

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/54



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/82 C12N 9/10

C12N 5/10 C07K 16/40

C07C 57/02 C12P 7/64

C12Q 1/68 A01H 5/00

[21] 申请号 02807345.2

[43] 公开日 2004 年 10 月 13 日

[11] 公开号 CN 1537166A

[22] 申请日 2002.3.26 [21] 申请号 02807345.2

[30] 优先权

[32] 2001.3.26 [33] GB [31] 0107510.0

[86] 国际申请 PCT/EP2002/003418 2002.3.26

[87] 国际公布 WO2002/077213 英 2002.10.3

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.26

[71] 申请人 布里斯托尔大学

地址 英国布里斯托尔

[72] 发明人 J·A·内皮尔 C·M·拉扎勒斯

B·齐 J·莱尔希尔

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 3 页 说明书 71 页 序列表 4 页
附图 6 页

[54] 发明名称 新延长酶基因以及 $\Delta 9$ -多不饱和脂肪酸的生产

[57] 摘要

本发明涉及具有 SEQ ID NO: 1 序列或其衍生序列的新延长酶基因, 涉及包含该序列或其衍生物的基因构建体并涉及其应用。本发明的核酸序列编码的多肽可将 α -亚麻酸($C_{18:3 \Delta 9, 12, 15}$) 延长至少两个碳原子而不延长 γ -亚麻酸($C_{18:3 \Delta 6, 9, 12}$)。本发明还涉及包含具有 SEQ ID NO: 1 序列或其衍生序列的延长酶基因的载体或生物体。本发明进一步涉及用于生产多不饱和脂肪酸(=PUFA)的方法, 所述生产应用包含延长酶基因的生物体进行, 该生物体能产生大量的油类且特别是产生具有高不饱和脂肪酸含量的油类。此外, 本发明涉及油类和/或脂肪酸组合物, 所述油类和/或脂肪酸组合物具有较高含量的带至少两个双键的多不饱和 C_{20} 或 C_{22} 脂肪酸, 和/或涉及具有较高含量的所述多不饱和脂肪酸的三酰基甘油组合物。

1. 源自植物的分离的核酸，其编码的多肽可将 α -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}9, 12, 15}$)延长至少两个碳原子，但不延长 γ -亚麻酸 ($C_{18:3 \text{ d}6, 9, 12}$)。

2. 分离的核酸，其包含编码可将 α -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}9, 12, 15}$) 延长至少两个碳原子而不延长 γ -亚麻酸 ($C_{18:3 \text{ d}6, 9, 12}$) 的多肽的核苷酸序列，所述核酸选自：

a) SEQ ID NO:1所示核酸序列，

b) 编码SEQ ID NO:2所示多肽的核酸序列，

c) SEQ ID NO:1所示序列的衍生物，该衍生物编码的多肽与编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的序列具有至少50%同源性且其序列行使延长酶的功能。

3. 权利要求2的分离核酸序列，其中该序列源自植物。

4. 权利要求2或3的分离核酸序列，其中该序列源自等鞭金藻属。

5. 权利要求1或2的分离核酸序列，其中该序列编码的多肽可延长 Δ 9-脂肪酸。

6. 由权利要求2到4之任一项的分离核酸编码的氨基酸序列。

7. 基因构建体，其包含权利要求 1到4之任一项的具有SEQ ID NO:1序列的分离核酸，其中该核酸功能性地连接一个或多个调控信号。

8. 权利要求7的基因构建体，其还包含额外的脂肪酸生物合成基因。

9. 权利要求7或8的基因构建体，其中所述额外的脂肪酸生物合成基因选自 Δ 19-、 Δ 17-、 Δ 15-、 Δ 12-、 Δ 9-、 Δ 8-、 Δ 6-、 Δ 5-、 Δ 4-去饱和酶，羟化酶，延长酶， Δ 12-acetylenase，酰基-ACP-硫酯酶， β -酮酰基-ACP-合酶或 β -酮酰基-ACP-还原酶。

10. 载体,其包含权利要求1或2的核酸或权利要求7到9任一项的基因构建体。

11. 生物体,其包含至少一种权利要求1或2的核酸、权利要求7到9之任何一项的基因构建体或权利要求10的载体。

12. 权利要求11的生物体,其中该生物体为微生物、动物或植物。

13. 权利要求11或12的生物体,其中该生物体为转基因植物。

14. 生产PUFA的方法,该方法包括在使生物体可产生PUFA的条件下培养生物体,所述生物体包含编码可将 α -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}9, 12, 15}$)延长至少两个碳原子而不延长 γ -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}6, 9, 12}$)的多肽的权利要求1或2的核酸、权利要求7到9之任何一项的基因构建体或权利要求10的载体。

15. 权利要求14的方法,其中由该方法产生的PUFA为在脂肪酸分子内具有至少两个双键的 C_{20} 或 C_{22} 脂肪酸分子。

16. 权利要求14的方法,其中 C_{20} 或 C_{22} 脂肪酸分子以油类、脂类或游离脂肪酸形式从生物体中分离。

17. 权利要求14到16之任何一项的方法,其中所述生物体为微生物、动物或植物。

18. 权利要求14到17之任何一项的方法,其中所述生物体为转基因植物。

19. 权利要求14到18之任何一项的方法,其中 C_{18} 脂肪酸为在分子内具有三个双键的脂肪酸。

20. 由权利要求14到19之任何一项的方法产生的油类、脂类或脂肪酸或其部分。

21. 包含PUFA且源自转基因植物的油类、脂类或脂肪酸组合物,其中所述转基因植物包含权利要求1或2的核苷酸序列、权利要求7到9之任何一项的基因构建体或权利要求10的载体。

22. 权利要求20或21的油类、脂类或脂肪酸组合物在饲料、食品、化妆品或制药中的用途。

23. 与权利要求1或2的核苷酸序列编码的多肽特异地相互作用的抗体。

24. 与权利要求1或2的核苷酸序列互补的反义核苷酸序列。

25. 试剂盒，其包含权利要求1或2的核苷酸序列、权利要求7到9之任何一项的基因构建体、权利要求10的载体或权利要求22的抗体。

新延长酶基因以及 $\Delta 9$ -多不饱和脂肪酸的生产

发明领域

本发明涉及具有SEQ ID NO: 1或其衍生序列的新延长酶 (elongase) 基因, 涉及包含该序列或其衍生序列的基因构建体并涉及其应用。本发明的核酸序列编码的多肽可将 α -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}9, 12, 15}$) 延长至少两个碳原子但不延长 γ -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}6, 9, 12}$)。本发明还涉及包含具有SEQ ID NO: 1或其衍生序列的延长酶基因的载体或生物体。

本发明进一步涉及用于生产多不饱和脂肪酸(=PUFA)的方法, 所述生产利用包含延长酶基因的生物体进行, 该生物体可产生大量的油且特别是具有高含量的不饱和脂肪酸的油。此外, 本发明涉及具有较高含量的带至少两个双键的多不饱和 C_{20} -或 C_{22} -脂肪酸的油和/或脂肪酸组合物, 和/或涉及具有较高含量的该多不饱和脂肪酸的三酰基甘油组合物。

发明背景

细胞内天然代谢过程中的某些产物和副产物在多种工业中具有效用, 所述工业包括食品、饲料、化妆品和制药工业。这些分子统称为“精细化学品”, 也包括脂类和脂肪酸, 其中一类代表分子为多不饱和脂肪酸。例如可将多不饱和脂肪酸(= PUFA)加入到婴儿制品中以使该制品具有更高的营养价值。例如PUFA对人类血液中胆固醇水平具有正面影响且因此可用于防止心脏疾病。精细化学品和多不饱和脂肪酸(= PUFA)可分离自动物来源, 例如鱼, 或利用微生物通过大规模微生物发酵培养生产, 所述微生物被发展为可产生和聚积或分泌大量的一种或多种所需分子。

对于生产PUFA特别有用的微生物为例如藻类的绿光等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*)、三角褐指藻 (*Phaedactylum tricornutum*) 或隐甲藻

(*Cryptocodinium*) 种, 纤毛虫如棘尾虫属 (*Stylonychia*) 或豆形虫属, 真菌如被孢霉属 (*Mortierella*)、虫霉属 (*Entomophthora*)、毛霉属 (*Mucor*) 或 *Thrausto-/Schizochytrium* 种。通过株系筛选, 已发展出各微生物的多种突变株, 这些突变株可产生包括PUFA在内的一系列所需化合物。然而, 用于提高特定分子产量的株系筛选方法是费时和困难的。

备选地, 可通过大规模的植物生产最方便地实现精细化学品的产生, 所述植物被发展为可产生前述的PUFA。对于此目的特别适宜的植物为包含高含量的脂类化合物的油籽植物, 如菜籽油菜 (*rapeseed*)、*canola*、亚麻籽、大豆、向日葵、琉璃苣和月见草。但如在本发明的详述中所提及的, 含油类或脂类和脂肪酸的其他作物植物也是非常适宜的。通过常规育种, 已开发了许多突变植物, 它们可产生一系列所需脂类和脂肪酸、辅因子和酶。但是, 对用于产生特定分子的新植物栽培品种的筛选是费时和困难的, 或当化合物并不天然存在于相关油类作物中时这甚至是不可能的, 如C₂₀和更长C-碳链多不饱和脂肪酸的情况。

发明概要

本发明提供了如在SEQ ID NO:1中描述的新核酸分子, 所述分子可用于修饰油类、脂肪酸、脂类、脂类衍生的化合物且最优选地可用于产生多不饱和脂肪酸。

在多种精细化学品的大规模工业生产中通常使用微生物如被孢霉属、虫霉属、毛霉属、隐甲藻以及其他藻类和真菌和植物, 特别是油籽植物。

如果可获得用于遗传操作上述微生物和纤毛虫(参见WO98/01572中的公开)或藻类和相关生物如三角褐指藻(参见Falciatore等, 1999, 海洋生物技术(*Marine Biotechnology*) 1 (3):239-251以及Dunahay等, 1995, 硅藻的遗传转化, 生理学杂志(*J. Phycol.*) 31:10004-1012及其中参考文献)的克隆载体和技术, 本发明的核酸分子可用于这些微生物的遗传改造以使其成为一种或多种精细化学品的更佳或更有效的生产者。精细化学品的产量或产率

的提高可以由操作本发明基因的直接效应导致，或可以由此操作的间接效应导致。

藓类和藻类是仅有已知可产生可观数量的多不饱和脂肪酸如花生四烯酸(ARA)和/或二十碳五烯酸(EPA)和/或二十二碳六烯酸(DHA)的植物系统。因此，源自如绿光等鞭金藻等藻类的核酸分子特别适于在宿主内，特别是在微生物如以上提及的微生物和植物如油籽植物，例如菜籽油菜、canola、亚麻籽、大豆、向日葵、琉璃苣中修饰脂类和PUFA的生产系统。此外，来自绿光等鞭金藻的核酸可用于鉴定其他物种中的DNA序列和酶，所述序列和酶可用于修饰各自生物体中PUFA前体分子的生物合成。

绿光等鞭金藻与其它藻类在DNA序列和多肽水平上享有高度同源性，这使得可以利用从其他藻类或生物体演化出的探针进行DNA分子的异源筛选，由此得到适于在第三物种中进行异源筛选或功能注释和基因功能预测的共有序列。因此，鉴定此类功能的能力可具有显著的实用性，例如预测酶的底物专一性。此外，这些核酸分子可用作参考序列，用于其他藻类的作图或用于产生PCR引物。

这些新核酸分子可编码此处称为PUFA特异性延长酶(PSE)的蛋白质。这些PSE能够，例如，参与脂类和脂肪酸生物合成所必需的化合物如PUFA的代谢(如生物合成或降解)，或帮助一个或多个脂类/脂肪酸化合物跨膜转运进入或排出细胞。

本申请中，我们更详细地说明了这些序列中一个的功能。我们已经首次分离出编码高特异性延长酶活性的功能活性基因，所述延长酶活性适于从 α -亚麻酸($C_{18:3 \text{ } \Delta 9, 12, 15}$)产生长链不饱和脂肪酸但不延长 γ -亚麻酸($C_{18:3 \text{ } \Delta 6, 9, 12}$)。因此，我们在此将其称作ASE(“ α -亚麻酸特异性延长酶”)基因或蛋白质，由此表示酶活性可导致 ω -3脂肪酸或 $\Delta 9$ -去饱和的长链多不饱和脂肪酸延长至少两个碳原子。尽管已知有多个涉及短链或中链饱和脂肪酸延长的专利申请(WO98/46776和US5,475,099)，但先前的出版物和专利并未显示特异针对 α -亚麻酸(ALA)且不接受 γ -亚麻酸(GLA)作为底物的功能活性ASE基因。WO00/12720描述了来自多种生物体的多种PSE，

但描述的基因均未显示出能区别GLA而特异针对ALA。WO00/12720中，被证实编码PSE的基因全部接受GLA作为底物，因此这些酶导致 $\Delta 6$ -去饱和的长链多不饱和脂肪酸的延长而不会如在本发明中所公开的导致 $\Delta 9$ -去饱和的脂肪酸的延长。

本发明中公开的ASE的独特特征是重要的，因为其导致的产物仅限于所需的产物而不含不需要的PUFA分子，如GLA延长所产生的那些分子。

WO99/64616、WO98/46763、WO98/46764、WO98/46765描述了在转基因植物中生产PUFA，显示了对来自几种来源的相应 $\Delta 12$ -、 $\Delta 5$ -或 $\Delta 6$ -去饱和酶活性的克隆和功能表达，但未阐述ASE编码基因或 α -亚麻酸特异性 $\Delta 6$ -去饱和酶基因，以及对于从ALA生产二十碳五烯酸和相关前体物所必需的功能活性。

对于PUFA的生产，多不饱和脂肪酸分子(如优选的 C_{18} 脂肪酸)通过延长酶的酶活性延长至少两个碳原子是必需的。本发明的核酸序列编码第一个来自植物的能够将在脂肪酸分子内具有至少两个双键、优选地三个双键的 $C_{18:3 \text{ d}6, 9, 12}$ 脂肪酸延长至少两个碳原子的延长酶。一轮延长过后，该酶活性导致生成 C_{20} 脂肪酸且两轮、三轮和四轮延长过后导致生成 C_{22} 、 C_{24} 或 C_{26} 脂肪酸。应用本发明的延长酶还可以合成更长的PUFA。本发明的延长酶活性优选产生 C_{20} 和/或 C_{22} 脂肪酸，在脂肪酸分子中具有至少两个双键，优选地具有三个或四个双键，特别优选地在脂肪酸分子中具有三个双键。可进行延长的优选脂肪酸分子为在 $\Delta 9$ -位具有双键的脂肪酸分子。用本发明的酶进行延长之后，可进行进一步的去饱和步骤。因此，由延长酶活性的产物和可能的进一步去饱和可导致具有更高去饱和程度的优选PUFA，如二十二碳二烯酸、花生四烯酸、 $\omega 6$ -二十碳三烯酸、双同- γ -亚麻酸(di-homo-linolenic acid)、二十碳五烯酸、 $\omega 3$ -二十碳三烯酸、 $\omega 3$ -二十碳四烯酸、二十二碳五烯酸或二十二碳六烯酸。特别优选的脂肪酸为 α -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}9, 12, 15}$)的延长产物stearidonic acid。本发明酶活性的底物优选地为 $\Delta 9$ -去饱和脂肪酸，所述脂肪酸在 $\Delta 9$ -位具有第一双键，例如axillarenic acid、12,13环氧油酸(C_{18} , $\Delta 9$ 顺式, 12-13环氧)、共轭亚油酸(C_{18} , $\Delta 9$

顺式, 11反式)、sterolic acid(C_{18} , $\Delta 9$ -炔)、 α -十八碳四烯酸(C_{18} , $\Delta 9$ 顺式, 11反式, 13反式)、棕榈油酸(C_{18} , $\Delta 9$ 顺式)、亚油酸或 α -亚麻酸。优选的底物为亚油酸和/或 α -亚麻酸。在脂肪酸中具有至少两个双键的脂肪酸可通过本发明的酶活性进行延长, 此时所述脂肪酸可采取游离脂肪酸、酰基-CoA-脂肪酸、脂肪酸烷基酯的形式或酯的形式, 如磷脂、糖脂、鞘脂、磷酸甘油酯、单酰基甘油酯、二酰基甘油酯或三酰基甘油酯的形式, 优选的形式为游离脂肪酸或酰基-CoA-脂肪酸。

如果可获得用于植物和植物转化的克隆载体(参见那些发表的文献和其中的引用文献: 植物分子生物学和生物技术(Plant Molecular Biology and Biotechnology)(CRC Press, Boca Raton, Florida), 6/7章, p. 71-119 (1993); F.F. White, 用于高等植物基因转移的载体, 在: “转基因植物”中, (Transgenic Plants), 第一卷, 工程和利用(Engineering and Utilization), 编.: Kung和R.Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes等, 用于基因转移的技术, 在: “转基因植物”中, 第一卷, 工程和利用(Engineering and Utilization), eds.: Kung 和 R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225), 本发明的核酸分子可用于多种植物的遗传改造, 以使它们成为一种或多种脂类衍生产物如PUFA的更佳或更有效的生产者。脂类衍生产物如PUFA的产量或产率的这种提高可由于操作本发明基因的直接效应导致, 或可由于此操作的间接效应导致。

本发明的ASE蛋白质的改变可通过多种机制由于该改变的蛋白质而直接影响到油籽植物或微生物的精细化学品的生产、产量和/或生产效率。可增加ASE蛋白质或基因的数量或活性, 以便产生更多数量的此化合物, 或当微生物在导入相应基因前缺乏该生物合成活性和能力时可从头生产此化合物。

将ASE基因导入到生物体或细胞中可能不仅增加终产物的生物合成流量, 也可增加或从头产生相应的三酰基甘油组合物。类似地, 可增加其他参与营养物输入的基因的数量或活性从而增加前体物、辅因子或中间体化

合物在细胞内或在存储区室内的浓度，由此进一步增加细胞产生PUFA的能力，参见下述，其中所述营养物为对于一种或多种精细化学品(如脂肪酸、极性和中性脂类)的生物合成所必需的营养物。脂肪酸和脂类本身即是所需的精细化学品；通过优化一种或多种参与这些化合物生物合成的ASE的活性或增加其数目，或通过削弱一种或多种参与这些化合物降解的ASE的活性，有可能增加植物或微生物的脂肪酸和脂类分子的生产、产量和/或生产效率。

本发明的ASE基因的突变也可导致产生具有改变活性的ASE蛋白质，所述改变的活性可直接或间接影响一种或多种所需精细化学品的生产。例如可增加本发明的ASE基因的数量或活性以使细胞的正常代谢废物或副产物(可由于所需精细化学品的过度生产而在数量上有所增加)在能够损害细胞内的其他分子或过程(这可降低细胞的生活力)或干扰精细化学品生物合成途径(这可降低所需精细化学品的产生、产量或生产效率)之前得以有效排出。此外，相对大数量的胞内所需精细化学品本身即可对细胞产生毒性或干扰酶反馈机制，例如变构调节，因此，例如，通过增加PUFA途径的其他下游酶或解毒酶的活性或数量，可能增加PUF向三酰基甘油部分的分配及可能增加种子细胞的生活力，而这又可导致在产生所需精细化学品的培养物或种子中细胞的更好地生长。也可操作本发明的ASE基因以产生相对数量的不同脂类和脂肪酸分子。这可对细胞的膜组成产生显著影响，并且除了产生新合成的PUFA之外还将导致生成新的油类。由于每一类脂都具有不同的物理特性，膜脂组成的改变可显著改变膜的流动性。膜流动性的改变可影响分子的跨膜转运以及细胞的完整性，二者均对精细化学品的产生具有显著的影响。在植物中这些改变还可进一步影响其他特征，如对非生物和生物胁迫条件的耐受性。

由于生物和非生物胁迫耐受性是一般的期望在多种植物中进行遗传的性状，所述植物如玉米、小麦、黑麦、燕麦、黑小麦、水稻、大麦、大豆、花生、棉花、菜籽油菜(rapeseed)和canola、木薯、胡椒、向日葵和万寿菊、茄属(solanaceous)植物如马铃薯、烟草、茄子和番茄，野豌豆(Vicia)属物

种、豌豆、苜蓿、灌木植物(咖啡、可可、茶)、柳属(*Salix*)物种、树(油椰、椰子)和多年生的草和饲料作物。作为本发明的一个进一步的实施方案,这些作物植物也可为用于遗传工程的优选靶植物。本发明特别优选的植物为油籽植物如大豆、花生、菜籽油菜、canola、向日葵、红花、树(油椰、椰子)或作物如玉米、小麦、黑麦、燕麦、黑小麦、水稻、大麦、苜蓿或灌木植物(咖啡、可可、茶)。

在另一实施方案中,本发明分离的核酸分子编码蛋白质或其部分,其中该蛋白质或其部分包括与SEQ ID NO: 2的序列有足够高的同源性的氨基酸序列,以致该蛋白质或其部分保持ASE活性。优选地,由此核酸分子编码的蛋白质或其部分保持参与化合物代谢的能力,所述化合物为对于PUFA或植物细胞膜的构建或分子的跨膜转运所必需的化合物。在一个实施方案中,核酸分子编码的蛋白质与SEQ ID NO.2的氨基酸序列的同源性为至少约50%,优选地至少约60%,且更优选地至少约70%、80%或90%且最优选地至少约95%、96%、97%、98%、99%或更高。在另一优选的实施方案中,蛋白质为全长绿光等鞭金藻蛋白质,所述蛋白质与SEQ ID NO.2的完整氨基酸序列(源自SEQ ID NO.1中显示的开放阅读框)基本同源。

相应地,本发明的一个方面涉及分离的核酸分子(如cDNA),其包含编码ASE蛋白质或其生物活性部份的核苷酸序列,还涉及适用作引物或杂交探针的核酸片段,所述引物或杂交探针可用于ASE编码核酸(如DNA或mRNA)的检测或扩增。在特别优选的实施方案中,分离的核酸分子包含在SEQ ID NO.1中给出的一段核苷酸序列、该序列的衍生物或其编码区或互补序列或酶活性部分。在另外的特别优选的实施方案中,本发明的分离核酸分子包含这样的核苷酸序列,其可以与SEQ ID NO.1中的核苷酸序列、其衍生物或部分杂交,或与它们至少约50%,优选地至少约60%,更优选地至少约70%、80%或90%,甚至更优选地至少约95%、96%、97%、98%、99%或更高同源。在其它优选实施方案中,分离的核酸分子编码SEQ ID

No.2所示氨基酸序列。本发明优选的ASE基因也优选具有至少一种此处描述的ASE活性。

在另一优选的实施方案中，分离的核酸分子源自绿光等鞭金藻且编码的蛋白质(如ASE融合蛋白质)包括生物活性域，该生物活性域此外该蛋白与SEQ ID NO.2中的一段氨基酸序列的同源性为至少约50%或更高，且能够参与对于细胞膜的构建或分子的跨膜转运所必需的化合物的代谢或具有在表2中所列出的一种或多种活性，此外，该核酸分子还包括编码异源多肽的异源核酸序列或调节区域。

在另一实施方案中，分离的核酸分子的长度为至少15个核苷酸，且在严格的条件下与包含SEQ ID NO.1的核苷酸序列的核酸分子杂交。优选地，分离的核酸分子与天然存在的核酸分子对应。更优选地，分离的核酸编码天然存在的绿光等鞭金藻 ASE或其生物活性部分。

本发明的另一方面涉及包含本发明的核酸分子的载体(如重组表达载体)，以及已经导入了该载体的宿主细胞，特别是微生物、植物细胞、植物组织、植物器官或整个植物。在一个实施方案中，该宿主细胞能够储存精细化学化合物，特别是PUFA，以致可从收获的材料中分离所需的化合物。然后这些化合物(油、脂类、三酰基甘油酯、脂肪酸)或ASE可从介质或宿主细胞中分离，所述宿主细胞在植物中为包含和储存精细化学化合物的细胞，最优选贮藏组织如种皮、块茎、表皮的细胞和种子细胞。

而本发明的另一方面涉及在SEQ ID NO.1中显示的分离ASE基因或其部分，例如，其生物活性部分。在一优选的实施方案中，分离的ASE或其部分可参与化合物的代谢，所述化合物对于微生物或植物细胞的细胞膜构建或分子的跨膜运输是必需的。在另一优选的实施方案中，分离的ASE或其部分与SEQ ID NO:2的氨基酸序列充分同源，以致该蛋白质或其部分仍能参与对于微生物或植物细胞的细胞膜构建或分子的跨膜转运所必需的化合物的代谢。

因此在另一优选的实施方案中，可以基于本发明描述的核酸通过同源重组利用藻类绿光等鞭金藻显示藓类基因的功能。

本发明的再一方面涉及分离的ASE基因或其部分,如其生物活性部分。在一优选的实施方案中,分离的ASE或其部分可参与对于微生物或植物细胞的细胞膜构建或分子的跨膜运输所必需的化合物的代谢。在另一优选的实施方案中,分离的PSE或其部分与SEQ ID NO:2的氨基酸序列充分同源,以致该蛋白质或其部分仍能够参与对于微生物或植物细胞的细胞膜构建或分子跨越这些细胞膜的运输所必需的化合物的代谢。

本发明也提供分离的ASE制备物。在优选的实施方案中,ASE基因包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在另一优选的实施方案中,本发明涉及分离的全长蛋白质,其与SEQ ID NO:2的完整氨基酸序列(由SEQ ID NO:1中的开放阅读框编码)基本同源。在另一实施方案中,该蛋白质与SEQ ID NO:2的完整氨基酸序列的同源性为至少约50%,优选地至少约60%,且更优选地至少约70%、80%或90%,且最优选地至少约95%、96%、97%、98%或99%或更高。在另外的实施方案中,分离的ASE包含与SEQ ID NO:2中的一段氨基酸序列至少约50%或更大同源的氨基酸序列,且能够参与对于微生物或植物细胞中脂肪酸的构建或分子跨越这些胞膜的运输所必需的化合物的代谢,或具有一种或多种PUFA延长活性——这就意味着对去饱和的具有至少两个双键位置的C18碳链的延长。

备选地,分离的ASE可包含由如下核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述核苷酸可与SEQ ID NO:1的核苷酸序列杂交,例如在严格的条件下杂交,或与SEQ ID NO:1的核苷酸序列有至少约50%,优选地至少约60%,更优选地至少约70%、80%或90%,且甚至更优选地至少约95%、96%、97%、98%或99%或更高的同源性。还优选ASE的优选形式具有一种或多种此处描述的ASE活性。

ASE多肽或其生物活性部分可以可操作地连接非-ASE多肽以形成融合蛋白质。在优选的实施方案中,该融合蛋白质具有不同于单独的ASE的活性。在另外的优选实施方案中,该融合蛋白质参与化合物的代谢,所述化合物对于微生物或植物中脂类和脂肪酸、辅因子和酶的合成或分子跨越植物细胞膜的运输是必需的。在特别优选的实施方案中,该融合蛋白质整

合在宿主细胞中调节细胞中所需化合物的产生。在一优选的实施方案中此融合蛋白质还包含单独的或联合的 $\Delta 4$ -、 $\Delta 5$ -或 $\Delta 8$ -去饱和酶活性。特别地，WO 00/34439中描述的来自细小裸藻 (*Euglena gracilis*) 的 $\Delta 8$ -去饱和酶和在US 6,051,754(高山被孢霉, *M. alpina*)、GB9814034.6 (秀丽隐杆线虫, *C. elegans*)中描述的 $\Delta 5$ -去饱和酶基因, 或在US 5,850,026中描述的 $\Delta 12$ -和 $\Delta 15$ -去饱和酶基因因为用于与本发明ASE基因共表达的适宜基因。引用的专利中均未显示与本发明描述的ASE基因的共表达。

本发明的另一方面涉及用于产生精细化学品的的方法。该方法涉及对含有可指导本发明ASE核酸分子表达的载体的适宜微生物或植物细胞、组织、器官或完整植物的培养, 以使精细化学品得以产生。在一优选的实施方案中, 该方法进一步包括获得包含该载体的细胞的步骤, 其中细胞用指导ASE核酸表达的载体进行转化。在另一优选的实施方案中, 该方法包括从培养物中回收精细化学品的步骤。在一特别优选的实施方案中, 细胞来自藻类如褐指藻属 (*phaeodactylum*), 纤毛虫如豆形虫属或棘尾虫属, 真菌如被孢霉或破囊壶菌属 (*Thraustochytrium*) 或Schizochytrium或来自以上提及的油籽植物。

本发明的另一方面涉及用于调整从微生物中产生分子的方法。该方法包括将细胞与调节ASE活性或ASE核酸表达的试剂接触以使细胞相关活性相对于在缺乏此试剂时的此相同活性发生改变。在一优选的实施方案中, 调整细胞用于脂类和脂肪酸、辅因子和酶的一个或多个代谢途径, 或调整细胞中化合物的跨膜转运, 以提高由该微生物产生的所需精细化学品的产量或产率。调整ASE活性的试剂可为刺激ASE活性或ASE核酸表达的试剂。刺激ASE活性或ASE核酸表达的试剂的实例包括小分子、活性ASE和已导入细胞中的编码ASE的核酸。抑制ASE活性或表达的试剂的示例包括小分子和反义ASE核酸分子。

本发明的另一方面涉及用于调节细胞中所需化合物生产的方法, 包括将野生型或突变ASE基因导入细胞, 所述基因可以位于单独的质粒上或整合到宿主细胞的基因组中。如果整合到基因组中, 该整合可为随机的, 或

可通过重组发生以使天然基因被导入的拷贝置换，从而导致细胞中所需化合物的产生受到调整；或者可以反式应用基因，使基因与功能表达单元功能性连接，所述单元至少含有利于基因表达的序列和利于对功能性转录的基因进行多聚腺苷酸化的序列。

在一优选的实施方案中，对所述生产进行修饰。在另一优选的实施方案中，增加了所述的所需化学物而减少了不需要的干扰化合物。在一特别优选的实施方案中，所述的所需精细化学品为脂类或脂肪酸、辅因子或酶。在一尤其优选的实施方案中，所述化学物为多不饱和脂肪酸。更优选地选自花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)或二十二碳六烯酸(DHA)。

发明详述

本发明提供参与藻类绿光等鞭金藻中脂类和脂肪酸、PUFA辅因子和酶的代谢或参与亲脂性化合物的跨膜转运的ASE核酸和蛋白质分子。本发明的分子可用于调节微生物，藻类和/或植物中精细化学品的生产，所述微生物为例如纤毛虫如豆形虫属或棘尾虫属、真菌如被孢霉属或破囊壶菌属或Schizochytrium，所述藻类如褐指藻属，所述植物如玉米、小麦、黑麦、燕麦、黑小麦、水稻、大麦、大豆、花生、棉花、芸苔属物种如菜籽油菜、canola和芜菁油菜、亚麻籽、胡椒、向日葵、琉璃苣、月见草和万寿菊、茄属植物如马铃薯、烟草、茄子和番茄、野豌豆属物种、豌豆、木薯、苜蓿、灌木植物(咖啡、可可、茶)、柳属物种、树(油椰、椰子)和多年生的和饲料作物，此调节可为直接的(例如，脂肪酸生物合成蛋白质的过表达或优化可直接影响修饰生物体的脂肪酸的产生、产量和/或生产效率)，或本发明分子可间接产生影响导致所需化合物的生产、产量和/或生产效率的提高或不需要的化合物的降低(例如，对脂类和脂肪酸、辅因子和酶的代谢的调节可导致细胞内的所需化合物的生产、产量和/或生产效率或组成的改变，而所述改变又可影响一种或多种精细化学品的产生)。本发明的各方面在以下进一步说明。

I. 精细化学品和PUFA

术语“精细化学品”为本领域内公知，包括由生物体产生的可应用于多种工业，例如但不限于，制药、农业、食品、饲料和化妆品工业的分子。该化合物也包括脂类、脂肪酸、辅因子和酶等(参见如Kuninaka, A. (1996) 核苷酸和相关化合物, 561-612页, 《Biotechnology》6卷, Rehm等, 编VCH: Weinheim, 和其中包含的参考文献), 脂类(包括饱和的和多不饱和的脂肪酸(例如花生四烯酸)), 维生素和辅因子(参见如Ullmann工业化学百科全书(Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry), A27卷, 维生素, 443-613页 (1996) VCH: Weinheim和其中的参考文献; 和Ong, A.S., Niki, E. & Packer, L. (1995), UNESCO/马来西亚科学和技术协会和亚州自由基研究协会联盟举办的“营养、脂类、健康和疾病”论文集(“Nutrition, Lipids, Health, and Disease” Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia, and the Society for Free Radical Research – Asia), 1994年9月1-3日在马来西亚槟榔屿举行, AOCS Press, (1995)), 酶以及由Gutcho (1983)在“Chemicals by Fermentation”(Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086)中及其中参考文献中描述的所有其他化学物。这些精细化学品中的某些的代谢和应用将在以下进一步说明。

不同前体分子和生物合成酶的组合将导致产生不同的脂肪酸分子，而这对膜的组成具有显著的影响。可以推断，PUFA将不仅掺入到三酰基甘油中也将掺入到膜脂中。

膜的生物合成是已充分表征的过程，涉及多种组份，包括作为双层膜的一部分的脂类。因此，新脂肪酸如PUFA的生成可为细胞或生物体的膜功能赋予新的特征。

细胞膜在细胞内执行多种功能。首先和最重要的是，细胞膜将细胞内内容和周围环境区分开来，因而赋予细胞以完整性。细胞膜也可作为有害的和不需要的化合物内流的屏障，以及所需化合物流出的屏障。

对于膜以及涉及的机制的更为详细的描述和含意, 参见: Bamberg, E. 等, (1993) 脂质双层膜上离子泵的电荷转运, *Q. Rev. Biophys.* 26: 1-25; Gennis, R.B. (1989) Pores, 通道和转运蛋白, 《生物膜, 分子结构和功能》(Biomembranes, Molecular Structure and Function), Springer: Heidelberg, p. 270-322; 以及Nikaido, H. 和Saier, H. (1992) 细菌中的转运蛋白质: 其设计中的共同主题, *科学 (Science)* 258: 936-942, 以及在上述每一份参考文献中所包含的参考文献。

脂类的合成可分为两部分: 脂肪酸的合成及其与sn-甘油-3-磷酸盐的连接, 和极性头部基团的加入或修饰。用于膜中的典型脂类包括磷脂、糖脂、鞘脂和磷酸甘油酯。脂肪酸合成开始于乙酰基CoA通过乙酰CoA羧化酶转换为丙二酰CoA或通过乙酰基转酰基酶转换为乙酰基-ACP。缩合反应之后, 这两个产物分子一起形成进一步的中间体, 所述中间体经过一系列的缩合、还原和脱水反应进行转化以生成具有所需链长度的饱和脂肪酸分子。从该分子产生不饱和脂肪酸由特定的去饱和酶进行催化, 所述催化可以为有氧(需要分子氧的辅助)反应或为无氧反应(对于在微生物中脂肪酸合成的参考, 参见 F.C. Neidhardt 等 (1996) 大肠杆菌和沙门氏菌(*E. coli* and *Salmonella*). ASM Press: Washington, D.C., p. 612-636 及其包含的参考文献; Lengeler 等 (编) (1999) 原核生物学(*Biology of Prokaryotes*). Thieme: Stuttgart, New York, 及其包含的参考文献; 以及Magnuson, K. 等, (1993) 微生物学综述(*Microbiological Reviews*)57: 522-542, 及其包含的参考文献)。

本发明的PUFA生物合成方法的优选前体为亚油酸和亚麻酸。这些C₁₈碳脂肪酸必须延长为C₂₀和C₂₂以获得二十碳和二十二碳链类型的脂肪酸。在多种去饱和酶如具有 $\Delta 6$ -或 $\Delta 8$ -和 $\Delta 5$ -及 $\Delta 4$ -去饱和酶活性的酶的作用下, 可获得二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸以及多种其他长链PUFA, 然后可将其提取出来用于多种目的, 例如在食品和饲料中应用。

对于长链PUFA的生产, 如以上所提及, 多不饱和C₁₈脂肪酸通过本发明延长酶的酶活性延长至少两个碳原子是必需的。本发明核酸序列编码能

将 α -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}9, 12, 15}$) 延长至少两个碳原子但不延长 γ -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}6, 9, 12}$)的第一个植物延长酶。

此外, 脂肪酸必需转运并掺入到三酰基甘油储存脂中, 随后再进行多种修饰。脂类合成的另一基本步骤为脂肪酸通过, 例如甘油-磷酸-酰基转移酶转移到极性头部基团上(参见 Frentzen, 1998, 脂类 (Lipid), 100(4-5):161-166)。

对于有关植物脂肪酸生物合成、去饱和、脂类代谢和脂类(lipoic)化合物的膜转运、 β -氧化、脂肪酸修饰和辅因子、三酰基甘油储存和组装的出版物, 包括其中的参考文献, 可参见以下的文章: Kinney, 1997, 遗传工程(Genetic Engineering), ed.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge和Browse, 1995, 植物细胞(Plant Cell)7:957-970; Shanklin和Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.,49:611-641; Voelker, 1996, 遗传工程(Genetic Engineering), ed.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau 等, 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne 等 1993, 《植物的膜和储存脂类的生物化学和分子生物学》(Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants), Eds: Murata和Somerville, Rockville, 美国植物生理学家协会(American Society of Plant Physiologists), 150-158, Murphy & Ross 1998, 植物杂志(Plant Journal). 13(1):1-16。

维生素、辅因子和营养物如PUFA包括一组这样的分子, 对于这些分子, 高等动物已经失去了合成其的能力而因此必须摄入, 或高等动物不能充分地自身产生而因此必须额外摄入, 但这些分子可由如细菌等其他生物体容易地合成。对这些分子在能够产生它们的生物体如细菌中的生物合成已有大量描述 (Ullmann工业化学百科全书, 维生素卷A27, 443-613页, VCH: Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) 生物化学途径: 生物化学和分子生物学图集(Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology), John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. & Packer, L.

(1995) UNESCO/马来西亚科学和技术协会和亚州自由基研究协会联盟举办的“营养、脂类、健康和疾病”论文集, 1994年9月1-3日在马来西亚槟榔屿举行, AOCS Press: Champaign, IL X, 374 S)。

所述这些分子或自身为生物活性底物或为生物活性底物的前体, 所述生物活性底物可在许多代谢途径中用作电子载体或中间体。除了它们的营养价值外, 这些化合物也具有显著的工业价值, 可用作着色剂、抗氧化剂和催化剂或其他加工助剂。(有关这些化合物的结构、活性和工业应用的综述, 参见, 例如, Ullmann工业化学百科全书, 维生素卷A27, 443-613页, VCH: Weinheim, 1996.)。多不饱和脂肪酸具有多种功能和健康有益效应, 如在冠心病、炎症机制、婴儿营养等方面。出版物和参考文献见(包括其中引用的文献): Simopoulos 1999, Am. J. Clin. Nutr., 70 (增刊3):560-569, Takahata 等, Biosc. Biotechnol. Biochem, 1998, 62 (11):2079-2085, Willich和Winther, 1995, Deutsche Medizinische Wochenschrift, 120 (7):229 ff。

II. 本发明的元素和方法

本发明至少部分基于这样的发现, 即此处称为ASE核酸和蛋白质分子的新分子对绿光等鞭金藻中细胞膜的产生具有影响并影响例如分子跨越该膜的运动。在一个实施方案中, ASE分子参与对于微生物和植物中细胞膜的构建所必需的化合物的代谢, 或直接影响分子跨越这些膜的转运。在一优选的实施方案中, 本发明ASE分子对膜组份产生和膜转运的调节活性影响到该生物体中所需精细化学品的产生。在一特别优选的实施方案中, 对本发明的ASE分子的活性进行调节, 以致由本发明ASE调节的微生物或植物代谢途径在生产、产量和/或生产效率上受到调整, 且化合物跨膜的转运效率发生改变, 该改变直接或间接调整微生物和植物的所需精细化学品的产生、产量和/或生产效率。

术语ASE或ASE多肽包括参与如下化合物代谢的蛋白质, 所述化合物对于微生物和植物中细胞膜的构建或分子跨这些膜的转运是必需的。ASE的示例在SEQ ID NO:1或其衍生物中公开。术语ASE基因或ASE核酸序列

包括编码ASE的核酸序列，其由编码区和相应的5'和3'非翻译区序列组成。ASE基因的示例包括SEQ ID NO:1的序列及其衍生物。术语产量或生产力为本领域内公知，包括在给定时间和给定发酵体积内形成的发酵产物(例如，所需的精细化学品)的浓度(例如，每小时每升产生的产物kg数)。术语生产效率包括达到特定生产水平所需要的时间(例如，细胞为获得特定的精细化学品生产量所需要的时间)。术语产率或产物/碳产率为本领域内公知，包括碳源转换为产物(即，精细化学品)的效率。这通常记作，例如，每kg碳源的kg产物数。通过增加化合物的生产或产率，经过给定时间在给定量的培养物内回收到的化合物分子的数量或回收到的有用分子的数量将增加。术语生物合成或生物合成途径为本领域内公知，且包括由细胞从中间体化合物合成化合物，优选有机化合物，其中所述的合成可为多步骤和受到高度调节的过程。术语降解或降解途径为本领域内公知，且包括由细胞将化合物(优选地为有机化合物)分解为降解产物(一般而言，为较小的或较低复杂性的分子)，其中所述的分解可为多步骤和受到高度调节的过程。术语代谢为本领域内公知，且包括发生于生物体内的所有生化反应的总和。特定化合物的代谢(例如脂肪酸的代谢)则包括细胞中与此化合物相关的全部生物合成、修饰和降解途径。

在另一实施方案中，本发明的ASE分子能够调节微生物或植物内所需分子的产生，所述所需分子如精细化学品。存在多种机制，通过这些机制本发明ASE的改变可直接影响在掺入了该改变的蛋白质的微生物或植物株中精细化学品的产生、产量和/或生产效率。可增加参与细胞内或从细胞向外的精细化学品转运的那些ASE的数量或活性，以使更大数量的这些化合物得以跨膜转运，由此它们可更容易地被回收和互相转换。此外，脂肪酸和脂类本身为所需的精细化学品；通过优化参与这些化合物生物合成的一种或多种本发明ASE的数目或活性，或通过削弱参与这些化合物降解的一种或多种ASE的活性，将可能增加微生物或植物的脂肪酸和脂类分子的生产、产量和/或生产效率。

本发明ASE基因的突变也可导致产生具有改变活性的ASE，而所述改变的活性可间接影响微生物或植物中一种或多种所需精细化学品的产生。例如，可增加参与废物排出的本发明ASE的数量或活性，以使细胞的正常代谢废物(可能由于所需精细化学品的过度产生而在数量上有所增加)在能够损害细胞内分子(这将降低细胞的生活力)或干扰精细化学品的生物合成途径(这将降低所需精细化学品的产生、产量或生产效率)之前得以有效排出。此外，细胞内相对大量的所需精细化学品本身可对细胞产生毒性，因此通过增加能够从细胞中排出该化合物的转运蛋白的活性或数目，可增加培养物中细胞的生活力，从而又导致产生所需精细化学品的培养物中细胞数目的增加。也可操作本发明的ASE以产生相对数量的不同脂类和脂肪酸分子。这可对细胞膜的脂组成产生显著的影响。由于每一类脂都具有不同的物理特性，因此细胞膜脂组成的变化可显著改变膜的流动性。膜流动性的改变可影响分子的跨膜运输以及细胞的完整性，二者均对大规模发酵培养物中微生物和植物的精细化学品生产具有显著的影响。植物细胞膜可赋予植物特定的特征，例如对热、冷、盐、干旱的耐受性和对如细菌和真菌等病原体的耐受性。因此，对膜化合物的调整可显著影响植物在以上提及的胁迫因素下的生存适应性。这可通过改变信号级联或直接改变膜组成而发生(例如参见: Chapman, 1998, 植物科学进展(Trends in Plant Science), 3 (11):419-426)并影响到信号级联(参见Wang 1999, 植物生理学(Plant Physiology), 120:645-651)或对冷的耐受性(如在WO 95/18222中公开的)。

如在实施例中所描述的，本发明的分离核酸序列包含在绿光等鞭金藻株的基因组内。分离的绿光等鞭金藻 ASE cDNA的核苷酸序列和预测的绿光等鞭金藻 ASE的氨基酸序列分别在SEQ ID NO:1和2中显示。

在源自其他已知延长酶基因的简并寡核苷酸和载体引物的辅助下，SEQ ID NO:1中的核酸分子片段通过聚合酶链反应得以分离。进一步扩增部分片段并用于分离包含足够代表功能活性ASE基因的序列信息的全长cDNA。一个克隆含有全长ASE基因，该基因显示出与已知延长酶基因较低

的同源性。此开放阅读框在酵母中的表达令人意外地显示出ASE基因特异性活性。此酶延长 $\Delta 9$ -脂肪酸，见实施例中的描述。

本发明也涉及其具有的氨基酸序列与SEQ ID NO:2中的氨基酸序列基本同源的蛋白质。如此处所应用，具有的氨基酸序列与选择的氨基酸序列基本同源的蛋白质应与此选择的氨基酸序列，例如与完整的所选择氨基酸序列有至少约50%的同源性。具有的氨基酸序列与选择的氨基酸序列基本同源的蛋白质也可以与此所选氨基酸序列的同源性为至少约50-60%，优选地至少约60-70%，且更优选地为至少约70-80%、80-90%或90-95%，且最优选地为至少约96%、97%、98%、99%或更高。

本发明的ASE或其生物活性部分或片段可参与对于微生物或植物中细胞膜的构建或分子的跨膜运输所必需的化合物的代谢，或可具有一种或多种对于延长C18 PUFA以生成C₂₂或C₂₄ PUFA以及相关的PUFA所必需的活性。

本发明的各个方面在以下的分段中进一步详细描述。

A. 分离的核酸分子

本发明的一个方面涉及编码ASE多肽或其生物活性部分的分离的核酸分子以及足以作为杂交探针或引物用于ASE编码核酸(例如ASE DNA)的鉴定和扩增的核酸片段。如此处所应用，术语“核酸分子”意在包括DNA分子(例如cDNA或基因组DNA)和RNA分子(例如mRNA)和应用核苷酸类似物产生的DNA或RNA类似物。该术语也包括位于基因编码区3'和5'端的非翻译序列：编码区5'端上游至少约500，优选地至少约400，更优选地至少约350、300、250、200、150且甚至更优选地至少约100个核苷酸的序列，及基因编码区3'端下游至少约1000，优选地至少约500，更优选地至少约400、300、250、200、150且甚至更为优选地100、80、60、40或20个核苷酸的序列。核酸分子可为单链或双链，但优选地为双链DNA。“分离的”核酸分子为与存在于其天然来源中的其他核酸分子分离的分子。优选地，

“分离的”核酸不含在其来源生物体的基因组DNA中天然位于其两侧的序列(即位于此核酸5'和3'端的序列)。例如，在多种实施方案中，分离的ASE

核酸分子可包含少于约5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb或0.1 kb的在其来源细胞(例如绿光等鞭金藻细胞)的基因组DNA中天然位于其两侧的核苷酸序列。此外,“分离的”核酸分子,如cDNA分子,当通过重组技术产生时可基本不含其他细胞物质或培养基,或者当化学合成时可基本不含化学前体或其他化学物;术语“基本不含细胞物质”包括这样的核酸分子制备物,其具有的其他物质如蛋白质、多糖等(此处也称为“污染物质”)少于约30%(干重),更优选地少于约20%,而更为优选地少于约10%,且最优选地少于约5%。

本发明的一个实施方案为源自植物的编码多肽的分离核酸分子,所述多肽可将 α -亚麻酸($C_{18:3\ d9, 12, 15}$)延长至少两个碳原子而不延长 γ -亚麻酸($C_{18:3\ d6, 9, 12}$)。

本发明进一步的实施方案为包含编码多肽的核苷酸序列的分离核酸,所述多肽可将 α -亚麻酸($C_{18:3\ d9, 12, 15}$)延长至少两个碳原子且不延长 γ -亚麻酸($C_{18:3\ d6, 9, 12}$),所述核酸选自:

- a) 在SEQ ID NO:1中描述的核酸序列,
- b) 编码SEQ ID NO:2中描述的多肽的核酸序列,
- c) SEQ ID NO:1所示序列的衍生物,该衍生物编码的多肽与编码SEQ ID NO:2中描述的氨基酸序列的序列至少50%同源性且其序列行使延长酶的功能。

以上提及的本发明的分离核酸源自能够合成PUFA的生物体,如纤毛虫、真菌、藻类或腰鞭毛虫,优选地源自植物,特别优选地源自等鞭金藻属(*Isochrysis*),且最优选地源自绿光等鞭金藻。

本发明的一个方面涉及编码ASE多肽或其生物活性部分的分离核酸分子,以及足以作为杂交探针或引物用于ASE编码核酸(例如ASE DNA)的鉴定和扩增的核酸片段。如此处所应用,术语“核酸分子”意在包括DNA分子(例如cDNA或基因组DNA)和RNA分子(例如mRNA)和应用核苷酸类物产生的DNA或RNA类似物。该术语也包括位于基因编码区3'和5'端的非翻译序列:编码区5'端上游至少约100个核苷酸的序列,及基因编码区3'端下

游至少约20个核苷酸的序列。核酸分子可为单链或双链，但优选地为双链DNA。“分离的”核酸分子为与存在于其天然来源中的其它核酸分子相分离的分子。优选地，“分离的”核酸不含在该核酸所来源的生物体的基因组DNA中天然位于其两侧的序列(即位于该核酸5'和3'端的序列)。例如，在多种实施方案中，分离的ASE核酸分子可包含少于约5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb或0.1 kb的在其所来源的细胞(例如，绿光等鞭金藻细胞)的基因组DNA中天然位于其两侧的核苷酸序列。此外，“分离的”核酸分子，如cDNA分子，当通过重组技术产生时可基本不含其他细胞物质或培养基，或当化学合成时基本不含化学前体物或其他化学物。基本不含意味着

本发明的核酸分子，例如具有SEQ ID NO:1的核苷酸序列的核酸分子或其部分，可应用标准分子生物学技术及此处提供的序列信息分离。例如，绿光等鞭金藻 ASE的cDNA可应用SEQ ID NO:1的全部或部分作为杂交探针通过标准杂交技术(例如，在Sambrook等，分子克隆：实验室指南(Molecular Cloning: A Laboratory Manual). 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989中所描述的)从绿光等鞭金藻文库中分离。此外，包含SEQ ID NO:1中一段序列的全部或部分的核酸分子可应用基于该序列或其部分，特别是his-盒基序附近的区域设计的寡核苷酸引物，通过聚合酶链反应而分离，参见Shanklin等(1994)生物化学(Biochemistry) 33, 12787-12794 (例如，包含SEQ ID NO:1中一段序列的全部或部分的核酸分子可通过聚合酶链反应而分离，其中所述分离应用的寡核苷酸引物是基于SEQ ID NO:1中此同一段序列进行设计的)。例如，可从植物细胞分离mRNA(例如通过硫氰酸胍提取方法，Chirgwin等(1979)生物化学(Biochemistry) 18: 5294-5299)并可应用反转录酶(例如Moloney MLV反转录酶，可获自Gibco/BRL, Bethesda, MD; 或AMV反转录酶，可获自Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) 制备cDNA。用于聚合酶链反应扩增的合成寡核苷酸引物的设计可基于SEQ ID NO:1中显示的一段核苷酸序列进行。本发明的核酸可应用cDNA

或，备选地，应用基因组DNA作为模板以及适宜的寡核苷酸引物根据标准PCR扩增技术扩增。由此扩增的核酸可克隆入合适的载体中并通过DNA序列分析来表征。此外，对应于ASE核苷酸序列的寡核苷酸可通过标准合成技术，例如应用自动DNA合成仪制备。

在SEQ ID NO:1中显示的cDNA包含编码ASE (即“编码区”) 的序列以及5'非翻译序列和3'非翻译序列信息。备选地，核酸分子可仅包含SEQ ID NO:1中任何一段序列的编码区或可包含分离自基因组DNA的完整基因组片段。

SEQ ID NO: 2为SEQ ID NO: 1中所示核酸分子Ig_ASE1的核苷酸序列中编码区的翻译产物。

在另一优选的实施方案中，本发明的分离核酸分子包含与SEQ ID NO:1中显示的一段核苷酸序列或其部分互补的核酸分子。与SEQ ID NO:1中显示的一段核苷酸序列互补的核酸分子为与SEQ ID NO:1中显示的一段核苷酸序列充分互补以致可与SEQ ID NO:1中显示的此段核苷酸序列杂交由此形成稳定的双链体的分子。

具有SEQ ID NO:1序列的新延长酶核酸序列的同系物 (homologs) 意指，例如，与SEQ ID NO:1中显示的核苷酸序列或其同系物至少约50-60%，优选地至少约60-70%，更优选地至少约70-80%、80-90%或90-95%，且甚至更为优选地至少约95%、96%、97%、98%、99%或更高同源的等位基因变体，其衍生物或部份。在再一优选的实施方案中，本发明的分离核酸分子包含这样的核苷酸序列，该序列可以与SEQ ID NO:1中显示的一段核苷酸序列或其部分杂交，例如在严格的条件下杂交。等位基因变体特别包括可通过从SEQ ID NO:1所示序列中缺失、插入或替换核苷酸而获得的功能变体，然而，对于一个或多个基因的插入而言，此目的在于使产生的合成蛋白质的酶活性有利地得以保留。仍具有延长酶活性的蛋白质意味着蛋白质与SEQ ID NO:2编码的蛋白质相比具有至少10%，优选地具有20%，特别优选地具有30%，最特别优选地具有40%的初始酶活性。

此外，SEQ ID NO:1的同系物还意味着，例如，细菌、真菌或植物同系物、截断的序列、具编码和非编码DNA序列的单链DNA或RNA。

SEQ ID NO:1的同系物也意指衍生物，例如，启动子变体。所述核苷酸序列上游的启动子可通过一个或多个核苷酸交换、插入和/或缺失进行修饰，而不损害启动子的功能性或活性。此外，还可以通过修饰启动子的序列或用更高活性的启动子，甚至来自异源生物体的启动子将其完全替换以提高启动子的活性。

此外，本发明的核酸分子可仅包含SEQ ID NO:1中序列的编码区的一部分，例如可用作探针或引物的片段或编码ASE生物活性部分的片段。基于从克隆自绿光等鞭金藻的ASE基因确定的核苷酸序列，可以产生如下探针和引物，所述探针和引物设计为用于鉴定和/或克隆其他细胞类型和生物体中的ASE基因同系物，以及鉴定和克隆来自绿光等鞭金藻或相关物种的ASE同系物。探针/引物一般包含基本纯化的寡核苷酸。寡核苷酸一般包含这样的核苷酸序列区域，该区域可以与SEQ ID NO:1中一段序列的有义链、SEQ ID NO:1中一段序列的反义链或它们的天然突变体中的至少约12，优选地约16，更优选地约25、40、50或75个连续核苷酸在严格的条件下进行杂交。基于SEQ ID NO:1核苷酸序列的引物可用于PCR反应以克隆ASE同系物。基于ASE核苷酸序列的探针可用于检测编码相同或同源蛋白质的转录本或基因组序列。在优选的实施方案中，探针进一步包含与其连接的标记基因，例如标记基因可为放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。该探针可用作基因组标记测试试剂盒的一部分用于鉴定误表达ASE的细胞，如这可通过测定在样本细胞中ASE编码核酸的水平，例如检测ASE mRNA的水平或测定基因组ASE基因是否已突变或缺失来进行。

在一个实施方案中，本发明的核酸分子编码的蛋白质或其部分包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列充分同源的氨基酸序列，这样该蛋白质或其部分维持了参与化合物代谢的能力，其中所述化合物对于微生物或植物中细胞膜的构建或分子跨这些膜的转运是必需的。如此处所应用，术语“充分同源”是指蛋白质或其部分所具有的氨基酸序列包括最小数目的与SEQ ID

NO:2氨基酸序列相同或等价(例如具有与SEQ ID NO:2的一段序列中的氨基酸残基类似的侧链的氨基酸残基)的氨基酸残基,这样该蛋白质或其部分仍能够参与对于微生物或植物中细胞膜的构建或分子的跨膜转运所必需的化合物的代谢。该膜成分代谢途径或膜转运系统中的蛋白质成员,如此处所描述,可对一种或多种精细化学品的产生和分泌起到作用。这些活性的示例也在此作出了描述。这样,ASE的功能可直接地或间接对一种或多种精细化学品的产生、产量和/或生产效率起到作用。ASE催化活性的底物专一性的示例在表2中列出。

在另一实施方案中,本发明核酸分子的衍生物编码与SEQ ID NO:2的完整氨基酸序列的同源性为至少约50-60%,优选地至少约60-70%,且更优选地至少约70-80%、80-90%、90-95%,且最优选地至少约96%、97%、98%、99%或更高的蛋白质。

由本发明的ASE核酸分子编码的蛋白质的部分优选地为所述其中一种ASE的生物活性部分。如此处所应用,术语“ASE的生物活性部分”意在包括ASE中参与如下化合物的代谢或具有表2中列出的活性的部分,例如结构域/基序,其中所述化合物对于微生物或植物中细胞膜的构建或分子的跨膜转运是必需的。为测定ASE或其生物活性部分是否能参与对于微生物或植物中细胞膜的构建或分子的跨膜转运所必需的化合物的代谢,可进行酶活性试验。该试验方法为本领域的技术人员公知,如在实施例8中所描述的。

编码ASE生物活性部分的其它核酸片段可通过分离SEQ ID NO:2中一段序列的一部分、表达ASE的此编码部分或肽(例如通过体外重组表达)并评估此ASE编码部分或肽的活性而得以制备。

本发明进一步包括这样的核酸分子,其由于遗传密码的简并性而区别于SEQ ID NO:1(及其部分)中所示的一段核苷酸序列,且因此与SEQ ID NO:1中显示的核苷酸序列编码相同的ASE。在另一实施方案中,本发明的分离核酸分子具有编码如下蛋白质的核苷酸序列,所述蛋白具有SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列。而在进一步的实施方案中,本发明的核酸分子

编码与SEQ ID NO:2的氨基酸序列(由SEQ ID NO:1中显示的开放阅读框编码)基本同源的全长绿光等鞭金藻蛋白质。

除了SEQ ID NO:1中显示的绿光等鞭金藻 ASE核苷酸序列外,本领域内的技术人员将会理解,可能导致ASE氨基酸序列改变的DNA序列多态性存在于群体内(例如绿光等鞭金藻群体)。由于自然变异,此类ASE基因的遗传多态性可存在于群体内的个体间。如此处所应用,术语“基因”和“重组基因”意指包含编码ASE,优选地编码绿光等鞭金藻的ASE的开放阅读框的核酸分子。此自然变异一般可在ASE基因核苷酸序列中导致1-5%的变化。作为自然变异结果的任何及全部的此类核苷酸变化和导致的ASE氨基酸多态性只要不改变ASE的功能活性均包括在本发明的范围之内。

对应于本发明绿光等鞭金藻 ASE cDNA的天然变体和非绿光等鞭金藻同系物的核酸分子可基于它们与此处公开的绿光等鞭金藻 ASE核酸的同源性,应用绿光等鞭金藻 cDNA或其部分作为杂交探针根据标准杂交技术在严格的杂交条件下分离。相应地,在另一实施方案中,本发明的分离核酸分子长至少15个核苷酸且在严格的条件下可与包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列的核酸分子杂交。在另外的实施方案中,核酸的长度为至少25、50、100、250或更多个的核苷酸。如此处所应用,术语“在严格的条件下杂交”意在描述用于杂交和洗涤的条件,在此条件下彼此同源性为至少60%的核苷酸序列一般仍相互杂交。优选地,在该条件下一般仍彼此杂交的序列具有至少约65%,更优选地至少约70%,且甚至更为优选地至少约75%或更高的同源性。该严格杂交条件在本领域内公知,且可在分子生物学最新方法(*Current Protocols in Molecular Biology*), John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6中查到。严格杂交条件的一个优选的非限定实例为,在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中约45℃杂交,之后在0.2 X SSC、0.1% SDS中在50-65℃下洗涤一或两次。优选地,在严格条件下与SEQ ID NO:1的序列杂交的本发明分离核酸分子与天然存在的核酸分子相对应。如此处所应用,“天然存在的”核酸分子意指该RNA或DNA分子具有出现于自然界中的核

核苷酸序列(例如编码天然蛋白质)。在一个实施方案中,核酸编码天然绿光等鞭金藻 ASE。

除了可存在于群体中的天然ASE序列变体,技术人员还将理解,可通过突变将变化导入SEQ ID NO:1的核苷酸序列中,由此导致所编码的ASE的氨基酸序列发生改变,而又不改变ASE的功能活性。例如,可在SEQ ID NO:1的序列内进行核苷酸替换以导致在非必需氨基酸残基处的氨基酸替换。“非必需”氨基酸残基为ASE的野生型序列(SEQ ID NO:2)中可发生改变但不引起该ASE的活性变化的残基,而“必需”氨基酸残基对ASE的活性是必需的。但是,其他氨基酸残基(例如那些在具有ASE活性的结构域中不保守的或仅为半保守的残基)可能对于活性并非必需,且因此可能适于发生改变而又不引起ASE活性的变化。

因此,本发明的另一方面涉及这样的核酸分子,其所编码的ASE含有对于ASE活性并非必需的修饰氨基酸残基。此ASE的氨基酸序列区别于包含在SEQ ID NO:2中的序列,但保持了此处描述的至少一种ASE活性。在一个实施方案中,分离的核酸分子包含编码蛋白质的核苷酸序列,其中该蛋白质包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少约50%同源的氨基酸序列并能够参与对于绿光等鞭金藻中细胞膜的构建或分子的跨膜转运所必需的化合物的代谢或具有表2中列出的一种或多种活性。优选地,由此核酸分子编码的蛋白质与SEQ ID NO:2中的一段序列的同源性为至少约50-60%,更优选地至少约60-70%,甚至更优选地为至少约70-80%、80-90%、90-95%,且最优选地为至少约96%、97%、98%或99%。

为测定两氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2的一段序列及其突变形式)或两核酸序列的同源百分比,将序列比对(align)用于最佳比较目的(例如可在一个蛋白质或核酸序列内导入缺口(gap)用于达到与另一蛋白质或核酸的最佳比对)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当一个序列(例如SEQ ID NO:2的一段序列)内的一个位置与另一序列(例如选自SEQ ID NO:2的序列的突变形式)内的对应位置被相同氨基酸残基或核苷酸占据,则这两个分子在该位置为同源的(即如此处应用的,氨基

酸或核酸的“同源性”等同于氨基酸或核酸的“同一性”)。两序列间的同源百分比为两序列享有的相同位置的数目的函数(即%同源性=相同位置的数目/总位置数目x100)。

编码与SEQ ID NO:2蛋白质序列同源的ASE的分离核酸分子,可通过在SEQ ID NO:1的核苷酸序列内导入一个或多个核苷酸替换、添加或缺失而产生,这样就可使一个或多个氨基酸替换、添加或缺失得以导入编码的蛋白质中。可通过标准技术,例如定点诱变和PCR介导的诱变将突变导入到SEQ ID NO:1的一段序列或其衍生物中。优选地,在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行保守氨基酸替换。“保守氨基酸替换”为将氨基酸残基用具有类似侧链的氨基酸残基进行替换。具有类似侧链的氨基酸残基家族已在本领域内定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天门冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链(例如甘氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。这样,ASE中的预测的非必需氨基酸残基优选来自相同侧链家族的另一氨基酸残基替换。备选地,在另一实施方案中,突变可沿全部或部分的ASE编码序列随机导入,例如通过饱和诱变的方式导入,然后可就此处描述的ASE活性筛选所产生的突变体以鉴定保留了ASE活性的突变体。在对SEQ ID NO:1的一段序列突变之后,可重组表达编码的蛋白质并应用,例如,此处描述的试验(参见实施例)测定蛋白质的活性。

用于编码酶的基因序列的定向进化和诱变的另一已知技术是基因改组(Stemmer, PNAS 1994, 91: 10747-10751, WO 97/20078和WO 98/13487)。基因改组为用于组合基因片段的方法且可与易错PCR联合以进一步提高所获序列及编码的酶活性的遗传可变性。此方法的一个前提是合适的筛选系统。对于延长酶而言,通过MALDI-TOF、气相色谱-质谱、薄层色谱或液相色谱

谱-质谱或其他合适的方法组合促进的高通量代谢物测量方法可用于监测疏水级分中新化合物或产物的出现。

除了以上描述的编码ASE的核酸分子，本发明的另一方面涉及与包含编码多肽的核苷酸序列的分离核酸反义的反义核酸分子，其中所述多肽可将 α -亚麻酸($C_{18:3}$ d9, 12, 15) 延长至少两个碳原子但不延长 γ -亚麻酸 ($C_{18:3}$ d6, 9, 12)，且所述核苷酸序列选自：

a) 在SEQ ID NO: 1中描述的核酸序列，

b) 编码SEQ ID NO: 2中描述的多肽的核酸序列，

c) SEQ ID NO: 1中所示序列的衍生物，该衍生物编码的多肽与编码SEQ ID NO:2中描述的氨基酸序列的序列具有至少50%的同源性且其序列行使延长酶的功能。

“反义”核酸包含与编码蛋白质的“有义”核酸互补，例如与双链cDNA分子的编码链互补或与mRNA序列互补的核苷酸序列。因此，反义核酸可以与有义核酸形成氢键。本发明反义核酸可与完整的ASE编码链互补，或仅与其部分互补。在一个实施方案中，反义核酸分子与编码ASE的核苷酸序列的编码链的“编码区”反义。术语“编码区”指该核苷酸序列区域包含可翻译为氨基酸残基的密码子(例如完整的编码区开始于且结束于终止密码子，即终止密码子之前的最后一个密码子)。在另一实施方案中，反义核酸分子与编码ASE的核苷酸序列的编码链的“非编码区”反义。术语“非编码区”指位于编码区两侧的不翻译成氨基酸的5'和3'序列(即也称作5'和3'非翻译区)。也可以应用反向重复技术，将反义片段与有义取向的该反义片段的一部分通过接头序列或可切割的内含子连接(第六届国际植物分子生物学会会议书摘(Abstract Book of the 6th Intern. Congr. Of Plant Mol Biol). ISPMB, Quebec 6月18-24,2000, 摘要编号 S20-9, Green等)。

已知编码此处公开的ASE的编码链序列(例如在SEQ ID NO: 1中列出的序列)，本发明的反义核酸可根据Watson和Crick碱基配对原则进行设计。反义核酸分子可与ASE mRNA的整个编码区互补，但更优选地是仅与ASE mRNA的一部分编码或非编码区反义的寡核苷酸。例如，反义寡核苷酸可

与ASE mRNA翻译起始位点周围的区域互补。反义寡核苷酸的长度可为，例如，约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50及更多个核苷酸。本发明的反义核酸可应用本领域内已知的方法应用化学合成和酶促连接反应进行构建。例如，反义核酸(例如反义寡核苷酸)可应用天然存在的核苷酸或各种修饰核苷酸进行化学合成，所述修饰核苷酸设计为用于增加分子的生物学稳定性或增加反义和有义核酸间形成的双链体的物理稳定性，例如可应用硫逐磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸。可用于产生反义核酸的修饰核苷酸的实例包括5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-羧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶核苷、5-羧基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖苷queosine、次黄苷、 N^6 -异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基次黄苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、 N^6 -腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖苷queosine、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基- N^6 -异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、queosine、2-硫代胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶、(acp3)w和2,6-二氨基嘌呤。备选地，反义核酸可应用表达载体进行生物制备，所述载体中已经以反义向亚克隆了一段核酸(即，来自插入核酸的RNA转录本对于目的靶核酸将是反义方向的，这将在下面的分部分中进一步描述)。

一般将本发明的反义核酸分子施用给细胞或使其原位产生，以便其可以杂交或结合编码ASE的细胞mRNA和/或基因组DNA，由此通过如抑制转录和/或翻译来抑制该蛋白质的表达。杂交方式可以通过常规的核苷酸互补形成稳定双链体，或，例如，对于与DNA双链体结合的反义核酸分子，可以是在双螺旋大沟处的特异相互作用。可修饰反义分子，以使它特异结合所选细胞表面表达的受体或抗原，例如，可以将反义核酸分子与结合细

胞表面受体或抗原的肽或抗体连接。也可使用下文中所述的载体将反义核酸分子递送至细胞中。为了获得足够的胞内反义分子浓度，优选其中反义核酸分子被置于强的原核、病毒或真核启动子(包括植物启动子)控制下的载体构建体。

在另一实施方案中，本发明的反义核酸分子为异核酸(anomeric nucleic acid)分子。异核酸分子与互补RNA形成特异的双链杂合体，杂合体中两条链走向相互平行，这与通常的单元不同(Gaultier等人(1987)，核酸研究(Nucleic Acids Res) 15:6625-6641)。反义核酸分子也可包含2'-O-甲基核糖核苷酸(Inoue等人(1987)，核酸研究(Nucleic Acids Res) 15:6131-6148)或嵌合RNA-DNA类似物(Inoue等人(1987)，FEBS Lett 215:327-330)。

又在另一实施方案中，本发明的反义核酸为核酶。核酶为具有核糖核酸酶活性能够剪切单链核酸如mRNA的催化RNA分子，其中所述单链核酸具有与核酶互补的区域。这样，核酶(例如，锤头状核酶(在Haselhoff和Gerlach(1988)，自然(Nature) 334:585-591)中描述)可用于催化剪切ASE mRNA转录本，由此抑制ASE mRNA的翻译。对编码ASE的核酸具有特异性的核酶可基于此处SEQ ID NO: 1中公开的ASE cDNA的核苷酸序列或基于本发明方法分离的异源序列进行设计。例如，可构建四膜虫L-19 IVS RNA的衍生物，其中活性位点的核苷酸序列与编码ASE的mRNA中的待剪切核苷酸序列互补。见，例如Cech等人，美国4,987,071和Cech等人，美国5,116,742。或者，可应用ASE mRNA从RNA分子库中选择具有特异核糖核酸酶活性的催化RNA，参见例如，Bartel, D.和Szostak, J.W. (1993) 科学(Science) 261:1411-1418。

或者，ASE基因表达可通过如下方式抑制，即，使核苷酸序列定向互补于ASE核苷酸序列的调节区(如ASE启动子和/或增强子)以形成三股螺旋结构来阻止ASE基因在靶细胞中转录。通常参见Helene, C. (1991) 抗癌药物设计(Anticancer Drug Des) 6(6): 569-84; Helene, C.等人(1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; 和Maher, L.J. (1992) Bioassays 14(12):807-15。

B. 基因构建体

本发明的另一实施方案为新基因构建体,其包含源自植物的所编码的多肽可将 α -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}9, 12, 15}$)延长至少两个碳原子但不延长 γ -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}6, 9, 12}$)的分离核酸,或包含SEQ ID NO:1的基因序列,如以上定义的共同系物、衍生物或类似物,其中,所述核酸或序列已功能性地连接一个或多个调控信号以利于增强基因表达。这些调控序列的示例为诱导物或阻遏物所结合且因此调节核酸表达的序列。除了这些新调控序列,位于实际结构基因前面的天然调控序列仍可存在,并且在适宜时,可通过遗传修饰以关闭此天然调控并增强基因的表达。但是,基因构建体也可具有较简单的结构,也就是说在SEQ ID NO:1序列或其同系物前不插入额外调控序列,且缺失天然启动子及其调控作用。相反,可突变天然调控序列以使调控不再发生并增强基因表达。基因构建体可额外有利地包含一个或多个功能性地与启动子连接的所谓增强子序列,这将使得核酸序列表达增强成为可能。也可以在DNA序列的3'端插入额外的有利序列,例如其它的调控元件或终止子。延长酶基因可在基因构建体中以一个或多个拷贝存在。此基因构建体中还可以存在额外的基因,这对于将这些额外的基因插入到生物体中是有利的。

用于此新方法的有利调控序列存在于如启动子例如cos-、tac-、trp-、tet-、trp-tet-、lpp-、lac-、lpp-lac-、lacI^q、T7-、T5-、T3-、gal-、trc-、ara-、SP6-、 λ -P_R-或 λ -P_L-启动子中并方便地用于革兰氏阴性细菌。其它有利的调控序列存在于,例如,革兰氏阳性启动子amy和SPO2、酵母或真菌启动子ADC1、MF α 、AC、P-60、CYC1、GAPDH、TEF、rp28、ADH或植物启动子CaMV/35S[Franck等,细胞(Cell) 21 (1980) 285-294]、PRP1[Ward等,植物分子生物学(Plant. Mol. Biol.) 22 (1993)]、SSU、OCS、lib4、usp、STLS1、B33、nos或泛素或菜豆蛋白启动子中。在此方面同样有利的为诱导型启动子,如在EP-A-0 388 186(苯磺酰胺诱导型),植物杂志(Plant J.) 2, 1992: 397-404(Gatz等,四环素诱导),EP-A-0 335 528(脱落酸

诱导)或WO 93/21334 (乙醇或或环己烯醇诱导)中描述的启动子。另外的有用植物启动子为马铃薯胞质FBPase启动子或ST-LSI启动子(Stockhaus 等, EMBO J. 8, 1989, 2445)、大豆(*Glycine max*)的磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶启动子(Genbank登录号U87999)或在EP-A-0 249 676中描述的结节特异性启动子。特别有利的启动子为允许在参与脂肪酸生物合成的组织中表达的启动子。最有利的为种子特异性启动子,例如usp-、LEB4-、菜豆蛋白或napin启动子。另外的特别有利的启动子为可用于单子叶植物或双子叶植物的种子特异性启动子,见US 5,608,152(来自菜籽油菜的napin 启动子)、WO 98/45461(来自拟南芥属 (*Araobidopsis*) 的菜豆蛋白启动子)、US 5,504,200(来自菜豆 (*Phoaseolus vulgaris*) 的菜豆蛋白启动子)、WO 91/13980(来自芸苔属 (*Brassica*) 的Bce4启动子), Baeumlein等, 植物杂志 (*Plant J.*), 2, 2, 1992: 233-239(来自豆类的LEB4启动子); 所述启动子可用于双子叶植物。在单子叶植物中例如以下启动子是有用的: 来自大麦的lpt-2-或lpt-1-启动子(WO 95/15389和WO 95/23230)、来自大麦的大麦醇溶蛋白启动子和在WO 99/16890中描述的其他有用启动子。

原则上,所有天然启动子及其调控序列,如以上提及的那些均可用于此新方法。应用合成启动子也是可能和有利的。

如以上所描述,基因构建体也可包含将要插入到生物体中的其它基因。在宿主生物体中插入和表达调控基因,如编码诱导物、阻遏物或酶(通过其酶活性干预调节)的基因,或生物合成途径中一种或多种或全部的基因也是可能和有利的。这些基因在来源上可为异源的或同源的。插入的基因可具有自身的启动子或可在SEQ ID NO:1或其同系物的启动子控制之下。

为表达其他存在的基因,基因构建体可以有利地包含额外的3'和/或5'末端调控序列以增强表达,这些末端调控序列可根据选择的宿主生物体和基因或多种基因因为达到最佳表达而进行选择。

如以上所述,这些调控序列意在使基因和蛋白质可进行特异表达。根据宿主生物体,这可意味着,例如仅在诱导后基因才表达或过表达,或基因立即表达和/或过表达。

而且，调控序列或因子可优选地对导入基因的表达具有有益的影响，且因此增强其表达。因此，对于调控元件，通过应用强转录信号，例如启动子和/或增强子，可以在转录水平上获得有利的增强。但是，此外，也可以通过例如提高mRNA的稳定性来增强翻译。

此外，本发明的基因构建体优选地包含不同生化途径的其它基因，例如用于维生素、类胡萝卜素，糖如单糖、寡糖或多糖合成的基因，或脂肪酸生物合成基因，更优选地基因构建体包含脂肪酸生物合成基因如去饱和酶、羟化酶、酰基-ACP-硫酯酶、延长酶、acetylenase、合酶或还原酶，如 $\Delta 19$ -、 $\Delta 17$ -、 $\Delta 15$ -、 $\Delta 12$ -、 $\Delta 9$ -、 $\Delta 8$ -、 $\Delta 6$ -、 $\Delta 5$ -、 $\Delta 4$ -去饱和酶、羟化酶、延长酶、 $\Delta 12$ -acetylenase、酰基-ACP-硫酯酶、 β -酮酰基-ACP-合酶或 β -酮酰基-ACP-还原酶。优选地，基因构建体包含选自以下的脂肪酸生物合成基因： $\Delta 19$ -、 $\Delta 17$ -、 $\Delta 15$ -、 $\Delta 12$ -、 $\Delta 9$ -、 $\Delta 8$ -、 $\Delta 6$ -、 $\Delta 5$ -、 $\Delta 4$ -去饱和酶、羟化酶、延长酶、 $\Delta 12$ -acetylenase、酰基-ACP-硫酯酶、 β -酮酰基-ACP-合酶或 β -酮酰基-ACP-还原酶。

C. 重组表达载体和宿主细胞

本发明的另一方面涉及包含编码ASE(或其部分)的核酸的载体，优选表达载体。如此处所用，术语“载体”是指这样的核酸分子，其可转运与其连接的另一核酸。一种类型的载体为“质粒”，是指其中可连接其它DNA片段的环状双链DNA环。另一种类型的载体为病毒载体，其中可将其它DNA片段连接入病毒基因组中。某些载体可在它们所导入的宿主细胞中自主复制(例如，具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其它载体(例如，非游离型哺乳动物载体)在导入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组中，并因此随着宿主基因组一起复制。而且，某些载体可指导与它们操作性连接的基因的表达。此类载体此处称为“表达载体”。一般，用于重组DNA技术中的表达载体通常为质粒形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换使用，因为质粒是最经常使用的载体形式。但是，本发明旨在包

括起到等同作用的其它形式的表达载体，如病毒载体(例如，复制缺陷型反转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

本发明的重组表达载体包含至少一个本发明的核酸或至少一个本发明的基因构建体，所述核酸和基因构建体为适于在宿主细胞中实现核酸表达的形式，这意味着重组表达载体包括基于用于表达的宿主细胞选择的一个或多个调控序列，其中所述调控序列可操作地连接待表达的核酸序列。在重组表达载体内，“可操作地连接”意指目的核苷酸序列与调控序列的连接方式将允许此核苷酸序列表达，且这些序列的彼此融合将使两序列完成预定的功能(所述功能归因于所应用的序列)(例如在体外转录/翻译系统中或当载体导入到宿主细胞时在宿主细胞中)。术语“调控序列”意在包括启动子、增强子和其他表达调控元件(例如多聚腺苷酸化信号)。此类调控序列描述在，例如，Goeddel; 基因表达技术：酶学方法(Gene Expression Technology: Methods in Enzymology) 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)中或可参见：Gruber和Crosby, 植物分子生物学和生物技术方法(in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology), CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick和Thompson, 第七章, 89-108, 包括其中参考文献。调控序列包括可在多种类型的宿主细胞中指导核苷酸序列组成型表达的序列以及仅在某些宿主细胞中在某些条件下指导核苷酸序列直接表达的序列。本领域内的技术人员将会理解，表达载体的设计可取决于多种因素，如待转化细胞的选择、所需蛋白质的表达水平，等。本发明的表达载体可导入到宿主细胞中以由此产生由此处描述的核酸编码的蛋白质或肽，包括融合蛋白质或肽(例如ASE、ASE的突变形式、融合蛋白质，等)。

本发明的重组表达载体可设计用于在原核或真核细胞中表达ASE。例如，ASE基因可在细菌细胞如谷氨酸棒状杆菌(*C. glutamicum*)、昆虫细胞(使用杆状病毒表达载体)、酵母和其它真菌细胞(参见Romanos, M.A.等人(1992)“在酵母中外源基因的表达：综述：(“Foreign gene Expression in yeast: a review”)，酵母(Yeast) 8: 423-488; J.W. Bennet & L.L. Lasure编辑的《更多的用于真菌的基因操作》(More Gene Manipulations in

Fungi), Academic Press: San Diego一书中的van den Hondel, C.A.M.J.J.等人(1991)“丝状真菌中的异源基因表达”, 396-428页; 以及Peberdy, J.F.等人编辑的《真菌的应用分子遗传学》(Applied Molecular Genetics of Fungi), Cambridge University Press: Cambridge一书中的van den Hondel, C.A.M.J.J.和Punt, P.J. (1991)“丝状真菌的基因转移体系和载体开发”, 1-28页)、藻类(Falciatore等, 1999, 海洋生物技术(Marine Biotechnology).1, 3:239-251)、各种纤毛虫: 全毛亚纲(Holotrichia)、缘毛亚纲(Peritrichia)、旋唇亚纲(Spirotrichia)、吸管亚纲(Suctoria)、四膜虫属(Tetrahymena)、草履虫属(Paramecium)、豆形虫属(Colpidium)、瞬目虫属(Glaucoma)、匙口虫属(Platyophrya)、Potomacus、Pseudocohnilembus、游仆虫属(Euplotes)、Engelmaniella和棘尾虫属(Stylonychia), 特别是Stylonychia lemnae(使用载体按照WO9801572中的转化方法实现)和多细胞植物细胞(参见Schmidt, R.和Willmitzer, L. (1988)“根癌农杆菌介导的拟南芥叶和子叶外植体的高效转化”, 植物细胞报道(Plant Cell Rep.): 583-586; 植物分子生物学和生物技术(Plant Molecular Biology and Biotechnology), C. Press, Boca Raton, Florida, 6/7章, 71-119页 (1993); F.F. White, B. Jeness等, 基因转移技术, “转基因植物”第一卷, 工程和利用(Engineering and Utilization), eds.:Kung和R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225(及其中引用的参考文献)、或哺乳动物细胞中表达。合适的宿主细胞在Goeddel, 基因表达技术: 酶学方法(Gene Expression Technology: Methods in Enzymology) 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)中进一步进行了讨论。或者, 可体外转录并翻译重组表达载体, 如使用T7启动子调控序列和T7聚合酶。

在原核生物中蛋白质的表达最经常用含有组成型或诱导型启动子的载体进行, 以指导融合或非融合蛋白表达。融合载体将一些氨基酸添加至其中的编码蛋白质上, 通常添加至重组蛋白的氨基末端, 但也可添加至C-末端或融合至蛋白质的合适区域内。此类融合载体一般具有三种目的: 1)

用于增加重组蛋白的表达; 2) 用于增加重组蛋白的溶解性; 和3) 在亲和纯化中作为配体而利于重组蛋白的纯化。通常, 在融合表达载体中, 于融合部分和重组蛋白的连接处导入蛋白酶剪切位点, 这使得在该融合蛋白纯化后可将重组蛋白与融合部分分离。此类酶和它们的对应识别序列包括Xa因子、凝血酶和肠激酶。

典型的融合表达载体包括pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. 和Johnson, K.S. (1988) 基因 (Gene) 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA)和pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), 它们分别将谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白或蛋白A结合至靶重组蛋白上。在一个实施方案中, 将延长酶ASE的编码序列克隆入pGEX表达载体, 以产生编码融合蛋白的载体, 该蛋白从N-末端至C-末端包含GST-凝血酶切割位点-X蛋白。该融合蛋白可以使用谷胱甘肽-琼脂糖树脂通过亲和层析纯化。通过用凝血酶切割该融合蛋白可回收未与GST融合的重组ASE。

适宜的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的示例包括pTrc(Amann等, (1988)基因(Gene)69:301-315)和pET 11d(Studier等, 基因表达技术: 酶学方法(Gene Expression Technology: Methods in Enzymology) 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89)。从pTrc载体表达靶基因依赖于宿主RNA聚合酶从杂合trp-lac融合启动子的转录。从pET 11d载体表达靶基因依赖于共表达的病毒RNA聚合酶(T7 gn1)介导的从T7 gn10-lac融合启动子的转录。该病毒聚合酶可以由宿主菌株BL21(DE3)或HMS174(DE3)中居住的、具有位于lacUV 5启动子转录调控下的T7 gn1基因的 λ 原噬菌体提供。

可用于原核生物体的其它载体为本领域内的技术人员公知; 此类载体为, 例如, 用于大肠杆菌的pLG338、pACYC184、pBR系列如pBR322、pUC系列如pUC18或pUC19、M113mp系列、pKC30、pRep4、pHS1、pHS2、pPLc236、pMBL24、pLG200、pUR290、pIN-III¹¹³-B1、 λ gt11或pBdCI, 用于链球菌 (Streptomyces) 中的pIJ101、pIJ364、pIJ702或pIJ361, 用于

芽孢杆菌 (*Bacillus*) 中的pUB110、pC194或pBD214, 用于棒状杆菌中的pSA77或pAJ667。

使重组蛋白表达最大化的一个策略是在蛋白水解切割重组蛋白质的能力受损的宿主细菌中表达蛋白质(Gottesman, S., 基因表达技术: 酶学方法 (Gene Expression Technology: Methods in Enzymology) 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128)。另一策略是改变欲插入表达载体中的核酸的核酸序列, 使编码每一氨基酸的各密码子为选择用于表达的细菌如谷氨酸棒状杆菌所优选使用的密码子(Wada等人(1992) 核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 20:2111-2118)。本发明核酸序列的此改变可应用标准的DNA合成技术实施。

在另一实施方案中, ASE表达载体为酵母表达载体。用于在酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中表达的载体的示例包括pYepSec1(Baldari,等, (1987) *Embo J.* 6:229-234)、pMFa (Kurjan 和 Herskowitz, (1982) 细胞 (Cell) 30:933-943)、pJRY88 (Schultz等, (1987) 基因 (Gene) 54:113-123)和pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)。适用于其他真菌(例如丝状真菌)的载体和载体构建方法包括在以下文献中详细描述的那些: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991)发展用于丝状真菌的基因转移系统和载体, 《实用真菌分子遗传学》(Applied Molecular Genetics of Fungi), J.F. Peberdy, 等编, 1-28页, Cambridge University Press: Cambridge, 或《真菌的更多基因操作》(More Gene Manipulations in Fungi) [J.W. Bennet & L.L. Lasure, 编, p. 396-428: Academic Press: San Diego]。另外的有用的酵母载体为, 例如2 μ M、pAG-1、YEp6、YEp13或pEMBLYe23。

备选地, 本发明的ASE可应用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中表达。现有可用于在培养的昆虫细胞(例如Sf 9细胞)中表达蛋白质的杆状病毒载体包括pAc系列(Smith 等 (1983) 分子细胞生物学 (Mol. Cell Biol). 3:2156-2165) 和 pVL 系列 (Lucklow 和 Summers (1989) 病毒学 (Virology) 170:31-39)。

以上提到的载体仅为可能有用载体的一个小的统览。另外的质粒为本领域内的技术人员公知并在例如克隆载体(Cloning Vectors)中描述(编Pouwels P.H. 等 Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018)。

在另一实施方案中,本发明的核酸应用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达。哺乳动物表达载体的示例包括pCDM8(Seed, B. (1987) 自然(Nature) 329:840)和pMT2PC (Kaufman 等 (1987) EMBO J. 6:187-195)。当用于哺乳动物细胞时,表达载体的控制功能通常由病毒调控元件提供。例如,通常应用的启动子源自多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒和猿猴病毒40。其他适用于原核和真核细胞的适宜表达系统参见Sambrook, J., Fritsh, E. F.,和Maniatis, T. 分子克隆: 实验室指南2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989的第16和17章。

在另一实施方案中,重组哺乳动物表达载体能够指导核酸优选地在特定细胞类型中表达(例如可使用组织特异性调控元件表达核酸)。组织特异性调控元件在本领域内公知。合适的组织特异性启动子的非限定示例包括白蛋白启动子(肝脏特异的; Pinkert 等 (1987) *Gene Dev.* 1:268-277)、淋巴特异性启动子(Calame和Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275)、特别是T细胞受体启动子(Winoto和Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733)和免疫球蛋白启动子(Banerji 等 (1983) *细胞(Cell)* 33:729-740; Queen和Baltimore (1983) *细胞(Cell)* 33:741-748)、神经元特异性启动子(例如神经丝启动子; Byrne和Ruddle (1989) *PNAS* 86:5473-5477)、胰腺特异性启动子(Edlund 等 (1985) *科学(Science)* 230:912-916)和乳腺特异性启动子(例如奶乳清启动子; U.S.专利号4,873,316和欧洲专利申请出版号No. 264,166)。也包括发育调节的启动子,例如鼠hox启动子(Kessel和Gruss (1990) *科学(Science)* 249:374-379)和甲胎蛋白启动子(Campes和Tilghman (1989) *Gene Dev.* 3:537-546)。

在另一实施方案中，本发明的ASE可在单细胞植物细胞中表达(例如藻类)，参见Falciatore 等，1999，海洋生物技术(Marine Biotechnology).1 (3):239-251及其中参考文献，以及可在来自高等植物的植物细胞(例如种子植物，如作物植物)中表达。植物表达载体的示例包括在以下文献中详细描述的那些：Becker, D., Kemper, E., Schell, J.和Masterson, R. (1992) “邻近左边界具有选择标记的新型植物二元载体”，植物分子生物学(Plant Mol. Biol.) 20: 1195-1197；和Bevan, M.W. (1984) “用于植物转化的二元农杆菌载体”，核酸研究(Nucl. Acid. Res.) 12: 8711-8721；用于高等植物中基因转移的载体，“转基因植物”，第一卷，工程和应用，编：Kung 和R. Wu, Academic Press, 1993, p. 15-38。

植物表达盒子优选含有能够驱动基因在植物细胞内表达的调控序列，所述调控序列进行可操作连接以使每一序列均能够完成其功能，例如终止转录，例如多聚腺苷酸化信号。优选的多聚腺苷酸化信号为那些源自根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) T-DNA，例如源自Ti-质粒pTiACH5中称为章鱼碱合酶的基因3(Gielen等, EMBO J. 3 (1984), 835 ff) 的信号或其功能等价物，但所有其他在植物中具有功能活性的启动子也是适宜的。

由于植物基因表达经常并非在转录水平上受限，故植物表达盒子优选含有其他可操作连接的序列如翻译增强子，例如含有来自烟草花叶病毒的5' -非翻译前导序列的过驱动序列，以提高蛋白质/RNA比率(Gallie等 1987, 核酸研究(Nucl. Acids Research)15: 8693-8711)。

植物基因表达必须可操作地与合适的启动子连接，以使基因可以以时间、细胞或组织特异的方式表达。优选的启动子为驱动组成型表达的启动子(Benfey等, EMBO J. 8 (1989) 2195-2202)，如那些源自植物病毒的启动子如35S CaAMV(Franck等, 细胞(Cell) 21 (1980) 285-294)、19S CaMV(也参见US 5,352,605和WO 84/02913)或植物启动子如在US 4,962,028中描述的来自核酮糖二磷酸羧化-加氧酶小亚基的启动子。另外，vATPase-基因启动子，例如来自甜菜 (*Beta vulgaris*) 的1153个碱基对的片段(植物分子生物

学(*Plant Mol Biol*), 1999, 39:463-475)也可用于驱动ASE基因单独地或与其他PUFA生物合成基因联合地表达。

其他优选用于植物基因表达盒子中进行可操作连接的序列为指导基因产物进入其适宜的细胞区室所必需的靶向序列(综述参见Kermode, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 4 (1996), 285-423及其引用的参考文献), 所述细胞区室如液泡、细胞核、各种质体如造粉体、叶绿体、色质体、胞外间隙、线粒体、内质网、油体、过氧化物酶体和其他植物细胞区室。

植物基因也可通过化学诱导启动子促进表达(综述参见Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89-108)。如果需要基因表达以时间特异的方式发生, 化学诱导启动子是特别适宜的。此启动子的示例为水杨酸诱导启动子(WO 95/19443)、四环素诱导启动子(Gatz等, (1992) 植物杂志(*Plant J.*) 2, 397-404)和乙醇诱导启动子(WO 93/21334)。

对生物或非生物胁迫条件产生应答的启动子也为适宜的启动子, 例如病原体诱导PRP1-基因启动子(Ward等, 植物分子生物学(*Plant. Mol. Biol.*) 22 (1993), 361-366)、来自番茄的热诱导hsp80-启动子(US 5,187,267)、来自马铃薯的冷诱导 α -淀粉酶启动子(WO 96/12814)或创伤诱导pinII-启动子(EP-A-0 375 091)。

那些使基因在发生脂类和油类生物合成的组织和器官中、在种子细胞如胚乳细胞和发育的胚中表达的启动子为特别优选的启动子。适宜的启动子为来自菜籽油菜的napin-基因启动子(US 5,608,152)、来自蚕豆的USP-启动子(Baeumlein 等, *Mol Gen Genet*, 1991, 225 (3):459-67)、来自拟南芥属的油质蛋白启动子(WO 98/45461)、来自菜豆的菜豆蛋白启动子(US 5,504,200)、来自芸苔属的Bce4-启动子(WO 91/13980)或豆球蛋白B4启动子(LeB4; Baeumlein等, 1992, 植物杂志(*Plant Journal*), 2 (2):233-9)以及使基因在单子叶植物(如玉米、大麦、小麦、黑麦、水稻等)中发生种子特异性表达的启动子。值得注意的适宜启动子为来自大麦的lpt2或lpt1-基因启动子(WO 95/15389和WO 95/23230)或在WO 99/16890中描述的启动子(来自大麦的大麦醇溶蛋白基因、水稻的谷蛋白基因、水稻的oryzin基因、水

稻的谷醇溶蛋白基因、小麦的麦醇溶蛋白基因、小麦的谷蛋白基因，玉米的玉米醇溶蛋白基因、燕麦的谷蛋白基因、高粱的kasirin基因、黑麦的裸麦醇溶蛋白（secalin）基因的启动子）。

因为质体为脂类生物合成的前体和一些终产物进行合成的区室，故可赋予质体特异性基因表达的启动子也为特别适宜的启动子。适宜的启动子如在WO 95/16783和WO 97/06250中描述的病毒RNA聚合酶启动子，以及在WO 99/46394中描述的来自拟南芥属的clpP-启动子。

本发明还提供了含本发明的DNA分子的重组表达载体，其中该DNA分子以反义方向克隆在表达载体中。也就是，DNA分子可操作地连接到调控序列上，该连接方式使得可以表达产生与PSE mRNA反义的RNA分子(通过转录该DNA分子)。可以对可操作地连接反义方向克隆的核酸的调控序列进行选择以指导反义RNA分子在多种细胞类型中持续表达，例如，可选择病毒启动子和/或增强子或调控序列以指导反义RNA实现组成型、组织特异性或细胞类型特异性表达。反义表达载体的形式可为重组质粒、噬菌粒或减毒病毒，其中在高效调控区域的控制下产生反义核酸，其活性由载体所导入的细胞的类型决定。利用反义基因进行的基因表达调控的讨论见Weintraub, H.等人，反义RNA作为遗传分析的分子工具，Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986 和 Mol等人，1990, FEBS Letters 268:427-430。

本发明的另一方面涉及已导入本发明的重组表达载体的宿主细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在此处可互换使用。应当理解，该术语不仅指特定的受试细胞，也指该细胞的后代或潜在后代。由于突变或环境影响在传代过程中可发生某些改变，这样，后代实际上不可能与亲代细胞相同，但其仍包括在此处所用术语的范围之内。

宿主细胞可为任何的原核或真核细胞。例如，ASE可在细菌细胞例如棒状杆菌、昆虫细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS 细胞)、藻类、纤毛虫、植物细胞、真菌或其他微生物如棒状杆菌中表达。其他适宜的宿主细胞为本领域内的技术人员公知。

载体DNA可通过常规转化或转染技术导入原核或真核细胞中。如此处所用，术语“转化”和“转染”、“接合”和“转导”意指本领域内公知的各种将外源核酸(例如，DNA)导入宿主细胞的技术，包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖-介导的转染、脂转染、天然感受态、化学介导的转移或电穿孔。转化或转染宿主细胞(包括植物细胞)的合适方法可参见Sambrook等人(分子克隆：实验室手册第二版，Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)和其它的实验室手册，例如分子生物学方法(Methods in Molecular Biology), 1995, 44卷，农杆菌方法(Agrobacterium protocols), 编：Gartland和Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey。

对于哺乳动物细胞的稳定转染，已知根据应用的表达载体和转染技术，仅一小部分的细胞可将外源DNA整合到基因组中。为鉴定和筛选整合体，一般将编码选择标记的基因(如抗生素抗性基因)与目的基因一同导入宿主细胞。优选的选择标记包括那些可赋予抗药性的标记，所述药物如潮霉素和氨基蝶呤，或在植物中，那些可赋予除草剂抗性的标记，所述除草剂如咪唑啉酮类化合物、磺酰脲类化合物、草甘膦或草胺膦(glufosinate)。编码选择标记的核酸可与编码ASE的基因位于同一载体上被导入宿主细胞中或可以位于不同的载体上导入。被导入的核酸稳定转染的细胞可通过例如药物筛选进行鉴定(例如，掺入了选择标志基因的细胞将存活，而其他细胞死亡)。

为生成同源重组微生物，制备出含至少部分ASE基因的载体，所述部分ASE基因中已经导入缺失、添加或替代因而可以改变(如功能性破坏)ASE基因。优选地，该ASE基因为绿光等鞭金藻ASE基因，但也可为来自相关植物或甚至来自藻类、哺乳动物、酵母或昆虫的同系物。在一个优选的实施方案中，载体设计为在同源重组后可功能性破坏内源ASE基因(即，不再编码功能蛋白质；也称为“敲除”载体)。或者，载体可设计为在同源重组后使内源ASE基因发生突变或改变但仍编码功能蛋白质(例如，可改变上游调控区域由此改变内源ASE的表达)。为通过同源重组产生点突变，也

可应用称作嵌合修复术(chimeraplasty)的DNA-RNA杂合体,参考Cole-Strauss等1999,核酸研究(Nucleus Research)27(5):1323-1330和Kmiec,基因治疗(Gene therapy).1999,美国科学家(American Scientist).87(3):240-247。

在同源重组载体内,改变的ASE基因部分被ASE基因的其它核酸在其5'和3'端两侧包围,以允许在载体携带的外源ASE基因和微生物或植物的内源ASE基因间发生同源重组。此其它的侧翼ASE核酸的长度应足以使和内源基因间的同源重组能成功地进行。一般地,将几百到几千碱基对的侧翼DNA(位于5'和3'末端)包括在载体内(参见例如用于描述同源重组载体的Thomas, K.R.,和Capecchi, M.R. (1987) 细胞(Cell) 51: 503或用于描述在绿光等鞭金藻中基于cDNA的重组的Strepp等,1998,PNAS,95(8):4368-4373)。可以应用本领域已知的技术,将载体导入到微生物或植物细胞中(例如通过农杆菌介导的基因转移、生物轰击、聚乙二醇或其他适用的方法)且筛选出导入的基因与内源ASE基因发生同源重组的细胞。对于植物细胞,AHAS基因(在Ott等,分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)1996,263:359-360中描述)特别适合用于标记基因表达和抗咪唑啉酮或磺酰脲类除草剂的抗性。

在另一实施方案中,产生的重组生物体,如微生物可含有允许对导入基因的表达实施调控的所选系统。例如,在载体中包含ASE基因将其置于乳糖操纵子的控制下,使得ASE基因仅在存在IPTG时表达。此类调控系统为本领域熟知。重组生物体意指这样的生物体,其在细胞内或基因组内于非“天然”位置或以一种非天然的方式进行了修饰的“天然”位置包含本发明的核酸序列、基因构建体或载体;这意味着编码序列被修饰和/或调控序列被修饰。修饰的意思是单核苷酸或一个或多个密码子与天然序列相比发生了改变,优选地为一个或多个密码子,更优选地为一到六个密码子改变。

本发明的宿主细胞(如培养的原核或真核宿主细胞)可用于产生(即表达)ASE。此外,在植物中可应用备选的方法,通过电穿孔或农杆菌介导的

基因转移直接将DNA转移到发育的花中。因此，本发明还提供了使用本发明的宿主细胞来产生ASE的方法。在一个实施方案中，该方法包括在适宜的培养基中培养本发明的宿主细胞(其中已导入了编码ASE的重组表达载体，或其基因组中已导入了编码野生型或改变的ASE的基因)，直至产生ASE。在另一实施方案中，该方法还包括从培养基或宿主细胞分离ASE。

原则上所有原核或真核生物体都为适于接受本发明核酸、新基因构建体或本发明载体的宿主细胞。方便应用的宿主生物体为例如细菌、真菌、酵母、动物或植物细胞。其它有利生物体为动物或优选地为植物或其部分。优选使用真菌、酵母或植物，特别优选真菌或植物，极为特别优选植物如含有大量脂类化合物的油籽植物如菜籽油菜、月见草、canola、花生，亚麻籽、大豆、红花、向日葵、琉璃苣，或植物如玉米、小麦、黑麦、燕麦、黑小麦、水稻、大麦、棉花、木薯、胡椒、万寿菊，茄属植物如马铃薯、烟草、茄子和番茄，野豌豆属物种，豌豆，苜蓿，灌木植物(咖啡、可可、茶)，柳属物种，树(油椰、椰子)和多年生草及饲料作物。本发明特别优选的植物为油籽植物如大豆、花生、菜籽油菜、canola、向日葵、红花、树(油椰、椰子)。

D. 分离的ASE

本发明的另一方面涉及分离的ASE及其生物活性部分。当通过重组DNA技术产生时，“分离的”或“纯化的”蛋白质或其生物活性部分基本上不含有细胞物质，或当通过化学合成时，“分离的”或“纯化的”蛋白质或其生物活性部分基本上不含有化学前体或其他化学物质。术语“基本上不含有细胞物质”包括这样的ASE制品，其中该蛋白质与细胞的细胞性成分分离，所述细胞为天然或重组产生该蛋白质的细胞。在一个实施方案中，术语“基本上不含有细胞物质”包括这样的ASE制品，其含少于约30%(按干重计)的非ASE(在此也称为“污染蛋白质”)，更优选地少于约20%的非ASE，且更优选地少于约10%的非ASE，以及最优选地少于约5%的非ASE。当重组产生ASE或其生物活性部分时，还优选其基本上不含有培养基，即，培养基在

蛋白质制品中所占有的体积小于20%，更优选地小于10%，且最优选地小于约5%。术语“基本上不含有化学前体或其他化学物质”包括这样的ASE制品，其中蛋白质从参与蛋白质合成的化学前体或其他化学物中分离出来。在一个实施方案中，术语“基本上不含有化学前体或其他化学物质”包括这样的ASE制品，其具有少于约30%(按干重计)的化学前体或非ASE化学物质，更优选地少于约20%的化学前体或非ASE化学物质，且更优选地少于约10%的化学前体或非ASE化学物质，且最优选地少于约5%的化学前体或非ASE化学物质。在优选的实施方案中，分离的蛋白质或其生物活性部分缺少与ASE来自同一生物体的污染蛋白质。一般，此类蛋白质通过非绿光等鞭金藻的其它植物或微生物如谷氨酸棒状杆菌或纤毛虫、藻类或真菌中重组表达如绿光等鞭金藻的ASE而产生。

本发明的分离ASE或其部分可参与化合物的代谢或具有一种或多种在表2中列出的活性，其中所述化合物参与绿光等鞭金藻中的细胞膜构建或参与分子跨这些膜的转运。在优选的实施方案中，蛋白质或其部分包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列充分同源的氨基酸序列，以致该蛋白质或其部分维持参与化合物代谢的能力，所述化合物对于绿光等鞭金藻中的细胞膜构建或分子的跨膜转运是必需的。蛋白质部分优选地为此处描述的生物活性部分。在另一优选的实施方案中，本发明的ASE具有在SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列。在另一优选的实施方案中，ASE具有如下核苷酸序列所编码的氨基酸序列，所述核苷酸可以与SEQ ID NO:1的核苷酸序列杂交，例如在严格的条件下杂交。在另一优选的实施方案中，ASE具有如下核苷酸序列所编码的氨基酸序列，所述核苷酸序列与SEQ ID NO:2的一段氨基酸序列有至少约50-60%，优选地至少约60-70%，更优选地至少约70-80%、80-90%、90-95%，且甚至更优选地至少约96%、97%、98%、99%或更高同源性。本发明优选的ASE也优选拥有此处描述的至少一种ASE活性。例如，本发明优选的ASE包括可与SEQ ID NO:1的核苷酸序列杂交(例如在严格的条件下杂交)的核苷酸序列所编码的氨基酸序列，且可参与对于绿

光等鞭金藻的细胞膜构建或分子的跨膜转运所必需的化合物的代谢或具有在表2中列出的一种或多种活性。

在另外的实施方案中，ASE与SEQ ID NO:2的氨基酸序列基本同源并保留了具SEQ ID NO:2的一段序列的蛋白质的功能活性，但由于自然变异或突变两者存在氨基酸序列的差异，见以上分段I中的详细描述。因此，在另一实施方案中，ASE为这样的蛋白质，其包含与SEQ ID NO:2的完整氨基酸序列有至少约50-60%，优选地至少约60-70%，且更优选地至少约70-80、80-90、90-95%，且最优选地至少约96%、97%、98%、99%或更高同源性的氨基酸序列，且具有至少一种此处描述的ASE活性。在另一实施方案中，本发明涉及与SEQ ID NO:2的完整氨基酸序列基本同源的全长绿光等鞭金藻蛋白质。

ASE的生物活性部分包括含有如下氨基酸序列的肽，所述氨基酸序列源自ASE的氨基酸序列，例如在SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列或源自与ASE同源的蛋白质的氨基酸序列，所述肽包括的氨基酸少于全长ASE或与ASE同源的全长蛋白质，但其显示出至少一种ASE活性。通常，生物活性部分(肽，例如长度为如5、10、15、20、30、35、36、37、38、39、40、50、100或更多个氨基酸的肽)包含具有至少一种ASE活性的结构域或基序。而且，其它生物活性部分(其中蛋白质的其他区域已缺失)可通过重组技术制备并针对一种或多种文中所述的功能活性进行评价。优选地，ASE的生物活性部分包括具有生物活性的一个或多个所选的结构域/基序或其部分。

ASE优选通过重组DNA技术产生。例如，可以将编码该蛋白质的核酸分子克隆入表达载体(如上所述)、将表达载体导入宿主细胞(如上所述)以及在宿主细胞中表达ASE。然后可通过合适的纯化方案，使用标准的蛋白质纯化技术从细胞分离ASE蛋白。除了重组表达外，ASE、多肽或肽可用标准的肽合成技术化学合成。而且，可从细胞(例如，内皮细胞)分离天然的ASE，例如使用抗-ASE抗体进行分离，该抗体可用本发明的ASE或其片段通过标准技术产生。

本发明也提供了ASE的嵌合或融合蛋白。如此处所用，ASE“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包括与非ASE多肽可操作地连接的ASE多肽。“ASE多肽”指具有与ASE相对应的氨基酸序列的多肽，而“非ASE多肽”指具有对应于实质上不同源于ASE的蛋白质的氨基酸序列的多肽，所述蛋白质例如，可以是与ASE蛋白质不同且来源于相同或不同的生物体的蛋白质。在融合蛋白内，术语“可操作地连接”意指ASE多肽和非ASE多肽相互融合以致两个序列均可实现预期的功能（所述功能指由所用序列引起的功能）。非ASE多肽可与ASE多肽的N-末端或C-末端融合。例如，在一个实施方案中，融合蛋白为GST-ASE融合蛋白，其中ASE序列融合至GST序列的C-末端。此类融合蛋白可利于重组ASE的纯化。在另一实施方案中，融合蛋白为在其N-末端含有异源信号序列的ASE。在某些宿主细胞（例如，哺乳动物宿主细胞）中，通过应用异源信号序列可增加ASE的表达和/或分泌。

优选地，本发明的ASE嵌合或融合蛋白通过标准的重组DNA技术制备。例如，编码不同多肽序列的DNA片段可根据常规技术以符合阅读框的方式连结在一起，所述技术为例如，应用钝末端或粘末端（用于连接）、限制性酶消化产生合适的末端、适当时填平粘端、碱性磷酸酶处理以避免不需要的接合以及酶促连接。在另一实施方案中，融合基因可由常规技术（包括DNA自动合成仪）合成。备选地，可应用锚定引物进行基因片段的PCR扩增，导致在两连续的基因片段间产生互补突出端，随后可以进行退火及重新扩增以产生嵌合基因序列（参见例如，最新分子生物学方法（*Current Protocols in Molecular Biology*），Ausubel等人编辑，John Wiley & Sons: 1992）。此外，许多商售的表达载体已编码有融合部份（如GST多肽）。可将编码ASE的核酸克隆到此类表达载体中，以使融合部分与ASE以符合阅读框的形式连接。

ASE的同系物可通过诱变产生，例如ASE的不连续点突变或截断。如此处所应用，术语“同系物”指ASE的变体形式，其可充当ASE活性的激动剂或拮抗剂。ASE的激动剂可持有与ASE基本相同的生物活性或其部份生物活性。ASE的拮抗剂可以，例如通过竞争性结合包括ASE在内的细胞膜

成分代谢级联的下游或上游成员，或通过结合介导化合物跨膜转运的ASE以阻止运输，而抑制天然形式的ASE的一种或多种活性。

在一个备选实施方案中，ASE的同系物可以通过针对ASE激动剂或拮抗剂活性筛选ASE的突变体组合文库进行鉴定，例如，所述文库可以为截短突变体文库。在一个实施方案中，通过在核酸水平上进行组合诱变，产生由多样化基因文库编码的多样化ASE变体文库。例如，多样化ASE变体文库可通过如下方式制备：将合成的寡核苷酸混合物酶促连接为基因序列以使一组简并的潜在ASE序列可表达为单独的多肽，或备选地，表达为其中含有该组ASE序列的一组较大融合蛋白（例如，用于噬菌体展示）。有多种方法可用于从简并的寡核苷酸序列产生潜在ASE同系物文库。可在DNA自动合成仪上进行简并基因序列的化学合成，然后将合成基因连入合适的表达载体。一组简并基因的应用使得可以在一个混合物中提供编码一组所需的潜在ASE序列的所有序列。用于合成简并寡核苷酸的方法在本领域内是公知的（参见例如，Narang, S.A(1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura等人(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura等人(1984) *科学 (Science)* 198:1056; Ike等人(1983) *核酸研究 (Nucleic Acid Res)* 11:477)。

此外，ASE的片段文库可用于产生多样化的ASE片段群，以筛选及随后挑选出ASE的同系物。在一个实施方案中，可通过用核酸酶处理ASE编码序列的双链PCR片段（在所述处理进行的条件下，在每个分子中仅发生大约一次切割）、将双链DNA变性、使DNA复性形成双链DNA（此双链DNA中可以包括来自不同切割产物的有义/反义对）、用S1核酸酶处理以从新形成的双链体中除去单链部分，然后将产生的片段文库连入表达载体，由此产生编码序列片段的文库。用该方法可形成表达文库，所述文库编码ASE不同大小的N-末端、C-末端及内部片段。

用于筛选通过点突变或截短产生的基因产物组合文库以及用于筛选cDNA文库以获得具有所选性质的基因产物的一些技术在本领域内是公知的。这些技术可经修改而适于快速筛选由ASE同系物的组合诱变产生的基因文库。最为广泛应用的适于高通量分析以筛选大型基因文库的技术一般

包括将基因文库克隆到可复制的表达载体中，用所获载体文库转化适宜细胞并表达组合基因，在该表达条件下对所需活性的测试将利于分离编码的基因产物已得以检测的载体。递归总体诱变（Recursive ensemble mutagenesis, REM）为增加文库中功能性突变体频率的一种新技术，其可与筛选试验联合应用以鉴定 ASE 同系物(Arkin 和 Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave 等人(1993) 蛋白质工程 (Protein Engineering) 6(3):327-331)。

在另一实施方案中，还可以本领域熟知的其他方法通过基于细胞的试验来分析多样化ASE文库。

E. 本发明的应用和方法

此处描述的核酸分子、蛋白质、蛋白质同系物、融合蛋白质、引物、载体和宿主细胞可用于以下的一种或多种方法：绿光等鞭金藻和相关生物体的鉴定、绿光等鞭金藻相关生物的基因组作图、目的绿光等鞭金藻序列的鉴定和定位、进化研究、功能所需的ASE区域的确定、对ASE活性的调节、对一种或多种细胞膜组分代谢的调节、对一种或多种化合物的跨膜转运的调节以及对细胞中所需化合物产生的调节，其中所述所需化合物为例如精细化学品，包括PUFA。

本发明的ASE核酸分子具有多种用途。首先，它们可用于鉴定生物体是否为绿光等鞭金藻或其近亲。它们也可用于在混合的微生物群体中鉴定绿光等鞭金藻或其相关菌的存在。本发明提供了许多绿光等鞭金藻基因的核酸序列；通过在严格条件下用跨越绿光等鞭金藻所独特的绿光等鞭金藻基因区域的探针探测从单一微生物群体或混合群体的培养物中提取的基因组DNA，由此可确定绿光等鞭金藻是否存在。尽管绿光等鞭金藻自身并不用于多不饱和酸的商业生产，但藻类是除藓类外仅有已知产生的PUFA在其总脂中所占百分比多于几的植物。因此与ASE相关的DNA序列特别适用于在其它生物体中生产PUFA。

本发明的核酸分子和蛋白质分子也可用作基因组特定区域的标记。这不仅可用于基因组作图，也可用于绿光等鞭金藻蛋白质的功能研究。例如，为了鉴定与特定的绿光等鞭金藻DNA-结合蛋白结合的基因组区域，可消化绿光等鞭金藻基因组，并将片段与此DNA-结合蛋白孵育。另外，那些与蛋白结合的片段可用本发明的核酸分子探测，优选地用具有易于检测的标记物的核酸分子探测；此核酸分子与基因组片段的结合可将片段定位于绿光等鞭金藻的基因组图谱中，并且当用不同的酶进行多次试验时，可利于快速确定与蛋白质结合的核酸序列。而且，本发明的核酸分子可充分同源于亲缘种的序列，这样这些核酸分子可作为标记用于构建亲缘藻类如绿光等鞭金藻的基因组图谱。

本发明的ASE核酸分子也可以用于进化和蛋白质结构研究。大量的原核和真核细胞应用本发明分子参与的代谢和转运过程；通过将本发明核酸分子的序列与来自其它生物体的编码类似酶的那些序列比较，可评估生物体的进化关系。类似地，此比较使得可评估哪些区域保守和哪些区域不保守，这有利于确定酶功能所必需的那些蛋白质区域。这种确定对蛋白质工程研究有价值，并可指出该蛋白质可耐受何种诱变且不丢失其功能。

对本发明ASE核酸分子进行操作可导致产生与野生型ASE功能不同的ASE。这些蛋白质可以在功效或活性上提高，可以在细胞内以较通常多的量存在，或可以在功效或活性上降低。功效或活性的提高意味着，例如酶的选择性和/或活性高于初始酶，优选地至少高10%，特别优选地至少高20%，最优选地至少高30%。

本发明的ASE的改变可通过多种机制直接影响到掺入该改变蛋白质后精细化学品的产生、产量和/或生产效率。如果细胞分泌所需化合物，则从纤毛虫、藻类或真菌的大规模培养物中回收精细化学品化合物将得以显著提高，因为该化合物可容易地从培养基中分离(这与从培养细胞物质中提取不同)。或者，如果细胞优选地在特定的区室中储存化合物，即具有某种胞内浓缩机制，亦可改善纯化。在植物表达ASE的例子中，增加的转运可改善在植物组织和器官中的分配(partition)。通过提高将精细化学品运出细胞

的转运蛋白分子的数目或活性，有可能增加存在于胞外介质中的所获精细化学品的数量，由此允许更容易地回收和纯化或，对于植物，更有效地分配。相反，为有效地过量产生一种或多种精细化学品，需要增加用于适当生物合成途径的辅因子、前体分子和中间体化合物的量。通过增加参与营养物输入的转运蛋白质的数量和/或活性，有可能因生物合成过程中营养物供应限制的消除而提高精细化学品的产量，其中所述营养物如碳源(即糖)、氮源(即氨基酸、铵盐)、磷酸盐和硫。脂肪酸如PUFA和含PUFA的脂类自身为所需的精心化学药品，因此通过优化参与这些化合物生物合成的一种或多种本发明ASE的活性或增加其数目，或通过削弱参与这些化合物降解的一种或多种基因的活性，有可能增加脂肪酸和脂类分子在纤毛虫、藻类、植物、真菌、酵母或其他微生物中的产生、产量和/或生产效率。

对本发明的一种或多种ASE基因的操作也可导致产生具有改变活性的ASE，从而间接影响到一种或多种精细化学品从藻类、植物、纤毛虫或真菌中的产生。例如，代谢的正常生化过程会导致产生多种废弃物(例如过氧化氢和其他活性氧种类)，这些废弃物可活跃地干扰此同一代谢过程(例如，过硝酸(peroxynitrite) 已知可硝化酪氨酸侧链，由此将使一些在活性位点具有酪氨酸的酶失活(Groves, J.T. (1999) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3(2): 226-235)。尽管这些废弃物一般被分泌排出，但用于大规模发酵生产的细胞由于优化以产生一种或多种精细化学品而可能比一般野生型细胞产生更多的废弃物。通过优化本发明的一种或多种ASE的活性，可以改进细胞的生活力以及维持有效的代谢活性且因此提高如PUFA等所需产物的生产。另，高水平的胞内所需精细化学品的存在可实际上对细胞产生毒性，因此通过增加细胞分泌这些化合物的能力，可进一步提高细胞的生活力。

此外，可操作本发明的ASE以改变多种脂类和脂肪酸分子的相对量。这可对细胞膜的脂组成产生显著的影响。由于每一类脂都具有不同的物理特性，膜脂组成的改变可显著改变膜的流动性。膜流动性的变化可影响分子的跨膜转运，如先前说明的，所述变化可改变废物或产生的精细化学品的运出或必需营养物的输入。此类膜流动性的变化也可显著影响细胞的完

整性；具有相对较弱的膜的细胞对可损害或杀死细胞的非生物和生物胁迫条件更为敏感。通过对参与产生用于膜构建的脂肪酸和脂类的ASE实施操作，以使产生的膜的膜组成更易于接受用于产生精细化学品的培养物中的环境条件，将使更大比例的细胞能够存活和繁殖。更多数目的生产细胞将导致培养物中精细化学品的生产、产量或生产效率更高。

前述用于ASE以导致精细化学品生产提高的突变策略并非意在成为限制；这些策略的变化对于本领域内的技术人员将是显而易见的。应用该策略并结合此处公开的机制，本发明的核酸分子和蛋白质分子可用于产生表达突变ASE核酸和蛋白质分子的藻类、纤毛虫、植物、动物、真菌或其他微生物如棒状杆菌，以提高所需化合物的产生、产量和/或生产效率。该所需的化合物可为藻类、纤毛虫、植物、动物或真菌的任何天然产物，包括生物合成途径的终产物和天然代谢途径的中间体，以及非所述细胞天然代谢产生的但可由本发明细胞产生的分子。

本发明的另一实施方案为用于产生PUFA的方法，该方法包括在PUFA可在生物体中产生的条件下培养生物体，所述生物体包含本发明的核酸、本发明的基因构建体或本发明的载体以编码可将 α -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}9, 12, 15}$)延长至少两个碳原子但不延长 γ -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}6, 9, 12}$)的多肽。优选地，该方法包括对生物体的培养，所述生物体包含所编码的多肽可将 α -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}9, 12, 15}$)延长至少两个碳原子而不延长 γ -亚麻酸($C_{18:3 \text{ d}6, 9, 12}$)的核苷酸序列，该核苷酸序列选自：

- a) 在SEQ ID NO:1中描述的核酸序列，
- b) 编码SEQ ID NO:2中所示多肽的核酸序列，
- c) SEQ ID NO:1中描述的序列的衍生物，该衍生物编码的多肽与编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的序列有至少50%同源性，且该多肽序列具有延长酶功能。

更优选地，所述核酸序列源自植物，优选地源自等鞭金藻属。所用序列编码可延长 $\Delta 9$ 脂肪酸的多肽。

由本发明方法产生的PUFA优选地为C₂₀或C₂₂脂肪酸分子，在脂肪酸分子中至少具有两个双键，优选地至少具有三个双键。

用于本发明方法中产生PUFA的生物体为微生物例如细菌如革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌，或优选地为蓝藻，纤毛虫如豆形虫属或棘尾虫属，真菌如被孢霉属或破囊壶菌属或Schizochytrium，藻类如褐指藻属，和/或植物如玉米、小麦、黑麦、燕麦、黑小麦、水稻、大麦、大豆、花生、棉花、芸苔属物种如菜籽油菜、canola和芜菁油菜、亚麻籽、胡椒、向日葵、琉璃苣、月见草和万寿菊、茄属植物如马铃薯、烟草、茄子和番茄、野豌豆属物种、豌豆、木薯、苜蓿、灌木植物(咖啡、可可、茶)、柳属物种、树(油椰、椰子)和多年生草及饲料作物，或直接地，如，其中脂肪酸生物合成蛋白质的过表达或优化对修饰生物体的脂肪酸产生、产量和/或生产效率具有直接影响的藓类或其他植物。

PUFA在本发明的方法中可以以油类、脂类或游离脂肪酸的形式产生。由此方法产生的PUFA可通过从培养生物体的培养物中或从大田中收获生物体、用有机溶剂破碎和/或抽提收获的材料而得以分离。可从该溶剂中分离到具有较高含量PUFA的含有脂类、磷脂、鞘脂、糖脂、三酰基甘油和/或游离脂肪酸的油类。通过脂类、磷脂、鞘脂、糖脂或三酰基甘油的碱性或酸性水解，可分离出含较高含量PUFA的游离脂肪酸。较高含量的PUFA意味着与不含编码本发明延长酶的额外核酸的初始生物体相比，PUFA至少高1%，优选地高10%，特别优选地高20%，最优选地高40%。

除了以上提及的方法，植物脂类优选地按Cahoon等 (1999) PNAS 96 (22): 12935-12940和Browse等(1986)分析生物化学(Analytic Biochemistry) 152: 141-145中所描述的方法从植物材料中提取。脂类或脂肪酸的定性和定量分析参见Christie, William W., 脂类方法学进展(Advances in lipids Methodology), Ayr/Scotland : Oily Press. - (Oily Press Lipids Library ; 2); Christie, William W., 气相色谱和脂类, 应用指南(Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide) - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989 Repr. 1992. - IX,307 p. - (Oily Press Lipid Library ; 1); 脂类研究进展(Progress

in Lipid Research), Oxford : Pergamon Press, 1(1952) - 16(1977), 于标题: 脂肪和其他脂类化学的进展(Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids)之下。

由此方法产生的PUFA优选地为在脂肪酸分子中具有至少两个双键的C₂₀或C₂₂, 优选地为具有三个到四个双键, 特别优选地具有三个双键。此C₂₀或C₂₂脂肪酸分子可以以油类、脂类或游离脂肪酸的形式从生物体中分离。有用的生物体为例如以上所提及的生物体。优选的生物体为转基因植物。

本发明的一个实施方案为由以上描述的方法产生的油类、脂类或脂肪酸或其部分, 特别优选地为源自转基因植物的包含PUFA的油类、脂类或脂肪酸组合物。

本发明的再一实施方案为该油类、脂类或脂肪酸组合物在饲料、食品、化妆品或制药中的应用。

本发明的另一实施方案为与以上描述的本发明核酸序列编码的多肽特异相互作用的单克隆或多克隆抗体, 其可由熟练技术人员熟知的方法制备。

本发明的再一实施方案为包含本发明的核苷酸序列、要求保护的基因构建体、要求保护的载体或如以上描述的抗体的试剂盒。该试剂盒可用于例如蛋白质、核酸序列的鉴定。

用于ASE以导致精细化学品产量提高的上述突变策略并非意在成为限制; 这些策略的变异对本领域内的技术人员是显而易见的。应用此策略, 以及结合此处公开的机制, 本发明的核酸分子和蛋白质分子可用于产生表达突变ASE核酸和蛋白质分子的藻类、纤毛虫、植物、真菌或其他微生物如棒状杆菌, 以提高所需化合物的产生、产量和/或生产效率。该所需的化合物可为藻类、纤毛虫、植物、真菌或棒状杆菌的任何天然产物, 包括生物合成途径的终产物和天然代谢途径的中间体, 以及非所述细胞天然代谢产生的但可由本发明的细胞产生的分子。

本发明进一步由以下的实施例说明,所述实施例不应解释为限制性的。此全部申请中引用的所有参考文献、专利申请、专利和出版的专利申请的内容均特此并入作为参考。

实施例

实施例1: 一般方法

a) 克隆程序和一般方法

克隆程序,例如,限制性切割、琼脂糖凝胶电泳、DNA片段的纯化、核酸向硝酸纤维素和尼龙膜的转移、DNA片段的连接、大肠杆菌和酵母细胞的转化、细菌的培养及重组DNA的序列分析按Sambrook等(1989)(Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)或Kaiser, Michaelis和Mitchell (1994) “酵母遗传学方法”(“Methods in Yeast Genetics”)(Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3)中描述进行。藻类如小球藻属(*Chlorella*)或褐指藻属的转化和培养按El-Sheekh(1999), *Biologia Plantarum* 42: 209-216; Apt等(1996), 分子和普通遗传学(Molecular and General Genetics)252 (5): 872-9中描述进行。

b) 化学药品:

在文中如不另外说明,应用的化学药品以分析纯品质从Fluka(Neu-Ulm)、Merck(Darmstadt)、Roth(Karlsruhe)、Serva(Heidelberg)和Sigma(Deisenhofen)公司获得。溶液用纯化的无致热原的水制备,所述水在下文中称作H₂O,来自Milli-Q水系统水纯化工厂(Millipore, Eschborn)。限制性内切酶、DNA修饰酶和分子生物学试剂盒从AGS(Heidelberg)、Amersham(Braunschweig)、Biometra(Göttingen)、Boehringer(Mannheim)、Genomed(Bad Oeynhausen)、New England Biolabs(Schwalbach/Taunus)、Novagen(Madison, Wisconsin, USA)、Perkin-Elmer(Weiterstadt)、Pharmacia(Freiburg)、Qiagen(Hilden)和Strata-Gene(Amsterdam, Netherlands)公司获得。如不另外说明,这些试剂根据生产商的说明书使用。

c) 藻类材料

对于此研究, 使用绿光等鞭金藻 CCAP 927/1藻类物种, 其获自藻类和原生动物培养物保藏中心, (Centre for Coastal and Marine Sciences, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll; UK)。

藻类的培养

绿光等鞭金藻应用含10%有机介质的f/2培养基培养, 见Guillard, R.R.L.的描述[1975; 用于饲养海洋无脊椎动物的浮游植物的培养(Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates). In: Smith, W.L.和Chanley, M.H. (Eds.) 海洋无脊椎动物的培养(Culture of marine Invertebrate animals), NY Plenum Press, 29-60页.]. 绿光等鞭金藻于14℃连续光照(光强度为30微爱因斯坦)下在玻璃容器中以100 rpm摇动培养。

f/2培养基的组成:

995.5 ml的人工海水中含:

- 1 ml NaNO_3 (75 g/l),
- 1 ml NaH_2PO_4 (5 g/l),
- 1 ml 微量元素溶液,
- 1 ml Tris/Cl pH 8.0,
- 0.5 ml f/2 维生素溶液,

微量元素溶液:

- Na_2EDTA (4.36 g/l),
- FeCl_3 (3.15 g/l),

基本微量元素:

- CuSO_4 (10 g/l),
- ZnSO_4 (22 g/l),
- CoCl_2 (10 g/l),
- MnCl_2 (18 g/l),
- NaMoO_4 (6.3 g/l)

f/2维生素溶液:

生物素: 10 mg/l,

维生素B1: 200 mg/l,

维生素B12: 0.1 mg/l,

有机介质:

乙酸钠 (1 g/l),

葡萄糖 (6 g/l),

琥珀酸钠(3 g/l),

细菌用胰蛋白胨 (4 g/l),

酵母提取物 (2 g/l)

实施例 2: 从藻类中分离DNA

总DNA的分离的细节涉及对通过过滤回收的一克鲜重材料的处理。

CTAB缓冲液:

2% (w/v) N-十六烷基-N,N,N-三甲基溴化铵(CTAB);

100 mM Tris HCl pH 8.0;

1.4 M NaCl;

20 mM EDTA。

N-十二烷基肌氨酸缓冲液:

10% (w/v) N-十二烷基肌氨酸;

100 mM Tris HCl pH 8.0;

20 mM EDTA。

在研钵中用石英砂在液氮下匀浆材料以使其成为细粉，之后转移到2ml Eppendorf管中。然后在冷冻材料上覆盖一层1ml的分解缓冲液(1ml CTAB缓冲液、100ml N-十二烷基肌氨酸缓冲液、20ml β -巯基乙醇和10ml 蛋白酶K溶液10mg/ml)并连续摇动下在60℃孵育1小时。将所获匀浆物分入两个Eppendorf容器(2ml)中并用相同体积的氯仿/异戊醇(24:1)振荡萃取两

次。为实现相分离，每一容器在室温8000 x g离心15min。然后在70℃沉淀DNA 30min。沉淀的DNA在4℃以10,000g离心30min进行沉积，之后重悬在100微升的TE缓冲液中(Sambrook 等, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)。进一步纯化时，用NaCl(终浓度为1.2 M)处理DNA并用两倍体积的纯乙醇70℃再次沉淀DNA 30min。用70%乙醇洗涤之后，干燥DNA并随后在50微升的H₂O+无DNase的RNase (终浓度为50mg/ml)中溶解。4℃过夜溶解DNA并随后在37℃进行RNase消化1小时。DNA置4℃储存。

实施例3: 从藻类中分离总RNA和poly-(A)+RNA

为进行转录本研究，分离总RNA和poly-(A)+RNA。

3000 g离心5分钟收集藻类培养物。沉淀块迅速在液氮中(-70℃) 冷冻。在液氮中用研杆在研钵中匀浆藻类材料(1g)。材料在二倍体积缓冲液，即TriPure™分离试剂(Roche)中分解至均匀。然后根据生产商的操作指南分离总RNA。

应用Amersham Pharmacia的mRNA分离试剂盒根据生产商的操作指南分离Poly(A)+RNA。

测定RNA或poly(A)+RNA的浓度之后，通过加入1/10体积的3M乙酸钠(pH 4.6)和2倍体积的乙醇沉淀RNA，并储存在-70℃。

实施例4: cDNA文库的构建

根据生产商的操作指南应用来自Stratagene的cDNA合成试剂盒合成双链cDNA。然后使之通过cDNA合成试剂盒(Amersham Pharmacia)中的Sephacyl S-400 Spun柱以除去接头和小分子。从柱子上洗脱的cDNA用苯酚萃取、乙醇沉淀并连接到Uni-Zap载体的臂上，然后应用Ready-To-Go λ包装试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech) 根据生产商的指南包装入噬菌体。获得了 1×10^6 pfu的文库，其中大多数插入片段的大小在0.4-2kb间。

实施例5: ASE1基因的鉴定和cDNA-克隆Ig ASE1的分析

比对 (alignment) 已知的延长酶序列(来自高山被孢霉、酿酒酵母(Elo1, Elo2, Elo3)、秀丽隐杆线虫(*C. elegans*) (F56H11.4, F41H10.8)), 选择共有基序MYXYYFL用于寡核苷酸设计。

合成反向互补寡核苷酸

5'-A(A/G)(A/G)AA(A/G)TA(A/G)TAIII(G/A)TACAT-3'(I = 脱氧肌苷)
用于触减PCR(touchdown PCR), 所述触减PCR应用绿光等鞭金藻的cDNA文库作为模板和通用T3启动子引物(5'-AATTAACCCTCACTAAA GGG-3')。

PCR条件为:

94°C 3分钟 (1个循环)

94°C 15秒 52°C 30秒, 72°C 45秒(4个循环)

94°C 15秒, 52°C 30秒(每个循环递减1°C), 72°C 45秒(10个循环)

94°C 15秒, 42°C 30秒, 72°C 45秒(25个循环)

72°C 6分钟(1个循环)。

克隆并测序约650bp的PCR产物, 且发现推导的氨基酸序列可以与假定的延长酶序列汇编物对齐。合成基因特异的(有义)引物5'-ACTCGAAGCTCTTCACATGG-3' 并与通用M13正向引物(5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')用于进一步的文库PCR反应中, 所述PCR反应应用以下的条件:

94°C 3分钟 (1个循环)

94°C 15秒, 55°C 30秒, 72°C (10个循环)

94°C 15秒, 55°C 30秒, 72°C 1分33秒 (每循环递增3秒)(20个循环)

72°C 6 min (1个循环)。

克隆并测序约850bp的PCR产物。两PCR产物序列重叠, 证实它们最终源自一个基因。

如在实施例6中描述的分自cDNA文库的那些cDNA克隆被用于DNA测序, 所述测序根据标准方法, 特别是应用ABI PRISM Big 染料中止循环

测序预备反应试剂盒(Perkin-Elmer, Weiterstadt, 德国)通过链终止方法进行。测序前, 通过体内切除从cDNA文库中回收质粒, 并在琼脂板上再转化DH10B (详细的材料和方法来自Stratagene, Amsterdam, Netherlands)。

质粒DNA从过夜培养的大肠杆菌培养物中制备, 所述培养物生长在含氨苄青霉素的Luria-Broth培养基中[参见Sambrook等(1989)(Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)]。

应用具有以下核苷酸序列的测序引物:

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'

5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

cDNA的完整核苷酸序列由约1064bp组成。其包含一789bp的开放阅读框, 编码263个氨基酸。此蛋白质序列与已知的酵母中延长中等链长脂肪酸所必需的延长酶基因仅具有低的同一性和相似性(Toke & Martin, 1996, 影响酿酒酵母脂肪酸延长的基因的分离和鉴定, 生物化学杂志(Journal of Biological Chemistry) 271,18413-18422.)。

表1. 绿光等鞭金藻延长酶与同源序列的比对

基因	高山被孢霉	人	小鼠	酵母	秀丽隐杆线虫
Ig_ASE1	27	25.5 ⁽¹⁾	24.3	21 ⁽³⁾	19
		20.2 ⁽²⁾		23.2 ⁽⁴⁾	
				23.6 ⁽⁵⁾	

表中数值为应用DNAMAN(Lynnon Biosoft)的成对比对得到的同源性百分比。应用的参数: 矩阵: BLOSUM, 比对方法: 最佳K-tuple: 2, 缺口开放: 10, 缺口罚分: 4, 缺口延伸: 0.1; ¹=ELOVL4; ²=Helo1; ³=Elo1; ⁴=Elo2; ⁵=Elo3。

序列取自人ELOVL (文献1、序列1), 人Helo1 (文献1、序列2), 高山被孢霉(Glelo, 文献3), 秀丽隐杆线虫(文献4), 小鼠Elov14 (文献1), 酵母(来自文献5和6的序列3、4、5)。

1. Zhang 等, 自然遗传(Nature Gen.)27: 89-93 (2001)。

2. Leonard 等, 生物化学杂志(Biochem. J.)350: 765–770 (2000).
 3. Parker-Barnes 等, 美国科学院院刊(Proc Natl. Acad. Sci. USA)97: 8284-8289, (2000).
 4. Beaudoin 等, 美国科学院院刊(Proc Natl. Acad. Sci. USA)97: 6421-6426. (2000).
 5. Toke和Martin, 生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 271: 18413-18422 (1996).
 6. Oh 等, 生物化学杂志(J. Biol. Chem.)272: 17373-17384 (1997).
- Ig_ASE1基因和被孢霉属及小鼠同系物的成对比对在图1和图2中显示。

以下的参数用于此比对:

成对比对:	固定罚分: 10
Ktuple: 1	漂移罚分: 10
对角线数目: 3	窗口大小: 5
权重基阵(蛋白质): PAM 250	缺口罚分: 5

实施例6: 通过杂交鉴定基因

基因序列可用于从cDNA或基因组文库鉴定同源或异源基因。

可应用例如cDNA文库通过核酸杂交分离同源基因(例如, 与同源的全长cDNA克隆和同系物): 根据目的基因的丰度, 将100 000到1 000 000个重组噬菌体铺板并转移到尼龙膜上。碱变性后, 通过例如UV交联将DNA固定在膜上。在高严格条件下进行杂交。在离子强度为1 M NaCl及温度为68℃的水溶液中进行杂交和洗涤。杂交探针通过, 例如, 放射性(³²P)切口平移标记 (High Prime, Roche, Mannheim, 德国) 产生。通过放射自显影术检测信号。

相关但并不相同的部分同源或异源基因可应用低严格杂交和洗涤条件按与以上描述类似的方法进行鉴定。对于水性杂交, 离子强度通常保持为1 M NaCl, 而温度从68℃逐渐降到42℃。

仅与(例如)10-20个氨基酸的独特结构域同源的基因序列可通过应用合成的放射性标记寡核苷酸探针分离。放射标记的寡核苷酸通过应用T4多核苷酸激酶对两互补寡核苷酸的5'端进行磷酸化而制备。互补寡核苷酸退火并连接以形成多联体。双链多联体然后通过例如切口平移放射标志。杂交通常应用高寡核苷酸浓度在低严格的条件下进行。

寡核苷酸杂交溶液:

6 x SSC

0.01 M 磷酸钠

1 mM EDTA (pH 8)

0.5 % SDS

100 μ g/ml 变性鲑鱼精子DNA

0.1 % 脱脂干牛奶

杂交过程中, 温度逐步降到低于估计的寡核苷酸 T_m 值5-10 $^{\circ}$ C或降到室温, 之后进行洗涤步骤和放射自显影。洗涤在极低严格的条件下进行, 例如应用4xSSC进行3个洗涤步骤。进一步的细节参见Sambrook, J.等(1989), 分子克隆: 实验室指南, Cold Spring Harbor Laboratory Press或Ausubel, F.M. 等 (1994) 分子生物学最新进展 “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons。

实施例7: 用于植物转化的质粒

对于植物转化, 可应用二元载体, 例如pGPTV(Becker等 1992, 植物分子生物学(Plant Mol. Biol.)20:1195-1197)或pBinAR(Höfgen和Willmitzer, 植物科学(Plant Science)66 (1990), 221-230)。二元载体的构建可通过将cDNA以有义或反义方向连入T-DNA中而实现。

位于cDNA 5'的植物启动子激活cDNA的转录。多聚腺苷酸化序列位于cDNA的3'。

可通过应用组织特异的启动子获得组织特异性表达。例如, 可通过将DC3或LeB4或USP启动子克隆到cDNA的5'获得种子特异性表达。也可应用任何其他种子特异性启动子元件。可应用CaMV 35S启动子获得在完整植物中的组成型表达。

表达的蛋白质可通过信号肽靶向细胞区室, 例如质体、线粒体或内质网(Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423)。将信号肽在读框内克隆到cDNA的5'端可实现融合蛋白质的亚细胞定位。

实施例8: 农杆菌的转化

农杆菌介导的植物转化可应用例如农杆菌菌株C58C1 (pGV2260) (Deblaere 等 1984, 核酸研究 (Nucl. Acids Res.)13, 4777-4788) 或GV3101(pMP90)(Koncz和Schell, 普通分子遗传学(Mol. Gen. Genet.)204 (1986), 383-396)或LBA4404(Clontech)进行。转化可通过标准转化技术完成 (Deblaere 等, 核酸研究(Nucl. Acids. Res.)13 (1984), 4777-4788)。

实施例9: 植物转化

农杆菌介导的植物转化可应用标准的转化和再生技术进行(Gelvin, Stanton B.; Schilperoort, Robert A, 植物分子生物学手册(Plant Molecular Biology Manual), 2nd Ed. - Dordrecht : Kluwer Academic Publ., 1995. ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R.; Thompson, John E., 植物分子生物学和生物技术中的方法(Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology), Boca Raton: CRC Press, 1993. - 360 pp., ISBN 0-8493-5164-2)。

例如可通过子叶或下胚轴转化菜籽油菜(Moloney等, 植物细胞报告8(Plant cell Report 8)(1989), 238-242; De Block 等, 植物生理学(Plant Physiol). 91 (1989, 694-701)。为了对农杆菌和植物进行筛选, 依赖于用于转化的二元载体和农杆菌菌株应用抗生素。通常应用卡那霉素作为植物筛选标记进行菜籽油菜筛选。

农杆菌介导的向亚麻的基因转移可应用如Mlynarova等(1994), 植物细胞报告(Plant Cell Report) 13: 282-285描述的技术实现。

大豆转化可通过例如在EP 0424 047、US 322 783(Pioneer Hi-Bred International)或在EP 0397 687、US 5 376 543、US 5 169 770(University Toledo)中描述的技术实现。

应用微粒轰击、聚乙二醇介导的DNA摄入或通过碳化硅纤维技术的植物转化可参见例如Freeling和Walbot在: 玉米手册(“The maize handbook”)(1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag, New York中的描述。

实施例10: 体内诱变

微生物的体内诱变可通过在维持其遗传信息完整性的能力受损的大肠杆菌或其他微生物(例如, 芽孢杆菌或酵母如酿酒酵母)中将质粒(或其他载体)DNA进行传代而实现。典型的突变菌株在用于DNA修复系统的基因中存在突变(例如mutHLS、mutD、mutT等; 参见Rupp, W.D. (1996), 《大肠杆菌和沙门氏菌属》, DNA修复机制(DNA repair mechanisms, in: Escherichia coli and Salmonella), 2277-2294页, ASM: Washington.)。此类菌株为本领域内的技术人员公知。该菌株的应用在, 例如Greener, A.和Callahan, M. (1994) 策略(Strategies)7: 32-34中阐述。优选地, 突变DNA分子在微生物中进行筛选和测试后再转移到植物中。根据本文件实施例部分内的多个实施例可产生转基因植物。

实施例11: 对转化生物体中重组基因产物表达的评估

在转化的宿主生物体中重组基因产物的活性已在转录和/或在翻译水平上进行了测定。

确定基因转录水平(指示可用于基因产物翻译的mRNA的数量)的一个有用方法是进行Northern印迹(参见, 例如, Ausubel 等 (1988) 分子生物学当前方法(Current Protocols in Molecular Biology), Wiley: New York

或上述实施例部分), 其中设计为结合目的基因的引物用可检测标签(通常具有放射性或化学发光性) 进行标记, 这样在提取生物体培养物的总RNA、走凝胶、转移到稳定基质上并与该探针进行孵育后, 探针的结合和结合量将指示出该基因mRNA的存在及存在量。该信息为转化基因转录水平的证据。从细胞、组织或器官中制备总细胞RNA可通过多种方法实现, 其均为本领域内公知的方法, 如在Bormann, E.R. 等 (1992)分子微生物学(*Mol. Microbiol.*) 6: 317-326中所描述的。

为评估由该mRNA翻译出的蛋白质的存在或相对的量, 可应用标准技术, 例如Western印迹(参见例如, Ausubel 等 (1988)分子生物学当前方法(*Current Protocols in Molecular Biology*), Wiley: New York)。在此方法中, 提取总细胞蛋白质、通过凝胶电泳分离、转移到如硝化纤维等基质上并与特异结合所需蛋白质的探针如抗体孵育。该探针通常用可容易地进行检测的化学发光或比色标签进行标记。观察到的标签的存在或数量指示出存在于细胞中的所需突变蛋白质的存在和数量。

实施例12: 分析重组蛋白质对所需产物产量的影响

在植物、真菌、藻类、纤毛虫或中此遗传修饰对所需化合物(例如脂肪酸)产量的影响可通过将修饰的微生物或植物在适宜的条件(如以上所描述的条件)下培养并分析培养基和/或细胞组分中所需产物(即脂类或脂肪酸)的产生是否提高进行评估。该分析技术为本领域内的技术人员公知, 包括光谱、薄层色谱、多种染色方法、酶学和微生物学方法, 以及分析色谱如高效液相色谱(参见例如, Ullmann工业化学百科全书, A2卷, 89-90页和443-613页, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A.等, (1987) HPLC在生物化学中的应用: 生物化学和分子生物学实验室技术(*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*), 17卷; Rehm 等 (1993) 生物技术(*Biotechnology*), 3卷, 第III章: 产物回收和纯化, 469-714页, VCH: Weinheim; Belter, P.A. 等 (1988) 生物分离: 生物技术的下游处理 (*Bioseparations: downstream processing for*

biotechnology), John Wiley和Sons; Kennedy, J.F.和Cabral, J.M.S. (1992) 用于生物材料的回收方法(Recovery processes for biological materials), John Wiley和Sons; Shaeiwitz, J.A.和Henry, J.D. (1988) 生物化学分离, 《Ullmann 工化学百科全书》, B3卷, 第11章, 1-27页, VCH: Weinheim; 和 Dechow, F.J. (1989) 生物技术中的分离和纯化技术(Separation and purification techniques in biotechnology), Noyes Publications.)。

除了以上描述的方法, 从植物材料中提取植物脂类可如Cahoon等(1999) PNAS 96 (22): 12935-12940和Browse等(1986) 分析生物化学(Analytic Biochemistry)152: 141-145中描述进行。脂类或脂肪酸的定性和定量分析参见Christie, William W., 脂类方法学进展(Advances in Lipid Methodology.), Ayr/Scotland : Oily Press. - (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., 气相色谱和脂类, 操作指南(Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide)- Ayr, Scotland: Oily Press, 1989 Repr. 1992. - IX, 307页- (Oily Press Lipid Library; 1); 脂类研究进展(Progress in Lipid Research), Oxford : Pergamon Press, 1(1952)-16(1977)在题目“脂肪和其他脂类化学中的进展”之下。

除了发酵终产物的测定外, 还可以分析用于产生所需化合物的代谢途径中的其他组分如中间体或副产物以确定化合物的总体产生效率。分析方法包括培养基中营养物(例如糖、碳氢化合物、氮源、磷酸盐和其他离子)水平的测量、生物量组成和生长的测量、对生物合成途径中共同代谢物产生的分析, 以及对发酵中产生的气体的测量。用于这些测量的标准方法在应用微生物生理学: 操作方法(Applied Microbial Physiology, A Practical Approach), P.M. Rhodes和P.F. Stanbury, eds., IRL Press, 103-129页; 131-163页; 和165-192页(ISBN: 0199635773)及其引用的参考文献中概述。

一个示例为脂肪酸的分析(简写: FAME, 脂肪酸甲酯; GC-MS, 气液色谱-质谱; TAG, 三酰基甘油; TLC, 薄层色谱)。

脂肪酸产物存在的明确证据可通过应用标准分析方法分析重组生物体而获得, 所述分析方法如由Christie及其中参考文献所描述的多种GC、

GC-MS或TLC(1997, 脂类方法学进展, 第四版(Advances on Lipid Methodology- Fourths ed.): Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, 气相色谱-质谱方法, 脂类(gas-chromatography-mass spectrometry methods, Lipids) 33:343-353)。

待分析的材料可通过超声、玻璃研磨、液氮和碾磨或通过其他可应用的方法进行分解。分解后材料必须进行离心。沉淀物重悬于Aqua dest中, 100℃加热10 min, 冰上冷却并再次离心, 之后在含2%二甲氧基丙烷的甲醇中以0.5M的硫酸90℃萃取1小时, 得到水解的油类和脂类化合物, 从而产生转甲基化的脂类。这些脂肪酸甲酯在石油醚中萃取且最终应用毛细管柱(Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0.32 mm)在170℃和240℃间的温度梯度下20min和240℃下5min进行GC分析。产生的脂肪酸甲酯的身份必须通过应用可商业(即Sigma)获得的标准进行确定。

对于脂肪酸, 当无法获得标准时, 分子身份必须通过衍生和随后的GC分析显示。例如, 三键脂肪酸的定位必须在用4,4-二甲氧基噁唑啉衍生物进行衍生化后通过GC-MS显示(Christie, 1998, 参见以上)。

实施例13: 在异源微生物系统中表达产物

菌株、生长条件和质粒

大肠杆菌菌株XL1 Blue MRF⁺ kan (Stratagene)用于从绿光等鞭金藻中亚克隆新延长酶Ig₂ASE1。我们应用酿酒酵母菌株INVSc 1(Invitrogen Co.)实现该基因的功能表达。大肠杆菌37℃生长在Luria-Bertani肉汤(LB, Duchefa, Haarlem, The Netherlands)中。需要时, 加入氨苄青霉素(100 mg/升), 对固体LB培养基加入1.5%(w/v)的琼脂(Difco)。酿酒酵母30℃生长在YPG-培养基或含有2%(w/v)棉子糖或葡萄糖的完全极限尿嘧啶缺失培养基(complete minimal dropout uracil medium)(CMdum; 参见: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Coen, D.M.,和Varki, A. (1995), 分子生物学当前方法(Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley & Sons, New

York.)中。固体培养基中加入2%(w/v)的Bacto™琼脂(Difco)。用于克隆和表达的载体为pUC 18(Pharmacia)和pYES2(Invitrogen Co.)。

实施例14: 酵母中绿光等鞭金藻的ALA-PUFA特异性延长酶(ASE基因)的克隆和表达

a) 克隆方法

对于在酵母中表达, 首先修饰绿光等鞭金藻基因Ig_ASE1以产生限制性位点以及用于高效翻译的酵母共有序列(Kozak, M. 1986)。由点突变确定位于AUG起始密码子两翼调节真核核糖体的翻译的序列(细胞(*Cell*)44, 283-292.)。在靠近起始密码子处引入一个位点。为扩增开放阅读框, 合成了一对与其5' -和3' -末端互补的引物。

正向引物: 5'-GGTACCATGGCCCTCGCAAACGA-3'

反向引物: 5'-TAGGACATCCACAATCCAT-3'

在热循环仪(Biometra)中以质粒DNA为模板进行PCR反应, 所述扩增应用*Pfu*-DNA聚合酶(Stratagene)以及以下的温度程序: 96°C 3 min; 之后25个循环的96°C 30 s、55°C 30 s和72°C 3 min; 1个循环的72°C 10 min并停止在4°C。

通过琼脂糖-TBE-凝胶电泳确认约800bp正确大小的扩增DNA片段。用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAquick Gel Extraktion Kit (QIAGEN))从胶中提取扩增的DNA并应用Sure克隆连接试剂盒(Sure Clone Ligation Kit (Pharmacia))将其连接到载体pCR 21(Invitrogen)的T/A位点中。转化大肠杆菌XL1 Blue MRF' kan后, 取24个氨苄青霉素抗性转化体进行DNA小量制备(Riggs, M.G. & McLachlan, A. (1986), 用于大数目质粒小量制备的简化筛选方法。生物技术(*BioTechniques*)4, 310-313.), 阳性克隆通过*Bam*HI限制性酶分析进行鉴定。克隆的PCR产物的序列通过再次序列分析进行确认, 所述序列分析应用ABI PRISM Big染料终止循环测序预备反应试剂盒(Perkin-Elmer, Weiterstadt)。

pCR-ASE1的质粒DNA进一步用*KpnI/SacI*限制性酶切且产生的DNA片段连入相同酶切的去磷酸化酵母-大肠杆菌穿梭载体pYES2中,导致生成pY2ASE1。转化大肠杆菌及从转化体小量制备DNA之后,检查载体内的DNA片段的方向。对一个克隆进行培养用于DNA大量制备,所述制备应用了Nucleobond® AX 500质粒DNA提取试剂盒(Nucleobond AX 500 Plasmid-DNA Extraction Kit (Macherey-Nagel, Düringen))。

用改进的PEG/乙酸锂方法(Ausubel 等, 1995)将pY2ASE1和pYES2转化至酿酒酵母中。在含2%葡萄糖的CMdum琼脂板上进行筛选后,选出四株pY2ASE1转化体和一株pYES2转化体用于进一步的培养和功能表达。

b) 在酵母中延长酶活性的功能表达

预培养:

用转基因酵母克隆(pY2ASE1a-d, pYES2)接种含2%(w/v)棉子糖的20 ml CMdum液体培养基中,并在30℃ 200 rpm培养3天,直到600 nm光密度(OD_{600})值达到1.5-2。

主培养:

为进行表达,向具有2%棉子糖和1%(v/v)的表面活性剂NP-40的20 ml CMdum液体培养基中补加待检测的脂肪酸,以使其终浓度为0.003%(w/v)。培养基用预培养物接种直至 OD_{600} 达到0.05。 OD_{600} 为0.2时用2%(w/v)的半乳糖诱导表达16 h,之后培养物的 OD_{600} 达到0.8-1.2。

c) 脂肪酸分析

从酵母培养物中提取总脂肪酸并通过气相色谱进行分析。为此,从5ml培养物中通过离心(1000 x g, 10 min, 4℃)收集细胞并用pH 8.0的100 mM $NaHCO_3$ 洗涤一次以除出残留的培养基和脂肪酸。为制备脂肪酸甲酯(FAMES),细胞沉淀用1 N甲醇 H_2SO_4 和2% (v/v)二甲氧基丙烷在80℃处理1 h。FAMES用2 ml石油醚萃取两次,用pH 8.0的100 mM $NaHCO_3$ 洗涤一次,并用蒸馏水洗涤一次之后用 Na_2SO_4 干燥。在氩气流下蒸发掉有机溶剂且将FAMES溶解在50 μ l的石油醚中。样本在ZEBRON ZB-Wax毛细管柱(30 m, 0.32 mm, 0.25 μ m; Phenomenex)上在Hewlett Packard 6850气相色

谱中用火焰离子化检测器实现分离。炉温的程序为从70℃(保持1 min.)以20℃/min的速率升到200℃,然后以5℃/min的速率升到250℃(保持5 min)并最终5℃/min的速率升到260℃。氮用作运载气体(4.5 ml/min, 70℃)。脂肪酸通过与FAME标准(SIGMA)的保留时间作比较而鉴定。

转基因酵母菌株的脂肪酸分布形式在表2中显示。

表2: 转基因酵母菌株中的脂肪酸分布形式(摩尔百分比)

诱导	- 底物		+ LA (18:2 n-6)		+ ALA (18:3 n-3)		+GLA (18:3 n-6)	
	+gal	-gal	+gal	-gal	+gal	-gal	+gal	-gal
16:0	28.7	30.2	27.0	28.9	26.6	28.9	30.0	31.0
16:1 n-9	41.6	42.4	30.7	25.4	30.1	26.4	24.3	24.6
18:0	6.8	6.1	5.7	5.8	6.3	6.3	6.8	6.2
18:1 n-9	22.9	21.3	16.5	13.4	18.4	16.6	14.7	13.4
18:2 n-6*	-	-	11.0	26.5	-	-	-	-
18:3 n-6*	-	-	-	-	-	-	24.2	24.8
18:3 n-3*	-	-	-	-	10.2	21.8	-	-
20:2 n-6	-	-	9.1	-	-	-	-	-
20:3 n-3	-	-	-	-	8.4	-	-	-
% 延长	0	-	45.3	-	45.2	-	0	-

表2的解释:

供给包含pY2ASE1的转基因酵母的不同底物的脂肪酸延长。作为延长底物提供的外源脂肪酸以星号[*]显示。给出的数值表示为由GC和FID确定的总脂肪酸甲酯的摩尔百分比。对于延长的底物,其也表示为转化百分比。ASE1转基因的表达通过加入半乳糖进行诱导。ASE1开放阅读框仅延长在 $\Delta 9$ 位具有双键的C18底物。所有数值为三次独立实验的平均值。

对由酵母总脂类制备的FAMES的GC分析结果(所述酵母用pY2ASE1转化并在不同外源脂肪酸(ALA, GLA, LA)存在下培养)以及其脂肪酸分布形式在表1中以摩尔百分比显示。GLA的加入并不产生任何

di-homo-GLA(20:3 d8,11,14) 延长产物而ALA得以延长以产生C20:3 d11,14,17且LA也得以延长以产生C20:2 d11, 14。

用pY2ASE1转化并补充外源底物的转基因酵母克隆在气相色谱中显示有额外的峰(在图3A-D中通过星号[*]标识), 所述峰已通过和饲喂/掺入的脂肪酸比较保留时间进行鉴定。气相色谱/质谱可为确认其身份提供额外的支持。

图3 A-D基本上显示了表2中给出的数据的GC图。

表3 A-D的解释:

从含pY2ASE1的转基因酵母中提取的脂肪酸甲酯的GC色谱。酵母培养物在存在(由星号表示)或不存在外源脂肪酸的条件下生长。外源脂肪酸(以钠盐形式)为LA(亚油酸; 18:2 $\Delta^{9,12}$; 18:2 n-6, 参见图3B)、ALA(α -亚麻酸; 18:3 $\Delta^{9,12,15}$; 18:3 n-3, 参见图3A)、GLA(γ -亚麻酸; 18:3 $\Delta^{6,9,12}$; 18:3 n-6, 参见图3C)或无底物(图3D)。图3B显示了通过加入半乳糖而诱导的ASE1 ORF表达。24 h后, 离心收集酵母细胞, 洗涤以除去外源基质之后进行甲基化。应用标准方法分离和检测脂肪酸甲酯并通过已知标准的共迁移鉴定峰。明显地, Ig_ASE1编码 $\Delta 9$ -C₁₈-PUFA-特异性延长活性。鉴定的产物显示Ig_ASE1的核苷酸序列编码藻类绿光等鞭金藻的 $\Delta 9$ 选择性C₁₈脂肪酸延长酶, 所述酶导致在转基因酵母中形成新的脂肪酸。

可用几种其他脂肪酸进行进一步的饲喂实验以更为详细地证实该延长酶的底物选择性。

实施例15: 从转化的生物体中一般地纯化所需产物

从植物材料或真菌、藻类、纤毛虫细胞或以上描述的培养物上清中回收所需产物可通过本领域内公知的多种方法进行。如果所需产物并不从细胞中分泌, 可通过低速离心从培养物中收集细胞, 细胞可通过如机械力或超声等标准技术进行裂解。植物器官可通过机械方式与其他组织或器官分离。匀浆后通过离心移除细胞残余物, 且保留含可溶性蛋白质的上清部分

用于进一步纯化所需化合物。如果产物从所需的细胞中分泌，则通过低速离心从培养物中移除细胞，且保留上清部分用于进一步的纯化。

来自每一纯化方法的上清级分用合适的树脂进行层析，其中或使所需分子保留在层析树脂上而使样本中的众多杂质离去，或使杂质被树脂保留而使样本离去。如果需要可应用相同或不同的层析树脂重复该层析步骤。本领域内的技术人员将熟练选择合适的层析树脂并将其最有效地应用于待纯化的特定分子。纯化产物可通过过滤或超滤进行浓缩，并储存在产物稳定性最大的温度下。

本领域内存在多种已知的纯化方法，且前述的纯化方法并非意在限制。此类纯化技术可参见，例如，Bailey, J.E. & Ollis, D.F. 生物化学工程基础 (Biochemical Engineering Fundamentals), McGraw-Hill: New York (1986) 中描述。分离的化合物的身份和纯度可通过本领域内的标准技术进行评估。这包括高效液相色谱(HPLC)、光谱方法、染色方法、薄层色谱方法、NIRS、酶试验或微生物学试验。此类分析方法的综述见：Patek 等(1994)应用环境微生物学(*Appl. Environ. Microbiol.*) 60: 133-140; Malakhova 等 (1996) *Biotekhnologiya* 11: 27-32; 和Schmidt 等 (1998) *Bioprocess Engineer.* 19: 67-70. Ullmann工业化学百科全书, (1996) A27卷, VCH: Weinheim, 89-90 页, 521-540页, 540-547页, 559-566页, 575-581和581-587页; Michal, G. (1999) 生物化学途径: 生物化学和分子生物学图集(Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology), John Wiley and Sons; Fallon, A. 等 (1987) HPLC在生物化学中的应用, 《生物化学和分子生物学实验室技术》Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology), 17卷。

等同方案

本领域内的技术人员将认识到，或将能够仅用常规实验确定许多与此处描述的本发明特定实施方案等同的方案。这些等同方案意在包括在权利要求内。

<110> 布里斯托尔大学(University of Bristol)

<120> 新延长酶基因以及 $\Delta 9$ -多不饱和脂肪酸的生产

<130> NAE2091/2001

<140> 2001_2091

<141> 2001-03-21

<160> 2

<170> PatentIn version 2.1

<210> 1

<211> 1064

<212> DNA

<213> 绿光等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(790)

<400> 1

g atg gcc ctc gca aac gac gcg gga gag cgc atc tgg gcg gct gtg acc 49

Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr

1

5

10

15

gac ccg gaa atc ctc att ggc acc ttc tcg tac ttg cta ctc aaa ccg 97

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro

20

25

30

ctg ctc cgc aat tcc ggg ctg gtg gat gag aag aag ggc gca tac agg 145

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg

35

40

45

acg tcc atg atc tgg tac aac gtt ctg ctg gcg ctc ttc tct gcg ctg 193

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu

50

55

60

agc ttc tac gtg acg gcg acc gcc ctc ggc tgg gac tat ggt acg ggc 241

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly

65

70

75

80

gcg tgg ctg cgc agg caa acc ggc gac aca ccg cag ccg ctc ttc cag	289
Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln	
85 90 95	
tgc ccg tcc ccg gtt tgg gac tcg aag ctc ttc aca tgg acc gcc aag	337
Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys	
100 105 110	
gca ttc tat tac tcc aag tac gtg gag tac ctc gac acg gcc tgg ctg	385
Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu	
115 120 125	
gtg ctc aag ggc aag agg gtc tcc ttt ctc cag gcc ttc cac cac ttt	433
Val Leu Lys Gly Lys Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe	
130 135 140	
ggc gcg ccg tgg gat gtg tac ctc ggc att cgg ctg cac aac gag ggc	481
Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly	
145 150 155 160	
gta tgg atc ttc atg ttt ttc aac tcg ttc att cac acc atc atg tac	529
Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr	
165 170 175	
acc tac tac ggc ctc acc gcc gcc ggg tat aag ttc aag gcc aag ccg	577
Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro	
180 185 190	
ctc atc acc gcg atg cag atc tgc cag ttc gtg ggc ggc ttc ctg ttg	625
Leu Ile Thr Ala Met Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu	
195 200 205	
gtc tgg gac tac atc aac gtc ccc tgc ttc aac tcg gac aaa ggg aag	673
Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys	
210 215 220	
ttg ttc agc tgg gct ttc aac tat gca tac gtc ggc tcg gtc ttc ttg	721
Leu Phe Ser Trp Ala Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu	
225 230 235 240	
ctc ttc tgc cac ttt ttc tac cag gac aac ttg gca acg aag aaa tcg	769
Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser	
245 250 255	
gcc aag gcg ggc aag cag ctc taggcctcga gccggctcgc gggttcaagg	820

Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
260

agggcgacac ggggggtggga cgtctgcatg gagatggatt gtggatgtcc ttacgcctta 880
ctcatcaatg tcctcccatc tctcccctct agaccttcta ctagccatct agaagggcag 940
ctcagagacg gataccgttc cccctcccct tccttttcgt ctttgctttg ccattgtttg 1000
tttgtctcta ttttttaaac tattgacgct aacgcgttac gctcgcaaaa aaaaaaaaaa 1060
aaaa 1064

<210> 2
<211> 263
<212> PRT
<213> 绿光等鞭金藻

<400> 2

Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
1 5 10 15
Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
20 25 30
Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
35 40 45
Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
50 55 60
Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
65 70 75 80
Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
85 90 95
Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
100 105 110
Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
 260

图 1: 绿光等鞭金藻延长酶(Ig-ASE1, 上列)与高山被孢霉延长酶

(M.alpinaGlelo, 下列)的成对比对。粗体表示相一致。

```

Ig_ASE1      . . . . .MALANDAGERIWAAVTDPEI. . . . . 20
M.alpinaGlelo MESIAPFLPSKMPQDLFMDLATAIGVRAAPYVDPLEAALVAQAQEKYIPTIVHHTR 55
               . . . . .
               ..LIGTFSYLLLKPLLRNSGLVDEKKGAYRTSMIWNVLLALFSAL. . . . . 64
               GFLVAVESPLARELPLMNPFHVLLIVLAYLVTVFVGMQIMKNFERFEVKTFSLH 110
               . . . . .SFYVTATALGWIDYGTGAWLRRQTGDTQPQLFQCPSPVWDSKLFWTAK 112
               NFCLVSISAYMCGGILYEAYQANYGLFENAADHTFKGLPMAKMIWL. . . . . 156
               AFYYSKYVEYLDTAWLRV. . . . .SFLQAFHHFGAPWDVYLGIRLHNEGWFWM 160
               .FYFSKIMEFVDTMIMVLKKNRQISFLHVYHHSSIFTIWLVTFVAPNGEAYFS 210
               FF.NSFIHTIMYTYGLTAAGYKFA..KPLITAMQICQFVGGFLLVWDYINV.P 211
               AALNSFIHVIMYGYFLSALGFKQVSIKFIYITRSQMTQFCMMSVQSSWDMYAMK 265
               CFNSDKGKLFSWAFNYAYVGSVFLFCHFFYQDN.LATKKSAKAGKQL. . . . . 258
               VLGRPGYPPFITALLWFYMWMTMLGLFYNFYRKNNAKLAQAKADAQAKKARKLQ 318

```

图 2: Ig-ASE1 多肽(上列)与小鼠多肽(下列)的成对比对。粗体表示

相一致。

IgASE1MALANDAGERIWAAVTDEIILIGTFSY	27
E1ov14_(Mus)	MGLLDSEPGSVLNAMSTAFNDTVEFYRWWTWTIADKRVADWPLMQSPWPTISISTL	55
VLLALFSALSFYVVTATALGWDYGT	79
	LLLKPLLNRNSGLVDEKKGAYRTSMIWN...VLLALFSALSFYVVTATALGWDYGT	110
	YLLFVWLGPKWMDREFFQMRLVLIINFGMVLNLFIIFRELFMGSYNAGYSYIC	
	GAWLRRQTGDTQPPLFQCPSFVWDSKLFWTAKAFYYSKYVEYLDTAWLR.....	129
	QSVDY.....SNDVNEVRIAAALWVYFVSKGVEYLDTVFFILRKKK	151
	..V S FLQAFHFHFGAPWDVYLGIRLHNEG V WIFMFF.N S FIHTIMYTYGLTAAGY	181
	NQVSFLHVYHCHTMFTLWVIGIKWVAGGQAFFGAQMNSFIHVIMYSYGLTAFGP	206
	KFKAKPLITAMQICQFVGGFLLVWDYINVPCFNSDKGLFSWAFNAYVGSVFL	236
	WIQKYLWVKRYLTMQLVQFHVVTIGHTALS L YTD C PPFKMHWALLAYAISFIFL	261
	FCHFFYQDNLATKKSAGKQL.....	258
	FLNFYTRTYNEPKQS.KTKGTATNGISSNGVNKSEKALENGKPKNGKPKGE	312

图 3A-D: 从表达 Ig-ASE1 基因产物的酵母中分离的脂肪酸甲酯的

HPLC 色谱

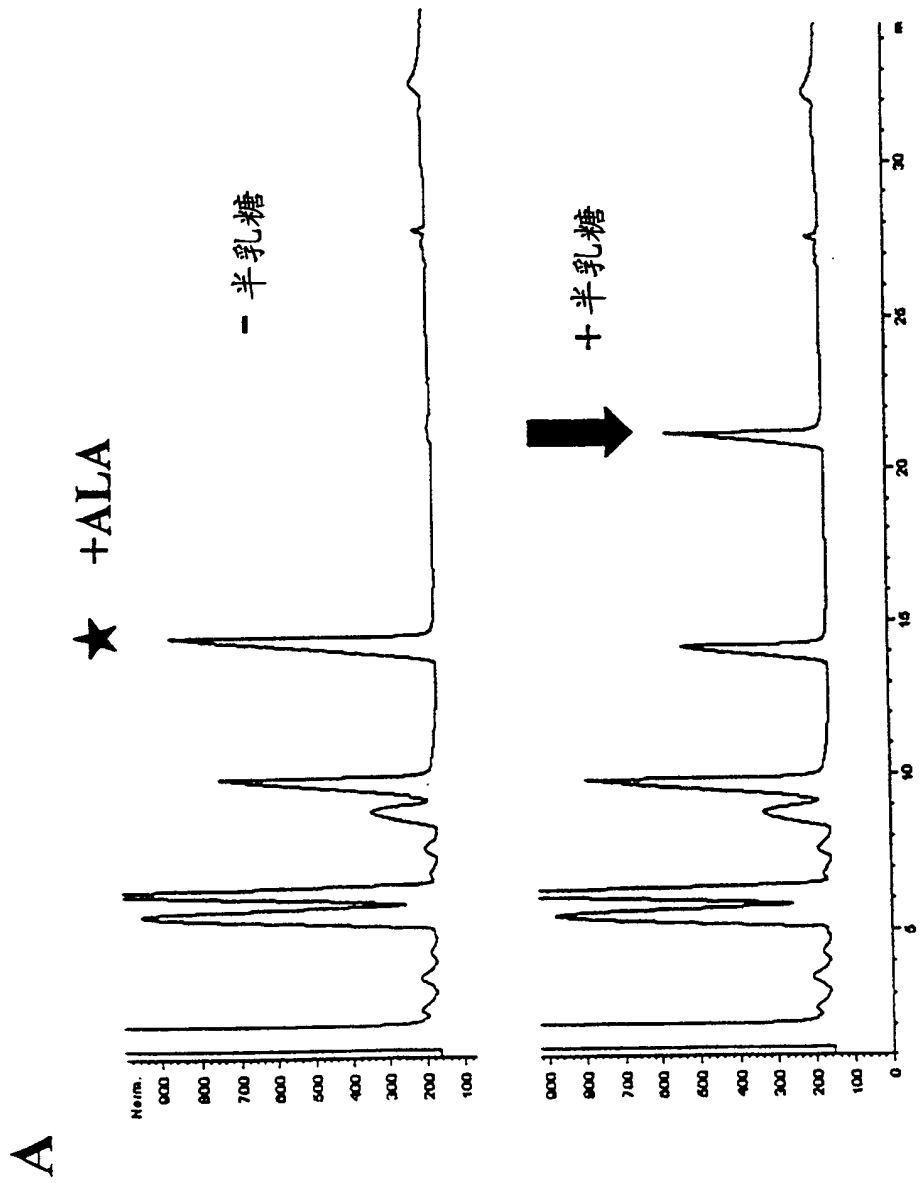


图 3A-D: 从表达 Ig-ASE1 基因产物的酵母中分离的脂肪酸甲酯的

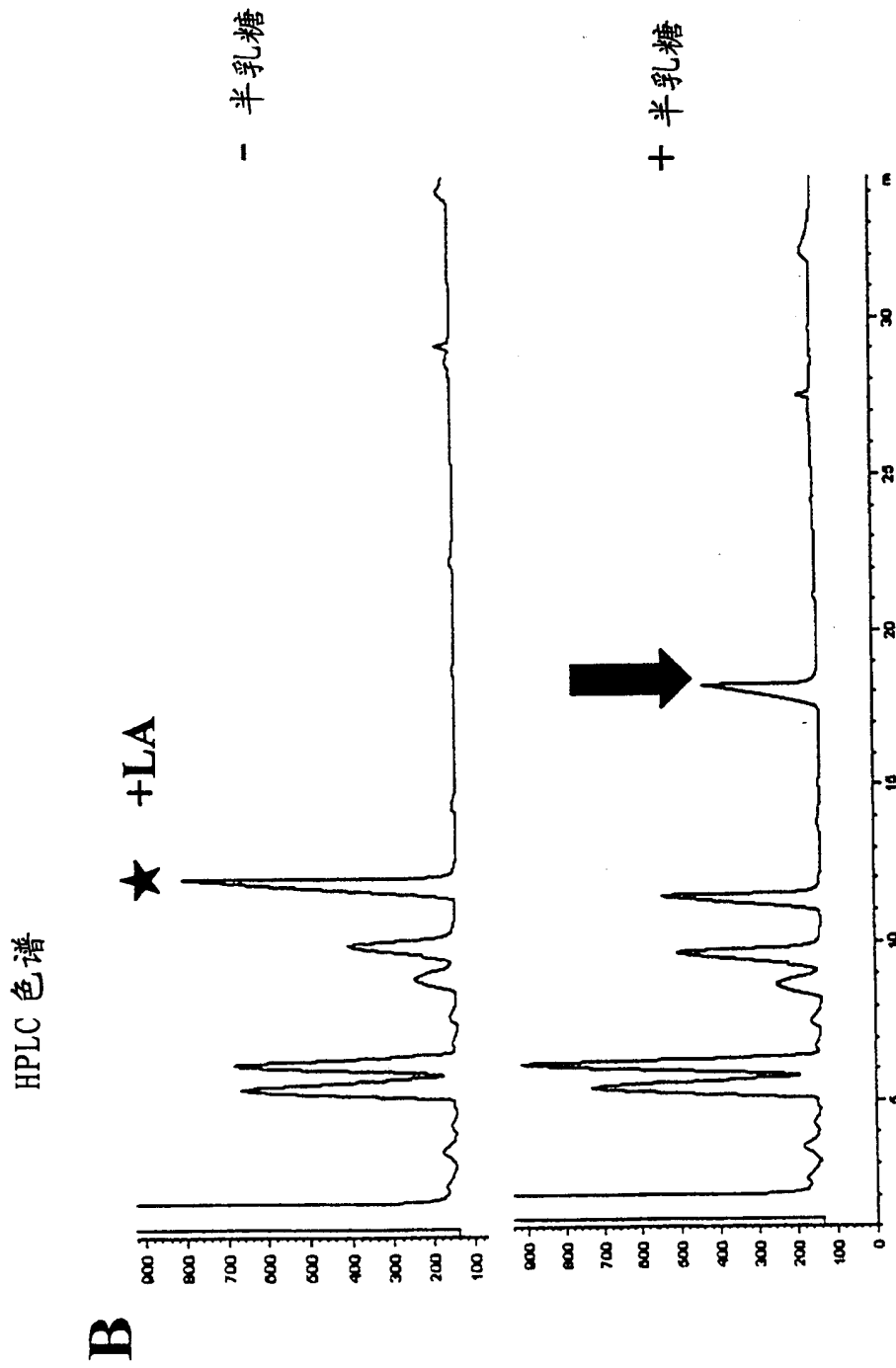


图 3A-D: 从表达 Ig-ASE1 基因产物的酵母中分离的脂肪酸甲酯的

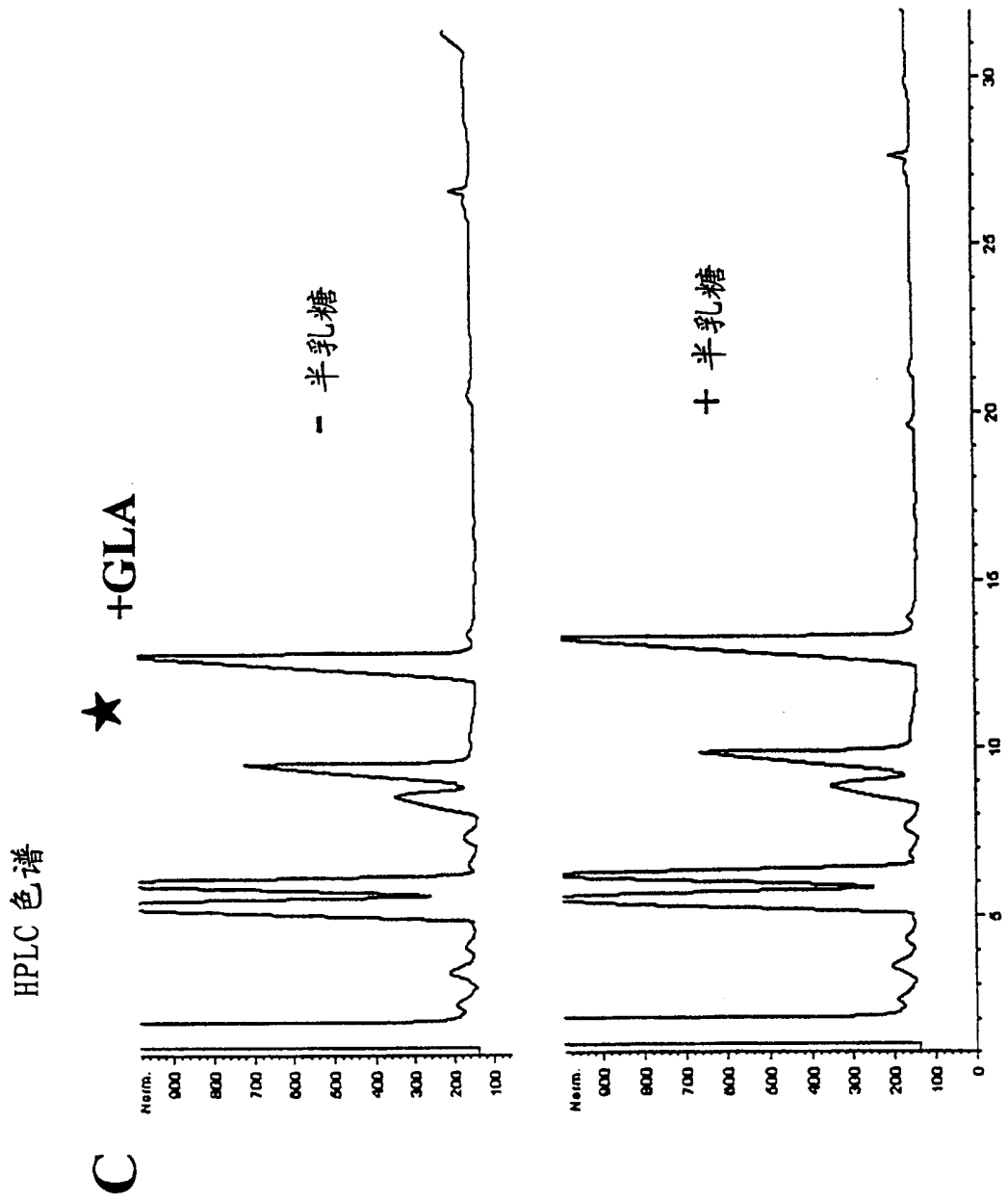


图 3A-D: 从表达 Ig-ASE1 基因产物的酵母中分离的脂肪酸甲酯的

