytase。
- [0813] [0278]EP0 120, 516 ;Filed Feb. 21, 1984 ;Issued Oct. 3, 1984. Schilperoort RA 等 人 :A process of the incorporation of foreign DNA into the genome of dicotyledonous plants ;Agrobacterium tumefaciens bacteria and a process for the production thereof ;plants and plant cells with modified genetic properties ;a process for the preparation。
- [0814] [0279]EP0 321, 004 ;Filed Oct. 28, 1988 ;Issued Jan. 22, 1992. Vaara T. 等人, A process for steeping cereals with a new enzyme preparation。
- [0815] [0280]IPN WO 91/05053 ;Filed Sept. 27, 1990 ;Issued April 18, 1991. VanGorcom R, 等人 :Cloning and expression of microbial phytase。
- [0816] [0281]Plant Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology (Cloth), 111) by Robert D. Hall (Editor) (March 1999) Humana Press ;ISBN : 0896035492
- [0817] [0282]Plant Molecular Biology :Essential Techniques by P. Jones (Editor), J. M. Sutton (Editor), Mark Sutton (Contributor) (September 25, 1997) John Wiley & Son Ltd ;ISBN :0471972681
- [0818] [0283]Plant Biochemistry and Molecular Biology by Hans-Walter Heldt (April 1998) Oxford University Press ;ISBN :019850179X
- [0819] [0284]Biochemistry and Molecular Biology of Plants by Bob B. Buchanan (Editor), Wilhelm Gruissem (Editor), Russell L. Jones (July 2000) American Society of Plant ;ISBN :0943088372
- [0820] [0285]Monoclonal Antibodies :A Manual of Techniques by Heddy Zola (September 1987) CRC Press ;ISBN :0849364760
- [0821] [0286]Immunochemistry in Practice by Robin Thorpe (Contributor), Alan P. Johnstone 3rd ed (January 15, 1996) Blackwell Science Inc ;ISBN :0865426333

[0001]

序列表

<110> 戴弗萨公司
SHORT, Jay M.

<120> 肌醇六磷酸酶, 其编码核酸及其制造和使用方法

<130> DIVER1370-9

<150> US 09/866, 379

<151> 2001-05-24

<150> US 09/580, 515

<151> 2000-05-25

<150> US 09/318, 528

<151> 1999-05-25

<150> US 09/291, 931

<151> 1999-04-13

<150> US 09/259, 214

<151> 1999-03-01

<150> US 08/910, 798

<151> 1997-08-13

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1308

<212> DNA

<213> 人T序列

<220>

<223> 修饰的肌醇六磷酸酶

<400> 1

```

atgaaagcga tcttaatccc atttttatct cttctgattc cgtaaaccgc gcaatctgca    60
ttcgctcaga gtgagccgga gctgaagctg gaaagtgtgg tgattgtcag tcgtcatggg    120
gtgctgtctc caaccaaggc cagcgaactg atgcaggatg tcacccaga cgcattggca    180
acctggccgg taaactggg tgagctgaca ccgcgcgggtg gtgagctaat cgcctatctc    240
ggacattact ggctgcagcg tctggtagcc gacggattgc tgcctaaatg tggctgcccc    300
cagtcctggc aggtcgcgat tattctgatg gtcgacgagc gtaccgctaa aacaggcgaa    360
gccttcgccg ccgggctggc acctgactgt gcaataaccg tacataccca ggcagatacg    420
tccagtcgcc atccgttatt taatcctcta aaaactggcg ttgccaact ggataacgcg    480
aacgtgactg acgcgatcct cgagagggca ggagggtcaa ttgctgactt taccgggcat    540
tatcaaacgg cgtttcgcga actggaacgg gtgcttaatt ttccgcaatc aaacttgtgc    600
cttaaacgtg agaaacagga cgaaagctgt tcattaacgc aggcattacc atcggaactc    660
aaggtagagc ccgactgtgt ctcatatacc ggtgcggtaa gcctcgcac aatgctgacg    720
gagatatttc tctgcaaca agcacaggga atgccggagc cggggtgggg aaggatcacc    780
gattcacacc agtgaacac cttgctaagt ttgcataacg cgcaatttga ttgctacaa    840
cgcacgccag aggttgcccc cagccgcgcc accccgttat tagatttgat caagacagcg    900
ttgacgcccc atccaccgca aaaacaggcg tatgggtgtg cattaccac ttcagtgtcg    960
tttatcgccc gacacgatac taatctggca aatctcggcg gcgcactgga gctcaactgg   1020
acgcttcccc gtcagccgga taacacgccg ccagggtgtg aactggtgtt tgaacgctgg   1080

```

[0002]

cgtcggctaa gcgataacag ccagtggatt caggtttcgc tggctttcca gactttacag 1140
 cagatgcgtg ataaaacgcc gctgtcatta aatacgccgc ccggagaggt gaaactgacc 1200
 ctggcaggat gtgaagagcg aaatgcgcag ggcatgtgtt cgttggcagg ttttacgcaa 1260
 atcgtgaatg aagcacgcat accggcgtgc agtttgagat ctcaceta 1308

<210> 2
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 修饰的肌醇六磷酸酶

<400> 2

Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr
 1 5 10 15

Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser
 20 25 30

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr
 35 40 45

Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val
 50 55 60

Lys Leu Gly Glu Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

Gly His Tyr Trp Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys
 85 90 95

Cys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp
 100 105 110

Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125

Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
 130 135 140

Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
 145 150 155 160

Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
 165 170 175

Phe Thr Gly His Tyr Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 180 185 190

Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu
 195 200 205

Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
 210 215 220

Asp Cys Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr

[0003]

225	230	235	240
Glu Ile Phe Leu	Leu Gln Gln Ala Gln Gly	Met Pro Glu Pro	Gly Trp
	245	250	255
Gly Arg Ile Thr	Asp Ser His Gln Trp	Asn Thr Leu Leu	Ser Leu His
	260	265	270
Asn Ala Gln Phe	Asp Leu Leu Gln Arg Thr	Pro Glu Val Ala	Arg Ser
	275	280	285
Arg Ala Thr Pro	Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr	Ala Leu Thr Pro	His
	290	295	300
Pro Pro Gln Lys	Gln Ala Tyr Gly Val Thr	Leu Pro Thr Ser	Val Leu
	310	315	320
Phe Ile Ala Gly	His Asp Thr Asn Leu Ala	Asn Leu Gly Gly	Ala Leu
	325	330	335
Glu Leu Asn Trp	Thr Leu Pro Gly Gln Pro	Asp Asn Thr Pro	Pro Gly
	340	345	350
Gly Glu Leu Val	Phe Glu Arg Trp Arg	Arg Leu Ser Asp	Asn Ser Gln
	355	360	365
Trp Ile Gln Val	Ser Leu Val Phe Gln Thr	Leu Gln Gln Met	Arg Asp
	370	375	380
Lys Thr Pro Leu	Ser Leu Asn Thr Pro Pro	Gly Glu Val Lys	Leu Thr
	390	395	400
Leu Ala Gly Cys	Glu Glu Arg Asn Ala Gln	Gly Met Cys Ser	Leu Ala
	405	410	415
Gly Phe Thr Gln	Ile Val Asn Glu Ala Arg	Ile Pro Ala Cys	Ser Leu
	420	425	430
Arg Ser His Leu			
	435		

<210> 3
 <211> 1901
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌 appA肌醇六磷酸酶

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (403)..(403)
 <223> n 是任一核苷酸

<400> 3	
taaggagcag aaacaatgtg gtatttactt tggttcgtcg gcattttgtt gatgtgttcg	60
ctctccaccc ttgtgttggt atggctggac ccgctctga aaagttaacg aacgtaggcc	120
tgatgcggcg cattagcatc gcatacggca atcaataatg tcagatatga aaagcggaaa	180
catatcgatg aaagcgatct taatcccatt tttatctctt ctgattccgt taaccccgca	240
atctgcattc gctcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtggtga ttgtcagtcg	300

[0004]

```

tcattggtgtg cgtgctccaa ccaaggccac gcaactgatg caggatgtca ccccagacgc 360
atggccaacc tggccggtaa aactgggttg gctgacaccg cngggtggtg agctaatacgc 420
ctatctcgga cattaccaac gccagcgtct ggtagccgac ggattgctgg cgaaaaaggg 480
ctgcccgcag tctggtcagg tcgcattat tgcctgatgc gacgagcgta cccgtaaaaac 540
aggcgaagcc ttccgcccg ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccaggc 600
agatacgtcc agtcccgtc cgttatttaa tctctaaaa actggcggtt gccaaactgga 660
taacgcgaac gtgactgacg cgatcctcag cagggcagga gggtaattg ctgactttac 720
cgggcatcgg caaacggcgt ttccggaact ggaacgggtg cttaatcttc cgcaatcaaa 780
cttgtgcctt aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc 840
ggaactcaag gtgagcgccg acaatgtctc attaacgggt gcggtaagcc tcgcatcaat 900
gctgacggag atatttctcc tgcaacaagc acagggaatg ccggagccgg ggtggggaag 960
gatcaccgat tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgc aattttattt 1020
gctacaacgc acgccagagg ttgccgcag ccgcgccacc ccgttattag attgatcaa 1080
gacagcggtg acgccccatc caccgcaaaa acaggcggtat ggtgtgacat taccacttc 1140
agtgtgttt atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctcggcgcg cactggagct 1200
caactggacg ctcccggtc agccggataa cagcccgcca ggtggtaaac tgggttttga 1260
acgttggcgt cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttcagac 1320
tttacagcag atgcgtgata aaacgccgct gtcattaaat acgccgccc gagaggtgaa 1380
actgacctg gcaggatgtg aagagcgaaa tgcgcagggc atgtgttctg tggcaggttt 1440
tacgcaaate gtgaatgaag cagcatacc gccgtgcagt ttgtaatgca taaaaagag 1500
cattcagtta cctgaatgct ctgaggtga tgacaaacga agaactgtct aatgcgtaga 1560
ccgaaaaagg cgttcacgcc gcatccggcc actttcagtt tctctcttc tcggagtaac 1620
tataaccgta atagttatag ccgtaactgt aagcgggtgct ggccggttta atcacaccat 1680
tgaggatagc gcctttaata ttgacgcctg cctgttccag acgctgcatt gacaaactca 1740
cctctttggc ggtgttcaag ccaaaacgcg caaccagcag gctggtgcca acagaacgcc 1800
ccaagaccgc ggcatcactc accgccagca tcggcggcgt atcgacaatc accagatcgt 1860
aatggtegtt cgcccattec agtaattgac gcatccgac g 1901

```

<210> 4
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌 appA肌醇六磷酸酶

<400> 4

Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr
 1 5 10 15

Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser
 20 25 30

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr
 35 40 45

Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val
 50 55 60

[0005]

Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys
 85 90 95
 Lys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp
 100 105 110
 Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125
 Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
 130 135 140
 Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
 145 150 155 160
 Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
 165 170 175
 Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 180 185 190
 Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu
 195 200 205
 Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
 210 215 220
 Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
 225 230 235 240
 Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp
 245 250 255
 Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
 260 265 270
 Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser
 275 280 285
 Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His
 290 295 300
 Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu
 325 330 335
 Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly
 340 345 350
 Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
 355 360 365

[0006]

Trp	Ile	Gln	Val	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Thr	Leu	Gln	Gln	Met	Arg	Asp
370						375					380				
Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Thr
385					390					395					400
Leu	Ala	Gly	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Ala	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Ala
				405					410					415	
Gly	Phe	Thr	Gln	Ile	Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Cys	Ser	Leu
			420					425					430		

DNA 序列 (SEQ ID NO: 1)

ATGAAAGCGATCTTAATCCATTTTTATCTCTTCTGATTCCGTTAACCCCGCAATCTGCATTGCTCAGAG
TGAGCCGGAGCTGAAGCTGGAAAGTGTGGTGATTGTGAGTCGTGTCATGGTGTGCGTGCTCCAACCAAGGC
CACGCAACTGATGCAGGATGTCACCCAGACGCATGGCCAACCTGGCCGGTAAAAGTGGGTGAGCTGACA
CCGCGCGGTGGTGAGCTAATCGCCTATCTCGGACATTACTGGCGTCAGCGTCTGGTAGCCGACGGATTG
CTGCCTAAATGTGGCTGCCCGCAGTCTGGTCAGGTCGCGATTATTGCTGATGTGACGAGCGTACCCGTA
AAACAGGCGAAGCCTTCGCCGCCGGGCTGGCACCTGACTGTGCAATAACCGTACATACCCAGGCAGATAC
GTCCAGTCCCAGTCCGTTATTTAATCCTCTAAAAACTGGCGTTTGCCAAGTGGATAACGCGAACGTGACT
GACGCGATCCTCGAGAGGGCAGGAGGGTCAATTGCTGACTTTACCGGGCATTATCAAACGGCGTTTCGC
GAACTGGAACGGGTGCTTAATTTTCCGCAATCAAACCTGTGCCTTAAACGTGAGAAACAGGACGAAAGCT
GTTTATTAAACGCAGGCATTACCATCGGAACTCAAGGTGAGCGCCGACTGTGTCTCATTAAACGGTGCGGT
AAGCCTCGCATCAATGCTGACGGAGATATTTCTCCTGCAACAAGCACAGGGAATGCCGGAGCCGGGGTG
GGGAAGGATCACCGATTACACCAAGTGAACACCTTGCTAAGTTTGCTAACGCGCAATTTGATTTGCTA
CAACGCACGCCAGAGGTTGCCCGCAGCCGCGCCACCCGTTATTAGATTTGATCAAGACAGCGTTGACGC
CCCATCCACCGCAAAAACAGGCGTATGGTGTGACATTACCACTTCAGTGCTGTTTATCGCCGGACACGA
TACTAATCTGGCAAATCTCGGCGGCGCACTGGAGCTCAACTGGACGCTTCCCGGTGAGCCGGATAACACG
CCGCCAGGTGGTGAAGTGGTGTGTAACGCTGGCGTCGGCTAAGCGATAACAGCCAGTGGATTGAGTT
TCGCTGGTCTTCCAGACTTTACAGCAGATGCGTGATAAAACGCCGCTGTCATTAAATACGCCGCCGGAG
AGGTGAAACTGACCCTGGCAGGATGTGAAGAGCGAAATGCGCAGGGCATGTGTTGTTGGCAGGTTTTA
CGCAAATCGTGAATGAAGCACGCATACCGGCGTGAGTTTGAGATCTCATCTA

图 1A

蛋白质序列 (SEQ ID NO: 2)

MKAILPFLSLLIPLTPQSAFAQSEPELKLESVVTVSRHGVRAPTKATQLMQDV
TPDAWPTWPVKLGELTPRGGELIAYLGHYWRQRLVADGLLPKCGCPQSGQV
AILADVDERTRKTGEAFAAGLAPDCAITVHTQADTSSPDPLFNPLKTGVCQLD
NANVTDAILERAGGSIADFTGHYQTAFRELERVLNFPQSNLCLKREKQDESCS
LTQALPSELKVSADCVSLTGAVSLASMLTEIFLLQQAQGMPEPGWGRITDSHQ
WNTLLSLENAQFDLLQRTPEVARSRATPLLDLIKTAALTPHPPQKQAYGVTLPT
SVLFIAGHDTNLANLGGALELNWTLPGQPDNTPPGGELVFERWRRLSDNSQW
IQVSLVFQTLQQMRDKTPLSLNTPPGEVKLTLAGCEERNAQGMCSLAGFTQIV
NEARIPACSLRSHL

图 1B

pH/温度曲线和稳定性

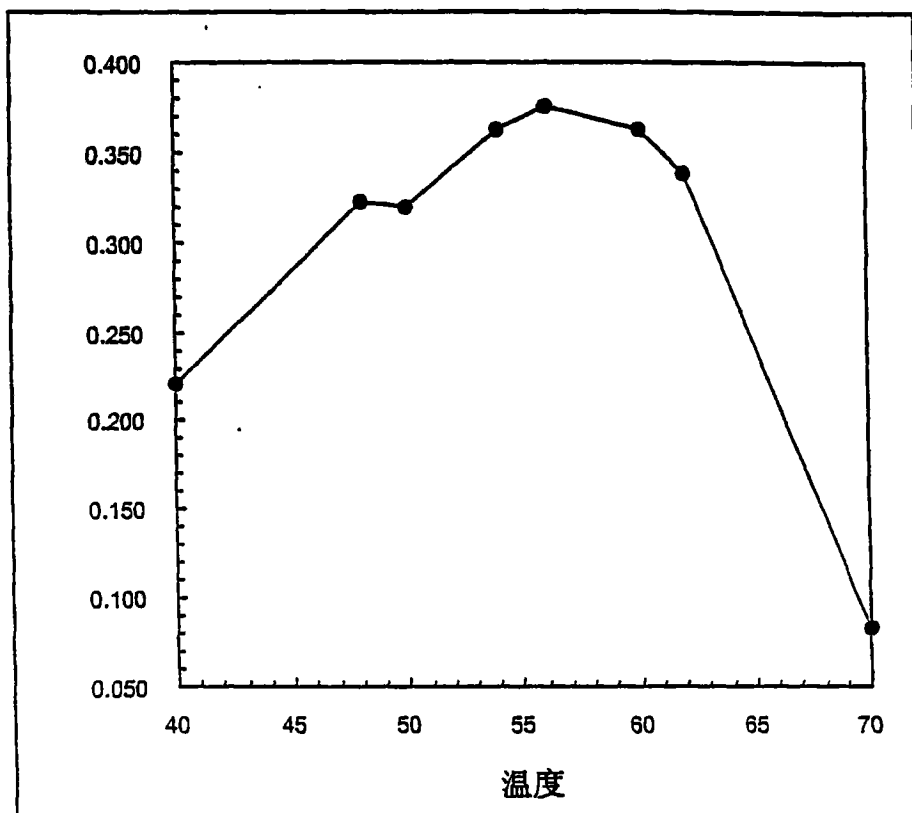


图 2A

pH/温度曲线和稳定性

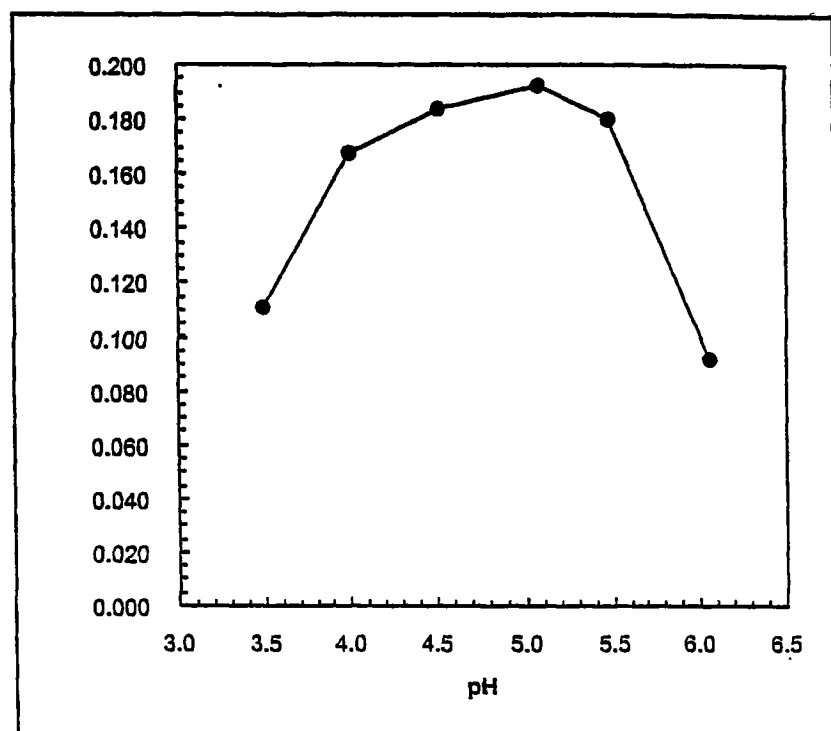


图 2B

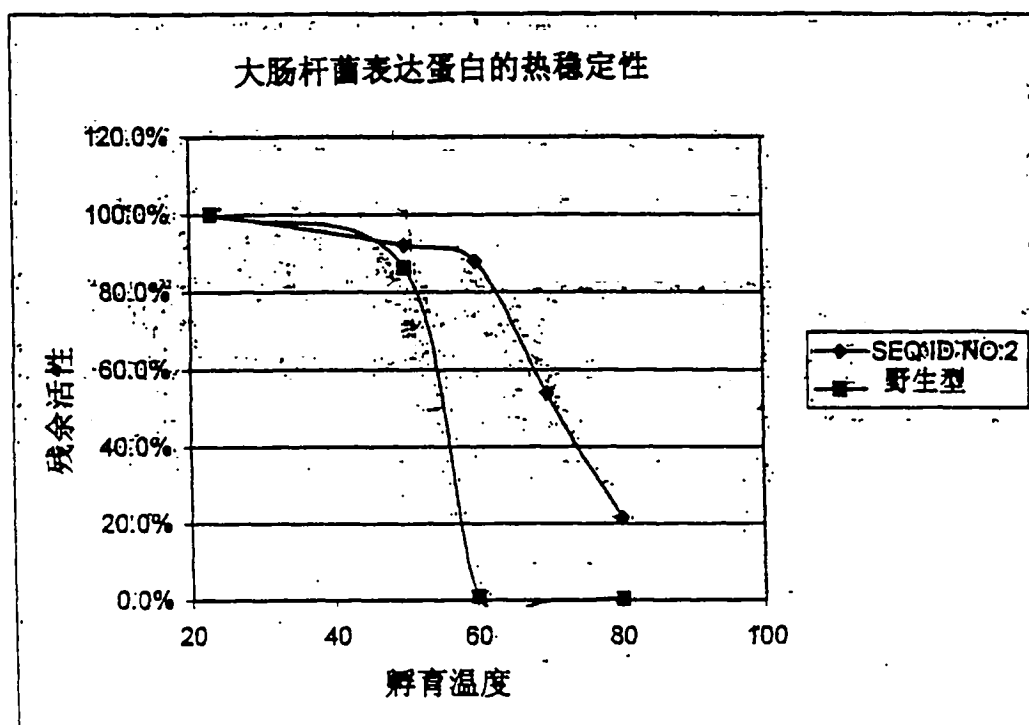


图 3

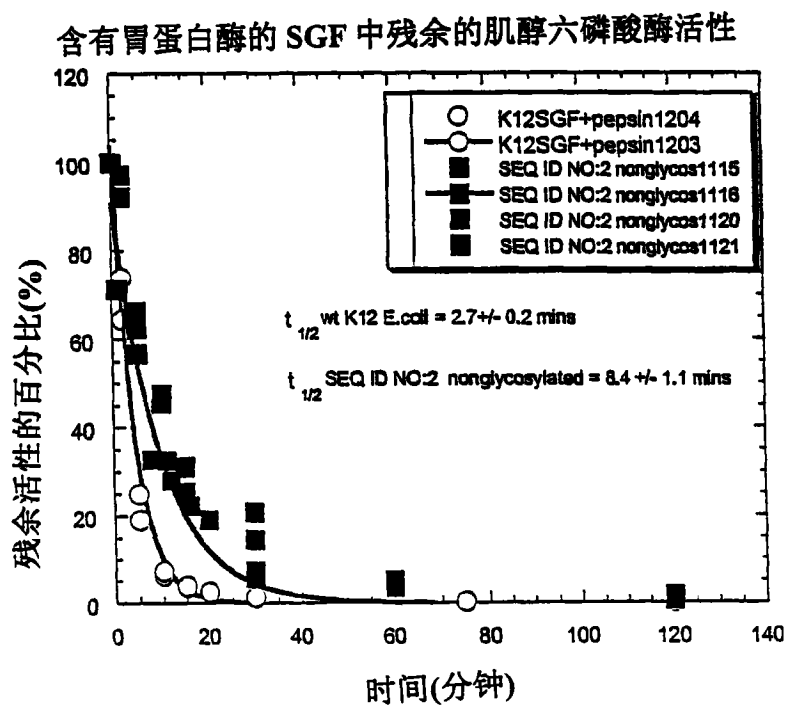


图 4

图 5

胃蛋白酶消化的肌醇六磷酸酶的 $T_{1/2}$

宿主	$T_{1/2}$ (分钟)
大肠杆菌	~8
毕赤酵母	~10
酿酒酵母	~25

图 6

预测的糖基化位点

QSEPELKLES VVIVSRHGVR APTKATQLMQ DV**T**PDAMP**T**W PVKLGELTPR GGELIAYLGH
 YWRQRLVADG LLPKCGCPQS GQVAIIADVD ERTRKTGEAF AAGLAPDCAI TVH**T**QAD**T**S**I**
 PDPLENPLKT GVCQLDNA**N**V TDAILERAGG SIADFTGHYQ TAFRELERVL NFPQSNLCLK
 REKQDESCSL TQALPSELKV SADCVSLTGA VSLASMLTEI FLLQQAQGMPEPGWGRITDS
 HQWNTLLSLH NAQFDLLQRT PEVARSRATP LLDLIK**T**ALT PHPPQKQAYG VTLPTSVLFI
 AGHDTNLANL GGALEL**N**WTL PGQPDNTPPG GELVFERWRR LSDNSQWQV SLVFQTLQQM
 RDKTPLSLNT PPGEVKLTLA GCEERNAQGM CSLAGFTQIV NEARIPACSL

图 7

SDS 聚丙烯凝胶电泳的结论

	毕赤酵母	酿酒酵母
O-糖基化	否	否
N-糖基化	是	是
N-糖基化形式	1 优势	2

图 8A

最大肽作图

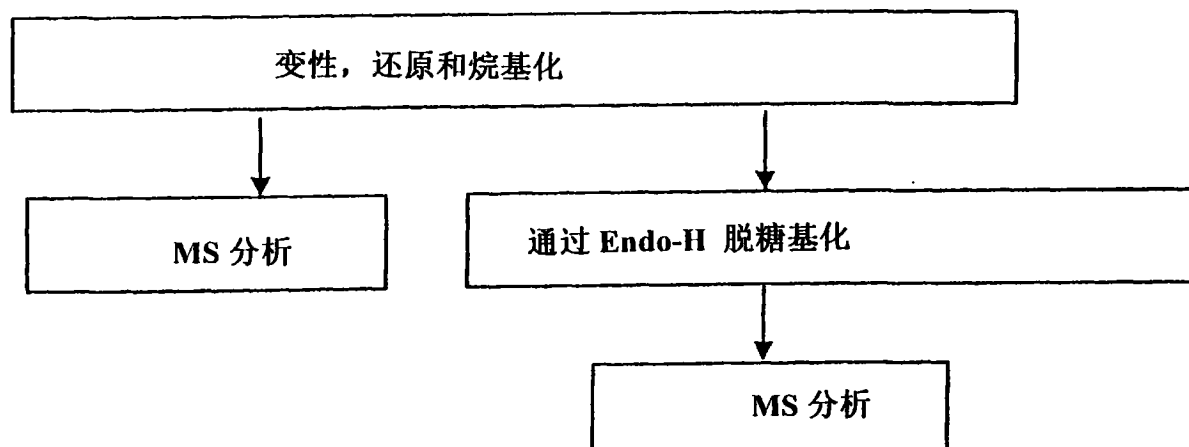


图 8B
糖基化作图

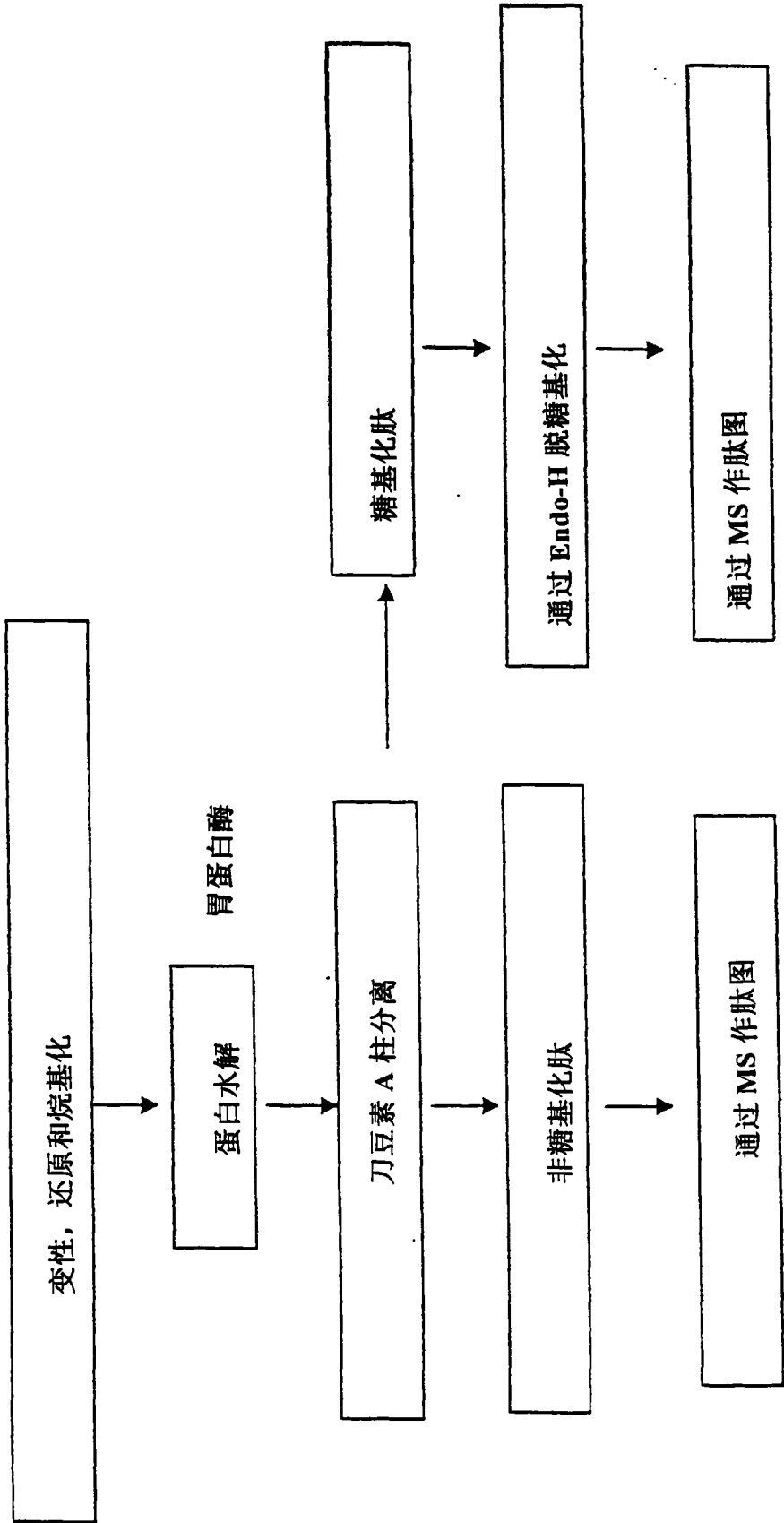


图 9A

已鉴定的毕赤酵母来源的肌醇六磷酸酶的糖基化位点

QSEPELKLES	VVIVSRHGVR	APTKATQLMQ	DVTPDAWPTW	PVKLGELTPR	GGELIAYLGH
YWRQRLVADG	LLPKCGCPQS	GQVAIIADVD	ERTRKTGEAF	AAGLAPDCAI	TVHTQADTSS
PDPLFNPLKT	GVCQLDNANV	TDAILERAGG	SIADFTGHYQ	TAFRELERVL	NFPQSNLCLK
REKQDESCSL	TQALPSELKV	SADCVSLTGA	VSLASMLTEI	FLQQAAQGM	EPGWGRITDS
HQWNTLLSLH	NAQFDLLQRT	PEVARSRATP	LLDLIKTALT	PHPPQKQAYG	VTLPTSVLFI
AGHDTNLANL	GGALELNWTL	PGQPDNTPPG	GELVFERWRR	LSDNSQWIV	SLVFQTLQQM
RDKTPLSLNT	PPGEVKLTLA	GCEERNAQGM	CSLAGFTQIV	NEARIPACSL	

图 9B

已鉴定的酿酒酵母来源的肌醇六磷酸酶的糖基化位点

```

QSEPELKLES  VVIVSRHGVR  APTKATQLMQ  DVTPDAWPTW  PVKLGELTPR  GGELIAYLGH
YWRQRLVADG  LLPKCGCPQS  GQVAIIADVD  ETRKKTGEAF  AAGLAPDCAI  TVHTQADTSS
PDPLFNPLKT  GVCQLDNANV  TDAILERAGG  SIADFTGHYQ  TAFRELERVL  NFPQSNLCLK
REKQDESCSL  TQALPSELKV  SADCVSLTGA  VSLASMLTEI  FLLQQAQGMP  EPGWGRITDS
HQWNTLLSLH  NAQFDLLQRT  PEVARSRATP  LLDLIKALT   PHPPQKQAYG  VTLPTSVLFI
AGHDTNLANL  GGALELNWTL  PGQPDNTPPG  GELVFERWRR  LSDNSQWIQV  SLVFQTLQQM
RDKTPLSLNT  PPGEVKLTLA  GCEERNAQGM  CSLAGFTQIV  NEARIPACSL

```

图 10

总结

毕赤酵母的肌醇六磷酸酶

在毕赤酵母中表达的肌醇六磷酸酶有三种形式。每种形式有一个糖链连接在氨基酸 #317 或 #344 或 #369 上。

酿酒酵母的肌醇六磷酸酶

在酿酒酵母中表达的肌醇六磷酸酶有三种形式。第一种形式有两个糖链连接在氨基酸 #317 和 #344 上。第二种和第三种形式携带了一个糖链, 连接在氨基酸 #317 或 #344 上。

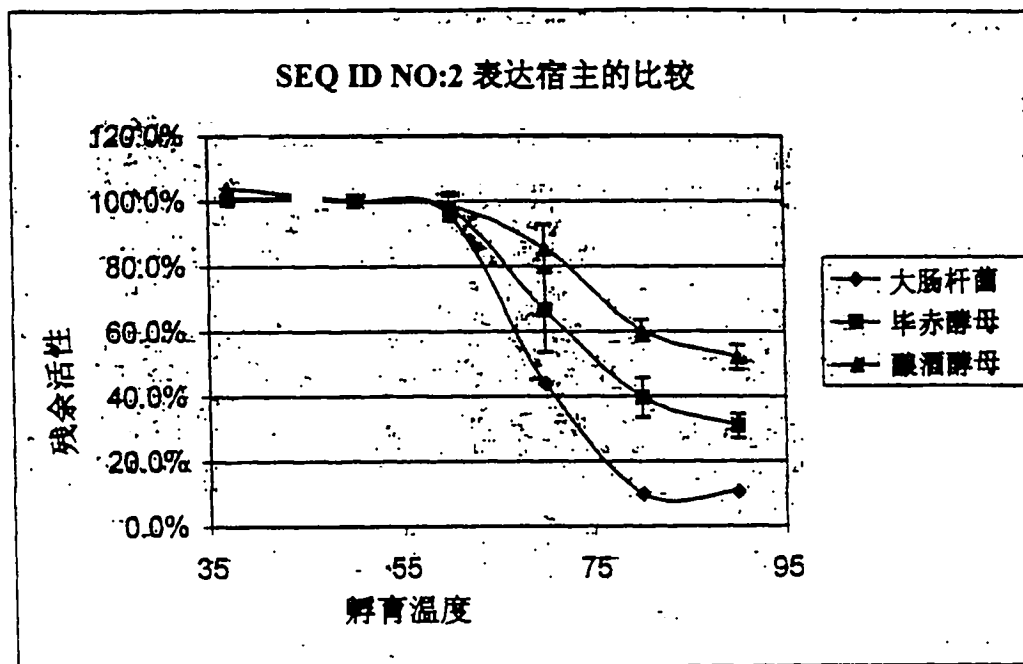


图 11

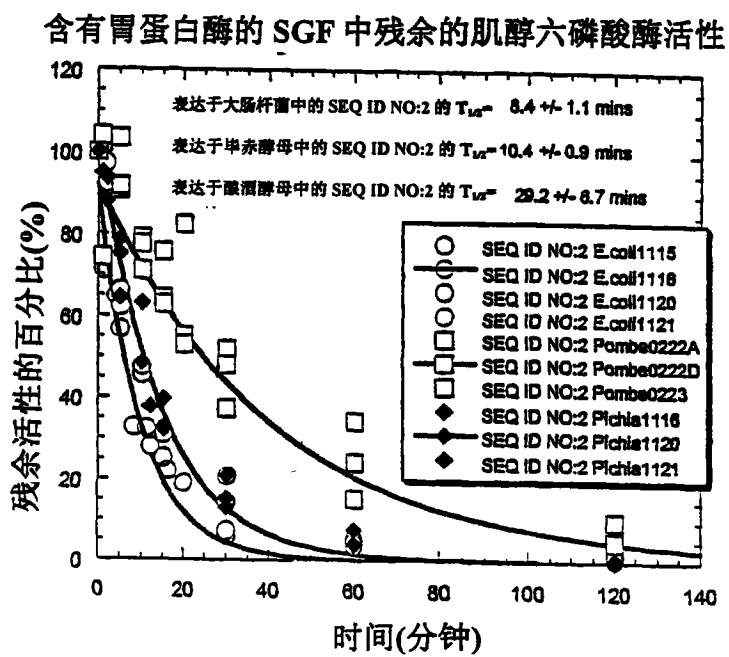


图 12

大肠杆菌 appA (GenBank 编号 M58708)(SEQ ID NO:3)

```

1 taaggagcag aaacaatgtg gtatttactt tggttcgtcg gcattttgtt gatgtgttcg
61 ctctccaccc ttgtgttggg atggctggac ccgcgtctga aaagttaacg aacgtaggcc
121 tgatgcggcg cattagcatc gcatcaggca atcaataatg tcagatatga aaagcggaaa
181 catatcgatg aaagcgatct taatcccat tttatctctt ctgattccgt taaccccgca
241 atctgcattc gctcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtgttga ttgtcagtcg
301 tcattgtgtg cgtgctccaa ccaaggccac gcaactgatg caggatgtca cccagacgc
361 atggccaacc tggccggtaa aactgggttg gctgacaccg cnggtgtgtg agtaatcgc
421 ctatctcgga cattaccaac gccagcgtct ggtagccgac ggattgtgtg cgaaaaagg
481 ctgcccgcag tctggtcagg tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgta cccgtaaac
541 aggcgaagcc ttcgcccgcc ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccaggc
601 agatacgtcc agtcccgatc cgttatitaa tctctaaaa actggcggtt gccaaactgga
661 taacgcgaac gtgactgacg cgatcctcag cagggcagga gggtaattg ctgactttac
721 cgggcatcgg caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg ctttaatttc cgcaatcaaa
781 ctgtgtcctt aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc
841 ggaactcaag gtgagcgccg acaatgtctc attaacgggt gcggtaaagc tcgcatcaat
901 gctgacggag atatttctcc tgcaacaagc acagggaatg ccggagccgg ggtggggag
961 gatcaccgat tcacaccagt ggaacacctt gctaagtgtg cataacgcgc aatttlati
1021 gctacaacgc acgccagagg ttgccgcag ccgcgccacc ccgttattag atttgatcaa
1081 gacagcggtg acgccccatc caccgcaaaa acaggcggtat ggtgtgacat taccacttc
1141 agtgtgtt atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctggcgggcg cactggagct
1201 caactggacg ctccccgtc agccggataa cacgccgcca ggtgtgaac tgggtgttga
1261 acgtgtggcg cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgtgtg tcttcagac
1321 ttacagcag atgctgata aaacgccgct gtcattaaat acgccgccc gagaggtgaa
1381 actgacctg gcaggatgtg aagagcgaaa tgcgcagggc atgtgtcgt tggcagggtt
1441 tacgcaaac gtgaatgaag cagcatacc ggcgtgcagt ttgtaatga taaaaagag
1501 cattcagta cctgaatgct ctgaggctga tgacaaacga agaactgtct aatgcgtaga
1561 ccgaaaaagg cgttcacgcc gcacccggcc acttcagtt tctctttc tcggagtaac
1621 tataaccgta atagttatag ccgtaactgt aagcgggtgt ggcgcgttta atcacaccat
1681 tgaggatagc gccttaata ttgacgcctg cctgttcag acgtgcatt gacaaactca
1741 cctctttggc ggtgttcaag ccaaaacgcg caaccagcag gctggtgcc acagaacgcc
1801 ccacgaccgc ggcatcactc accgcagca tcggcggtgt atcgacaatc accagatcgt
1861 aatgtcgtt cgcccatcc agtaattgac gcatccgatc g

```

图 13

大肠杆菌 appA 肌醇六磷酸酶(野生型)的氨基酸序列

```

MKAILIPFLSLLIPLTPQSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVT
PDAWPTWPKLGLWLTTPRGGELIAYLGHYQRQRLVADGLLAKKGCPQSGQVA
IADVDERTRKTGEAFAAGLAPDCAITVHTQADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDNA
NVTDAILSRAGGSIADFTGHRQTAFRELERVLNFPQSNLCLKREKQDESCSLTQ
ALPSELKVSADNVSLTGAVSLASMLTEIFLLQQAQGMPEPGWGRITDSHQWNT
LLSLHNAQFYLLQRTPEVARSRATPLLDLIKALTPHPQKQAYGVTLPTSVLFI
AGHDTNLANLGGALELNWTLPGQPDNTPPGGELVFERWRRLSDNSQWIVSL
VFQTLQQMRDKTPLSLNTPPGEVKLTLAGCEERNAQGMCSLAGFTQIVNEARI
PACSL

```

图 14

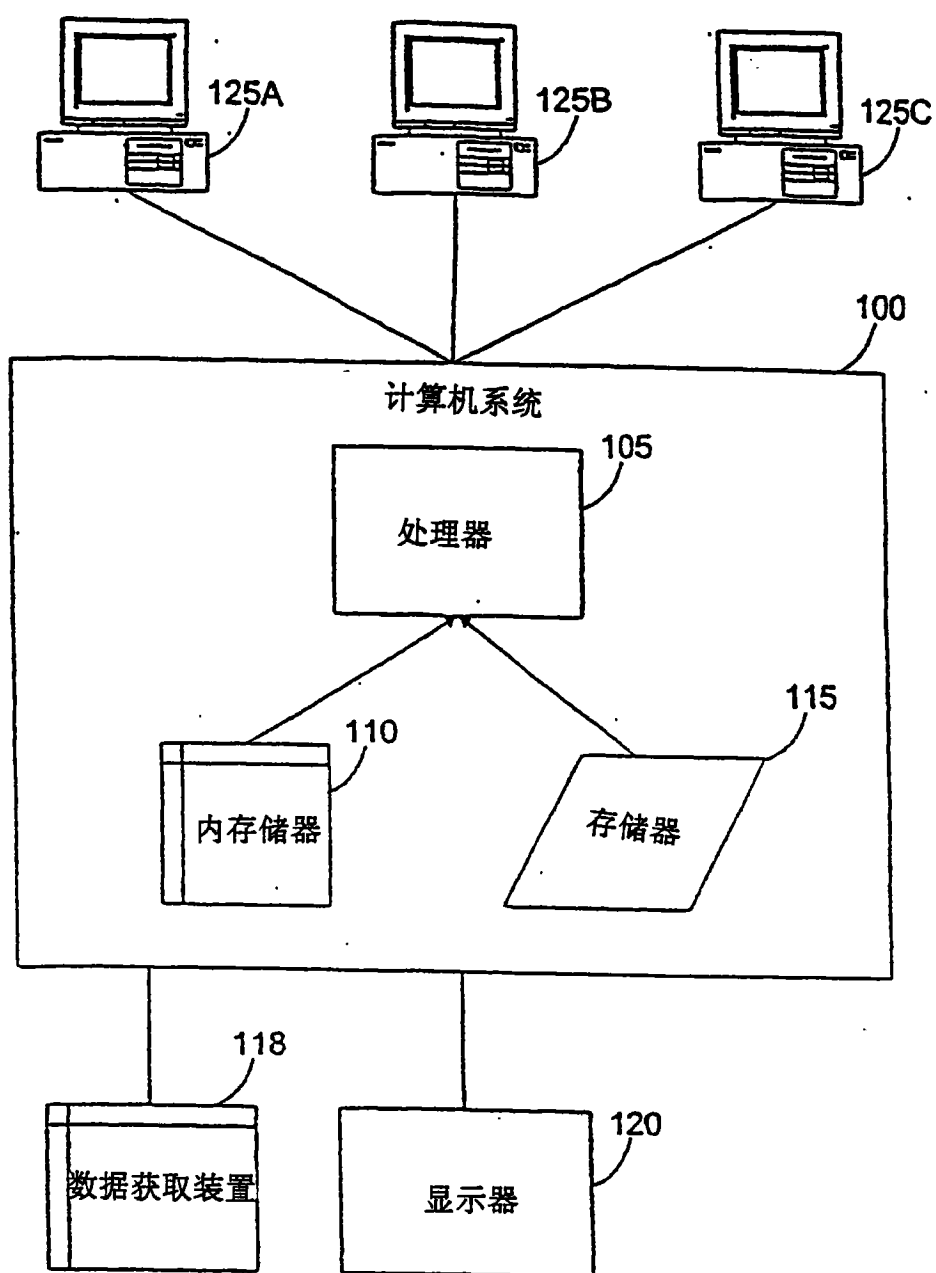


图 15

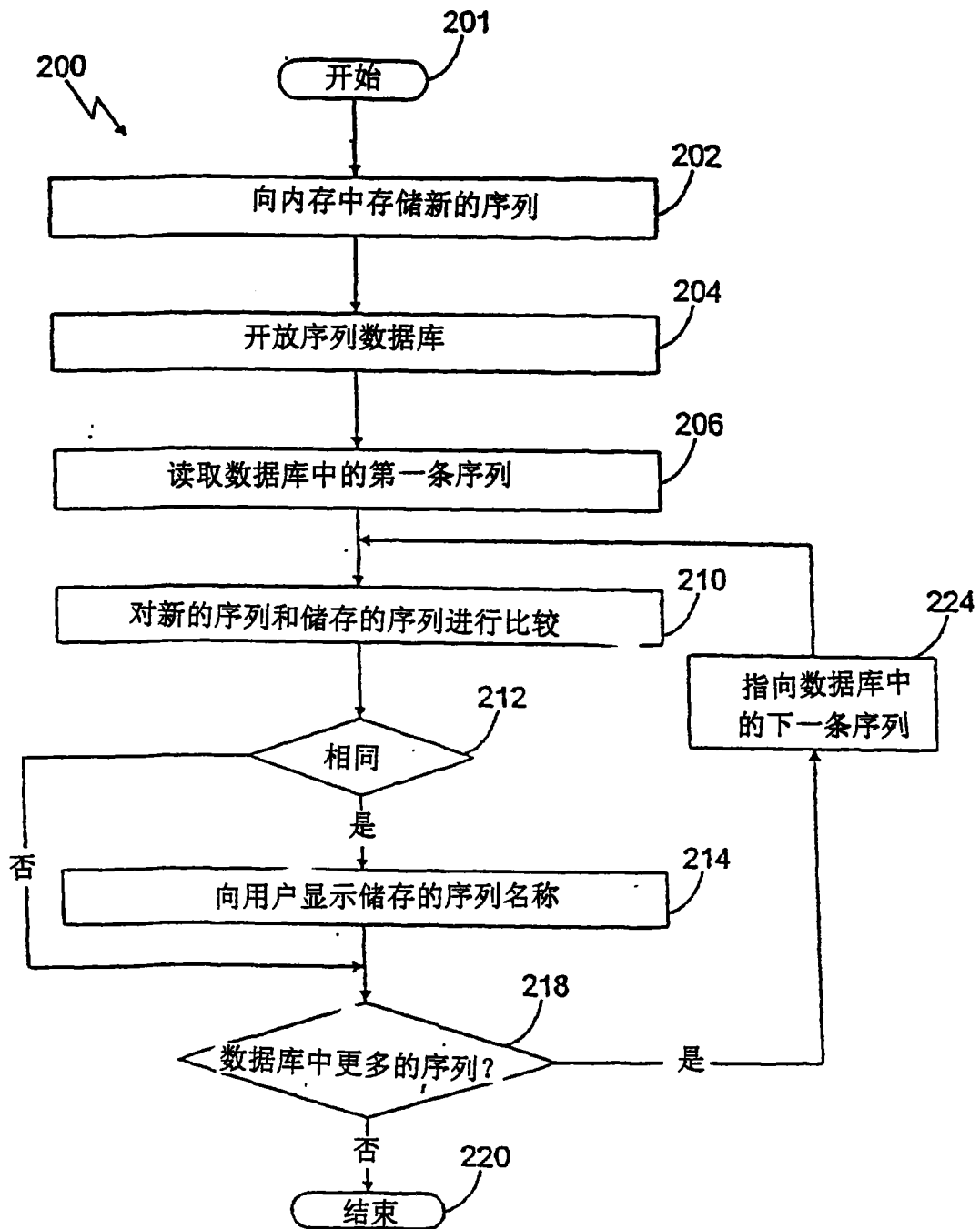


图 16

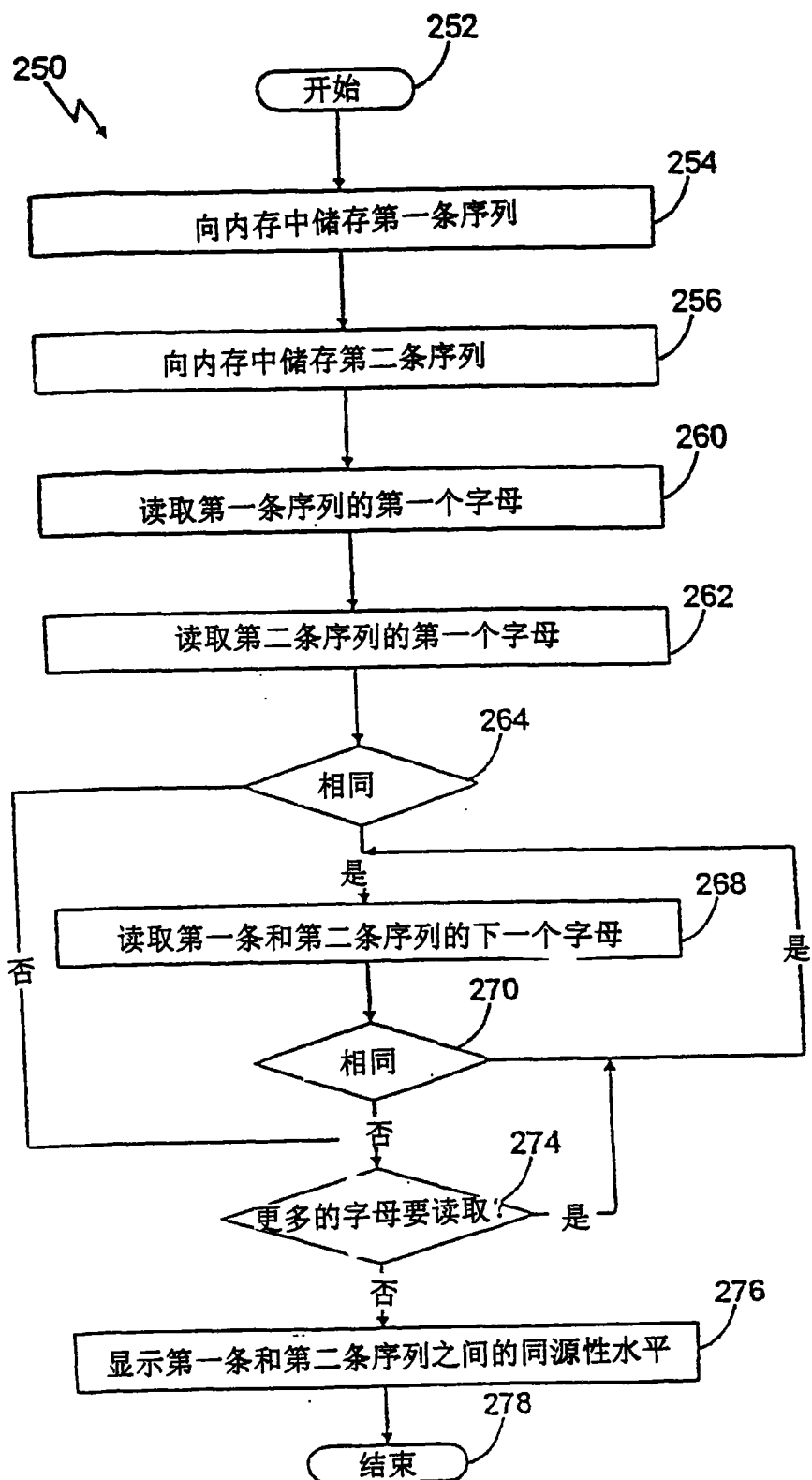


图 17

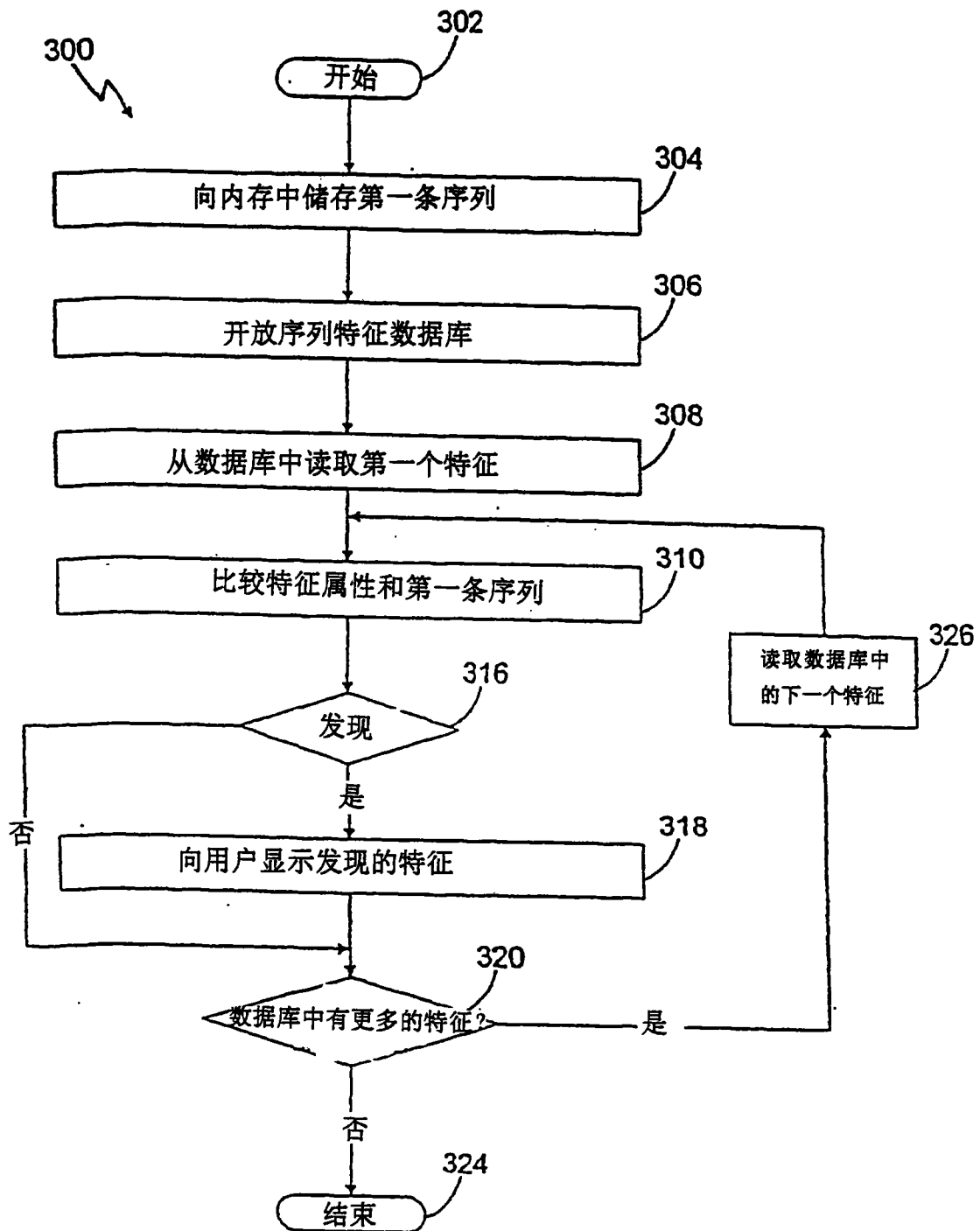


图 18