



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101970638 B

(45) 授权公告日 2015. 02. 11

(21) 申请号 200880118875. 4

(22) 申请日 2008. 10. 03

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2010. 06. 02

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2008/078642 2008. 10. 03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02009/046231 EN 2009. 04. 09

(83) 生物保藏信息
PTA-8614 2007. 08. 23
PTA-8802 2007. 11. 29

(73) 专利权人 纳幕尔杜邦公司
地址 美国特拉华州

(72) 发明人 Z · 薛 N · S · 亚达夫 Q · Q · 朱

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公
司 72001
代理人 李波 郭文洁

(51) Int. Cl.

C12N 1/00 (2006. 01)

C12P 7/64 (2006. 01)

C12N 15/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 1544281A A, 2005. 06. 22, 全文 .

US 2007/118929 A1, 2007. 05. 24, 全文 .

US 2006/0115881 A1, 2006. 06. 01, 说明书第
23-27、175-176、317 段, 表 1、9, 序列 50、54-62.

审查员 蔺娜

权利要求书1页 说明书101页 附图12页

(54) 发明名称

用于高水平生产二十碳五烯酸的优化解脂耶
氏酵母菌株

(57) 摘要

本发明描述了工程化的含油酵母解脂耶氏酵
母菌株, 该菌株能够生产在总油级分大于 50 重
量%的二十碳五烯酸 [“EPA”], 这是一种 ω -3 多
不饱和脂肪酸。这些菌株过表达异源 $\Delta 9$ 延伸酶、
 $\Delta 8$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶、 $\Delta 17$ 去饱和酶、 $\Delta 12$
去饱和酶和 $C_{16/18}$ 延伸酶, 并且任选地过表达二酰
基甘油胆碱磷酸转移酶。也描述了优选的基因敲
除菌株。来自优化的解脂耶氏酵母菌株的生产宿
主细胞、用于在所述宿主细胞中生产 EPA 的方法、
和包含 EPA 的产物是受权利要求书保护的。

1. 用于生产二十碳五烯酸的重组解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 生产宿主细胞, 所述细胞包含:

六个拷贝的编码 $\Delta 9$ 延伸酶的基因, 所述 $\Delta 9$ 延伸酶由 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列组成;

一个拷贝的编码 $\Delta 9$ 延伸酶的基因, 所述 $\Delta 9$ 延伸酶由 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列组成;

六个拷贝的编码 $\Delta 8$ 去饱和酶的基因, 所述 $\Delta 8$ 去饱和酶由 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列组成;

四个拷贝的编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因, 所述 $\Delta 5$ 去饱和酶由 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列组成;

一个拷贝的编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因, 所述 $\Delta 5$ 去饱和酶由 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列组成;

三个拷贝的编码 $\Delta 17$ 去饱和酶的基因, 所述 $\Delta 17$ 去饱和酶由 SEQ ID NO:51 所示的氨基酸序列组成;

五个拷贝的编码 $\Delta 12$ 去饱和酶的基因, 所述 $\Delta 12$ 去饱和酶由 SEQ ID NO:55 所示的氨基酸序列组成;

四个拷贝的编码 $C_{16/18}$ 延伸酶的基因, 所述 $C_{16/18}$ 延伸酶由 SEQ ID NO:61 所示的氨基酸序列组成;

两个拷贝的编码二酰基甘油胆碱磷酸转移酶的基因, 所述二酰基甘油胆碱磷酸转移酶由 SEQ ID NO:69 所示的氨基酸序列组成;

过氧化物酶体生物合成因子蛋白, 其表达被下调, 其中所述过氧化物酶体生物合成因子蛋白由 SEQ ID NO:104 所示的氨基酸序列组成; 和

失活的 SEQ ID NOs:87、89 和 91 所示的基因;

其中所述生产宿主细胞生产按所述生产宿主细胞中总脂肪酸重量%计 50-60 重量%的二十碳五烯酸。

2. 权利要求 1 的重组解脂耶氏酵母生产宿主细胞, 其中所述宿主细胞生产按所述生产宿主细胞中总脂肪酸重量%计 53.2% -60% 的二十碳五烯酸。

3. 用于生产包含二十碳五烯酸的微生物油的方法, 所述方法包括:

- a) 培养权利要求 1 的生产宿主细胞, 其中生产包含二十碳五烯酸的微生物油; 以及
- b) 任选地回收步骤 (a) 的微生物油。

用于高水平生产二十碳五烯酸的优化解脂耶氏酵母菌株

[0001] 本专利申请要求提交于 2007 年 10 月 3 日的美国临时申请 60/977,174 和 60/977,177 的优先权,它们全文以引用方式并入本文。

发明领域

[0002] 本发明属于生物技术领域。更具体地讲,本发明涉及工程化的含油酵母解脂耶氏酵母菌株,该菌株能够高水平有效地生产二十碳五烯酸—一种 ω -3 多不饱和脂肪酸。

[0003] 发明背景

[0004] 二十碳五烯酸 (“EPA”;顺式 -5,8,11,14,17- 二十碳五烯酸; ω -3) 是生物活性前列腺素的生物合成过程中的一种重要中间体。此外,认为 EPA 具有临床和药用价值。例如,已知 EPA 具有以下药理学作用:1) 血小板凝集抑制作用(溶血栓作用);2) 血液中性脂肪降低作用;3) 血液 VLDL-胆固醇和 LDL-胆固醇降低作用和 HDL-胆固醇提高作用(抗动脉硬化作用);4) 血液粘度降低作用;5) 降血压作用;6) 抗炎作用;和 7) 抗肿瘤作用。同样,EPA 提供一种降低血液胆固醇和甘油三酯的天然方法。增加 EPA 的摄取已经显示是有益的,或者对冠心病、高血压、炎症病症(例如类风湿性关节炎)、肺病和肾病、II 型糖尿病、肥胖症、溃疡性结肠炎、克隆氏病、神经性厌食症、烧伤、骨关节炎、骨质疏松、注意力缺乏/多动症、以及早期结直肠癌具有积极效果。参见例如综述 McColl, J., NutraCos, 2(4): 35-40 (2003); Sinclair, A., 等人, In Healthful Lipids; C. C. Akoh and O. -M. Lai, 编辑; AOCS; Champaign, IL, 2005; Chapter 16。近来的发现也已经证实 EPA 在治疗精神病症方面的用途,例如精神分裂症(美国专利公开 6,331,568;美国专利公开 6,624,195)。最后,也可将 EPA 用于涉及功能性食品(保健品)、婴儿营养品、批量营养物质、化妆品和动物健康的产品。

[0005] 期望使用重组方法用微生物生产 EPA,该方法与从天然微生物来源生产的 EPA(例如异养生物硅藻小环藻属和菱形藻属;假单胞菌属、交替单胞菌属或希瓦氏菌菌种;丝状真菌属或腐霉属;或长被孢霉、根结线虫、或水蓑衣线虫)或分离自鱼油和海洋浮游生物 EPA 相比具有若干个优点。例如,能够使用具有优选的产油特性的重组微生物,因为宿主天然存在的微生物脂肪酸特征能通过将新生物合成途径导入宿主和/或抑制不可取的途径而被改变。这导致所需多不饱和脂肪酸[“PUFA”]或其共轭形式的生产水平提高并且减少不可取 PUFA 的生产。第二,重组微生物能够提供特殊形式的 PUFA,该 PUFA 可具有特别的用途。此外,能通过控制培养条件操纵微生物油生产,要注意的是通过向微生物表达的酶提供特定的底物源,或通过加入化合物/基因工程以抑制不可取的生物化学途径。因此例如改变由此生产的 ω -3 对 ω -6 脂肪酸的比率或工程化生产不显著积聚其它下游或上游 PUFA 产物的特殊 PUFA(例如 EPA)是可能的。在重组微生物中的 EPA 生产也避免使用非持续性的海洋来源物质,这些物质会产生令人讨厌的风味和污染物,它们很难去除并且去除费用昂贵。分离自发酵重组微生物的所得 EPA 油不需要纯化这些生物积聚的化合物。

[0006] 文献报道了许多最近的实例,其中负责 EPA 生产的 ω -3/ ω -6 PUFA 生物合成途径的不同部分已经被导入植物(例如 Qi, B. 等人, Nature Biotech., 22:739-745 (2004)) 和

啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (非含油酵母) (参见 Dyer, J. M. 等人, Appl. Environ. Microbiol., 59:224-230 (2002); 美国专利公开 6,136,574; Domergue, F. 等人, Eur. J. Biochem., 269:4105-4113 (2002))。

[0007] 解脂耶氏酵母具有许多使其尤其可用于 PUFA 生产的特性 (参见例如共有的美国专利公开 7,238,482)。将含油酵母定义为那些天然能够合成并积聚油的酵母,其中积聚的油为细胞干重的至少 25%。EPA 的商业生产将需要生产按总脂肪酸重量%计高产 EPA 的菌株。申请人通过工程化高度优化的解脂耶氏酵母菌株已经解决了所述问题,该菌株能够生产在总油级分中大于 53.2% 的 EPA。

[0008] 发明简述

[0009] 本发明提供在微生物油中合成 EPA 的生产宿主。所述菌株是重组耶氏酵母菌种,该菌株在其基因组内掺入许多基因元件和修饰,使其就 EPA 生产而言具有独特的吸引力。

[0010] 因此,本发明提供了用于生产二十碳五烯酸的重组耶氏酵母菌种生产宿主细胞,所述细胞包含:

[0011] a) 至少一种编码 $\Delta 9$ 延伸酶的基因,所述延伸酶具有选自 SEQ ID NO:5、7、9、11、13、15 和 17 的氨基酸序列;

[0012] b) 至少一种编码 $\Delta 8$ 去饱和酶的基因,所述去饱和酶具有选自 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、29、31 和 33 的氨基酸序列;并且

[0013] 其中耶氏酵母菌种生产宿主细胞生产按生产宿主细胞中总脂肪酸重量%计至少约 43.3 重量%的二十碳五烯酸。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明提供用于生产包含二十碳五烯酸的微生物油的方法,所述方法包括:

[0015] a) 培养本发明的生产宿主,其中生产包含二十碳五烯酸的微生物油;并且

[0016] b) 任选地回收步骤 (a) 的微生物油。

[0017] 在另一个实施方案中,本发明提供微生物油组合物,所述微生物油组合物具有按总脂肪酸重量%计至少约 25 重量%的二十碳五烯酸,或者具有按总脂肪酸重量%计至少约 30 重量%的二十碳五烯酸和小于约 25 重量%的亚油酸,或者具有按总脂肪酸重量%计至少约 50 重量%的 ω -3 多不饱和脂肪酸。

[0018] 在另一个实施方案中,本发明提供了按总脂肪酸重量%计的以下脂肪酸浓度的微生物油:

[0019] a) 约 48 至约 55 重量%的二十碳五烯酸;

[0020] b) 约 1.5 至约 3.0 重量%的二十碳四烯酸;

[0021] c) 约 0.1 至 0.7 重量%的花生四烯酸;

[0022] d) 约 1.0 至约 2.5 重量%的二高- γ -亚麻酸;

[0023] e) 约 2.0 至约 3.5 重量%的二十碳二烯酸;

[0024] f) 约 2.0 至约 3.0 重量%的 α -亚麻酸;

[0025] g) 约 17.0 至约 20.0 重量%的亚油酸 (18:2);

[0026] h) 约 3.5 至约 6.5 重量%的油酸 (18:1);

[0027] i) 约 1.0 至约 2.0 重量%的硬脂酸 (18:0);

[0028] j) 约 0.5 至约 3.5 重量%的棕榈油酸 (16:1);和

[0029] k) 约 2.5 至约 4.5 重量%的棕榈酸 (16:0)。

[0030] 在另一个实施方案中,本发明的微生物油具有按总脂肪酸重量%计如下的脂肪酸浓度:

[0031] a) 至少约 43.3 重量%的二十碳五烯酸;

[0032] b) 小于约 23.6 重量%的亚油酸 (18:2);和

[0033] c) 小于约 9.4 重量%的油酸 (18:1)。

[0034]

生物保藏

下列生物材料保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (ATCC) (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209), 并具有下列名称、保藏号和保藏日期。

生物材料	保藏号	保藏日期
解脂耶氏酵母 (Yarrowia lipolytica) Y4128	ATCC PTA-8614	2007 年 8 月 23 日
解脂耶氏酵母 (Yarrowia lipolytica) Y4127	ATCC PTA-8802	2007 年 11 月 29 日

上面列出的生物材料将按照国际承认的用于专利程序目的的微生物保藏的布达佩斯条约的有关条款来保存。所列出的保藏物将会被保持在指定的国际保藏机构中至少 30 年, 并且一旦准予专利公开它将会对公众开放。在由政府行为授予的专利权的部分废除中, 保藏物的可用性不会构成实践主题发明的许可。

附图简述和序列描述

[0036] 图 1A 和图 1B 示出了 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径, 并且当考虑下文对该途径的描述时应被视为一起。

[0037] 图 2A 提供了解脂耶氏酵母 Pex10p (即, SEQ ID NO:104 [GenBank 保藏号 CAG81606] 的氨基酸 327-364)、解脂耶氏酵母 Pex2p (即, SEQ ID NO:96 [GenBank 保藏号 CAG77647] 的氨基酸 266-323) 和解脂耶氏酵母 Pex12p (即, SEQ ID NO:105 [GenBank 保藏号 CAG81532] 的氨基酸 342-391) 的 C₃HC₄ 环状锌指基序的比对, 它们具有星号指示的保守 C₃HC₄ 环状锌指基序的半胱氨酸和组氨酸残基。图 2B 示出了解脂耶氏酵母 Pex10p C₃HC₄ 指状基序的不同氨基酸残基之间和它们结合的两个锌离子之间的本发明相互作用。

[0038] 图 3 图示了解脂耶氏酵母菌株 Y4305 的发育, 该菌株在总脂质级分中生产大于 53.2% 的 EPA。

[0039] 图 4 是 GC 色谱, 显示在解脂耶氏酵母菌株 Y4305 中的脂肪酸分布型, 该菌株在总脂质级分中生产 53.2% 的 EPA。

[0040] 图 5 提供了下列质粒的质粒图谱: (A) pZP3-Pa777U; 和 (B) pY117。

[0041] 图 6 提供了下列质粒的质粒图谱：(A)pZP2-2988；和 (B)pZKUE3S。

[0042] 图 7 提供了下列质粒的质粒图谱：(A)pZKL2-5U89GC；和 (B)pZKL1-2SP98C。

[0043] 图 8 提供了如下质粒的质粒图谱：(A)pZKUM；和 (B)pZKD2-5U89A2。

[0044] 图 9 提供了下列质粒的质粒图谱：(A)pFBAIN-MOD-1；和 (B)pFBAIN-PEX10。

[0045] 图 10 提供了下列质粒的质粒图谱：(A)pEXP-MOD-1；和 (B)pPEX10-1。

[0046] 图 11A 图示了解脂耶氏酵母菌株 Y4184 的发育，该菌株在总脂质级分中生产 30.7% 的 EPA。图 11B 提供了 pYPS161 的质粒图谱。

[0047] 根据下面的详细描述和附带的序列描述可以更充分地理解本发明，下面的详细描述和附带的序列描述形成了本申请的一部分。

[0048] 下面的序列遵循 37C.F.R. § 1.821-1.825 (“对包含核苷酸序列和 / 或氨基酸序列公开内容的专利申请的要求 - 序列规则”) (“Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures-the Sequence Rules”), 并且符合世界知识产权组织 (World Intellectual Property Organization) (WIPO) ST. 25 标准 (1998) 以及 EPO 和 PCT 的序列表要求 (规则 5.2 和 49.5(a-bis) 以及行政指令 (Administrative Instructions) 的 208 节和附录 C)。用于核苷酸和氨基酸序列数据的符号和格式遵循在 37C.F.R. § 1.822 中列出的规则。

[0049] SEQ ID NO: 1-135、150、151、155-158、173-189 和 196-201 是编码引物、基因或蛋白 (或它们的片段) 的 ORF 或质粒, 如表 1 所述。

[0050] 表 1

[0051] 基因和蛋白质 SEQ ID 号汇总

[0052]

描述	核酸 SEQ ID NO.	蛋白 SEQ ID NO.
解脂耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶 (“Y1D12”)	1 (1936bp)	2 (419AA)
用于基因在耶氏酵母菌种中最优表达的经密码子优化的翻译起始位点	3 (10bp)	--
小眼虫、 $\Delta 9$ 延伸酶 (“EgD9e”)	4 (777bp)	5 (258AA)
合成 $\Delta 9$ 延伸酶来源于小眼虫, 其密码子经最优化以在解脂耶氏酵母 (“EgD9eS”) 中表达	6 (777bp)	7 (258AA)
小型绿藻属 CCMP389 $\Delta 9$ 延伸酶 (“E389D9e”)	8 (792bp)	9 (263AA)

合成 $\Delta 9$ 延伸酶,该酶来源于小型绿藻属 CCMP389,其密码子经优化以在解脂耶氏酵母 (“E389D9eS”) 中表达	10 (792bp)	11 (263AA)
<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373 $\Delta 9$ 延伸酶 (美国专利公开申请 12/102879) (“EaD9E1o1”)	12 (774bp)	13 (258AA)
合成 $\Delta 9$ 延伸酶,该酶来源于 <i>Euglena anabaena</i> UTEX 373(美国专利公开申请 12/102879),其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“EaD9eS”)	14 (774bp)	15 (258AA)
<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373 $\Delta 9$ 延伸酶 (美国专利公开申请 12/102879) (“EaD9E1o2”)	16 (774bp)	17 (258AA)
小眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶 (“Eg5”或“EgD8”)	18 (1271bp)	19 (421AA)
合成 $\Delta 8$ 去饱和酶,该酶来源于小眼虫,其密码子经优化以在解脂耶氏酵母 (“D8SF”或“EgD8S”) 中表达	20 (1272bp)	21 (422AA)

[0053]

合成突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (“EgD8M”),该酶来源于小眼虫 (“EgD8S”)(美国专利公开 7, 256, 033)	22 (1272bp)	23 (422AA)
<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373 $\Delta 8$ 去饱和酶 (美国专利公开申请 12/099811) (“EaD8es3”)	24 (1260bp)	25 (420AA)
合成 $\Delta 8$ 去饱和酶,该酶来源于 <i>Euglena anabaena</i> UTEX 373(美国专利公开申请 12/099811),其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“EaD8S”)	26 (1260bp)	27 (420AA)
<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373 $\Delta 8$ 去饱和酶 (美国专利公开申请 12/099811) (“EaD8es1”)	28 (1260bp)	29 (420AA)
<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373 $\Delta 8$ 去饱和酶 (美国专利公开申请 12/099811) (“EaD8es2”)	30 (1260bp)	31 (420AA)
<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373 $\Delta 8$ 去饱和酶 (美国专利公开申请 12/099811) (“EaD8es4”)	32 (1260bp)	33 (420AA)
小眼虫 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“EgD5”)	34 (1350bp)	35 (449AA)

合成 $\Delta 5$ 去饱和酶, 该酶来源于小眼虫, 其密码子经优化以在解脂耶氏酵母 (“EgD5S”) 中表达	36 (1350bp)	37 (449AA)
多甲藻属 CCMP626 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“RD5”)	38 (1392bp)	39 (463AA)
合成 $\Delta 5$ 去饱和酶, 该酶来源于多甲藻属 CCMP626, 其密码子经优化以在解脂耶氏酵母 (“RD5S”) 中表达	40 (1392bp)	41 (463AA)
Euglena anabaena UTEX 373 $\Delta 5$ 去饱和酶 (美国专利公开申请 12/111237) (“EaD5Des1”)	42 (1362bp)	43 (454AA)
合成 $\Delta 5$ 去饱和酶, 该酶来源于 Euglena anabaena UTEX 373 (美国专利公开申请 12/111237), 其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“EaD5S”)	44 (1362bp)	45 (454AA)
合成突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“EgD5S-HXGG” 包含一种 HGGG 或一种 HHGG 基序), 该酶来源于小眼虫 (“EgD5S”) (美国临时专利申请号 61/098333)		122 (449AA)

[0054]

合成突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“EgD5S-HPGS” 包含一种 HPGS 基序), 该酶来源于小眼虫 (“EgD5S”) (美国临时专利申请号 61/098333)		124 (449AA)
合成突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“EaD5S-HCGG” 包含一种 HCGG 基序), 该酶来源于 Euglena anabaena UTEX 373 (“EaD5S”) (美国临时专利申请号 61/098333)		125 (454AA)
合成突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“RD5S-HXGG” 包含一种 HCGG 或一种 HWGG 基序), 该酶来源于多甲藻属 CCMP626 (“RD5S”) (美国临时专利申请号 61/098333)		126 (463AA)
栎树猝死病菌 (Phytophthora ramorum) $\Delta 17$ 去饱和酶 (“PrD17”)	46 (1086bp)	47 (361AA)
合成 $\Delta 17$ 去饱和酶, 该酶来源于栎树猝死病菌 (Phytophthora ramorum), 其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“PrD17S”)	48 (1086bp)	49 (361AA)
瓜果腐霉菌 (Pythium aphanidermatum) $\Delta 17$ 去饱和酶 (“PaD17”)	50 (1080bp)	51 (359AA)

合成 $\Delta 17$ 去饱和酶,该酶来源于瓜果腐霉菌 (<i>Pythium aphanidermatum</i>),其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“PaD17S”)	52 (1080bp)	53 (359AA)
串珠镰刀菌 (<i>Fusarium moniliforme</i>) $\Delta 12$ 去饱和酶 (“FmD12”)	54 (1434bp)	55 (477AA)
合成 $\Delta 12$ 去饱和酶,该酶来源于串珠镰刀菌 (<i>Fusarium moniliforme</i>),其密码子经优化以在解脂耶氏酵母 (“FmD12S”) 中表达	56 (1434bp)	57 (477AA)
高山被孢霉 (<i>Mortierella alpina</i>) $C_{16/18}$ 延伸酶	58 (828bp)	59 (275AA)
合成 $C_{16/18}$ 延伸酶,该酶来源于高山被孢霉 (<i>Mortierella alpina</i>)EL03,其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“ME3S”)	60 (828bp)	61 (275AA)

[0055]

串珠镰刀菌 (<i>Fusarium moniliforme</i>) $\Delta 15$ 去饱和酶 (“FmD15”)	62 (1209bp)	63 (402AA)
合成 $\Delta 15$ 去饱和酶,该酶来源于串珠镰刀菌 (<i>Fusarium moniliforme</i>),其密码子经优化以在解脂耶氏酵母 (“FmD15S”) 中表达	64 (1209bp)	65 (402AA)
解脂耶氏酵母 $\Delta 9$ 去饱和酶 (“YID9”)	66 (1449bp)	67 (482AA)
解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶基因 (“Y1CPT1”)	68 (1185bp)	69 (394AA)
解脂耶氏酵母 Ura3 (GenBank 保藏号 AJ306421)	70 (4844bp)	71 (284AA)
解脂耶氏酵母 Leu2 (GenBank 保藏号 AF260230)	72 (5194bp)	73 (405AA)
解脂耶氏酵母 Lys5 (GenBank 保藏号 M34929)	74 (2569bp)	—
解脂耶氏酵母 Pox1 (GenBank 保藏号 XP_504703)	—	75 (677AA)

解脂耶氏酵母 Pox2 (GenBank 保藏号 XP_505264)	--	76 (700AA)
解脂耶氏酵母 Pox3 (GenBank 保藏号 XP_503244)	--	77 (700AA)
解脂耶氏酵母 Pox4 (GenBank 保藏号 XP_504475)	--	78 (701AA)
解脂耶氏酵母 Pox5 (GenBank 保藏号 XP_502199)	--	79 (699AA)
解脂耶氏酵母 Lip1 (GenBank 保藏号 Z50020)	80 (3278bp)	81 (486AA)
解脂耶氏酵母 Lip2 (GenBank 保藏号 AJ012632)	82 (5304bp)	83 (334AA)
解脂耶氏酵母 Lip3 (GenBank 保藏号 AJ249751)	84 (3630bp)	85 (498AA)

[0056]

解脂耶氏酵母 Lip4a (GenBank 保藏号 XP_503825)	--	86 (406AA)
解脂耶氏酵母 SCP2 (GenBank 保藏号 XM_503410)	87 (390bp)	88 (129AA)
解脂耶氏酵母 YALIO18711g (GenBank 保藏号 XM_501987)	89 (546bp)	90 (181AA)
解脂耶氏酵母 YALIOF24167g (GenBank 保藏号 XM_505819)	91 (1556bp)	92 (351AA)
解脂耶氏酵母二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT2) (美国专利公开 7,267,976)	93 (2119bp)	94 (514AA)
解脂耶氏酵母 Pex1p (GenBank 保藏号 CAG82178)	--	95 (1024AA)
解脂耶氏酵母 Pex2p (GenBank 保藏号 CAG77647)	--	96 (381AA)

解脂耶氏酵母 Pex3p (GenBank 保藏号 CAG78565)	--	97 (431AA)
解脂耶氏酵母 Pex3Bp (GenBank 保藏号 CAG83356)	--	98 (395AA)
解脂耶氏酵母 Pex4p (GenBank 保藏号 CAG79130)	--	99 (153AA)
解脂耶氏酵母 Pex5p (GenBank 保藏号 CAG78803)	--	100 (598AA)
解脂耶氏酵母 Pex6p (GenBank 保藏号 CAG82306)	--	101 (1024AA)
解脂耶氏酵母 Pex7p (GenBank 保藏号 CAG78389)	--	102 (356AA)
解脂耶氏酵母 Pex8p (GenBank 保藏号 CAG80447)	--	103 (671AA)
解脂耶氏酵母 Pex10p (GenBank 保藏号 CAG81606)	--	104 (377AA)

[0057]

解脂耶氏酵母 Pex12p (GenBank 保藏号 CAG81532)	--	105 (408AA)
解脂耶氏酵母 Pex13p (GenBank 保藏号 CAG81789)	--	106 (412AA)
解脂耶氏酵母 Pex14p (GenBank 保藏号 CAG79323)	--	107 (380AA)
解脂耶氏酵母 Pex16p (GenBank 保藏号 CAG79622)	--	108 (391AA)
解脂耶氏酵母 Pex17p (GenBank 保藏号 CAG84025)	--	109 (225AA)
解脂耶氏酵母 Pex19p (GenBank 保藏号 AAK84827)	--	110 (324AA)
解脂耶氏酵母 Pex20p (GenBank 保藏号 CAG79226)	--	111 (417AA)

解脂耶氏酵母 Pex22p (GenBank 保藏号 CAG77876)	---	112 (195AA)
解脂耶氏酵母 Pex26p (GenBank 保藏号 NC_006072, 核苷酸 117230-118387 的反义翻译)		113 (386AA)
包含解脂耶氏酵母 Pex10 基因的重叠群, 该基因编码过氧化物酶体生物合成因子蛋白 (Pex10p) (GenBank 保藏号 AB036770)	114 (3387bp)	
解脂耶氏酵母 Pex10 (GenBank 保藏号 AB036770, 核苷酸 1038-2171) (蛋白序列与 SEQ ID NO :104 100% 相同)	115 (1134bp)	116 (377AA)
解脂耶氏酵母 Pex10 (GenBank 保藏号 AJ012084, 它对应于 GenBank 保藏号 AB036770 的核苷酸 11072171) (相对于 SEQ ID NO :104 和 116 的蛋白序列截短了最初的 23 个氨基酸)	117 (1065bp)	118 (354AA)
解脂耶氏酵母 Pex10p C3HC4 环状锌指基序 (即, SEQ ID NO :104 的氨基酸 327-364)	---	119 (38AA)

[0058]

解脂耶氏酵母截短 Pex10p (GenBank 保藏号 CAG81606 [SEQ ID NO :104], 删除了 C-末端的 32 个氨基酸)		120 (345AA)
解脂耶氏酵母乙酰羟酸合酶 (AHAS) 突变基因, 该基因包含一种 W497L 突变	121 (2987bp)	
大肠杆菌 LoxP 重组位点, 被 Cre 重组酶重组	123 (34bp)	
质粒 pZP3-Pa777U	127 (13,066bp)	---
质粒 pY117	128 (9570bp)	---
质粒 pZP2-2988	129 (15,743bp)	---
质粒 pZKUE3S	130 (6303bp)	---
质粒 pZKL2-5U89GC	131 (15,812bp)	---

质粒 pZKL1-2SP98C	132 (15, 877bp)	--
质粒 pZKUM	133 (4313bp)	--
合成的突变型 Ura3 基因包含对耶氏酵母属的从 +21 至 +53 的 33bp 的删除、+376 的 1bp 删除、和 从 +400 至 +403 的 3bp 删除 Ura3 编码区 (GenBank 保藏号 AJ306421)	134 (1459bp)	--
质粒 pZKD2-5U89A2	135 (15, 966bp)	--
质粒 pFBAIN-MOD-1	150 (7222bp)	--
质粒 pFBAln-PEX10	151 (8133bp)	--
质粒 pEXP-MOD1	155 (7277bp)	--
质粒 pPEX10-1	156 (7559bp)	--

[0059]

质粒 pPEX10-2	157 (8051bp)	--
质粒 pYPS161	158 (7966bp)	--
嵌合片段 :DNA 来自染色体 E、 未知 DNA 和 pZKD2-5U89A2 的 5' - 末端	173 (844bp)	--
未知 DNA 位于 pZKD2- 5U89A2 的 5' - 末端和染色体 E 之间	174 (303bp)	--
嵌合片段 :染色体 F, 未知 DNA 和 pZP3-PA777U 的 5' - 末端	175 (2365bp)	--
未知 DNA 位于 pZP3-PA777U 和染色体 F 之间的 5' - 末端	176 (1729bp)	--
嵌合片段 :染色体 F 和 pZP3-PA777U 的 AscIIPacI 片段的 3' - 末端之间	177 (326bp)	--

嵌合片段:染色体 C 和 pZKL2-5U89GC 的 AscIISphI 片段的 5' - 末端	178 (519bp)	--
未知 DNA 位于染色体 C 和 pZKL2-5U89GC 的 AscIISphI 片段的 5' - 末端的接合处	179 (66bp)	---
片段包含来自染色体 C 和 pZKL2-5U89GC 的 AscIISphI 片段的 3' - 末端的 DNA	180 (711bp)	
未知 DNA 位于染色体 C 和 pZKL2-5U89GC 的 Asc\ /Sph\ 片段的 3' - 末端的接合处	181 (65bp)	--
HPGG 基序	--	182
HXGG 基序	--	183
HPGX 基序	---	184
HGGG 基序	--	185
HHGG 基序	--	186
HPGS 基序	--	187
HCGG 基序	--	188
HWGG 基序	--	189

[0060]

合成突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“EgD5S-HGGG”), 该酶来源于小眼虫 (“EgD5S”) (美国临时专利申请号 61/098333)	196 (1350bp)	
合成突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“EgD5S-HHGG”), 该酶来源于小眼虫 (“EgD5S”) (美国临时专利申请号 61/098333)	197 (1350bp)	
合成突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“EgD5S-HPGS”), 该酶来源于小眼虫 (“EgD5S”) (美国临时专利申请号 61/098333)	198 (1350bp)	---
合成突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“EaD5S-HCGG”), 该酶来源于 <i>Euglena anabaena</i> UTEX 373 (“EaD5S”) (美国临时专利申请号 61/098333)	199 (1365bp)	---

合成突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“RD5S-HCGG”), 该酶来源于多甲藻属 CCMP626 (“RD5S”) (美国临时专利申请号 61/098333)	200 (1392bp)	--
合成突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“RD5S-HWGG”), 该酶来源于多甲藻属 CCMP626 (“RD5S”) (美国临时专利申请号 61/098333)	201 (1392bp)	--

[0061] SEQ ID NO :136-143 分别对应于引物 pZP-GW-5-1、pZP-GW-5-2、pZP-GW-5-3、pZP-GW-5-4、pZP-GW-3-1、pZP-GW-3-2、pZP-GW-3-3 和 pZP-GW-3-4, 所述引物用于执行基因组步移以测定菌株 Y4128 中的 pZP2-2988 基因组整合位点。

[0062] SEQ ID NO :144 和 145 分别对应于基因组步移法接头引物, 而 SEQ ID NO :146 分别对应于巢式接头引物。

[0063] SEQ ID NO :147 和 148 分别对应于引物 Per10 F1 和 ZPGW-5-5, 所述引物用于测定 pZP2-2988 的基因组整合位点的 5' 末端。

[0064] SEQ ID NO :149 对应于引物 Per10 R, 该引物用于扩增解脂耶氏酵母 Pex10 基因的编码区。

[0065] SEQ ID NO :152-154 分别对应于引物 PEX10-R-BsiW\、PEX10-F1-Sal\ 和 PEX10-F2-Sal\, 所述引物用于构建 pPEX10-1 和 pPEX10-2。

[0066] SEQ ID NO :159 和 160 分别对应于 Pex-10del1 3' . 正向引物和 Pex-10del2 5' . 反向引物, 所述引物用于鉴定具有 Pex10 删除的细胞。

[0067] SEQ ID NO :161-164 分别对应于引物 KL2-3-1、KD2-3-2、SCP-5-2 和 KD2-5-3, 所述引物用于执行基因组步移以测定菌株 Y4305 中的 pZKD2-5U89A2 的基因组整合位点。

[0068] SEQ ID NO :165-168 分别对应于引物 79-5-POX-1、79-5-POX-2、4305ZP3-3-2 和 79-3-POX-3, 所述引物用于执行基因组步移以测定菌株 Y4305 中的 pZP3-PA777U 的基因组整合位点。

[0069] SEQ ID NO :169-172 分别对应于引物 KL2-5-2、KL2-5-3、KL2-3-2 和 KL2-3-3, 所述引物用于执行基因组步移以测定菌株 Y4305 中的 pZKL2-5U89GC 的基因组整合位点。

[0070] SEQ ID NO :190-195 分别对应富含 His 的基序, 该富含 His 的基序是属于双铁膜蛋白超家族的膜结合脂肪酸去饱和酶的特征。

[0071] 发明详述

[0072] 本文所引用的以下专利、专利申请和出版物均以引用的方式将其全文并入本文：美国专利公开申请 11/265761 (提交于 2005 年 11 月 2 日)、美国临时申请 60/977, 174 (提交于 2007 年 10 月 3 日) 和美国临时申请 60/977, 177 (提交于 2007 年 10 月 3 日)。

[0073] 本文所述的是生产宿主菌株解脂耶氏酵母, 该菌株能够生产大于 25% 的二十碳五烯酸 (EPA ;20:5 ω -3)。积聚这种特定多不饱和脂肪酸 [“PUFA”] 通过导入功能性 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径完成, 该途径包含的蛋白具有 $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶、 $\Delta 17$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $C_{16/18}$ 延伸酶活性, 从而能够生产缺乏 γ -亚麻酸 [“GLA”] 的 EPA 油。因此, 该公开证明解脂耶氏酵母能被工程化以商业生产 EPA 及其衍生物。生产方法也是受权利要求书保护的。

[0074] PUFA 或其衍生物可用作膳食替代品或补充剂,尤其是婴儿代乳品 (formula),用于接受静脉内营养法的患者或用来预防或治疗营养不良。作为另外一种选择,可将纯化的 PUFA (或其衍生物) 掺入食用油、脂肪或调配的人造黄油中,以便食用者在正常使用中将获得所需量的膳食补充。PUFA 还可被掺入到婴儿代乳品、营养补充剂或其它食品中,并且可用作抗炎或降胆固醇剂。任选地,该组合物可以用于药用 (人药或兽药)。

[0075] 给人或动物补充以重组手段产生的 PUFA 可导致加入的 PUFA 以及它们的代谢物的水平升高。例如,用 EPA 处理不但会导致 EPA 含量提高,而且会导致 EPA 下游产物如类二十烷酸 (即,前列腺素、白三烯、血栓素)、二十二碳五烯酸 [“DPA”] 和二十二碳六烯酸 [“DHA”] 水平提高。复杂的调节机制使得期望组合多种 PUFA 或者添加不同的 PUFA 缀合物,以便预防、控制或克服这种机制来在个体中实现所需水平的特定 PUFA。

[0076] 作为另外一种选择,PUFA 或其通过本文公开的方法制备的衍生物能应用于动物或水产饲料的合成中,如干饲料、半湿饲料和湿饲料,因为这些制剂一般需要至少 1-2% 的营养物质组合物是 ω -3 和 / 或 ω -6PUFA。

[0077] 定义

[0078] 在本公开中,使用了大量术语和缩写。给出了如下定义。

[0079] “开放阅读框”缩写为“ORF”。“聚合酶链反应”缩写为“PCR”。

[0080] “美国典型培养物保藏中心”缩写为“ATCC”。

[0081] “多不饱和脂肪酸”缩写为“PUFA”。

[0082] “二酰基甘油酰基转移酶”缩写为“DAG AT”或“DGAT”。

[0083] “三酰基甘油”缩写为“TAG”。

[0084] “辅酶 A”缩写为“CoA”。

[0085] “总脂肪酸”缩写为“TFA”。

[0086] “脂肪酸甲酯”缩写为“FAME”。

[0087] “干细胞重量”缩写为“DCW”。

[0088] 如本文所用,“术语”发明或“本发明”旨在指如本文中的权利要求和说明书中所描述的本发明的所有方面和所有实施方案,并无意于局限于任一具体实施方案或方面。

[0089] 术语“食品”指一般适于人类消耗的任何食物。一般的食品包括但不限于:肉类产品、谷类食物、烘焙食物、小吃食物、乳类产品、饮料等。术语“食物类似物”、“功能性食物”、“医疗食物”和“医疗营养物质”在专利公布 US 2006-0115881-A1 中定义。

[0090] 如本文所用,术语“药物”指一种化合物或物质,如果它在美国售卖,将受 Federal Food, Drug and Cosmetic Act 的 Section 503 或 505 控制。

[0091] 术语“婴儿代乳品”指设计专用于人类婴儿消耗的食品,因为它模拟人类母乳。婴儿代乳品的一般商业实例包括但不限于:Similac®和 I\somil®。

[0092] 术语“饮食补充剂”指一种产品,该产品:(i) 旨在补充饮食并因此不用作常规食品或用作膳食或饮食的单独一项;(ii) 包含一种或多种膳食成分 (包括例如维生素、矿物质、香草或其它植物制剂、氨基酸、酶和腺体) 或它们的组分;(iii) 旨在以药丸、胶囊、片剂、或液体形式口服;和 (iv) 被标记为饮食补充剂。

[0093] 术语“临床状况”将指人或动物的状况,该状况损害人或动物的健康状态和健康,并且能通过补充 PUFA 尤其是 ω -3 和 / 或 ω -6 脂肪酸进行治疗。临床状况可采用大量文

献证明了的疾病状态形式如冠心病或由营养不良引起的健康状态不良的常见状况。

[0094] 术语“动物饲料”指旨在专用于动物消耗的饲料,动物包括家畜如宠物、农场动物等,或用于为了生产食品而喂养的动物,如养鱼场。术语“水产养殖饲料”、“水产饲料”和“饲料营养物质”在专利公布 US 2006-0115881-A1 中定义。

[0095] 如本文所用,术语“生物质”具体地讲是指耗费的或使用的酵母细胞物质,该物质由以商业显著量生产 PUFA 的重组生产宿主发酵产生,其中优选的生产宿主是含油酵母的重组菌株,解脂耶氏酵母。生物质可以是以下形式:全细胞、全细胞溶解产物、匀化细胞、部分水解细胞物质、和 / 或部分纯化细胞物质(例如微生物产生的油)。

[0096] 术语“脂质”指任何脂溶性的(即,亲脂的)、天然存在的分子。脂质是具有多种关键生物学功能的化合物的各种不同基团,所述功能例如细胞膜的结构组分、能量贮存来源和信号途径的中间体。可以将脂质广泛定义为疏水性或两亲性小分子,它们完全地或部分地起源于酮类或异戊二烯基团。表 2 显示了对脂质的综述,它基于 LipidMetabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS) 分类体系 (National Institute of General Medical Sciences, Bethesda, MD)。

[0097] 表 2

[0098] 脂质类别综述

[0099]

结构	脂质类别	脂质类别实例
构件		
来源于酮亚基 缩合	脂肪酰	包括脂肪酸、类二十烷酸、脂肪族酯和脂酰胺
	甘油酯	主要包括单、双、和三取代甘油酯，最为人所熟知的是脂肪酸甘油酯[“三酰基甘油”]
	甘油磷脂或 磷脂	包括磷脂酰胆碱、磷酸酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇和磷脂酸
	鞘脂类	包括神经酰胺、磷酸鞘脂类（例如鞘磷脂）、糖鞘脂（例如神经节苷脂）、鞘氨醇、脑苷脂类
	糖脂	包括糖酰胺、糖酰胺多糖、酰基海藻糖、酰基海藻糖多糖
	聚酮化合物	包括卤化内酯、聚烯、直链四环素、聚醚抗生素、类黄酮、芳族聚酮化合物
来源于异戊二 烯亚基缩合	甾醇脂质	包括甾醇（例如胆固醇）、C18 甾体化合物（例如雌激素）、C19 甾体化合物（例如雄性激素）、C21 甾体化合物（例如孕激素、糖皮质激素和盐皮质激素）、开环甾体化合物、胆汁酸
	异戊烯醇	包括类异戊二烯、类胡萝卜素、醌、对苯二酚；氢醌、聚异戊烯醇、藿烷类化合物

[0100] 本文术语细胞的“总脂质级分”指细胞的所有酯化脂肪酸。能分离在总脂质级分中的不同亚级分,包括三酰基甘油[“油”]级分、磷脂酰胆碱级分和磷脂酰乙醇胺级分,但是这并不包括所有亚级分。

[0101] “脂质体”指通过单层磷脂以及通常通过特异性蛋白结合的脂质小滴。这些细胞器是大多数生物运输/贮存中性脂类的位点。认为脂质体来源于包含 TAG 生物合成酶的内质网的微区。它们的合成及尺寸受特异性蛋白组分的控制。

[0102] “中性脂类”指那些一般以贮存脂肪和油形式存在于细胞中的脂质体中的脂质,它们的名称是因为在细胞 pH 下,所述脂质无带电基团。它们一般是完全非极性的,对水无亲和力和力。中性脂类一般指脂肪酸的单酯、二酯、和/或三酯,也分别称为单酰基甘油、二酰基甘油或三酰基甘油,或统称为酰基甘油。为了从酰基甘油中释放游离脂肪酸,必须发生水解反应。

[0103] 术语“三酰基甘油”[“TAG”]和“油”是可互换的,它们指由酰化甘油分子的三个脂肪酰残基组成的中性脂类。TAG 能够包含长链 PUFA,以及较短的饱和的和不饱和的脂肪酸以及较长链的饱和脂肪酸。细胞的 TAG 级分也称作“油级分”,并且“油的生物合成”一般指在细胞中合成 TAG。油或 TAG 级分是总脂质级分的亚级分,虽然它也是构成总脂质含量

的主要部分,总脂质含量以含油生物细胞中的总脂肪酸重量占干细胞重量[参见下文]的百分比表示。油[“TAG”]级分中的脂肪酸组合物和总脂质级分的脂肪酸组合物一般是相似的。因此,总脂质级分中的 PUFA 浓度的提高或降低将对应于油[“TAG”]级分中的 PUFA 浓度的升高或降低,反之亦然。

[0104] 术语“磷脂酰胆碱”或“PC”指磷脂,它是细胞膜的主要组分。一般能描述 PC 的化学结构包含以下组分:一种胆碱分子、一种磷酸基和甘油,其中脂肪酰链是 R 基在甘油分子的 sn-1 和 sn-2 位点上连接起来形成的。

[0105] 术语“总脂肪酸”[“TFA”] 本文指所有细胞脂肪酸的总量,所述脂肪酸在给定实例中能过碱酯交换方法(本领域已知的方法)被衍生化成脂肪酸甲酯[“FAME”],例如它可以是总脂质级分或油级分。因此,总脂肪酸包括来自中性和极性脂质级分的脂肪酸,包括磷脂酰胆碱级分、磷脂酰乙醇胺级分和二酰基甘油、单酰基甘油和三酰基甘油[“TAG 或油”]级分,但是不包括游离脂肪酸。

[0106] 术语细胞的“总脂质含量”是 TFA 的量度,以干细胞重量[“DCW”]百分比的形式表示。因此,总脂质含量[“TFA% DCW”]等同于例如每 100 毫克 DCW 的总脂肪酸毫克数。

[0107] 脂肪酸浓度本文一般表示为 TFA 的重量百分比[“% TFA”],例如每 100 毫克 TFA 的给定脂肪酸毫克数。除非在本文公开内容中另作具体说明,给定脂肪酸相对于总脂质的百分比等同于按% TFA 计的脂肪酸浓度(例如总脂质的% EPA 等同于 EPA% TFA)。

[0108] 在一些情况下,可使用细胞中给定脂肪酸占干细胞重量的百分比[“% DCW”]形式表达其含量。因此例如二十碳五烯酸% DCW 将根据下式进行测定:(二十碳五烯酸% TFA)*(TFA% DCW)]/100。

[0109] 术语“脂质特征”和“脂质组合物”是可互换的,并且指在特定脂质级分(例如在总脂质级分或油[“TAG”]级分中)中包含的单个脂肪酸的量,其中所述量用 TFA 百分比形式表示混合物中存在的各个脂肪酸的总量应当是 100。

[0110] 术语“脂肪酸”指不同链长的长链脂族酸(链烷酸),链长为约 C_{12} 至 C_{22} (尽管更长和更短链长的酸均是已知的)。主要的链长介于 C_{16} 和 C_{22} 之间。脂肪酸的结构可用简单的记号系统“X:Y”来表示,其中 X 表示具体脂肪酸中碳(“C”)原子的总数,而 Y 表示双键的数目。另外的关于“饱和脂肪酸”对“不饱和脂肪酸”、“单不饱和脂肪酸”对“多不饱和脂肪酸”(“PUFA”)、以及“ ω -6 脂肪酸”(“ ω -6 或 n-6”)对“ ω -3 脂肪酸”(“ ω -3 或 n-3”)之间的区别的详细信息在美国专利 7,238,482 中有所提供,该专利以引用方式并入本文。

[0111] 表 3 提供了用于描述本文 PUFA 的命名。在标题为“简化符号”一栏中, ω -指代系统用于表明碳数目、双键的数目和最接近 ω 碳的双键位置,双键位置的计数从 ω 碳开始(为此 ω 碳的编号为 1)。该表的其余部分汇总了 ω -3 和 ω -6 脂肪酸及其前体的俗名、将在整个说明书中使用的缩写以及每种化合物的化学名称。

[0112] 表 3

[0113] 多不饱和脂肪酸及其前体的命名

[0114]

俗名名称	缩写	化学名称	简化符号
肉豆蔻酸	--	十四酸	14:0
棕榈酸	棕榈酸	十六酸	16:0
棕榈油酸	--	9-十六碳烯酸	16:1
硬脂酸	--	十八酸	18:0
油酸	--	顺式-9-十八碳烯酸	18:1
亚油酸	LA	顺式-9,12-十八碳二烯酸	18:2 ω-6
γ-亚麻酸	GLA	顺式-6,9,12-十八碳三烯酸	18:3 ω-6
附子脂酸	EDA	顺式-11,14-二十碳二烯酸	20:2 ω-6
二高-γ-亚麻酸	DGLA	-顺式-8, 11, 14- 二十碳三烯酸	20:3 ω-6
花生四烯酸	ARA	顺式-5,8,11,14-二十碳四烯酸	20:4 ω-6
α-亚麻酸	ALA	顺式-9,12,15-十八碳三烯酸	18:3 ω-3
硬脂艾杜糖酸	STA	顺式-6,9,12,15-十八碳四烯酸	18:4 ω-3
二十碳三烯酸	ETrA	顺式-11,14,17-二十碳三烯酸	20:3 ω-3
金松烯酸	SCI	顺式-5,11,14-二十碳三烯酸	20:3b ω-6
杜松烯酸 (juniperonic)	JUP	-顺式-5, 11, 14, 17-二十碳四 烯酸	20:4b ω-3
二十碳 四烯酸	ETA	-顺式-8, 11, 14, 17- 二十碳四烯酸	20:4 ω-3
二十碳 五烯酸	EPA	-顺式-5, 8, 11, 14, 17- 二十碳五烯酸	20:5 ω-3
二十二碳三烯酸	DRA	-顺式-10,13,16- 二十二碳三烯酸	22:3 ω-3
二十二碳 四烯酸	DTA	-顺式-7,10,13,16- 二十二碳四烯酸	22:4 ω-3
二十二碳 五烯酸	DPA _n -6	-顺式-4,7,10,13,16- 二十二碳五烯酸	22:5 ω-6

[0115]

二十二碳 五烯酸	DPA	- 顺式 -7, 10, 13, 16, 19- 二十二碳五烯酸	22:5 ω -3
二十二碳 六烯酸	DHA	- 顺式 -4, 7, 10, 13, 16, 19- 二十二碳六烯酸	22:6 ω -3

[0116] 术语“高水平 EPA 生产”是指生产占微生物宿主总脂质至少约 25% 的 EPA, 优选占微生物宿主总脂质至少约 30% 的 EPA, 更优选占微生物宿主总脂质至少约 35% 的 EPA 5, 更优选占微生物宿主总脂质至少约 40% 的 EPA, 更优选占微生物宿主总脂质至少约 40-45% 的 EPA, 更优选占微生物宿主总脂质至少约 45-50% 的 EPA, 更优选占微生物宿主总脂质至少约 50-60%, 并且最优选占微生物宿主总脂质至少约 60-70% 的 EPA。EPA 的结构形式不受限制; 因此例如 EPA 可在总脂质中以游离脂肪酸形式或酯化形式存在, 例如酰基甘油、磷脂、硫脂或糖脂。

[0117] 术语“缺乏 GLA”是指当使用具有约 0.1% 可检测水平下限的设备进行 GC 分析测量时, 在微生物宿主的总脂质中可检测到的 GLA 小于约 1%。

[0118] 术语“无任何 DHA”是指当使用具有约 0.1% 可检测水平下限的设备进行 GC 分析测量时, 在微生物宿主的总脂质中无任何可检测到的 DHA。

[0119] 代谢途径或生物合成途径在生物化学意义上可认为是发生于细胞内由酶催化的一系列化学反应, 以实现细胞待使用的或待贮存的代谢产物的形成, 或启动另一代谢途径 (称作流量产生步骤)。很多此类途径均很精细, 并涉及对起始物质的逐步修饰以使之形成具有期望的精确化学结构的产物。

[0120] 术语“PUFA 生物合成途径”是指将油酸转化成诸如 LA、EDA、GLA、DGLA、ARA、DRA、DTA 和 DPAn-6 之类的 ω -6 脂肪酸和诸如 ALA、STA、ETra、ETA、EPA、DPA 和 DHA 之类的 ω -3 脂肪酸的代谢过程。该过程在文献中已有很好的描述 (如参见 PCT 公开 No. WO2006/052870)。简而言之, 该过程涉及通过添加碳原子来延长碳链和通过加入双键来使分子去饱和这通过存在于内质网膜内的一系列特异性去饱和酶和延伸酶 (称为“PUFA 生物合成途径酶”) 进行。更具体地讲, “PUFA 生物合成途径酶”是指如下与 PUFA 生物合成相关的任何酶 (以及编码该酶的基因), 包括: Δ 4 去饱和酶、 Δ 5 去饱和酶、 Δ 6 去饱和酶、 Δ 12 去饱和酶、 Δ 15 去饱和酶、 Δ 17 去饱和酶、 Δ 9 去饱和酶、 Δ 8 去饱和酶、 Δ 9 延伸酶、 $C_{14/16}$ 延伸酶、 $C_{16/18}$ 延伸酶、 $C_{18/20}$ 延伸酶和 / 或 $C_{20/22}$ 延伸酶。

[0121] 术语“ ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径”是指在合适条件下表达时编码催化 ω -3 和 ω -6 脂肪酸二者之一或两者产生的酶的一组基因。通常, 参与 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径的基因编码 PUFA 生物合成途径酶。图 1A 和图 1B 示出了代表性的途径, 提供了肉豆蔻酸经过多种中间产物向 DHA 的转化, 这展示了 ω -3 和 ω -6 脂肪酸两者是如何可以从共同来源而产生。该途径自然分成两部分, 其中一部分将产生 ω -3 脂肪酸而另一部分只产生 ω -6 脂肪酸。只产生 ω -3 脂肪酸的部分在本文中称作 ω -3 脂肪酸生物合成途径, 而只产生 ω -6 脂肪酸的部分在本文中称作 ω -6 脂肪酸生物合成途径。

[0122] 如本文中关于 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径所用的, 术语“功能性的”是指该途径中的一些 (或全部) 基因表达活性酶, 导致体内催化或底物转化。应当理解, “ ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径”或“功能性 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径”并不意味着上文中所有

PUFA 生物合成途径酶基因都是必需的,因为许多脂肪酸产物将仅要表达该途径中的一亚组基因。

[0123] 术语“ $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径”将指最低程度包括至少一种 $\Delta 9$ 延伸酶和至少一种 $\Delta 8$ 去饱和酶的 PUFA 生物合成途径,从而使得能分别从 LA 和 ALA 开始,以 EDA 和 / 或 ETrA 作为脂肪酸中间产物来生物合成 DGLA 和 / 或 ETA。当表达其它去饱和酶和延伸酶时,也可合成 ARA、DTA、DPAn-6、EPA、DPA、和 DHA。

[0124] 术语“ $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径”将指最低程度包括至少一种 $\Delta 6$ 去饱和酶和至少一种 $C_{18/20}$ 延伸酶的 PUFA 生物合成途径,从而使得能分别从 LA 和 ALA 开始,以 GLA 和 / 或 STA 作为脂肪酸中间产物来生物合成 DGLA 和 / 或 ETA。当表达其它去饱和酶和延伸酶时,也可合成 ARA、DTA、DPAn-6、EPA、DPA、和 DHA。

[0125] 术语“脂肪酸中间产物”是指在脂肪酸代谢途径中产生的任何脂肪酸,其可以通过其他代谢途径酶的作用进一步转化成本途径的目的脂肪酸产物。例如,当利用 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径产生 EPA 时,可以产生 EDA、ETrA、DGLA、ETA 和 ARA 并被认为是“脂肪酸中间产物”,因为这些脂肪酸可通过其他代谢途径酶的作用进一步转化成 EPA。

[0126] 术语“脂肪酸副产物”是指在脂肪酸代谢途径中产生的既非该途径的目的脂肪酸产物又非该途径的“脂肪酸中间产物”的任何脂肪酸。例如,当利用 $\Delta 9$ 延伸酶 M8 去饱和酶途径中产生 EPA 时,金松烯酸 (sciadonic) 和杜松烯酸 (juniperonic) 也可通过 $\Delta 5$ 去饱和酶分别作用于 EDA 或 ETrA 而产生。它们被认为是“脂肪酸副产物”,因为两者均不能通过其他代谢途径酶的作用进一步转化成 EPA。

[0127] 术语“去饱和酶”是指可以在一种或多种脂肪酸中去饱和 (即引入双键) 而产生所关注的脂肪酸或前体的多肽。尽管在整个说明书中使用 ω -指代系统来指代特定的脂肪酸,但使用 Δ -系统从底物的羧基端计数来表示去饱和酶的活性更方便。本文特别关注的脂肪酸是:1) $\Delta 8$ 去饱和酶,它催化 EDA 转化成 DGLA 和 / 或催化 ETrA 转化成 ETA;2) $\Delta 5$ 去饱和酶,它催化 DGLA 转化为 ARA 和 / 或催化 ETA 转化为 EPA;3) $\Delta 17$ 去饱和酶,它在分子羧基末端编号为 17^{th} 和 18^{th} 的碳原子之间去饱和脂肪酸,并且它例如催化底物脂肪酸 ARA 转化成 EPA 和 / 或催化底物脂肪酸 DGLA 转化成 ETA;和 4) $\Delta 12$ 去饱和酶,它催化油酸转化成 LA。

[0128] 偶尔也将 $\Delta-17$ ($\Delta 17$) 去饱和酶和 $\Delta 15$ 去饱和酶称作“ $\omega-3$ 去饱和酶”、“ $w-3$ 去饱和酶”、和 / 或“ $\omega-3$ 去饱和酶”,这是基于它们将 $\omega-6$ 脂肪酸转化成它们的 $\omega-3$ 对应物的能力 (如分别将 LA 转化成 ALA 或将 DGLA 转化成 ETA 以及将 ARA 转化成 EPA)。

[0129] 一些去饱和酶对两种或多种底物有活性。基于这一能力,能根据它们的去饱和酶活性将这些酶进一步分类为“一官能的”或“双官能的”。所期望的是通过用脂肪酸去饱和酶的基因来转化合适的宿主并测定它对该宿主脂肪酸概况的作用,从而经验性地测定脂肪酸去饱和酶的特异性。“酶底物”是指去饱和酶多肽在底物活性位点与之结合并以反应方式作用于底物。

[0130] 术语“EgD8”是指分离自小眼虫的 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:18 和 19);EgD8 与描述于美国专利公开 7, 256, 033 的、命名为“Eg5”的蛋白 100% 相同并且功能等同。术语“EgD8S”是指来源于小眼虫的合成 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:20 和 21) $\Delta 8$ 去饱和酶称为“EgD8”,其中 EgD8S 的密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达。EgD8S 与描述于美国专利公

开 7, 256, 033 中的“D8SF”100%相同并且功能等同。

[0131] 术语“EgD8M”指突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :22 和 23), 它有至少一种相对于来源于小眼虫的合成 $\Delta 8$ 去饱和酶的突变, 该合成去饱和酶经密码子最优化以在解脂耶氏酵母中表达 (即, EgD8S)。更具体地讲, 虽然“突变”可包括任何删除、插入、和点突变 (或它们的组合), 在优选的实施方案中将突变型 EgD8M 描述为突变型 EgD8S-23 (SEQ ID NO :23)。具体地讲, 突变型 EgD8S-23 (描述于专利公布 US 20080138868 A1 中) 相对于如 SEQ ID NO :21 所示的合成的密码子优化 EgD8S 序列包含以下 24 个氨基酸突变: 4S 突变成 A、5K 突变成 S、12T 突变成 V、16T 突变成 K、17T 突变成 V、66P 突变成 Q、67S 突变成 A、108S 突变成 L、117G 突变成 A、118Y 突变成 F、120L 突变成 M、121M 突变成 L、125Q 突变成 H、126M 突变成 L、132V 突变成 L、133L 突变成 V、162L 突变成 V、163V 突变成 L、293L 突变成 M、407A 突变成 S、408V 突变成 Q、418A 突变成 G、419G 突变成 A 和 422L 突变成 Q。使用 Vector NTI®'s AlignX 程序 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 的预设参数成对比对突变型 EgD8S-23 氨基酸序列 (SEQ ID NO :23) 和合成的经密码子优化的序列 SEQ ID NO :21, 结果揭示在两种蛋白长度为 422 个氨基酸的序列之间有 94.3% 的序列同一性和 97.9% 的共有序列。突变型 EgD8S-23 (SEQ ID NO :23) 的 $\Delta 8$ 去饱和酶活性至少约功能上等同于合成的经密码子优化的 EgD8S (SEQ ID NO :21) 的 $\Delta 8$ 去饱和酶活性。

[0132] 术语“EaD8Des3”指从 *Euglena anabaena* UTEX 373 中分离的由本文 SEQ ID NO :24 编码的 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :25)。同样地, 术语“EaD8S”是指来源于 *Euglena anabaena* UTEX 373 的、经密码子优化以便在解脂耶氏酵母中表达的合成 $\Delta 8$ 去饱和酶 (即 SEQ ID NO :26 和 27)。EaD8 和 EaD8S 描述于美国专利公开申请 12/099811 (提交于 4/09/2008) 中; 在该专利申请中将 EaD8 命名为“EaD8Des3”。

[0133] 术语“EgD5”是指从小眼虫中分离的由本文 SEQ ID NO :34 编码的 $\Delta 5$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :35)。同样, 术语“EgD5S”是指来源于小眼虫的合成 $\Delta 5$ 去饱和酶, 其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (即 SEQ ID NO :36 和 37)。EgD5 和 EgD5S 描述于 PCT 公开 WO2007/136671。

[0134] 就本文目的而言, 术语“RD5”是指 $\Delta 5$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :39), 该酶分离自多甲藻属 CCMP626, 由本文的 SEQ ID NO :38 编码。同样地, 术语“RD5S”是指合成 $\Delta 5$ 去饱和酶, 该酶来源于多甲藻属 CCMP626, 其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (即, SEQ ID NO :40 和 41)。RD5 和 RD5S 描述于美国专利公开申请 11/748637 (提交于 5/15/2007)。

[0135] 术语“EaD5”是指从 *Euglena anabaena* UTEX 373 中分离的由本文 SEQ ID NO :42 编码的 $\Delta 5$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :43)。同样地, 术语“EaD5S”是指来源于 *Euglena anabaena* UTEX 373 的、经密码子优化以便在解脂耶氏酵母中表达的合成 $\Delta 5$ 去饱和酶 (即 SEQ ID NO :44 和 45)。EaD5 和 EaD5S 描述于美国专利公开申请 12/111237 (提交于 4/29/2008) 中; 在该专利申请中将 EaD5 命名为“EaD5Des1”。

[0136] 术语“突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶”是指如本文所述的 $\Delta 5$ 去饱和酶, 该酶在细胞色素 b5 结构域的 His-Pro-Gly-Gly (HPGG; SEQ ID NO :182) 基序中具有至少一种突变, 其中所述突变导致氨基酸取代 (保守的或者非保守的)。虽然所述突变可包括任何氨基酸取代, 突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶优选地包含至少一种选自 His-Xaa-Gly-Gly (SEQ ID NO :182) 和 His-Pro-Gly-Xaa (SEQ ID NO :184) 的突变基序, 并且突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶的 $\Delta 5$ 去饱和酶

活性至少约功能上等同于野生型 $\Delta 5$ 去饱和酶的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性。更优选的,突变基序选自:His-Gly-Gly-Gly(HGGG;SEQ ID NO:185)、His-His-Gly-Gly(HHGG;SEQ ID NO:186)、His-Cys-Gly-Gly(HCGG;SEQ ID NO:188)、His-Trp-Gly-Gly(HWGG;SEQ ID NO:189)和 His-Pro-Gly-Ser(HPGS;SEQ ID NO:187);参见例如如SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:196、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:198、SEQ ID NO:199、SEQ ID NO:200和SEQ ID NO:201所示的 $\Delta 5$ 去饱和酶。

[0137] 每个“突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶”具有一种“对应的野生型 $\Delta 5$ 去饱和酶”。具体地讲,突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶和对应的野生型 $\Delta 5$ 去饱和酶具有相同的氨基酸序列,除了野生型将包含一种在细胞色素 b_5 结构域内的 HPGG(SEQ ID NO:182)基序,然而突变型将包含至少一种在此基序内的突变(如上所述)。

[0138] 当突变型 $\Delta 5$ 序列的酶活性和特异选择性比得上对应的野生型 $\Delta 5$ 去饱和酶的酶活性和特异选择性时(或活性更高时),突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶“至少约功能上等同”于对应的野生型 $\Delta 5$ 去饱和酶。因此,当比较每种酶的“转化效率”时,功能上等同的突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶将具有 $\Delta 5$ 去饱和酶活性,该酶活性相对于对应的野生型 $\Delta 5$ 去饱和酶活性基本上不降低(即,突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶将具有至少约 50%,优选至少约 75%,更优选至少约 85%,最优选至少约 95%的野生型 $\Delta 5$ 去饱和酶活性)。两种多肽的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性可以是基本上相同的。优选地,突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶在与对应的野生型 $\Delta 5$ 去饱和酶进行比较时将具有提高的酶活性和特异选择性,即,具有至少约 101-105%,更优选至少约 106-115%以及最优选至少约 116-125%的野生型 $\Delta 5$ 去饱和酶活性。

[0139] 术语“PaD17”是指分离自瓜果腐霉菌的由 SEQ ID NO:50 编码的 $\Delta 17$ 去饱和酶(SEQ ID NO:51)。同样地,术语“PaD17S”是指经密码子优化以用于在解脂耶氏酵母中表达的来源于瓜果腐霉菌的合成 $\Delta 17$ 去饱和酶(即 SEQ ID NO:52 和 53)。基于在美国专利公开申请 11/779915(提交于 7/19/2007)中描述的分析,将 PaD17 和 PaD17S 进一步分成双官能的 $\Delta 17$ 去饱和酶。具体地讲,“双官能的 $\Delta 17$ 去饱和酶”、“双官能的 $\Delta 17$ 去饱和酶活性”或“主要的 $\Delta 17$ 去饱和酶活性”是指优先将 ARA 转化成 EPA 和/或将 DGLA 转化成 ETA 但是另外还具有将 LA 转化成 ALA 的有限能力(因而展示出主要的 $\Delta 17$ 去饱和酶活性和有限的 $\Delta 15$ 去饱和酶活性)的 $\Delta 17$ 去饱和酶。相比之下,“一官能的 $\Delta 17$ 去饱和酶”、“一官能的 $\Delta 17$ 去饱和酶活性”或“专一的 $\Delta 17$ 去饱和酶活性”是指能够将 ARA 转化成 EPA 和/或将 DGLA 转化成 ETA 但不能将 LA 转化成 ALA 的 $\Delta 17$ 去饱和酶。

[0140] 术语“PrD17”是指鉴定自栎树猝死病菌的由 SEQ ID NO:46 编码的 $\Delta 17$ 去饱和酶(SEQ ID NO:47)。相比之下,术语“PrD17S”是指经密码子最优化以用于在解脂耶氏酵母中表达的来源于栎树猝死病菌的合成的 $\Delta 17$ 去饱和酶(即 SEQ ID NO:48 和 49)。PrD17 和 PrD17S 被鉴定为双官能的 $\Delta 17$ 去饱和酶;它们描述于美国专利公开申请 11/787772(提交于 4/18/2007)和美国专利公开申请 11/779915(提交于 7/19/2007)。

[0141] 术语“串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)”与“串珠镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)”同义,并且也与“藤仓赤霉(*Gibberella fujikuroi*)”同义。术语“FmD12”指分离自串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)的由 SEQ ID NO:54 编码的 $\Delta 12$ 去饱和酶(SEQ ID NO:55)。FmD12 与如 GenBank 保藏号 DQ272515 所述的藤仓赤霉(*Gibberella fujikuroi*) $\Delta 12$ 去饱和酶相同。同样地,术语“FmD12S”是指经密码子优化以用于在解脂

耶氏酵母中表达的来源于串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 的合成 $\Delta 12$ 去饱和酶 (即 SEQ ID NO:56 和 57)。FmD12 描述于 PCT 公开 W0 2005/047485 中。

[0142] 本文特别关注的其它去饱和酶包括:1) $\Delta 15$ 去饱和酶,该酶催化 LA 转化成 ALA 和 / 或催化 GLA 转化成 STA;和 2) $\Delta 9$ 去饱和酶,该酶催化棕榈酸转化成棕榈油酸 (16:1) 和 / 或催化硬脂酸转化成油酸 (18:1)。

[0143] 术语“FmD15”是指分离自串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 的由 SEQ ID NO:62 编码的 $\Delta 15$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:63)。FmD15 与如 GenBank 保藏号 DQ272516 所述的藤仓赤霉 (*Gibberella fujikuroi*) $\Delta 15$ 去饱和酶相同。同样地,术语“FmD15S”指经密码子优化以用于在解脂耶氏酵母中表达的来源于串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 的合成 $\Delta 15$ 去饱和酶 (即 SEQ ID NO:64 和 65)。基于在 PCT 公开 W02005/047480 中描述的分析,将 FmD15 进一步分成双官能的 $\Delta 15$ 去饱和酶;预期 FmD15S 是功能相似的。具体地讲,“双官能的 $\Delta 15$ 去饱和酶”、“双官能的 $\Delta 15$ 去饱和酶活性”或“主要的 $\Delta 15$ 去饱和酶活性”是指优先将 LA 转化成 ALA 但是另外还具有将油酸转化成 LA 的有限能力 (因而展示出主要的 $\Delta 15$ 去饱和酶活性和有限的 $\Delta 12$ 去饱和酶活性) 的 $\Delta 15$ 去饱和酶。相比之下,“一官能的 $\Delta 15$ 去饱和酶”、“一官能的 $\Delta 15$ 去饱和酶活性”或“专一的 $\Delta 15$ 去饱和酶活性”是指能够将 LA 转化成 ALA 但不能将油酸转化成 LA 的 $\Delta 15$ 去饱和酶。

[0144] 术语“Y1D9”是指 $\Delta 9$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:67),该酶分离自解脂耶氏酵母,由 SEQ ID NO:66 编码 (也参见 GenBank 保藏号 XM_501496)。

[0145] 其它有用的 PUFA 去饱和酶包括:1) $\Delta 6$ 去饱和酶,该酶催化 LA 转化成 GLA 和 / 或催化 ALA 转化成 STA;和 2) $\Delta 4$ 去饱和酶,该酶催化 DPA 转化成 DHA 和 / 或催化 DTA 转化成 DPAn-6。

[0146] 术语“延伸酶”是指能延长脂肪酸碳链从而产生比该延伸酶作用于其上的脂肪酸底物长 2 个碳原子的酸的多肽。该延长过程在与脂肪酸合酶相关的多步骤机制中发生,如 PCT 公开 W0 2005/047480 中所述。延伸酶体系催化反应的实例如 GLA 转化成 DGLA、STA 转化成 ETA、ARA 转化成 DTA 以及 EPA 转化成 DPA。通常,延伸酶的底物选择性有些广泛,但由链长度和不饱和的程度及类型两者来区分。例如, $C_{14/16}$ 延伸酶将利用 C_{14} 底物 (如肉豆蔻酸), $C_{16/18}$ 延伸酶将利用 C_{16} 底物 (如棕榈酸), $C_{18/20}$ 延伸酶 (也称为 $\Delta 6$ 延伸酶,两个术语可以互换使用) 将利用 C_{18} 底物 (如 GLA、STA),而 $C_{20/22}$ 延伸酶将利用 C_{20} 底物 (如 ARA、EPA)。以类似方式, $\Delta 9$ 延伸酶能够催化 LA 和 ALA 分别转化成 EDA 和 ETrA。

[0147] 重要的是,须注意一些延伸酶具有广泛的特异性并因而单个延伸酶可能催化几种延伸酶反应 (如,从而可作为 $C_{16/18}$ 延伸酶和 $C_{18/20}$ 延伸酶起作用)。可能理想的是,通过用脂肪酸延伸酶的基因来转化合适的宿主并测定它对该宿主脂肪酸概况的作用,从而经验性地测定脂肪酸延伸酶的特异性。

[0148] 术语“EgD9e”指从小眼虫中分离的由 SEQ ID NO:4 编码的 $\Delta 9$ 延伸酶 (SEQ ID NO:5)。相比之下,术语“EgD9eS”是指来源于小眼虫的合成 $\Delta 9$ 延伸酶,其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (即 SEQ ID NO:6 和 7)。EgD9e 和 EgD9eS 描述于 PCT 公开 W0 2007/061742。

[0149] 术语“E389D9e”是指 $\Delta 9$ 延伸酶 (SEQ ID NO:9),该酶分离自小型绿藻属 CCMP389,由 SEQ ID NO:8 编码。相比之下,术语“E389D9eS”是指合成 $\Delta 9$ 延伸酶,该酶来源于小

型绿藻属 CCMP389, 其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (即, SEQ ID NO:10 和 11)。E389D9e 和 E389D9eS 描述于 PCT 公开 WO 2007/061742。

[0150] 术语“EaD9e”是指从 *Euglena anabaena* UTEX 373 中分离的由 SEQ ID NO:12 编码的 $\Delta 9$ 延伸酶 (SEQ ID NO:13)。同样地, 术语“EaD9eS”是指来源于 *Euglena anabaena* UTEX 373 的合成 $\Delta 9$ 延伸酶, 其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (即 SEQ ID NO:14 和 15)。EaD9e 和 EaD9eS 描述于美国专利公开申请 12/102879 (提交于 4/15/2008) 中; 在该专利申请中将 EaD9e 命名为“EaD9E101”。

[0151] 术语“ELO3”指高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) C_{16/18} 脂肪酸延伸酶 (SEQ ID NO:59), 该酶由 elo3 基因 (SEQ ID NO:58) 编码, 优先催化棕榈酸 (16:0) 转化成硬脂酸 (18:0)。ELO3 描述于 PCT 公开 WO 2007/046817 中。相关地, 术语“ME3S”是指来源于高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 的合成 C16/18 脂肪酸延伸酶, 其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达 (即, SEQ ID NO:60 和 61)。

[0152] 术语“转化效率”和“底物转化百分比”是指特定酶 (如去饱和酶或延伸酶) 能够将底物转化成产物的效率。转化效率根据下面的公式测量: $([\text{产物}]/[\text{底物} + \text{产物}]) \times 100$, 其中‘产物’包括源于它的途径中的中间产物和所有产物。

[0153] 术语“酰基转移酶”指负责转移除氨基-酰基 (EC 2.3.1.-) 之外的基团的酶。

[0154] 术语“DAG AT”指二酰基甘油酰基转移酶 (也称为酰基-CoA-二酰基甘油酰基转移酶或二酰基甘油 O-酰基转移酶) (EC 2.3.1.20)。该酶负责将酰基-CoA 和 1,2-二酰基甘油转化成 TAG 和 CoA, 因此它涉及 TAG 生物合成的最终步骤。存在两个 DAG AT 酶家族: DGAT1 和 DGAT2。前一个家族与酰基-CoA: 胆固醇酰基转移酶 [“ACAT”] 基因家族具有同源性, 而后一个家族与之不相关 (Lardizabal 等人, J. Biol. Chem., 276(42):38862-38869 (2001))。

[0155] 术语“Y1DGAT2”指 DGAT2 酶 (SEQ ID NO:94), 该酶分离自解脂耶氏酵母, 由 SEQ ID NO:93 编码。Y1DGAT2 是 5, 描述于美国专利公开 7,267,976 中。已经测定了 Y1DGAT2 蛋白的长度是 514 氨基酸残基 (对应于 SEQ ID NO:93 的核苷酸 +291 至 +1835), 并且因此在 SEQ ID NO:93 内的两种附加巢式 ORF 仅编码完整蛋白的截短形式。

[0156] 术语“二酰基甘油胆碱磷酸转移酶”是指酶 (EC 2.7.8.2), 它催化从 CDP-胆碱和 1,2-二酰基甘油合成磷脂酰胆碱。这种酶是 CDP-胆碱途径的组成部分, 负责磷脂酰胆碱 [“PC”] 生物合成。

[0157] 术语“Y1CPT1”是指二酰基甘油胆碱磷酸转移酶 (SEQ ID NO:69), 该酶分离自解脂耶氏酵母, 由 SEQ ID NO:68 编码。Y1CPT1 描述于 PCT 公开 WO 2006/052870 中 (也参见 GenBank 保藏号 XM_501703 (YALI0C10989g))。

[0158] 术语“过氧化物酶体”是指普遍存在于所有真核细胞中的细胞器。它们具有单独的脂双层膜, 该膜将它们的内容物与细胞溶质分离开来, 并且包含下文所述功能必需的多种膜蛋白。过氧化物酶体经由“扩展的穿梭机制”选择性输入蛋白。更具体地讲, 存在着至少 32 个已知的过氧化物酶体蛋白 (称为 peroxin), 它们参与通过 ATP 水解穿过过氧化物酶体膜输入蛋白的过程。一些过氧化物酶体蛋白在其 N-末端或 C-末端包含特异蛋白信号, 即, 过氧化物酶体靶信号或“PTS”, 它们引导蛋白通过过氧化物酶体膜。一旦细胞蛋白进入过氧化物酶体, 它们通常经过一些方法降解。例如, 过氧化物酶体包含氧化酶, 例如过氧化氢酶、D-氨基酸氧化酶和尿酸氧化酶, 这些酶能够降解对细胞有毒的物质。作为另外一种选择, 过

氧化物酶体降解脂肪酸分子以生成乙酰 -CoA 游离分子,它们被回输到细胞溶质中,该过程称为 β -氧化。

[0159] 术语“过氧化物酶体生物合成因子蛋白”、“过氧化物酶体蛋白”和“Pex 蛋白”是可互换的,并且指涉及过氧化物酶体生物合成的和 / 或参与通过 ATP 水解使细胞蛋白穿过过氧化物酶体膜的过程的蛋白。编码这些蛋白的基因的首字母缩写是“Pex 基因”。命名体系描述于 Distel 等人, *J. Cell Biol.*, 135 :1-3 (1996)。迄今已经在多种真核生物中鉴定了至少 32 个不同的 Pex 基因。已经从对突变体的分析中分离了多种 Pex 基因,所述突变体显示具有异常的过氧化物酶体功能或结构。根据 Kiel, J. A. K. W. 等人的文献 (*Traffic*, 7 :1291-1303 (2006)), 其中对 17 个不同真菌中的基因组序列进行了电脑模拟的信息学分析 (*silico analysis*), 鉴定了以下 Pex 蛋白 :Pex1p、Pex2p、Pex3p、Pex3Bp、Pex4p、Pex5p、Pex5Bp、Pex5Cp、Pex5/20p、Pex6p、Pex7p、Pex8p、Pex10p、Pex12p、Pex13p、Pex14p、Pex15p、Pex16p、Pex17p、Pex14/17p、Pex18p、Pex19p、Pex20p、Pex21p、Pex21Bp、Pex22p、Pex22p 样和 Pex26p。这些蛋白本文将统称为由“Pex 基因”编码的“Pex 蛋白”。

[0160] 术语“保守结构域”或“基序”指进化上相关的蛋白质的比对序列中在特定位置保守的一组氨基酸。虽然同源蛋白质之间在其他位置的氨基酸可以发生变化,但在特定位置高度保守的氨基酸表明对蛋白质的结构、稳定性或活性来说是必需的氨基酸。因为它们可通过它们在蛋白质同系物家族的比对序列中的高度保守来鉴定,所以它们可用作识别标签或“签名”来确定具有新的测定序列的蛋白质是否属于以前鉴定的蛋白质家族。参考本文相关部分,存在于 $\Delta 5$ 去饱和酶 (即,动物、植物和真菌) 中的基序在 N 末端包括三个组氨酸框 (即, H(X)₃-4H[SEQ ID NO :190 和 191]、H(X)₂₋₃HH[SEQ 33 ID NO :192 和 193] 和 H/Q(X)₂₋₃HH[SEQ ID NO :194 和 195]) 和一种血红素结合基序 (即, His-Pro-Gly-Gly 或 HPGG ; SEQ ID NO :182), 它们在融合细胞色素 Jb₅ 结构域内。同样地, Pex2p、Pex10p 和 Pex12p 在它们的羧基末端都有一种富含半胱氨酸的基序, 已知该基序是 C₃HC₄ 环状锌指基序。该基序是它们的活性必需的, 涉及蛋白停靠并转移到过氧化物酶体中 (Kiel, J. A. K. W., 等人, *Traffic*, 7 :1291-1303 (2006))。

[0161] 术语“C₃HC₄ 环状锌指基序”或“C₃HC₄ 基序”一般指结合两个锌离子的保守半胱氨酸富含基序, 它们通过如式 I 所示的氨基酸序列进行鉴定 :

[0162] 式 I : CX₂CX₉₋₂₇CX₁₋₃HX₂CX₂CX₄₋₄₈CX₂C

[0163] 在解脂耶氏酵母编码过氧化物酶体生物合成因子 10 蛋白的基因中的 C₃HC₄ 环状锌指基序 (即 Y1Pex10p) 位于 SEQ ID NO :104 的氨基酸 327-364 之间, 并且由 CX₂CX₁₁CX₁HX₂CX₂CX₁₀CX₂C 基序 (SEQ ID NO :119) 限定。在解脂耶氏酵母编码过氧化物酶体生物合成因子 2 蛋白的基因中的 C₃HC₄ 环状锌指基序 (即 Y1Pex2p), 位于 SEQ ID NO :96 的氨基酸 266-323 之间。解脂耶氏酵母过氧化物酶体生物合成因子 12 蛋白 (即 Y1Pex12p) 包含位于 SEQ ID NO :105 的氨基酸 342-391 之间的不完全 C₃HC₄ 环指基序。图 2A 列出了对应于 Y1Pex10、Y1Pex2 和 Y1Pex12 的 C₃HC₄ 环状锌指基序的蛋白序列 ; 星号表示基序的保守半胱氨酸或组氨酸残基。

[0164] 认为 Y1Pex10、Y1Pex2 和 Y1Pex12 通过蛋白 - 蛋白相互作用形成环指复合物。本发明的 Y1Pex10p C₃HC₄ 指状基序 (具有两个锌残基) 的胱氨酸和组氨酸残基间相互作用在图 2B 中用图表示出。

[0165] 术语“Pex10”指编码过氧化物酶体生物合成因子 10 蛋白或过氧化物酶体装配蛋白 Peroxin 10 的基因,其中 peroxin 蛋白将在下文中称为“Pex10p”。Pex10p 功能尚未被清楚的阐明,虽然对其它生物的研究已经揭示 Pex10 产物位于过氧化物酶体膜内并且是细胞器正常功能所必需的。 C_3H_4 环状锌指基序在 Pex10p 的 C-末端区域是保守的(Kalish, J. E. 等人, *Mol. Cell Biol.*, 15 :64065-6419(1995); Tan, X. 等人, *J. Cell Biol.*, 128 :307-319(1995); Warren, D. S., 等人, *Am. J. Hum. Genet.*, 63 :347-359(1998)), 并且是酶活性所必需的。

[0166] 术语“YlPex10”指编码解脂耶氏酵母过氧化物酶体生物合成因子 10 蛋白的基因,其中所述蛋白将在下文中称为“YlPex10p”。该特定的 peroxin 近来由 Sumita 等人 (*FEMS Microbiol. Lett.*, 214 :31-38(2002)) 进行了研究。YlPex10 的核苷酸序列在 GenBank 中注册了多个保藏号,包括 GenBank 保藏号 CAG81606 (SEQ ID NO :104)、AB036770 (SEQ ID NO :114、115 和 116) 以及 AJ012084 (SEQ ID NO :117 和 118)。如 SEQ ID NO :118 所示的 YlPex10p 的序列长度为 354 个氨基酸。相比之下,如 SEQ ID NO :104 和 SEQ ID NO :116 所示的 YlPex10p 序列每个长度为 377 个氨基酸,它们 100% 相同的序列在蛋白 N-末端具有附加地 23 个氨基酸(对应于与 GenBank 保藏号 AJ012084 (SEQ ID NO :118) 中鉴定的起始密码子不同的起始密码子)。

[0167] 在天然 Pex 基因中的或与之相关的术语“中断”是指在一部分该基因中的插入、删除、或定向突变,所述中断导致基因敲除使得该基因从基因组中删除并且不翻译蛋白,或者导致翻译的 Pex 蛋白具有插入、删除、氨基酸取代或其它定向突变。蛋白中的中断位置可以在例如蛋白的 N-末端部分中或在蛋白的 C-末端部分中。中断的 Pex 蛋白相对于未中断的 Pex 蛋白将具有减弱的活性,并且可能是无功能的。在编码 Pex 蛋白的天然基因中的中断也包括导致 Pex 蛋白低表达或少表达的替代方法,例如能够经由操纵调控序列、转录和翻译因子和 / 或信号转导途径或使用有义、反义或 RNAi 技术等方法导致中断。

[0168] 术语“含油生物”指那些往往以油形式贮存它们的能源的生物 (Weete, In :*Fungal Lipid Biochemistry*, 第 2 版, Plenum, 1980)。术语“含油酵母”指那些能制造油(即 TAG)的、分类为酵母的微生物。通常,含油微生物的细胞油或 TAG 含量符合 S 形曲线,其中脂质浓度增加直至在晚对数培育生长期或早稳定培育生长期时它达到最高浓度,随后在晚稳定培育生长期和死亡期期间逐渐下降 (Yongrmanitchai 和 Ward, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 :419-25(1991))。含油微生物积累油超过它们的干细胞重量的约 25% 的情形并不鲜见。含油酵母的实例包括但不限于如下属:耶氏酵母属、假丝酵母属、红酵母属、红冬孢酵母属、隐球酵母属、丝孢酵母属和油脂酵母属。

[0169] 术语“可发酵碳源”指微生物将其代谢以获取能量的碳源。一般的碳源包括但不限于:单糖、低聚糖、多糖、烷烃、脂肪酸、脂肪酸酯、单酸甘油酯、甘油二酯、甘油三酸酯、二氧化碳、甲醇、甲醛、甲酸盐和含碳胺。

[0170] 如本文所用,术语“分离的核酸片段”、“分离的核酸分子”和“基因构建体”将可以互换使用,并将指单链或双链的 RNA 或 DNA 聚合体,任选含有合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。DNA 聚合物形式的分离的核酸片段可由 cDNA、基因组 DNA 或合成 DNA 的一个或多个片段构成。

[0171] 氨基酸或核苷酸序列的“基本部分”指这样的部分,该部分包括的多肽的氨基酸

序列或基因的核苷酸序列足以通过推定而鉴定所述多肽或基因,所述鉴定或者可以由本领域技术人员通过人工评价序列来完成,或者可以利用诸如 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool ;Altschul,S.F. 等人,J.Mol.Biol.,215 :403-410(1993))。一般来讲,为了推测鉴定多肽或核酸序列是否与已知的蛋白质或基因同源,需要有 10 个或更多邻接氨基酸或者 30 个或更多核苷酸的序列。此外,对于核苷酸序列,包含 20-30 个邻接核苷酸的基因特异性寡核苷酸探针可用于序列依赖性的基因鉴定(如 DNA 杂交)和基因分离(如细菌菌落或噬斑的原位杂交)的方法中。此外,12 至 15 个碱基的短寡核苷酸可在 PCR 中用作扩增引物,以便获得包含该引物的特定核酸片段。因此,核苷酸序列的“基本部分”包含的序列足以特异性地鉴定和 / 或分离包含该序列的核酸片段。

[0172] 术语“互补的”用于描述核苷酸碱基之间能够彼此杂交的关系。例如,对于 DNA,腺嘌呤与胸腺嘧啶互补,而胞嘧啶与鸟嘌呤互补。

[0173] “密码子简并性”指允许核苷酸序列在不影响所编码的多肽的氨基酸序列的情况下发生变化的遗传密码的性质。技术人员非常了解具体宿主细胞在使用核苷酸密码子以确定给定氨基酸时所表现出的“密码子偏倚性”。因此,当合成基因用以改善在宿主细胞中的表达时,希望对基因进行设计,使得其密码子使用频率接近该宿主细胞优选的密码子使用频率。

[0174] “合成的基因”可由使用本领域技术人员已知的方法化学合成的寡核苷酸构件装配而成。将这些寡核苷酸基本单位进行退火并随后连接以形成基因节段,该基因节段随后在酶促作用下装配而构建成完整的基因。因此,基于最优化核苷酸序列以反映宿主细胞的密码子偏倚性,可以定制基因用以最优化基因表达。如果密码子使用偏向于宿主偏好的那些密码子,则技术人员会理解成功的基因表达的可能性。优选的密码子的确定可基于对来源于宿主细胞的基因(其中序列信息可获得)的检测。例如在美国专利公开 7,125,672 中提供了解脂耶氏酵母的密码子使用特制。

[0175] “基因”指表达特定蛋白质的核酸片段,并且该核酸片段可以指单独的编码区或可以包含位于编码序列之前的调节序列(5' 非编码区)和之后的调节序列(3' 非编码区)。“天然基因”是指天然存在的具有其自己的调控序列的基因。“嵌合基因”指不是天然基因的任何基因,包含在天然情况下不是一起存在的调控序列和编码序列。因此,嵌合基因可包括源于不同来源的调控序列和编码序列,或者包括源于同一来源但以不同于天然存在的方式排列的调控序列和编码序列。“内源性基因”指位于生物体的基因组内它的天然位置的天然基因。“外来”基因指通过基因转移导入到宿主生物体内的基因。外来基因可包括插入到非天然生物体内的天然基因、导入到天然宿主内的新位置的天然基因,或嵌合基因。“转基因”是已通过转化方法导入基因组内的基因。“经密码子最优化的基因”是其密码子使用频率经设计用以模仿宿主细胞优选的密码子使用频率的基因。

[0176] “编码序列”指编码特定氨基酸序列的 DNA 序列。“合适的调控序列”指位于编码序列的上游(5' 非编码序列)、中间或下游(3' 非编码序列)的核苷酸序列,其可影响相关编码序列的转录、RNA 加工或稳定性或者翻译。调控序列可包括启动子、增强子、静默子、5' 不翻译前导序列(例如在转录起始位点和翻译启动密码子之间的序列)、内含子、多腺苷酸化识别序列、RNA 加工位点、效应子结合位点和茎-环结构。

[0177] “启动子”指能够控制编码序列或功能性 RNA 表达的 DNA 序列。一般来讲,编码序

列位于启动子序列的3'端。启动子可整个源于天然基因,或者由源于不同的天然存在的启动子的不同元件组成,或者甚至包含合成的DNA片段。本领域内的技术人员应当理解,不同的启动子可在不同的组织或细胞类型中,或者在不同的发育阶段,或者响应不同的环境条件或生理条件而引导基因的表达。通常将在大多数细胞类型中、在大多数情况下引起基因表达的启动子称为“组成型启动子”。还应认识到,因为在大多数情况下还不能完全确定调控序列的确切范围,不同长度的DNA片段可能具有相同的启动子活性。

[0178] 术语“GPD启动子”或“GPD启动子区”指位于由gpd基因编码的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(E.C.1.2.1.12)的'ATG'翻译起始密码子之前的5'上游未翻译区,它是表达必需的。合适的解脂耶氏酵母GPD启动子区实例描述于美国专利公开7,259,255中。

[0179] 术语“GPDIN启动子”或“GPDIN启动子区”指位于gpd基因的'ATG'翻译起始密码子之前的5'上游未翻译区(它是表达必需的),加上具有gpd基因的内含子的一部分5'编码区。合适的解脂耶氏酵母GPDIN启动子区实例描述于专利公布US 2006/0019297-A1中。

[0180] 术语“GPM启动子”或“GPM启动子区”指位于由gpm基因编码的磷酸甘油酸变位酶(EC 5.4.2.1)的'ATG'翻译起始密码子之前的5'上游未翻译区,它是表达必需的。合适的解脂耶氏酵母GPM启动子区实例描述于美国专利公开7,259,255中。

[0181] 术语“GPM/FBAIN启动子”或“GPM/FBAIN启动子区”指一种嵌合启动子,该启动子包含“GPM启动子”和FBAIN启动子(下文)中包含的内含子的融合。合适的解脂耶氏酵母GPM/FBAIN启动子区实例描述于美国专利公开7,202,356中。

[0182] 术语“FBA启动子”或“FBA启动子区”指位于由fba1基因编码的果糖二磷酸醛缩酶(E.C.4.1.2.13)的'ATG'翻译起始密码子之前的5'上游未翻译区,它是表达必需的。合适的解脂耶氏酵母FBA启动子区实例描述于美国专利公开7,202,356中。术语“FBAIN启动子”或“FBAIN启动子区”指位于fba1基因的'ATG'翻译起始密码子之前的5'上游未翻译区(它是表达必需的),加上具有gpd基因的内含子的一部分5'编码区。合适的解脂耶氏酵母FBAIN启动子区实例描述于美国专利公开7,202,356中。

[0183] 术语“FBAINm启动子”或“FBAINm启动子区”指FBAIN启动子的修饰版本,其中FBAINm具有在ATG翻译启动密码子和FBAIN启动子的内含子之间的52bp删除(因此仅包括N末端的22个氨基酸),以及在内含子后的新翻译共有基序。此外,虽然FBAIN启动子当与表达基因的编码区融合时生成融合蛋白,FBAINm启动子不生成此类融合蛋白。合适的解脂耶氏酵母FBAINm启动子区实例描述于美国专利公开7,202,356中。

[0184] 术语“GPAT启动子”或“GPAT启动子区”指位于由gpat基因编码的甘油3-磷酸O-酰基转移酶(E.C.2.3.1.15)的'ATG'翻译起始密码子之前的5'上游未翻译区,它是表达必需的。合适的解脂耶氏酵母GPAT启动子区实例描述于美国专利公开7,264,949中。

[0185] 术语“YAT1启动子”或“YAT1启动子区”指位于由yat1基因编码的铵转运酶(TC 2.A.49;GenBank保藏号XM_504457)的'ATG'翻译起始密码子之前的5'上游未翻译区,它是表达必需的。合适的解脂耶氏酵母YAT1启动子区实例描述于专利公布US 2006/009410210 A1中。

[0186] 术语“EXP1启动子”或“EXP1启动子区”指位于由解脂耶氏酵母TALI0C12034g”基因(GenBank保藏号XM_501745)编码蛋白的、在'ATG'翻译起始密码子之前的5'上游未

翻译区,它是表达所必需的。基于 TALI0C12034g”与 sp|Q12207 啤酒糖酵母非经典输出蛋白 2(其功能涉及缺乏断裂信号序列的新蛋白输出途径)的显著同源性,本文将该基因命名为 exp1 基因,它编码命名为 EXP1 的蛋白。合适的解脂耶氏酵母 EXP1 启动子区的实例描述于 PCT 公开 WO 2006/052870 中。

[0187] “内含子”是存在于大多数真核细胞中的基因序列中的非编码 DNA 序列(位于编码区、5' 非编码区、或 3' 非编码区)。它们的完整功能是未知的;然而,一些增强子位于内含子中(Giacopelli F. 等人, Gene Expr., 11:95-104(2003))。这些内含子序列被转录,但是在 mRNA 被翻译成蛋白之前被从 mRNA 转录物前体中移除。该内含子移除过程通过序列(即,外显子)的自主拼接在内含子两端进行。

[0188] 术语“增强子”指能从邻近的真核启动子处提高转录水平并因此提高基因转录水平的 - 顺式 - 调控序列。增强子能在长度为几万碱基的 DNA 上作用于启动子,并且可以是它们调节的启动子的 5' 或 3'。增强子也可位于内含子内。

[0189] 术语“3' 非编码序列”和“转录终止子”指位于编码序列下游的 DNA 序列。这包括多腺苷酸化识别序列和编码能影响 mRNA 加工或基因表达的调节信号的其它序列。多腺苷酸化信号通常表征为影响多腺苷酸片添加到 mRNA 前体的 3' 末端。3' 区可影响相关编码序列的转录、RNA 加工或稳定性或翻译。

[0190] “RNA 转录物”指由 RNA 聚合酶催化的 DNA 序列的转录所产生的产物。当 RNA 转录物是 DNA 序列的完全互补的拷贝时,它被称为初级转录物,或者它可以是源自初级转录物的转录后加工的 RNA 序列并被称作成熟 RNA。“信使 RNA”或“mRNA”指无内含子并且可以由细胞翻译成蛋白质的 RNA。“cDNA”指与 mRNA 互补并源于 mRNA 的双链 DNA。“有义”RNA 指包含 mRNA 并因而能由细胞翻译成蛋白质的 RNA 转录物。“反义 RNA”指与全部或部分靶初级转录物或 mRNA 互补,并阻止靶基因表达的 RNA(美国专利 5,107,065;PCT 公开 WO 99/28508)。反义 RNA 可以与特定基因转录物的任何部分,即 5' 非编码序列、3' 非编码序列或编码序列互补。“功能性 RNA”指反义 RNA、核酶 RNA 或其它不能翻译可是对细胞过程有影响作用的 RNA。

[0191] 术语“可操作地连接”是指单个核酸片段上的核酸序列的关联,使得其中一种核酸序列的功能受到另一种核酸序列的影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达时,它可操作地连接编码序列。即,编码序列处于启动子的转录控制下。编码序列可以以有义或反义的取向可操作地连接至调节序列。

[0192] 如本文所用,术语“表达”是指转录和有义(mRNA)或反义 RNA 的稳定积聚。表达也可指将 mRNA 翻译成多肽。

[0193] “成熟”蛋白质指经翻译后加工的多肽(即已经去除了存在于初始翻译产物中的任何前肽或肽原的多肽)。“前体”蛋白质是指 mRNA 的初级翻译产物,即前肽和肽原仍然存在。前肽和肽原可以是(但不限于)细胞内定位信号。

[0194] 术语“重组酶”是指进行位点特异性重组以改变 DNA 结构的酶,它包括转座酶、 γ 整合/剪切酶、以及位点特异性重组酶。

[0195] “重组酶位点”或“位点特异性重组酶序列”是指重组酶将识别并与之结合的 DNA 序列。应当理解,这可以是野生型或突变型重组酶位点,只要保持有官能团,重组酶仍可识别该位点、结合到 DNA 序列上并且催化两个邻近重组酶位点之间发生重组。

[0196] “转化”是指将核酸分子转移至宿主生物中,导致在遗传上稳定遗传。例如,核酸分子可以是自主复制的质粒,例如,或者它可以整合进宿主生物的基因组中。含有转化核酸片段的宿主生物被称为“转基因”或“重组”或“转化”生物体。

[0197] 术语“质粒”和“载体”是指通常携带有不属于细胞中心代谢的部分的基因的染色体外元件,并且常常是环状双链 DNA 片段的形式。这类元件可以是源自任何来源的自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体或单链或双链 DNA 或 RNA 的核苷酸序列(线性或环状),其中多个核苷酸序列已连接或重组为一种独特构建体,该独特构建体能够将表达盒引入细胞中。

[0198] 术语“表达盒”是指包含如下序列的 DNA 片段:所选基因的编码序列和所选基因产物表达所需的位于编码序列之前(5' 非编码序列)和之后(3' 非编码序列)的调控序列。因此,表达盒通常由如下序列构成:1)一种启动子序列;2)一种编码序列(即,ORF)和3)一种3'不翻译区域(即,终止子),它在真核细胞中通常包含聚腺苷酸位点。表达盒通常包含于载体中以有利于克隆和转化。可以将不同表达盒转化进包括细菌、酵母、植物和哺乳动物细胞在内的不同生物体中,只要能针对每种宿主使用正确的调控序列。

[0199] 术语“同源重组”是指两个 DNA 分子之间的 DNA 片段交换(在杂交期间)。被交换的片段通过在两个 DNA 分子之间的相同核苷酸序列位点(即,“同源区”)侧接。术语“同源区”是指在参与同源重组的、彼此具有同源性的核酸片段上的核苷酸序列区。有效的同源重组将一般发生在这些同源区长度为至少约 10bp 的地方,优选地发生在同源区长度为至少约 50bp 的地方。意欲进行重组的片段通常包含至少两个同源区,其中期望具有定向基因分裂或置换。

[0200] 术语“序列分析软件”是指可用于分析核苷酸或氨基酸序列的任何计算机算法或软件程序。“序列分析软件”可商购获得或独立开发。典型的序列分析软件包括但不限于:1) GCG 程序包(Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group(GCG), Madison, WI);2) BLASTP、BLASTN、BLASTX(Altschul 等人, J. Mol. Biol., 215:403-410(1990));3) DNASTAR(DNASTAR, Inc. Madison, WI);4) Sequencher(Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI);和5)整合了 Smith-Waterman 算法的 FASTA 程序(W. R. Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. 编辑: Suhai, Sandor. Plenum; New York, NY)。在本专利申请案的上下文中应当理解,使用序列分析软件进行分析时,除非另外指明,否则分析结果将基于所参考程序的“默认值”。在此所用的“默认值”是指在首次初始化软件时软件最初加载的任何值或参数集。

[0201] 本文使用的标准重组 DNA 和分子克隆技术是本领域熟知的并且已经在如下文献中有过描述:Sambrook, J., Fritsch, E. 和 Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY(1989)(下文称为“Maniatis”);Silhavy, T. J., Bannan, M. L. 和 Enquist, L. W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY(1984);以及 Ausubel, F. M. 等人, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, Hoboken, NJ(1987). An Overview: Microbial Biosynthesis Of Fatty Acids and Triacylglycerols

[0202] 通常,含油微生物的脂质蓄积是响应存在于生长培养基中的总的碳氮比而触发。

该过程（导致含油微生物中游离棕榈酸（16:0）的从头合成）在美国专利 7,238,482 中有详细描述。棕榈酸是长链饱和的和不饱和脂肪酸衍生物的前体，这些脂肪酸衍生物通过延伸酶和去饱和酶的作用形成（图 1A 和图 1B）。

[0203] TAG（脂肪酸的主要贮存单位）通过涉及如下反应的一系列反应形成：1) 一分子的酰基辅酶 A 和甘油-3-磷酸通过酰基转移酶酯化而生成溶血磷脂酸；2) 第二分子的酰基辅酶 A 通过酰基转移酶酯化而生成 1,2-二酰基甘油磷酸（通常称为磷脂酸）；3) 通过磷脂酸磷酸酶移除磷酸以生成 1,2-二酰基甘油 [“DAG”]；和 4) 通过酰基转移酶加入第三脂肪酸以形成 5TAG。

[0204] 广谱的脂肪酸可被整合进 TAG 中，包括饱和的和不饱和的脂肪酸以及短链和长链的脂肪酸。一些能通过酰基转移酶被掺入 TAG 的脂肪酸非限制性实例包括：癸酸（10:0）、月桂酸（12:0）、肉豆蔻酸（14:0）、棕榈酸（16:0）、棕榈油酸（16:1）、硬脂酸（18:0）、油酸（18:1）、异油酸（18:1）、LA、桐油酸（18:3）、ALA、GLA、花生酸（20:0）、EDA、ETrA、DGLA、ETA、ARA、EPA、二十二烷酸（22:0）、DPA、DHA、木蜡酸（24:0）、神经酸（24:1）、蜡酸（26:0）和褐煤酸（28:0）脂肪酸。在本文所述的方法和宿主细胞中，最期望将 EPA 掺入 TAG 中。

[0205] 虽然大多数 PUFA 以中性脂类的形式掺入 TAG 并贮存于脂质体中，但是重要的是认识到在含油生物中测量总 PUFA 应包括那些位于磷脂酰胆碱级分、磷脂酰乙醇胺级分、和三酰基甘油（也称为 TAG 或油）级分中的 PUFA。

[0206] 最优化生物合成 EPA—一种 ω -3 脂肪酸

[0207] 其中油酸转化成 EPA 的代谢过程涉及通过添加碳原子使碳链延长和通过加入双键使分子去饱和。这需要存在于内质网膜内的一系列特殊去饱和酶和延伸酶。然而，如在图 1A 和图 1B 中看到的和如下所述的，存在多个用于 EPA 生产的替代途径。

[0208] 具体地讲，图 1A 和图 1B 描述了下文所述的途径。所有途径都需要最初通过 $\Delta 12$ 去饱和酶将油酸转化成亚油酸 [“LA”]（第一种 ω -6 脂肪酸）。然后，利用“ $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径”并将 LA 用作底物来如下形成长链 ω -6 脂肪酸：1) 通过 $\Delta 9$ 延伸酶将 LA 转化成二十碳二烯酸 [“EDA”]；2) 通过 $\Delta 8$ 去饱和酶将 EDA 转化成二高- γ -亚麻酸 [“DGLA”]；3) 通过 $\Delta 5$ 去饱和酶将 DGLA 转化成花生四烯酸 [“ARA”]；4) 通过 $C_{20/22}$ 延伸酶将 ARA 转化成二十二碳四烯酸 [“DTA”]；以及，5) 通过 $\Delta 4$ 去饱和酶将 DTA 转化成二十二碳五烯酸 [“DPA ω -6”]。

[0209] “ $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径”也能够如下使用 α -亚麻酸 [“ALA”] 作底物生产长链 ω -3 脂肪酸：1) 通过 $\Delta 15$ 去饱和酶将 LA 转化成 ALA，第一种 ω -3 脂肪酸；2) 通过 $\Delta 9$ 延伸酶将 ALA 转化成二十碳三烯酸 [“ETrA”]；3) 通过 $\Delta 8$ 去饱和酶将 ETrA 转化成二十碳四烯酸 [“ETA”]；4) 通过 $\Delta 5$ 去饱和酶将 ETA 转化成二十碳五烯酸 [“EPA”]；5) 通过 $C_{20/22}$ 延伸酶将 EPA 转化成二十二碳五烯酸 [“DPA”]；以及，6) 通过 $\Delta 4$ 去饱和酶将 DPA 转化成二十二碳六烯酸 [“DHA”]。任选地，可以将 ω -6 脂肪酸转化成 ω -3 脂肪酸。例如，ETA 和 EPA 通过 $\Delta 17$ 去饱和酶活性分别从 DGLA 和 ARA 生成。就本文目的而言，有利地是 $\Delta 9$ 延伸酶/ $\Delta 8$ 去饱和酶途径能够生产缺少显著量 γ -亚麻酸 [“GLA”] 的 EPA 油。

[0210] 用于 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成的替代途径利用 $\Delta 6$ 去饱和酶和 $C_{18/20}$ 延伸酶，即“ $\Delta 6$ 去饱和酶/ $\Delta 6$ 延伸酶途径”。更具体地讲，LA 和 ALA 可通过 $\Delta 6$ 去饱和酶被分别转化成 GLA 和十八碳四烯酸 [“STA”]；然后， $C_{18/20}$ 延伸酶将 GLA 转化成 DGLA 和 / 或将 STA 转

化成 ETA。

[0211] 用于 EPA 生产的优选微生物宿主：解脂耶氏酵母

[0212] 预期需要导入解脂耶氏酵母以生产 EPA 的特定官能团将取决于宿主生物、它的天然 PFUA 概况和 / 或去饱和酶 / 延伸酶概况、底物的可利用性和期望的终产物。相对于天然宿主细胞，已知解脂耶氏酵母能天然生产 18:2 脂肪酸并因此具有天然的 $\Delta 12$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :1 和 2 ; 参见美国专利公开 7, 214, 491)。

[0213] 如 PCT 公开 WO 2006/052870 所述，制备能够生产高浓度 EPA 并且不同合成 GLA 的重组解脂耶氏酵母菌株最少需要表达以下基因： $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶和 $\Delta 17$ 去饱和酶或 $\Delta 15$ 去饱和酶（或两种都有），其中可任选地附加表达至少一种以下基因： $\Delta 9$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶、 $C_{14/16}$ 延伸酶和 $C_{16/18}$ 延伸酶。该处提供的选择具有去饱和酶或延伸酶活性的特定多肽时的考虑事项包括：1) 多肽的底物特异性；2) 多肽或其组分是否为限速酶；3) 去饱和酶或延伸酶是否是合成所需 PUFA 所必需的；4) 多肽所需的辅因子；5) 多肽在其产生后是否被修饰，例如，通过激酶或异戊烯转移酶修饰；和 / 或，6) 每种特定去饱和酶和 / 或延伸酶的转化效率。

[0214] 在本专利申请中，其中制备了重组解脂耶氏酵母的最优化菌株，该菌株具有生产例如在总脂质级分中的 14% 至大于 53.2% 的 EPA 的能力，它最少包含 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生物合成途径的以下基因：

[0215] a) 至少一种编码 $\Delta 9$ 延伸酶的基因；和

[0216] b) 至少一种编码 $\Delta 8$ 去饱和酶的基因；和

[0217] c) 至少一种编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因；和

[0218] d) 至少一种编码 $\Delta 17$ 去饱和酶的基因；和

[0219] e) 至少一种编码 $\Delta 12$ 去饱和酶的基因；和

[0220] f) 至少一种编码 $C_{16/18}$ 延伸酶的基因。

[0221] 更优选地，重组解脂耶氏酵母菌株还包含至少一种编码二酰基甘油胆碱磷酸转移酶 (CPT1) 的基因。最优选地，重组解脂耶氏酵母菌株还包含至少一种编码 $\Delta 15$ 去饱和酶的基因；和 / 或至少一种编码 $\Delta 9$ 去饱和酶的基因。在能够生产高水平 EPA 的解脂耶氏酵母最优化菌株中所需元件的附加方面在下文中进行了详细阐述，其中最优化菌株将生产占重组解脂耶氏酵母宿主细胞总脂质至少约 25% 的 EPA，优选地占总脂质至少约 30% 的 EPA，更优选地占总脂质至少约 35% 的 EPA，更优选地占总脂质至少约 40% 的 EPA，更优选地占总脂质至少约 40-45% 的 EPA，更优选地占总脂质至少约 45-50% 的 EPA，更优选地占总脂质至少约 50-60%，并且最优选地占总脂质至少约 60-70% 的 EPA。

[0222] 在另一个实施方案中，本文所述的最优化重组解脂耶氏酵母菌株将生产包含占总脂质至少约 25% 的 EPA 的微生物油，并且该微生物油包含占总脂质小于约 1% 的 GLA 以及不含任何 DHA。

[0223] 在另一个实施方案中，本文所述的最优化重组解脂耶氏酵母菌株将生产包含占总脂质至少约 30% 的 EPA 的微生物油，并且该微生物油包含占总脂质小于约 25% 的 LA。

[0224] 在一个优选的实施方案中，本文所述的最优化重组解脂耶氏酵母菌株将生产相对于干细胞重量至少约 12% 的微生物油。

[0225] 在另一个优选的实施方案中，本文所述的最优化重组解脂耶氏酵母菌株将生产按

总脂肪酸百分比计至少约 50% 的 ω -3PUFA。

[0226] 用于最优化的 EPA 生物合成的优选去饱和酶和延伸酶基因

[0227] 申请人已经对多种 $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶、 $\Delta 17$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $C_{16/18}$ 延伸酶进行了相当多的分析,以测定那些酶当在解脂耶氏酵母中表达时是否具有最佳的底物特异性和 / 或底物选择性。基于这些分析,由此得到的基因和密码子优化的基因描述于表 4,本文认为它们优选在解脂耶氏酵母中表达以构建 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径,该途径能够进行高水平的 EPA 生物合成。在下文中详细阐述了涉及每个基因的附加细节。

[0228] 如下文图 4 所示,所述的多个优选 EPA 生物合成基因的密码子已经经过优化以在解脂耶氏酵母中表达,如美国专利公开 7,125,672 中所述。这是本领域技术人员熟知的:能通过在选定宿主微生物中用那些用于最佳基因表达的密码子置换天然基因中的密码子来提高编码 mRNA 的翻译效率,从而增加异源基因的表达。此外,为了包括有效的酵母翻译启动序列并获取最佳的基因表达,围绕经密码子优化的合成基因的翻译起始密码子 'ATG' 的核苷酸序列被频繁改变以包括以下在 'ATG' 启动密码子周围的共有序列: 'MAMMATGNHS' (SEQ ID NO:3),其中该核酸简并密码如下使用:M = A/C;S = C/G;H = A/C/T;和 N = A/C/G/T。

[0229]

表 4
解脂耶氏酵母中用于 EPA 生物合成的优选去饱和酶和延伸酶

ORF	生物	共同未决的专利申请 参考	野生型缩写和 SEQ ID NO	密码子优化的 缩写和 SEQ ID NO	突变型 缩写和 SEQ ID NO
Δ 9 延伸酶	小眼虫	专利公布 US 2007- 0117190A1; PCT 公开 WO 2007/061742	“EgD9e” (SEQ ID NO:4 和 5)	“EgD9eS” (SEQ ID NO:6 和 7)	--
	小型绿藻属, CCMP389	专利公布 US 2007- 0117190A1; PCT 公开 WO 2007/061742	“E389D9e” (SEQ ID NO:8 和 9)	“E389D9eS” (SEQ ID NO:10 和 11)	--
	眼虫藻 淡水藻 UTEX 373	美国专利公开申请 12/102879 (提交于 4/15/2008)	“EaD9e” * (SEQ ID NO:12 和 13)	“EaD9eS” (SEQ ID NO:14 和 15)	--
Δ 8 去饱和酶	小眼虫	美国专利公开 7,256,033; 专利公布 US 2008- 0138868A1	“EgD8” * (SEQ ID NO:18 和 19)	“EgD8S” * (SEQ ID NO:20 和 21)	“EgD8M” * (SEQ ID NO:22 和 23)

[0230]

$\Delta 5$ 去饱和酶	眼虫藻 淡水藻 UTEX 373	美国专利公开申请 12/099811 (提交于 4/09/2008)	“EaD8” * (SEQ ID NO:24 和 25)	“EaD8S” (SEQ ID NO:26 和 27)	--
	小眼虫	PCT 公开 WO 2007/136671; 美国专利公开 申请 61/098333 (提交于 9/18/2008)	“EgD5” (SEQ ID NO:34 和 35)	“EgD5S” (SEQ ID NO:36 和 37)	“EgD5S-HXGG”, 包含 HGGG 或 HHGG 基序 (SEQ ID NO:122); 和 “EgD5S-HPGS”, 包含 HPGS 基序 (SEQ ID NO:124)
	多甲藻属 CCMP626	PCT 公开 WO 2007/136646; 美国专利公开 申请 61/098333 (提交于 9/18/2008)	“RD5” (SEQ ID NO:38 和 39)	“RD5S” (SEQ ID NO:40 和 41)	“RD5S-HXGG”, 包含 HCGG 或 HWGG 基序 (SEQ ID NO:126)
	眼虫藻 淡水藻 UTEX 373	美国专利公开申请 12/111237 (提交于 4/29/2008); 美国专利公开 申请 61/098333 (提交于 9/18/2008)	“EaD5” * (SEQ ID NO:42 和 43)	“EaD5S” * (SEQ ID NO:44 和 45)	“EaD5S-HCGG”, 包含 HCGG 基序 (SEQ ID NO:125)

[0231]

Δ17 去饱和酶	栎树猝死病菌	PCT 公开 WO 2007/123999; PCT 公开 WO 2008/054565	"PrD17" (SEQ ID NO:46 和 47)	"PrD17S" (SEQ ID NO:48 和 49)	--
	瓜果腐霉菌	PCT 公开 WO 2008/054565	"PaD17" (SEQ ID NO:50 和 51)	"PaD17S" (SEQ ID NO:52 和 53)	--
Δ12 去饱和酶	串珠镰刀菌	专利公布 US 2005- 0216975A1; PCT 公开 WO 2005/047485	"FmD12" * (SEQ ID NO:54 和 55)	"FmD12S" (SEQ ID NO:56 和 57)	--
C _{16/18} 延伸酶	高山被孢霉 (<i>Mortierella alpina</i>)	专利公布 US 20070087420 A1; PCT 公开 WO 2007/046817	"ELO3" (SEQ ID NO:58 和 59)	"ME3S" (SEQ ID NO:60 和 61)	--
Δ15 去饱和酶	串珠镰刀菌 (<i>Fusarium moniliforme</i>)	专利公布 US 20050132442 A1; PCT 公开 WO 2005/047480	"FmD15" * (SEQ ID NO:62 和 63)	"FmD15S" (SEQ ID NO:64 和 65)	--
Δ9 去饱和酶			"YID9" (SEQ ID NO:66 和 67)		--

注:

- 在美国专利公开申请 12/102879 中将 EaD9e 鉴定为 "EaD9Elo1"; 在该专利申请中将突变型 Δ9 延伸酶(来自 *Euglena anabaena* UTEX 373) 鉴定为 "EaD9Elo2" (SEQ ID NO:16 和 17)。
- 在美国专利公开 7,256,033 中将 EgD8S 鉴定为 "Eg5"。
- 在美国专利公开 7,256,033 中将 EgD8S 鉴定为 "D8SF"。
- 在专利公布 US 2008-0138868 A1 中将 EgD8M 鉴定为 "EgD8S-23"。

[0232]

- 在美国专利公开申请 12/099811 中将 EaD8 鉴定为 “EaD8Des3”；在该专利申请中将突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶（来自 *Euglena anabaena* UTEX 373）鉴定为 “EaD8Des1”（SEQ ID NO:28 和 29）、“EaD8Des2”（SEQ ID NO:30 和 31）和 “EaD8Des4”（SEQ ID NO:32 和 33）。
- 在美国专利公开申请 12/111237 中将 EaD5 鉴定为 “EaD5Des1”。
- 在专利公布 US 2005-0216975 A1 和 PCT 公开 WO 2005/047485 中将 FmD12 鉴定为 “Fm2”。
- 在专利公布 US 2005-0132442 A1 和 PCT 公开 WO 2005/047480 中将 FmD15 鉴定为 “Fm1”。

[0233] 至少一种编码 $\Delta 9$ 延伸酶的基因,该酶将 LA 转化成 EDA 和/或将 ALA 转化成 ETrA :
在专利公布 US 2007-0117190 A1 和 PCT 公开 W02007/061742 中来自小眼虫的 $\Delta 9$ 延伸酶

被分离并定性。在那些文献中将其命名为 EgD9e, 其编码区长 777bp (SEQ ID NO :4) 并编码 258 个氨基酸的蛋白 (SEQ ID NO :5)。如引用的公布所述, EgD9e 的 $\Delta 9$ 延伸酶活性与来自绿光等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 的合成 $\Delta 9$ 延伸酶基因 [“IgD9eS”] (IgD9e; NCBI 保藏号 AAL37626 [GI 17226123], locus AAL37626, CDS AF390174; GenBank 保藏号 AF390174) (CDS = 核苷酸 2-793)) 进行比较并且其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达。EgD9e 当将 LA 转化成 EDA 时具有比 IgD9eS 更大的底物转化效率 (10.0% 对 6.9%)。

[0234] EgD9e 的密码子最优化导致产生 EgD9eS (SEQ ID NO :6)。除了修饰翻译起始位点之外, 还修饰了 777bp 的编码区的 117bp (15.1%) 并最优化了 106 个密码子 (然而由密码子优化的基因 [即, SEQ ID NO :7] 编码的蛋白序列与野生型蛋白序列 [即, SEQ ID NO :5] 相同)。当在解脂耶氏酵母中表达时, EgD9eS 与野生型 EgD9e 相比其将 LA 延伸成 EDA 的效率要高约 16.2%。

[0235] 小型绿藻属 CCMP389 $\Delta 9$ 延伸酶的分离和表征也在专利公布 US2007-0117190 A1 和 PCT 公开 WO 2007/061742 中进行了描述。E389D9e 编码区长 792bp (SEQ ID NO :4) 并编码 263 个氨基酸的蛋白 (SEQ ID NO :9)。E389D9e 和 EgD9e 蛋白序列具有 65.1% 的同一性, 这使用 Clustal V 分析方法 (Higgins, D. G. 和 Sharp, P. M., Comput.. Appl. Biosci., 5 :151-153 (1989); Higgins 等人, Comput.. Appl. Biosci., 8 :189-191 (1992)) 通过 LASERGENE™ 计算生物信息学程序包 (DNASTAR™ Inc., Madison, WI) 的 MegAlign™ v6.1 程序完成, 该程序使用双序列比对的预设参数 (KTUPLE = 1, GAP PENALTY = 3, WINDOW = 5, DIAGONALS SAVED = 5, GAP LENGTH PENALTY = 10)。当在解脂耶氏酵母中表达时, E389D9e 将约 11% 的 LA 转化成 EDA。

[0236] E389D9e 的密码子优化导致 792bp 编码区的 128bp 修饰 (16.2%) 并优化了 113 个密码子。这将 E389D9e (SEQ ID NO :10) 内的 GC 含量从 45.7% 提高到 50.1%。由经密码子最优化的基因编码的蛋白质序列 (即 SEQ ID NO :11) 与野生型蛋白质序列 (即 SEQ ID NO :9) 相同。当在解脂耶氏酵母中表达时, E389D9eS 将约 12% 的 LA 延伸成 EDA。

[0237] 最近在美国专利公开申请 12/102879 中描述了 *Euglena anabaena* UTEX 373 $\Delta 9$ 延伸酶 (EaD9e) 的分离和表征 (在该专利申请中将其命名为 EaD9e1o1)。EaD9e 编码区长 774bp (SEQ ID NO :12) 并编码 258 个氨基酸的蛋白 (SEQ ID NO :13)。依照 Clustal V 分析方法 (同上), 使用 LASERGENE 计算生物信息学程序包 (DNASTAR Inc.) 的 MegAlign™ v6.1 程序, 用预设参数进行成对比对 (同上), 结果 EaD9e 与 IgD9e 具有 32.9% 的序列同一性并与 EgD9e 具有 77.1% 的序列同一性。当在解脂耶氏酵母中表达 EaD9e 时, 基于以下公式报道了 22.7% 的 $\Delta 9$ 延伸: $([EDA]/[LA+EDA]) \times 100$ 。随后在申请人的实验室中, EaD9e 在解脂耶氏酵母中的替代克隆载体中的表达导致 12% 的 $\Delta 9$ 延伸。

[0238] 在合成 EaD9eS (SEQ ID NO :14) 期间除了修饰翻译起始位点之外, 还修饰了 774bp EaD9e 编码区的 106bp (13.7%) 并最优化了 98 个密码子 (38.0%)。由经密码子最优化的基因编码的蛋白质序列 (即 SEQ ID NO :15) 与野生型蛋白质序列 (即 SEQ ID NO :13) 相同。当在解脂耶氏酵母中表达时, EaD9eS 将约 13% 的 LA 延伸成 EDA。

[0239] 至少一种编码 $\Delta 8$ 去饱和酶的基因, 该酶将 EDA 转化成 DGLA 和 / 或将 ETrA 转化成 ETA; 分离自并来源于小眼虫的若干个 $\Delta 8$ 去饱和酶是本文优选的。美国专利公开 7, 256, 033 公开了小眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶, 该酶能够将 EDA 和 EtrA 5 去饱和 (在该文献中命

名为“Eg5”)。虽然与 Eg5 的核苷酸序列和氨基酸序列 100%相同并且功能上等同,本文将野生型小眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶称为“EgD8”。EgD8 编码区长 1263bp(即,SEQ ID NO:18 的核苷酸 4-1269)并编码 421 个氨基酸的蛋白(SEQ IDNO:19)。

[0240] 美国专利公开 7,256,033 也公开了来源于 EgD8 并经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达的合成 $\Delta 8$ 去饱和酶(在该文献中命名为“D8SF”)。虽然与 D8SF 的核苷酸序列和氨基酸序列 100%相同并且功能上等同,本文将密码子优化的野生型小眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶称为“EgD8S”(SEQ ID NO:20 和 21)。具体地讲,EgD8 的 1263bp 编码区中有 207bp(16.4%)被修饰,对应于 192 个密码子的密码子优化。此外,EgD8S 另外有一种插入到野生型 EgD8 的氨基酸残基 1 和 2 之间的缬氨酸;因此,EgD8S 的全长为 422 个氨基酸(SEQ ID NO:21)。EgD8S 在解脂耶氏酵母中的表达证明其与 EgD8 相比能更有效地将 EDA 去饱和成 DGLA。

[0241] 尽管可以使用 EgD8 和 EgD8S,本文鉴定为 EgD8M(SEQ ID NO:22 和 23)的合成工程化突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶优先用于本文所述的耶氏酵母属工程化菌株。如专利公布 US 2008-0138868 A1 所详细阐述,EgD8M(本文鉴定为“EgD8S-23”)通过在 EgD8S 内制造多轮定向突变制备。筛选每个突变对所得突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶活性的效应以确保与 EgD8S(SEQ ID NO:21)的 $\Delta 8$ 去饱和酶活性功能等同。作为该工作的结果,突变型 EgD8M(SEQ ID NO:23)相对于如 SEQ ID NO:21 所示的合成的密码子优化 EgD8S 序列包含以下 24 个氨基酸突变:4S 突变成 A、5K 突变成 S、12T 突变成 V、16T 突变成 K、17T 突变成 V、66P 突变成 Q、67S 突变成 A、108S 突变成 L、117G 突变成 A、118Y 突变成 F、120L 突变成 M、121M 突变成 L、125Q 突变成 H、126M 突变成 L、132V 突变成 L、133L 突变成 V、162L 突变成 V、163V 突变成 L、293L 突变成 M、407A 突变成 S、408V 突变成 Q、418A 突变成 G、419G 突变成 A 和 422L 突变成 Q。使用 Vector NTI®的 AlignX 程序(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)的预设参数成对比对 EgD8M 和 EgD8S 蛋白序列,结果揭示在两种蛋白长度为 422 个氨基酸的序列之间有 94.3%的序列同一性和 97.9%的共有序列。

[0242] 最近在美国专利公开申请 12/099811 中描述了 *Euglena anabaena* UTEX 373 $\Delta 8$ 去饱和酶(“EaD8”)的分离和表征(在该专利申请中将其命名为“EaD8Des3”)。EaD8 编码区长 1260bp(SEQ ID8NO:24)并编码 420 个氨基酸的蛋白(SEQ ID NO:25)。基于 Clustal V 分析方法(同上),使用 LASERGENE 计算生物信息学程序包(DNASTAR Inc.)的 MegAlign™ v6.1 程序,用预设参数进行成对比对(同上),结果 EaD8 与 EgD8 具有 71.9%的序列同一性。当在解脂耶氏酵母中表达 EaD8 时,酶在用 DGLA 作底物时报道了平均 52.3%的 C20 去饱和度,在用 ETrA 作底物时报道了平均 45.5%的 C20 去饱和度。

[0243] 随后确认 EaD8 的 $\Delta 8$ 去饱和酶活性,基于 EaD8 的编码序列设计 EaD8S(SEQ ID NO:26)。除了修饰翻译起始位点之外,还对 1260bp 编码区中的 231bp 进行了修饰(18.3%)并最优化了 208 个密码子(49.5%)。GC 含量从 EaD8 中的 56.8%减少到 EaD8S 中的 54.8%。由密码子优化的基因(即,SEQ ID NO:27)编码的蛋白序列与野生型蛋白序列(即,SEQ ID NO:25)相同。

[0244] 至少一种编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因,该酶将 DGLA 转化成 ARA 和/或将 ETA 转化成 EPA;在 PCT 公开 WO 2007/136671 中分离并表征了来自小眼虫的 $\Delta 5$ 去饱和酶(即,EgD5)。如 SEQ ID NO:34 所示的 EgD5 的 1350bp 编码区编码 449 个氨基酸的蛋白(SEQ ID NO:35),它将 DGLA 转化成 ARA,平均转化效率为约 33%。

[0245] EgD5 的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性与充分表征的高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) $\Delta 5$ 去饱和酶 (即, “MaD5”; 美国专利公开 6, 075, 183 和 PCT 公开 WO 2004/071467 以及 WO 2005/047479) 当在解脂耶氏酵母中表示时进行比较。当用 DGLA、EDA 和 ETA 作底物时, EgD5 在解脂耶氏酵母中的活性比 MaD5 高大约 2.6- 至 2.9- 倍, 然而去饱和酶对 ETrA 的活性大约相同 (活性通过 EgD5 对特定底物的 % $\Delta 5$ 去饱和度除以 MaD5 对相同底物的 % $\Delta 5$ 去饱和度和进行计算)。EgD5 和 MaD5 对 DGLA (对 EDA) 的底物特异性在耶氏酵母属中大约相同, 但是 EgD5 对 ETA (对 ETrA) 比 MaD5 优先大约 2.5- 倍; 底物特异性通过 DGLA 或 ETA 的 % $\Delta 5$ 去饱和度分别除以 EDA 或 ETrA 的 % $\Delta 5$ 去饱和度进行计算。EgD5 对 ω -6 底物 (即, EDA 和 DGLA) 比对 ω -3 底物 (即, ETrA 和 ETA) 也分别具有优先度。尽管已有这些结果, 当体内使用底物时可观察到一些 EgD5 活性的变化; 因此可能需要进一步的实验。

[0246] EgD5 的密码子最优化导致 1350bp 编码区中的 196bp 被修饰 (14.5%) 并最优化了总计 449 个密码子中的 189 个密码子 (42%)。由经密码子最优化的 EgD5S 基因编码的蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:37) 与野生型蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:35) 相同。当在解脂耶氏酵母中表达时, 鉴定为 EgD5S (SEQ ID NO:36) 的密码子优化的基因比野生型基因对 DGLA 去饱和成 ARA 的效率 36%。

[0247] 多甲藻属 CCMP626 $\Delta 5$ 去饱和酶 (RD5) 在 PCT 公开 W02007/136646 中被分离和表征。RD5 的 1392bp 编码序列如 SEQ IDNO:38 所示, 而编码的蛋白是 463 个氨基酸 (SEQ ID NO:39)。该 $\Delta 5$ 去饱和酶在解脂耶氏酵母中将 DGLA 转化成 ARA, 转化效率为 35% (平均值)。RD5 也与高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) $\Delta 5$ 去饱和酶进行比较 (MaD5; 同上)。当用 DGLA、EDA、ETrA 和 ETA 作底物时, RD5 在耶氏酵母属中比 MaD5 的活性高大约 3.0- 至 9.7- 倍。RD5 与 MaD5 相比, 对适宜的 ω -6 底物 (即, DGLA 对 EDA) 的底物特异性为大约 0.4, 对 ω -3 底物 (即, ETA 对 ETrA) 的底物特异性为大约 0.6。RD5 对 ω -6 底物 (即, EDA 和 DGLA) 比对 ω -3 底物 (即, ETrA 和 ETA) 分别具有大约 1.4 倍的优先度。关于 EgD5, 当体内使用底物时可观察到一些 RD5 活性的变化; 因此可能需要进一步的实验。

[0248] RD5 的密码子最优化除了修饰翻译起始位点外, 还导致 1392bp 编码区中的 247bp 发生修饰 (17.7%;) 并且优化了 229 个密码子 (49.4%)。GC 含量从 RD5 中的 49.3% 提高到合成基因 (即, RD5S) 内的 54.2%。分别将 WcoI 位点和 WotI 位点整合到 RD5S (SEQ ID NO:40) 的翻译起始密码子的周围和终止密码子之后。由经密码子最优化的基因编码的蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:41) 与野生型蛋白质序列 (即 SEQ IDNO:39) 相同。RD5S 将 DGLA 转化成 ARA 的效率比野生型 RD5 高约 8.9%。

[0249] *Euglena anabaena* UTEX 373 $\Delta 5$ 去饱和酶 (EaD5) 在美国专利公开申请 12/111237 中进行了分离和表征 (在该文献中称为 EaD5Des1)。其编码区长 1362bp (SEQ ID NO:42) 并编码 454 个氨基酸的蛋白 (SEQ ID NO:43), 依照 Clustal V 分析方法 (同上), 使用 LASERGENE 计算生物信息学程序包 (DNASTAR Inc.) 的 MegAlign™ v6.1 程序, 用预设参数成对比对 EaD5 和 EgD5 (同上), 结果它们具有 77.1% 的序列同一性。EaD5 显示具有 $\Delta 5$ 去饱和酶活性, 其 DGLA 或 ETA 对 EDA 或 ETrA 分别具有 3.5 倍的优先度。此外, EaD5 相对于 ω -3 底物优选 ω -6 底物。

[0250] 随后确认 EaD5 的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性, 基于 EaD5 的编码序列设计 EaD5S (SEQ ID NO:44)。除了修饰翻译起始位点之外, 还对 1362bp 编码区中的 183bp 进行了修饰 (13.4%) 并

最优化了 174 个密码子 (38.3%)。GC 含量从野生型基因 (即, EaD5) 中的 57.6% 降低到 EaD5S 中的 54.6%。NcoI 位点和 NotI 位点分别被掺入翻译启动密码子周围和 EaD5S (SEQ ID NO:44) 的终止密码子之后。由经密码子最优化的基因编码的蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:45) 与野生型蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:43) 相同。

[0251] 最近美国临时专利申请号 61/098333 (以引用方式并入本文) 描述了突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶, 当该酶在解脂耶氏酵母中异源表达时相对于它们的 EgD5S、EaD5S 和 RD5S 对应物具有改善的酶活性。尽管 $\Delta 5$ 去饱和酶包含若干个保守序列 (即, 三个组氨酸框 [SEQ ID NO:190-195] 和细胞色素 b_5 结构域), 选择血红素结合基序 (即, His-Pro-Gly-Gly 或 HPGG; SEQ ID NO:182) 作为用于突变研究的靶序列。结果证明在 EgD5S、EaD5S 或 RD5S 中的 HPGG 基序的脯氨酸残基和第二甘氨酸残基都不是 $\Delta 5$ 去饱和酶功能必需的。然而更令人惊讶地是鉴定出若干个突变酶相对于非突变去饱和酶具有提高的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性。EgD5S-HXGG (SEQ ID NO:122) 具有一种 HGGG (SEQ ID NO:185) 基序和与 EgD5S 相比 104.6% 的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性, 或具有一种 HHGG (SEQ ID NO:186) 基序和与 EgD5S 相比 103.6% 的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性。EgD5S-HPGS (SEQ ID NO:124) 包含一种 HPGS (SEQ ID NO:187) 基序, 具有与 EgD5S 相比 106.9% 的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性。RD5S-HXGG (SEQ ID NO:126) 具有一种 HCGG (SEQ ID NO:188) 基序和与 RD5S 相比 138.6% 的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性, 或具有一种 HWGG (SEQ ID NO:189) 基序和与 RD5S 相比 113.5% 的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性 (虽然 RD5S-HXGG 结果基于最初的分析结果并且不是定量分析)。并且 EaD5S-HCGG (SEQ ID NO:125) 包含一种 HCGG (SEQ ID NO:188) 基序, 显示与 EaD5S 相比 107.9% 的 $\Delta 5$ 去饱和酶活性。优选的突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶具有如 SEQ ID NO:196 (对应于如 SEQ ID NO:122 所示的氨基酸序列)、SEQ ID NO:197 (对应于如 SEQ ID NO:122 所示的氨基酸序列)、SEQ ID NO:198 (对应于如 SEQ ID NO:124 所示的氨基酸序列)、SEQ ID NO:199 (对应于如 SEQ ID NO:125 所示的氨基酸序列)、SEQ ID NO:200 (对应于如 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列) 和 SEQ ID NO:201 (对应于如 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列) 所示的核酸序列。

[0252] 至少一种编码 $\Delta 17$ 去饱和酶的基因, 该酶将 ARA 转化成 EPA 和 / 或将 DGLA 转化成 ETA; 美国专利公开申请 11/787772 提供关于分离和表征栎树猝死病菌 (*Phytophthora ramorum*) $\Delta 17$ 去饱和酶 (“PrD17”) 的细节。PrD17 是 361 个氨基酸的酶 (SEQ ID NO:47), 由如 SEQ ID NO:46 所示的 1086bp ORF 编码。PrD17 进行最优化以在解脂耶氏酵母中表达; 具体地讲, 除了修饰翻译起始位点之外还修饰了 168bp 的编码区 (15.5%) 并且优化了 160 个密码子 (44.2%)。GC 含量从 PrD17 中的 64.4% 减少到合成基因 (即 PrD17S) 中的 54.5%。分别将 NcoI 位点和 NotI 位点整合到 PrD17S (SEQ ID NO:48) 的翻译起始密码子的周围和终止密码子之后。由经密码子最优化的基因编码的蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:49) 与野生型蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:47) 相同。

[0253] 当在解脂耶氏酵母中表达 PrD17S 时, 将 ARA 转化成 EPA 的平均比率是约 49%。在美国专利公开申请 11/779915 中对 PrD17S 底物特异性的进一步分析也测定出 PrD17S 能利用 EDA 和 DGLA 作有效底物, 导致每种底物有大于 25% 的转化效率。

[0254] 在美国专利公开申请 11/779915 中分离并表征了来自瓜果腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum*) 的 $\Delta 17$ 去饱和酶。PaD17 编码区长 1080bp (SEQ ID NO:50) 并编码 359 个氨基酸的蛋白 (SEQ ID NO:51)。成对比对来自致病疫霉菌 (*Phytophthora*

infestans) (PiD17; GenBank 保藏号 CAJ30870; PCT 公开 WO 2005/083053)、大豆疫霉菌 (Phytophthora sojae) (PsD17; PCT 公开 WO 2006/100241; PCT 公开 WO2007/123999)、栎树猝死病菌 (Phytophthora ramorum) (PrD17; SEQ ID NO:47; 同上) 的 $\Delta 17$ 去饱和酶蛋白和 PaD17, 所述比对使用 Clustal W 分析 (描述于 Higgins 和 Sharp, CABIOS, 5: 151-153 (1989); Higgins, D. G. 等人, Comput. Appl. Biosci., 8: 189-191 (1992)) 进行, 它存在于 LASERGENE 计算生物信息学程序包 (DNASTAR Inc.) 的 MegAlign™ v6.1 程序中, 使用预设参数, 结果显示具有以下百分比相似性: PiD17 和 PaD17 之间为 74.5%; PrD17 和 PaD17 之间为 75.0%; 而 PsD17 和 PaD17 之间为 75.3%。

[0255] 除了修饰翻译起始位点, PaD17 的优化还导致对 1080bp 编码区中的 188bp 进行了修饰 (包括终止密码子) (17.4%) 并且优化了 175 个密码子 (48.6%)。GC 含量从 PaD17 中的 61.8% 降低到 PaD17S (SEQ ID NO:52) 中的 54.5%。分别将 NcoI 位点和 NcoI 位点整合到 PaD17S 的翻译起始密码子的周围和终止密码子之后。由经密码子最优化的基因编码的蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:53) 与野生型蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:51) 相同。与野生型 PaD17 的 18.4% 至 19.5% 的转化效率范围相比, PaD17S 的转化效率的范围是 54.1% 至 55.6%。

[0256] PaD17S (SEQ ID NO:52) 的底物特异性相对于 PsD17S (合成 $\Delta 17$ 去饱和酶, 该酶来源于 PsD17 并且其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达; 美国专利公开申请 11/787772) 和 PrD17S (SEQ ID NO:48) 进行进一步评估。尽管所有三个 $\Delta 17$ 去饱和酶都具有对 ARA 的最强优先度、对 EDA 和 DGLA 相对较低的活性、和对 GLA 最低的活性, 发现 PaD17S10 具有对 ARA 最强的总体活性。此外, PaD17S 对 C18 底物 LA 具有显著的 $\Delta 15$ 去饱和酶活性, 其中所述活性比得上 $\Delta 17$ 去饱和酶对 C20 底物 EDA 和 DGLA 的活性。

[0257] 至少一种编码 $\Delta 12$ 去饱和酶的基因, 该酶将油酸转化成 LA; 解脂耶氏酵母具有编码 $\Delta 12$ 去饱和酶的天然基因 (“Y1D12”; SEQ ID NO:1 和 2), 该基因在美国专利公开 7, 214, 491 中被鉴定和表征。然而, 如 PCT 公开 WO 2005/047485 和 WO 2006/052870 所述, 串珠镰刀菌 (Fusarium moniliforme) $\Delta 12$ 去饱和酶 (“FmD12”; 由 SEQ ID NO:54 和 55 编码) 在解脂耶氏酵母中生产 18:2 时具有比 Y1D12 更高的效率。更具体地讲, 虽然两种 $\Delta 12$ 去饱和酶都催化油酸转化成 LA, 但是两种酶的总体特异性不同 (这从而影响每种酶的底物转化百分比)。FmD12 具有比 Y1D12 更高的将 LA 载入磷脂酰胆碱底物的 sn-2 位点的能力。当测定出在解脂耶氏酵母的翻译延伸因子 EF1- α 启动子 (TEF; 美国专利公开 6, 265, 185) 控制下表达 FmD12 比以前在 TEF 启动子控制下表达编码 Y1D12 的嵌合基因 (59% 的 LA 产物积聚) 生产更高水平的 18:2 (68% 的 LA 产物积聚) 时, 这一点得到了证明。这分别对应于底物转化百分比的差异 (按照 $([18:2+18:3]/[18:1+18:2+18:3]) \times 100$ 计算): 85% 对 74%。基于这些结果, 作为一种工程化解脂耶氏酵母高 EPA 生产菌株的方法, 表达真菌 FmD12 相对于表达天然 Y1D12 是优选的。此外, 超表达 FmD12 同时敲除 Y1D12 可尤其有利于 $\Delta 9$ 延伸产物 LA。

[0258] FmD12 优化导致 1434bp 编码区的 182bp 被修饰 (12.7%) 和 172 个密码子被优化 (36%), 10 从而产生如 FmD12S (SEQ ID NO:56) 所示的基因。由经密码子最优化的 FmD12S 基因编码的蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:57) 与野生型蛋白质序列 (即 SEQ ID NO:55) 相同。

[0259] 至少一种编码用于将棕榈酸转化成硬脂酸(18:0)的 $C_{16/18}$ 延伸酶的基因:虽然解脂耶氏酵母确实具有天然 $C_{16/18}$ 延伸酶(在PCT公开WO 2006/052870中称为“YE2”并被表征),但是在本专利申请中优选的 $C_{16/18}$ 延伸酶是高山被孢霉(*Mortierella alpina*) $C_{16/18}$ 延伸酶(EL03)。EL03(SEQ ID NO:59)是一种275个氨基酸的酶,由如SEQ ID NO:58所示的828bp ORF编码,在专利公布US 2007-0087420 A1和PCT公开WO 2007/046817中分离并表征该酶。如该文献所述,EL03在解脂耶氏酵母中,在强天然启动子(即,FBAIN)的控制下超表达,从而产生一种转化体,该转化体生产比无EL03的对照菌株多35%的C18脂肪酸(即,18:0、C18:1、C18:2和GLA)和少31%的C16脂肪酸。这些数据证明EL03使用C16脂肪酸作底物以生产C18脂肪酸。

[0260] EL03优化导致828bp编码区的114bp被修饰(13.8%)和111个密码子被优化(40.2%),从而产生命名为ME3S(SEQ ID NO:60)的基因。由经密码子最优化的ME3S基因编码的蛋白质序列(即SEQ ID NO:61)与野生型蛋白质序列(即SEQ ID NO:59)相同。

[0261] 至少一种编码 $\Delta 15$ 去饱和酶的基因,该酶将LA转化成ALA和/或将GLA转化成STA:本文所述的串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*) $\Delta 15$ 去饱和酶(FmD15)以SEQ ID NO:62和63表示,它们是用于提高ALA产量的优选 $\Delta 15$ 去饱和酶。所述酶包含402个氨基酸,由1209bp的编码序列编码。

[0262] 该特定 $\Delta 15$ 去饱和酶与以前已知的 $\Delta 15$ 去饱和酶(PCT公开WO2005/047480和WO 2006/052870)相比具有若干个独有特性。第一,FmD15以其显著的 $\Delta 12$ 去饱和酶活性为特征(因此用双官能表征该酶)。以前的研究已经测定出用编码SEQ ID NO:62的嵌合基因转化的解脂耶氏酵母的 $\Delta 12$ 去饱和酶中断菌株能够将24%的油酸转化成LA(按照 $([18:2+18:3]/[18:1+18:2+18:3])*100$ 计算底物转化百分比),此外能将96%的LA转化成ALA(按照 $[18:3]/[18:2+18:3]*100$ 计算底物转化百分比)。第二,相对于其它异源表达的 $\Delta 15$ 去饱和酶,FmD15当在解脂耶氏酵母中表达时能以非常高的水平合成ALA[即,用编码SEQ ID NO:62的嵌合基因转化过的解脂耶氏酵母能显示具有占转化宿主细胞总脂肪酸31%的ALA产物积聚,这等同于83%的ALA转化效率(按照 $[18:3]/[18:2+18:3]*100$ 计算)。例如,当在非含油酵母酿酒酵母(*Sacchomyces cerevisiae*)中表达线虫 $\Delta 15$ 去饱和酶时,%ALA产物积聚是仅仅4.1%(Meesapyodsuk等人,Biochem., 39:11948-11954(2000)),然而当在啤酒糖酵母中表达油菜 $\Delta 15$ 去饱和酶时,%ALA产物积聚是仅仅1.3%(Reed.,D.W.等人,Plant Physiol.,122:715-720(2000))。最后,FmD15对18:2的下游 $\omega-6$ 衍生物具有相对广泛的底物特异性。具体地讲, $\Delta 15$ 去饱和酶能够催化GLA转化成STA、DGLA转化成ETA、以及ARA转化成EPA。

[0263] FmD15优化导致1209bp编码区的135bp被修饰(11.2%)和128个密码子被优化(31.8%),如SEQ ID NO:64的FmD15S基因所示。由密码子最优化的基因编码的所得FmD15S蛋白序列(即SEQ ID NO:65)与野生型蛋白质序列(即SEQ ID NO:63)相同。

[0264] 至少一种编码 $\Delta 9$ 去饱和酶用于将棕榈酸转化成棕榈油酸(16:1)和/或将硬脂酸转化成油酸(18:1)的基因:将位于解脂耶氏酵母CLIB122(GenBank保藏号XM_501496)基因组序列中的位点标记YALI0C05951g鉴定为解脂耶氏酵母 $\Delta 9$ 去饱和酶。Y1D9是482个氨基酸的酶(SEQ ID NO:67),由如SEQ ID NO:66所示的1449bp ORF编码。当Y1D9在YAT1启动子的控制下在解脂耶氏酵母中过表达时,在转化子中的油与在用对照DNA片段转

化过的宿主细胞中的油相比提高约 6%。

[0265] 虽然提供了编码 PUFA 生物合成途径酶的优选去饱和酶和延伸酶基因的序列（所述酶适于在解脂耶氏酵母中生产 EPA），但是这些基因并不意指受限。许多其它编码 PUFA 生物合成途径酶的基因将适于本文的目的，能从多种来源分离这些基因，例如分离自天然来源如细菌、藻类、真菌、植物、动物等，以及经由半合成途径或从头合成途径生成。此外，替代酶可以是野生型酶、密码子优化的酶、融合酶、合成酶和 / 或突变酶，它们具有合适的去饱和酶或延伸酶活性。这些替代酶的特征将在于能够：1) 将 LA 延伸成 EDA 和 / 或将 ALA 延伸成 ETrA ($\Delta 9$ 延伸酶)；2) 催化 EDA 转化成 DGLA 和 / 或催化 ETrA 转化成 ETA ($\Delta 8$ 去饱和酶)；3) 催化 DGLA 转化成 ARA 和 / 或催化 ETA 转化成 EPA ($\Delta 5$ 去饱和酶)；4) 催化 ARA 转化成 EPA 和 / 或催化 DGLA 转化成 ETA ($\Delta 17$ 去饱和酶)；5) 催化油酸转化成 LA ($\Delta 12$ 去饱和酶)；6) 延伸 C16 底物以生产 C18 产物 ($C_{16/18}$ 延伸酶)；7) 催化 LA 转化成 ALA ($\Delta 15$ 去饱和酶)；和 / 或，8) 催化棕榈酸转化成棕榈油酸和 / 或催化硬脂酸转化成油酸 ($\Delta 9$ 去饱和酶)。

[0266] 作为另外一种选择，能使用与表 4 所示的去饱和酶和延伸酶基本上相同的其它 DNA 在解脂耶氏酵母中生产 EPA。“基本上相同”意指氨基酸序列或核酸序列以提高的优先度顺序表现出与选择的多肽或编码氨基酸序列的核酸序列至少 80%，90% 或 95% 的同源性。就多肽而言，比对序列的长度一般为至少 16 个氨基酸，优选地至少 20 个氨基酸或最优选地 35 个氨基酸。就核酸而言，比对序列的长度一般为至少 50 个核苷酸，优选地至少 60 个核苷酸，更优选地至少 75 个核苷酸，最优选地 110 个核苷酸。

[0267] 同源性通常使用序列分析软件进行测量，其中术语“序列分析软件”指可用于分析核苷酸或氨基酸序列的任何计算机算法或软件程序。“序列分析软件”可商购获得或独立开发。典型的序列分析软件包括但不限于：1) GCG 程序包 (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI)；2) BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul 等人, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990))；3) DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI)；和 4) 整合了 Smith-Waterman 算法的 FASTA 程序 (W. R. Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Suhai, Sandor, 编辑, Plenum: New York, NY)。在这一描述中，除非另外指明，只要序列分析软件用于分析，分析结果都基于所用程序的“默认值”。在此所用的“默认值”是指在首次初始化软件时软件最初加载的任何值或参数集。通常，这种计算机软件通过将同源程度赋予多种置换、缺失和其他修饰来匹配相似的序列。

[0268] 其它 DNA，虽然不与表 4 所示的优选去饱和酶和延伸酶基本上相同，但如果所述替代去饱和酶和延伸酶以与上述优选去饱和酶和延伸酶基本上相同的方式行使功能，也能被用于本文目的。

[0269] 预期本领域的技术人员能制备具有双管能或三官能活性的嵌合融合蛋白。因此，能生产嵌合融合蛋白，它具有：延伸酶和去饱和酶活性（例如，如提交于 2008 年 4 月 3 日的美国专利公开申请 12/061738 所述的 $\Delta 9$ 延伸酶 $\Delta 8$ 去饱和酶融合基因）；双 - 或三 - 延伸酶活性（例如 $C_{16/18}$ 延伸酶 $\Delta 9$ 延伸酶融合基因）；或双 - 或三 - 去饱和酶活性（例如 $\Delta 5$ 去饱和酶 $\Delta 12$ 去饱和酶融合基因）。例如，嵌合融合蛋白具有适于本文目的的 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶活性，它能通过将 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $\Delta 5$ 去饱和酶用连接接头融合到一

起而合成。 $\Delta 12$ 去饱和酶或 $\Delta 5$ 去饱和酶可能位于融合蛋白的 N-末端部分。设计并合成合适接头分子的方法易于为本领域技术人员所知,例如连接子可能是丙氨酸或赖氨酸序列并且将不影响融合酶的活性。优选的去饱和酶和延伸酶基因能被融合到一起,它们将从表 4 所述的那些基因中选择,同上。

[0270] 最后,用于合成序列并将序列连接到一起的方法是本领域所熟知的,并且在文献中进行了充分描述。因此,体外诱变和选择、定点诱变、化学诱变、“基因改组 (gene shuffling)”法或其它手段可用于获得天然存在的去饱和酶和 / 或延伸酶基因的突变,例如那些在表 4 中描述的基因。这将 5 使得能分别在体内产生具有去饱和酶或延伸酶活性的多肽,该多肽在宿主细胞内具有更佳的物理参数和动力参数 (例如更长的半衰期或更高的所需 PUFA 的产生速率)。

[0271] 表达二酰基甘油胆碱磷酸转移酶用于最优化 EPA 生物合成

[0272] 本文所述的最优化重组解脂耶氏酵母菌株具有生产例如占总脂质大于 25% 的 EPA 的能力,该菌株最少包含 $\Delta 9$ 延伸酶、 $\Delta 8$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶、 $\Delta 17$ 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $C_{16/18}$ 延伸酶。然而除了那些去饱和酶和延伸酶之外,优选的解脂耶氏酵母菌株还包含至少一种编码二酰基甘油胆碱磷酸转移酶 [“CPT1”] 的基因。

[0273] 二酰基甘油胆碱磷酸转移酶 (EC 2.7.8.2) 是一种在负责磷脂酰胆碱生物合成的 CDP-胆碱途径中催化以下反应的酶: CDP-胆碱 + 1,2-二酰基甘油 = 胞苷 -5' -单磷酸 (CMP) + 磷脂酰胆碱。解脂耶氏酵母的二酰基甘油胆碱磷酸转移酶 (Y1CPT1) 如 GenBank 保藏号 XM_501703 (YALI0C10989g) 所示;该酶具有 394 个氨基酸 (SEQ ID NO:69),由 SEQ ID NO:68 的 1185bp 编码序列编码。如前文的 W02006/052870 所述,在强解脂耶氏酵母启动子控制下超表达 Y1CPT1 证明与不超表达其天然 Y1CPT1 的亲本菌株相比,会导致 EPA 相对于 EPA 生产菌株中的总脂肪酸的百分比提高。

[0274] 在最优化的 EPA 菌株中的优选基因敲除菌株

[0275] 除了调控多种优选去饱和酶、延伸酶和二酰基甘油胆碱磷酸转移酶基因的表达 (同上),重组耶氏酵母菌种同时缺失多个天然酶活性也可以是有用的。这常常通过定向基因敲除,在将线性 DNA 整合到宿主基因组中期间完成。并不令人惊讶地是,优选的敲除包括那些用于选择转化子 (例如乳清酸核苷 -5' -磷酸脱羧酶 [Ura3-]、酵母氨酸脱氢酶 [Lys5-]、异丙基苹果酸脱氢酶 [Leu2-]) 和那些减少脂肪酸降解和 TAG 降解 (例如酰基 CoA 氧化酶同功酶 [POX1-、POX2-、POX3-、POX4- 和 POX5-]、脂肪酶 [Lip1-、Lip2-、Lip3-、Lip4a-]) 的敲除。其它优选的基因敲除菌株是那些显示导致表型“中性”突变的菌株,其中耶氏酵母属宿主细胞似乎不受影响 (例如 YALI0F24167g [GenBank 保藏号 XM_505819]、YALI0C18711g- [GenBank 保藏号 XP_501987]、SCP2- [YALI0E01298g; GenBank 保藏号 XM_503410])。相比之下,已经证明一些优选的基因敲除导致总油含量和 / 或 EPA 占总脂肪酸的百分比提高 (例如二酰基甘油酰基转移酶 2 [DGAT2-]、过氧化物酶体生物合成因子蛋白 3 [Pex3p-]、过氧化物酶体生物合成因子蛋白 10 [Pex10p-]、过氧化物酶体生物合成因子蛋白 16 [Pex16p-])。在下文中将附加地详细描述基因敲除的这些广泛类别中的每一种 (下文将不会重申解脂耶氏酵母 $\Delta 12$ 去饱和酶敲除的作用,因为在以前描述串珠镰刀菌 $\Delta 12$ 去饱和酶期间已经提供了该原因)。

[0276] 重要的是注意到尽管下文为特定基因提供了示例性的 SEQ IDNO,关于基因敲除的

讨论不以任何方式受本文提供的具体序列的限制。本领域熟知的是可以使用与下文所述的编码序列基本上相同的其它 DNA (因此,将期望例如在不同菌株和宿主之间的些微序列不同)。

[0277] 用于选择转化子的基因敲除:如前文 PCT 公开 WO 2006/052870 所述,将包含表达盒的质粒 DNA 整合到乳清酸核苷 -5' - 磷酸脱羧酶基因位点 (Ura3 ;GenBank 保藏号 AJ306421[SEQ ID NO :70])、异丙基苹果酸盐脱氢酶基因位点 (Leu2 ;GenBank 保藏号 AF260230[SEQ IDNO :72]) 和酵母氨酸脱氢酶基因位点 (Lys5 ;GenBank 保藏号 M34929[SEQ ID NO :74]) 中是可能的。这通常导致整合位点处的基因敲除,基于细胞在分别缺乏尿嘧啶、亮氨酸或赖氨酸的培养基上生长的能力,易于利用基因敲除作为区分转化细胞和未转化细胞的手段。

[0278] 在一些优选的方法中,能重复使用 Ura3 基因与 5- 氟乳清酸 (5- 氟尿嘧啶 -6- 羧酸一水合物或“5-FOA”) 的组合进行选择。5-FOA 对具有编码乳清苷 5' - 单磷酸脱羧酶 (OMP 脱羧酶) 的功能性 URA3 基因的酵母细胞有毒性;基于这种毒性,5-FOA 特别可用于选择和鉴定 Ura⁻ 突变酵母菌株 (Bartel, P. L. 和 Fields, S., Yeast 2-Hybrid System, OxfordUniversity :New York, 第 7 卷,第 109-147 页,1997)。更具体地讲,技术人员可以首先敲除天然 Ura3 基因以产生具有 Ura⁻ 显型的菌株,其中基于 5-FOA 抗性进行选择。然后,可将多个嵌合基因和新的 Ura3 基因整合到耶氏酵母属基因组的不同位点以产生具有 Ura⁺ 显型的新菌株。当敲除导入的 Ura3 基因时,随后的整合将产生新的 Ura3⁻ 菌株 (再次使用 5-FOA 选择进行鉴别)。因此,能将 Ura3 基因 (与 5-FOA 选择组合使用) 用作多轮转化的选择标记并从而以方便的方式容易地将基因修饰整合进耶氏酵母属基因组。

[0279] 用于减少脂肪酸和 TAG 降解的基因敲除:在本文所述的最优化解脂耶氏酵母中故意中断影响脂肪酸 5 降解和 TAG 降解的那些途径 (例如当将多个表达盒整合进细胞中时) 也是有用的。这最小化在汇集的酰基 -CoA 中或在细胞的 TAG 级分中积聚的 EPA 的降解 (PCT 公开 WO 2006/052870)。这些途径分别通过酰基 -CoA 氧化酶和脂肪酶基因代表。更具体地讲,酰基 -CoA 氧化酶 (EC 1.3.3.6) 催化过氧化物酶体 β - 氧化反应,其中每循环的降解产生一种乙酰 -CoA 分子和一种脂肪酸,该脂肪酸比脂肪酸底物短两个碳原子。在解脂耶氏酵母中存在五个酰基 -CoA 氧化酶同功酶,它们由 POX1、POX2、POX3、POX4 和 POX5 基因编码 (也称作 Aco1、Aco2、Aco3、Aco4 和 Aco5 基因),分别对应于 GenBank 保藏号 AJ001299-AJ001303 (也参见对应的 GenBank 保藏号 XP_504703[SEQ ID NO :75]、XP_505264[SEQ IDNO :76]、XP_503244[SEQ ID NO :77]、XP_504475[SEQ ID NO :78] 和 XP_502199[SEQ ID NO :79])。每个同功酶具有不同的底物特异性。例如,POX3 基因编码酰基 -CoA 氧化酶,该酶对短链脂肪酸具有活性,然而 POX2 基因编码酰基 -CoA 氧化酶,该酶对长链脂肪酸具有活性 (Wang H. J., 等人, J. Bacteriol., 181 :5140-5148 (1999))。为了避免任何混淆,申请人将把上述的酰基 -CoA 氧化酶称作 POX 基因,然而根据一些公开可用的文献,该术语能与 Aco 基因命名法互换使用。

[0280] 同样地,在解脂耶氏酵母中已经检测到若干个脂肪酶 (EC 3.1.1.3),包括细胞内的、膜结合的和细胞外的酶 (Choupina, A., 等人, Curr. Genet., 35 :297 (1999) ;Pignede, G., 等人, J. Bacteriol., 182 :2802-2810 (2000))。例如, Lip1 (GenBank 保藏号 Z50020[SEQ ID NO :80]) 和 Lip3 (GenBank 保藏号 AJ249751[SEQ ID NO :84]) 是细胞内的或膜结合的,

然而 Lip2 (GenBank 保藏号 AJ012632[SEQ ID NO :82]) 编码细胞外脂肪酶。Lip4a (GenBank 保藏号 XP_503825[SEQ ID NO :86]) 是耶氏酵母属脂肪酶 4 (GenBank 保藏号 XP_503697) 同源物。它与变形假丝酵母的细胞外三酰基甘油脂肪酶 (GenBank 保藏号 CAD21430) 具有高度同源性。这些脂肪酶中的每一种都是合适的中断靶标, 因为该酶催化其中 TAG 和水直接降解成 DAG 和脂肪酸阴离子的反应。

[0281] 因此, 如前文的 PCT 公开 WO 2006/052870 所述, 将包含表达盒的质粒 DNA 整合进任何以下基因位点并从而导致基因敲除是有利地: Pox1 (Aco1)、Pox2 (Aco2)、Pox3 (Aco3)、Pox4 (Aco4)、Pox5 (Aco5)、Lip1、Lip2、Lip3 和 Lip4a。

[0282] 其它基因敲除: 因为在解脂耶氏酵母中的同源重组频率相对较低, 将表达盒整合进解脂耶氏酵母的基因组可能不时发生, 导致无意的中断除那些最初被定向的基因之外的解脂耶氏酵母基因。这提供在转化子中筛选 EPA 生产提高的转化子并鉴定附加的有用基因敲除的机会。通过这些手段鉴定以下三个基因敲除, 以及在下文中描述 Pex10- 基因敲除。

[0283] 解脂耶氏酵母 SCP2 (YAL10E01298g[SEQ ID NO :87]) 编码甾醇载体蛋白, 该蛋白参与脂质传送和代谢 (Ferreya R. G. 等人, Arch. Biochem. Biophys., 453 :197-206 (2006))。已证实 SCP2 蛋白位于过氧化物酶体并通过促进酶和底物的相互作用参与氧化长链脂肪酸。SCP2 已经显示结合脂肪酸和它们的 CoA 酯。因此, 中断该基因可能是有益的, 会降低 EPA 和其它途径中间体的氧化水平。在本文实施例中, 在菌株 Y4305 中鉴定了 SCP2- 基因敲除。

[0284] 也发现 ORF YAL10C18711g (GenBank 保藏号 XP_501987[SEQ ID NO :89]) 发生基因中断, 这当在其反应起始密码子中插入表达盒时发生。YAL10C18711g 与啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 基因 YLR050C 同源, 其基因功能是未知的。由 GFP 和 YLR050C 组成的嵌合蛋白显示位于内质网区域 (Huh W. K., 等人, Nature, 425 (6959) : 686-691 (2003)), 说明它可能与脂肪酸去饱和或脂质生产有关。在本文实施例中, 首先在菌株 Y4217 中鉴定了 YAL10C18711g 基因敲除。

[0285] 有时表达盒的整合发生在基因编码区外部, 但是在特定编码区之前 (5' 非编码序列) 和之后 (3' 非编码序列) 的调控序列中。这种类型的插入可能影响 ORF 的表达。在本专利申请中, 表达盒插入菌株 Y4086 中的 YAL10F24167g (GenBank 保藏号 XM_505819[SEQ ID NO :91]) 的 5' - 区域, 位于起始密码子上游 154bp 处。YAL10F24167g 与啤酒糖酵母 SPS4 基因同源, 它显示在孢子形成期间被表达 (尽管不清楚其确切功能) (Hepworth SR 等人, Mol. Cell. Biol., 15 (7) :3934-3944 (1995))。

[0286] 二酰基甘油酰基转移酶基因敲除: 酰基转移酶与 TAG 的生物合成紧密相关, 并且在 PCT 公开 WO 2006/052870 中已经描述了四个真核酰基转移酶基因家族。这些家族包括酰基 -CoA: 胆固醇酰基转移酶 [“ACAT”] 家族, 一般称为甾醇酰基转移酶; 卵磷脂: 胆固醇酰基转移酶 [“LCAT”] 家族; 甘油 3- 磷酸酰基转移酶和酰基 -CoA 溶血磷脂酸酰基转移酶 [“GPAT/LPAAT”] 家族; 和二酰基甘油酰基转移酶 [“DAG AT”] 家族。也参见引用文献 D. Sorger 和 G. Daum, Appl. Microbiol. Biotechnol., 61 :289-299 (2003), 以及 H. Mullner 和 G. Daum, Acta Biochimica Polonica, 51 (2) :323-347 (2004)。DAG AT 家族 (EC 2.3.1.20) 包括 DGAT2, 它涉及 TAG 生物合成的最终步骤; 具体地讲, 该酶催化将第三脂肪酸加到 1,2- 二酰基甘油 [“DAG”] 的 sn-3 位点上以形成 TAG。

[0287] 在 PCT 公开 WO 2006/052870 中敲除解脂耶氏酵母基因,该基因编码 DGAT1(在 PCT 公开 WO 2006/052914 中表征)、DGAT2(SEQ ID NO:93 和 94;在美国专利公开 7,267,976 中表征)和 PDAT(在美国专利公开 7,267,976 中表征)(参见该文献实施例 29 和 30)。具体地讲,在包含中断 DGAT2 和 / 或 DGAT1 和 / 或 PDAT 基因的菌株中发现总油含量降低而 EPA 百分比提高。例如,与天然 DGAT2 不发生中断的亲本菌株相比,DGAT2 敲除导致 % EPA(占总脂肪酸 [“TFA”]) 加倍而脂质含量(TFA%干细胞重量)减半。如 PCT 公开 WO 2006/052912 详细阐述的进一步实验导致这一假说:能调控宿主生物的天然 DAG AT 的活性并从而能操纵在宿主脂质和油中的 PUFA 百分比。具体地讲,因为期望油的生物合成在产油期间与多不饱和化竞争,减少或失活生物的一种或多种酰基转移酶的活性(例如 PDAT 和 / 或 DGAT1 和 / 或 DGAT2)并从而降低油的生物合成的总体速率、同时增加掺入脂质或油级分的 PUFA 百分比(相对于总脂肪酸)是可能的。这一结果因为多不饱和化效率更高;或者换句话说通过下调特定 DAG AT 的活性,在油的生物合成和多不饱和化之间的底物竞争减少,在产油期间有利于多不饱和化。

[0288] 基于上文概述的数据,期望重组耶氏酵母属生产宿主缺乏其编码 DGAT2(SEQ ID NO:93)的天然基因。

[0289] 过氧化物酶体生物合成因子蛋白(PEX)基因敲除:

[0290] 过氧化物酶体是普遍存在于所有真核细胞中的细胞器。它们的主要作用是降解细胞定位的细胞器中的多种物质,例如毒性化合物、脂肪酸等。例如,在过氧化物酶体中能够发生 β -氧化过程,其中脂肪酸分子发生降解,最后产生乙酰-CoA 的游离分子(它被回输到细胞溶质中)。虽然线粒体中的 β -氧化过程导致 ATP 合成,在过氧化物酶体中的 β -氧化引起高电位电子转移到 O_2 中并导致形成 H_2O_2 , H_2O_2 随后被过氧化物酶体过氧化氢酶转化成水和 O_2 。长链(如 C_{18} - C_{22})脂肪酸在过氧化物酶体中经过初始 β -氧化,然后经过线粒体 β -氧化。

[0291] 已知负责通过水解 ATP 使蛋白穿过过氧化物酶体膜的蛋白是过氧化物酶体生物合成因子蛋白,或“peroxins”。这些过氧化物酶体生物合成因子蛋白也包括那些涉及过氧化物酶体生物合成/装配的蛋白。过氧化物酶体生物合成因子蛋白的基因首字母缩写 Pex;并且命名体系描述于 Distel 等人, *J. Cell Biol.*, 135:1-3(1996)。迄今已经在多种真核生物中鉴定了至少 32 个不同的 Pex 基因。然而在真菌中, Kiel 等人近来的文献(*Traffic*, 7:1291-1303(2006))提出过氧化物酶体生物合成/基质蛋白输入所需的最小数目是 17,因此仅需要 Pex1p、Pex2p、Pex3p、Pex4p、Pex5p、Pex6p、Pex7p、Pex8p、Pex10p、Pex12p、Pex13p、Pex14p、Pex17p、Pex19p、Pex20p、Pex22p 和 Pex26p。这些蛋白以协同方式作用以完成增生(复制)过氧化物酶体并经由转移进入过氧化物酶体以输入蛋白(参见 Waterham, H. R. 和 J. M. Cregg. *BioEssays*, 19(1):57-66(1996))。

[0292] 在酵母解脂耶氏酵母中,基于 5 过氧化物酶体生物合成机制的同源性和强保守性(Kiel 等人,同上)已经鉴定了多种不同的 Pex 基因,包括:Y1Pex1p(GenBank 保藏号 CAG82178[SEQ ID NO:95])、Y1Pex2p(GenBank 保藏号 CAG77647[SEQ ID NO:96])、Y1Pex3p(GenBank 保藏号 CAG78565[SEQ ID NO:97])、Y1Pex3Bp(GenBank 保藏号 CAG83356[SEQ ID NO:98])、Y1Pex4p(GenBank 保藏号 CAG79130[SEQ ID NO:99])、Y1Pex5p(GenBank 保藏号 CAG78803[SEQ ID NO:100])、Y1Pex6p(GenBank 保

藏号 CAG82306[SEQ ID NO:101])、YlPex7p(GenBank 保藏号 CAG78389[SEQ ID NO:102])、YlPex8p(GenBank 保藏号 CAG80447[SEQ ID NO:103])、YlPex10p(GenBank 保藏号 CAG81606[SEQ ID NO:104])、YlPex12p(GenBank 保藏号 CAG81532[SEQ ID NO:105])、YlPex13p(GenBank 保藏号 CAG81789[SEQ ID NO:106])、YlPex14p(GenBank 保藏号 CAG79323[SEQ ID NO:107])、YlPex16p(GenBank 保藏号 CAG79622[SEQ ID NO:108])、YlPex17p(GenBank 保藏号 CAG84025[SEQ ID NO:109])、YlPex19p(GenBank 保藏号 AAK84827[SEQ ID NO:110])、YlPex20p(GenBank 保藏号 CAG79226[SEQ ID NO:111])、YlPex22p(GenBank 保藏号 CAG77876[SEQ ID NO:112]) 和 YlPex26p(GenBank 保藏号 NC_006072 的反义翻译,核苷酸 117230-118387[SEQ ID NO:113])。此外,以及分离并表征了这些基因中的一些基因。Bascom, R. A. 等人 (Mol. Biol. Cell, 14:939-957 (2003)) 描述了 YlPex3p; Szilard, R. K. 等人 (J. Cell Biol., 131:1453-1469 (1995)) 描述了 YlPex5p; Nuttley, W. M. 等人 (J. Biol. Chem., 269:556-566 (1994)) 描述了 YlPex6p; Elizen G. A., 等人 (J. Biol. Chem., 270:1429-1436 (1995)) 描述了 YlPex9p; Elizen G. A. 等人 (J. Cell Biol., 137:1265-1278 (1997)) 和 Titorenko, V. I. 等人 (Mol. Cell Biol., 17:5210-5226 (1997)) 描述了 YlPex16p; Lambkin, G. R. 和 R. A. Rachubinski (Mol. Biol. Cell., 12(11):3353-3364 (2001)) 描述了 YlPex19; 以及 Titorenko V. I. 等人 (J. Cell Biol., 142:403-420 (1998)) 和 Smith J. J. 以及 R. A. Rachubinski (J. Cell Biol., 276:1618-1625 (2001)) 描述了 YlPex20p。然而本文最初关注的基因是 5YlPex10p(GenBank 保藏号 CAG81606、AB036770 和 AJ012084)。表征于 Sumita 等人 (FEMS Microbiol. Lett., 214:31-38 (2002)), 它证明:1) YlPex10p 用作过氧化物酶体的组分; 和 2) YlPex10p 的 C₃HC₄ 环状锌指基序是蛋白功能必需的, 这经由制造 C341S、C346S 和 H343W 点突变并随后进行生长分析来测定。

[0293] 已经提出过氧化物酶体是脂质的分解代谢和合成代谢所必需的 (Lin, Y. 等人, Plant Physiology, 135:814-827 (2004)); 然而, 该假说是基于对 Pex16p 的同源物的研究。更具体地讲, Lin, Y. 等人 (同上) 报道拟南芥 Shrunken 种子 1 (sse1) 突变体具有异常的过氧化物酶体生物合成和脂肪酸合成, 这基于 sse1 种子中的油与野生型相比减少了 10% 至 16%。相关的, Binns, D. 等人 (J. Cell Biol., 173(5):719-731 (2006)) 检查了啤酒糖酵母中的过氧化物酶体-脂质体相互作用并测定两个细胞器之间的广泛物理接触促进脂质体内的结合脂解及过氧化物酶体脂肪酸氧化。更具体地讲, 检查不同 Pex 基因敲除菌株的 TAG 游离脂肪酸的比率, 发现比率相对于野生型提高。然而, 在申请人的受让人的工作之前, 尚未在生产 PUFA 的生物中进行过对 Pex 敲除的研究。

[0294] 在本文所述的一些优选重组耶氏酵母属生产宿主中, 宿主缺乏编码过氧化物酶体生物合成因子蛋白的天然基因, 所述蛋白选自: Pex1p、Pex2p、Pex3p、Pex3Bp、Pex4p、Pex5p、Pex5Bp、Pex5Cp、Pex5/20p、Pex6p、Pex7p、Pex8p、Pex10p、Pex12p、Pex13p、Pex14p、Pex15p、Pex16p、Pex17p、Pex14/17p、Pex18p、Pex19p、Pex20p、Pex21p、Pex21B、Pex22p、Pex22p 样和 Pex26p。更优选的, 中断的过氧化物酶体生物合成因子蛋白是 Pex2p、Pex10p 和/或 Pex12p, 因为这三个 Pex 蛋白在靠近它们 C 末端处都具有相似的 C₃HC₄ 环状锌指基序, 该基序据推测是它们活性必需的 (图 2A)。作为另外一种选择, 中断的过氧化物酶体生物合成因子蛋白选自: Pex3p、Pex10p 和 Pex16p。

[0295] 在编码过氧化物酶体生物合成因子蛋白的天然基因中的中断可能是在部分基因中的插入、删除、或定向突变,例如在蛋白 N-末端部分或在蛋白 C-末端部分。作为另外一种选择,该中断能导致完全的基因敲除,使得基因从宿主细胞基因组中除去。或者该中断可能是导致无功能蛋白的定向突变。在任何情况下,中断导致与天然过氧化物酶体生物合成因子蛋白未被中断的亲本菌株相比,在重组耶氏酵母属生产宿主的总脂质级分和油级分中以总脂肪酸百分比形式表示的 PUFA 量增加。

[0296] 如实施例所证明并如表 5 所概述的(下文)那样,中断 YIPex10p 的 C_3HC_4 环状锌指基序的 C-末端部分(实施例 4 和 5)、删除整个染色体 YIPex10 基因(实施例 8)都导致产生 458 解脂耶氏酵母的工程化 EPA 生产菌株,相对于尚未中断天然 Pex10p 的亲本菌株,该菌株在总脂质级分和油级分中具有以总脂肪酸百分比形式表示的、提高量的 PUFA。此外,在解脂耶氏酵母的工程化 EPA 生产菌株中表达染色体外的 YIPex10p 逆转该效应,所述菌株在基因组 Pex10p 中具有中断并提高总脂质级分和油级分中的 PUFA 量(实施例 6)。

[0297] 更具体地讲,表 5 汇编了来自实施例 4、5、6 和 8 的数据,使得关于总脂质含量[“TFA% DCW”]、以总脂肪酸重量%表达的给定脂肪酸浓度[“% TFA”]、和干细胞重量百分比形式表达的给定脂肪酸含量[“% DCW”]的趋势能基于存在/不存在 Pex10p 中断或敲除被推论出来。“所需 PUFA% TFA”和“所需 PUFA% DCW”分别定量所需 PUFA 产物(即,EPA)的特定浓度或含量,所述产物通过设计工程化 PUFA 生物合成途径进行生产。“所有 PUFA”包括 LA、ALA、EDA、DGLA、ETrA、ETA 和 EPA、然而“C20 PUFA”被限定为 EDA、DGLA、ETrA、ETA 和 EPA。

[0298]

表 5

在具有突变 Pex 基因的解脂耶氏酵母菌株中的 PUFA% TFA 和 % DCW

实施例	菌株	基因组 Pex 基因	TFA % DCW	% TFA			% DCW		
				所需 PUFA	全部 PUFA	C20 PUFA	所需 PUFA	全部 PUFA	C20 PUFA
4、5	Y4086	野生型 Pex10 (SEQ ID NO:104; 377AA)	28.6	9.8	60.1	25.2	2.8	17.2	7.2
	Y4128	突变型* Pex10 (SEQ ID NO:120; 345AA)	11.2	42.8	79.3	57.9	4.8	8.9	6.4
6	Y4128 + pFBAIn- PEX10	在嵌合 FBAINm::Pex10::Pex20 基因内的突变型* Pex10 (SEQ ID NO:120; 345AA) + 质粒野生型 Pex10 (SEQ ID NO:104; 377AA)	29.2	10.8	60	27.3	3.1	17.5	8.0
	Y4128 + pPEX10-1	突变型* Pex10 (SEQ ID NO:120; 345AA) + 质 粒野生型 Pex10 (SEQ ID NO:104; 377AA), 在 Pex10-5' (500bp) ::Pex10::Pex10-3' 基因内	27.1	10.7	60.1	26.7	2.9	16.2	7.2
	Y4128 + pPEX10-2	突变型* Pex10 (SEQ ID NO:120; 345AA) + 质 粒野生型 Pex10 (SEQ ID NO:104; 377AA) 在 Pex10-5' (991bp) ::Pex10::Pex10-3' 基因内	28.5	10.8	59	26.9	3.1	16.8	7.7
	Y4128 + 对 照	突变型* Pex10 (SEQ ID NO:120; 345AA)	22.8	27.7	62.6	42.3	6.3	14.2	9.6
8	Y4184U	野生型 Pex10 (SEQ ID NO:104; 377AA)	11.8	20.6	nq [♦]	nq [♦]	2.4	nq [♦]	nq [♦]
			8.8	23.2	nq [♦]	nq [♦]	2.0	nq [♦]	nq [♦]

[0299]

	Y4184U Δ Pex10	突变型 Pex10	17.6	43.2	◆ nq	◆ nq	7.6	◆ nq	◆ nq
			13.2	46.1	◆ nq	◆ nq	6.1	◆ nq	◆ nq

* 在 Y4128 中的 Pex10 中断导致截短的蛋白，其中 C-末端的最后 32 个氨基酸(对应于 C₃HC₄ 环状锌指基序的 C 末端部分)不存在。

◆ nq = 非定量的

[0300] 能得出以下结论（相对于天然 Pex 蛋白未被中断的亲本菌株或表达中断天然 Pex 蛋白的“后备”基因的亲本菌株）：

[0301] 1) 在生产 PUFA 的耶氏酵母属中的 Pex 中断导致总脂质级分和油级分中的单个 PUFA (例如 EPA 或 DLGA) 的重量%相对于总脂肪酸的重量% (% TFA) 提高;

[0302] 2) 在生产 PUFA 的耶氏酵母属中的 Pex 中断导致总脂质级分和油级分中的 C20 PUFA 的重量%相对于总脂肪酸的重量% (% TFA) 提高;

[0303] 3) 通过延伸点 1), 在生产 PUFA 的耶氏酵母属中的 Pex 中断导致总脂质级分和油级分中的任何 PUFA 和所有 PUFA 组合的量相对于总脂肪酸的重量%提高;和

[0304] 4) 在生产 PUFA 的耶氏酵母属中的 Pex 中断导致单个 PUFA (例如 EPA 或 DLGA) 相对于干细胞重量的百分比提高。

[0305] 当比较在“所有 PUFA % DCW”、“C20 PUFA % DCW”和 TFA % DCW 中的 Pex 中断的效应时,能观察到不同的结果。具体地讲,在一些情况下,在生产 PUFA 的耶氏酵母属中的 Pex 中断导致总脂质级分和油级分中的 C₂₀ PUFA 或所有 PUFA 的量(以干细胞重量百分比形式表示)提高(相对于天然 Pex 蛋白未被中断的亲本菌株)。在其它情况下,在总脂质级分和油级分中有以干细胞重量百分比形式表示的减少量的 C₂₀ PUFA 或所有 PUFA (相对于天然 Pex 蛋白未被中断的亲本菌株)。也观察到相对于总脂质含量(TFA % DCW)的类似结果,因此 Pex 中断的效应可能导致总脂质含量提高或降低。

[0306] 基于过氧化物酶体生物合成因子蛋白在细胞内以受调控功能作用的能力,不希望受任何具体说明或理论的限制,假定在含油酵母细胞中的 Pex 基因中断或敲除影响过氧化物酶体中天然存在的脂质分解代谢和合成代谢,或受过氧化物酶体的影响。与尚未中断其天然过氧化物酶体生物合成因子蛋白的含油酵母相比,中断或基因敲除导致总脂质级分和油级分中的 PUFA 量增加,所述 PUFA 量以总脂肪酸百分比形式表示。在一些情况下,也观察到在总脂质级分和油级分中以干细胞重量百分比形式表示的 PUFA 量增加,和/或以干细胞重量百分比形式表示的总脂质含量增加。假定这种通用机制可应用于所有真核生物中,如藻类、真菌、卵菌、酵母、类眼虫、原生藻菌、植物和一些哺乳动物系统,因为所有这些生物都包含过氧化物酶体。

[0307] 基因敲除的中断方法

[0308] 虽然本领域的技术人员可使用多种技术中断天然耶氏酵母属基因,所述基因选自 Ura3、Lys5、Leu2、Pox1、Pox2、Pox3、Pox4、Pox5、Lip1、Lip2、Lip3、Lip4a、YALI0F24167g、YALI0C18711g、SCP2[YALI0E01298g]、DGAT2、Pex1p、Pex2p、Pex3p、Pex3Bp Pex4p、Pex5p、Pex5Bp、Pex5Cp、Pex5/20p、Pex6p、Pex7p、Pex8p、Pex10p、Pex12p、Pex13p、Pex14p、Pex15p、Pex16p、Pex17p、Pex14/17p、Pex18p、Pex19p、Pex20p、Pex21p、Pex21B、Pex22p、Pex22p-like、Pex26p 和 $\Delta 12$ 去饱和酶,一般特定基因的内源活性能通过以下技术降低或消除,例如:1) 通过插入、取代和/或删除所有或部分靶基因中断所述基因;或,2) 操纵控制蛋白表达的调控序列。这些技术将都在下文中简要讨论;然而本领域的技术人员将了解这些技术在现有的文献中已有详细描述,并且不受本文所述的方法、宿主细胞、和产物的限制。本领域的技术人员也将认识到大多数适用的技术使用任何特定的含油酵母。

[0309] 经由插入、取代和/或删除的中断:为了中断基因,将外源 DNA 片段(通常是一种选择性标记基因,但是任选地是嵌合基因或嵌合基因串,它们传送所期望的表型使之表达)插入靶基因以打断它的编码区或启动子序列并从而在功能上失活基因。将中断盒转化到宿主细胞中导致外源 DNA 片段通过同源重组置换功能性天然基因(参见例如:Hamilton

等人, J. Bacteriol., 171:4617-4622 (1989); Balbas 等人, Gene, 136:211-213 (1993); Gueldeiner 等人, Nucleic Acids Res., 24:2519-2524 (1996); 和 Smith 等人, Methods Mol. Cell. Biol., 5:270-277 (1996)。本领域的技术人员将会知道基因定向常规方法的许多改良方法, 所述方法容许有阳性选择和阴性选择、生成基因敲除、以及插入外来 DNA 序列到例如哺乳动物系统、植物细胞、丝状真菌、和 / 或微生物系统的特定基因组位点中。申请人优选这一方法作为在解脂耶氏酵母中制备基因中断的手段 (例如在本文实施例中, 在多种高水平 EPA 生产重组菌株中通过上述手段中断编码 Leu⁻ 和 Ura⁻ 的天然基因)。

[0310] 然而, 如上文所提到的那样, 解脂耶氏酵母表现出相当低的同源重组频率并因此常常将在除那些最初定向的位点之外的位点上表达盒插入到解脂耶氏酵母基因组中, 尽管在载体中存在定向位点。这可能导致随机中断解脂耶氏酵母的基因, 例如本文通过中断编码 YALI0C18711g、SCP2 和 Pex10p 的天然基因证明了这一点。

[0311] 替代基因中断的非特异性方法是使用转座元件或转座子。转座子是随机插入 DNA 但随后能根据序列进行检索以测定插入位点的基因元件。体内和体外转座技术是已知的, 并且涉及转座元件与转座酶的组合使用。当转座元件或转座子与核酸片段在存在转座酶的情况下接触时, 转座元件将随机插入核酸片段中。该技术用于随机诱变和基因分离, 因为中断基因可基于转座元件的序列进行鉴定。用于体外转座的试剂盒是可商购获得的并包括: 1) Primer Island Transposition Kit, 得自 Perkin Elmer Applied Biosystems, Branchburg, NJ, 基于酵母的 Ty1 元件; 2) Genome Priming System, 得自 New England Biolabs, Beverly, MA, 基于细菌转座子 Tn7; 和 3) EZ::TN 转座子插入系统, 得自 Epicentre Technologies, Madison, WI, 基于 Tn5 细菌转座元件。

[0312] 调控序列的操纵: 特定基因的内源活性一般能通过操纵调控序列控制蛋白表达来减少或消除。本领域熟知与编码序列附连的调控序列包括转录和翻译“控制”核苷酸序列, 所述序列位于编码序列的上游 (5' 非编码序列)、内部、或下游 (3' 非编码序列), 并且影响附连的编码序列的转录、RNA 加工或稳定性、或翻译。因此, 操纵 Pex 基因调控序列可以指操纵特定 Pex 基因的启动子、静默子、5' 非转录前导序列 (介于转录起始位点好翻译启动密码子之间)、内含子、增强子、启动控制区、多腺苷酸化识别序列、RNA 加工位点、效应子结合位点和茎-环结构。然而在所有情况下, 操纵的结果是下调基因的表达。

[0313] 因此例如鉴定为 YALI0F24167g 的耶氏酵母属 ORF 的启动子在一些本文所述的优化高水平 EPA 生产菌株中被中断。显而易见的是, 类似的操纵可以在对应于耶氏酵母属基因的调控序列中进行, 所述基因编码 Ura3、Lys5、Leu2、Pox1、Pox2、Pox3、Pox4、Pox5、Lip1、Lip2、Lip3、Lip4a、YALI0C18711g、SCP2[YALI0E01298g]、DGAT2、Pex1p、Pex2p、Pex3p、Pex3Bp、Pex4p、Pex5p、5Pex5Bp、Pex5Cp、Pex5/20p、Pex6p、Pex7p、Pex8p、Pex10p、Pex12p、Pex13p、Pex14p、Pex15p、Pex16p、Pex17p、Pex14/17p、Pex18p、Pex19p、Pex20p、Pex21p、Pex21B、Pex22p、Pex22p 样、Pex26p 和 / 或 $\Delta 12$ 去饱和酶, 从而导致基因下调或敲除。作为另外一种选择, 驱动其中一种上述基因表达的天然启动子可以用与天然启动子相比启动子活性减弱的异源启动子取代。用于操纵调控序列的方法是本领域技术人员熟知的。

[0314] 技术人员将能够使用这些方法和本领域熟知的其它方法中断在含油酵母细胞中的天然 Ura3、Lys5、Leu2、Pox1、Pox2、Pox3、Pox4、Pox5、Lip1、Lip2、Lip3、Lip4a、YALI0F24167g、YALI0C18711g、SCP2[YALI0E01298g]、DGAT2、Pex1p、Pex2p、Pex3p、Pex3Bp

Pex4p、Pex5p、Pex5Bp、Pex5Cp、Pex5/20p、Pex6p、Pex7p、Pex8p、Pex10p、Pex12p、Pex13p、Pex14p、Pex15p、Pex16p、Pex17p、Pex14/17p、Pex18p、Pex19p、Pex20p、Pex21p、Pex21B、Pex22p、Pex22p 样、Pex26p 和 / 或 $\Delta 12$ 去饱和酶。

[0315] 用于外源基因表达的常规表达系统、表达盒、载体和转化

[0316] 含有引导外来蛋白质高水平表达的调控序列的微生物表达系统和表达载体是本领域技术人员熟知的。能使用这些表达系统和表达载体中的任何一种构建编码优选去饱和酶、延伸酶和 CPT1 蛋白的嵌合基因。然后能使用标准转化方法将这些嵌合基因导入解脂耶氏酵母以提供高水平表达的编码酶。

[0317] 可用于转化耶氏酵母属宿主细胞的载体（如构建体、质粒）和 DNA 表达盒是本领域熟知的。存在于构建体中的序列的具体选择取决于所需的表达产物、宿主细胞的性质以及提出的相对于未转化细胞分离转化细胞的手段。然而，通常载体含有至少一个表达盒、选择标记和允许自主复制或染色体整合的序列。合适的表达盒通常包含基因控制转录起始的 5' 区（如启动子）、基因编码序列和控制转录终止的 DNA 片段 3' 区（如终止子）。最优选的是当 2 个控制区都来源于来自转化的宿主细胞的基因，尽管它们无需来源于对生产宿主是天然的基因（例如解脂耶氏酵母）。

[0318] 如果两种或更多种基因从独立的复制载体表达，则希望每个载体具有不同的选择手段并且应该缺乏与其它构建体的同源性以便维持稳定表达和防止元件在构建体之间重配 (reassortment)。可用实验方法确定对调控区、选择手段和所引入的构建体的增殖方法的正确选择，以便所有导入的基因均以需要的水平表达从而提供所需产品的合成。

[0319] 构建体或载体包含受关注的基因，可通过任何标准技术将其导入宿主细胞如耶氏酵母属细胞。这些技术包括转化（如醋酸锂转化 [Methods in Enzymology, 194 : 186-187 (1991)]）、原生质体融合、基因枪轰击 (bolistic impact)、电穿孔、显微注射或将所关注的基因引入宿主细胞中的任何其他方法。本文用于解脂耶氏酵母的较优选方法是基于 DNA 线性片段的整合技术，如美国专利公开 4,880,741 和 5,071,764 以及 Chen, D. C. 等人 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 48(2) :232-235(1997)) 所述。

[0320] 为方便起见，已经通过任何方法操纵来摄取 DNA 序列（如表达盒）的宿主细胞在本文中称为“转化的”、“转化子”、或“重组体”。转化的宿主将具有至少一个拷贝的表达盒，而且可以具有两个或更多个拷贝，这取决于该表达盒是整合进基因组内还是存在于具有多拷贝数的染色体外元件上。转化的宿主细胞可以通过多种选择技术来鉴定，如美国专利 7,238,482 和美国专利 7,259,255 所述。

[0321] 用于本文的优选选择方法是对卡那霉素、潮霉素和氨基糖苷 G418 抗性以及在缺乏尿嘧啶、亮氨酸、赖氨酸、色氨酸或组氨酸的培养基上生长的能力。在另一个实施方案中，5-氟乳清酸 (5-氟尿嘧啶-6-羧酸一水合物；“5-FOA”) 可用于选择酵母 Ura⁻ 突变体。该化合物对酵母细胞具有毒性，酵母细胞具有编码乳清酸核苷 5' - 单磷酸脱羧酶 (OMP 脱羧酶) 的功能性 URA3 基因 (Bartel, P. L. 和 Fields, S., Yeast 2-Hybrid System, Oxford University :New York, 第 7 卷, 第 109-147 页, 1997)。

[0322] 更具体地讲，技术人员可以首先敲除天然 Ura3 基因以产生具有 Ura⁻ 显型的菌株，其中基于 5-FOA 抗性进行选择。然后，可将多个嵌合基因和新的 Ura3 基因整合到耶氏酵母属基因组的不同位点以产生具有 Ura⁺ 显型的新菌株。当敲除导入的 Ura3 基因时，随后的

整合将产生新的 Ura3⁻ 菌株（再次使用 5-FOA 选择进行鉴别）。因此，能将 Ura3 基因（与 5-FOA 选择组合使用）用作多轮转化的选择标记并从而以方便的方式容易地将基因修饰整合进耶氏酵母属基因组。

[0323] 本文利用的备选的优选选择方法依赖于用于解脂耶氏酵母的基于磺酰脲抗性。更具体地讲，该标记基因是具有单个氨基酸改变（W497L）的天然乙酰羟酸合酶（“AHAS”或乙酰乳酸合酶；E. C. 4. 1. 3. 18），从而赋予了磺酰脲除草剂抗性（SEQ ID NO:121；PCT 公开 W02006/052870）。AHAS 是支链氨基酸生物合成途径中最常见的酶并且它是磺酰脲类和咪唑啉酮类除草剂的靶标。

[0324] 本文在耶氏酵母属中利用的用于回收选择标记的附加方法依赖位点特异性重组酶系统。简而言之，位点特异性重组系统由两个元件组成：1) 具有特定 DNA 序列 [例如 LoxP] 的重组位点；和 2) 当两个或更多个重组位点在相同 DNA 分子上以给定间隔取向相同时，特异性结合到 DNA 序列上并催化 DNA 序列间重组（即，切除）的重组酶 [例如 Cre]。该方法可用作选择的一种手段，因为“回收利用”一对优选的选择标记用于多个连续转化是可能的。

[0325] 更具体地讲，制备包含靶基因以及第一选择标记（例如 Ura3、潮霉素磷酸转移酶 [HPT]）的整合构建体，所述靶基因是期望插入耶氏酵母属基因组中的基因（例如去饱和酶、延伸酶、CPT1），所述选择标记通过重组位点侧接。在转化和选择转化体后，通过引入携带第二选择标记（例如 AHAS）的复制型质粒和适用于识别引入基因组中的位点特异性重组位点的重组酶来将第一选择标记从染色体切除。当选择那些携带第二标记的转化子并确认第一选择标记从耶氏酵母属基因组中切除时，然后在不进行选择的情况下从宿主中获取复制质粒。这产生了既不具有第一选择标记又不具有第二选择标记的转化体，因而该去除了质粒的菌株可用于另一轮转化。本领域的技术人员将认识到该方法不受本文所用的特定选择标记或位点特异性重组系统的限制。

[0326] 在解脂耶氏酵母中超表达外源基因

[0327] 本领域的技术人员熟知的一点是仅仅将基因（例如去饱和酶、延伸酶、CPT1）插入克隆载体不确保它能以所需速率、浓度、量等表达。期望操纵许多控制转录、RNA 稳定性、翻译、蛋白质稳定性和位置、氧限制和从宿主细胞分泌的不同遗传元件。更具体地讲，通过改变以下几个方面可控制基因表达：相关转录启动子和终止子序列的性质；所克隆基因的拷贝数目；该基因是质粒携带的还是整合到了宿主细胞的基因组中；所合成的外来蛋白质的最终细胞定位；蛋白质在宿主生物内的翻译效率；所克隆基因的蛋白质在宿主细胞内的固有稳定性；以及所克隆基因中的密码子使用，以使得其频率与宿主细胞的优选密码子使用频率接近。这些超表达的若干个方法将在下文讨论，并且作为超表达例如去饱和酶、延伸酶和 CPT1 蛋白的手段用于重组耶氏酵母属宿主细胞。

[0328] 通过使用更强的启动子（调控型的或组成型的）引起表达增加、通过从 mRNA 或编码蛋白中移除 / 删除去稳定化序列、或通过将稳定序列加到 mRNA（美国专利申请 4, 910, 141）上，能在转录水平上提高所需基因的表达。

[0329] 可用于驱动异源基因或其部分在耶氏酵母属宿主细胞中表达的起始控制区或启动子有很多，并且为本领域技术人员所知。表达能以诱导型或组成型完成。诱导型表达可通过诱导可操作地连接至所关注的基因的可调节启动子的活性来完成，而组成型表达可通过

利用可操作地连接至所关注的基因的组成型启动子来实现。事实上,能够引导去饱和酶、延伸酶和 CPT1 基因在耶氏酵母属中表达的任何启动子(即天然的、合成的或嵌合的启动子)将均是适用的,但来自宿主物种的转录和翻译区是尤其有用的。虽然存在许多能在耶氏酵母属中表达基因的调控序列(例如取决于期望组成型转录还是诱导型转录、启动子在表达所关注的 ORF 中的效率、构建的容易性等),但在优选的实施方案中启动子选自表 6 显示的那些启动子(或它们的衍生物)。在 PCT 公开 WO 2006/052870 中提供了下文启动子的活性比较。

[0330] 表 6

[0331] 用于在解脂耶氏酵母中超表达的优选启动子

[0332]

启动子名称	天然基因	参照序列
GPD	甘油醛-3-磷酸-脱氢酶	美国专利公开 7, 259, 255
GPDIN*	甘油醛-3-磷酸-脱氢酶	专利公布 US 2006/0019297-A1
GPM	磷酸甘油酸变位酶	美国专利公开 7, 259, 255
GPM/FBAIN	磷酸甘油酸变位酶**	美国专利公开 7, 202, 356
FBA	果糖-二磷酸醛缩酶	美国专利公开 7, 202, 356
FBAIN***	果糖-二磷酸醛缩酶	美国专利公开 7, 202, 356
FBAIN _m ****	果糖-二磷酸醛缩酶	美国专利公开 7, 202, 356
GPAT	甘油 3-磷酸 O-酰基转移酶	美国专利公开 7, 264, 949
YAT1	铵转运酶	专利公布 US 2006/0094102-A1
EXP1	输出蛋白	PCT 公开 WO 2006/052870

[0333] *GPDIN 启动子包含一个 GPD 启动子区,加上一部分 5' 编码区,该编码区具有编码甘油醛-3-磷酸-脱氢酶的 gpd 基因的内含子。

[0334] **GPM/FBAIN 启动子是一种嵌合启动子,该启动子包含“GPM 启动子”和 FBAIN 启动子(下文)中包含的内含子的融合。

[0335] ***FBAIN 启动子包含一个 FBA 启动子区,加上一部分 5' 编码区,该编码区具有编码果糖-二磷酸醛缩酶的 fba1 基因的内含子。

[0336] ***FBAINm 启动子指 FBAIN 启动子的修饰版本,其中 FBAINm 具有在 ATG 翻译启动密码子和 FBAIN 启动子的内含子之间的 52bp 删除(因此仅包括 N 末端的 22 个氨基酸),以及在内含子后的新翻译共有基序。此外,虽然 FBAIN 启动子当与表达基因的编码区融合时生成融合蛋白,FBAINm 启动子不生成此类融合蛋白。

[0337] 当然在另一个实施方案中,也能使用来源于表 6 所述的任何启动子区的其它启动子用于在解脂耶氏酵母中的异源表达,以有利于 EPA 在 TAG 和总脂质级分中的高水平生产和积聚。具体地讲,上述任何启动子的长度的改变可能导致突变启动子具有相同的或改变的活性;然而该启动子将仍旧具有驱动耶氏酵母属中基因表达的功能。

[0338] 终止区通常可源于起始区从其获得的基因的 3' 区或来自不同的基因。大量的终止区是已知的并且(在用于与它们源自的属和物种相同和不同的属和物种两者时)在多种宿主中发挥的功能令人满意。终止区的选择通常更多是为了方便而不是因为任何特殊的性质。优选地,终止区来源于酵母基因,尤其是糖酵母属、裂殖糖酵母属、假丝酵母属、耶氏酵母属或克鲁维氏酵母属。编码 γ -干扰素和 α -2 干扰素的哺乳动物基因的 3' 区域也是酵母中功能已知的区域。3' - 区也可以是合成的,因为本领域的技术人员可利用可用的信息来设计和合成用作转录终止子的 3' - 区序列。终止位点可以是非必需的,但是是高度优选的。

[0339] 虽然不意味着受限,在本文公开内容中使用的终止区来源于多种耶氏酵母属天然基因并包括:解脂耶氏酵母细胞外蛋白酶~100bp 的 3' 区域(XPR;GenBank 保藏号 M17741);酰基-coA 氧化酶(Aco3;GenBank 保藏号 AJ001301 和 CAA04661);Pox3;GenBank 保藏号 XP_503244)终止子;Pex20(GenBank 保藏号 AF054613)终止子;Pex16(GenBank 保藏号 U75433)终止子;Lip1(GenBank 保藏号 Z50020)终止子;Lip2(GenBank 保藏号 AJ012632)终止子;和 3-氧酰基-coA 硫解酶(OCT;GenBank 保藏号 X69988)5 终止子。

[0340] 可以将 PUFA 生物合成途径去饱和酶和延伸酶基因和/或 CPT1 基因另外的拷贝(即,一种以上的拷贝)导入解脂耶氏酵母,从而提高 EPA 生产和积聚。具体地讲,另外的基因拷贝可以被克隆到单个表达构建体中;和/或克隆基因另外的拷贝可以通过增加质粒拷贝数或通过克隆基因多次整合进基因组中来导入宿主细胞中(下文)。例如在一个实施方案中,将解脂耶氏酵母菌株(即,菌株 Y4128)工程化以生产按总脂肪酸百分比计大于 37.6% 的 EPA,通过将嵌合基因导入并整合到耶氏酵母属基因组中,所述基因包括:4 拷贝的 $\Delta 9$ 延伸酶、4 拷贝的 $\Delta 8$ 去饱和酶、3 拷贝的 $\Delta 5$ 去饱和酶、3 拷贝的 $\Delta 17$ 去饱和酶、3 拷贝的 $\Delta 12$ 去饱和酶和 1 拷贝的 C16/18 延伸酶。

[0341] 同样地,在另一个实施方案中,将解脂耶氏酵母菌株 Y4305 工程化以生产按总脂肪酸百分比计大于 53.2% 的 EPA,通过将嵌合基因导入并整合到耶氏酵母属基因组中,所述基因包括:7 拷贝的 $\Delta 9$ 延伸酶、7 拷贝的 $\Delta 8$ 去饱和酶、5 拷贝的 $\Delta 5$ 去饱和酶、3 拷贝的 $\Delta 17$ 去饱和酶、5 拷贝的 $\Delta 12$ 去饱和酶、3 拷贝的 C16/18 延伸酶和 2 拷贝的二酰基甘油胆碱磷酸转移酶(CPT1)。

[0342] 重要的是注意到当按照本文方法制备最优化的解脂耶氏酵母菌株时,常常涉及多个去饱和酶、延伸酶、和 CPT1 的拷贝。例如如果需要 2 拷贝的 $\Delta 9$ 延伸酶,这可能涉及:1) 分离自单个菌种的特定 $\Delta 9$ 延伸酶的两拷贝的相同编码序列;或,2) 分离自菌种“A”的 $\Delta 9$ 延伸酶的一种编码序列和分离自菌种“B”的 $\Delta 9$ 延伸酶的一种编码序列,因此一共产生两

种 $\Delta 9$ 延伸酶。

[0343] 一般来讲,一旦已经获得适用于在含油酵母中表达的 DNA 盒(例如包含启动子、ORF 和终止子的嵌合基因),则将其置于能够在宿主细胞中自主复制的质粒载体中,或将其直接整合进宿主细胞的基因组中。表达盒的整合可以在宿主基因组中随机地发生或者可以通过使用这样的构建体来靶向,即该构建体含有足以靶向宿主基因座中的重组的与宿主基因组同源的区。虽然不依赖本文,如果构建体靶向内源性基因座,则转录和翻译调控区的全部或某些可以由内源性基因座提供。

[0344] 在解脂耶氏酵母中表达基因的优选方法是通过将线性 DNA 片段整合到宿主基因组中;当期望基因高水平表达时,整合到基因组中的多个位置可以是尤其有用的为此目的,希望鉴定在基因组中以多拷贝存在的序列,如 Ylt1 和 solo zeta 元件,这些序列以分散方式遍布于一些解脂耶氏酵母菌株的基因组中,它们为至少 35 个拷贝/基因组和 50-60 个拷贝/基因组(Schmid-Berger 等人, J. Bact., 176(9):2477-2482(1994))。然而遗憾的是,不是所有解脂耶氏酵母菌株都具有 zeta 区域(例如 ATCC #20362 菌株)。当菌株缺乏此类区域时,将包含表达盒的线性 DNA 片段整合进替代位点以达到所需拷贝数也是可能的。例如,优选的替代位点包括:Ura3 位点(GenBank 保藏号 AJ306421)、Leu2 基因位点(GenBank 保藏号 AF260230)、Lys5 基因位点(GenBank 保藏号 M34929)、Aco2 基因位点(GenBank 保藏号 AJ001300)、Pox3 基因位点(Pox3:GenBank 保藏号 XP_503244;或 Aco3:GenBank 保藏号 AJ001301)、 $\Delta 12$ 去饱和酶基因位点(美国专利公开 7,214,491)、Lip1 基因位点(GenBank 保藏号 Z50020)和/或 Lip2 基因位点(GenBank 保藏号 AJ012632)。在另一个实施方案中,如前文所述 Pox1、Pox4、Pox5、Lip3、Lip4a、YALI0F24167g、YALI0C18711g、SCP2[YALI0E01298g]、DGAT2、Pex1p、Pex2p、Pex3p、Pex3Bp、Pex4p、Pex5p、Pex5Bp、Pex5Cp、Pex5/20p、Pex6p、Pex7p、Pex8p、Pex10p、Pex12p、Pex13p、Pex14p、Pex15p、Pex16p、Pex17p、Pex14/17p、Pex18p、Pex19p、Pex20p、Pex21p、Pex21B、Pex22p、Pex22p 样、Pex26p 和 $\Delta 12$ 去饱和酶基因位点可用于构建体整合。

[0345] Juretzek 等人(Yeast, 18:97-113(2001))提出在解脂耶氏酵母中的整合 DNA 片段的稳定性取决于单个转化子、受体菌株和所用的靶向平台。因此,技术人员将认识到必须筛选多个转化子以获取显示所需表达水平和、调节和模式的菌株或植物品系。这种筛选可以通过 DNA 印迹的 Southern 分析(Southern, J. Mol. Biol., 98:503(1975))、mRNA 表达的 Northern 分析(Kroczeck, J. Chromatogr. Biomed. Appl., 618(1-2):133-145(1993))、蛋白质表达的 Western 分析、PUFA 产物的表型分析或 GC 分析来完成。

[0346] EPA 生产的发酵过程

[0347] 转化过的微生物宿主细胞在能最优化嵌合酶基因(例如编码去饱和酶、延伸酶、CPT1 等的基因)表达的条件下增殖,产生最大的和最经济的 PUFA 产量。通常,可通过改变碳源的类型和量、氮源的类型和量、碳氮比、不同矿物离子的量、氧水平、生长温度、pH、生物量生产期的时长、油积聚期的时长以及细胞收获的时间和条件优化培养基条件。解脂耶氏酵母通常生长在复合培养基(如酵母提取物-蛋白胨-葡萄糖液体培养基(YPD))或缺乏生长所必需的成分并由此强迫选择所需表达盒的确定成分的极限培养基中(如 Yeast Nitrogen Base(DIFCO Laboratories, Detroit, MI))。

[0348] 用于本文所述方法和宿主细胞的发酵培养基必须包含合适的碳源如在美国专利

7, 238, 482 中提出的碳源。尽管预期本发明中利用的碳源可以涵盖许多种含碳源,但优选的碳源是糖类、甘油和 / 或脂肪酸。最优选的碳源是葡萄糖和 / 或包含介于 10-22 个碳之间的脂肪酸。

[0349] 氮可以由无机源 (如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 或有机源 (如尿素或谷氨酸) 提供。除了合适的碳源和氮源,发酵培养基还必须含有合适的矿物质、盐、辅因子、缓冲液、维生素和本领域技术人员已知的适合高水平 EPA 生产的含油酵母生长并促进 EPA 产生的酶促途径的其它组分。要特别注意促进脂质和 PUFA 合成的几种金属离子 (如 Fe^{+2} 、 Cu^{+2} 、 Mn^{+2} 、 Co^{+2} 、 Zn^{+2} 和 Mg^{+2}) (Nakahara, T. 等人, Ind. Appl. Single Cell Oils, D. J. Kyle 和 R. Colin (编辑). 第 61-97 页 (1992))。

[0350] 用于本文所述方法和宿主细胞的优选生长培养基是常规的商业制备培养基,如酵母氮源培养基 (Yeast Nitrogen Base, DIFCO Laboratories, Detroit, MI)。也可以使用其它确定成分的生长培养基或合成的生长培养基,且适于解脂耶氏酵母生长的培养基对微生物学或发酵科学领域的技术人员来说将是已知的。适于发酵的 pH 范围通常介于约 pH4.0 至 pH8.0 之间,其中优选将 pH5.5 至 pH7.5 作为初始生长条件的范围。发酵可以在有氧或厌氧条件下进行,其中优选为微好氧条件。

[0351] 通常,在含油酵母细胞中积聚高水平的 PUFA 需要两个阶段的过程,因为代谢状态必须在生长和脂肪的合成 / 贮存之间达到“平衡”。因此,最优选的是,两个阶段的发酵过程是在解脂耶氏酵母中产生 EPA 所必需的。这种方法在美国专利 7, 238, 482 中有所描述,其也描述了多种合适的发酵工艺设计 (即分批式、补料分批式和连续式) 和生长过程中的注意事项。

[0352] EPA 纯化和处理

[0353] 在本文的一些方面中,主要产品是含油酵母生物质。同样地,从生物质中分离和纯化包含 EPA 的油可能是不必要的 (即,其中全细胞生物质是产品)。

[0354] 然而,某些最终用途和 / 或产品形式可能需要来自生物质的部分和 / 或全部分离 / 纯化的包含 EPA 的油,以产生部分纯化的生物质、纯化油、和 / 或纯化 EPA。包括 EPA 在内的 PUFA 可以游离脂肪酸或酯化形式如酰基甘油、磷脂、硫脂或糖脂形式存在于宿主生物 (例如耶氏酵母属) 中。这些脂肪酸可通过本领域熟知的多种方法从宿主细胞中提取。关于酵母脂质的提取技术、质量分析和可接受标准的一篇综述是 Z. Jacobs (Critical Reviews in Biotechnology, 12 (5/6) :463-491 (1992)) 的综述。有关下游加工的简述也可由 A. Singh 和 O. Ward (Adv. Appl. Microbiol., 45 :271-312 (1997))。

[0355] 一般来讲,用于纯化来自耶氏酵母属生物质的 EPA 和其它 PUFA 的手段可包括用有机溶剂萃取 (例如美国专利 6, 797, 303 和美国专利 5, 648, 564)、超声处理、超临界流体萃取 (如使用二氧化碳)、皂化和物理手段例如挤压、珠粒打浆机或它们的组合。另外的详细信息可参考美国专利 7, 238, 482 的教导内容。

[0356] 包含已经精炼过的和 / 或纯化过的 EPA 的油可被氢化,从而产生具有多种熔炼特性和质地的脂肪。多种经加工的脂肪 (包括涂脂、糖脂、硬黄油、人造黄油、烘焙起酥油等) 需要室温下不同的硬度,并且仅能通过改变来源油的物理特性来制备。这最普遍地通过催化氢化完成 (参见 PCT 公开 WO 2006/052870 以获得另外的细节和参考内容)。

[0357] 使用包含 EPA 的组合物

[0358] 本文提供包含具有 EPA 的含油酵母生物质的食品、婴儿代乳品、功能性食物、医疗食物、医疗营养品、饮食补充剂、药物组合物、动物饲料、和个人护理产品。同样地,也提供包含具有分离自重组含油酵母生物质的 EPA 的 EPA 或微生物油的食物、婴儿代乳品、饮食补充剂、药物组合物、动物饲料、和个人护理产品。

[0359] 食物加工和食物配制领域的技术人员将了解生物质、部分纯化生物质、纯化油、和 / 或纯化 EPA 的量和组成是如何根据目的物种和 / 或最终用途加入特定产品中的。更具体地讲,“有效”量将被掺入产品制剂,然而该量将取决于食物或饲料产品、期望补充该产品的膳食或医疗食物或医疗营养品打算纠正或治疗的医学状况。最期望地是有效量的 EPA 将足以提供与 ω -3/ ω -6 PUFA 消耗相关的期望健康特性。举例来说,通常掺入产品的 EPA 量考虑了与加工条件、一般处理和贮藏条件、EPA 在产品中的稳定性、以及目的物种的生物利用 / 生物吸收效率相关的损失。

[0360] 加工和配制领域的技术人员将熟悉浓缩从本文所述的重组耶氏酵母属生产宿主细胞中生产的油、从而提高 EPA 在总脂质级分中的浓度的方法,该方法使得它包含至少约 60%,至少约 70%,至少约 80%或甚至至少约 90%的 EPA。本领域的技术人员也熟知混合本文所述的纯化油与其它纯化脂肪酸(例如 LA、GLA、EDA、DGLA、ARA、DTA、DPAn-6、ALA、STA、ETrA、ETA、DPA 和 DHA)、或包含优选浓度的替代脂肪酸的油的方法。这些技术使得能够制备包含独特定制的脂肪特征的油。

[0361] 个人护理产品:在个人护理产品的上下文中, ω -3 脂肪酸在护肤制剂中具有特别的应用,其中它们可用于提高皮肤调理的效果。技术人员应当了解如何提供有效量的有关 ω -3 脂肪酸或包含与护肤组合物相同组分的油。除了 PUFA 油或 ω -3 脂肪酸之外,护肤组合物还可包含护肤组合物的美容上可接受的介质,其实例描述于 Philippe 等人的美国专利公开 6,280,747 中。例如,美容上可接受的介质可以是无水组合物,该组合物包含的脂肪物质比例一般为按重量计约 10%至约 90%(相对于组合物总重),其中的脂相包含至少一种液体、固体或半固体脂肪物质。脂肪物质包括但不限于油、蜡、树胶、和所谓的糊状脂肪物质。作为另外一种选择,组合物可以是稳定的分散体形式如油包水或水包油乳液。此外,组合物可包含一种或多种常规化妆品或护肤添加剂或辅剂,包括但不限于抗氧化剂、防腐剂、填料、表面活性剂、UVA 和 / 或 UVB 防晒剂、芳香剂、增稠剂、润湿剂和阴离子、非离子或两性聚合物、以及染料。

[0362] 食品:市场目前支持各种掺入了 ω -3 和 / 或 ω -6 脂肪酸(尤其是 LA、GLA、ARA、EPA、DPA 和 DHA)的食物和饲料产品。预期本文所述的酵母生物质、部分纯化的生物质、纯化油、和 / 或纯化 EPA 将在食品中发挥功能以赋予本发明制剂的健康有益效果。

[0363] 本文所述的酵母宿主生产的耶氏酵母属生物质、部分纯化的生物质、纯化油、和 / 或纯化 EPA 将适用于多种食品,包括但不限于:食物类似物、饮料、肉类产品、谷类食品、烘焙食物、小吃食物和乳类产品。

[0364] 食物类似物能使用本领域技术人员熟知的方法制备。提到的有肉类类似物、干酪类似物、乳品类似物等。由大豆制成的肉类类似物包含大豆蛋白或豆腐以及其它成分,混合在一起以模拟各种肉类。这些肉类替代物以冷冻、罐头或干燥食品的形式销售。通常使用它们的方法与它们替代的食品相同。肉类类似物的实例包括但不限于:火腿类似物、香肠类似物、熏肉类类似物等。

[0365] 取决于食品类似物的功能和组成特性,可将它们分成仿造品或替代品。例如,仿造干酪仅需类似它设计替代的干酪。然而,仅仅假如一种产品的营养等同于它替代的干酪并符合干酪的最低组成要求时,才能将其称之为替代干酪。因此,替代干酪将通常具有比仿造干酪更高的蛋白水平,并用维生素和矿物质进行强化。

[0366] 乳品类似物或非乳品食品包括但不限于:仿造乳品和非乳品冷冻甜点(例如那些由大豆和/或大豆蛋白产品制成的食品)。

[0367] 肉类产品包括多种产品。在美国“肉类”包括产自牛、猪和羊的“红肉”。除了红肉之外还有家禽类肉产品,包括鸡、火鸡、鹅、珠鸡、鸭和鱼以及贝类。调味和加工肉制品有多种类别:新鲜的、腌制的和油炸的、以及腌制的和煮熟的。肠和热狗是加工肉制品的实例。因此,如本文所用,术语“肉类产品”包括但不限于加工肉制品产品。

[0368] 谷类食品是来自谷物加工的食物。谷物包括来自生产可食用谷物(种子)的草本植物家族的任何植物。最常见的谷物是大麦、玉米、小米、燕麦、奎奴亚藜、大米、裸麦、高粱、黑小麦、小麦和野生稻。

[0369] 谷类食品的实例包括但不限于:整谷粒、粉碎谷粒、粗磨粉、面粉、麸皮、胚芽、早餐谷类食物、挤出食物、意大利面食等。

[0370] 烘焙食品包括上文提到的任何谷类食物并已被烘焙或用类似于烘焙的方法进行加工(即,通过受热进行干燥或硬化)。烘焙食品的实例包括但不限于:面包、粉饼、油炸圈饼、巴、意大利面食、面包瓢、烘焙小吃、小点心、小薄脆饼干、小饼干、和小脆饼干。如上文所述,来自重组 EPA 生产宿主细胞的油可用作一种成分。

[0371] 小吃食品包括上文或下文所述的任何食物。

[0372] 油炸食品包括上文或下文所述的任何油炸食物。

[0373] 饮料可以是液体或干粉形式。例如,提到了:非碳酸盐饮料;新鲜的、冷冻的、罐装的或浓缩的果汁;调味奶或原奶饮料等等。成人和婴儿营养代乳品是本领域熟知的和可商购获得的(例如 Similac[®]、Ensure[®]、Jevity[®]、和 Alimentum[®],来自 Ross Products Division, Abbott Laboratories)。

[0374] 乳品产品是来源于乳品的产品。乳品类似物或非乳品产品来源于除乳品之外的其它来源,例如上文讨论的豆奶。这些产品包括但不限于:全脂乳、脱脂乳、发酵乳产品如酸奶或酸乳、奶油、黄油、炼乳、奶粉、咖啡增白剂、咖啡伴侣、冰淇淋、干酪等。

[0375] 其中有耶氏酵母属生物物质、部分纯化生物物质、纯化油、和/或纯化 EPA 的附加食品可包括例如:口香糖、糖果盒白糖、明胶和布丁、硬糖和软糖、果酱和凝胶剂、白砂糖、糖替代品、甜沙司、浇头和糖浆、以及干混粉末混合物。

[0376] 婴儿代乳品:婴儿代乳品是喂给婴儿或儿童的液体或再生粉末。本文将“婴儿代乳品”定义为肠营养产品,它能取代人母乳来喂养婴儿并通常由所需百分比的脂肪与所需百分比的碳水化合物及蛋白质在水溶液中混合组成(例如参见美国专利公开 4,670,285)。根据世界范围内的组合物研究,以及专家组指出的水平,平均人母乳通常包含约 0.20%至 0.40%的总脂肪酸(约占 50%的来自脂肪的卡路里);并且一般 DHA 对 ARA 的比率在约 1:1 至 1:2 的范围内(参见例如来自 Enfamil LIPIL[™][Mead Johnson & Company] 和 Similac Advance[™][Ross Products Division, Abbott Laboratories] 的制剂)。婴儿代乳品在婴儿饮食中起到特殊作用,因为它们经常是婴儿唯一的营养来源。虽然母乳仍旧是婴

儿最好的食物,但婴儿代乳品足以成为使婴儿不仅存活而且健康成长的第二食品。

[0377] 健康食品和药品:本发明的生物质、部分纯化生物质、纯化油、和/或纯化EPA可用于制剂以赋予健康食品健康有益效果,包括功能性食品、医疗食物、医疗营养品和饮食补充剂。此外,本发明的耶氏酵母属生物质、部分纯化生物质、纯化油、和/或纯化EPA可用于标准药物组合物。能将本发明的解脂耶氏酵母工程化菌株或由此制备的包含EPA的微生物油轻易地掺入上文提到的任何食品以制备例如功能性食品或医疗食物。例如包括EPA的更高浓度的制剂包括胶囊、粉末、片剂、软凝胶、胶囊锭、液体浓缩物和乳液,它们能在人或除人之外的动物中用作饮食补充剂。

[0378] 动物饲料产品:动物饲料本文一般定义为旨在用作饲料或混入饲料的产品,用于除人之外的动物。本文所述的耶氏酵母属生物质、部分纯化生物质、纯化油、和/或纯化EPA可用作多种动物饲料的成分。

[0379] 更具体地讲,尽管不受本文的限制,期望来自重组耶氏酵母属宿主细胞的EPA能用于宠物食品、反刍动物和家禽食品以及水产养殖食品。宠物食品是那些旨在饲喂给宠物(例如狗、猫、鸟类、爬行动物、和啮齿动物)的食物。这些产品可包括上文的谷类和健康食物、以及肉类和肉类副产品、大豆蛋白产品、草和干草产品(例如苜蓿、梯牧草、燕麦或雀麦草、蔬菜)。反刍动物和家禽食品是那些旨在饲喂给动物(例如火鸡、鸡、牛、和猪)的食物。关于上文的宠物食物,这些产品可包括上文列出的谷类和健康食物、大豆蛋白产品、肉类和肉类副产品、以及草和干草产品。水产养殖食品(或“水产品饲料”)是那些旨在用于水产养殖场的食物,即,关于在淡水或海水中繁殖、饲养、或养殖水生生物和/或动物的食物。

[0380] 预期本发明的生产高浓度EPA的工程化解脂耶氏酵母菌株在动物饲料制剂中将是尤其有用的。除了提供必需的 ω -3PUFA之外,酵母本身是有用的蛋白和其它营养物质来源(例如维生素、矿物质、核酸、络合碳水化合物等),它能有助于动物的总体健康状态和营养,以及提高制剂的口味。因此预期加入包含重组耶氏酵母属生产宿主的酵母生物质将是动物饲料制剂中的饲料营养物质的优异附加来源。更具体地讲,解脂耶氏酵母(ATCC #20362)基因按相对于干细胞重量的百分比计大约具有以下化学组合物:35%蛋白、40%脂质、10%碳水化合物、5%核酸、5%灰分和5%水分。此外,在碳水化合物级分中包含大约45.6mg/g β -葡聚糖、大约11.4mg/g 甘露聚糖、和大约52.6mg/g 甲壳质(而海藻糖是最少的组分[大约0.7mg/g])。

[0381] 已有相当多的文献检查了 β -葡聚糖、甘露聚糖和甲壳质的免疫调节效应(参见PCT公开WO 2006/052870)。基于解脂耶氏酵母的特有蛋白:脂质:碳水化合物组合物以及特有络合碳水化合物特征(包含大约1:4:4.6比率的甘露聚糖 β -葡聚糖:甲壳质),预期本文所述的遗传工程化酵母细胞(或其部分)将是对动物饲料制剂有用的添加剂。这可通过例如加入全[冻干]酵母细胞、纯化细胞壁、纯化酵母碳水化合物或多个其它部分发生。

[0382] 在水产养殖中,随着对不同鱼类的营养需求的了解增加和饲料制造业中的技术进步,已经发展并使用制造的或人工的饮食(配制饲料)来补充或替代天然饲料。然而一般来讲,在用于鱼类的水产养殖饲料中包括的不同营养物质的一般比例包括(对干燥饮食的百分比):32-45%的蛋白,428%的脂肪(其中至少有1-2%的 ω -3和/或 ω -6PUFA),10-30%的碳水化合物,1.0-2.5%的矿物质和1.0-2.5%的维生素。制剂中可任选地加入多

种其它成分。这些成分包括：1) 类胡萝卜素，它尤其适用于鲑鱼和观赏的“水族柜”鱼，分别用以促进肉和皮肤的着色；2) 粘合剂，它用于提供饲料小丸的稳定性并减少将营养物质过滤到水中（例如牛心、淀粉、纤维素果胶、胶质、阿拉伯树胶、刺槐菜豆、琼脂、卡拉胶和其它海藻酸盐）；3) 防腐剂如抗微生物剂和抗氧化剂，用于延长鱼食的储存寿命并减少脂肪的臭味（例如维生素 E、丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、乙氧喹啉以及丙酸、苯甲酸或山梨酸的钠盐和钾盐）；4) 化学吸引剂和调味剂，用于提高饲料的适口性及其摄取；和 5) 其它饲料成分。这些其它饲料成分能够包括以下物质：如纤维和灰分，它们用作填料并分别用作钙源和磷源，以及植物性物质和 / 或鱼粉或鱿鱼粉（例如活的、冷冻的、或干燥的藻类、盐水虾、轮虫或其它浮游生物），它们用于提高鱼食的营养价值并提高它的接受度。Nutrient Requirements of Fish(National Research Council, National Academy:Washington D. C., 1993) 提供了对鱼类的基本营养物质和不同成分的营养成分的详细描述。

[0383] 水产饲料制剂的制造商需要考虑多种因素，因为完整饮食必须是营养平衡的、可口的、水稳定的、并且具有合适的大小和质地。关于水产饲料的营养物质组合可以参考：Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds(Hertrampf, J.W. 和 F. Piedad-Pascual. Kluwer Academic :Dordrecht, The Netherlands, 2000) 和 Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp(Tacon, A. G. J. Argent Laboratories :Redmond, 1990)。一般来讲，将饲料配制成干的（即，最终含水量为 610%），半湿的（即，35-40%的含水量）或湿的（即，50-70%的含水量）。干饲料包括以下形式：干燥成分的简单松散混合物（即，“捣碎品”或“粗粉”）；压缩小丸、胶粒或颗粒；和薄片。根据鱼的饲喂需求，能将小丸制成沉于水的或浮于水的。半湿饲料和湿饲料由单一成分或混合成分制成，例如杂鱼或煮熟的豆类，并且能被制成饼状或球状。

[0384] 然后清楚地是本发明的生产高浓度 EPA 的工程化解脂耶氏酵母菌株在大多数水产品饲料制剂中将是尤其有用的。除了提供必需的 ω -3 和 / 或 ω -6PUFA 之外，酵母本身是一种有用的蛋白来源，它能提高制剂的适口性。在替代实施方案中，能将由本发明的解脂耶氏酵母菌株制备的油经过从细胞群中提取并纯化后直接加入水产品饲料制剂中。

[0385] 由补充 EPA 引起的临床健康有益效果

[0386] 虽然 EPA 饮食补充剂已经显示可用于降低血清胆固醇和甘油三酸酯，并且对例如对冠心病、高血压、炎性病症（例如类风湿性关节炎）、肺病和肾病、II 型糖尿病、肥胖症、溃疡性结肠炎、克隆氏病、神经性厌食症、烧伤、骨关节炎、骨质疏松、注意力缺乏 / 多动症、早期结直肠癌和精神失常（例如精神分裂症）具有有益功效（参见例如 McCol1, J., NutraCos, 2(4) :35-40(2003) ;Sinclair, A. 等人 In Healthful Lipids ;C. C. Akoh and O. -M. Lai, 编辑 ;AOCS :Champaign, IL(2005), Chapter16), 但是仍未阐明这些临床观察的分子和生物化学机制。要注意的是，许多过去的研究不能识别代谢上和功能上彼此不同的单个长链 ω -3 脂肪酸（例如 EPA 和 DHA），因此每种脂肪酸可具有特异的生理机能。这种机制上的不了解很大程度上是使用鱼油作 PUFA 源的结果，与之相反的是在临床研究中使用的纯 EPA 或纯 DHA[例如来自鲱鱼、鳕鱼肝脏、沙丁鱼和凤尾鱼的油的脂肪酸组合物包含的油具有大约 0.9 : 1 至 1.6 : 1 的 EPA : DHA 比率（基于在 The Lipid Handbook, 第 2 版 ; F. D. Gunstone, J. L. Harwood 和 F. B. Padley, 编辑 ;Chapman 和 Hall, 1994) 中的数据]。虽然如此，逐渐认识到 EPA 本质上是一种重要的 ω -3 脂肪酸。因此，本文期望本文所述的重

组耶氏酵母属生产宿主的富含 EPA 的油将在多种治疗应用中具有非常广泛的用途,例如炎症、心血管病、基因表达的营养物质调节和血脂异常,并且具体地讲应用于治疗临床状况,包括:冠心病、高血压、炎性病症、II 型糖尿病、溃疡性结肠炎、克隆氏病、神经性厌食症、烧伤、骨关节炎、骨质疏松、和注意力缺乏 / 多动症。

[0387] 虽然涉及这些应用的每一种的下述结果基于临床上对人类的研究,这不应理解为限制性的;具体地讲,申请人预见使用富含 EPA 的油治疗多种其它动物的相似健康问题(例如家养宠物、反刍动物、家禽、鱼等)。

[0388] EPA 和炎症:已经提出了许多生物化学机制解释鱼油的抗炎特性。当前的一个流行机制提出 ω -3 脂肪酸减少在炎性细胞膜中的 ω -6 脂肪酸量并抑制 ω -6 脂肪酸代谢,该脂肪酸能够合成来源于 ω -6 脂肪酸的促炎介质(例如前列腺素系列 2 和白三烯系列 4)。此外, ω -3 脂肪酸产生强炎性调节剂(例如前列腺素系列 3 和白三烯系列 5)。然而,近来的研究已经鉴定了一个新的脂质抗炎调节剂家族,称为 resolvin(“resolution phase interaction product”),它们在低纳摩尔范围内的生物活性指示它们是非常强的抗炎调节剂。在该家族中有 EPA 来源的 resolvin(即, E 系列 resolvin 或“RvE”)和 DHA 来源的 resolvin(即, D 系列 resolvin 或“RvD”)(参见 Serhan, C. N., *Pharma. & Therapeutics*, 105:7-21(2005))。RvE1(5S,12R,18R-三羟基-6Z,8E,10E,14Z,16E-EPA)的不同作用在 Arita, M. 等人 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(21):7671-7676(2005)) 中证明,提供了可形成 EPA 对人类健康和疾病起到一些有益作用的基础的机制证据。

[0389] 这一新生物学发现强调了富含 EPA 的产品对炎性过程的营养和医学管理的潜在用途。此外,因为炎症导致从心血管病到代谢系统疾病(例如代谢综合征 X、肥胖症、糖尿病)、到神经系统疾病(例如阿尔茨海默病)范围的许多疾病,期望富含 EPA 的油(如本文所述的那些油)将具有非常广泛的用途。期望的医疗用途可来源于:1) 使用 EPA 或 RvEs 作医疗食物中的生物活性成分;和 / 或,2) 将 EPA 加入非处方或处方药物作治疗助剂。最后, EPA 可作为合成 RvEs 的前体和医药优化的新化学个体。

[0390] EPA 和心血管病:鱼油及其相关 ω -3 脂肪酸在心血管病的二次预防管理中已经显示出相当强的心肌保护能力(即,受试者已经出现心血管症状或者受试者已经患过心血管疾病)。然而与这些研究的光明前景同样的是,它们留下了许多未答复的关键问题;要注意的是, EPA 对 DHA 的相对重要性和这些脂肪酸在初次预防中的功效[例如对以下情况的患者:1) 无心肌梗塞或心绞痛病史并且无血管成形 / 支架植入以及无冠状动脉搭桥的患者;和 2) 临床不显示心绞痛或心电图异常的患者]。

[0391] 日本 EPA 脂质干预研究(Japanese EPA Lipid Intervention Study,“JELIS”)致力于在大规模随机对照试验中解决这些问题,使用 > 98% 的纯化 EPA-乙酯与斯达汀的组合(Yokoyama, M. 和 H. Origasa, *Amer. Heart J.*, 146:613-620(2003);Yokoyama, M. 等人, *Lancet*, 369:1090-1098(2007))。如同预测的那样,作者发现接受 EPA 加斯达汀的患者的心血管事件相对于那些只接受斯达汀的患者减少了 19%。这为了 EPA 本质上是心肌保护性的提供了强力支持,因此有助于开放富含 EPA 的油的市場。它也提供了将 EPA/resolvin 型混合物与斯达汀组合的机会,和 / 或提供了将来源于本文所述的重组耶氏酵母属的油用作高纯度来源的 EPA 生产 EPA-乙酯药物的机会,该药物目前来源于鱼油并从鱼油中制造(例如来自 Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan 的 EPADEL)。

[0392] 长期以来已经确定 C- 反应蛋白 (CRP) 是用于跟踪不同炎症状况和代谢状况的有用的生物标记,例如心血管代谢疾病(例如代谢综合症、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝病、糖尿病前状况如“胰岛素抵抗”,糖尿病)、神经行为状况(例如阿尔茨海默病、注意力缺乏/多动症、抑郁症、双极情感障碍、精神分裂症、产后抑郁症、绝经后失调、例如热潮红)、炎症病症如结肠炎、克隆氏病、肠易激综合症、和 resolvin 相关的病症,其中提高的血清 CRP 浓度与疾病风险提高有关(N. Engl. J. Med., 343(7):512(2000); Diabetes Care, 28:878-881(2005); Digestive and Liver Disease, 40(3):194-199(2008); Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 32(6):1008-1024(2007); American Journal of Physiology, 294(1, Pt. 1):G27-G38(2008); Progress in Nutrition, 9(2):124-133(2007); Nutrients, Stress, and Medical Disorders, 317-324(2006). Editor(s): Yehuda, Shlomo; Mostofsky, David I. Publisher: Humana Press Inc., Totowa, NJ)。提出并详细描述了用于测试 C- 反应蛋白血清浓度的方法。许多研究已经得出结论:施用 ω -3 脂肪酸能够与 C- 反应蛋白的血清水平减少相关联(Nutrition Research (New York, NY, United States), 28(5):309-314(2008); Journal of Biological Sciences (Faisalabad, Pakistan), 7(8):1368-1374(2007); Nephrology, Dialysis, Transplantation, 22(12):3561-3567(2007))。因此,经由施用本文所述的可消耗形式(其中治疗临床状况或减少 C- 反应蛋白)的重组微生物油提供用于治疗临床状况(如那些上文提到的状况)的方法以及用于减少 C- 反应蛋白血清水平的方法在本发明的范围内。

[0393] ω -3PUFA 和营养物质调节基因表达:这是为人们熟知的:长链 ω -3 PUFA 具有推动分配的功能,它能够引导:1) 葡萄糖从脂肪酸生物合成转向糖原贮藏;和 2) 脂肪酸从甘油三酸酯合成转向氧化。这一再分配的净效应是减少循环的甘油三酸酯并且在一些菌种中减少脂肪沉积。有增加的科学证据证明这些长链 ω -3 PUFA 对代谢发挥效应的分子机制是不同配体活化的转录因子相互作用的结果,所述转录因子继而调控基因表达。

[0394] 迄今通过脂肪酸调控的基因转录似乎是由于至少 4 个转录因子家族活性或丰度的改变:PPAR(过氧化物酶体增殖物活化受体)、LXR(肝脏 x 受体)、HNF-4 α (肝细胞核因子 4)和 SREBP(固醇调节元件结合蛋白)(参见 Clarke, S. D., J. Nutr., 131(4):1129-1132(2001)和 Curr. Opin. Lipidology, 15:13-18(2004); Pegorier, J.-P. 等人, J. Nutr., 134:2444S-2449S(2004))。例如这种相互作用,据信 EPA 在肝脏中通过活化 PPAR α 降低血清甘油三酸酯;并且它的一些抗炎活性(尤其是在血管壁水平上)也可通过动脉巨噬细胞中的 PPAR 生物调节。

[0395] 对脂肪酸控制特异基因表达机制的了解可提供发展新治疗策略的方向,所述治疗策略用于更好地管理全身脂质代谢并控制甘油三酸酯和胆固醇血清水平、冠心病和其它慢性病的确定的风险因素。同样地,期望未来的研究将会知道 EPA 对 DHA 作为营养物质-基因相互作用的调节子,在保持并促进最佳人类健康过程中起到的作用的差别。

[0396] ω -3 PUFA 和血脂异常:已经常常将摄取鱼油与低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇的轻度增加联系起来,这是导致心脏病风险增加的不利事件。Theobald, H. E. 等人近来的研究(Amer. J. Clinical Nutrition, 79:558-563(2004))提出该 LDL 胆固醇升高可能实际上是由 DHA(与 EPA 相反)引起。具体地讲,在 3 个月中每日摄取~0.7g DHA 将中年男人和妇女的 LDL 胆固醇提高 7%;相比之下,使用纯化 EPA 或富含 EPA 的油的研究已经一般不报

道 LDL 胆固醇的类似增加 (Harris, W. S., Amer. J. Clinical Nutrition, 65 (Supplement) : 1645S-1654S (1997))。虽然需要进一步研究以阐明由低剂量 DHA 导致的 LDL 胆固醇提高的原因, 本发明富含 EPA、不包含 DHA 的油的效用可能潜在具有显著的临床优势。

[0397] 虽然期望纯化本文所述的重组微生物油以生产包含相对纯的 EPA 的油, 但是在替代实施方案中, 使用富集 EPA 和至少一种其它 PUFA 的最终油产品可能具有观察得到的优势。例如, 证据指示补充 EPA 和 GLA 的组合可对血清脂质产生有利影响。具体地讲, M. Laidlaw 和 B. J. Holub (Amer. J. Clinical Nutrition, 77 : 37-42 (2003)) 报道了包含 EPA 和 DHA (总计 4g) 以及 GLA (2g) 的混合物的每日补充剂, 该补充剂经过 28 天有利地改变了健康妇女的血液脂质和脂肪酸特征。在接受 EPA、DHA 和 GLA 的那些患者中, 除了将患者的 LDL 胆固醇减少 11.3% 之外, 还将计算的心肌梗塞 10 年风险减少了 43%。因此, 加入 GLA 抵消了 EPA 和 DHA 引起 LDL 胆固醇轻微升高的趋势 (Theobald 等人, 同上)。合在一起, Laidlaw 和 Holub 以及 Theobald 等人进行的研究可证明富含 EPA 和 GLA 但是不含 DHA 的油的临床有益效果。

[0398] GLA 和 EPA 补充剂组合的用途也已经作为减少或抗慢性炎症的手段被广泛普及, 因为它涉及疾病如关节炎、糖尿病和心脏病 (F. Chilton 和 L. Tucker, Inflammation Nation: The First Clinically Proven Eating Plan to End Our Nation's Secret Epidemic. Fireside Books)。具体地讲, 虽然 GLA 补充以前显示能减少生成的炎症脂质调节剂并减轻慢性炎症病症的临床症状 (例如类风湿性关节炎), 但是也已知补充钙相同脂肪酸会引起血清 ARA 水平的显著增加, 这是一种具有潜在危害的副作用。这些双重效应的基本原理据信是由于在肝脏中存在 $\Delta 5$ 去饱和酶活性, 它能够将基本的 $\omega-6$ 脂肪酸 LA 完全转化成 ARA (经由 $\omega-6$ $\Delta 6$ 去饱和酶 $\Delta 6$ 延伸酶途径并通过 GLA 和 DGLA 中间体), 然而炎症细胞如嗜中性粒细胞缺少将 DGLA 转化成 ARA 的代谢能力。因此假设 EPA 共补充将阻止在肝脏中合成 ARA, 然而能够合成 DGLA。该原则的临床证据在人类饮食研究中由 J. B. Barham 等人 (J. Nutr., 130 : 1925-1931 (2000)) 中建立, 其中证明了保持 GLA 减少脂质调节剂能力的补充策略 (不引起血清 ARA 水平的升高) 需要加入 EPA。因此, 这些涉及炎症的研究进一步支持包含 GLA 和 EPA 的油的效用 (然而在缺乏 EPA 补充情况下使用 GLA 可能是禁忌的)。在 PCT 公开 2006/033723 中提出在解脂耶氏酵母中生产 GLA 的方法。

[0399] 优选实施方案的描述

[0400] 本文证明的是在含油酵母, 解脂耶氏酵母的总脂质级分中合成了按总脂肪酸百分比计大于 53.2% EPA。如图 3 所示, 通过将不同基因整合到野生型 ATCC #20362 解脂耶氏酵母中制备了多个解脂耶氏酵母菌株, 其中每个转化菌株能够生产不同量的 PUFA (包括 EPA)。一些表达 $\Delta 9$ 延伸酶 $\Delta 8$ 去饱和酶途径的代表性转化生物体的基因型和完整脂质特征在下表 7 和 8 中显示。将脂肪酸鉴定为 16:0、16:1、18:0、18:1 (油酸)、18:2 (LA)、18:3 (ALA)、GLA、20:2 (EDA)、DGLA、ARA、ETA 和 EPA; 并且每个组合物以 % 总脂肪酸形式表示。“TFA % DCW”表示细胞中的总脂肪酸, 以干细胞重量百分比形式表示。

[0401] 通过 GC 分析从在发酵培养基 (FM) 中生长 2 天以及在高葡萄糖培养基 (HGM) 中生长 5 天的耶氏酵母属菌株中获取含油特征 (参见一般方法的培养基配方)。因为生长条件不同, GC 特征可能稍微不同于那些实施例中提供的 GC 特征 (例如不同培养基、培养烧瓶或管、以及生长时间长度等)。

[0402]

表 7
表达 $\Delta 9$ 延伸酶 $\Delta 8$ 去饱和酶途径的代表性解脂耶氏酵母菌株的基因型

菌株	加入的基因数							基因敲除
	$\Delta 9$ ELO	$\Delta 8$	$\Delta 5$	$\Delta 17$	$\Delta 12$	C16/18 ELO	CPT1	
Y4001	2	--	--	--	1		--	Leu-
Y4036	3	2	--	--	2		--	Leu-, unknown 1-
Y4069	3	2	3	--	2		--	Ura-, unknown 1-, unknown 2-
Y4070	3	2	3	--	2		--	Ura-, unknown 1-, unknown 3-
Y4084	3	2	3	3	2		--	unknown 1-, unknown 2-, unknown 4-
Y4086	3	2	3	3	2		--	YAL10F24167g-*, unknown 1-, unknown 2-
Y4127	4	4	3	3	3		--	unknown 1-, unknown 2-, unknown 4-, unknown 5-
Y4128	4	4	3	3	3		--	Pex10-, YAL10F24167g-*, unknown 1-, unknown 2-
Y4158	5	5	3	3	4	2	1	unknown 1-, unknown 2-, unknown 4-, unknown 5-, unknown 6-
Y4184	6	6	4	3	4	3	2	unknown 1-, unknown 2-, unknown 4-, unknown 5-, unknown 6-, unknown 7-
Y4217	5	5	4	3	3	2	1	YAL10C18711g-, Pex10-, YAL10F24167g-*, unknown 1-, unknown 3-
Y4259	6	6	4	3	4	3	2	YAL10C18711g-, Pex10-, YAL10F24167g-*, unknown 1-, unknown 3-, unknown 8-
Y4305	7	7	5	3	5	3	2	SCP2-(YAL10E01298g), YAL10C18711g-, Pex10-, YAL10F24167g-*, unknown 1-, unknown 3-, unknown 8-

* YAL10F24167g- 基因敲除是在 YAL10F24167g 的启动子区域中的中断的结果。

[0403]

表 8
表达 $\Delta 9$ 延伸酶 $\Delta 8$ 去饱和酶途径的代表性解脂耶氏酵母菌株的脂质特征

菌株	脂肪酸含量 (% TFA)											TFA% DCW
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 (ALA)	EDA (20:2)	DGLA	ARA	ETA	EPA	
Y4001	4.3	4.4	3.9	35.9	23	0	23.8	0	0	0	--	--
Y4036	7.7	3.6	1.1	14.2	32.6	0	15.6	18.2	0	0	--	--
Y4070	8.0	5.3	3.5	14.6	42.1	0	6.7	2.4	11.9	--	--	--
Y4086	3.3	2.2	4.6	26.3	27.9	6.9	7.6	1	0	2	9.8	28.6
Y4128	6.6	4	2.0	8.8	19	2.1	4.1	3.2	0	5.7	42.1	18.3
Y4158	3.2	1.2	2.7	14.5	30.4	5.3	6.2	3.1	0.3	3.4	20.5	27.3
Y4184	3.1	1.5	1.8	8.7	31.5	4.9	5.6	2.9	0.6	2.4	28.9	23.9
Y4217	3.9	3.4	1.2	6.2	19.0	2.7	2.5	1.2	0.2	2.8	48.3	20.6
Y4259	4.4	1.4	1.5	3.9	19.7	2.1	3.5	1.9	0.6	1.8	46.1	23.7
Y4305	2.8	0.7	1.3	4.9	17.6	2.3	3.4	2.0	0.6	1.7	53.2	27.5

[0404] 如上表所见,表达 $\Delta 9$ 延伸酶 $\Delta 8$ 去饱和酶途径并生产最多 EPA 的菌株是解脂耶氏酵母的重组菌株 Y4305。该生物的 GC 色谱图在图 4 中显示。下文描述了在菌株 Y4305 中

包含的基因修饰的更详细概述（其中在实施例中提供了全部细节）：

[0405] (1) 在 GPD::Fmd12::Pex20 和 YAT1::Fmd12::OCT 嵌合基因中表达 2 拷贝串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) $\Delta 12$ 去饱和酶；

[0406] (2) 在 GPM/FBAIN::Fmd12S::OCT、EXP1::Fmd12S::Aco 和 YAT1::Fmd12S::Lip2 嵌合基因中表达 3 拷贝合成 $\Delta 12$ 去饱和酶基因（其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达），该基因来源于串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) $\Delta 12$ 去饱和酶；

[0407] (3) 在 YAT1::ME3S::Pex16 和 EXP1::ME3S::Pex20 嵌合基因中表达 3 拷贝合成 $C_{16/18}$ 延伸酶基因（其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达），该基因来源于高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) $C_{16/18}$ 延伸酶；

[0408] (4) 在 GPAT::EgD9e::Lip2 嵌合基因中表达 1 拷贝小眼虫 $\Delta 9$ 延伸酶；

[0409] (5) 表达 5 拷贝的合成 $\Delta 9$ 延伸酶基因（其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达），该基因来源于小眼虫 $\Delta 9$ 延伸酶，在 EXP1::EgD9eS::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、FBA::EgD9eS::Pex20、GPD::EgD9eS::Lip2 和 YAT1::EgD9eS::Lip2 嵌合基因中表达；

[0410] (6) 表达 1 拷贝的合成 $\Delta 9$ 延伸酶基因（其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达），该基因来源于小型绿藻属 CCMP389 $\Delta 9$ 延伸酶，在 YAT1::E389D9eS::Oct 嵌合基因中表达；

[0411] (7) 表达 7 拷贝的突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶基因，该基因来源于合成 $\Delta 8$ 去饱和酶（来源于小眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶并且其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达），在 FBAINm::EgD8M::Pex20、EXP1::EgD8M::Pex16、GPDIN::EgD8M::Lip1、YAT1::EgD8M::Aco、和 FBAIN::EgD8M::Lip1 嵌合基因中表达；

[0412] (8) 在 FBAIN::EgD5::Aco 嵌合基因中表达 1 拷贝的小眼虫 $\Delta 5$ 去饱和酶；

[0413] (9) 表达 3 拷贝的合成 $\Delta 5$ 去饱和酶基因（其密码子经优化以在解脂耶氏酵母），该基因来源于小眼虫 $\Delta 5$ 去饱和酶，在 EXP1::EgD5S::Pex20、YAT1::RD5S::OCT、YAT1::EgD5S::Aco 和 EXP1::EgD5S::Aco 嵌合基因中表达；

[0414] (10) 表达 1 拷贝的合成 $\Delta 5$ 去饱和酶基因（其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达），该基因来源于多甲藻属 CCMP626 $\Delta 5$ 去饱和酶，在 YAT1::RD5S::OCT 嵌合基因中表达；

[0415] (11) 在 EXP1::PaD17::Pex16 和 FBAINm::PaD17::Aco 嵌合基因中表达 2 拷贝的瓜果腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum*) $\Delta 17$ 去饱和酶；

[0416] (12) 在 YAT1::PaD17S::Lip1 嵌合基因中表达 1 拷贝的合成 $\Delta 17$ 去饱和酶基因（其密码子经优化以在解脂耶氏酵母中表达），该基因来源于瓜果腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum*) $\Delta 17$ 去饱和酶；

[0417] (13) 在 YAT1::Y1CPT1::Aco 和 GPD::Y1CPT1::Aco 嵌合基因中表达 2 拷贝的解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶；

[0418] (14) 中断天然解脂耶氏酵母基因，该基因编码过氧化物酶体生物合成因子 10 蛋白 (PEX10)；

[0419] (15) 中断天然解脂耶氏酵母基因，该基因编码 SCP2 (YALI0E01298g ; GenBank 保藏号 XM_503410)；

[0420] (16) 中断天然解脂耶氏酵母基因，该基因编码 YALI0C18711g (GenBank 保藏号

XP_501987) ;以及,

[0421] (17) 中断天然解脂耶氏酵母基因, 该基因编码 YALI0F24167g (GenBank 保藏号 XM_505819)。

[0422] 因此, 描述了具有以下按总脂肪酸重量%计的脂肪酸浓度的微生物油:

[0423] a) 约 48%至约 55% EPA;

[0424] b) 约 1.5%至约 3.0% ETA;

[0425] c) 约 0.1%至 0.7% ARA;

[0426] d) 约 1.0%至约 2.5% DGLA;

[0427] e) 约 2.0%至约 3.5% EDA;

[0428] f) 约 2.0%至约 3.0% ALA;

[0429] g) 约 17.0%至约 20.0%亚油酸 (18:2);

[0430] h) 约 3.5%至约 6.5%油酸 (18:1);

[0431] i) 约 1.0%至约 2.0%硬脂酸 (18:0);

[0432] j) 约 0.5%至约 3.5%棕榈油酸 (16:1);和

[0433] k) 约 2.5%至约 4.5%棕榈酸 (16:0)。

[0434] 在另一个实施方案中, 提供本文的微生物油, 其中所述油具有以下按总脂肪酸重量%计的脂肪酸浓度:

[0435] a) 至少约 43.3% EPA;

[0436] b) 小于约 23.6% LA(18:2);和

[0437] c) 小于约 9.4%油酸 (18:1)。

[0438] 在较优选的实施方案中, 微生物油还包含按总脂肪酸重量%计小于约 4.2%的 EDA。

[0439] 虽然申请人证明在这些特定重组解脂耶氏酵母菌株中生产按总脂肪酸重量%计多达 55.6%的 EPA, 预期在宿主细胞中 EPA 的浓度能经由如本文所述的附加基因修饰被显著地改变。这可能导致 EPA 产量提高或包含 EPA 和至少一种其它 ω -3 和 / 或 ω -6 PUFA 的解脂耶氏酵母油产量提高。

[0440] 此外基于本文所述的教导和结果, 期望本领域的技术人员将认识到使用含油酵母作为生产平台合成多种 ω -3 和 / 或 ω -6 PUFA 的可行性和商业用途, 该方法使用 $\Delta 9$ 延伸酶 $\Delta 8$ 去饱和酶途径。

实施例

[0441] 在下面的实施例中将进一步限定本发明。应该理解, 这些实施例尽管说明了本发明的优选实施方案, 但仅是以例证的方式给出的。根据上面的论述和这些实施例, 本领域的技术人员能确定本发明的基本特征, 并在不脱离本发明的精神和范围的情况下, 能够对本发明做出多种改变和修饰, 以使其适用于多种用法和条件。

[0442] 一般方法

[0443] 实施例中使用的标准的重组 DNA 技术和分子克隆技术是本领域所熟知的并且在如下文献中有描述:

[0444] 1) Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory

Manual ;Cold Spring Harbor Laboratory :Cold Spring Harbor, NY(1989) (Maniatis) ;2) T. J. Silhavy, M. L. Bannan 和 L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions ;Cold Spring Harbor Laboratory :Cold Spring Harbor, NY(1984) ;和 3) Ausubel, F. M. 等人, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. 和 Wiley-Interscience 出版, Hoboken, NJ(1987)。

[0445] 适用于微生物培养物的维持和生长的材料和方法是本领域熟知的。适用于下面实施例的技术可在 Manual of Methods for General Bacteriology (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg 和 G. Briggs Phillips 编辑), American Society for Microbiology : Washington, D. C. (1994)) ; 或 Thomas D. Brock in Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology, 第 2 版, Sinauer Associates :Sunderland, MA(1989) 的描述中找到。用于生长和维持微生物细胞的所有试剂、限制性酶和材料得自 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI)、DIFCO Laboratories (Detroit, MI)、New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA)、GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD)、或 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)。通常于 37℃ 下在 Luria Bertani (LB) 平板上培养大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株。

[0446] 一般的分子克隆根据标准方法 (Sambrook 等人, 同上) 来完成。通过 Sigma-Genosys (Spring, TX) 合成低聚核苷酸。单个 PCR 扩增反应在 50 μ L 总体积下进行, 它包含 :除非另外指明, PCR 缓冲液 (包含 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM Tris-HCl (pH 8.75), 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100), 100 μ g/mL BSA (终浓度), 200 μ M 各种脱氧核苷酸三磷酸腺苷, 10 pmole 各种引物和 1 μ L Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene, San Diego, CA)。定点诱变使用 Stratagene' s QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis 试剂盒, 按照制造商的说明书进行。当 PCR 或定点诱变涉及亚克隆时, 测序构建体以确认未将错配导入序列。将 PCR 产物克隆到 Promega' s pGEM-T-easy 载体 (Madison, WI) 中。

[0447] DNA 序列是在 ABI 自动测序仪上采用染料终止剂技术 (美国专利 5,366,860 ; EP 272,007) 使用载体和插入片段特异性引物的组合来产生的。序列编辑是在 Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) 中进行的。所有序列在两个方向上覆盖至少两次。基因序列的比较是使用 DNASTAR 软件 (DNA Star, Inc.) 完成。作为另外一种选择, 使用得自 Genetics Computer Group Inc. (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI) 的程序包完成对遗传序列的操纵。GCG 程序 "Pileup" 使用的空位形成预设值为 12, 而空位延伸预设值为 4。GCG "Gap" 或 "Bestfit" 程序使用的预设空位形成罚分为 50, 而预设空位延伸罚分为 3。除非另外指明, 在所有其他情况下使用 GCG 程序的预设参数。

[0448] BLAST (Basic Local Alignment Search Tool ;Altschul, S. F., 等人, J. Mol. Biol., 215 :403-410 (1993) 和 Nucleic Acids Res., 25 :3389-3402 (1997)) 研究以确定与 BLAST "nr" 数据库 (包含所有非冗余 GenBank CDS 的翻译序列, 来源于 3 维结构 Brookhaven Protein Data Bank、SWISS-PROT 蛋白质序列数据库、EMBL 和 DDBJ 数据库的序列) 中含有的序列具有相似性的分离的序列。将序列在所有可读框内翻译并采用由 NCBI 提供的 BLASTX 算法 (Gish, W. 和 States, D. J., Nature Genetics, 3 :266-272 (1993)), 比较该序列与包含在 "nr" 数据库中的所有可公开获得的蛋白质序列的相似性。

[0449] 根据百分比同一性、百分比相似性和期望值(expectation value),报告了BLASTX比较的结果,该结果总结了与查询序列具有最大相似性的序列。“百分比同一性”定义为两种蛋白质之间相同的氨基酸的百分比。“百分比相似性”定义为两种蛋白质之间相同的或保守的氨基酸的百分比。“期望值”用给定分值估计限定匹配数的匹配的统计显著性,该匹配数是在完全偶然地搜索数据库中这种大小片段时所预期的。

[0450] 缩写的含义如下:“sec”表示秒,“min”表示分钟,“h”表示小时,“d”表示天,“μL”表示微升,“mL”表示毫升,“L”表示升,“μM”表示微摩尔,“mM”表示毫摩尔,“M”表示摩尔,“mmol”表示毫摩尔,“μmole”表示微摩尔,“g”表示克,“μg”表示微克,“ng”表示纳克,“U”表示单位,“bp”表示碱基对,“kB”表示千碱基对,“DCW”表示干细胞重量,而“TFA”表示总脂肪酸。

[0451] 表达盒的命名

[0452] 表达盒的结构将通过简单的记号系统“X::Y::Z”表示,其中X描述启动子片段,Y描述基因片段而Z描述终止子片段,它们均彼此可操作地连接。

[0453] 解脂耶氏酵母的转化和培养

[0454] 解脂耶氏酵母菌株 ATCC #20362 购自美国典型培养物保藏中心(Rockville,MD)。解脂耶氏酵母菌株通常是在根据下面所示的配方的数种培养基中于 28-30℃下培育。根据标准方法,按需要通过将 20g/L 琼脂添加到每种液体培养基中来制备琼脂平板。

[0455] YPD 琼脂培养基(每升):10g 酵母提取物[Difco],20g Bacto 蛋白胨[Difco],和 20g 葡萄糖。

[0456] 基本培养基(MM)(每升):20g 葡萄糖,1.7g 酵母氮源,无氨基酸,1.0g 脯氨酸,pH6.1(不需要调节)。

[0457] 基本培养基+尿嘧啶(MM+尿嘧啶或MMU)(每升):如上制备 MM 培养基并加入 0.1g 尿嘧啶和 0.1g 尿苷。

[0458] 基本培养基+尿嘧啶+磺酰脲类(MMU+SU)(每升):如上制备 MMU 培养基并加入 280mg 磺酰脲类。

[0459] 基本培养基+亮氨酸+亮氨酸(MMLeuLys)(每升):如上制备 MM 培养基并添加 0.1g 亮氨酸和 0.1g 赖氨酸。

[0460] 基本培养基+5-氟乳清酸(MM+5-FOA)(每升):20g 葡萄糖、6.7g 酵母氮源、75mg 尿嘧啶、75mg 尿苷,并且基于对一系列从 100mg/L 至 1000mg/L 的浓度的 FOA 活性试验(因为供应商提供的每批料中会发生改变),选用适量的 FOA(Zymo Research Corp., Orange, CA)。

[0461] 高糖培养基(HGM)(每升):80 葡萄糖,2.58g KH₂PO₄ 和 5.36g K₂HPO₄, pH7.5(不需要调节)。

[0462] 无酵母提取物的发酵培养基(FM无YE)(每升):6.70g/L 酵母氮源,6.00g KH₂PO₄, 2.00g K₂HPO₄, 1.50g MgSO₄·7H₂O, 和 20g 葡萄糖。

[0463] 发酵培养基(FM)(每升):如上制备无 YE 培养基的 FM 并加入 5.00g 酵母提取物(BBL)。

[0464] 除非另外说明,否则解脂耶氏酵母的转化根据 Chen, D. C. 等人(Appl. Microbiol Biotechnol., 48(2):232-235(1997))的方法完成。简而言之,将耶氏酵母划线到 YPD 平板

上,并在 30℃下生长大约 18 小时。从平板上刮掉几大环量的细胞并将其重悬浮于含有下面成分的 1mL 转化缓冲液中:2.25mL 50% PEG,平均分子量为 3350;0.125mL 2M 醋酸锂, pH6.0;以及 0.125mL 2M DTT。然后,将大约 500ng 线性化的质粒 DNA 在 100 μL 重悬浮的细胞中孵育,并将其在 39℃下维持 1 小时,每间隔 15 分钟进行涡旋混合。将细胞铺在选择培养基平板上并在 30℃下维持 2 至 3 天。

[0465] 解脂耶氏酵母的脂肪酸分析

[0466] 为了进行脂肪酸分析,将细胞通过离心收集并如 Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (Can. J. Biochem. Physiol., 37:911-917(1959)) 中所述提取脂质。通过将脂质提取物与甲醇钠进行酯交换反应而制备脂肪酸甲酯 [“FAME”] (Roughan, G. 和 Nishida I., Arch Biochem Biophys., 276(1):38-46(1990)) 并随后将其用配有 30m×0.25mm(内径) HP-INNOWAX (Hewlett-Packard) 柱的 Hewlett-Packard 6890 气相色谱仪 (GC) 进行分析。烘箱温度以 3.5℃/分钟从 170℃(保持 25 分钟)升到 185℃。

[0467] 为了进行直接的碱催化酯交换反应,收获耶氏酵母培养物 (3mL),在蒸馏水中洗涤一次,并在 Speed-Vac 中在真空下干燥 5-10 分钟。将甲醇钠 (100 μL,浓度为 1%) 加入样本中,然后将样本涡旋振荡 20 分钟。在加入 3 滴 1M 氯化钠和 400 μL 己烷后,涡旋并离心样本。移出上层并如上所述用 GC 进行分析。

[0468] 实施例 1

[0469] 产生解脂耶氏酵母菌株 Y4086 以通过 Δ9 延伸酶/A8 去饱和酶途径生产占总脂质约 14% 的 EPA

[0470] 本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y4086 的构建,该菌株能通过 Δ9 延伸酶 Δ8 去饱和酶途径的表达生产相对于总脂质而言约 14% 的 EPA (图 3)。

[0471] 菌株 Y4086 的产生需要构建菌株 Y2224 (由野生型耶氏酵母菌株 ATCC #20362 的 Ura3 基因的自主突变而产生的 FOA 抗性突变体)、菌株 Y4001 (产生 17% EPA,具有 Leu⁻表型)、菌株 Y4001U (产生 12% EPA,具有 Leu⁻和 Ura 表型)、菌株 Y4036 (产生 18% DGLA,具有 Leu⁻表型)、菌株 Y4036U (具有 Leu⁻和 Ura⁻表型) 和菌株 Y4070 (产生 12% ARA,具有 Ura⁻表型)。关于构建菌株 Y2224、Y4001、Y4001U、Y4036、Y4036U 和 Y4070 的更多细节描述于 PCT 公开 WO 2008/073367 的实施例 7 中,该文献以引用方式并入本文。

[0472] 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y4070 的最终基因型是 Ura⁻、unknown 1⁻、unknown 3⁻、Leu⁺、Lys⁺、GPD::Fmd12::Pex20、YAT1::Fmd12::OCT、YAT1::ME3S::Pex16、GPAT::EgD9e::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、FBAINm::EgD8M::Pex20、EXP1::EgD8M::Pex16、FBAIN::EgD5::Aco、EXP1::EgD5S::Pex20、YAT1::RD5S::OCT。

[0473] 产生菌株 Y4086 以生产占总脂质约 14% 的 EPA

[0474] 生成构建体 pZP3-Pa777U (图 5A;SEQ ID NO:127) 以将三个 Δ17 去饱和酶基因整合到菌株 Y4070 的 Pox3 位点中 (GenBank 保藏号 AJ001301),从而能够生产 EPA。pZP3-Pa777U 质粒含有如下组分:

[0475] 表 9

[0476] 描述质粒 pZP3-Pa777U (SEQ ID NO:127)

[0477]

RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
在 SEQ ID NO :127 中	
AscI/BsiWI (3527-4297)	770bp 的耶氏酵母 Pox3 基因 (GenBank 保藏号 AJ001301) 的 5' 部分
PacI/SphI (1-827)	827bp 的耶氏酵母 Pox3 基因 (GenBank 保藏号 AJ001301) 的 3' 部分
ClaI/SwaWI (6624-4457)	YAT1::PaD17S::Lip1 包含 : • YAT1 :解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (图中标记为 “YAT”; 专利公布 US 2006/0094102-A1) ; • PaD17S :密码子优化的 $\Delta 17$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :52), 来源于瓜果腐霉菌 (<i>Pythium aphanidermatum</i>) (PCT 公开 W0 2008/054565) ; • Lip1 :来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 保藏号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
EcoRI/PmeI (8359-10611)	EXP1::PaD17::Pex16 包含 : • EXP1 :解脂耶氏酵母输出蛋白 (EXP1) 启动子 (在图中标记为 “Exp”; PCT 公开 W0 2006/052870) ; • PaD17 :瓜果腐霉菌 (<i>Pythium aphanidermatum</i>) $\Delta 17$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO :50) (图中标记为 “PaD17WT”; PCT 公开 W0 2008/054565) ; • Pex16 :来自耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 保藏号 U75433) 的 Pex16 终止子序列
PmeI/PacI (10611-1)	FBAINm::PaD17::Aco 包含 : • FBAINm :解脂耶氏酵母 FBAINm 启动子 (美国专利 7, 202, 356) ; • PaD17 :瓜果腐霉菌 (<i>Pythium aphanidermatum</i>) $\Delta 17$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO :50) (图中标记为 “PaD17WT”; PCT 公开 W0 2008/054565) ; • Aco :耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 保藏号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列
ClaI/EcoRI (6624-8359)	LoxP::Ura3::LoxP 包含 : • LoxP 序列 (SEQ ID NO :123) ; • 耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 保藏号 AJ306421) ; • LoxP 序列 (SEQ ID NO :123)

[0478] 将 pZP3-Pa777U 质粒用 AscI/SphI 消化, 然后根据“一般方法”将其用于转化菌株 Y4070。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30℃ 下维持 2 至 3 天。然后将单菌落再次划线至 MM 平板上, 随后将其在 30℃ 下接种至液体 MMLeuLys 中并以 250rpm/min 摇动 2 天。离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换反应来制备 FAME, 并随后用 Hewlett-Packard6890GC 进行分析。

[0479] GC分析显示,EPA存在于含有 pZP3-Pa777U 的 3 种嵌合基因的转化体中,但不存在于亲本 Y4070 菌株中。所选的 96 个菌株中大部分产生占总脂质约 10-13% 的 EPA。有 2 个菌株(即 #58 和 #79)产生了占总脂质约 14.2% 和 13.8% 的 EPA。将这两个菌株分别命名为 Y4085 和 Y4086。

[0480] 相对于野生型 10 解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y4086 的最终基因型是 Ura3⁺、Leu⁺、Lys⁺、unknown 1⁻、unknown 2⁻、YALI0F24167g⁻、GPD::FmD12::Pex20、YAT1::FmD12::OCT、YAT1::ME3S::Pex16、GPAT::EgD9e::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、FBAINm::EgD8M::Pex20、EXP1::EgD8M::Pex16、FBAIN::EgD5::Aco、EXP1::EgD5S::Pex20、YAT1::RD5S::OCT、YAT1::PaD17S::Lip1、EXP1::PaD17::Pex16、FBAINm::PaD17::Aco。

[0481] 实施例 2

[0482] 产生解脂耶氏酵母菌株 Y4128 以通过 $\Delta 9$ 延伸酶 $\Delta 8$ 去饱和酶途径生产占总脂质约 37% 的 EPA

[0483] 本实施例描述来源于解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y4128 的构建,该菌株能够占总脂约 37.6% 的 EPA(即,以总脂肪酸相对于 Y4086 的百分比表示的 EPA 浓度有大于 2 倍的提高)。

[0484] 菌株 Y4128 的产生需要构建菌株 Y2224、Y4001、Y4001U、Y4036、Y4036U、Y4070 和 Y4086(如实施例 1 所述),以及构建菌株 Y4086U1(Ura⁻)。

[0485] 产生菌株 Y4086U1(Ura⁻)

[0486] 菌株 Y4086U1 经由在菌株 Y4086 的构建体 pY117 中暂时表达 Cre 重组酶(图 5B; SEQ ID NO:128;描述于 PCT 公开 W0 2008/073367)制备 Ura⁻表型。这从基因组释放出 LoxP 夹着的 Ura3 基因。突变的耶氏酵母属乙酰羟酸合酶(即,“AHAS”;E. C. 4. 1. 3. 18;GenBank 保藏号 XP_501277,包含 W497L 突变,如 SEQ ID NO:121 所示;参见 PCT 公开 W0 2006/052870)在质粒 pY117 中,赋予其磺酰脲类抗除草剂性(SUR),该抗性用作阳性筛选标记。

[0487] 质粒 pY117 来源于质粒 pY116(描述于 PCT 公开 W0 2008/073367 的实施例 7 中),这通过将侧接 PacI-SwaI 位点的突变型 AHAS 基因插入用 PacI-SwaI 消化的 pY116 中从而用磺酰脲类标记置换 LEU 选择性标记完成。构建体 pY117 因此包含以下组分:

[0488] 表 10

[0489] 描述质粒 pY117(SEQ ID NO:128)

[0490]

SEQ ID NO:128 内的 RE 位点和 核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
1328 至 448	ColE1 质粒复制起点
2258 至 1398	用于在大肠杆菌中选择的氨苄青霉素抗性基因(AmpR)
2438-2838	大肠杆菌 f1 复制起点

3157 至 4461	耶氏酵母自主复制序列 (ARS18 ;GenBank 保藏号 Z17608)
PacI/SwaI 4504-7498	解脂耶氏酵母 AHAS 基因 (GenBank 保藏号 XP_501277), 该基因包含 W497L 突变 (SEQ ID NO :121 ;PCT 公开 WO 2006/052870)
SwaI-PmeI 7498-218	GPAT::Cre::XPR 包含 : • GPAT :解脂耶氏酵母 GPAT 启动子 (美国专利 4, 264, 949) ; • Cre :重组酶蛋白的肠杆菌噬菌体 P1 Cre 基因 (GenBank 保藏号 X03453), 除了一种碱基变化 (T4G), 其导致一种氨基酸改变 (S2A) 而产生了 NcoI 位点以方便克隆 ; • XPR :耶氏酵母 Xpr 基因 (GenBank 保藏号 M17741) 的约 100bp 的 3' 区

[0491] 根据“一般方法”将质粒 pY117 用于转化菌株 Y4086。在转化后,将细胞置于 MMU+SU (280 μ g/mL 磺酰脲类 ;也称作氯嘧磺隆, E. I. duPont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, DE) 平板上并在 30°C 下保持 2 至 3 天。挑取在 MMU+SU 平板上生长的 SU^R 单菌落, 将其在 30°C 下划线至 YPD 液体培养基中并以 250rpm/min 摇动 1 天以清除 pY117 质粒。将生长培养基划线接种在 MMU 平板上。在 30°C 下保持两天后, 将单克隆再划线接种在 MM 和 MMU 平板上。选择可以在 MMU 平板上生长但不在 MM 平板上生长的那些菌落。将这些菌株中具有 Ura⁻ 表型的两个菌株命名为 Y4086U1 和 Y4086U2。

[0492] 产生菌株 Y4128 以生产占总脂质约 37% 的 EPA

[0493] 制备构建体 pZP2-2988 (图 6A ;SEQ ID NO :129) 以将一种 $\Delta 12$ 去饱和酶基因、两种 $\Delta 8$ 去饱和酶基因和一种 $\Delta 9$ 延伸酶基因整合到菌株 Y4086U1 的 Pox2 位点 (GenBank 保藏号 AJ001300) 中, 从而在较高水平上生产 EPA。pZP2-2988 质粒含有如下组分 :

[0494] 表 11

[0495] 描述质粒 pZP2-2988 (SEQ ID NO :129)

[0496]

SEQ ID NO :129 中的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
AscI/BsiWI (3083-2273)	803bp 的耶氏酵母 Pox2 基因 (GenBank 保藏号 AJ001300) 的 5' 部分
PacI/SphI (6446-5791)	649bp 的耶氏酵母 Pox2 基因 (GenBank 保藏号 AJ001300) 的 3' 部分
PmeI/BsiWI (347-2273)	FBA::EgD9eS::Pex20 包含 : • FBA :解脂耶氏酵母 FBA 启动子 (美国专利 7, 202, 356) ; • EgD9eS :密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶 (SEQ ID NO :6), 该酶来源于小眼虫 (PCT 公开 WO 2007/061742) ; • Pex20 :来自耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 保藏号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列

ClaI/PmeI (13318-347)	GPM/FBAIN::FmD12S::OCT 包含 : • GPM/FBAIN :嵌合的解脂耶氏酵母 GPM/FBAIN 启动子 (图中分别标记为 “GPM” 和 “FBA 内含子”) (美国专利公开 7, 202, 356) ; • FmD12S :密码子优化的 $\Delta 12$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :56), 该酶来源于串珠镰刀菌 (<i>Fusarium moniliforme</i>), 图中标记为 “F.D12S”; PCT 公开 W0 2005/04785) ; • OCT :耶氏酵母 OCT 基因 (GenBank 保藏号 X69988) 的 OCT 终止子序列
ClaI/EcoRI (13318-11581)	LoxP::Ura3::LoxP 包含 : • LoxP 序列 (SEQ ID NO :123) ; • 耶氏酵母 Ura3 基因 (基因库编号 AJ306421) ; • LoxP 序列 (SEQ ID NO :123)
EcoRII/SwaI (11581-8884)	GPDIN::EgD8M::Lip1 包含 : • GPDIN :解脂耶氏酵母 GPDIN 启动子 (专利公布 US 2006/0019297-A1) ; • EgD8M :合成突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :22 ;专利公布 US 2008-0138868 A1), 它来源于小眼虫 (“EgD8S”; 美国专利公开 7, 256, 033) ;

[0497]

	• Lip1 :来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 保藏号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
SwaI/PacI (8884-6446)	YAT1::EgD8M::ACO 包含 : • YAT1 :解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (图中标记为 “YAT”; 专利公布 US 2006/0094 102-A1) ; • EgD8M :合成突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :22 ;专利公布 US 2008-0138868 A1), 该酶来源于小眼虫 (“EgD8S”; 美国专利公开 4, 256, 033) ; • Aco :耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 保藏号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列

[0498] 将 pZP2-2988 质粒用 AscI/SphI 消化, 然后根据 “一般方法” 将其用于转化菌株 Y4086U1。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30°C 下维持 2 至 3 天。将单菌落再次划线至 MM 平板上, 随后将其在 30°C 下接种至液体 MMLeuLys 中并以 250rpm/min 摇动 2 天。通过离心收集细胞, 将其重悬浮于 HGM 中, 然后以 250rpm/min 摇动 5 天。离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换反应来制备 FAME, 并随后用 Hewlett-Packard6890 GC 进行分析。

[0499] GC 分析显示大多数选择的 96 个菌株生产占总脂 12-15.6% 的 EPA。有 2 个菌株 (即, Group I 中的 #37 和 Group II 中的 #33) 生产占总脂约 37.6% 和 16.3% 的 EPA。将这两个菌株分别命名为 Y4128 和 Y4129。

[0500] 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y4128 的最终基因型是 :YALI0F24167g-、PexIO-、unknown 1-、unknown 2-、GPD::FmD12::Pex20、YAT1::FmD12::OCT、GPM/FBAIN::FmD12S::OCT、YAT1::ME3S::Pex16、GPAT::EgD9e::Lip2、

EXP1::EgD9eS::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、FBA::EgD9eS::Pex20、FBAINm::EgD8M::Pex20、EXP1::EgD8M::Pex16、GPDIN::EgD8M::Lip1、YAT1::EgD8M::Aco、FBAIN::EgD5::Aco、EXP1::EgD5S::Pex20、YAT1::RD5S::OCT、YAT1::PaD 17S::Lip1、EXP1::PaD17::Pex16、FBAINm::PaD17::Aco。在 2007 年 8 月 23 日将解脂耶氏酵母菌株 Y4128 保藏于美国典型培养物保藏中心,并且命名为 ATCC PTA-8614。

[0501] 实施例 3

[0502] 产生优化的解脂耶氏酵母菌株 Y4305 以通过 $\Delta 9$ 延伸酶 A8 去饱和酶途径生产占总脂质大于 53% 的 EPA

[0503] 本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y4305 的构建,该菌株能通过 $\Delta 9$ 延伸酶 $\Delta 8$ 去饱和酶途径的表达生产相对于总脂质大于 53% 的 EPA (图 3)。

[0504] 菌株 Y4305 的产生需要构建菌株 Y2224、菌株 Y4001、菌株 Y4001U、菌株 Y4036、菌株 Y4036U、Y4070 和菌株 Y4086 (如上文实施例 1 所述)、菌株 Y4086U1 和 Y4128 (如上文实施例 2 所述)、以及菌株 Y4128U3 (Ura⁻)、Y4217 (生产占总脂质 42% 的 EPA)、Y4217U2 (lira⁻)、Y4259 (生产占总脂质 46.5% 的 EPA) 和 Y4259U2 (lira⁻)。

[0505] 产生 Y4128U 菌株

[0506] 为了中断菌株 Y4128 中的 Ura3 基因,制备构建体 pZKUE3S (图 6B ;SEQ ID NO :130) 以将 EXP1::ME3S::Pex20 嵌合基因整合到菌株 Y4128 的 Ura3 基因中。质粒 pZKUE3S 包含以下组分:

[0507] 表 12

[0508] 描述质粒 pZKUE3S (SEQ ID NO :130)

[0509]

SEQ ID NO :130 中的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
BsiWI/PacI (318-1038)	721bp 的耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 登陆号 AJ306421) 的 5' 部分
SphI/PmeI (3915-4594)	729bp 的耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 登陆号 AJ306421) 的 3' 部分
EcoRI/BsiWI (4628-318)	EXP1::ME3S::Pex20 包含: • EXP1 :解脂耶氏酵母输出蛋白 (EXP1) 启动子 (在图中标记为“Exp”;PCT 公开 WO 2006/052870); • ME3S :源于高山被孢霉的经密码子最优化的 C_{16/18} 延伸酶基因 (SEQ ID NO :60) (PCT 公布 WO 2007/046817); • Pex20 :耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 保藏号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
2149-1269	ColEI 质粒复制起点
3079-2219	用于在大肠杆菌中选择的氨苄青霉素抗性基因 (Amp ^R)

3659-3259	f1 起点
-----------	-------

[0510] 将质粒 pZKUE3S 用 SphI/PacI 消化, 然后根据“一般方法”将其用于转化菌株 Y4128。转化后, 将细胞铺至 MM+5-FOA 选择平板上并在 30℃ 下维持 2 至 3 天。

[0511] 挑取在 MM+5-FOA 选择平板上生长的总共 24 个转化子, 并且再次划线接种到新 MM+5-FOA 平板上。从板上剥离细胞, 提取脂质, 通过酯交换反应来制备 FAME, 并随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

[0512] GC 分析显示来自平板的具有 pZKUE3S 的所有转化子中存在占总脂质 10-15% 的 EPA。鉴定为 #3、#4、#10、#12、#19 和 #21 的菌株分别生产占总脂 12.9%、14.4%、15.2%、15.4%、14% 和 10.9% 的 EPA, 将它们分别命名为 Y4128U1、Y4128U2、Y4128U3、Y4128U4、Y4128U5 和 Y4128U6 (统称为 Y4128U)。

[0513] Y4128 (37.6%) 对 Y4128U (平均 13.8%, 如实施例 2 所述) % EPA 定量差异是因为不同的生长条件。具体地讲, 前者的培养基在液体培养基中生长两天后进行分析, 而后的培养基在琼脂平板上生长后进行分析。申请人已经观察到当比较琼脂平板与液体培养基中的结果时, 总脂质中的 % EPA 提高了 2-3 倍。因此, 虽然不能直接比较结果, Y4128 和 Y4128U 菌株证明都产生高水平的 EPA。

[0514] 产生菌株 Y4217 以生产占总脂质约 42% 的 EPA

[0515] 制备构建体 pZKL2-5U89GC (图 7A; SEQ ID NO:131) 以将一种 $\Delta 9$ 延伸酶基因、一种 $\Delta 8$ 去饱和酶基因、一种 $\Delta 5$ 去饱和酶基因和一种解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶基因 (CPT1) 整合到菌株 Y4128U3 的 Lip2 位点 (GenBank 保藏号 AJ012632) 中, 从而在较高水平上生产 EPA。pZKL2-5U89GC 质粒含有如下组分:

[0516] 表 13

[0517] 描述质粒 pZKL2-5U89GC (SEQ ID NO:131)

[0518]

SEQ ID NO:131 中的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
AscI/BsiWI (730-1)	722bp 的耶氏酵母 Lip2 基因 5' 部分 (图中标记为“Lip2. 5N”; GenBank 保藏号 AJ012632)
PacI/SphI (4141-3438)	697bp 的耶氏酵母 Lip2 基因 3' 部分 (图中标记为“Lip2. 3N”; GenBank 保藏号 AJ012632)

SwaI/BsiWI (13382-1)	YAT1::Y1CPT1::Aco 包含： • YAT1 :解脂耶氏酵母 YAT1 启动子（图中标记为“YAT”；专利公布 US 2006/0094102-A1）； • Y1CPT1 :解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶基因 (SEQ ID NO :68) (图中标记为“CPT1”；PCT 公开 WO 2006/052870)； • Aco :耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 保藏号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列
PmeI/SwaI (10745-13382)	FBAIN::EgD8M::Lip1,它包含： • FBAIN :解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子（美国专利公开 7, 202, 356）； • EgD8M :合成突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :22) (图中标记为“D8S-23”；专利公布 US 2008-0138868 A1), 该酶来源于小眼虫 (“EgD8S”；美国专利公开 7, 256, 033)； • Lip1 :来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 保藏号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
PmeI/ClaI (10745-8650)	GPD::EgD9eS::Lip2 包含： • GPD :解脂耶氏酵母 GPD 启动子（图中标记为“GPD Pro”；美国专利公开 7, 259, 255）； • EgD9eS :密码子优化的 D9 延伸酶基因 (SEQ ID NO :6), 该基因来源于小眼虫（图中标记为“EgD9ES”；PCT 公开 WO 2007/061742）； • Lip2 :来自耶氏酵母 Lip2 基因 (GenBank 保藏号 AJ012632) 的 Lip2 终止子序列

[0519]

ClaI/EcoRI (8650-6581)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 保藏号 AJ306421)
EcoRI/PacI (6581-4141)	YAT1::EgDD5S::ACO 包含： • YAT1 :解脂耶氏酵母 YAT1 启动子（图中标记为“YAT”；专利公布 US 2006/0094102-A1）； • EgD5S :密码子优化的 $\Delta 5$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :36), 该酶来源于小眼虫 (PCT 公开 WO 2007/136671)； • Aco :耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 保藏号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列

[0520] 将 pZKL2-5U89GC 质粒用 AscI/SphI 消化, 然后根据“一般方法”将其用于转化菌株 Y4128U3。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30℃ 下维持 4 至 3 天。将单菌落再次划线至 MM 平板上, 随后将其在 30℃ 下接种至液体 MM 中并以 250rpm/min 摇动 2 天。通过离心收集细胞, 将其重悬浮于 HGM 中, 然后以 250rpm/min 摇动 5 天。离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换反应来制备 FAME, 并随后用 Hewlett-Packard6890GC 进行分析。

[0521] GC 分析显示大多数选择的 96 个菌株生产占总脂 32-39.9% 的 EPA。有 6 个菌株（即，第二组的 #35、#38、#40、#71、#76 和 #81）产生了占总脂质约 41.1%、41.8%、41.7%、41.1%、41% 和 41.1% 的 EPA。这六个菌株分别命名为 Y4215、Y4216、Y4217、Y4218、Y4219 和 Y4220。

[0522] 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的菌株 Y4215、Y4216、Y4217、Y4218、Y4219 和 Y4220 的最终基因型是：YALI0C18711g⁻、PexI0⁻、YALI0F24167g⁻、unknown 1⁻、unknown 3⁻、GPD::FmD12::Pex20、YAT1::FmD12::OCT、GPM/FBAIN::FmD12S::OCT、YAT1::ME3S::Pex16、EXP1::ME3S::Pex20、GPAT::EgD9e::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、FBA::EgD9eS::Pex20、GPD::EgD9eS::Lip2、FBAINm::EgD8M::Pex20、FBAIN::EgD8M::Lip1、EXP1::EgD8M::Pex16、GPDIN::EgD8M::Lip1、YAT 1::EgD8M::Aco、FBAIN::EgD5::Aco、EXP1::EgD5S::Pex20、YAT1::EgD5S::Aco、YAT1::RD5S::OCT、YAT1::PaD17S::Lip1、EXP1::PaD17::Pex16、FBAINm::PaD17::Aco、YAT1::Y1CPT1::ACO。

[0523] 生成菌株 Y4217U2(Ura⁻)

[0524] 为了中断菌株 Y4217 中的 Ura3 基因，使用构建体 pZKUE3S（图 6B；SEQ ID NO：130）以将 EXP1::ME3S::Pex20 嵌合基因整合到菌株 Y4217 的 Ura3 基因中。转化后，将细胞铺至 MM+5-FOA 选择平板上并在 30℃ 下维持 4 至 3 天。

[0525] 挑取在 MM+5-FOA 平板上生长的总共 6 个转化子，并且再次分别划线接种到 MM 平板和 MM+5-FOA 平板上。所有 6 个菌株具有 Ura⁻ 表型（即，细胞能在 MM+5-FOA 平板上生长，但是不能在 MM 平板上生长）。从 MM+5-FOA 板上剥离细胞，提取脂质，通过酯交换反应来制备 FAME，并随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

[0526] GC 分析显示在 MM+5-FOA 平板上生长的具有 pZKUE3S 的所有转化子中存在占总脂质 18.7% 至 28.6% 的 EPA。将生产占总脂质 22.5% 和 28.6% 的 EPA 的两个菌株（即，#4 和 #5）分别命名为菌株 Y4217U1 和 Y4217U2。

[0527] 产生菌株 Y4259 以生产占总脂质约 46.5% 的 EPA

[0528] 制备构建体 pZKL1-2SP98C（图 7B；SEQ ID NO：132）以将一种 $\Delta 9$ 延伸酶基因、一种 $\Delta 8$ 去饱和酶基因、一种 $\Delta 12$ 去饱和酶基因和一种解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶基因（CPT1）整合到菌株 Y4217U2 的 Lip1 位点（GenBank 保藏号 Z50020）中，从而在较高水平上生产 EPA。pZKL1-2SP98C 质粒含有如下组分：

[0529] 表 14

[0530] 描述质粒 pZKL1-2SP98C (SEQ ID NO：132)

[0531]

SEQ ID NO：132 中的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
AscI/BsiWI (3474-2658)	809bp 的耶氏酵母 Lip1 基因 5' 部分（图中标记为“Lip1-5' N”； GenBank 保藏号 Z50020）

PacI/SphI (6951-6182)	763bp 的耶氏酵母 Lip1 基因 3' 部分 (图中标记为 “Lip1. 3N” ; GenBank 保藏号 Z50020)
SwaI/BsiWI (1-2658)	GPD::Y1CPT1::Aco 包含 : • GPD :解脂耶氏酵母 GPD 启动子 (美国专利 7, 259, 255) ; • Y1CPT1 :解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶基因 (SEQ ID NO :68) (图中标记为 “CPT1” ;PCT 公开 W0 2006/052870) ; • Aco :耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 保藏号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列
PmeI/SwaI (13241-1)	FBAIN::EgD8M::Lip1, 它包含 : • FBAIN :解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子 (美国专利公开 7, 202, 356) ; • EgD8M :合成突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :22 ;专利 公布 US 2008-0138868 A1), 该酶来源于小眼虫 (“EgD8S” : 美国专利公开 7, 256, 033) ; • Lip1 :来自耶氏酵母 Lip1 基因的 Lip1 终止子序列 (GenBank 保藏号 Z50020)
PmeI/ClaI (13241-11385)	YAT1::EgD9eS::Lip2 包含 : • YAT1 :解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (图中标记为 “YAT” ; 专利公布 US 2006/0094102-A1) ; • EgD9eS :密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶基因 (SEQ ID NO :6) , 该基因来源于小眼虫 (图中标记为 “EgD9ES” ;PCT 公开 W0 2007/061742) ; • Lip2 :来自耶氏酵母 Lip2 基因 (GenBank 保藏号 AJ012632) 的 Lip2 终止子序列

[0532]

ClaI/EcoRI (11385-9648)	LoxP::Ura3::LoxP, 它包含 : • LoxP 序列 (SEQ ID NO :123) ; • 耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 保藏号 AJ306421) ; • LoxP 序列 (SEQ ID NO :123)
EcoRI/PacI (9648-6951)	EXP1::FmD12S::ACO 包含 : • EXP1 :解脂耶氏酵母输出蛋白 (EXP1) 启动子 (在图中 标记为 “Exp” ;PCT 公开 W0 2006/052870) ; • FmD12S :密码子优化的 $\Delta 12$ 延伸酶 (SEQ ID NO :56) , 该 酶来源于串珠镰刀菌 (<i>Fusarium moniliforme</i>) (图中标记为 “FD12S” ;PCT 公开 W0 2005/047485) ; • Aco :耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 保藏号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列

[0533] 将 pZKL1-2SP98C 质粒用 AscI/SphI 消化, 然后根据 “一般方法” 将其用于转化菌

株 Y4217U2。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30℃ 下维持 4 至 3 天。将单菌落再次划线至 MM 平板上,随后将其在 30℃ 下接种至液体 MM 中并以 250rpm/min 摇动 2 天。通过离心收集细胞,将其重悬浮于 HGM 中,然后以 250rpm/min 摇动 5 天。离心收集细胞,提取脂质,通过酯交换反应来制备 FAME,并随后用 Hewlett-Packard6890GC 进行分析。

[0534] GC 分析显示大多数选择的 72 个菌株生产占总脂 40-44% 的 EPA。有 6 个菌株 (即, #2、#4、#8、#9、#48 和 #58) 产生了占总脂质约 46.5%、44.5%、44.5%、44.8%、44.5% and 44.3% 的 EPA。这六个菌株分别命名为 Y4259、Y4260、Y4261、Y4262、Y4263 和 Y4264。

[0535] 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y4259 的最终基因型是: YALI0C18711g⁻、Pex10⁻、5 YALI0F24167g⁻、unknown 1⁻、unknown 3⁻、unknown 8⁻、GPD::Fmd12::Pex20、YAT1::Fmd12::OCT、GPM/FBAIN::Fmd12S::OCT、EXP1::Fmd12S::Aco、YAT1::ME3S::Pex16、EXP1::ME3S::Pex20 (2 copies)、GPAT::EgD9e::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、FBA::EgD9eS::Pex20、GPD::EgD9eS::Lip2、YAT1::EgD9eS::Lip2、FBAINm::EgD8M::Pex20、FBAIN::EgD8M::Lip1 (2 copies)、EXP1::EgD8M::Pex16、GPDIN::EgD8M::Lip1、YAT1::EgD8M::Aco、FBAIN::EgD5::Aco、EXP1::EgD5S::Pex20、YAT1::EgD5S::Aco、YAT1::RD5S::OCT、YAT1::PaD17S::Lip1、EXP1::PaD17::Pex16、FBAINm::PaD17::Aco、YAT1::Y1CPT1::ACO、15GPD::Y1CPT1::ACO。

[0536] 生成菌株 Y4259U2 (Ura⁻)

[0537] 为了中断菌株 Y4259 中的 Ura3 基因,使用构建体 pZKUM (图 8A ;SEQ ID NO :133) 以将 Ura3 突变基因整合到菌株 Y4259 的 Ura3 基因中。质粒 pZKUM 包含以下组分:

[0538] 表 15

[0539] 描述质粒 pZKUM (SEQ ID NO :133)

[0540]

SEQ ID NO :133 中的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
SalI/PacI (32845-1)	合成突变型 Ura3 基因 (SEQ ID NO :134, 其中 1459bp 的 DNA 片段包含对耶氏酵母 Ura3 编码区域 (GenBank 登陆号 AJ306421) 从 +21 至 +53 的 33bp 删除、+376 的 1bp 删除、和从 +400 至 +403 的 3bp 删除)
1112-232	ColE1 质粒复制起点
2042-1182	用于在大肠杆菌中选择的氨苄青霉素抗性基因 (AmpR)

[0541] 挑取在 MM+5-FOA 平板上生长的总共 3 个转化子,并且再次分别划线接种到 MM 平板和 MM+5-FOA 平板上。所有 3 个菌株具有 Ura⁻ 表型 (即,细胞能在 MM+5-FOA 平板上生长,但是不能在 MM 平板上生长)。从 MM+5-FOA 板上剥离细胞,提取脂质,通过酯交换反应来制备 FAME,并随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

[0542] GC 分析显示在 MM+5-FOA 平板上生长的 pZKUM 转化子 #1、#2 和 #3 中存在占总脂质 31.4%、31% 和 31.3% 的 EPA。这三个菌株分别命名为菌株 Y4259U1、Y4259U2 和 Y4259U3 (统称为 Y4259U)。

[0543] 产生菌株 Y4305 以生产占总脂质大于 53% 的 EPA

[0544] 制备构建体 pZKD2-5U89A2 (图 8B; SEQ ID NO:135) 以将一种 $\Delta 9$ 延伸酶基因、一种 $\Delta 5$ 去饱和酶基因、一种 $\Delta 8$ 去饱和酶基因和一种 $\Delta 12$ 去饱和酶基因整合到菌株 Y4259U2 的二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT2) 位点中, 从而在较高水平上生产 EPA。pZKD2-5U89A2 质粒含有如下组分:

[0545] 表 16

[0546] 描述质粒 pZKD2-5U89A2 (SEQ ID NO:135)

[0547]

SEQ ID NO:135 中的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
AscI/BsiWI (1-736)	728bp 的耶氏酵母 DGAT2 基因 5' 部分 (SEQ ID NO:93) (图中标记为 “YLDGAT5'”; 美国专利公开 7, 267, 976)
PacI/SphI (4164-3444)	714bp 的耶氏酵母 DGAT2 基因 3' 部分 (SEQ ID NO:93) (图中标记为 “YLDGAT3'”; 美国专利公开 7, 267, 976)
SwaI/BsiWI (13377-1)	YAT1::FmD12S::Lip2, 它包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (图中标记为 “YAT”; 专利公布 US 2006/0094102-A1); • FmD12S: 密码子优化的 $\Delta 12$ 延伸酶 (SEQ ID NO:56), 该酶来源于串珠镰刀菌 (<i>Fusarium moniliforme</i>) (图中标记为 “F.D12S”; PCT 公开 WO 2005/047485); • Lip2: 来自耶氏酵母 Lip2 基因 (GenBank 保藏号 AJ012632) 的 Lip2 终止子序列
PmeI/SwaI (10740-13377)	FBAIN::EgD8M::Lip1, 它包含: • FBAIN: 解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子 (美国专利公开 7, 202, 356); • EgD8M: 合成突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:22; 专利公布 US 2008-0138868 A1), 该酶来源于小眼虫 (“EgD8S”; 美国专利公开 7, 256, 033); • Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 保藏号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
ClaI/PmeI (8846-10740)	YAT1::E389D9eS::OCT, 它包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (图中标记为 “YAT”; 专利公布 US 2006/0094102-A1); • E389D9eS: 密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶 (SEQ ID NO:10), 该酶来源于小型绿藻属 CCMP389 (图中标记为 “D9ES-389”; PCT 公开 WO 2007/061742);

[0548]

	• OCT: 耶氏酵母 OCT 基因 (GenBank 保藏号 X69988) 的 OCT 终止子序列
--	---

ClaI/EcoRI (8846-6777)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 保藏号 AJ306421)
EcoRI/PacI (6777-4164)	EXP1::EgD5S::ACO, 它包含 : • EXP1 :解脂耶氏酵母输出蛋白 (EXP1) 启动子 (在图中标记为“Exp” ; PCT 公开 W0 2006/052870) ; • EgD5S :密码子优化的 $\Delta 5$ 去饱和酶 (SEQ ID NO :36), 该酶来源于小眼虫 (PCT 公开 W0 2007/136671) ; • Aco :耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 保藏号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列

[0549] 将 pZKD2-5U89A2 质粒用 AscI/SphI 消化, 然后根据“一般方法”将其用于转化菌株 Y4259U2。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30℃ 下维持 4 至 3 天。将单菌落再次划线至 MM 平板上, 随后将其在 30℃ 下接种至液体 MM 中并以 250rpm/min 摇动 2 天。通过离心收集细胞, 将其重悬浮于 HGM 中, 然后以 250rpm/min 摇动 5 天。离心收集细胞, 提取脂质, 通过酯交换反应来制备 FAME, 并随后用 Hewlett-Packard6890GC 进行分析。

[0550] GC 分析显示大多数选择的 96 个菌株生产占总脂 40-46% 的 EPA。有 4 个菌株 (即, #12、#44、#56and#93) 分别产生了占总脂质约 53.2%、46.4%、46.8% 和 47.8% 的 EPA。这四个菌株分别命名为 Y4305、Y4306、Y4307 和 Y4308。

[0551] 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y4305 的最终基因型是 SCP2-(YALI0E01298g)、YALI0C18711g-、Pex10-、YALI0F24167g-, unknown 1-、unknown 3-、unknown 8-、GPD::FmD12::Pex20、YAT1::FmD12::OCT、GPM/FBAIN::FmD12S::OCT、EXP1::FmD12S::Aco、YAT1::FmD12S::Lip2、YAT1::ME3S::Pex16、EXP1::ME3S::Pex20 (3copies)、GPAT::EgD9e::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、FBA::EgD9eS::Pex20、GPD::EgD9eS::Lip2、YAT1::EgD9eS::Lip2、YAT1::E389D9eS::OCT、FBAINm::EgD8M::Pex20、FBAIN::EgD8M::Lip1 (2 个拷贝)、EXP1::EgD8M::Pex16、GPDIN::EgD8M::Lip1、YAT1::EgD8M::Aco、FBAIN::EgD5::Aco、EXP1::EgD5S::Pex20、YAT1::EgD5S::Aco、EXP1::EgD5S::ACO、YAT1::RD5S::OCT、YAT1::PaD 17S::Lip1、EXP1::PaD17::Pex16、FBAINm::PaD17::Aco、YAT1::Y1CPT1::ACO、GPD::Y1CPT1::ACO。

[0552] 实施例 4

[0553] 测定解脂耶氏酵母菌株 Y4128 的总脂质含量

[0554] 菌株 Y4128 生产的脂质总量和脂质中的每种脂肪酸的百分比通过 GC 分析进行测量。具体地讲, 如一般方法所述, 提取总脂, 通过酯交换反应来制备 FAME, 并随后用 Hewlett-Packard 6890 GC 进行分析。

[0555] 干细胞重量如下进行测定: 从 10mL 培养物中经由离心收集细胞, 用水洗涤细胞一次以移除残余培养基, 在 80℃ 真空炉中干燥细胞过夜, 称量干细胞重量。样本中的 FAME 总量通过比较 GC 特征图中的所有峰面积与加入的已知量内部标准品 C15:0 脂肪酸的峰面积进行测定。

[0556] 基于上述分析, 测定菌株 Y4086 和 Y4128 的以干细胞重量百分比形式表示的脂质

含量 (DCW) 和脂质组合物。菌株 Y4128 与菌株 Y4086 相比脂质含量降低 (11.2TFA% DCW 对 28.6TFA% DCW)。相反地, 菌株 Y4128 与菌株 Y4086 相比脂质中的 EPA 浓度提高, 如下表 17 所示。将脂肪酸鉴定为 18:0 (硬脂酸)、18:1 (油酸)、LA、ALA、EDA、DGLA、ETra、ETA 和 EPA; 脂肪酸组成表示为总脂肪酸的重量百分比 (wt. %) (TFA)。

[0557] 表 17

[0558] 在解脂耶氏酵母菌株 Y4086 和 Y4128 中的脂质组合物

[0559]

样本	18:0	18:1	18:2 [LA]	18:3(n-3) [ALA]	20:2 [EDA]	20:3 (n-6) [DGLA]	20:3 (n-3) [ETra]	20:4 (n-3) [ETA]	20:5(n-3) [EPA]
Y4086	4.6	26.8	28.0	6.9	7.6	0.9	4.9	2.0	9.8
Y4128	1.8	6.7	19.6	1.8	4.2	3.4	1.5	6.0	42.8

[0560] 细胞中的 EPA 含量以 mg EPA/g 干细胞形式表示, 并且按照下式计算: (% EPA/ 脂质) * (% 脂质 / 干细胞重量) * 0.1, 从菌株 Y4086 中的 28mg EPA/g DCW 提高到菌株 Y4128 中的 47.9mg EPA/g DCW。

[0561] 因此, 表 17 中的结果显示与亲本菌株 Y4086 相比, 菌株 Y4128 具有更低的总脂质含量 (TFA% DCW) (11.2% 对 28.6%), 更高的 EPA% TFA (42.8% 对 9.8%), 和更高的 EPA% DCW (4.8% 对 2.8%)。此外, 菌株 Y4128 的 EPA 相对于总 PUFA 的量提高了 3.3 倍 (54% 的 PUFA [% TFA] 对 16.3% 的 PUFA [% TFA]), 而 C20PUFA 相对于总 PUFA 的量提高了 1.7 倍 (73% 的 PUFA [% TFA] 对 42% 的 PUFA [% TFA])。

[0562] 实施例 5

[0563] 测定在解脂耶氏酵母菌株 Y4128 中的整合位点 pZP2-2988 发生 Pex10 整合

[0564] 菌株 Y4128 中的 pZP2-2988 基因组整合位点通过基因组步移法, 使用来自 Clontech (Palo Alto, CA) 的 Universal GenomeWalker™ 试剂盒, 按照制造商推荐的规程进行测定。基因质粒序列, 设计以下引物 10 用于基因组步移法: pZP-GW-5-1 (SEQ ID NO: 136)、pZP-GW-5-2 (SEQ ID NO: 137)、pZP-GW-5-3 (SEQ ID NO: 138)、pZP-GW-5-4 (SEQ ID NO: 139)、pZP-GW-3-1 (SEQ ID NO: 140)、pZP-GW-3-2 (SEQ ID NO: 141)、pZP-GW-3-3 (SEQ ID NO: 142) 和 pZP-GW-3-4 (SEQ ID NO: 143)。

[0565] 使用 Qiagen Miniprep 试剂盒用改进规程从菌株 Y4128 中制备基因组 DNA。从 YPD 培养基平板上刮除细胞并置于 1.5mL 微管中。将细胞沉淀物 (100 μL) 用 250 μL 缓冲液 P1 重悬, 该缓冲液 P1 包含 0.125M β-巯基乙醇和 1mg/mL 酵母裂解酶 20T (MP Biomedicals, Inc., Solon, OH)。细胞悬浮液在 37°C 培养 30 分钟。然后将缓冲液 P2 (250 μL 加到管中。在将管颠倒几次进行混合后, 加入 350 μL 缓冲液 N3。然后将微管中的混合物在 14,000rpm 下离心 5 分钟。将上清液注入 Qiagen 小量制备离心柱中, 离心 1 分钟。加入 0.75mL 缓冲液 PE 洗涤一次柱子, 然后在 14,000rpm 下离心 1 分钟。在 14,000rpm 下再离心 1 分钟干燥该柱。通过加入 50 μL 的缓冲液 EB 到柱中洗脱基因组 DNA, 允许静置 1 分钟并在 14,000rpm

下离心 1 分钟。

[0566] 使用纯化的基因组 DNA 进行基因组步移法。按照 GenomeWalker 试剂盒的规程, 用限制性酶 DraI、EcoRV、PvuII 和 StuI 分别消化 DNA。就每次消化而言, 反应混合物包含 10 μ L 10X 限制缓冲液, 10 μ L 适用的限制性酶和 8 μ g 基因组 DNA, 总体积为 100 μ L。反应混合物在 37°C 下培养 4 小时。然后使用 Qiagen PCR 纯化试剂盒, 严格按照制造商规程纯化经消化的 DNA 样本。DNA 样本用 16 μ L 水洗脱。然后将纯化的经消化基因组 DNA 样本连接到基因组步移接头上(下文)。每个连接混合物包含 1.9 μ L 基因组步移接头, 1.6 μ L 10X 连接缓冲液, 0.5 μ L T4DNA 连接酶和 4 μ L 消化过的 DNA。反应混合物在 16°C 下培养过夜。然后将 72 μ L 的 50mM TrisHCl, 1mM EDTA, pH7.5 加到每个连接混合物中。

[0567] 就 5' 末端基因组步移法而言, 使用 1 μ L 的每个连接混合物作模板进行四个 PCR 反应。此外, 每个反应混合物包含 1 μ L 的 10 μ M 引物 pZP-GW-5-1 (SEQ ID NO:136), 1 μ L 的 10 μ M 试剂盒配送的 GenomeWalker 接头, 41 μ L 水, 5 μ L 10X cDNA PCR 反应缓冲液和 1 μ L 来自 Clontech 的 Advantage cDNA 聚合酶混合物。Genome Walker 接头序列 (SEQ ID NOs: 144[顶链] 和 145[底链]) 显示如下:

[0568] 5' -GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGT-3'

[0569] 3' -H2N-CCCGACCA-5'

[0570] PCR 条件如下: 95°C 1 分钟, 随后是 30 个 95°C 20 秒和 68°C 3 分钟的循环, 最后在 68°C 延伸 7 分钟。将 PCR 产物每个进行 1:100 的稀释, 并且将 1 μ L 稀释 PCR 产物用作模板进行第二轮 PCR。条件是相同的, 不同的是 pZP-GW-5-2 (SEQ ID NO:137) 置换 pZP-GW-5-1 (SEQ ID NO:136)。

[0571] 就 3' - 末端基因组步移而言, 如上文所述进行四个 PCR 反应, 不同的是使用引物 pZP-GW-3-1 (SEQ ID NO:140) 和巢式接头引物 (SEQ ID NO:146)。PCR 产物同样进行稀释并用作第二轮 PCR 的模板, 使用 pZP-GW-3-2 (SEQ ID NO:141) 置换 pZP-GW-3-1 (SEQ ID NO:140)。

[0572] 通过凝胶电泳分析 PCR 产物。使用 EcoRV 消化的基因组 DNA 作模板和引物 pZP-GW-3-2 以及巢式接头引物, 一种反应产物生成 ~1.6kb 的片段。分离该片段, 用 Qiagen 凝胶纯化试剂盒纯化并克隆到 pCR2.1-TOPO 中。序列分析显示该片段包括两部分: 质粒 pZP2-2988 和耶氏酵母属来自染色体 C 的基因组 DNA。它们在染色体 C 的核苷酸位点 139826 上接合。这位于 Pex10 基因的编码区内部 (GenBank 保藏号 CAG81606)。

[0573] 为了测定接合的 5' 末端, 使用来自菌株 Y4128 的基因组 DNA 作模板以及引物 Per10 F1 (SEQ ID NO:147) 和 ZPGW-5-5 (SEQ ID NO:148) 进行 PCR 扩增。反应混合物包括 1 μ L 的每个均为 20 μ M 的引物, 1 μ L 基因组 DNA, 22 μ L 水和 25 μ L TaKaRa ExTaq 2X 预混物 (TaKaRa Bio Inc., Otsu Shiga, Japan)。热循环仪条件是: 94°C 1 分钟, 然后为 30 个循环的 94°C 20 秒、55°C 20 秒和 72°C 2 分钟, 随后在 72°C 进行 7 分钟最后的延伸反应。扩增了 1.6kb 的 DNA 片段并将其克隆到 pCR2.1-TOPO 中。序列分析显示它是一个嵌合片段, 该片段位于耶氏酵母属来自染色体 C 的基因组 DNA 和 pZP2-2988 之间。接合位于染色体 C 的核苷酸位点 139817。因此, 染色体 C 的 10 个核苷酸的片段被来自菌株 Y4128 中的 pZP2-2988 (图 6A) 的 AscI/SphI 片段置换。因此, 菌株 Y4128 中的 Pex10 缺少编码蛋白 (SEQ ID NO:120) 的最后 32 个氨基酸。

[0574] 基于上述结论,实施例 3 中分离的 Y4128U 菌株(同上)后来将称为 Δ pex10 菌株。为清楚起见,菌株 Y4128U1 等同于菌株 Y4128U1(Δ pex10)。

[0575] 实施例 6

[0576] 在解脂耶氏酵母菌株 Y4128U1(Δ pex10) 中的 Pex10 质粒表达

[0577] 构建递送解脂耶氏酵母 Pex10 基因的三个质粒:1)pFBAIn-PEX10 允许 Pex10 ORF 在 FBAInm 启动子控制下表达;和 2)pPEX10-1 和 pPEX10-2 允许在天然 Pex10 启动子控制下表达 Pex10,虽然 pPEX10-1 使用较短版本(~ 500 bp)的启动子而 pPEX10-2 使用较长版本(~ 900 bp)的启动子。在构建这些表达质粒并转化后,测定 Pex10 质粒表达对解脂耶氏酵母菌株 Y4128U1(Δ pex10) 总油和 EPA 水平的效应。删除 Pex10 导致细胞中以 TFA 百分比形式表示的 EPA 的量提高,但是以 DCW 百分比形式表示的总脂质的量降低。

[0578] 构建 pFBAIn-PEX10、pPEX10-1 和 pPEX10-2

[0579] 为了构建 pFBAIn-PEX10,使用引物 Per10 F1(SEQ ID NO:147) 和 Per10 R(SEQ ID NO:149),使用解脂耶氏酵母基因组 DNA 作模板扩增 Pex 10 基因的编码区。PCR 反应混合物包含 1 μ L 的每个均为 20 μ M 的引物,1 μ L 解脂耶氏酵母基因组 DNA(~ 100 ng),25 μ L ExTaq2X 预混物和 22 μ L 水。反应如下进行:94 $^{\circ}$ C 1 分钟,然后为 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 20 秒、55 $^{\circ}$ C 20 秒和 72 $^{\circ}$ C 90 秒,之后在 72 $^{\circ}$ C 进行 7 分钟最终延伸反应。PCR 产物是一个 1168bp 的 DNA 片段,它用 Qiagen PCR 纯化试剂盒进行纯化,用 WcoI 和 WotI 消化,并克隆到用相同的两种限制性酶消化的 pFBAIn-MOD-1(SEQ ID NO:150;图 9A) 中。

[0580] 8 个单克隆进行序列分析,2 个具有无错的正确 Pex10 序列。pFBAIn-PEX10(SEQ ID NO:151;图 9B) 组分在下表 18 中列出。

[0581] 表 18

[0582] 质粒 pFBAIn-PEX10(SEQ ID NO:151) 的组分

[0583]

SEQ ID NO:151 中的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
SglIII-SsiWI (6040-318)	FBAInm::Pex10::Pex20,它包含: • FBAInm:解脂耶氏酵母 FBAInm 启动子(美国专利 7,202,356); • Pex10:解脂耶氏酵母 Pex10 ORF(GenBank 保藏号 AB036770,核苷酸 1038-2171;SEQ ID NO:104); • Pex20:来自耶氏酵母 Pex20 基因(GenBank 保藏号 AF054613)的 Pex20 终止子序列
PacI-SglIII (4530-6040)	耶氏酵母属 URA3(GenBank 保藏号 AJ306421)
(3123-4487)	耶氏酵母自主复制序列 18(ARS18;GenBank 保藏号 A17608)
(2464-2864)	f1 复制起点

(1424-2284)	用于在大肠杆菌中选择的氨苄青霉素抗性基因 (Amp ^R)
(474-1354)	ColEI 质粒复制起点

[0584] 为了构建 pPEX10-1 和 pPEX10-2, 设计并合成引物 PEX10-R-BsiWI (SEQ ID NO : 152)、PEX10-F1-SalI (SEQ ID NO : 153) 和 PEX10-F2-SalI (SEQ ID NO : 154)。使用基因组解脂耶氏酵母 DNA 和引物 PEX10-R-BsiWI 和 PEX10-F1-SalI 进行的 PCR 扩增生成一个 1873bp 的片段, 该片段包含 Pex10 ORF, Pex10 基因的 500bp 的 5' 上游区域和 215bp 的 3' 下游区域, 该基因的两端侧接 SalI 和 SsiWI 限制性位点。该片段用 Qiagen PCR 纯化试剂盒进行纯化, 用 SalI 和 SsiWI 消化, 并克隆到用相同的两种酶消化的 pEXP-MOD-1 (SEQ ID NO : 155 ; 图 10A) 中以生成 pPEX10-1 (SEQ ID NO : 156 ; 图 12B)。质粒 pEXP-MOD1 类似于 pFBAln-MOD-1 (SEQ ID NO : 150 ; 图 9A), 不同的是后者的 FBAlnm 启动子被 EXP1 启动子置换。表 19 列出 pPEX10-1 的组分。

[0585] 表 19

[0586] 质粒 pPEX10-1 (SEQ ID NO : 156) 的组分

[0587]

SEQ ID NO : 156 中的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
SalI-SsiWI (5705-1)	Pex10-5' ::Pex10::Pex10-3' 包含 : • Pex10-5' : 500bp 的解脂耶氏酵母 Pex10 基因的 5' 启动子区 (GenBank 保藏号 AB036770) ; • Pex10 : 解脂耶氏酵母 Pex10 ORF (GenBank 保藏号 AB036770, 核苷酸 1038-2171 ; SEQ ID NO : 104) ; • Pex10-3' : 来自耶氏酵母属 Pex10 基因的 215bp 的 Pex10 终止子序列 (GenBank 保藏号 AB036770) [注意图中的整个 Pex10-5' ::Pex10::Pex10-3' 表达盒统一标记成 “PEX10”]
PacI-SalI (4216-5703)	耶氏酵母属 URA3 基因 (GenBank 保藏号 AJ306421)
(2806-4170)	耶氏酵母自主复制序列 18 (ARS18 ; GenBank 保藏号 M91600) (GenBank 保藏号 A17608)
(2147-2547)	f1 复制起点
(1107-1967)	用于在大肠杆菌中选择的氨苄青霉素抗性基因 (Amp ^R)
(157-1037)	ColEI 质粒复制起点

[0588] 使用 PEX10-R-BsiWI (SEQ ID NO : 152) 和 PEX10-F2-SalI (SEQ ID NO : 154) 对解脂耶氏酵母基因组 DNA 进行 PCR 扩增生成一个 2365bp 的片段, 该片段包含 Pex10 ORF, Pex10 基因的 991bp 的 5' 上游区域和 215bp 的 3' 下游区域, 该基因的两端侧接 SalI 和 SsiWI 限

制性位点。用 Qiagen PCR 纯化试剂盒纯化该片段,用 SalI 和 SsiWI 进行消化,然后将其克隆到进行了相似消化的 pEXP-MOD-1 中。这导致合成 pPEX10-2 (SEQ ID NO:157),其构建类似于质粒 pPEX10-1 的构建 (表 19, 同上),除了在嵌合 Pex10-5'::Pex10::Pex10-3' 基因中有更长的 Pex10-5' 启动子。

[0589] 在菌株 Y4128U1 (Δ pex10) 中表达 Pex10

[0590] 按照一般方法中的规程将质粒 pFBAIN-MOD-1 (对照;SEQ IDNO:150)、pFBAIN-PEX10 (SEQ ID NO:151)、pPEX10-1 (SEQ IDNO:156) 和 pPEX10-2 (SEQ ID NO:157) 转化到 Y4128U1 (Δ pex10) 中。将转化子置于 MM 平板上。递送上述质粒的总脂质含量和转化子的脂肪酸组合物如实施例 4 所述进行分析。

[0591] 下表 20 显示以干细胞重量 (TFA% DCW) 百分比显示的脂质含量和脂质组合物。具体地讲,将脂肪酸鉴定为 18:0 (硬脂酸)、18:1 (油酸)、LA、ALA、EDA、DGLA、ETrA、ETA 和 EPA;脂肪酸组成表示为总脂肪酸的重量百分比 (wt. %)。

[0592]

表 20

在用多个 Pex10 质粒转化过的解脂耶氏酵母菌株 Y412BU1 (Δ pex10) 中的脂质组合物

质粒	TFA% DCW	18:0	18:1	18:2 [LA]	18:3 (ω 3) [ALA]	20:2 [EDA]	20:3 (ω 6) [DGLA]	20:3 (ω 3) [ETra]	20:4 (ω 3) [ETA]	20:5 (ω 3) [EPA]
pFBAIN-MOD-1	22.8	1.9	9.6	18.3	2.0	4.3	2.3	2.1	5.9	27.7
pFBAIN-PEX10	29.2	4.0	24.9	25.1	7.6	6.6	1.0	5.3	3.6	10.8
pPEX10-1	27.1	3.9	25.0	25.2	8.2	6.4	0.9	5.2	3.5	10.7
pPEX10-2	28.5	4.3	25.4	24.5	7.6	6.4	1.0	5.3	3.4	10.8

[0593] 表 20 中的结果显示在 Y4128U1 (Δ pex10) 中从天然解脂耶氏酵母 Pex10 启动子或从解脂耶氏酵母 FBAINm 启动子表达 Pex10, 将 EPA 百分比降低至 Y4086 的水平, 同时提高总

脂质含量 (TFA% DCW) 5 到 Y4086 的水平 (参见表 17 数据用于比较)。每克干细胞的 EPA 含量从对照样本中 (即, 递送 pFBAln-MOD-1 的细胞) 的 63.2mg 变成递送 pFBAln-PEX10 的细胞中的 31.5mg、递送 pPEX10-1 的细胞中的 29mg 以及递送 pPEX10-2 的细胞中的 30.8mg。这些结果证明中断 Pex10 的环指结构域提高细胞中的 EPA 的量但降低细胞中的总脂质含量。

[0594] 因此, 表 20 的结果显示与具有对照质粒的 Y4128U1 (Δ pex10) 转化子相比, 所有具有 Pex10 表达质粒的转化子显示更高的脂质含量 (TFA% DCW) ($> 27\%$ 对 22.8%), 更低 EPA% TFA (ca. 10.8% 对 27.7%), 和更低的 EPA% DCW ($< 3.1\%$ 对 6.3%)。此外, 具有对照质粒的菌株 Y4128U1 (Δ pex10) 转化子与那些具有 Pex10 表达质粒的转化子相比, EPA 相对于总 PUFA 的量提高了 2.5 倍 (44% 的 PUFA[% TFA] 对 17.5% (avg) 的 PUFA[% TFA]), C20PUFA 相对于总 PUFA 的量提高了 1.5 倍 (67% 的 PUFA[% TFA] 对 44% (avg) 的 PUFA[% TFA])。

[0595] 实施例 7

[0596] 产生解脂耶氏酵母菌株 Y4184U 以生产 EPA

[0597] 解脂耶氏酵母菌株 Y4184U 用作实施例 8 中的宿主, 下文菌株 Y4184U 来源于解脂耶氏酵母 ATCC #20362, 并且能够经由 $\Delta 9$ 延伸酶/A8 去饱和酶途径的表达生产相对于总脂质的高水平 EPA。该菌株具有 Ura⁻ 表型并且其构建如 PCT 公开 WO 2008/073367 的实施例 7 所述, 该文献以引用方式并入本文。

[0598] 然而概括地说, 菌株 Y4184U 的产生需要构建菌株 Y2224、菌株 Y4001、菌株 Y4001U、菌株 Y4036、菌株 Y4036U 和菌株 Y4069 (如上文实施例 1 所述)。进一步产生菌株 Y4184U (在图 11B 用图表表示) 需要生成菌株 Y4084、菌株 Y4084U1、菌株 Y4127 (在 2007 年 11 月 29 日保藏于美国典型培养物保藏中心, 保藏号 ATCC PTA-8802)、菌株 Y4127U2、菌株 Y4158、菌株 Y4158U1 和菌株 Y4184。

[0599] 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC #20362 的菌株 Y4184 (生产占总脂质 31% 的 EPA) 的最终基因型是 unknown 1⁻、unknown 2⁻、unknown 4⁻、unknown 5⁻、unknown 6⁻、unknown 7⁻、YAT1::ME3S::Pex16、EXP1::ME3S::Pex20 (2 拷贝)、GPAT::EgD9e::Lip2、FBAlNm::EgD9eS::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、FBA::EgD9eS::Pex20、YAT1::EgD9eS::Lip2、GPD::EgD9eS::Lip2、GPDIN::EgD8M::Lip1、YAT 1::EgD8M::Aco、EXP1::EgD8M::Pex16、FBAlNm::EgD8M::Pex20、FBAlN::EgD8M::Lip1 (2 拷贝)、GPM/FBAlN::FmD12S::Oct、EXP1::FmD12S::Aco、YAT1::FmD12::Oct、GPD::FmD 12::Pex20、EXP1::EgD5S::Pex20、YAT1::EgD5S::Aco、YAT1::Rd5S::Oct、FBAlN::EgD5::Aco、FBAlNm::PaD17::Aco、EXP1::PaD17::Pex16、YAT1::PaD17S::Lip1、YAT1::Y1CPT1::Aco、GPD::Y1CPT1::Aco。

[0600] 最后, 为了中断菌株 Y4184 中的 Ura3 基因, 制备构建体 pZKUE3S (图 6B; SEQ ID NO: 130) 以将 EXP1::ME3S::Pex20 嵌合基因整合到菌株 Y4184 的 Ura3 基因中以分别生成菌株 Y4184U1 (占总脂质 11.2% 的 EPA)、Y4184U2 (占总脂质 10.6% 的 EPA) 和 Y4184U4 (占总脂质 15.5% 的 EPA) (统称为 Y4184U)。

[0601] 实施例 8

[0602] 解脂耶氏酵母菌株 Y4184U4 中的 Pex10 染色体删除提高 EPA 积聚和总脂质含量

[0603] 构建体 pYPS161 (图 11B, SEQ ID NO:158) 用于从生产 EPA 的耶氏酵母菌株 Y4184U4 中敲除染色体 Pex10 基因 (实施例 7)。用 Pex10 敲除构建体转化脂耶氏酵母菌株 Y4184U4 导致生成菌株 Y4184 (Δ pex10)。测定并比较 Pex10 敲除对总油和 EPA 水平的效应。具体地讲,敲除 Pex10 导致细胞中 EPA (% TFA 和 % DCW) 百分比提高和总脂质含量提高。

[0604] 构建体 pYSP161

[0605] 构建体 pYPS161 包含以下组分:

[0606] 表 21

[0607] 质粒 pYPS161 (SEQ ID NO:158) 的描述

[0608]

SEQ ID NO:158 中的 RE 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
AscI/BsiWI (1521-157)	耶氏酵母属 Pex10 基因的 1364bp 的 Pex10 敲除片段 #1 (GenBank 保藏号 AB036770)
PacI/SphI (5519-4229)	耶氏酵母属 Pex10 基因的 1290bp 的 Pex10 敲除片段 #2 (GenBank 保藏号 AB036770)
SaII/EcoRI (7170-5551)	耶氏酵母属 URA3 基因 (GenBank 保藏号 AJ306421)
2451-1571	ColEI 质粒复制起点
3369-2509	用于在大肠杆菌中选择的氨苄青霉素抗性基因 (Amp ^R)
3977-3577	f1 复制起点

[0609] 生成解脂耶氏酵母基因敲除菌株 Y4184 (Δ Pex10)

[0610] 用于转化脂耶氏酵母菌株 Y4184U4 (实施例 7) 的如一般方法所述的标准规程使用 Pex10 敲除构建体 pYPS161 的纯化 5.3kBAscI/SphI 片段 (同上),并且还制备了细胞单独对照。在每个转化实验中有 ~ 200 至 250 个菌落存在,然而在细胞单独平板上无菌落存在 (每期望值)。

[0611] 菌落 PCR 用于筛选具有 Pex10 删除的细胞。具体地讲,PCR 反应使用 MasterAmp Taq 聚合酶 (Epicentre Technologies, Madison, WI),使用 PCR 引物 Pex-10del1 3' . 正向 (SEQ ID NO:159) 和 Pex-10del2 5' . 反向 (SEQ ID NO:160),按照标准 20 规程进行。PCR 反应条件为 94°C 5 分钟,然后 30 个循环的 94°C 30 秒、60°C 30 秒和 72°C 2 分钟,之后在 72°C 进行 6 分钟的最终延伸反应。该反应然后保持在 4°C。如果 Pex10 基因敲除构建体在 Pex10 区域整合,期望生成长度为 2.8KB 的单一 PCR 产物。相反地,如果该菌株在除 Pex10 区域之外的染色体区域内整合 Pex10 基因敲除构建体,然后将生成两个 PCR 片段,即 2.8kB 和 1.1kB 的片段。在 288 个筛选的菌落中,大部分菌落具有在随机位点整合的 Pex10 基因敲除构建体。288 个菌落中仅有一个菌落包含 Pex10 敲除。将该菌株命名为 Y4184 (Δ pex10)。

[0612] 评估解脂耶氏酵母菌株 Y4184 和 Y4184(Δ Pex10) 的总油和 EPA 产量

[0613] 为了评估 Pex10 基因敲除对总脂质级分中的 PUFA 百分比和细胞中的总脂质含量的效应,菌株 Y4184 和 Y4184(Δ Pex10) 在可比较的含油条件下生长。具体地讲,培养物在初始 OD600 为 ~ 0.1 的情况下开始生长,在含有 25mL 发酵培养基 (FM) 或无酵母提取物 (FM 无 YE) 的 FM 培养基的 250mL 烧瓶中生长 48 小时。在 50mL 圆锥管中,以 8000rpm 离心 10 分钟收获细胞。弃去上清液,将细胞重悬于 25mL HGM 中并转移到新的 250mL 烧瓶中。细胞在 30℃透气培养另外 120 小时。

[0614] 为了测定干细胞重量 (DCW),处理来自 5mL FM 生长培养基和 10mL 无 YE 生长培养物的 FM 的细胞。培养的细胞在 4300rpm 下离心 10 分钟。使用 10mL 生理盐水重悬沉淀物并在相同条件下二次离心。然后用 1mL 无菌 H₂O (第三次) 重悬沉淀物,将其转移到预先称重的铝盘中。细胞在 80℃真空炉中干燥过夜。测量细胞重量。

[0615] 递送上述质粒的总脂质含量和转化子的脂肪酸组合物如实施例 4 所述进行分析。

[0616] DCW、总脂质含量 (TFA% DCW)、总 EPA% TFA、和 EPA% DCW 在下表 25 中显示。

[0617] 表 22

[0618] 在解脂耶氏酵母菌株 Y4184 和 Y4184 中的脂质组合物 (Δ Pex10)

[0619]

培养基	菌株	DCW	TFA % DCW	EPA % TFA	EPA % DCW
FM	Y4184	11.5	11.8	20.6	2.4
	Y4184 (Δ Pex10)	11.5	17.6	43.2	7.6
FM 无 YE	Y4184	4.6	8.8	23.2	2.0
	Y4184 (Δ Pex10)	4.0	13.2	46.1	6.1

[0620] 表 22 中的结果显示敲除 Y4184(Δ Pex10) 中的染色体 Pex10 基因与菌株 Y4184 中的 EPA 百分比和总油含量相比提高 EPA 百分比 (% TFA 和 % DCW) 并提高总油含量,菌株 Y4184 的天然 Pex10p 未被敲除。更具体地讲,在 FM 培养基中,EPA(% TFA) 有约 109% 的提高,EPA 产量 (% DCW) 有约 216% 的提高,总油量 (TFA% DCW) 有约 49% 的提高。在无 YE 的 FM 培养基中,EPA(% TFA) 有约 100% 的提高,EPA 产量 (% DCW) 有约 205% 的提高,总油量 (TFA% DCW) 有约 50% 的提高。

[0621] 因此,表 22 中的结果显示与亲本菌株 Y4184 相比,Y4184(Δ Pex10) 菌株在 FM 培养基中具有更高的脂质含量 (TFA% DCW) (17.6% 对 11.8%),更高的 EPA% TFA(43.2% 对 20.6%),和更高的 EPA% DCW(7.6% 对 2.4%)。同样的,与亲本菌株 Y4184 相比,Y4184(Δ Pex10) 菌株在无 YE 的 FM 培养基中具有更高的脂质含量 (TFA% DCW) (13.2% 对 8.8%),更高的 EPA% TFA(46.1% 对 23.2%),和更高的 EPA% DCW(6.1% 对 2.0%)。

[0622] 本领域的技术人员能够容易地工程化合适的基因敲除构建体 (类似于 pYPS161) 以使得替代染色体 Pex 敲除基因通过转化进入亲本解脂耶氏酵母菌株。优选的 Pex 基因将

包括:Pex1p(GenBank 保藏号 CAG82178 ;SEQ ID NO :95)、Pex2p(GenBank 保藏号 CAG77647 ;SEQ ID NO :96)、Pex3p(GenBank 保藏号 CAG78565 ;SEQ ID NO :97)、Pex3Bp(GenBank 保藏号 CAG83356 ;SEQ ID NO :98)、Pex4p(GenBank 保藏号 CAG79130 ;SEQ ID NO :99)、Pex5p(GenBank 保藏号 CAG78803 ;SEQ ID NO :100)、Pex6p(GenBank 保藏号 CAG82306 ;SEQ ID NO :101)、Pex7p(GenBank 保藏号 CAG78389 ;SEQ ID NO :102)、Pex8p(GenBank 保藏号 CAG80447 ;SEQ ID NO :103)、Pex12p(GenBank 保藏号 CAG81532 ;SEQ ID NO :105)、Pex13p(GenBank 保藏号 CAG81789 ;SEQ ID NO :106)、Pex14p(GenBank 保藏号 CAG79323 ;SEQ ID NO :107)、Pex16p(GenBank 保藏号 CAG79622 ;SEQ ID NO :108)、Pex17p(GenBank 保藏号 CAG84025 ;SEQ ID NO :109)、Pex19p(GenBank 保藏号 AAK84827 ;SEQ ID NO :110)、Pex20p(GenBank 保藏号 CAG79226 ;SEQ ID NO :111)、Pex22p(GenBank 保藏号 15CAG77876 ;SEQ ID NO :112) 和 Pex26p(GenBank 保藏号 NC_006072,核苷酸 117230-118387 的反义翻译 ;SEQ ID NO :113)。

[0623] 期望的是染色体中断 Pex 基因将导致与天然过氧化物酶体生物合成因子蛋白未被中断的真核生物相比,在总脂质级分和油级分中积聚的以总脂肪酸百分比形式表示的 PUFA 量增加,其中所述 PUFA 量可能是:1) 以功能性 PUFA 生物合成途径所需终产品形式产生的 PUFA,与以中间体或副产品形式(例如 EPA)产生的 PUFA 相反,2) C20 和 C22PUFA,和/或 3) 总 PUFA。优选的结果是与天然过氧化物酶体生物合成因子蛋白未被中断的真核生物相比,不但以总脂肪酸百分比表示的 PUFA 量提高,而且以干细胞重量百分比形式表示的 PUFA 量也提高。此外,PUFA 量可能是:1) 以功能性 PUFA 生物合成途径所需终产品形式产生的 PUFA,与以中间体或副产品形式产生的 PUFA 相反,2) C20 和 C22PUFA,和/或 3) 总 PUFA。在一些情况下,相对于未中断天然过氧化物酶体生物合成因子蛋白的真核生物,总脂质含量也将提高。

[0624] 实施例 9

[0625] 测定解脂耶氏酵母菌株 Y4305 中的整合位点 pZKD2-5U89A2、pZP3-PA777U 和 pZKL2-5U89GC

[0626] 解脂耶氏酵母菌株 Y4305 中的基因组整合位点 pZKD2-5U89A2、pZP3-PA777U 和 pZKL2-5U89GC 通过基因组步移法,使用来自 Clontech 的 Universal GenomeWalker™ 试剂盒进行测定,该方法类似于实施例 5 所述的用于鉴定解脂耶氏酵母菌株 Y4128 中的整合位点 pZP2-2988 的方法。

[0627] 基因组步移法鉴定 pZKD2-5U89A2 整合位点

[0628] 基于 pZKD2-5U89A2 序列(SEQ ID NO :135)设计引物 KL2-3-1(SEQ ID NO :161)和 KD2-3-2(SEQ ID NO :162)以鉴定整合构建体 3' -末端的整合位点(即,解脂耶氏酵母 DGAT2 基因[SEQ ID NO :93]的 3' 侧接区)。

[0629] 使用 Qiagen Miniprep 试剂盒,用实施例 5 中所述的改进规程从菌株 Y4305 中制备基因组 DNA。在分离基因组 DNA 后,依照实施例 5 的方法用 DraI、EcoRV、PvuII 和 StuI 进行限制性酶消化,随后进行纯化并连接到基因组步移法接头上(SEQ ID NO :144 和 145)。

[0630] 就基因组步移法而言,使用 1 μ L 的每个连接混合物作模板进行四个 PCR 反应。此外,每个反应混合物包含 1 μ L 的 10 μ m 引物 KL2-3-1(SEQ ID NO :161),1 μ L 的 10 μ m 试剂盒配送的接头引物(SEQ ID NO :144 and 145),41 μ L 水,5 μ L 10X cDNA PCR 反应缓冲液

和 1 μ L 来自 Clontech 的 Advantage cDNA 聚合酶混合物。PCR 条件如下:95 $^{\circ}$ C 1 分钟,随后是 30 个 95 $^{\circ}$ C 20 秒和 68 $^{\circ}$ C 3 分钟的循环,最后在 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟。将 PCR 产物每个进行 1 : 100 的稀释,并且将 1 μ L 稀释 PCR 产物用作模板进行第二轮 PCR。条件是完全相同的,不同的是 KD2-3-2(SEQ ID NO:162) 置换 KL2-3-1(SEQ ID NO:161)。

[0631] 来自第二轮的 PCR 产物用凝胶电泳进行分析。一种反应产物包含一个 $\sim$ 560bp 的片段。将该片段用 Qiagen 凝胶纯化试剂盒分离、纯化,克隆进 pCR2.1-TOPO(Invitrogen)中。序列分析显示该片段包括两部分:质粒 pZKD2-5U89A2 和一部分解脂耶氏酵母来自染色体 E 的基因组 DNA。它们在染色体 E 的核苷酸位点 150905 上接合。这位于 SCP2 基因的编码区内部(SEQ ID NO:87;GenBank 保藏号 XM_503410)。

[0632] 为了测定接合的 5' 末端,使用来自菌株 Y4305 的基因组 DNA 作模板以及引物 SCP-5-2(SEQ ID NO:163) 和 KD2-5-3(SEQ ID NO:164) 进行 PCR 扩增。反应混合物包括 1 μ L 的每个均为 20 μ M 的引物,1 μ L 基因组 DNA,22 μ L 水和 25 μ L TaKaRa ExTaq 2X 预混物(TaKaRaBio.Inc., Shiga, Japan)。热循环仪条件是:94 $^{\circ}$ C 1 分钟,然后为 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 20 秒、55 $^{\circ}$ C 20 秒和 72 $^{\circ}$ C 1 分钟,随后在 72 $^{\circ}$ C 进行 7 分钟最后的延伸反应。扩增了 $\sim$ 900kb 的 DNA 片段并将其克隆到 pCR2.1-TOPO 中。

[0633] 序列分析揭示存在一个 844bp 的嵌合片段(SEQ ID NO:173),该片段包含:1) 一部分来自染色体 E 的解脂耶氏酵母基因组 DNA;2) 长度为 303 个核苷酸的未知 DNA 片段(SEQ ID NO:174),该片段与 NCBI 数据库中的任何已知序列无同源性;和 3) 来自 pZKD2-5U89A2(SEQ ID NO:135) 的 AscI/SphI 片段的 5' 末端。接合位于染色体 E 的核苷酸位点 150901。因此,染色体 E 的三 bp 核苷酸的片段被未知 DNA 片段和来自菌株 Y4305 的 pZD2-5U89A2 的 AscI/SphI 片段置换。因此,SCP2 基因在长度为 129 个氨基酸的蛋白的密码子 71 后被中断。所得截短的 SCP2 ORF 在 C 末端缺少 58 个密码子。

[0634] 基因组步移法鉴定 pZP3-PA777U 整合位点

[0635] 为 pZP3-PA777U 设计以下引物:79-5-POX-1(SEQ ID NO:165) 和 79-5-POX-2(SEQ ID NO:166)。在 pZKD2-5U89A2 的情况下使用如上所述的相同一组 Y4305 基因组 DNA 连接混合物进行用于 5' 插入接合的基因组步移法,该方法使用相同的条件,不同的是:1) 在第一轮 PCR 中引物 79-5-POX-1 置换 KL2-3-1;和 2) 在第二轮 PCR 中引物 79-POX-5-2 置换 KD2-3-2。 $\sim$ 2350bp 的片段获取自其中一种 PCR 反应(SEQ ID NO:175)。该片段进行测序并显示包含来自染色体 F 的解脂耶氏酵母基因组 DNA,未知 DNA 的一个 1729bp 的片段(SEQ ID NO:176),和来自 pZP3-PA777U 5' 末端的 DNA(SEQ ID NO:127)。插入接合位于染色体 F 上的核苷酸位点 3159605。插入位点在 ORFYALi0F24167g(SEQ ID NO:91) 起始密码子上游 154bp 处,ORF 与啤酒糖酵母 ORF YOR313C(SPS4) 弱相似,编码孢子形成特异蛋白。

[0636] 3' 末端接合通过 PCR 获得,使用引物 4305ZP3-3-2(SEQ ID NO:167) 和 79-3-POX-3(SEQ ID NO:168)。反应混合物包括 1 μ L 的每个均为 20 μ M 的引物,1 μ L 基因组 DNA,22 μ L 水和 25 μ L TaKaRaExTaq 2X 预混物(TaKaRa Bio.Inc., Shiga, Japan)。热循环仪条件是:94 $^{\circ}$ C 1 分钟,然后为 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 20 秒、55 $^{\circ}$ C 20 秒和 72 $^{\circ}$ C 1 分钟,随后在 72 $^{\circ}$ C 进行 7 分钟最后的延伸反应。扩增了 $\sim$ 300kb 的 DNA 片段并将其克隆到 pCR2.1-TOPO 中。

[0637] 序列分析显示一个 326bp 的嵌合片段(SEQ ID NO:177) 位于解脂耶氏酵母来自染

染色体 F 的基因组 DNA 和 pZP3-PA777U (SEQ ID NO :127) 之间。接合位于染色体 F 的核苷酸位点 3159605。

[0638] 基于 5' 和 3' 分析,将包含 pZP3-PA777U 的 AscI/PacI 片段和 1729bp 的未知 DNA 的 DNA 片段在位点 3159605 上插入染色体 F,该位点在 YALi0F24167g ORF (SEQ ID NO :91) 上游 154bp 处。

[0639] 基因组步移法鉴定 pZKL2-5U89GC 整合位点

[0640] 设计以下因为用于 pZKL2-5U89GC 的基因组步移:KL2-5-2 (SEQ ID NO :169)、KL2-5-3 (SEQ ID NO :170)、KL2-3-2 (SEQ ID NO :171)、和 KL2-3-3 (SEQ ID NO :172)。使用所述用于 pZKD2-5U89A2 的相同一组 Y4305 基因组 DNA 连接混合物进行用于 5' 插入接合的基因组步移法,该方法使用相同的条件,不同的是:1) 在第一轮 PCR 中引物 KL2-5-2 置换 KL2-3-1;和 2) 在第二轮 PCR 中引物 KL2-5-3 置换 KD2-3-2。将来自其中一种反应产物的 519bp 的片段克隆到 pCR2.1-TOPO 中并测序。BLAST 分析显示该 519bp 的片段 (SEQ ID NO :178) 包含来自解脂耶氏酵母染色体 C 和 pZKL2-5U89GC 的 AscI/SphI 片段 5' 末端的 DNA。接合位于位点 2568793。更具体地讲,将 66bp 的未知 DNA (SEQ ID NO :179) 插入染色体 C 和 pZKL2-5U89GC (SEQ ID NO :131) 之间。

[0641] 用于 3' 插入接合的基因组步移法与用于 5' 插入接合的基因组步移法确切相同,不同的是:1) 在第一轮 PCR 中引物 KL2-3-2 置换 KL2-5-2;和 2) 在第二轮 PCR 中引物 KL2-3-3 置换 KL2-5-3。将来自其中一种 PCR 产物的 711bp 的片段克隆到 pCR2.1-TOPO 中并测序。BLAST 分析显示该 711bp 的片段 (SEQ ID NO :180) 包含来自解脂耶氏酵母染色体 C 和 pZKL2-5U89GC 的 DNA。接合位于位点 2568787。因此,将 65bp 的未知 DNA (SEQ ID NO :181) 插入染色体 C 和 pZKL2-5U89GC 之间。

[0642] 基于 5' 和 3' 接合分析,将来自 pZKL2-5U89GC 的 AscI/SphI 片段插入解脂耶氏酵母染色体 C。它置换染色体 C 介于 2568787 和 2568793 之间的 5bp 核苷酸片段。将六十六 (66)bp 的未知 DNA 插入位点 2568793 和 pZKL2-5U89GC 的 AscI/SphI 片段 5' 末端之间,并且将 66bp 的未知 DNA 插入位点 2568787 和 pZKL2-5U89GC 的 AscI/SphI 片段 3' 末端之间。该插入删除了 ORF YALi0C18711g (SEQ ID NO :89) 翻译起始密码子的第一种核苷酸 'A', 该基因是啤酒糖酵母基因 YLR050C 的同源物。该插入因此破坏了起始密码子并将启动子区从无功能的 ORF 中分开。

[0643] 实施例 10

[0644] 解脂耶氏酵母菌株 Y4305 的发酵

[0645] 本实施例描述了解脂耶氏酵母菌株 Y4305 (实施例 3) 的 2-L 发酵,发酵时间历时 162 小时。每隔 4 至 15 小时监控脂质特征。EPA 最多占在 148 小时后生产的总脂质 55.6%, 对应于 12.1 的 EPA% DCW。

[0646] 种子培养物:为了在摇瓶中制备种子培养物,将遗传工程菌株解脂耶氏酵母 Y4305 的解冻的冰冻甘油原液 (0.1mL) 转移到 500mL 摇瓶中,瓶中包含 50mL 复合培养基,它包含 D-葡萄糖 (20g/L),无氨基酸的酵母氮源 (3.4g/L), KH_2PO_4 (6.0g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (3.3g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.5g/L) 和盐酸噻胺 (1.5mg/L)。将摇瓶培养物在 30°C 下培养 48 小时至 600nm (OD_{600}) 的光密度为约 2。

[0647] 发酵:使用 2 升的 Biostat® B 发酵罐 (B. Braun Biotech International,

Germany) 进行发酵实验。将上文的摇瓶种子培养物 (50mL, $OD_{600} \sim 2$) 转移到 2 升的 Biostat® B 发酵罐中开始发酵 ($t = 0$ 小时), 发酵罐包含 950mL 新鲜发酵培养基。新鲜的发酵培养基包括酵母提取物 (5.0g), 无氨基酸的酵母氮源 (6.7g), KH_2PO_4 (6.0g), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (3.3g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1.5g), 盐酸噻胺 (1.5mg), D- 葡萄糖 (50g), 痕量金属溶液 (100X) (24mL), 和消泡剂 204 (0.2mL; Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。痕量金属溶液 (100X) 包含柠檬酸 (10g/L)、 $CaCl_2 \cdot H_2O$ (1.5g/L)、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (10g/L)、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.39g/L)、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.38g/L)、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.20g/L)、和 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0.30g/L)。通过将叶轮速度级联控制在 80 和 1200rpm 之间, 将溶解氧的浓度 (pO_2) 控制在零点以上。将通气速率控制在介于 1.0L/min 至 2.0L/min 之间。当葡萄糖在培养基中的浓度低于 20g/L 时, 开始给料葡萄糖 (600g/L)。在整个发酵过程中将葡萄糖浓度保持在 20-60g/L 范围内。

[0648] 用于控制 pH 的酸是 H_3PO_4 (20%, w/v)。用于控制 pH 的碱在生长期是 NH_4OH (28% NH_3 , w/v), 然后在脂质生产期换成 KOH (56%, w/v)。分别将温度控制在 30-32°C, 将 pH 值控制在 5-7。

[0649] 发酵实验运行 162 小时。每隔 4-15 小时采集发酵样本 (10-20mL) 测量细胞内脂质浓度、脂质特征、细胞光密度、干细胞重量 (DCW)、葡萄糖浓度、主要阳离子、和有机 15 酸。按照一般方法将耶氏酵母细胞的细胞内脂质用甲醇和氯仿抽提出来, 通过 GC 测定其浓度和特征。

[0650] 结果: 下表 23 显示在 162 小时的发酵期间, 在 15 个时间点中的每个时间点上的每种单个脂肪酸的干细胞重量 (DCW)、总脂质 (TFA% DCW) 和组合物, 脂肪酸用 % 总 20 脂肪酸表示。

[0651]

表 23: 在 162 小时发酵期间的解脂耶氏酵母菌株 Y4305 的脂质组合物

时间 (小时)	DCW (g/L)	TFA %	16:0 棕 桐酸	16:1 棕 桐酸	18:0 硬 脂酸	18:1 油 酸	18:2 亚 油酸	18:3 (n-3) ALA	20:2 EDA	20:3 (n-6) DGLA	20:4 ARA	20:4 (5,11, 14,17)	20:4 (n-3) ETA	20:5 EPA	其它
22.4	1.02	6.7	15.1	1.7	2.4	2.7	41.4	1.6	4.0	2.1	0.8	0.0	0.0	26.6	1.7
26.2	2.42	6.2	15.4	1.6	1.8	3.4	42.0	1.4	3.5	1.8	1.1	0.6	0.6	24.0	2.8
37.9	22.10	9.0	13.6	2.1	1.2	6.0	43.2	1.9	3.7	1.2	0.8	0.6	0.1	21.1	4.2
49.7	49.44	12.7	8.4	2.2	1.3	12.2	34.4	3.1	6.2	1.1	0.5	1.3	0.6	23.8	4.7
58.2	54.32	15.5	7.1	1.9	1.5	12.6	29.0	3.9	6.2	1.0	0.4	1.6	0.8	29.2	4.4
68.3	52.76	18.6	5.6	1.5	1.6	12.2	26.6	4.6	5.7	1.0	0.3	1.7	0.9	33.2	4.3
75.7	52.59	19.8	4.5	1.3	1.5	11.2	25.4	4.7	5.2	1.1	0.3	1.5	1.1	37.3	4.2
89.9	50.45	21.6	3.3	1.1	1.3	9.4	23.6	4.4	4.2	1.4	0.4	1.1	1.3	43.3	4.6
99.7	50.13	21.7	2.9	1.0	1.2	8.2	22.6	4.1	3.7	1.5	0.4	0.9	1.3	46.9	4.5
113.9	46.57	22.7	2.6	0.9	1.1	6.9	20.9	3.5	3.1	1.7	0.5	0.8	1.4	51.1	5.0
123.7	45.60	21.8	2.4	0.8	1.0	6.3	19.7	3.1	2.9	1.8	0.6	0.8	1.4	53.6	5.1
137.9	44.67	21.90	2.4	0.8	1.0	5.8	18.5	2.8	2.7	1.8	0.6	0.7	1.3	55.4	5.6
147.8	45.47	21.70	2.5	0.8	1.1	5.8	18.3	2.6	2.6	1.7	0.6	0.8	1.3	55.6	5.6
162.1	44.94	20.80	2.8	0.8	1.1	6.0	18.5	2.5	2.6	1.7	0.6	0.8	1.2	54.6	5.8

[0652] 因此, 在 89.9 小时时的发酵结果显示生产了具有按 % TFA 计至少约 43.3% 的 EPA、小于约 23.6% 的 LA(18:2) 和小于约 9.4% 的油酸 (18:1) 的微生物油。微生物油可附

加地 5 包含按 % TFA 计小于约 4.2% 的 EDA。

[0653] 按 % TFA 计的总 ω -3 含量通过把 ALA、ETrA、杜松烯酸 (c/s-5, 11, 14, 17- 二十碳四烯酸, 20:4)、ETA 和 EPA 的 % TFA 相加进行测定。从 89.9 小时至 162.1 小时的发酵期间的 ω -3 含量按 TFA 百分比计大于 50.7%, 达到最高含量 61% (147.8 小时)。

[0654] 同样地, 在每个时间点上的 EPA % DCW 按下式计算: $[(\text{二十碳五烯酸 \% TFA}) * (\text{TFA \% DCW})] / 100$ 。在发酵 89.9 小时时, EPA % DCW 是 9.35; 在发酵期间所有其它后续时间点, EPA % DCW 增高, 最高水平为在 137.9 小时时的 12.13EPA % DCW。

[0655] 发酵领域的技术人员将了解取决于发酵运行本身、培养基条件、工艺参数、发酵规模等, 以及其中进行培养物采样的特定时间点, 特定耶氏酵母属菌株 (例如 Y4305) 的含油特征将发生变化 (如表 23 所示)。因此例如人们可以预想来自菌株 Y4305 的微生物油可包含至少约 43% 的 EPA、小于约 24% 的 LA(18:2)、小于约 10% 的油酸 (18:1)、小于约 4% 的 EDA、小于约 2% 的 ETA、小于约 1% 的 ARA、小于约 4% 的硬脂酸 (18:0) 和小于约 4% 的棕榈酸 (16:0), 其中每种脂肪酸按 % TFA 计。

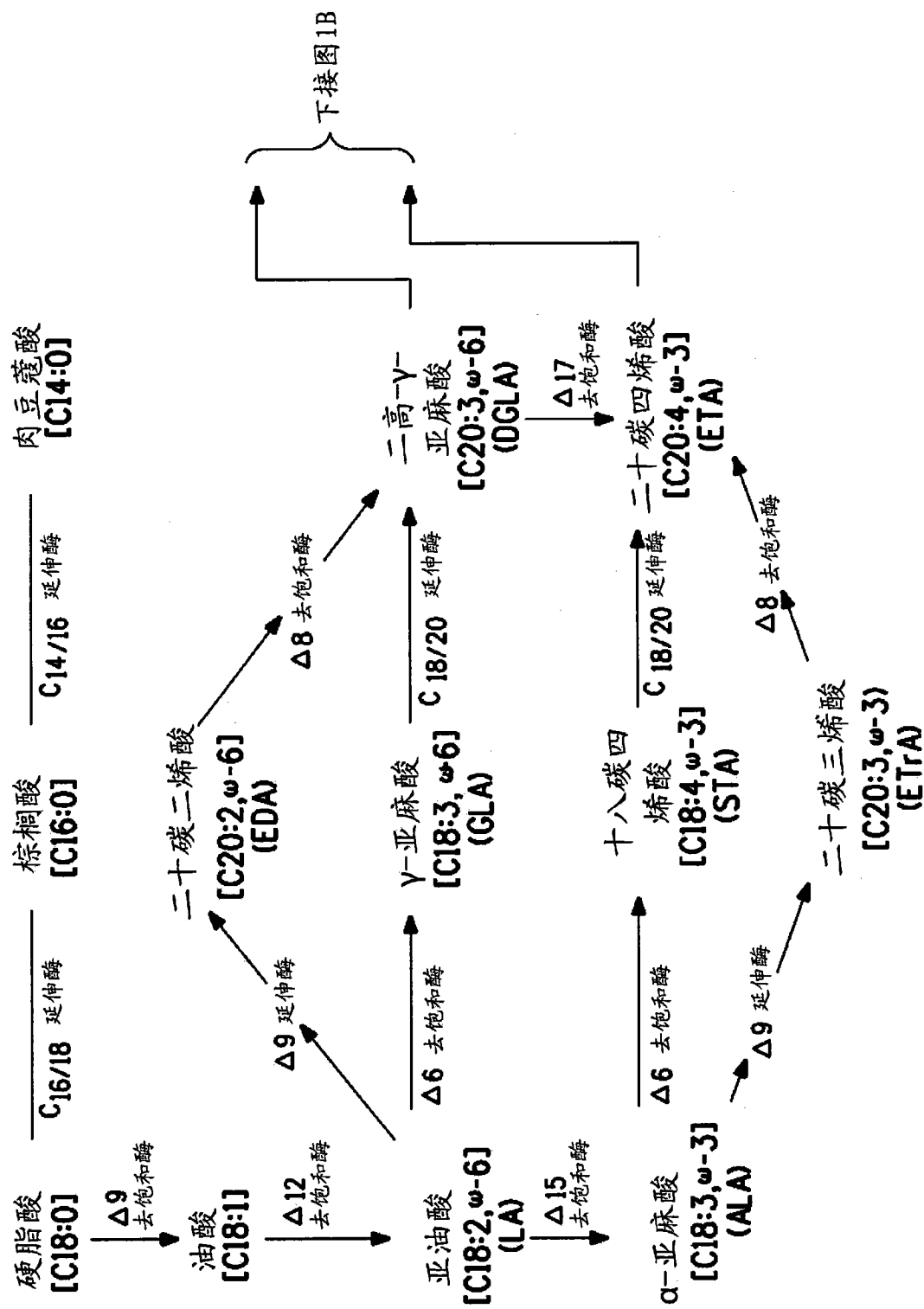


图 1A

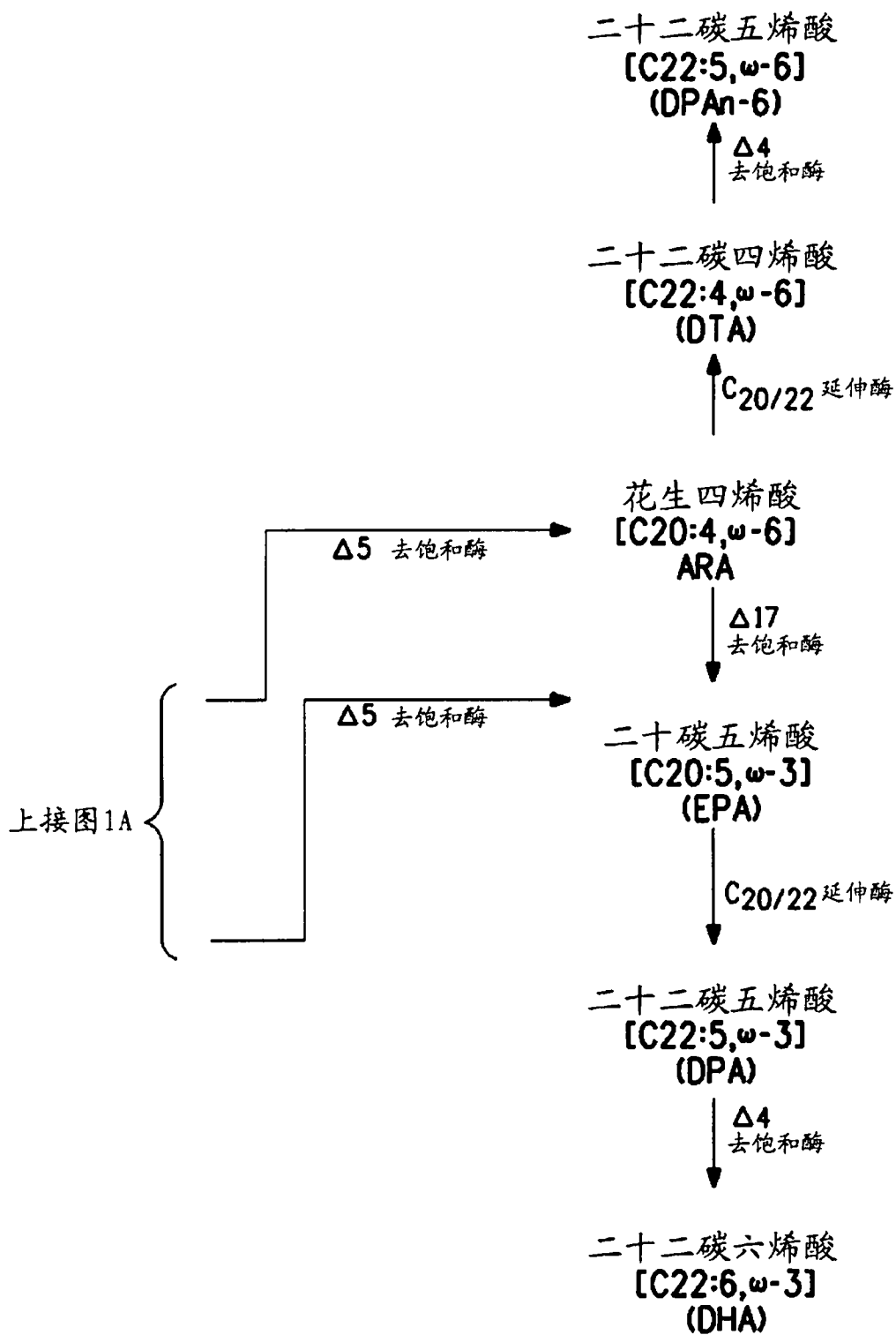


图 1B

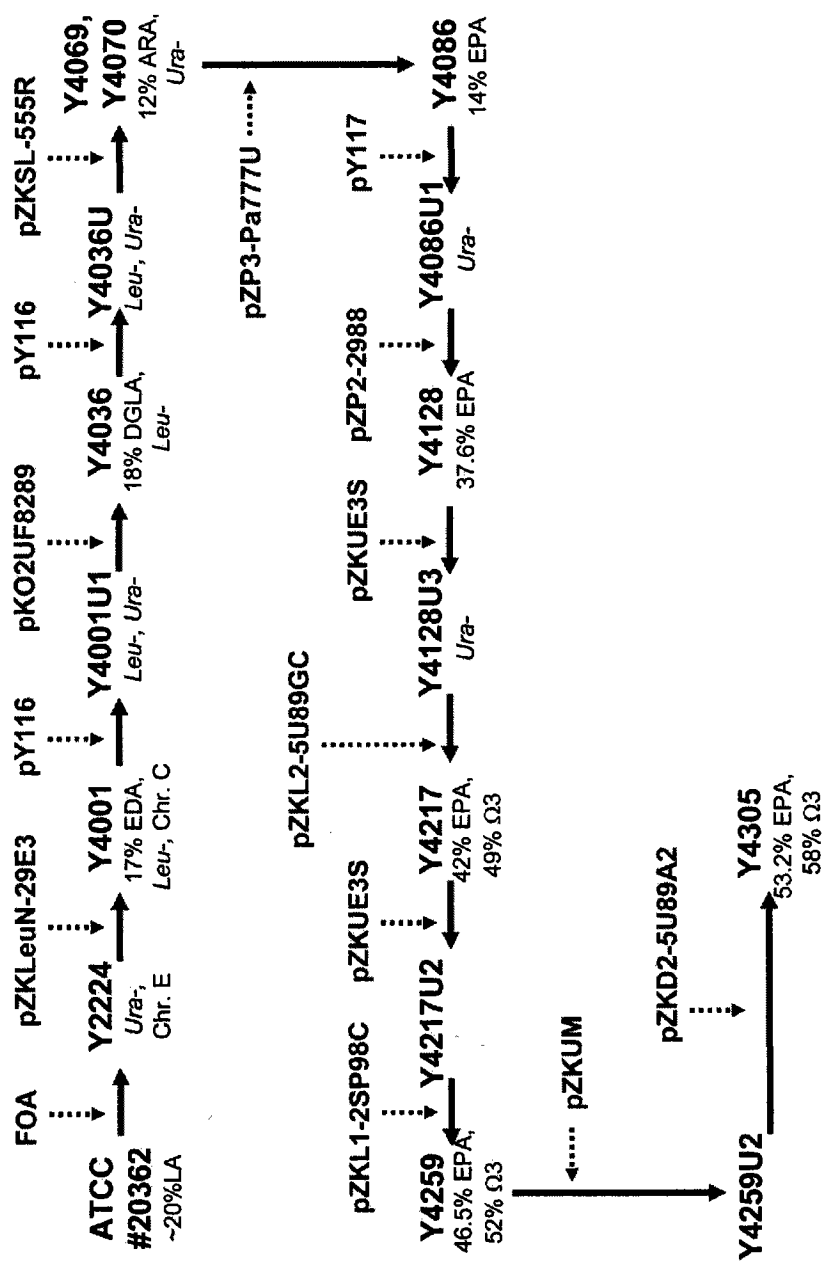


图 3

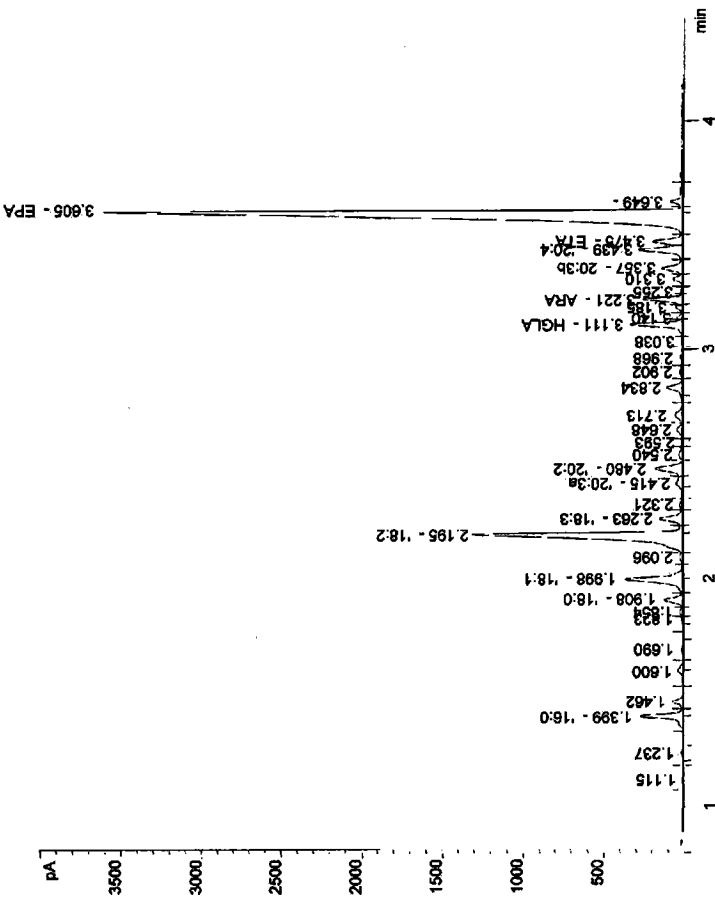


图 4

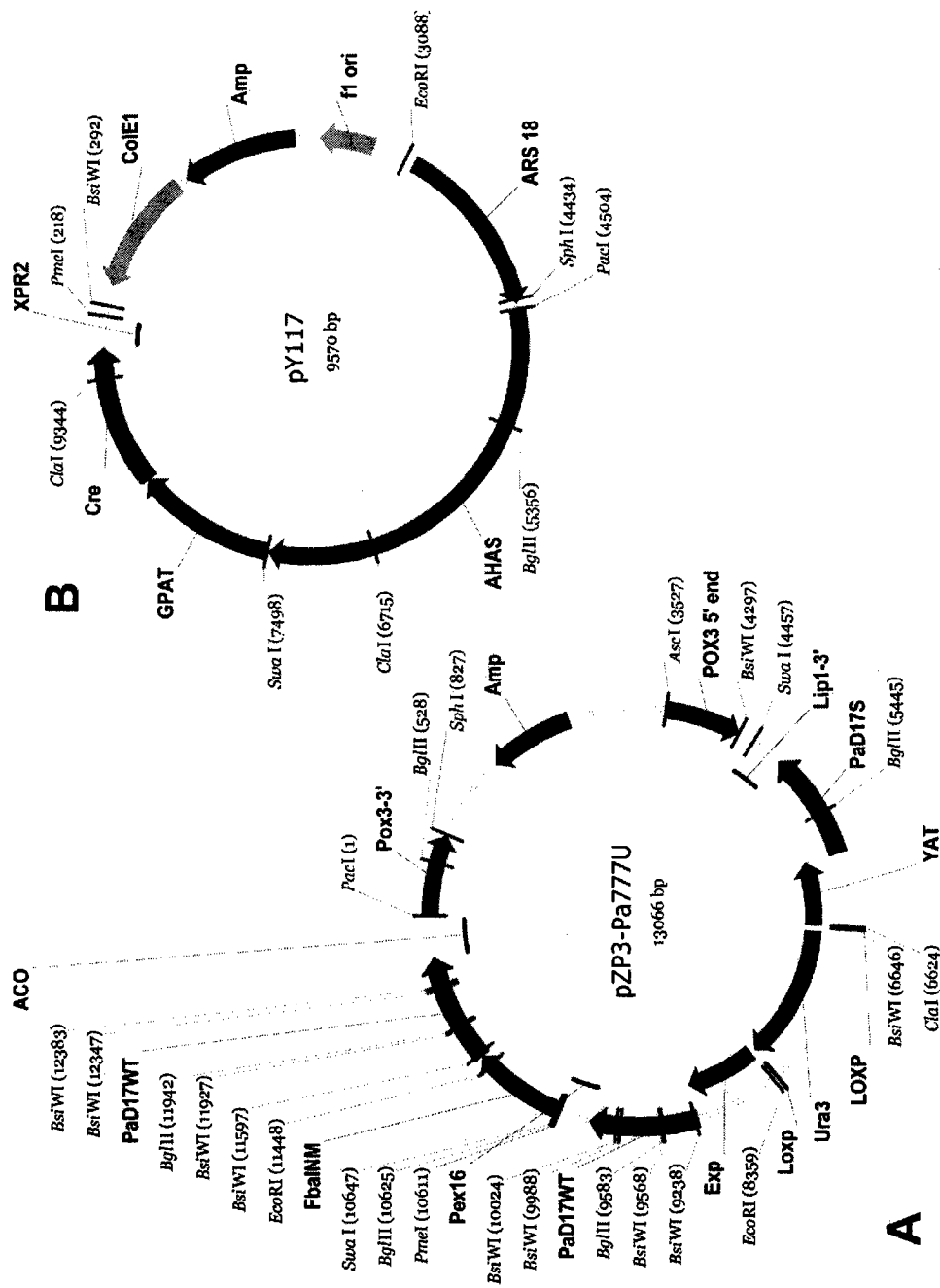


图 5

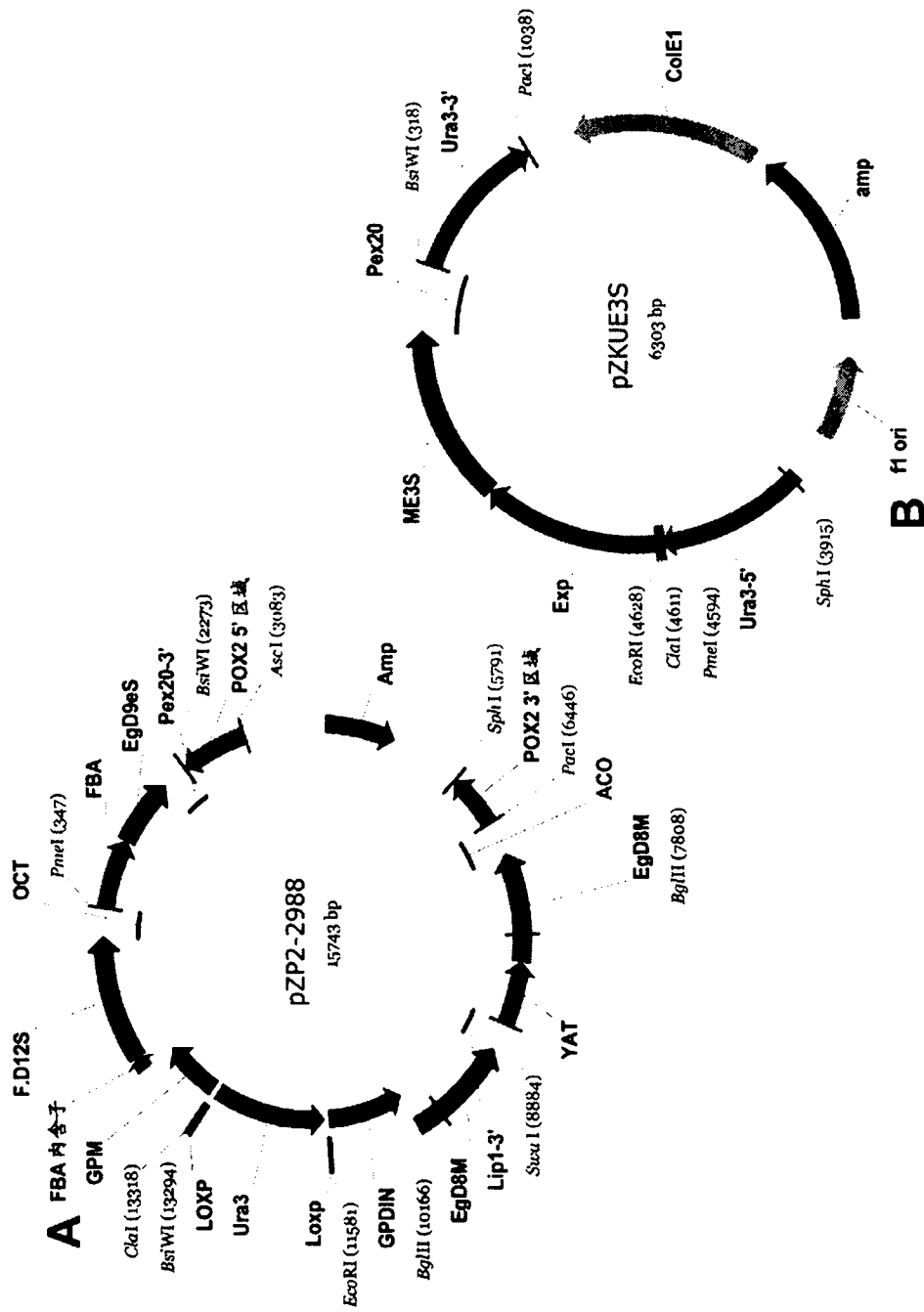


图 6

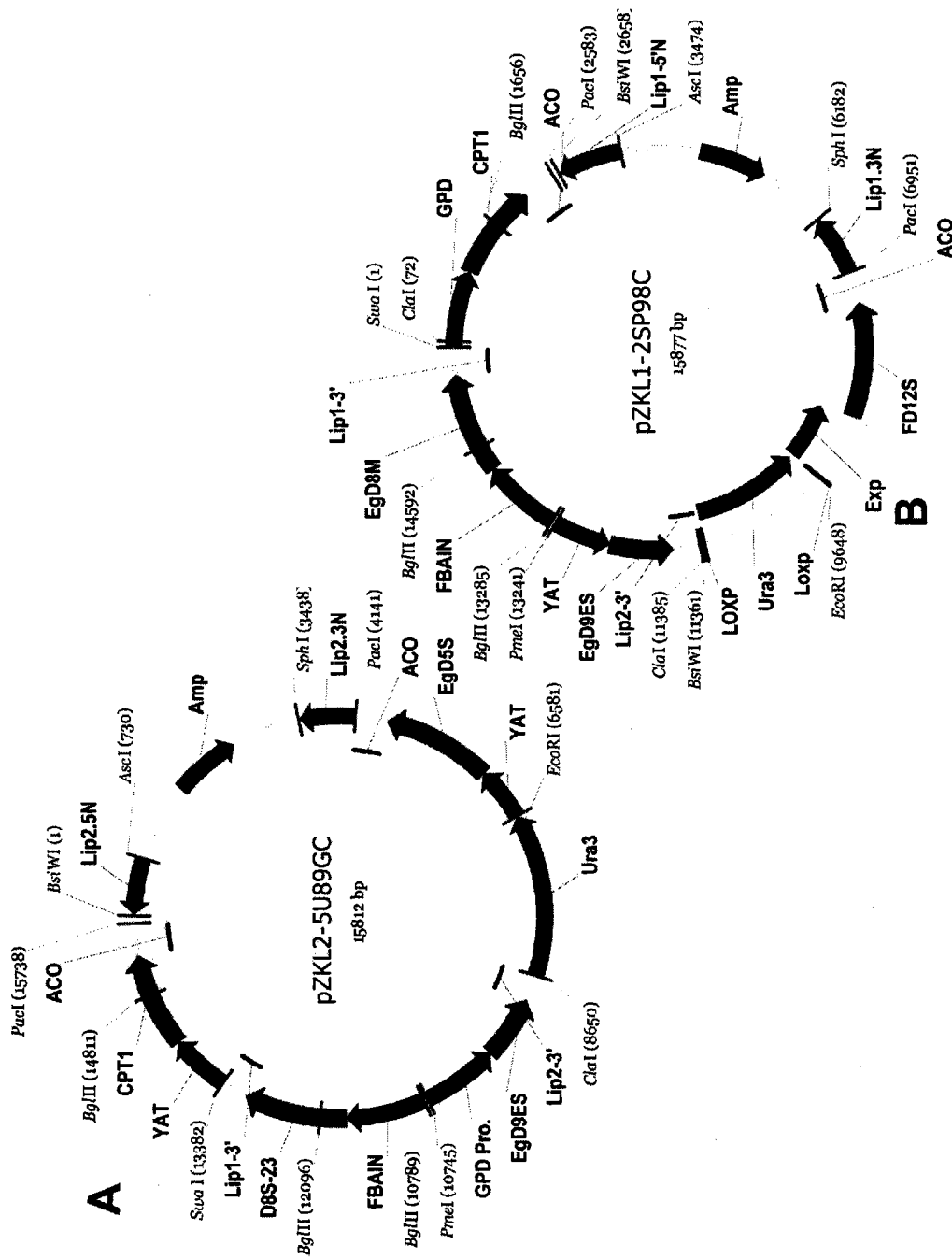


图 7

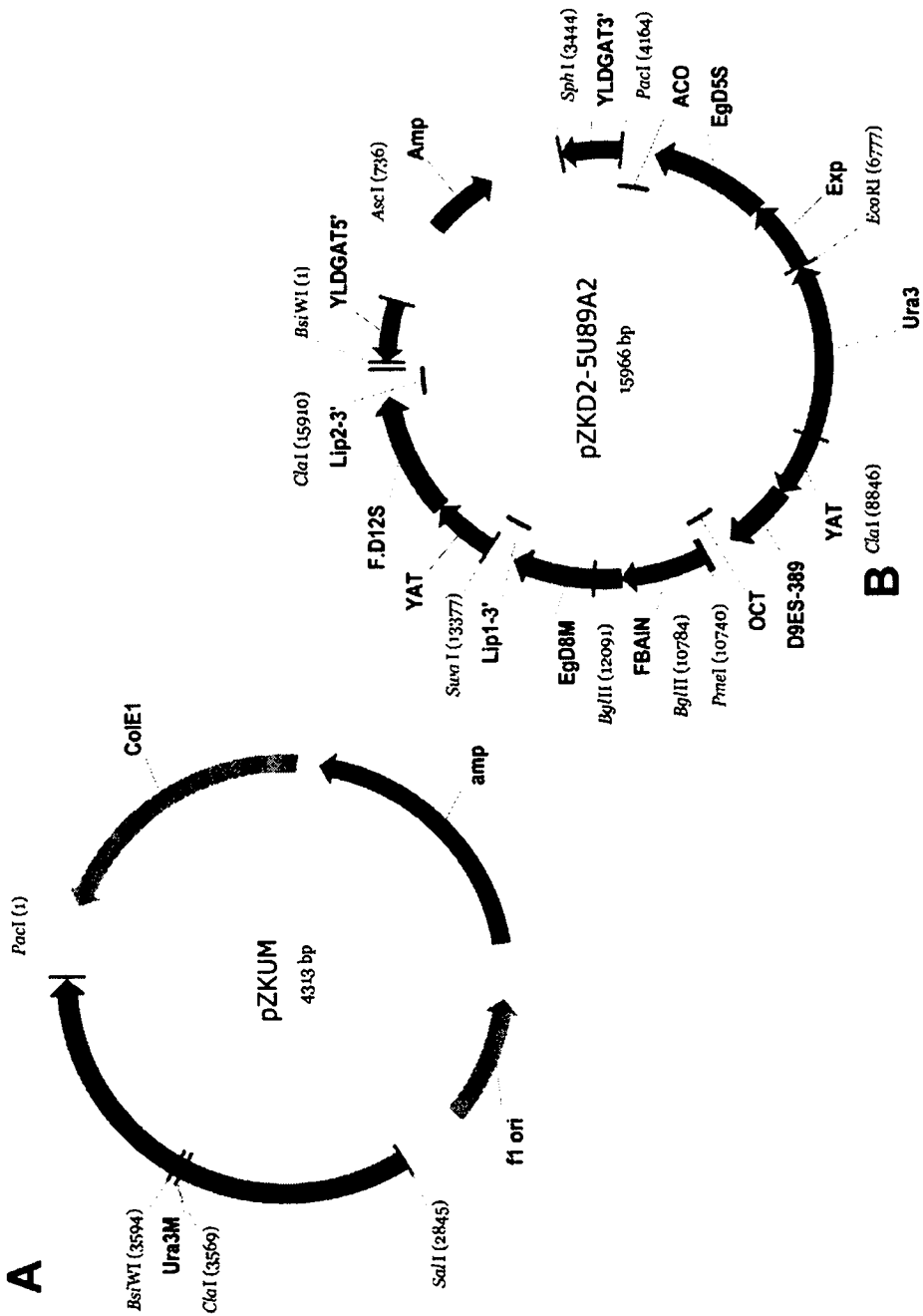


图 8

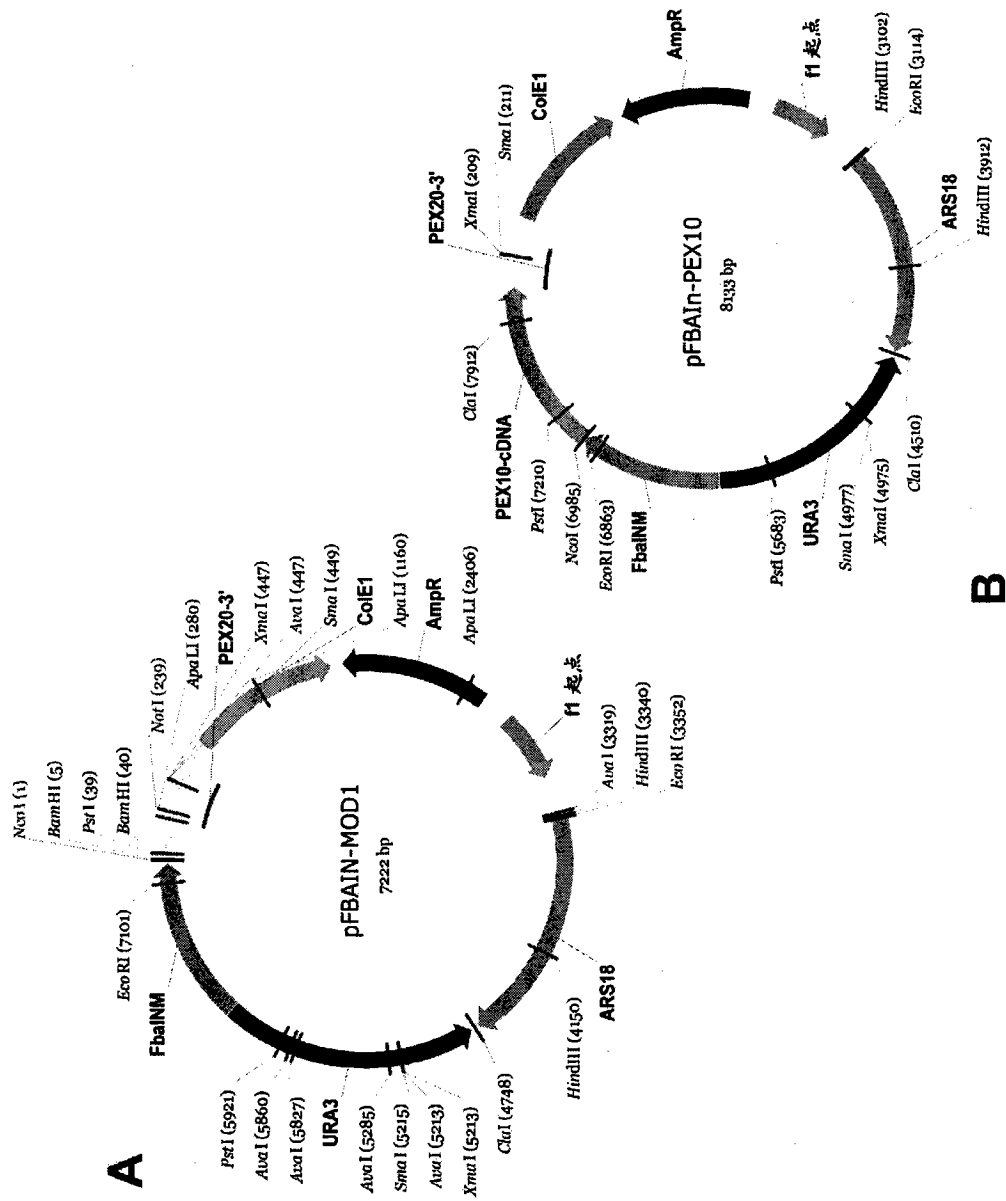


图 9

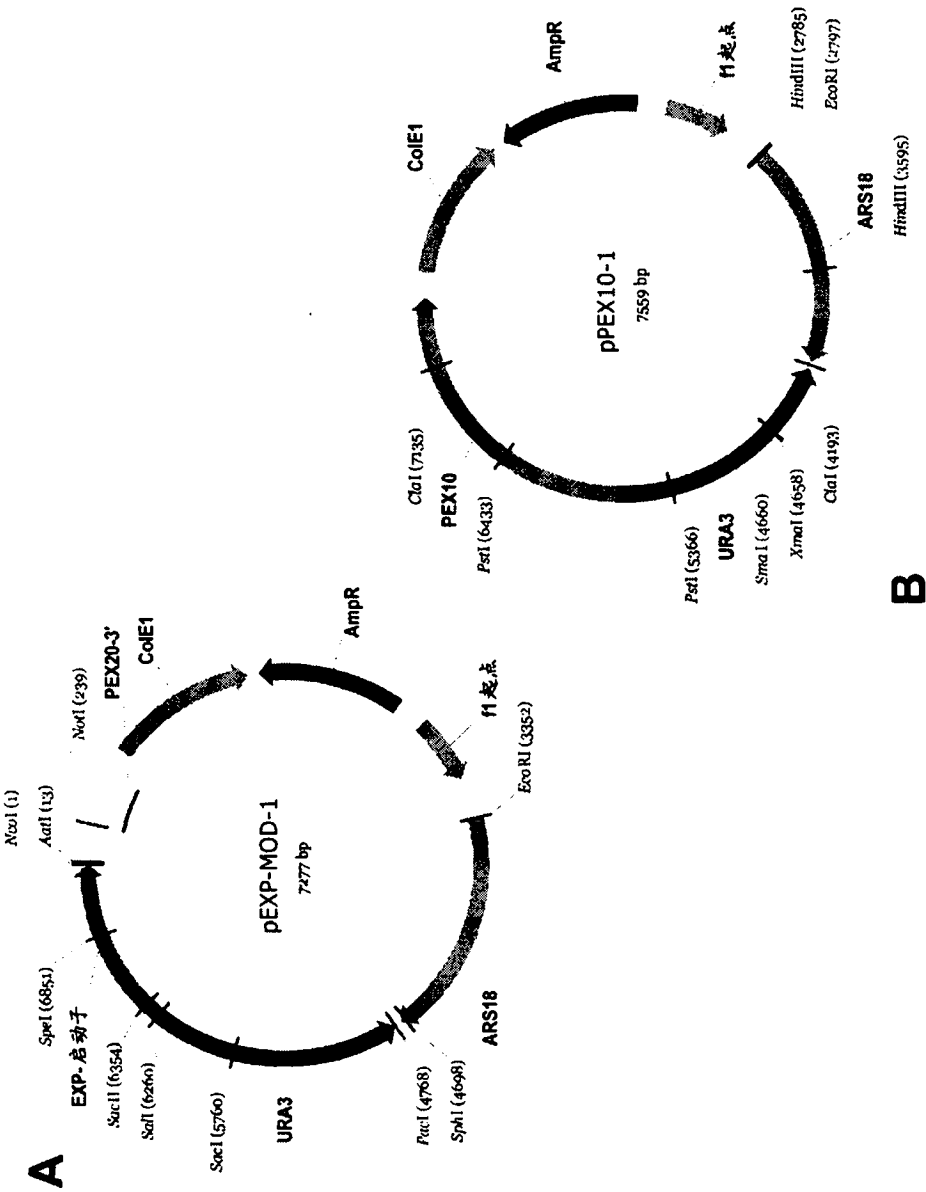


图 10

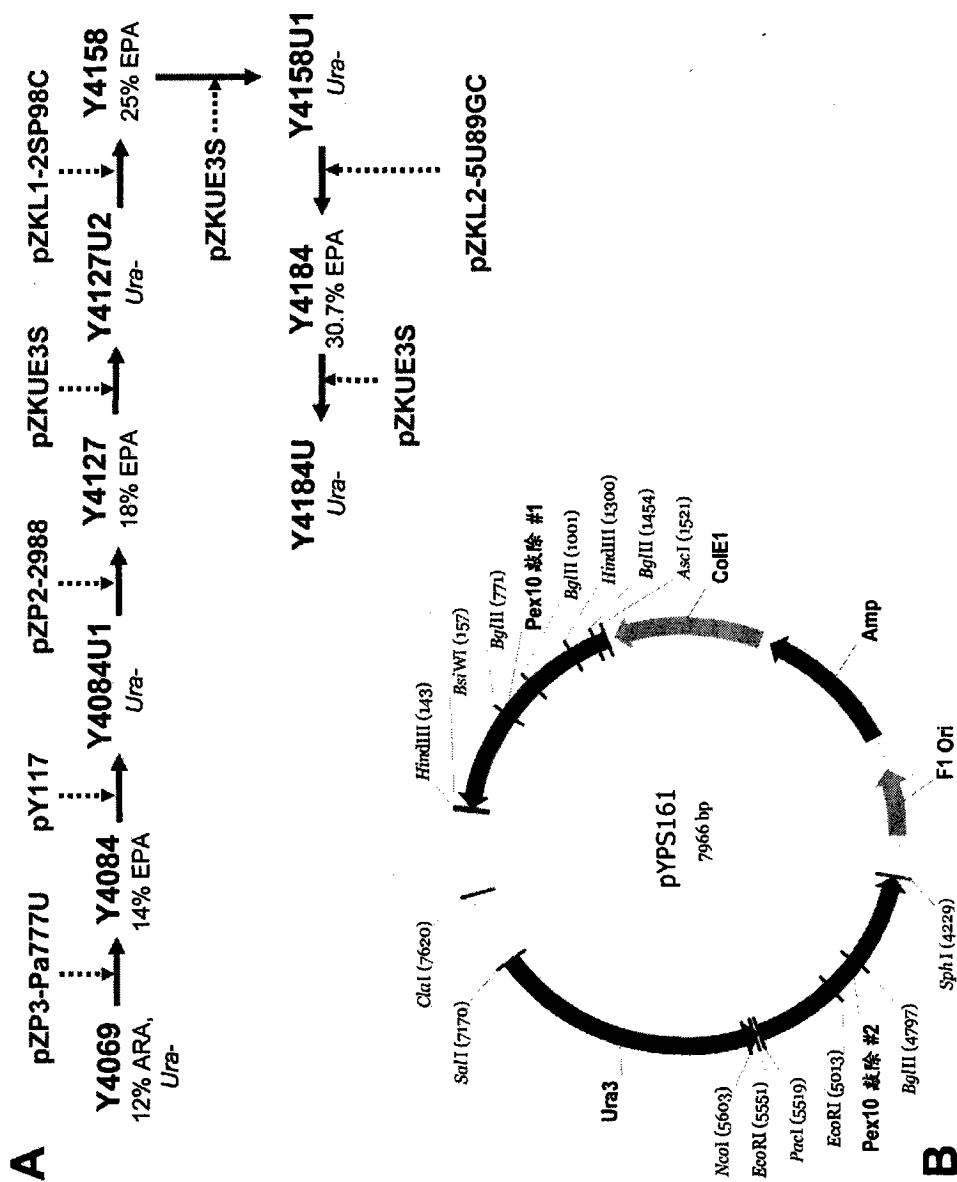


图 11