

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102782124 B

(45) 授权公告日 2015.04.22

(21) 申请号 201080041384.1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010.07.14

C12N 9/00(2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 9/02(2006.01)

12/505293 2009.07.17 US

C12N 15/82(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2012.03.16

US 20070117190 A1, 2007.05.24, 全文.

(86) PCT国际申请的申请数据

US 20080254195 A1, 2008.10.16, 全文.

PCT/US2010/041893 2010.07.14

审查员 田颖

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/008803 EN 2011.01.20

(83) 生物保藏信息

PTA-10200 2009.07.10

(73) 专利权人 雅培制药有限公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 S. 佩雷拉 T. 达斯 P. 克里什南

P. 穆克吉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李连涛 郭文洁

权利要求书2页 说明书31页

序列表34页 附图21页

(54) 发明名称

用于产生富含多不饱和脂肪酸的油的新
Δ9-延伸酶

(57) 摘要

本公开内容涉及编码 Δ9-延伸酶的分离的多核苷酸，由分离的多核苷酸编码的 Δ9-延伸酶，包含分离的多核苷酸的表达载体，包含表达载体的宿主细胞，和用于产生 Δ9-延伸酶和多不饱和脂肪酸的方法。

1. 一种分离的核酸,其编码具有延伸酶活性的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列选自 SEQ ID NO :18 和 SEQ ID NO :20。
2. 一种分离的核酸分子,其选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19。
3. 权利要求 1 或 2 的分离的核酸分子,其中所述分离的核酸分子编码利用多不饱和脂肪酸作为底物的功能上活性的延伸酶。
4. 权利要求 1 或 2 的分离的核酸分子,其中所述分离的核酸分子来自类眼虫属物种 (*Euglenoid sp.*)。
5. 权利要求 4 的分离的核酸分子,其中所述分离的核酸分子来自 *Euglena deses Ehr.* CCMP 2916。
6. 一种纯化多肽,其由权利要求 1 或 2 的分离的核酸分子编码。
7. 一种纯化多肽,其延伸在碳 9 位置上含有不饱和的多不饱和脂肪酸,其中所述多肽的氨基酸序列选自 SEQ ID NO :18 和 SEQ ID NO :20。
8. 一种表达载体,其包含与调节序列可操作地连接的核酸分子,其中所述核酸分子选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19。
9. 一种宿主细胞,其包含权利要求 8 的表达载体,其中所述宿主细胞选自真菌细胞。
10. 一种产生 $\Delta 9-$ 延伸酶的方法,所述方法包含步骤 :
 - a) 分离核酸分子,其中所述分离的核酸分子的核苷酸序列选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19 ;
 - b) 构建包含与 ii) 调节序列可操作地连接的 i) 分离的核酸分子的表达载体 ; 和
 - c) 在足以产生 $\Delta 9-$ 延伸酶的时间和条件下,将所述表达载体引入宿主细胞内,其中所述宿主细胞选自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。
11. 一种用于产生多不饱和脂肪酸的方法,其包含步骤 :
 - a) 分离核酸分子,其中所述分离的核酸分子的核苷酸序列选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19 ;
 - b) 构建包含与 ii) 调节序列可操作地连接的 i) 分离的核酸分子的表达载体 ;
 - c) 在足以表达 $\Delta 9-$ 延伸酶的时间和条件下,将所述表达载体引入宿主细胞内,其中所述宿主细胞选自拟南芥和酿酒酵母 ; 和
 - d) 使所表达的 $\Delta 9-$ 延伸酶暴露于底物多不饱和脂肪酸,以便将所述底物多不饱和脂肪酸转换为第一种产物多不饱和脂肪酸,其中所述底物多不饱和脂肪酸是亚油酸(LA) 和 α - 亚麻酸(ALA) 中的至少一种,并且所述第一种产物多不饱和脂肪酸是 $\omega 6$ -二十碳二烯酸($\omega 6$ -EDA) 和 $\omega 3$ -二十碳三烯酸($\omega 3$ -ETrA) 中的至少一种。
12. 权利要求 11 的方法,其进一步包含使所述第一种产物多不饱和脂肪酸暴露于至少一种去饱和酶、至少一种另外的延伸酶或其组合的步骤,以便将所述第一种产物多不饱和脂肪酸转换为第二种或后续产物多不饱和脂肪酸,其中所述第二种或后续产物多不饱和脂肪酸选自二高 γ - 亚麻酸(DGLA)、 $\omega 3$ -二十碳四烯酸($\omega 3$ -ETA)、花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)、二十二碳六烯酸(DHA) 及其组合。
13. 一种用于在宿主细胞中产生多不饱和脂肪酸的方法,其包含步骤 :

a) 分离核酸分子,其中所述分离的核酸分子的核苷酸序列选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19 ;

b) 构建包含与 ii) 调节序列可操作地连接的 i) 分离的核酸分子的表达载体;

c) 在足以表达 $\Delta 9-$ 延伸酶和 $\Delta 8-$ 去饱和酶的时间和条件下,将 i) 表达载体和 ii) 包含分离的核酸分子的至少一种另外的重组 DNA 构建体引入宿主细胞内,所述分离的核酸分子编码 $\Delta 8-$ 去饱和酶且与至少一种调节序列可操作地连接,其中所述宿主细胞选自拟南芥和酿酒酵母;和

d) 使所表达的 $\Delta 9-$ 延伸酶和 $\Delta 8-$ 去饱和酶暴露于选自亚油酸(LA)、 α -亚麻酸(ALA)及其组合的底物多不饱和脂肪酸,以便将所述底物多不饱和脂肪酸转换为第一种产物多不饱和脂肪酸,

其中所述第一种产物多不饱和脂肪酸选自二高 γ -亚麻酸(DGLA)、 $\omega 3$ -二十碳四烯酸($\omega 3$ -ETA)及其组合。

14. 权利要求 13 的方法,其进一步包含使所述第一种产物多不饱和脂肪酸暴露于至少一种另外的去饱和酶或至少一种另外的延伸酶的步骤,以便将所述第一种产物多不饱和脂肪酸转换为第二种或后续多不饱和脂肪酸,其中所述第二种或后续多不饱和脂肪酸选自花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)、二十二碳六烯酸(DHA)及其组合。

15. 权利要求 13 的方法,其进一步包含将重组 DNA 构建体引入所述宿主细胞内,所述重组 DNA 构建体包含与 ii) 调节序列可操作地连接的 i) 编码 $\Delta 5-$ 去饱和酶的分离的核酸分子。

用于产生富含多不饱和脂肪酸的油的新 $\Delta 9-$ 延伸酶

[0001] 公开内容背景

[0002] 本公开内容涉及编码 $\Delta 9-$ 延伸酶的分离的多核苷酸，由分离的多核苷酸编码的 $\Delta 9-$ 延伸酶，包含分离的多核苷酸的表达载体，包含表达载体的宿主细胞，和用于产生 $\Delta 9-$ 延伸酶和多不饱和脂肪酸的方法。

[0003] 多不饱和脂肪酸(PUFA)在生活型的适当起作用中发挥很多作用。例如，PUFA 是细胞质膜的重要组分，在其中它们以磷脂的形式发现。它们还充当哺乳动物前列腺环素、类花生酸、白三烯和前列腺素的前体。另外，PUFA 是发育中的婴儿脑的适当发育以及组织形成和修复必需的。考虑到 PUFA 的生物学意义，做出有效产生其以及导致其产生的中间产物的尝试。

[0004] 许多酶，最值得注意的是去饱和酶和延伸酶，涉及 PUFA 生物合成(参见图 1)。去饱和酶催化在底物的脂肪酸烷基链内在碳原子之间不饱和(例如双键)的引入。延伸酶催化 2- 碳单位对脂肪酸底物的添加。例如，亚油酸(LA, 18:2n-6)通过 $\Delta 12-$ 去饱和酶由油酸(OA, 18:1n-9)产生。二十碳二烯酸(EDA, 20:2n-6)通过 $\Delta 9-$ 延伸酶由亚油酸(LA, 18:2n-6)产生。二高 γ -亚麻酸(DGLA, 20:3n-6)通过 $\Delta 8-$ 去饱和酶由二十碳二烯酸(EDA, 20:2n-6)产生。花生四烯酸(ARA, 20:4n-6)通过 $\Delta 5-$ 去饱和酶由二高 γ -亚麻酸(DGLA, 20:3n-6)产生(参见图 1)。

[0005] 延伸酶催化 γ -亚麻酸(GLA, 18:3n-6)至二高 γ -亚麻酸(DGLA, 20:3n-6)的转换和十八碳四烯酸(SDA, 18:4n-3)至二十碳四烯酸(ETA, 20:4n-3)的转换。延伸酶还催化花生四烯酸(ARA, 20:4n-6)至肾上腺酸(ADA, 22:4n-6)的转换和二十碳五烯酸(EPA, 20:5n-3)至 $\omega 3$ -二十二碳五烯酸(22:5n-3)的转换。 $\Delta 9-$ 延伸酶延伸在碳 9 位置上含有不饱和的多不饱和脂肪酸。例如， $\Delta 9-$ 延伸酶催化亚油酸(LA, 18:2n-6)至二十碳二烯酸(EDA, 20:2n-6)的转换和 α -亚麻酸(ALA, 18:3n-3)至二十碳三烯酸(ETrA, 20:3n-3)的转换。 $\omega 3$ -ETrA 随后可以通过 $\Delta 8-$ 去饱和酶转换为 $\omega 3$ -ETA。 $\omega 3$ -ETA 随后可以用于产生其他多不饱和脂肪酸，例如 $\omega 3$ -EPA，其可以加入药物组合物、营养组合物、动物饲料以及其他产物例如化妆品中。

[0006] 在过去已鉴定的延伸酶依据它们作用于其的底物不同。此外，它们存在于动物和植物中。在哺乳动物中发现的那些具有作用于饱和、单不饱和和多不饱和脂肪酸的能力。相比之下，在植物中发现的那些对于饱和或单不饱和脂肪酸是特异性的。因此，为了产生在植物中的多不饱和脂肪酸，存在关于 PUFA 特异性延伸酶的需要。

[0007] 在植物和动物中，延伸过程被认为是 4 步机制的结果(Lassner 等人, *The Plant Cell* 8:281-292 (1996))。CoA 是酰基载体。步骤 1 涉及丙二酰-CoA 与长链酰基-CoA 的缩合，以获得二氧化碳和 β -酮酰基-CoA，其中酰基部分已延伸 2 个碳原子。后续反应包括还原为 β -羟基酰基-CoA，脱水为烯酰-CoA，和第二次还原，以获得延伸的酰基-CoA。起始缩合反应不仅是底物特异性步骤还是限速步骤。

[0008] 应当指出动物不能去饱和超过 $\Delta 9$ 位置，并且因此不能将油酸(OA, 18:1n-9)转换成亚油酸(LA, 18:2n-6)。同样地， α -亚麻酸(ALA, 18:3n-3)不能由哺乳动物合成，因为它

们缺乏 Δ 15- 去饱和酶活性。然而, α -亚麻酸可以通过 Δ 6- 去饱和酶转换为十八碳四烯酸 (SDA, 18:4n-3) (参见 WO 96/13591; 还参见美国专利号 5,552,306), 随后为在哺乳动物和藻类中延伸为二十碳四烯酸 (ETA, 20:4n-3)。这种多不饱和脂肪酸(即, ETA, 20:4n-3)随后可以通过 Δ 5- 去饱和酶转换为二十碳五烯酸 (EPA, 20:5-3)。包括真菌和植物的其他真核生物具有在碳 12 (参见 WO 94/11516 和美国专利号 5,443,974) 和 15 (参见 WO 93/11245) 上去饱和的酶。动物的主要多不饱和脂肪酸因此衍生自饮食和 / 或亚油酸或 α -亚麻酸的去饱和和延伸。考虑到哺乳动物无法产生这些必需长链脂肪酸, 从天然产生这些脂肪酸的物种中分离涉及 PUFA 生物合成的基因且在微生物、植物或动物系统(其可以改变以提供一种或多种 PUFA 的商业数量的产生) 中表达这些基因是具有显著利益的。因此, 存在关于延伸酶、编码该酶的基因以及产生该酶的重组方法的明确需要。

[0009] 考虑到上述讨论, 还存在关于含有超过天然存在那些外的 PUFA 水平的油以及富含新 PUFA 的那些的确定需要。此类油可以通过延伸酶基因的分离和表达进行制备。

[0010] 最重要的长链 PUFA 之一是二十碳五烯酸 (EPA)。EPA 在真菌以及海产油中发现。二十二碳六烯酸 (DHA) 是另一种重要的长链 PUFA。DHA 最通常在鱼油中发现, 并且还可以从哺乳动物脑组织中纯化。花生四烯酸 (ARA) 是第三种重要的长链 PUFA。ARA 在丝状真菌中发现, 并且还可以从哺乳动物组织包括肝和肾上腺中纯化。

[0011] ARA、EPA 和 / 或 DHA 例如可以经由替代 Δ 8- 去饱和酶 / Δ 9- 延伸酶途径或常规 Δ 6 途径产生(参见图 1)。先前已鉴定了在用于产生长链 PUFA 特别是 ARA、EPA 和 DHA 的常规 Δ 6 途径中对底物脂肪酸有活性的延伸酶。用于将 LA 转换为 DGLA 和 ALA 转换为 ω 3-ETA 的常规 Δ 6 途径利用 Δ 6- 去饱和酶, 以将 LA 转换为 GLA 和 ALA 转换为十八碳四烯酸 (SDA), 和 Δ 6- 延伸酶, 以将 GLA 转换为 DGLA 和 SDA 转换为 ω 3-ETA。然而, 在一些情况下, 替代 Δ 8- 去饱和酶 / Δ 9- 延伸酶途径可以相对于常规 Δ 6 途径优选。例如, 如果特定残留 ω -6 或 ω -3 脂肪酸中间产物例如 GLA 或 SDA 在 DGLA、 ω 3-ETA、ARA、EPA、 ω 3- 二十二碳五烯酸、 ω 6- 二十二碳五烯酸、ADA 和 / 或 DHA 的产生过程中是不需要的, 那么替代 Δ 8- 去饱和酶 / Δ 9- 延伸酶途径可以用作常规 Δ 6 途径的替代物, 以绕过 GLA 和 SDA 形成。

[0012] 在本公开内容中, 已鉴定了 Δ 9- 延伸酶的新来源用于产生长链 PUFA, 特别是 DGLA、ETA、ARA、EPA、 ω 3- 二十二碳五烯酸、 ω 6- 二十二碳五烯酸、ADA 和 / 或 DHA。本公开内容的 Δ 9- 延伸酶将例如 LA 转换为 ω 6-EDA 和 ALA 转换为 ω 3-ETrA。来自 ω 6-EDA 的 DGLA 和来自 DGLA 的 ARA 产生随后分别通过 Δ 8- 去饱和酶和 Δ 5- 去饱和酶催化。

[0013] 公开内容概述

[0014] 在一个方面, 本公开内容涉及包含分离的核苷酸序列或与之互补的分离的核酸分子或其片段, 所述分离的核苷酸序列编码具有延伸酶活性的多肽, 其中所述多肽的氨基酸序列与选自 SEQ ID NO :18 和 SEQ ID NO :20 的氨基酸序列具有至少 68% 序列同一性。

[0015] 在另一个方面, 本公开内容涉及包含选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19 的核苷酸序列的至少 68% 或与之互补的分离的核苷酸序列或其片段。分离的核苷酸序列或其片段编码利用多不饱和脂肪酸作为底物的功能上活性的延伸酶, 且特别是功能上活性的 Δ 9- 延伸酶。

[0016] 核苷酸序列可以来自例如类眼虫属物种 (*Euglenoid* sp.), 并且可以具体地从例如 *Euglena deses* Ehr. CCMP 2916 中分离。

[0017] 在另一个方面,本公开内容涉及由上述分离的核苷酸序列编码的纯化多肽,以及延伸在碳9位置上含有不饱和的多不饱和脂肪酸且与选自 SEQ ID NO :18 和 SEQ ID NO :20 的氨基酸序列具有至少 68% 氨基酸同一性的纯化多肽。

[0018] 在另外一个方面,本公开内容涉及表达载体。表达载体包含与调节序列可操作地连接的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列包含选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19 的核苷酸序列的至少 68% 或与之互补。本公开内容还涉及包含这种表达载体的宿主细胞。宿主细胞可以是例如真核细胞或原核细胞。合适的真核细胞和原核细胞在本文中阐述。本公开内容还涉及包含表达载体的转基因种子。

[0019] 在另一个方面,本公开内容涉及包含上述表达载体的植物细胞、植物种子、植物或植物组织,其中表达载体的核苷酸序列的表达导致通过植物细胞、植物或植物组织产生至少一种多不饱和脂肪酸。多不饱和脂肪酸可以例如选自 ω 6-EDA 和 ω 3-ETrA 及其组合。本公开内容还包括由上述植物细胞、植物种子、植物或植物组织表达的一种或多种植物油或脂肪酸。

[0020] 此外,本公开内容涉及产生 Δ 9- 延伸酶的方法。该方法包含步骤 :a) 分离包含选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19 的核苷酸序列的至少 68% 或与之互补的核苷酸序列 ;b) 构建包含与 ii) 调节序列可操作地连接的 i) 分离的核苷酸序列的表达载体 ; 和 c) 合适时,在足以表达 Δ 9- 延伸酶的时间和条件下,将表达载体引入宿主细胞内。宿主细胞可以是例如真核细胞或原核细胞。特别地,真核细胞可以是例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞或真菌细胞。植物细胞可以来自选自大豆、芸苔属(*Brassica*)物种、红花、向日葵、玉蜀黍、棉花和亚麻的油料种子植物。

[0021] 另外,本公开内容涉及用于产生多不饱和脂肪酸的方法,其包含步骤 :a) 分离包含选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19 的核苷酸序列的至少 68% 或与之互补的核苷酸序列 ;b) 构建包含与调节序列可操作地连接的分离的核苷酸序列的表达载体 ;c) 在足以表达 Δ 9- 延伸酶的时间和条件下,将表达载体引入宿主细胞内 ; 和 d) 使所表达的 Δ 9- 延伸酶暴露于底物多不饱和脂肪酸,以便将底物多不饱和脂肪酸转换为第一种产物多不饱和脂肪酸。“底物”多不饱和脂肪酸是例如 LA 或 ALA,并且“第一种产物”多不饱和脂肪酸分别是例如 ω 6-EDA 或 ω 3-ETrA。这种方法可以进一步包含使第一种产物多不饱和脂肪酸暴露于至少一种去饱和酶、至少一种另外的延伸酶或其组合的步骤,以便将第一种产物多不饱和脂肪酸转换为第二种或后续多不饱和脂肪酸。第二种或后续产物多不饱和脂肪酸可以是例如 DGLA 或 ω 3-ETA、ARA、EPA、DPA、DHA 或其组合。

[0022] 在另一个方面,本公开内容涉及用于在宿主细胞中产生多不饱和脂肪酸的方法,其包含步骤 :a) 分离包含选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19 的核苷酸序列的至少 68% 或与之互补的核苷酸序列 ;b) 构建包含与调节序列可操作地连接的分离的核苷酸序列的表达载体 ;c) 在足以表达 Δ 9- 延伸酶和 Δ 8- 去饱和酶的时间和条件下,将 i) 表达载体和 ii) 包含分离的核苷酸序列的至少一种另外的重组 DNA 构建体引入宿主细胞内,所述分离的核苷酸序列编码 Δ 8- 去饱和酶且与至少一种调节序列可操作地连接 ; 和 d) 使所表达的 Δ 9- 延伸酶和 Δ 8- 去饱和酶暴露于选自 LA、ALA 及其组合的底物多不饱和脂肪酸,以便将底物多不饱和脂肪酸转换为第一种产物多不饱和脂肪酸。第一种产物多不饱和脂肪酸可以是例如 DGLA、 ω 3-ETA 或其组合。这种方法可以进一步包含使第一种产物多不饱和脂肪酸

暴露于至少一种去饱和酶、至少一种另外的延伸酶或其组合的步骤，以便将第一种产物多不饱和脂肪酸转换为第二种或后续多不饱和脂肪酸。第二种或后续产物多不饱和脂肪酸可以是例如 ARA、EPA、DPA、DHA 或其组合。在一个方面，这种方法可以进一步包含将重组 DNA 构建体引入宿主细胞内，所述重组 DNA 构建体包含与 i) 调节序列可操作地连接的 i) 编码 $\Delta 5-$ 去饱和酶的分离的核苷酸序列。宿主细胞可以是如上所述的。

[0023] 在另一个方面，本公开内容涉及用于产生转基因植物的方法，其包含用包含选自 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :19 的核苷酸序列的至少 68% 或与之互补的至少一种分离的核苷酸序列或其片段转化植物细胞，且由经转化的植物细胞再生转基因植物。植物细胞可以来自选自大豆、芸苔属物种、红花、向日葵、玉蜀黍、棉花和亚麻的油料种子植物。在另一个方面，本公开内容涉及得自通过这种方法产生的转基因植物的种子。

[0024] 还应当指出本文提及的每种核苷酸和氨基酸序列已指定特定序列鉴定编号。引入本文作为参考的序列表(其附于此)列出了每种此类序列及其相应编号。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1 显示脂肪酸生物合成途径和 $\Delta 9-$ 延伸酶在这个途径中的作用。

[0027] 图 2A 和 2B 显示核苷酸序列 SEQ ID NO :26 和 SEQ ID NO :27 的比对，其分别是 Eug-M07-ELO#10 和 Eug-M07-ELO#14 变体的核苷酸序列，克隆到载体 pYX242 的 *Bam HI/Hind III* 位点内，如实施例 3 中讨论的。在变体周围描绘框。

[0028] 图 3A 和 3B 显示来自 *Euglenadeses Ehr.* CCMP 2916 (Eug-M07-ELO-10) (SEQ ID NO :18) 的 $\Delta 9-$ 延伸酶的氨基酸序列与来自小眼虫 (*Euglena gracialis*) (SEQ ID NO :4)、球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) (SEQ ID NO :2) 的已知 $\Delta 9-$ 延伸酶；小鼠 Elov14 延伸酶(登记 # AAG47667 ;SEQ ID NO :21)、人 ELOVL2 延伸酶(登记 # NP_060240 ;SEQ ID NO :22)、和秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 延伸酶(登记 # AF244356 ;SEQ ID NO :23) 的氨基酸序列比对。非变体残基是加阴影的。

[0029] 图 4A 显示来自盐生巴夫藻 (*Pavlova salina*) 的 $\Delta 9-$ 延伸酶氨基酸序列(登记 # AAY15135 ;SEQ ID NO :1)。

[0030] 图 4B 显示来自球等鞭金藻的 $\Delta 9-$ 延伸酶氨基酸序列(登记 #AF390174 ;SEQ ID NO :2)。

[0031] 图 4C 显示来自裸藻属物种 (*Eutreptiella sp.*) 的 $\Delta 9-$ 延伸酶氨基酸序列(SEQ ID NO :3)。

[0032] 图 4D 显示来自小眼虫的 $\Delta 9-$ 延伸酶氨基酸序列(登记 # CAT16687 ;SEQ ID NO :4)。

[0033] 图 4E 显示来自 *Euglena anabena* 的 $\Delta 9-$ 延伸酶氨基酸序列(SEQ ID NO :5)。

[0034] 图 5A 显示如实施例 1 中所述获得的，克隆 plate2_M07 的核苷酸序列(SEQ ID NO :6)。

[0035] 图 5B 显示如实施例 1 中所述获得的，克隆 plate2_M07 的推导氨基酸序列(SEQ ID NO :7)。

[0036] 图 6A 显示如实施例 2 中所述获得的，plate2_M07 基因片段假定 3' 末端的核苷酸序列(SEQ ID NO :13)。

[0037] 图 6B 显示如实施例 2 中所述获得的，plate2_M07 基因片段假定 3' 末端的预测氨

基酸序列(SEQ ID NO :14 和 30-32)。SEQ ID NO :14 和 30-32 由代表终止密码子的“*”分开。

[0038] 图 6C 显示 SEQ ID NO :14。

[0039] 图 6D 显示 SEQ ID NO :30。

[0040] 图 6E 显示 SEQ ID NO :31。

[0041] 图 6F 显示 SEQ ID NO :32。

[0042] 图 7A 显示如实施例 3 中所述获得的,来自 *Euglena deses Ehr.* CCMP 2916 (Eug-M07-EL0#10) 的假定 Δ 9- 延伸酶的核苷酸序列(SEQ ID NO :17)。

[0043] 图 7B 显示如实施例 3 中所述获得的,通过来自 *Euglena deses Ehr.* CCMP 2916 (Eug-M07-EL0#10) 的假定 Δ 9- 延伸酶的核苷酸序列(SEQ ID NO :17)编码的预测氨基酸序列(SEQ ID NO :18)。

[0044] 图 8A 显示如实施例 3 中所述获得的,来自 *Euglena deses Ehr.* CCMP 2916 (Eug-M07-EL0#14) 的变体 Δ 9- 延伸酶的核苷酸序列(SEQ ID NO :19)。

[0045] 图 8B 显示如实施例 3 中所述获得的,通过来自 *Euglena deses Ehr.* CCMP 2916 (Eug-M07-EL0#14) 的变体 Δ 9- 延伸酶的核苷酸序列(SEQ ID NO :19)编码的预测氨基酸序列(SEQ ID NO :20)。

[0046] 图 9A 显示来自小鼠 Elov14 延伸酶的氨基酸序列(登记 # AAG47667 ;SEQ ID NO :21)。

[0047] 图 9B 显示来自人 ELOVL2 延伸酶的氨基酸序列(登记 # NP_060240 ;SEQ ID NO :22)。

[0048] 图 9C 显示来自秀丽隐杆线虫延伸酶的氨基酸序列(登记 # AF244356 ;SEQ ID NO :23)。

[0049] 公开内容详述

[0050] 本公开内容涉及来自类眼虫属物种,例如 *Euglena deses Ehr.*,特别是 *Euglena deses Ehr.* CCMP 2916 的 Δ 9- 延伸酶基因的核苷酸(例如基因)和翻译的氨基酸序列。此外,本公开内容还包括基因和由基因编码的酶的使用。例如,基因和相应酶可以用于产生多不饱和脂肪酸例如 ω 6-EDA、ω 3-EtrA、DGLA、ω 3-ETA、ARA、EPA、ω 3- 二十二碳五烯酸、ω 6- 二十二碳五烯酸、ADA、DHA 或其任何组合,其可以加入药物组合物、营养组合物和其他有价值产物中。

[0051] 定义

[0052] 如本文使用的,单数形式“一 (a,an)”和“该 (the)”包括复数参考,除非上下文另有明确说明。对于本文数目范围的叙述,明确考虑了具有相同精确度的在其中的每个插入数目。例如对于范围 6-9,除 6 和 9 外还考虑了数目 7 和 8,并且对于范围 6.0-7.0,明确考虑了数目 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 和 7.0。

[0053] 嵌合构建体:如本文使用的,短语“嵌合构建体”指在自然界中通常未发现在一起的核酸分子组合。相应地,嵌合构建体可以包含衍生自不同来源的调节序列和编码序列,或衍生自相同来源但以与自然界中天然发现的那种不同的方式排列的调节序列和编码序列。

[0054] 编码序列:如本文使用的,术语“编码序列”指编码特异性氨基酸序列的 DNA 序列。“调节序列”指这样的核苷酸序列,其位于编码序列上游(5' 非编码序列)、之内或下游(3'

非编码序列),并且影响所结合的编码序列的转录、RNA 加工或稳定性或翻译。调节序列可以包括但不限于启动子、翻译前导序列、内含子和多腺苷酸化识别序列。

[0055] 互补性:如本文使用的,术语“互补性”指在 2 个 DNA 区段之间的关联性程度。它通过测量在合适条件下,一个 DNA 区段的有义链与另一个 DNA 区段的反义链杂交以形成双螺旋的能力进行测定。在双螺旋中,腺嘌呤在一条链中出现,胸腺嘧啶在另一条链中出现。类似地,无论何处在一条链中发现鸟嘌呤,在另一条中发现胞嘧啶。2 个 DNA 区段的核苷酸序列之间的关联性越大,在 2 个 DNA 区段的链之间形成杂交双链体的能力越大。

[0056] 由……编码、杂交和严格条件:如本文使用的,短语“由……编码”指编码多肽序列的核酸序列,其中所述多肽序列或其部分含有来自由核酸序列编码的多肽的至少 3 个连续氨基酸、更优选至少 8 个连续氨基酸、并且更加优选至少 15 个连续氨基酸的氨基酸序列。

[0057] 本公开内容还涵盖分离的核苷酸序列,其编码具有 PUFA 延伸酶活性的酶,并且在中等严格条件下可与核酸杂交,所述核酸具有包含含有 SEQ ID NO :17 或 SEQ ID NO :19 的核苷酸序列或与之互补的核苷酸序列(图 7A 和 8A 中分别显示)。当在合适的温度和离子强度条件下,单链形式的核酸分子可以对其他核酸分子退火时,核酸分子是可与另一个核酸分子“杂交的”(参见 Sambrook 等人, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Second Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)。温度和离子强度的条件决定杂交的“严格”。“杂交”要求 2 个核酸含有互补序列。然而,取决于杂交的严格,可以出现在碱基之间的错配。关于杂交核酸的合适严格性取决于核酸的长度和互补程度。此类变量是本领域技术人员众所周知的。更具体而言,2 个核苷酸序列之间的相似性或同源性程度越大,关于具有那些序列的核酸杂交物的 T_m 值越大。对于长度大于 100 个核苷酸的杂交物,已衍生用于计算 T_m 的等式(参见, Sambrook 等人, 同上)。对于由较短核酸的杂交,错配的位置变得更重要,并且寡核苷酸的长度决定其特异性(参见, Sambrook 等人, 同上)。

[0058] 一般地,严格条件将是这样的,其中在 pH 7.0 – 8.3 盐浓度小于约 1.5 M Na 离子,一般约 0.01 – 1.0 M Na 离子浓度(或其他盐),并且温度对于短探针(例如 10 – 50 个核苷酸)是至少约 30°C 并且对于长探针(例如大于 50 个核苷酸)是至少约 60°C。严格条件还可以伴随去稳定剂例如甲酰胺的添加来达到。低严格条件的例子包括在 37°C 用 30 – 35% 甲酰胺、1 M NaCl、1% SDS (十二烷基硫酸钠) 的缓冲溶液杂交,和在 50 – 55°C 在 1 X – 2 X SSC (20 X SSC=3.0 M NaCl/0.3 M 柠檬酸三钠) 中洗涤。中等严格条件的例子包括在 37°C 在 40 – 45% 甲酰胺、1 M NaCl、1% SDS 中杂交,和在 55 – 60°C 在 0.5 X – 1 X SSC 中洗涤。高严格条件的例子包括在 37°C 在 50% 甲酰胺、1 M NaCl、1% SDS 中杂交,和在 60 – 65°C 在 0.1 X SSC 中洗涤。

[0059] 外显子:如本文使用的,术语“外显子”指基因序列的部分,其被转录且在衍生自基因的成熟信使 RNA 中发现,但不一定是编码最终基因产物的序列部分。

[0060] 表达、反义抑制和共阻抑:如本文使用的,术语“表达”指功能最终产物的产生。基因的表达涉及基因的转录和 mRNA 翻译成前体或成熟蛋白质。

[0061] 如本文使用的,短语“反义抑制”指能够阻抑靶蛋白质表达的反义 RNA 转录物的产生。

[0062] 如本文使用的,术语“共阻抑”指能够阻抑等同或基本上相似的外源或内源基因表

达的有义 RNA 转录物的产生(参见,美国专利号 5,231,020)。

[0063] 功能上等价的片段或子片段:在本文中可互换使用的术语“其在功能上等价的片段或子片段”和“功能上等价的片段或子片段”指分离的核酸分子的部分或子序列,其中无论片段或子片段是否编码活性酶,改变基因表达或产生一些表型的能力都被保留。例如,片段或子片段可以用于设计嵌合构建体,以在经转化的植物中产生所需表型。通过以相对于植物启动子序列合适的方向连接核酸片段或其子片段(无论它是否编码活性酶),可以设计嵌合构建体用于在共阻抑或反义抑制中使用。

[0064] 基因、天然基因、外源基因和转基因:如本文使用的,术语“基因”指表达特异性蛋白质的核酸分子,包括在编码序列前(5' 非编码序列)和后(3' 非编码序列)的调节序列。

[0065] 如本文使用的,短语“天然基因”指如在自然界中发现的具有其自身调节序列的基因。

[0066] “外源”基因指在宿主生物中通常未发现,但通过基因转移引入宿主生物内的基因。外源基因可以包含插入非天然生物内的天然基因或嵌合构建体。

[0067] 如本文使用的,术语“转基因”指已通过转化程序引入基因组内的基因。

[0068] 棉属(Gossypium)物种:如本文使用的,短语“棉属物种”指木本棉(*Gossypium arboreum*)、海島棉(*Gossypium barbadense*)、草棉(*Gossypium herbaceum*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、陆地棉陆地变种(*Gossypium hirsutum* var *hirsutum*)、*Gossypium hirsutum* var *marie-galante*、*Gossypium lapideum*、*Gossypium sturtianum*、*Gossypium thurberi*、*Gossypium thurberi*、夏威夷棉(*Gossypium tomentosum*) 或 *Gossypium tormentosum* 的任何植物。

[0069] 同源性:术语“同源性”、“同源的”、“基本上相似的”和“基本上对应的”在本文中可互换使用,并且指核酸分子,其中一个或多个核苷酸碱基中的变化不影响核酸分子介导基因表达或产生一些表型的能力。这些术语还指本公开内容的核酸分子的修饰,例如相对于起始、未经修饰的分子,基本上不改变所得到的核酸分子的功能性质的一个或多个核苷酸的缺失或插入。因此如本领域技术人员应当理解,公开内容涵盖超过具体示例性序列。

[0070] 宿主细胞:如本文使用的,短语“宿主细胞”意指包含本公开内容的分离的核酸序列或其片段的细胞。宿主细胞可以是原核细胞(例如大肠埃希杆菌(*Escherichia coli*)、蓝细菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*))或真核细胞(例如真菌、昆虫、植物或哺乳动物细胞)。

[0071] 可以使用的真菌细胞的例子是酵母菌属物种(*Saccharomyces* spp.)、假丝酵母属物种(*Candida* spp.)、油脂酵母属物种(*Lipomyces* spp.)、耶氏酵母属(*Yarrowia* spp.)、克鲁维酵母属物种(*Kluyveromyces* spp.)、汉逊酵母属物种(*Hansenula* spp.)、曲霉菌属物种(*Aspergillus* spp.)、青霉菌属物种(*Penicillium* spp.)、链孢霉属物种(*Neurospora* spp.)、木霉菌属物种(*Trichoderma* spp.)和毕赤酵母属物种(*Pichia* spp.)。特别优选的真菌细胞是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0072] 植物细胞可以是单子叶或双子叶植物细胞。特别优选的植物细胞来自油料种子植物例如大豆(*Glycine max*)(例如大豆)、芸苔属物种、红花(*Carthamus tinctorius L.*)(例如红花)、葵花(*Helianthus annuus*)(例如向日葵)、玉蜀黍(*Zea mays*)(例如玉蜀黍)、棉属物种(棉花)和亚麻(*Linum usitatissimum*)(例如亚麻)。

[0073] 同一性、序列同一性和序列同一性百分率(%同一性):当在核苷酸或多肽序列的背景中使用时,在本文中可互换使用的术语“同一性”或“序列同一性”指,当在指定比较窗上就最大限度对应比对时,在2个序列中相同的核酸碱基或氨基酸残基。因此,同一性定义为在2个DNA或多肽区段的相同链(有义或反义)之间的一致性、对应或等价程度。

[0074] “序列同一性百分率”或“%同一性”通过下述进行计算:在特定区域上比较2个最佳比对的序列,测定在其上等同碱基在2个序列中出现的位置数目,以便获得匹配位置数目,将此类位置数目除以待比较的区段中的总位置数目,并且将结果乘以100。序列的最佳比对可以通过下述进行计算:Smith & Waterman, *Appl. Math.* 2:482 (1981) 的算法, Needleman & Wunsch, J. *Mol. Biol.* 48:443 (1970) 的算法, Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:2444 (1988) 的方法和实现相关算法的计算机程序(例如 Higgins 等人, CABIOS. 5L151-153 (1989))、FASTDB (Intelligenetics)、BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul 等人, *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402 (1997))、PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) 或 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI)。(参见,美国专利号5,912,120)。序列同一性百分比的有用例子包括但不限于68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。这些同一性可以使用本文描述的任何程序进行测定。

[0075] 间接或直接地:如本文使用的,当与基因及其相应酶在多不饱和脂肪酸产生中的使用结合使用时,术语“间接地”涵盖这样的情况,其中第一种酸通过第一种酶(例如通过例如 $\Delta 9$ -延伸酶的LA至 $\omega 6$ -EDA)转换为第二种酸(即途径中间产物),且随后第二种酸通过使用第二种酶转换为第三种酸(例如通过例如 $\Delta 8$ -去饱和酶的 $\omega 6$ -EDA至DGLA)。

[0076] 如本文使用的,当与基因及其相应酶在多不饱和脂肪酸产生中的使用结合使用时,术语“直接地”涵盖其中酶直接将第一种酸转换为第二种酸的情况,其中第二种酸随后用于组合物中(例如通过例如 $\Delta 9$ -延伸酶的LA至 $\omega 6$ -EDA转换,或通过例如 $\Delta 8$ -去饱和酶的 $\omega 3$ -ETrA至 $\omega 3$ -ETA转换)。

[0077] 内含子:如本文使用的,术语“内含子”指在基因中不编码蛋白质序列部分的间插序列。因此,此类序列被转录成RNA且随后被切除并且不翻译。该术语还用于被切除的RNA序列。

[0078] 分离的:如本文使用的,术语“分离的”指使用本领域已知的常规技术,从其天然存在的环境或来源中取出的核酸分子(DNA或RNA)或蛋白质或其生物学活性部分(例如从细菌、藻类、真菌、植物、脊椎动物、哺乳动物等)。分离的核酸分子或蛋白质实质上或基本上不含通常伴随在其天然存在的环境中的核酸分子或蛋白质或与之相互作用的组分。

[0079] 分离的核酸片段或分离的核酸序列:如本文使用的,短语“分离的核酸片段”或“分离的核酸序列”指RNA或DNA的聚合物,其是单链或双链的,任选含有合成、非天然或改变的核苷酸碱基。DNA聚合物形式的分离的核酸片段可以由cDNA、基因组DNA或合成DNA的一个或多个区段组成。(指定多核苷酸的“片段”指这样的多核苷酸序列,其包含与指定核苷酸序列的区域等同或互补的大概至少约6个连续核苷酸、优选至少约8个连续核苷酸、更优选

至少约 10 个连续核苷酸、至少约 15 个连续核苷酸、至少约 20 个连续核苷酸、至少约 25 个连续核苷酸等的邻接序列)。核苷酸(通常以其 5' 单磷酸形式发现)通过其单字母指名如下提及：“A”用于腺苷酸或脱氧腺苷酸(分别用于 RNA 或 DNA),“C”用于胞苷酸或脱氧胞苷酸,“G”用于鸟苷酸或脱氧鸟苷酸,“U”用于尿苷酸,“T”用于脱氧胸苷酸,“R”用于嘌呤(A 或 G),“Y”用于嘧啶(C 或 T),“K”用于 G 或 T,“H”用于 A 或 C 或 T,“I”用于肌苷,和“N”用于任何核苷酸。

[0080] 成熟的和前体:如本文使用的,当与术语“蛋白质”结合使用时,术语“成熟的”指翻译后加工的多肽;即初级翻译产物中存在的任何前或原肽已从其中去除的那种。如本文使用的,当与术语“蛋白质”结合使用时,术语“前体”指 mRNA 的初级翻译产物;即仍存在前和原肽。前和原肽可以是但不限于细胞内定位信号。

[0081] 3' 非编码序列:如本文使用的,短语“3' 非编码序列”指位于编码序列下游且包括多腺苷酸化识别序列和其他序列的 DNA 序列,所述其他序列编码能够影响 mRNA 加工或基因表达的调节信号。多腺苷酸化信号通常特征在于影响多腺苷酸束对于 mRNA 前体的 3' 末端的添加。不同 3' 非编码序列的使用由 Ingelbrecht 等人,(1989) *Plant Cell* 1:671-680 示例。

[0082] 非天然存在的:如本文使用的,短语“非天然存在的”指其为人工的,与自然界中天然发现的那种不一致的某物。

[0083] 可操作地连接的:如本文使用的,短语“可操作地连接的”指核酸序列在单个核酸分子上的结合,从而使得一个的功能由另一个调节。例如,当启动子能够调节编码序列的表达时(即,编码序列在启动子的转录控制下),启动子与该编码序列是可操作地连接的。编码序列可以以有义或反义方向与调节序列可操作地连接。在另一个例子中,公开内容的互补 RNA 区可以直接或间接地在靶 mRNA 5'、或靶 mRNA 3',或在靶 mRNA 内可操作地连接,或第一个互补区对于靶 mRNA 是 5' 并且其互补体是 3'。

[0084] 植物:如本文使用的,术语“植物”指全植物、植物器官、植物组织、种子、植物细胞、种子及其后代。植物细胞包括但不限于来自种子、悬浮培养、胚胎、分生组织区域、愈伤组织、叶、根、枝条、配子体、孢子体、花粉和小孢子的细胞。

[0085] 聚合酶链反应或 PCR:如本文使用的,短语“聚合酶链反应”或“PCR”指用于合成大量特异性 DNA 区段的技术,由一系列重复循环组成(Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT)。一般地,使双链 DNA 热变性,使与靶区段的 3' 边界互补的 2 个引物在低温退火,且随后在中间温度延伸。一组这 3 个连续步骤被称为一个循环。

[0086] PCR 是在短时间段中,通过模板的反复复制,用于将 DNA 扩增数百万倍的有力技术(Mullis 等人, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273 (1986);Erlich 等人,欧洲专利申请 50,424;欧洲专利申请 84,796;欧洲专利申请 258,017,欧洲专利申请 237,362;Mullis,欧洲专利申请 201,184,Mullis 等人美国专利号 4,683,202;Erlich,美国专利号 4,582,788;和 Saiki 等人,美国专利号 4,683,194)。该过程利用特异性体外合成的寡核苷酸组,以引发 DNA 合成。引物的设计取决于希望进行分析的 DNA 的序列。该技术通过在高温使模板解链,允许引物对模板内的互补序列退火且随后用 DNA 聚合物复制模板的许多循环(通常 20-50)执行。PCR 反应的产物通过在琼脂糖凝胶中分离然后为溴化乙啶染色和用 UV 透视显现进行分析。可替代地,放射性 dNTP 可以加入 PCR 中,以便将标记掺入产

物内。在这种情况下,通过使凝胶暴露于 x 射线胶片显现 PCR 的产物。放射性标记的 PCR 产物的附加优点是可以定量个别扩增产物的水平。

[0087] 启动子和增强子:如本文使用的,术语“启动子”指能够控制编码序列或功能 RNA 表达的 DNA 序列。启动子序列由近端和更远端的上游元件组成,后一元件通常被称为增强子。

[0088] 如本文使用的,术语“增强子”指这样的 DNA 序列,其可以刺激启动子活性,并且可以是启动子的先天性元件或插入以增强启动子的水平或组织特异性的异源元件。启动子序列还可以位于基因的转录部分内和 / 或转录序列的下游。启动子可以以其整体衍生自天然基因,或可以由衍生自在自然界中发现的不同启动子的不同元件组成,或甚至包含合成 DNA 区段。本领域技术人员应当理解不同启动子可以指导在不同组织或细胞类型中、或在不同发育阶段或响应不同环境条件的基因表达。引起基因在大多数时间在大多数细胞类型中表达的启动子通常被称为“组成型启动子”。在植物细胞中有用的多个类型的新启动子不断被开发;众多例子可以在由 Okamuro 和 Goldberg, (1989)*Biochemistry of Plants* 15:1 82 的汇编中发现。进一步认识到因为在大多数情况下,调节序列的确切边界并未完全限定,所以某些变异的 DNA 分子可以具有等同启动子活性。

[0089] 重组体:如本文使用的,术语“重组体”指例如通过化学合成或通过由基因工程技术进行核酸分离区段的操作,2 个否则分离的序列区段的人工组合。

[0090] 重组构建体、表达构建体和重组表达构建体:短语“重组构建体”、“表达构建体”和“重组表达构建体”在本文中可互换使用,并且指遗传材料的功能单位,其可以使用本领域技术人员众所周知的标准方法插入细胞的基因组内。此类构建体可以是其自身或可以与载体结合使用。如果使用载体,那么载体的选择取决于将用于转化宿主植物的方法,如本领域技术人员众所周知的。例如,可以使用质粒载体。技术人员充分知道必须存在于载体上的遗传元件,以便成功转化、选择且繁殖包含公开内容的任何分离的核酸分子的宿主细胞。技术人员还将认识到不同独立转化事件将导致表达的不同水平和模式(Jones 等人,(1985)*EMBO J.* 4:2411 2418 ;De Almeida 等人,(1989)*Mol. Gen. Genetics* 218:78 86),并且因此必须筛选多重事件,以便获得展示出所需表达水平和模式的品系。此类筛选可以通过 DNA 的 DNA 分析、mRNA 表达的 RNA 分析、蛋白质表达的蛋白质分析或表型分析完成。

[0091] RNA 转录物、信使 RNA、cDNA、功能 RNA 和内源 RNA:如本文使用的,短语“RNA 转录物”指起因于 RNA 聚合酶催化的 DNA 序列转录的产物。当 RNA 转录物是 DNA 序列的完全互补拷贝时,它被称为初级转录物,或它可以是衍生自初级转录物的转录后加工的 RNA 序列,并且被称为成熟 RNA。

[0092] 如本文使用的,短语“信使 RNA (mRNA)”指不含内含子且可以通过细胞翻译成蛋白质的 RNA。

[0093] 如本文使用的,术语“cDNA”指与 mRNA 模板互补且使用酶逆转录酶由 mRNA 模板合成的 DNA。cDNA 可以是单链的或使用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 分子转换成双链形式。“有义”RNA 指包括 mRNA 且可以在细胞内或在体外翻译成蛋白质的 RNA 转录物。“反义 RNA”指与靶初级转录物或 mRNA 的全部或部分互补且阻断靶基因表达的 RNA 转录物(美国专利号 5,107,065)。反义 RNA 的互补性可以是对于特异性基因转录物的任何部分,即在 5' 非编码序列、3' 非编码序列、内含子或编码序列。

[0094] 如本文使用的,短语“功能 RNA”指反义 RNA、核酶 RNA、或可以不翻译但仍对细胞过程具有作用的其他 RNA。

[0095] 术语“互补体”和“反向互补体”在本文中就 mRNA 转录物而言是可互换使用的,并且意欲定义信使的反义 RNA。

[0096] 如本文使用的,短语“内源 RNA”指在用本公开内容的重组构建体转化前,由宿主的基因组中存在的任何核酸序列编码的任何 RNA,无论是天然存在还是非天然存在的,即通过重组方法、诱变等引入的。

[0097] 相似性:当指的是 2 个氨基酸序列、蛋白质或多肽之间的“相似性”时,术语“相似性”指 2 个序列中一系列等同以及保守氨基酸残基的存在。2 个氨基酸序列之间的相似性程度越高,2 个序列的对应、一致性或等价性越高。

[0098] 稳定转化、瞬时转化和转化:如本文使用的,短语“稳定转化”指核酸分子转移到宿主生物的基因组内,包括核和细胞器基因组,导致遗传上稳定的继承。

[0099] 相比之下,如本文使用的,短语“瞬时转化”指核酸分子转移到宿主生物的核或含 DNA 细胞器内,导致基因表达而无整合或稳定继承。含有经转化的核酸分子的宿主生物被称为“转基因”生物。稻、玉米和其他单子叶植物的细胞转化优选方法是使用粒子加速或“基因枪”转化技术(Klein 等人,(1987) *Nature* (London) 327:70-73;美国专利号 4,945,050),或使用含转基因的合适 Ti 质粒的土壤杆菌属介导的方法(Ishida Y. 等人,(1996) *Nature Biotech.* 14:745-750)。

[0100] 如本文使用的,术语“转化”指稳定转化和瞬时转化。

[0101] 翻译前导序列:如本文使用的,短语“翻译前导序列”指位于基因的启动子序列和编码序列之间的 DNA 序列。翻译前导序列存在于翻译起始序列上游的完全加工的 mRNA。翻译前导序列可以影响初级转录物至 mRNA 的加工、mRNA 稳定性或翻译效率。翻译前导序列的例子已得到描述(Turner, R. 和 Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3:225)。

[0102] 本文引用的所有专利、专利申请和优先权文件在此整体引入作为参考。

[0103] Δ9-延伸酶基因和由此编码的酶

[0104] 由本公开内容的 Δ9- 延伸酶基因编码的酶是经由替代 Δ8- 去饱和酶 / Δ9- 延伸酶途径,具有长度 20 个或更多个碳的长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)产生中必需的。分离的 *Euglena deses Ehr.* CCMP 2916 Δ9- 延伸酶基因的核苷酸序列显示于图 7A 中,并且相应蛋白质的预测氨基酸序列显示于图 7B 中。

[0105] 使用 Δ9- 延伸酶和 Δ8- 去饱和酶的 LA 至 DGLA 和 ALA 至 ω3-ETA 转换被称为替代 Δ8- 去饱和酶 / Δ9- 延伸酶途径。用于将 LA 转换为 DGLA 和 ALA 转换为 ω3-ETA 的常规 Δ6 途径分别利用 Δ6- 去饱和酶,以将 LA 转换为 GLA 和 ALA 转换为 SDA,和 Δ6- 延伸酶,以将 GLA 转换为 DGLA 和 SDA 转换为 ω3-ETA。在任一途径中,ARA 或 EPA 的产生随后通过例如 Δ5- 去饱和酶催化。例如, DHA 可以在 EPA 至 ω3- 二十二碳五烯酸(DPA) 和 ω3- 二十二碳五烯酸至 DHA 的转换后产生,分别利用例如 Δ5- 延伸酶和 Δ4- 去饱和酶。

[0106] 尽管例如 DGLA、ω3-ETA、ARA、EPA、ω3- 二十二碳五烯酸、ω6- 二十二碳五烯酸、ADA 和 / 或 DHA 可以经由替代 Δ8- 去饱和酶 / Δ9- 延伸酶途径或常规 Δ6 途径产生,但在一些情况下,替代 Δ8- 去饱和酶 / Δ9- 延伸酶途径可以优选超过常规 Δ6 途径。例如,

如果特定残留 ω -6 或 ω -3 脂肪酸中间产物例如 GLA 或 SDA 在 DGLA、 ω 3-ETA、ARA、EPA、 ω 3-二十二碳五烯酸、 ω 6-二十二碳五烯酸、ADA 和 / 或 DHA 的产生过程中是不需要的, 那么替代 Δ 8-去饱和酶 / Δ 9-延伸酶途径可以用作常规 Δ 6 途径的替代物, 以绕过 GLA 和 SDA 形成。

[0107] 如上所述, Δ 9-延伸酶是替代 Δ 8-去饱和酶 / Δ 9-延伸酶途径中的必需酶。例如, 如果没有 Δ 9-延伸酶基因和由此编码的酶, EPA 无法经由替代 Δ 8-去饱和酶 / Δ 9-延伸酶途径合成。如图 1 中所示, 本公开内容的分离的 Δ 9-延伸酶将例如 ALA 转换为 ω 3-ETrA 和 LA 转换为 ω 6-EDA。来自 ω 3-ETrA 的 ω 3-ETA 和来自 ω 3-ETA 的 EPA 产生随后分别通过例如 Δ 8-去饱和酶和 Δ 5-去饱和酶催化。由于使用替代 Δ 8-去饱和酶 / Δ 9-延伸酶途径, 中间产物 GLA 和 SDA 脂肪酸被绕过。

[0108] 应当指出本公开内容还涵盖具有这样的序列的核苷酸序列(和相应的编码蛋白质), 所述序列包含在序列(即与之具有序列同一性)SEQ ID NO:17(即,*Euglena deses Ehr.* CCMP 2916 的 Δ 9-延伸酶基因的分离的核苷酸序列)或 SEQ ID NO:19(即,*Euglena deses Ehr.* CCMP 2916 的变体 Δ 9-延伸酶基因)中的至少 68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 核苷酸、或由其组成或与之互补。此类序列可以来自人来源以及其他非人来源(例如秀丽隐杆线虫或小鼠)。

[0109] 此外, 本公开内容还涵盖包含 SEQ ID NO:17(显示于图 7A 中)或 SEQ ID NO:19(显示于图 8A 中)的核苷酸序列或由其组成的片段和衍生物, 以及来自其他来源且具有上述互补性或对应的序列。上述序列的功能等价物(即具有 Δ 9-延伸酶活性的序列)也由本公开内容涵盖。

[0110] 衍生自 SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:19 的片段可以具有这样的长度, 其包含 10 - 约 780 个核苷酸、10 - 约 700 个核苷酸、10 - 约 650 个核苷酸、10 - 约 500 个核苷酸、10 - 约 250 个核苷酸、10 - 约 100 个核苷酸、10 - 约 50 个核苷酸、或 15 - 40 个核苷酸, 或由其组成。在一个方面, SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:19 的片段编码具有 Δ 9-延伸酶活性的多肽。在另一个方面, SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:19 的片段可以用作引物和探针。制备引物和探针的方法是本领域技术人员众所周知的。此类引物和探针可以具有 10 - 50 个核苷酸、优选 15 - 40 个核苷酸的长度。

[0111] 本文还考虑了 SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:19 的核苷酸序列的变体。此类变体可以含有一个或多个碱基对添加、置换或缺失。由本公开内容涵盖的 SEQ ID NO:17 的核苷酸变体的非限制性例子显示于下表 A 中。SEQ ID NO:17 的变体的一个具体例子是 SEQ ID NO:19(参见图 8A)。

[0112] 表 A

[0113]

序列置换 (SEQ ID NO: 17 \Rightarrow SEQ ID NO: 19)	
GCT ₂₄	\Rightarrow GCC ₂₄
GC ₈₃ C	\Rightarrow GT ₈₃ C
G ₂₃₂ TA	\Rightarrow A ₂₃₂ TA
A ₃₀₁ TG	\Rightarrow T ₃₀₁ TG
C ₃₁₀ TC	\Rightarrow A ₃₁₀ TC
ACA ₆₃₀	\Rightarrow ACT ₆₃₀
AAA ₇₅₀	\Rightarrow AAG ₇₅₀

[0114] 本公开内容还涵盖来自其他来源,且具有对于 SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:19 的上述互补性或对应的核苷酸序列。SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:19 的功能等价物(即具有 $\Delta 9-$ 延伸酶活性的序列)也由本公开内容涵盖。

[0115] 本公开内容还涵盖编码具有 $\Delta 9-$ 延伸酶活性的多肽的核苷酸序列或其片段,其中所述多肽的氨基酸序列与包含 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列具有至少 68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99% 序列同一性。此类序列可以来自人来源以及其他非人来源(例如秀丽隐杆线虫或小鼠)。

[0116] 本公开内容还包括分离的和 / 或纯化的多肽,其延伸在碳 9 位置上含有不饱和的多不饱和脂肪酸(即具有 $\Delta 9-$ 延伸酶活性),并且与氨基酸序列(即 SEQ ID NO:18 (显示于图 7B 中)或 SEQ ID NO:20 (显示于图 8B 中))具有至少 68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99% 相似性或同一性。具体而言,本公开内容包括具有 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列的纯化多肽。

[0117] 本文还考虑了具有 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:20 的序列的多肽片段。此类片段可以具有包含 10 - 约 260 个连续氨基酸、10 - 约 200 个连续氨基酸、10 - 约 100 个连续氨基酸、10 - 约 50 个连续氨基酸、10 - 约 40 个连续氨基酸、10 - 约 30 个连续氨基酸、或 10 - 约 20 个连续氨基酸,或由其组成的长度。

[0118] 本文还考虑了具有 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:20 的序列的多肽的变体。此类变体可以含有一个或多个氨基酸添加、置换或缺失。由本公开内容涵盖的 SEQ ID NO:18 的氨基酸变体的非限制性例子显示于下表 B 中。SEQ ID NO:18 的变体的一个具体例子是 SEQ ID NO:20 (参见图 8B)。

[0119]

氨基酸置换 (SEQ ID NO: 18 ⇒ SEQ ID NO: 20)	
A ₂₈	⇒ V ₂₈
V ₇₈	⇒ I ₇₈
M ₁₀₁	⇒ L ₁₀₁
L ₁₀₁	⇒ I ₁₀₁

[0120] Δ 9- 延伸酶的产生

[0121] 一旦已分离和 / 或纯化编码 Δ 9- 延伸酶的核酸(例如基因), 它随后就可以通过使用载体或构建体引入原核或真核宿主细胞内。载体例如噬菌体、粘粒或质粒可以包含编码 Δ 9- 延伸酶的核苷酸序列, 以及在宿主细胞中起作用且能够引发由核苷酸序列编码的 Δ 9- 延伸酶表达的任何调节序列(例如启动子)。调节序列与核苷酸序列处于可操作的结合中或与之可操作地连接。(如上所述, 如果调节序列影响编码序列的转录或表达, 那么调节被说成与编码序列“可操作地连接”。)合适启动子包括例如来自编码醇脱氢酶、3- 磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸葡萄糖异构酶、磷酸甘油酸激酶、酸性磷酸酶、T7、TPI、乳酸酶、金属硫蛋白、巨细胞病毒立即早期、乳清酸性蛋白质、葡萄糖淀粉酶的基因的那些, 和在半乳糖的存在下激活的启动子例如 GAL1 和 GAL10。此外, 在载体内还可以包括编码其他蛋白质、寡糖、脂质等的核苷酸序列, 以及其他调节序列例如多聚腺苷酸化信号(例如 SV-40T- 抗原的多腺苷酸信号、卵白蛋白或牛生长激素)。构建体中存在的序列的选择取决于所需表达产物以及宿主细胞的性质。

[0122] 如上所述, 一旦已构建载体, 它随后就可以通过本领域普通技术人员已知的方法引入选择的宿主细胞内, 包括例如转染、转化和电穿孔(参见 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, 第 1-3 卷, 编辑 Sambrook 等人, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。宿主细胞随后在允许基因表达的合适条件下培养, 导致所需 PUFA 的产生, 其随后使用本领域已知的常规技术进行回收且纯化。

[0123] 合适的原核宿主细胞的例子包括但不限于细菌例如大肠埃希杆菌、枯草芽孢杆菌以及蓝细菌例如螺旋藻属物种 (*Spirulina spp.*) (即蓝绿藻)。真核细胞可以是例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞或真菌细胞。真菌细胞可以是例如酵母菌属物种、假丝酵母属物种、油脂酵母属物种、耶氏酵母属、曲霉菌属物种、青霉菌属物种、链孢霉属物种、克鲁维酵母属物种、汉逊酵母属物种、木霉菌属物种或毕赤酵母属物种。特别地, 真菌细胞可以是酵母细胞例如酵母菌属物种、假丝酵母属物种、汉逊酵母属物种和毕赤酵母属物种。酵母细胞还可以是酿酒酵母。植物细胞包括但不限于来自油料种子植物的植物细胞, 所述油料种子植物例如大豆(例如大豆)、芸苔属物种、红花(例如红花)、葵花(例如向日葵)、玉蜀黍(例如玉蜀黍)、棉属物种(棉花)和亚麻(例如亚麻)。

[0124] 在宿主细胞中的表达可以以瞬时或稳定方式完成。瞬时表达可以由含有在宿主细胞中起作用的表达信号的所引入的构建体发生, 但所述构建体在宿主细胞中不复制且很少整合, 或其中宿主细胞不繁殖。瞬时表达还可以通过诱导与目的基因可操作地连接的可调节启动子的活性来完成, 尽管这些可诱导系统频繁显示出低基础水平的表达。稳定表达可以通过构建体的引入来达到, 所述构建体可以整合到宿主基因组内或在宿主细胞中自主复

制。目的基因的稳定表达可以通过下述进行选择：使用位于表达构建体上的可选标记或与表达构建体一起转染的可选标记，随后选择表达标记的细胞。当稳定表达起因于整合时，构建体的整合位点可以在宿主基因组内随机发生或可以通过使用构建体靶向，所述构建体含有与宿主基因组具有足够同源性的区域，以与宿主基因座靶向重组。当构建体靶向内源基因座时，所有或某些转录和翻译调节区可以通过内源基因座提供。

[0125] 还可以使用转基因哺乳动物，以便表达 $\Delta 9-$ 延伸酶和最终一种或多种目的 PUFA。更具体而言，一旦产生上述构建体，它随后就可以插入胚胎的原核内。胚胎随后可以植入雌性接受者内。可替代地，还可以利用核转移方法 (Schnieke, 等人, *Science* 278:2130-2133 (1997))。随后允许妊娠和出生(参见例如，美国专利号 5,750,176 和美国专利号 5,700,671)。与在非转基因动物中通常发现的水平比较，来自后代的乳、组织或其他液体样品随后应含有改变水平的 PUFA。可以监控后续代关于改变或增强水平的 PUFA 的产生，和从而编码所需去饱和酶的基因掺入其基因组内。用作宿主的哺乳动物可以选自例如小鼠、大鼠、兔、猪、山羊、绵羊、马和牛。然而，可以使用任何哺乳动物，前提是它具有将编码目的酶的 DNA 掺入其基因组内的能力。

[0126] 对于 $\Delta 9-$ 延伸酶多肽的表达，功能转录和翻译起始和终止区与编码延伸酶多肽的 DNA 可操作地连接。转录和翻译起始和终止区衍生自多个非排外的来源，包括待表达的 DNA、已知或怀疑能够在所需系统中表达的基因、表达载体、化学合成、或来自宿主细胞中的内源基因座。在植物组织和 / 或植物部分中的表达呈现一些效率，特别是当组织或部分是早期收获的那种，例如种子、叶、果实、花、根等。通过利用特异性调节序列，例如美国专利号 5,463,174、4,943,674、5,106,739、5,175,095、5,420,034、5,188,958 和 5,589,379 的那些，表达可以靶向植物的那个定位。

[0127] 可替代地，所表达的蛋白质可以是产生产物的酶，所述产物可以直接或在修饰后掺入来自宿主植物的液体部分内。 $\Delta 9-$ 延伸酶或反义 $\Delta 9-$ 延伸酶转录物的表达可以改变在植物部分和 / 或植物组织中发现的特异性 PUFA 或其衍生物的水平。

[0128] $\Delta 9-$ 延伸酶多肽编码区可以单独或与其他基因(例如编码 $\Delta 8-$ 去饱和酶的基因、编码 $\Delta 5-$ 去饱和酶的基因、编码 $\Delta 17-$ 去饱和酶的基因、编码 $\Delta 5-$ 延伸酶的基因和 / 或编码 $\Delta 4-$ 去饱和酶的基因)一起表达，以便产生含有更高比例的所需 PUFA 的组织和 / 或植物部分，或其中 PUFA 组成更紧密类似人母乳的那种(参见 WO 95/24494)。终止区可以衍生自从其中获得起始区的基因的 3' 区或衍生自不同基因。大量终止区在来自相同和不同属和物种的多种宿主中是已知的并且已发现是令人满意的。终止区通常为方便起见而不是由于任何特定性质进行选择。

[0129] 如上所述，植物(例如大豆(大豆)或欧洲油菜(*Brassica napus*) (芸苔))或植物组织也可以分别用作宿主或宿主细胞，用于表达 $\Delta 9-$ 延伸酶，其进而可以用于产生多不饱和脂肪酸。更具体而言，所需 PUFA 可以在种子中表达。分离种子油的方法是本领域已知的。因此，除提供关于 PUFA 的来源外，种子油组分可以通过 $\Delta 9-$ 延伸酶基因以及可能去饱和酶基因(例如 $\Delta 8-$ 去饱和酶、 $\Delta 17-$ 去饱和酶、 $\Delta 5-$ 去饱和酶、 $\Delta 4-$ 去饱和酶等)和其他延伸酶基因(例如 $\Delta 5-$ 延伸酶等)的表达进行操作，以便提供可以加入营养组合物、药物组合物、动物饲料和化妆品中的种子油。再一次，在对于 $\Delta 9-$ 延伸酶表达足够的时间和条件下，将包含与启动子可操作地连接的编码 $\Delta 9-$ 延伸酶的 DNA 序列的载体引入植物组织或植物内。载

体还可以包含编码其他酶的一种或多种基因,例如 $\Delta 4-$ 去饱和酶、 $\Delta 5-$ 去饱和酶、 $\Delta 6-$ 去饱和酶、 $\Delta 10-$ 去饱和酶、 $\Delta 12-$ 去饱和酶、 $\Delta 15-$ 去饱和酶、 $\Delta 17-$ 去饱和酶、 $\Delta 19-$ 去饱和酶、 $\Delta 6-$ 延伸酶和 / 或 $\Delta 5-$ 延伸酶。植物组织或植物可以产生酶作用于其上的相关底物,或编码产生此类底物的酶的载体可以引入植物组织、植物细胞或植物内。此外,底物可以喷射在表达合适酶的植物组织上。使用这些多样技术,通过使用植物细胞、植物组织或植物可以产生 PUFA。还应当指出本公开内容还涵盖包含上述载体的转基因植物,其中载体的核苷酸序列的表达导致在例如转基因植物的种子中的多不饱和脂肪酸产生。

[0130] 来自单一植物原生质体转化体或来自多个转化外植体的植物的再生、发育和培养是本领域众所周知的(Weissbach 和 Weissbach, In :*Methods for Plant Molecular Biology*, (编辑), Academic Press, Inc. San Diego, CA, (1988))。这种再生和生长过程一般包括步骤:选择转化细胞,培养这些个别化细胞通过胚胎发育的通常阶段直到生根小植株阶段。转基因胚胎和种子类似地进行再生。所得到的转基因生根的枝条其后种植在合适的植物生长介质例如土壤中。

[0131] 含有编码目的蛋白质的外源、内源基因的植物的发育或再生是本领域众所周知的。优选地,使再生的植物自花授粉以提供纯合的转基因植物。否则,使得自再生植物的花粉与农业上重要品系的种子生长植物杂交。相反地,来自这些重要品系的植物的花粉用于给再生植物授粉。含有所需多肽的本公开内容的转基因植物使用本领域技术人员众所周知的方法进行培养。

[0132] 存在用于由植物组织再生植物的多种方法。具体再生方法将取决于起始植物组织和待再生的特定植物物种。

[0133] 主要通过使用根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)用于转化双子叶植物且获得转基因植物的方法已对于下述得到公开:棉花(美国专利号 5,004,863、美国专利号 5,159,135、美国专利号 5,518,908);大豆(美国专利号 5,569,834,美国专利号 5,416,011, McCabe 等人,*BioTechnology* 6:923 (1988), Christou 等人,*Plant Physiol.* 87:671 674 (1988));芸苔属(美国专利号 5,463,174);花生(Cheng 等人,*Plant Cell Rep.* 15:653 657 (1996), McKently, 等人, *Plant Cell Rep.* 14:699 703 (1995));番木瓜;和豌豆(Grant 等人,*Plant Cell Rep.* 15:254 258, (1995))。

[0134] 使用电穿孔、粒子轰击和土壤杆菌属的单子叶植物转化也已得到报道。转化和植物再生已在下述中达到:芦笋(Bytebier 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84:5354, (1987));大麦(Wan 和 Lemaux, *Plant Physiol.* 104:37 (1994));玉蜀黍(Rhodes 等人, *Science* 240:204 (1988), Gordon-Kamm 等人, *Plant Cell* 2:603 618 (1990), Fromm 等人, *BioTechnology* 8:833 (1990), Koziel 等人, *BioTechnology* 11:194, (1993), Armstrong 等人, *Crop Science* 35:550 557 (1995));燕麦(Somers 等人, *BioTechnology* 10:15 89 (1992));果园草(Horn 等人, *Plant Cell Rep.* 7:469 (1988));稻(Toriyama 等人, *Theor Appl. Genet.* 205:34, (1986);Part 等人, *Plant Mol. Biol.* 32:1135 1148, (1996);Abedinia 等人, *Aust. J. Plant Physiol.* 24:133 141(1997);Zhang 和 Wu, *Theor. Appl. Genet.* 76:835 (1988);Zhang 等人 *Plant Cell Rep.* 7:379, (1988);Battraw 和 Hall, *Plant Sci.* 86:191 202 (1992);Christou 等人, *Bio/Technology* 9:957 (1991));黑麦(De la Pena 等人, *Nature* 325:274 (1987));甘蔗(Bower 和 Birch, *Plant J.* 2:409

(1992));高羊茅(Wang 等人, *BioTechnology* 10:691 (1992)),和小麦(Vasil 等人, *Bio/Technology* 10:667 (1992);美国专利号 5,631,152)。

[0135] 通过经由聚乙二醇处理、电穿孔或粒子轰击将核酸分子引入植物细胞内,已开发了基于克隆的核酸构建体的瞬时表达的用于基因表达的测定(Marcotte 等人, *Nature* 335:454 457 (1988);Marcotte 等人, *Plant Cell* 1:523 532 (1989);McCarty 等人, *Cell* 66:895 905 (1991);Hattori 等人, *Genes Dev.* 6:609 618 (1992);Goff 等人, *EMBO J.* 9:2517 2522 (1990))。

[0136] 瞬时表达系统可以用于功能上剖析基因构建体(一般参见, Maliga 等人, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press (1995))。应当理解本公开内容的任何核酸分子可以以永久或瞬时方式与其他遗传元件例如载体、启动子、增强子等组合引入植物细胞内。

[0137] 除上文讨论的程序外,从业者熟悉标准资源材料,其描述用于大分子(例如 DNA 分子、质粒等)的构建、操作和分离,重组生物的生成以及克隆的筛选和分离的具体条件和程序(参见例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1989);Maliga 等人, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press (1995);Birren 等人, *Genome Analysis :Detecting Genes*, 1, Cold Spring Harbor, New York (1998);Birren 等人, *Genome Analysis :Analyzing DNA*, 2, Cold Spring Harbor, New York (1998);*Plant Molecular Biology :A Laboratory Manual*, 编辑 Clark, Springer, New York (1997))。

[0138] 可以通过宿主细胞天然或转基因产生的底物以及可以由载体中存在的 DNA 序列编码的酶显示于图 1 中,所述载体以后引入宿主细胞内。

[0139] 考虑到上文,本公开内容涵盖产生 $\Delta 9-$ 延伸酶的方法,其包含步骤:1) 分离包含编码 $\Delta 9-$ 延伸酶的核苷酸序列(例如选自 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:19 的核苷酸序列)的至少 68% 或与之互补的核苷酸序列;2) 构建包含与调节序列可操作地连接的核苷酸序列的表达载体;和 3) 在足以产生 $\Delta 9-$ 延伸酶的时间和条件下,将载体引入宿主细胞内。

[0140] 本公开内容还涵盖产生多不饱和脂肪酸的方法。在一个方面,该方法涉及:1) 分离包含编码 $\Delta 9-$ 延伸酶的核苷酸序列(例如选自 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:19 的核苷酸序列)的至少 68% 或与之互补的核苷酸序列;2) 构建包含与调节序列可操作地连接的核苷酸序列的表达载体;3) 在足以产生 $\Delta 9-$ 延伸酶的时间和条件下,将表达载体引入宿主细胞内;和 4) 使所表达的 $\Delta 9-$ 延伸酶暴露于底物多不饱和脂肪酸,以便将底物多不饱和脂肪酸转换为第一种产物多不饱和脂肪酸。底物 PUFA 的例子包括 LA、ALA 及其组合。可以通过这种方法产生的第一种产物多不饱和脂肪酸的例子是 $\omega 6$ -EDA, $\omega 3$ -ETrA, 或 $\omega 6$ -EDA 和 $\omega 3$ -ETrA。例如,当 LA 暴露于 $\Delta 9-$ 延伸酶时,它被转换为 $\omega 6$ -EDA。在另一个例子中,当 ALA 暴露于 $\Delta 9-$ 延伸酶时,它被转换为 $\omega 3$ -ETrA。

[0141] 该方法可以进一步涉及一个或多个步骤:使第一种产物多不饱和脂肪酸暴露于至少一种去饱和酶、至少一种另外的延伸酶或其组合,和任选重复这个步骤(即,使第二种或后续产物多不饱和脂肪酸暴露于去饱和酶或延伸酶(这可以与任何先前使用的去饱和酶或延伸酶相同或不同),以将第一种产物多不饱和脂肪酸转换为第二种或后续(例如第三种、第四种、第五种、第六种等)产物多不饱和脂肪酸)。这个步骤可以根据需要重复多次,直至

获得所需产物多不饱和脂肪酸。例如,如果第一种产物多不饱和脂肪酸是 ω 6-EDA,那么该方法可以进一步包含使 ω 6-EDA 暴露于例如 Δ 8-去饱和酶,其将 ω 6-EDA 转换为 DGLA(第二种产物多不饱和脂肪酸)。DGLA 随后可以任选通过使 DGLA 暴露于例如 Δ 5-去饱和酶转换为 ARA(第三种产物多不饱和脂肪酸)。ARA 随后可以暴露于 Δ 17-去饱和酶,以产生 EPA(第四种产物多不饱和脂肪酸)。再进一步地,任选地 EPA 可以暴露于 Δ 5-延伸酶,以产生 DPA(第五种产物多不饱和脂肪酸)。DPA 随后可以任选暴露于 Δ 4-去饱和酶,以产生 DHA(第六种产物多不饱和脂肪酸)。在另一个例子中,如果第一种产物多不饱和脂肪酸是 ω 3-ETrA,那么该方法可以进一步包含使 ω 3-ETrA 暴露于例如 Δ 8-去饱和酶,其将 ω 3-ETrA 转换为 ETA(第二种产物多不饱和脂肪酸)。ETA 随后可以通过使 ETA 暴露于例如 Δ 5-去饱和酶转换为 EPA(第三种产物多不饱和脂肪酸)。EPA 可以进一步转换为如上所述的其他多不饱和脂肪酸。

[0142] 在另一个方面,该方法涉及:1) 分离包含编码 Δ 9-延伸酶的核苷酸序列(例如选自 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:19 的核苷酸序列)的至少 68%或与之互补的核苷酸序列;2) 构建包含与调节序列可操作地连接的分离的核苷酸序列的表达载体;3) 在足以表达 Δ 9-延伸酶和 Δ 8-去饱和酶的时间和条件下,将表达载体和包含分离的核苷酸序列的至少一种另外的重组 DNA 构建体引入宿主细胞内,所述分离的核苷酸序列编码 Δ 8-去饱和酶且与至少一种调节序列可操作地连接;和 4) 使所表达的 Δ 9-延伸酶和 Δ 8-去饱和酶暴露于选自 LA、ALA 及其组合的底物多不饱和脂肪酸,以便将底物多不饱和脂肪酸转换为第一种产物多不饱和脂肪酸。第一种产物多不饱和脂肪酸的例子包括 DGLA、 ω 3-ETA 及其组合。此外,该方法可以进一步涉及一个或多个步骤:使第一种产物多不饱和脂肪酸暴露于至少一种另外的去饱和酶或至少一种另外的延伸酶,和任选重复这个步骤(即,使第二种或后续产物多不饱和脂肪酸暴露于去饱和酶或延伸酶(这可以与先前使用的任何去饱和酶或延伸酶相同或不同)),以将第一种产物多不饱和脂肪酸(例如 DGLA 和 / 或 ω 3-ETA)转换为第二种或后续(例如第三种、第四种、第五种、第六种等)产物多不饱和脂肪酸。这个步骤可以根据需要重复多次,直至获得所需产物多不饱和脂肪酸。在一个方面,该方法进一步包括将重组 DNA 构建体引入宿主细胞内,所述重组 DNA 构建体包含与调节序列可操作地连接的编码 Δ 5-去饱和酶的分离的核苷酸序列。

[0143] 因此, Δ 9-延伸酶可以用于产生多不饱和脂肪酸,其进而可以用于特定有利目的,或可以用于产生其他 PUFA。

[0144] Δ 9-延伸酶基因的用途

[0145] 如上所述, Δ 9-延伸酶基因和由此编码的 Δ 9-延伸酶具有许多用途。例如,基因和相应酶可以间接或直接地用于产生多不饱和脂肪酸,例如 Δ 9-延伸酶可以用于产生 ω 6-EDA、 ω 3-ETrA、DGLA、 ω 3-ETA、ARA、EPA、 ω 3-二十二碳五烯酸、 ω 6-二十二碳五烯酸、ADA 和 / 或 DHA。“直接地”意欲涵盖其中酶直接将酸转换为另一种酸的情况,后面一种酸用于组合物中(例如 LA 至 ω 6-EDA 的转换)。“间接地”意欲涵盖这样的情况:其中酸通过酶转换为另一种酸(即,途径中间产物)(例如 LA 至 ω 6-EDA),并且随后后面一种酸通过使用非延伸酶转换为另一种酸(例如通过例如 Δ 8-去饱和酶的 ω 6-EDA 至 DGLA)。这些多不饱和脂肪酸(即,通过 Δ 9-延伸酶的活性直接或间接地产生的那些)可以加入例如营养组合物、药物组合物、化妆品和动物饲料中,所有这些由本公开内容涵盖。这些用途在下文详细描述。

[0146] 营养组合物

[0147] 本公开内容包括营养组合物。为了本公开内容的目的,此类组合物包括用于人消耗包括用于肠或肠胃外消耗的任何食物或制剂,当摄入体内时,其(a)作用于营养或建立组织或供应能量和 / 或(b)维持、恢复或支持足够的营养状态或代谢功能。

[0148] 本公开内容的营养组合物包含如本文描述的通过使用 $\Delta 9-$ 延伸酶基因直接或间接地产生的至少一种油或酸,并且可以为固体或液体形式。另外,组合物可以包括以对于特定用途所需量的食用常量营养素、维生素和矿物质。取决于组合物是预期用于正常、健康婴儿、儿童还是预期用于具有专门需要的成人,例如伴随一些代谢状况(例如代谢病症)的那些,此类成分的量将改变。

[0149] 可以加入组合物中的常量营养素的例子包括但不限于食用脂、碳水化合物和蛋白质。此类食用脂的例子包括但不限于椰子油、大豆油以及甘油单酯和二酯。此类碳水化合物的例子包括但不限于葡萄糖、食用乳糖和水解淀粉(search)。另外,可以用于公开内容的营养组合物中的蛋白质的例子包括但不限于大豆蛋白质、电渗析乳清、电渗析脱脂乳、乳清或这些蛋白质的水解产物。

[0150] 就维生素和矿物质而言,下述可以加入本公开内容的营养组合物中:钙,磷,钾,钠,氯化物,镁,锰,铁,铜,锌,硒,碘以及维生素 A、E、D、C 和 B 复合物。还可以加入其他此类维生素和矿物质。

[0151] 在本公开内容的营养组合物中利用的组分将具有半纯化或纯化的起源。半纯化或纯化的意指已通过天然材料的纯化或通过合成进行制备的材料。

[0152] 本公开内容的营养组合物的例子包括但不限于婴儿配方、饮食补充剂、饮食代替物、和再水合组合物。特别有利的营养组合物包括但不限于用于婴儿进行肠和肠胃外补充的那些,专门婴儿配方、用于老年人的补充剂、和用于具有胃肠困难和 / 或吸收不良的那些的补充剂。

[0153] 即使当不需要饮食的补充时,本公开内容的营养组合物也可以加入食物中。例如,组合物可以加入任何类型的食物中,包括但不限于人造黄油、改良黄油、干酪、乳、酸奶酪、巧克力、糖果、零食、色拉油、烹饪油、烹饪脂肪(cooking fats)、肉、鱼和饮料。

[0154] 在本公开内容的优选实施方案中,营养组合物是肠营养产物,更优选地,成人或儿科肠营养产物。这种组合物可以施用于经历应激或由于慢性或急性疾病状态具有专门需要的成人或儿童。除依照本公开内容产生的多不饱和脂肪酸外,组合物可以包含如上所述的常量营养素、维生素和矿物质。常量营养素可以以等价于人乳中那些的量存在,或在能量基础上即在根据热量的基础上存在。

[0155] 用于配制液体或固体肠和肠胃外营养配方的方法是本领域众所周知的。

[0156] 例如,肠配方可以进行灭菌且随后在现成饲养(RTF)基础上利用或贮存于浓缩液体或粉末中。粉末可以通过喷雾干燥如上所述制备的配方且通过再水合浓缩物重建其进行制备。成人和儿科营养配方是本领域众所周知的,且是商购可得的(例如来自 Ross Products Division, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio 的 Similac®、Ensure®、Jevity® 和 Alimentum®)。依照本公开内容产生的油或酸可以加入这些配方的任何中。

[0157] 当处于液体形式时,本公开内容的营养组合物的能量密度范围可以为约 0.6 Kcal - 约 3 Kcal/ml。当处于固体或粉末形式时,营养补充剂可以含有约 1.2 - 超过 9 Kcals/

克,优选约 3 - 7 Kcals/ 克。一般而言,液体产物的重量摩尔渗透压浓度应小于 700 mOsm,且更优选小于 660 mOsm。

[0158] 除依照本公开内容产生的 PUFA 外,如上所述,营养配方可以包括常量营养素、维生素和矿物质。这些另外组分的存在帮助个体摄入这些要素的每日最低需要量。除 PUFA 的提供外,还可以希望将锌、铜、叶酸和抗氧化剂加入组合物中。认为这些物质增强受应激的免疫系统,且将因此对接受组合物的个体提供进一步利益。药物组合物还可以补充有这些要素。

[0159] 在一个更优选的实施方案中,除抗氧化剂和至少一种 PUFA 外,营养组合物还包含碳水化合物的来源,其中至少 5 重量% 的碳水化合物是不消化的寡糖。在一个更优选的实施方案中,营养组合物另外包含蛋白质、牛磺酸和肉碱。

[0160] 如上所述,依照本公开内容产生的 PUFA 或其衍生物可以加入饮食代替物或补充剂中,特别是婴儿配方,用于经历静脉内饲养的患者或用于预防或治疗营养不良或其他状况或疾病状态。作为背景,应当指出人母乳具有包含约 0.15% - 约 0.36% 作为 DHA、约 0.03% - 约 0.13% 作为 EPA、约 0.30% - 约 0.88% 作为 ARA、约 0.22% - 约 0.67% 作为 DGLA、和约 0.27% - 约 1.04% 作为 GLA 的脂肪酸概况。因此,依照本公开内容产生的脂肪酸例如 ARA、EPA 和 / 或 DHA 可以用于改变例如婴儿配方的组成,以便更好地复制人母乳的 PUFA 含量或改变在非人哺乳动物的乳中通常发现的 PUFA 的存在。特别地,用于在药理学或食物补充剂特别是母乳代替物或补充剂中使用的组合物将优选包含 ARA、EPA、DGLA 和 DHA 中的一种或多种。更优选地,油将包含约 0.3 - 30% ARA、和约 0.2 - 30% DGLA。

[0161] 包含计算为甘油三酯的约 2 - 约 30 重量百分比脂肪酸的肠胃外营养组合物由本公开内容涵盖。可以任选包括其他维生素,特别是脂溶性维生素例如维生素 A、D、E 和 L- 肉碱。当需要时,防腐剂例如 α - 生育酚可以按重量计约 0.1% 的量加入。

[0162] 此外,ARA 和 DGLA 的比值可以适合于特定给定最终用途。当作为母乳补充剂或代替物配制时,包含 ARA、DGLA 和 GLA 中的一种或多种的组合物将分别以约 1:19:30 至约 6:1:0.2 的比值提供。例如,动物的母乳可以在范围为 1:19:30 至 6:1:0.2 的 ARA:DGLA:GLA 比值方面不同,这包括优选约 1:1:1、1:2:1、1:1:4 的中间产物比值。当一起在宿主细胞中产生时,调整前体底物例如 EDA 和 DGLA 至 ARA 的转换率和百分比可以用于精确控制 PUFA 比值。例如,DGLA 至 ARA 的 5% 至 10% 转换率可以用于产生约 1:19 的 ARA 至 DGLA 比值,而约 75% 至 80% 转换率可以用于产生约 6:1 的 ARA 至 DGLA 比值。因此,不论在细胞培养系统还是宿主动物中,调节延伸酶表达的时机、程度和特异性以及去饱和酶(例如但不限于 Δ8- 去饱和酶)和其他延伸酶的表达可以用于调节 PUFA 水平和比值。依照本公开内容产生的 PUFA/ 酸(例如 ARA 和 EPA)随后可以以所需浓度和比值与其他 PUFA/ 酸(例如 DGLA)组合。

[0163] 另外,依照本公开内容产生的 PUFA 或含有其的宿主细胞也可以用作动物食物补充剂,以将动物的组织或乳脂肪酸组成改变为对于人或动物消耗更希望的那种。

[0164] 采用依照本公开内容产生的多不饱和脂肪酸的某些营养补充剂、婴儿制剂、营养代替物和其他营养溶液的例子在下文描述。

[0165] 婴儿制剂:婴儿制剂的例子包括但不限于 somil® 含铁大豆配方(somil® Soy Formula with Iron)、用于腹泻的 Isomil® DF 大豆配方(Isomil® DF Soy Formula For

Diarrhea)、Isomil® Advance® 含铁大豆配方(Isomil® Advance® Soy Formula with Iron)、Isomil® Advance® 20 即食含铁大豆配方(Isomil® Advance® 20 Soy Formula With Iron Ready To Feed)、Similac® 婴儿配方(Similac® Infant Formula)、Similac® Advance® 含铁婴儿配方(Similac® Advance® Infant Formula with Iron)、Similac® NeoSure® Advance® 含铁婴儿配方(Similac® NeoSure® Advance® Infant Formula With Iron)、Similac 即食天然护理改善低铁人乳增强剂(Similac Natural Care Advance Low-Iron Human Milk Fortifier Ready To Use)，所有从 Abbott Nutrition (Columbus, OH) 商购可得。本公开内容的各种 PUFA 可以代替和 / 或加入本文描述的婴儿配方和本领域技术人员已知的其他婴儿配方中。

[0166] 营养制剂：营养制剂的例子包括但不限于 ENSURE®、高蛋白 ENSURE® (ENSURE® HIGH PROTEIN)、ENSURE PLUS®、ENSURE® 粉(ENSURE® POWDER)、ENSURE® 布丁(ENSURE® PUDDING)、含纤维 ENSURE® (ENSURE® WITH FIBER)、OxepaAbbott Nutrition (Columbus, OH) 商购可得。上文描述和本领域技术人员已知的各种营养补充剂可以由依照本公开内容产生的 PUFA 取代和 / 或补充有依照本公开内容产生的 PUFA。

[0167] 药物组合物

[0168] 本公开内容还涵盖包含依照本文描述的方法使用本文描述的 $\Delta 9$ -延伸酶基因产生的一种或多种酸和 / 或所得到的油的药物组合物。更具体而言，此类药物组合物可以包含一种或多种酸和 / 或油以及标准、众所周知、无毒的药学可接受的载体、佐剂或媒介物，例如磷酸盐缓冲盐水、水、乙醇、多元醇、植物油、湿润剂或乳剂例如水 / 油乳剂。组合物可以为液态或固体形式。例如，组合物可以为片剂、胶囊、可摄入液体或粉末、可注射或局部软膏或乳膏的形式。合适流动性可以例如通过下述得到维持：在分散体的情况下维持所需粒度和使用表面活性剂。还可能希望包括等渗剂，例如糖、氯化钠等。除此类惰性稀释剂外，组合物还可以包括佐剂，例如湿润剂、乳化和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂。

[0169] 除活性化合物外，悬液可以包含悬浮剂例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、氢氧化铝氧化物(aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂 - 琼脂和西黄蓍胶或这些物质的混合物。

[0170] 固体剂型例如片剂和胶囊可以使用本领域众所周知的技术进行制备。例如，依照本公开内容产生的 PUFA 可以用普通片剂基例如乳糖、蔗糖和玉米淀粉制成片剂，所述片剂基与粘合剂例如阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶，崩解剂例如马铃薯淀粉或海藻酸，和润滑剂例如硬脂酸或硬脂酸镁组合。胶囊可以通过将这些赋形剂连同抗氧化剂和一种或多种相关 PUFA 一起掺入明胶胶囊内进行制备。抗氧化剂和 PUFA 组分应符合上文呈现的指导。

[0171] 对于静脉内施用，依照本公开内容产生的 PUFA 或其衍生物可以掺入商业制剂例如 Intralipids 6.64 – 9.46% ARA、1.45 – 3.11% DGLA、和 0.02 – 0.08% GLA。这些 PUFA 或其代谢前体可以单独或与其他 PUFA 组合施用，以便达到患者中的正常脂肪酸概况。当需要时，制剂的个别组分可以以试剂盒形式个别提供，用于单次或多次使用。特定脂肪酸的一般剂量是每天 0.1 mg – 20 g (直到 100 g)，且优选每天 10 mg – 1、2、5 或 10 g。

[0172] 本公开内容的药物组合物的可能施用途径包括例如肠(例如经口和经直肠)和肠胃外。例如，液体制剂可以例如经口或经直肠施用。此外，同质混合物可以完全分散在水中，在无菌条件下与药学可接受的稀释剂、防腐剂、缓冲剂或抛射剂混合，以便形成喷雾剂或

吸入剂。

[0173] 当然,施用途径将取决于所需效应。例如,如果组合物待用于治疗粗糙、干燥或衰老皮肤,以治疗受损或烧伤皮肤,或治疗受疾病或状况影响的皮肤或毛发,那么它可能可以局部应用。

[0174] 待施用于患者的组合物的剂量可以通过普通技术人员进行测定,且取决于多种因素例如患者的重量、患者的年龄、患者的免疫状态等。

[0175] 就形式而言,组合物可以是例如溶液、分散体、悬液、乳剂或随后重建的无菌粉末。

[0176] 本公开内容还包括通过使用本文描述的药物和 / 或营养组合物治疗多种病症。特别地,本公开内容的组合物可以用于治疗血管成形术后的再狭窄。此外,炎症、类风湿性关节炎、哮喘和牛皮癣的症状还可以用本公开内容的组合物进行治疗。证据还指出 PUFA 可以涉及钙代谢;因此,本公开内容的组合物可能可以用于治疗或预防骨质疏松症和肾或泌尿道结石。

[0177] 另外,本公开内容的组合物还可以用于治疗癌症。恶性细胞已显示具有改变的脂肪酸组成。脂肪酸的添加已显示减缓其生长,引起细胞死亡且增加其对化学治疗剂的敏感性。此外,本公开内容的组合物还可以用于治疗与癌症相关的恶病质。

[0178] 本公开内容的组合物还可以用于治疗糖尿病(参见美国专利号 4,826,877 和 Horrobin 等人,*Am. J. Clin. Nutr.* 1993)第 57 卷(Suppl.)732S-737S)。改变的脂肪酸代谢和组成已在糖尿病动物中得到证实。

[0179] 此外,包含通过使用 $\Delta 9$ -延伸酶直接或间接地产生的 PUFA 的本公开内容的组合物还可以用于治疗湿疹、降低血压和改善数学检查得分。另外,本公开内容的组合物可以用于抑制血小板聚集、诱导血管舒张、降低胆固醇水平、抑制血管壁平滑肌和纤维组织增殖(Brenner 等人,*Adv. Exp. Med. Biol.* (1976)第 83 卷,第 85-101 页)、降低或预防胃肠出血和非甾体抗炎药的其他副作用(参见美国专利号 4,666,701)、预防或治疗子宫内膜异位症和经前期综合征(参见美国专利号 4,758,592)、和治疗病毒感染后的肌痛脑脊髓炎和慢性疲劳(参见美国专利号 5,116,871)。

[0180] 本公开内容的组合物的进一步用途包括在治疗 AIDS、多发性硬化和炎症皮肤病症中,以及用于维持一般健康的用途。

[0181] 另外,本公开内容的组合物可以用于化妆品目的。它可以加入预先存在的化妆品组合物,从而使得形成混合物或可以用作单独的组合物。

[0182] 兽医应用

[0183] 应当指出上述药物和营养组合物可以与动物(即,驯养或非驯养的)以及人有关地利用,因为动物经历与人相同的许多需要和状况。例如,本公开内容的油或酸可以用于动物或水产养殖饲料补充剂、动物饲料代替物、动物维生素或动物局部软膏中。

[0184] 本公开内容可以使用下述非限制性例子进行举例说明。

[0185] 实施例 1:来自 *Euglena deses Ehr.* CCMP 2916 的 cDNA 文库构建和序列分析,以分离假定的 $\Delta 9$ 延伸酶候选物

[0186] 某些海洋藻类的脂肪酸组成分析揭示相当大量的二十二碳六烯酸(DHA, 22:6 n-3)(按总脂质的重量计 15%)存在于*Euglenadeses Ehr.* CCMP 2916 中(参见表 1)。此外,这种生物展示出替代 $\Delta 8$ -去饱和酶 / $\Delta 9$ -延伸酶途径的中间产物(参见图 1),指示这个途

径在这种生物中是活性的。因此，预期这种生物将含有能够将亚油酸(LA, 18:2 n-6)转换为 ω 6-二十碳二烯酸(ω 6-EDA, 20:2 n-6)或 α -亚麻酸(ALA, 18:3, n-3)转换为 ω 3-二十碳三烯酸(ω 3-ETrA, 20:3n-3)的活性 Δ 9-延伸酶，以及将 ω 6-二十碳二烯酸(ω 6-EDA, 20:2 n-6)转换为二高 γ -亚麻酸(DGLA, 20:3 n-6)或 ω 3-二十碳三烯酸(ω 3-EtrA, 20:3n-3)转换为 ω 3-二十碳四烯酸(ω 3-ETA, 20:4n-3)的活性 Δ 8-去饱和酶(参见图1)。

[0187] 表1 :*Euglena deses* Ehr. CCMP 2916 的脂肪酸概况

[0188]

脂肪酸		%总脂质
硬脂酸	18:0	0.529
油酸	18:1 n-9	1.663
亚油酸(LA)	18:2 n-6	3.137
γ 亚麻酸(GLA)	18:3 n-6	0.096
α -亚麻酸(ALA)	18:3 n-3	16.515
十八碳四烯酸(SDA)	18:4 n-3	0.126
ω 6-二十碳二烯酸(EDA)	20:2 n-6	4.149
二高 γ -亚油酸(DGLA)	20:3 n-6	0.442
花生四烯酸(ARA)	20:4 n-6	3.719
ω 3-二十碳三烯酸(ω 3-ETrA)	20:3 n-3	1.984
ω 3-二十碳四烯酸(ω 3-ETA)	20:4 n-3	0.496
二十碳五烯酸(EPA)	20:5 n-3	7.104
肾上腺酸(ADA)	22:4 n-6	0.841
ω 6-二十二碳五烯酸(ω 6-DPA)	22:5 n-6	5.775
ω 3-二十二碳五烯酸(ω 3-DPA)	22:5 n-3	1.176
二十二碳六烯酸(DHA)	22:6 n-3	15.239

[0189] 这个研究的目的是从*Euglenadeses* Ehr. CCMP 2916 中分离全长 Δ 9-延伸酶基因，且通过在异源宿主酿酒酵母中表达表征其酶促活性。

[0190] 为了从*Euglenadeses* Ehr. CCMP 2916 中分离全长基因，使用从生物中分离的总 RNA 构建微小 cDNA 文库。为此，*Euglenadeses* Ehr. CCMP 2916 的细胞团块得自 Provasoli-Guillard-National Center for Marine Phytoplankton (CCMP-Bigelow Laboratories, West Boothbay, Maine)，并且根据制造商的方案，使用 Qiagen RNeasy Maxi 试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)，从其中分离总 RNA。简言之，使用研钵和研棒在液氮中压碎冷冻细胞团块，将其悬浮于 RLT 缓冲液(Qiagen RNeasy Plant Mini 试剂盒)中，并且经过 QiaShredder。根据制造商的方案，使用 RNeasy maxi 柱纯化 RNA。

[0191] 通过专有的技术使用来自*Euglenadeses* Ehr. CCMP 2916 的 50 μ g RNA，通过 Agencourt Biosciences (Waltham, MA) 构建微小 cDNA 文库。Agencourt 在第一链过程中使用几个独特和专有的步骤，这最终获得相对于常用技术 25 - 30% 增加的效率。在专有的过程期间，使用设计为减少或消除内部引发事件的条件，将 RNA 逆转录为 ssDNA。这个和专门循环程序的组合增加全长克隆的数目。在第二链合成后，cDNA 克隆随后以大于 1.2kb 进行大小选择，以减少小的、截短 cDNA 的优先克隆。对于大插入片段文库，选择的插入片段大小是 >4kb，以对于更大的插入片段克隆增强。在大小选择后，将 cDNA 末端磨光(polish)且

使用稀有切割酶消化 cDNA。在 cDNA 引发步骤过程中将关于其的位点引入克隆内的“稀有切点(rare-cutter)”限制性酶随后用于制备克隆用于直接克隆到 pAGEN 载体内。与利用沿着克隆以随机间隔切割的更普通的限制性酶的其他 cDNA 文库构建过程比较,“稀有切点”限制性酶在 cDNA 克隆内切割的可能性为 20 倍低,从而获得许多更全长的克隆。结果是具有由稀有切割限制性酶产生的 5' 平端和 3' 突出端的插入片段。由于这个过程,不需要另外的衔接子连接,以确保定向克隆。这改善克隆过程的总体效率。将载体专门改造用于定向克隆而无需使用 5' 衔接子,由于在克隆过程中减少数目的 cDNA 操作,进一步增强转化效率。在初级 cDNA 文库完成后,它就独立克隆的数目、重组克隆百分率和平均插入片段大小进行测试。

[0192] 随后将克隆转化到 DH10B 大肠杆菌(*E. coli*) (T1 噬菌体抗性细菌细胞) 内。所得到的文库的滴度是 3.2×10^6 cfu/ml, 具有 1.3 kb 平均插入片段大小的 3.52×10^7 的独立克隆数目。

[0193] 将来自这个 cDNA 文库的 4224 个克隆进行测序,并且使用 BLAST 分析载体修剪的序列,以鉴定与已知 Δ9- 延伸酶序列具有同源性的序列。BLAST 分析揭示来自 *Euglenadeses Ehr. CCMP 2916* cDNA 文库的 5 个假定命中,与来自下述的已知 Δ9- 延伸酶序列具有同源性:盐生巴夫藻(登记 # AAY15135 ;SEQ ID NO :1 ;图 4A)、球等鞭金藻(登记 #AF390174 ;SEQ ID NO :2 ;图 4B)、裸藻属物种(参见 WO 2007/061845 A2 ;SEQ ID NO :3 ;图 4C)、小眼虫(登记 # CAT16687 ;SEQ ID NO :4 ;图 4D)、和 *Euglena anabena* (参见 WO 2008/0194685 A1 ;SEQ ID NO :5 ;图 4E)。

[0194] 得自来自 *Euglenadeses Ehr. CCMP 2916* cDNA 文库的测序克隆,指定为‘plate2_M07’(SEQ ID NO :6 ;图 5A)的一个 EST 克隆显示与先前鉴定的 Δ9- 延伸酶的高序列同源性。这个 DNA 片段长度是 744 bp,并且它的推导氨基酸序列(SEQ ID NO :7 ;图 5B)展示出与来自小眼虫的 Δ9- 延伸酶(SEQ ID NO :4)的最高序列同一性(66% 氨基酸序列同一性)。基于与其他 Δ9- 延伸酶的比对,plate2_M07 基因片段看起来含有基因的‘ATG’起始位点,但不含有假定 *Euglenadeses Ehr. CCMP 2916* Δ9- 延伸酶的 3' 末端。

[0195] 实施例 2:来自 *Euglena deses Ehr. CCMP 2916* 的 plate2_M07 延伸酶的 3' 末端的分离

[0196] 来自实施例 1 的 plate2_M07 克隆序列用作模板以分离其 3' 末端。

[0197] 根据制造商的说明书,使用 SMART RACE 试剂盒(BD Biosciences)合成第一链 cDNA。对于 3' RACE- 现成 cDNA 的合成,将来自 *Euglenadeses Ehr. CCMP 2916* 的 1.5 μg 总 RNA 和 1 μl 3' CDS 引物(5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC (T)₃₀VN-3', 其中 N = A、C、G 或 T;并且 V = A、G 或 C (SEQ ID NO :8)) (12 μM) 在无核酸酶 PCR 管中以 5 μl 的总体积混合,在 70°C 温育 2 分钟,并且在冰上速冻(snap-chilled)。在短暂离心后,将 2 μl 5X 第一链缓冲液 [250 mM Tris-HCl (pH-8.3)、375 mM KCl 和 30 mM MgCl₂]、1 μl 0.1 M DTT 和 1 μl 10 mM dNTP 混合物加入管中。在 42°C 温育 2 分钟后,将 1 μl 逆转录酶(PowerScript RT, BD Biosciences)加入管中,并且在 42°C 温育 90 分钟。第一链 cDNA 在 100 μl Tricine-EDTA 缓冲液 [10 mM Tricine-KOH (pH 8.5)、1.0 mM EDTA] 中稀释,并且酶在 72°C 热灭活 7 分钟。

[0198] 为了分离类眼虫属物种延伸酶基因片段(即 plate2_M07 克隆序列)的 3' 末端,基

于来自 plate2_M07 的部分基因序列的序列信息设计引物。使用 3' - RACE 现成 cDNA 作为模板和下述引物执行初级 PCR 扩增 :Eug Elo M0-7 FP1 (基因特异性引物) (5' -AGG CGC TGT GGA TCT TCG TCT TCC -3') (SEQ ID NO :9), 与 RACE 引物 Universal Primer Mix A (UPM, BD Biosciences) 组合 :

[0199] 长引物(0.4 μ M) :5' - CTA ATA CGA CTC ACT ATA GCA AGC AGT GGT ATC AAC GCA GAG T-3' (SEQ ID NO :10); 和

[0200] 短引物(2 μ M) :5' - CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C -3' (SEQ ID NO :11)。

[0201] 在 25 μ l 的最终反应体积中, 使用 0.25 μ l(100 mM) 基因特异性引物、0.25 μ l(100 mM) UPM 引物、2.5 μ l cDNA 模板、2.5 μ l 2.5 mM dNTP、5 μ l 5X PCR Buffer (Advantage[®] GC II 聚合酶缓冲液(Clontech)、200 mM Tricine-KOH (pH 9.2)、75 mM 乙酸钾、17.5 mM 乙酸镁、25% DMSO、18.75 μ g/ml BSA、0.005 % Tween 20、0.005% Nonidet-P40)、2.5 μ l GC Melt Reagent (Clontech)、0.5 μ l 50X Advantage[®] GC I 聚合酶(Clontech) 和 11.5 μ L Milli-Q[®] 水(Millipore) 执行扩增。样品最初在 94°C 变性 3 分钟, 随后为 94°C 30 秒、64°C 30 秒和 68°C 1.3 分钟的 2 个循环; 94°C 30 秒、62°C 30 秒和 68°C 1.30 分钟的 3 个循环; 94°C 30 秒、60°C 30 秒和 68°C 1.30 分钟的 4 个循环; 和 94°C 30 秒、58°C 30 秒和 68°C 1.30 分钟的 26 个循环。在反应在 4°C 终止前, 执行在 68°C 10 分钟的最终延伸循环。

[0202] PCR 产物的分析揭示非常模糊的条带, 这可能是由于在细胞中低水平的延伸酶基因转录物。因此, 使用来自上述初级 PCR 反应的 1 μ l 产物作为模板执行巢式 PCR 反应。用于巢式 PCR 的引物是 Eug Elo M0-7 FP2 (基因特异性引物) : 5' - TCC CCG TGC CGA AGT CGT TCA TCA CC -3' (SEQ ID NO :12), 以及 Universal Primer Mix A (UPM) 引物 (SEQ ID NOs :10 和 11)。PCR 反应条件和循环参数与用于初级 PCR 反应的相同。

[0203] 使用 Qiagen Gel Purification 试剂盒(Qiagen) 凝胶纯化通过巢式 PCR 获得的 548 bp 扩增子(SEQ ID NO :13 ;图 6A), 并且克隆到 pTZ57R/T 载体(T/A 克隆载体, MBI Fermentas)内且测序。测序揭示这个片段(SEQ ID NO :13)含有 plate2_M07 延伸酶片段的完全 3' 末端连同 'TAG' 终止密码子和含有多聚腺苷酸尾部的下游区。这个片段的预测氨基酸序列(SEQ ID NOs :14 和 30-32)显示于图 6B 中。第一个星号指示 plate 2_M07 编码的蛋白质的终止位点。

[0204] 实施例 3 : 来自 Euglenadeses Ehr. CCMP 2916 的全长 plate2_M07 延伸酶基因的分离

[0205] 使用 *Euglena deses Ehr.* cDNA 文库作为模板, 和基于实施例 1 和实施例 2 中获得的序列信息设计为含有 plate2_M07 基因的 5' 和 3' 末端的引物, 通过 PCR 扩增分离 plate2_M07 延伸酶的全长基因序列。此外, 将 *BamHI/HindIII* 位点掺入引物(有下划线的)内, 以促进基因克隆到酵母表达载体 pYX242 的 *BamHI/HindIII* 位点内。使用下述引物序列 :

[0206] M07-Elo 正向引物 :5' - CAC CAT GGA TCC ATG GAC GTC GCG ACT ACG CTG G -3' (SEQ ID NO :15), 和

[0207] M07-Elo 反向引物 :5' - ACG CGT AAG CTT CTA GTC CAC TTT CTT CTC ATC CTT C-3' (SEQ ID NO :16)。

[0208] 使用 0.5 μ l (100 μ M) 每种引物、1 μ l (\sim 110ng) *Euglenadeses Ehr.* cDNA 文库质粒库作为模板、5 μ l 2.5 mM dNTP、10 μ l 5X Phusion GC Buffer (Finnzymes)、5 μ L

DMSO、0.5 μ L (1 U) Phusion 聚合酶(Finnzymes) 和 27.5 μ L Milli-Q® 水(Millipore) 执行扩增。样品最初在 98°C 变性 3 分钟, 随后为 98°C 8 秒、60°C 12 秒和 72°C 45 秒的 2 个循环; 和 98°C 8 秒、58°C 12 秒和 72°C 45 秒的 28 个循环。在反应在 4°C 终止前, 执行在 72°C 3 分钟的最终延伸循环。

[0209] PCR 导致 \sim 789 bp 产物, 将所述产物克隆到 pYX242 载体的 *Bam HI/Hind III* 位点内, 且转化到大肠杆菌 DH5 α (Invitrogen) 内。将从而获得的质粒 DNA 测序, 以获得指定 ‘Eug-M07-EL0#10’ (SEQ ID NO:17; 图 7A) 的 789 bp 基因的全长基因序列。根据布达佩斯条约, 于 2009 年 7 月 10 日, 将 SEQ ID NO:17 保藏于美国典型培养物中心, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, 并且给予保藏号 ATCC PTA-10200。认为这种基因编码来自 *Euglenadeses Ehr.* CCMP 2916 的假定 $\Delta 9-$ 延伸酶, 具有 262 个氨基酸(SEQ ID NO:18; 图 7B) 的预测长度。这种基因用于表达研究, 以表征其酶促活性。

[0210] 除 Eug-M07-EL0#10 克隆外, 在测序过程中鉴定另外的变体克隆, 其在跨越全长基因的一些区域中展示出某些序列变异。这些序列变异可能在 PCR 扩增过程中出现。当与原始 Eug-M07-EL0#10 克隆比较时, 一个此类变体 Eug-M07-EL0 #14 的序列分析揭示许多核苷酸和相应氨基酸变化(参见表 2 以及图 2A 和 2B)。Eug-M07-EL0 #14 的核苷酸(SEQ ID NO:19)和预测的氨基酸序列(SEQ ID NO:20)分别显示于图 8A 和 8B 中。原始 Eug-M07-EL0#10 克隆和变体 Eug-M07-EL0#14 用于表达分析。

[0211] 表 2: 与原始克隆 Eug-M07-EL0#10 比较, 在变体克隆 Eug-M07-EL0#14 中的核苷酸和氨基酸变化

[0212]

核苷酸变化 Eug-M07-EL0#10 (SEQ ID NO: 17) \Rightarrow Eug-M07-EL0#14 (SEQ ID NO: 19)	相应氨基酸变化 (SEQ ID NO: 18 \Rightarrow SEQ ID NO: 20)
GCT ₂₄ \Rightarrow GCC ₂₄	沉默突变
GC ₈₃ C \Rightarrow GT ₈₃ C	A ₂₈ \Rightarrow V ₂₈
G ₂₃₂ TA \Rightarrow A ₂₃₂ TA	V ₇₈ \Rightarrow I ₇₈
A ₃₀₁ TG \Rightarrow T ₃₀₁ TG	M ₁₀₁ \Rightarrow L ₁₀₁
C ₃₁₀ TC \Rightarrow A ₃₁₀ TC	L ₁₀₁ \Rightarrow I ₁₀₁
ACA ₆₃₀ \Rightarrow ACT ₆₃₀	沉默突变
AAA ₇₅₀ \Rightarrow AAG ₇₅₀	沉默突变

[0213] 关于与 BLAST ‘nr’ 数据库中含有的序列的相似性, 使用 Eug-M07-EL0 #10 作为查询的 Blast 检索揭示由 Eug-M07-EL0#10 编码的预测氨基酸序列(SEQ ID NO:18)展示出与球等鞭金藻 $\Delta 9-$ 延伸酶(SEQ ID NO:2)的最高氨基酸序列同一性(36% 序列同一性)。SEQ ID NO:18 与来自小眼虫的已知 $\Delta 9-$ 延伸酶(登记 # CAT 16687; SEQ ID NO:4)的配对比对揭示高得多的氨基酸序列同一性(66% 同一性)。此处, Vector NTI® AlignX 程序的缺省参数用于配对比对。与盐生巴夫藻 $\Delta 9-$ 延伸酶(SEQ ID NO:1)的配对比对揭示仅 \sim 15% 的序列同一性。

[0214] 与去饱和酶不同, 延伸酶展示出极少高度保守的基序。这些酶是含有预期为跨膜

区的 4 - 5 个疏水段的高度疏水蛋白质。此外,发现高度保守的组氨酸框(HXXHH) (SEQ ID NO :28) 包埋在第四个跨膜区中,并且对于酶促活性是必需的(参见 Leonard, 等人, “Elongation of long-chain fatty acids,” *Prog Lipid Res.* (2004) 第 43 卷, 第 36-54 页)。在某些延伸酶中,‘HXXHH’ 基序(SEQ ID NO :28) 中的第一个组氨酸残基由谷氨酰胺(Q) 替换,导致‘QXXHH’ (SEQ ID NO :29) 作为保守基序。这个 QXXHH (SEQ ID NO :29) 基序在大多数 $\Delta 9-$ 延伸酶包括 Eug-M07-EL0#10 中发现。此外,Eug-M07-EL0#10 延伸酶含有其他不变残基,其存在于迄今为止的大多数延伸酶中,如由 Leonard, 等人,“Elongation of long-chain fatty acids,” *Prog Lipid Res.* (2004) 第 43 卷, 第 36-54 页描述的。

[0215] 图 3A 和 3B 描述了来自 Eug-M07-EL0#10 延伸酶的氨基酸序列与具有不同底物特异性的其他已知延伸酶的比对。这些包括小鼠 Elovl4 延伸酶(登记 # AAG47667 ;SEQ ID NO :21 ;图 9A)、人 ELOVL2 延伸酶(登记 # NP_060240 ;SEQ ID NO :22 ;图 9B)、和秀丽隐杆线虫延伸酶(登记 # AF244356 ;SEQ ID NO :23),加上来自小眼虫(SEQ ID NO :4) 和球等鞭金藻(SEQ ID NO :2) 的 $\Delta 9-$ 延伸酶。比对中的不变氨基酸是加阴影的。假定这些不变残基是关于这些延伸酶的功能性的重要决定簇,这是由于跨越物种的高度保守。使用 Vector NTI 软件执行比对,所述软件使用修改的 ClustalW 算法。

[0216] 实施例 4:由基因 Eug-M07-EL0#10 编码的假定 $\Delta 9-$ 延伸酶的酶促活性的表征

[0217] 将编码假定 $\Delta 9-$ 延伸酶的 Eug-M07-EL0#10 和 Eug-M07-EL0#14 变体分别克隆到酵母表达载体 pYX242 (Novagen) 的 *Bam*H/*Hind*III 位点内。将这些构建体转化到感受态酿酒酵母菌株 SC334 细胞内。根据由制造商指定的条件,使用 Alkali-Cation Yeast Transformation Kit (QBioGene) 执行酵母转化。在缺乏亮氨酸的培养基(DOB [-Leu]) 上就亮氨酸营养缺陷体选择转化体。

[0218] 为了表征由 Eug-M07-EL0#10 和 Eug-M07-EL0#14 编码的酶的延伸酶活性,转化体在 50 μM 特异性脂肪酸底物(下文列出的) 的存在下生长,并且向特异性产物的转换用于测定底物特异性:

[0219] 对于 $\Delta 9-$ 延伸酶活性:

[0220] 亚油酸(18:2 n-6) \Rightarrow 二十碳二烯酸(EDA, 20:2 n-6)

[0221] α -亚麻酸(18:3 n-3) \Rightarrow 二十碳三烯酸(ETrA, 20:3 n-3)

[0222] 对于 $C_{18}-$ 延伸酶活性:

[0223] γ -亚麻酸(GLA, 18:3 n-6) \Rightarrow 二高 γ -亚麻酸(DGLA, 20:3 n-6)

[0224] 十八碳四烯酸(SDA, 18:4 n-3) \Rightarrow $\omega 3$ -花生四烯酸($\omega 3$ -ETA, 20:4 n-3)

[0225] 对于 $C_{20}-$ 延伸酶活性:

[0226] 花生四烯酸(ARA, 20:4 n-6) \Rightarrow 肾上腺酸($\omega 6$ -ADA, 22:4 n-6)

[0227] 二十碳五烯酸(EPA, 20:5 n-3) \Rightarrow $\omega 3$ -二十二碳五烯酸($\omega 3$ -DPA, 22:5 n-3)

[0228] 阴性对照菌株由在酿酒酵母 334 中表达的 pYX242 载体组成。

[0229] 将从选择性 DOB [-Leu] 培养基中分离的经转化的菌落在 10 ml YPD 液体肉汤中在 30°C 生长过夜,伴随剧烈搅拌。随后将 5 ml 这种过夜培养物加入含有 50 μM (终浓度) 多种脂肪酸底物(如指定的) 的 45 ml 选择性培养基(DOB [-Leu]),并且将这些在 24°C 剧烈搅拌(250 rpm) 48 - 72 小时(如指示的)。

[0230] 对于总脂质萃取,将酵母细胞以 2000 rpm 向下旋转 15 分钟,且加入 0.5 ml 水,使

样品涡旋，随后加入 10 ml 甲醇伴随轻轻回荡。随后加入 20 ml 氯仿，将样品以高速涡旋 1 分钟并且允许在室温静置 2 小时。随后将 6 ml 盐水加入样品中，随后以 2200 rpm 离心 10 分钟。将上层氯仿取出到干净 / 干燥的 30 ml 小瓶中，并且在 40°C 在氮流下将氯仿蒸发至干燥。一旦溶剂已完全蒸发，将 2 ml 氯仿加入每个小瓶，并且使样品衍生化。

[0231] 对于脂质至脂肪酸甲酯(FAME)的衍生化，将每个管掺料 100 μl 内部标准(17.216 μg/100 μl)甘油三十七烷酸酯(Triheptadecanoic acid)。在 40°C 在氮下将氯仿蒸发至干燥，加入 2 ml 三氟化硼的 14% 甲醇溶液，随后加入 2 滴(~50 μl) 甲苯。将每个小瓶用氮冲洗，并且在 95°C 加热 15 分钟。在小瓶已冷却后，加入 2 ml 盐水且通过剧烈涡旋 1 分钟用 4 ml 己烷萃取脂质。随后将己烷萃取物转移到 20 ml 干净 / 干燥的螺旋瓶盖管内，加入 5 ml di-H₂O 且使样品涡旋，且在 1500 rpm 离心 4 分钟。随后将洗涤的己烷转移到 20 ml 试剂管内。将己烷蒸发至干燥，并且用 0.5 ml 新鲜己烷重建每种样品。将重建的最终己烷涡旋以分散脂质。随后将整个样品装载到 GC 自动取样器小瓶内，并且注射 4 μl 用于分析。用 NuChek Std. 461 校准 GC。

[0232] 使用下式计算底物至产物的转换百分比：

$$\frac{[\text{产物}]}{[\text{产物}] + [\text{底物}]} \times 100.$$

[0234] 表 3 代表基于加入的底物的转换百分比，Eug-M07-EL0#10 和 Eug-M07-EL0#14 编码的蛋白质的酶活性。Eug-M07-EL0#10 编码的蛋白质将 10.5% LA (18:2n-6) 转换为 EDA (20:2 n-6) 和 23.2% ALA (18:3n-3) 转换为 ETrA (20:3n-3)。这指示 Eug-M07-EL0#10 基因编码 Δ 9- 延伸酶，其可以识别 n-6 和 n-3 脂肪酸底物。变体克隆 Eug-M07-EL0#14 编码的蛋白质也展示出 Δ 9 延伸酶活性，将 7.84% LA (18:2n-6) 转换为 EDA (20:2 n-6) 和 17.15% ALA (18:3n-3) 转换为 ETrA (20:3n-3)。然而，这种活性低于原始 Eug-M07-EL0#10 编码的蛋白质的那种。这指示在 Eug-M07-EL0#14 和 Eug-M07-EL0#10 之间不同的残基是这种酶的 Δ 9- 延伸活性的重要决定簇。

[0235] 用仅载体的对照检测到极低本底(底物的非特异性转换)活性(参见表 3)。Eug-M07-EL0#10 和 Eug-M07-EL0#14 编码的酶对测试的任何其他 PUFA 底物都不具有活性(参见表 4)，指示这种酶对于涉及替代 Δ 8- 去饱和酶 / Δ 9- 延伸酶途径的底物是特异性的(参见图 1)。

[0236] 表 3：在酿酒酵母菌株 SC334 中表达的 Eug-M07-EL0#10 和 Eug-M07-EL0#14 编码的蛋白质的 Δ 9- 延伸酶活性

% 总脂肪酸	Eug-M07-EL0#10	Eug-M07-EL0#14	载体对照
LA (18:2n-6) ^a	8.84	12.575	10.65
EDA (20:2n-6, Δ 11, 14) ^b	1.038	1.066	0.0985
% LA → EDA 转换 ^c	10.5	7.84	0.91
ALA (18:3n-3) ^a	8.788	10.89	13.96
ETrA (20:3n-3, Δ 11, 14, 17) ^b	2.665	2.198	0.166
% ALA → ETrA 转换 ^c	23.2	17.15	1.22

[0237] ^a 在 50 μM 底物的存在下在 24°C 生长 48 小时的培养物。数目代表 2 个不同实验的平均值。

[0238] ^b 形成的产物量。

[0239] ^c %转换 = ([产物] / { [产物] + [底物] }) x 100。

[0240] 表4：在酿酒酵母菌株 SC334 中表达的 Eug-M07-EL0#10 和 Eug-M07-EL0#14 编码的蛋白质的延伸酶活性的特异性

%总脂肪酸	Eug-M07-EL0#10	Eug-M07-EL0#14	载体对照
GLA (18:3n-6) ^a	12.90	14.23	14.49
DGLA (20:3n-6) ^b	0.171	0.194	0.164
% GLA → DGLA 转换 ^c	1.31	1.34	1.12
ARA (20:4n-6) ^a	27.645	25.044	22.711
肾上腺酸(22:4n-6) ^b	0.0	0.0	0.019
% ARA → 肾上腺酸转换 ^c	0	0	0.08
SDA (18:4n-3) ^a	6.899	8.335	8.642
ω3-ETA (20:4n-3) ^b	0.077	0.047	0.198
% SDA → ω3-ETA 转换 ^c	1.10	0.56	2.24
EPA (20:5n-3) ^a	18.84	13.351	12.016
ω3-DPA (22:5n-3) ^b	0.131	0.093	0.083
% EPA → ω3-DPA 转换 ^c	0.69	0.69	0.69

[0241] ^a 在 50 μM 底物的存在下在 24°C 生长 48 小时的培养物。数目代表 2 个不同实验的平均值。

[0242] ^b 形成的产物量。

[0243] ^c %转换 = ([产物] / { [产物] + [底物] }) x 100。

[0244] 实施例 5：在植物种子中的 Δ9- 延伸酶 ‘Eug-M07-EL0#10’ 的表达

[0245] 通过 PCR 从含有相应基因的质粒扩增 Eug-M07-EL0#10 延伸酶的编码序列，应用下述有义和反义寡核苷酸引物(加入的限制性酶位点是有下划线的)：

[0246] 5' - TATAGAATTCAAATGGACGTCGCGACTACGCTG-3' (SEQ ID NO:24), 和

[0247] 5' - TATTCTCGAGTCTAGTCCACTTCTCATCCTTC-3' (SEQ ID NO:25)。

[0248] 用高保真 Phusion 聚合酶(New England Biolabs) 进行 PCR 反应。用限制性酶 EcoRI 和 XbaI 消化 PCR 扩增的基因，并且所得到的产物在二元载体 p0308-DsRed 中在其 5' 末端与来自大豆的种子特异性大豆球蛋白-1 启动子连接，并且在其 3' 末端上与大豆球蛋白-1 3' 非翻译区连接，以生成质粒‘pEugEL0’。大豆球蛋白-1 调节元件先前已由 Nielsen, 等人，“Characterization of the glycinin gene family in soybean,” *Plant Cell* (1989) 第 1 卷, 第 313-328 页描述。这种载体还含有在用于通过荧光选择经转化的种子的木薯花叶病毒启动子的控制下的 Ds-Red 转基因和用于细菌选择的卡那霉素抗性标记。作为用于这些实验的对照，球等鞭金藻 Δ9- 延伸酶基因(SEQ ID NO:2)也作为在 p0308-Ds-Red 中在大豆球蛋白-1 启动子控制下的 EcoRI/XbaI 片段进行克隆，以生成质粒‘pIsoD9’。

[0249] 通过电穿孔将 pEugEL0 和 pIsoD9 引入根瘤土壤杆菌菌株 C58 MP90 内。通过花浸渍法(Clough, 等人, “Floral dip :a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*,” *Plant J.*, (1998) 第 16 卷, 第 735-743 页), 卡那霉素抗性土壤杆菌随后用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 生态型 Col-0 的转化。在土壤杆菌花浸渍后，将植物维持在 22°C 伴随 16 小时日长，直至达到成熟和弄干。对于这些实验，使用拟南芥属的 fad3/fae1 突变体，其在其种子油中含有低水平的 α - 亚麻酸和极短链脂肪酸(≥ C20)，但升高水平的亚油酸(Cahoon, 等人, “Conjugated fatty acids

accumulate to high levels in phospholipids of metabolically engineered soybean and *Arabidopsis* seeds," *Phytochemistry* (2006)第 67 卷, 第 1166–1176 页)。这个遗传背景接近来自作物例如红花和低亚麻酸大豆的种子油的脂肪酸概括。使用由 Pidkowich, 等人, "Modulating seed beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II level converts the composition of a temperate seed oil to that of a palm-like tropical oil," *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 第 104 卷, 第 4742–4747 页描述的方法, 通过 DsRed 标记蛋白质的荧光, 鉴定得自土壤杆菌浸渍的拟南芥属 (*Arabidopsis*) 植物的转基因种子。如由 Cahoon 和 Shanklin, "Substrate-dependent mutant complementation to select fatty acid desaturase variants for metabolic engineering of plant seed oils," *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 第 97 卷, 第 12350–12355 页描述的, 通过使用三甲基氢氧化锍 (TMSH) 试剂, 对单一转基因和非转基因对照种子实施组成成分脂质包括三酰基甘油的直接转酯作用。通过使用配备 INNOWax 柱 (30 m 长度 x 0.25 mm 内径) 的 Agilent 6890 气相层析仪和以 7°C / 分钟从 185°C (保持 1 分钟) 编程到 230°C (保持 2 分钟) 的烘箱温度, 通过气相层析伴随火焰离子化检测来分析得自单个种子的脂肪酸甲酯。基于其相对于与来自野生型拟南芥 Col-0 的种子具有已知同一性的脂肪酸甲酯的保留时间, 并且通过保留时间与标准脂肪酸甲酯的保留时间的比较, 鉴定组分脂肪酸甲酯。

[0250] 表 5 中所示的是来自用 pEugEL0 构建体转化的植物来自 6 个独立转化事件的单个 T1 种子的脂肪酸组成。还显示的是单个 T1 种子的脂肪酸组成, 代表用 pIsoD9 构建体, 对照 Δ 9-延伸酶转化的植物的独立事件(参见表 6)。相对于未转化的 *fad3/fae1* 种子(参见表 7), 来自 pEugEL0 转化的转基因种子的脂肪酸组成中的主要变化是高水平 EDA (20:2n-6, Δ 11, 14) 的存在。在这些种子中, 20:2 的相对量范围为总脂肪酸的 40% – 49% (w/w)。通过比较, 20:2 占非转基因 *fad3/fae1* 种子的总脂肪酸的 >0.5% (参见表 7)。这伴随在 LA (18:2n-6, Δ 9, 12) 的相对量方面从非转基因 *fad3/fae1* 种子(参见表 7)中的约 50% 到 pEugEL0 中低至 14% 的同时降低。这与充当关于由 Eug-M07-EL0#10 延伸酶赋予的 20:2 合成的主要底物的 18:2 一致。相对于非转基因 *fad3/fae1* 种子, 二十碳烯酸 (20:1 Δ 11) 和花生酸 (20:0) 的量在 pEugEL0 转化的种子中也是升高的, 但这些脂肪酸各自占转基因种子中总脂肪酸的 <3%。这些发现指示 Eug-M07-EL0#10 延伸酶在植物中对于 C₁₈ PUFA 例如 LA (18:2n-6) 具有底物优先性, 并且是在富含 LA (18:2n-6) 的种子中用于 20:2 产生的有效酶。为了比较, 改造为表达球等鞭金藻 Δ 9-EL0 (pIsoD9) 的种子将 20:2 积累到 30 – 40% 总脂肪酸并且 20:0 和 20:1 各自积累到 <3% 的总脂肪酸的量(参见表 6)。

[0251] 表 5^a :表达 Eug-M07-EL0#10 的单个 T1 转基因拟南芥属 *fad3/fae1* 种子的脂肪酸组成。

脂肪酸	品系 1	品系 2	品系 3	品系 4	品系 5	品系 6
16:0	9.5	9.1	8.2	7.1	8.2	8.0
18:0	3.5	3.6	4.1	3.4	3.2	3.5
18:1	18.5	17.5	19.1	20.3	12.7	16.5
18:2	21.3	14.3	14.1	15.6	19.9	21.5
18:3	0.9	1.3	>0.1	>0.1	>0.1	0.7
20:0	1.0	1.0	1.2	0.9	0.8	0.9
20:1	1.3	1.2	1.5	2.3	2.0	2.3
20:2	42.3	49.4	48.6	47.2	49.3	44.3

其它	1.7	2.6	2.4	2.1	2.1	1.8
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

- [0252] ^a 每个种子代表独立转基因事件。所示值是种子中总脂肪酸的重量%。
- [0253] 表 6^a :表达球等鞭金藻 ELO 的单个 T₁ 转基因拟南芥属 *fad3/fae1* 种子的脂肪酸组成。

脂肪酸	品系 1	品系 2	品系 3	品系 4	品系 5
16:0	7.5	8.4	6.7	7.4	7.2
18:0	3.9	3.3	4.0	3.3	4.3
18:1	22.8	19.5	15.9	15.2	20.8
18:2	26.3	23.9	29.2	25.3	26.2
18:3	1.0	1.2	0.4	0.6	0.9
20:0	1.1	0.9	1.2	1.0	1.1
20:1	2.0	1.6	2.8	2.2	2.2
20:2	34.1	38.8	37.1	40.2	36.1
其它	1.1	2.3	2.2	2.9	1.1

- [0254] ^a 每个种子代表独立转基因事件。所示值是种子中总脂肪酸的重量%。
- [0255] 表 7^a :单个拟南芥属 *fad3/fae1* 对照种子的脂肪酸组成。

脂肪酸	品系 1	品系 2	品系 3	品系 4	品系 5
16:0	7.9	8.4	6.9	8.9	8.0
18:0	4.9	3.9	3.2	5.3	3.8
18:1	28.6	34.7	40.6	32.5	31.1
18:2	53.3	49.6	46.8	50.9	53.6
18:3	2.6	1.8	1.0	1.3	1.5
20:0	1.3	0.7	0.8	1.0	0.8
20:1	0.9	0.4	0.4	0.2	0.5
20:2	≥ 0.1	≥ 0.1	≥ 0.1	≥ 0.1	≥ 0.1
其它	0.1	0.2	0.1	0.1	0.5

- [0256] ^a 所示值是种子中总脂肪酸的重量%。
- [0257] 实施例 6 :Δ 9- 延伸酶 ‘Eug-M07-ELO#10 与 Δ 8- 去饱和酶的共表达
- [0258] 可以共表达 Eug-M07-ELO#10 连同 Δ 8- 去饱和酶, 以重建替代 Δ 8- 去饱和酶 / Δ 9- 延伸酶途径, 导致 ARA 产生。此外, 将可以在异源宿主例如油料种子植物或油性酵母中共表达 3 种基因, Δ 9- 延伸酶 ‘Eug-M07-ELO#10’ 连同 Δ 8- 去饱和酶和 Δ 5- 去饱和酶, 以重建 ARA 生物合成途径, 这将导致在这些异源宿主中的 ARA 产生。
- [0259] 考虑到上文, 可见达到公开内容的几个目的且获得其他有利结果。
- [0260] 因为在上述主题中可以做出多种变化而不背离公开内容的范围, 所以预期上述说明书中含有的所有主题应解释为举例说明性且不以限制性含义。

序列表

<110> PEREIRA, SUZETTE

DAS, TAPAS

KRISHNAN, PADMAVATHY

MUKERJI, PRADIP

<120> 用于产生富含多不饱和脂肪酸的油的新 $\Delta 9$ -延伸酶

<130> 28072-58 (9914USL1)

<140>

<141>

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 302

<212> PRT

<213> 盐生巴夫藻

<400> 1

Met Lys Ala Ala Ala Gly Lys Val Gln Gln Glu Ala Glu Arg Leu Thr
1 5 10 15

Ala Gly Leu Trp Leu Pro Met Met Leu Ala Ala Gly Tyr Leu Leu Val
20 25 30

Leu Ser Ala Asn Arg Ala Ser Phe Tyr Glu Asn Ile Asn Asn Glu Lys
35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Thr Ser Trp Phe Ser Leu Pro Cys Val Met Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gly Leu Thr Lys Tyr Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80

Lys Pro Met Gln Gly Leu Lys Asp Tyr Met Phe Thr Tyr Asn Leu Tyr
85 90 95

Gln Val Ile Ile Asn Val Trp Cys Ile Ala Ala Phe Val Val Glu Val
100 105 110

Arg Arg Ala Gly Met Ser Ala Val Gly Asn Lys Val Asp Leu Gly Pro
115 120 125

Asn Ser Phe Arg Leu Gly Phe Val Thr Trp Val His Tyr Asn Asn Lys
130 135 140

Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Leu Trp Met Val Leu Arg Lys Lys Thr
145 150 155 160

Gln Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Val Leu Leu Ile Trp
165 170 175

Ala Trp Phe Cys Val Val Lys Phe Cys Asn Gly Gly Asp Ala Tyr Phe
180 185 190

Gly Gly Met Leu Asn Ser Ile Ile His Val Met Met Tyr Ser Tyr Tyr
195 200 205

Thr Met Ala Leu Leu Gly Trp Ser Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Leu Thr

210	215	220
-----	-----	-----

Gln Ala Gln Leu Val Gln Phe Cys Ile Cys Leu Ala His Ala Thr Trp	225	230
---	-----	-----

Ala Ala Ala Thr Gly Val Tyr Pro Phe His Ile Cys Leu Val Glu Ile	245	250
---	-----	-----

Trp Val Met Val Ser Met Leu Tyr Leu Phe Thr Lys Phe Tyr Asn Ser	260	265
---	-----	-----

Ala Tyr Lys Gly Ala Ala Lys Gly Ala Ala Ala Ser Ser Asn Gly Ala	275	280
---	-----	-----

Ala Ala Pro Ser Gly Ala Lys Pro Lys Ser Ile Lys Ala Asn	290	295
---	-----	-----

<210> 2

<211> 263

<212> PRT

<213> 球等鞭金藻

<400> 2

Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr	1	5	10
---	---	---	----

15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Lys Pro	20	25
---	----	----

30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg	35	40
---	----	----

45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
65 70 75 80

Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe
130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly
145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr
165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro
180 185 190

Leu Ile Thr Ala Met Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu

195

200

205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys
 210 215 220

Leu Phe Ser Trp Ala Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser
 245 250 255

Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
 260

<210> 3

<211> 263

<212> PRT

<213> 裸藻属物种

<400> 3

Met Ala Ala Val Ile Glu Val Ala Asn Glu Phe Ala Ala Ile Thr Ala
 1 5 10 15

Glu Thr Leu Pro Lys Val Asp Tyr Gln Arg Leu Trp Arg Asp Ile Tyr
 20 25 30

Ser Cys Glu Leu Leu Tyr Phe Ser Ile Ala Phe Val Ile Leu Lys Phe
 35 40 45

Thr Leu Gly Glu Leu Ser Asp Ser Gly Lys Lys Ile Leu Arg Val Leu
 50 55 60

Phe Lys Trp Tyr Asn Leu Phe Met Ser Val Phe Ser Leu Val Ser Phe
65 70 75 80

Leu Cys Met Gly Tyr Ala Ile Tyr Thr Val Gly Leu Tyr Ser Asn Glu
85 90 95

Cys Asp Arg Ala Phe Asp Asn Ser Leu Phe Arg Phe Ala Thr Lys Val
100 105 110

Phe Tyr Tyr Ser Lys Phe Leu Glu Tyr Ile Asp Ser Phe Tyr Leu Pro
115 120 125

Leu Met Ala Lys Pro Leu Ser Phe Leu Gln Phe Phe His His Leu Gly
130 135 140

Ala Pro Met Asp Met Trp Leu Phe Val Gln Tyr Ser Gly Glu Ser Ile
145 150 155 160

Trp Ile Phe Val Phe Leu Asn Gly Phe Ile His Phe Val Met Tyr Gly
165 170 175

Tyr Tyr Trp Thr Arg Leu Met Lys Phe Asn Phe Pro Met Pro Lys Gln
180 185 190

Leu Ile Thr Ala Met Gln Ile Thr Gln Phe Asn Val Gly Phe Tyr Leu
195 200 205

Val Trp Trp Tyr Lys Asp Ile Pro Cys Tyr Arg Lys Asp Pro Met Arg

210

215

220

Met Leu Ala Trp Ile Phe Asn Tyr Trp Tyr Val Gly Thr Val Leu Leu
225 230 235 240

Leu Phe Ile Asn Phe Phe Val Lys Ser Tyr Val Phe Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Thr Ala Asp Lys Lys Val Gln
260

<210> 4

<211> 258

<212> PRT

<213> 小眼虫

<400> 4

Met Glu Val Val Asn Glu Ile Val Ser Ile Gly Gln Glu Val Leu Pro
1 5 10 15

Lys Val Asp Tyr Ala Gln Leu Trp Ser Asp Ala Ser His Cys Glu Val
20 25 30

Leu Tyr Leu Ser Ile Ala Phe Val Ile Leu Lys Phe Thr Leu Gly Pro
35 40 45

Leu Gly Pro Lys Gly Gln Ser Arg Met Lys Phe Val Phe Thr Asn Tyr
50 55 60

Asn Leu Leu Met Ser Ile Tyr Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Met Ala
65 70 75 80

Tyr Ala Met Tyr Thr Ile Gly Val Met Ser Asp Asn Cys Glu Lys Ala
85 90 95

Phe Asp Asn Asn Val Phe Arg Ile Thr Thr Gln Leu Phe Tyr Leu Ser
100 105 110

Lys Phe Leu Glu Tyr Ile Asp Ser Phe Tyr Leu Pro Leu Met Gly Lys
115 120 125

Pro Leu Thr Trp Leu Gln Phe Phe His His Leu Gly Ala Pro Met Asp
130 135 140

Met Trp Leu Phe Tyr Asn Tyr Arg Asn Glu Ala Val Trp Ile Phe Val
145 150 155 160

Leu Leu Asn Gly Phe Ile His Trp Ile Met Tyr Gly Tyr Tyr Trp Thr
165 170 175

Arg Leu Ile Lys Leu Lys Phe Pro Met Pro Lys Ser Leu Ile Thr Ser
180 185 190

Met Gln Ile Ile Gln Phe Asn Val Gly Phe Tyr Ile Val Trp Lys Tyr
195 200 205

Arg Asn Ile Pro Cys Tyr Arg Gln Asp Gly Met Arg Met Phe Gly Trp
210 215 220

Phe Phe Asn Tyr Phe Tyr Val Gly Thr Val Leu Cys Leu Phe Leu Asn

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Phe Tyr Val Gln Thr Tyr Ile Val Arg Lys His Lys Gly Ala Lys Lys			
245	250	255	

Ile Gln			
---------	--	--	--

<210> 5			
---------	--	--	--

<211> 258			
-----------	--	--	--

<212> PRT			
-----------	--	--	--

<213> Euglena anabena			
-----------------------	--	--	--

<400> 5			
---------	--	--	--

Met Glu Ala Ala Lys Glu Leu Val Ser Ile Val Gln Glu Glu Leu Pro			
1	5	10	15

Lys Val Asp Tyr Ala Gln Leu Trp Gln Asp Ala Ser Ser Cys Glu Val			
20	25	30	

Leu Tyr Leu Ser Val Ala Phe Val Ala Ile Lys Phe Met Leu Arg Pro			
35	40	45	

Leu Asp Leu Lys Arg Gln Ala Thr Leu Lys Leu Phe Thr Ala Tyr			
50	55	60	

Asn Phe Leu Met Ser Ile Tyr Ser Phe Gly Ser Phe Leu Ala Met Ala			
65	70	75	80

Tyr Ala Leu Ser Val Thr Gly Ile Leu Ser Gly Asp Cys Glu Thr Ala			
85	90	95	

Phe Asn Asn Asp Val Phe Arg Ile Thr Thr Gln Leu Phe Tyr Leu Ser
100 105 110

Lys Phe Val Glu Tyr Ile Asp Ser Phe Tyr Leu Pro Leu Met Asp Lys
115 120 125

Pro Leu Ser Phe Leu Gln Phe Phe His His Leu Gly Ala Pro Ile Asp
130 135 140

Met Trp Leu Phe Tyr Lys Tyr Arg Asn Glu Gly Val Trp Ile Phe Val
145 150 155 160

Leu Leu Asn Gly Phe Ile His Trp Ile Met Tyr Gly Tyr Tyr Trp Thr
165 170 175

Arg Leu Ile Lys Leu Asn Phe Pro Met Pro Lys Asn Leu Ile Thr Ser
180 185 190

Met Gln Ile Ile Gln Phe Asn Val Gly Phe Tyr Ile Val Trp Lys Tyr
195 200 205

Arg Asn Val Pro Cys Tyr Arg Gln Asp Gly Met Arg Met Phe Ala Trp
210 215 220

Ile Phe Asn Tyr Trp Tyr Val Gly Thr Val Leu Leu Leu Phe Leu Asn
225 230 235 240

Phe Tyr Val Gln Thr Tyr Ile Arg Lys Pro Arg Lys Asn Gln Gly Lys

245

250

255

Lys Glu

<210> 6

<211> 744

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多核苷酸

<400> 6

tttcggtccg gattcccgaa aattttttt cgtgttgctt ggctagtagc ccccccctccc 60

tcctgtgacc ctccaccaca caccccccaa aggatggacg tcgcgactac gctggctggc 120

atcgcgccgg acgtgctgcc ccgcgtggac tacgcgcggc ttggcgccga cgccgcccgc 180

tgcgagggttc tatacctttc gctgttcttc atgcgccatga agttcatcct tcgcggccctc 240

ggcgacaagg ggcaggcccg cctcaagtgc ctcttcaccc tctacaacct cgtgatgtcc 300

atctactccc tcggatcttt cggttaatg ggctacgcct tggcgatat cggagtgctc 360

ggtgttgatt gcgggaaagc attctaaat cccatgttcc gcctcaccgc tcagtttttc 420

tacatcagca agtacgttga gtacatcgat tccttctacg tgcttctcac caacaagccc 480

ctgacctacc tgcatgttcc ttccaccaccc ggagcccccg tcgacctctg gctttctctg 540

cagtacgaaa acgaggcgct gtggatcttc gtcttctca acggcttcat ccacttcac 600

atgtacgggt actactgggc ccggctggtg aagctcccggt tcccccgtgcc gaagtcgttc 660

atcacctcca tgcagatcat ccagttcaac ctgggcttct acctcgtgtg gcggtaaccac 720

acaatcccgta gctaccgaca ggac 744

<210> 7

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多肽

<400> 7

Met	Asp	Val	Ala	Thr	Thr	Leu	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Asp	Val	Leu	Pro
1															15

Arg	Val	Asp	Tyr	Ala	Arg	Leu	Gly	Arg	Asp	Ala	Ala	Cys	Glu	Val
														30

Leu	Tyr	Leu	Ser	Leu	Phe	Phe	Ile	Ala	Met	Lys	Phe	Ile	Leu	Arg	Pro
35														45	

Leu	Gly	Asp	Lys	Gly	Gln	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser	Leu	Phe	Thr	Leu	Tyr
50														60	

Asn	Leu	Val	Met	Ser	Ile	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	Phe	Val	Val	Met	Gly
65														80	

Tyr	Ala	Leu	Ala	Asp	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	Cys	Gly	Lys	Ala
85														95	

Phe	Ser	Asn	Pro	Met	Phe	Arg	Leu	Thr	Ala	Gln	Leu	Phe	Tyr	Ile	Ser
100														110	

Lys Tyr Val Glu Tyr Ile Asp Ser Phe Tyr Val Leu Leu Thr Asn Lys
115 120 125

Pro Leu Thr Tyr Leu Gln Phe Phe His His Leu Gly Ala Pro Val Asp
130 135 140

Leu Trp Leu Phe Leu Gln Tyr Glu Asn Glu Ala Leu Trp Ile Phe Val
145 150 155 160

Phe Leu Asn Gly Phe Ile His Phe Ile Met Tyr Gly Tyr Tyr Trp Ala
165 170 175

Arg Leu Val Lys Leu Pro Phe Pro Val Pro Lys Ser Phe Ile Thr Ser
180 185 190

Met Gln Ile Ile Gln Phe Asn Leu Gly Phe Tyr Leu Val Trp Arg Tyr
195 200 205

His Thr Ile Pro Cys Tyr Arg Gln Asp
210 215

<210> 8

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (57)..(57)

<223> a, c, g 或 t

<400> 8

aagcagtggt atcaacgcag agtactttt tttttttt tttttttt ttttvn

57

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400> 9

aggcgctgtg gatttcgtc ttcc

24

<210> 10

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400> 10

ctaatacgac tcactatagc aagcagtggt atcaacgcag agt

43

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400> 11

ctaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400> 12

tccccgtgcc gaagtcgttc atcacc

26

<210> 13

<211> 548

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多核苷酸

<400> 13

tccccgtgcc gaagtcgttc atcacctcca tgcagatcat ccagtcaac ctgggcttct 60

acctcgtgtg gcggtaaccac actatccgt gctaccgaca ggacccaatg cgaatgttcg 120

cttggctctt caactacttc tacgtggag tggcttact gctttttg aatttctacg 180

tgcacacgta cgtgatcaag aaggcgccgc ggctggcgaa ggatgagaag aaagtggact 240

agcggagccg gcggcgccca ctgggaccgg gtggctccgt gccccttcc tcgcccggca 300

tcgaacccac ccaycccccc actagcctcc acgatactcc ctccctcct ccccagtcca 360

ccgtcgaaag gtatccaggc cttcgactc acacttgcga ccagatggcg gtttaacctc	420
tgcgcgactc ggagagttgc cctaaccatc ttttttagaa ctgcgattt gactgtgttg	480
aactggatcc gatgaccctc gttttccat accgttgtwm aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa	540
aaaaaaaaaa	548

<210> 14

<211> 79

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多肽

<400> 14

Pro Val Pro Lys Ser Phe Ile Thr Ser Met Gln Ile Ile Gln Phe Asn			
1	5	10	15

Leu Gly Phe Tyr Leu Val Trp Arg Tyr His Thr Ile Pro Cys Tyr Arg		
20	25	30

Gln Asp Pro Met Arg Met Phe Ala Trp Leu Phe Asn Tyr Phe Tyr Val		
35	40	45

Gly Val Val Leu Leu Leu Phe Leu Asn Phe Tyr Val His Thr Tyr Val		
50	55	60

Ile Lys Lys Ala Arg Arg Leu Ala Lys Asp Glu Lys Lys Val Asp		
65	70	75

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400> 15

caccatggat ccatggacgt cgcgactacg ctgg

34

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400> 16

acgcgttaagc ttctagtcca ctttcttctc atccttc

37

<210> 17

<211> 789

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多核苷酸

<400> 17

atggacgtcg cgactacgct ggctggcatc gcggcggacg tgctgccccg cgtggactac

60

gcgcggcttg ggccgcacgc cgccgcctgc gaggttctat accttcgct gttcttcatc

120

gccatgaagt tcatccttcg ccccctcggc gacaaggggc aggccgcct caagtcgctc

180

ttcacccctct acaacctcgatgtccatc tactccctcg gatcttcgt tgtaatggc

240

tacgccttgg cgatatcgg agtgctcggt ggtgattgcg gaaagcatt ctc当地atccc	300
atgttccgcc tcaccgctca gttgttctac atcagcaagt acgttgagta catcgattcc	360
ttctacgtgc ttctcaccaa caagcccctg acctacctgc agttttcca ccacctcgga	420
ccccccgtcg accctctggct cttectgcag tacgaaaacg aggcgctgtg gatcttcgtc	480
ttcctcaacg gttcatcca cttcatcatg tacgggtact actgggccc gctggtaag	540
ctcccggtcc ccgtgccc gtcgttcate acctccatgc agatcatcca gttcaacctg	600
ggtttctacc tcgtgtggcg gtaccacaca atcccggtct accgacagga cccaatgcga	660
atgttcgctt ggctcttcaa ctacttctac gtgggagtgg tcttactgct gttttgaat	720
ttctacgtgc acacgtacgt gatcaagaaa gcgcggcggc tggcgaagga tgagaagaaa	780
gtggacttag	789

<210> 18

<211> 262

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多肽

<400> 18

Met Asp Val Ala Thr Thr Leu Ala Gly Ile Ala Ala Asp Val Leu Pro			
1	5	10	15

Arg Val Asp Tyr Ala Arg Leu Gly Arg Asp Ala Ala Ala Cys Glu Val		
20	25	30

Leu	Tyr	Leu	Ser	Leu	Phe	Phe	Ile	Ala	Met	Lys	Phe	Ile	Leu	Arg	Pro
35															
Leu	Gly	Asp	Lys	Gly	Gln	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser	Leu	Phe	Thr	Leu	Tyr
50															
Asn	Leu	Val	Met	Ser	Ile	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	Phe	Val	Val	Met	Gly
65															
Tyr	Ala	Leu	Ala	Asp	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	Cys	Gly	Lys	Ala
85															
Phe	Ser	Asn	Pro	Met	Phe	Arg	Leu	Thr	Ala	Gln	Leu	Phe	Tyr	Ile	Ser
100															
Lys	Tyr	Val	Glu	Tyr	Ile	Asp	Ser	Phe	Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	Asn	Lys
115															
Pro	Leu	Thr	Tyr	Leu	Gln	Phe	Phe	His	His	Leu	Gly	Ala	Pro	Val	Asp
130															
Leu	Trp	Leu	Phe	Leu	Gln	Tyr	Glu	Asn	Glu	Ala	Leu	Trp	Ile	Phe	Val
145															
Phe	Leu	Asn	Gly	Phe	Ile	His	Phe	Ile	Met	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Ala
165															
Arg	Leu	Val	Lys	Leu	Pro	Phe	Pro	Val	Pro	Lys	Ser	Phe	Ile	Thr	Ser
180															

Met Gln Ile Ile Gln Phe Asn Leu Gly Phe Tyr Leu Val Trp Arg Tyr
 195 200 205

His Thr Ile Pro Cys Tyr Arg Gln Asp Pro Met Arg Met Phe Ala Trp
 210 215 220

Leu Phe Asn Tyr Phe Tyr Val Gly Val Val Leu Leu Leu Phe Leu Asn
 225 230 235 240

Phe Tyr Val His Thr Tyr Val Ile Lys Lys Ala Arg Arg Leu Ala Lys
 245 250 255

Asp Glu Lys Lys Val Asp
 260

<210> 19

<211> 789

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多核苷酸

<400> 19

atggacgtcg cgactacgct ggccggcata gcggcggacg tgctgccccg cgtggactac 60

gcgcggcttg ggcgcgacgc cgtcgctgc gaggttctat accttcgct gttcttcata 120

gccatgaagt tcatcattcg ccccctcgcc gacaaggggc aggccgcct caagtcgctc 180

ttcacccctct acaacctcgat gatgtccatc tactccctcg gatcttcgt tataatggc 240

tacgccttgg cggatatcgaggatcggt ggtgattgac gaaagcatt ctcaaatccc 300

ttgttccgca tcaccgctca gttgttctac atcagcaagt acgttgagta catcgattcc	360
ttctacgtgc ttctcaccaa caagcccctg acctaacctgc agtttcca ccacacctgga	420
ccccccgtcg acctctggct cttcctgcag tacgaaaacg aggcgctgtg gatcttcgtc	480
ttcctcaacg gcttcatcca cttcatcatg tacgggtact actgggcccg gctggtaag	540
ctcccggtcc ccgtgccgaa gtcgttcatc acctccatgc agatcatcca gttcaacctg	600
ggcttctacc tcgtgtggcg gtaccacact atcccggtct accgacagga cccaatgcga	660
atgttcgctt ggctttcaa ctacttctac gtgggagtgg tcttactgtt gttttgaat	720
ttctacgtgc acacgtacgt gatcaagaag gcgcggcggc tggcgaagga tgagaagaaa	780
gtggactag	789

<210> 20

<211> 262

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多肽

<400> 20

Met Asp Val Ala Thr Thr Leu Ala Gly Ile Ala Ala Asp Val Leu Pro			
1	5	10	15

Arg Val Asp Tyr Ala Arg Leu Gly Arg Asp Ala Val Ala Cys Glu Val		
20	25	30

Leu Tyr Leu Ser Leu Phe Phe Ile Ala Met Lys Phe Ile Leu Arg Pro	
---	--

35	40	45
----	----	----

Leu Gly Asp Lys Gly Gln Ala Arg Leu Lys Ser Leu Phe Thr Leu Tyr
50 55 60

Asn Leu Val Met Ser Ile Tyr Ser Leu Gly Ser Phe Val Ile Met Gly
65 70 75 80

Tyr Ala Leu Ala Asp Ile Gly Val Leu Gly Gly Asp Cys Gly Lys Ala
85 90 95

Phe Ser Asn Pro Leu Phe Arg Ile Thr Ala Gln Leu Phe Tyr Ile Ser
100 105 110

Lys Tyr Val Glu Tyr Ile Asp Ser Phe Tyr Val Leu Leu Thr Asn Lys
115 120 125

Pro Leu Thr Tyr Leu Gln Phe Phe His His Leu Gly Ala Pro Val Asp
130 135 140

Leu Trp Leu Phe Leu Gln Tyr Glu Asn Glu Ala Leu Trp Ile Phe Val
145 150 155 160

Phe Leu Asn Gly Phe Ile His Phe Ile Met Tyr Gly Tyr Tyr Trp Ala
165 170 175

Arg Leu Val Lys Leu Pro Phe Pro Val Pro Lys Ser Phe Ile Thr Ser
180 185 190

Met Gln Ile Ile Gln Phe Asn Leu Gly Phe Tyr Leu Val Trp Arg Tyr

195	200	205
-----	-----	-----

His Thr Ile Pro Cys Tyr Arg Gln Asp Pro Met Arg Met Phe Ala Trp	210	215	220
---	-----	-----	-----

Leu Phe Asn Tyr Phe Tyr Val Gly Val Val Leu Leu Leu Phe Leu Asn	225	230	235	240
---	-----	-----	-----	-----

Phe Tyr Val His Thr Tyr Val Ile Lys Lys Ala Arg Arg Leu Ala Lys	245	250	255
---	-----	-----	-----

Asp Glu Lys Lys Val Asp	260
-------------------------	-----

<210> 21

<211> 312

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 21

Met Gly Leu Leu Asp Ser Glu Pro Gly Ser Val Leu Asn Ala Met Ser	1	5	10	15
---	---	---	----	----

Thr Ala Phe Asn Asp Thr Val Glu Phe Tyr Arg Trp Thr Trp Thr Ile	20	25	30
---	----	----	----

Ala Asp Lys Arg Val Ala Asp Trp Pro Leu Met Gln Ser Pro Trp Pro	35	40	45
---	----	----	----

Thr Ile Ser Ile Ser Thr Leu Tyr Leu Leu Phe Val Trp Leu Gly Pro	50	55	60
---	----	----	----

Lys Trp Met Lys Asp Arg Glu Pro Phe Gln Met Arg Leu Val Leu Ile
65 70 75 80

Ile Tyr Asn Phe Gly Met Val Leu Leu Asn Leu Phe Ile Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Phe Met Gly Ser Tyr Asn Ala Gly Tyr Ser Tyr Ile Cys Gln Ser
100 105 110

Val Asp Tyr Ser Asn Asp Val Asn Glu Val Arg Ile Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Trp Trp Tyr Phe Val Ser Lys Gly Val Glu Tyr Leu Asp Thr Val Phe
130 135 140

Phe Ile Leu Arg Lys Lys Asn Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr
145 150 155 160

His His Cys Thr Met Phe Thr Leu Trp Trp Ile Gly Ile Lys Trp Val
165 170 175

Ala Gly Gly Gln Ala Phe Phe Gly Ala Gln Met Asn Ser Phe Ile His
180 185 190

Val Ile Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Phe Gly Pro Trp Ile
195 200 205

Gln Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Arg Tyr Leu Thr Met Leu Gln Leu Val

210

215

220

Gln Phe His Val Thr Ile Gly His Thr Ala Leu Ser Leu Tyr Thr Asp
225 230 235 240

Cys Pro Phe Pro Lys Trp Met His Trp Ala Leu Ile Ala Tyr Ala Ile
 245 250 255

Pro Lys Gln Ser Lys Thr Gly Lys Thr Ala Thr Asn Gly Ile Ser Ser
 275 280 285

Lys Asn Gly Lys Pro Lys Gly Glu
305 310

<210> 22

296

〈212〉 PRT

〈213〉 智人(*Homo sapiens*)

〈400〉 22

Met Glu His Leu Lys Ala Phe Asp Asp Glu Ile Asn Ala Phe Leu Asp
 1 5 10 15

Asn Met Phe Gly Pro Arg Asp Ser Arg Val Arg Gly Trp Phe Met Leu

20

59

Asp Ser Tyr Leu Pro Thr Phe Phe Leu Thr Val Met Tyr Leu Leu Ser
35 40 45

Ile Trp Leu Gly Asn Lys Tyr Met Lys Asn Arg Pro Ala Leu Ser Leu
50 55 60

Arg Gly Ile Leu Thr Leu Tyr Asn Leu Gly Ile Thr Leu Leu Ser Ala
65 70 75 80

Tyr Met Leu Ala Glu Leu Ile Leu Ser Thr Trp Glu Gly Gly Tyr Asn
85 90 95

Leu Gln Cys Gln Asp Leu Thr Ser Ala Gly Glu Ala Asp Ile Arg Val
100 105 110

Ala Lys Val Leu Trp Trp Tyr Tyr Phe Ser Lys Ser Val Glu Phe Leu
115 120 125

Asp Thr Ile Phe Phe Val Leu Arg Lys Lys Thr Ser Gln Ile Thr Phe
130 135 140

Leu His Val Tyr His His Ala Ser Met Phe Asn Ile Trp Trp Cys Val
145 150 155 160

Leu Asn Trp Ile Pro Cys Gly Gln Ser Phe Phe Gly Pro Thr Leu Asn
165 170 175

Ser Phe Ile His Ile Leu Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Val Phe

180	185	190
-----	-----	-----

Pro Ser Met His Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Gln Ala	195	200	205
---	-----	-----	-----

Gln Leu Val Gln Phe Val Leu Thr Ile Thr His Thr Met Ser Ala Val	210	215	220
---	-----	-----	-----

Val Lys Pro Cys Gly Phe Pro Phe Gly Cys Leu Ile Phe Gln Ser Ser	225	230	235	240
---	-----	-----	-----	-----

Tyr Met Leu Thr Leu Val Ile Leu Phe Leu Asn Phe Tyr Val Gln Thr	245	250	255
---	-----	-----	-----

Tyr Arg Lys Lys Pro Met Lys Lys Asp Met Gln Glu Pro Pro Ala Gly	260	265	270
---	-----	-----	-----

Lys Glu Val Lys Asn Gly Phe Ser Lys Ala Tyr Phe Thr Ala Ala Asn	275	280	285
---	-----	-----	-----

Gly Val Met Asn Lys Lys Ala Gln	290	295
---------------------------------	-----	-----

<210> 23

<211> 288

<212> PRT

<213> 秀丽隐杆线虫

<400> 23

Met Ala Gln His Pro Leu Val Gln Arg Leu Leu Asp Val Lys Phe Asp	1	5	10	15
---	---	---	----	----

Thr Lys Arg Phe Val Ala Ile Ala Thr His Gly Pro Lys Asn Phe Pro
20 25 30

Asp Ala Glu Gly Arg Lys Phe Phe Ala Asp His Phe Asp Val Thr Ile
35 40 45

Gln Ala Ser Ile Leu Tyr Met Val Val Val Phe Gly Thr Lys Trp Phe
50 55 60

Met Arg Asn Arg Gln Pro Phe Gln Leu Thr Ile Pro Leu Asn Ile Trp
65 70 75 80

Asn Phe Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Ala Gly Ala Val Lys Met Thr
85 90 95

Pro Glu Phe Phe Gly Thr Ile Ala Asn Lys Gly Ile Val Ala Ser Tyr
100 105 110

Cys Lys Val Phe Asp Phe Thr Lys Gly Glu Asn Gly Tyr Trp Val Trp
115 120 125

Leu Phe Met Ala Ser Lys Leu Phe Glu Leu Val Asp Thr Ile Phe Leu
130 135 140

Val Leu Arg Lys Arg Pro Leu Met Phe Leu His Trp Tyr His His Ile
145 150 155 160

Leu Thr Met Ile Tyr Ala Trp Tyr Ser His Pro Leu Thr Pro Gly Phe

165

170

175

Asn Arg Tyr Gly Ile Tyr Leu Asn Phe Val Val His Ala Phe Met Tyr
 180 185 190

Ser Tyr Tyr Phe Leu Arg Ser Met Lys Ile Arg Val Pro Gly Phe Ile
 195 200 205

Ala Gln Ala Ile Thr Ser Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Ile Ser Cys
 210 215 220

Ala Val Leu Ala His Leu Gly Tyr Leu Met His Phe Thr Asn Ala Asn
 225 230 235 240

Cys Asp Phe Glu Pro Ser Val Phe Lys Leu Ala Val Phe Met Asp Thr
 245 250 255

Thr Tyr Leu Ala Leu Phe Val Asn Phe Phe Leu Gln Ser Tyr Val Leu
 260 265 270

Arg Gly Gly Lys Asp Lys Tyr Lys Ala Val Pro Lys Lys Asn Asn
 275 280 285

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400> 24

tatagaattc aaatggacgt cgcgactacg ctg

33

<210> 25

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400> 25

tattctcgag ttcttagtcca ctttcttctc atccttc

37

<210> 26

<211> 801

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多核苷酸

<400> 26

ggatccatgg acgtcgcgac tacgctggct ggcatcgcg gggacgtgct gccccgcgtg 60

gactacgcgc ggcttggcgcg cgacgcccgc gcctgcgagg ttctataacct ttcgctgttc 120

ttcatcgcca tgaagttcat cttcgcccc ctcggcgaca agggcaggc ccgcctaag 180

tcgctttca ccctctacaa cctcgatg tccatctact ccctcgatc ttgcgttta 240

atgggctacg cttggcgga tatcgatg ctcggatgg attgcggaa agcattctca 300

aatccatgt tccgcctcac cgctcgttg ttctacatca gcaagtacgt tgagtacatc 360

gattccttct acgtgcttct caccaacaag cccctgaccc acctgcgtt cttccaccac 420

ctcggagccc ccgtcgacct ctggcttcc ctgcagtacg aaaacgaggc gctgtggatc	480
ttcgtcttcc tcaacggctt catccacttc atcatgtacg ggtactactg ggcccggttg	540
gtgaagctcc cggtccccgt gccgaagtgc ttcatcacct ccatgcagat catccagttc	600
aacctgggct tctacctcggt gtggcggtac cacacaatcc cgtgttaccg acaggaccca	660
atgcgaatgt tcgcttggct cttcaactac ttctacgtgg gagtggtctt actgctgttt	720
ttgaatttct acgtgcacac gtacgtgatc aagaaagcgc ggcggctggc gaaggatgag	780
aagaaagtgg actagaagct t	801

〈210〉 27

〈211〉 801

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 人工序列描述 :合成多核苷酸

〈400〉 27

ggatccatgg acgtcgcgac taegctggcc ggcatcgccg cggacgtgct gccccgcgtg	60
gactacgcgc ggcttggcg cgacgccgtc gcctgcgagg ttctataacct ttgcgttgc	120
ttcatcgcca tgaagttcat cttcgcccc ctcggcgaca aggggcaggg ccgcctcaag	180
tgcgtttca ccctctacaa cctcgatg tccatctact ccctcgatc ttgcgttata	240
atgggctacg cttggcgga tatcgatg ctcgggtgg attgcggaa agcattctca	300
aatcccttgt tccgcatcac cgctcgttgc ttctacatca gcaagtacgt tgagtacatc	360
gattccttct acgtgcttct caccaacaag cccctgaccc acctcgatc ttccaccac	420
ctcggagccc ccgtcgacct ctggcttcc ctgcagtacg aaaacgaggc gctgtggatc	480

ttcgtttcc tcaacggctt catccacttc atcatgtacg ggtactactg ggcccggtg	540
gtgaagctcc cggtccccgt gccgaagtgc ttcatcacct ccatgcagat catccaggttc	600
aacctgggct tctacctcggtac cacactatcc cgtgctaccg acaggaccca	660
atgcgaatgt tcgcttggtt cttcaactac ttctacgtgg gagtggtctt actgctgttt	720
ttgaatttct acgtgcacac gtacgtgatc aagaaggcgc ggccggctggc gaaggatgag	780
aagaaagtgg actagaagct t	801

⟨210⟩ 28

⟨211⟩ 5

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ 人工序列

⟨220⟩

⟨223⟩ 人工序列描述 :合成肽

⟨220⟩

⟨221⟩ MOD_RES

⟨222⟩ (2)..(3)

⟨223⟩ 任何氨基酸

⟨400⟩ 28

His Xaa Xaa His His

1 5

⟨210⟩ 29

⟨211⟩ 5

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ 人工序列

⟨220⟩

<223> 人工序列描述 :合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(3)

<223> 任何氨基酸

<400> 29

Gln Xaa Xaa His His

1 5

<210> 30

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多肽

<400> 30

Arg Ser Arg Arg Arg Pro Leu Gly Pro Gly Gly Ser Val Arg Pro Ser
1 5 10 15

Ser Pro Gly Ile Glu Pro Thr His Ser Pro Thr Ser Leu His Asp Thr
20 25 30

Pro Phe Pro Pro Pro Gln Ser Thr Val Glu Arg Tyr Pro Gly Pro Ser
35 40 45

Thr His Thr Cys Asp Gln Met Ala Val
50 55

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成肽

<400> 31

Pro Leu Arg Asp Ser Glu Ser Cys Pro Asn His Leu Phe

1

5

10

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> 任何氨基酸

<400> 32

Asn Ser Arg Leu Asp Cys Val Glu Leu Asp Pro Met Thr Leu Val Phe

1

5

10

15

Pro Tyr Arg Cys Xaa Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

20

25

30

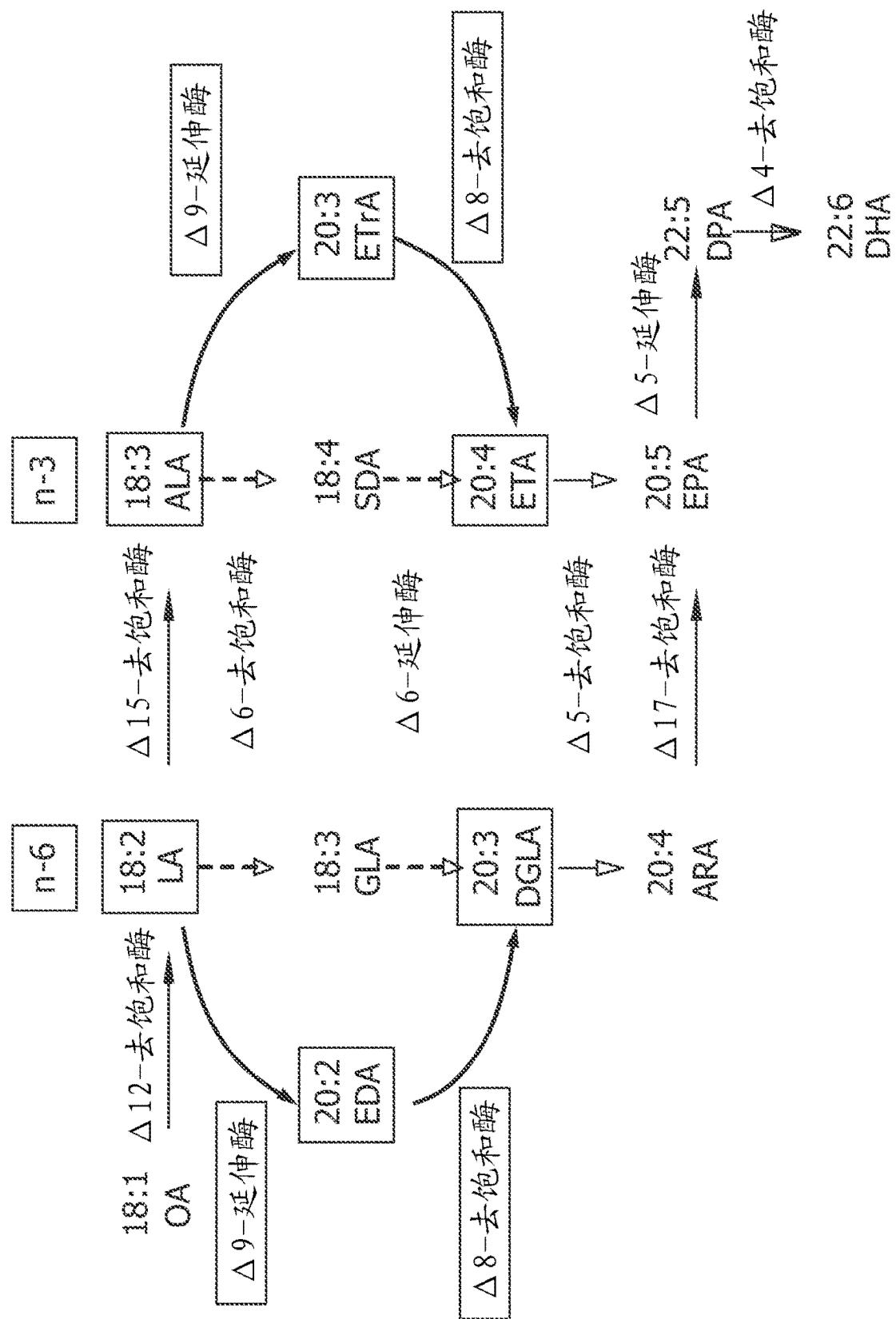


图 1

Eug-MO7-ELO #10 (1) 1 GGATCCATGGACGTCGGCACTACGGCTGGC
 Eug-MO7-ELO #14 (1) GGATCCATGGACGTCGGCACTACGGCTGGC 50
 Eug-MO7-ELO #10 (51) 51 GCCCCCCGGACTACGGCGCTGGGCCACGGCGC
 Eug-MO7-ELO #14 (51) GCCCCCCGGACTACGGCGCTGGGCCACGGCGC 100
 Eug-MO7-ELO #10(101) 101 TTCTTACCTTGCTGTCTCATGCCATTCA
 Eug-MO7-ELO #14(101) TTCTTACCTTGCTGTCTCATGCCATTCA 150
 Eug-MO7-ELO #10(151) 151 CTCGGCGACAAGGGGCAGGGCCCAAG
 Eug-MO7-ELO #14(151) CTCGGCGACAAGGGGCAGGGCCCAAG 200
 Eug-MO7-ELO #10(201) 201 CCTCGGTGATGTCCATCTACTCCCGATCT
 Eug-MO7-ELO #14(201) CCTCGGTGATGTCCATCTACTCCCGATCT 250
 Eug-MO7-ELO #10(251) 251 CCTTGGGGATAATCGGAGTGGTGA
 Eug-MO7-ELO #14(251) CCTTGGGGATAATCGGAGTGGTGA 300
 Eug-MO7-ELO #10(301) 301 AATCCCCAATGGTCCGG
 Eug-MO7-ELO #14(301) AATCCCCAATGGTCCGG 350
 Eug-MO7-ELO #10(351) 351 TGAGTACATCGATTCCCTAC
 Eug-MO7-ELO #14(351) TGAGTACATCGATTCCCTAC 400
 Eug-MO7-ELO #10(401) 401 ACCCTGGCAGTTCTCCACCC
 Eug-MO7-ELO #14(401) ACCCTGGCAGTTCTCCACCC 450

图 2A

图 2B

	1	50
Eug-MO7-ELO-10	(1) -----MDVATTLAGIAADVLPRVDYARLGRDAAACEVLY	
小眼虫-D9	(1) -----MEVVNETIVSIGQEVLPKVDYAQQLWSDASHCEVLY	
球等鞭金藻-D9	(1) -----MALANDAGERIWAAVTDPEILI	
小鼠-Elov14	(1) MGLLDSEPGSVLNAMSTAFNDTVEFYRWTWTIADKRVADWPLMQSPWPPTI	
人-EL0VL2	(1) -----MEHLKAFDDEINAFLDNMFGPRDSRVRGWFMLDSYLPFT	
秀丽隐杆线虫-ELO	(1) --MAQHPLVQRLLDVKFDTKRFVAIATHGPKNFPDAEGRKFADHFDTI 51	
		100
Eug-MO7-ELO-10	(35) LSLFFIAMKFILRPLG--DKGQARLKSLFTLY LVMSIYSLGSFVVMGYA	
小眼虫-D9	(35) LSIAFVILKFTLGPLG--PKGQSRMKFVFTNY LLMSIYSLGSFLSMAYA	
球等鞭金藻-D9	(23) GTFSYLLLKPLLRLNSGLVDEKKGAYRTSMIWIY VLLALFSALSFYVTATA	
小鼠-Elov14	(51) SISTLYLLFVWLGPWKWMKDREPQFMRLVLIY FGMVLLNLFIGRELFG	
人-EL0VL2	(40) FLTVMYLLSIWLGKYMKNRPALSRLRGILTLY LGITLLSAYMLAELILS	
秀丽隐杆线虫-ELO	(49) QASILYMWVVVGTKWFMNRQPQLTIPLNIW FILAAFSIAGAVKMTPE	
		150
Eug-MO7-ELO-10	(83) LA-----DIGVLGGDCGKAFSNPMFRITAQLFYI YY Y	
小眼虫-D9	(83) MY-----TIGVMSDNCEKAFDNNVFRITTQLFYL FL Y	
球等鞭金藻-D9	(73) LGWDYGTGAWLRRQTGDTPQPLFQCPSPVWDSKLFTWTAKAFYY YY Y	
小鼠-Elov14	(101) SY-----N-AGYSYICQSVDYSNDVNEVRIAALWWYFVS GV Y	
人-EL0VL2	(90) TW-----E--GGYNLQCQDLTSAGEADIRVAKVLWWYYF SV F	
秀丽隐杆线虫-ELO	(99) FF-----GTIANKGIVASYCKVFDFTKGENGYWWLFMAS LP L	
		200
Eug-MO7-ELO-10	(118) I SFYVL TNK--PLTY QFF LGAPVDLWLFLQYNEALWIF-VFL G	
小眼虫-D9	(118) I SFYLP MGK--PLTW QFF LGAPMDMWLFYNYRNEAWWIF-VLL G	
球等鞭金藻-D9	(123) L TAWLV KGK--RVSF QAF FGAPWDVYLGIRLHNNEGFWIF-MFFNS	
小鼠-Elov14	(140) L TVFFI RKKNNOVSF HWY CTMFTLWWIGIKWVAGGQAFFGAQMRS	
人-EL0VL2	(128) L TIFV RKKTTSQITF HWY ASMFNIWWCVLNWIPOCGQSFFGPTL S	
秀丽隐杆线虫-ELO	(139) V TIFLVI KCR--PLMF HWY ILTMIYAWYSHPLPGFNRYG-IYL F	
		151

图 3A

		201		250
Eug-MC7-ELO-10	(165)	FIFIFIGGWWARILVKLPFPVP---KSFITSMQIIQENLG--FYLVWRYH		
小眼虫-D9	(165)	PIIWIMMGGWWTRLIKLKFPMP---KSLITSMQIIQENVG--FYIVWKYR		
球等鞭金藻-D9	(170)	FIITTIMSTYGLTAAGYKFKA----KPLITAMQICQEVGG--FLLVWDYI		
小鼠-Elov14	(190)	FIIVVIMESYGLTAFGPWIKQKYLWWKRYLQMLQLVQ-----H-VTIGHT		
人-EL0VL2	(178)	FIKILIMSSYGLSVFPMHKYL-WKKYLTQAQLVQEV-----LTITHT		
秀丽隐杆线虫-ELO	(186)	VVIAFMSSYFLRSMKIRVPGF--IAQAITSLQIVQIISCAVLAHLGYL		
		251		300
Eug-MC7-ELO-10	(210)	TIPCYRQDPMRMFAWLNFYVGVVLLQELNQYVHTYVIKKARRLAKDEK		
小眼虫-D9	(210)	NIPCYRQDGMRMFGWFFNYFYVGTVLCLQELNQYVQTYIVRKHKGAKKIQ-		
球等鞭金藻-D9	(214)	NVPCFNSDKGKLFQAFNYAYVGSVFLECHFQDNLATKKSAKAGKQL		
小鼠-Elov14	(234)	ALSLYTDCPFPKWMHWALIAYAISFIFQELNQYTRTYNEPKQSKPGKTAT		
人-EL0VL2	(221)	MSAVVKPCGFPFGCLIFQSSYMLTLVILQELNQYVQTYRKKPMKKDMQEPP		
秀丽隐杆线虫-ELO	(234)	MHFTNANCDFEPSPVFKLAVFMDTTYLAQVNQFLQSYVLRGGKDKYKAVP		
		301		329
Eug-MC7-ELO-10	(260)	KVD-----		
小眼虫-D9	(259)	-----		
球等鞭金藻-D9	(264)	-----		
小鼠-Elov14	(284)	NGISSNGVNKSEKALENGKPQKNGKPKGE		
人-EL0VL2	(271)	AGKEVKNGFSKAYFTAANGVMNKKAQ---		
秀丽隐杆线虫-ELO	(284)	KKKNN-----		

图 3B

盐生巴夫藻 Δ 9-延伸酶 (SEQ ID NO: 1)

1 MKAAGKVVQQEAERLTAAGLWLPMMLAAGYLLVLSANRASFYENINNEKGAA
51 YSTSWFSLPCVIMTAVYLGGVFGTLTKYFEGRKPMQGLKDYMFTYYNLYQVII
101 NVWCIAAFVVEVRAGMSAVGNKVDLGPNSFRLGTVTWWVHYNNNKYYVELLD
151 TLWMVLRKKTTQQVSFLHHVVYHHVLLIWIWAWFCVVKFCNGGDAYFGGMLNSII
201 HVMMSYYTMALLGWSCPWKRYLTTQAQLVQFCICLAHATWAATGVYPFH
251 ICLVEIWVIVSMLYLFTKFYNNSAYKGAAKGAAASSNGAAAAPS
301 AN

图 4A

球等鞭金藻 Δ 9-延伸酶 (SEQ ID NO: 2)

1 MALANDAGERIWAAVTDPPEILLGTSYLLKPLLRLNSGLVDEKKGAYRTS
51 MIWYNVLLALFSAALSFYVVTATALGWDYGTTGAWLRRQTDTPQPLFQCPSP
101 VWDSDKLFTWTAKAFYYSKYVEYLDTAWLVLKGKRVSFLQAFHHFGAPWDV
151 YLGIRLHNEGVWIFMFFNSFIHTIMYTYYGLTAAGYKFKAKPPLITAMQIC
201 QFVGCGFLLVWWDYINVPCFNSDKGKLFSWAFNYAYVGSVFLLFCFFFYQDN
251 LATKKSAKAGKQL

图 4B

裸藻属物种 Δ 9-延伸酶(SEQ ID NO: 3)

1 MAVIEVANEFAAITAETLPLKVDYQRLWWRDIYSCELLYFSIAFVILKFTL
51 GELSDSGKKIILRVLFKWYNLFM\$VFSLV\$FLCMGYAIYTVGLYSNECDRA
101 FDNSLFRFATKVFYYSKFLEYIDSFYLPILMAKPLSFLQFFHHLGAPMDMW
151 LFVQYSGESIWIIFVFLNGFIHFVMYGYYWTRLMKFNFPMPPKQLITAMQIT
201 QFNVGFYLVWWYKDIPCYRKDPMRMLAWIIFNYWYVGTVLLLFINFFVKSY
251 VFPKPKTADKKVQ

图 4C

小眼虫 Δ 9-延伸酶(SEQ ID NO: 4)

1 MEVVNEIVSIGQEVLPKVDYAQQLWSDASHCEVLYLSIAFVILKFTLGPLG
51 PKGQSRMKFVFTNNYNNLLMSIYSLGSFLSMAYAMYTIGVMSDNCEKAFDNN
101 VFRITTQLFYLSKFLEYIDSFYLPPLMCKPLTMQFFHHLGAPMDMWLFYN
151 YRNEAVWIFVLLNGFIHWIMYGYYWTRLIKLIKFPMPKSLITSMQIIQFNV
201 GFYIVWKYRNIPCYRQDGMRMFGWFFNYFYVGTVLCLFLNFYVQTYIVRK
251 HKGAKKIQ

图 4D

Euglena anabena Δ 9-延伸酶 (SEQ ID NO: 5)

1 MEAAKELVSIIVQEEELPKVDYAQQLWQDASSCEVLYLSVAIKFMLRPLD
51 LKRQATLKKLEFTAYNFLMSIYSFGSFLAMAYALSVTGILSGDCETAFNNND
101 VFRITTQLFYLSKFVEYIDSFYLPPLMDKPLSFLQFFHHLLGAPIDMWLIFYK
151 YRNNEGIVWIFVLLNGFIHWIMYGYYWTRLIKLNFPMPKVNLTSMQIIQFNV
201 GFYIVWWKYRNIVPCYRQDGMRMFAWIFNYWYVGTVLLLFLNFYVQTYIRKP
251 RKNQQGKKE

图 4E

SEQ ID NO: 6

1 TTTCGGGATTCCCCGGAAATTTCCTGTGACCCCTCACCACACACACCCCCAAAGGATGGACG
 51 CCCCCCTCCCTCCTGTGACCCCTCACCACACACACACCCCCAAAGGATGGACG
 101 TCGCGACTACGCTGGCTGGCATCGCGGGGACGGTGCCTGCCCGCGTGGAC
 151 TACGCCGGCTTGGCGCGACGCCGGCTGGAGGGTCTAACCTTTC
 201 GCTGTTCTTCATGCCATGCCATGAAGTTCATCCTTCGCCCCCTCGGGACAAAGG
 251 GGCAAGCCCCGCTCAAGTCCGCTCTCACCCCTCTACAACACTCGTGATGTCC
 301 ATCTACTCCCTCGGATCTTTCTGTTGTAATGGGCTACGGCCTTGGGGATAT
 351 CGGAGGTGCTCGGTGATTCGGGAAAGCATTCTCAAATCCCATGTTCC
 401 GCCTCACCGCTCAGTTGTTCTACATCAGCAAGTAGTACGGTTGAGTACATTCGAT
 451 TCCTTCTACGTTGCTTCTCACCCAAGCCCCCTGACCTAACCTGCAGTTCTT
 501 CCACCAACCTCGGAGCCCCGGTCACTGGACCTCTGGCTCTCCGCAGTACGAAA
 551 ACGAGGGCCTGTTGGATTCCTTCGTCATCCACTTCATCCACTTCATC
 601 ATGTAACGGGTACTACTGGGCCCCGGCTGGTGAAGGCTCCGGTGGCTGCC
 651 GAAGTCGTTCATCACCTCCATGCAGATCATCCAGTTCAACCTGGGGCTTCT
 701 ACCTCGTGTGGGGTACCAACACACATCCCCGCTACCGACAGGAC

图 5A

SEQ ID NO: 7

1 MDVATTLAGIAADVLPRVDYARLGRDAAACEVLYLSLFFIAMKFLRPLG
51 DKGQARLKSLFTLNYNLVMSIYSLGSFVVVMGYALADIGVLLGGDCGKA
FSNPK
101 MFRILTAQLFYISKYYVEYIDSFYVLLTNPPLTYLQFFFHHLGAPV
DLWLFLO
151 YENEALWIFVFLNGFIHFIMYGYYWARLVKLPPFPVPKSFITSMQII
QFN
201 GFYLVWRYHTIPCYRQD

图 5B

SEQ ID NO: 13

1 TCCCCGTGCCGAAGTCCGTTCATCACCTCCATGCAGATCATCCAGTTCAAC
51 CTGGGCTTCTACCTCGTGTGGCGGTACCACTATCCGGTGCTACCGACA
101 GGACCCAATGCGAATGTTCGCTTCGCTTCAACTACTTCTACGTGGGAG
151 TGGTCTTACTGCTGTTTTGAATTTCAGTGCACACGTACGTGATC
201 AAGAAGGGGGGGCTGGCGAAGGAGATGAGAAGAAAGTAGTGGACTAGCGGGAG
251 CCCGGGGCCCCACTGGACCCGGTGGCTCCGTGCGCCCCCTCGCCCCG
301 GCATCGAACCCACCCAYTCCCCACTAGCCTCCACGATACTCCCTCCCT
351 CCTCCCCAGTCCACCGTCAAGGTATCCAGGCCCTCGACTCACACTTG
401 CGACCAAGATGGCGGTTAACCTCTGGGGACTCGGGAGTTGCCCTAAC
451 ATCTGTTCTAGAACTCGCGATTGGACTGTGTTGAACTGGATCCGATGACC
501 CTCGTTTTCCATACCGTTGTWMAAAAAAAA
551 A

图 6A

1 PVPKSFTSMQIIQFNLGFYLVWWRYHTIIPCYRQDPMIRMFAWLFLNYYFYVG
 51 VLLLFLNFYVHTTYVIKKARRLAKEKKVVD*RSRRRPLGPGGSVRPSSPGIE
 101 PTHSPTSLHDTPFPQQSTVERYPGPSTHTCDQMAV*PLRDSESCPNNHLF*N
 151 SRLDCCVELDPMTLVFPYRCXKKKKKKK

图 6B

SEQ ID NO: 14
 1 PVPKSFTSMQIIQFNLGFYLVWWRYHTIIPCYRQDPMIRMFAWLFLNYYFYVG
 51 VLLLFLNFYVHTYVIKKARRLAKEKKVDD

图 6C

SEQ ID NO: 30
 1 RSRRRPLGPGGSVRPSSPGIEPTHSPTSLHDTPFPPQQSTVERYPGPSTH
 51 TCDQMAV

图 6D

SEQ ID NO: 31

1 PLRDSESCPNHLF

图 6E

SEQ ID NO: 32

1 NSRLDCVELDPMTLVFPYRCXKKKKKKKK

图 6F

SEQ ID NO: 17

1 ATGGACGTCGCGACTACGGCTGGCATCGCGGCCGACGTGCTGCC
 51 CGTGGACTACGGCGGGCTTGGCGCGACGGCCTGGAGGTTCTAT
 101 ACCTTTCGCTGTCTTCATCGCCATGAAGTTCATCCTTCGCCC
 151 GACAAGGGCAGGGCCCTCAAGTCGCTCTCACCCCTACAACCTCGT
 201 GATGTCGATCTACTCCCTCGGATCTTTGGTTGTAATGGCTACGGCTTG
 251 CGGATATCGGAGGTGCTCGGTGGTGAATTGGGGAAAGCATTCTCAAATCCC
 301 ATGTTCCGCTCACCGCTCAGTTCTACATCAGCAAGTAGCTTGA
 351 CATCGATTCCCTTCTACGTCGCTTCTCACCAACAAAGCCCC
 401 AGTTCTTCCACCAACCTCGGAGCCCCCGTCGACCCTCTGGCTCT
 451 TAGGAAACGAGGGCTGTTGATCTTCGTCCTCACCGGCTTCATCCA
 501 CTTCATCTGTACGGGTACTACTGGCCCCCATGCAGATCATCC
 551 CCGTGGCGAAGTCGTTCATCACCTCCATCCAGTTCAACCTG
 601 GGCTTCTACCTCGTGGCGGTACCCACACAATCCC
 651 CCCAATGCGAATGTTGGCTCTCAACTACTTCTACGTTGGAGTGG
 701 TCTTACTGCTGTTTTGAATTCTACGTCACACGTACGTGATCAAGAAA
 751 GCGGGCGGCTGGCGAAGGATGAGAAGTAGGGACTAG

图 7A

SEQ ID NO: 18

1 MDVATTLAGIAADVLPRVDYARLGRDAAACEVLYLSLEFFIAMKFLIRPLG
51 DKGQARLKSLIFTLYNLVMSIYSLGSFVWMGYALADIGVILGGDCGKAQFSNP
101 MFRRLTAQLFYISKYVEYIDSFFYVLLTNKPLTYLQFFFHHILGAPVDLWLFHQ
151 YENEALWIFVFLNGFIHFIMYGYYWARKLVKLPPFPVPKSFITSMQILOQFNLL
201 GFYLVWVRYHTIPCYRQDPMRMFAWLFINYFYVGVVLLLFLNVHTYVIKK
251 ARRLAKDEKKVD*

图 7B

SEQ ID NO: 19

1 ATGGACGCTCGCGACTACGGCTGGGCCATCGCGGGACGTGCTGCCCG
 51 CGTGGACTACGGCGCTTGGGGACGGCGCTCGCCTGGAGGTTCTAT
 101 ACCTTTCGCTGTTCTTCATGCCATGAAAGTTCATCCTTCGCCCCCTCGGC
 151 GACAAGGGCAGGCCGCTCAAGTCGCTCTCACCAACCTCGT
 201 GATGTCATCTACTCCCTCGGATCTCGTTTCGTTATAATGGGCTACGCCCTGG
 251 CGGATATCGGAGTGCTCGGTGATTGGGGAAAGCATTCTCAAATCCC
 301 TTGTTCCGCATCACCGCTCAGTTGTTCTACATCAGCAAGTACGTTGAGTA
 351 CATCGATTCCCTTACG TGCTTCTCACCAACAAAGCCCCCTGACCTACCTGC
 401 AGTTCTCCACCTCGGAGCCCCGTCGACCTCTGGCTCTCCTGCAG
 451 TACGAAAACGAGGGCTGTGGATCTTCGTCCTCAACGGCTTCATCCA
 501 CTTCATCGTACGGGTACTACTGGCCGGCTGGTGAAGCTCCGTTCC
 551 CCGTGCCGAAGTCTGGTTCATCACCTCCATGCAGATCATCCAGTTCAACCTG
 601 GGCTTCTACCTCGTGTGGGGTACCAACTATCCCGTACCGACAGGA
 651 CCCAATGGGAAATGTTGGCTTCAACTACCTCTACGTTGGAGTGG
 701 TCCTTACTGCTGTTTGAATTCTACGTCACACGTACGTGATCAAGAACG
 751 GCGCGGGCTGGCGAAGGATGAGAAGAAAGTAGCTGGACTAG

图 8A

SEQ ID NO: 20

1 MDVATTLAGIAADVLPRVDYARLGRDAVACEVLYLSLFFIAMKFIILRPLG
51 DKGQARLKSLLFTLYNLMMSIYSLGSFVIMGYALADIGVLLGGDCGKAFSNP
101 LFRITAQLFYISKYVEYYIDSFYVLLTNKPLTYLQFFFHHLGAPVDLWLFHQ
151 YENEA LWIIFVFLNGFIHFIH FIMYGYYWARLVKL PFPVPKSFITSMQIIQFNLL
201 GFYLVWWRYHTIPCYRQDPMRMFAWL FNYYFYVGVVLLFLNFYVHTYVIKK
251 ARR LAKDEEKVVD*

图 8B

小鼠Elov14延伸酶 (SEQ ID NO: 21)

1 MGLLDSEPGSVLNAMSTAFNDTVEFYRWTWTTIADKRVADWPPLMQSPWPTI
51 SISTLYLLFVWLGPKWMKDREPFFQMRVLVLIYNGGMVLLNLFIIFRELFG
101 SYNAGYSYICQSVDYSNDVNEVRIAAAALWWYFVSKGVEYLDOTVFFILRK
151 NNQVSFLHHVYYHHCTMFTLWWIGIKWVAGGQAFFGAQMNNSFIHVIMYSYG
201 LTAFGPWIQKYLWWWKRYLTMLQLVQFHVTIGHTALSLYTDCPFVMMHWA
251 LIAYAISFIFLNFYTRTYNNEPKQSKTGKTATNGISSNGVNKSEKALEN
301 GKPQKNGKPKGE*

图 9A

人EL0VL2延伸酶(SEQ ID NO: 22)

```

1 MEHLKAFDDDEINAFLDNMFGPRDSRVRGVFWFMLDSYLPPTFFLTVMYLLSIW
51 LGNKYMKNRPALSRLRGILTLGILTLYNLGSAYMLAEILILSTWEGGYNQLQCQ
101 DLTSAAGEADIRVAKVLWWYYFSKSVEFLDTIFVLRKKTSQITFLHHVVHH
151 ASMFNIIWWCVLNWIPCGQSFFGPTLNNSFIHILMYSYYGLSVFPSTMHKYLVW
201 WKKYLTQAQLVQFVLTTHTMSAVVKPCGFFGCLIFQSSYMLTLVILFL
251 NFYVQTYRKKPMMKKPMKKDMQEPAGKEVKNGFSKAYFTAANGVMNKKAQ*

```

图 9B

秀丽隐杆线虫延伸酶(SEQ ID NO: 23)

```

1 MAQHPLVQRLLDVKFDTKRFVAIATHGPKNFPDAEGRKFFADHFDFDTIQA
51 SILYMVVVFGTKWFMNRQPFQLTIPLNINWNFILAAFSIAGAVKMTPEFFF
101 GTIANKGIVASYCKVFDFTKGENGYWWVLFMASKLFFELVDTIFLVLRKRP
151 LMFLHWYHHILTMIIYAWYSHPLTPGFNRGYGIYLNFMYSYYFLRSM
201 KIRVPGFIAQAITSLQIVQFIIISCAVLAHLGYLMHFTNANCDFEPEPSVFKL
251 AVFMDTTYLAFLVNFFLQSYVLRGGKDKYKAVPKKKNN*

```

图 9C