



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102803289 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201080026332. 7

N · S · 亚达夫 Q · 朱

(22) 申请日 2010. 06. 14

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公司 72001

(30) 优先权数据

61/187366 2009. 06. 16 US

代理人 李波 李炳爱

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 12. 13

(51) Int. Cl.

C07K 14/195(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/038535 2010. 06. 14

(56) 对比文件

US 2009093543 A1, 2009. 04. 09, 说明书第 53 页表 23、第 1 页第 12-14 段 .

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/147904 EN 2010. 12. 23

WO 2009046248 A1, 2009. 04. 09, 说明书第 82 页第 9-10 段 .

(83) 生物保藏信息

PTA-10025 2009. 05. 14

CN 101018862 A, 2007. 08. 15, 全文 .

PTA-10026 2009. 05. 14

CN 101111601 A, 2008. 01. 23, 全文 .

PTA-10027 2009. 05. 14

审查员 王奇

(73) 专利权人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 S-P · 洪 P · L · 夏普 Z · 薛

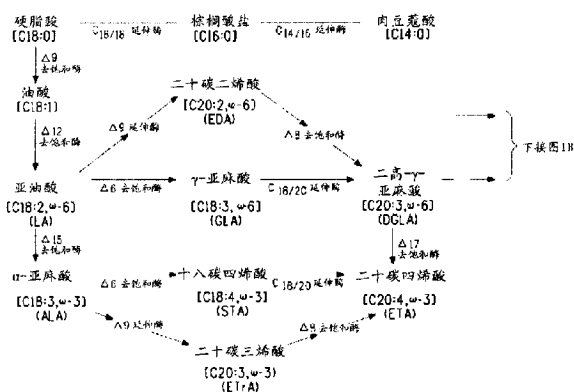
权利要求书1页 说明书92页 附图15页

(54) 发明名称

用于高水平生产二十碳五烯酸的改善的优化的解脂耶氏酵母菌株

(57) 摘要

本发明描述了含油酵母解脂耶氏酵母的工程化的菌株,所述菌株能够生产包含按总脂肪酸的重量百分比计的 [“ % TFA ”] 高于 50 重量 % 的二十碳五烯酸 [“ EPA ”] (一种 ω -3 多不饱和脂肪酸), 并且具有至少 3.1 的 EPA % TFA 对亚油酸比值 (以 % TFA 测量) 的油。这些菌株除其他异源的 $\Delta 9$ 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、 $C_{16/18}$ 延伸酶外,还过表达至少一种 $\Delta 9$ 延伸酶 / $\Delta 8$ 去饱和酶复合酶,并任选地过表达二酰基甘油胆碱磷酸转移酶、丙二酰 - 辅酶 A 合成酶和 / 或酰基 - 辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶。至少一种过氧化物酶体生物合成因子蛋白的表达被下调。主张了在所述宿主细胞中生产 EPA 的方法、从所述细胞获得的油、和由此生产的产品。



1. 生产油的重组耶氏酵母属(*Yarrowia* sp) 宿主细胞, 所述油包含:
 - (a) 按总脂肪酸的重量百分比计至少 50% 的二十碳五烯酸; 并且,
 - (b) 按总脂肪酸的重量百分比计的二十碳五烯酸与按总脂肪酸的重量百分比计的亚油酸的比值为至少 3.1,其中所述耶氏酵母属宿主细胞包含:
 - (i) 至少一种由 SEQ ID NO:13 组成的复合酶;
 - (ii) 表达被下调的过氧化物酶体生物合成因子蛋白 3;
 - (iii) 至少一种重组构建体, 所述构建体包含至少一种核苷酸序列, 其编码由 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31 或 SEQ ID NO:32 组成的酰基-辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶, 和
 - (iv) 至少一种重组构建体, 所述构建体包含至少一种核苷酸序列, 其编码由 SEQ ID NO:42 组成的丙二酰-辅酶 A 合成酶。
2. 权利要求 1 的重组宿主细胞, 其中所述酰基-辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶由 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:31 组成。
3. 用于制备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 或 2 的宿主细胞, 其中包含二十碳五烯酸的微生物油被生产; 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改善的优化的解脂耶氏酵母菌株

[0001] 本专利申请要求均于 2009 年 6 月 16 日提交的美国临时申请 61/187366、61/187368 和 61/187359 的权益,并且这些申请中的每一个均以引用方式全文并入本文。

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,该菌株能够有效地生产高浓度的二十碳五烯酸——一种 ω -3 多不饱和脂肪酸 [“PUFA”]。

[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] 在临床上和制药上的价值是众所周知的 (美国专利申请公布 2009-0093543-A1)。类似地,相对于从天然的微生物源或通过分离从鱼油和海洋浮游生物生产 EPA,利用重组方法在微生物中生产 EPA 的优点也是被充分认可的。

[0005] 尽管文献报道了负责 EPA 的生产的 ω -3/ ω -6 多不饱和脂肪酸 [“PUFA”] 生物合成途径的多个部分在其中被引入植物和非含油酵母的许多最近的实例,申请人的受让人的主要努力聚焦在含油酵母解脂耶氏酵母 (美国专利 7,238,482 ;美国专利申请公布 2006-0115881-A1 ;美国专利申请公布 2009-0093543-A1) 上。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%。

[0006] 更具体地讲,美国专利申请公布 2006-0115881-A1 展示了通过表达下列基因在重组解脂耶氏酵母菌株中占总脂肪酸 9% 的 EPA 的生产而无 γ -亚麻酸 [“GLA”; ω -6] 的共合成: Δ 9 延伸酶、 Δ 8 去饱和酶、 Δ 5 去饱和酶、 Δ 17 去饱和酶、 Δ 12 去饱和酶和 $C_{16/18}$ 延伸酶。

[0007] 美国专利申请公布 2009-0093543-A1 描述了用于生产 EPA 的优化的重组解脂耶氏酵母菌株,并展示了通过在其天然的过氧化物酶体生物合成因子 10 蛋白 (PEX10) 中包含破坏的宿主细胞中表达下列基因,在重组解脂耶氏酵母菌株中占总脂肪酸 55.6% 的 EPA 的生产: Δ 9 延伸酶、 Δ 8 去饱和酶、 Δ 5 去饱和酶、 Δ 17 去饱和酶、 Δ 12 去饱和酶、 $C_{16/18}$ 延伸酶和二酰基甘油胆碱磷酸转移酶。

[0008] 尽管有以上引用的公开,除高的总脂质含量外,还允许占总脂肪酸的高重量%的 EPA 生产,同时使中间体脂肪酸如亚油酸 [“LA”; ω -6] 的生产和最终的油产物中的副产物脂肪酸最小化的 EPA 商业生产,但是菌株的改善依然是必要的。通过工程化改善的优化的解脂耶氏酵母菌株,申请人已解决了上述问题,其中所述改善允许下列中的至少一种:总油级分中 61.8% EPA 的生产,按干细胞重量的百分比计 39.6% 的总脂肪酸的生产,或具有 6.1 的 EPA 对 LA 比值的脂质的生产。

[0009] 发明概述

[0010] 在第一个实施方案中,本发明涉及生产油的重组耶氏酵母属宿主细胞,所述油包含:

[0011] (a) 按总脂肪酸的重量百分比计至少 50% 的二十碳五烯酸 ; 并且

[0012] (b) 所述油按总脂肪酸的重量百分比计的二十碳五烯酸与按总脂肪酸的重量百分比计的亚油酸的比值为至少 3.1。

[0013] 在第二个实施方案中, 本发明涉及权利要求 1 的重组耶氏酵母属宿主细胞, 其中所述宿主细胞包含 :

[0014] (a) 至少一种包含多肽的复合酶, 所述多肽具有连接到至少一种 $\Delta 8$ 去饱和酶的至少一种 $\Delta 9$ 延伸酶 ;

[0015] (b) 至少一种其表达被下调的过氧化物酶体生物合成因子蛋白 ; 和

[0016] (c) 至少一种重组构建体, 所述构建体包含至少一种编码酶的核苷酸序列, 所述酶选自丙二酰 - 辅酶 A 合成酶和酰基 - 辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶。

[0017] 优选地, 所述丙二酰 - 辅酶 A 合成酶基本上由以下序列组成, 所述序列选自 SEQ ID NO :40 和 SEQ ID NO :42。

[0018] 优选地, 所述酰基 - 辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶基本上由以下序列组成, 所述序列选自 SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :31 和 SEQ ID NO :32。

[0019] 优选地, 所述复合酶连接子选自 : SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :7。

[0020] 优选地, 所述复合酶基本上由以下序列组成, 所述序列选自 SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :13。

[0021] 在第三个实施方案中, 本发明涉及用于制备包含二十碳五烯酸的微生物油的方法, 所述方法包括 :

[0022] a) 培养任何本发明的宿主细胞, 其中包含二十碳五烯酸的微生物油被生产 ; 以及,

[0023] b) 任选地回收步骤 (a) 的微生物油。

[0024] 在第四个实施方案中, 本发明涉及进一步加工通过本发明的方法制备的油。

[0025] 在第五个实施方案中, 本发明涉及用于生产包含按总脂肪酸的重量百分比计至少 50% 的二十碳五烯酸的油的重组宿主细胞, 所述宿主细胞选自 : 具有 ATCC 名称 ATCC PTA-10025 的解脂耶氏酵母 Y8406 ; 具有 ATCC 名称 ATCC PTA-10026 的解脂耶氏酵母 Y8412 ; 和, 具有 ATCC 名称 ATCCPTA-10027 的解脂耶氏酵母 Y8259。

[0026] 生物保藏

[0027] 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), 并且具有下列名称、保藏号和保藏日期。

[0028]

生物材料	保藏号	保藏日期
解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>) Y8406	ATCC PTA-10025	2009 年 5 月 14 日
解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>) Y8412	ATCC PTA-10026	2009 年 5 月 14 日

解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)Y8259	ATCC PTA-10027	2009 年 5 月 14 日
--	----------------	-----------------

[0029] 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藏。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就将会对公众开放。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。

[0030] 附图简述和序列描述

[0031] 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一起观看。

[0032] 图 2 图示了在总脂质级分中生产大于 60.9% EPA 的解脂耶氏酵母菌株 Y9481、Y9497 和 Y9502 的开发。

[0033] 图 3 提供了 pY116 的质粒图谱。

[0034] 图 4 提供了下列质粒的图谱:(A)pZKSL-5S5A5 ;和,(B)pZP3-Pa777U。

[0035] 图 5 提供了下列质粒的图谱:(A)pZKUM ;和,(B)pZKL2-5mB89C。

[0036] 图 6 提供了下列质粒的图谱:(A)pZKL1-2SR9G85 ;和,(B)pZSCP-Ma83。

[0037] 图 7 提供了下列质粒的图谱:(A)pZKL4-398F2 ;和,(B)pZP2-85m98F。

[0038] 图 8 提供了下列质粒的图谱:(A)pZK16-ML8N ;和,(B)pZK16-ML。

[0039] 图 9 图示了在总脂质级分中生产大于 61.8% 的 EPA 的解脂耶氏酵母菌株 Y8672 的开发。

[0040] 图 10 提供了下列质粒的图谱:(A)pZKL2-5m89C ;和,(B)pY201,包含嵌合的 YAT1::ScAle1S::Lip1 基因。

[0041] 图 11 提供了下列质粒的图谱:(A)pY168,包含嵌合的 YAT1::YlAle1::Lip1 基因 ;和,(B)pY208,包含嵌合的 YAT1::MaLPAAT1S::Lip1 基因。

[0042] 图 12 提供了下列质粒的图谱:(A)pY207,包含嵌合的 YAT1::YlLPAAT1::Lip1 基因 ;和,(B)pY175,包含嵌合的 YAT1::CeLPCATS::Lip1 基因。

[0043] 图 13 提供了实施例中所所述的每种菌株的 EPA% TFA、LA% TFA 和 EPA% TFA 对 LA% TFA 的比值的比较。

[0044] 图 14 提供了下列质粒的图谱:(A)pY222,包含嵌合的 YAT1::ScLPAATS::Lip1 基因 ;和,(B)pY177,包含嵌合的 YAT1::YlLPAAT1::Lip1 基因。

[0045] 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。

[0046] 下面的序列遵循 37C.F.R. § 1.821-1.825(“对含有核酸序列和 / 或氨基酸序列公开的专利申请的要求—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 中所列出的规定。

[0047] SEQ ID NO :1-156 是编码启动子、基因或蛋白质 (或它们的片段) 或质粒的开放

阅读框 (ORF), 如表 1 中所述。

[0048] 表 1: 基因和蛋白质 SEQ ID 编号摘要

[0049]

描述	核酸 序列标识号	蛋白质 序列标识号
复合酶连接子 GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS	--	1
复合酶连接子 GPARPAGLPPATYYDSLAV	--	2
复合酶连接子 PARPAGLPPATYYDSLAV	--	3
复合酶连接子 PTRPAGPPPATYYDSLAV	--	4
复合酶连接子 PGGPGKPSEIASLPPPIRPVGNPPAAYYDALAT	--	5
复合酶连接子 PARPAGLPPATYYDSLAVSGRT	--	6
复合酶连接子 PGGPGKPSEIASLPPPIRPVGNPPAAYYDALATGRT	--	7
DGLA 合酶, 包含 EgD9eS/EgD8M 基因融合	8 (2112 bp)	9 (703 AA)
DGLA 合酶, 包含 EaD9eS/EaD8S 基因融合	10 (2109 bp)	11 (702 AA)
DGLA 合酶, 包含 E389D9eS/EgD8M 基因融合	12 (2127 bp)	13 (708 AA)
啤酒糖酵母 Ale1 (“ScAle1” ; 也就是 ORF “YOR175C”)	14 (1860 bp)	15 (619 AA)

[0050]

解脂耶氏酵母 Ale1 (“YIAle1”)	16 (1539 bp)	17 (512 AA)
膜结合 O-酰基转移酶基序 M(V/I)LxxKL	--	18
膜结合 O-酰基转移酶基序 RxKYYxxW	--	19
膜结合 O-酰基转移酶基序 SAxWHG	--	20
美国专利申请公布 2008-0145867-A1 基序 EX ₁₁ WNX ₂ -[T/V]-X ₂ W	--	21
来源于啤酒糖酵母的合成的 Ale1, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达(“ScAle1S”)	22 (1870 bp)	23 (619 AA)
秀丽隐杆线虫 LPCAT (“CeLPCAT”)	24 (849 bp)	25 (282 AA)
来源于秀丽隐杆线虫的合成的 LPCAT, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达(“CeLPCATS”)	26 (859 bp)	27 (282 AA)
高山被孢霉 LPAAT1 (“MaLPAAT1”)	28 (945 bp)	29 (314 AA)
解脂耶氏酵母 LPAAT1 (“YILPAAT1”)	30 (1549 bp)	31 (282 AA)
啤酒糖酵母 LPAAT (“ScLPAAT” ; 也就是 ORF “YDL052C”)	--	32 (303 AA)
1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶基序 NHxxxxD	--	33
1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶基序 EGTR	--	34
来源于高山被孢霉的合成的 LPAAT1, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达(“MaLPAAT1S”)	35 (955 bp)	36 (314 AA)
解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶基因 (“YICPT1”)	37 (1185 bp)	38 (394 AA)
豌豆根瘤菌 (<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>) 3841 丙二酰-辅酶 A 合成酶(GenBank 登录号 YP_766603) (“rMCS”)	39 (1515 bp)	40 (504 AA)
来源于豌豆根瘤菌 (<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>) 3841 的合成的丙二酰-辅酶 A 合成酶(GenBank 登录号 YP_766603), 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“MCS”)	41 (1518 bp)	42 (505 AA)
小眼虫 Δ9 延伸酶(“EgD9e”)	43 (777 bp)	44 (258 AA)
来源于小眼虫的合成的 Δ9 延伸酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“EgD9eS”)	45 (777 bp)	46 (258 AA)
小型绿藻属 CCMP389Δ9 延伸酶 (“E389D9e”)	47 (792 bp)	48 (263 AA)
来源于小型绿藻属 (<i>Eutreptiella</i> sp.) CCMP389 的合成的 Δ9 延伸酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“E389D9eS”)	49 (792 bp)	50 (263 AA)
<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373 Δ9 延伸酶(“EaD9Elo1”)	51 (774 bp)	52 (258 AA)

[0051]

来源于 <i>Euglena anabena</i> UTEX 373 的合成的 $\Delta 9$ 延伸酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“EaD9eS”)	53 (774 bp)	54 (258 AA)
小眼虫 $\Delta 8$ 去饱和酶 (“Eg5” 或 “EgD8”)	55 (1271 bp)	56 (421 AA)
来源于小眼虫的合成的 $\Delta 8$ 去饱和酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“D8SF” 或 “EgD8S”)	57 (1272 bp)	58 (422 AA)
合成的突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶(“EgD8M”), 来源于小眼虫 (“EgD8S”)	59 (1272 bp)	60 (422 AA)
<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373 $\Delta 8$ 去饱和酶(“EaD8es3”)	61 (1260 bp)	62 (420 AA)
来源于 <i>Euglena anabena</i> UTEX 373 的合成的 $\Delta 8$ 去饱和酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“EaD8S”)	63 (1260 bp)	64 (420 AA)
小眼虫 $\Delta 5$ 去饱和酶 (“EgD5”)	65 (1350 bp)	66 (449 AA)
来源于小眼虫的合成的 $\Delta 5$ 去饱和酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“EgD5S”)	67 (1350 bp)	68 (449 AA)
突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶(“EgD5M”), 来源于小眼虫 (“EgD5”) (美国专利公布 2010-0075386-A1)	69 (1350 bp)	70 (449 AA)
合成的突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶(“EgD5SM”), 来源于小眼虫 (<i>Euglena gracilis</i>) (“EgD5S”) (美国专利公布 2010-0075386-A1)	71 (1350 bp)	72 (449 AA)
多甲藻属 CCMP626 $\Delta 5$ 去饱和酶(“RD5”)	73 (1392 bp)	74 (463 AA)
来源于多甲藻属 (<i>Peridinium</i> sp.) CCMP626 的合成的 $\Delta 5$ 去饱和酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“RD5S”)	75 (1392 bp)	76 (463 AA)
<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373 $\Delta 5$ 去饱和酶(“EaD5”)	77 (1362 bp)	78 (454 AA)
来源于 <i>Euglena anabena</i> UTEX 373 的合成的 $\Delta 5$ 去饱和酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“EaD5S”)	79 (1362 bp)	80 (454 AA)
合成的突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶(“EaD5SM”), 来源于 <i>Euglena anabaena</i> (“EaD5S”) (美国专利公布 2010-0075386-A1)	81 (1365 bp)	82 (454 AA)
栎树猝死病菌 (<i>Phytophthora ramorum</i>) $\Delta 17$ 去饱和酶 (“PrD17”)	83 (1086 bp)	84 (361 AA)
合成的 $\Delta 17$ 去饱和酶, 来源于栎树猝死病菌 (<i>Phytophthora ramorum</i>), 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“PrD17S”)	85 (1086 bp)	86 (361 AA)
瓜果腐霉菌 (<i>Pythium aphanidermatum</i>) $\Delta 17$ 去饱和酶 (“PaD17”)	87 (1080 bp)	88 (359 AA)
来源于瓜果腐霉菌的合成的 $\Delta 17$ 去饱和酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (“PaD17S”)	89 (1080 bp)	90 (359 AA)
串珠镰刀菌 (<i>Fusarium moniliforme</i>) $\Delta 12$ 去饱和酶 (“FmD12”)	91 (1434 bp)	92 (477 AA)

[0052]

来源于串珠镰刀菌的合成的 $\Delta 12$ 去饱和酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 ("FmD12S")	93 (1434 bp)	94 (477 AA)
高山被孢霉 (Mortierella alpina) C _{16/18} 延伸酶	95 (828 bp)	96 (275 AA)
来源于高山被孢霉 ELO3 的合成 C _{16/18} 延伸酶, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 ("ME3S")	97 (828 bp)	98 (275 AA)
Shindou 等人, 膜结合 O-酰基转移酶基序 WHGxxxGYxxxF	--	99
Shindou 等人, 膜结合 O-酰基转移酶基序 YxxxxF	--	100
Shindou 等人, 膜结合 O-酰基转移酶基序 YxxxYFxxH	--	101
美国专利申请公布 2008-0145867-A1 基序 M-[V/I]-[L/I]-xxK-[L/V/I]-xxxxxxDG	--	102
美国专利申请公布 2008-0145867-A1 基序 RxKYYxxWxxx- [E/D]-[A/G]xxxxGxG-[F/Y]-xG	--	103
美国专利申请公布 2008-0145867-A1 基序 SAxWHGxxPGYxx-[T/F]-F	--	104
Lewin, T.W. 等人和 Yamashita 等人, 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸 酰基转移酶基序 GxxFI-[D/R]-R	--	105
Lewin, T.W. 等人, 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶基序 [V/I]-[P/X]-[I/V/L]-[I/V]-P-[V/I]	--	106
Yamashita 等人, 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶基序 IVPIVM	--	107
解脂耶氏酵母 Pex1p (GenBank 登录号 CAG82178)	--	108 (1024 AA)
解脂耶氏酵母 Pex2p (GenBank 登录号 CAG77647)	--	109 (381 AA)
解脂耶氏酵母 Pex3p (GenBank 登录号 CAG78565)	--	110 (431 AA)
解脂耶氏酵母 Pex3Bp (GenBank 登录号 CAG83356)	--	111 (395 AA)
解脂耶氏酵母 Pex4p (GenBank 登录号 CAG79130)	--	112 (153 AA)
解脂耶氏酵母 Pex5p (GenBank 登录号 CAG78803)	--	113 (598 AA)
解脂耶氏酵母 Pex6p (GenBank 登录号 CAG82306)	--	114 (1024 AA)
解脂耶氏酵母 Pex7p (GenBank 登录号 CAG78389)	--	115 (356 AA)
解脂耶氏酵母 Pex8p (GenBank 登录号 CAG80447)	--	116 (671 AA)
解脂耶氏酵母 Pex10p (GenBank 登录号 CAG81606)	--	117 (377 AA)
解脂耶氏酵母 Pex12p (GenBank 登录号 CAG81532)	--	118 (408 AA)

[0053]

解脂耶氏酵母 PEX13p (GenBank 登录号 CAG81789)	--	119 (412 AA)
解脂耶氏酵母 Pex14p (GenBank 登录号 CAG79323)	--	120 (380 AA)
解脂耶氏酵母 Pex16p (GenBank 登录号 CAG79622)	--	121 (391 AA)
解脂耶氏酵母 Pex17p (GenBank 登录号 CAG84025)	--	122 (225 AA)
解脂耶氏酵母 Pex19p (GenBank 登录号 AAK84827)	--	123 (324 AA)
解脂耶氏酵母 Pex20p (GenBank 登录号 CAG79226)	--	124 (417 AA)
解脂耶氏酵母 Pex22p (GenBank 登录号 CAG77876)	--	125 (195 AA)
解脂耶氏酵母 Pex26p (GenBank 登录号 NC_006072, 核苷酸 117230-118387 的反义翻译)	--	126 (386 AA)
质粒 pY116	127 (8739 bp)	--
质粒 pZKSL-5S5A5	128 (13975 bp)	--
质粒 pZP3-Pa777U	129 (13066 bp)	--
质粒 pZKUM	130 (4313 bp)	--
质粒 pZKL2-5mB89C	131 (15991 bp)	--
质粒 pZKL1-2SR9G85	132 (14554 bp)	--
质粒 pZSCP-Ma83	133 (15119 bp)	--
质粒 pZKL4-398F2	134 (14623 bp)	--
质粒 pZP2-85m98F	135 (14619 bp)	--
质粒 pZK16-ML8N	136 (15262 bp)	--
质粒 pZK16-ML	137 (13075bp)	--
质粒 pZKL2-5m89C	138 (15799 bp)	--
质粒 pY201	139 (9641 bp)	--
被 Cre 重组酶识别的大肠杆菌(Escherichia coli) LoxP 重组位点	140 (34 bp)	--
引物 798	141	--
引物 799	142	--

[0054]

引物 800	143	--
引物 801	144	--
质粒 pY168	145 (9320 bp)	--
质粒 pY208	146 (8726 bp)	--
引物 856	147	--
引物 857	148	--
质粒 pY207	149 (8630 bp)	--
质粒 pY175	150 (8630 bp)	--
来源于啤酒糖酵母的合成的 LPAAT, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达(“ScLPAATS”)	151 (926 bp)	152 (303 AA)
质粒 pY222	153 (7891 bp)	--
引物 869	154	--
引物 870	155	--
质粒 pY177	156 (9598bp)	--

[0055] 发明详述

[0056] 本文描述的是能够生产高于 50% 的二十碳五烯酸 [“EPA”; 20:5 ω -3] 的解脂耶氏酵母生产宿主菌株。通过引入包含具有 $\Delta 9$ 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 $C_{16/18}$ 延伸酶活性的蛋白质的功能性的 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径, 从而使得能够生产 EPA 并使 γ -亚麻酸 [“GLA”] 最小化, 实现这种特定的多不饱和脂肪酸 [“PUFA”] 的积累。因此, 本公开证明了解脂耶氏酵母能被工程化以允许 EPA 及其衍生物的商业生产。还主张了生产的方法和由此生产的油。

[0057] PUFA 如 EPA (或其衍生物) 被用作膳食替代品或补充剂, 尤其是婴儿代乳品, 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, 可以将纯化的 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 还可以掺入婴儿代乳品、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)。

[0058] 为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 处理能够不仅导致 EPA 水平的升高, 而且导致 EPA 的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”; 顺式 -7, 10, 13, 16, 19- 二十二碳五烯酸; 22:5 ω -3] 和二十二碳六烯酸 [“DHA”; 顺式 -4, 7, 10, 13, 16, 19- 二十二碳六烯酸; 22:6 ω -3] 水平的升高。复杂的调控机制使得合并多种 PUFA 或添加 PUFA 的不同复合物来预防、控制或克服此类机制, 以使特定的 PUFA 在个体中达到所期望的水平是合乎期望的。

[0059] 作为另外一种选择, 通过本文公开的方法制备的 PUFA 或其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 ω -3 和 / 或 ω -6 PUFA 营养物质组合物。

[0060] 本文所引用的所有专利、专利申请和出版物均以引用的方式全文并入本文。

[0061] 在本公开中,使用了大量的术语和缩写。给出了如下定义。

[0062] “开放阅读框”缩写为 ORF。

[0063] “聚合酶链反应”缩写为“PCR”。

[0064] “美国典型培养物保藏中心”缩写为“ATCC”。

[0065] “多不饱和脂肪酸”缩写为“PUFA”。

[0066] “三酰基甘油”缩写为“TAG”。

[0067] “辅酶 A”缩写为“CoA”。

[0068] “总脂肪酸”缩写为“TFA”。

[0069] “脂肪酸甲酯”缩写为“FAME”。

[0070] “细胞干重”缩写为“DCW”。

[0071] 如本文所用的,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。

[0072] 术语“食物产品”指一般适于人类消耗的任何食物。典型的食物产品包括但不限于:内类产品、谷类产品、烘焙食品、快餐食品、乳制品、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”如美国专利申请公布 2006-0115881-A1 中所定义的。

[0073] 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。

[0074] 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。婴儿代乳品的典型的商品化实例包括但不限于:Similac®和 Isomil®。

[0075] 术语“饮食补充剂”是指(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的产品。

[0076] 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”如美国专利申请公布 2006-0115881-A1 中所定义的。

[0077] 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,其来自以商业上有意义的量生产 PUFA 的重组生产宿主的发酵,其中优选的生产宿主是含油酵母解脂耶氏酵母的重组菌株。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)。

[0078] 术语“脂质”指任何脂溶性的(即,亲脂的)、天然存在的分子。美国专利申请公布 2009-0093543-A1 中提供了对脂质的一般综述(参见其中的表 2)。

[0079] 术语“甘油磷脂”是指一大类分子,它们具有甘油核心,在甘油核心的 sn-1 位和 sn-2 位有脂肪酸,并且极性的头部基团(例如,磷酸酯、胆碱、胆胺、甘油、肌醇基、丝氨酸、心磷脂)通过磷酸二酯键连接在 sn-3 位上。甘油磷脂因此包括磷脂酸[“PA”]、磷脂酰胆碱[“PC”]、磷脂酰乙醇胺[“PE”]、磷脂酰甘油[“PG”]、磷脂酰肌醇[“PI”]、磷脂酰丝氨酸[“PS”]和心磷脂[“CL”]。甘油磷脂拥有巨大的多样性,这不仅是可变的磷酸基头

部基团所致,而且还因为它们的脂肪酸的不同链长和饱和程度。一般而言,饱和的和单不饱和的脂肪酸在 sn-1 位被酯化,而多不饱和脂肪酸在 sn-2 位被酯化。

[0080] “溶血磷脂”通过 sn-2 位脂肪酸的脱酰反应而衍生自甘油磷脂。溶血磷脂包括,例如,溶血磷脂酸 [“LPA”]、溶血磷脂酰胆碱 [“LPC”]、溶血磷脂酰乙醇胺 [“LPE”]、溶血磷脂酰丝氨酸 [“LPS”]、溶血磷脂酰甘油 [“LPG”] 和溶血磷脂酰肌醇 [“LPI”]。

[0081] 术语“油脂”是指在 25℃ 时为液体且通常为多不饱和的脂类物质。在含油生物中,油脂构成了总脂质的主要部分。“油脂”主要由三酰基甘油 [“TAG”] 组成,但还可包含其他中性脂质、磷脂和游离脂肪酸。油中的脂肪酸组合物和总脂质的脂肪酸组合物一般来讲是相似的;因此,总脂质中的 PUFA 浓度的提高或降低将对应于油中的 PUFA 浓度的提高或降低,反之亦然。

[0082] “中性脂质”是指那些一般作为贮存脂肪存在于细胞中的脂质体中的脂质,它们之所以被称为“中性脂质”,是因为在细胞的 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。中性脂质一般指脂肪酸的甘油单酯、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。

[0083] 术语“三酰基甘油” [“TAG”] 是指由三个脂肪酰残基酯化一个甘油分子组成的中性脂质。TAG 可以包含长链 PUFA 和饱和脂肪酸,以及较短的饱和的和不饱和的脂肪酸。

[0084] 本文所用术语“总脂肪酸” [“TFA”] 是指所有细胞脂肪酸的总量,所述脂肪酸在给定样品中能通过碱酯交换方法(如本领域所已知的)被衍生为脂肪酸甲酯 [“FAME”],所述样品可以是例如生物质或油脂。因此,总脂肪酸包括来自中性脂类级分(包括二酰基甘油、单酰基甘油和 TAG)的脂肪酸和来自极性脂质级分(包括,例如,PC 和 PE 级分)的脂肪酸,但是不包括游离脂肪酸。

[0085] 术语细胞的“总脂质含量”是 TFA 的量度,按干细胞重量 [“DCW”] 的百分比的形式表示,不过总脂质含量可近似地以 FAME 占 DCW 的百分比 [“FAME% DCW”] 量度。因此,总脂质含量 [“TFA% DCW”] 等于,例如,每 100 毫克 DCW 的脂肪酸毫克数。

[0086] 本文中总脂质中的脂肪酸浓度表示为 TFA 的重量% [“% 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)。

[0087] 在一些情况下,将给定的脂肪酸在细胞中的含量表示为其占干细胞重量的重量% [“% DCW”] 是有用的。如此,例如 EPA% DCW 将根据下式被测定: $(\text{EPA} \% \text{TFA}) * (\text{TFA} \% \text{DCW}) / 100$ 。然而,以给定的脂肪酸占干细胞重量的重量% [“% DCW”] 表示的给定的脂肪酸在细胞中的含量可以近似计算为: $(\text{EPA} \% \text{TFA}) * (\text{FAME} \% \text{DCW}) / 100$ 。

[0088] 术语“脂质谱”和“脂质组成”是可互换的,并且指在特定脂质级分中,例如在总脂质或油脂中,包含的各种脂肪酸各自的量,其中所述量按 TFA 的重量% 形式表示混合物中存在的各个脂肪酸的总量应当是 100。

[0089] 术语“萃取油”指已经从其他细胞材料中分离的油,例如其能够合成油的微生物。萃取油通过多种方法获得,其中最简单的方法仅涉及物理方法。例如,使用多种挤压构造(例如,螺杆、螺旋压榨机、活塞、珠磨器等)的机械压碎能够从细胞材料分离油。作为另外一种选择,可通过用多种有机溶剂处理(例如己烷)、酶提取、渗透压冲击破碎、超声波提

取、超临界流体萃取（例如 CO₂ 萃取）、皂化、以及这些方法的组合进行油萃取。萃取的油不需要进行不必要的纯化或进一步浓缩。本文所述的提取的油将包含至少 50EPA% TFA。

[0090] 术语“混合油”是指通过将本文所述的提取的油与任何组合的或单独的油混合或共混以得到所期望的组成而获得的油。因此，例如，来自不同微生物的各种类型的油能够被混合以得到所期望的 PUFA 组成。作为另外一种选择或除此之外，本文所公开的包含 PUFA 的油能够与鱼油、植物油或二者的混合物共混，以得到所期望的组成。

[0091] 术语“脂肪酸”指不同链长的长链脂族酸（链烷酸），链长为从约 C₁₂ 至 C₂₂，尽管更长和更短链长的酸都是已知的。主要的链长介于 C₁₆ 和 C₂₂ 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。美国专利 7,238,482 中提供了关于“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”]之间的区别的更多细节，该专利以引用方式并入本文。

[0092] 表 2 提供了用于描述本文的 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 脂肪酸及它们的前体的俗名、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。

[0093] 表 2：多不饱和脂肪酸和前体的命名

[0094]

通用名	缩写	化学名称	简化符号
肉豆蔻酸	--	十四酸	14:0
棕榈酸	棕榈酸盐	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
二十碳二烯酸	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
十八碳四烯酸	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 (sciadonic)	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
二十二碳四烯酸	DTA	顺式-7, 10, 13, 16-二十二碳四 烯酸	22:4 ω -6
二十二碳五烯酸	DPA ω -6	顺式-4,7, 10, 13, 16-二十二碳 五烯酸	22:5 ω -6

[0095]

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

[0096] 术语“PUFA 生物合成途径”是指将油酸转化成诸如 LA、EDA、GLA、DGLA、ARA、DTA 和 DPA ω -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（如参见美国专利申请公布 2006-0115881-A1）。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”指与 PUFA 生物合成相关联的任何以下酶（以及编码所述酶的基因），所述酶包括： 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。

[0097] 术语“ Δ 9 延伸酶 / Δ 8 去饱和酶途径”将指最低程度包括至少一种 Δ 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。

[0098] 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。本文尤其感兴趣的是: $\Delta 8$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶、 $\Delta 17$ 去饱和酶和 $\Delta 12$ 去饱和酶。其他有用的去饱和酶能够包括 $\Delta 4$ 去饱和酶、 $\Delta 6$ 去饱和酶、 $\Delta 15$ 去饱和酶和 $\Delta 9$ 去饱和酶。

[0099] 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,如国际申请公布 WO 2005/047480。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(例如肉豆蔻酸), $C_{16/18}$ 延伸酶将利用 C_{16} 底物(例如棕榈酸), $C_{18/20}$ 延伸酶将利用 C_{18} 底物(例如 GLA、STA),而 $C_{20/22}$ 延伸酶[也称为 $\Delta 5$ 延伸酶或 C_{20} 延伸酶]将利用 C_{20} 底物(例如 ARA、EPA)。就本文目的而言,能够确定两种不同类型的 $C_{18/20}$ 延伸酶: $\Delta 6$ 延伸酶将催化 GLA 和 STA 分别转化成 DGLA 和 ETA,而 $\Delta 9$ 延伸酶能够催化 LA 和 ALA 分别转化成 EDA 和 ETrA。

[0100] 术语“复合酶”或“融合蛋白”是指具有至少两种独立的和可分离的酶活性的单一多肽,其中第一种酶活性优选与第二种酶活性相连接(美国专利申请公布 2008-0254191-A1)。所述至少两种独立的和可分离的酶活性之间的“连接”或“结合”最低限度包含单个多肽键,尽管所述连接也可以由一个氨基酸残基如脯氨酸或包含至少一个脯氨酸残基的多肽组成。优选的连接子选自:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7。

[0101] 术语“DGLA 合酶”是指复合酶,其中 $\Delta 9$ 延伸酶连接至 $\Delta 8$ 去饱和酶。术语“EgD9eS/EgD8M”是指通过连接子序列(即,SEQ ID NO:1[GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS];美国专利申请公布 2008-0254191-A1)将 $\Delta 9$ 延伸酶“EgD9eS”(美国专利 7,645,604)连接至 $\Delta 8$ 去饱和酶“EgD8M”(美国专利 7,709,239)而得到的 DGLA 合酶(SEQ ID NO:8 和 9)。类似地,术语“EaD9eS/EaD8S”是指通过如 SEQ ID NO:1 所示的连接子序列将 $\Delta 9$ 延伸酶“EaD9eS”(美国专利申请公布 2008-0254522-A1)连接至 $\Delta 8$ 去饱和酶“EaD8S”(美国专利申请公布 2008-0254521-A1)而得到的 DGLA 合酶(SEQ ID NO:10 和 11)。并且,术语“E389D9eS/EgD8M”是指通过如 SEQ ID NO:1 所示的连接子序列将 $\Delta 9$ 延伸酶“E389D9eS”(美国专利 7,645,604)连接至 $\Delta 8$ 去饱和酶“EgD8M”(supra)而得到的 DGLA 合酶(SEQ ID NO:12 和 13)。

[0102] 术语“转化效率”和“底物转化百分比”是指特定酶(如去饱和酶、延伸酶或复合酶)能够将底物转化成产物的效率。转化效率根据下式测量:([产物]/[底物+产物])*100,其中‘产物’包括直接产物和在该途径中来源于它的所有产物。

[0103] 术语“ C_{18} - C_{20} 延伸转化效率”是指 $C_{18/20}$ 延伸酶能够将 C_{18} 底物(即 LA、ALA、GLA、STA)转化为 C_{20} 产物(即 EDA、ETrA、DGLA、ETA)的效率。这些 $C_{18/20}$ 延伸酶可以或者是 $\Delta 9$ 延伸酶或者是 $\Delta 6$ 延伸酶。

[0104] 术语“ $\Delta 9$ 延伸转化效率”是指 $\Delta 9$ 延伸酶能够将 C_{18} 底物（即 LA、ALA）转化为 C_{20} 产物（即 EDA、ETrA）的效率。

[0105] 术语“酰基转移酶”是指负责将酰基基团从供体脂质转移至受体脂质分子的酶。

[0106] 术语“酰基-辅酶 A :溶血磷脂酰基转移酶”[“LPLAT”] 是指具有使多种溶血磷脂底物在 sn-2 位酰化的能力的一大类酰基转移酶。更具体地讲, LPLAT 包括具有催化 LPA 至 PA 的转化的能力的 LPA 酰基转移酶 [“LPAAT”], 具有催化 LPC 至 PC 的转化的能力的 LPC 酰基转移酶 [“LPCAT”], 具有催化 LPE 至 PE 的转化的能力的 LPE 酰基转移酶 [“LPEAT”], 具有催化 LPS 至 PS 的转化的能力的 LPS 酰基转移酶 [“LPSAT”], 具有催化 LPG 至 PG 的转化的能力的 LPG 酰基转移酶 [“LPGAT”], 和具有催化 LPI 至 PI 的转化的能力的 LPI 酰基转移酶 [“LPIAT”]。LPLAT 命名的标准化还未被正式化, 因此多种其他的命名也在本领域中被使用（例如, LPAAT 也被称为酰基-辅酶 A :1-酰基-sn-甘油-3-磷酸 2-O-酰基转移酶、1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶和 / 或 1-酰基甘油磷酸酰基转移酶 [“AGPAT”], 而 LPCAT 经常被称为酰基-辅酶 A :1-酰基溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶）。此外, 值得注意的是, 一些 LPLAT 如啤酒糖酵母 Ale1 (ORF YOR175C ; SEQ ID NO :15), 具有广泛的特异性, 因此单种酶可能能够催化若干种 LPLAT 反应, 包括 LPAAT、LPCAT 和 LPEAT 反应 (Tamaki, H. 等人, J. Biol. Chem., 282 :34288-34298 (2007) ; Ståhl, U. 等人, FEBS Letters, 582 :305-309 (2008) ; Chen, Q. 等人, FEBS Letters, 581 :5511-5516 (2007) ; Benghezal, M. 等人, J. Biol. Chem., 282 :30845-30855 (2007) ; Riekhof, 等人, J. Biol. Chem., 282 :28344-28352 (2007))。

[0107] 更具体地讲, 术语“至少具有溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 [“LPCAT”] 活性的多肽”将指那些能够催化下列反应的酶: 酰基-辅酶 A +1-酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 $\rightarrow$ 辅酶 A +1, 2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (EC 2.3.1.23)。LPCAT 活性已被描述于两个结构上不同的蛋白质家族中, 即 LPAAT 蛋白质家族 (Hishikawa, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105 :2830-2835 (2008) ; 国际申请公布 WO 2004/076617) 和 ALE1 蛋白质家族 (Tamaki, H. 等人, 参见上文 ; Ståhl, U. 等人, 参见上文 ; Chen, Q. 等人, 参见上文 ; Benghezal, M. 等人, 参见上文 ; Riekhof, 等人, 参见上文)。

[0108] 术语“LPCAT”是指满足下列的 ALE1 蛋白质家族的蛋白: 1) 具有 LPCAT 活性 (EC 2.3.1.23) 并且基于 Clustal W 比对方法, 在与选自 SEQ ID NO :15 (ScAle1) 和 SEQ ID NO :17 (Y1Ale1) 的氨基酸序列进行比较时, 具有至少约 45% 的氨基酸同一性 ; 和 / 或, 2) 具有 LPCAT 活性 (EC 2.3.1.23) 并且具有至少一种膜结合 O-酰基转移酶 [“MBOAT”] 蛋白质家族基序, 所述基序选自 M(V/I)LxxKL (SEQ ID NO :18)、RxxKYYxxW (SEQ ID NO :19)、SAxWHG (SEQ ID NO :20) 和 EX₁₁WXX₂-[T/V]-X₂W (SEQ ID NO :21)。ALE1 多肽的实例包括 ScAle1 和 Y1Ale1。

[0109] 术语“ScAle1”是指从啤酒糖酵母 (ORF “YOR175C”) 分离的 LPCAT (SEQ ID NO :15), 其被如 SEQ ID NO :14 所示的核苷酸序列编码。与此相对, 术语“ScAle1S”是指来源于啤酒糖酵母的合成的 LPCAT, 其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达 (即, SEQ ID NO :22 和 23)。

[0110] 术语“Y1Ale1”是指从解脂耶氏酵母分离的 LPCAT (SEQ ID NO :17), 其被如 SEQ ID NO :16 所示的核苷酸序列编码。

[0111] 术语“LPCAT”还指具有 LPCAT 活性 (EC 2.3.1.23), 并且基于 Clustal W 比对方法, 在与如 SEQ ID NO :25 (CeLPCAT) 所示的氨基酸序列进行比较时, 具有至少约 90% 的氨

基酸同一性的蛋白质。

[0112] 术语“CeLPCAT”是指从秀丽隐杆线虫分离的LPCAT酶(SEQ ID NO:25),其被如SEQ ID NO:24所示的核苷酸序列编码。与此相对,术语“CeLPCATS”是指来源于秀丽隐杆线虫的合成LPCAT,其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达(即,SEQ ID NO:26和27)。

[0113] 术语“至少具有溶血磷脂酸酰基转移酶[“LPAAT”]活性的多肽”将指那些能够催化下列反应的酶:酰基-辅酶A+1-酰基-sn-甘油3-磷酸→辅酶A+1,2-二酰基-sn-甘油3-磷酸(EC 2.3.1.51)。

[0114] 术语“LPAAT”是指满足下列的蛋白质:1)具有LPAAT活性,并且基于Clustal W比对方法,在与选自SEQ ID NO:29(MaLPAAT1)、SEQ ID NO:31(Y1LPAAT1)和SEQ ID NO:32(ScLPAAT1)的氨基酸序列进行比较时,具有至少约43.9%的氨基酸同一性;和/或,2)具有LPAAT活性并且具有至少一种1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶家族基序,所述基序选自:NHxxxxD(SEQ ID NO:33)和EGTR(SEQ ID NO:34)。LPAAT多肽的实例包括ScLPAAT、MaLPAAT1和Y1LPAAT1。

[0115] 术语“ScLPAAT”是指从啤酒糖酵母(ORF“YDL052C”)分离的LPAAT(SEQ ID NO:32)。

[0116] 术语“MaLPAAT1”是指从高山被孢霉分离的LPAAT(SEQ ID NO:29),其被如SEQ ID NO:28所示的核苷酸序列编码。与此相对,术语“MaLPAAT1S”是指来源于高山被孢霉的合成的LPAAT,其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达(即,SEQ ID NO:35和36)。

[0117] 术语“Y1LPAAT1”是指从解脂耶氏酵母分离的LPAAT(SEQ ID NO:31),其被如SEQ ID NO:30所示的核苷酸序列编码。

[0118] 术语“直系同源物”是指如通过在系统发育树分析中处于一个进化枝上和催化相同的酶反应显示的,从共同的祖先蛋白质进化而来的来自不同物种的同源蛋白质。

[0119] 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。

[0120] 术语“Y1CPT1”是指二酰基甘油胆碱磷酸转移酶(SEQ ID NO:38),该酶分离自解脂耶氏酵母,由SEQ ID NO:37编码。Y1CPT1描述于国际申请公布WO 2006/052870中(另参见GenBank登录号XM_501703(YALI0C10989g))。

[0121] 术语“丙二酸”,根据国际纯粹与应用化学联合会[“IUPAC”]系统命名法也被称为丙烷二羧酸,是指如 $\text{CH}_2(\text{COOH})_2$ 所示的化学结构的二元羧酸。丙二酸根或丙烷二羧酸根离子通过失去两个氢离子来源于丙二酸(即, $\text{CH}_2(\text{COO})_2^{2-}$)。丙二酸的盐和酯包括但不限于丙二酸二乙酯 $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2(\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4)]$ 、丙二酸二甲酯 $[(\text{CH}_3)_2(\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4)]$ 和丙二酸二钠 $[\text{Na}_2(\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4)]$ 。

[0122] “丙二酸根”是指丙二酸的电离形式以及它的酯和盐。所有这些在本文中统称为“丙二酸”。

[0123] “丙二酸-辅酶A”[CAS编号524-14-1]是指能够通过乙酰-辅酶A向丙二酰-辅酶A的羧化反应形成的酰基硫酯。作为另外一种选择,丙二酰-辅酶A通过丙二酰-辅酶A合成酶从底物丙二酸酶反应地产生。

[0124] “丙二酰-辅酶A合成酶”[EC 6.2.1.-]催化下列酶反应:丙二酸+ATP+辅酶A→丙二酰-辅酶A+AMP+焦磷酸(PPi)。该酶首先纯化自丙二酸-生长型荧光

假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*) (Kim, Y. S. 和 S. K. Bang, *J. Biol. Chem.*, 260 : 5098-5104(1985)), 尽管之后又从豆科植物根瘤中的类细菌分离了多种根瘤菌同源物 (参见, 例如, Kim, Y. S. 和 H. Z. Chae, *Biochem. J.*, 273 :511-516(1991) 和 Kim, Y. S. 和 S. W. Kang, *Biochem. J.*, 297 :327-333(1994))。

[0125] 如本文所用, 术语“rMCS”是指编码从豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) 3841 (GenBank 登录号 YP_766603) 分离的丙二酰-辅酶 A 合成酶 (SEQ ID NO : 40) 的基因 (SEQ ID NO :39)。类似地, 术语“MCS”编码来源于豌豆根瘤菌 3841 的丙二酰-辅酶 A 合成酶的、针对在解脂耶氏酵母中的表达经过密码子优化的合成的基因 (即, SEQ ID NO :41 和 42)。

[0126] 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-辅酶 A 游离分子, 它们被输回到细胞溶质中, 该过程称为 β -氧化。

[0127] 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。编码任何这些蛋白的基因的首字母缩写是“Pex 基因”。基因的命名体系描述于 Distel 等人, *J. Cell Biol.*, 135 :1-3(1996) 中。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 (*Traffic*, 7 :1291-1303(2006)) 的综述, 其中进行了对 17 种不同的真菌物种基因组序列的计算机分析, 鉴定了下列 Pex 蛋白质 :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-like 和 Pex26p。这些蛋白本文将统称为由“Pex 基因”编码的“Pex 蛋白”。

[0128] 术语“保守结构域”或“基序”表示进化上相关的蛋白质的比对序列中在特定位置处保守的一组氨基酸。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。

[0129] 术语“下调”在至少一种过氧化物酶体生物合成因子蛋白中或与之相关时, 是指与野生型蛋白质的活性相比, 天然的过氧化物酶体生物合成因子蛋白的活性的降低或消除。下调通常在天然的 Pex 基因具有“破坏”时发生, “破坏”指在该基因的部分中的插入、缺失、或定向突变, 所述破坏导致整个基因敲除使得该基因从基因组中缺失并且不翻译出蛋白质, 或者导致翻译的 Pex 蛋白具有插入、缺失、氨基酸取代或其它定向突变。蛋白中的中断位置可以是在例如蛋白的 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。导致 Pex 蛋白质的表达降低或缺失的下调还可以通过操纵调控序列、转录和翻译因子和 / 或信号转导途径,或者通过使用有义、反义或 RNAi 技术等实现。

[0130] 术语“含油的”是指倾向于以油的形式贮存它们的能源的那些生物 (Weete, *Fungal Lipid Biochemistry*, 第 2 版, Plenum, 1980)。术语“含油酵母”是指那些能够产油并被归类为酵母的微生物。通常,含油微生物的细胞油脂含量符合 S 形曲线,其中脂质浓度增加直至在对数生长期晚期或稳定生长期早期达到最高浓度,随后在稳定生长期晚期和死亡期逐渐下降 (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以下属: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。

[0131] 术语“可发酵的碳源”是指微生物将其代谢以获取能量的碳源。典型的碳源包括但不限于:单糖、二糖、低聚糖、多糖、烷烃、脂肪酸、脂肪酸的酯、单酸甘油酯、甘油二酯、甘油三酯、二氧化碳、甲醇、甲醛、甲酸盐和含碳胺类。

[0132] 术语“多核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸序列”、“核酸片段”和“分离的核酸片段”本文可互换使用。这些术语涵盖核苷酸序列等的范围。多核苷酸可以是 RNA 或 DNA 的聚合物,它们可以是单链或双链,任选含有合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。DNA 聚合物形式的多核苷酸可由 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA 或它们的混合物的一个或多个片段构成。核苷酸(通常以它们的 5' - 单磷酸形式存在)通过单字母命名指代如下:“A”指腺苷酸或脱氧腺苷酸(分别用于 RNA 或 DNA),“C”指胞苷酸或脱氧胞苷酸,“G”指鸟苷酸或脱氧鸟苷酸,“U”指尿苷酸,“T”指脱氧胸苷酸,“R”指嘌呤(A 或 G),“Y”指嘧啶(C 或 T),“K”指 G 或 T,“H”指 A 或 C 或 T,“I”指肌苷,“N”指任何核苷酸。

[0133] 氨基酸或核苷酸序列的“基本部分”指这样的部分,该部分包含的多肽的氨基酸序列或基因的核苷酸序列足以通过推定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对所述序列的人工评估进行,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 个或更多个核苷酸的序列。此外,对于核苷酸序列,包含 20-30 个连续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(例如 Southern 杂交)和基因分离(如细菌菌落或噬菌斑的原位杂交)的方法中。此外,12-15 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”所包含的序列应足以特异性地鉴定和 / 或分离包含该序列的核酸片段。

[0134] 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。

[0135] “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来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。

[0136] “合成基因”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基本单位装配而成。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好性,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谱。

[0137] “基因”指能够表达特定蛋白的核酸片段,并且其可单独指编码区或可包括在编码序列之前(5' 非编码序列)和之后(3' 非编码序列)的调节序列。“天然基因”指与其自身调节序列一起天然存在的基因。“嵌合基因”指非天然基因的任何基因,包含非天然一起存在的调节序列和编码序列。因此,嵌合基因可包含源自不同来源的调控序列和编码序列,或者源自相同来源、但是排列方式与天然存在的排列方式不同的调控序列和编码序列。“内源基因”是指在生物基因组中的天然位置的天然基因。“外来”基因指通过基因转移导入至宿主生物内的基因。外来基因可包括插入到非天然生物内的天然基因、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。

[0138] “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”指位于编码序列上游(5' 非编码序列)、中间、或下游(3' 非编码序列)并影响相关联的编码序列的转录、RNA 加工或稳定性、或翻译的核苷酸序列。调控序列可包括启动子、增强子、沉默子、5' 非翻译前导序列(例如在转录起始位点和翻译起始密码子之间的序列)、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。

[0139] “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。启动子可整体源于天然基因,或者由源于天然存在的不同启动子的不同元件构成,或者甚至可包含合成的 DNA 片段。本领域内的技术人员应当理解,不同的启动子可以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。导致基因在大部分时间内在大多数细胞类型中表达的启动子通常称为“组成型启动子”。进一步认识到,由于在大多数情况下调控序列的确切边界尚未完全确定,因此不同长度的 DNA 片段可能具有相同的启动子活性。

[0140] 术语“3' 非编码序列”和“转录终止子”是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他序列。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。

[0141] 术语“可操作地连接”是指核酸序列在单个核酸片段上的关联,使得其中一个核酸序列的功能受到另一个核酸序列的影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达时,它可操作地与编码序列连接。即,编码序列处于启动子的转录控制下。编码序列可以按有义或反义的取向可操作地连接至调控序列。

[0142] 如本文所用,术语“表达”是指有义(mRNA)或反义 RNA 的转录和稳定积聚。表达也可指将 mRNA 翻译成多肽。

[0143] “转化”是指将核酸分子转移进宿主生物。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。包含转化核酸片段的宿主生物被称为“转基因”或“重组”或“转化的”生物体或“转化体”。

[0144] “稳定转化”是指将核酸片段转移进宿主生物的基因组中(既包括核基因组也包括细胞器基因组),导致基因稳定遗传(即,该核酸片段被“稳定地整合”)。相反,“瞬时转化”是指核酸片段转移进宿主生物体的胞核中或含 DNA 的细胞器中,从而导致基因表达而不整合或不稳定遗传。

[0145] 术语“质粒”和“载体”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。

[0146] 术语“表达盒”指 DNA 片段,所述 DNA 片段包含:所选基因的编码序列和所选基因产物表达所需的位于该编码序列之前(5' 非编码序列)和之后(3' 非编码序列)的调控序列。因此,表达盒通常由下列组成:1) 启动子序列;2) 编码序列(即,ORF);和 3) 3' 非翻译区(即终止子),所述非翻译区在真核生物中通常包含多聚腺苷酸化位点。表达盒通常包含于载体中以有利于克隆和转化。只要能针对每种宿主使用正确的调控序列,则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。

[0147] 术语“序列分析软件”指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将包括但不限于:1) GCG 程序软件包(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)。在本专利申请的上下文中应当理解,使用序列分析软件进行分析时,分析结果将基于所参考程序的“默认值”,除非另外指明。在此所用的“默认值”将指在首次初始化软件时软件最初加载的任何值或参数集。

[0148] 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所描述:Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY(1989)(下文中称为“Maniatis”);Silhavy, T. J., Bennis, 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 出版, Hoboken, NJ(1987)。

[0149] 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的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 1)。

[0150] 可将多种脂肪酸（包括饱和的和饱和的脂肪酸以及短链和长链脂肪酸）掺入 TAG，它是脂肪酸的主要贮藏单位。在本文所述的方法和宿主细胞中，EPA 向 TAG 中的掺入是最合乎期望的，尽管 EPA 的结构形式是不受限制的（因此，例如，EPA 在总脂质中可以作为游离脂肪酸或以酯化形式如酰基甘油、磷脂、硫脂或糖脂存在）。

[0151] 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 应至少包括那些位于 PC、PE 和 TAG 级分中的 PUFA。

[0152] 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长酶。然而，如在图 1 中看到的和如下文所述的，存在多个用于 EPA 生产的替代途径。

[0153] 具体地讲，图 1 描述了下文所述的途径。所有途径都需要首先通过 $\Delta 12$ 去饱和酶将油酸转化为亚油酸 [“LA”]- 第一个 $\omega-6$ 脂肪酸。然后，使用“ $\Delta 9$ 延伸酶 / $\Delta 8$ 去饱和酶途径”并用 LA 作底物，如下形成长链 $\omega 6$ 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 $\omega-6$ ”]。

[0154] “ $\Delta 9$ 延伸酶 / $\Delta 8$ 去饱和酶途径”也能够利用 α -亚麻酸 [“ALA”] 作为底物生产长链 $\omega-3$ 脂肪酸如下：1) 通过 $\Delta 15$ 去饱和酶将 LA 转化成 ALA，第一个 $\omega-3$ 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， $\omega-6$ 脂肪酸可转化成 $\omega-3$ 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，有利的是 $\Delta 9$ 延伸酶 / $\Delta 8$ 去饱和酶途径能够生产不含显著量的 γ -亚麻酸 [“GLA”] 的 EPA 油。

[0155] $\omega-3/\omega-6$ 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，通过 $\Delta 6$ 去饱和酶，LA 和 ALA 可分别被转化为 GLA 和十八碳四烯酸 [“STA”]；然后， $C_{18/20}$ 延伸酶将 GLA 转化为 DGLA 并且 / 或者将 STA 转化为 ETA。

[0156] EPA 在重组耶氏酵母属宿主细胞中经济的商业生产需要考虑多种变量，包括 EPA 浓度 [“EPA% TFA”] 和总脂质含量 [“TFA% DCW”]。此外，还期望在最终的油产品中降低中间体脂肪酸和副产物脂肪酸的生产，以使所期望的脂肪酸即 EPA 的生产最大化。

[0157] 中间体脂肪酸是能够通过其他代谢途径的酶的作用被进一步转化为 EPA 的那些脂肪酸（例如，油酸、LA、ALA、EDA、DGLA、ETA）。与此相对，副产物脂肪酸（例如，金松烯酸、杜松烯酸）是指所产生的既不是 EPA 也不是能被进一步转化为 EPA 的中间体脂肪酸的任何脂肪酸。

[0158] 美国专利申请公布 2009-0093543-A1 描述了具有生产微生物油的能力的优化的重组解脂耶氏酵母菌株，其中所述微生物油包含至少约 43.3EPA% TFA，同时具有少于约 23.6LA% TFA (EPA : LA 比值为 1.83)。优选的菌株是 Y4305，其最高产量为 55.6EPA% TFA，具有 3.03 的 EPA : LA 比值。一般地，美国专利申请公布 2009-0093543-A1 的 EPA 菌株包

含 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径的下列基因：

[0159] a) 至少一种编码 Δ 9 延伸酶的基因 ;和,

[0160] b) 至少一种编码 Δ 8 去饱和酶的基因 ;和,

[0161] c) 至少一种编码 Δ 5 去饱和酶的基因 ;和,

[0162] d) 至少一种编码 Δ 17 去饱和酶的基因 ;和,

[0163] e) 至少一种编码 Δ 12 去饱和酶的基因 ;和,

[0164] f) 至少一种编码 $C_{16/18}$ 延伸酶的基因 ;和,

[0165] g) 任选地,至少一种编码二酰基甘油胆碱磷酸转移酶 (CPT1) 的基因。

[0166] 具有上述酶学功能的优选的基因的实例列于表 3 中 (尽管这些基因不应视为对本发明的限制)。

[0167]

表 3: 解脂耶氏酵母中用于 EPA 生物合成的优选的去饱和酶和延伸酶

ORF	生物	共同未决的专利申请参考文献	野生型 缩写和 SEQ ID NO	密码子优化的 缩写和 SEQ ID NO	突变体缩写和 SEQ ID NO
Δ9 延伸酶	小眼虫	美国专利 7,645,604 中。	"EgD9 _e " (SEQ ID NO: 43 和 44)	"EgD9 _{eS} " (SEQ ID NO: 45 和 46)	--
	小型绿藻属 CCMP389	美国专利 7,645,604 中。	"E389D9 _e " (SEQ ID NO: 47 和 48)	"E389D9 _{eS} " (SEQ ID NO: 49 和 50)	--
	<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373	美国专利申请公布 2008-0254522-A1; 国际申请公布 WO 2008/128241。	"EaD9 _e " * (SEQ ID NO: 51 和 52)	"EaD9 _{eS} " (SEQ ID NO: 53 和 54)	--
Δ8 去饱和酶	小眼虫 (<i>Euglena gracilis</i>)	美国专利 7,256,033; 美国专利 7,709,239	"EgD8" * (SEQ ID NO: 55 和 56)	"EgD8 _S " * (SEQ ID NO: 57 和 58)	"EgD8 _M " * (SEQ ID NO: 59 和 60)
	<i>liuglena anabaena</i> UTEX 373	美国专利申请公布 2008-0254521-A1; 国际申请公布 WO 2008/124194	"EaD8" * (SEQ ID NO: 61 和 62)	"EaD8 _S " (SEQ ID NO: 63 和 64)	--
Δ5 去饱和酶	小眼虫 (<i>Euglena gracilis</i>)	美国专利 7,678,560; 美国专利公布 2010-0075386-A1	"EgD5" (SEQ ID NO: 65 和 66)	"EgD5 _S " (SEQ ID NO: 67 和 68)	"EgD5 _M " (SEQ ID NO: 69 和 70); "EgD5 _{SM} " (SEQ ID NO: 71 和 72)

Δ17 去饱和酶	多甲藻属 CCMP626	美国专利 7,695,950; 美国专利公布 2010-0075386-A1	"RD5" (SEQ ID NO: 73 和 74)	"RD5S" (SEQ ID NO: 75 和 76)	--
	<i>Euglena anabaena</i> UTEX 373	美国专利申请公布 2008-0274521-A1; 美国专利公布 2010-0075386-A1	"EaD5" * (SEQ ID NO: 77 和 78)	"EaD5S" * (SEQ ID NO: 79 和 80)	"EaD5SM" (SEQ ID NO: 81 和 82)
Δ12 去饱和酶	栎树猝死病菌 (<i>Phytophthora ramorum</i>)	美国专利 7,465,793	"PrD17" (SEQ ID NO: 83 和 84)	"PrD17S" (SEQ ID NO: 85 和 86)	--
	瓜果腐霉菌 (<i>Pythium aphanidermatum</i>)	美国专利 7,556,949	"PaD17" (SEQ ID NO: 87 和 88)	"PaD17S" (SEQ ID NO: 89 和 90)	--
C ₁₆ 18 延伸酶	串珠镰刀菌 (<i>Fusarium moniliforme</i>)	美国专利 7,504,259	"FmD12" * (SEQ ID NO: 91 和 92)	"FmD12S" (SEQ ID NO: 93 和 94)	--
	高山被孢霉 (<i>Mortierella alpina</i>)	美国专利 7,470,532	"ELO3" (SEQ ID NO: 95 和 96)	"ME3S" (SEQ ID NO: 97 和 98)	--
二酰基甘油胆碱 磷酸转移酶	解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	国际申请公布 WO 2006/052870	"YICP1" (SEQ ID NO: 37 和 38)	--	--

* 注意: EaD9e在美国专利申请公布2008-0254522-A1中被鉴定为“EaD9E1o1”；EgD8在美国专利7,256,033中被鉴定为“Eg5”；EgD8S在美国专利7,256,033中被鉴定为“D8SF”；EgD8M在美国专利7,709,239中被鉴定为“EgD8S-23”；EaD8在美国专利申请公布2008-0254521-A1中被鉴定为“EaD8Des3”；EaD5在美国专利申请公布2008-0274521-A1中被鉴定为“EaD5Des1”；以及，FmD12在美国专利7,504,259中被鉴定为“Fm2”。

[0169] 本文提供的是具有生产改善的微生物油能力的优化的重组解脂耶氏酵母菌株，所述改善是基于EPA% TFA和EPA：LA的比值，相对于美国专利申请公布2009-0093543-A1中

所述的那些菌株而言。除了表达如上文所定义的并如美国专利申请公布 2009-0093543-A1 中所详述的 ω -3/ ω -6 脂肪酸生物合成途径的基因外,这些改善的菌株的区别特征还在于:

[0170] 1) 包含至少一种复合酶,所述复合酶包含具有连接到至少一种脂肪酸 Δ 8 去饱和酶的至少一种 Δ 9 延伸酶 [“DGLA 合酶”] 的多肽;

[0171] 2) 任选地包含至少一种编码酶的多核苷酸,所述酶选自丙二酰-辅酶 A 合成酶或酰基-辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶 [“LPLAT”];

[0172] 3) 包含至少一种其表达被下调的过氧化物酶体生物合成因子蛋白;

[0173] 4) 生产至少约 50EPA% TFA ;和,

[0174] 5) 具有至少约 3.1 的 EPA : LA 比值。

[0175] 美国专利申请公布 2008-0254191-A1,尤其是实施例 55 和 56 (这两个实施例以引用方式并入本文),描述了当在解脂耶氏酵母中异源表达时,相对于它们单独的 Δ 9 延伸酶和 / 或 Δ 8 去饱和酶对应物具有改善的酶学活性的 DGLA 合酶。与本发明尤其相关的是,连接子序列 (即, SEQ ID NO :1 [GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS]) 被用于使 Δ 9 延伸酶 (即, EgD9eS、EaD9eS 或 E389D9eS) 与 Δ 8 去饱和酶 (即, EgD8M 或 EaD8S) 融合,从而得到 EgD9eS/EgD8M (SEQ ID NO :8 和 9)、EaD9eS/EaD8S (SEQ ID NO :10 和 11) 和 E389D9eS/EgD8M (SEQ ID NO :12 和 13)。令人意外地,使这两种独立的酶融合为一个由连接子区域分隔的融合蛋白提高了从 LA 到 DGLA 的流量,表明在该融合蛋白中, Δ 9 延伸酶的产物可能作为 Δ 8 去饱和酶的底物被直接输送。

[0176] 下文的表 4 提供了对作为基因融合的结果,美国专利申请公布 2008-0254191-A1 中以转化效率标注的改善的总结。具体而言,以粗体字显示的数字是延伸酶或去饱和酶活性的改善百分比,而括号中显示的细节提供了基因融合中的延伸酶或去饱和酶转化效率对比当该基因被单独表达时的延伸酶或去饱和酶转化效率。

[0177] 表 4 : Δ 9 延伸酶和 Δ 8 去饱和酶转化作为基因融合结果的改善

	基因融合	Δ 9 改善	Δ 8 改善
[0178]	EgD9eS/EgD8M (SEQ ID NO:8 和 9)	5% (21%对 20%转化)	97% (73%对 37%转化)
	EaD9eS/EaD8S (SEQ ID NO:10 和 11)	38% (18%对 13%转化)	32% (58%对 41%转化)
	E389D9eS/EgD8M (SEQ ID NO:12 和 13)	50% (18%对 12%转化)	89% (70%对 37%转化)

[0179] 基于上述结果,在具有生产改善的 EPA% TFA 的能力的改善的优化的重组解脂耶氏酵母菌株中,至少一种 DGLA 合酶 (例如上文所述的 EgD9eS/EgD8M、EaD9eS/EaD8S 和 E389D9eS/EgD8M 基因融合) 的表达是优选的。这种基因融合能够利用适用于在解脂耶氏酵母中的表达的优选的 Δ 9 延伸酶和 Δ 8 去饱和酶的任何组合而产生;并且,所述连接子可选自:SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :7。

[0180] 先前的研究已确定,涉及在解脂耶氏酵母中工程化 PUFA 生产的许多基因突变导致了在发酵过程中副产物丙二酸的增加 (丙二酸占所积累的总有机酸的 ~ 45%)。异源丙

二酰-辅酶 A 合成酶的表达逆转了这一效应,并导致副产物丙二酸的大幅度减少。

[0181] 更具体地讲,美国专利申请 12/637877(提交于 2009 年 12 月 15 日,代理人案号 CL4323)描述了在产物生产过程中,避免在发酵过程中不能被进一步利用的有机酸(具体而言为丙二酸)“副产物”的积累的一般化方法。这避免了生物体内碳和能量的浪费,减少了在发酵过程中维持最佳的 pH 范围所需的碱的量,并且减少了发酵废蒸汽中需要中和的副产物有机酸的量。

[0182] 丙二酰-辅酶 A 合成酶 [EC 6.2.1.-] 催化下列酶反应:丙二酸+ATP+辅酶 A→丙二酰-辅酶 A+AMP+焦磷酸(PPi)。通过将副产物(即,丙二酸)转化为丙二酰-辅酶 A,该底物变得可用于生物体中的脂肪酸合成。具体而言,脂肪酸合成可概括为下列公式(忽略 H⁺和水):乙酰-辅酶 A+7 丙二酰-辅酶 A+14NADPH→棕榈酸酯+7CO₂+14NADP⁺+8 辅酶 A。

[0183] 在美国专利申请 12/637877 中构建并在解脂耶氏酵母中表达了经密码子优化的丙二酰-辅酶 A 合成酶。具体而言,基于来自豌豆根瘤菌 3841 的丙二酰-辅酶 A 合成酶基因的编码序列(rMCS;SEQ ID NO:39 和 40,对应于 GenBank 登录号 YP_766603),设计了经密码子优化的丙二酰-辅酶 A 合成酶基因(“MCS”,SEQ ID NO:41)。除对翻译起始位点的改变外,还改变了 1515bp 编码区(包括终止密码子)中的 233bp(15.4%)、优化了 219 个密码子(43.4%)、将 GC 含量从野生型基因(即,rMCS)中的 61.4%降低至合成基因(即,MCS)中的 55.6%,并且由于耶氏酵母不能利用“GTG”进行翻译起始,还在 rMCS 基因(SEQ ID NO:39)前面添加了翻译起始密码子“ATG”。上述经密码子优化的 MCS 基因(SEQ ID NO:41)为编码 505 个氨基酸的多肽的 1518bp 和终止密码子(SEQ ID NO:42)。

[0184] MCS(SEQ ID NO:42)在解脂耶氏酵母菌株 Y4305U 中的表达生产了 49EPA% TFA,使丙二酸的总量(g/g DCW)降低了~94%,而既没有影响脂肪酸谱也没有影响总脂质产量(TFA% DCW)。

[0185] 基于上述结果,至少一种丙二酰-辅酶 A 合成酶在改善的优化的重组解脂耶氏酵母菌株中的表达,作为减少不需要的副产物的产生并从而降低生产成本的手段是合乎期望的。优选的丙二酰-辅酶 A 合成酶如 SEQ ID NO:40 和 42 所示,但这些不应对本公开构成限制。本领域的技术人员能够容易地辨识适用于在解脂耶氏酵母中的表达的替代性异源丙二酰-辅酶 A 合成酶。

[0186] 甘油磷脂是生物酶的主要组分,其包含甘油核心,脂肪酸作为 R 基连接在甘油核心的 sn-1 位和 sn-2 位上,而极性头部基团通过磷酸二酯键连接在 sn-3 位上。下面的表 5 概述了最初由 Kennedy 和 Weiss(J. Biol. Chem., 222:193-214(1956))描述的从头生物合成途径的步骤:

[0187] 表 5:甘油磷脂从头生物合成的一般反应

[0188]

sn-甘油-3-磷酸 → 溶血磷脂酸 (1-酰基-sn-甘油 3-磷酸或“LPA”)	甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT) [E.C. 2.3.1.15]使第 1 个酰基-辅酶 A 酯化至 sn-甘油 3-磷酸的 sn-1 位。
LPA → 磷脂酸 (1, 2-二酰基甘油磷酸酯或“PA”)	溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT) [E.C. 2.3.1.51]使第 2 个酰基-辅酶 A 酯化至 LPA 的 sn-2 位。

[0189]

PA → 1, 2-二酰基甘油(“DAG”) 或者 PA → 胞苷二磷酸二酰基甘油(“CDP-DG”)	磷脂酸磷酸酶[E.C. 3.1.3.4] 从 PA 移除磷酸根; 然后 DAG 能够被转化为磷脂酰胆碱[“PC”]、磷酸酰乙醇胺[“PE”]或 TAG (TAG 的合成需要二酰基甘油酰基转移酶(DGAT) [E.C. 2.3.1.20]或者磷脂: 二酰基甘油酰基转移酶(PDAT) [E.C.2.3.1.158]) CDP-二酰基甘油合酶[EC 2.7.7.41]导致 PA 和胞苷三磷酸的缩合, 消去焦磷酸酯; CDP-DG 能够随后被转化为磷脂酰甘油[“PG”]、磷脂酰肌醇[“PI”]、磷脂酰丝氨酸[“PS”]或心磷脂[“CL”]
--	--

[0190] 在被从头合成之后, 甘油磷脂能够经历 sn-2 位的脂肪酰成分的快速翻转。这种“重构”, 或者“酰基编辑”, 被认为是甘油磷脂的脱酰反应和所得到的溶血磷脂随后的再酰化所致。

[0191] 在 Lands 循环 (Lands, W. E., J. Biol. Chem., 231:883-888(1958)) 中, 重构通过下列协同的反应发生: 1) 磷脂酶, 例如磷脂酶 A₂, 从磷脂酰胆碱的 sn-2 位释放脂肪酸; 和, 2) 酰基-辅酶 A: 溶血磷脂酰基转移酶 [“LPLAT”], 例如溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 [“LPCAT”], 使溶血磷脂酰胆碱 [“LPC”] 在 sn-2 位再酰化。其他的甘油磷脂也可以在它们相应的溶血磷脂酰基转移酶活性作用下涉及重构, 包括具有溶血磷酸酰乙醇胺酰基转移酶 [“LPEAT”] 活性、溶血磷脂酰丝氨酸酰基转移酶 [“LPSAT”] 活性、溶血磷脂酰甘油酰基转移酶 [“LPGAT”] 活性和溶血磷脂酰肌醇酰基转移酶 [“LPIAT”] 活性的 LPLAT 酶。在所有情况下, LPLAT 负责从细胞的酰基-辅酶 A 库中移除酰基-辅酶 A 脂肪酸和在 sn-2 位酰化磷脂库中的多种溶血磷脂底物。最后, LPLAT 还包括涉及从 LPA 向 PA 的从头生物合成的 LPAAT 酶。

[0192] 在其他的情况下, 这种 sn-2 位重构被认为是具有 LPCAT 活性的酶的正向和逆向反应所致 (Stymne S. 和 A. K. Stobart, Biochem J., 223(2):305-314(1984))。

[0193] Shindou 等人最近的数篇综述提供了对甘油磷脂生物合成和 LPLAT 的功能的概述 (J. Biol. Chem., 284(1):1-5(2009); J. Lipid Res., 50:S46-S51(2009))。并且, 基于保守基序的存在, 在公开文献和专利文献中已报道了多种 LPLAT。

[0194] 更具体地讲, 已提出了多种 LPLAT 基序, 它们根据在被分析的比对中所包括的特定物种存在少量变异。例如, Shindou 等人 (Biochem. Biophys. Res. Comm., 383:320-325(2009)) 基于对来自人类 (*Homo sapiens*)、红原鸡 (*Gallus gallus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 和秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的序列的比对, 提出了下列对 LPLAT 活性重要的膜结合 O-酰基转移酶 [“MBOAT”] 家族基序: WD、WHGxxxGYxxxF (SEQ ID NO:99)、YxxxxxF (SEQ ID NO:100) 和 YxxxYFxxH (SEQ ID NO:101)。这些之中, WD、WHGxxxGYxxxF 和 YxxxxxF 基序存在于 ScA1e (SEQ ID NO:15) 和 Y1A1e1 (SEQ ID NO:17) 中, 但 YxxxYFxxH 基序不是。就 A1e1 同源物而言, 替代性的非植物基序也描述于美国专利申请公

布 2008-0145867-A1 中 ; 具体而言, 这些包括 :M-[V/I]-[L/I]-xxK-[L/V/I]-xxxxxxDG (SEQ ID NO :102)、RxKYYxxWxxx-[E/D]-[A/G]xxxxGxG-[F/Y]-xG (SEQ ID NO :103)、EX₁₁W_{NX₂}-[T/V]-X₂W (SEQ ID NO :21) 和 SAxWHGxxPGYxx-[T/F]-F (SEQ ID NO :104)。

[0195] 类似地, Lewin, T. W. 等人 (Biochemistry, 38 :5764-5771 (1999) 和 Yamashita 等人 (Biochim. Biophys. Acta, 1771 :1202-1215 (2007)) 基于对来自细菌、酵母、线虫和哺乳动物的序列的比对, 提出了下列对 LPLAT 活性重要的 1- 酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸酰基转移酶 [“LPAAT”] 家族基序 :NHxxxxD (SEQ ID NO :33)、GxxFI-[D/R]-R (SEQ ID NO :105)、EGTR (SEQ ID NO :34) 以及 [V/I]-[P/X]-[I/V/L]-[I/V]-P-[V/I] (SEQ ID NO :106) 和 IVPIVM (SEQ ID NO :107) 二者之一。上述 NHxxxxD 和 EGTR 基序存在于 MaLPAAT1 (SEQ ID NO :29)、YILPAAT1 (SEQ ID NO :31) 和 CeLPCAT (SEQ ID NO :25) 中, 但其他基序不是。

[0196] 基于可公开获得的 Ale1、LPCAT 和 LPAAT 蛋白质序列, 包括本文所描述的那些, 用于包括在本文改善的优化的重组解脂耶氏酵母菌株中的 LPLAT 或者具有选自 M(V/I) LxxKL (SEQ ID NO :18)、RxKYYxxW (SEQ ID NO :19)、SAxWHG (SEQ ID NO :20) 和 EX₁₁W_{NX₂}-[T/V]-X₂W (SEQ ID NO :21) 的 MBOAT 家族基序, 或者具有选自 NHxxxxD (SEQ ID NO :33) 和 EGTR (SEQ ID NO :34) 的 1- 酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸酰基转移酶家族基序。

[0197] 由于脂肪酸的生物合成需要酰基 - 辅酶 A 库和磷脂库之间酰基基团的迅速交换, LPLAT 对 PUFA 生产的影响也已被设想。具体而言, 去饱和主要在磷脂的 sn-2 位发生, 而延伸在酰基 - 辅酶 A 库中发生。

[0198] 更具体地讲, 此前 LPCAT 已被假设对于解脂耶氏酵母的 TAG 部分中 EPA 的积累可能是重要的 (美国专利申请公布 2006-0115881-A1)。如该文献中所述, 这一假设基于下列研究 :1) Stymne S. 和 A. K. Stobart (Biochem. J., 223 (2) :305-314 (1984)), 他们假设酰基 - 辅酶 A 库和 PC 库之间的交换可能是由于 LPCAT 的正向和逆向反应 ;2) Domergue, F. 等人 (J. Bio. Chem., 278 :35115 (2003)), 他们提出 GLA 在 PC 的 sn-2 位的积累和酵母中 ARA 不能被有效地合成是因为涉及 PUFA 生物合成的延伸步骤在酰基 - 辅酶 A 库中发生, 而 Δ5 和 Δ6 去饱和步骤主要在 PC 的 sn-2 位发生 ;3) Abbadi, A. 等人 (The Plant Cell, 16 :2734-2748 (2004)), 他们根据在转基因油料种子植物中对 PUFA 积累限制的分析, 提出 LPCAT 在 Δ6 去饱和酶 / Δ6 延伸酶途径的成功重构中起着关键作用 ;和 4) Renz, A. 等人在国际申请公布 WO 2004/076617A2 和 WO 2004/087902 A2 中的工作。

[0199] 更具体地讲, 国际申请公布 WO 2004/076617 A2 描述了一种 LPCAT 从秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) (克隆 T06E8.1) [“CeLPCAT”] 的分离, 并报道了当这种 LPCAT 在分别用外源的 18:2 或 α - 亚麻酸 [“ALA”; 18:3] 脂肪酸饲养的经生物工程改造的啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株中表达时, Δ6 去饱和和 Δ6 延伸的效率的提高, 以及长链 PUFA 二十碳二烯酸 [“EDA”; 20:2] 和二十碳四烯酸 [“ETA”; 20:4] 的生物合成分别提高。

[0200] 国际申请公布 WO 2004/087902 A2 (实施例 16) 描述了高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) LPAAT- 样蛋白质 (分别由具有 417 个氨基酸长度或 389 个氨基酸长度的蛋白质编码, 它们除 N 端 28 个氨基酸残基的延伸外是相同的) 的分离, 并报道了这些蛋白质之一利用与国际申请公布 WO 2004/076617 A2 中的那些相似的方法的表达, 表达导致了 EDA 和 ETA 生物合成的类似改善。

[0201] 国际申请公布 WO 2004/076617 和 WO 2004/087902 教导了 EDA 和 ETA 的生物合成的改善是由于 CeLPLAT 和一些 LPAAT- 样蛋白质中可逆的 LPCAT 活性, 尽管不是所有的 LPAAT- 样蛋白质均具有 LPCAT 活性。此外, Renz, A. 等人推断, LPCAT 允许新合成的脂肪酸在磷脂和酰基-辅酶 A 库之间有效的和持续的交换, 因为去饱和酶催化双键向 PC- 偶联的脂肪酸中的引入而延伸酶专门地催化辅酶 A 酯化的脂肪酸 (酰基-辅酶 A) 的延伸。

[0202] 多份其他的参考文献一般地描述了 LPLAT 与 PUFA 生物合成基因的共表达对于在转基因生物的油中提高所期望的脂肪酸的量、提高总的油含量或者选择性地提高所期望的脂肪酸的含量的有益效果 (例如, 国际申请公布 WO 2006/069936、WO 2006/052870、WO 2009/001315、WO 2009/014140)。

[0203] 本文中 (以及申请人的受让人的共同提交的美国临时专利申请 61/187359 中, 该专利提交于 2009 年 6 月 16 日, 代理人案号为 CL4361USPRV, 以引用方式全文并入本文) 证明了 LPAAT 和 LPCAT 对于 EPA 在解脂耶氏酵母的 TAG 部分中的积累的确是重要的。具体而言, 发现了 LPLAT 的过表达能够导致 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率的改善。如上文所定义的, 术语“转化效率”是指特定的酶例如 $\Delta 9$ 延伸酶能够将底物 (例如 LA) 转化为产物 (例如 EDA) 的效率。因此, 在经过改造以生产 EPA 的菌株中, $\Delta 9$ 延伸酶转化效率的改善被证明导致 EPA% TFA 和 / 或 EPA% DCW 的提高。

[0204] 这些结果以及其他的支持性工作, 是下文主张的用于在生产 LC-PUFA 的重组含油微生物宿主细胞中提高 C_{18} - C_{20} 延伸转化效率的方法的基础, 其中所述方法包括:

[0205] a) 向所述生产 LC-PUFA 的重组宿主细胞中导入至少一种分离的多核苷酸, 所述多核苷酸编码至少具有酰基-辅酶 A: 溶血磷脂酰基转移酶活性的多肽, 其中所述多肽选自:

[0206] (i) 基于 Clustal W 比对方法, 在与选自 SEQ ID NO:15 (ScA1e1) 和 SEQ ID NO:17 (Y1A1e1) 的氨基酸序列进行比较时, 具有至少 45% 的氨基酸同一性的多肽;

[0207] (ii) 具有至少一种膜结合 O-酰基转移酶蛋白家族基序的多肽, 其中所述基序选自: M(V/I)LxxKL (SEQ ID NO:18)、RxKYYxxW (SEQ ID NO:19)、SAxWHG (SEQ ID NO:20) 和 EX₁₁WXX₂-[T/V]-X₂W (SEQ ID NO:21);

[0208] (iii) 基于 Clustal W 比对方法, 在与如 SEQ ID NO:25 (CeLPCAT) 所示的氨基酸序列进行比较时, 具有至少 90% 的氨基酸同一性的多肽;

[0209] (iv) 基于 Clustal W 比对方法, 在与选自 SEQ ID NO:29 (MaLPAAT1)、SEQ ID NO:31 (Y1LPAAT1) 和 SEQ ID NO:32 (ScLPAAT1) 的氨基酸序列进行比较时, 具有至少 43.9% 的氨基酸同一性的多肽; 和

[0210] (v) 具有至少一种 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶蛋白家族基序的多肽, 其中所述基序选自: NHxxxxD (SEQ ID NO:33) 和 EGTR (SEQ ID NO:34);

[0211] 其中所述编码至少具有酰基-辅酶 A: 溶血磷脂酰基转移酶活性的多肽的至少一种分离的多核苷酸可操作地连接到至少一种调控序列, 所述调控序列是相同的或不同的; 以及,

[0212] b) 使所述含油的微生物宿主细胞生长;

[0213] 其中所述含油的微生物宿主细胞的 C_{18} - C_{20} 延伸转化效率相对于对照宿主细胞提高。

[0214] 优选地, 所述编码至少具有酰基-辅酶 A: 溶血磷脂酰基转移酶活性的多肽的多核

昔酸是稳定整合的并且所述 C_{18} - C_{20} 延伸转化效率的提高为至少约 4%，

[0215] 更优选地，与对照宿主细胞相比，所述在至少一种生产 LC-PUFA 的含油微生物宿主细胞中 C_{18} - C_{20} 延伸转化效率的提高为至少约 4-10%，更优选至少约 10-20%，更优选至少约 20-40%，以及最优选至少约 40-60% 或更高。

[0216] 基于上述 C_{18} - C_{20} 延伸转化效率的改善，相对于美国专利申请公布 2009-0093543-A1 中所述的那些菌株，具有生产改善的 EPA% TFA 的能力的优化的重组解脂耶氏酵母菌株，将任选地包含至少一种如上文所述的方法中所定义的酰基-辅酶 A：溶血磷脂酰基转移酶 [“LPLAT”]。在优选的实施方案中，所述 LPLAT 的氨基酸序列选自：SEQ ID NO：15 (ScA1e1)、SEQ ID NO：16 (Y1A1e1)、SEQ ID NO：25 (CeLPCAT)、SEQ ID NO：29 (MaLPAAT1)、SEQ ID NO：31 (Y1LPAAT1) 和 SEQ ID NO：32 (ScLPAAT1)。

[0217] 美国专利申请公布 2009-0093543-A1 描述了在重组耶氏酵母属中有用的多种敲除，包括对转化体的选择有用的那些、减少了脂肪酸的降解和 TAG 的降解的那些和显得导致表型上“中性”的突变（其中耶氏酵母宿主细胞显得未受影响）的那些。然而，最优选的是导致相对于总脂肪酸的 EPA 浓度 [“EPA% TFA”] 升高的那些基因敲除（例如，二酰基甘油酰基转移酶基因敲除，过氧化物酶体生物合成因子蛋白 [“PEX”] 基因敲除）。

[0218] 更具体地讲，美国专利申请公布 2009-0093543-A1 设想，在一些优选的重组耶氏酵母生产宿主中，所述宿主选自下列的缺乏编码过氧化物酶体生物合成因子蛋白的天然基因：Pex1p (SEQ ID NO：108)、Pex2p (SEQ ID NO：109)、Pex3p (SEQ ID NO：110)、Pex3Bp (SEQ ID NO：111)、Pex4p (SEQ ID NO：112)、Pex5p (SEQ ID NO：113)、Pex6p (SEQ ID NO：114)、Pex7p (SEQ ID NO：115)、Pex8p (SEQ ID NO：116)、Pex10p (SEQ ID NO：117)、Pex12p (SEQ ID NO：118)、Pex13p (SEQ ID NO：119)、Pex14p (SEQ ID NO：120)、Pex16p (SEQ ID NO：121)、Pex17p (SEQ ID NO：122)、Pex19p (SEQ ID NO：123)、Pex20p (SEQ ID NO：124)、Pex22p (SEQ ID NO：125) 和 Pex26p (SEQ ID NO：126)。更优选的被破坏的过氧化物酶体生物合成因子蛋白是 Pex2p、Pex3p、Pex10p、Pex12p 和 Pex16p，尽管只提供了涉及 Pex10p 的数据。

[0219] 国际申请公布 WO 2009/046248 通过比较解脂耶氏酵母的 Δ Pex16、 Δ Pex3 和 Δ Pex10 菌株，确认并拓展了美国专利申请公布 2009-0093543-A1 中提出的假设和研究。该文献中的结果显示，相对于针对 EPA 的生产工程化的未破坏的菌株，Pex10 的破坏导致了 EPA% TFA 3.3 倍的升高和 C_{20} PUFA 的量 1.7 倍的升高。类似地，在针对 DGLA 的生产工程化的 Δ Pex16 菌株中观察到了 DGLA% TFA 1.65 倍的升高和 $C_{20}>$ PUFA% TFA 1.3 倍的升高。在针对 DGLA 的生产工程化的 Δ Pex3 菌株中观察到了 DGLA% TFA 2.0 倍的升高和 C_{20} PUFA% TFA 1.7 倍的升高。

[0220] 这些结果以及其他的支持性工作，是下文主张的用于在具有总脂质含量、总脂质级分和油级分的含油真核生物体中提高相对于总脂肪酸的重量%的一种 PUFA 或 PUFA 的组合的重量%的方法的基础，所述方法包括：

[0221] a) 提供含油真核生物，所述生物在编码过氧化物酶体生物合成因子蛋白的天然基因中包含破坏，这产生 PEX 破坏的生物；和编码功能性 PUFA 生物合成途径的基因；以及

[0222] b) 使所述 PEX 破坏的生物在下述条件下生长：当与未破坏其天然过氧化物酶体生物合成因子蛋白的含油真核生物中的那些的重量%相比较时，PEX 破坏的生物的总脂质级分和油级分中的至少一种 PUFA 的重量%相对于总脂肪酸的重量%增加。

[0223] 按总脂肪酸的百分比计增加的一定量的 PUFA 可以是 :1) 相对于 PUFA 中间体或副产物,是功能性 PUFA 生物合成途径所期望的终产物的 PUFA ;2) C_{20} - C_{22} PUFA ;和 / 或,3) 总的 PUFA。

[0224] 除了相对于总脂肪酸重量%提高一种 PUFA 或 PUFA 组合的重量%之外,在一些情况下,还可以提高或降低细胞的总脂质含量 (TFA% DCW)。这意味着无论 PEX 基因破坏是否引起 PEX 破坏细胞中的总脂质量提高或降低,该破坏总是引起一种 PUFA 或 PUFA 组合的重量%提高。

[0225] 基于以上所述,相对于美国专利申请公布 2009-0093543-A1 中所述的那些菌株,具有生产改善的 EPA% TFA 的能力的优化的重组解脂耶氏酵母菌株将包含至少一种其表达已被下调的过氧化物酶体生物合成因子蛋白 (即,从而产生 PEX 破坏的生物)。在优选的菌株中,所述下调的过氧化物酶体生物合成因子蛋白是 Pex3p (SEQ ID NO :110)、Pex10p (SEQ ID NO :117)、或 Pex16p (SEQ ID NO :121)。

[0226] 尽管对于本领域的技术人员存在多种用以实现天然的耶氏酵母基因的破坏的可用技术,一般而言特定基因的内源活性能够通过下列技术被降低或消除,例如 1) 通过对靶基因的全部或部分的插入、取代和 / 或缺失破坏该基因 ;或,2) 操纵控制该基因的表达的调控序列。美国专利申请公布 2009-0093543-A1 以及国际申请公布 WO 2009/046248 中对于这些技术均有论及。本领域的技术人员将认识到这些以及其他的方法在现有文献中已有详细描述,并且不受本文所述的方法、宿主细胞、和产品的限制。本领域的技术人员也将认识到用于任何特定的含油酵母的大多数适用的技术。

[0227] 优化的菌株将生产至少约 40-50EPA% TFA,优选至少约 50-55EPA% TFA,更优选至少约 55-60EPA% TFA,更优选至少约 60-70EPA% TFA,以及最优选至少约 70-80EPA% TFA。

[0228] 如对于本领域的技术人员将显而易见的,使用本文所述的方法能够工程化众多生产至少约 50EPA% TFA 的优化的耶氏酵母菌株。因此,就商业目的而言,优选的菌株的选择将还要考虑工程化的菌株的总脂质含量,因为按总脂肪酸的百分比计的 EPA 浓度 [“EPA% TFA”] 和总脂质含量 [“TFA% DCW”] 均影响按干细胞重量计的细胞 EPA 含量 [“EPA% DCW”]。也就是说,EPA% DCW 被计算为 : $(EPA\% TFA) \times (TFA\% DCW) / 100$ 。例如,生产 50EPA% TFA 并具有 24TFA% DCW 的菌株、生产 55EPA% TFA 并具有 21.82TFA% DCW 的菌株、生产 60EPA% TFA 并具有 20TFA% DCW 的菌株、生产 65EPA% TFA 并具有 18.46TFA% DCW 的菌株和生产 70EPA% TFA 并具有 17.14TFA% DCW 的菌株均生产 12EPA% DCW。在优选的实施方案中,所述改善的优化的解脂耶氏酵母菌株将生产至少约 10-12EPA% DCW,优选至少约 12-14EPA% DCW,更优选至少约 14-16EPA% DCW,更优选至少约 16-18EPA% DCW,更优选至少约 18-20EPA% DCW,更优选至少约 20-22EPA% DCW,更优选至少约 22-24EPA% DCW,以及最优选至少约 24-26EPA% DCW。

[0229] 除具有至少约 50EPA% TFA 外,所述改善的优化的解脂耶氏酵母菌株中、或者来自其的提取的或未浓缩的油中的脂质谱将具有至少约 3.1 的 EPA% TFA 对 LA% TFA 比值。如美国专利申请公布 2009-0093543-A1 (表 23) 中所展示的,EPA、LA 和油酸构成了生产大于 40EPA% TFA 的解脂耶氏酵母菌株的脂质谱中存在的脂肪酸的大约 76-80%。其中,LA% TFA 大约比油酸% TFA 高三倍。基于这些观察,本领域的技术人员将会知道,使中间体脂肪酸 LA 的浓度最小化 (导致提高的 EPA : LA 比值),将导致更多的碳被“推”着通过 PUFA 生物合成

途径并允许提高的 EPA 合成。在优选的实施方案中, EPA : LA 的比值将为至少约 3.1-3.5, 更优选至少约 3.5-4.5, 更优选至少约 4.5-5.5, 以及最优选至少约 5.5-6.5。

[0230] 通过本文所述的改善的优化的重组解脂耶氏酵母菌株生产的脂质将还具有以下特征: 当通过 GC 分析测量时具有少于约 0.5% 的 GLA 或 DHA (所述 GC 分析使用具有低至约 0.1% 的检测水平的设备) 和具有少于约 8% 的饱和脂肪酸含量。这一低百分比的饱和脂肪酸 (即, 16:0 和 18:0) 导致对人和动物实在的健康有益效果。

[0231] 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。任何的这些能被用于构建编码优选的去饱和酶、延伸酶、CPT1、DGLA 合酶、丙二酰-辅酶 A 合成酶和酰基-辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶蛋白质的嵌合基因。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所编码的酶。

[0232] 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)。

[0233] 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。

[0234] 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 (例如, 醋酸锂转化 [Methods in Enzymology, 194 : 186-187 (1991)]、基因枪轰击 (bolistic impact)、电穿孔、显微注射或将所关注的基因导入宿主细胞中的任何其他方法。本文用于解脂耶氏酵母的更优选的方法是基于 DNA 线性片段的整合技术, 如美国专利 4,880,741 和美国专利 5,071,764 中以及 Chen, D. C. 等人 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 48(2) : 232-235 (1997)) 所述的。

[0235] 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”、“转化体”、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。

[0236] 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。在替代实施方案中, 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 (美国专利申请公布 2009-0093543-A1), 或者赋予磺酰基脲抗除草剂性 (国际申请公布 WO 2006/052870) 的天然的乙酰羟酸合酶 (或乙酰乳酸合酶; E. C. 4.1.3.18) 被用于进行对转化体的选择。一种利用位点特异性重组酶体系的独特方法, “回收利用” 一对优选的选择标记用于多次连续转化, 美国专利申请公布 2009-0093543-A1 中也教导了该方法。

[0237] 如本领域的技术人员所熟知的, 仅仅将基因(例如去饱和酶、延伸酶、CPT1、DGLA 合酶、丙二酰-辅酶 A 合成酶和酰基-辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶)插入克隆载体不确保它能以所需速率、浓度、量等表达。操纵许多控制转录、RNA 稳定性、翻译、蛋白质稳定性和蛋白质位置、氧限制和从宿主细胞的分泌的不同遗传元件可能是合乎期望的。更具体地讲, 可通过改变下列来控制基因的表达: 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进了宿主细胞的基因组中; 所合成外源蛋白质的最终细胞定位; 蛋白质在宿主生物内的翻译和正确折叠的效率; 所克隆基因的蛋白质在宿主细胞中内在的稳定性; 和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。下文将讨论这些过表达方法中的若干种, 并且它们作为过表达例如去饱和酶、延伸酶、CPT1 蛋白质、DGLA 合酶、丙二酰-辅酶 A 合成酶和酰基-辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶的方法在重组耶氏酵母宿主细胞中是有用的。

[0238] 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 4,910,141)上, 能在转录水平上提高所需基因的表达。

[0239] 可用于驱动异源基因或其部分在耶氏酵母属宿主细胞中的表达的转录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。几乎任何能够在耶氏酵母中指导去饱和酶、延伸酶、CPT1、DGLA 合酶、丙二酰-辅酶 A 合成酶和酰基-辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶基因的表达的启动子(即, 天然的、合成的、或嵌合的)都将是适合的, 尽管来自该宿主物种的转录和翻译区域是尤其有用的。

[0240] 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。3' - 区也可以是合成的, 因为本领域的技术人员可利用可获得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。

[0241] 尽管无意构成限制, 在本公开中有用的优选的启动子区域和终止区是美国专利公布 2009-0093543-A1 中所教导的那些。

[0242] PUFA 生物合成途径的去饱和酶、延伸酶和 DGLA 合酶基因和/或 CPT1、丙二酰-辅酶 A 合成酶和酰基-辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶基因的附加的拷贝(即一个以上的拷贝)可被导入解脂耶氏酵母以由此提高 EPA 的生产和积累。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)。

[0243] 需注意的重要的一点是, 当按照本文的方法制备优化的解脂耶氏酵母菌株时, 多种去饱和酶、延伸酶、CPT1、DGLA 合酶、丙二酰-辅酶 A 合成酶和酰基-辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶的拷贝数是经常被提及的。如果, 例如需要 2 拷贝的 $\Delta 9$ 延伸酶, 这可以是指: 1) 从单个物种分离的特定 $\Delta 9$ 延伸酶的相同编码序列的两个拷贝; 或, 2) 从物种“A”分离的 $\Delta 9$ 延伸酶的一个编码序列和从物种“B”分离的 $\Delta 9$ 延伸酶的一个编码序列, 如此总共得到

两种 $\Delta 9$ 延伸酶。

[0244] 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。

[0245] 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优选的基因座包括美国专利公布 2009-0093543-A1 中教导的那些。

[0246] 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类型的菌株。此类筛选可以通过 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。

[0247] 使转化的微生物宿主细胞在这样的条件下生长:使嵌合基因(例如,编码去饱和酶、延伸酶、CPT1、DGLA 合酶、丙二酰-辅酶 A 合成酶和酰基-辅酶 A 溶血磷脂酰基转移酶的)的表达最优化并生产最高和最经济 EPA 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、生物质生产期的时长、油积聚期的时长以及细胞收获的时间和方法优化培养基条件。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基本培养基中(如 Yeast Nitrogen Base(DIFCO Laboratories, Detroit, MI))。

[0248] 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 和美国专利申请 12/641,929(提交于 2009 年 12 月 19 日)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。最优选的是葡萄糖、蔗糖、转化蔗糖、果糖和/或包含介于 10-22 个之间的碳原子的脂肪酸。例如,可发酵的碳源可以选自转化蔗糖、葡萄糖、果糖和这些的组合,前提是葡萄糖与转化蔗糖和/或果糖联合使用。

[0249] 术语“转化蔗糖”,在本文中也称为“转化糖”,是指包含由蔗糖水解而来的相等部分的果糖和葡萄糖的混合物。转化蔗糖可以包含 25 至 50%葡萄糖和 25 至 50%果糖的混合物。转化蔗糖还可以包含蔗糖,蔗糖的量取决于水解度。

[0250] 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。特别关注的是促进脂质和 PUFA 合成的几种金属离子,例如 Fe^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} 和 Mg^{+2} (Nakahara, T. et al., Ind. Appl. Single Cell Oils, D. j. Kyle 和 R. Colin, 编辑, pp 61-97(1992))。

[0251] 用于本文所述方法和宿主细胞的优选的生长培养基是常规的商业制备培养基,例如酵母氮源基础培养基 (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 pH 4.0 至 pH 8.0 之间,其中优选将 pH 5.5 至 pH 7.5 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,其中优选微氧条件。

[0252] 通常,在含油酵母细胞中积聚高水平的 PUFA 需要包括两个阶段的过程,由于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。

[0253] 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)。

[0254] 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))。A. Singh 和 O. Ward (Adv. Appl. Microbiol., 45:271-312 (1997))。

[0255] 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、珠磨器、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。

[0256] 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。这最常见的是通过催化加氢实现(更多细节和参考文献参见国际申请公布 WO 2006/052870)。

[0257] 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。类似地,还提供包含分离自重组含油酵母生物质的 EPA 或包含 EPA 的微生物油的食物、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。

[0258] 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。

[0259] 最期望的是有效量的 EPA 将足以提供与 ω -3/ ω -6 PUFA 消耗相关的期望健康特性。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。

[0260] 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酸谱的油。

[0261] 个人护理产品:当涉及个人护理产品时, 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向护肤组合物中提供有效量的相关 ω -3 脂肪酸或包含 ω -3 脂肪酸的油。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 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,所述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、润湿剂和阴离子或非离子或两性聚合物、以及染料。

[0262] 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。

[0263] 食物产品将包括但不限于:食物类似物、饮料、肉制品、谷类制品、烘焙食物、快餐食品和乳制品。

[0264] 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、培根类似物等。

[0265] 取决于食物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。

[0266] 乳类似物或非乳品食物产品包括但不限于: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)。

[0267] 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。存在一大类调味的和加工的肉制品:新鲜的、熏制并干燥的、和熏制并烹制的。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。

[0268] 谷类食品是来自谷物加工的食品。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、昆诺阿藜、大米、裸麦、高粱、

黑小麦、小麦和野生稻。谷类食物产品的实例包括但不限于：全谷类、压碎的谷类、粗磨粉、面粉、麸皮、胚芽、早餐谷类食物、挤出食品、意大利面食等。

[0269] 烘焙食物产品包括上文提到的任何谷类食物产品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。烘焙食物产品的实例包括但不限于：面包、蛋糕、甜甜圈、巴、意大利面食、面包屑、烘焙零食、迷你小面包、迷你咸饼干、迷你饼干、和迷你椒盐脆饼干。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。

[0270] 小吃食品包括上文或下文所述的任何食品。

[0271] 油炸食品包括上文或下文所述的任何油炸食品。

[0272] 饮料可以是液体或干粉形式。例如，可以提及：非碳酸饮料；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）。

[0273] 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、发酵乳制品如酸奶酪或酸奶、奶油、黄油、炼乳、脱水乳、咖啡冲淡剂、咖啡奶油、冰淇淋、奶酪等。

[0274] 可将所述耶氏酵母生物质、部分纯化的生物质、纯化的油、和 / 或纯化的 EPA 包括于其中的更多的食物产品是，例如：口香糖、糖果和糖霜、凝胶物和布丁、硬糖和软糖、果酱和果子冻、白砂糖、糖替代品、甜沙司、浇头和糖浆、以及干混粉末混合物。

[0275] 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 的比值在约 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。

[0276] 健康食物产品和药物：本发明的生物质、部分纯化的生物质、纯化的油、和 / 或纯化的 EPA 可用于制剂以赋予健康食品健康有益效果，包括功能性食物、医疗食物、医疗营养品和饮食补充剂。此外，耶氏酵母生物质、部分纯化的生物质、纯化的油、和 / 或纯化的 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由此制备例如功能性食物或医疗食物。例如，包含 EPA 的更加浓缩的制剂包括胶囊、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。

[0277] 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生物质、部分纯化的生物质、纯化的油、和 / 或纯化的 EPA 可用作多种动物饲料的成分。

[0278] 更具体地讲，尽管不应被理解为限制，期望来自重组耶氏酵母宿主细胞的 EPA 产品能用于宠物食品、反刍动物和家禽的食物产品以及水产养殖的食物产品。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）的食品。这些产品可包括上文的谷类和健康食品、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）以及蔬菜。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）的食品。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品、大豆蛋白产品、肉类和肉类副产品、以及草和干草产品。水产养殖食物产品（或“水产品饲料”）是那些旨在用于水产养殖场的食品，即，涉及在淡水或海水中繁殖、饲养、或养殖水生生物和 / 或动物的食品。

[0279] 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，酵母本身还是有用的蛋白质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生产宿主的酵母生物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（更多细节参见美国专利申请公布 2009-0093543-A1）。

[0280] 这样，显然地，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，酵母本身还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在从细胞群中提取并纯化后直接加入水产品饲料制剂中。

[0281] EPA 自身就是重要的 ω -3 脂肪酸这一点正日益被意识到。因此，本文预期，本文所述的重组耶氏酵母生产宿主的富含 EPA 的油，在多种治疗应用中，例如炎症、心血管疾病、基因表达的营养调节和血脂异常，并且尤其在包括冠心病、高血压、炎症病症、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、抑郁症、和注意力不足 / 多动症的临床状况的处理中，将具有非常广泛的用途。

[0282] 美国专利申请公布 2009-0093543-A1 描述了关于 EPA 和炎症、EPA 和心血管疾病、 ω -3PUFA 和基因表达的营养调节、以及 ω -3PUFA 和血脂异常的更多人类临床研究并应在其中被提及。最近，作为评估油类对心血管疾病危险因素的影响的方法，在 110 名正常的健康受试者中进行了随机、双盲、安慰剂对照的研究，其中向受试者提供了下列中的一种 6 周时间：600mg/ 天 EPA、1800mg/ 天 EPA、600mg/ 天 DHA 或橄榄油（安慰剂）(Gillies, P., “The New Science of Omega-3 Fatty Acids: Differential Nutritional Pharmacology” Texas Human Nutrition Conference, Texas A&M University, 2010 年 2 月。每天 600mg EPA 的补充被发现维持了已处于正常范围内的健康的胆固醇水平。要注意的是，该研究中的 EPA 油是来源于工程化的解脂耶氏酵母菌株。

实施例

[0283] 本发明将在下面的实施例中得到进一步阐述。应当理解，尽管这些实施例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，本领域的技术人员可以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，可对本发明做出多种改变和修改，以使其适用于多种用法和条件。

[0284] 一般方法

[0285] 实施例中使用的标准的重组 DNA 和分子克隆技术是本领域所熟知的并且描述

于: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. 开发, Bennan, 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. and Wiley-Interscience 出版, Hoboken, NJ(1987)。

[0286] 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。适用于下述实施例的技术可见于 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)); 或者 Thomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 第2版, Sinauer Associates: Sunderland, MA(1989)。除非另外指明, 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), 除非另外说明。通常于 37°C 下在 Luria Bertani [“LB”] 平板上培养大肠杆菌 (E. coli) 菌株。

[0287] 一般的分子克隆根据标准方法 (Sambrook 等人, 同上) 来完成。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。PCR 产物被克隆到 Promega 的 pGEM-T-easy 载体 (Madison, WI) 中。

[0288] 缩写含义如下: “sec”表示秒, “min”表示分钟, “h”表示小时, “d”表示天, “ μ L”表示微升, “mL”表示毫升, “L”表示升, “ μ M”表示微摩尔每升, “mM”表示毫摩尔每升, “M”表示摩尔每升, “mmol”表示毫摩尔, “ μ mole”表示微摩尔, “g”表示克, “ μ g”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, “DCW”表示干细胞重量, “TFA”表示总脂肪酸。

[0289] 表达盒的命名

[0290] 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。

[0291] 解脂耶氏酵母的转化和培养

[0292] 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°C 下培养。根据标准方法, 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。

[0293] YPD 琼脂培养基 (每升): 10g 酵母提取物 [Difco], 20g Bacto 蛋白胨

[0294] [Difco]; 以及 20g 葡萄糖。

[0295] 基础的基本培养基 [“MM”] (每升): 20g 葡萄糖, 1.7g 不含氨基酸的酵母氮源, 1.0g 脯氨酸, 和 pH 6.1 (无需调节)。

[0296] 基本培养基 + 尿嘧啶 [“MM+ 尿嘧啶或 MMU”] (每升): 如上所述制备 MM 培养基并加入 0.1g 尿嘧啶和 0.1g 尿苷。

[0297] 基本培养基 + 尿嘧啶 + 磺酰脲类 [“MMU+SU”] (每升): 如上所述制备 MMU 培养基并加入 280mg 磺酰脲类。

[0298] 基本培养基 + 尿嘧啶 + 赖氨酸 [“MMUraLys”](每升):如上所述制备 MM 培养基并加入 0.1g 尿嘧啶、0.1g 尿苷和 0.1g 赖氨酸。

[0299] 基础培养基 +5- 氟乳清酸 [“MM+5-FOA”](每升):20g 葡萄糖、6.7g 酵母氮源基础、75mg 尿嘧啶、75mg 尿苷,以及基于对一系列从 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)。

[0300] 高葡萄糖培养基 [“HGM”](每升):80 葡萄糖、2.58gKH₂PO₄和 5.36gK₂HPO₄, pH 7.5(不需要调节)。

[0301] 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。

[0302] 发酵培养基 [“FM”](每升):6.70g/L 酵母氮源,6.00g KH₂PO₄, 2.00gK₂HPO₄, 1.50g MgSO₄*7H₂O, 20g 葡萄糖和 5.00g 酵母提取物(BBL)。

[0303] 解脂耶氏酵母的转化如美国专利申请公布 2009-0093543-A1 中所述进行,该文献以引用方式并入本文。

[0304] 解脂耶氏酵母的脂肪酸分析

[0305] 对于脂肪酸 [“FA”] 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)) 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., 第 276 卷,第 1 期,第 38-46 页(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。炉温以 3.5℃ / 分钟从 170℃(保持 25 分钟)升至 185℃。

[0306] 为了进行直接的碱催化酯交换反应,收集耶氏酵母细胞(0.5mL 培养物),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%) 和已知量的 C15:0 三酰基甘油(C15:0TAG;目录号 T-145, Nu-Check Prep, Elysian, MN) 加入样品中,然后将样品涡旋,于温度为 50℃下振荡 30 分钟。在加入 3 滴 1M 氯化钠和 400 μl 己烷后,涡旋并离心样品。移除上层并用 GC 进行分析。

[0307] 经由 GC 分析记录的 FAME 峰值在与已知脂肪酸进行比较时通过它们的保留时间进行鉴定,并且通过比较 FAME 与已知量的内部标准品(C15:0TAG) 的峰面积进行定量。因此,根据下式计算近似量(μg) 的任意脂肪酸 FAME [“μg FAME”]: (指定脂肪酸的 FAME 峰面积 / 标准品 FAME 峰面积) * (μg 标准品 C15:0TAG), 根据下式计算一定量(μg) 的任意脂肪酸 [“μg FA”]: (指定脂肪酸的 FAME 峰面积 / 标准品 FAME 峰面积) * (μg 标准品 C15:0TAG) * 0.9503, 因为 1 μg C15:0TAG 等于 0.9503 μg 脂肪酸。注意:0.9503 的转换因子是大多数脂肪酸测定的近似值,其范围介于 0.95 和 0.96 之间。

[0308] 概述每种单个脂肪酸以 TFA 重量%表示的量的脂质特征通过用单个 FAME 峰面积除以所有 FAME 峰面积的总数并乘以 100 进行计算。

[0309] 通过烧瓶检测法对解脂耶氏酵母中总脂质含量和组成的分析

[0310] 为了详细分析在解脂耶氏酵母的特定菌株中的总脂质含量和组成,如下进行了烧瓶检测分析。具体而言,一个接种环的新鲜划线的细胞被接种至 3mL FM 培养基,并于 30℃ 以 250rpm 培养过夜。测量 OD_{600nm}, 在 125mL 烧瓶中,加入一个等分试样的细胞,使得 25mL FM

培养基中最终的 OD_{600nm} 为 0.3。在 30℃ 振荡培养箱中以 250rpm 培养 2 天后,通过离心收集 6mL 培养物,并在 125mL 烧瓶中重悬于 25mL HGM 中。30℃ 振荡培养箱中以 250rpm 培养 5 天后,使用 1mL 等分试样进行脂肪酸分析(同上),并且干燥 10mL 用于干细胞重量[“DCW”]测定。

[0311] 就 DCW 测定而言,通过在 Beckman GS-6R 离心机的 Beckman GH-3.8 转子中以 4000rpm 离心 5 分钟,收集了 10mL 培养物。沉淀被重悬于 25mL 水中,并如上文所述重新收集。将洗涤后的沉淀物重悬在 20mL 水中并转移到预先称过重的铝盘上。细胞悬浮液在 80℃ 真空炉中干燥过夜。测量细胞重量。

[0312] 计算了细胞的总脂质含量[“TFA% DCW”],并将其与用于将按 TFA 的重量%计的每种脂肪酸的浓度[“% TFA”]和按干细胞重量的百分比计的 EPA 含量[“EPA% DCW”]制表的数据共同考虑。来自烧瓶检测法的数据将以表的形式显示,该表总结了细胞总的干细胞重量[“DCW”]、细胞的总脂质含量[“TFA% DCW”]、按 TFA 的重量%计的每种脂肪酸的浓度[“% TFA”]和按干细胞重量的百分比计的 EPA 含量[“EPA% DCW”]。更具体地讲,脂肪酸将被鉴定为 16:0(棕榈酸)、16:1(棕榈油酸)、18:0(硬脂酸)、18:1(油酸)、18:2(LA)、ALA、EDA、DGLA、ARA、ETrA、ETA、EPA 和其他。

[0313] 实施例 1

[0314] 生产占总脂肪酸约 46% 的 DGLA 的解脂耶氏酵母菌株 L135(Ura3⁺, Leu⁻, Δ pex3) 的构建

[0315] 本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的菌株 L135 的构建,该菌株能通过 Δ 9 延伸酶/Δ 8 去饱和酶途径的表达生产相对于总脂质而言约 46% 的 DGLA。

[0316] 简而言之,如图 2 中所示,菌株 L135 通过菌株 Y2224(由野生型耶氏酵母菌株 ATCC#20362 的 Ura3 基因自主突变而产生的 FOA 抗性突变体)、菌株 Y4001(产生 17% EDA,具有 Leu⁻表型)、菌株 Y4001U1(Leu⁻和 Ura⁻)、菌株 Y4036(产生 18% DGLA,具有 Leu⁻表型)和菌株 Y4036U(Leu⁻和 Ura⁻)的构建,来源于解脂耶氏酵母 ATCC#20362。关于菌株 Y2224、Y4001、Y4001U、Y4036 和 Y4036U 的构建的进一步细节描述于美国专利申请公布 2008-0254191 的一般方法部分,该文献以引用方式并入本文。

[0317] 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362,菌株 Y4036U 最终的基因型为 Ura3⁻, YAT1::ME3S::Pex16, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD9eS::Lip2, GPAT::EgD9e::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::OCT(其中 FmD12 是串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*) Δ 12 去饱和酶基因[美国专利 7,504,259];ME3S 是经密码子优化的 C_{16/18} 延伸酶基因,来源于高山被孢霉(*Mortierella alpina*)[美国专利 7,470,532];EgD9e 是小眼虫 Δ 9 延伸酶基因[美国专利 7,645,604];EgD9eS 是经密码子优化的 Δ 9 延伸酶基因,来源于小眼虫[美国专利 7,645,604];EgD8M 是合成的突变型 Δ 8 去饱和酶[美国专利 7,709,239],来源于小眼虫[美国专利 7,256,033])。

[0318] 带有 Pex3 染色体缺失的 L135 菌株的构建

[0319] 菌株 L135 的构建描述于国际申请公布 WO 2009/046248 的实施例 12 中,该文献以引用方式并入本文。简而言之,构建体 pY157 被用于在菌株 Y4036U 中敲除编码过氧化物酶体生物发生因子 3 蛋白质[过氧化物酶体装配蛋白质 Peroxin 3 或“Pex3p”]的染色体基

因,从而产生菌株 L135(也被称为菌株 Y4036(Δ pex3))。与菌株 Y4036(其天然的 Pex3p 未被敲除)中相比,菌株 L135 中染色体 Pex3 基因的敲除导致了下列结果:更高的脂质含量(TFA% DCW)(大约 6.0%对 4.7%),更高的 DGLA% TFA(46%对 19%),更高的 DGLA% DCW(大约 2.8%对 0.9%)和降低的 LA% TFA(12%对 30%)。此外, Δ 9 延伸酶转化效率百分数从菌株 Y4036 中的大约 48%提高至菌株 L135 中的 83%。

[0320] 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362,菌株 L135 最终的基因型是 Ura3+, Leu-, Pex3-, 未知 1-, YAT1::ME3S::Pex16, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD9eS::Lip2, GPAT::EgD9e::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, GPD::Fmd12::Pex20, YAT1::Fmd12::OCT。

[0321] 实施例 2

[0322] 生产占总脂肪酸[“TFA”]从约 18%至约 41%的 ARA 的解脂耶氏酵母菌株的构建

[0323] 本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的菌株 Y8006 的构建,该菌株能通过 Δ 9 延伸酶/ Δ 8 去饱和酶途径的表达生产相对于总脂质而言约 41%的 ARA。

[0324] 菌株 Y8006(图 2)的开发需要菌株 Y2224、Y4001、Y4001U、Y4036、Y4036U 和 L135(描述于实施例 1 中)的构建,以及菌株 L135U9 和 Y8002 的构建。

[0325] L135U9(Leu-、Ura3-)菌株的产生

[0326] 通过在菌株 L135 中瞬时表达质粒 pY116(图 3;SEQ ID NO:127;描述于国际申请公布 W0 2008/073367 的实施例 7 中,该文献以引用方式并入本文)中的 Cre 重组酶以产生 Leu- 和 Ura- 表型,构建了菌株 L135U。根据“一般方法”,将质粒 pY116 用于转化新鲜生长的 L135 细胞。将转化细胞铺在 MMLeuUra 上并在 30°C 下维持 3 至 4 天。挑取三个菌落,将其在 30°C 下接种至 3mL 液体 YPD 培养基中并以 250rpm/min 摇动 1 天。将培养物用液体 MMLeuUra 培养基稀释至 1:50,000,将 100 μ L 铺至新的 YPD 平板上并在 30°C 下维持 2 天。从三个平板中的每一个挑取八个菌落(总计 24 个菌落)并划线至 MMLeu 和 MMLeuUra 选择平板上。选择在 MMLeuUra 平板上生长但不在 MMLeu 平板上生长的菌落并通过 GC 分析来确定 C20:2(EDA)的存在。具有 Leu- 和 Ura- 表型的一个菌株被命名为 L135U9。

[0327] 生产占 TFA 约 32%的 ARA 的 Y8002 菌株的构建

[0328] 构建了构建体 pZKSL-5S5A5(图 4A;SEQ ID NO:128)以将三种 Δ 5 去饱和酶基因整合进菌株 L135U9 的 Lys 基因座,由此使得能够生产 ARA。pZKSL-5S5A5 质粒含有如下组分:

[0329] 表 6:质粒 pZKSL-5S5A5(SEQ ID NO:128)的描述

[0330]

SEQ ID NO:128 中的限制酶(RE)位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
<i>AscI/BstWI</i> (5925-6645)	耶氏酵母 <i>Lys5</i> 基因的 720 bp 5'部分(GenBank 登录号 M34929;在图中标记为“lys5 5'区域”)

[0331]

<i>PacI/SphI</i> (2536-3225)	耶氏酵母 <i>Lys5</i> 基因的 689 bp 3' 部分(GenBank 登录号 M34929; 在图中标记为 “ <i>Lys5-3'</i> ”)
<i>EcoRI / BstWI</i> (9338-6645)	FBAIN::EgD5SM::Pex20, 包含: • FBAIN: 解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子 (美国专利 7,202,356); • EgD5SM: 合成的突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶(SEQ ID NO:71; 美国专利公布 2010-0075386-A1), 来源于小眼虫 (美国专利 7,678,560) (在图中标记为 “ED5S”); • Pex20: 来自耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 登录号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
<i>PmeI / ClaI</i> (11503-1)	YAT1::EaD5SM::OCT, 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子(在图中标记为 “YAT” ; 美国专利申请公布 2006-0094102-A1); • EaD5SM: 合成的突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶(SEQ ID NO:81; 美国专利公布 2010-0075386-A1), 来源于 <i>Euglena anabaena</i> (美国专利申请公布 2008-0274521-A1) (在图中标记为 “EaD5S”); • OCT: 耶氏酵母 OCT 基因 (GenBank 登录号 X69988) 的 OCT 终止子序列
<i>ClaI/PacI</i> (1-2536)	EXP1::EgD5M::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” ; 国际申请公布 WO 2006/052870) ; • EgD5M: 突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶(SEQ ID NO:69; 美国专利公布 2010-0075386-A1)除去了内部的 <i>EcoRI</i>、<i>BglII</i>、<i>HindIII</i> 和 <i>NcoI</i> 限制酶位点, 来源于小眼虫 (美国专利 7,678,560) (在图中标记为 “<i>Euglena D5WT</i>”); • Pex16: 来自耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 登录号 U75433) 的 <i>Pex16</i> 终止子序列
<i>EcoRI/PmeI</i> (9360-11503)	耶氏酵母 <i>Leu2</i> 基因 (GenBank 登录号 M37309)

[0332] 将 pZKSL-5S5A5 质粒用 *AscI*/*SphI* 消化, 然后根据“一般方法”将其用于转化菌株 L135U9。将转化细胞铺在 MMUraLys 平板上并在 30℃ 下维持 2 至 3 天。然后将单菌落再次划线至 MMUraLys 平板上, 随后将其在 30℃ 下接种至液体 MMUraLys 中并以 250rpm/min 摇动 2 天。根据“一般方法”, 对细胞进行了脂肪酸分析。

[0333] GC 分析显示, ARA 存在于含有 pZKSL-5S5A5 的 3 种嵌合基因的转化体中, 但不存在于亲本 L135U9 菌株中。将生产了占 TFA 约 32.2%、32.9%、34.4%、32.1% 和 38.6% 的 ARA 的五个菌株 (即, #28、#62、#73、#84 和 #95) 分别命名为菌株 Y8000、Y8001、Y8002、Y8003 和 Y8004。进一步的分析显示, pZKSL-5S5A5 的三种嵌合基因没有整合进 Y8000、Y8001、Y8002、Y8003 和 Y8004 菌株中的 *Lys5* 位点。所有菌株都具有 *Lys+* 表型。

[0334] 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362, 菌株 Y8000、Y8001、Y8002、Y8003 和 Y8004 最终的基因型为 *Ura-*, *Pez3-*, 未知 1-, 未知 2-, *Leu+*, *Lys+*, *YAT1::ME3S::Pex16*, *GPD::FmD12::Pex20*, *YAT1::FmD12::Oct*, *GPAT::EgD9e::Lip2*, *FBAINm::EgD9eS::Lip2*, *EXP1::EgD9eS::Lip1*, *FBAINm::EgD8M::Pex20*, *EXP1::EgD8M::Pex16*,

FBAIN::EgD5SM::Pex20, EXP1::EgD5M::Pex16, YAT1::EaD5SM::Oct。

[0335] 生产占 TFA 约 41% 的 ARA 的 Y8006 菌株的构建

[0336] 构建了构建体 pZP3-Pa777U (图 4B; SEQ ID NO:129; 描述于美国专利申请公布 2009-0093543-A1 的表 9 中, 该文献以引用方式并入本文), 以将三种 $\Delta 17$ 去饱和酶基因整合进菌株 Y8002 的 Pox3 基因座 (GenBank 登录号 AJ001301)。

[0337] 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 Y8002。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 MM 中并以 250rpm/min 摇动 2 天。根据“一般方法”, 对细胞进行了脂肪酸分析。

[0338] GC 分析显示, 在所选择的 96 个包含 pZP3-Pa777U 的 3 种嵌合基因的转化体中, 大多数中存在占 TFA26% 至 31% 的 EPA, 而在亲本 Y8002 菌株中不存在。菌株 #69 生产了占 TFA 约 38% 的 EPA 并被命名为 Y8007。有一个菌株 (即, 菌株 #9) 没有生产 EPA, 但是生产了占 TFA 约 41% 的 ARA。该菌株被命名为 Y8006。基于菌株 Y8006 中 EPA 生产的缺失, 其相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的基因型被假定为 Pex3-, 未知 1-, 未知 2-, 未知 3-, Leu+, Lys+, Ura+, YAT1::ME3S::Pex16, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, GPAT::EgD9e::Lip2, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD5SM::Pex20, EXP1::EgD5M::Pex16, YAT1::EaD5SM::Oct。

[0339] 与此相对, 菌株 Y8007 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Pex3-, 未知 1-, 未知 2-, 未知 3-, Leu+, Lys+, Ura+, YAT1::ME3S::Pex16, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, GPAT::EgD9e::Lip2, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD5SM::Pex20, EXP1::EgD5M::Pex16, YAT1::EaD5SM::Oct, YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco (其中 PaD17 是瓜果腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum*) $\Delta 17$ 去饱和酶 [美国专利 7, 556, 949]; PaD17S 是经密码子优化的 $\Delta 17$ 去饱和酶, 来源于瓜果腐霉菌 [美国专利 7, 556, 949])。

[0340] pZP3-Pa777U 的 3 种嵌合基因在 Pox3 基因座 (GenBank 登录号 AJ001301) 的整合在菌株 Y8006 和 Y8007 中未被确认。

[0341] 实施例 3

[0342] 生产占总脂肪酸 [“TFA”] 从约 24% 至约 56% 的 EPA 的解脂耶氏酵母菌株的构建

[0343] 本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的菌株 Y8412 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而言约 56% 的 EPA。

[0344] 菌株 Y8412 (图 2) 的开发需要菌株 Y2224、Y4001、Y4001U、Y4036、Y4036U 和 L135 (描述于实施例 1 中), 菌株 L135U9 和 Y8002 (描述于实施例 2 中), 以及菌株 Y8006U6、Y8069、Y8069U、Y8154、Y8154U、Y8269 和 Y8269U 的构建。

[0345] 菌株 Y8006U6 (Ura3-) 的构建

[0346] 为了破坏 Ura3 基因, 构建体 pZKUM (图 5A; SEQ ID NO:130; 描述于美国专利申请公布 2009-0093543-A1 的表 15 中, 该文献以引用方式并入本文) 被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y8006 的 Ura3 基因。

[0347] 将质粒 pZKUM 用 SalI/PacI 消化,然后根据“一般方法”将其用于转化菌株 Y8006。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。

[0348] 挑取在 MM+5-FOA 平板上生长的总共 8 个转化体,并且再次分别划线接种到 MM 平板和 MM+5-FOA 平板上。所有 8 个菌株具有 Ura⁻ 表型(即,细胞能在 MM+5-FOA 平板上生长,但不能在 MM 平板上生长)。从 MM+5-FOA 平板上刮下细胞,并根据“一般方法”对其进行脂肪酸分析。

[0349] GC 分析显示,在生长于 MM+5-FOA 平板上的 pZKUM⁻ 转化体菌株 #1、#2、#4、#5、#6 和 #7 中,分别存在 22.9%、25.5%、23.6%、21.6%、21.6% 和 25% 的 ARA。这六个菌株分别被命名为菌株 Y8006U1、Y8006U2、Y8006U3、Y8006U4、Y8006U5 和 Y8006U6(统称为 Y8006U)。

[0350] 生产占 TFA 约 37.5% 的 EPA 的 Y8069 菌株的构建

[0351] 构建了构建体 pZP3-Pa777U(图 4B;SEQ ID NO:129;描述于美国专利申请公布 2009-0093543-A1 的表 9 中,该文献以引用方式并入本文),以将三种 $\Delta 17$ 去饱和酶基因整合进菌株 Y8006U6 的 Pox3 基因座(GenBank 登录号 AJ001301)。

[0352] 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 Y8006U6。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 MM 中并以 250rpm/min 摇动 2 天。根据“一般方法”,对细胞进行了脂肪酸分析。

[0353] 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 Y8006U6 菌株中。所筛选的 24 个菌株中大部分产生占 TFA 24-37% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 37.5%、43.7%、37.9% 和 37.5% 的 EPA 的四个菌株(即,#1、#6、#11 和 #14)分别命名为菌株 Y8066、Y8067、Y8068 和 Y8069。pZP3-Pa777U 的 3 种嵌合基因在菌株 Y8066、Y8067、Y8068 和 Y8069 的 Pox3 基因座(GenBank 登录号 AJ001301)的整合未被确认。

[0354] 菌株 Y8066、Y8067、Y8068 和 Y8069 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺, Pex3⁻, 未知 1⁻, 未知 2⁻, 未知 3⁻, 未知 4⁻, Leu⁺, Lys⁺, YAT1::ME3S::Pex16, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, GPAT::EgD9e::Lip2, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD5SM::Pex20, EXP1::EgD5M::Pex16, YAT1::EaD5SM::Oct, YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco。

[0355] 菌株 Y8069U(Ura3⁻) 的构建

[0356] 为了破坏 Ura3 基因,构建体 pZKUM(图 5A;SEQ ID NO:130;描述于美国专利申请公布 2009-0093543-A1 的表 15 中)以与关于 pZKUM 对菌株 Y8006 的转化所述的(参见上文)相似的方式,被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y8069 的 Ura3 基因中。总计 3 个转化体被培养并被鉴定为具有 Ura⁻ 表型。

[0357] GC 分析显示,在生长于 MM+5-FOA 平板上的 pZKUM⁻ 转化体菌株 #1、#2 和 #3 中,分别存在 22.4%、21.9% 和 21.5% 的 EPA。这三个菌株分别被命名为菌株 Y8069U1、Y8069U2、和 Y8069U3(统称为 Y8069U)。

[0358] 生产占 TFA 约 44.8% 的 EPA 的菌株 Y8154 的构建

[0359] 构建了构建体 pZKL2-5mB89C(图 5B;SEQ ID NO:131)以将一个 $\Delta 5$ 去饱和酶基因、一个 $\Delta 9$ 延伸酶基因、一个 $\Delta 8$ 去饱和酶基因和一个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 Y8069U3 的 Lip2 基因座 (GenBank 登录号 AJ012632) 中, 由此使得能够生产更高水平的 EPA。pZKL2-5mB89C 质粒含有如下组分:

[0360] 表 7: 质粒 pZKL2-5mB89C (SEQ ID NO: 131) 的描述

[0361]

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
<i>AscI/BsiWI</i> (730-1)	耶氏酵母属 <i>Lip2</i> 基因的 722bp 5' 部分 (图中标记为 "Lip2.5N"; GenBank 登录号 AJ012632)
<i>PacI/SphI</i> (4141-3438)	耶氏酵母 <i>Lip2</i> 基因的 697bp 3' 部分 (图中标记为 "Lip2.3N"; GenBank 登录号 AJ012632)
<i>SwaI/BsiWI</i> (13561-1)	YAT1::YICPT1::Aco 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (在图中标记为 "YAT"; 美国专利申请公布 2006-0094102-A1); • YICPT1: 解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶基因 (SEQ ID NO: 37) (图中标记为 "解脂耶氏酵母 CPT1 cDNA"; 国际申请公布 WO 2006/052870); • Aco: 来自耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 登录号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列

[0362]

<i>PmeI/SwaI</i> (10924-13561)	FBAIN::EgD8M::Lip1, 包含: • FBAIN: 解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子 (美国专利 7,202,356); • EgD8M: 合成的突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:59; 美国专利 7,709,239), 来源于小眼虫 (“EgD8S”; 美国专利 7,256,033) (图中标记为 “D8S-23”); • Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 登录号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
<i>PmeI/ClaI</i> (10924-9068)	YAT1::EgD9eS::Lip2 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子(在图中标记为 “YAT”; 美国专利申请公布 2006-0094102-A1); • EgD9eS: 经密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶(SEQ ID NO:45), 来源于小眼虫 (美国专利 7,645,604); • Lip2: 来自耶氏酵母 Lip2 基因 (GenBank 登录号 AJ012632) 的 Lip2 终止子序列
<i>ClaI/EcoRI</i> (9068-6999)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 登录号 AJ306421)
<i>EcoRI/PacI</i> (6999-4141)	GPDIN::EgD5SM::ACO, 包含: • GPDIN: 解脂耶氏酵母 GPDIN 启动子 (美国专利 7,459,546); • EgD5SM: 合成的突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶(SEQ ID NO:71; 美国专利公布 2010-0075386-A1), 来源于小眼虫 (美国专利 7,678,560) (在图中标记为 “EgD5S-HPGS”); • Aco: 来自耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 登录号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列

[0363] 将 pZKL2-5mB89C 质粒用 *AscI*/*SphI* 消化, 然后根据“一般方法”将其用于转化菌株 Y8069U3。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30℃ 下维持 3 至 4 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。根据“一般方法”, 对细胞进行了脂肪酸分析。

[0364] GC 分析显示, 所选择的 96 个菌株中大多数生产占 TFA 大约 38-44% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 44.7%、45.2%、45.4%、44.8%、46.1%、48.6% 和 45.9% 的 EPA 的七个菌株 (即, #1、#39、#49、#62、#70、#85 和 #92) 分别命名为菌株 Y8151、Y8152、Y8153、Y8154、Y8155、Y8156 和 Y8157。在这些 EPA 菌株中, Lip2 基因的敲除未被确认。

[0365] 菌株 Y8151、Y8152、Y8153、Y8154、Y8155、Y8156 和 Y8157 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺, Pex3⁻, 未知 1⁻, 未知 2⁻, 未知 3⁻, 未知 4⁻, 未知 5⁻, Leu⁺, Lys⁺, YAT1::ME3S::Pex16, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, GPAT::EgD9e::Lip2, YAT1::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD8M::Lip1, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, EXP1::EgD5M::Pex16, YAT1::EaD5SM::Oct, FBAIN::EgD5SM::Pex20, GPDIN::EgD5SM::Aco, FBAINm::PaD17::Aco, EXP1::PaD17::Pex16, YAT1::PaD17S::Lip1, YAT1::Y1CPT::Aco。

[0366] 菌株 Y8154U1 (Ura3⁻) 的构建

[0367] 为了破坏 Ura3 基因,构建体 pZKUM(图 5A;SEQ ID NO:130;描述于美国专利申请公布 2009-0093543-A1 的表 15 中)以与关于 pZKUM 对菌株 Y8006 的转化所述的(参见上文)相似的方式,被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y8154 的 Ura3 基因中。总计 8 个转化体被培养并被鉴定为具有 Ura⁻ 表型。

[0368] GC 分析显示,在 pZKUM- 转化体菌株 #7 中有占 TFA23.1% 的 EPA。该菌株被命名为菌株 Y8154U1。

[0369] 生产占 TFA 约 45.3% 的 EPA 的菌株 Y8269 的构建

[0370] 构建了构建体 pZKL1-2SR9G85(图 6A;SEQ ID NO:132),以将一个 DGLA 合酶 $\Delta 12$ 去饱和酶基因和一个 $\Delta 5$ 去饱和酶基因整合到菌株 Y8154U1 的 Lip1 基因座(GenBank 登录号 Z50020)中,以由此使得能够生产更高水平的 EPA。DGLA 合酶是复合酶,包括连接到 $\Delta 8$ 去饱和酶的 $\Delta 9$ 延伸酶

[0371] pZKL1-2SR9G85 质粒含有如下组分:

[0372] 表 8:质粒 pZKL1-2SR9G85(SEQ ID NO:132) 的描述

[0373]

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
<i>AscI/BsiWI</i> (4189-3373)	耶氏酵母属 <i>Lip1</i> 基因的 809bp 5'部分(图中标记为“Lip1-5'N”; GenBank 登录号 Z50020)
<i>PacI/SphI</i> (7666-6879)	耶氏酵母属 <i>Lip1</i> 基因的 763bp 3'部分(图中标记为“Lip1.3N”; GenBank 登录号 Z50020)

[0374]

<i>ClaI/SwaI</i> (1-3217)	YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1, 包含: - YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子(在图中标记为“YAT”; 美国专利申请公布 2006-0094102-A1); - E389D9eS/EgD8M: 包括来源于小型绿藻属 (<i>Eutreptiella</i> sp.) CCMP389 的经密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶 (“E389D9eS”), 连接子、和来源于小眼虫的合成的突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (“EgD8M”) 的基因融合 (SEQ ID NO:12) (图中分别标记为 “E389S”、“连接子” 和 “EgD8M”; 美国专利申请公布 2008-0254191-A1); - Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 登录号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
<i>SaI/ClaI</i> (11982-1)	GPM::EgD5SM::Oct 包含: - GPM: 解脂耶氏酵母 GPM 启动子 (图中标记为 “GPML”; 美国专利 7,202,356); - EgD5SM: 合成的突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:71; 美国专利公布 2010-0075386-A1), 来源于小眼虫 (美国专利 7,678,560) (在图中标记为 “ED5S”); - OCT: 耶氏酵母 OCT 基因 (GenBank 登录号 X69988) 的 OCT 终止子序列
<i>SaI/EcoRI</i> (11982-10363)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 登录号 AJ306421)
<i>EcoRI/PacI</i> (10363-7666)	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”; 国际申请公布 WO 2006/052870); - FmD12S: 经密码子优化的 $\Delta 12$ 延伸酶 (SEQ ID NO:93), 来源于串珠镰刀菌 (图中标记为 “FD12S”; 美国专利 7,504,259); - Aco: 来自耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 登录号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列

[0375] 将 pZKL1-2SR9G85 质粒用 AscI/SphI 消化, 然后根据“一般方法”将其用于转化菌株 Y8154U1。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30℃ 下维持 3 至 4 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。根据“一般方法”, 对细胞进行了脂肪酸分析。

[0376] GC 分析显示, 所选择的 96 个菌株中大多数生产占总脂质 40-44.5% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 44.8%、45.3%、47%、44.6% 和 44.7% 的 EPA 的五个菌株 (即, #44、#46、#47、#66 和 #87) 分别命名为菌株 Y8268、Y8269、Y8270、Y8271 和 Y8272。在这些 EPA 菌株中, Lip1 基因座的敲除 (GenBank 登录号 Z50020) 未被确认。

[0377] 菌株 Y8268、Y8269、Y8270、Y8271 和 Y8272 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺, Pex3⁻, 未知 1⁻, 未知 2⁻, 未知 3⁻, 未知 4⁻, 未知 5⁻, 未知 6⁻, YAT1::ME3S::Pex16, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, GPAT::EgD9e::Lip2, YAT1::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD8M::Lip1, YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1, GPD::FmD12::Pex20,

YAT1::FmD12::Oct, EXP1::FmD12S::Aco, EXP1::EgD5M::Pex16, YAT1::EaD5SM::Oct, FBAIN::EgD5SM::Pex20, GPDIN::EgD5SM::Aco, GPM::EgD5SM::Oct, FBAINm::PaD17::Aco, EXP1::PaD17::Pex16, YAT1::PaD17S::Lip1, YAT1::YlCPT::Aco。

[0378] 菌株 Y8269U(Ura3-) 的构建

[0379] 为了破坏 Ura3 基因,构建体 pZKUM(图 5A;SEQ ID NO:130;描述于美国专利申请公布 2009-0093543-A1 的表 15 中)以与关于 pZKUM 对菌株 Y8006 的转化所述的(参见上文)相似的方式,被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y8269 的 Ura3 基因中。总计 8 个转化体被培养并被鉴定为具有 Ura- 表型。

[0380] GC 分析显示,在 pZKUM- 转化体菌株 #2、#3 和 #5 中分别有占 TFA23.0%、23.1%和 24.2%的 EPA。这些菌株分别被命名为菌株 Y8269U1、Y8269U2 和 Y8269U3(统称为 Y8269U)。

[0381] 生产占 TFA 约 51.2% EPA 和 55.8%的菌株 Y8406 和菌株 Y8412 的构建

[0382] 构建了构建体 pZSCP-Ma83(图 6B;SEQ ID NO:133),以将一种 Δ8 去饱和酶基因、一种 C_{16/18}延伸酶基因和一种丙二酰-辅酶 A 合成酶基因整合进菌株 Y8269U1 的 SCP2 基因座(GenBank 登录号 XM_503410),从而使得能生产较高水平的 EPA。pZSCP-Ma83 质粒含有如下组分:

[0383] 表 9:质粒 pZSCP-Ma83(SEQ ID NO:133) 的描述

[0384]

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
-------------------------------	--------------

[0385]

<i>Bsi</i> WI/ <i>Asc</i> I (1-1328)	耶氏酵母 <i>SCP2</i> 基因的 1327bp 3'部分 (图中标记为 "SCP2-3'" ; GenBank 登录号 XM_503410)
<i>Sph</i> I/ <i>Pac</i> I (4036-5816)	耶氏酵母 <i>SCP2</i> 基因的 1780bp 5'部分 (图中标记为 "SCP2-5'" ; GenBank 登录号 XM_503410)
<i>Swa</i> I/ <i>Bsi</i> WI (12994-1)	GPD::ME3S::Pex20, 包含: • GPD: 解脂耶氏酵母 GPD 启动子 (美国专利 7,259,255); • ME3S: 经密码子优化的 C_{16/18} 延伸酶基因 (SEQ ID NO:97), 来源于高山被孢霉 (美国专利 7,470,532); • Pex20: 来自耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 登录号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
<i>Pme</i> I/ <i>Swa</i> I (10409-12994)	YAT1::MCS::Lip1 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (在图中标记为 "YAT" ; 美国专利申请公布 2006/0094102-A1); • MCS: 经密码子优化的丙二酰-辅酶 A 合成酶基因 (SEQ ID NO:41), 来源于豌豆根瘤菌 (<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>) 3841 (美国专利申请 12/637877); • Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 登录号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
<i>Cla</i> I/ <i>Pme</i> I (7917-10409)	GPD::EaD8S::Pex16 包含: • GPD: 解脂耶氏酵母 GPD 启动子 (美国专利 7,259,255); • EaD8S: 经密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO:63), 来源于 <i>Euglena anabaena</i> (美国专利申请公布 2008-0254521-A1); • Pex16: 来自耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 登录号 U75433) 的 Pex16 终止子序列
<i>Sal</i> I/ <i>Eco</i> RI (7467-5848)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 登录号 AJ306421)

[0386] 将 pZSCP-Ma83 质粒用 *Asc*I/*Sph*I 消化, 根据“一般方法”将其用于分别地转化菌株 Y8269U1、Y8269U2 和 Y8269U3。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30℃ 下维持 3 至 4 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。根据“一般方法”, 对细胞进行了脂肪酸分析。

[0387] 通过 GC 对来自每种 pZSCP-Ma83 转化 (即转入 Y8269U1、Y8269U2 和 Y8269U3) 的总计 96 个菌株进行了分析。所择选的 288 个菌株中大部分产生占 TFA43-47% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 51.3%、47.9%、50.8%、48%、47.8%、47.8% 和 47.8% 的 EPA 的用 pZSCP-Ma83 转化的七个 Y8269U1 菌株 (即, #59、#61、#65、#67、#70、#81 和 #94) 分别命名为菌株 Y8404、Y8405、Y8406、Y8407、Y8408、Y8409 和 Y8410。将生产了占 TFA 约 48.8%、50.8%、和 49.3% 的 EPA 的用 pZSCP-Ma83 转化的三个 Y8269U2 菌株 (即, #4、#13 和 #17) 分别命名为菌株 Y8411、Y8412 和 Y8413。并且, 将生产了占 TFA 约 49.3% 和 53.5% 的 EPA 的用 pZSCP-Ma83 转化的两个 Y8269U3 菌株 (即, #2 和 #16) 分别命名为菌株 Y8414 和 Y8415。

[0388] 在任何的这些通过用 pZSCP-Ma83 转化产生的 EPA 菌株中, SCP2 基因座 (GenBank 登录号 XM_503410) 在菌株 Y8404、Y8405、Y8406、Y8407、Y8408、Y8409、Y8410、Y8411、Y8412、

Y8413、Y8414 和 Y8415 中的敲除未被确认。

[0389] 菌株 Y8404、Y8405、Y8406、Y8407、Y8408、Y8409、Y8410、Y8411、Y8412、Y8413、Y8414 和 Y8415 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺, Pex3⁻, 未知 1⁻, 未知 2⁻, 未知 3⁻, 未知 4⁻, 未知 5⁻, 未知 6⁻, 未知 7⁻, YAT1::ME3S::Pex16, GPD::ME3S::Pex20, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, GPAT::EgD9e::Lip2, YAT1::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD8M::Lip1, GPD::EgD8S::Pex16, YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, EXP1::FmD12S::Aco, EXP1::EgD5M::Pex16, YAT1::EgD5SM::Oct, FBAIN::EgD5SM::Pex20, GPDIN::EgD5SM::Aco, GPM::EgD5SM::Oct, FBAINm::PaD17::Aco, EXP1::PaD17::Pex16, YAT1::PaD17S::Lip1, YAT1::Y1CPT::Aco, YAT1::MCS::Lip1。

[0390] 解脂耶氏酵母菌株 Y8406 于 2009 年 5 月 14 日被保藏于美国典型培养物保藏中心, 并被命名为 ATCC PTA-10025。解脂耶氏酵母菌株 Y8412 于 2009 年 5 月 14 日被保藏于美国典型培养物保藏中心, 并被命名为 ATCCPTA-10026。

[0391] 通过烧瓶检测法对总脂质含量和组成的分析

[0392] 培养了来自 YPD 平板的菌株 Y8404、Y8405、Y8406、Y8407、Y8408、Y8409、Y8410、Y8411、Y8412、Y8413、Y8414 和 Y8415 的细胞并按照一般方法部分就总脂质含量和组成对它们进行了分析。表 10 总结了所述细胞的总的干细胞重量 [“DCW”]、细胞的总脂质含量 [“TFA% DCW”]、以占 TFA 的重量% [“% TFA”] 表示的每种脂肪酸的浓度和以干细胞重量%表示的 EPA 含量 [“EPA% DCW”]。更具体地讲, 脂肪酸被鉴定为 16:0 (棕榈酸)、16:1 (棕榈油酸)、18:0 (硬脂酸)、18:1 (油酸)、18:2 (LA)、ALA、EDA、DGLA、ARA、ETrA、ETA、EPA 和其他。

[0393]

表 10: 烧瓶检测法测得的耶氏酵母菌株 Y8404、Y8405、Y8406、Y8407、Y8408、Y8409、Y8410、Y8411、Y8412、Y8413、Y8414 和 Y8415 的总脂质含量和组成

菌株	DCW (g/L)	TFA% DCW	%TFA													EPA% DCW
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	ETFA	ETA	EPA	其他	
Y8404	4.1	27.3	2.8	0.8	1.8	5.1	20.4	2.1	2.9	2.5	0.6	0.8	2.4	51.1	6.3	14.0
Y8405	3.9	29.6	2.7	0.5	2.9	5.7	20.5	2.8	2.7	2.1	0.5	0.7	2.0	51.4	5.1	15.2
Y8406	4.0	30.7	2.6	0.5	2.9	5.7	20.3	2.8	2.8	2.1	0.5	0.8	2.1	51.2	5.4	15.7
Y8407	4.0	29.4	2.6	0.5	3.0	5.6	20.5	2.8	2.7	2.1	0.4	0.7	2.1	51.5	5.1	15.2
Y8408	4.1	29.8	2.9	0.6	2.7	5.7	20.2	2.8	2.6	2.1	0.5	0.9	2.1	51.2	5.5	15.3
Y8409	3.9	30.8	2.8	0.5	2.9	5.7	20.6	2.7	2.7	2.1	0.5	0.8	2.1	51.0	5.2	15.7
Y8410	4.0	31.8	2.7	0.5	3.0	5.7	20.5	2.9	2.7	2.1	0.5	0.7	2.1	50.9	5.3	16.2
Y8411	3.6	30.5	2.7	0.3	3.3	5.1	19.9	2.6	2.4	2.0	0.5	0.6	1.8	52.9	5.7	16.1
Y8412	3.2	27.0	2.5	0.4	2.6	4.3	19.0	2.4	2.2	2.0	0.5	0.6	1.9	55.8	5.6	15.1
Y8413	2.9	27.2	3.1	0.4	2.6	5.4	19.9	2.2	2.8	2.0	0.5	0.7	1.8	52.4	5.9	14.2
Y8414	3.7	27.1	2.5	0.7	2.3	6.0	19.9	1.6	3.4	3.4	0.6	0.6	3.1	49.4	6.1	13.4
Y8415	3.6	25.9	1.4	0.3	1.9	4.5	16.0	1.3	2.7	2.9	0.5	0.6	2.5	59.0	6.1	15.3

[0394] 实施例 4

[0395] 生产占总脂肪酸 [“TFA”] 约 53.6% 的 EPA 并具有 37.6% 的总脂质含量的解脂耶

氏酵母菌株 Y8647 的构建

[0396] 本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的菌株 Y8647 的构建,该菌株通过 $\Delta 9$ 延伸酶 / $\Delta 8$ 去饱和酶途径的表达能够生产相对于总脂质而言约 53.6% 的 EPA 并具有 37.6% 的总脂质含量 [“TFA% DCW”]。菌株 Y8647 (图 2) 的开发需要菌株 Y2224、Y4001、Y4001U、Y4036、Y4036U 和 L135 (描述于实施例 1 中), 菌株 L135U9 和 Y8002 (描述于实施例 2 中), 菌株 Y8006U6、Y8069、Y8069U、Y8154、Y8154U、Y8269 和 Y8269U (描述于实施例 3 中) 以及菌株 Y8412U6 的构建。

[0397] 菌株 Y8412U6 (Ura3⁻) 的构建

[0398] 为了破坏 Ura3 基因,构建体 pZKUM (图 5A;SEQ ID NO:130;描述于美国专利申请公布 2009-00935433-A1 的表 15 中) 以与关于 pZKUM 对菌株 Y8006 的转化所述的 (实施例 3) 相似的方式,被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y8412 (实施例 3) 的 Ura3 基因中。总计 8 个转化体被培养并被鉴定为具有 Ura⁻ 表型。

[0399] GC 分析显示,在 pZKUM- 转化体菌株 #4 和 #6 中分别有占 TFA 25.9% 和 26.9% 的 EPA。这两个菌株分别被命名为菌株 Y8412U6 和 Y8412U8 (统称为 Y8412U)。

[0400] 菌株 Y8647 的构建

[0401] 构建了构建体 pZKL4-398F2 (图 7A;SEQ ID NO:134), 以将一个 C_{16/18} 延伸酶基因、一个 DGLA 合酶、和一个 $\Delta 12$ 去饱和酶基因整合进菌株 Y8412U6 的耶氏酵母脂肪酶 - 样基因座 (命名为 Lip4, GenBank 登录号 XM_503825), 从而使得能生产较高水平的 EPA。pZKL4-398F2 质粒含有如下组分:

[0402] 表 11:质粒 pZKL4-398F2 (SEQ ID NO:134) 的描述

[0403]

SEQ ID NO:134 中的限制酶 (RE) 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
<i>AscI</i> / <i>BsiWI</i> (11164-10412)	耶氏酵母脂肪酶 4 基因座的 745bp 5' 部分 (图中标记为 “Lip4”; GenBank 登录号 XM_503825)

[0404]

<i>PacI</i> / <i>SphI</i> (1-13872)	耶氏酵母脂肪酶 4 基因座的 782bp 3' 部分 (图中标记为 “Lip4-3” ; GenBank 登录号 XM_503825)
<i>EcoRI</i> / <i>PacI</i> (2877-1)	GPDIN::FmD12::Pex16, 包含: • GPDIN: 解脂耶氏酵母 GPDIN 启动子 (美国专利 7,459,546); • FmD12: 串珠镰刀菌 $\Delta 12$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:91) (图中标记为 “F.D12” ; 美国专利 7,504,259); • Pex16: 来自耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 登录号 U75433) 的 Pex16 终止子序列
<i>PmeI</i> / <i>SwaI</i> (8361-10256)	YAT1::ME3S::Lip1 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (在图中标记为 “YAT” ; 美国专利申请公布 2006-0094102-A1); • ME3S: 经密码子优化的 $C_{16/18}$ 延伸酶基因 (SEQ ID NO:97), 来源于高山被孢霉 (美国专利 7,470,532); • Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 登录号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
<i>SwaI</i> / <i>ClaI</i> (8325-4946)	FBAINm::EaD9eS/EaD8S::Lip2 包含: • FBAINm: 解脂耶氏酵母 FBAINm 启动子 (美国专利 7,202,356); • EaD9eS/EaD8S: 包含来源于 <i>Euglena anabaena</i> 的经密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶 (“EaD9eS”)、连接子、和来源于 <i>Euglena anabaena</i> 的经密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶 (“EaD8S”) 的基因融合 (SEQ ID NO:63) (图中分别标记为 “EaD9eS”、“连接子” 和 “EaD8S” ; 美国专利申请公布 2008-0254191-A1); • Lip2: 来自耶氏酵母 Lip2 基因 (GenBank 登录号 AJ012632) 的 Lip2 终止子序列
<i>ClaI</i> / <i>EcoRI</i> (49146-2877)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 登录号 AJ306421)

[0405] 将 pZKL4-398F2 质粒用 *AscI*/*SphI* 消化, 然后根据“一般方法”将其用于转化菌株 Y8412U6。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30°C 下维持 3 至 4 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 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。根据“一般方法”, 对细胞进行了脂肪酸分析。

[0406] GC 分析显示, 所选择的 96 个转化体菌株中大多数生产占 TFA50-52.7% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 52.8%、53.1%、52.8%、53.2%、53.1%、52.8%、和 52.9% 的 EPA 的七个菌株 (即, #31、#35、#38、#41、#60、#61 和 #95) 分别命名为 Y8646、Y8647、Y8648、Y8649、Y8650、Y8651 和 Y8652。

[0407] 在这些 EPA 菌株中, Lip4 基因座 (GenBank 登录号 XM_503825) 的敲除未被确认。

[0408] 菌株 Y8646、Y8647、Y8648、Y8649、Y8650、Y8651 和 Y8652 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺, Pex3⁻, 未知 1⁻, 未知 2⁻, 未知 3⁻, 未知 4⁻, 未知 5⁻, 未知 6⁻, 未知 7⁻, 未知 8⁻, YAT1::ME3S::Pex16, GPD::ME3S::Pex20, YAT1::ME3S::Lip1, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, GPAT::EgD9e::Lip2, YAT1::EgD9eS::Lip2,

FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD8M::Lip1, GPD::EaD8S::Pex16, YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1, FBAINm::EaD9eS/EaD8S::Lip2, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, EXP1::FmD12S::Aco, GPDIN::FmD12::Pex16, EXP1::EgD5M::Pex16, FBAIN::EgD5SM:Pex20, GPDIN::EgD5SM::Aco, GPM::EgD5SM::Oct, YAT1::EaD5SM::Oct, FBAINm::PaD17::Aco, EXP1::PaD17::Pex16, YAT1::PaD17S::Lip1, YAT1::Y1CPT::Aco, YAT1::MCS::Lip1。

[0409] 通过烧瓶检测法对总脂质含量和组成的分析

[0410] 培养了来自 YPD 平板的菌株 Y8647、Y8648、Y8649 和 Y8650 的细胞并按照一般方法部分就总脂质含量和组成对它们进行了分析。表 12 总结了所述细胞的总的干细胞重量 [“DCW”]、细胞的总脂质含量 [“TFA% DCW”]、以占 TFA 的重量% [“% TFA”] 表示的每种脂肪酸的浓度和以干细胞重量%表示的 EPA 含量 [“EPA% DCW”]。脂肪酸被鉴定为 16:0 (棕榈酸)、16:1 (棕榈油酸)、18:0 (硬脂酸)、18:1 (油酸)、18:2 (LA)、ALA、EDA、DGLA、ARA、ETrA、ETA、EPA 和其他。

[0411]

表 12: 烧瓶检测法测得的耶氏酵母菌株 Y8647、Y8648、Y8649 和 Y8650 的总脂质含量和组成

菌株	DCW (g/L)	TFA% DCW	%TFA													EPA % DCW
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	ETa	ETA	EPA	其他	
Y8647	3.8	37.6	1.3	0.2	2.1	4.7	20.3	1.7	3.3	3.6	0.7	0.6	3.0	53.6	4.5	20.1
Y8648	3.5	27.8	2.3	0.3	2.7	4.3	18.6	2.3	2.1	2.2	0.6	0.6	1.9	56.7	4.9	15.7
Y8649	3.6	27.9	2.4	0.3	2.9	3.7	18.8	2.2	2.1	2.4	0.6	0.8	2.1	55.8	5.5	15.6
Y8650	3.5	28.2	2.2	0.3	2.9	3.8	18.8	2.4	2.1	2.4	0.6	0.6	2.1	56.1	5.3	15.8

[0412] 实施例 5

[0413] 生产占总脂肪酸〔“TFA”〕约 54.5%的 EPA 并具有 39.6%的总脂质含量的解脂耶

氏酵母菌株 Y9028 的构建

[0414] 本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的菌株 Y9028 的构建, 该菌株通过 $\Delta 9$ 延伸酶 / $\Delta 8$ 去饱和酶途径的表达能够生产相对于总脂质而言约 54.5% 的 EPA 并具有 39.6% 的总脂质含量 [“TFA% DCW”]。菌株 Y9028 (图 2) 的开发需要菌株 Y2224、Y4001、Y4001U、Y4036、Y4036U 和 L135 (描述于实施例 1 中), 菌株 L135U9 和 Y8002 (描述于实施例 2 中), 菌株 Y8006U6、Y8069、Y8069U、Y8154、Y8154U、Y8269 和 Y8269U (描述于实施例 3 中)、菌株 Y8412U6 和 Y8647 (描述于实施例 4 中) 以及菌株 Y8467U 的构建。

[0415] 菌株 Y8647U (Ura3⁻) 的构建

[0416] 为了破坏 Ura3 基因, 构建体 pZKUM (图 5A; SEQ ID NO:130; 描述于美国专利申请公布 No. 2009-0093543-A1) 的表 15 中) 以与关于 pZKUM 对菌株 Y8006 的转化所述的 (实施例 3) 相似的方式, 被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y8647 (实施例 4) 的 Ura3 基因中。总计 12 个转化体被培养并被鉴定为具有 Ura⁻ 表型。

[0417] GC 分析显示, 在 pZKUM⁻ 转化体菌株 #1、#3、#4 和 #12 中分别有占 TFA 30.2%、29.2%、28.1% 和 29.9% 的 EPA。这四个菌株分别被命名为菌株 Y8647U1、Y8647U2、Y8647U3、和 Y8647U6 (统称为 Y8647U)。

[0418] 菌株 Y9028 的构建

[0419] 构建了构建体 pZP2-85m98F (图 7B; SEQ ID NO:135), 以将一个 $\Delta 8$ 去饱和酶基因、一个 DGLA 合酶和一个 $\Delta 5$ 去饱和酶基因整合到菌株 Y8647U3 的耶氏酵母 Pox2 基因座 (GenBank 登录号 AJ001300) 中, 以由此使得能够生产更高水平的 EPA。pZP2-85m98F 质粒含有如下组分:

[0420] 表 13: 质粒 pZP2-85m98F (SEQ ID NO:135) 的描述

[0421]

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
<i>AscI</i> / <i>BsiWI</i> (5986-5176)	耶氏酵母 <i>Pox2</i> 基因的 810 bp 5' 部分 (GenBank 登录号 AJ001300)
<i>PacI</i> / <i>SphI</i> (9349-8694)	耶氏酵母 <i>Pox2</i> 基因的 655 bp 3' 部分 (GenBank 登录号 AJ001300)

[0422]

<i>PmeI/SwaI</i> (2493-5020)	EXP1::EgD5SM::Lip1, 包含: • EXP1: 解脂耶氏酵母输出蛋白 (EXP1) 启动子 (在图中标记为 “EXP” ; 国际申请公布 WO 2006/052870) ; • EgD5SM: 合成的突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:71; 美国专利公布 2010-0075386-A1), 来源于小眼虫 (美国专利 7,678,560); • Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 登录号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
<i>ClaI/PmeI</i> (1-2493)	GPD::EaD8S::Pex16, 包含: • GPD: 解脂耶氏酵母 GPD 启动子 (美国专利 7,259,255); • EaD8S: 经密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶基因 (SEQ ID NO:63), 来源于 <i>Euglena anabaena</i> (美国专利申请公布 2008-0254521-A1); • Pex16: 来自耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 登录号 U75433) 的 <i>Pex16</i> 终止子序列
<i>SaII/EcoRI</i> (14170 -12551)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 登录号 AJ306421)
<i>EcoRI/PacI</i> (12551-9349)	YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco, 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (在图中标记为 “YAT” ; 美国专利申请公布 2006/0094102-A1); • EgD9eS/EgD8M: 包含来源于小眼虫的经密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶 (“EgD9eS”)、连接子、和来源于小眼虫的经密码子优化的 $\Delta 8$ 去饱和酶 (“EgD8M”) 的基因融合 (SEQ ID NO:8) (图中分别标记为 “EgD9eS”、“连接子” 和 “EgD8M” ; 美国专利申请公布 2008-0254191-A1); • Aco: 来自耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 登录号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列

[0423] 将 pZP2-85m98F 质粒用 *AscI*/*SphI* 消化, 根据“一般方法”将其用于分别地转化菌株 Y8647U1、Y8647U2、Y8647U3 和 Y8647U6。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30°C 下维持 3 至 4 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 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。根据“一般方法”, 对细胞进行了脂肪酸分析。

[0424] GC 分析显示, 所选择的 48 个用 pZP2-85m98F 转化的 Y8647U1 菌株中大多数生产占 TFA49-52% 的 EPA。并且, 将生产了占 TFA 约 52.6% 和 52.1% 的 EPA 的两个菌株 (即, #30 和 #31) 分别命名为菌株 Y9024 和 Y9025。

[0425] 所选择的 60 个用 pZP2-85m98F 转化的 Y8647U2 菌株中大多数生产占 TFA49-51.9% 的 EPA。菌株 #6 生产了占 TFA 约 52% 的 EPA 并被命名为 Y9026。

[0426] 所选择的 60 个用 pZP2-85m98F 转化的 Y8647U3 菌株中大多数生产占 TFA50-52.2% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 53.2%、53.7%、54.0%、52.9%、53.4% 和 52.3% 的 EPA 的用六个菌株 (即, #5、#6、#14、#15、#20 和 #34) 分别命名为 Y9027、Y9028、Y9029、Y9030、Y9031 和 Y9032。

[0427] 类似地, GC 分析显示, 所选择的 48 个用 pZP2-85m98F 转化的 Y8647U6 菌株中大多

数生产占 TFA 50–52.1% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 52.2% 和 52.8% 的 EPA 的两个菌株 (即, #27 和 #44) 分别命名为菌株 Y9033 和 Y9034。

[0428] 在任何的这些通过用 pZP2-85m98F 转化产生的 EPA 菌株中, Pox2 基因座 (GenBank 登录号 AJ001300) 在菌株 Y9024、Y9025、Y9026、Y9027、Y9028、Y9029、Y9030、Y9031、Y9032、Y9033 和 Y9034 中的敲除未被确认。

[0429] 这些菌株相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺, Pex3⁻, 未知 1⁻, 未知 2⁻, 未知 3⁻, 未知 4⁻, 未知 5⁻, 未知 6⁻, 未知 7⁻, 未知 8⁻, 未知 9⁻, YAT1::ME3S::Pex16, GPD::ME3S::Pex20, YAT1::ME3S::Lip1, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, GPAT::EgD9e::Lip2, YAT1::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD8M::Lip1, GPD::EaD8S::Pex16 (2 copies), YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1, YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco, FBAINm::EaD9eS/EaD8S::Lip2, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, EXP1::FmD12S::Aco, GPDIN::FmD12::Pex16, EXP1::EgD5M::Pex16, FBAIN::EgD5SM::;Pex20, GPDIN::EgD5SM::Aco, GPM::EgD5SM::Oct, EXP1::EgD5SM::Lip1, YAT1::EaD5SM::Oct, FBAINm::PaD17::Aco, EXP1::PaD17::Pex16, YAT1::PaD17S::Lip1, YAT1::Y1CPT::Aco, YAT1::MCS::Lip1。

[0430] 通过烧瓶检测法对总脂质含量和组成的分析

[0431] 培养了来自 YPD 平板的菌株 Y9028、Y9029 和 Y9031 的细胞并按照一般方法部分就总脂质含量和组成对它们进行了分析。

[0432] 下面的表 14 总结了所述细胞的总的干细胞重量 [“DCW”]、细胞的总脂质含量 [“TFA% DCW”]、以占 TFA 的重量% [“% TFA”] 表示的每种脂肪酸的浓度和以干细胞重量% 表示的 EPA 含量 [“EPA% DCW”]。更具体地讲, 脂肪酸被鉴定为 16:0 (棕榈酸)、16:1 (棕榈油酸)、18:0 (硬脂酸)、18:1 (油酸)、18:2 (LA)、ALA、EDA、DGLA、ARA、ETra、ETA、EPA 和其他。

[0433]

表 14: 烧瓶检测法测得的耶氏酵母菌株 Y9028、Y9029 和 Y9031 的总脂质含量和组成

菌株	DCW (g/L)	TFA% DCW	%TFA													EPA% DCW
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	ETFA	ETA	EPA	其他	
Y9028	3.3	39.6	1.3	0.2	2.1	4.4	19.8	1.7	3.2	2.5	0.8	0.7	1.9	54.5	6.1	21.6
Y9029	3.2	38.4	1.3	0.3	1.7	4.4	19.8	1.5	3.2	3.3	0.9	0.7	2.4	53.8	6.0	20.7
Y9031	3.3	38.6	1.3	0.3	1.8	4.7	20.1	1.7	3.2	3.2	0.9	0.8	2.6	52.3	6.3	20.2

[0434] 实施例 6

[0435] 生产占总脂肪酸 [“TFA”] 至少约 57% 的 EPA 并具有至少约 35% 的总脂质含量的

解脂耶氏酵母菌株 Y9481 和 Y9502 的构建

[0436] 本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC#20362 并表达 $\Delta 9$ 延伸酶 / $\Delta 8$ 去饱和酶途径的菌株 Y9481 和 Y9502 的构建。菌株 Y9481 能够生产相对于总脂质而言约 60.9% 的 EPA 并具有 35% 的总脂质含量 [“TFA% DCW”], 而菌株 Y9502 能够生产相对于总脂质而言约 57% 的 EPA 并具有 37.1% 的“TFA% DCW”。

[0437] 菌株 Y9481 和 Y9502 (图 2) 的开发需要菌株 Y2224、Y4001、Y4001U、Y4036、Y4036U 和 L135 (描述于实施例 1 中), 菌株 L135U 和 Y8002 (描述于实施例 2 中), 菌株 Y8006U6、Y8069、Y8069U、Y8154、Y8154U、Y8269 和 Y8269U (描述于实施例 3 中)、菌株 Y8412U6 和 Y8647 (描述于实施例 4 中)、菌株 Y8467U 和 Y9028 (描述于实施例 5 中) 以及菌株 Y9028U 的构建。

[0438] 菌株 Y9028U (Ura3⁻) 的构建

[0439] 为了破坏 Ura3 基因, 构建体 pZKUM (图 5A; SEQ ID NO:130; 描述于美国专利申请公布 No. 2009-0093543-A1 的表 15 中) 以与关于 pZKUM 对菌株 Y8006 的转化所述的 (实施例 3) 相似的方式, 被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y9028 (实施例 5) 的 Ura3 基因中。总计 8 个转化体被培养并被鉴定为具有 Ura⁻ 表型。

[0440] GC 分析显示, 在 pZKUM- 转化体菌株 #1、#3、#4 和 #5 中分别有占 TFA 24.1%、24.9%、24.5% 和 24.5% 的 EPA。这四个菌株分别被命名为菌株 Y9028U1、Y9028U2、Y9028U3、和 Y9028U4 (统称为 Y9028U)。

[0441] 整合载体 pZK16-ML8N 的组分

[0442] 构建了构建体 pZK16-ML8N (图 8A; SEQ ID NO:136), 以将一个 $\Delta 8$ 去饱和酶基因、一个丙二酰 - 辅酶 A 合成酶基因、和一个溶血磷脂酸酰基转移酶基因 [“LPAAT”] 整合进菌株 Y9028U2 的耶氏酵母 YALI0B14795p 基因座 (GenBank 登录号 XM_500900) 中。pZK16-ML8N 质粒含有如下组分:

[0443] 表 15: 质粒 pZK16-ML8N (SEQ ID NO:136) 的描述

[0444]

SEQ ID NO:136 中的限制酶 (RE) 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
<i>AscI/BsiWI</i> (1905-1)	YALI0B14795p 基因座的 1904 bp 5'部分(GenBank 登录号 XM_500900, 图中标记为 “Y8716-5’”)
<i>PacI/SphI</i> (6414-4613)	YALI0B14795p 基因座的 1801 bp 3'部分(GenBank 登录号 XM_500900, 图中标记为 “Y8716-3’”)
<i>SwaI/BsiWI</i> (12920 - 1)	YAT1::EgD8M::Pex20, 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子(在图中标记为 “YAT” ; 美国专利申请公布 2006-0094102-A1); • EgD8M: 合成的突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:59; 美国专利 7,709,239), 来源于小眼虫 (“EgD8S”; 美国专利 7,256,033) • Pex20: 来自耶氏酵母 Pex20 基因 (GenBank 登录号 AF054613) 的 Pex20 终止子序列
<i>PmeI/SwaI</i> (10534-12920)	FBA::MCS::Lip1, 包含: • FBA: 解脂耶氏酵母 FBA 启动子 (美国专利 7,202,356); • MCS: 经密码子优化的丙二酰-辅酶 A 合成酶基因(SEQ ID NO:41), 来源于豌豆根瘤菌 (<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>) 3841 (美国专利申请 12/637877); • Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 登录号 Z50020) 的 Lip1 终止子序列
<i>ClaI/PmeI</i> (8515-10534)	YAT1::MaLPAAT1S::Pex16, 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子(在图中标记为 “YAT” ; 美国专利申请公布 2006-0094102-A1); • MaLPAAT1S: 经密码子优化的溶血磷脂酸酰基转移酶基因 (SEQ ID NO:35), 来源于高山被孢霉 (美国专利申请公布 2006-0115881-A1; 美国专利申请公布 2009-0325265-A1); • Pex16: 来自耶氏酵母 Pex16 基因 (GenBank 登录号 U75433) 的 Pex16 终止子序列
<i>SalI/EcoRI</i> (8065 - 6446)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 登录号 AJ306421)

[0445] 整合载体 pZK16-ML 的组分

[0446] 构建了构建体 pZK16-ML (图 8B; SEQ ID NO:137), 以将一个丙二酰-辅酶 A 合成酶基因和一个溶血磷脂酸酰基转移酶基因 [“LPAAT”] 整合进菌株 Y9028U2 的耶氏酵母 YALI0B14795p 基因座 (GenBank 登录号 XM_500900) 中。pZK16-ML 质粒的组分与 pZK16-ML8N (参见上文) 的那些是相同的;但是, pZK16-ML8N 的 YAT1::EgD8M::Pex20 嵌合基因是缺失的。

[0447] 菌株 Y9481 和 Y9502 的构建

[0448] 用 *AscI*/*SphI* 分别地消化了 pZK16-ML8N 质粒和 pZK16-ML 质粒, 然后按照一般方法部分用于分别地转化菌株 Y9028U2。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30°C 下维持 3 至 4 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 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。根据

“一般方法”，对细胞进行了脂肪酸分析。

[0449] GC 分析显示，所选择的 96 个用 pZK16-ML8N 转化的 Y9028U2 菌株中大多数生产占 TFA 50-55.4% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 58.1%、61.4%、56.2%、58.1%、57.5%、57.0%、55.9%、57.6%、57.8%、55.5%、57.6%、58.1%、57.1%、56.2% 和 58.6% 的 EPA 的十五个菌株（即，#8、#18、#21、#24、#29、#48、#60、#66、#68、#75、#76、#78、#90、#95 和 #96）分别命名为菌株 Y9472、Y9473、Y9474、Y9475、Y9476、Y9477、Y9478、Y9479、Y9480、Y9481、Y9482、Y9483、Y9484、Y9485 和 Y9486。

[0450] 这些 pZK16-ML8N 转化体菌株相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺，Pex3⁻，未知 1⁻，未知 2⁻，未知 3⁻，未知 4⁻，未知 5⁻，未知 6⁻，未知 7⁻，未知 8⁻，未知 9⁻，未知 10⁻，YAT1::ME3S::Pex16，GPD::ME3S::Pex20，YAT1::ME3S::Lip1，FBAINm::EgD9eS::Lip2，EXP1::EgD9eS::Lip1，GPAT::EgD9e::Lip2，YAT1::EgD9eS::Lip2，FBAINm::EgD8M::Pex20，EXP1::EgD8M::Pex16，FBAIN::EgD8M::Lip1，YAT1::EgD8M::Pex20，GPD::EaD8S::Pex16 (2copies)，YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1，YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco，FBAINm::EaD9eS/EaD8S::Lip2，GPD::FmD12::Pex20，YAT1::FmD12::Oct，EXP1::FmD12S::Aco，GPDIN::FmD12::Pex16，EXP1::EgD5M::Pex16，FBAIN::EgD5SM::Pex20，GPDIN::EgD5SM::Aco，GPM::EgD5SM::Oct，EXP1::EgD5SM::Lip1，YAT1::EaD5SM::Oct，FBAINm::PaD17::Aco，EXP1::PaD17::Pex16，YAT1::PaD17S::Lip1，YAT1::Y1CPT::Aco，YAT1::MCS::Lip1，FBA::MCS::Lip1，YAT1::MaLPAAT1S::Pex16。

[0451] 类似地，GC 分析显示，所选择的 96 个用 pZK16-ML 转化的 Y9028U2 菌株中大多数生产占 TFA 51-55.5% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 56.5%、57.4%、56.8%、57.0%、56.4%、57.3%、58.2%、55.6%、57.8%、55.6%、57.6%、56.8%、55.8%、56.4%、56.1% 和 57% 的 EPA 的十六个菌株（即，#4、#8、#15、#16、#39、#44、#46、#63、#66、#80、#85、#86、#88、#89、#90 和 #96）分别命名为 Y9496、Y9497、Y9498、Y9499、Y9500、Y9501、Y9502、Y9503、Y9504、Y9505、Y9506、Y9507、Y9508、Y9509、Y9510 和 Y9511。

[0452] 这些 pZK16-ML 转化体菌株相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺，Pex3⁻，未知 1⁻，未知 2⁻，未知 3⁻，未知 4⁻，未知 5⁻，未知 6⁻，未知 7⁻，未知 8⁻，未知 9⁻，未知 10⁻，YAT1::ME3S::Pex16，GPD::ME3S::Pex20，YAT1::ME3S::Lip1，FBAINm::EgD9eS::Lip2，EXP1::EgD9eS::Lip1，GPAT::EgD9e::Lip2，YAT1::EgD9eS::Lip2，FBAINm::EgD8M::Pex20，EXP1::EgD8M::Pex16，FBAIN::EgD8M::Lip1，GPD::EaD8S::Pex16 (2copies)，YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1，YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco，FBAINm::EaD9eS/EaD8S::Lip2，GPD::FmD12::Pex20，YAT1::FmD12::Oct，EXP1::FmD12S::Aco，GPDIN::FmD12::Pex16，EXP1::EgD5M::Pex16，FBAIN::EgD5SM::Pex20，GPDIN::EgD5SM::Aco，GPM::EgD5SM::Oct，EXP1::EgD5SM::Lip1，YAT1::EaD5SM::Oct，FBAINm::PaD17::Aco，EXP1::PaD17::Pex16，YAT1::PaD17S::Lip1，YAT1::Y1CPT::Aco，YAT1::MCS::Lip1，FBA::MCS::Lip1，YAT1::MaLPAAT1S::Pex16。

[0453] 在任何这些通过用 pZK16-ML8N 或 pZK16-ML 转化产生的 EPA 菌株中，YALI0B14795p 基因座 (GenBank 登录号 XM_500900) 在菌株 Y9472、Y9473、Y9474、Y9475、Y9476、Y9477、Y9478、Y9479、Y9480、Y9481、Y94782、Y9483、Y9484、Y9485、Y9486、Y9496、Y9497、Y9498、Y9499、Y9500、Y9501、Y9502、Y9503、Y9504、Y9505、Y9506、Y9507、Y9508、

Y9509、Y9510 和 Y9511 中的敲除未被确认。

[0454] 通过烧瓶检测法对总脂质含量和组成的分析

[0455] 培养了来自 YPD 平板的菌株 Y9477、Y9481、Y9486、Y9497、Y9502、Y9504、Y9508 和 Y9510 的细胞并按照一般方法部分就总脂质含量和组成对它们进行了分析。

[0456] 下面的表 16 总结了所述细胞的总的干细胞重量 [“DCW”]、细胞的总脂质含量 [“TFA% DCW”]、以占 TFA 的重量% [“% TFA”] 表示的每种脂肪酸的浓度和以干细胞重量%表示的 EPA 含量 [“EPA% DCW”]。更具体地讲,脂肪酸被鉴定为 16:0(棕榈酸)、16:1(棕榈油酸)、18:0(硬脂酸)、18:1(油酸)、18:2(LA)、ALA、EDA、DGLA、ARA、ETrA、ETA、EPA 和其他。

[0457]

表 16: 烧瓶检测法测得的耶氏酵母菌株 Y9477、Y9481、Y9486、Y9497、Y9502、Y9504、Y9508 和 Y9510 的总脂质含量和组成

菌株	DCW (g/L)	TFA% DCW	%TFA													EPA % DCW
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	ETA	ETA	EPA	其他	
Y9477	3.2	32.6	2.6	0.5	3.4	4.8	10.0	0.5	2.5	3.7	1.0	0.5	2.1	61.4	6.9	20.0
Y9481	3.1	35.0	2.5	0.5	3.1	4.7	11.0	0.6	2.6	3.6	0.9	0.5	2.1	60.9	6.8	21.3
Y9486	3.1	32.2	2.1	0.7	1.8	4.2	11.9	0.6	2.9	4.2	1.2	0.7	2.4	60.3	6.7	19.4
Y9497	3.7	33.7	2.4	0.5	3.2	4.6	11.3	0.8	3.1	3.6	0.9	0.7	2.3	58.7	7.1	19.8
Y9502	3.8	37.1	2.5	0.5	2.9	5.0	12.7	0.9	3.5	3.3	0.8	0.7	2.4	57.0	7.5	21.3
Y9504	3.7	33.7	2.2	0.5	3.0	4.5	11.3	0.7	2.9	3.5	0.9	0.7	2.3	59.9	7.1	20.1
Y9508	3.7	34.9	2.3	0.5	2.7	4.4	13.1	0.9	2.9	3.3	0.9	0.7	2.3	58.7	7.3	20.5
Y9510	3.6	35.1	2.5	0.5	2.7	4.4	11.7	0.7	2.9	3.7	0.9	0.7	2.3	58.9	7.8	20.7

[0458] 实施例 7

[0459] 生产占总脂肪酸 [“TFA”] 约 61.8% 的 EPA 并具有 26.5% 的总脂质含量的解脂耶

氏酵母菌株 Y8672 的构建

[0460] 本实施例描述了来源于解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的菌株 Y8672 的构建, 该菌株通过 $\Delta 9$ 延伸酶 / $\Delta 8$ 去饱和酶途径的表达能够生产相对于总脂质而言约 61.8% 的 EPA 并具有 26.5% 的总脂质含量 [“TFA% DCW”]。菌株 Y8672 (图 9) 的开发需要菌株 Y2224、Y4001、Y4001U、Y4036、Y4036U 和 L135 (描述于实施例 1 中), 菌株 L135U9 和 Y8002 (描述于实施例 2 中), 菌株 Y8006U6、Y8069、Y8069U (描述于实施例 3 中) 以及菌株 Y8145、Y8145U、Y8259、Y8259U、Y8367 和 Y8367U 的构建。

[0461] 生产占 TFA 约 48.5% 的 EPA 的菌株 Y8145 的构建

[0462] 构建了构建体 pZKL2-5m89C (图 10; SEQ ID NO:138) 以将一个 $\Delta 5$ 去饱和酶基因、一个 $\Delta 9$ 延伸酶基因、一个 $\Delta 8$ 去饱和酶基因和一个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 Y8069U3 (实施例 3) 的 Lip2 基因座 (GenBank 登录号 AJ012632) 中, 以由此使得能够生产更高水平的 EPA。pZKL2-5m89C 质粒含有如下组分:

[0463] 表 17: 质粒 pZKL2-5m89C (SEQ ID NO:138) 的描述

[0464]

SEQ ID NO:138 中的限制酶 (RE) 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
<i>AscI/BsiWI</i> (730-1)	耶氏酵母属 <i>Lip2</i> 基因的 722bp 5' 部分 (图中标记为 “Lip2.5N”; GenBank 登录号 AJ012632)
<i>PacI/SphI</i> (4141-3438)	耶氏酵母 <i>Lip2</i> 基因的 697bp 3' 部分 (图中标记为 “Lip2.3N”; GenBank 登录号 AJ012632)
<i>SwaI/BsiWI</i> (13143-1)	GPD::YICPT1::Aco 包含: • GPD: 解脂耶氏酵母 GPD 启动子 (美国专利 7,259,255); • YICPT1: 解脂耶氏酵母二酰基甘油胆碱磷酸转移酶基因 (SEQ ID NO:37) (国际申请公布 WO 2006/052870); • Aco: 来自耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 登录号 AJ001300) 的 Aco 终止子序列

[0465]

<i>PmeI/SwaI</i> (10506-13143)	FBAIN::EgD8M::Lip1, 包含: • FBAIN: 解脂耶氏酵母 FBAIN 启动子 (美国专利 7,202,356); • EgD8M: 合成的突变型 $\Delta 8$ 去饱和酶 (SEQ ID NO:59; 美国专利 7,709,239), 来源于小眼虫 (“EgD8S”; 美国专利 7,256,033) • Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因 (GenBank 登录号 Z50020) 的 <i>Lip1</i> 终止子序列
<i>PmeI/ClaI</i> (10506-8650)	YAT1::EgD9eS::Lip2 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子(在图中标记为 “YAT”; 美国专利申请公布 2006-0094102-A1); • EgD9eS: 经密码子优化的 $\Delta 9$ 延伸酶基因(SEQ ID NO:45), 来源于小眼虫 (美国专利 7,645,604); • Lip2: 来自耶氏酵母 Lip2 基因 (GenBank 登录号 AJ012632) 的 <i>Lip2</i> 终止子序列
<i>ClaI/EcoRI</i> (8650-6581)	耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 登录号 AJ306421)
<i>EcoRI/PacI</i> (6581-4141)	YAT1::EgD5SM::ACO, 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子(在图中标记为 “YAT”; 美国专利申请公布 2006-0094102-A1); • EgD5SM: 合成的突变型 $\Delta 5$ 去饱和酶(SEQ ID NO:71; 美国专利公布 2010-0075386-A1), 来源于小眼虫 (美国专利 7,678,560); • Aco: 来自耶氏酵母 Aco 基因 (GenBank 登录号 AJ001300) 的 <i>Aco</i> 终止子序列

[0466] 将 pZKL2-5m89C 质粒用 *AscI*/*SphI* 消化, 然后根据“一般方法”将其用于转化菌株 Y8069U3。将转化细胞铺在 MM 平板上并在 30°C 下维持 3 至 4 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 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。根据“一般方法”, 对细胞进行了脂肪酸分析。

[0467] GC 分析显示, 所选择的 96 个菌株中大多数生产占 TFA 38-44.5% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 45.1%、45.6%、45.0% 和 45.6% 的 EPA 的四个菌株 (即, #10、#50、#70 和 #89) 分别命名为 Y8143、Y8144、Y8145 和 Y8146。在这些 EPA 菌株中, Lip2 基因座的敲除 (GenBank 登录号 AJ012632) 未被确认。

[0468] 菌株 Y8143、Y8144、Y8145 和 Y8146 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺, Pex3⁻, 未知 1⁻, 未知 2⁻, 未知 3⁻, 未知 4⁻, 未知 5⁻, Leu⁺, Lys⁺, YAT1::ME3S::Pex16, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, GPAT::EgD9e::Lip2, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, YAT1::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, FBAIN::EgD8M::Lip1, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD5SM::Pex20, YAT1::EgD5SM::Aco, EXP1::EgD5M::Pex16, YAT1::EaD5SM::Oct, YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco, GPD::Y1CPT1::Aco。

[0469] 通过烧瓶检测法对总脂质含量和组成的分析

[0470] 培养了来自 YPD 平板的菌株 Y8143、Y8144、Y8145 和 Y8146 的细胞并按照一般方法部分就总脂质含量和组成对它们进行了分析。

[0471]

表 18: 烧瓶检测法测得的耶氏酵母菌株 Y8143、Y8144、Y8145 和 Y8146 的总脂质含量和组成

菌株	DCW (g/L)	TFA% DCW	%TFA													EPA% DCW
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	ETFA	ETA	EPA	其他	
Y8143	4.6	22.3	4.2	1.5	1.4	3.6	18.1	2.6	1.7	1.6	0.6	2.2	1.6	50.3	11.6	11.2
Y8144	4.3	23	4.0	1.5	1.4	3.3	18.0	2.6	1.8	1.7	0.7	2.3	1.6	50.6	11.5	11.6
Y8145	4.6	23.1	4.3	1.7	1.4	4.8	18.6	2.8	2.2	1.5	0.6	2.2	1.5	48.5	9.9	11.2
Y8146	4.5	23.8	4.3	1.7	1.4	4.8	18.7	2.8	2.0	1.5	0.6	2.2	1.5	48.3	11.2	11.5

[0472] 菌株 Y8145U(Ura3-) 的构建

[0473] 为了破坏 Ura3 基因,构建体 pZKUM(图 5A;SEQ ID NO:130;描述于美国专利申请

公布 2009-0093543-A1 的表 15 中) 以与关于 pZKUM 对菌株 Y8006 的转化所述的(实施例 3) 相似的方式, 被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y8145 的 Ura3 基因中。总计 8 个转化体被培养并被鉴定为具有 Ura⁻ 表型。

[0474] GC 分析显示, 在 pZKUM- 转化体菌株 #5、#6 和 #7 中分别有占 TFA22.5%、22.6% 和 23.4% 的 EPA。这三个菌株分别被命名为菌株 Y8145U1、Y8145U2、和 Y8145U3(统称为 Y8145U)。

[0475] 生产占 TFA 约 53.9% 的 EPA 的 Y8259 菌株的构建

[0476] 构建了构建体 pZKL1-2SR9G85(实施例 3、图 6A ;SEQ ID NO :132), 以将一个 DGLA 合酶基因、一个 $\Delta 12$ 去饱和酶基因和一个 $\Delta 5$ 去饱和酶基因整合进菌株 Y8145U 的 Lip1 基因座 (GenBank 登录号 Z50020), 以由此使得能够生产更高水平的 EPA。

[0477] 用 AscI/SphI 消化了 pZKL1-2SR9G85 质粒, 然后以与关于 pZKL1-2SR9G85 对菌株 Y8145U1 的转化(实施例 3) 所述的相似的方式, 用于转化菌株 Y8145U1。根据“一般方法”, 对细胞进行了脂肪酸分析。

[0478] GC 分析显示, 所选择的 96 个菌株中大多数生产占总脂质 40-44.0% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 45.2%、47%、44.4%、44.3% 和 45.2% 的 EPA 的五个菌株(即, #7、#14、#48、#56 和 #60) 分别命名为 Y8255、Y8256、Y8257、Y8258 和 Y8259。在这些 EPA 菌株中, Lip1 基因座的敲除 (GenBank 登录号 Z50020) 未被确认。

[0479] 这些菌株相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺, Pex3⁻, 未知 1⁻, 未知 2⁻, 未知 3⁻, 未知 4⁻, 未知 5⁻, 未知 6⁻, Leu⁺, Lys⁺, YAT1::ME3S::Pex16, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, EXP1::FmD12S::ACO, GPAT::EgD9e::Lip2, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, YAT1::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, FBAIN::EgD8M::Lip1, EXP1::EgD8M::Pex16, YAT1::E389S/EgD8M::Lip1, FBAIN::EgD5SM::Pex20, YAT1::EgD5SM::Aco, GPM::EgD5SM::Oct, EXP1::EgD5M::Pex16, YAT1::EaD5SM::Oct ;YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco, GPD::Y1CPT1::Aco。

[0480] 解脂耶氏酵母菌株 Y8259 于 2009 年 5 月 14 日被保藏于美国典型培养物保藏中心, 并被命名为 ATCC PTA-10027。

[0481] 通过烧瓶检测法对总脂质含量和组成的分析

[0482] 培养了来自 YPD 平板的菌株 Y8256 和 Y8259 的细胞并按照一般方法部分就总脂质含量和组成对它们进行了分析。

[0483]

表 19: 烧瓶检测法测得的耶氏酵母菌株 Y8256 和 Y8259 的总脂质含量和组成

菌株	DCW (g/L)	TFA% DCW	%TFA													EPA % DCW
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	ETa	ETA	EPA	其他	
Y8256	4.0	20.1	3.5	1.4	1.3	3.8	18.8	2.0	2.1	1.6	0.8	2.1	1.7	49.9	11.0	10.0
Y8259	4.7	20.5	3.5	1.3	1.3	4.8	16.9	2.3	1.9	1.7	0.6	1.8	1.6	53.9	8.4	11.0

[0484] 菌株 Y8259U(Ura3-) 的构建

[0485] 为了破坏 Ura3 基因,构建体 pZKUM(图 5A ;SEQ ID NO:130 ;描述于美国专利申请

公布 2009-0093543-A1 的表 15 中) 以与关于 pZKUM 对菌株 Y8006 的转化所述的(实施例 3) 相似的方式, 被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y8259 的 Ura3 基因中。总计 8 个转化体被培养并被鉴定为具有 Ura⁻ 表型。

[0486] GC 分析显示, 在 pZKUM- 转化体菌株 #3 中有占 TFA 26.6% 的 EPA。该菌株被命名为菌株 Y8259U。

[0487] 生产占 TFA 约 58.3% 的 EPA 的 Y8367 菌株的构建

[0488] 构建了构建体 pZP2-85m98F (实施例 5, 图 7B ;SEQ ID NO :135), 以将一个 $\Delta 8$ 去饱和酶基因、一个 DGLA 合酶、和一个 $\Delta 5$ 去饱和酶基因整合进菌株 Y8259U 的耶氏酵母 Pox2 基因座 (GenBank 登录号 AJ001300), 以由此使得能够生产更高水平的 EPA。

[0489] 用 AscI/SphI 消化了 pZP2-85m98F 质粒, 然后以与关于 pZP2-85m98F 对菌株 Y8647U3 的转化 (实施例 5) 所述的相似的方式, 用于转化菌株 Y8259U。根据“一般方法”, 对细胞进行了脂肪酸分析。

[0490] GC 分析显示, 所选择的 96 个用 pZP2-85m98F 转化的 Y8259U 菌株中大多数生产占 TFA 41-46% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 46.7%、46.5%、47.4% 和 46.9% 的 EPA 的四个菌株 (即, #26、#33、#77 和 #81) 分别命名为 Y8367、Y8368、Y8369 和 Y8370。在这些 EPA 菌株中, Pox2 基因座 (GenBank 登录号 AJ001300) 的敲除未被确认。

[0491] 菌株 Y8367、Y8368、Y8369 和 Y8370 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺, Pex3⁻, 未知 1⁻, 未知 2⁻, 未知 3⁻, 未知 4⁻, 未知 5⁻, 未知 6⁻, 未知 7⁻, Leu⁺, Lys⁺, YAT1::ME3S::Pex16, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, EXP1::FmD12S::ACO, GPAT::EgD9e::Lip2, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, YAT1::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, FBAIN::EgD8M::Lip1, EXP1::EgD8M::Pex16, GPD::EaD8S::Pex16, YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1, YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco, FBAIN::EgD5SM::Pex20, YAT1::EgD5SM::Aco, GPM::EgD5SM::Oct, EXP1::EgD5M::Pex16, EXP1::EgD5SM::Lip1, YAT1::EaD5SM::Oct, YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco, GPD::Y1CPT1::Aco。

[0492] 通过烧瓶检测法对总脂质含量和组成的分析

[0493] 培养了来自 YPD 平板的菌株 Y8367、Y8368、Y8369 和 Y8370 的细胞并按照一般方法部分就总脂质含量和组成对它们进行了分析。

[0494]

表 20: 烧瓶检测法测得的耶氏酵母菌株 Y8367、Y8368、Y8369 和 Y8370 的总脂质含量和组成

菌株	DCW (g/L)	TFA% DCW	%TFA											EPA % DCW		
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	ETFA	ETA		EPA	其他
Y8367	3.6	18.4	3.7	1.2	1.1	3.4	14.2	1.1	1.5	1.7	0.8	2.1	1.0	58.3	9.9	10.7
Y8368	4.7	19.2	3.0	1.4	1.3	4.3	17.9	1.3	2.4	2.8	1.0	1.8	1.9	52.5	8.4	10.1
Y8369	3.5	19.7	3.7	1.2	1.6	4.2	15.6	1.8	1.7	1.9	0.6	1.7	1.6	55.8	8.6	11.0
Y8370	4.0	23.3	3.4	1.1	1.4	4.0	15.7	1.9	1.7	1.9	0.6	1.8	1.5	56.4	8.6	13.1

[0495] 菌株 Y8367U(Ura3-) 的构建

[0496] 为了破坏 Ura3 基因,构建体 pZKUM(图 5A;SEQ ID NO:130;描述于美国专利申请公布 2009-0093543-A1 的表 15 中)以与关于 pZKUM 对菌株 Y8006 的转化所述的(实施例

3) 相似的方式,被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y8367 的 Ura3 基因中。总计 8 个转化体被培养并被鉴定为具有 Ura⁻ 表型。

[0497] GC 分析显示,在 pZKUM- 转化体菌株 #2、#3 和 #6 中分别有占 TFA25.6%、25.5% 和 25.4% 的 EPA。这三个菌株分别被命名为菌株 Y8367U1、Y8367U2 和 Y8367U3 (统称为 Y8367U)。

[0498] 生产占 TFA 约 61.8% 的 EPA 的 Y8672 菌株的构建

[0499] 构建了构建体 pZSCP-Ma83 (实施例 3,图 6B;SEQ ID NO:133),以将一种 $\Delta 8$ 去饱和酶基因、一种 C_{16/18} 延伸酶基因和一种丙二酰 - 辅酶 A 合成酶基因整合进菌株 Y8637U 的 SCP2 基因座 (GenBank 登录号 XM_503410),以由此使得能够生产更高水平的 EPA。

[0500] 用 AscI/SphI 消化了 pZSCP-Ma83 质粒,然后以与关于 pZSCP-Ma83 对菌株 Y8269U1 的转化 (实施例 3) 所述的相似的方式,用于转化菌株 Y8367U1。根据“一般方法”,对细胞进行了脂肪酸分析。

[0501] GC 分析显示,所选择的 96 个用 pZSCP-Ma83 转化的 Y8367U1 菌株中大多数生产占 TFA 46-52.5% 的 EPA。将生产了占 TFA 约 53.2%、52.8%、52.7%、52.9%、53.0%、52.6%、53.1% 和 52.7% 的 EPA 的八个菌株 (即, #8、#40、#43、#44、#61、#63、#68 和 #70) 分别命名为 Y8666、Y8667、Y8668、Y8669、Y8670、Y8671、Y8672 和 Y8673。在这些 EPA 菌株中,SCP2 基因座 (GenBank 登录号 XM_503410) 的敲除未被确认。

[0502] 菌株 Y8666、Y8667、Y8668、Y8669、Y8670、Y8671、Y8672 和 Y8673 相对于野生型解脂耶氏酵母 ATCC#20362 的最终基因型为 Ura⁺, Pex3⁻, 未知 1⁻, 未知 2⁻, 未知 3⁻, 未知 4⁻, 未知 5⁻, 未知 6⁻, 未知 7⁻, 未知 8⁻, Leu⁺, Lys⁺, YAT1::ME3S::Pex16, GPD::ME3S::Pex20, GPD::Fmd12::Pex20, YAT1::Fmd12::Oct, EXP1::Fmd12S::ACO, GPAT::EgD9e::Lip2, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, YAT1::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, FBAIN::EgD8M::Lip1, EXP1::EgD8M::Pex16, GPD::EaD8S::Pex16 (2copies), YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1, YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco, FBAIN::EgD5SM::Pex20, YAT1::EgD5SM::Aco, GPM::EgD5SM::Oct, EXP1::EgD5M::Pex16, EXP1::EgD5SM::Lip1, YAT1::EaD5SM::Oct, YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco, GPD::YlCPT1::Aco, YAT1::MCS::Lip1。

[0503] 通过烧瓶检测法对总脂质含量和组成的分析

[0504] 培养了来自 YPD 平板的菌株 Y8666、Y8669、Y8679 和 Y8672 的细胞并按照一般方法部分就总脂质含量和组成对它们进行了分析。

[0505]

表 21: 烧瓶检测法测得的耶氏酵母菌株 Y8666、Y8669、Y8670 和 Y8672 的总脂质含量和组成

菌株	DCW (g/L)	TFA% DCW	%TFA													EPA % DCW
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	ETa	ETA	EPA	其他	
Y8666	3.2	25.2	2.3	0.3	2.3	4.1	15.1	1.3	1.7	1.4	0.7	0.6	1.3	62.2	6.7	15.6
Y8669	3.2	26.4	2.3	0.3	2.3	4.1	15.7	1.4	1.8	1.6	0.7	0.5	1.1	61.5	6.7	16.3
Y8670	3.2	27.3	1.9	0.4	3.4	4.3	17.0	1.5	2.2	1.7	0.6	0.5	1.1	60.9	4.5	16.6
Y8672	3.3	26.5	2.3	0.4	2.0	4.0	16.1	1.4	1.8	1.6	0.7	0.4	1.1	61.8	6.4	16.4

[0506] 实施例 8

[0507] 包含不同 LPLAT 开放阅读框的不同表达载体的构建

[0508] 本实施例描述了一系列载体的构建,每种载体包含适合在解脂耶氏酵母中的表达的 LPLAT 开放阅读框。LPLAT 开放阅读框包括啤酒糖酵母 Ale1、解脂耶氏酵母 Ale1、高山被孢霉 LPAAT1、解脂耶氏酵母 LPAAT1 和秀丽隐杆线虫 LPCAT。实施例 9 描述了将这些载体转入解脂耶氏酵母菌株 Y8406U 之后获得的结果。

[0509] LPLAT 的起源

[0510] 在专利文献和公开文献中,已有多种 LPLAT 被鉴定,但这些基因的官能度此前还未被直接比较。表 22 总结了可公开获得的 LPLAT(即, ScAle1、ScLPAAT、MaLPAAT1 和 CeLPCAT)和本文中鉴定的 LPLAT 直系同源物(即, YIAle1 和 YILPAAT1),在就在解脂耶氏酵母中的表达对异源基因进行密码子优化之后(参见下文),这些基因被用于本实施例中。

[0511] 表 22 :功能性描述的 LPLAT

[0512]

LPLAT	生物	开放阅读框名称	参考	SEQ ID NO
Ale1	啤酒糖酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) *	开放阅读框 “YOR175C” 或 “ScAle1”	GenBank 登录号 NP_014818; 美国专利申请公布 20080145867 (对应于国际申请公布 WO 2008/076377); 国际申请公布 WO 2009/001315。	14, 15
	解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	“YALI0F19514p” 或 “YIAle1”	GenBank 登录号 XP_505624; 国际申请公布 WO 2009/001315。	16, 17
LPAAT	啤酒糖酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	开放阅读框 “YDL052C” 或 “ScLPAAT”	GenBank 登录号 NP_010231	32
	高山被孢霉 (<i>Mortierella alpina</i>)	“MaLPAAT1”	美国专利申请公布 2006-0115881-A1; 美国专利申请公布 2009-0325265-A1。	28, 29
	解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	“YALI0E18964g” 或 “YILPAAT1”	GenBank 登录号 XP_504127; 美国专利 7,189,559	30, 31

[0513]

LPCAT	秀丽隐杆线虫*	“克隆 T06E8.1” 或 “CeLPCAT”	GenBank 登录号 CAA98276; 国际申请公布 WO 2004/076617 (对应于美国专利申请公布 2006-0168687-A1)	24, 25
-------	---------	-----------------------------	--	--------

[0514] *啤酒糖酵母 Ale1 和秀丽隐杆线虫 LPCAT 被用作比较实施例。

[0515] 更具体地讲, ScLPAAT(SEQ ID NO:32) 和 ScAle1(SEQ ID NO:15) 蛋白质序列被用作查询序列,以从公开的解脂耶氏酵母蛋白质数据库“Yeast project

Genolevures” (Center for Bioinformatics, LaBRI, Talence Cedex, France) (另参见 Dujon, B. 等人, Nature, 430 (6995) :35-44 (2004)) 鉴定直系同源物。基于对最佳匹配结果的分析, 来自解脂耶氏酵母的 Ale1 和 LPAAT 直系同源物在本文中分别被鉴定为 YlAle1 (SEQ ID NO :17) 和 YlLPAAT (SEQ ID NO :31)。通过进行反向 BLAST, 进一步确认了 YlAle1 和 YlLPAAT1 分别作为 ScAle1 和 ScLPAAT 的直系同源物的鉴定, 所述反向 BLAST 即, 用 SEQ ID NO :17 和 31 作为查询序列, 针对啤酒糖酵母公开的蛋白质数据库, 分别找到 ScAle1 和 ScLPAAT 作为最佳匹配结果。

[0516] 利用 LASERGENE 生物信息学计算机软件包 (DNASTAR, Inc., Madison, WI) 的 MegAlign™ 程序 (版本 8.0.2) 的 Clustal W 方法 (慢速, 准确, Gonnet 选项; Thompson 等人, Nucleic Acids Res., 22:4673-4680 (1994)), 比对了以上鉴定为 ScAle1 (SEQ ID NO :15), YlAle1 (SEQ ID NO :17)、ScLPAAT (SEQ ID NO :32)、MaLPAAT1 (SEQ ID NO :29)、YlLPAAT1 (SEQ ID NO :31) 和 CeLPCAT (SEQ ID NO :25) 的 LPLAT 蛋白质。由此得到了表 23, 其中相似度百分比显示在该表的上方三角形中, 而趋异度百分比显示在下方三角形中。

[0517] 表 23 : 不同 LPLAT 之间的同一性和趋异度百分比

[0518]

YlLPAAT 1	CeLPCAT	MaLPAAT1	ScAle1	ScLPAAT	YlAle1	
--	26.6	34.0	9.6	43.9	11.7	YlLPAAT1
184.3	--	36.4	11.3	32.4	14.5	CeLPCAT
137.5	126.4	--	11.1	34.6	15.0	MaLPAAT1
545.0	442.0	456.0	--	13.5	45.0	ScAle1
97.9	145.7	134.5	365.0	--	15.6	ScLPAAT

[0519]

426.0	339.0	330.0	94.3	317.0	--	YlAle1
-------	-------	-------	------	-------	----	--------

[0520] 通过该方法显示的同一性百分比允许每种 LPAAT 多肽之间最小的同一性百分比和每种 Ale1 多肽之间最小的同一性百分比的确定。LPAAT 多肽之间同一性的范围为 34.0% 同一性 (MaLPAAT1 和 YlLPAAT1) 至 43.9% 同一性 (ScLPAAT 和 YlLPAAT1), 而 ScAle1 和 YlAle1 多肽之间的同一性为 45%。

[0521] 膜结合 O- 酰基转移酶 [“MBOAT”] 家族基序: 通过用 ScAle1 (SEQ ID NO :15) 作为查询序列, 采用默认参数 (期望阈值 = 10; 字长 = 3; 得分参数矩阵 = BLOSUM62; 空位罚分: 空位 = 11, 延伸 = 1) 针对“nr”蛋白质数据库 (包括全部的非冗余 GenBank CDS 翻译、来源于来自布鲁克海文蛋白质数据库 (Brookhaven Protein Data Bank [“PDB”]) 的 3 维结构的序列、除来自 WGS 计划的那些环境样本外的包括在 SWISS-PROT 蛋白质序列数据库的最新的发布、PIR 和 PRF 中的序列) 中的真菌蛋白质进行美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information [“NCBI”]) BLASTP 2.2.20 (蛋白质-蛋白质基本局部比对搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool); Altschul 等人, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997); 和 Altschul 等人, FEBS J., 272:5101-5109 (2005)) 检索, 鉴定了 ScAle1 蛋白质序列 (SEQ ID NO :15) 的直系同源物。获得了下列匹配结果:

[0522] 表 24 :ScAle1 (SEQ ID NO :15) 基于 BLAST 分析的真菌直系同源物

[0523]

GenBank 登录号	物种
NP_014818.1	啤酒糖酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
XP_001643411.1	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i> DSM 70294
XP_448977.1	光滑假丝酵母 (<i>Candida glabrata</i>)
XP_455985.1	乳酸克鲁维酵母 (<i>Kluyveromyces lactis</i>)
NP_986937.1	棉阿舒囊霉 (<i>Ashbya gossypii</i>) ATCC 10895
XP_001385654.2	树干毕赤酵母 (<i>Pichia stipitis</i>) CBS 6054
XP_001487052.1	季也蒙毕赤酵母 (<i>Pichia guilliermondii</i>) ATCC 6260
EDK36331.2	季也蒙毕赤酵母 (<i>Pichia guilliermondii</i>) ATCC 6260
XP_001525914.1	长孢洛德酵母 (<i>Lodderomyces elongisporus</i>) NRRL YB-4239
XP_461358.1	汉逊德巴利酵母 (<i>Debaryomyces hansenii</i>) CBS767
XP_713184.1	白假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>) SC5314
XP_001645053.1	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i> DSM 70294
XP_505624.1	解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)
XP_001805526.1	小麦颖枯病菌 (<i>Phaeosphaeria nodorum</i>) SN15

[0524]

XP_001598340.1	油菜菌核病菌 (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) 1980
XP_001907785.1	鹅柄孢壳菌 (<i>Podospora anserina</i>)
XP_001931658.1	小麦黄斑枯叶菌 (<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>) Pt-1C-BFP
XP_001560657.1	葡萄胞盘菌 (<i>Botryotinia fuckeliana</i>) B05.10
XP_963006.1	粗糙脉孢菌 (<i>Neurospora crassa</i>) OR74A
XP_364011.2	稻瘟病菌 (<i>Magnaporthe grisea</i>) 70-15
XP_001209647.1	土曲霉 (<i>Aspergillus terreus</i>) NIH2624
XP_001822945.1	米曲霉(<i>Aspergillus oryzae</i>) RIB40
XP_001257694.1	费希新萨托菌 (<i>Neosartorya fischeri</i>) NRRL 181
XP_747591.2	烟曲霉(<i>Aspergillus fumigatus</i>) Af293
XP_001270060.1	棒曲霉 (<i>Aspergillus clavatus</i>) NRRL 1
NP_596779.1	粟酒裂殖酵母
XP_001396584.1	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
XP_001229385.1	球毛壳菌(<i>Chaetomium globosum</i>) CBS 148.51
XP_001248887.1	灰酷球孢子菌 (<i>Coccidioides immitis</i>) RS
XP_664134.1	构巢曲霉 (<i>Aspergillus nidulans</i>) FGSC A4
XP_566668.1	新生隐球菌新生变种(<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>) JEC21
XP_001839338.1	冈山灰盖鬼伞(<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>)7#130
XP_757554.1	玉米黑粉菌 (<i>Ustilago maydis</i>) 521

[0525] 用 DNASTAR 比对了表 24 的酵母和真菌蛋白质序列。使用 Clustal W 比对方法 (参见上文) 进行了多重序列比对和同一性百分比计算。

[0526] 更具体地讲,使用 Clustal W 比对方法进行的多重蛋白质比对的默认参数是:空位罚分=10,空位长度罚分=0.2,延迟分歧序列 (Delay Divergent Seqs) (%) = 30, DNA 转换权重 (Transition Weight) = 0.5,蛋白质权重矩阵 = Gonnet 系列, DNA 权重矩

阵 = IUB, 采用“慢速 - 准确 (slow-accurate)”选项。对所得到的比对进行了分析, 以确定 Ale1 同源物的非植物基序的存在或不存在, 如美国专利申请公布 2008-0145867-A1 中所鉴定的。具体而言, 这些包括: M-[V/I]-[L/I]-xxK-[L/V/I]-xxxxxxDG (SEQ ID NO:102)、RxKYYxxWxxx-[E/D]-[A/G]xxxxGxG-[F/Y]-xG (SEQ ID NO:103)、EX₁₁WNX₂-[T/V]-X₂W (SEQ ID NO:21) 和 SAxWHGxxPGYxx-[T/F]-F (SEQ ID NO:104), 其中 X 编码任何氨基酸残基。SEQ ID NO:104 中的 His 残基已被报道可能是该蛋白中的活性位点残基。

[0527] 只有一个基序, 即, EX₁₁WNX₂-[T/V]-X₂W (SEQ ID NO:21), 在所比对的全部 33 种生物中是完全保守的。其余的 M-[V/I]-[L/I]-xxK-[L/V/I]-xxxxxxDG (SEQ ID NO:102)、RxKYYxxWxxx-[E/D]-[A/G]xxxxGxG-[F/Y]-xG (SEQ ID NO:103) 和 SAxWHGxxPGYxx-[T/F]-F (SEQ ID NO:104) 基序仅为部分保守的。因此, 为了本方法的目的, 这些基序被适当地截短, 以符合 0 错配 (即, SAxWHG [SEQ ID NO:20])、1 错配 (即, RxKYYxxW [SEQ ID NO:19])、或 2 错配 (即, M(V/I) (L/I) xxK (LVI) [SEQ ID NO:18])。

[0528] 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶“LPAAT”家族基序: 对包括 ScLPAAT (SEQ ID NO:18)、MaLPAAT1 (SEQ ID NO:15) 和 YlLPAAT1 (SEQ ID NO:17) 的蛋白质比对的分析显示, 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶家族基序 EGTR (SEQ ID NO:20) 存在于每种上述 LPAAT 直系同源物中。基于此, MaLPAAT1 被鉴定为一种可能的 LPAAT, 其与国际申请公布 WO 2004/087902 中公开的高山被孢霉 LPAAT-样蛋白质 (即, SEQ ID NO:93 和 95) 有明显的区别。

[0529] 值得注意的是, EGTR (SEQ ID NO:20) 基序尽管在国际申请公布 WO 2004/087902 中的 LPCAT 序列中不存在, 但却存在于 CeLPCAT (SEQ ID NO:2) 中。似乎是其他残基在 LPAAT-样蛋白质中区别了 LPAAT 和 LPCAT 序列。一个此类的残基可能是 EGTR (SEQ ID NO:20) 基序的延伸。具体而言, ScLPAAT (SEQ ID NO:18)、MaLPAAT1 (SEQ ID NO:15) 和 YlLPAAT1 (SEQ ID NO:17) 中的 EGTR 基序直接接着的是一个丝氨酸残基, 而 CeLPCAT 中的 EGTR 基序直接接着的是一个天冬酰胺残基。与此相对, 国际申请公布 WO 2004/087902 中的两种 LPCAT 在 EGTR 基序中具有缬氨酸对精氨酸残基的取代, 并且该基序直接接着的是缬氨酸残基。

[0530] 包含经密码子优化的啤酒糖酵母 Ale1 基因的 pY201 的构建

[0531] 通过 DNA 2.0 (Menlo Park, CA), 对被命名为“ScAle1”的啤酒糖酵母 ORF (SEQ ID NO:14), 就在解脂耶氏酵母中的表达进行了优化。除密码子优化外, 还将 5'Pci1 和 3'Not1 克隆位点引入了该嵌合基因中 (即, ScAle1S; SEQ ID NO:22)。在 ScAle1S 基因中的修改均未改变所编码的蛋白质的氨基酸序列 (即, 经密码子优化的基因所编码的蛋白质序列 [即, SEQ ID NO:23] 与野生型蛋白质序列 [即, SEQ ID NO:15] 是相同的)。ScAle1S 被克隆进 pJ201 (DNA 2.0), 得到 pJ201:ScAle1S。

[0532] 从 pJ201:ScAle1S 切下了包含 ScAle1S 的 1863bp Pci1/Not1 片段, 并用于构建 pY201 (SEQ ID NO:139; 表 25; 图 10A)。除包含嵌合的 YAT1::ScAle1S::Lip1 基因外, pY201 还包含解脂耶氏酵母 URA3 选择标记, 所述标记两侧为 LoxP 位点, 必要时其可通过重组酶介导的重组用于随后的移除。YAT1::ScAle1S::Lip1 嵌合基因和 URA3 基因的两侧均与解脂耶氏酵母 Pox3 基因的 5' 和 3' 区域具有同源性的片段相接, 以有利于通过双重同源重组的整合, 尽管向解脂耶氏酵母中的整合的发生已知通常不通过同源重组。如此, 构建体 pY201

因此包含以下组分：

[0533] 表 25 :对质粒 pY201 (SEQ ID NO :139) 的描述

[0534]

SEQ ID NO:139 中的限制酶 (RE) 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
<i>BsiWI/SbfI</i> (1-1706 bp)	LoxP:: <i>Ura3</i> ::LoxP 包含: • LoxP 序列 (SEQ ID NO:140) • 解脂耶氏酵母 <i>Ura3</i> 基因 (GenBank 登录号 AJ306421) • LoxP 序列 (SEQ ID NO:140)
<i>SbfI/SphI</i> (1706-3043 bp)	解脂耶氏酵母 POX3 酰基-辅酶 A 氧化酶 3 的 3' 部分 (GenBank 登录号 YALI0D24750g) (即 pY201 中的 bp 2215-3038)
<i>SphI/AscI</i> (3043-5743 bp)	• <i>ColE1</i> 质粒复制起点 • 用于在大肠杆菌中的选择的氨苄青霉素抗性基因 (Amp^R) (即 pY201 中 [互补的] bp 3598-4758); • 大肠杆菌 <i>f1</i> 复制起点
<i>AscI/BsiWI</i> (5743-6513 bp)	解脂耶氏酵母 POX3 酰基-辅酶 A 氧化酶 3 的 5' 部分 (GenBank 登录号 YALI0D24750g) (即 pY201 中的 bp 5743-6512)
<i>BsiWI/BsiWI</i> (6514-1 bp) [<i>NotI</i> 位点, 位于 <i>ScAle1S</i> 和 <i>Lip1</i> 之间, 存在于 bp 9154 bp]	YAT1:: <i>ScAle1S</i> :: <i>Lip1</i> , 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (美国专利申请公布 2006/0094102-A1) (即, pY201 中的 bp 6514-7291) • <i>ScAle1S</i>: 经密码子优化的 <i>Ale1</i> (SEQ ID NO:22), 来源于啤酒糖酵母 YOR175C (即, pY201 中的 bp 7292-9151; 图中标记为 “<i>Sc LPCATs</i> ORF”); • <i>Lip1</i>: 来自耶氏酵母 <i>Lip1</i> 基因的 <i>Lip1</i> 终止子序列 (GenBank 登录号 Z50020) (即, pY201 中的 bp 9160-9481; 图中标记为 “<i>Lip1-3</i>”)

[0535] 包含解脂耶氏酵母 *Ale1* 基因的 pY168 的构建

[0536] 使用 PCR 引物 798 和 799 (SEQ ID NO 分别为 :141 和 142), 通过 PCR 从解脂耶氏酵母 ATCC#20362 cDNA 文库扩增了被命名为 “Y1A1e1” 的解脂耶氏酵母开放阅读框 (GenBank 登录号 XP_505624 ; SEQ ID NO :16)。此外, 通过 PCR 引物 800 和 801 (SEQ ID NO 分别为 :143 和 144) 从 pY201 (SEQ ID NO :139) 扩增了 YAT 启动子。由于上述引物对被设计为产生两种彼此具有一段重叠的 PCR 产物, 随后使用引物 798 和 801 (SEQ ID NO 分别为 :141 和 144) 并用这两种 PCR 片段作为模板, 通过重叠 PCR 扩增了 YAT1::*Y1A1e1* 融合片段。PCR 采用制造商的推荐规范和 Pfu Ultra™ 高保真 DNA 聚合酶 (Stratagene, 目录号 600380) 在 RoboCycler Gradient 40PCR 仪 (Stratagene) 中进行。扩增的进行如下: 首先于 95°C 变性 4 分钟, 然后是 30 个循环的 :95°C 变性 30 秒, 55°C 退火 1 分钟, 72°C 延伸 1 分钟。最后在 72°C 进行 10 分钟的延伸循环, 随后在 4°C 终止反应。

[0537] 凝胶纯化了包含 YAT1::*Y1A1e1* 融合片段的 PCR 产物, 并用 *ClaI*/*NotI* 进行了消化。该 *ClaI*-*NotI* 片段被连接至已被类似地消化过 (从而移除了 YAT1::*ScAle1S* 片段) 的 pY201, 以产生包含嵌合的 YAT1::*Y1A1e1*::*Lip1* 基因的 pY168 (SEQ ID NO :145)。通过 DNA

测序确认了耶氏酵母 Ale1 开放阅读框的 DNA 序列。除了 pY168 中的是 YAT1::YlAle1::Lip1 基因而 pY201 (图 10A) 中是 YAT1::ScAle1S::Lip1 基因之外, pY168 (图 10B; SEQ ID NO: 145) 中存在的组分与 pY201 中存在的那些是相同的。注意在图 10B 中 YlAle1 被标记为“Yl LPCAT”。

[0538] 包含高山被孢霉 LPAAT1 基因的 pY208 的构建

[0539] 通过 DNA 2.0 (Menlo Park, CA), 对被命名为“MaLPAAT1”的高山被孢霉开放阅读框 (SEQ ID NO: 28), 就在解脂耶氏酵母中的表达进行了优化。除密码子优化外, 还将 5' PciI 和 3' NotI 克隆位点引入了该嵌合基因中 (即, MaLPAAT1S; SEQ ID NO: 35)。在 MaLPAAT1S 基因中的修改均未改变所编码的蛋白质的氨基酸序列 (即, 经密码子优化的基因所编码的蛋白质序列 [即, SEQ ID NO: 36] 与野生型蛋白质序列 [即, SEQ ID NO: 29] 是相同的)。MaLPAAT1S 被克隆进 pJ201 (DNA 2.0), 得到 pJ201:MaLPAAT1S。

[0540] 从 pJ201:MaLPAAT1S 切下包含 MaLPAAT1S 的 945bp PciI/NotI 片段, 并用于在与 pY201 (SEQ ID NO: 139) 的两个片段的 3 方连接中构建 pY208 (SEQ ID NO: 146)。具体而言, 将 MaLPAAT1 片段与 3530bp 的 Sph-NotI pY201 片段和 4248bp 的 NcoI-SphI pY201 片段连接, 从而得到 pY208。除了 pY208 中的是 YAT1::MaLPAAT1S::Lip1 基因而 pY201 (图 10A) 中是 YAT1::ScAle1S::Lip1 基因之外, pY208 (图 11A; SEQ ID NO: 146) 中存在的组分与 pY201 中存在的那些是相同的。

[0541] 包含解脂耶氏酵母 LPAAT1 基因的 pY207 的构建

[0542] 在美国专利 7, 189, 559 中描述了来自解脂耶氏酵母的推定的 LPAAT1 (本文中命名为“YlLPAAT1”; SEQ ID NO: 30 和 31), 其 GenBank 登录号为 XP_504127。该蛋白质被注释为“与 uniprot|P33333 啤酒糖酵母 YDL052cSLC1 脂肪酰基转移酶相似”。

[0543] 用解脂耶氏酵母 ATCC#20362 cDNA 文库作为模板, 并使用 PCR 引物 856 和 857 (SEQ ID NO 分别为: 147 和 148) 通过 PCR 扩增了 YlLPAAT1 开放阅读框 (SEQ ID NO: 30)。PCR 使用与上文中关于在合成 pY168 之前对 YAT1::YlAle1 融合片段的扩增所述的相同的组分和条件进行。

[0544] 用 PciI 和 NotI 消化了包含 YlLPAAT1 开放阅读框的 PCR 产物, 然后将其用于与来自 pY168 的两种片段的 3 方连接中。具体而言, 将 YlLPAAT1 片段与 3530bp 的 Sph-NotI pY168 片段和 4248bp 的 NcoI-SphI pY168 片段连接, 以产生包含 YAT1::YlLPAAT1::Lip1 嵌合基因的 pY207。通过 DNA 测序确认了解脂耶氏酵母 LPAAT1 开放阅读框。除了 pY207 中的是 YAT1::YlLPAAT1::Lip1 嵌合基因而 pY201 (图 10A) 中是 YAT1::ScAle1S::Lip1 基因之外, pY207 (图 11B; SEQ ID NO: 149) 中存在的组分与 pY201 中存在的那些是相同的。注意 YlLPAAT1 在图 11B 中被标记为“Yl LPAT1 ORF”。

[0545] 包含秀丽隐杆线虫 LPCAT 基因的 pY175 的构建

[0546] 由 GenScript Corporation (Piscataway, NJ) 对被命名为“CeLPCAT” (SEQ ID NO: 24) 的秀丽隐杆线虫开放阅读框, 就在解脂耶氏酵母中的表达进行了优化。除密码子优化外, 还将 5' NcoI 和 3' NotI 克隆位点引入了该嵌合基因中 (即, CeLPCATS; SEQ ID NO: 26)。在 CeLPCATS 基因中的修改均未改变所编码的蛋白质的氨基酸序列 (即, 经密码子优化的基因所编码的蛋白质序列 [即, SEQ ID NO: 27] 与野生型蛋白质序列 [即, SEQ ID NO: 25] 是相同的)。

[0547] 包含 CeLPCATS 的 NcoI-NotI 片段被用于在与来自 pY168(SEQ ID NO:145) 的两种片段的 3 方连接中构建 pY175(SEQ ID NO:150)。具体而言,将包含 CeLPCATS 的 NcoI-NotI 片段与 3530bp 的 Sph-NotI pY168 片段和 4248bp 的 NcoI-SphI pY168 片段连接,从而得到 pY175。除了 pY175 中的是 YAT1::CeLPCATS::Lip1 基因而 pY201(图 10A) 中是 YAT1::ScAle1S::Lip1 基因之外,pY175(图 12A;SEQ ID NO:150) 中存在的组分与 pY201 中存在的那些是相同的。注意在图 12A 中 CeLPCATS 被标记为“Ce. LPCATsyn”。

[0548] 实施例 9

[0549] 不同的 LPLAT 在生产 EPA 的解脂耶氏酵母菌株 Y8406 中的功能表征

[0550] 生产 EPA 的解脂耶氏酵母菌株 Y8406U 被用于从功能上表征在啤酒糖酵母 Ale1、解脂耶氏酵母 Ale1、高山被孢霉 LPAAT1、解脂耶氏酵母 LPAAT1 和秀丽隐杆线虫 LPCAT 在被稳定整合进耶氏酵母宿主染色体中后,它们的过表达的效应。这与包含其天然的 LPLAT(即 Ale1 和 LPAAT1) 的宿主构成了比较。

[0551] 转化和生长

[0552] 为了破会 Ura3 基因(实施例 3),构建体 pZKUM(图 5A;SEQ ID NO:130;描述于美国专利申请公布 2009-0093543-A1 的表 15 中)以与关于 pZKUM 对菌株 Y8006 的转化所述的(实施例 3)相似的方式,被用于将 Ura3 突变型基因整合进菌株 Y8406 的 Ura3 基因中。若干个转化体被培养并被鉴定为具有 Ura⁻ 表型。

[0553] GC 分析显示,在 pZKUM- 转化体菌株 #4 和 #5 中有占 FAME 26.1% 的 EPA。这两个菌株分别被命名为菌株 Y8406U1 和 Y8406U2(统称为 Y8406U)。

[0554] 然后,用实施例 8 中所述的整合载体的线性 SphI-AscI 片段,其中每种 LPCAT 处于耶氏酵母 YAT1 启动子的控制下,分别地转化了解脂耶氏酵母菌株 Y8406U。具体而言,根据“一般方法”转化了载体 pY201(YAT1::ScAle1S::Lip1)、pY168(YAT1::Y1Ale1::Lip1)、pY208(YAT1::MaLPAAT1S::Lip1)、pY207(YAT1::Y1LPAAT1::Lip1) 和 pY175(YAT1::CeLPCATS::Lip1)。

[0555] 每种转化混合物被铺在 MM 琼脂平板上。挑取了若干个所得到的 URA⁺ 转化体,并接种至 3mL FM 培养基(Biomix,目录号 CM-6681,Biomix Technology, San Diego, CA) 中,上述 FM 培养基每升包含:6.7g 不含氨基酸的 Difco Yeast Nitrogen Base(酵母氮源)、5g 酵母提取物、6gKH₂PO₄、2g K₂HPO₄、1.5g MgSO₄·7H₂O、1.5mg 硫胺素·HCl、和 20g 葡萄糖。在摇动器上以 200rpm 和 30℃ 生长 2 天后,通过离心收集培养物,并重悬于 3mL 包含 0.63% 磷酸二氢钾、2.7% 磷酸氢二钾、8.0% 葡萄糖的 HGM 培养基(目录号 2G2080, Teknova Inc., Hollister, CA) 中,调节至 pH 7.5。在摇动器上以 200rpm 和 at 30℃ 生长 5 天后,通过离心收集 1mL 培养物的等分试样并通过 GC 分析。具体而言,经过培养的细胞通过在 13,000rpm 下离心 1 分钟进行收集,提取总脂质并通过酯交换制备脂肪酸甲酯[“FAMES”],随后用 Hewlett-Packard 6890GC(一般方法)进行分析。

[0556] 基于所述 3mL 培养物的脂肪酸组成,进一步表征了经过选择的转化体。具体而言,选择了用表达载体 pY201(包含 ScAle1S) 转化的菌株 Y8406U 的克隆 #5 和 #11,并分别命名为“Y8406U::ScAle1S-5”和“Y8406U::ScAle1S-11”;选择了用表达载体 pY168(包含 Y1Ale1) 转化的菌株 Y8406U 的克隆 #16,并命名为“Y8406U::Y1Ale1”;选择了用表达载体 pY208(包含 MaLPAAT1S) 转化的菌株 Y8406U 的克隆 #8,并命名为“Y8406U::MaLPAAT1S”;

选择了用表达载体 pY207 (包含 Y1LPAAT1) 转化的菌株 Y8406U 的克隆 #21, 并命名为“Y8406U::Y1LPAAT1”; 并且选择了用表达载体 pY175 (包含 CeLPCATS) 转化的菌株 Y8406U 的克隆 #23, 并命名为“Y8406U::CeLPCATS”。此外, 菌株 Y8406 (作为菌株 Y8406U(Ura-) 的亲本的 Ura+ 菌株) 被用作对照物。

[0557] 每种经过选择的转化体和对照物被划线至 MM 琼脂平板上。然后, 一个接种环的新鲜划线的细胞被接种至 3mL FM 培养基, 并于 30℃ 以 250rpm 培养过夜。测量 OD_{600nm} , 在 125mL 烧瓶中, 加入一个等分试样的细胞, 使得 25mL FM 培养基中最终的 OD_{600nm} 为 0.3。在 30℃ 振荡培养箱中以 250rpm 培养 2 天后, 通过离心收集 6mL 培养物, 并在 125mL 烧瓶中重悬于 25mL HGM 中。30℃ 振荡培养箱中以 250rpm 培养 5 天后, 使用 1mL 等分试样进行 GC 分析 (同上), 并且干燥 10mL 用于干细胞重量 [“DCW”] 测定。

[0558] 就 DCW 测定而言, 通过在 Beckman GS-6R 离心机的 Beckman GH-3.8 转子中以 4000rpm 离心 5 分钟, 收集了 10mL 培养物。沉淀被重悬于 25mL 水中, 并如上文所述重新收集。将洗涤后的沉淀物重悬在 20mL 水中并转移到预先称过重的铝盘上。细胞悬浮液在 80℃ 真空炉中干燥过夜。测量细胞重量。

[0559] 脂质含量、脂肪酸组成和转化效率

[0560] 在相同条件下进行了总共四次单独的实验。实验 1 比较了对照菌株 Y8406 对菌株 Y8406U::ScA1e1S-5。实验 2 比较了对照菌株 Y8406 对菌株 Y8406U::Y1A1e1。实验 3 比较了对照菌株 Y8406 对菌株 Y8406U::Y1A1e1、strain Y8406U::ScA1e1S-11、和 strain Y8406U::MaLPAAT1S。实验 4 比较了对照菌株 Y8406 对菌株 Y8406U::MaLPAAT1S、strain Y8406U::Y1LPAAT1 和 strain Y8406U::CeLPCATS。

[0561] 在每个实验中, 对于 Y8406 对照菌株和 Y8406U 转化体菌株的 1 个、2 个或 3 个重复的培养物 [“重复样品”], 对脂质含量、脂肪酸组成和 EPA 占 DCW 的百分比进行了定量。此外, 每种 Y8406U 转化体的数据还被显示为占 Y8406 对照物的百分比。下面的表 26 总结了细胞的总脂质含量 [“TFA% DCW”]、以占 TFA 的重量% [“% TFA”] 表示的每种脂肪酸的浓度和以占干细胞重量的百分比表示的 EPA 含量 [“EPA% DCW”]。更具体地讲, 脂肪酸被鉴定为 16:0 (棕榈酸)、16:1 (棕榈油酸)、18:0 (硬脂酸)、18:1 (油酸)、18:2 (LA)、ALA、EDA、DGLA、ARA、ETrA、ETA 和 EPA。

[0562] 表 27 总结了在 PUFA 生物合成途径中起作用并且为 EPA 的生产所需的每种去饱和酶和 $\Delta 9$ 延伸酶的转化效率。具体而言, 对于每种 Y8406 对照菌株和 Y8406U 转化体菌株, 提供了 $\Delta 12$ 去饱和酶转化效率 [“ $\Delta 12CE$ ”]、 $\Delta 8$ 去饱和酶转化效率 [“ $\Delta 8CE$ ”]、 $\Delta 5$ 去饱和酶转化效率 [“ $\Delta 5CE$ ”]、 $\Delta 17$ 去饱和酶转化效率 [“ $\Delta 17CE$ ”] 和 $\Delta 9$ 延伸转化效率 [“ $\Delta 9e CE$ ”]; 每种 Y8406U 转化体的数据被显示为占 Y8406 对照物的百分比。转化效率按照下列式子计算: 产物 / (产物 + 底物) * 100, 其中产物既包括产物也包括产物衍生物。

[0563]

表 26: 解脂耶氏酵母 Y8406 的 LPCAT 转化体菌株中的脂质含量和组成

实验	菌株	重复	TFA% DCW	%TFA												EPA % DCW
				16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	ERA	ETA	EPA	
1	Y8406	平均 3	17.6	3.8	0.7	3.3	6.4	22.6	2.5	2.8	2.2	0.5	1.9	2.0	48.9	8.6
	Y8406U:: ScAlecS-5	平均 3	18.3	4.2	0.7	3.5	5.7	15.1	0.6	3.3	3.7	0.8	1.8	2.3	56.9	10.4
		%对照	104	111	100	106	89	67	24	118	168	160	95	115	116	121
2	Y8406	平均 3	23.2	3.5	0.6	3.3	6.4	22.3	2.7	2.6	2.1	0.5	1.6	2.0	49.9	11.6
	Y8406U:: YLAel	平均 3	22.3	3.8	0.7	2.9	3.9	12.7	0.4	3.0	3.8	0.8	1.6	2.4	60.9	13.6
		%对照	96	109	117	88	61	57	15	115	181	160	100	120	122	117
3	Y8406	1	26.1	2.7	0.7	2.8	6.5	20.5	2.5	3.2	2.3	0.7	0.8	0.0	50.8	13.3
	Y8406U:: YLAel	平均 2	23.3	3.3	0.7	2.4	3.6	12.1	0.5	3.2	3.5	0.9	0.0	2.3	62.2	14.5
		%对照	89	122	100	86	55	59	20	100	152	129	0	na	122	109
4	Y8406U:: ScAlecS-11	平均 2	28.0	3.0	0.7	3.0	5.5	13.1	0.6	3.5	3.8	0.9	0.0	2.4	58.5	16.4
		%对照	107	111	100	107	85	64	24	109	165	129	0	na	115	123
	Y8406U:: MalPPAATIS	平均 2	23.7	4.4	0.8	4.2	6.6	11.2	0.7	2.7	3.7	0.9	0.0	2.5	57.0	13.5
		%对照	91	163	114	150	102	55	28	84	161	129	0	na	112	102
	Y8406	平均 2	27.9	2.8	0.6	3.1	6.2	20.6	2.9	2.9	2.0	0.6	0.7	2.0	49.4	13.8
	Y8406U:: MalPPAATIS	平均 2	25.2	4.8	0.8	4.8	6.9	11.6	0.8	2.5	3.0	0.7	0.0	2.3	55.3	14.0
		%对照	90	171	133	155	111	56	28	86	150	117	0	115	112	101
	Y8406U:: YILPAATI	平均 2	25.2	3.7	0.7	4.2	6.2	13.0	1.2	2.3	2.6	0.6	0.0	2.2	56.7	14.3
		%对照	90	132	117	135	100	63	41	79	130	100	0	110	115	104
	Y8406U:: CelPCATS	平均 2	24.7	3.8	0.6	4.6	7.1	13.9	1.6	2.3	2.6	0.6	0.4	2.2	53.6	13.2
		%对照	89	136	100	148	115	67	55	79	130	100	57	110	109	96

[0564]

表 27: 解脂耶氏酵母 Y8406 的 LPCAT 转化体菌株中的去饱和酶和延伸酶转化效率

实验	菌株	重复	$\Delta 12$ CE	$\Delta 9$ CE	$\Delta 8$ CE	$\Delta 5$ CE	$\Delta 17$ CE
1	Y8406U::ScA1e1S-5	平均 3	93	70	92	92	90
		平均 3	94	81	93	91	89
		%对照	101	116	101	98	98
		平均 3	93	70	93	93	91
2	Y8406U::Y1A1e1	平均 3	96	85	94	91	90
		%对照	103	121	101	98	98
		1	93	72	93	96	89
		平均 2	96	85	96	92	89
3	Y8406U::Y1A1e1	%对照	104	119	103	96	100
		平均 2	94	83	95	91	88
		%对照	101	117	102	95	99
		平均 2	92	85	96	90	89
		%对照	100	119	103	94	100
		Y8406U::MaLPAAATIS					
4	Y8406U::MaLPAAATIS	平均 2	93	71	94	93	91
		平均 2	92	84	96	91	90
		%对照	99	118	102	99	100
		平均 2	93	82	96	92	92
		%对照	100	115	103	100	101
		平均 2	92	80	96	92	91
		%对照	99	113	102	99	100
		Y8406U::CeLPcCATS					

[0565] 基于表 26 和 27 中关于实验 1、2 和 3 的数据, LPLAT 在 EPA 菌株 Y8406U::ScA1e1S-5、Y8406U::ScA1e1S-11、Y8406U::Y1A1e1 和 Y8406U::MaLPAAATIS 中的过表达导致了以占 TFA 的重量%计的 LA(18:2) 浓度 [“LA% TFA”] 的显著降低 (达对照物的 67% 或更低)、以占 TFA 的重量%计的 EPA 浓度 [“EPA% TFA”] 的升高 (达对照物的至少 12%)、和 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率的升高 (达对照物的至少 16%)。与 Y8406U::ScA1e1S-5 和 Y8406U::ScA1e1S-11 相比, Y8406U::Y1A1e1 具有更低的 LA% TFA、更高的 EPA% TFA、更好的 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率、和略低的 TFA% DCW 和 EPA% DCW。除 MaLPAAATIS 的过表达导致了较低的 LA% TFA、EPA% TFA、和 EPA% DCW 外, Y8406U::Y1A1e1 和 Y8406U::MaLPAAATIS 是

相似的。

[0566] 实验 4 显示, LPLAT 在 EPA 菌株 Y8406U::Y1A1e1、Y8406U::MaLPAAT1S 和 Y8406U::CeLPCATS 中的过表达导致了 LA% TFA 的显著降低(达对照物的 67% 或更低)、EPA% TFA 的升高(达对照物的至少 9%)、和 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率的升高(达对照物的至少 13%)。与 Y8406U::CeLPCATS 相比, Y8406U::Y1LPAAT1 和 Y8406U::MaLPAAT1S 均具有更低的 LA% TFA、更高的 EPA% TFA、更高的 EPA% DCW、和略好的 TFA% DCW。除 MaLPAAT1S 的过表达导致了较低的 LA% TFA、略低的 EPA% TFA 和 EPA% DCW、以及略低的 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率外, Y8406U::Y1LPAAT1 和 Y8406U::MaLPAAT1S 是相似的。

[0567] 在本领域中众所周知, 大多数去饱和发生在磷脂的 sn-2 位上, 而脂肪酸延伸发生在酰基-辅酶 A 上。此外, 预期 ScA1e1S、Y1A1e1、MaLPAAT1S 和 Y1LPAAT1 仅使酰基基团从酰基-辅酶 A 库掺入溶血磷脂, 例如溶血磷脂酸 [“LPA”] 和溶血磷脂酰胆碱 [“LPC”] 的 sn-2 位。因此, 预期 ScA1e1S、Y1A1e1、MaLPAAT1S、和 Y1LPAAT1 的表达将由于提高的磷脂底物可用性而导致去饱和的提高, 而不导致需要辅酶 A 库中提高的底物可用性的延伸的提高。我们的数据(参见上文)显示, 意外地, ScA1e1S、Y1A1e1、MaLPAAT1S 和 Y1LPAAT1 的表达在生产 EPA 的耶氏酵母菌株中显著提高了 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率但并未提高(以 $\Delta 12$ 去饱和酶转化效率、 $\Delta 8$ 去饱和酶转化效率、 $\Delta 5$ 去饱和酶转化效率或 $\Delta 17$ 去饱和酶转化效率测量的)去饱和。

[0568] CeLPCAT 此前已被显示在饲喂 LA 或 GLA 的啤酒糖酵母中提高 $\Delta 6$ 延伸转化效率(国际申请公布 W0 2004/076617)。这归因于其使脂肪酸从磷脂释放至辅酶 A 库的可逆的 LPCAT 活性。在国际申请公布 W0 2004/076617 中, 并未预期在针对没有饲喂脂肪酸情况下的高水平 LC-PUFA 生产进行过基因工程改造的含油微生物如解脂耶氏酵母中, $\Delta 9$ 延伸转化效率的改善。

[0569] 此外, 在生产 EPA 的耶氏酵母菌株中, ScA1e1S、Y1A1e1、MaLPAAT1S、Y1LPAAT1 和 CeLPCATS 的表达没有显著改变所积累的 PUFA 水平或总脂质含量。

[0570] 在先的研究已显示, 由于在磷脂和酰基-辅酶 A 库之间酰基基团的转移不良, $\Delta 6$ 延伸和 $\Delta 9$ 延伸都是长链 PUFA 生物合成中的瓶颈。基于上文所展示的 LPCAT 的过表达造成的 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率的提高, 预期本文所述的 LPCAT 和它们的直系同源物如 ScLPAAT, 将同样提高 $\Delta 6$ 延伸转化效率。

[0571] 实施例 10

[0572] 包含 LPAAT 开放阅读框和自主复制序列的表达载体的构建

[0573] 本实施例描述了适用于在解脂耶氏酵母中没有整合的 LPAAT 基因表达的、包含自主复制序列 [“ARS”] 和 LPAAT 开放阅读框的载体的构建。开放阅读框包括编码 SEQ ID NO:32 的啤酒糖酵母 LPAAT 和编码 SEQ ID NO:31 的解脂耶氏酵母 LPAAT1。实施例 11 描述了将这些载体转入解脂耶氏酵母之后获得的结果。

[0574] 包含经密码子优化的啤酒糖酵母 LPAAT 基因的 pY222 的构建

[0575] 通过 DNA 2.0 (Menlo Park, CA), 对被命名为“ScLPAAT”的啤酒糖酵母开放阅读框 (SEQ ID NO:32), 就在解脂耶氏酵母中的表达进行了优化。除密码子优化外, 还将 5' PciI 和 3' NotI 克隆位点引入了该嵌合基因中 (即, ScLPAATS; SEQ ID NO:151)。在 ScLPAATS 基因中的修改均未改变所编码的蛋白质的氨基酸序列 (即, 经密码子优化的基因所编码的

蛋白质序列 [即, SEQ ID NO :152] 与野生型蛋白质序列 [即, SEQ ID NO :32] 是相同的)。ScLPAATS 被克隆进 pJ201 (DNA 2.0), 得到 pJ201:ScLPAATS。

[0576] 包含 ScLPAATS 的 926bp 的 PciI/NotI 片段被从 pJ201:ScLPAATS 上切下, 并被克隆进 NcoI-NotI 切割的 pYAT-DG2-1 中, 以构建 pY222 (SEQ ID NO :153 ; 表 28 ; 图 14A)。因此, 构建体 pY222 包含下列组分 :

[0577] 表 28 : 对质粒 pY222 (SEQ ID NO :153) 的描述

[0578]

SEQ ID NO:153 中的限制酶 (RE) 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
<i>SalI/SwaI</i> (1-2032)	YAT1::ScLPAATS::Lip1, 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (美国专利申请公布 2006/0094102-A1); • ScLPAATS: 经密码子优化的 ScLPAATS (SEQ ID NO:151) (图中标记为 “Sc LPAAT ORF”); • Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因的 <i>Lip1</i> 终止子序列 (GenBank 登录号 Z50020); 图中标记为 “Lip1-3”)
<i>SwaI/AvaI</i> (2032-4946)	• <i>ColE1</i> 质粒复制起点 • 用于在大肠杆菌中选择的氨苄青霉素抗性基因 (Amp^R) • 大肠杆菌 f1 复制起点
<i>AvaI-SphI</i> (4946-6330)	解脂耶氏酵母着丝粒和自主复制序列 [“ARS”] 18 基因座
<i>SphI-SalI</i> (6330-1)	解脂耶氏酵母 URA3 基因 (GenBank 登录号 AJ306421)

[0579] 包含解脂耶氏酵母 LPAAT1 基因的 pY177 的构建

[0580] 使用引物 869 (SEQ ID NO :154) 和引物 870 (SEQ ID NO :155), 以质粒 pYAT-DG2-1 作为模板, 通过标准 PCR 扩增了解脂耶氏酵母着丝粒和自主复制序列 [“ARS”]。用 AscI/AvrII 消化了 PCR 产物, 并克隆进 AscI-AvrII 消化过的 pY207 (SEQ ID NO :149 ; 实施例 8) 中, 以构建 pY177 (SEQ ID NO :156 ; 表 29 ; 图 14B)。因此, 除 AscI 和 AvrII 之间 373bp 的 pY207 序列被包含 ARS 的 1341bp 序列替换之外, pY177 中存在组分与 pY207 (图 12A) 中的那些是相同的。更具体地讲, pY177 包含下列组分 :

[0581] 表 29 : 对质粒 pY177 (SEQ ID NO :156) 的描述

[0582]

SEQ ID NO:156 中的限制酶 (RE) 位点和核苷酸	片段和嵌合基因组分的描述
<i>BsiWI/SbfI</i> (1-1706 bp)	LoxP::Ura3::LoxP 包含: • LoxP 序列 (SEQ ID NO:140) • 解脂耶氏酵母 Ura3 基因 (GenBank 登录号 AJ306421) • LoxP 序列 (SEQ ID NO:140)

[0583]

<i>SbfI/SphI</i> (1706-3043 bp)	解脂耶氏酵母 POX3 酰基-辅酶 A 氧化酶 3 的 3' 部分(GenBank 登录号 YALI0D24750g)
<i>SphI/AscI</i> (3043-5743 bp)	• <i>ColE1</i> 质粒复制起点 • 用于在大肠杆菌中选择的氨苄青霉素抗性基因 (Amp^R) • 大肠杆菌 f1 复制起点
<i>AscI/BsiWI</i> (5743-6513 bp)	解脂耶氏酵母 POX3 酰基-辅酶 A 氧化酶 3 的 5' 部分(GenBank 登录号 YALI0D24750g)
<i>AscI/AvrII</i> (5743-7084 bp)	解脂耶氏酵母着丝粒和自主复制序列[“ARS”] 18 基因座
<i>AvrII/BsiWI</i> (7084-7481 bp)	解脂耶氏酵母 POX3 酰基-辅酶 A 氧化酶 3 的 5' 部分(GenBank 登录号 YALI0D24750g)
<i>BsiWI/BsiWI</i> (7481-1 bp)	YAT1::YILPAAT1::Lip1, 包含: • YAT1: 解脂耶氏酵母 YAT1 启动子 (美国专利申请公布 2006/0094102-A1); • YILPAAT1: 解脂耶氏酵母 LPAAT1 (“YALI0E18964g”; GenBank 登录号 XP_504127) (SEQ ID NO:30) (图中标记为 “YILPAT1 ORF”); • Lip1: 来自耶氏酵母 Lip1 基因的 <i>Lip1</i> 终止子序列(GenBank 登录号 Z50020); 图中标记为 “Lip1-3”)

[0584] 实施例 11

[0585] 不同的 LPAAT 在生产 EPA 的解脂耶氏酵母菌株 Y8406 中的功能表征

[0586] 生产 EPA 的解脂耶氏酵母菌株 Y8406U 被用于从功能上表征在自主复制质粒上的没有整合的啤酒糖酵母 LPAATS (SEQ ID NO:151) 和解脂耶氏酵母 LPAAT1 (SEQ ID NO:30) 的表达的效应。这与包含其天然的 LPAAT 的宿主构成了比较。

[0587] 转化和生长

[0588] 用来自实施例 10 的未切割的质粒分别地转化了解脂耶氏酵母菌株 Y8406U (实施例 9)。具体而言,按照“一般方法”转化了载体 pY177 (YAT1::YILPAAT1::Lip1) [SEQ ID NO:156] 和 pY222 (YAT1::ScLPAATS::Lip1) [SEQ ID NO:153]。

[0589] 每种转化混合物被铺在 MM 琼脂平板上。挑取了若干个所得到的 URA⁺ 转化体,并接种至 3mL CSM-U 培养基 (Teknova 目录号 C8140, Teknova Inc., Hollister, CA) 中,其中 CSM-U 培养基是指含有葡萄糖减去尿嘧啶的 CM 肉汤,包含 0.13% 氨基酸省却成分粉末尿嘧啶,0.17% 酵母氮源,0.5% (NH₄)₂SO₄ 和 2.0% 葡萄糖。在摇动器上以 200rpm 和 30℃ 生长 2 天后,通过离心收集培养物,并重悬于 3mL HGM 培养基 (目录号 2G2080, Teknova Inc.) 中。在摇动器上生长 5 天后,收集上述培养物的 1mL 等分试样并通过 GC 进行分析,如实施例 9 中所述。

[0590] 基于所述 3mL 培养物的脂肪酸组成,通过烧瓶检测法进一步表征了经过选择的转化体。具体而言,选择了用表达载体 pY222 (包含 ScLPAATS) 转化的菌株 Y8406U 的克隆 #5 和 #6,并分别命名为 “Y8406U::ScLPAATS-5” 和 “Y8406U::ScLPAATS-6”;选择了用表达载体 pY177 (包含 YILPAAT1) 转化的菌株 Y8406U 的克隆 #1,并命名为 “Y8406U::YILPAAT1”。

[0591] 此外,菌株 Y8406 (作为菌株 Y8406U (Ura⁻) 的亲本的 Ura⁺ 菌株) 被用作对照物。

[0592] 每种经过选择的转化体和对照物被划线至 MM 琼脂平板上。然后,一个接种环的新

鲜划线的细胞被接种至 3mL CSM-U 培养基,并于 30℃以 250rpm 培养过夜。测量 OD_{600nm},在 125mL 烧瓶中,加入一个等分试样的细胞,使得 25mL CSM-U 培养基中最终的 OD_{600nm}为 0.3。在 30℃振荡培养箱中以 250rpm 培养 2 天后,通过离心收集 6mL 培养物,并在 125mL 烧瓶中重悬于 25mL HGM 中。30℃振荡培养箱中以 250rpm 培养 5 天后,使用 1mL 等分试样进行 GC 分析(参见上文),并且干燥 10mL 用于干细胞重量[“DCW”]测定,如实施例 9 中所述。

[0593] 脂质含量、脂肪酸组成和转化效率

[0594] 对于 Y8406 对照菌株和 Y8406U 转化体菌株的 2 个重复的培养物[“重复样品”],对脂质含量、脂肪酸组成和 EPA 占 DCW 的百分比进行了定量。此外,每种 Y8406U 转化体的数据还被显示为占 Y8406 对照物的百分比。下面的表 30 总结了细胞的总脂质含量[“TFA% DCW”]、以占 TFA 的重量%[“% TFA”]表示的每种脂肪酸的浓度和以占干细胞重量的百分比表示的 EPA 含量[“EPA% DCW”]。更具体地讲,脂肪酸被鉴定为 16:0(棕榈酸)、16:1(棕榈油酸)、18:0(硬脂酸)、18:1(油酸)、18:2(LA)、ALA、EDA、DGLA、ARA、ETrA、ETA 和 EPA。

[0595] 表 31 以与实施例 9 中所述的相同的方式总结了在 PUFA 生物合成途径中起作用并且为 EPA 的生产所需的每种去饱和酶和 $\Delta 9$ 延伸酶的转化效率。

[0596]

表 30: 解脂耶氏酵母 Y8406 的 ScLPAATS 和 YILPAAT1 转化体菌株中的脂质含量和组成

菌株	重复	TFA % DCW	%TFA												EPA % DCW
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	ERA	ETA	EPA	
Y8406	平均 2	22.0	2	0	2	4	19	2	3	4	1	2	3	55	12
	平均 2	24.6	2	1	2	6	14	1	3	5	1	2	3	55	14
Y8406U:: YILPAAT1	%对照	112	98	153	102	148	76	50	120	144	101	109	123	101	113
	平均 2	21.6	3	1	3	6	14	1	3	4	1	2	3	57	12
ScLPAATS-5	%对照	98	131	137	125	131	74	56	100	117	86	101	108	104	102
	平均 2	21.4	3	1	3	5	14	1	3	4	1	2	3	58	12
Y8406U:: ScLPAATS-6	%对照	97	125	133	121	124	72	52	97	119	88	102	111	106	103
	平均 2	21.4	3	1	3	5	14	1	3	4	1	2	3	58	12

表 31: 解脂耶氏酵母 Y8406 的 ScLPAATS 和 YILPAAT1 转化体菌株中的去饱和酶和延伸酶转化效率

菌株	重复	$\Delta 12$ CE	$\Delta 9$ CE	$\Delta 8$ CE	$\Delta 5$ CE	$\Delta 17$ CE
Y8406	平均 2	95	77	92	90	92
	平均 2	93	82	92	87	90
Y8406U::YILPAAT1	%对照	98	107	99	97	98
	平均 2	94	83	93	89	92
Y8406U::ScLPAATS-5	%对照	98	108	100	99	100
	平均 2	94	83	93	89	92
Y8406U::ScLPAATS-6	%对照	99	109	101	99	100
	平均 2	94	83	93	89	92

[0597] 基于以上表 30 和表 31 中的数据, ScLPAATS 和 YILPAAT1 在生产 EPA 的菌株 Y8406U::YILPAAT1、Y8406U::ScLPAATS-5 和 Y8406U::ScLPAATS-6 中的表达均导致了按 TFA

的重量%计的 LA(18:2) 浓度 [“LA% TFA”] 的降低 (达对照物的 76% 或更低) 和 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率的升高 (达对照物的至少 7%)。ScLPAATS 和 Y1LPAAT1 对脂质谱具有相似的影响。

[0598] 然后,将以上获得的结果与实施例 9 中获得的那些进行了比较,尽管采用了不同的方式来表征 LPLAT。具体而言,在实施例 9 中,由于载体缺少 ARS 序列,携带 LPLAT 的线性化的 DNA 通过染色体整合被转化。这导致了稳定的整合,并且在预培养和被转至 HGM 之前的 2 天的生长中,菌株均生长于相对丰富的、非选择性的 FM 生长培养基中。

[0599] 在实施例 11 中,从功能上对 Y1LPAAT1 和 ScLPAATS 的表征在自我复制的质粒上进行。因此,用携带每种 LPAAT 和 ARS 序列的环状 DNA 转化解脂耶氏酵母菌株 Y8406。为了维持这些质粒并检测未整合的基因的表达,在预培养和被转至 HGM 之前的 2 天的生长中,必须使转化体在选择培养基 (即,CSM-U 培养基) 上生长。

[0600] 以上所述的这些差异能够促成脂质谱和含量的差异,如实施例 9 和 11 中通过 Y1LPAAT1 的表达所显示的。在实施例 9 中,基于 Y1LPAAT 的表达,LA% TFA、EPA% TFA 和 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率相对于对照物的变化分别为 63%、115% 和 115%,而在实施例 11 中,基于 Y1LPAAT 的表达,LA% TFA、EPA% TFA 和 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率相对于对照物的变化分别为 76%、101% 和 107%。因此,与实施例 9 中所观察到的相比,实施例 11 中 $\Delta 9$ 延伸和 LC-PUFA 生物合成的改善是最小化的。这些差异可以归因于染色体整合的“位置效应”和/或不同的生长条件。

[0601] 由于就在自主复制质粒上被转入解脂耶氏酵母菌株 Y8406 的 ScLPAATS 和 Y1LPAAT 而言,LC-PUFA 生物合成的改善 (测量为 LA% TFA 的降低、EPA% TFA 的升高和 $\Delta 9$ 延伸酶转化效率的升高) 是相似的,预期这两种 LPLAAT 在稳定整合进宿主染色体时将同样发挥相似的功能。因此,ScLPAATS 将很可能以与 Y1LPAAT1 被稳定整合进宿主染色体的实施例 9 中所观察到的相似的方式改善脂质谱。

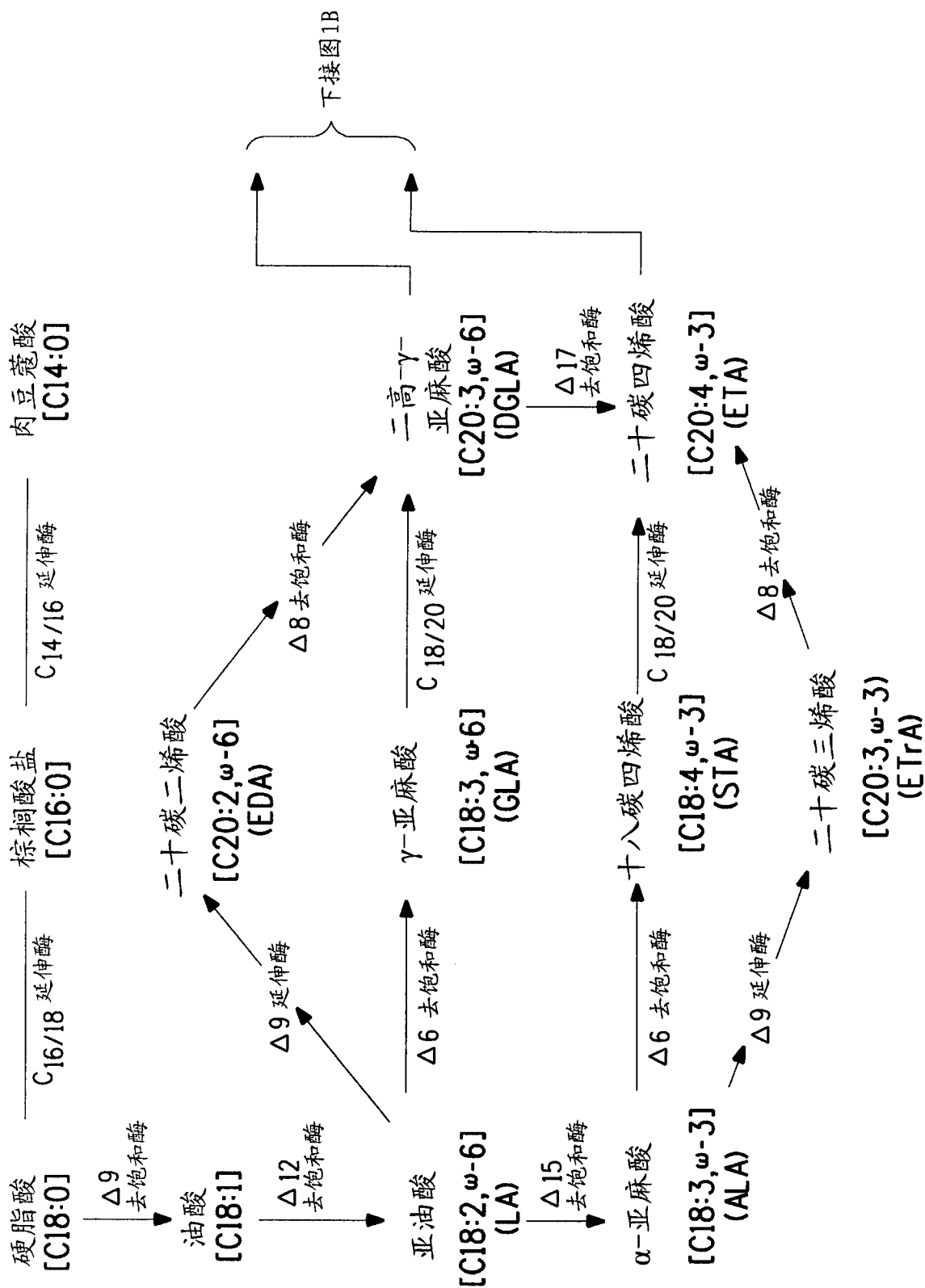


图 1A

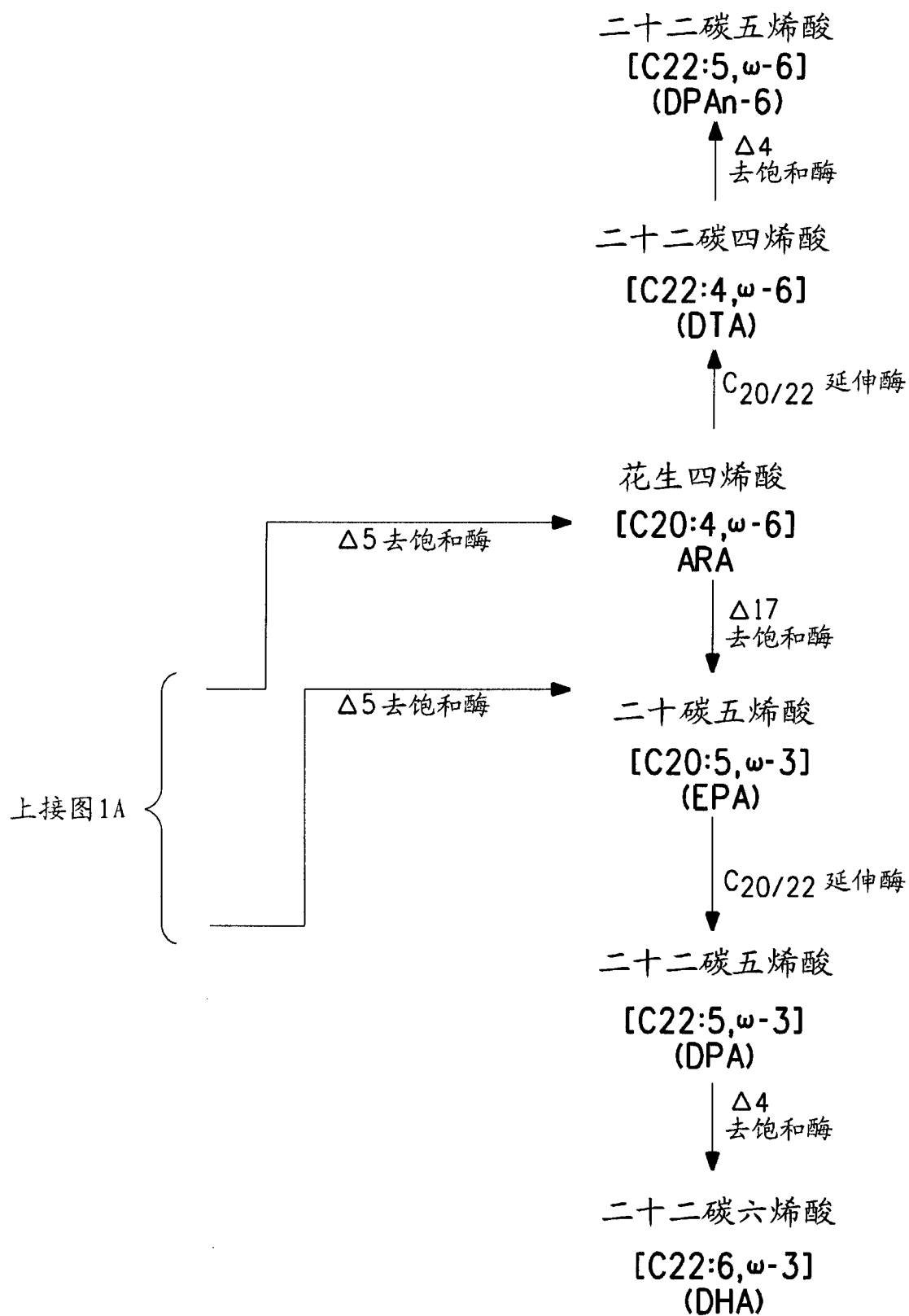


图 1B

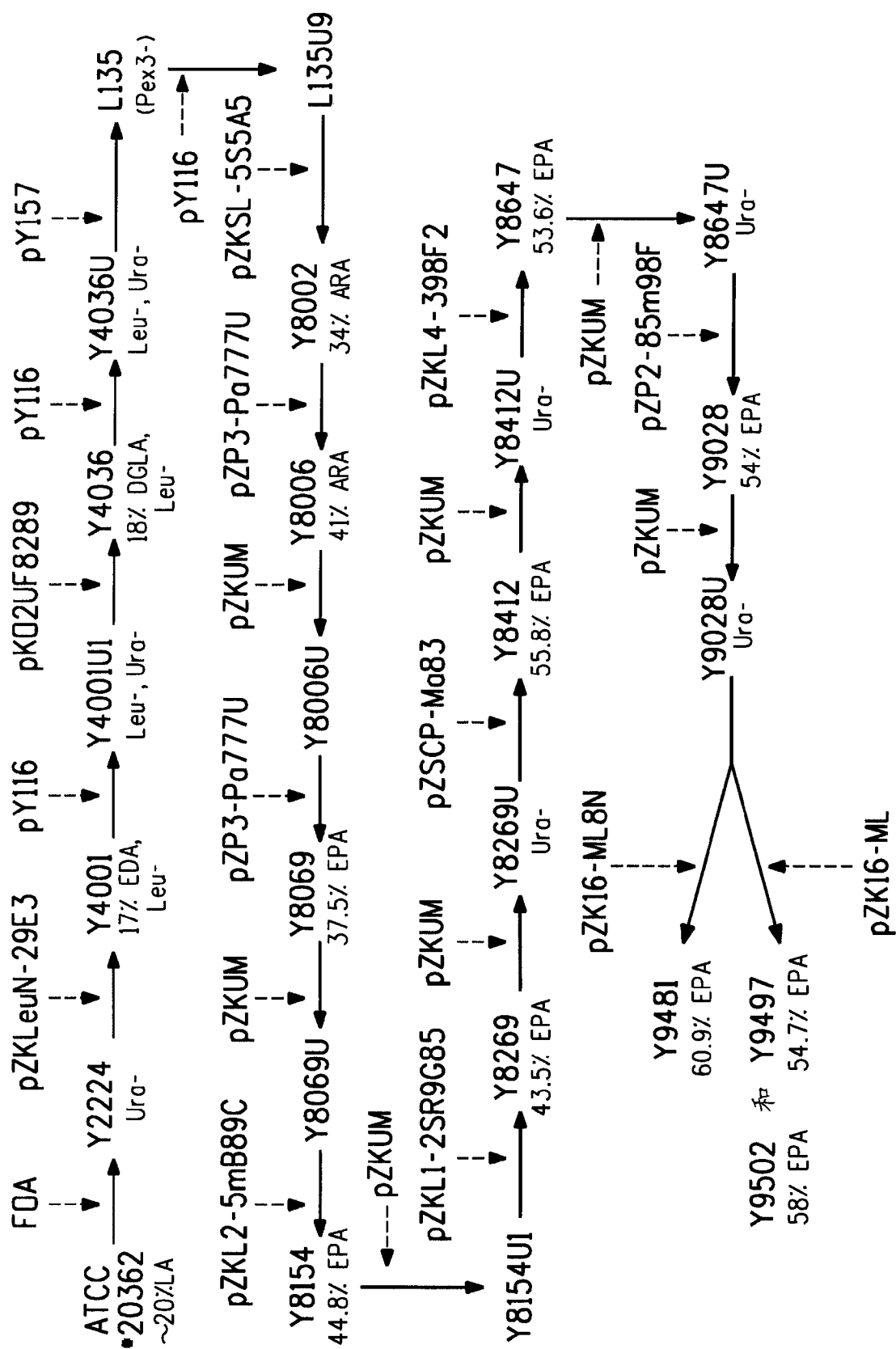


图 2

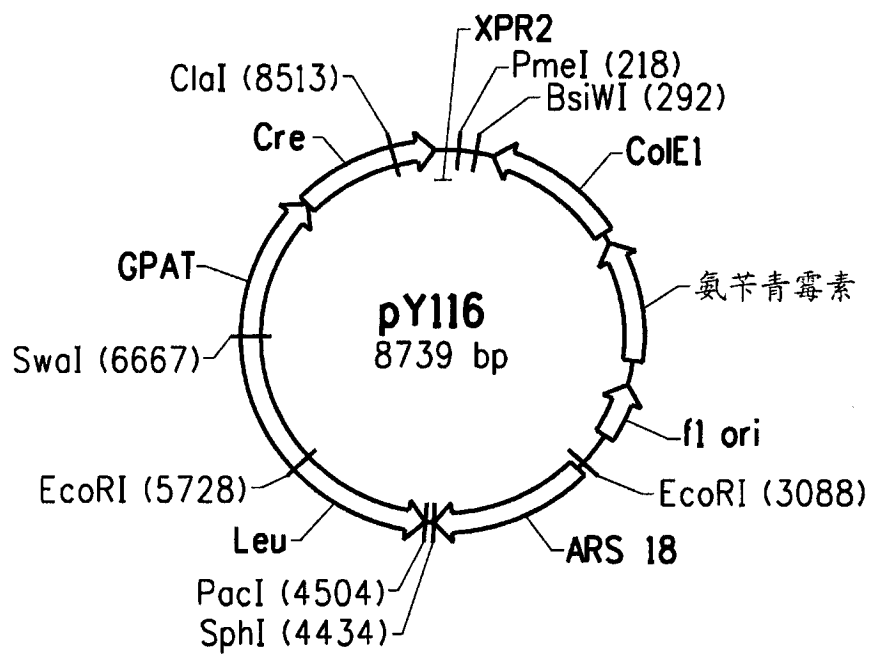


图 3

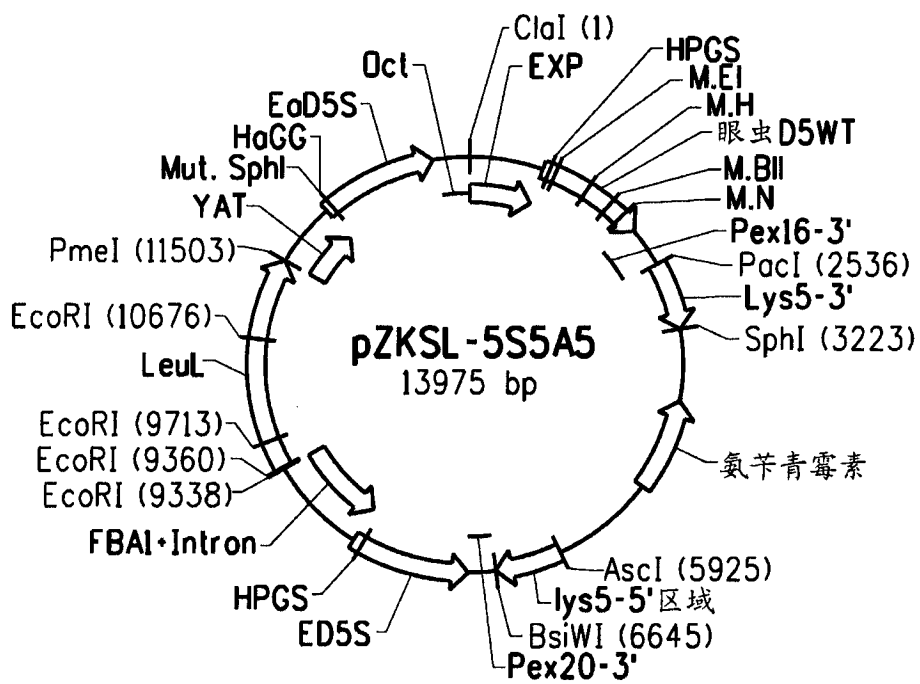


图 4A

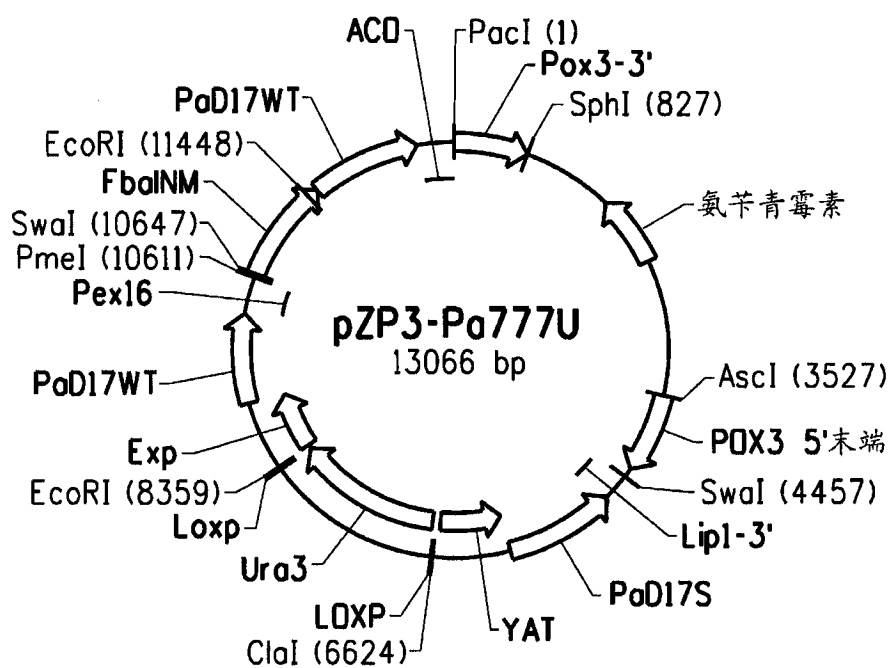


图 4B

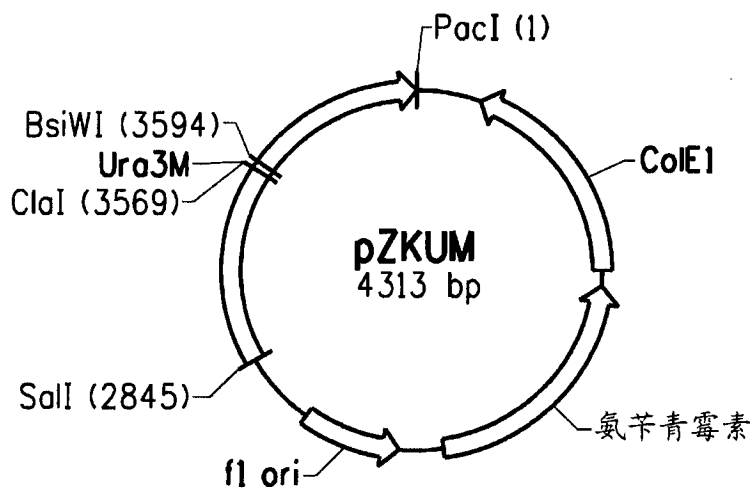


图 5A

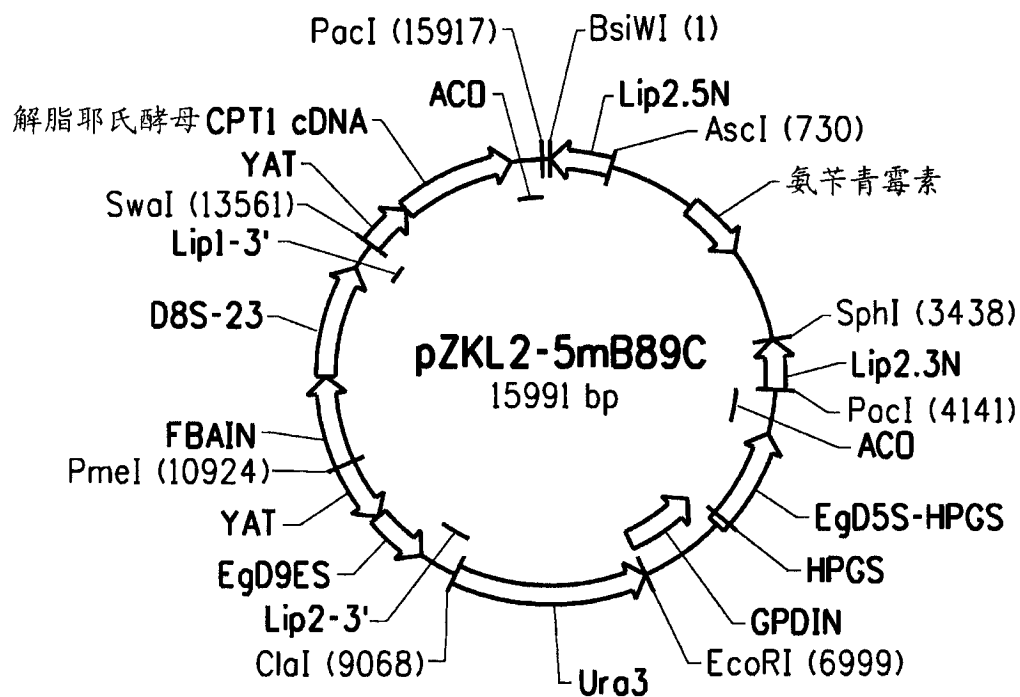


图 5B

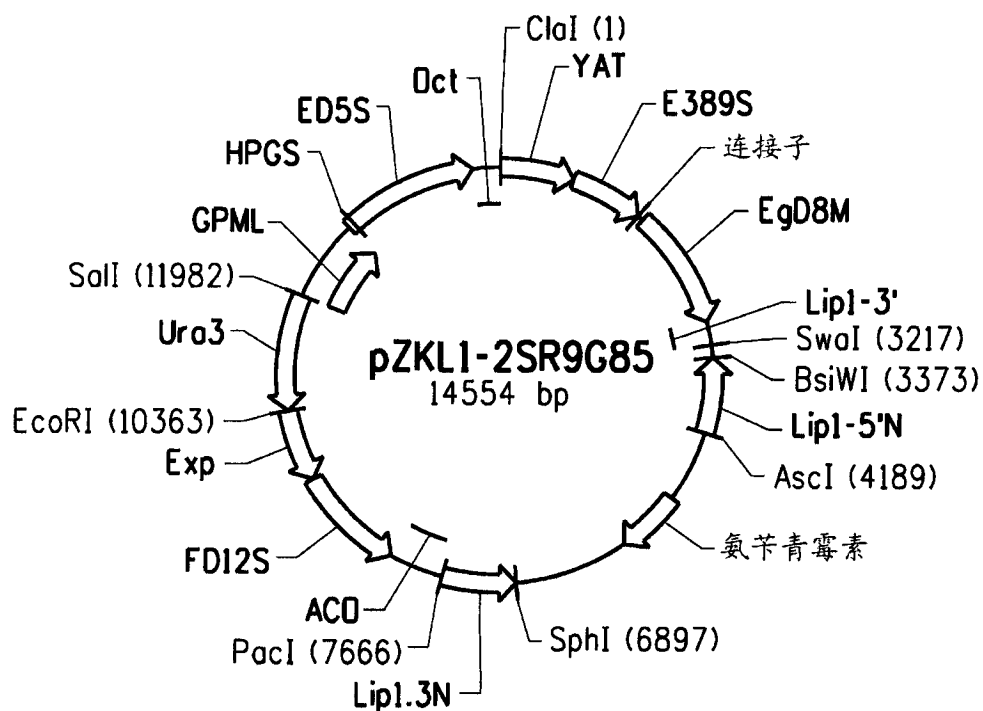


图 6A

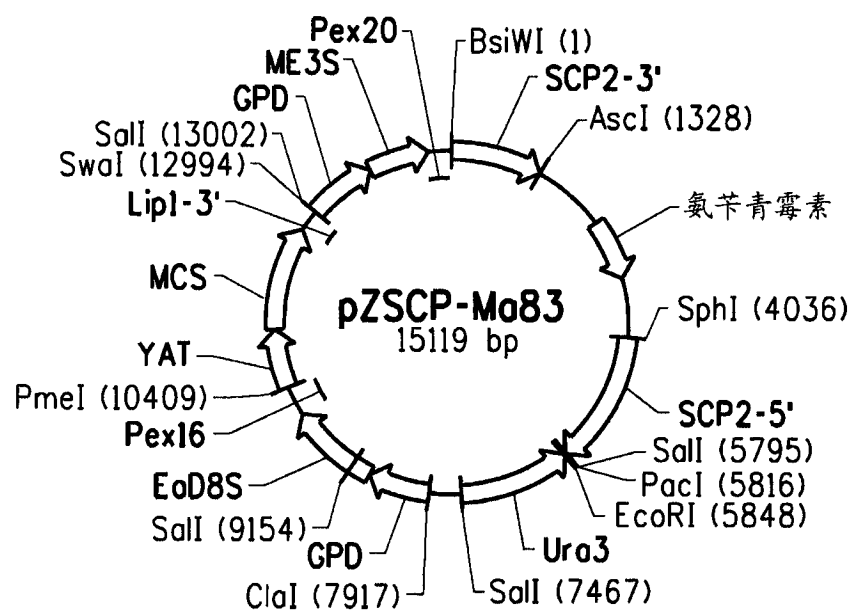


图 6B

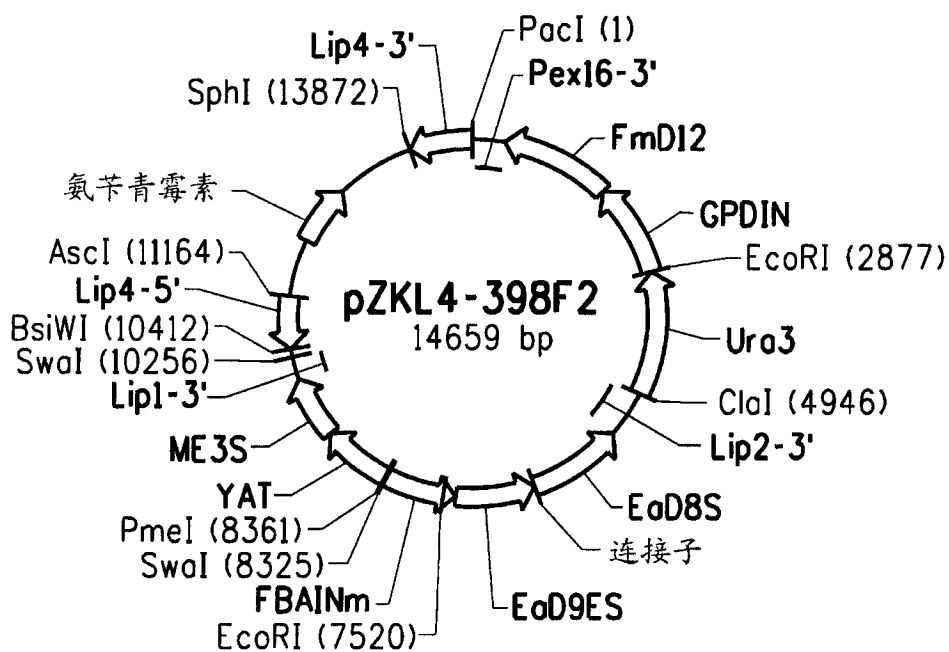


图 7A

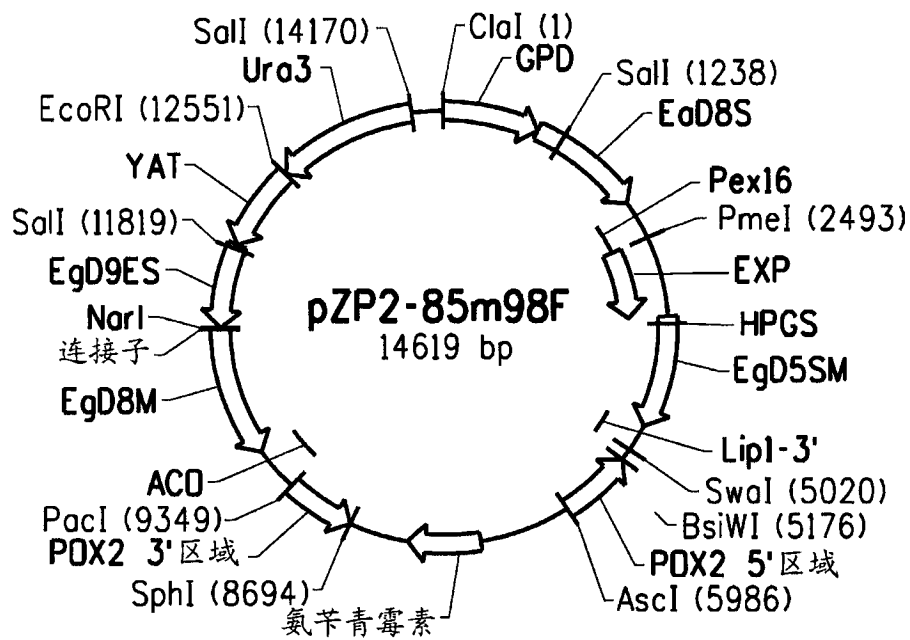


图 7B

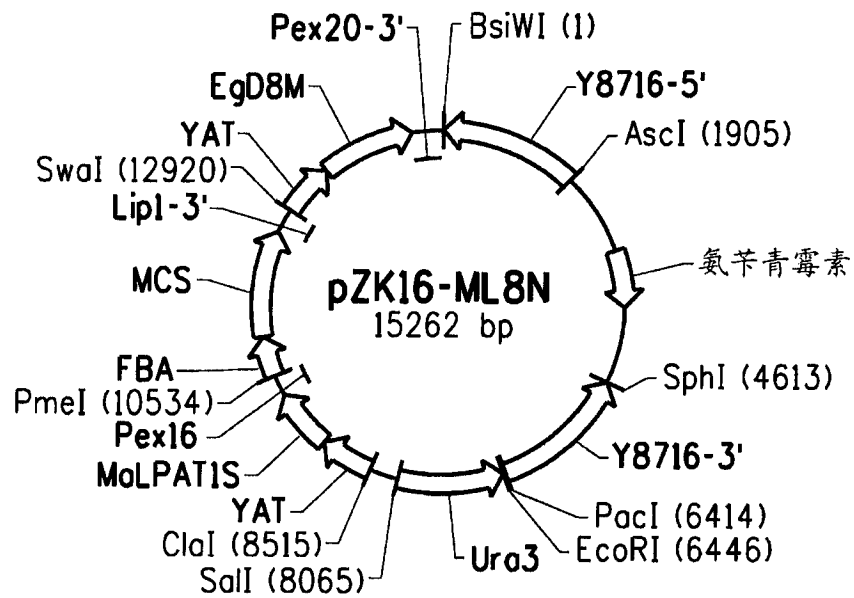


图 8A

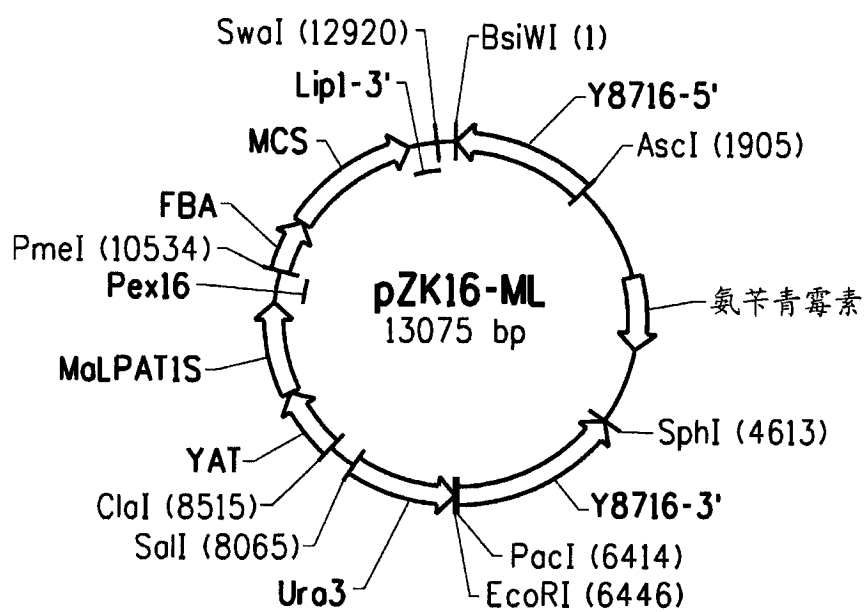


图 8B

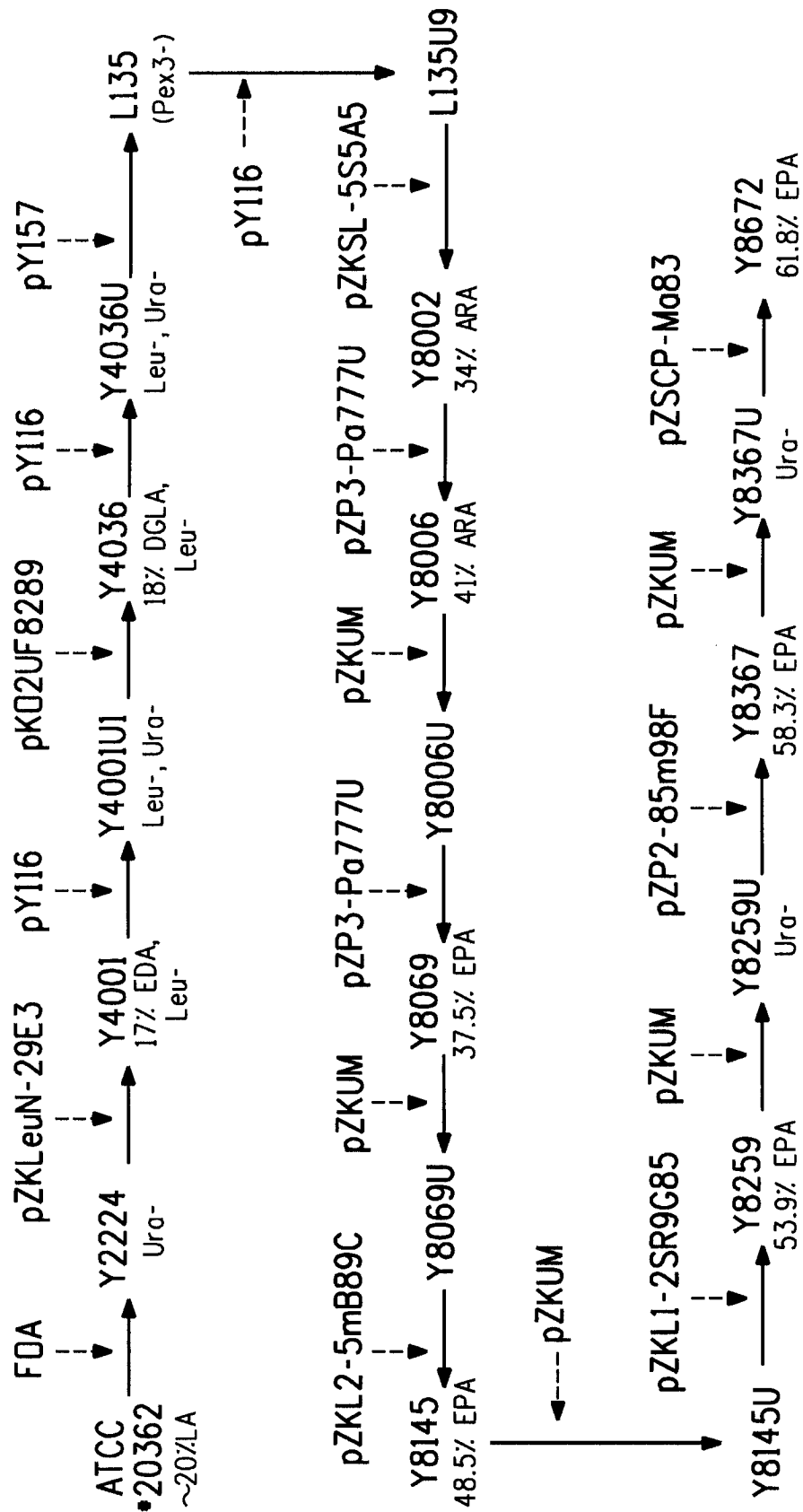


图 9

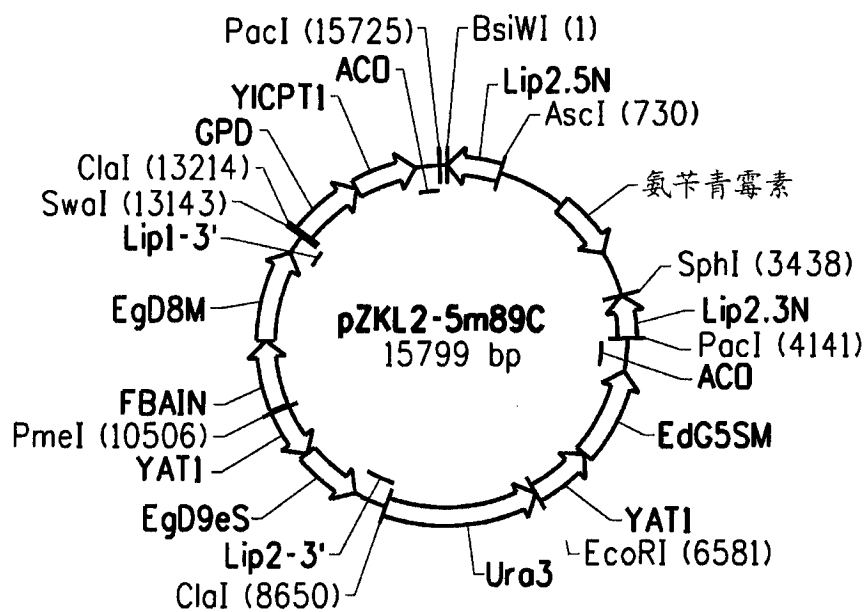


图 10A

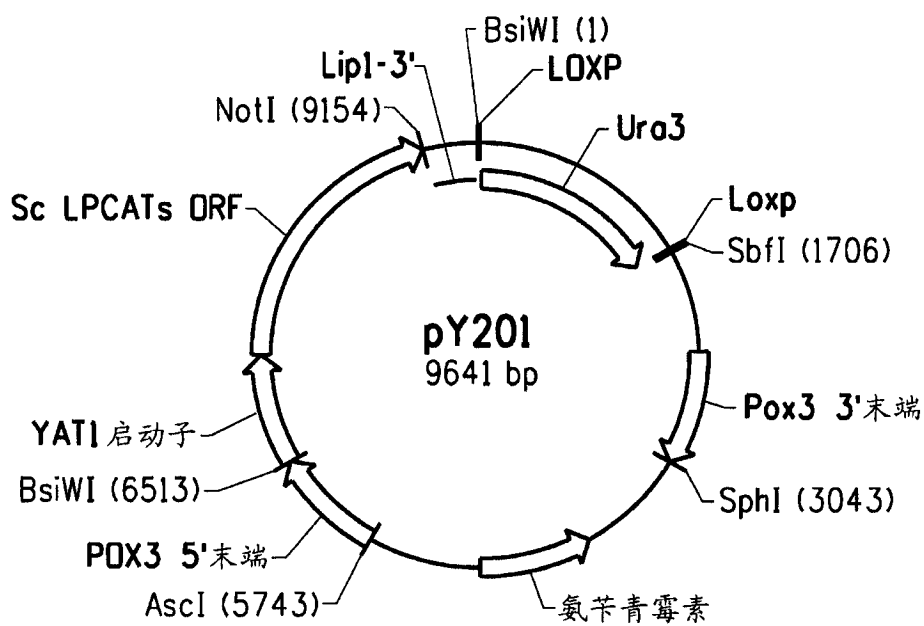


图 10B

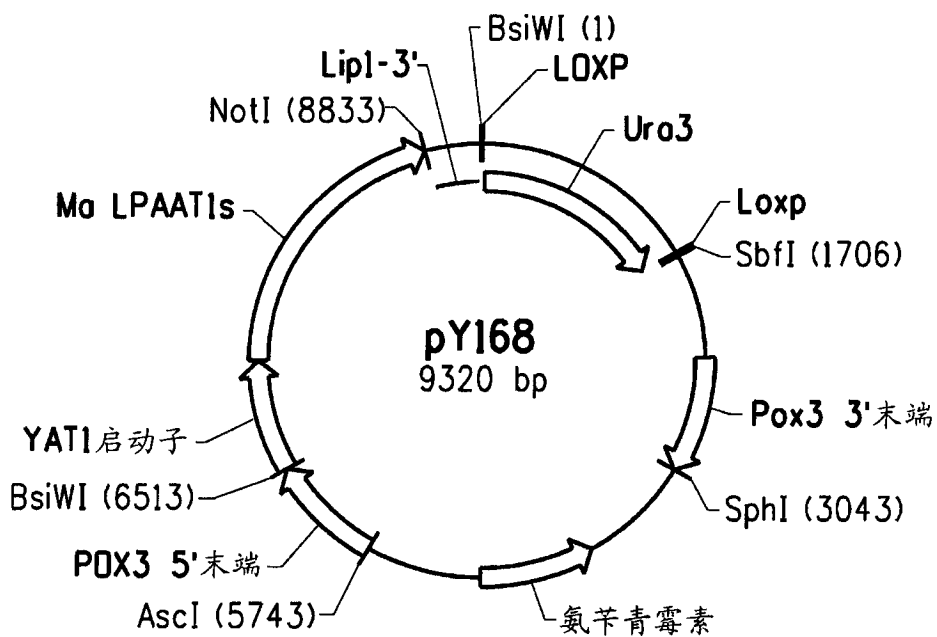


图 11A

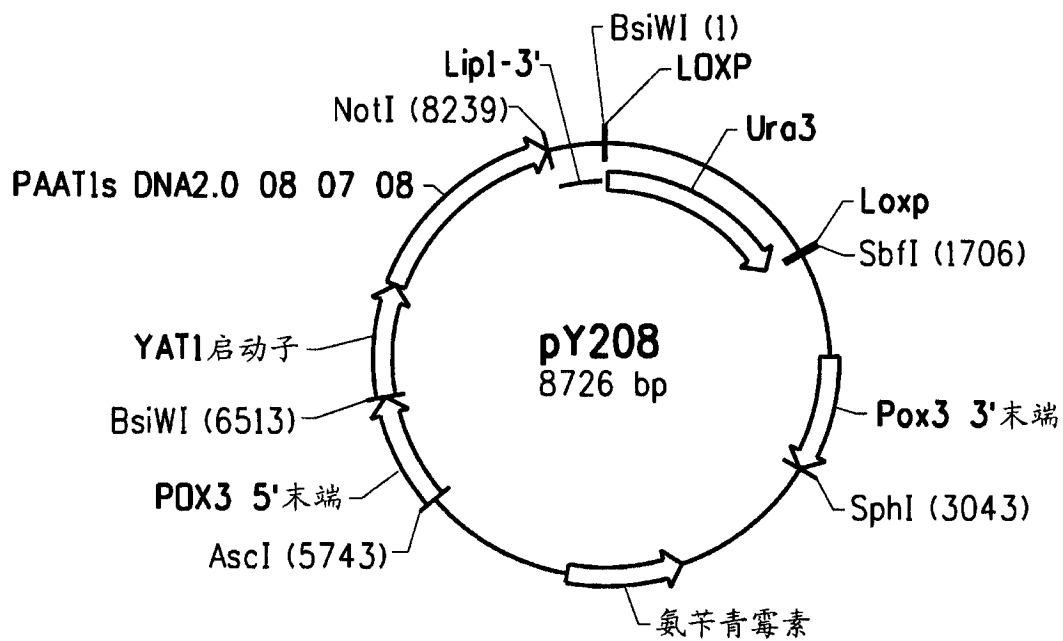


图 11B

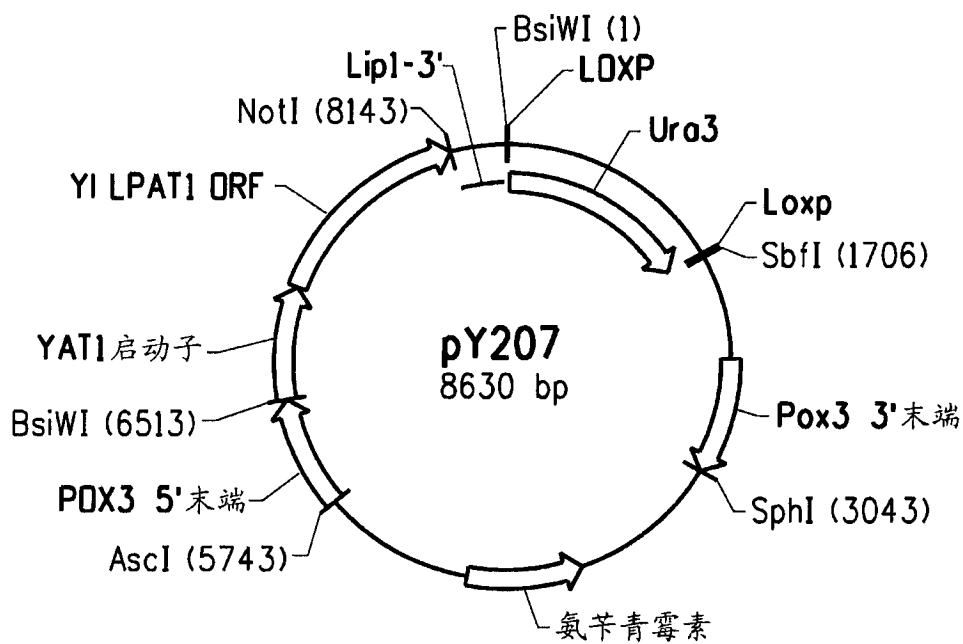


图 12A

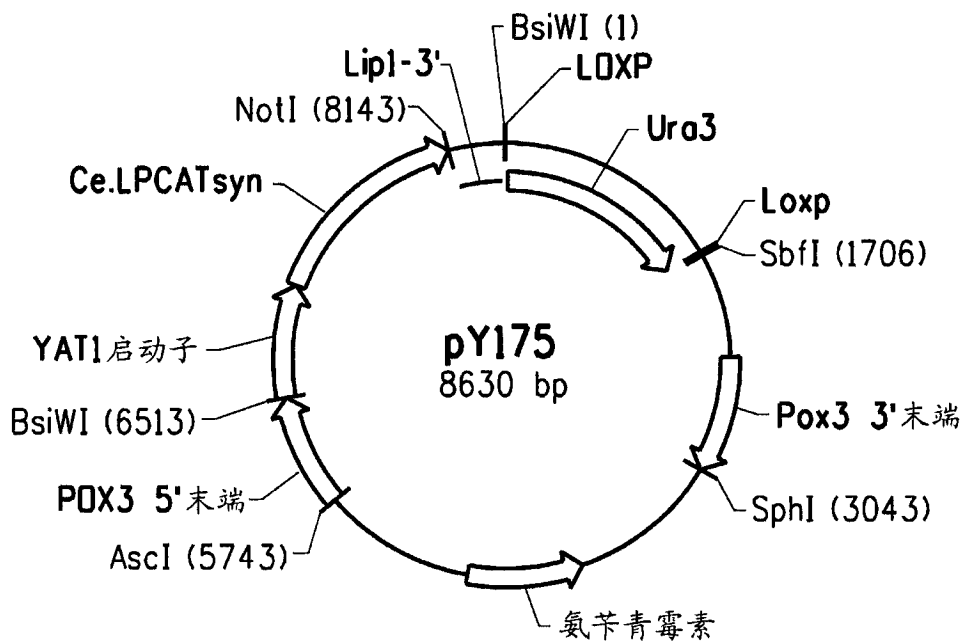


图 12B

菌株	LA % TFAs	EPA % TFAs	EPA/LA 比率
Y9481	11.00	60.90	5.54
Y9486	11.90	60.30	5.07
Y9497	11.30	58.70	5.19
Y9502	12.70	57.00	4.49
Y9504	11.30	59.90	5.30
Y9508	13.10	58.70	4.48
Y9510	11.70	58.90	5.03
Y8143	18.10	50.30	2.78
Y8144	18.00	50.60	2.81
Y8145	18.60	48.50	2.61
Y8146	18.70	48.30	2.58
Y8256	18.80	49.90	2.65
Y8259	16.90	53.90	3.19
Y8367	14.20	58.30	4.11
Y8368	17.90	52.50	2.93
Y8369	15.60	55.80	3.58
Y8370	15.70	56.40	3.59
Y8666	15.10	62.20	4.12
Y8669	15.70	61.50	3.92
Y8670	17.00	60.90	3.58
Y8672	16.10	61.80	3.84

菌株	LA % TFAs	EPA % TFAs	EPA/ LA 比率
Y8404	20.40	51.10	2.50
Y8405	20.50	51.40	2.51
Y8406	20.30	51.20	2.52
Y8407	20.50	51.50	2.51
Y8408	20.20	51.20	2.53
Y8409	20.60	51.00	2.48
Y8410	20.50	50.90	2.48
Y8411	19.90	52.90	2.66
Y8412	19.00	55.80	2.94
Y8413	19.90	52.40	2.63
Y8414	19.90	49.40	2.48
Y8415	16.00	59.00	3.69
Y8647	20.30	53.60	2.64
Y8648	18.60	56.70	3.05
Y8649	18.80	55.80	2.97
Y8650	18.80	56.10	2.98
Y9028	19.80	54.50	2.75
Y9029	19.80	53.80	2.72
Y9031	20.10	52.30	2.60
Y9477	10.00	61.40	6.14

图 13

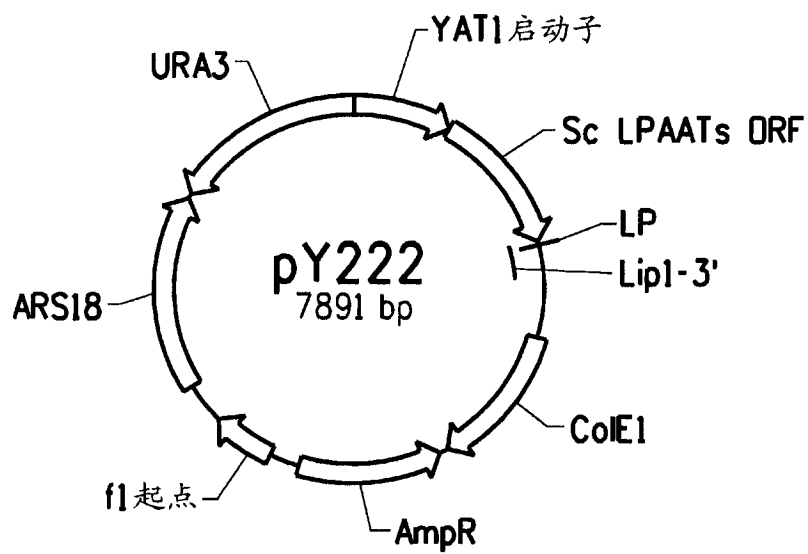


图 14A

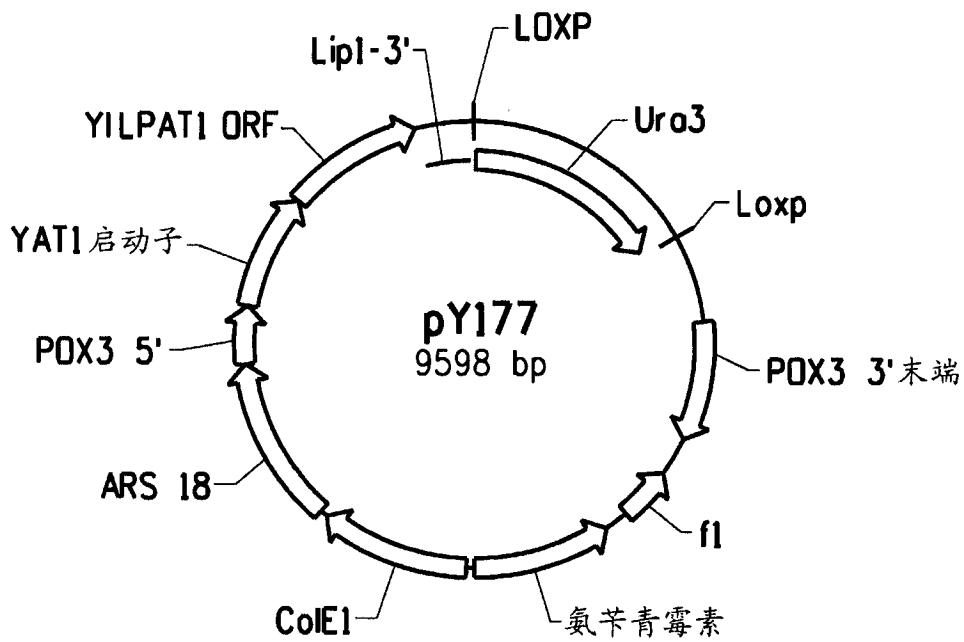


图 14B