

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101006176 B

(45) 授权公告日 2012. 03. 21

(21) 申请号 200580027907. 6

(22) 申请日 2005. 08. 19

(30) 优先权数据

241671/2004 2004. 08. 20 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 02. 15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2005/015497 2005. 08. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02006/019192 JA 2006. 02. 23

(73) 专利权人 三得利控股株式会社

地址 日本大阪府

(72) 发明人 清水昌 樱谷英治

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

代理人 薛俊英 王维玉

(51) Int. Cl.

C12N 15/09 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

A23L 1/30 (2006. 01)

C12N 9/00 (2006. 01)

C07K 16/40 (2006. 01)

C12P 7/64 (2006. 01)

C12M 1/00 (2006. 01)

C12P 21/02 (2006. 01)

C12M 1/34 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1384882 A, 2002. 12. 11, 说明书, 权利要求书.

Meesapyodsuk D, et

al., .Characterization of the regiochemistry and cryptoregiochemistry of a *Caenothabditiselegans* fatty acid desaturase expressed in *Saccharomy. Biochemistry* 39. 2000, 39(39), 11948-11954.

姚汝华、周青峰. 黑加仑籽和油的营养学研究. 广州食品工业科技 11 1. 1995, 11(1), 第 1 页摘要.

ces cerevisiae.

审查员 邢云龙

权利要求书 1 页 说明书 23 页

序列表 14 页 附图 4 页

(54) 发明名称

具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽及编码其多肽的多核苷酸及其利用

(57) 摘要

本发明提供具有广泛的底物特异性, 具有在 ω 3 位高效生成不饱和键的 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽及编码其多肽的多核苷酸。通过使此多核苷酸在生物体内表达, 可大量生产 n-3 系列 PUFAs。具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽且是由序列号 :1 所示的氨基酸序列组成的多肽, 编码具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸且是由序列号 :2 或 3 所示的碱基序列组成的多核苷酸等, 均对 n-3 系列脂肪酸的生产起作用。

1. 多肽,其是具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽,其特征在于,其是由序列号 :1 所示的氨基酸序列组成的多肽。

2. 抗体,其与权利要求 1 中所述的多肽结合。

3. 多核苷酸,其编码权利要求 1 中所述的多肽。

4. 多核苷酸,其是编码具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸,其特征在于,其是以下 (c) 或 (d) 中的任一种多核苷酸:

(c) 由序列号 :2 或 3 所示的碱基序列组成的多核苷酸;

(d) 由序列号 :2 所示的碱基序列中第 14 位到第 1366 位的碱基序列组成的多核苷酸。

5. 载体,其含有权利要求 3 或 4 中所述的多核苷酸。

6. 使用权利要求 3 或 4 中所述的多核苷酸对真菌、或对来自动物、植物或其后代的细胞或组织进行转化后得到的转化体。

7. 权利要求 6 中所述的转化体,其中,上述植物是大豆、菜籽、芝麻、橄榄、亚麻籽、玉米、向日葵或红花。

8. 权利要求 6 或 7 所述的转化体,其中,脂肪酸组成被改变。

9. 多肽的生产方法,其使用权利要求 5 中所述的载体。

10. 多肽的生产方法,其使用权利要求 6 ~ 8 中任一项所述的转化体。

11. 脂肪酸的生产方法,其使用权利要求 6 ~ 8 中任一项所述的转化体或权利要求 5 中所述的载体。

12. 权利要求 11 中所述的脂肪酸的生产方法,其包括将导入上述多核苷酸的生物或细胞从培养开始或用最适培养温度培养后,用比最适培养温度低的温度培养,以生产脂肪酸。

13. 权利要求 12 中所述的脂肪酸的生产方法,其中,比上述最适培养温度低的温度为 0°C 以上、 20°C 以下。

14. 权利要求 11、12 或 13 中所述的脂肪酸的生产方法,其中,上述脂肪酸为 α -亚麻酸、十八碳四烯酸、 $20:4\Delta^{8,11,14,17}$ 或二十碳五烯酸。

15. 获得编码具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸的方法,所述方法包括:从由生物制备的基因组 DNA 或 cDNA 中,通过 PCR 获得编码具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸的工序,所述的 PCR 将权利要求 3 或 4 中所述的多核苷酸的片段寡核苷酸用作引物。

16. 检测器具,其中,权利要求 1 中所述的多肽固定在基板上。

17. 检测器具,其中,权利要求 2 中所述的抗体固定在基板上。

具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽及编码其多肽的多核苷酸及其利用

技术领域

[0001] 本发明涉及具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性、催化 n-3 系列不饱和脂肪酸合成反应的多肽及编码其多肽的多核苷酸以及这些的代表性的利用。

背景技术

[0002] 多不饱和脂肪酸 (PUFAs; Polyunsaturated fatty acids) 作为细胞膜磷脂的组成成分, 且作为前列腺素、血栓素、白三烯等类激素的生理活性物质的前体, 在生物体内起着重要的作用。由此 PUFAs 合成的生理活性物质被称为类花生酸, 需要时在体内合成, 调节炎症反应、生殖功能、免疫应答、血压等。有报道指出 PUFAs 还是婴幼儿脑发育的必需物质。

[0003] 相关的 PUFAs, 从各生物合成途径可分为 n-3 系列、n-6 系列、n-9 系列等。此处, “n-”后接续的数字 3、6 及 9, 表示从 PUFAs 的甲基开始数, 最初的双键出现在第几位的碳上。例如, “n-3”系列是指以甲基端的碳为 1 位碳, 向羧基端顺序为 2 位、3 位... 时, 从甲基开始数最初的双键出现在 3 位碳的 PUFAs, 也表示为 ω 3 系列。图 7 表示动物中主要的 n-3 系列及 n-6 系列的 PUFAs。作为必需脂肪酸的 α -亚麻酸及在生物体内可由 α -亚麻酸 (ALA) 代谢产生的十八碳四烯酸、20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$ 、二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳六烯酸 (DHA) 等属于 n-3 系列 (ω 3 系列)。作为必需脂肪酸的亚油酸 (LA) 及在生物体内可由亚油酸代谢产生的 γ -亚麻酸 (GLA)、二高- γ -亚麻酸 (DGLA)、花生四烯酸 (AA 或 ARA) 等属于 n-6 系列 (ω 6 系列)。图中例如“18:2 $\Delta^{9,12}$ ”, 其 18:2 表示碳数为 18、双键数为 2。而 $\Delta^{9,12}$ 表示以羧基的碳为 1 位碳, 向甲基端顺序为 2 位、3 位... 时双键的位置。因动物不能使超过 Δ^9 位的甲基端的 C-C 键去饱和, 所以, 必须从食物 (植物性食物) 中摄取作为必需脂肪酸的 α -亚麻酸及亚油酸, 而且不能进行 n-6 系列向 n-3 系列、或 n-3 系列向 n-6 系列的相互转化。

[0004] 已很清楚 n-6 系列 PUFAs 和 n-3 系列 PUFAs 分别具有不同的功能, 在生物体内均起着重要的作用。已知 n-3 系列 PUFAs 具有以 EPA 的抗血栓作用、改善血清脂质的作用、DHA 的提高学习能力的作用、抗癌作用为代表的多种生理活性, 是用于保持生物体恒常性的必需物质。如上所述, 因动物不能在体内合成 n-3 系列 PUFAs, 所以, 经口摄取 n-3 系列 PUFAs 非常重要。

[0005] 如上所述, 为了合成近来被指出重要性的 n-3 系列 PUFAs, 需要 ω 3 脂肪酸去饱和酶, 其可使从脂肪酸的甲基开始数时的 3 位和 4 位、即 ω 3 位和 ω 4 位之间形成不饱和键, 且具有生成 ω 3 不饱和脂肪酸的活性。此 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因迄今为止已在高等植物、绿藻、线虫、卵菌纲、子囊菌纲等中克隆 [例如, 参照日本特开 2001-95588 公报 (平成 13 年 (2001) 4 月 10 日公开)、国际公开第 W0 03/064596 号小册子 (pamphlet) (平成 15 年 (2003) 8 月 7 日公开)、Science 258:1353-1355 (1992)、Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:1314-1327 (2002)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:1142-1147 (1997)、Biochemistry 39:11948-11954 (2000)、Biochem. J. 378:665-671 (2004)、Microbiology 150:

1983-1990(2004)、Biochem. Biophys. Res. Commun. 150 :335-341(1988)]。

[0006] 如日本特开 2001-95588 公报、Science 258 :1353-13355(1992)、Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 :1314-1327(2002) 所报道,由高等植物、绿藻的 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因编码的蛋白质具有如下活性,将亚油酸 (18:2) 的碳数 18 的 n-6 系列脂肪酸转化为 n-3 系列的 α -亚麻酸 (18:3)。但是,由高等植物、绿藻的 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因编码的蛋白质不能将碳数 20 的脂肪酸转变为 n-3 系列。

[0007] Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 :1142-1147(1997)、Biochemistry 39 :11948-11954(2000) 中报道了由线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因 (FAT-1) 编码的蛋白质对碳数 16 ~ 20 的 n-6 系列脂肪酸起作用,使其 ω 3 位生成不饱和键。但在 Biochemistry 39 :11948-11954(2000) 中也报道了使此 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因在酵母中表达时,从 n-6 系列的花生四烯酸 (20:4) 向 n-3 系列的二十碳五烯酸 (EPA) (20:5) 的转化率非常低,小于 1.9%。

[0008] 国际公开第 W0 03/064596 号小册子、Biochem. J. 378 :665-671(2004) 中有如下报道,由卵菌纲 (*Saprolegnia diclina*) 的 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因 (SDD17) 编码的蛋白质对碳数 20 的 n-6 系列脂肪酸起作用,使其 ω 3 位生成不饱和键。但却不能使碳数 18 的 n-6 系列脂肪酸的 ω 3 位去饱和。

[0009] 且 Microbiology 150 :1983-1990(2004) 中报道了从属于子囊菌的 *Saccharomyces kluyveri* 中克隆 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因。由此基因编码的蛋白质具有将 n-6 系列的亚油酸 (18:2) 转变为 n-3 系列的 α -亚麻酸 (18:3) 的活性。但是此 ω 3 脂肪酸去饱和酶不能使碳数 20 的 n-6 系列脂肪酸的 ω 3 位去饱和。

[0010] 已知作为脂质生产菌的高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 在低温时生成二十碳五烯酸 (EPA)。即以葡萄糖为碳源、在 25℃ 培养 *M. alpina* 时不生成二十碳五烯酸,但在 11℃ 培养时则生成二十碳五烯酸 [例如,参照 Biochem. Biophys. Res. Commun. 150 :335-341(1988)]。由此可证明,低温下存在诱导基因表达或使其活性化的 ω 3 脂肪酸去饱和酶。

[0011] 且已知许多 *Mortierella* 亚属的菌株在低温下培养时,可在菌体内积累二十碳五烯酸。此时,因未检测出二十碳五烯酸 (EPA) 以外的 n-3 系列脂肪酸,所以,可认为在低温条件下,花生四烯酸的 ω 3 位去饱和,从而生成二十碳五烯酸 (EPA) [参照 J Am Oil Chem Soc 65, 1455-1459(1988)]。由此可明确证明,存在着使碳数 20 的脂肪酸去饱和的 ω 3 脂肪酸去饱和酶。

发明内容

[0012] 如上所述, ω 3 脂肪酸去饱和酶基因至今为止已在高等植物、绿藻、线虫、卵菌纲、子囊菌纲等中克隆。但是,至今为止已被报道的 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因存在着以下问题,可使 ω 3 位去饱和的底物局限于特定碳数的脂肪酸或即使导入宿主细胞使其表达,其去饱和率也很低等。如果可获得对更大范围的脂肪酸起作用且使脂肪酸 ω 3 位高效生成不饱和键的 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因,即可更高效地合成更多种类的 n-3 系列脂肪酸。

[0013] 在真菌类中唯一被克隆的来自 *S. kluyveri* 的 ω 3 脂肪酸去饱和酶不能使碳数 20 的脂肪酸去饱和。而如上所述,虽已证明 *Mortierella* 亚属的菌株中存在使碳数 20 的脂肪

酸去饱和的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶,但还未能达到获得此 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因的阶段。即使使用通过此种已知的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的序列比较而设计的简并引物等,克隆来自 *M. alpina* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因也非常困难。

[0014] 本发明鉴于上述的问题点,其目的在于,提供对更大范围的脂肪酸起作用、且具有使脂肪酸 $\omega 3$ 位高效生成不饱和键的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽、及编码其多肽的多核苷酸。

[0015] 本发明者为解决上述课题锐意研究的结果,在真菌类的唯一克隆了 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因的 *S. kluyveri* 中, (i) 来自该 *S. kluyveri* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列与 *S. kluyveri* 自身的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶的同源性最高 (60%), (ii) *S. kluyveri* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列与来自 *M. alpina* 的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶的同源性高 (38.6%) [Microbiology 150:1983-1990 (2004)], 由此可推测 *M. alpina* 中的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶和 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列也具有同源性高的可能性。因此,比较 *M. alpina* 的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶、*S. kluyveri* 的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶及 *S. kluyveri* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的推测氨基酸序列并设计引物,使用此引物,通过 PCR,成功地获得了 *M. alpina* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因。并且,使所得到的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因在生物体内实际表达时,发现其对碳数 18 及 20 的 n-6 系列脂肪酸均起作用,且可使脂肪酸的 $\omega 3$ 位高效生成不饱和键,使本发明得以完成。

[0016] 即本发明所涉及的多肽是具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽,其特征在于,其是以下 (a) 或 (b) :

[0017] (a) 由序列号 :1 所示的氨基酸序列组成的多肽 ;

[0018] (b) 由序列号 :1 所示的氨基酸序列中取代、缺失、插入或附加 1 个或多个氨基酸的氨基酸序列组成的多肽。

[0019] 根据上述构成,本发明所涉及的多肽可催化 $\omega 3$ 不饱和脂肪酸的合成反应。

[0020] 本发明所涉及的抗体,其特征在于与上述多肽结合。

[0021] 根据上述构成,本发明所涉及的抗体可鉴定表达具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽的生物体或其组织或细胞。

[0022] 本发明所涉及的多核苷酸,其特征在于编码上述多肽。

[0023] 且本发明所涉及的多核苷酸是编码具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸,其优选是以下 (c)、(d)、(e) 或 (f) :

[0024] (c) 由序列号 :2 或 3 所示的碱基序列组成的多核苷酸 ;

[0025] (d) 由序列号 :2 所示的碱基序列中第 14 位到第 1366 位的碱基序列组成的多核苷酸 ;

[0026] (e) 与由序列号 :2 或 3 所示的碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸在严谨条件下杂交的多核苷酸 ;

[0027] (f) 与由序列号 :2 所示的碱基序列中第 14 位到第 1366 位的碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸在严谨条件下杂交的多核苷酸 ; 中的任一个。

[0028] 根据上述构成,为了在转化体中合成具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽,可使用上述多核苷酸。

[0029] 本发明所涉及的载体,其特征在于含有上述多核苷酸。

[0030] 根据上述构成,可将上述多核苷酸导入生物或细胞并使具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽重组表达,或可使用无细胞蛋白质合成系统,合成具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽。

[0031] 本发明所涉及的转化体,其特征在于导入上述多核苷酸。上述转化体优选真菌(酵母、丝状菌等)、动物、或植物或其后代、或来自这些的细胞或组织,上述植物优选大豆、菜籽、芝麻、橄榄、亚麻籽、玉米、向日葵或红花。本发明所涉及的转化体,优选脂肪酸组成被改变的转化体。

[0032] 本发明所涉及的上述多肽的生产方法,其特征在于使用上述载体。且本发明所涉及的上述多肽的生产方法,还可使用上述转化体。

[0033] 根据上述构成,可在低成本且对环境低负荷的条件下提供催化 ω 3 脂肪酸去饱和反应的多肽。

[0034] 本发明所涉及的脂肪酸的生产方法,其特征在于使用上述转化体。

[0035] 本发明所涉及的上述多肽的生产方法,其包括将导入上述多核苷酸的转化体从培养开始或用最适培养温度培养后,用比最适培养温度低的温度培养,以生产多肽;或将上述多肽的合成系统置于 0°C 以上、 20°C 以下的温度条件时,可生产上述多肽。比上述最适培养温度低的温度可为 0°C 以上、 20°C 以下。

[0036] 本发明所涉及的脂肪酸的生产方法,优选包括将导入上述多核苷酸的生物或细胞从培养开始或在最适培养温度培养后,用比最适培养温度低的温度培养,以生产脂肪酸。且比上述最适培养温度低的温度,优选为 0°C 以上、 20°C 以下。

[0037] 根据上述构成,可使催化 ω 3 脂肪酸去饱和反应的多肽更高效地起作用。因此,可高效生产 ω 3 位去饱和的脂肪酸。

[0038] 且上述脂肪酸的生产方法,优选上述脂肪酸是 α -亚麻酸(ALA)、十八碳四烯酸、 $20:4\Delta^{8,11,14,17}$ 或二十碳五烯酸(EPA)。

[0039] 本发明所涉及的食物或工业产品,其特征在于,含有通过上述脂肪酸生产方法获得的 α -亚麻酸(ALA)、十八碳四烯酸、 $20:4\Delta^{8,11,14,17}$ 或二十碳五烯酸(EPA)。

[0040] 根据上述构成,因 n-3 系列的 PUFAs 具有抑制过敏、炎症、血液凝固或血管收缩的作用,所以可有效利用于食物或工业产品。

[0041] 本发明所涉及的获得具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多核苷酸方法,其特征在于,包括从由生物制备的基因组 DNA 或 cDNA 中,通过

[0042] (g) 杂交,其以与上述多核苷酸在严谨条件下杂交的多核苷酸或其片段寡核苷酸为探针;或

[0043] (h) PCR,其将上述多核苷酸的片段寡核苷酸用作引物;获得编码具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸的工序。

[0044] 根据上述构成,可高效获得编码具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸。

[0045] 本发明所涉及的多核苷酸,可以是与上述 (c)、(d)、(e) 或 (f) 中的任一种多核苷酸在严谨条件下杂交的多核苷酸。

[0046] 根据上述构成,将上述多核苷酸作为反义多核苷酸使用,可控制上述生物体或其组织或细胞中具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的表达。只要使编码上述 (a)、(b) 多肽的多核苷酸及上述 (c) ~ (f) 的多核苷酸同时在同一细胞内表达,即可产生 RNAi。因此可抑

制多肽的表达。

[0047] 本发明所涉及的多核苷酸,可以是上述多核苷酸的片段。

[0048] 根据上述构成,上述寡核苷酸可用作检测编码具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸的杂交探针或用于扩增该多核苷酸的引物。并且,如果使用上述寡核苷酸,即可鉴定表达了具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽的生物体或其组织或细胞。以上述寡核苷酸为反义寡核苷酸使用时,可控制上述生物体或其组织或细胞中具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽的表达。

[0049] 本发明所涉及的检测器具,其特征在于,与上述 (c)、(d)、(e) 或 (f) 中的任一种多核苷酸在严谨条件下杂交的多核苷酸及 / 或作为该核苷酸的片段的上述寡核苷酸固定在基板上。

[0050] 根据上述构成,检测与所涉及的多核苷酸或所涉及的寡核苷酸杂交的多核苷酸,即可容易地检测出表达具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽的生物。

[0051] 且本发明所涉及的检测器具也可以是上述多肽固定在基板上的检测器具。

[0052] 根据上述构成,检测与上述多肽相互作用的物质,即可容易地检测出调节上述多肽的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的物质。

[0053] 本发明所涉及的检测器具,也可以是上述抗体固定在基板上的检测器具。

[0054] 根据上述构成,检测与上述抗体结合的抗原,即可容易地检测出具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽。

[0055] 在本发明中,多肽是具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽,包括具有与序列号 :1 所示的氨基酸序列有 70% 以上同源性的氨基酸序列的多肽及具有与序列号 :1 所示的氨基酸序列有 90% 以上同源性的氨基酸序列的多肽。

[0056] 本发明所涉及的多肽可催化真菌(酵母、丝状菌等)或植物等生物中内源性脂肪酸的 $\omega 3$ 去饱和反应,所以,只要使用转化体,该转化体导入了含有编码本发明所涉及的多肽的多核苷酸的重组表达载体,即可用低成本且对环境低负荷的生产工序大量制备 α -亚麻酸(ALA)、十八碳四烯酸、 $20:4 \Delta^{8,11,14,17}$ 、二十碳五烯酸(EPA)等的n-3系列脂肪酸。而且,本发明通过大量制备 α -亚麻酸(ALA)、十八碳四烯酸、 $20:4 \Delta^{8,11,14,17}$ 、二十碳五烯酸(EPA)等的n-3系列脂肪酸,可提供廉价的食物或工业产品。

附图说明

[0057] 图1表示Mortierella alpina及Saccharomyces kluyveri的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶及Saccharomyces kluyveri的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的推测氨基酸序列以及其之间同源性高的氨基酸序列。

[0058] 图2是比较Mortierella alpina的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列与Mortierella alpina的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶、Saccharomyces kluyveri的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶、大豆内质网中局部存在的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶、大豆叶绿体中局部存在的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列的比较图。

[0059] 图3表示添加底物亚油酸时,在导入pYMAW3的酵母Saccharomyces cerevisiae中,通过气相色谱法进行脂肪酸分析的结果。

[0060] 图4表示添加底物 γ -亚麻酸时,在导入pYMAW3的酵母

Saccharomyces cerevisiae 中,通过气相色谱法进行脂肪酸分析的结果。

[0061] 图 5 表示添加底物二高- γ -亚麻酸时,在导入 pYMAW3 的酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中,通过气相色谱法进行脂肪酸分析的结果。

[0062] 图 6 表示添加底物花生四烯酸时,在导入 pYMAW3 的酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中,通过气相色谱法进行脂肪酸分析的结果。

[0063] 图 7 表示动物中主要的 n-3 系列及 n-6 系列 PUFAs 的示意图。

具体实施方式

[0064] 以下,详细叙述本发明所涉及的具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽、编码该多肽的多核苷酸及其利用。

[0065] (1) 多肽

[0066] 本发明所涉及的多肽是新型 ω 3 去饱和酶,其使脂肪酸的 ω 3 位去饱和,生成 n-3 系列脂肪酸。本发明所涉及的多肽,只要具有使脂肪酸的 ω 3 位去饱和的活性,无特别限定, ω 3 脂肪酸去饱和的对象底物优选具有使碳数 18 及 / 或 20 的脂肪酸的 ω 3 位去饱和活性的多肽。更优选具有使碳数 18 及 20 的脂肪酸的 ω 3 位去饱和活性的多肽。由于可使 ω 3 位去饱和的底物对象范围非常广泛,所以可生产多种 n-3 系列脂肪酸。

[0067] 成为底物的脂肪酸可以是饱和脂肪酸,也可以是不饱和脂肪酸,但更优选不饱和脂肪酸,进一步优选 n-6 系列脂肪酸。通过使 n-6 系列脂肪酸的 ω 3 位去饱和,即可在生物的体内生产起重要作用的 PUFAs。

[0068] 本发明所涉及的多肽,优选具有使底物脂肪酸 n-6 系列脂肪酸的 ω 3 位去饱和活性的多肽,此种脂肪酸只要是 n-6 位具有不饱和键的脂肪酸即可,其双键的数量和位置无特别限定。其中,本发明所涉及的多肽特别优选具有使亚油酸、 γ -亚麻酸、二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸的 ω 3 位去饱和活性的多肽。由此可认为,使 ω 3 位去饱和,即可由亚油酸合成 α -亚麻酸,由 γ -亚麻酸合成十八碳四烯酸,由二高- γ -亚麻酸合成 $20:4 \Delta^{8,11,14,17}$,由花生四烯酸合成二十碳五烯酸。所得到的 n-3 系列 PUFAs,因具有抑制过敏、炎症、血液凝固或血管收缩的作用,所以可作为食品或工业产品有效利用。

[0069] 在本说明书中使用时,术语“多肽”可与“肽”或“蛋白质”互换使用。且多肽的“片段”意指该多肽的部分片段。本发明所涉及的多肽可从天然供给源中分离,也可化学合成。

[0070] 术语“分离”的多肽或蛋白质,意指从其天然环境中获取的多肽或蛋白质。在宿主细胞中表达的重组产生的多肽及蛋白质,与通过任意适当的技术、实质上被纯化的天然或重组的多肽及蛋白质同样可认为是分离的多肽及蛋白质。

[0071] 本发明所涉及的多肽,包括天然的纯化产物、化学合成的产物及从原核生物宿主或真核生物宿主[包括例如细菌、真菌(酵母、丝状菌等)、高等植物细胞、昆虫细胞、及哺乳动物细胞]中通过重组技术产生的产物。依赖于在重组产生方法中使用的宿主,本发明所涉及的多肽可进行糖基化或非糖基化。而且本发明所涉及的多肽在一些情况下,作为宿主介导过程的结果,含有起始的改变蛋氨酸残基。

[0072] 本发明提供具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽。一种实施方式中,本发明所涉及的多肽是由序列号:1 所示的氨基酸序列组成的多肽、或是由序列号:1 所示的氨基酸序列组成的多肽的突变体且具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽。

[0073] 突变体可例举为包括缺失、插入、倒位、重复及取代的突变体。特别是多肽中的“中性”氨基酸取代，一般对其多肽的活性基本上无影响。

[0074] 多肽氨基酸序列中的一些氨基酸可在对此多肽的结构或功能无显著影响的情况下很容易地被改变，这是该领域众所周知的。并且不仅是人为改变，天然蛋白质中存在着不显著改变该蛋白质的结构或功能的突变体也是众所周知的。

[0075] 本领域技术人员可使用公知技术，很容易地使多肽氨基酸序列中 1 个或多个氨基酸发生突变。例如，可根据公知的定点突变法，使编码多肽的多核苷酸的任意碱基发生突变。针对编码多肽的多核苷酸的任意位点设计引物，可制备缺失突变体或附加突变体。而且使用本说明书中所述的方法，可容易地确定所制备的突变体是否具有所需活性。

[0076] 本发明中的突变体无特别限定，但优选不改变本发明所涉及的多肽活性的突变。具体地说，可为沉默突变、保守性替换等。

[0077] 代表性的保守性替换，是脂肪族氨基酸 Ala、Val、Leu 及 Ile 中的 1 个氨基酸向其他氨基酸的取代；羟基残基 Ser 及 Thr 的交换、酸性残基 Asp 及 Glu 的交换、酰胺残基 Asn 及 Gln 之间的取代、碱性残基 Lys 及 Arg 的交换以及芳香族残基 Phe、Tyr 之间的取代。沉默取代是指即使氨基酸取代、添加或缺失，也不影响多肽活性的突变。

[0078] 如上详述，有关哪种氨基酸的变化是沉默的表现型（即对功能不具有显著有害的作用）的进一步的介绍，可从 Bowie, J. U. 等《Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions》，Science 247:1306-1310 (1990)（本说明书中作为参考引用）找到。

[0079] 本实施方式中涉及的多肽是具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽，优选由

[0080] (a) 序列号：1 所示的氨基酸序列；或

[0081] (b) 序列号：1 所示的氨基酸序列中，取代、缺失、插入或附加 1 个或多个的氨基酸的氨基酸序列组成的多肽。

[0082] 上述“取代、缺失、插入或附加 1 个或多个的氨基酸”是指通过定点诱变法等公知的突变多肽制备法，可进行取代、缺失、插入或附加的数量（优选 10 个以下，更优选 7 个以下，最优选 5 个以下）的氨基酸被取代、缺失、插入或附加之意。如上所述，此种突变多肽不限于具有通过公知的突变多肽制备法人为导入的突变的多肽，还可以是分离纯化天然存在的多肽后的产物。

[0083] 本发明中也包括具有与序列号：1 所示的氨基酸序列的同源性为 70% 以上、优选 90% 以上的氨基酸序列，且具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽。此种多肽中氨基酸序列的同源性可为 70% 以上，优选为 90% 以上，更优选为 95% 以上，进一步优选为 98% 以上，特别优选为 99% 以上。

[0084] 本说明书中，上述“同源性”是指通过 BLAST (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. et al, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) 检索得到的值，氨基酸序列的同源性可由 BLAST 检索来确定。具体地说，可使用 BLAST 软件包（从 sgi32bit 版、ver. 2.0.12; NCBI 获得）的 b12seq 程序 (Tatiana A. Tatusova 及 Thomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999)，根据默认参数算出。双序列比对参数分别使用程序名“blastp”，空位开放罚分 (Cost to open a gap) (Gap 插入 Cost 值) 为“0”，空位扩展罚分 (Cost to extend a gap) (Gap 伸长 Cost 值) 为“0”，Query 序列的过滤使用“SEG”，

“Matrix 使用“BLOSUM62”。

[0085] 本发明所涉及的多肽可以是氨基酸以肽键结合形成的多肽,但不限于此,也可以是包含多肽以外结构的复合多肽。在本说明书中使用时,“多肽以外的结构”可为糖链、异戊间二烯基等,但无特别限定。

[0086] 本发明所涉及的多肽也可以是包含附加多肽的多肽。附加多肽可为例如 His、Myc、Flag 等的表位标记多肽。

[0087] 其他实施方式中,本发明所涉及的多肽可以象融合蛋白质一样的改变了的形态重组表达。例如,本发明所涉及的多肽的附加氨基酸,特别是带电氨基酸区域,为改善纯化过程中或继续的操作及保存过程中的稳定性及持续性,可附加在多肽的 N 末端。

[0088] 在本实施方式中涉及的多肽的 N 末端或 C 末端可附加标签标记(tag 序列或 marker 序列),标签标记例如,是编码使融合多肽容易进行纯化的肽的序列。此种序列可在多肽的最终制备前除去。在本发明的此特定的优选实施方式中,标签(tag)氨基酸序列是六聚组氨酸肽[例如,pQE 载体(Qiagen, Inc.)中提供的标签],其他很多均可由公知的及/或可用商业手段获得。例如,如 Gentz 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989)(本说明书中作为参考引用)中所述,六聚组氨酸提供融合蛋白质的简单的纯化。“HA”标签是用于针对来自流感红血球凝集素(HA)蛋白质的表位进行纯化的其他有用的肽,在 Wilson 等、Cell 37:767(1984)(本说明书中作为参考引用)中有所记载。其他的此种融合蛋白质,包括在 N 或 C 末端进行 Fc 融合的本实施方式所涉及的多肽或其片段。

[0089] 本发明所涉及的多肽,可以是将后述的本发明所涉及的多核苷酸(编码本发明所涉及的多肽的基因)导入宿主细胞,使其多肽在细胞内表达的状态,也可以是从细胞、组织等中分离纯化的状态。本发明所涉及的多肽还可以是化学合成的多肽。

[0090] 重组生成的进行可使用该领域中众所周知的方法,例如,可使用以下详述的载体及细胞进行。

[0091] 合成肽可使用化学合成的公知方法合成。例如,可使用 Houghten, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135(1985)(本说明书中作为参考引用)中的方法。此“Simultaneous Multiple Peptide Synthesis(SMPS)”方法还如 Houghten 等(1986)的美国专利第 4,631,211 号中记载。此方法中,将用于种种肽的固相合成的各种树脂置于各自的溶剂透过性袋(packet)中,可最佳使用与固相法相关的多数同一的重复工序。完整的操作手册的步骤,可同时进行 500 ~ 1000 以上的合成(Houghten 等、前面已出现、5134)。这些文献在本说明书中作为参考引用。

[0092] 如以下详述,本发明所涉及的多肽在使脂肪酸的 ω 3 位去饱和、以生成 n-3 系列脂肪酸的方法及试剂盒中非常起作用。

[0093] 如此可以说,本发明所涉及的多肽至少含有序列号:1 所示的氨基酸序列即可。即应该注意的是,由序列号:1 所示的氨基酸序列和具有特定功能(例如标签)的任意的氨基酸序列组成的多肽也包括在本发明中。且序列号:1 所示的氨基酸序列及该任意的氨基酸序列可在不阻碍各自功能的情况下,用适合的连接肽连接。

[0094] (2) 多核苷酸

[0095] 本发明提供编码具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的本发明所涉及的多肽的多核苷酸。在本说明书中使用时,术语“多核苷酸”可与“核酸”或“核酸分子”互换使用,指核苷酸的聚

合体。在本说明书中使用时,术语“碱基序列”可与“核酸序列”或“核苷酸序列”互换使用,用脱氧核糖核酸(省略为A、G、C及T)的序列表示。“含有序列号:2所示的碱基序列的多核苷酸或其片段”是指包含用序列号:2的各脱氧核苷酸A、G、C及/或T表示的序列的多核苷酸或其片段部分。

[0096] 本发明所涉及的多核苷酸能以RNA(例如mRNA)的形态或DNA的形态(例如cDNA或基因组DNA)存在。DNA可以是双链或单链。单链DNA或RNA可以是编码链(也称作有义链)或也可以是非编码链(也称为反义链)。

[0097] 在本说明书中使用时,术语“寡核苷酸”是指几个至数十个核苷酸结合的产物,可与“多核苷酸”互换使用。寡核苷酸,短的称为二核苷酸(二聚体)、三核苷酸(三聚体),长的用30mers或100mers的聚合核苷酸的数量表示。寡核苷酸可作为更长的多核苷酸的片段生成,也可化学合成。

[0098] 本发明所涉及的多核苷酸的片段,可适当选择与PCR、探针等用途相应的最佳大小,可优选至少为12nt(核苷酸),更优选至少为15nt以上,更优选在15~25nt的范围内,可以是30nt以上,也可以是40nt以上,无特别限定。至少20nt长度的片段,例如是指包含序列号:2或3所示的碱基序列中20以上连续碱基的片段。参照本说明书,因本说明书已提供序列号:2或3所示的碱基序列,所以,本领域技术人员基于序列号:2或3,可容易地制备DNA片段。例如,使用限制性核酸内切酶切割或通过超音波的剪切,可方便地制备各种大小的片段。或此种片段可合成制备。合适的片段(寡核苷酸)可通过Applied Biosystems Incorporated(ABI, 850 Lincoln Center Dr., Foster City, CA 94404) 392型合成仪等合成。

[0099] 本发明所涉及的多核苷酸,其5'端或3'端可与编码上述tag标记(tag序列或marker序列)的多核苷酸融合。

[0100] 本发明还进一步涉及编码具有 ω 3脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸的突变体。突变体,象天然的等位基因突变体一样可天然生成。“等位基因突变体”是指占据生物染色体上指定基因座的基因的一些能交替的形态之一。非天然存在的突变体,例如可使用该领域众所周知的诱变技术生成。

[0101] 此种突变体,可以是编码具有 ω 3脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸的碱基序列中缺失、取代、或附加了1个或多个碱基的突变体。突变体可在编码或非编码区域、或其两者中产生突变。编码区域的突变,可生成保守或非保守的氨基酸的缺失、取代或附加。

[0102] 本发明还进一步提供分离后的多核苷酸,该分离后的多核苷酸包括在严谨杂交条件下编码具有 ω 3脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸、或与该多核苷酸杂交的多核苷酸。

[0103] 一种实施方式中,本发明所涉及的多核苷酸是编码具有 ω 3脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸,且优选是

[0104] (a) 编码由序列号:1所示的氨基酸序列组成的多肽的多核苷酸;或

[0105] (b) 编码由序列号:1所示的氨基酸序列中取代、缺失、插入或附加1个或多个氨基酸的氨基酸序列组成的多肽的多核苷酸中的任一个。

[0106] 其他实施方式中,本发明所涉及的多核苷酸是编码具有 ω 3脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸,优选是以下的(c)、(d)、(e)或(f)中的任一个:

[0107] (c) 由序列号 :2 或 3 所示的碱基序列组成的多核苷酸 ;

[0108] (d) 由序列号 :2 所示的碱基序列中第 14 位到第 1366 位的碱基序列组成的多核苷酸 ;

[0109] (e) 与由序列号 :2 或 3 所示的碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸在严谨条件下杂交的多核苷酸 ;

[0110] (f) 与由序列号 :2 所示的碱基序列中第 14 位到第 1366 位的碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸在严谨条件下杂交的多核苷酸。

[0111] 且上述“严谨条件”是指只有在序列间存在至少 90 % 以上的同一性、优选至少 95 % 以上的同一性、最优选 97 % 的同一性时所发生的杂交。

[0112] 上述杂交可使用如 Sambrook 等、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989) 中所述的众所周知的方法进行。通常, 温度越高, 盐浓度越低, 其严谨性越高 (杂交越难), 可获得更同源的多核苷酸。杂交的条件, 可优选使用以往公知的条件, 无特别限定, 例如, 42℃、6×SSPE、50 % 甲酰胺、1 % SDS、100 μg/ml 鲑精 DNA、5×Denhardt 液 (1×SSPE ; 0.18M 氯化钠、10mM 磷酸钠、pH7.7、1mM EDTA。5×Denhardt 液 ; 0.1 % 牛血清白蛋白、0.1 % 聚蔗糖、0.1 % 聚乙烯吡咯烷酮)。

[0113] 而且在其他的实施方式中, 本发明所涉及的多核苷酸优选是与上述 (c)、(d)、(e) 或 (f) 中的任一种多核苷酸在严谨条件下杂交的多核苷酸。

[0114] 另一实施方式中, 本发明所涉及的多核苷酸优选是上述多核苷酸的片段的寡核苷酸。

[0115] 本发明所涉及的多核苷酸或寡核苷酸不只是双链 DNA, 还包括构成它的正义链及反义链的各单链 DNA、RNA。本发明所涉及的多核苷酸或寡核苷酸, 可用作通过反义 RNA 的作用机制进行基因表达操作的工具。

[0116] 反义 RNA 技术的基本原理是导入生成与靶基因互补的 RNA 转录体的嵌合基因。其结果, 所得到的表现型是来自内源基因的基因产物的减少。通过导入本发明所涉及的多核苷酸或寡核苷酸, 使具有 ω3 脂肪酸去饱和活性的多肽的含量降低, 可降低生物中的 n-3 系列脂肪酸的含量, 同时可防止成为底物的脂肪酸含量的降低。

[0117] 因此, 例如希望生产如花生四烯酸的 n-6 脂肪酸时, 可通过使具有 ω3 脂肪酸去饱和活性的多肽的含量降低, 防止由 ω3 去饱和引起花生四烯酸含量的下降。DNA 中, 包括通过例如克隆、化学合成技术或其组合得到的 cDNA、基因组 DNA 等。并且本发明所涉及的多核苷酸或寡核苷酸也可包含非翻译区域 (UTR) 的序列、载体序列 (包含表达载体序列) 等的序列。

[0118] 也可通过 RNA 干涉 (RNAi) 抑制多肽的表达。RNAi 是指通过将双链 RNA 导入细胞内, 在细胞内部降解与该双链 RNA 序列同源的 mRNA, 从而使基因表达受到抑制现象。由于使用此方法也可使具有 ω3 脂肪酸去饱和活性的多肽含量降低, 所以可使生物中 n-3 系列脂肪酸的含量下降, 同时可防止成为底物的脂肪酸的含量下降。具体地说, 如果编码上述 (a)、(b) 多肽的多核苷酸及上述 (c) ~ (f) 的多核苷酸能同时在同一细胞内表达, 即可产生 RNAi, 因此可抑制多肽的表达。

[0119] 获得本发明所涉及的多核苷酸或寡核苷酸的方法, 可以通过公知的技术, 分离含有本发明所涉及的多核苷酸或寡核苷酸的 DNA 片段并进行克隆的方法。例如, 制备与本

发明的多核苷酸的一部分碱基序列特异性杂交的探针,可筛选基因组 DNA 文库、cDNA 文库。此种探针,只要是与本发明所涉及的多核苷酸的碱基序列或其互补序列的至少一部分特异性杂交的探针,任何序列及 / 或长度的探针均可使用。

[0120] 获得本发明所涉及的多核苷酸的方法,可以是使用 PCR 等扩增手段的方法。例如,分别从本发明多核苷酸的 cDNA 的 5' 端及 3' 端序列 (或其互补序列) 中制备引物,使用这些引物,以基因组 DNA (或 cDNA) 等为模板进行 PCR 等,通过扩增夹在两引物间的 DNA 区域,可大量获得含有本发明所涉及的多核苷酸的 DNA 片段。

[0121] 用于获得本发明所涉及的多核苷酸的供给源无特别限定,优选是不仅包括碳数 18 及 20 的 n-6 位具有不饱和键的脂肪酸,还包括这些脂肪酸的 ω 3 位发生去饱和的脂肪酸的生物材料。在本说明书中使用术语“生物材料”是指生物学样品 (从生物体获得的组织样品或细胞样品)。例如, α -亚麻酸由亚油酸经 ω 3 去饱和反应生成,十八碳四烯酸由 γ -亚麻酸经 ω 3 去饱和反应生成,20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$ 由二高- γ -亚麻酸经 ω 3 去饱和反应生成,二十碳五烯酸由花生四烯酸经 ω 3 去饱和反应生成,所以,例如只要是含有这些底物-生成物对的全部或一部分的生物材料,即可获得编码催化 n-3 系列脂肪酸合成反应的多肽的多核苷酸。后述实施例中,作为上述供给源使用 *Mortierella alpina*,但不限于此。

[0122] 本发明的目的在于,提供编码具有使碳数 18 及 / 或 20 的脂肪酸的 ω 3 位去饱和活性的多肽的多核苷酸及与该多核苷酸杂交的寡核苷酸,不在于本说明书中具体叙述的多核苷酸及寡核苷酸的制备方法等。因此,应该注意的是,通过上述各方法以外的方法获得的多核苷酸也属于本发明的技术范围,该多核苷酸编码具有使碳数 18 及 / 或 20 的脂肪酸的 ω 3 位去饱和活性的多肽。

[0123] (3) 抗体

[0124] 本发明提供与具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽特异性结合的抗体。在本说明书中使用术语“抗体”是指免疫球蛋白 [IgA、IgD、IgE、IgG、IgM 及这些的 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fc 片段],例如多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体、抗独特型抗体及人源抗体,但不限于此。本发明所涉及的抗体对选择表达具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的生物材料非常起作用。

[0125] “抗体”可根据各种公知的方法 [例如,HarLow 等、《Antibodies: A laboratory manual》、Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)、岩崎等《单克隆抗体杂交瘤和 ELISA》讲谈社 (1991)、日语原名;岩崎ら、「単クローン抗体ハイブリドーマと ELISA」、講談社 (1991)] 制备。

[0126] 肽抗体可根据该领域众所周知的方法制备。例如参照 Chow, M. 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910-914 及 Bittle, F. J. 等、J. Gen. Virol. 66:2347-2354 (1985) (本说明书中作为参考引用)。一般地,动物可用游离肽免疫。但是,抗肽抗体效价可通过与高分子载体 [例如,钥孔血蓝素 (KLH) 或破伤风类毒素] 偶联进行追加免疫。例如,含有半胱氨酸的肽可使用如 m-马来酰亚胺苯甲基 (maleimide benzoyl)-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (hydroxysuccinimide ester) (MBS) 的接头与载体偶联,另外,其他的肽可使用如戊二醛的更一般的交联剂与载体偶联。如兔、大鼠及小鼠的动物可用游离肽或与载体偶联的肽的任一种,例如可通过在腹腔内及 / 或皮内注射含有约 100 μ g 的肽或载体蛋白及 Freund 的佐剂的乳剂来进行免疫。例如为提供使用吸附于固体表面的游离肽、通过 ELISA 分析可检测

出的具有有效效价的抗肽抗体,一些追加免疫注射例如如需间隔约 2 星期。免疫动物血清中抗肽抗体的效价通过抗肽抗体的选择可增加,其抗肽抗体的选择,例如是根据该领域众所周知的方法,通过固体支持体上的肽吸附及选择后的抗体的洗脱。

[0127] 在本说明书中使用时,术语“与具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽特异性结合的抗体”包括可与具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽抗原特异性结合的完整的抗体分子及抗体片段[例如,Fab 及 $F(ab')_2$ 片段]。Fab 及 $F(ab')_2$ 片段欠缺完整抗体的 Fc 部分,通过循环进一步迅速地除去,且基本不具有完整抗体的组织的非特异性结合(Wahl 等、J. Nucl. Med. 24 :316-325(1983)(本说明书中作为参考引用)。因此,优选这些片段。

[0128] 可与具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的肽抗原结合的进一步的抗体,可通过使用抗独特型抗体用两个步骤产生。此种方法使用抗体其自身即是抗原的事实,因此,可获得与二次抗体结合的抗体。根据此方法,使用与具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽特异性结合的抗体免疫动物(优选小鼠)。然后,此种动物的脾细胞用于产生杂交瘤细胞,且筛选杂交瘤细胞是为了鉴定产生抗体的克隆,该抗体与和具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽特异性结合的抗体的结合能力,可被具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽抗原阻断。此种抗体包括与具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽特异性结合的抗体的抗独特型抗体,且可用于进一步诱导与具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽特异性结合的抗体的形成及用于免疫动物。

[0129] 已很明确,Fab 及 $F(ab')_2$ 以及本发明所涉及的抗体的其他片段可按照本说明书中公开的方法使用。此种片段可使用代表性的如木瓜蛋白酶(产生 Fab 片段)或胃蛋白酶[产生 $F(ab')_2$ 片段]的酶,通过蛋白质的分解,切割产生。或具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽结合片段,可通过重组 DNA 技术的适用或合成化学产生。

[0130] 如此可以说,本发明所涉及的抗体至少具备识别本发明所涉及的具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的抗体片段即可[例如,Fab 及 $F(ab')_2$ 片段]。即应注意的是,由识别本发明所涉及的具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的抗体片段和不同抗体分子的 Fc 片段组成的免疫球蛋白也包括在本发明内。

[0131] 也就是说,本发明的目的在于,提供识别本发明所涉及的具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的抗体,不在于本说明书中具体记载的各个免疫球蛋白的种类(IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM)、嵌合抗体的制备方法、肽抗原的制备方法等。因此,必须注意的是,通过上述各方法以外的方法获得的抗体也属于本发明的技术范围。

[0132] (4) 本发明所涉及的多肽及/或多核苷酸的利用

[0133] (4-1) 载体

[0134] 本发明提供用于生成具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽而使用的载体。本发明所涉及的载体可以是用于体外翻译的载体,也可以是用于重组表达的载体。

[0135] 本发明所涉及的载体只要含有上述本发明所涉及的多核苷酸,无特别限定。例如,可以是插入了编码具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸的 cDNA 的重组表达载体等。重组表达载体的制备方法可以使用质粒、噬菌体或黏粒等,无特别限定。

[0136] 载体的具体种类无特别限定,可适当选择在宿主细胞中可表达的载体。即选择与宿主细胞的种类相应的、确实使本发明所涉及的多核苷酸表达的适合的启动子序列,将其与本发明所涉及的多核苷酸整合进各种质粒等的载体,并可以此载体为表达载体使用。

[0137] 表达载体优选含有至少 1 个选择性标记。此种标记可使用抗生素抗性基因、经补

充了的营养缺陷型株的标记基因（即营养缺陷型标记）等。具体地说，例如，真核生物细胞培养可列举为二氢叶酸还原酶或新霉素抗性基因等，大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 及其他细菌中的培养可列举为四环素抗性基因或氨基青霉素抗性基因，但无特别限定。

[0138] 只要使用上述选择性标记，即可确认宿主细胞中是否导入了本发明所涉及的多核苷酸。也可将本发明所涉及的多肽作为融合多肽使其表达，例如，也可将来自 *Aequorea coerulescens* (Brandt) 的绿色荧光多肽 GFP (GreenFluorescent Protein) 作为标记使用，将本发明所涉及的多肽作为 GFP 融合多肽使其表达。由此可确认导入表达。

[0139] 在植物中表达时，使用重组表达载体的情况下，用于植物体转化的重组表达载体只要是在该植物内可使本发明所涉及的多核苷酸表达的载体，无特别限定。此种载体，例如可列举为具有在植物细胞内组成性表达多核苷酸的启动子（例如，花椰菜花叶病毒的 35S 启动子）的载体、或具有通过外界刺激被诱导活化的启动子的载体。

[0140] 因此可以说，本发明所涉及的载体至少含有编码本发明所涉及的多肽的多核苷酸即可。即应注意的是，表达载体以外的载体也包含于本发明的技术的范围。

[0141] 也就是说，本发明的目的在于，提供含有编码本发明所涉及的多肽的多核苷酸的载体，不在于本说明书中具体记载的各个载体种类及生物种、以及载体的制备方法及细胞导入方法。因此，必须注意的是，使用上述以外的载体种类及载体的制备方法获得的载体也属于本发明的技术范围。

[0142] (4-2) 宿主及转化方法

[0143] 上述宿主无特别限定，可优选使用以往公知的各种生物。具体地说，例如，可以是大肠杆菌 (*E. coli*) 等的细菌；酵母（出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe*）、丝状菌等的真菌；线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的卵母细胞；猪、大鼠、小鼠等的哺乳类；其他动物等，但无特别限定。用于上述宿主细胞的适当的培养培养基及条件是本领域众所周知的。

[0144] 本发明中成为转化对象的植物，可以指植物体全株、植物器官（例如叶、花瓣、茎、根、种子等）、植物组织（例如表皮、韧皮部、薄壁组织、木质部、维管束、栅状组织、海绵组织等）或植物培养细胞或各种形态的植物细胞（例如，悬浮培养细胞）、原生质体、叶片切片、愈伤组织等的任一个。用于转化的植物无特别限定，属于单子叶植物纲或双子叶植物纲的植物均可。

[0145] 将上述表达载体导入宿主细胞的方法即转化法也无特别限定，可优选使用电穿孔法、磷酸钙法、脂质体法、DEAE 葡聚糖法、醋酸锂法、粒子轰击法等以往公知的方法。例如，用昆虫转移表达本发明所涉及的多肽时，可利用使用了杆状病毒的表达系统。

[0146] 向植物内导入基因，可使用本领域技术人员公知的转化方法（例如，土壤杆菌法、基因枪法、PEG 法、电穿孔法等）。例如，土壤杆菌介导的方法和直接向植物细胞导入的方法是众所周知的。使用土壤杆菌法时，将构建的用于植物的表达载体导入适合的土壤杆菌 [例如，根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)]，此菌株根据叶盘法（内宫博文著，植物基因操作手册，1990，27-31pp，讲谈社 scientific，东京）（日语原名；内宫博文著，植物遺伝子操作マニュアル，1990，27-31pp，講談社サイエンティフィック，東京）等感染无菌培养叶片，可获得转化植物。还可使用 Nagel 等方法 (*Micribiol. Lett.*, 67, 325 (1990))。此方法是如下方法，首先例如将表达载体导入土壤杆菌，然后将转化的土壤杆菌用 Plant

Molecular Biology Manual (S. B. Gelvin 等, Academic Press Publishers) 中所述的方法导入植物细胞或植物组织。此处,“植物组织”包括通过植物细胞培养所得到的愈伤组织。使用土壤杆菌法进行转化时,可使用双元载体 (pBI121 或 pPZP202 等)。

[0147] 将基因直接导入植物细胞或植物组织的方法,已知有电穿孔法、基因枪法。使用基因枪时,可直接使用植物体、植物器官、植物组织自身,可在制备切片后使用,也可制备原生质体后使用。可将如此制备的样品使用基因导入装置 [例如 PDS-1000/He (BIO-RAD 公司) 等] 处理。处理条件因植物或样品的不同而不同,通常用 450 ~ 2000psi 左右的压力、4 ~ 12cm 左右的距离进行。

[0148] 导入了基因的细胞或植物组织,首先使用潮霉素抗性等的抗药性选择,其次用常规方法再生植物体。由转化细胞进行的植物体的再生,可用与植物细胞的种类相应的本领域技术人员公知的方法进行。

[0149] 将植物培养细胞作为宿主使用时,转化是将重组载体用基因枪、电穿孔法等导入培养细胞。转化结果的所得到的愈伤组织、茎、须根等可直接用于细胞培养、组织培养或器官培养,还可使用以往已知的植物组织培养法,通过添加适当浓度的植物激素 (生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸、乙烯、油菜素内酯等) 使植物体再生。

[0150] (4-3) 转化体

[0151] 本发明提供导入上述编码具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸的转化体。在此“转化体”不仅包括细胞、组织或器官,还包括生物个体。

[0152] 转化体的制备方法 (生产方法) 无特别限定,例如,可以是上述重组载体导入宿主后转化的方法。成为转化对象的生物也无特别限定,可是在上述宿主中举例的各种微生物、植物或动物。

[0153] 本发明所涉及的转化体的脂肪酸与天然存在的脂肪酸相比,其组成被改变。本发明所涉及的转化体优选是真菌 (酵母、丝状菌等)、植物或其后代、动物或来自这些的细胞或组织,所涉及的植物特别优选大豆、菜籽、芝麻、橄榄、亚麻籽、玉米、向日葵或红花。即本发明中用于转化的植物,可优选使用油脂制造用的栽培植物。

[0154] 通过将含有该多核苷酸的重组载体导入植物中,使该基因可表达,可获得含有编码本发明所涉及的多肽的多核苷酸的转化体。

[0155] 确认基因是否被导入,可通过 PCR 法、Southern 杂交法、Northern 杂交法等进行。例如,从转化体中制备 DNA,设计 DNA 特异性引物以进行 PCR。PCR 的条件可用与制备上述质粒所使用的条件同样的条件进行。之后,扩增产物可进行琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳或毛细管电泳等,用溴化乙锭、SYBR Green 液等染色,且通过检测扩增产物出现的 1 条扩增带,可确认进行了转化。使用预先用荧光色素等标记的引物进行 PCR,可检测扩增产物。而且也可采用在酶标板等的固相上结合扩增产物,通过荧光或酶反应等确认扩增产物的方法。

[0156] 一旦获得本发明所涉及的多核苷酸整合进基因组内的转化体,即可通过该生物体的有性生殖或无性生殖得到其后代。从该生物体或其后代、或这些的克隆中,例如为植物时可得到种子、果实、切穗、块茎、块根、植株、愈伤组织、原生质体等,以这些为基础可进行该植物体的量产。因此,本发明中也包括可表达地导入本发明所涉及的多核苷酸的生物体或与该生物体具有同一特性的该生物体的后代或来自它们的组织。

[0157] 如此可以说,本发明所涉及的转化体至少导入编码本发明所涉及的多肽的多核苷酸即可。即应该注意的是,通过重组表达载体以外的手段生成的转化体也包括在本发明的技术的范围内。

[0158] 也就是说,本发明的目的在于,提供以导入编码本发明所涉及的多肽的多核苷酸为特征的转化体,不在于本说明书中具体记载的各个载体种类及导入方法。因此,必须注意的是,使用上述以外的载体种类及生物种、以及载体制备方法及细胞导入方法获得的转化体也包括在本发明的技术的范围。

[0159] (4-4) 多肽的生产方法

[0160] 本发明提供生产本发明所涉及的多肽的方法。

[0161] 一种实施方式中,本发明所涉及的多肽的生产方法,其特征在于,使用含有编码本发明所涉及的多肽的多核苷酸的载体。

[0162] 本实施方式的一个方面,本实施方式中所涉及的多肽的生产方法优选将上述载体用于无细胞蛋白质合成系统。使用无细胞蛋白质合成系统时,可使用各种市售的试剂盒。优选本实施方式中涉及的多肽的生产方法包含培养上述载体和无细胞蛋白质合成液的工序。

[0163] 本实施方式的其他方面,本实施方式中所涉及的多肽的生产方法优选使用重组表达系统。使用重组表达系统时,可采用如下方法等,将本发明所涉及的多核苷酸整合进重组表达载体后,通过公知方法可表达地导入宿主,并纯化在宿主内翻译后得到的上述多肽。重组表达载体可以是质粒,也可以不是,只要能将目的多核苷酸导入宿主即可。本实施方式中涉及的多肽的生产方法优选包含将上述载体导入宿主的工序。

[0164] 如此在宿主中导入外源多核苷酸时,为使外源多核苷酸可表达,表达载体优选整合能在宿主中起作用的启动子。纯化重组产生的多肽的方法因使用的宿主、多肽的性质不同而不同,可通过标签(tag)的利用等比较容易地纯化目的多肽。

[0165] 本实施方式中所涉及的多肽的生产方法,优选进一步包含从含有本发明所涉及的多肽的细胞或组织的提取液中纯化该多肽的工序。纯化多肽的工序优选采用公知的方法(例如,破坏细胞或组织后离心分离,回收可溶性组分的方法),从细胞、组织中制备细胞提取液后,再从此细胞提取液中利用公知的方法(例如,硫酸铵沉淀或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水作用色谱法、亲和层析法、羟基磷灰石色谱法、及外源凝集素色谱法)纯化的工序,但不限于此。最优选使用高效液相色谱法("HPLC")进行纯化。

[0166] 另一实施方式中,本发明所涉及的多肽的生产方法,其特征在于,从天然表达本发明所涉及的多肽的细胞或组织中纯化该多肽。本实施方式中所涉及的多肽的生产方法,优选包含使用上述抗体或寡核苷酸,鉴定天然表达本发明所涉及的多肽的细胞或组织的工序。且本实施方式中所涉及的多肽的生产方法还优选进一步包含纯化上述多肽的工序。

[0167] 其他实施方式中,本发明所涉及的多肽的生产方法,其特征在于,化学合成本发明所涉及的多肽。本领域技术人员应容易理解,只要以本说明书中所述的本发明所涉及的多肽的氨基酸序列为基础,应用公知的化学合成技术,即可化学合成本发明所涉及的多肽。

[0168] 如上所述,根据生产本发明所涉及的多肽的方法而获得的多肽,可以是天然存在的突变多肽,也可以是人工制备的突变多肽。

[0169] 制备突变多肽的方法也无特别限定。例如,可通过使用利用定点诱变法[例如参

照 Hashimoto-Gotoh, Gene 152 :271-275(1995)]、PCR 法在碱基序列中导入点突变以制备突变多肽的方法、或通过插入转座子的突变株制备法等公知的突变多肽制备法,制备突变多肽。突变多肽的制备可利用市售的试剂盒。

[0170] 如此可以说,本发明所涉及的多肽的生产方法,至少使用以编码具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽的氨基酸序列、或具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽的多核苷酸的碱基序列为基础的公知常用技术即可。

[0171] 也就是说,本发明的目的在于,提供具有 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的多肽的生产方法,必须注意的是,包含上述各种工序以外的工序的生产方法也属于本发明的技术范围。

[0172] (4-5) 脂肪酸的生产方法

[0173] 本发明提供生产脂肪酸的方法,其使用表达本发明所涉及的多肽的生物体或细胞。上述生物体可以是天然的未经改变的生物体,也可以是使用重组表达系统的转化体。

[0174] 一种实施方式中,本发明所涉及的脂肪酸生产方法是使用用编码本发明所涉及的多肽的多核苷酸转化的生物体或其组织生产脂肪酸。优选上述生物体是真菌(酵母、丝状菌等)、植物或动物。

[0175] 本实施方式的优选部分,本发明所涉及的脂肪酸生产方法包含将编码本发明所涉及的多肽的多核苷酸导入上述生物体的工序。将多核苷酸导入上述生物体的工序可使用上述各种基因导入方法。本实施方式的此部分中,上述生物体在转化之前所产生的脂肪酸和转化后所产生的脂肪酸的组成不同。具体地说,从上述生物体得到的脂肪酸,例如 α -亚麻酸、十八碳四烯酸、 $20:4 \Delta^{8,11,14,17}$ 、二十碳五烯酸等的 n-3 系列脂肪酸的含有率增加。本实施方式的此部分的脂肪酸生产方法,优选进一步包含从上述生物体中提取脂肪酸的工序。

[0176] 例如,含有从如上所述的 α -亚麻酸、十八碳四烯酸、 $20:4 \Delta^{8,11,14,17}$ 、或 / 及二十碳五烯酸含量增加了的本发明所涉及的转化体中提取的脂肪酸的油,可作为 α -亚麻酸、十八碳四烯酸、 $20:4 \Delta^{8,11,14,17}$ 、或 / 及二十碳五烯酸含量高的食品提供。且为转化植物体时,不限于提取的脂肪酸,上述转化植物体的种子、果实、切穗、块茎及 / 或块根等也可作为富含 α -亚麻酸、十八碳四烯酸、 $20:4 \Delta^{8,11,14,17}$ 或 / 及二十碳五烯酸的食品提供。用于改变脂肪酸组成的对象无特别限定,也可将植物以外的动物、细菌、或真菌(酵母、丝状菌等)等所有的生物作为对象。

[0177] 其他实施方式中,本发明所涉及的脂肪酸生产方法,还包含在天然表达本发明所涉及的多肽的上述生物体中,以本发明所涉及的多核苷酸或寡核苷酸为反义核苷酸导入的工序。在上述生物体中导入多核苷酸或寡核苷酸的工序,可使用上述的反义 RNA 技术。另外也可使用前述的 RNAi 的技术。

[0178] 本实施方式中所涉及的脂肪酸生产方法,优选进一步包含使用上述抗体或寡核苷酸、鉴定天然表达本发明所涉及的多肽的上述生物体的工序。本实施方式此部分中涉及的脂肪酸生产方法,优选进一步包含从上述生物体中提取脂肪酸的工序。

[0179] 本实施方式中,上述生物体在导入上述多核苷酸或寡核苷酸之前产生的脂肪酸和导入后产生的脂肪酸的组成不同。具体地说,从上述生物体得到的脂肪酸,其天然产生的 α -亚麻酸、十八碳四烯酸、 $20:4 \Delta^{8,11,14,17}$ 、二十碳五烯酸等的 n-3 系列脂肪酸的含有率减少。且这些底物亚油酸、 γ -亚麻酸、二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸等含有率的减少程度降低了。

[0180] 如此可以说,本发明所涉及的脂肪酸的生产方法至少使用表达本发明所涉及的多肽的生物体即可。

[0181] 也就是说,本发明的目的在于,提供以通过本发明所涉及的多肽来改变脂肪酸组成的生物体为基础的脂肪酸生产方法,必须注意的是,使用上述生物体为动物、植物或各种微生物的生产方法也属于本发明的技术范围。

[0182] (4-6) 食品及工业产品

[0183] 本发明提供使用通过上述脂肪酸生产方法得到的脂肪酸制造的食品及工业产品。本项中所述的食物,例如上述转化体是植物时,可以是植物的种子、果实、切穗、块茎、及/或块根,也可以是使用从上述转化体中提取的脂肪酸制造的食物。上述转化体是微生物时,可以是该微生物本身,也可以是提取物等的加工物。并且,本发明的食物还可以是上述转化体的动物的肉或乳。

[0184] 工业产品中包括使用从上述转化体中提取的脂肪酸制造的食物添加剂、动物用饲料添加剂。如上所述,已知n-3系列PUFAs具有以EPA的抗血栓作用、改善血清脂质的作用、DHA的提高学习能力的作用、抗癌作用为代表的多种生理活性,是用于保持生物体恒常性的必需物质。但是,以人为代表的动物不能在体内合成n-3系列PUFAs,所以,经口摄取n-3系列PUFAs非常重要。因此,当从食物中摄取的n-3系列PUFAs不足时,期望用食物添加剂、动物用饲料添加剂补充。所以可将从上述转化体中提取的脂肪酸作为PUFAs用于上述目的。

[0185] 补充从上述转化体中提取的n-3系列PUFA时,不只是补充的PUFAs的含有率会增加,其下游代谢产物的含有率也会增加。例如,补充 α -亚麻酸时,不只使 α -亚麻酸的含有率增加,也可使二十二碳六烯酸(DHA)、前列腺素等的下游产物的含有率增加。二十二碳六烯酸是婴幼儿脑发育的必需物质,所以从上述转化体中提取的脂肪酸作为育儿用奶粉、育儿用的食物添加剂也非常有益。

[0186] (4-7) 检测器具

[0187] 本发明提供各种检测器具。本发明所涉及的检测器具是本发明所涉及的多核苷酸或片段固定在基板上、或本发明所涉及的多肽或抗体固定在基板上的检测器具,在各种条件下,可用于本发明所涉及的多核苷酸及多肽的表达模式的检测、测定等。

[0188] 在本说明书中使用时,术语“基板”意指可负载目的物(例如,多核苷酸、寡核苷酸、多肽或蛋白质)的物质,可与术语“支持体”互换使用。优选的基板(支持体)可列举为微球(例如,聚苯乙烯珠)、固相(例如,玻璃管、试剂条、聚苯乙烯制的微孔板或氨基结合型的微孔板)等,但不限于此。将目的物固定在上述基板上的方法可以是本领域技术人员众所周知的方法,例如Nature 357:519-520(1992)(本说明书中作为参考引用)中所述。

[0189] 一种实施方式中,本发明所涉及的检测器具,其特征在于,本发明所涉及的多核苷酸及/或寡核苷酸固定在基板上。本实施方式的优选部分中,本实施方式中涉及的检测器具是所谓的DNA芯片。在本说明书中使用时,术语“DNA芯片”是指将合成的寡核苷酸固定在基板上的合成型DNA芯片,但不限于此,还包含将PCR产物等的cDNA固定在基板上的粘贴型DNA微阵列。DNA芯片,例如,可以是将与本发明的基因特异性杂交的探针(即本发明所涉及的寡核苷酸)固定在基板(载体)上的DNA芯片。

[0190] 探针所使用的序列,可根据从cDNA的序列中特定特征性序列的公知的方法[例如可为SAGE法(Serial Analysis of Gene Expression法)(Science276:1268,1997;Cell 88:243,

1997 ;Science 270 :484,1995 ;Nature 389 :300,1997 ;美国专利第 5,695,937 号)等确定。

[0191] DNA 芯片的制造可采用公知的方法。例如,寡核苷酸,使用合成寡核苷酸时,可通过 fitriography 技术和固相法 DNA 合成技术的组合,在基板上合成寡核苷酸。另外,寡核苷酸使用 cDNA 时,可使用阵列机在基板上粘贴。

[0192] 例如,配置完全匹配探针(寡核苷酸)和该完全匹配探针中一个碱基被取代的错配探针,可更加提高多核苷酸的检测精度。而且,为同时检测不同的多核苷酸,也可将多种寡核苷酸固定在同一基板上制成 DNA 芯片。

[0193] 用于本实施方式中涉及的检测器具的基板的材质,只要是能稳定固定多核苷酸或寡核苷酸的材质均可。上述基板以外,例如还可列举为聚碳酸酯、塑料等的合成树脂、玻璃等,但不限于此。基板的形态也无特别限定,例如,可优选使用板状、膜状等的基板。本实施方式的优选部分中,本实施方式中所涉及的检测器具可将各种生物或其组织或细胞中制备的 cDNA 文库用于目标样品检测。

[0194] 其他的实施方式中,本发明所涉及的检测器具,其特征在于,本发明所涉及的多肽或抗体固定在基板上。本实施方式的优选部分中,本实施方式中所涉及的检测器具是所谓的蛋白质芯片。

[0195] 用于本实施方式中所涉及的检测器具的基板的材质,只要是可稳定固定多肽或抗体的材质均可。上述基板以外,例如还可列举为聚碳酸酯、塑料等的合成树脂、玻璃等,但不限于此。基板的形态也无特别限定,例如,可优选使用板状、膜状等的基板。

[0196] 上述方法以外的将多肽或抗体固定在基板上的方法,例如,在硝酸纤维素膜、PDVF 膜上将多肽、抗体按照斑点印迹法的要领点样的物理吸附法、或为了减轻多肽、抗体的变性,在载玻片上结合聚丙烯酰胺凝胶垫,然后在其上将多肽、抗体点样的方法。不仅要使多肽、抗体吸附于基板表面,还要使其牢固结合,也可使用利用了醛基修饰玻片的方法(G. MacBeath, S. L. Schreiber, Science, 289, 1760 (2000))。在使基板上多肽的取向一致后固定的方法,可使用通过寡聚组氨酸标签,向用镍络合物进行了表面修饰的基板固定的方法(H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, Science, 293, 2101 (2001))。

[0197] 本实施方式的优选部分中,本实施方式中所涉及的检测器具可将各种生物或其组织或细胞中的提取液作为目标样品用于检测。

[0198] 如此可以说,本发明所涉及的检测器具至少是本发明所涉及的多核苷酸或寡核苷酸、或本发明所涉及的多肽或与该多肽结合的抗体固定在支持体上的检测器具。也可以说,本发明所涉及的检测器具只要具备固定本发明所涉及的多核苷酸或寡核苷酸、或本发明所涉及的多肽或与该多肽结合的抗体的基板即可。即应该注意的是,具备这些支持体(包括基板)以外的构成材料时也包括在本发明的技术范围内。

[0199] 也就是说,本发明的目的在于,提供检测本发明所涉及的多肽或本发明所涉及的多核苷酸、或与本发明所涉及的抗体结合的多肽的器具,不在于本说明书中具体记载的各个支持体的种类、固定化方法。因此,必须注意的是,包含上述支持体以外的构成材料的检测器具也属于本发明的技术范围。

[0200] 实施例

[0201] (实施例 1:通过 PCR 的 ω 3 脂肪酸去饱和酶的部分序列的克隆)

[0202] 比较 *Mortierella alpina* 及 *Saccharomyces kluyveri* 的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶以及 *S. kluyveri* 的 ω 3 脂肪酸去饱和酶的推测氨基酸序列,设计对应于同源性高的氨基酸序列的引物。图 1 表示 *M. alpina* 及 *S. kluyveri* 的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶以及 *S. kluyveri* 的 ω 3 脂肪酸去饱和酶的推测氨基酸序列。图中,上行表示 *M. alpina* 的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶的推测氨基酸序列(序列号:10),中行表示 *S. kluyveri* 的 ω 3 脂肪酸去饱和酶的推测氨基酸序列(序列号:11),下行表示 *S. kluyveri* 的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶的推测氨基酸序列(序列号:12)。设计引物 ω 3-F1 及 ω 3-R1,该引物由对应于图中用下划线表示的同源性高的氨基酸序列的简并寡核苷酸组成。

[0203] ω 3-F1(对应的氨基酸序列:WVLAHECGH,引物为正向)

[0204] 5'-TGGGTIYTBGCICAYGARTGYGGHCA-3'(序列号:4)

[0205] ω 3-R1(对应的氨基酸序列:TFLQHTDPK,引物为反向)

[0206] 5'-TTIGGRTICIGTRTGYTGVARAAIGT-3'(序列号:5)

[0207] 在上述引物的碱基序列中,“I”表示肌苷,“Y”表示 T(胸腺嘧啶)或 C(胞嘧啶),“B”表示 G(鸟嘌呤)、C 或 T,“R”表示 G 或 A(腺嘌呤),“H”表示 A、C 或 T,“V”表示 A、G 或 C。且上述“I”在序列号:4 及序列号:5 中用“n”表示。

[0208] *M. alpina*(1S-4 株)的基因组 DNA,可根据 Sakuradani et al. 1999a, Δ^9 -Fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing fungus. Unique gene sequence and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. Eur J Biochem 260:208-216 的方法制备。

[0209] 以得到的 *M. alpina* 的基因组 DNA 为模板,使用上述引物 ω 3-F1 及 ω 3-R1 进行 PCR。PCR 使用 ExTaq(TAKARA BIO),进行 94°C 3 分钟、(94°C 1 分钟、55°C 1 分钟、72°C 1 分钟)30 个循环、72°C 10 分钟的反应。PCR 反应使用含有 1 μ g 基因组 DNA、0.25 μ l Takara Ex Taq 聚合酶(TAKARA BIO)、5 μ l 10 $\times$ Ex Taq buffer、各 200 μ M 的 dNTP、各 200 pmol 的引物的全容积 50 μ l 的反应混合液进行。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳时,可确认出 1 条约 600bp 的片段。

[0210] 此 PCR 条件,因以 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶基因为模板扩增的 DNA 片段也为约 600bp,所以认为此 DNA 片段中,来自 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因的序列和来自 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶基因的片段混合存在。因此,用限制性内切酶 KpnI 酶切此 DNA 片段,该酶只切割碱基序列已很明确的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶基因中的 1 处,然后再次进行琼脂糖凝胶电泳。其结果,得到原本大小的 DNA 片段及比其短的 2 个片段,表明 PCR 产物中混合存在着来自 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶的 DNA 片段和与其不同的 DNA 片段。

[0211] 因此,纯化 PCR 产物中用 KpnI 未能酶切的片段,将其通过 ligation high(东洋纺社制)(東洋紡社製)与 pT7Blue T-vector(Novagen 公司制)连接(以后的 TA cloning 也均同样进行)。碱基序列的分析用 ABI3100(美国应用生物系统公司制)进行。同源性检索用 blastx、针对 GenBank 中注册的氨基酸序列进行。其结果,显示出与来自 *M. alpina*(1S-4 株)的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶基因有最高的同源性,该区域的碱基序列的同一性为 57%。

[0212] (实施例 2: ω 3 脂肪酸去饱和酶基因组 DNA 序列的确定)

[0213] 根据所得到的约 600bp 的碱基序列设计以下引物,进行 Inverse PCR(反向 PCR)。

[0214] ω 3-IPCRR2

[0215] 5'-GACCCATCCAAAGATGGTGTGATC-3' (序列号:6)

[0216] ω 3-IPCRF2

[0217] 5'-GACTGTCTTCATGTACTATGGCATC-3' (序列号:7)

[0218] 首先,将由 *Mortierella alpine* 制备的基因组 DNA 用 EcoRI 完全酶切,通过 ligation high(东洋纺社制)在 15°C 反应一夜,通过自连闭环。以其为模板,使用上述引物 ω 3-IPCRF2 及 ω 3-IPCRR2 进行 PCR。PCR 的反应混合物除模板浓度为 50ng/ μ l 以外,均与实施例 1 相同。PCR 使用 ExTaq(TAKARA BIO),进行 94°C 3 分钟、(94°C 1 分钟、60°C 2 分钟、72°C 3 分钟)35 个循环、72°C 15 分钟的反应。

[0219] 使用与实施例 1 同样的方法,所得到的 3-4kb 的 DNA 片段 TA 克隆到载体 pT7Blue T-vector(Novagen 公司制)中,从插入的约 4kb 的片段两端确定各自数百 bp 的碱基序列,再与之前得到的部分序列连接。此碱基序列如序列号:2 所示。从与同源序列的比较和起始密码子、终止密码子的出现等,推测 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因的编码区域。编码区域为 14~1366,有 1 处存在内含子。

[0220] (实施例 3: ω 3 脂肪酸去饱和酶 cDNA 的克隆)

[0221] 已很清楚 ω 3 脂肪酸去饱和酶通过低温培养表达活性。因此,首先将 *M. alpina*(1S-4 株)在 GY 液体培养基中 28°C、培养 7 日后,12°C、培养 2 日,回收菌体。根据 Sakuradani et al.1999a, Δ^9 -Fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing fungus. Unique gene sequence and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. Eur J Biochem 260:208-216 的方法提取全 RNA。将 1 μ g 的全 RNA 使用 1st-Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMV)(Roche Diagnostics Corporation 公司),以 6 碱基随机引物为引物进行反转录反应,合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,使用以下引物 ω 3-ExF3 及 ω 3-ExR3 进行 PCR。PCR 反应使用含有 1 μ g 模板 cDNA、0.25 μ l Takara LA Taq 聚合酶(TAKARA BIO)、5 μ l 10 $\times$ LA Taq buffer、2mM MgCl₂、各 200 μ M 的 dNTP、各 100pmol 的引物的全容积 50 μ l 的反应混合液进行。且 PCR 的反应条件使用 94°C 3 分钟、(94°C 1 分钟、60°C 2 分钟、72°C 3 分钟)35 个循环、72°C 15 分钟。

[0222] ω 3-ExF3:5'-CAGAGTCATAaagcttAAatgGCCCCCCT-3' (序列号:8)

[0223] ω 3-ExR3:5'-GACgcatgcCGTATTCAAATTGttaTTAATGC-3' (序列号:9)

[0224] 引物 ω 3-ExF3 含有 ATG 起始位点(序列中用小写字母表示)、和 HindIII 克隆位点 aagctt(序列中用小写字母表示)。引物 ω 3-ExR3 含有 TAA 终止位点(序列中用小写字母表示)、和 SphI 克隆位点 gcatgc(序列中用小写字母表示)。

[0225] 用与实施例 1 中所述方法同样的方法,将所得到的 DNA 片段 TA 克隆到载体 pT7Blue T-vector(Novagen 公司制)中,确定碱基序列。确定的 cDNA 的碱基序列如序列号:3 所示。cDNA 的碱基序列与由上述实施例 2 确定的基因组 DNA 碱基序列(序列号:2)的 14 位碱基到 343 位碱基的 330bp、及 485 位碱基到 1366 位碱基的 882bp 组成的 1212bp 一致。由此可知,序列号:2 所示的碱基序列的 14 位碱基到 1366 位碱基的 1353bp 是 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因,且此基因含有由序列号:2 所示的碱基序列的 345 位碱基到 485 位碱基的 141bp 组成的内含子,编码 403 个氨基酸。

[0226] 比较由此 cDNA 编码的氨基酸序列与至今为止已知的其他生物种的 ω 3 脂肪酸去

饱和酶、及 *M. alpina* 的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列。图 2 中从上行开始顺序为：*M. alpina* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶（图中表示为“MAW3”，序列号：1）、*M. alpina* 的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶（图中表示为“Mor- Δ^{12} ”，序列号：10）、*S. kluyveri* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶（图中表示为“Sac $\omega 3$ ”，序列号：11）、大豆内质网中局部存在的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶（图中表示为“Soybean $\omega 3$ (ER)”，序列号：13）、大豆叶绿体中局部存在的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶（图中表示为“Soybean $\omega 3$ (Chl)”，序列号：14）的氨基酸序列。*M. alpina* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列与 *M. alpina* 的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶、*S. kluyveri* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶、大豆内质网中局部存在的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶、大豆叶绿体中局部存在的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列分别具有 51%、36%、34%、32% 的同一性。如图 2 所示，可知即使 *M. alpina* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶与 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶中 *S. kluyveri* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列最相似，也只不过显示出 36% 的较低的同一性。由此可知，与其说 *M. alpina* 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶与至今为止已知的其它生物种的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列相似，不如说与 *M. alpina* 自身的 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶的氨基酸序列更相似。

[0227] （实施例 4： $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因表达载体的构建）

[0228] 构建使所得到的来自 *M. alpina* (1S-4 株) 的 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的 cDNA 在酵母中表达的表达载体。

[0229] 将在实施例 3 中得到的 DNA 片段用 HindIII-SphI 处理后，与酵母表达载体 pYES2 (Invitrogen 公司制) 的 HindIII-SphI 位点连接，构建质粒 pYMAW3。此 pYMAW3 在 pYES2 的 HindIII-SphI 位点整合 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的全长 1212bp 的 cDNA。

[0230] （实施例 5：使用表达载体的酵母的转化）

[0231] 用此质粒 pYMAW3 转化酵母 *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen 公司)，获得转化体 $\omega 3$ -1 及 $\omega 3$ -2。转化根据 Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K., (1994) Transformation by electroporation. In Current protocols in Molecular Biology. pp. 13.7.5.-13.7.7., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York 的方法使用电穿孔法进行。转化体的选择以色氨酸营养缺陷型为指标，使用 YNBD (-Trp) 培养基进行。

[0232] （实施例 6： $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因的表达和功能分析）

[0233] 首先，将含有棉子糖 2% (Difco)、多聚蛋白胨 2% (Daigo)、酵母浸膏 1% (Difco) 的液体培养基高压灭菌后，作为可检测 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的底物，准备分别添加 0.1% (v/w) n-6 系列脂肪酸的亚油酸 (LA; 18:2 $\Delta^{9,12}$)、n-6 系列脂肪酸的 γ -亚麻酸 (GLA; 18:3 $\Delta^{6,9,12}$)、n-6 系列脂肪酸的二高- γ -亚麻酸 (DGLA; 20:3 $\Delta^{8,11,14}$) 或 n-6 系列脂肪酸的花生四烯酸 (AA 或 ARA; 20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$) 的甲酯的底物。在各自的培养基中接种 1 白金耳转化株，在 28°C、300rpm、振荡培养 24 小时。且作为对照，使用含有未经改变的 pYES2 载体的酵母 INVSC1。

[0234] 之后，为使 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因表达，在培养基中添加半乳糖，使最终浓度为 2%，然后在 28°C、309rpm、振荡培养 48 小时。

[0235] （实施例 7： $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性的检测）

[0236] 为检测 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和活性，进行全细胞脂肪酸分析。脂肪酸分析按照 Sakuradani et al. 1999a, Δ^9 -Fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing

fungus.Unique gene sequence and its heterologousexpression in a fungus, Aspergillus.Eur J Biochem 260 :208-216 的方法进行。

[0237] 通过离心回收酵母细胞,用蒸馏水洗涤后在 100℃下干燥。干燥后的细胞加入含有 10%氯化氢的甲醇,在 50℃下放置 3 小时,直接使甲基转移。如此,通过盐酸甲醇法,将菌体细胞内的脂肪酸残基衍生为甲酯后,用己烷提取,将馏去己烷后所得到的脂肪酸甲酯用气相色谱法分析。

[0238] 结果如下表 1 所示。且表中用“pYES2”表示的菌株,表示含有未经改变的 pYES2 载体的对照株,“ ω 3-1”、“ ω 3-2”表示使用不同的转化株进行的 2 次独立实验。“底物(%)”表示被检测的全脂肪酸中底物[例如,n-6 系列脂肪酸的亚油酸(LA ;18:2 $\Delta^{9,12}$)]的摩尔组成。“生成物(%)”表示被检测的全脂肪酸中 ω 3 去饱和生成物(例如,底物为 LA 时,n-3 系列脂肪酸是 α -亚麻酸(ALA ;18:3 $\Delta^{9,12,15}$)的摩尔组成。另外,“转化率(%)”使用 $\{(\text{生成物}(\%)/(\text{底物}(\%)+\text{生成物}(\%)))\} \times 100$ 算出。且含有未经改变的 pYES2 载体的对照株中,作为底物添加的脂肪酸也完全未改变。

[0239] (表 1)

[0240]

菌株	底物	底物 (%)	生成物	生成物 (%)	转化率 (%)
pYES2	18:2n-6	13.2	18:3n-3	0.0	0
	18:3n-6	19.4	18:4n-3	0.0	0
	20:3n-6	7.0	20:4n-3	0.0	0
	20:4n-6	8.3	20:5n-3	0.0	0
ω 3-1	18:2n-6	10.8	18:3n-3	1.4	11.6
	18:3n-6	17.3	18:4n-3	1.9	9.8
	20:3n-6	5.8	20:4n-3	0.3	5.4
	20:4n-6	3.9	20:5n-3	0.4	9.1
ω 3-2	18:2n-6	9.3	18:3n-3	1.9	16.9
	18:3n-6	10.3	18:4n-3	2.6	20.1
	20:3n-6	7.1	20:4n-3	0.3	4.2
	20:4n-6	9.0	20:5n-3	0.2	2.4

[0241] 如表 1 所示,可确认,在酵母中表达来自 M. alpina(1S-4 株)的 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因时,可使添加的全部种类的碳数 18 及 20 的 n-6 系列脂肪酸的 ω 3 位去饱和,从而生成 n-3 系列脂肪酸。即 n-6 系列脂肪酸的亚油酸(LA ;18:2 $\Delta^{9,12}$)转化为 n-3 系列脂肪酸的 α -亚麻酸(ALA ;18:3 $\Delta^{9,12,15}$),n-6 系列脂肪酸的 γ -亚麻酸(GLA ;18:3 $\Delta^{6,9,12}$)转化为 n-3 系列脂肪酸的十八碳四烯酸(18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$),n-6 系列脂肪酸的二高- γ -亚麻酸(DGLA ;20:3 $\Delta^{8,11,14}$ 转化为 n-3 系列脂肪酸的 20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$,n-6 系列脂肪酸的花生四烯酸(AA 或 ARA ;20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$)转化为 n-3 系列脂肪酸的二十碳五烯酸(EPA ;20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$)。从未能检测出其他的新型脂肪酸可判断,此 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因不具有 Δ^{12} 脂肪酸去饱和活性、 Δ^6 脂肪酸去饱和活性及 / 或 Δ^5 脂肪酸去饱和活性。

[0242] 如表 1 所示,来自 M. alpina(1S-4 株)的 ω 3 脂肪酸去饱和酶可使碳数 18 及 20

的 n-6 系列脂肪酸的 ω 3 位去饱和,与碳数 20 的 n-6 系列脂肪酸相比,可使碳数 18 的 n-6 系列脂肪酸的 ω 3 位更高效地去饱和。

[0243] 图 3~图 6 表示通过气相色谱法的脂肪酸分析的结果。图 3 表示添加亚油酸时的分析结果,图 4 表示添加 γ -亚麻酸时的分析结果,图 5 表示添加二高- γ -亚麻酸时的分析结果,图 6 表示添加花生四烯酸时的分析结果。从这些图中可确认, ω 3 脂肪酸去饱和酶基因进行了表达的酵母细胞中,有添加的 n-6 系列脂肪酸的 ω 3 位发生去饱和后生成的 n-3 系列脂肪酸的新型色谱峰。且在同一图中所示的对照株的分析结果中未发现其色谱峰。有新型色谱峰的脂肪酸酯,由通过与其标准物质的保留时间比较及 GLC-MS 分析所得到的分子离子峰及片段模式鉴定。

[0244] (实施例 8:酵母在低温条件下的 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因的表达和功能分析)

[0245] 使用实施例 4 中得到的质粒 pYMAW3 转化酵母 INVSC1 (Invitrogen 公司),使用转化体 ω 3-1,在低温条件下使 ω 3 脂肪酸去饱和酶基因表达。

[0246] 将棉子糖 2% (Difco)、多聚蛋白胨 2% (Daigo)、酵母浸膏 1% (Difco) 的液体培养基高压灭菌后,添加 0.05% (v/w) 与实施例 6 同样的底物。在各自的培养基中接种 1 白金耳转化株,在 28°C、300rpm、振荡培养 24 小时。之后在培养基中添加半乳糖,使最终浓度为 2%,再用 20°C 或 12°C、300rpm、振荡培养 48 小时。

[0247] 对照、脂肪酸甲酯的分析与实施例 5 相同。结果如下表 2 所示。表中虽未显示,但使用未经改变的 pYES2 载体转化的对照株中,在任一温度下,作为底物添加的脂肪酸也均未改变。“底物(%)”、“生成物(%)”、“转化率(%)”见实施例 7 的说明。

[0248] (表 2)

反应温度	转化率 (%)			
	18:2 n-6→	18:3 n-6→	20:3 n-6→	20:4 n-6→
	18:3 n-3	18:4 n-3	20:4 n-3	20:5 n-3
28°C	2.3	7.8	2.4	2.1
20°C	19.0	30.9	8.7	4.6
12°C	30.1	45.9	19.8	14.7

[0250] 如表 2 所示,可确认即使加入任一底物,在 20°C 或 12°C 的低温条件下均比 28°C 时的转化率高数倍。从中可知,来自 *M. alpina* (1S-4 株) 的 ω 3 脂肪酸去饱和酶是在低温下更高效地发挥作用的酶。

[0251] 本发明不限于上述实施方式,可在权利要求所示的范围内进行种种变更。即在权利要求所示范围内,组合使用适当改变的技术手段后所获得的实施方式也包括在本发明的技术范围内。

[0252] 综上所述,本发明所涉及的多肽及多核苷酸对 n-3 系列脂肪酸的生产起作用。且可表达地导入本发明所涉及的多核苷酸的转化体或细胞,在食品领域、各种工业领域中,在生产 n-3 系列脂肪酸或使用这些的产品上极为起作用。特别是上述转化体是植物体时,因可将植物体自身作为食品使用,所以在农业领域等也非常起作用。

序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 三得利株式会社 (SUNTORY LIMITED)

<120> 具有 ω 3 脂肪酸去饱和活性的多肽及编码其多肽的多核苷酸及多肽和多核苷酸的利用

(Polypeptide with desaturating activity for omega 3-fatty acid,
polynucleotide encoding the polypeptide,
and use of the polypeptide and Polynucleotide)

<130>G06-0116CN

<140>PCT/JP2005/015497

<141>2005-08-19

<150>JP 2004-241671

<151>2004-08-20

<160>14

<170>PatentIn Ver. 2.1

<210>1

<211>403

<212>PRT

<213> 高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)

<400>1

```

Met Ala Pro Pro His Val Val Asp Glu Gln Val Arg Arg Arg Ile Val
1           5           10           15
Val Glu Asp Glu Ile Lys Ser Lys Lys Gln Phe Glu Arg Asn Tyr Val
20           25           30
Pro Met Asp Phe Thr Ile Lys Glu Ile Arg Asp Ala Ile Pro Ala His
35           40           45
Leu Phe Ile Arg Asp Thr Thr Lys Ser Ile Leu His Val Val Lys Asp
50           55           60
Leu Val Thr Ile Ala Ile Val Phe Tyr Cys Ala Thr Phe Ile Glu Thr
65           70           75           80

```

Leu Pro Ser Leu Ala Leu Arg Val Pro Ala Trp Ile Thr Tyr Trp Ile		
85	90	95
Ile Gln Gly Thr Val Met Val Gly Pro Trp Ile Leu Ala His Glu Cys		
100	105	110
Gly His Gly Ala Phe Ser Asp Ser Lys Thr Ile Asn Thr Ile Phe Gly		
115	120	125
Trp Val Leu His Ser Ala Leu Leu Val Pro Tyr Gln Ala Trp Ala Met		
130	135	140
Ser His Ser Lys His His Lys Gly Thr Gly Ser Met Thr Lys Asp Val		
145	150	155
Val Phe Ile Pro Ala Thr Arg Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Ala Leu Glu		
165	170	175
Lys Pro Ala Val Glu Glu Glu Val Ser Glu Gln Glu His His His His		
180	185	190
Glu Glu Ser Ile Phe Ala Glu Thr Pro Ile Tyr Thr Leu Gly Ala Leu		
195	200	205
Leu Phe Val Leu Thr Phe Gly Trp Pro Leu Tyr Leu Ile Val Asn Phe		
210	215	220
Ser Gly His Glu Ala Pro His Trp Val Asn His Phe Gln Thr Val Ala		
225	230	235
Pro Leu Tyr Glu Pro His Gln Arg Lys Asn Ile Phe Tyr Ser Asn Cys		
245	250	255
Gly Ile Val Ala Met Gly Ser Ile Leu Thr Tyr Leu Ser Met Val Phe		
260	265	270
Ser Pro Leu Thr Val Phe Met Tyr Tyr Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Val		
275	280	285
Asn Ala Trp Ile Val Cys Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr Asp Pro Lys		
290	295	300
Val Pro Hi Phe Arg Asp Asn Glu Trp Asn Phe Gln Arg Gly Ala Ala		
305	310	315
Cys Thr Ile Asp Arg Ser Phe Gly Thr Ile Val Asn His Leu His His		
325	330	335
His Ile Gly Asp Ser His Gln Cys His His Met Phe Ser Gln Met Pro		
340	345	350
Phe Tyr Asn Ala Val Glu Ala Thr Lys Tyr Leu Lys Ala Lys Leu Gly		
355	360	365
Lys Tyr Tyr Ile Phe Asp Asp Thr Pro Ile Ala Lys Ala Leu Tyr Arg		
370	375	380
Asn Trp Arg Glu Cys Lys Phe Val Glu Asp Glu Gly Asp Val Val Phe		

385	390	395	400
Tyr Lys His			
<210>2			
<211>1381			
<212>DNA			
<213> 高山被孢霉 (<i>Mortierella alpina</i>)			
<400>2			
tcataccgag aaaatggccc cccctcacgt tgtcgacgaa caagttcgac gcaggatcgt	60		
cgttgaggac gagatcaagt ctaagaagca atttgagcgc aactatgtgc ccatggactt	120		
tacgattaag gagattcgag atgcgatccc tgcccacctc ttcatccgtg ataccacaaa	180		
gtcgatcctg catgtcgtca aggatctggg caccatcgcc atcgtctttt actgtgcaac	240		
cttcattgag actctgccct cgctcgctct gcgagttcct gcctggatca cctactggat	300		
catccaagga actgtcatgg tcggccccctg gatcttggct catggtaagg aaacgaaaaa	360		
tcccatgtgt atttctgtac tacagaaggc gaagtttgta cctgaaaaga tcagcgtcgt	420		
cccttgattt agaatgtaac taaccttgca atcgatgac ctaaattttc ttgtgtcaac	480		
gacagagtgc ggccacggag ctttctcgga tagcaagacg atcaacacca tctttggatg	540		
ggtcctccac tctgtctttt tggcgcctta ccaggcctgg gctatgtcac actccaagca	600		
tcacaagggt actggatcga tgaccaaaaga tgtcgttttc atccctgcca ctcgttccta	660		
caagggcctc ccagcactgg agaagcctgc cgtcgaagag gaggtttcgg agcaggaaca	720		
ccaccaccac gaggagtcca tctttgccga aactcccatc tacacgctcg gagcgctttt	780		
gttcgtcttg acctteggat ggcccttgta cttgatcgtc aacttttcag gacacgaggc	840		
ccctcactgg gtcaaccatt tccagactgt cgctcctctc tatgagcctc accagcgcaa	900		
gaacatcttc tactccaact gcggcattgt cgccatgggt tcgatcttga cttacctttc	960		
gatggtcttc tcgcccttga ctgtcttcat gtactatggc atcccttacc tcggagtcaa	1020		
cgcctggatc gtctgcatta cctatctcca gcacaccgat cccaaggtgc ctcaactccg	1080		
tgataacgag tggaacttcc agcgcgggtgc tgccctgact atcgaccgat cttcgggtac	1140		
catcgtgaac cacctgcacc accacattgg cgactctcac cagtgccacc atatgttctc	1200		
gcagatgccc ttctacaatg ctgtggaggc tacaaagtac ttgaaggcca aacttggcaa	1260		
gtactacata tttagacgaca cgcccattgc caaagccctc taccgcaatt ggagagagtg	1320		
caaattcgtg gaggacgagg gagatgtagt gttttacaag cattaacaat ttgaatacga	1380		
a	1381		

<210>3

<211>1212

<212>DNA

<213> 高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)

<400>3

```

atggccccc ctcacgttgt cgacgaacaa gttcgacgca ggatcgtcgt tgaggacgag 60
atcaagtcta agaagcaatt tgagcgcaac tatgtgcca tggactttac gattaaggag 120
attcgagatg cgatccctgc ccacctcttc atccgtgata ccacaaagtc gatcctgcat 180
gtcgtcaagg atctggtcac categccate gtcttttact gtgcaacctt cattgagact 240
ctgccctcgc tcgctctgcg agttcctgcc tggatcacct actggatcat ccaaggaact 300
gtcatggtcg gcccctggat cttggctcat gagtgcggcc acggagcttt ctcggatagc 360
aagacgatca acaccatctt tggatgggtc ctccactctg ctcttttggg gccctaccag 420
gcctgggcta tgtcacactc caagcatcac aagggtactg gatcgatgac caaagatgac 480
gttttcatcc ctgccactcg ttctacaag ggccctcccag cactggagaa gcctgccgtc 540
gaagaggagg ttccggagca ggaacaccac caccacgagg agtccatctt tgccgaaact 600
cccatctaca cgctcggagc gcttttgttc gtcttgacct tcggatggcc cttgtacttg 660
atcgtcaact ttccaggaca cgaggccct cactgggtca accatttcca gactgtcgtc 720
cctctctatg agcctcacca gcgcaagaac atcttctact ccaactgcgg cattgtcgcc 780
atgggttcga tcttgactta ctttctgatg gtcttctcgc ccttgactgt cttcatgtac 840
tatggcatcc cttacctcgg agtcaacgcc tggatcgtct gcattaccta tctccagcac 900
accgatccca aggtgcctca ctcccgatg aacgagtgga acttecagcg cgggtgctgcc 960
tgcactatcg accgatcctt cggtaccatc gtgaaccacc tgcaccacca cattggcgac 1020
tctcaccagt gccaccatat gttctcgcag atgcccttct acaatgctgt ggaggctaca 1080
aagtacttga aggccaaact tggcaagtac tacatatattg acgacacgcc cattgccaaa 1140
gccctctacc gcaattggag agagtgc aaa ttcgtggagg acgagggaga tgtagtgttt 1200
tacaagcatt aa 1212

```

<210>4

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述 :人工合成的引物序列

(Description of Artificial Sequence:Artificially Synthesized Primer Sequence)

<220>

<221> 修饰碱基 (Modified base)

<222>6

<223>n 是肌苷 (n is inosine)

<220>

<221> 修饰碱基 (Modified base)

<222>12	
<223>n 是肌苷 (n is inosine)	
<400>4	
tgggtntybtg cncaygartg ygghca	26
<210>5	
<211>26	
<212>DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :人工合成的引物序列 (Description of Artificial Sequence :Artificially Synthesized Primer Sequence)	
<220>	
<221> 修饰碱基 (Modified base)	
<222>3	
<223>n 是肌苷 (n is inosine)	
<220>	
<221> 修饰碱基 (Modified base)	
<222>9	
<223>n 是肌苷 (n is inosine)	
<220>	
<221> 修饰碱基 (Modified base)	
<222>14	
<223>n 是肌苷 (n is inosine)	
<400>5	
ttnggrtcng trtgytgvar raangt	26
<210>6	
<211>25	
<212>DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :人工合成的引物序列	

(Description of Artificial Sequence :Artificially Synthesized Primer Sequence)

<400>6

gacccatcca aagatggtgt tgate

25

<210>7

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述 :人工合成的引物序列

(Description of Artificial Sequence :Artificially Synthesized Primer Sequence)

<400>7

gactgtcttc atgtactatg gcatc

25

<210>8

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述 :人工合成的引物序列

(Description of Artificial Sequence :Artificially Synthesized Primer Sequence)

<400>8

cagagtcata aagcttaa at ggccccccct

30

<210>9

<211>29

<212>DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述 :人工合成的引物序列

(Description of Artificial Sequence :Artificially Synthesized Primer

Sequence)

<400>9

gacgcatgcc gtattcaaat tgттаатgc

29

<210>10

<211>400

<212>PRT

<213> 高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)

<400>10

Met	Ala	Pro	Pro	Asn	Thr	Ile	Asp	Ala	Gly	Leu	Thr	Gln	Arg	His	Ile
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Ala	Ala	Pro	Thr	Ser	Ala	Lys	Pro	Ala	Phe	Glu	Arg	Asn
			20					25					30		
Tyr	Gln	Leu	Pro	Glu	Phe	Thr	Ile	Lys	Glu	Ile	Arg	Glu	Cys	Ile	Pro
	35						40					45			
Ala	His	Cys	Phe	Glu	Arg	Ser	Gly	Leu	Arg	Gly	Leu	Cys	His	Val	Ala
	50						55				60				
Ile	Asp	Leu	Thr	Trp	Ala	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Ala	Ala	Thr	Gln	Ile
65				70					75					80	
Asp	Lys	Phe	Glu	Asn	Pro	Leu	Ile	Arg	Tyr	Leu	Ala	Trp	Pro	Ala	Tyr
			85						90					95	
Trp	Ile	Met	Gln	Gly	Ile	Val	Cys	Thr	Gly	Ile	Trp	Val	Leu	Ala	His
			100						105				110		
Glu	Cys	Gly	His	Gln	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn	Asn	Thr
			115						120				125		
Val	Gly	Trp	Ile	Leu	His	Ser	Met	Leu	Leu	Val	Pro	Tyr	His	Ser	Trp
	130						135					140			
Arg	Ile	Ser	His	Ser	Lys	His	His	Lys	Ala	Thr	Gly	His	Met	Thr	Lys
145					150				155					160	
Asp	Gln	Val	Phe	Val	Pro	Lys	Thr	Arg	Ser	Gln	Val	Gly	Leu	Pro	Pro
			165						170				175		
Lys	Glu	Asn	Val	Ala	Val	Ala	Val	Gln	Glu	Glu	Asp	Met	Ser	Val	His
			180						185				190		
Leu	Asp	Glu	Glu	Ala	Pro	Ile	Val	Thr	Leu	Phe	Trp	Met	Val	Ile	Gln
			195						200				205		
Phe	Leu	Phe	Gly	Trp	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ile	Met	Asn	Ala	Ser	Gly	Gln
	210						215						220		

Asp	Tyr	Gly	Arg	Trp	Thr	Ser	His	Phe	His	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ile	Phe
225					230					235					240
Glu	Pro	Arg	Asn	Phe	Phe	Asp	Ile	Ile	Ile	Ser	Asp	Leu	Gly	Val	Leu
			245						250					255	
Ala	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ser	Met	Gln	Leu	Ser	Leu	Leu
		260						265				270			
Thr	Val	Thr	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Val	Pro	Tyr	Leu	Phe	Val	Asn	Phe	Trp
	275					280					285				
Leu	Val	Leu	Ile	Thr	Phe	Leu	Gln	His	Thr	Asp	Pro	Lys	Leu	Pro	His
290					295					300					
Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala	Trp	Asn	Phe	Gln	Arg	Gly	Ala	Leu	Cys	Thr	Val
305				310					315					320	
Asp	Arg	Ser	Phe	Gly	Lys	Phe	Leu	Asp	His	Met	Phe	His	Gly	Ile	Val
			325					330					335		
His	Thr	His	Val	Ala	His	His	Leu	Phe	Ser	Gln	Met	Pro	Phe	Tyr	His
	340						345					350			
Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	His	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr
	355						360					365			
Val	Tyr	Asp	Pro	Ser	Pro	Ile	Val	Val	Ala	Val	Trp	Arg	Ser	Phe	Arg
	370					375					380				
Glu	Cys	Arg	Phe	Val	Glu	Asp	His	Gly	Asp	Val	Val	Phe	Phe	Lys	Lys
385				390						395					400

<210>11

<211>419

<212>PRT

<213>Saccharomyces kluyveri

<400>11

Met	Ser	Ile	Glu	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Val	Ala	Ile	Asn	Ser
1				5					10					15	
Lys	Ala	Val	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	Thr	Val	Val	Gln	Pro	Lys	Thr	Ala
			20					25					30		
Ile	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Val	Phe	Lys	Val	Pro	Asp	Tyr	Thr	Ile	Lys
		35				40						45			
Asp	Ile	Leu	Ser	Ala	Ile	Pro	Lys	Glu	Cys	Tyr	Lys	Arg	Asp	Thr	Leu
	50					55					60				
Trp	Ser	Leu	His	Tyr	Val	Val	Arg	Asp	Ile	Ala	Ala	Ile	Leu	Val	Ile
65					70					75					80

Gly Tyr Leu Gly Thr Asn Tyr Ile Pro Val Leu Phe Pro Asn Ser Ala		
85	90	95
Leu Leu Arg Gly Ile Ala Tyr Ala Ile Gln Ser Tyr Leu Ile Gly Leu		
100	105	110
Phe Gly Phe Gly Leu Trp Ile Leu Ala His Glu Cys Gly His Ser Ala		
115	120	125
Phe Ser Glu Ser Asn Ala Val Asn Asp Thr Val Gly Trp Val Leu His		
130	135	140
Ser Trp Trp Met Val Pro Tyr Phe Pro Trp Lys Phe Ser His Ser Lys		
145	150	155
160		
His His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Ile Pro		
165	170	175
Tyr Thr Lys Asp Glu Phe Ile Thr Met Lys Lys Lys Ser Lys Phe Ala		
180	185	190
Glu Ile Thr Glu Glu Ala Pro Val Met Thr Leu Phe Asn Leu Ile Ala		
195	200	205
Gln Gln Val Gly Gly Leu Gln Leu Tyr Leu Ala Thr Asn Ala Thr Gly		
210	215	220
Gln Pro Tyr Pro Gly Val Lys Lys Phe Phe Lys Ser His Tyr Trp Pro		
225	230	235
240		
Thr Ser Pro Val Phe Asp Ala Lys Asp Phe Trp Trp Ile Ile Met Ser		
245	250	255
Asp Ile Gly Ile Val Ser Thr Leu Leu Ile Asn Tyr Leu Trp Tyr Arg		
260	265	270
Ala Tyr Gly Ala His Val Val Leu Ile Asn Trp Phe Ile Pro Trp Leu		
275	280	285
Trp Val Asn His Trp Leu Val Phe Val Thr Phe Leu Gln His Thr Asp		
290	295	300
Pro Thr Met Pro His Tyr Asp Ala Glu Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly		
305	310	315
320		
Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Asn Phe Gly Phe Val Gly Gln His Ile		
325	330	335
Phe His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Cys Ser Arg		
340	345	350
Ile Pro Phe Tyr Asn Ala Arg Lys Ala Thr Ser Ala Ile Lys Glu Val		
355	360	365
Met Gly Gln His Tyr Arg Tyr Glu Gly Glu Asn Met Trp Lys Ser Leu		
370	375	380
Trp Lys Val Ala Arg Ser Cys Gln Tyr Val Glu Gly Asp Asn Gly Val		

385	390	395	400
Arg Met Phe Arg Asn Thr Asn Gly Val Gly Val Lys Pro Glu Asp Gly			
	405	410	415
Ser Ser Gln			

<210>12

<211>416

<212>PRT

<213>Saccharomyces kluyveri

<400>12

Met Ser Ala Val Thr Val Thr Gly Ser Asp Pro Lys Asn Arg Gly Ser			
1	5	10	15
Ser Ser Asn Thr Glu Gln Glu Val Pro Lys Val Ala Ile Asp Thr Asn			
	20	25	30
Gly Asn Val Phe Ser Val Pro Asp Phe Thr Ile Lys Asp Ile Leu Gly			
	35	40	45
Ala Ile Pro His Glu Cys Tyr Glu Arg Arg Leu Ala Thr Ser Leu Tyr			
	50	55	60
Tyr Val Phe Arg Asp Ile Phe Cys Met Leu Thr Thr Gly Tyr Leu Thr			
65	70	75	80
His Lys Ile Leu Tyr Pro Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Ser Ile			
	85	90	95
Ile Lys Phe Thr Phe Trp Ala Leu Tyr Thr Tyr Val Gln Gly Leu Phe			
	100	105	110
Gly Thr Gly Ile Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gln Ala Phe			
	115	120	125
Ser Asp Tyr Gly Ile Val Asn Asp Phe Val Gly Trp Thr Leu His Ser			
	130	135	140
Tyr Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Gly Lys His			
145	150	155	160
His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro Ala			
	165	170	175
Thr Lys Glu Glu Phe Lys Lys Ser Arg Asn Phe Phe Gly Asn Leu Ala			
	180	185	190
Glu Tyr Ser Glu Asp Ser Pro Leu Arg Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Val			
	195	200	205
Gln Gln Leu Gly Gly Trp Ile Ala Tyr Leu Phe Val Asn Val Thr Gly			
	210	215	220

Gln	Pro	Tyr	Pro	Asp	Val	Pro	Ser	Trp	Lys	Trp	Asn	His	Phe	Trp	Leu
225					230				235						240
Thr	Ser	Pro	Leu	Phe	Glu	Gln	Arg	Asp	Ala	Leu	Tyr	Ile	Phe	Leu	Ser
			245						250					255	
Asp	Leu	Gly	Ile	Leu	Thr	Gln	Gly	Ile	Val	Leu	Thr	Leu	Trp	Tyr	Lys
		260						265					270		
Lys	Phe	Gly	Gly	Trp	Ser	Leu	Phe	Ile	Asn	Trp	Phe	Val	Pro	Tyr	Ile
		275					280					285			
Trp	Val	Asn	His	Trp	Leu	Val	Phe	Ile	Thr	Phe	Leu	Gln	His	Thr	Asp
	290					295					300				
Pro	Thr	Met	Pro	His	Tyr	Asn	Ala	Glu	Glu	Trp	Thr	Phe	Ala	Lys	Gly
305					310					315				320	
Ala	Ala	Ala	Thr	Ile	Asp	Arg	Lys	Phe	Gly	Phe	Ile	Gly	Pro	His	Ile
			325						330					335	
Phe	His	Asp	Ile	Ile	Glu	Thr	His	Val	Leu	His	His	Tyr	Cys	Ser	Arg
		340					345					350			
Ile	Pro	Phe	Tyr	Asn	Ala	Arg	Pro	Ala	Ser	Glu	Ala	Ile	Lys	Lys	Val
		355				360						365			
Met	Gly	Lys	His	Tyr	Arg	Ser	Ser	Asp	Glu	Asn	Met	Trp	Lys	Ser	Leu
	370					375					380				
Trp	Lys	Ser	Phe	Arg	Ser	Cys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Asn	Gly	Val
385				390						395				400	
Leu	Met	Phe	Arg	Asn	Ile	Asn	Asn	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Ala	Glu	Lys
			405						410					415	

<210>13

<211>380

<212>PRT

<213> 大豆 (Glycine max)

<400>13

Met	Val	Lys	Asp	Thr	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Ala	Asn	Asn	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Gln	Gln	Lys	Gly	Ser	Ser	Phe	Asp	Phe	Asp	Pro	Ser	Ala	Pro	Pro	Pro
			20					25					30		
Phe	Lys	Ile	Ala	Glu	Ile	Arg	Ala	Ser	Ile	Pro	Lys	His	Cys	Trp	Val
		35					40					45			
Lys	Asn	Pro	Trp	Arg	Ser	Leu	Ser	Tyr	Val	Leu	Arg	Asp	Val	Leu	Val
	50					55					60				

Ile Ala Ala Leu Val Ala Ala Ala Ile His Phe Asp Asn Trp Leu Leu			
65	70	75	80
Trp Leu Ile Tyr Cys Pro Ile Gln Gly Thr Met Phe Trp Ala Leu Phe			
	85	90	95
Val Leu Gly His Asp Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Ser Pro Leu			
	100	105	110
Leu Asn Ser Leu Val Gly His Ile Leu His Ser Ser Ile Leu Val Pro			
	115	120	125
Tyr His Gly Trp Arg Ile Ser His Arg Thr His His Gln Asn His Gly			
	130	135	140
His Ile Glu Lys Asp Glu Ser Trp Val Pro Leu Thr Glu Lys Ile Tyr			
145	150	155	160
Lys Asn Leu Asp Ser Met Thr Arg Leu Ile Arg Phe Thr Val Pro Phe			
	165	170	175
Pro Leu Phe Val Tyr Pro Ile Tyr Leu Phe Ser Arg Ser Pro Gly Lys			
	180	185	190
Glu Gly Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Asn Leu Phe Pro Pro Ser Glu			
	195	200	205
Arg Lys Gly Ile Ala Ile Ser Thr Leu Cys Trp Ala Thr Met Phe Ser			
	210	215	220
Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Phe Ile Thr Ser Pro Leu Leu Val Leu Lys			
225	230	235	240
Leu Tyr Gly Ile Pro Tyr Trp Ile Phe Val Met Trp Leu Asp Phe Val			
	245	250	255
Thr Tyr Leu His His His Gly His His Gln Lys Leu Pro Trp Tyr Arg			
	260	265	270
Gly Lys Glu Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Val Asp Arg			
	275	280	285
Asp Tyr Gly Trp Ile Tyr Asn Ile His His Asp Ile Gly Thr His Val			
	290	295	300
Ile His His Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val Glu Ala			
305	310	315	320
Thr Gln Ala Ala Lys Pro Val Leu Gly Asp Tyr Tyr Arg Glu Pro Glu			
	325	330	335
Arg Ser Ala Pro Leu Pro Phe His Leu Ile Lys Tyr Leu Ile Gln Ser			
	340	345	350
Met Arg Gln Asp His Phe Val Ser Asp Thr Gly Asp Val Val Tyr Tyr			
	355	360	365
Gln Thr Asp Ser Leu Leu Leu His Ser Gln Arg Asp			

370	375	380
<210>14		
<211>453		
<212>PRT		
<213> 大豆 (Glycine max)		
<400>14		
Met Ala Thr Trp Tyr His Gln Lys Cys Gly Leu Lys Pro Leu Ala Pro		
1	5	10
Val Ile Pro Arg Pro Arg Thr Gly Ala Ala Leu Ser Ser Thr Ser Arg		
20	25	30
ValG lu Phe Leu Asp Thr Asn Lys Val Val Ala Gly Pro Lys Phe Gln		
35	40	45
Pro Leu Arg Cys Asn Leu Arg Glu Arg Asn Trp Gly Leu Lys Val Ser		
50	55	60
Ala Pro Leu Arg Val Ala Ser Ile Glu Glu Glu Gln Lys Ser Val Asp		
65	70	75
Leu Thr Asn Gly Thr Asn Gly Val Glu His Glu Lys Leu Pro Glu Phe		
85	90	95
Asp Pro Gly Ala Pro Pro Pro Phe Asn Leu Ala Asp Ile Arg Ala Ala		
100	105	110
Ile Pro Lys His Cys Trp Val Lys Asp Pro Trp Arg Ser Met Ser Tyr		
115	120	125
Val Val Arg Asp Val Ile Ala Val Phe Gly Leu Ala Ala Ala Ala Ala		
130	135	140
Tyr Leu Asn Asn Trp Leu Val Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Ala Gln Gly		
145	150	155
Thr Met Phe Trp Ala Leu Phe Val Leu Gly His Asp Cys Gly His Gly		
165	170	175
Ser Phe Ser Asn Asn Ser Lys Leu Asn Ser Val Val Gly His Leu Leu		
180	185	190
His Ser Ser Ile Leu Val Pro Tyr His Gly Trp Arg Ile Ser His Arg		
195	200	205
Thr His His Gln His His Gly His Ala Glu Asn Asp Glu Ser Trp His		
210	215	220
Pro Leu Pro Glu Lys Leu Phe Arg Ser Leu Asp Thr Val Thr Arg Met		
225	230	235
Leu Arg Phe Thr Ala Pro Phe Pro Leu Leu Ala Phe Pro Val Tyr Leu		
245	250	255

Phe Ser Arg Ser Pro Gly Lys Thr Gly Ser His Phe Asp Pro Ser Ser		
260	265	270
Asp Leu Phe Val Pro Asn Glu Arg Lys Asp Val Ile Thr Ser Thr Ala		
275	280	285
Cys Trp Ala Ala Met Leu Gly Leu Leu Val Gly Leu Gly Phe Val Met		
290	295	300
Gly Pro Ile Gln Leu Leu Lys Leu Tyr Gly Val Pro Tyr Val Ile Phe		
305	310	315
Val Met Trp Leu Asp Leu Val Thr Tyr Leu His His His Gly His Glu		
325	330	335
Asp Lys Leu Pro Trp Tyr Arg Gly Lys Glu Trp Ser Tyr Leu Arg Gly		
340	345	350
Gly Leu Thr Thr Leu Asp Arg Asp Tyr Gly Trp Ile Asn Asn Ile His		
355	360	365
His Asp Ile Gly Thr His Val Ile His His Leu Phe Pro Gln Ile Pro		
370	375	380
His Tyr His Leu Val Glu Ala Thr Glu Ala Ala Lys Pro Val Phe Gly		
385	390	395
Lys Tyr Tyr Arg Glu Pro Lys Lys Ser Ala Ala Pro Leu Pro Phe His		
405	410	415
Leu Ile Gly Glu Ile Ile Arg Ser Phe Lys Thr Asp His Phe Val Ser		
420	425	430
Asp Thr Gly Asp Val Val Tyr Tyr Gln Thr Asp Ser Lys Ile Asn Gly		
435	440	445
Ser Ser Lys Leu Glu		
450		

Mor-Δ 12 ---MAPPNTIDAGLQRIHISTSAPTSAPKAFERN---YOLPEFTIKETRECI PAHCFERSGLRGLCHVAIDL TWASLLFLAA TOIDK---FEN---PL
 Sacω 3 MSIEIVGSSSGVA INSKAVSSATITVQPKTATDINGNVFNPVDYITKDILSAIPKECYKROTLMSLHYVVRDIAAIVIGYLGNTYIP---VLFPSAL
 SacΔ 12 MSATVITG-SDP---KNRGSSSNTEQEVKVAIDTNGNVFNPVDFTIKDILGATPHECYERRLATSLYVVRDIFCMITTEGYLTHKILYPLLI SYTSNSI

Mor-Δ 12 IRYLAWPAYWIMGGIVCTGIWVLAHECGHQSFSSTKLTNNITVGV LHSMLVPIYHSWRISHSKHHKATGHMTKDOVFVPKTRSQVGLPPKENVAVAQEE
 Sacω 3 LRGLA AIQSYLIGLFGGLHLLAHECGHSAFSESNAVNDTVGVVLSHNNVPIYFPWKFSSKHHKATGHMTDRMVFIPYTKDEFITMK-----KK
 SacΔ 12 IKFTFWALVITYVQGLFGTGIWVLAHECGHQAESDYGIVNDVGVGTLHSYLMVPIYFSWKYSHSKHHKATGHMTDRMVFVPATKEEFKKS RN-----FF

Mor-Δ 12 DMSVHLD EEAIVITLFWVVIDLFGWPAYLIINASGODYG---RWTSHETYSPIFEPRNFDDITISDLGVLAALGTLIYASNL SLLTVTKYIIVPYL
 Sacω 3 SKFAETIEEAPVMTLENIAQQVGGQLQYLATNATGOPYPGVKFFKSHYVPTSPVFDKDFWIIIMSDIGIVSTLLINYLWYRAYGAHV INWFIPHL
 SacΔ 12 GNLA EYSEDSPLRTIYELVQOLGGHIAYLFWNVITGOPYP VPSKKNHFWLTSPLEFORDALYIFLSDLGILITOGIVLTLWYKFGWSLFINWFVPYI

Mor-Δ 12 FVNFVVLITFLQHTDPKLPHYREGANNFORGALCTVDRSFGKFLDMFHGIVHTVAHHLFSOMPFYHAEETHHUKLLGEYVYVDPSPIVVAVRSGF
 Sacω 3 VVNHVLFVITFLQHTDPTMPHYDAEEWTFAGAAATDRNFGVBOHIFHDI IETHVLHHCYCRIPFYNARKATSAIKVEMGCHYRYEGENMWKSLWKVA
 SacΔ 12 VVNHVLFVITFLQHTDPTMPHYDAEEWTFAGAAATDRNFGVBOHIFHDI IETHVLHHCYCRIPFYNARPAEAIKKVMGKHYSSENMMWKS LKWSF

Mor-Δ 12 REGRFVEDHGDVVFEEK-----
 Sacω 3 RSCQYVEGDNGVRFNRTNGVGVKPEDGSSQ
 SacΔ 12 RSCQYVVDGNGVLMFRNINWCGVGAEEK---

图 1

MAW3 -----MAPPHVVEQW-RRRIVVEDE-IKSKKQFERN
 Mor-Δ 12 -----MAPPNTIDAGLQRIHISTSAPTSAPKAFERN
 Sacω 3 -----MSIEIVGSSSGVA INSKAVSSATITVQPKTATDINGNVF
 Soybeanω 3 -----NVKDT-KPLAYANN-GYQOKGS-S-DFD
 Soybeanω 3 (Ch1) MATWYHQKGLKPLAPVIPRPTGAALSSSTRVEFLDNTKVVAGPKFQPLRCNLRRERNWGLKVSAPLRVASIEEQKSVOLTNGTNGVHEKLP E---FD

MAW3 YW-PWDFTIKEIRDAIPAHLEIRDTITKSLHVVKOLVITAIY-FYCATFETLPSL-AL RVPANIT--YVITOGITVWVPHLAHECGHGAFSDSKTLN
 Mor-Δ 12 YQLP-BFTIKETRECI PAHCFERSGLRGLCHVAIDL TWASLL-FLAA TOIDKFENPLI--RYLAWPA--YVIMOGITVCTBIWVLAHECGHQSFSSTKTLN
 Sacω 3 KW-P-DYITKDILSAIPKECYKROTLMSLHYVVRDIAAIVIGYLGNTYIPVDFPN ALRGIAIAQS YLIGLFGF-GLWVLAHECGHSAFSESNAVN
 Soybeanω 3 (ER) PSAPPFRKIAETRASIPKHCWVKNPWRSLSYVLRDVLVLAAL-VAADITHFNWLL-----WLI--YCPITOGITMFWALFVLGHGCGHGSFSDSPLLN
 Soybeanω 3 (Ch1) PGAPPPENLADIRAAIPKHCWVKDPWRSSYVVRDIAVFGI-AAAAYLNNWLV-----WPL--YVADOGITMFWALFVLGHGCGHGSFSSNKLN

MAW3 TIFGVVLSALVPIYQAMANSKHHKGTGSMTKOVVFI PATRSYKB-LPALEKPAVEEIVSEQEHHEEESIFAETPIYTLGAL-FVLTFGWPLYLIV
 Mor-Δ 12 NTGVNTHLSMLVPIYHSWRISHSKHHKATG MTKDOVFVPKTRSOVB-LPPKENAAA VQEEEDMSVHLD EEA-----PIVITFWN-VIGLFGWP VLIW
 Sacω 3 DTGVHLSHNNVPIYFPWKFSSKHHKATGHMTDRMVFIPYTKDEFITMKKSKFAEIEAPVMTL-----FNLIAQQVGGQLYLATNAT-GOP-VPGV
 Soybeanω 3 (ER) SLVGHILHSSILVPIYHGRISHRTHHONHOTEKDESWHQ-----LT--EKIYKNLDSMTLRIRFTYP-----FPL-EVYIYVLS
 Soybeanω 3 (Ch1) SVVGHLLHSSILVPIYHGRISHRTHHONHONDESWHQ-----LP--EKLFRSLDTVTRMLRFTAP-----FPL-LAFDVVLS

MAW3 NFSCHAPHPVNTOTVAPVIEPHORKNIFYSNCHIVAMGSLIT-YLSMVFSLTV-FWYIGIPYLGUNAWVICTITYLOHTOP--KVPFRDNEWNFORG
 Mor-Δ 12 NASGODYGRMTSHETYSPIFEPRNFDDITISDLGVLAALGALI-YASNL SLLTV-TKYIIVPYL FVNFVVLITFLQHTOP--KLPHYREGANNFORG
 Sacω 3 KKKFKS-----HYWPTSPVFDKDFWIIIMSDIGI-VST-LLINYLWYRAYGAHVLINWFIPHLVANHVLVITFLQHTDPT-MPYDAEEWTFAGK
 Soybeanω 3 (ER) RSPKTKGS-----FNPYSNIFPISERNIAISTLCWATPFLII-YLSF/TSPILDLKL-YGIPYVIFVMGLDFVITLHHGHGKLPWYRCKEWSYLRG
 Soybeanω 3 (Ch1) RSPKTKGS-----FDPSSDLFVNERKDVITSTACAAALGLLV-GUGFVM PTQLLKL-YGVPIVIFVMGLDLVITYLHHGHGKLPWYRCKEWSYLRG

MAW3 AACTIDRSFGITVNNLHHH-TGDSHCHHMFSON-PFYNAVEATKY-LKAKLGKYYIFDDT-----PIAKALYRNWRECK--FVEDGGOVVFYKH
 Mor-Δ 12 ALCTVDRSFGKFLDMFHG-IVHTVAHHLFSOMPFYHAEETHHUKLLGEYVYVDPSP-----PIVAVVMSFREGOR--FVEDGGOVVFYKH
 Sacω 3 AATIDRNEGVGOIIFHDI IETHVLHHCYCRIPFYNARKATSAIKVEMGCHYRYEGENMWKSS---LWK--VARSCQ--YVGDNGVRMFRNTNGVG
 Soybeanω 3 (ER) GLTIVDRDYGWYNNI-HHD-IG-TGVTHHLPPI-PRVHLVEATQAA-KPVLEGYVREPERSAP-LDFHLIKVLISQNRQDHFVSDIGOVVYVOTO
 Soybeanω 3 (Ch1) GLTILDRDYGWYNNI-HHD-IG-TGVTHHLPPI-PRVHLVEATEAA-KPVFGKYVREPCKSAAPLDFHLIGETISFKTDHFVSDIGOVVYVOTDSKIN

Sacω 3 VKPEDGSSQ
 Soybeanω 3 (ER) SLLHSDRD
 Soybeanω 3 (Ch1) GSSKLE

图 2

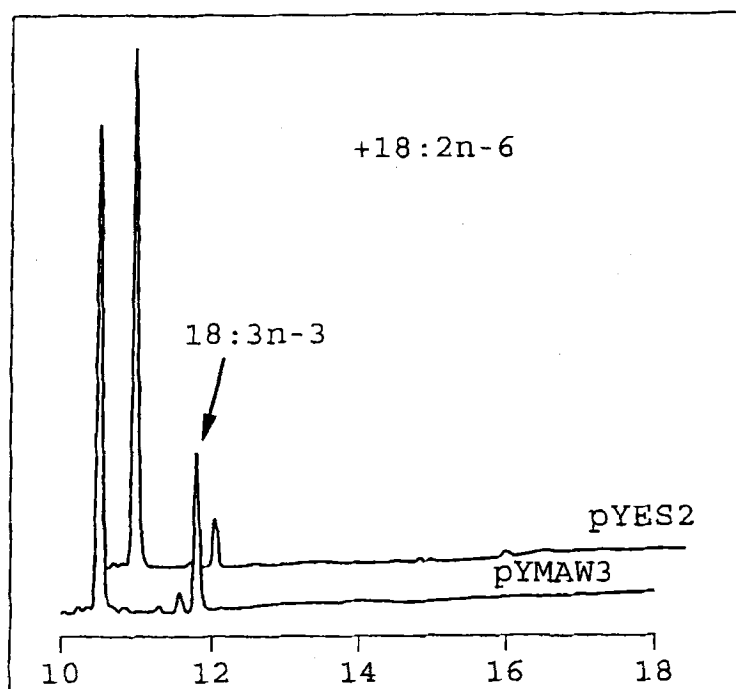


图 3

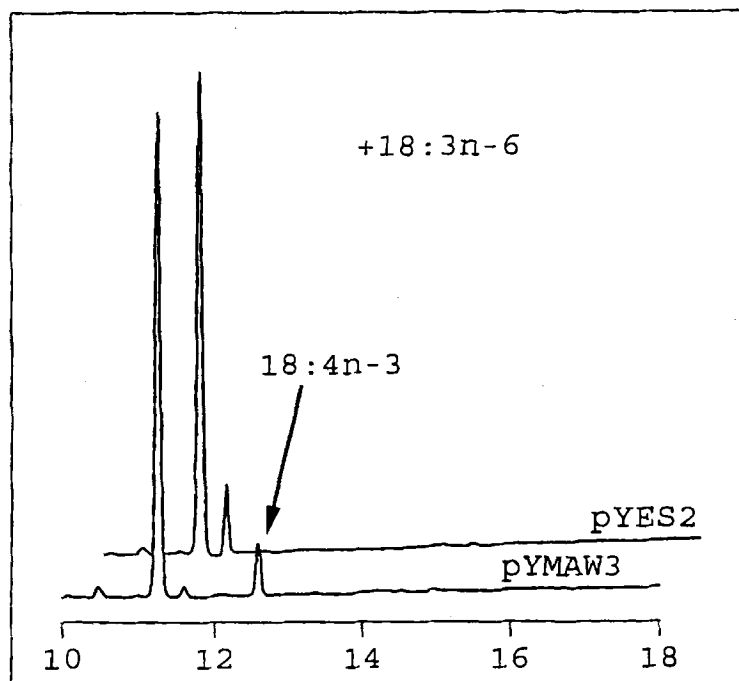


图 4

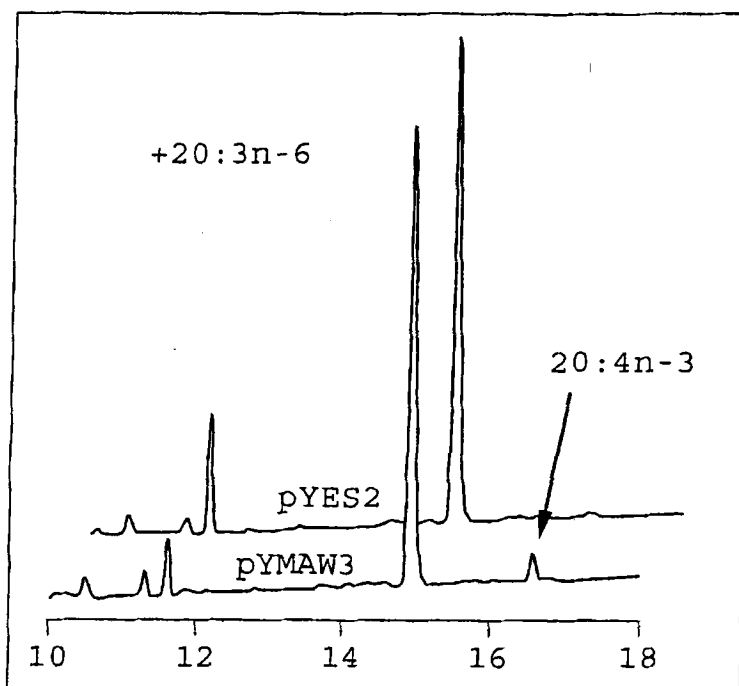


图 5

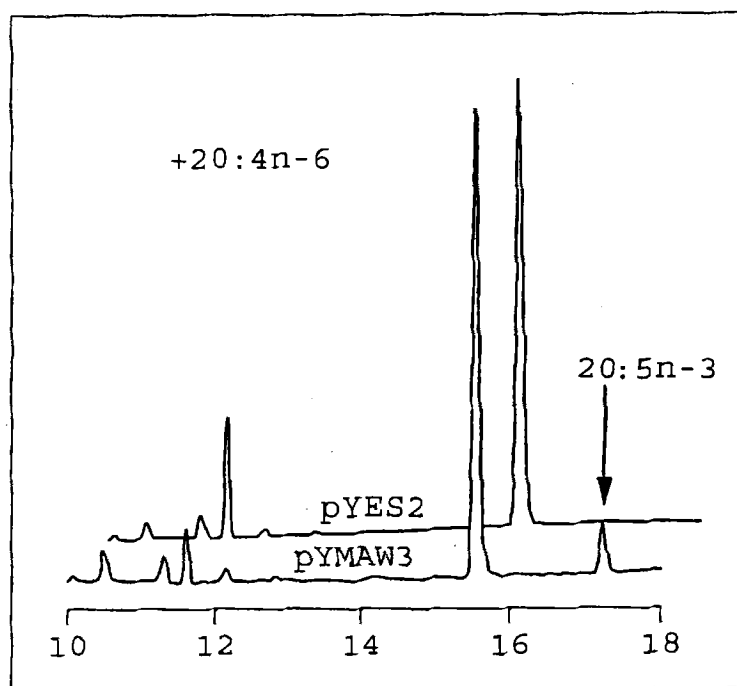


图 6

	n-6系列PUFAs	n-3系列PUFAs
碳数18	亚油酸 (LA) $18:2\Delta^{9,12}$ ↓ γ-亚麻酸 (GLA) $18:3\Delta^{6,9,12}$ ↓	α-亚麻酸 (ALA) $18:3\Delta^{9,12,15}$ ↓ 十八碳四烯酸 $18:4\Delta^{6,9,12,15}$ ↓
碳数20	二高-γ-亚麻酸 (DGLA) $20:3\Delta^{8,11,14}$ ↓ 花生四烯酸 (AA 或 ARA) $20:4\Delta^{5,8,11,14}$	$20:4\Delta^{8,11,14,17}$ ↓ 二十碳五烯酸 (EPA) $20:5\Delta^{5,8,11,14,17}$ ↓
碳数22		二十二碳六烯酸 (DHA) $22:6\Delta^{4,7,10,13,16,19}$

图 7