

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

C12P 7/40

C12N 15/63 C12N 15/53



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97104566.6

[43]公开日 1998年2月25日

[11] 公开号 CN 1174236A

分案原申请号 92113085.6

[22]申请日 92.10.10

[30]优先权

[32]91.10.10 [33]US [31]774,475

[32]92.1.8 [33]JP [31]817919

[71]申请人 罗纳-布朗克农业化学公司

地址 法国里昂

[72]发明人 T·托马斯 A·S·雷迪 M·努西奥  
G·弗雷西内

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜

权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 诱导产生十八碳四烯酸的方法

[57]摘要

本发明公开了一种在  $\gamma$ -亚麻酸缺陷或缺乏的细菌或植物中诱导十八碳四烯酸产生的方法,其特征在于该方法包括用一种 SEQ ID No: 1 或 SEQ ID No: 3 的分离的核酸或者一种具有一个或多个插入、缺失或取代的碱基、同时保持所述分离核酸的亚麻酸产生功能的 SEQ ID No: 1 或 SEQ ID No: 3 的核酸,或者用一种包含所述核酸的载体转化所述细菌或植物。

(BJ)第 1456 号

## 权 利 要 求 书

---

1.一种在 $\gamma$ -亚麻酸缺陷或缺乏的细菌中诱导十八碳四烯酸产生的方法,其中所述细菌产生亚油酸;该方法包括用一种 SEQ ID No: 1 或 SEQ ID No: 3 的分离的核酸,或者用一种具有一个或多个插入、缺失或取代的碱基、同时保持所述分离核酸的亚麻酸产生功能的 SEQ ID No: 1 或 SEQ ID No: 3 的核酸转化所述的细菌。

2.一种在 $\gamma$ -亚麻酸缺陷或缺乏的细菌或植物中诱导十八碳四烯酸产生的方法,其中所述细菌或植物产生亚油酸;该方法包括用一种载体转化所述细菌或植物,所述载体包含一种 SEQ ID No: 1 或 SEQ ID No: 3 的分离的核酸或者一种具有一个或多个插入、缺失或取代的碱基、同时保持所述分离核酸的亚麻酸产生功能的 SEQ ID No: 1 或 SEQ ID No: 3 的核酸,所述分离的核酸可操作地与影响所述核酸的基因产物表达的启动子相连接。

3.一种在 $\gamma$ -亚麻酸缺陷或缺乏的细菌或植物中诱导十八碳四烯酸产生的方法,其中所述细菌或植物产生亚油酸;该方法包括用一种载体转化所述细菌或植物,所述载体包含一种 SEQ ID No: 1 或 SEQ ID No: 3 的分离的核酸或者一种具有一个或多个插入、缺失或取代的碱基、同时保持所述分离核酸的亚麻酸产生功能的 SEQ ID No: 1 或 SEQ ID No: 3 的核酸,所述分离的核酸可操作地与影响所述核酸的基因产物表达的启动子和终止信号相连接。

# 说明书

## 诱导产生十八碳四烯酸的方法

5           亚油酸(18: 2) (LA)经 $\Delta$  6-去饱和酶的作用转变成 $\gamma$  亚麻酸(18: 3) (GLA)。当 $\Delta$  6-去饱和酶或者是编码这种酶的核酸被转入到产 LA 的细胞中后即可产生 GLA。本发明提供了含有 $\Delta$  6-去饱和酶基因的核酸。更具体地说, 本发明的核酸包括 $\Delta$  6-去饱和酶基因的启动子、编码区和终止区。本发明进一步还涉及含有与异源调节顺序进行功能性结合的  
10            $\Delta$  6-去饱和酶编码区的重组构建体。本发明的核酸和重组体构建体可用在转基因生物体中生产 GLA。

          不饱和脂肪酸, 如亚油酸( $C_{18} \Delta 9, 12$ )和 $\alpha$ -亚麻酸( $C_{18} \Delta 9, 12, 15$ )是每日食物摄入的必需成分, 它不能被脊椎动物自身合成, 因为脊椎动物细胞只能在脂肪酸的 $\Delta$  9 位置引入双键, 但不能在 $\Delta$  9 双键和脂肪酸边的甲基末端之间引入另外双键。亚油酸和 $\alpha$ -亚麻酸是其它产物的前体, 所以它们是必需脂肪酸, 并且通常是从植物中获取。亚油酸  
15           可以由哺乳动物转变为 $\gamma$ -亚麻酸(GLA,  $C_{18} \Delta 6, 9, 12$ ), 再转变为花生四烯酸(20: 4)。花生四烯酸是一种相当重要的脂肪酸, 因为它是大多数前列腺素必不可少的前体。

20           通过转变为 GLA 和花生四烯酸, 亚油酸食品中满足了食物中的 GLA 和花生四烯酸的需要。然而, 已经证明了饱和脂肪酸的消耗和疾病的发生如高胆固醇血症、粥样硬化以及与冠脉疾病易感性相关的化学物质紊乱之间的关系。而消耗不饱和脂肪与血胆固醇的降低有关, 患粥样硬化的危险性就减小。GLA 饮食的治疗性优点来自于 GLA 可  
25           作为花生四烯酸的前体, 继而有助于前列腺素的合成。因此, 更多的不饱和的 GLA 而不是亚油酸将有益于健康, 但是, 在任何商业性生产的谷类植物中实际上都不存在 GLA。

5 亚油酸在 $\Delta$  6-去饱和酶的作用下转变为 GLA。 $\Delta$  6-去饱和酶具有约 359 个氨基酸，有一个膜结合区和一个脂肪酸去饱和作用的活化位点。当 $\Delta$  6-去饱和酶转入一个本身只产生亚油酸而不产生 GLA 的细胞中时，该细胞就可以产生 GLA。本发明通过提供 $\Delta$  6-去饱和酶的基因编码，产生含有功能性 $\Delta$  6-去饱和酶并产生 GLA 的转基因生物体。除了产生大量的 GLA 外，本发明还提供了新的 GLA 饮食来源。

本发明涉及一种被分离的 $\Delta$  6-去饱和酶基因，具体地说，这种被分离的基因含有 $\Delta$  6-去饱和酶启动子、编码区和终止密码区。

10 本发明还涉及含有 $\Delta$  6-去饱和酶启动子、编码区、终止密码区的表达载体。

本发明还涉及包括 $\Delta$  6-去饱和酶编码区与外源调节区即非源于 $\Delta$  6-去饱和酶基因的单元进行功能性结合的表达载体。

本发明还提供含有本发明载体的细胞和生物体以及这类生物体的子代。

15 本发明还提供了被分离的细菌性 $\Delta$  6-去饱和酶，进一步还涉及被分离的编码细菌性 $\Delta$  6-去饱和酶的核酸。

本发明提供了产生增高 $\gamma$ -亚麻酸(GLA)含量的植物的方法，通过用本发明的分离的核酸转化植物细胞，以及用上述高 GLA 含量的植物细胞再生植物。

20 本发明提供了一种产生耐寒植物的方法。

图 1 描绘了集胞藻属菌(*synechocystis*)  $\Delta$  6-去饱和酶(图 1A)和 $\Delta$  12-去饱和酶(图 1B)的推测氨基酸顺序的水疗法图。用实线表示推测的膜距区(membrane spanning regions)。用 19 个氨基酸残基窗格大小计算疏水指数(kyte, et al, 1982, J. Molec. Biol. 157)。

25 图 2 表示野生型鱼腥藻属细菌(图 2A)和转基因鱼腥藻属细菌(图 2B)的气液色谱图。

图 3 是带有重叠区和亚克隆的粘性质粒 cSy75、cSy13 和 cSy7 的简图。cSy75、cSy75-3.5 和 cSy7 的亚克隆的起始点用带斜条的框

线表示。还未被活化的限制性位点写在括号内。

图 4 表示野生型(图 A)和转移基因型烟草(图 B)的气液色谱图。

5 本发明提供了一种分离的编码 $\Delta$  6-去饱和酶的核酸, 为了鉴定编  
码 $\Delta$  6-去饱和酶的核酸, 从能产生 GLA 的生物体中分离 DNA。例如,  
所说的生物体可以是动物细胞、某些真菌(如被孢霉属), 某些细菌(例  
如集胞藻属)或某些植物(琉璃苣、月见草属、茶藨子属植物)。基因 DNA  
10 的分离可以用本领域普通技术人员已知的各种方法进行, 例如用  
Sambrook 等人举证的方法(Molecular Cloning: A laboratory Manual,  
Cold Spring Harbor, NY. 1989)。用物理方法或酶消化作用将分离的  
DNA 裂解, 然后再通过参考文献中的(例如 Sambrook et al, 1989)各种  
已知方法把裂解片段克隆到合适的载体中, 如噬菌体或粘性质粒载  
体。本文特别设计了含有本发明 DNA 的表达载体。通过获得的功能性  
15 分析结果鉴定编码 $\Delta$  6-去饱和酶的 DNA。含有裂解的 DNA 片段的载  
体通过感染、转结合和转染等方式转移到产亚油酸但不产 GLA 的宿主  
生物体中。本文所说的“转化”通常指的是将外源 DNA 掺入到宿主细  
胞中, 将重组 DNA 导入宿主生物体中的方法是本领域普通技术人员已  
知的。例如可以参考的文献有 Sambrook et al., 1989。这些有机体的  
GLA 的生产(如功能的获得)诸如气液色谱图或其它普通技术人员所熟  
悉的方法鉴定。

20 经诱导产生 GLA 的生物体, 亦即通过载体的导入而获得上述功  
能的生物体被证明为表达了编码 $\Delta$  6-去饱和酶的 DNA, 再从生物体  
中回收所说的 DNA。回收的 DNA 可再次裂解, 用表达载体进行克隆,  
并用上述过程进行功能性评估, 以便更为精确地弄清楚编码 $\Delta$  6-去饱  
和酶的 DNA。

25 本发明的一个例子是从蓝藻细菌集胞藻属菌(Pasteur Culture  
Collection, (PCC) 6803, American Type Culture Collection, (ATCC) 27184)  
中分离随机的 DNA, 克隆到粘性质粒载体中, 并通过转结合作用导入  
到 GLA 缺陷的蓝藻细菌鱼腥藻属菌菌株 PCC7120, ATCC 27893 中。

用气相色谱监测从鱼腥藻属菌的亚油酸生成 GLA, 并分离相应的 DNA 片段。

用本领域普通技术人员已知的方法, 例如 Sam brook 等人(1989)描述的方法对分离的 DNA 排序。

5 根据本发明, 已经分离了含有  $\Delta$  6-去饱和酶基因的 DNA。更具体是说, 一段含有  $\Delta$  6-去饱和酶基因的 3.588kb 的 DNA 已从蓝藻细菌集胞藻属菌中分离出来。测定 3.588kb DNA 的核苷酸顺序并示于 SEQ ID NO. 1 中。表明有效编码区的开放读码存在于核苷酸 317-1507 和核苷酸 2002-3081。为了明确负责编码  $\Delta$  6-去饱和酶的核苷酸, 把提供  
10  $\Delta$  6-去饱和酶活性的 3.588kb 片段裂解为二个亚片段。其中的每一个亚片段都仅含有一个开放读码。片段 ORF1 含有核苷酸 1-1704, 片段 ORF2 含有核苷酸 1705-3588。每一个片段都以向前和逆向两种方向亚克隆到结合的表达载体中(AM542, Wolk et al, 1984 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1561), 该载体含有一种蓝藻细菌羧化酶启动子。所得到的构建体[即 ORF1 (F), ORF1 (R), ORF2 (F)和 ORF2 (R)]通过标准方法  
15 (例如参见 Wolk, et al, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1561)结合到野生型鱼腥藻属菌 PCC7120 中。在选择性培养基(含有 30  $\mu$ g/ml 新霉素的无机培养基 BG11N, 参见 Rippka et al, 1979, J. Gen Microbiol. 111, 1)生长二周后, 从死亡的非结合性细胞的棕色背景中被结合的鱼腥藻属细胞为 Neo<sup>R</sup> 绿色菌落。筛选出绿色菌落, 并在选择性液体培养基(含有 15  $\mu$ g/ml 新霉素的 BG11N)中生长。用标准方法(例如 Dahmer et al, 1989, Journal of American Oil Chemical Society 66, 543)从所得的含有向前和逆向定位的 ORF1 和 ORF2 构建体的转结合体中提取脂类, 作为对比, 同样也从鱼腥藻属菌和集胞藻属菌的野生型培养物中提取  
20 脂类。通过气液色谱(GLC), 例如用装有氢火焰电离检测器和毛细管柱的 Tracor-560 气液色谱分析脂肪酸甲基酯。GLC 分析结果示于表 1 中。

表 1: 野生型和转基因蓝藻细菌中 C<sub>18</sub> 脂肪酸

来 源	18: 0	18: 1	18: 2	γ 18: 3	α 18: 3	18: 4
鱼腥藻属菌(野生型)	+	+	+	-	+	-
鱼腥藻属菌 + ORF1 (F)	+	+	+	-	+	-
鱼腥藻属菌 + ORF1 (R)	+	+	+	-	+	-
鱼腥藻属菌 + ORF2 (F)	+	+	+	+	+	+
鱼腥藻属菌 + ORF2 (R)	+	+	+	-	+	-
集胞藻属菌(野生型)	+	+	+	+	-	-

如 GLC 分析所确定的, 当含有以向前方向定位的 ORF2 的构建体  
 5 通过转结合, GLA 缺陷的鱼腥藻属菌便获得了生产 GLA 的功能。带有以相对于羧化酶启动子而言相反的方向定位的 ORF2 或以正或反两个方向定位的 ORF1 的构建体的转结合体未显示出 GLA 的生成。这一分析结果表明, 位于 1884bp 片段中的单个开放读码编码 Δ 6-去饱和酶。1884bp 片段示于 SEQ ID NO: 3 中。这也分别由示于图 1(A)和(B)  
 10 中的 Δ 6-去饱和酶和 Δ 12-去饱和酶[Wada et al, 1990, Nature, 347]之间水疗法图完全相似性所证实。

通过上述功能性分析, 或通过用分离编码鱼腥藻菌 Δ 6-去饱和酶的核酸作为杂交探针的核酸杂交技术从其它的产 GLA 生物体鉴定分离的编码 Δ 6-去饱和酶的核酸。本发明设想的基因组克隆和 cDNA 克隆的方法是技术人员已知的。杂交探针可以含有公开于 SEQ ID NO: 1  
 15 中的完整 DNA 序列或者是限制性片段或是其它的 DNA 片段, 包括寡核苷酸探针, 用交叉杂交来克隆同源基因的方法是本领域普通技术人员已知的, 例如可见于 Sambrook (1989)和 Beltz et al, 1983, Methods in Enzymology 100, 266。

20 通过导入编码 Δ 6-去饱和酶 DNA 而获得生产 GLA 功能的转基因

生物体也获得了产十八碳四烯酸(octadecatetraenoic acid) (18: 4  $\Delta$  6,9,12,15) 的功能。十八碳四烯酸(Octadecatetraenoic acid)正常存在于鱼油和紫草科的一些植物种中(Craig et al, 1964, J. Amer. Oil Chem. Soc. 41, 209-211; Gross et al; 1976, Can. J. Plant Sci. 56, 659-664)。在本发明的转基因生物体中, 十八碳四烯酸是在  $\Delta$  6-去饱和酶的作用下  $\alpha$ -亚麻酸进一步去饱和或是在  $\Delta$  15-去饱和酶作用下 GLA 进一步去饱和而得到的。

由 ORF2 编码的 359 个氨基酸, 即编码  $\Delta$  6-去饱和酶的开放读码用 SEQ ID NO: 2 表示。本发明进一步设想了编码 SEQ ID NO: 2 的氨基酸的其它核苷酸顺序。鉴定例如由遗传密码简并性而产生的这类顺序是普通专业技术人员已知的。而且, 通过上述得到的功能性分析, 本领域的普通技术人员能确定含有编码  $\Delta$  6-去饱和酶的 ORF2 的 1884bp 片段的更次一级片段。

本发明设计了任何  $\Delta$  6-去饱和酶多肽片段以及保留有将 LA 转变成 GLA 活性的核酸。

在本发明的另外一方面, 含有 1884bp 片段的载体或含有  $\Delta$  6-去饱和酶基因启动子、编码顺序和终止区的更小的片段被转移到一种生物体中, 例如蓝藻细菌中, 在所说的生物体中,  $\Delta$  6-去饱和酶启动子和终止区是能发挥功能的。因此, 本发明提供了生产重组的  $\Delta$  6-去饱和酶的生物体。另外一方面, 本发明提供了分离的  $\Delta$  6-去饱和酶, 它能够通过标准的蛋白质纯化技术(例如可参见 Ausubel et al, 1987, Current Protocols in molecular Biology, Green Publishing Associates, New York)从重组生物体中纯化出来。

本发明还提供了含有编码  $\Delta$  6-去饱和酶的 DNA 的载体。在各种生物体中构建适合的载体指导表达  $\Delta$  6-去饱和酶编码顺序是本领域普通技术人员显而易见的。特别优选的是可复制性表达载体, 本文所述的可复制性表达载体指的是经过处理的用于调控目的基因即  $\Delta$  6-去饱和酶基因表达的 DNA 或 RNA 的分子。优选的载体是质粒、噬菌体、



粘性质粒或病毒。诸如 wolk et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1561-1565 和 Bustos et al (1991) J. Bacteriol. 174, 7525-7533 所述的往复性载体证实与本发明相符。一些文献(Sambrook et al, (1989); Goeddel, ed. (1990) Methods in Enzymology 185 Academic press; Perbal 1988, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons, Inc.)对能够插入和表达编码所说 $\Delta$  6-去饱和酶核酸的载体进行了详细论述。这类载体还含有能有效表达编码 $\Delta$  6-去饱和酶核酸的核酸顺序。能够有效进行基因产物表达的顺序单元包括启动子、增强子成分; 上游活化顺序、转录终止信号和多腺苷酸化位点, 基本的和组织特异性的启动子本发明都考虑到了。为了转化植物细胞, 花椰菜花叶病毒(CaMV) 35s 启动子和在植物种子突变过程中被调整过的启动子都特别值得感兴趣。所有这类启动子和转录调节成分的单个体或结合体用于本发明的可复制性表达载体, 并为本领域普通技术人员所了解。例如 Restrepo 等人 (Plant Cell, 2,987, 1990)描述过 CaMV35S 启动子。还设计了经遗传工程处理的和遗传突变的调节顺序。

普通的技术人员能够决定适于在特定宿主细胞中进行表达的载体和调节成分。例如, 含有来自编码鱼腥藻属菌的羧化酶基因启动子的载体可连接到 $\Delta$  6-去饱和酶编码区, 并进一步可连接到来自集胞藻属菌的终止信号, 这些载体在蓝藻细菌中适合 $\Delta$  6-去饱和酶的表达。本文中的“可连接”(Operably linked)指的是启动子和终止子顺序有效地发挥调节转录的作用。另一个例子是适于在转基因植物中表达 $\Delta$  6-去饱和酶的载体能含有一个衍生于半日花素。napin 或 glycin 种子特异性的启动子顺序, 该启动子可连接到 $\Delta$  6-去饱和酶编码区, 并进一步可行性连接到种子终止信号或 nopaline 合成酶终止信号。

本发明特别考虑了将半日花素(helianthinin)调节成分作为指导本发明 $\Delta$  6-去饱和酶表达的启动子成分, 调节成分在申请号为 628、354 申请日为 1991, 4, 8 的美国未决申请中公开, 该申请并入本文作为参考。

对本文公开的核苷酸顺序或具有所设计功能的调节成分的修饰也包括在本发明范围内。这类修饰作用包括插入、替代和缺失以及反映遗传密码简并性的特异性替代。

5 构建这种杂交载体的标准技术是本领域普通技术人员已知的，并可参见文献，如 Sambrook et al, 1989 或大量可随处可得的关于重组 DNA 技术的实验室手册。多种设计可用于 DNA 片段的连接，所做的选择取决于 DNA 片段的末端性质，根据本发明，杂交载体包括便于克隆、表达或加工的其它核苷酸顺序成分，例如编码信号肽的顺序，编码使蛋白质在内质网中滞留所要求的 KDEL 的顺序，或是编码引导  $\Delta$  6-去饱和酶进入叶绿体的转运肽的顺序。这些顺序是本领域普通专业  
10 人员已知的。例如，Van den Broeck 等人(Nature 313, 358, 1985)已描述过比较理想的转运肽。又如，Michaelis 等人(Ann. Rev. Microbiol, 36, 425, 1982)公开了原核的和真核的信号顺序。

本发明的另外一个方面是提供了含有编码本发明的  $\Delta$  6-去饱和酶  
15 DNA 的生物体而不是蓝藻细菌。根据本发明的设计，转基因生物体包括细菌、蓝藻细菌、真菌、植物和动物。本发明分离的 DNA 可以通过现有技术已知的方法，如感染、转染、转化或转结合而导入宿主细胞中。将本发明的 DNA 转移到上述生物体中的技术是普遍知晓的，可见于参考文献中，如 Sambrook et al, 1989。

20 已知多种植物转化方法。根据 Horsch 等人(Science 227, 1229, 1985)描述的叶花盘转化一再生方法可将  $\Delta$  6-去饱和酶基因导入到植物中。其它的转化方法，如原生质体培养(Horsch et al, 1984, Science 223, 496; De Block et al (1984) EMBO J. 2, 2143, Barton et al, (1983) Cell 32, (1033)也可以应用，且包括于本发明的范围内，在一个优选的实施方案中，  
25 用土壤杆菌衍生的载体转化植物。而且，其它的方法可用来将本发明的  $\Delta$  6-去饱和酶基因插入到植物细胞中。这类可选择的方法包括 biolistic 方法(Klein et al, 1987, Nature 327, 70)、电穿孔、化学诱导 DNA 摄入以及用病毒或花粉作为载体的应用。

当转化的方法需要时，本发明的 $\Delta$  6-去饱和酶基因可以插入到植物转化载体中，例如 Bevan (1984, Nucleic Acids Res. 12, 8111)描述过的二元载体。植物转化载体可以通过修饰根癌土壤杆菌的天然基因转移系统进行衍生，天然系统包括含有称作 T-DNA 的大片段的大 Ti (肿瘤诱生性)质粒，它可被转移到转化的植物中。 Ti 质粒的另外一个片段 Vir 区是负责 T-DNA 转移的。 T-DNA 区是由末端重复区接界的。在经修饰的二元载体中，缺失了肿瘤诱导基因，并利用 Vir 区的功能转移由 T-DNA 边界顺序接界的外源 DNA。 T 区还含有一个用于抗生素抗性的可选择性标记和一个作为转移的插入顺序的多克隆位点。这种工程菌被称为“去武装”根癌土壤杆菌菌株，并且允许由 T-区接界的顺序的有效转化到植物的核基因组中。表面无菌的叶花盘与去武装的含外源 DNA 的根癌土壤杆菌一起孵育，培养 2 天，然后转移到含抗生素的培养基中。当培养物在含有合适的抗生素的培养基中生根之后，筛选被转化的嫩芽，再转移到泥土中进行再生。

本发明的另一方面是提供了含有本发明分离的 DNA 的转基因植物或这些植物的子代，单子叶和双子叶植物都考虑到了。借助上述任一种植物转化方法分离的编码 $\Delta$  6-去饱和酶的 DNA 转化植物细胞。被转化的植物细胞通常是在胼胝体培养物或叶花盘中，通过本领域技术人员已知的方法(例如， Horsch et al, 1985, Science, 227, 1129)再生成一个完全的转基因植物。在一个优选的实施例方案中，转基因植物是向日葵、油籽油菜、玉米、烟草、花生或大豆。因为转基因植物的子代遗传编码 $\Delta$  6-去饱和酶 DNA，得自被转化植物的种子或插枝常用于保持转基因的植物系。

本发明进一步提供了生产 GLA 含量提高了的转基因植物的方法。该方法包括将编码 $\Delta$  6-去饱和酶的 DNA 导入缺乏 GLA 或 GLA 水平较低但含有 LA 的植物细胞中，和从转基因细胞再生提高了 GLA 含量的植物。特别考虑了商业性生产的农作物植物作为转基因生物体，它包括但不限于向日葵、大豆、油籽油菜、玉米、花生和烟草。

本发明进一步提供了生产含有 GLA 转基因生物体的方法。该方法包括将编码  $\Delta$  6-去饱和酶 DNA 导入缺乏 GLA 或具有低水平 GLA 但含有 LA 的生物体中，在另一个实施方案中，该方法包括将含有编码  $\Delta$  6-去饱和酶和  $\Delta$  6-去饱和酶 DNA 的一种或多种表达载体导入缺乏 GLA 和 LA 的生物体中。因此，通过表达  $\Delta$  12-去饱和酶，在缺乏 LA 和 GLA 的生物体中诱导 LA 的产生，然后因  $\Delta$  6-去饱和酶的表达而产生 GLA。通过本领域技术人员已知的重组技术方法(Sambrook, et al, 1989)和已公开的  $\Delta$  12-去饱和酶顺序(Wada et al, 1990, Nature 347, 200-203)可以构建含有编码  $\Delta$  12-去饱和酶或是含有编码  $\Delta$  12-去饱和酶和  $\Delta$  6-去饱和酶的 DNA 的表达载体。

此外，根据本发明，已发现 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 2002-3081 编码蓝藻细菌的  $\Delta$  12-去饱和酶，据此。该顺序能用于构建有关本题的表达载体。特别考虑于商业性生产的农作物植物的作为转基因生物体，它包括但不限于向日葵、大豆、油籽菜油、玉米、花生和烟草。

本发明进一步涉及一种在植物中诱导抗寒力的方法。寒冷敏感性可能产生于细胞膜中脂质的相变。膜脂中相变温度取决于脂肪酸的不饱和度。因此，通过导入  $\Delta$  6-去饱和酶使 LA 转变成 GLA 以增加不饱和度即可诱生或改善抗寒能力。鉴此，本发明的方法包括将编码  $\Delta$  6-去饱和酶的 DNA 导入植物细胞，并从所说的被转化植物细胞再生改善了抗寒力的植物，在一个优选的实施方案中，所说的植物是向日葵、大豆、油籽油菜、玉米、花生或烟草。

下面的实施例将进一步说明本发明。

#### 实施例 1

##### 菌株和培养条件

集胞藻属菌(PCC 6803, ATCC 27184)、鱼腥藻属菌(PCC 7120, ATCC 27893)和聚胞藻属菌(Synechococcus) (PCC 7942, ATCC 33912) 置 BG11N + 培养基(Rippka et al, 1979, J. Gen. Microbiol. 111, 1-610 中在白炽灯照明条件下( $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )于  $30^\circ\text{C}$  行光能自养性生长。

选择粘性质粒和质粒并使之在 Maniatis et al, (1982) [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold spring Harbor laboratory, Cold Spring, New York]等人所描述的在标准浓度的含抗生素的 LB 介质的 大肠杆菌菌株 DH5  $\alpha$  中生长。

## 5 实施例 2

### 集胞藻属菌粘性质粒基因组文库的构建

用 Sau 3A 部分消化得自集胞藻属菌(PCC 6803)的总的基因组 DNA, 并在蔗糖梯度上进行分离(Austubel et al, 1987, Current protocols in molecular Biology, Greene publishing Associates and Wiley Inter scinec, New York)。筛选含有 30-40kbDNA 片段的馏份, 并连接到粘性质粒载体的脱磷酸 BamHI 位点 PDUCA7 (Buikema et al (1991) J. Bacteriol. 183, 1879-1885)。如 Ausubel 等人所述(1987)在体外包装连接的 DNA, 并包装的噬菌体在含有 AVal 和 E-co4711 甲基酶辅助质粒 pRL528 (Buikema et al. 1991)的 E. Col-iDH5  $\alpha$  中繁殖。随机分离共 1152 克隆, 并单个维持于 12 个 96 孔微量滴定板中。

## 15 实施例 3

### 鱼腥藻属菌获得表达 GLA 的功能

鱼腥藻属菌(PCC 7120)是一种花丝状蓝藻细菌, 缺乏 GLA 但含有足够量的生成 GLA 的前体亚油酸(图 2; 表 2)。实施例 2 中所述的集胞藻属菌粘性质粒文库结合到鱼腥藻属菌(PCC 7120)中, 鉴定生产 GLA 的转结合体。在 BG11N + 液态介质中, 鱼腥藻属菌细胞生长至对数中期, 之后在相同介质中悬浮至终浓度约  $2 \times 10^8$  细胞/ml。生长于含氨基青霉素的 LB 中的 E. Coli Rp4 (Burkardt et al, 1979, J Gen. Microbiol. 114, 341-348)对数中期培养物经洗涤后重悬于新鲜的 LB 培养基中。然后将鱼腥藻属菌与 RP4 混合, 并均匀地分散于含有 5%LB 的 BG11N + 平板上。粘性质粒基因组文库经平板印影培养到含  $50 \mu\text{g}$  /ml 卡那霉素和  $17.5 \mu\text{g}$  /ml 氯霉素的 LB 平板上, 继而将上述培养物切成小片置于含有鱼腥藻属菌和 RP4 和 BG11N + 平板上, 于  $30^\circ\text{C}$  孵育

24 小时后, 30  $\mu$ g/ml 的新霉素加至平板底层于 30  $^{\circ}$ C 继续孵育直至出现转结合体。

结合作用完成后分离单个的转结合体, 并置于含 15  $\mu$ g/ml 新霉素的 2ml BG11N + 液体培养基中生长。如下所述, 从野生型培养物和含有 10 个转结合体库的培养物中制备脂肪酸甲基酯。通过离心收集野生型和转基因型蓝藻细菌培养物。用蒸馏水洗涤二次。按 Dahmer 等人所述方法(1989, J. Amer. Oil Chem. Soc. 66, 543-548)从这些培养物中提取脂肪酸甲基酯, 并通过气液色谱(GLC)用装有氢火焰电离检测仪和毛细管柱(30m  $\times$  0.25mm, 结合了 FSOT Superox II, Alltech Associate Inc., IL)的 Tracor-560 进行分析。以滞留时间和标样(得自 Sigma 化学公司)的共同色谱分析来鉴定脂肪酸。平均脂肪酸组成通过各个 C<sub>18</sub> 脂肪酸峰值区与内标区的比值归一化确定。

有代表性的 GLC 图谱示于图 2 中, 还显示了 C<sub>18</sub> 脂肪酸甲基酯。通过与已知的脂肪酸甲基酯标准物的洗脱时间进行比较鉴别出各个峰, 并用气相色谱质谱光谱测定法进行证实。图 2(A)描述了野生型鱼腥藻属菌脂肪酸的 GLC 分析。箭头表示 GLA 的迁移时间。图 2(B)是带有 pAm542 + 1.8F 的鱼腥藻属菌转结合体脂肪酸的 GLC 图谱。证明了 2 个产 GLA 库(从代表 250 个转结合体的 25 个库中)能产生 GLA。对每个 GLA 阳性库的单个转结合体进行产 GLA 的分析, 两个来自不同库的独立的转结合体 AS13 和 AS75 被鉴定为能表达很高水平的 GLA 并分别含有粘性质粒 cSy13 和 cSy75(图 3)。粘性质粒在约 7.5kb 长度的区域重叠。cSy75 的一个 3.5kb NheI 片段再克隆入载体 pDUCA7 中, 并转移到鱼腥藻属菌中从而获得 GLA 表达功能(图 2)。

cSy75-3.5 的 3.5kb NheI 片段的两个 NheI/Hind III 亚片段(1.8 和 1.7kb)被亚克隆到 “pBLUESCRIPT” 中(Stratagene)(图 3)用于测序。按照 Maniatis 等人(1982)和 Ausubel 等人(1987)所述的方法进行标准的分子生物学技术操作。通过用 Advanced DNA Technologies Laboratory (Biology Department, Texas A & M University)合成特殊的低聚核苷酸引

物用“SEQUENASE”(United States Biochemical)进行pBS1.8的双链双脱氧测序(Sanger et al. 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467)。用Devereux等人(1984, Nucleic Acids Res. 12, 387-395)描述的GCG(Madison WI)软件进行DNA序列分析。

5           两个Nhe I/Hind III片段都以相对于蓝藻细菌羧化酶启动子的向前和逆向两个方向转移到结合性表达载体AM542中,再经结合作用导入鱼腥藻属菌。含有向前方向定位的1.8kb片段(AM542-1.8F)的转结合体产生大量的GLA和十八碳四烯酸, (图2, 表2)。含有其它构建体(无论是逆向定位的1.8kb片段还是向前和逆向定位的1.7kb片段)的转结合体不能产生可检测水平的GLA(表2)。

10           图2将从野生型鱼腥藻属菌中提取的C<sub>18</sub>脂肪酸图谱(图2A)与含有向前方向定位的cSy75-3.5的1.8kb片段的转基因鱼腥藻属菌提取物中的C<sub>18</sub>脂肪酸图谱(图2B)进行了比较。得自AM542-1.8F的脂肪酸甲基酯的GLC分析显示了一个与可靠的GLA标准物滞留时间一致的峰。经气相色谱质谱光谱测定法进行的有关该峰的分析证实, 它的质谱裂解方式与GLA参照样品的相同。改变了多不饱和脂肪酸含量的转基因鱼腥藻属菌在生长速度和形态学方面与野生型鱼腥藻属菌相似。

20

25

表 2: 野生型和转基因蓝藻细菌中 C<sub>18</sub> 脂肪酸的比较

菌株	脂肪酸					
	18: 0	18: 1	18: 2	18: 3(α)	18: 3(γ)	18: 4
野生型						
集胞藻属菌(PCC 6803)	13.6	4.5	54.5	-	27.3	-
鱼腥藻属菌(PCC 7120)	2.9	24.8	37.1	35.2	-	-
聚胞藻属(蓝藻)(PCC 7942)	20.6	79.4	-	-	-	-
鱼腥藻属菌转结合体						
cSy75	3.8	24.4	22.3	9.1	27.9	12.5
cSy75-3.5	4.3	27.6	18.1	3.2	40.4	6.4
pAM542-1.8F	4.2	13.9	12.1	19.1	25.4	25.4
pAM542-1.8R	7.7	23.1	38.4	30.8	-	-
pAM542-1.7F	2.8	27.8	36.1	33.3	-	-
pAM542-1.7R	2.8	25.4	42.3	29.6	-	-
聚胞藻属菌转结合体						
pAM854	27.8	72.2	-	-	-	-
pAM854-Δ 12	4.0	43.2	46.0	-	-	-
pAM854-Δ 6	18.2	81.8	-	-	-	-
pAM854-Δ 6 和 Δ 12	42.7	25.3	19.5	-	16.5	-

5 18: 0, 硬脂酸; 18: 1, 油酸; 18: 2, 亚油酸; 18: 3(α), α-亚麻酸, 18: 3(γ), γ-亚麻酸; 18: 4, 十八碳四烯酸。

#### 实施例 4

用 Δ 6 和 Δ 12 去饱和酶基因转化聚胞藻属

用根据公开的集胞藻属菌 Δ 12 去饱和酶基因顺序(Wada et al, 1990, Nature, 347, 200-203)合成的寡核苷酸筛选集胞藻属菌基因组文



库, 分离到含有  $\Delta 12$  去饱和酶基因的第三种粘性质粒 cSy7。得自含有  $\Delta 12$  去饱和酶基因的这种粘性质粒的 1.7kb *Ava*I 片段被鉴定并用作探测器测定 cSy13, 测定表明 cSy13 不仅含有  $\Delta 6$ -去饱和酶基因, 而且含有  $\Delta 12$ -去饱和酶基因(图 3)。基因组的 Southern 吸印分析进一步表明  $\Delta 6$  和  $\Delta 12$  去饱和酶基因两者在集胞藻属菌基因组中是唯一的, 所以两种涉及  $C_{18}$  脂肪酸去饱和作用的功能性基因紧密连接在集胞藻属菌基因组中。

单细胞蓝藻细菌聚胞藻属菌(PCC 7942)缺乏亚油酸和 GLA(3)。  $\Delta 6$  和  $\Delta 12$  去饱和酶基因被单个和一起克隆穿梭载体 pAM854 (Bustos et al, 1991, J. Bacteriol. 174, 7525-7533)中, 该载体含有将外源 DNA 整合到聚胞藻属菌基因组中所需的顺序(Golden et al, 1987, Methods in Enzymol. 153, 215-231)。用这些基因构建体转化聚胞藻属菌并筛选菌落。从转基因聚胞藻属菌中提取脂肪酸甲基酯, 并且 GLC 进行分析。

表 2 说明, 野生型聚胞藻属菌中的主要脂肪酸是硬脂酸(18: 0)和油酸(18: 1)。用 pAM854- $\Delta 12$  转化的聚胞藻属菌表达了除主要脂肪酸以外的亚油酸(18: 2)。带有 pAM854- $\Delta 6$  和  $\Delta 12$  转化体生产亚油酸和 GLA(表 1)。这些结果表明, 含有  $\Delta 12$  和  $\Delta 6$ -去饱和酶基因的聚胞藻属菌已经获得了在  $C_{18}$  脂肪酸的  $\Delta 12$  位置上引进第二个双键和在  $\Delta 6$  位置上引进第 3 个双键的能力。但是, 观察表明, 在含 pAM854- $\Delta 6$  的转化体中, 脂肪酸组成并没有变化, 这表明, 在由  $\Delta 12$  去饱和酶合成的酶作用物缺乏的情况下,  $\Delta 6$  去饱和酶不活泼。该实验进一步证明 1.8kb *Nhe*I/*Hind* III 片段(图 3)含有集胞藻属菌  $\Delta 6$ -去饱和酶基因的编码区和启动子区。改变了多不饱和脂肪酸含量的转基因聚胞藻属菌在生长速度和形态学方面与野生型菌株相似。

#### 25 实施例 5

##### $\Delta 6$ -去饱和酶的核苷酸顺序

测定了包括功能性  $\Delta 6$ -去饱和酶基因的 cSy75-3.5 的 1.8kb 片段的核苷酸顺序。一个编码 359 个氨基酸多肽的开放读码被鉴定(图 4)。由

Kyte-Doolittle (Kyte et al. [1982], J. Mol. Biol. 157. 105-132 水疗分析鉴定疏水氨基酸的两个区可代表转换膜区(transmembrane domains)(图 1A), 并且  $\Delta$  6-去饱和酶基因与  $\Delta$  12-去饱和酶基因(图 1B, Wada et al.) 和  $\Delta$  9 去饱和酶基因(Thiede et al.) [1986] J. Biol Chem. 261, 13230-5 13235)的水疗图相似。

但是, 集胞藻属菌的  $\Delta$  6-去饱和酶和  $\Delta$  12-去饱和酶之间的顺序相似性在核苷酸水平小于 40%, 在氨基酸水平约小于 18%。

### 实施例 6

#### 蓝藻细菌的 $\Delta$ 6-去饱和酶转移到烟草中

10 将蓝藻细菌的  $\Delta$  6-去饱和酶基因转移到植物表达载体中, 再通过土壤杆菌介导的基因转移技术转移到烟草中。为了保证被转移的去饱和酶在叶及发育的种子中合适地表达及内质网和叶绿素中去饱和基因产物的确定。安装带有集胞藻属菌去饱和酶开放读码(ORF)的各种表达盒。这些盒的成分包括: (i) 35S 启动子或衍生于向日葵半日花素基因的种子特异性启动子, 它分别启动  $\Delta$  6-去饱和酶基因在所有植物组织  
15 中表达或仅在发育的种子中表达; (ii) 一种推测的信号肽, 它来自胡萝卜延伸蛋白基因或向日葵半日花素基因, 引导新合成的  $\Delta$  6-去饱和酶进入 ER; (iii) 位于  $\Delta$  6-去饱和酶 ORF 羧基末端的 ER 腔滞留信号顺序 (KDEL); (iv) 引导  $\Delta$  6-去饱和酶进入叶绿体的理想转运肽。35S 启动子是 Restrepo 等人(1990)所述质粒 pRTL2 衍生物。Van de Broeck 等人  
20 (1985)描述了理想的转移肽顺序。Chen 等人(1985, EMBO J. 9, 2145)描述了胡萝卜延伸蛋白信号肽。

生产含有嵌合蓝藻细菌性去饱和酶基因的转基因烟草植物, 所说的嵌合体由融合到内质网滞留顺序(KDEL)中的集胞藻属菌  $\Delta$  6-去饱和酶基因和由 CaMv 35S 启动子启动的延伸蛋白信号肽组成。转基因  
25 烟草基因组 DNA 的 PCR 扩增反应表明  $\Delta$  6 去饱和酶基因已被掺入到烟草基因组中, 从这些转基因烟草植物叶中提取脂肪酸甲基酯, 并且气液色谱(GLC)进行分析。这些转基因烟草集聚了大量的 GLA(图 4)。

图 4 表示通过 GLC 确定的脂肪酸甲基酯。与已知的脂肪酸甲基酯标准品的洗脱时间进行比较鉴定出各个峰。因此，涉及脂肪酸代谢的蓝藻细菌的基因可用于生产改变了脂肪酸组成的转基因植物。

### 序列表

- 5 (1)概况
- (i)申请人: Thomas, Terry L.  
Reddy, Avutu S.  
Nuccio, Michael  
Freysinet, Georges I.
- 10 (ii)发明名称: 利用  $\Delta$  6-去饱和酶生产  $\gamma$  亚麻酸  
(iii)顺序数目: 3  
(iv)通信地址:
- (A)地址: Scully, Scott, Murphy & Presser  
(B)街道: 400 Garden City Plaza  
15 (C)州: 纽约  
(D)国家: 美国  
(F)邮政编码: 11530
- (v)计算机可读形式:
- (A)介质类型: Floppy 盘  
20 (B)计算机: IBM PC 可容性  
(C)操作系统: PC-DOS/MS-DOS  
(D)软件: Patent In Pelease #1.0 Version #1.25
- (vi)目前的申请资料:
- (A)申请号: 待定  
25 (B)申请日: 1992. 1. 8  
(C)分类
- (viii)代理人情况
- (A)姓名: McNulty, Willian E.

(B)登记号: 22, 606

(C)参考/标记号: 8383Z

(ix)电信信息:

(A)电话: (516)742-4343

5 (B)传真: (516)742-4366

(C)电传: 230 901 SANS UR

(2)SEQ ID NO: 1

(i)顺序特征:

(A)长度: 3588bp

10 (B)类型: 核酸

(C)链股数: 双

(D)拓扑学: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组的)

(ix)性质:

15 (A)名称/关键: CDS

(B)定位: 2002..3081

(xi)顺序描述: SEQ ID NO: 1

GCTAGCCACC AGTGACGATG CCTTGAATTT GGCCATTCTG ACCCAGGCCC GTATTCTGAA 60  
TCCCCGCATT CGCATTGTTA ATCGTTTGTT CAACCATGCC CTGGGTAAAC GTTTAGACAC 120  
CACCTTGCCA GACCACGTTA GTTTGAGTGT TTCCGCCCTG GCGGCCCCGA TTTTTTCCTT 180  
20 TGC GGCTTTG GGCAATCAGG CGATCGGGCA ATTGCGTTTG TTTGACCAGA CTTGGCCCAT 240  
TCAGGAAATT GTCATTCACC AAGACCATCC CTGGCTCAAT TTACCCCTGG CGGATTTATG 300  
GGATGATCCG AGCCGAATGT TGATCTATTA CCTACCGGCC CACAGTGAAA CGGATTTAGT 360  
AGGCGCAGTG GTGAATAATT TAACGTTGCA ATCTGGGGAC CATTTAATAG TGGGACAAAA 420  
ACCCCAACCC AAGACCAAAC GGCGATCGCC TTGGCGCAA TTTTCCAAAC TGATTACCAA 480  
CCTGCGGGAG TATCAGCGGT ATGTCCAACA GGTGATATGG GTGGTGTGT TTTTATTGTT 540  
25 GATGATTTTT CTGGCCACCT TCATCTACGT TTCCATTGAT CAACATATTG CCCCAGTGGA 600  
CGCGTTGTAT TTTCCGTGG GCATGATTAC CGGGGCCGGT GGCAAGGAAG AGGTGGCCGA 660

	AAAGTCCCC	GATATCATCA	AAGTATTCAC	AGTGGTGATG	ATGATCGCCG	GGGCGGGGGT	720
	GATTGGTATT	TGTTATGCCC	TACTGAATGA	TTTCATCCTT	GGCAGTCGCT	TTAGTCAGTT	780
	TTTGGATGCG	GCCAAGTTAC	CCGATCGCCA	TCACATCATC	ATTTGTGGGC	TGGGGGGAGT	840
	GAGCATGGCC	ATTATTGAAG	AGTTAATTCA	CCAGGGCCAT	GAAATTGTGG	TAATCGAAAA	900
5	GGATACAGAT	AATCGTTTCT	TGCATACGGC	CCGCTCCCTG	GGGGTGCCCG	TAATTGTGGA	960
	GGATGCCCCG	CTAGAAAGAA	CGTTGGCCTG	CGCCAATATC	AACCGAGCCG	AAGCCATTGT	1020
	GGTGGCCACC	AGCGACGACA	CCGTAACTT	GGAAATTGGC	CTAACTGCCA	AGGCGATCGC	1080
	CCCTAGCCTG	CCAGTGGTGT	TGCGTTGCCA	GGATGCCCAG	TTTAGCCTGT	CCCTGCAGGA	1140
	AGTATTTGAA	TTTGAAACGG	TGCTTTGTCC	GGCGGAATTG	GCCACCTATT	CCTTTGCGGC	1200
	GGCGGCCCTG	GGGGGCAAAA	TTTTGGGCAA	CGGCATGACC	GATGATTTGC	TGTGGGTAGC	1260
	CCTAGCCACC	TTAATCACTC	CTAACCATCC	CTTTGCCGAC	CAATTGGTTA	AAATGCAGC	1320
10	CCAAAAGTCT	GATTTCTGTT	CCCTCTATCT	AGAACGGGGT	GGCAAAACCA	TCCATAGCTG	1380
	GGAATTATTG	GGTACCCATC	TCGACTCTGG	AGACGTGTG	TATTTAACCA	TGCCCGCCAC	1440
	TGCCCTAGAG	CAACTTTGGC	GATCGCCCCG	TGCCACTGCT	GATCCTCTGG	ACTCTTTTTT	1500
	GGTTTAGCAT	GGGGGGATGG	AACTCTTGAC	TCGGCCCCAAT	GGTGATCAAG	AAAGAACGCT	1560
	TTGTCTATGT	TTAGTATTTT	TAAGTTAACC	AACAGCAGAG	GATAACTTCC	AAAAGAAATT	1620
	AAGCTCAAAA	AGTAGCAAAA	TAAGTTTAAT	TCATAACTGA	GTTTTACTGC	TAAACAGCGG	1680
	TGCAAAAAAG	TCAGATAAAA	TAAAAGCTTC	ACTTCGGTTT	TATATTGTGA	CCATGGTTC	1740
15	CAGGCATCTG	CTCTAGGGAG	TTTTTCCGCT	GCCTTAGAG	AGTATTTTCT	CCAAGTCGGC	1800
	TAACTCCCCC	ATTTTTAGGC	AAAATCATAT	ACAGACTATC	CCAATATTGC	CAGAGCTTTG	1860
	ATGACTCACT	GTAGAAGGCA	GACTAAAATT	CTAGCAATGG	ACTCCCAGTT	GGAATAAATT	1920
	TTTAGTCTCC	CCCGGCGCTG	GAGTTTTTTT	GTAGTTAATG	GCGGTATAAT	GTGAAAGTTT	1980
	TTTATCTATT	TAAATTTATA	A	ATG CTA ACA GCG GAA AGA ATT AAA TTT ACC			2031
				Met Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Phe Thr			
				1	5	10	
20	CAG AAA CGG GGG TTT CGT CGG GTA CTA AAC CAA CGG GTG GAT GCC TAC						2079
	Gln Lys Arg Gly Phe Arg Arg Val Leu Asn Gln Arg Val Asp Ala Tyr						
		15		20		25	
	TTT GCC GAG CAT GGC CTG ACC CAA AGG GAT AAT CCC TCC ATG TAT CTG						2127
	Phe Ala Glu His Gly Leu Thr Gln Arg Asp Asn Pro Ser Met Tyr Leu						
		30		35		40	
	AAA ACC CTG ATT ATT GTG CTC TGG TTG TTT TCC GCT TGG GCC TTT GTG						2175
	Lys Thr Leu Ile Ile Val Leu Trp Leu Phe Ser Ala Trp Ala Phe Val						
		45		50		55	
	CTT TTT GCT CCA GTT ATT TTT CCG GTG CGC CTA CTG GGT TGT ATG GTT						2223
	Leu Phe Ala Pro Val Ile Phe Pro Val Arg Leu Leu Gly Cys Met Val						
		60		65		70	
25	TTG GCG ATC GCC TTG GCG GCC TTT TCC TTC AAT GTC GGC CAC GAT GCC						2271
	Leu Ala Ile Ala Leu Ala Ala Phe Ser Phe Asn Val Gly His Asp Ala						
		75		80		85	
							90

	AAC CAC AAT GCC TAT TCC TCC AAT CCC CAC ATC AAC CGG GTT CTG GGC	2319
	Asn His Asn Ala Tyr Ser Ser Asn Pro His Ile Asn Arg Val Leu Gly	
	95 100 105	
	ATG ACC TAC GAT TTT GTC GGG TTA TCT AGT TTT CTT TGG CGC TAT CGC	2367
	Met Thr Tyr Asp Phe Val Gly Leu Ser Ser Phe Leu Trp Arg Tyr Arg	
	110 115 120	
5	CAC AAC TAT TTG CAC CAC ACC TAC ACC AAT ATT CTT GGC CAT GAC GTG	2415
	His Asn Tyr Leu His His Thr Thr Asn Ile Leu Gly His Asp Val	
	125 130 135	
	GAA ATC CAT GGA GAT GGC GCA GTA CGT ATG AGT CCT GAA CAA GAA CAT	2463
	Glu Ile His Gly Asp Gly Ala Val Arg Met Ser Pro Glu Gln Glu His	
	140 145 150	
	GTT GGT ATT TAT CGT TTC CAG CAA TTT TAT ATT TGG GGT TTA TAT CTT	2511
	Val Gly Ile Tyr Arg Phe Gln Gln Phe Tyr Ile Trp Gly Leu Tyr Leu	
	155 160 165 170	
10	TTC ATT CCC TTT TAT TGG TTT CTC TAC GAT GTC TAC CTA GTG CTT AAT	2559
	Phe Ile Pro Phe Tyr Trp Phe Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Val Leu Asn	
	175 180 185	
	AAA GGC AAA TAT CAC GAC CAT AAA ATT CCT CCT TTC CAG CCC CTA GAA	2607
	Lys Gly Lys Tyr His Asp His Lys Ile Pro Pro Phe Gln Pro Leu Glu	
	190 195 200	
	TTA GCT AGT TTG CTA GGG ATT AAG CTA TTA TGG CTC GGC TAC GTT TTC	2655
	Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ile Lys Leu Leu Trp Leu Gly Tyr Val Phe	
	205 210 215	
	GGC TTA CCT CTG GCT CTG GGC TTT TCC ATT CCT GAA GTA TTA ATT GGT	2703
	Gly Leu Pro Leu Ala Leu Gly Phe Ser Ile Pro Glu Val Leu Ile Gly	
	220 225 230	
15	GCT TCG GTA ACC TAT ATG ACC TAT GGC ATC GTG GTT TGC ACC ATC TTT	2751
	Ala Ser Val Thr Tyr Met Thr Tyr Gly Ile Val Val Cys Thr Ile Phe	
	235 240 245 250	
	ATG CTG GCC CAT GTG TTG GAA TCA ACT GAA TTT CTC ACC CCC GAT GGT	2799
	Met Leu Ala His Val Leu Glu Ser Thr Glu Phe Leu Thr Pro Asp Gly	
	255 260 265	
	GAA TCC GGT GCC ATT GAT GAC GAG TGG GCT ATT TGC CAA ATT CGT ACC	2847
	Glu Ser Gly Ala Ile Asp Asp Glu Trp Ala Ile Cys Gln Ile Arg Thr	
	270 275 280	
20	ACG GCC AAT TTT GCC ACC AAT AAT CCC TTT TGG AAC TGG TTT TGT GGC	2895
	Thr Ala Asn Phe Ala Thr Asn Asn Pro Phe Trp Asn Trp Phe Cys Gly	
	285 290 295	
	GGT TTA AAT CAC CAA GTT ACC CAC CAT CTT TTC CCC AAT ATT TGT CAT	2943
	Gly Leu Asn His Gln Val Thr His His Leu Phe Pro Asn Ile Cys His	
	300 305 310	
	ATT CAC TAT CCC CAA TTG GAA AAT ATT ATT AAG GAT GTT TGC CAA GAG	2991
	Ile His Tyr Pro Gln Leu Glu Asn Ile Ile Lys Asp Val Cys Gln Glu	
	315 320 325 330	
25	TTT GGT GTG GAA TAT AAA GTT TAT CCC ACC TTC AAA GCG GCG ATC GCC	3039
	Phe Gly Val Glu Tyr Lys Val Tyr Pro Thr Phe Lys Ala Ala Ile Ala	
	335 340 345	
	TCT AAC TAT CGC TGG CTA GAG GCC ATG GGC AAA GCA TCG TGACATTGCC	3088
	Ser Asn Tyr Arg Trp Leu Glu Ala Met Gly Lys Ala Ser	
	350 355 360	

TTGGGATTGA AGCAAAATGG CAAAATCCCT CGTAAATCTA TGATCGAAGC CTTTCTGTTG 3148  
 CCCGCCGACC AAATCCCCGA TGCTGACCAA AGGTTGATGT TGGCATTGCT CCAAACCCAC 3208  
 TTTGAGGGGG TTCATTGGCC GCAGTTTCAA GCTGACCTAG GAGGCAAAGA TTGGGTGATT 3268  
 TTGCTCAAAT CCGCTGGGAT ATTGAAAGGC TTCACCACCT TTGGTTTCTA CCCTGCTCAA 3328  
 5 TGGGAAGGAC AAACCGTCAG AATTGTTTAT TCTGGTGACA CCATCACCGA CCCATCCATG 3388  
 TGGTCTAACC CAGCCCTGGC CAAGGCTTGG ACCAAGGCCA TGCAAATTCT CCACGAGGCT 3448  
 AGGCCAGAAA AATTATATTG GCTCCTGATT TCTTCCGGCT ATCGCACCTA CCGATTTTGT 3508  
 AGCATTTTTG CCAAGGAATT CTATCCCCAC TATCTCCATC CCACTCCCCC GCCTGTACAA 3568  
 AATTTTATCC ATCAGCTAGC 3588

(2)SEQ ID NO: 2

10 (i)顺序特征:

(A)长度: 359 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑学: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

15 (xi)顺序描述: SEQ ID NO: 2

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

Phe Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Val Leu Asn Lys Gly Lys Tyr His Asp  
 180 185 190  
 His Lys Ile Pro Pro Phe Gln Pro Leu Glu Leu Ala Ser Leu Leu Gly  
 195 200 205  
 Ile Lys Leu Leu Trp Leu Gly Tyr Val Phe Gly Leu Pro Leu Ala Leu  
 210 215 220  
 Gly Phe Ser Ile Pro Glu Val Leu Ile Gly Ala Ser Val Thr Tyr Met  
 225 230 235 240  
 Thr Tyr Gly Ile Val Val Cys Thr Ile Phe Met Leu Ala His Val Leu  
 245 250 255  
 Glu Ser Thr Glu Phe Leu Thr Pro Asp Gly Glu Ser Gly Ala Ile Asp  
 260 265 270  
 Asp Glu Trp Ala Ile Cys Gln Ile Arg Thr Thr Ala Asn Phe Ala Thr  
 275 280 285  
 Asn Asn Pro Phe Trp Asn Trp Phe Cys Gly Gly Leu Asn His Gln Val  
 290 295 300  
 Thr His His Leu Phe Pro Asn Ile Cys His Ile His Tyr Pro Gln Leu  
 305 310 315 320  
 Glu Asn Ile Ile Lys Asp Val Cys Gln Glu Phe Gly Val Glu Tyr Lys  
 325 330 335  
 Val Tyr Pro Thr Phe Lys Ala Ala Ile Ala Ser Asn Tyr Arg Trp Leu  
 340 345 350  
 Glu Ala Met Gly Lys Ala Ser  
 355

(2)SEQ ID NO: 3

(i)顺序特征:

(A)长度: 1884bp

(B)类型: 核酸

(C)链股数: 双

(D)拓扑学: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组的)

(xi)顺序描述: SEQ ID NO: 3



	AGCTTCACTT CGGTTTTATA TTGTGACCAT GGTTCCCAGG CATCTGCTCT AGGGAGTTTT	60
	TCCGCTGCCT TTAGAGAGTA TTTTCTCCAA GTCGGCTAAC TCCCCATTT TTAGGCAAAA	120
	TCATATACAG ACTATCCCAA TATTGCCAGA GCTTTGATGA CTCACTGTAG AAGGCAGACT	180
	AAAATTCTAG CAATGGACTC CCAGTTGGAA TAAATTTTTA GTCTCCCCCG GCGCTGGAGT	240
5	TTTTTTGTAG TTAATGGCGG TATAATGTGA AAGTTTTTTA TCTAITTAAA TTTATAAATG	300
	CTAACAGCGG AAAGAATTAA ATTTACCCAG AAACGGGGGT TTCGTCGGGT ACTAAACCAA	360
	CGGGTGGATG CCTACTTTGC CGAGCATGGC CTGACCCAAA GGGATAATCC CTCCATGTAT	420
	CTGAAAACCC TGATTATTGT GCTCTGGTTG TTTTCCGCTT GGGCCTTTGT GCTTTTTGCT	480
	CCAGTTATTT TTCCGGTGCG CCTACTGGGT TGTATGGTTT TGGCGATCGC CTTGGCGGCC	540
	TTTTCCCTCA ATGTCGGCCA CGATGCCAAC CACAATGCCT ATTCCTCCAA TCCCCACATC	600
	AACCGGGTTC TGGGCATGAC CTACGATTTT GTCGGGTTAT CTAGTTTTCT TTGGCGCTAT	660
10	CGCCACAACT ATTTGCACCA CACCTACACC AATATTCTTG GCCATGACGT GGAAATCCAT	720
	GGAGATGGCG CAGTACGTAT GAGTCCTGAA CAAGAACATG TTGGTATTTA TCGTTTCCAG	780
	CAATTTTATA TTTGGGGTTT ATATCTTTTC ATTCCTTTT ATTGGTTTCT CTACGATGTC	840
	TACCTAGTGC TTAATAAAGG CAAATATCAC GACCATAAAA TTCCTCCTTT CCAGCCCCTA	900
	GAATTAGCTA GTTTGTAGG GATTAAGCTA TTATGGCTCG GCTACGTTTT CGGCTTACCT	960
	CTGGCTCTGG GCTTTTCCAT TCCTGAAGTA TTAATTTGGT CTTCCGGTAACT CTATATGACC	1020
15	TATGGCATCG TGTTTTGCAC CATCTTTATG CTGGCCCCATG TGTTGGAATC AACTGAATTT	1080
	CTCACCCCCG ATGGTGAATC CGGTGCCATT GATGACGAGT GGGCTATTTG CCAAATTCGT	1140
	ACCACGGCCA ATTTTGCCAC CAATAATCCC TTTTGGAACT GGTTTTGTGG CGGTTTAAAT	1200
	CACCAAGTTA CCCACCATCT TTTCCCCAAT ATTTGTCATA TTCACTATCC CCAATTGGAA	1260
	AATATTATTA AGGATGTTG CCAAGAGTTT GGTGTGGAAT ATAAAGTTTA TCCCACCTTC	1320
	AAAGCGGCGA TCGCCTCTAA CTATCGCTGG CTAGAGGCCA TGGGCAAAGC ATCGTGACAT	1380
	TGCCTTGGGA TTGAAGCAAA ATGGCAAAAT CCCTCGTAAA TCTATGATCG AAGCCTTTCT	1440
20	GTTGCCCGCC GACCAAATCC CCGATGCTGA CCAAAGTTG ATGTTGGCAT TGCTCCAAAC	1500
	CCACTTTGAG GGGGTTTCATT GGCCGCAGTT TCAAGCTGAC CTAGGAGGCA AAGATTGGGT	1560
	GATTTTGCTC AAATCCGCTG GGATATTGAA AGGCTTCACC ACCTTTGGTT TCTACCCTGC	1620
	TCAATGGGAA GGACAAACCG TCAGAATTGT TTATTCTGGT GACACCATCA CCGACCCATC	1680
	CATGTGGTCT AACCCAGCCC TGGCCAAGGC TTGGACCAAG GCCATGCAAA TTCTCCACGA	1740
	GGCTAGGCCA GAAAAATTAT ATTGGCTCCT GATTTCTTCC GGCTATCGCA CCTACCGATT	1800
25	TTTGAGCATT TTTGCCAAGG AATTCTATCC CCACTATCTC CATCCCCTC CCCCGCCTGT	1860
	ACAAAATTTT ATCCATCAGC TAGC	1884

说明书附图

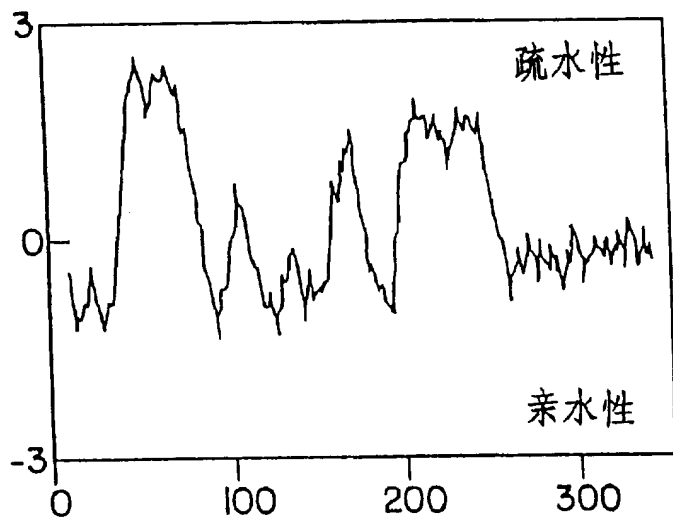


图 IA

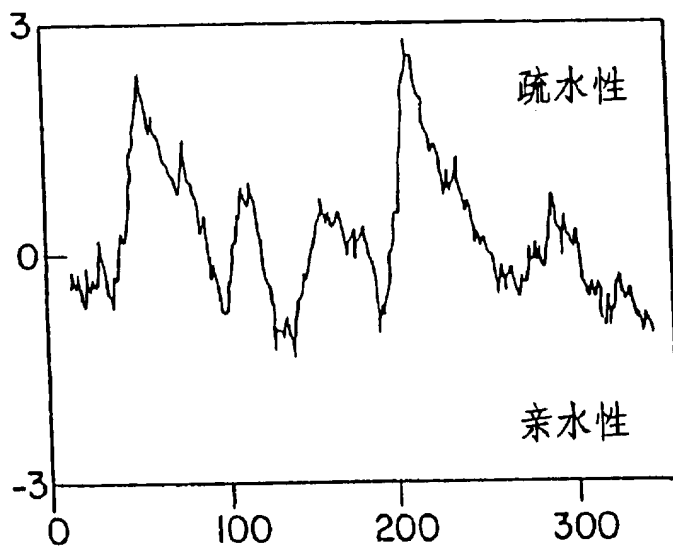
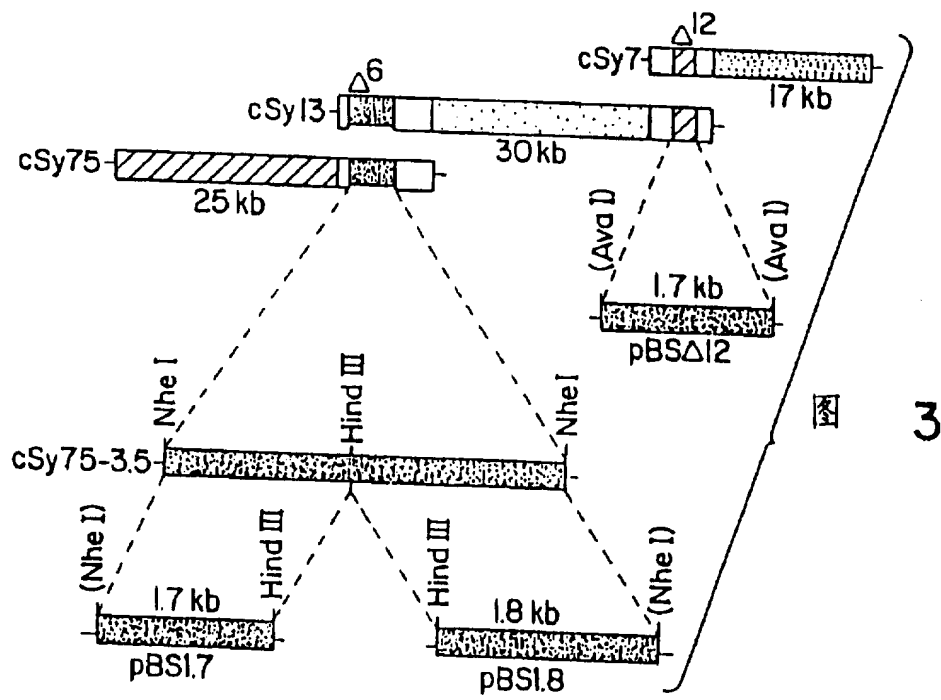
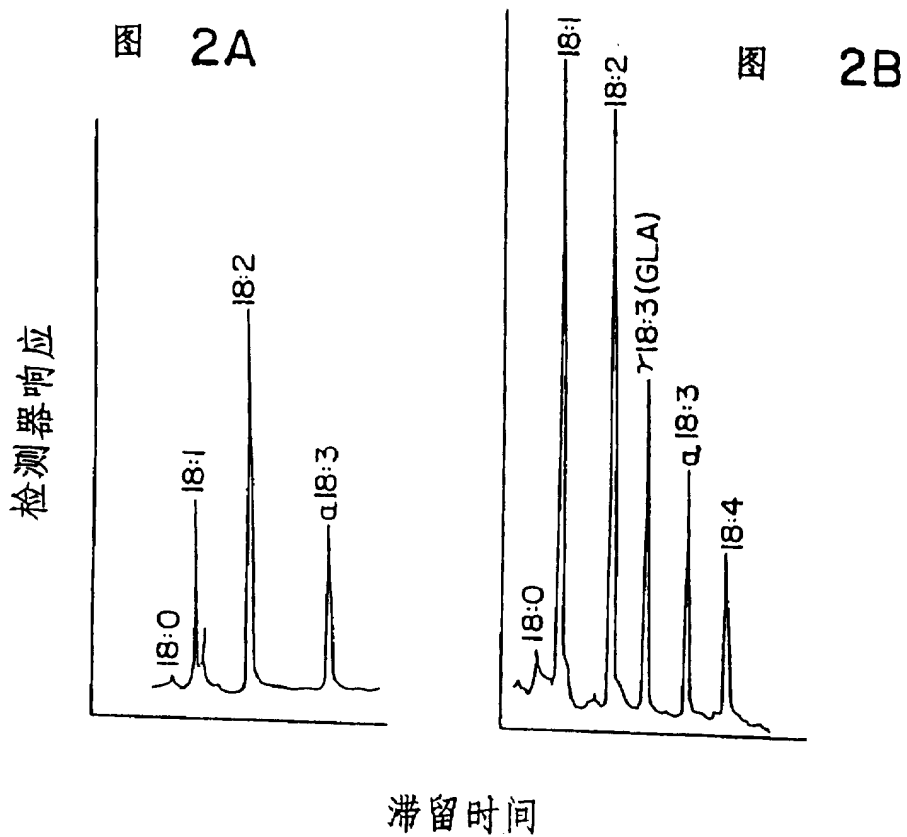


图 IB



烟草叶脂肪酸甲基酯(野生型)

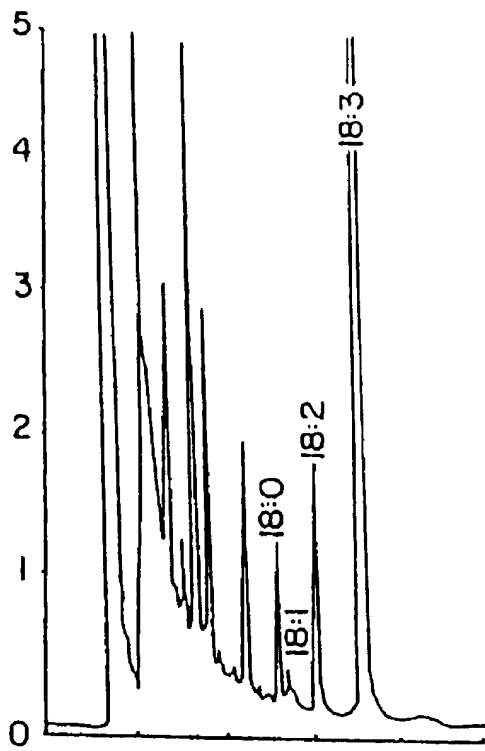


图 4A

转基因烟草脂肪酸甲基酯  
(+ $\Delta^6$  去饱和酶)

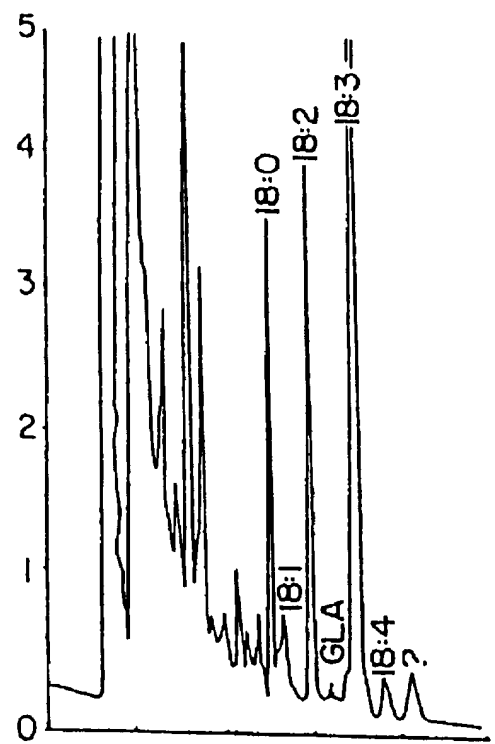


图 4B