

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/55

C12N 9/16 A61K 38/43

A01K 67/027 A23K 1/165

A23L 1/015

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00808022.4

[43] 公开日 2002 年 5 月 29 日

[11] 公开号 CN 1351666A

[22] 申请日 2000.5.25 [21] 申请号 00808022.4

[30] 优先权

[32]1999.5.25 [33]US [31]09/318,528

[86] 国际申请 PCT/US00/14846 2000.5.25

[87] 国际公布 WO00/71728 英 2000.11.30

[85] 进入国家阶段日期 2001.11.26

[71] 申请人 戴弗萨公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 J·M·肖特 K·A·克雷茨

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 赵蓉民 彭益群

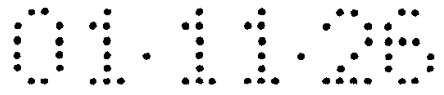
权利要求书 4 页 说明书 74 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 重组细菌肌醇六磷酸酶及其应用

[57] 摘要

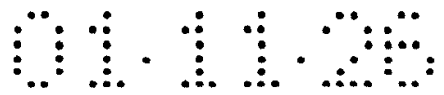
来源于大肠杆菌 B 的纯化重组肌醇六磷酸酶。酶的分子量大约为 47.1 千道尔顿且有肌醇六磷酸酶活性。此酶可以从天然或重组宿主细胞内产生,可以用于帮助需要的肌醇六磷酸盐消化。尤其是,本发明的肌醇六磷酸酶可以在食品中应用以改善富含肌醇六磷酸盐成分的喂养价值。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



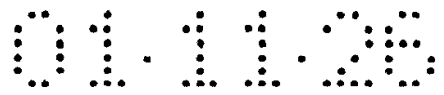
权 利 要 求 书

1. 改善含肌醇六磷酸盐食品营养价值的方法，包括以下步骤：
用实质上纯的肌醇六磷酸酶与所述的含肌醇六磷酸盐的食品接触，该肌醇六磷酸酶具有选自 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列，使得所述实质上纯的肌醇六磷酸酶催化无机磷从所述的含肌醇六磷酸盐食品中的肌醇六磷酸盐中释放。
2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的实质上纯肌醇六磷酸酶是通过含编码肌醇六磷酸酶的核酸的重组表达系统产生的，该核酸具有选自下述序列的核苷酸序列：
 - a) SEQ ID NO:1, 和
 - b) SEQ ID NO:1 其中 T 也可以是 U;其中编码肌醇六磷酸酶的核酸的表达导致所述实质上纯的肌醇六磷酸酶的产生。
3. 权利要求 1 所述的方法，其中所述无机磷从所述含肌醇六磷酸盐食品中的肌醇六磷酸盐中的释放，发生于所述含肌醇六磷酸盐食品被接受生物体摄取之前。
4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述无机磷从所述含肌醇六磷酸盐食品中的肌醇六磷酸盐中的释放，发生于所述含肌醇六磷酸盐食品被接受生物体摄取之后。
5. 权利要求 1 所述的方法，其中所述无机磷从所述含肌醇六磷酸盐食品中的肌醇六磷酸盐中的释放，部分发生于所述含肌醇六磷酸盐食品被接受生物体摄取之前，部分发生于摄取之后。
6. 权利要求 2 所述方法中使用的重组表达系统，其中所述的重组表达系统包含在宿主细胞内并表达编码具有 SEQ ID NO:2 所述氨基酸序列的肌醇六磷酸酶的核苷酸序列，其中编码所述的酶的核苷酸序列可操作地与所述宿主细胞内可运行的转录控制序列相连。
7. 一个载体，包括权利要求 6 所述的表达系统。
8. 权利要求 6 所述的表达系统，其中所述控制序列包括结构启动子。
9. 权利要求 6 所述的表达系统，其中所述控制序列包括组织特异的启动子。



10. 权利要求 6 所述的表达系统，其中所述的宿主细胞是原核细胞。
11. 权利要求 6 所述的表达系统，其中所述的宿主细胞是真核细胞。
12. 权利要求 6 所述的表达系统，其中所述的宿主细胞是植物细胞。
13. 权利要求 6 所述的表达系统，其中所述的核苷酸序列之前是可操作地连接在所述核苷酸序列上的编码一个信号肽的多核苷酸序列。
14. 权利要求 13 所述的表达系统，其中所述的信号肽是来自烟草的 PR 蛋白 PR-S 信号肽。
15. 经修饰的含有权利要求 6 所述表达系统的原核细胞。
16. 经修饰的含有权利要求 6 所述表达系统的真核细胞。
17. 经修饰的含有权利要求 6 所述表达系统的植物细胞、植物部分或植物。
18. 一种产生含微生物肌醇六磷酸酶的动物饲料的方法，包括：
 - a) 在所述核苷酸序列被表达的条件下培养权利要求 17 所述的植物细胞、植物部分或植物；和
 - b) 将所述的植物细胞、植物部分或植物转变成适合动物饲料的组分。
19. 动物饲料组合物，其包括权利要求 17 所述的植物种子、植物细胞、植物部分或植物与含肌醇六磷酸盐的食物的混合物。
20. 一种能够通过外源肌醇六磷酸酶的活性增强消化而受益的治疗人或动物的方法，该方法包括给予所述的人或动物一定量的转基因植物的植物种子、植物细胞、植物部分或植物，其中所述的转基因植物经修饰含有一个表达系统，该表达系统以在所述人或动物消化道内提供有效量的肌醇六磷酸酶活性，表达编码肌醇六磷酸酶的核苷酸序列。
21. 转基因的非人生物体，其基因组包括编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的异种核酸序列，其中所述的转基因导致肌醇六磷酸酶多肽的表达。
22. 一种产生变异体的方法，包括：

获得核酸，该核酸包括 SEQ ID NO:1 中所述的序列，基本上与其相同的序列，



与其互补的序列，包含其至少 30 个连续核苷酸的片段，和包含 SEQ ID NO:1 互补序列的至少 30 个连续核苷酸的片段；和

修饰所述序列的一个或多个核苷酸成为另一个核苷酸，删除所述序列中的一个或多个核苷酸，或添加给所述序列一个或多个核苷酸。

23. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由选自下面的方法引导的：错误倾向 PCR、移动、寡核苷酸定向突变、组合 PCR、有性 PCR 突变、体内突变、盒式突变、循环集合突变、指数集合突变、位点特异的突变、连接重装、GSSM 和它们任何的组合。

24. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由错误倾向 PCR 引导的。

25. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由移动引导的。

26. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由寡核苷酸定向突变引导的。

27. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由组合 PCR 引导的。

28. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由有性 PCR 突变引导的。

29. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由体内突变引导的。

30. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由盒式突变引导的。

31. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由循环集合突变引导的。

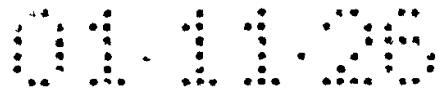
32. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由指数集合突变引导的。

33. 权利要求 22 所述的方法，其中所述修饰是由位点特异的突变引导的。

34. 具有其上储存有下列核酸序列的计算机可读媒体：SEQ ID NO:1 中所述的核酸序列和基本上与其相同的序列，或 SEQ ID NO:2 中所述的多肽序列和基本上与其相同的序列。

35. 包括处理器和数据储存装置的计算机系统，其中所述的数据储存装置上储存有 SEQ ID NO:1 中所述的核酸序列和基本上与其相同的序列，或 SEQ ID NO:2 中所述的多肽序列和基本上与其相同的序列。

36. 权利要求 35 所述的计算机系统, 进一步包括序列比较算法和其上至少储存了一个参考序列的数据储存装置。
37. 权利要求 36 所述的计算机系统, 其中序列比较算法包括表示多形性的计算机程序。
38. 权利要求 35 所述的计算机系统, 进一步包括鉴别所述序列特征的认识器。
39. 一种将第一序列与参考序列或序列数据库比较的方法, 其中所述的第一序列是 SEQ ID NO:1 中所述的核酸序列, 和基本上与其相同的序列, 或 SEQ ID NO:2 中所述的多肽序列, 和基本上与其相同的序列, 该方法包括:
通过使用比较序列的计算机程序读取第一序列和参考序列或序列数据库; 和用计算机程序确定第一序列和参考序列或序列数据库之间的不同。
40. 权利要求 39 所述的方法, 其中确定第一序列和参考序列之间的不同包括鉴别多形性。



说明书

重组细菌肌醇六磷酸酶及其应用

1.发明领域

本发明涉及新的鉴定多核苷酸，由这些多核苷酸编码的多肽，这些多核苷酸和多肽的用途，以及这些多核苷酸和多肽的产生和分离。更特别的是，本发明的多肽已经被鉴定为肌醇六磷酸酶，尤其是具有肌醇六磷酸酶活性的微生物酶。

2.背景

2.1.1-简述：矿物质是所有生物体生长的必要成分。食物中的矿物质来源于许多物质，包括植物。例如植物的种子是丰富的矿物质来源，因为它们包含有与肌醇六磷酸分子的磷酸根复合的离子。这些与肌醇六磷酸盐相关的矿物质满足了一些圈养类生物的饮食需要，如多胃的反刍动物。因此，反刍动物不需要在饮食中添加无机磷酸盐和矿物质，因为瘤胃中的微生物产生催化肌醇六磷酸盐（肌醇-六磷酸盐）转变成肌醇和无机磷酸盐的酶。在这一过程中，与肌醇六磷酸盐复合的矿物质被释放出来。然而，大多数圈养类生物不能有效的利用与肌醇六磷酸盐相关的矿物质。因此，例如，在单胃动物（如，猪，鸟，和鱼）的牲畜产生中，通常需要在饲料中添加矿物质和/或抗生素物质，改变消费生物体的消化菌群环境，提高生长率。

正如这样，在许多应用中存在许多与肌醇六磷酸盐没有充分水解有关问题，这些问题涉及营养，体内外处理步骤，健康和医药，环境保持和资源管理。以下是这些问题的非限制性实例：

- 1) 饮食中添加矿物质费用昂贵。
- 2) 在许多体内外应用中未水解的肌醇六磷酸盐的存在是不希望和有问题的（如导致意外淤泥的出现）。
- 3) 饮食中添加抗生素对人类和动物一样都存在一种医疗威胁，即增加耐受抗生素的病原体量。
- 4) 大便内未吸收的矿物质排到环境中严重干扰和损害了周围土壤，养鱼池和表面水源的生态系统。
- 5) 许多潜在食物的有价值的营养成分明显未被利用和浪费了。

2.1.2-营养关系：许多有潜在营养的植物，包括尤其是它们的种子，含有相当数量的营养成分，如，磷酸盐，其以一种方式与肌醇六磷酸盐相关因此这些营养成分不能在消耗时被自由获取。这些营养成分的不可获得性可以被一些生物克服，这些生物体包括母牛和其他反刍动物，它们具有充足的消化能力水解肌醇六磷酸盐，释放相关的营养成分，这很大程度上来源于它们消化道内共生生命形式的存

在。然而，大多数圈养类动物，包括猪，鱼，鸡，火鸡，及其他包括人的非反刍类生物，不能在消化后有效的释放这些营养成分。

因此，含有肌醇六磷酸盐的食物需要添加外源营养成分和/或一种有肌醇六磷酸酶活性的来源以弥补大部分种类的生物体在消耗中营养成分的供给不足。

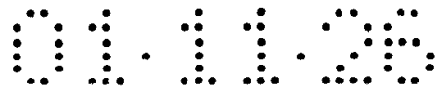
2.1.3-体外体内处理关系：在另一个方面，未水解的肌醇六磷酸盐的存在导致体内外处理中的一些问题，包括，但不局限于-食物的处理。在一个实例中，如EP0321004-B1(Vaara 等)所描述的，在处理玉米和高粱谷粒中有一个处理步骤，将坚硬的谷粒浸泡在水中以软化它们。在这一过程中滤出的水溶性物质通过蒸发浓缩变成玉米浸泡液的一部分。玉米浸泡液中未水解的植酸，大部分以钙和镁盐的形式存在，其与磷结合并且与蛋白和金属离子一起沉淀为不需要的淤泥。这种淤泥在玉米浸泡液的蒸发，转运和储存中是成问题的。因此，在这公开的肌醇六磷酸酶分子-或者单独存在或者与其它制剂组合（包括但不局限于酶，包括蛋白酶）-不仅在这一应用中（如，防止不需要的淤泥），而且在其他需要肌醇六磷酸盐水解作用的应用中都是有用的。

2.1.4-医学关系：饮食内加入抗生素物质在家畜的生产过程中有许多好处。例如，除了它作为预防性抵御疾病的作用，外源性使用抗生素已经被证明可以增加生长率，使其上升 3-5%。这一作用的机制可能也包括（或部分包括）圈养动物消化道菌群环境的变化，导致微菌丛平衡，更有利于营养物质的吸收。

然而，与过量应用抗生素相关的明显副作用是产生病原性抗生素抵抗微生物菌株的储库的危险。这一危险是急迫的，已知人耐药性病原体的上升与牲畜类抗生素的使用有关。例如，阿伏帕星，动物饲料中使用的抗生素，1997 年在许多地方已经被禁止使用，现在给予动物另外一种抗生素，维吉霉素，与一种新药 Synercid, 非常相似，后者用来代替人类的万古霉素。然而，许多研究表明圈养动物的一些肠球菌素抵抗 synercid。结果，非预期的耐药后果，如那些已经在阿伏帕星和维吉霉素上看到的，不管什么新抗生素用作圈养动物的预防治疗似乎又要发生。因此，研究人员呼吁应严格控制工业上药物使用。

在饲料中添加即将公开的肌醇六磷酸酶分子，饲养动物使其生长率增加与使用抗生素，如阿伏帕星，获得的生长率增加是相同的-如果不是过量的话。因此，即将公开的肌醇六磷酸酶分子-或单独或与其他制剂联合（包括但不局限于酶，包括蛋白酶）-不仅在这一应用（如，增加圈养动物的生长率）中，而且在其他需要肌醇六磷酸盐水解作用的应用中都是有用的。

2.1.5-环境关系：肌醇六磷酸酶缺乏的生物种类-不管食物中是否添加矿物质-消耗含肌醇六磷酸盐食物的环境后果是未吸收的矿物质排出后导致粪便污染。这一污染不仅对其栖息地而且继而对其周围水源都有副作用。这一环境的改变最初在食物链的最低层发生，因此具有穿越高层的潜力，且通过生态系统引起长久和灾难性的损害-尤其是在持续污染多年后。这一问题能在任何有浓缩肌醇六磷酸盐



的地方显露出来-包括体内（如通过牲畜的产生地，动物园，野生栖息地的动物，等等）和体外（如在商业谷物湿磨，蜂蜡浸泡过程，等等）处理过程。

2.1.6-财政关系：决定使用外源添加肌醇六磷酸酶分子-不管是完全代替或增加外源使用矿物质和/或抗生素-最终需要使用者通过一项财政可行性和成本有效性的测试，使用者的生计依赖于相关的应用，如牲畜生产。

结果，在许多应用中需要获得有效和成本上有效的肌醇六磷酸盐水解的方法。尤其是，在商业应用中需要优化水解肌醇六磷酸盐的方法。在一个特殊方面，需要优化商业治疗方法改善人类和圈养动物消耗含肌醇六磷酸盐食物的营养供给。

以前就有重组肌醇六磷酸酶报道，但通过本发明新发现的肌醇六磷酸酶分子提高了它们较差的活性。因此，即将公开的肌醇六磷酸酶分子较以前鉴定的肌醇六磷酸酶分子，如真菌来源的肌醇六磷酸酶分子提供了本质上更高的工业性能。

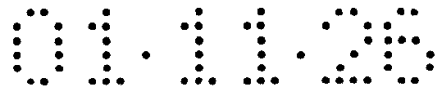
2.2-肌醇六磷酸盐和肌醇六磷酸盐水解的一般概述

2.2.1-肌醇六磷酸盐水解导致营养物质的释放：在实际上所有的植物种子中肌醇六磷酸盐作为磷的储存源存在（Graf(Ed.),1986）。在谷类和荚果中植酸通常形成种子的正常部分。它与饮食中的矿物质结合起作用，这些矿物质在新生植物从种子中发芽时是必需的。当肌醇六磷酸中的磷酸根被种子中的肌醇六磷酸酶去除时，其结合金属离子的能力消失，矿物质变得可以被植物吸收。在牲畜喂养的谷物中，肌醇六磷酸结合的微量矿物质很大程度上不能被缺乏肌醇六磷酸酶活性的单胃动物吸收。

虽然一些肌醇六磷酸盐的水解发生在结肠，但是大多数肌醇六磷酸盐通过单胃动物的胃肠道，在粪尿中排出，导致在密集牲畜生产地区的粪便肌醇六磷酸盐污染问题。结肠中释放的无机磷对牲畜来说营养价值略微降低，因为无机磷大部分-如果不是全部-在小肠吸收。因此，肌醇六磷酸盐中营养学上的重要饮食矿物质的可评价量对单胃动物来说是无法获得的。

总之，肌醇六磷酸盐-相关的营养物质不仅包括与肌醇六磷酸盐共价连接的磷酸盐，而且包括其他与肌醇六磷酸盐螯合的矿物质。而且，在摄取中，未水解的肌醇六磷酸盐可能进一步相遇并与其他矿物质结合。矿物质的螯合可以抑制酶的活性，这些矿物质用于这些酶作为辅因子起作用。

2.2.2-细菌酶可以水解肌醇六磷酸盐：肌醇六磷酸盐转变成肌醇和无机磷可以被细菌酶催化，该酶指广义上的肌醇六磷酸酶。肌醇六磷酸酶如肌醇六磷酸酶#EC3.1.3.8 能催化肌醇六磷酸盐水解成 D-肌醇 1, 2, 4, 5, 6-五磷酸盐和正磷酸盐。据报道某些真菌肌醇六磷酸酶将肌醇五磷酸盐水解成四，三，和低级磷酸盐。如，据报道 *A.ficum* 肌醇六磷酸盐产生肌醇二和一-磷酸盐的混合物（Ullah,1988）。产生肌醇六磷酸酶的微生物由细菌如枯草芽胞杆菌(Powar 和 Jagannathan, 1982)和假单胞菌(Cosgrove, 1970); 酵母如啤酒酵母（Nayini 和 Markakis,1984）；和真菌如



土曲霉菌(Yamada 等,1968)组成。

酸性磷酸酶是催化多种磷酸酯水解的酶,通常最优的 pH 值在 6.0 以下(Igarashi 和 Hollander,1968)。如, #EC3.1.3.2 酶催化正磷酸单酯水解成正磷酸盐产物。据报道一种酸性磷酸酶已经从 *A.ficum* 中纯化。去糖基化形式的酸性磷酸酶的分子量明确为 32.6kDa(Ullah 等,1987)。

肌醇六磷酸酶和较不特异的酸性磷酸酶是通过真菌曲霉属 *ficuum* 作为胞外酶产生的(Shieh 等,1969)。Ullah 报道从野生型 *A.ficum* 纯化的肌醇六磷酸酶,其分子量为 61.7kDA (SDS-PAGE 电泳;糖基化作用矫正);pH 最适在 pH2.5 和 pH5.5;Km 大约为 40 μ m;特异活性大约为 50U/kg(Ullah,1988)。PCT 专利申请 WO91/05053 也报道公开了从曲霉菌 *ficuum* 中分离和分子克隆肌醇六磷酸酶,最适 pH 是 pH2.5 和 pH5.5, Km 大约是 250 μ m, 特异活性大约是 100U/kg 蛋白。

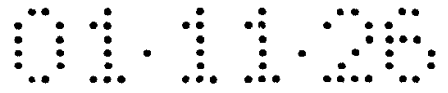
简言之,所引用的以前报道的细菌酶的特异活性大约在 50-100U/kg 蛋白范围内。与之相反,已经测定本发明公开的肌醇六磷酸酶活性大约是 4400U/kg。这相当于活性改善了大约 40 倍或更高。

2.3-解决肌醇六磷酸盐水解不充分的问题

2.3.1-工业应用中的酶添加剂: 使用可以产生肌醇六磷酸酶的微生物作为单胃动物饲料添加剂的可能性以前已有报道 (USPN 3,297,548 Shieh 和 Ware; Nelson 等,1971)。这一方法的成本有效性是这一和其他工业应用的主要局限。因此改善肌醇六磷酸酶分子势在必行。

也有报道微生物肌醇六磷酸酶可用于在某些工业过程,如小麦和玉米的消费产品,中生产动物饲料。在一个方面,玉米的湿磨过程产生固体谷蛋白作为动物饲料。据报道加入肌醇六磷酸酶可以改善饲料产品的营养价值。例如,使用真菌肌醇六磷酸酶和处理条件 ($t \sim 50^{\circ}\text{C}$ 和 $\text{pH} \sim 5.5$) 以前已有报道(如 EP 0 321 004)。简单地说,在使用传统浸泡方法制造大豆食品过程中,如,不加入外源性肌醇六磷酸酶的方法,据报道未水解的肌醇六磷酸盐的存在使得食品和废弃物不适合用来饲养鱼,家禽和其他非反刍动物,及喂奶的小牛的饲料。据报道肌醇六磷酸酶可用于改善这一高蛋白大豆物质的营养和商业价值(见 Finase 酶, Alko,Rajamaki,芬兰)。真菌肌醇六磷酸酶和一种 pH2.5 最佳酸性磷酸酶的结合形成 A. 黑曲霉多糖已经被 Alko 有限公司作为动物饲料添加剂用在他们的植酸降解产品 Finas F 和 Finas S.中。然而,这一方法的成本有效性对更大范围的应用来说仍有较大的局限性。因此一种成本有效的肌醇六磷酸酶来源将明显增加大豆餐食作为动物饲料的价值(Shieh 等,1969)。

2.3.2-需要最佳的酶添加剂: 为了解决暴露的问题,已经建议用外源性肌醇六磷酸酶处理食品,但这一方法没有完全优化,尤其关于实用性和成本有效性。这种优化需要考虑存在较广范围的应用,尤其是用于大批量的生产。例如,食品及



其制备方法，和接受的微生物的种类都有很大的范围。

在一个特定的实例中，要重视的是鱼饲料胶囊的制造需要将其成分暴露在高温和/或高压之下以便使产生的胶囊在投入水之前不溶解和/或降解（如在消费前）。因此需要这一制造过程获得高温和/或高压条件下稳定的添加酶。因此，不同肌醇六磷酸酶可以分别优选或适于不同的应用。

此外可以认识到优化一个酶过程的方法是通过重要催化酶进行修饰和改善。例如，要形成的转基因植物是由一个表达肌醇六磷酸酶分子的表达系统构成的。要重视的是，通过尝试改善不直接涉及表达的分子的活性的因子，如表达水平，只有有限的-可能是不充分的-优化水平可能在最大程度上实现。因此，也需要获得改善了特性的分子。

一种特别的实现分子特征改善的方法是通过一种称为定向进化（directed evolution）的技术方法，包括 Diversa Corporation 的所有的方法，该方法中的术语 DirectEvolution® 已形成和注册。这些方法在 Diversa 的共同拥有的专利（US 5, 830, 696）和一些共同待批的专利申请中有进一步的详细阐述。简单地说，DirectEvolution® 包括：a) 一种或多种分子模板经受诱变产生新分子和 b) 从具有更多所需特征的新分子的后代种类中选择。

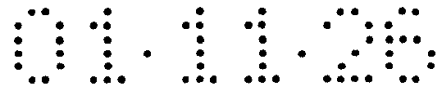
然而，定向进化的能力依赖于起始模板的起始选择，及诱变过程的选择和使用的筛选过程。例如，对随机选择的分子模板和/或对含有过度亚理想特征的初始分子模板的全范围的诱变排列的产生和评价的方法常常是一项可怕的巨大工程。这些模板的使用提供了，在最好的程度上，间接的亚理想通路并且潜在提供了产生充足的改良后代分子的很少的前景。另外，也意识到我们目前关于严格预测有益的修饰能力的知识是非常局限的。

因此，需要一种发现和利用自然界中具有进化前特性-优选进化前酶的优点-的分子的方法。因此在本公开中，要意识的自然界提供了（通过我们有时称之为“自然进化”的过程）可以立即用于商业应用或其他应用的分子，为了获得甚至更大的改变可以进行定向进化。

总之，需要新的，高活性的，生理上有效的，来源经济的肌醇六磷酸酶活性。特别地，需要鉴定新的肌醇六磷酸酶：a) 在一种或多种特异应用中有较高活性，因此可以用来优化这些特异的应用；b) 作为定向进化的模板获得甚至更进一步改善的新生分子；和 c) 通过诸如杂交为基础的方法等方式，作为鉴定其他相关分子的工具。本发明以一种新的方式满足了这些需要。

3. 发明概述

本发明提供了一种多核苷酸和一种多核苷酸编码的多肽，它已被鉴定为具有肌醇六磷酸酶活性的肌醇六磷酸酶。依据本发明的一个方面，提供了一种新颖的重组酶，及其活性片段，类似物和衍生物。



更特别的，本发明涉及细菌来源的重组肌醇六磷酸酶分子的用途，其可用于改善含肌醇六磷酸盐食物的营养价值。早期出版物已揭示了真菌肌醇六磷酸酶的使用，但用于这一目的细菌肌醇六磷酸酶是新的。

更特别的，本发明涉及新鉴定的大肠杆菌来源的重组肌醇六磷酸酶分子的用途，其可用于改善含肌醇六磷酸盐食物的营养价值。

这种应用包括使用新鉴定的分子来水解食物中的肌醇六磷酸盐。水解可以在肌醇六磷酸盐摄取前或在摄取后或者在摄取前和摄取后都发生。这一应用尤其与非反刍生物相关，但不局限于此，并且包括在转化宿主公开的新肌醇六磷酸酶分子的表达，公开的新肌醇六磷酸酶分子与食物和其他物质中的肌醇六磷酸盐的接触，和在动物的消化系统使用公开的新肌醇六磷酸酶分子。

另外，水解可不依赖于消耗发生，如，在体外应用，如在反应容器中。因此，含肌醇六磷酸盐的物质的处理包括较大范围的物质的处理，包括那些并不需要成为食物的物质，如，对排泄物（或粪便）的处理。

本发明优选的分子包括从大肠埃希氏杆菌 B 中分离的重组肌醇六磷酸酶，与以前鉴定的真菌肌醇六磷酸酶相比，它能改善磷从肌醇六磷酸和肌醇六磷酸的盐类中释放的效率。

依据本发明的一个方面，提供了一种可用于掺入食物中的肌醇六磷酸酶。更具体地，提供了一种可用于改善含肌醇六磷酸盐食物的营养价值的肌醇六磷酸酶。更具体地，还提供了一种肌醇六磷酸酶，当用于含肌醇六磷酸盐的食物中时，可明显改善消耗它的生物体生长的情况。从理论上讲，肌醇六磷酸酶活性的有益作用机制主要包括（如果不是本质上的）可以察觉的肌醇六磷酸酶的水解。有益的作用可以在含肌醇六磷酸盐的食物摄取前或可选择摄取后或可选择在摄取前和摄取后都发生。在摄取后发生有益作用的情况下，本发明的一个目的是提供一种肌醇六磷酸酶，其具有非反刍生物在消耗过程中仍保留的活性。

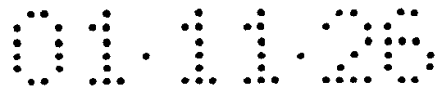
依据本发明的另外一个方面，提供了编码本发明酶的分离核酸分子-包括 mRNA, DNA, cDNA, 基因组 DNA-及活性衍生物，类似物和这些酶的片段。

依据本发明的另一个方面，提供了一个通过重组技术产生这种多肽的方法，该方法包括在促进所述酶表达的条件下培养重组的原核和/或真核宿主细胞并随后回收所述的酶，该重组的原核和/或真核宿主细胞包含编码本发明酶的核苷酸序列。

依据本发明的另一个方面，提供了一个在转基因植物或植物器官表达这种酶或编码这种酶的多核苷酸的方法和产生这种植物的方法。该是通过引入植物中一个由编码这种肌醇六磷酸酶的核酸序列组成的表达构建体实现的。

依据本发明的另一个方面，还提供了将这种酶或编码这种酶的多核苷酸用于工业化生产过程的方法，如从植物材料的肌醇六磷酸盐释放矿物质的方法，这一方法或在体外，即，饲料的处理方法，或在体内，如将这种酶施用动物身上。

依据本发明的另一个方面，提供了由公开的饲料处理方法制造的食品。



依据本发明的再一个方面，提供了将这种酶或编码这种酶的多核苷酸用于涉及研究，发现和发展的体外应用目的的使用方法。在一个非限定性的实例中，这种方法包括鉴定和分离相似序列的探针的产生，这种序列可能编码其他生物中相似的酶。

在一个特定的非限定的实例中，也提供了生产核酸探针的方法，这种探针包括足够长度的核酸分子以便与本发明的核酸序列特异杂交。通过优选实施方案，这些探针的杂交基础方法包括，但不限制于，PCR，北方(Northern)和南方(Southern)杂交类型，RNA 保护测定和原位杂交类型。本发明公开的分子的用途进一步包括，以一种非限定性的方式的诊断应用。

根据一个非限定的实例，这些方法包括公开的分子的抗体的产生，这些抗体的使用，包括，例如用于与其他生物体酶相似序列的鉴定和分离。在另外一个非限定性的实例中这些方法包括使用本发明的酶作为模板用于定向进化，该方法包括用筛选基础方法产生新分子，发现具有改善特征的子代分子。

也提供了一种转基因的非人类生物体，其基因组包括编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的异源核酸序列，其中所述转基因导致肌醇六磷酸酶多肽的表达。

本发明的这些和其他方面从本文的讲授中对本领域的专业技术人员是显而易见的。

4.附图的简要说明

下述附图是发明实施方案的描述，并不意味限制于本发明被权利要求所包含的范围。

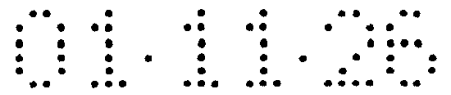
图 1A 和 B 表明核苷酸和本发明酶的推论的氨基酸序列。序列测定使用 378 自动 DNA 测序仪 (Applied Biosystems, Inc.)。

图 2 显示本发明肌醇六磷酸酶的 pH 值和温度曲线以及稳定性数据。这些分析使用的测定见下述肌醇六磷酸酶活性的测定：肌醇六磷酸酶的测定是在 37°C 孵育 150 μ l 酶预备液与添加 1mM CaCl₂ 的 600 μ l 2mM 植酸钠的 pH7.5, 100mM Tris HCl 缓冲液 30 分钟。孵育后通过加入 750 μ l 5%三氯乙酸终止反应。在加入 1500 μ l 显色试剂 (4 体积的 1.5%钼酸铵在 5.5%硫酸溶液和 1 体积的 2.7%硫酸亚铁：Shimizu,1992) 后用 700nm 磷酸盐标准分光光度测定法测定释放的磷酸盐。图 2 中 Y 轴表示 700nm 处的 OD 值。X 轴表示温度或 pH 。

5.术语的定义

为了更好的理解这里提供的实施例，我们将描述某些经常出现的方法和/或术语。另外，这里使用的标题和次标题是为了给读者提供方便，不以何种方式限定本发明。

这里使用的术语“抗体”指完整的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的片段，



如 Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, 和 SCA 片段, 它们能结合肌醇六磷酸酶多肽的抗原决定簇。可以用本领域已知的方法制造 (见 Harlow and Lane, 见上) 这些抗体片段, 这些抗体片段保留一些与它们来源抗体的抗原 (如肌醇六磷酸酶抗原) 选择性结合能力进一步描述如下。

(1) Fab 片段由抗体分子的单价抗原结合片段组成, 并可以通过用木瓜蛋白酶消化整个抗体分子产生, 产生由整个轻链和重部分链组成的片段。

(2) 抗体分子的 Fab' 片段可以通过用胃蛋白酶处理整个抗体分子获得, 接着还原, 产生由整个轻链和重部分链组成的分子。每个抗体分子经这一方法处理后获得两个 Fab' 片段。

(3) 抗体的 (Fab')₂ 片段可以通过用胃蛋白酶处理整个抗体分子获得, 而不要后续的还原。一个 (Fab')₂ 片段是两个 Fab' 片段的二聚体, 通过两个二硫键结合在一起。

(4) Fv 片段定义为包含表达为两个链的轻链可变区和重链可变区的基因工程片段。

(5) 单链抗体 (“SCA”) 是一个基因工程单链分子包含轻链可变区和重链可变区, 通过合适的, 弹性的多肽连接子连接。

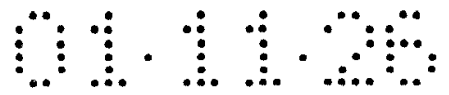
术语 “降解有效的” 数量指与未与酶接触的肌醇六磷酸盐相比, 需要降解至少 50% 肌醇六磷酸盐的酶的数量。优选的是, 至少 80% 的肌醇六磷酸盐被降解。

DNA 的 “消化” 指用限制酶催化的 DNA 的断裂, 限制酶仅在 DNA 的某些序列中起作用。这里用的不同的限制酶是商业上可以获得的, 它们的作用条件, 辅助因子和其它需要的条件对于本领域的普通技术人员是已知的。为了分析的目的, 典型的 1 μg 质粒或 DNA 片段在大约 20 μl 的缓冲液中与大约 2 单位的酶作用。为了质粒构建中分离 DNA 片段的目的, 典型的 5 至 50 μg 的 DNA 用 20 至 250 单位的酶在一个大容积内消化。特定限制酶合适的缓冲液和底物数量由制造商说明。通常使用的孵育时间大约是 37°C 约 1 小时, 但是可以根据提供者的说明书改变。消化后反应物直接在凝胶上电泳以分离需要的片段。

本发明所使用的术语 “抗原决定簇” 指一个抗原上的抗原决定因素, 如肌醇六磷酸酶多肽, 可与抗体的抗体结合位点, 如肌醇六磷酸酶特异的抗体结合。抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团, 如氨基酸或糖侧链组成, 并可以有特异的三维结构特征, 和特异的电荷特征。

术语 “片段”, “衍生物” 和 “类似物” 当指图 1 中的酶时, 包括保留至少一个生理功能或活性与参考酶至少本质上相同的酶。而且, 术语 “片段”, “衍生物” 和 “类似物” 可以用一个 “原体形式”, 如可以通过分裂来修饰的, 以产生具有明显高活性的成熟酶的低活性的原蛋白的实例说明。

术语 “基因” 表示参与了产生多肽链的 DNA 片段; 它包括编码区的前区或后区 (头和尾), 以及单一编码片段 (外显子) 之间的中介序列 (内含子)。



术语“分离的”表示从其最初环境（如，如果它是自然发生的话即自然环境）移走的物质。例如，在一个活体动物存在的自然形成的多核苷酸或酶没有被分离，但是从自然系统一些或所有共同存在的物质中分离的相同的多核苷酸或酶是被分离的。这些多核苷酸可以是载体的一部分和/或这些多核苷酸或酶可以是组成成分的一部分，但如果这些载体或组成成分不是自然环境的一部分的话，仍然被分离。

通过“分离的核酸”表示一种核酸，如一个 DNA 或 RNA 分子，这种核酸不紧邻 5' 或 3' 末端侧向序列，而它正常在它来源的自然的基因组中是紧邻的。因此这个术语描述了，例如，掺入到载体如质粒或病毒载体中的核酸；掺入到异种细胞（或同种细胞的基因组，但所在位点与自然发生的位点不同）基因组中的核酸；和作为分离分子，如 PCR 扩增或限制酶消化产生的 DNA 片段，或体外转录产生的 RNA 分子存在的核酸。术语也描述了形成杂交基因部分的重组核酸，后者编码可用来例如，在产生融合蛋白的其它多肽序列。

“连接”指在两个双链核酸片段之间形成磷酸二酯键的方法（Sambrook 等,1989）。除非其他所指，连接可以使用已知的缓冲液和条件完成，用每 0.5 μ g 大约等摩尔量的待连接 DNA 片段使用 10 单位 T4 DNA 连接酶（“连接酶”）。

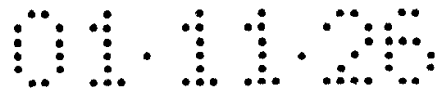
在此使用的一个“核酸分子”包括至少一个核苷酸碱基或一个核苷酸碱基对，分别依赖它是否是单链或是双链。而且，一个核酸分子可以排它地或嵌合地属于任何含核苷酸分子的基团，举例如，但不局限于，以下核酸分子基团：RNA, DNA, 基因组核酸，非基因组核酸，自然产生或非自然产生的核酸，和合成的核酸。这包括，以非限定性举例，与任何细胞器，如线粒体相关的核酸，核糖体 RNA，和由一种或多种自然存在或非自然存在的成分嵌合组成的核酸分子。

另外，“核酸分子”可以包含部分一个或多个以非核苷酸为基础，举例，但不限于氨基酸和糖。因此，通过实例，但不限于一个部分是以核苷酸为基础的，部分是以蛋白为基础的核糖体，被认为是“一个核酸分子”。

另外，通过实例，但不局限于，用可探测部分标记，如放射性或可选择的非放射性标记的核酸分子，也同样作为一个“核酸分子”。

术语“编码特定酶的核酸序列”或一个特定酶“的 DNA 编码序列”或一个“编码特定酶的核苷酸序列” - 及其他同名术语 - 指在合适的调控序列的控制下转录和翻译成酶的 DNA 序列。“启动子序列”是能在细胞内结合 RNA 聚合酶并启动下游（3' 方向）编码序列转录的 DNA 调控区域。启动子是 DNA 序列的一部分。这一序列区在 3' 端有一个起始密码子。启动子序列包括碱基的最小数目，以背景结合以上的可检测水平启动转录的必需元件结合于此。然而，RNA 聚合酶与序列结合，并且在起始密码子（启动子的 3' 末端）开始转录以后，转录在 3' 方向下游发生。在启动子序列内会发现转录起始位点（通过核酶 S1 基因序列方便地确定）及负责结合 RNA 聚合酶的蛋白结合区（连续序列）。

术语“编码一种酶（蛋白）的核酸”或“编码一种酶（或蛋白）的 DNA”或



“编码一种酶（蛋白）的多核苷酸”和其他同名术语包括一种仅包括酶的编码序列的多核苷酸及包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

在一个优选的实施方案中，一种“特异核酸分子种类”通过其化学结构定义，举例如通过，但不局限于，其基本序列。在另外一个优选的实施方案中，一种特异的“核酸分子种类”通过核酸种类的功能定义或通过来源于核酸种类产品的功能定义。因此，通过非限定性实例的方式，一个“特异核酸分子种类”可以通过一种或多种归因于它的活性或特性定义，包括归因于它表达产物的活性或特性。

“工作核酸样品收集入核酸库”的直接定义包括将核酸样品并入载体-为基础的集合物中的方法，如通过连接进入载体，和转化入一个宿主。相关载体，宿主，和其他试剂的描述及它的特异非限定实例在以后提供。“将工作核酸样品收集入核酸库”的直接定义也包括将核苷酸样品并入非载体-为基础的集合物中的方法，如通过连接到接头上。优选的接头可以使 PCR 引物退火以加速 PCR 扩增。

因此，在一个非限定实施方案中，一个“核酸库”是包括一种或多种核酸分子的载体-为基础的集合物。在另外一个优选的实施方案中，一个“核酸库”是包括核酸分子的非载体-为基础的集合物。仍然在另外一个优选的实施方案中，一个“核酸库”是包括核酸分子的联合集合物，部分是载体-为基础的，部分是非载体-为基础的。优选的是，根据个体核酸分子种类，包括库的分子的集合物是可搜索和分离的。

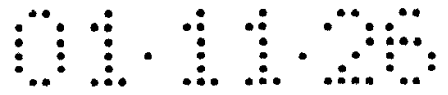
本发明提供了一个“核酸构建物”或可选择的一个“核苷酸构建物”或可选择的一个“DNA 构建物”。这里使用的术语“构建物”描述了一个分子，如多核苷酸（如一个肌醇六磷酸酶多核苷酸）可以选择性的以化学键与一种或多种其它的分子部分如一个载体，或载体的一部分结合。在一个特异-但非限制-的方面，一个核苷酸构建物以适于宿主细胞转化的 DNA 表达为例。

“寡核苷酸”指或者一个单链多脱氧核苷酸或者两个互补的多脱氧核苷酸链，它们可以通过化学合成。这种合成的寡核苷酸可以具有或不具有 5'磷酸盐。在激酶存在的情况下，那些没有 5'磷酸者不用 ATP 添加磷酸盐将不与另外的寡核苷酸连接。合成的寡核苷酸将与没有被去磷酸化的片段连接。

当 RNA 聚合酶将两个编码序列转录成单独的 mRNA 时，一个编码序列与另外一个编码序列“可操作地连接”，mRNA 然后翻译成单独的具有来源于两种编码序列氨基酸的多肽。编码序列不需要一个与另一个相邻，只要表达的序列最后被加工产生需要的蛋白。

在发明方法中的术语“肌醇六磷酸酶特异探针”，指与编码肌醇六磷酸酶多肽的核酸结合，或其互补序列结合的探针，其可检测程度比编码其他酶，或其互补序列的核酸要大。

严格意义上，术语“肌醇六磷酸盐”，“植酸”和“肌醇六磷酸钙镁”可以区别如下：“肌醇六磷酸盐”指植酸的阴离子形式；“植酸”指肌醇六磷酸，植



物包括尤其是植物的叶子中自然存在的一种化合物，可以作为肌醇六磷酸酶的底物；和“肌醇六磷酸钙镁”指植酸的一种盐，如植酸的钙镁盐。因此，可以理解“肌醇六磷酸盐”，“植酸”和“肌醇六磷酸钙镁”是化学相关和可以内在转化的形式，具有一个共同的化学结构。因此，正如在此使用的，“肌醇六磷酸盐”，“植酸”和“肌醇六磷酸钙镁”是可互换的术语，由于它们高度相关，相似，化学上可以内在转化，都（或者具有或者没有所述的化学内在转化）可以被在此公开的新的肌醇六磷酸酶降解。因此，术语“肌醇六磷酸盐”，“植酸”和“肌醇六磷酸钙镁”的其中一种在这里公开方法的描述中，可以理解它作为一个代表性术语起作用，其进一步是指肌醇六磷酸酶的任何底物，包括“肌醇六磷酸盐”，“植酸”和“肌醇六磷酸钙镁”。

一个“多核苷酸”是由 2 个或更多核苷酸碱基或核苷酸碱基对组成的分子。

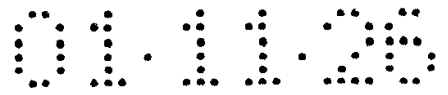
具有“前体”或“原体”的分子是在途中经过一种或多种共价或非共价化学修饰的任何组合（如糖基化，水解分裂，二聚体化或低聚体化，温度-诱导或 pH-诱导的构象变化，伴随辅因子，等等），获得一种更成熟的分子形式，这种分子形式与参考的原体分子相比有不同的特性（如活性增加）。当一个“前体”或“原体”的前体分子能经历两种或更多化学修饰时（如两个水解裂开，或一个水解裂开和一个糖基化变化），途中产生了成熟分子，术语“前体”或“原体”也可以用于参考的前体分子。因此，前体—原体酶是“前态—原体—形式”的酶。同样的，前体—原体激素是“前体—原体—形式”的激素。

这里使用的术语“试剂”包括本发明的肌醇六磷酸酶分子。优选的是，这种肌醇六磷酸酶分子催化肌醇六磷酸盐水解成肌醇和游离磷酸盐，从植酸复合物中释放矿物质。一种肌醇六磷酸酶的实例是来源于大肠埃希氏杆菌 B.的肌醇六磷酸酶。这种实例的酶见图 1，SEQ ID NO: 2。另外，如此所述，术语“试剂”包括本发明的底物试剂分子，如肌醇六磷酸盐分子。优选的是，在食物，潜在食物，副食品（既有体外副食品也有体内副食品，如体内外反应产物和动物排泄产物），食物前体，和其他来源的肌醇六磷酸盐中可以发现这种肌醇六磷酸盐分子。

“重组”酶指重组 DNA 技术产生的酶，即，编码需要酶的外源 DNA 构建转化细胞产生。“合成”酶是那些化学合成的酶。

本领域中已知的两种酶之间的“相似性”是通过比较氨基酸序列和一种酶的氨基酸与第二种酶的序列的保守氨基酸替代物决定的。相似性可以由本领域内熟知的步骤测定，例如，BLAST 程序（国家生物信息中心的局部基本排列搜索工具）。

一对分子的成员（如，抗体-抗原对或核酸对）说成相互“特异结合”，如果它们相互结合后亲和力比其他非特异分子的结合力大。例如，抗体与它结合的抗原的结合比非特异蛋白更有效可以描述成与抗原的特异结合。（类似地，核酸探针可以描述成与靶核酸特异结合，如果它通过碱基连接相互作用与靶核酸形成特异双体（见上）。）



“严格的杂交条件”表示仅仅在序列间至少 90%相同，优选的是至少 95%相同，最好是 97%相同，杂交才会发生。见 Sambrook 等,1989，在此整体引入作为参考。

本发明还包括具有与肌醇六磷酸酶多肽序列“实质上相同的”的序列的多肽，如 SEQ ID NO: 1 的一种。一种“实质上相同的”氨基酸序列是不同于参考文献序列的序列和仅仅通过保守氨基酸替代的序列，例如，一种氨基酸序列替代另外一种同类的氨基酸序列（如替代一种疏水氨基酸，如异亮氨酸，缬氨酸，亮氨酸，或蛋氨酸，为另外一种，或替代一种极性的氨基酸为另外一种，如替代精氨酸为赖氨酸，谷氨酸为天冬氨酸，或谷氨酰胺为天冬酰胺）。

另外一种“实质上相同的”氨基酸序列是不同于一个参考序列的序列和通过一种或多种非-保守替代，缺失，或插入的序列，尤其是当这样一个替代发生在分子的非活性位点的位点时，提示多肽必须保留它的行为特性。例如，一种或多种氨基酸可以从肌醇六磷酸酶多肽缺失，导致多肽的结构修饰，但并不明显改变其生理活性。例如，不需要肌醇六磷酸酶生物活性的氨基-或羧基-末端氨基酸可以被去掉。这种修饰导致形成更小的活性肌醇六磷酸酶多肽。

本发明提供了一种“实质上的纯酶”。这里使用的术语“实质上的纯酶”描述了一种分子，如一种实质上不含有其他蛋白，脂类，碳水化合物，核酸和其他生物物质的多肽（如肌醇六磷酸酶多肽，或其片段），但它与它们是自然相关的。例如，一种实质上的纯分子，如一种多肽，至少占目标分子干重的 60%。多肽的纯度可以使用标准方法测定，包括如，聚丙烯酰胺凝胶电泳（如 SDS-PAGE），柱层析法（如高效液相色谱（HPLC）），和氨基末端氨基酸序列分析。

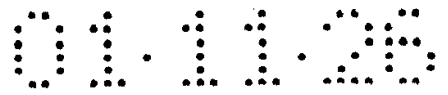
6.发明的详细描述

6.1 – 新的肌醇六磷酸酶

6.1.1-新肌醇六磷酸酶-一般概述：本发明提供了纯化的重组肌醇六磷酸酶，见图 1。另外，本发明提供了编码成熟酶的分离核酸分子（多核苷酸），此成熟酶具有图 1 推断的氨基酸序列。

本发明的肌醇六磷酸酶分子（尤其是重组酶和编码它的多核苷酸），它们的结构和它们的起源在专利上是新的。另外，关于本活性肌醇六磷酸酶分子在专利上也是新的。例如，使用一种测定方法（在食品化学药典，第四版中有描述），证明本发明的肌醇六磷酸酶的活性与真菌(曲霉属)肌醇六磷酸酶相比有明显高的活性。具体地，许多实验表明大肠杆菌肌醇六磷酸酶的活性大约是 4400U/mg，而曲霉属肌醇六磷酸酶的活性大约是 105U/mg。这相当于在活性上有超过 40 倍以上的差异。

6.1.2-肌醇六磷酸酶多肽：本发明提供了一种纯化的重组酶，其催化肌醇六磷酸盐水解为肌醇和游离磷酸盐，从植酸复合物中释放出矿物质。典型的纯化酶是来源于大肠埃希氏杆菌 B 的肌醇六磷酸酶。这一典型的肌醇六磷酸酶见图 1 SEQ



ID NO: 2 所示。

除了图 1 的酶（尤其是成熟酶）以外，本发明的酶还包括具有与肌醇六磷酸酶多肽序列“实质上相同的”序列的多肽，如 SEQ ID 1 中的一种。

在一个实施方案中，本发明 SEQ ID NO: 2 的肌醇六磷酸酶的分子量大约是 47,056 千道尔顿，其测定使用 SDS-PAGE 并从基因的核苷酸序列推断。PI 是 6.70。这种酶的 pH 和温度的关系以及稳定性数据见图 2。这种纯化的酶可以用来催化肌醇六磷酸盐水解成肌醇和需要的游离磷酸盐。本发明的肌醇六磷酸酶具有较高的热稳定性；因此它尤其适用于高温和/或高压应用包括，但不局限于，不过早溶于水的鱼食胶囊的制备。

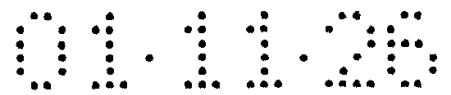
本发明的肌醇六磷酸酶多肽具有图 1 所示的肌醇六磷酸酶氨基酸序列（SEQ ID NO: 2）。肌醇六磷酸酶多肽，如从中大肠杆菌 B 分离的那些，其特征是催化肌醇六磷酸盐水解成肌醇和游离的磷酸盐，从植酸复合物中释放出矿物质。

本发明的其他肌醇六磷酸酶多肽是与肌醇六磷酸酶多肽氨基酸序列至少有约 50% 相同的氨基酸序列的多肽，如 SEQ ID NO: 2 中任何肌醇六磷酸酶。决定氨基酸序列同源性的比较的长度可以是，例如，至少 15 个氨基酸和例如至少 20, 25 或 35 个氨基酸。

同源或相同性常常使用序列分析软件（如基因计算机集团的序列分析软件包，Wisconsin 大学生物工程中心，1710 大学大道，Madison, WI 53705）测定。这个软件通过选定多个缺失，替代或其他修饰的同源程度选出相同的序列。上下文中两个或多个核酸或多肽序列的术语“同源”和“相同”指当在对比窗口或指定区域比较和排列最大一致性时，两个或多个相同序列或或相同的子序列，或具有特异比例的氨基酸残基或相同的核苷酸，其测定使用任何数目的序列比较算法或通过手工排列和可视化检查。

为了序列比较，典型地，是将一种序列作为参考序列，与测试序列比较，但可以使用参考序列的数据库。当使用一种序列比较算法，测试和参考序列输入计算机，继之同等序列被指定，如果需要，序列算法程序参数被指定。使用默认程序参数，或可以指定其他可选择的参数。然后序列比较算法基于程序参数上计算检测序列相对参考序列的序列等同百分比。

这里使用的一个“对比窗口”，包括任何邻位数目的一个片段的参考，该邻位选自由 20 至 600 组成的基团，通常大约 50 至大约 200，更通常大约 100 至大约 150，在两种序列都最佳排列后，其中一种序列可以与邻位相同数目的参考序列相比较。作为比较的序列排列方法在本领域中是已知的。比较序列的最佳排列可以通过，如 Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981 的局部同源算法, Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970 的同源排列算法，Person 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988 的相似性方法搜索，这些算法的计算机化工具（Wisconsin 基因软件包，基因计算机组，575 科学 Madison 博士，WI



的 GAP, BESTFIT, FASTA, 和 TFASTA), 或手工排列和可视化检查来进行。其他测定同源或相同性的算法包括, 例如, 除了 BLAST 程序(国家生物资料中心的局部基本排列搜索工具)以外, ALIGN, AMAS(多排列序列的分析), AMPS(蛋白多序列排列), ASSET(排列片断统计估算工具), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN(生物序列比较分析节点), BLIMPS(Blocks IMProved Searcher), FASTA, 区间和切点, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, Smith-Waterman 算法, DARWIN, Las Vegas 算法, FNAT(强化核苷酸排列工具), 框架排列, 框架寻找, DYNAMIC, FILTER, FSAP(Fristensky 序列分析包), GAP(全球排列程序), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC(敏感序列比较), LALIGN(局部序列排列), LCP(局部容量程序), MACAW(多排列构建和分析工作台), MAP(多排列程序), MBLKP, MBLKN, PIMA(模式诱导的多序列排列), SAGA(基因算法序列排列)和 WHAT-IF。这些算法程序也可以用来扫描基因数据库, 以鉴定有实质上相同序列的多核苷酸序列。许多基因数据库都是可获得的, 例如, 人类基因组的实质部分可作为人类基因组序列计划的一部分而获得(J.Roach, http://weber.u.Washington.edu/~roach/human_genome_progress_2.html) (Gibbs,1995)。至少 21 个其他基因组已经被测序, 包括, 例如, *M.genitalium*(Fraser 等,1995), *M.jannaschii*(Bult 等,1996), *H.influenzae*(Fleischmann 等,1995), 大肠杆菌(Blattner 等,1997), 和酵母(*S.cerevisiae*)(Mewes 等,1997) 和 *D.melanogaster*(Adams 等,2000)。在模型生物如小鼠, *C.elegans*, 和 *Arabidopsis sp* 基因组测序中已经取得了明显的进步。含有一些功能信息注释的基因组信息的许多数据库由不同的组织进行维护, 通过国际互联网可以得到, 例如, <http://www.tigr.org/tdb>; <http://www.genetics.wisc.edu>; <http://genome-www.stanford.edu/~ball>; <http://hiv-web.lanl.gov>; <http://www.ncvi.nlm.nih.gov>; <http://www.ebi.ac.uk>; <http://pasteur.fr/other/biology>; 和 <http://www.genome.wi.mit.edu>。

一个有用的算法实例是 BLAST 和 BLAST2.0 算法, 分别在 Altschul 等, *Nuc.Acid Res.*25:3389-3402,1977, 和 Altschul 等, *J.Mol.Biol.*215:403-410,1990 中分别描述。运行 BLAST 分析的软件可以公开通过生物技术信息国家中心获得(<http://www.ncvi.nlm.nih.gov>)。这一算法首先包括通过在所查询的序列中鉴别长度 W 的短代码识别高分序列对(HSPs), 当在序列数据库中排列相同长度的代码时, 它可以匹配或满足一些正值一值分数 T 。 T 指作为相邻代码的域值分数(Altschul 等, 见上)。这些最初的相邻代码命中作为启动寻找含它们的较长 HSPs 的搜索依据。只要累加排列分数增加, 命中的代码沿着每一序列向两个方向延伸。核苷酸序列的累加分数使用参数 M 计算(一对匹配残基的回馈分数; 总是 >0)。氨基酸序列的评分矩阵使用累加分数计算。命中的代码在每一方向延伸, 在以下情况下停止, 当: 累加排列分数从它的最大获得值通过定量 X 下降时; 累加分数

由于一种或多种负分残基排列累加降至 0 或以下时；或任何一个序列到达末端时。BLAST 算法参数 W, T 和 X 决定了排列的敏感性和速度。BLASTN 程序（用于核苷酸序列）采用默认一个长度为 11 的代码，期望值（E）为 10，M=5，N=-4 和两链的比较。用于氨基酸序列的 BLASTP 程序采用默认的一个长度为 3 的代码，期望值（E）为 10，BLOSUM62 评分矩阵（见 Henikoff 和 Henikoff, Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10915,1989）排列（B）为 50，期望值（E）为 10，M=5，N=-4，和两链的比较。

BLAST 算法在统计分析两个序列的相似性时也起作用（见如，Karlin 和 Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873,1993）。BLAST 算法提供的一种相似性的测量是最小数目的可能性（P（N）），它提供一种可能性的提示，即两个核苷酸或氨基酸序列可能偶然相配。例如，如果检测的核酸与参考核酸相比其最小数目可能性低于 0.2 的话，可以认为这一核酸与参考核酸序列相似，更优选低于大约 0.01，最好优选低于大约 0.001。

在一个实施方案中，蛋白和核酸序列同源使用基础局部排列搜索工具（Basic Local Alignment Search Tool）（“BLAST”）评价。尤其是，5 种特异的 BLAST 程序用来进行以下工作：

- （1）BLASTP 和 BLAST3 比较一个氨基酸查询序列与一个蛋白序列数据库；
- （2）BLASTN 比较一个核苷酸查询序列与一个核苷酸序列数据库；
- （3）BLASTX 比较一个查询核苷酸序列（双链）的六框架结构概念翻译产物与一个蛋白序列数据库；
- （4）TBLSTN 比较一个查询蛋白序列与所有六种可读框架（双链）中翻译的一个核苷酸序列数据库；和
- （5）TBLASTX 比较一个核苷酸查询序列的六框架结构翻译物与一个数据库核苷酸序列六种框架结构。

BLAST 程序通过在一个查询氨基或核酸序列与一个优选通过蛋白或核酸序列数据库获得的检测序列之间鉴别相似片段鉴别同源序列，这里的片段是指“高分数的片段碱基对”。高分片段碱基对优选通过评分矩阵的方法鉴别（即，排列），其中许多在本领域中是已知的。优选的使用的评分矩阵是 BLOSUM62 矩阵（Gonnet 等, Science 256:1443-1445,1992; Henikoff 和 Henikoff, Proteins17:49-61,1993）。次优选的是，可以使用 PAM 或 PAM250 矩阵（见，如 Schwartz 和 Dayhoff, eds,1978，检测距离关系的矩阵：蛋白序列和结构图集，Washington:国家生物医学研究委员会）。BLAST 程序可以通过美国国家医学图书馆获得，如在 www.ncbi.nlm.nih.gov。

上述算法中的参数可以根据研究的序列长度和同源的程度来修改。在一些实施方案中，在使用者没有说明书的时候，参数可以是算法的默认参数。

本发明进一步涉及一种具有图 1 推断的氨基酸序列的酶，及类似物，衍生物，和这种酶的片段。

图 1 酶的一个类似物，衍生物或酶的片段可以是(a)用不是由基因代码编码的一个氨基酸残基替代的一种或多种氨基酸残基其中的一个，或(b)包括一个替代基团的一种或多种氨基酸残基中的一个，或(c)成熟酶与另一种化合物融合的一个，如增加酶的半衰期的化合物（例如，聚乙二醇），或(d)提供了一种标记或标识，如 6 倍 His 标记或绿色荧光蛋白标记，(e)附加的氨基酸融合至成熟酶内中的一个，如一种引导或分泌序列或用于纯化成熟酶或原蛋白原序列的一个序列。这些类似物，衍生物和片段被认为是在此讲授的本领域中的专业技术人员的范围之内。

一种变体，如，一种“片段”，“类似物”或“衍生物”酶，和参考酶可能在氨基酸序列的一种或多种替代物，附加物，缺失物，融合物和截断物上不同，它可以以任何组合形式存在。

优选变体中，那些是从保守氨基酸替代的参考物中发生变化的。这种替代是在一个多肽中给定的氨基酸被另外一种类似特征的氨基酸替代。已知典型的保守替代是用替换，一种替换另一种，在脂肪族氨基酸 Ala,Val,Leu 和 Ile 中；Ser 和 Thr 羧基互换，酸基残基 Asp 和 Glu 的交换，Asn 和 Gln 氨基残基之间替代，Lys 和 Arg 碱性残基交换和芳香族残基 Phe 和 Tyr 中的替换。

因此，在一个特异的非限定的实例中，一种替代可以包括一个氨基酸被另外一个类似特性的氨基酸替代。在另外一个特异的非限定性实例中，一种替代可以包括一个氨基酸被不相似的氨基酸替代，其中变化是非抑制或静止的或至少一种酶的特性被加强。

另外，在一个非限定性的实例中，一种附加物包括在蛋白的羧基末端或者氨基或可选择的在末端区之间的一种附加物，其中变化是非抑制或静止的或至少一种酶的特性被加强。

在另外一个特异的非限定的实例中，一种变化可以由许多修饰组成，包括替代，附加，缺失，融合和/或切断，在由参考多核苷酸（SEQ ID NO: 1）编码的酶中，因此，不管个别修饰的效果，当共同发生时，修饰效果是非抑制或静止的或至少一种酶的特性被加强。

最优选的是保留与来自其改变的参考多肽具有实质上相同生物学功能和活性的变体。

本发明的术语“变体”指多核苷酸或多肽，其一个或多个碱基对，密码子，内含子，外显子或氨基酸残基（分别）被修饰，仍然保留本发明肌醇六磷酸酶的生物学活性。变体可以通过任何数目的方式产生，包括方法如，错误倾向 PCR、移动、寡核苷酸定向突变、组合 PCR、有性 PCR 突变、体内突变、盒式突变、循环集合突变、指数集合突变、位点特异的突变、连接重装、GSSM 和它们任何的组合，以下会有更完整的讨论。

6.1.3-肌醇六磷酸酶多核苷酸：依据本发明的一个方面，提供了编码成熟酶的分 离核酸分子（多核苷酸），该酶具有图 1 推断的氨基酸序列。

编码 SEQ ID NO: 2 的多核苷酸最初从大肠埃希杆菌 B 基因组中回收的基因组 DNA，以下会有描述。它包含一种开放的可读框架，该框架编码一个 432 个氨基酸残基的蛋白。

依据本发明的另外一个方面，提供了一种分离的多核苷酸，该分离的多核苷酸编码包括图 1 的 DNA 的本发明的一个典型的酶（SEQ ID NO: 1）。

本发明还涉及与参考多核苷酸不同的多核苷酸，其变化是静止的变化，例如，这种变化不改变多核苷酸编码的氨基酸序列。本发明还涉及核苷酸变化，该变化引起由参考多核苷酸（SEQ ID NO: 1）编码的酶的氨基酸替代，附加，缺失，融合，和切断。在发明的一个优选方面，这些酶保留了与参考多核苷酸编码的酶大致相同的生物功能。

本发明还提供了编码上述肌醇六磷酸酶多肽的分离的核酸分子。例如，包括在本发明内的编码 SEQ ID NO: 2 的核酸。这些核酸包含自然产生的核苷酸序列，或不同于那些自然产生的编码肌醇六磷酸酶的核酸，但编码相同的氨基酸的序列，这是由于基因代码的简并性。本发明的核酸包含 DNA 或 RNA 核苷酸，或它的组合体或修饰体。发明的典型核酸见 SEQ ID NO: 1。

本发明的多核苷酸可以是 DNA 的形式，DNA 包括 cDNA，基因组 DNA 和合成 DNA。DNA 可以是双链或单链，如果单链可以是编码链或非编码（反义）链。编码成熟酶的编码序列可以与图 1 所示的编码序列和/或淀质克隆（SEQ ID NO: 1）相同，或可以是一个不同的编码序列，而这一编码序列，是基因代码的超员或简并的结果，编码了与图 1 DNA（如，SEQ ID NO: 1）相同的成熟酶。

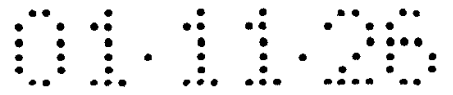
编码图 1（如，SEQ ID NO: 2）成熟酶的多核苷酸可以包括，但不局限于：仅对成熟酶的编码序列；成熟酶的编码序列和附加编码序列如一个引导序列或一个原蛋白序列；成熟酶的编码序列（选择性附加编码序列）和非编码序列，如内含子或成熟酶的非编码序列 5'和/或 3' 编码序列。

本发明进一步涉及这里和上面描述的多核苷酸的变体，它编码具有图 1（如，SEQ ID NO: 2）推断的氨基酸序列酶的片段，类似物和衍生物。多核苷酸的变体可以是一个自然产生的多核苷酸的等位基因变体或一个多核苷酸的非自然产生的变体。

因此，本发明包括编码与图 1 所示相同成熟酶的多核苷酸，以及这些多核苷酸的变体，该变体编码图 1 酶的一个片段，衍生物或类似物。这种核苷酸变体包括缺失变体，替代变体和附加或插入变体。

正如这里和上面所示，多核苷酸可以具有一个自然产生图 1 所示编码序列的等位基因变体的一个编码序列。如在本领域中已知的，一个等位基因变体是一个多核苷酸序列的另外一种形式，它可以有一个或多个核苷酸的替代，缺失或附加，实质上并不改变所编码酶的功能。

如这里讨论的，变体可以通过任何方式产生，包括的方法如错误倾向 PCR、



移动、寡核苷酸定向突变、组合 PCR、有性 PCR 突变、体内突变、盒式突变、循环集合突变、指数集合突变、位点特异的突变、连接重装、GSSM 和它们任何的组合。

在一个方面，一个非随机方法命名为合成的连接重装 (SLR)，有一些与随机移动相关，只是核酸构筑块不是移动或链状结合或随机嵌合，而是非随机结合，可以用于产生变体。

SLR 方法不依赖于要移动的多核苷酸之间高水平同源物的存在。本发明可以用于非随机产生子代分子库 (或区)，包括超过 10^{100} 不同的嵌合体。可以想象，SLR 甚至可以用来产生包括超过 10^{1000} 不同子代嵌合体的库。

因此，在一个方面，发明提供了一个非随机方法产生一类具有总装配顺序的最终嵌合核酸分子，该其顺序是通过设计选择，设计方法包括通过设计产生一些具有有用的相容的可连接末端的多数特异核酸构筑块的步骤，将这些核酸构筑块装配，因此获得了总装配顺序的设计。

要装配的核酸构筑块的相容的可连接末端对这类顺序的装配来说认为是“有用的”，如果它们能使构筑块在测定前顺序中被偶联。因此，在一个方面，核酸构筑块可以偶联的总装配顺序通过专门对可连接末端进行设计，并且如果使用了超过一种装配步骤，那么可被偶联的核酸构筑块的总装配顺序可通过装配步骤系列顺序来特殊化。在发明的一个实施方案中，退火构筑部件用酶处理，如连接酶 (如 T4 DNA 连接酶) 以实现构筑部件的共价结合。

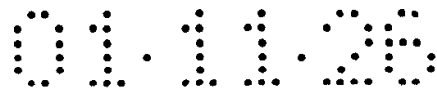
在另外一个实施方案中，核酸构筑块的设计依赖一些前体核酸模板的序列分析获得，模板作为产生子代最终嵌合核酸分子的基础。因此这些前体核酸模板作为序列资料来源帮助设计要突变，如嵌合或移动的核酸构筑块。

在一个实例中，本发明提供了相关基因家族的嵌合及其编码相关产物的家族。在一个特定的实例中，编码的产品是酶。本发明的酶和多肽可以依据这里描述的方法突变。

因此根据发明的一个方面，一些前体核酸模板序列为了选择一种或多种分界点而排列，分界点可以定位于同源区域。分界点可以用于描述要产生的核酸构筑块的界限。因此，在前体分子中鉴别和选择的分界点作为子代分子装配的潜在嵌合点。

一个有用的典型分界点是同源区域 (包括至少一个同源核苷酸碱基) 被至少两个前体模板分享，但是典型分界点是被至少一半前体，至少三分之二的前体模板，至少四分之三的前体模板，优选的是几乎所有的前体模板，分享的同源区域。甚至最优选的是有用的典型分界点是同源区域被所有的前体模板分享。

在一个实施方案中，为了产生详尽的库进行完整的连接重装方法。换一句话说，核酸构筑块的所有可能的顺序组合是以一类最终嵌合的核酸分子为代表。同时，每一组合的装配顺序 (如在每一最终嵌合核苷酸的 5' 至 3' 序列的每一构筑块的顺序) 经过设计 (或非随机)。由于方法的非随机属性，出现不需要的副产品的



可能被大大降低了。

在另外一个实施方案中，方法提供了系统性执行的连接重装过程，例如为了产生系统性的区室文库，可以系统性的筛选区室，如一个挨一个。换一句话说发明提供，通过选择性和审慎使用特异核苷酸构筑块，与选择性和审慎使用的顺序的分步骤的装配反应，可以实现实验性的设计，其中子代产品特异种类可以在每一反应管获得。这允许进行一个系统性的检查和筛选步骤。因此，这允许潜在非常大数量的子代分子可以在较小基团中进行检查。

由于它执行嵌合的能力在一定意义上是高度弹性的，虽然也很详尽和系统性，尤其当在子代分子中有低水平的同源性时，但本发明提供一个包括大量子代分子的库（组）的产生。由于本发明的连接重装的非随机属性，优选产生的子代分子包括最终嵌合核酸分子的库，该分子具有一个总体的通过设计选择的装配顺序。在一个特定的实施方案中，这样一个产生的库包括超过 10^3 至 10^{1000} 不同的子代分子种类。

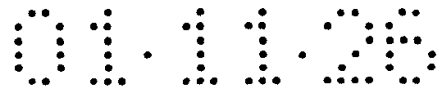
在一个方面，一类最终嵌合的核酸分子，其产生如上描述，包括编码多肽的多核苷酸。根据一个实施方案，这一多核苷酸是一个基因，可以是人造基因。根据另外一个实施方案，这种多核苷酸是一个基因通路，可以是一个人造基因通路。本发明提供一种或多种由本发明产生的人造基因可以被掺入一个人造基因通路，如一个真核生物中的（包括一种植物）可操作通路。

在另外一个实例中，产生构筑块的步骤的合成属性允许设计和引入核苷酸（如，一种或多种核苷酸，例如可能是密码子或内含子或调控序列），以后可选择性在体外过程（如通过基因突变）或体内过程（如通过利用宿主生物的基因剪接能力）中移除。适宜的是，除了产生可用分界点的潜在益处外，许多例子中引入这些核苷酸还需要许多其它理由。

因此，根据另外一个实施方案，发明提供了一个核酸构筑块可以用于引入一个内含子。因此，发明提供功能性内含子可以引入本发明的人造基因中。本发明还提供了功能性内含子引入本发明人造基因的通路。因此，本发明提供了嵌合多核苷酸的产生，该多核苷酸是含一个（或多个）人工引入内含子的人造基因。

因此，发明还提供了嵌合多核苷酸的产生，多核苷酸是包含一个（或多个）人工引入内含子的人造基因通路。优选是，人工引入的内含子在一种或多种宿主细胞的基因剪接上有用的，剪接的方式是自然发生的内含子在基因剪接中起作用。发明提供了产生含内含子的人造多核苷酸引入宿主生物用作重组和/或剪接方法。

本发明产生的人造基因也可以用作与另外的核酸重组的底物。类似的，本发明产生的人造基因通路也可以用作与另外的核酸重组的底物。在一个优选的实例中，重组的促进是通过，或发生在，在人造含内含子基因和一个核酸之间作为一个重组对同源区域。在一个尤其优选的实例中，重组对也可以是本发明产生的



一个核酸，包括一个人造基因或一个人造基因通路。重组的促进可以通过，或发生在，存在在一个或（多个）人工引入的人工基因的内含子上的同源区域。

本发明的合成连接重新装配方法利用许多核酸构筑块，每一个优选具有两个可连接端。每一个核酸构筑块的两个可连接端可以是两个平端（如每一个含 0 个核苷酸的悬垂），或优选一个平端一个悬垂端，或最优选的是有两个悬垂端。

这一目的的可用的悬垂可以是 3'悬垂或 5'悬垂。因此，核酸构筑块可以有一个 3'悬垂或一个 5'悬垂或两个 3'悬垂或两个 5'悬垂。核酸构筑块聚合形成一个最后嵌合核酸分子的总顺序通过目的性的实验设计而不是随机决定。

根据一个优选的实施方案，核酸构筑块通过两个单链核酸（也指单链寡核苷酸）的化学合成产生，使它们接触以便让它们退火形成双链核酸构筑段块。

双链核酸构筑块尺寸可以变化。这些构筑块的尺寸可以很小也可以很大。优选的构筑段块尺寸区域从一个碱基对（不包括任何悬垂）至 100,000 碱基对（不包括任何悬垂）。也提供了其他优选的尺寸范围，较低的限度从 1 个碱基对至 10,000 个碱基对（包括两者之间的每一整数值），和高限度从 2 个碱基对至 100,000 个碱基对（包括两者之间的每一整数值）。

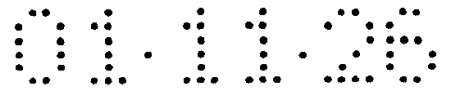
许多通过产生双链核酸构筑块的方法可用于本发明；它们在本领域中是已知的，可以逐渐被熟练的专业技术人员所使用。

根据一个实施方案，双链核酸构筑块的产生，首先通过产生两个单链核酸允许它们退火形成一个双链核酸构筑块。双链核酸构筑块的两条链可以在每一个远离任何形式悬垂的核苷酸上互补；因此不包含错配，也远离任何悬垂。根据另外一个实施方案，双链核酸构筑段块的两条链互补较每一远离任何形式悬垂的核苷酸少。因此，根据这一实施方案，双链核酸构筑块可以用于引入密码子简并。优选的密码子简并是使用这里描述的区域饱和基因突变引入，使用一种或多种 N, N, G/T 基因盒或选择使用另外一种或多种 N, N, N 基因盒。

本发明的体内重组方法可以在一个未知的特异多核苷酸或序列的杂交或等位基因上设盲进行。然而，不必要知道特异多核苷酸的实际的 DNA 或 RNA 序列。

在混合数量基因内使用重组方法对产生任何有用蛋白是有用的，例如，白介素 I，抗体 tPA 和生长激素。这种方法可以用于产生具有变化特性或活性的蛋白。这一方法对产生杂交核酸序列也是有用的，例如，启动子区，内含子，外显子增强子序列，基因的 3' 未翻译区或 5' 未翻译区。因此这一方法可以用来产生增加表达率的基因。这一方法在研究重复 DNA 序列中也是有用的。最后，这一方法可能用于突变核糖体或 aptamers。

在一个方面，这里描述的多核苷酸和多肽的变体通过使用还原基因重新分配，重组和选择的重复循环获得，它们允许高度复合线性序列如 DNA, RNA 的定向分子进化或蛋白的完全重组。



分子的体内移动对提供变体有用，可以利用细胞的自然属性重组多聚体。而体内重组为分子的多样性提供了较大的自然条件，基因重组保持相对较复杂的过程包括 1) 识别同源序列；2) 链解开，链进入和导致重组交叉产物的代谢步骤；最后 3) 检查交叉进入分泌重组分子。交叉的形成需要识别同源序列。

在另外一个实施方案中，本发明包括从至少第一个多核苷酸和第二个多核苷酸产生杂交多核苷酸的方法。本发明可以用来产生一个杂交多核苷酸，其方法是通过引入至少第一个多核苷酸和第二个多核苷酸进入合适的宿主细胞，它们至少有一个相同的部分同源序列区。部分同源序列区促进导致序列重新识别产生一个杂交多核苷酸的过程。这里使用的术语“杂交多核苷酸”，是从本发明的方法中得到的任何核苷酸序列，包含至少两种来源多核苷酸序列。这种杂交多核苷酸可以从分子内重组事件中得到，它促进了 DNA 分子中的序列整合。另外，这种杂交多核苷酸可以从还原基因重配的分子外过程得到，这一过程利用了重复序列在 DNA 分子内改变核苷酸序列。

本发明提供了一种产生杂交多核苷酸的方法，该杂交多核苷酸可以编码生物活性杂交多肽（如杂交肌醇六磷酸酶）。在一个方面，原始多核苷酸编码生物活性多肽。本发明的方法通过利用细胞过程产生新的杂交多肽，这一过程整合原始多肽序列，因此得到的杂交多核苷酸编码表现来源于原始生物活性多肽的多肽。例如，原始多肽可以从不同的微生物中编码一个特殊的酶。从一种生物或变体的第一个多核苷酸编码的酶可以，例如，有效的在特殊的环境条件下起作用，如高盐。从一种不同的生物或变体来源的第二个多核苷酸编码的酶可以，例如，有效的在不同的环境条件下起作用，如极高温度。包含来自第一个和第二个原始多核苷酸顺序的杂交多核苷酸可以编码一种展示原始多核苷酸编码的两种酶的特性的酶。因此，杂交多核苷酸编码的酶可以有效的在第一个和第二个多核苷酸编码的每一个酶共有的环境条件下有效作用，如，高盐和极高的温度。

原始多核苷酸编码的酶包括，但不局限于，肌醇六磷酸酶。来自本发明方法的一个杂交多核苷酸可以展示特殊的酶活性，而不表现原始酶的特殊酶活性。例如，编码水解酶活性多核苷酸重组和/或还原基因重新分配后，得到的杂交多核苷酸编码的杂交多肽可以筛选从每一个原始酶获得的特殊水解酶活性，如，水解酶起作用的键的类型和水解酶作用的温度。因此，例如，水解酶可以被筛选以确定那些化学功能，从原始酶中鉴别杂交水解酶，如(a)酰胺（肽键），如蛋白酶；(b) 脂键，如酯酶和脂肪酶；(c) 乙缩醛,如糖苷酶和例如，杂交多肽作用的温度，pH 或盐浓度。

原始多核苷酸的来源可以从个体生物体分离（“分离物”），在限定介质内生长的生物收集（“强化培养”），或，非培养生物（“环境样品”）。优选使用不依赖培养的方法从环境样品中获得多核苷酸编码的新活性，因为它允许获得生物多样性的未使用资源。

“环境库”是从环境样品中产生，代表自然发生生物的基因组集合，在克隆载体中实现，可以在合适的原核宿主内繁殖。因为克隆的 DNA 最初是从环境样品中直接提取，库不局限于可以在纯培养下生长的小部分原核细胞。另外，在这些样品中存在的环境 DNA 的正常化可允许原始样品中存在的所有种类有更多同等 DNA 显示。这可以明显增加从样品中的最小成分中发现兴趣基因的效率，这可以通过相对显性种类的几个数量顺序来显示。

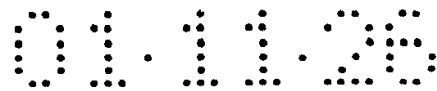
例如，从一个或多个非培养微生物产生的基因库中筛选感兴趣的活性。编码感兴趣的生物活性分子的潜在通路首先被基因表达文库形式的原核细胞捕获。编码感兴趣的活性的多核苷酸从这些库中分离，引入一个宿主细胞。宿主细胞在促进重组和/或还原基因重排的条件下生长，产生潜在的具有新的或增加活性的活性生物分子。

多核苷酸制备的微生物包括原核微生物，如黄色无芽孢杆菌属，真细菌，和原始真细菌，和较低级真核微生物如真菌，一些藻和原虫。多核苷酸可以从环境样品中分离，其中核酸可以不从培养生物获得或从一种或多种培养的生物中获得。在一个方面，这些微生物可以是有特殊嗜好，如嗜高温，嗜寒冷，psychrotrophs，适盐性，嗜酸性。特别优选有特殊嗜好的微生物中分离的编码酶的多核苷酸。这种酶可以在陆栖热喷泉和深海高温孔内超过 100°C 的温度下工作，可以在北极水低于 0°C 下，在死海饱和盐环境，在煤沉淀和地热富含硫物的 pH 在 0 左右，或在污泥 pH 超过 11 环境下工作。例如，一些从特别嗜好的生物中克隆和表达的酯酶和脂肪酶在较广范围温度和 pH 值下表现很高活性。

这里和上面描述的选择和分离的多核苷酸被引入合适的宿主细胞。合适的宿主细胞是任何能促进重组和/或还原基因重新分配的细胞。选择的多核苷酸优选是已经在包含合适控制序列的载体内。宿主细胞可以是高级真核细胞，如哺乳动物细胞，或低级真核细胞，如酵母细胞，或优选的，宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞。构建体引入宿主细胞可以用钙磷转染，DEAE-葡聚糖介导的转染，或电穿孔 (Dasiv 等,1986)。

作为合适宿主的代表性的实例，将提到：细菌细胞，如大肠杆菌，链霉菌属，沙门菌属 typhimurium; 细菌细胞，如酵母；昆虫细胞如果蝇 S2 和 Spodoptera SF9; 动物细胞如 CHO, COS 或小牛黑色素瘤；腺病毒；和植物细胞。在此所讲授的合适宿主的选择在本领域的那些技术人员的理解范围内。

对不同哺乳动物细胞培养系统的特殊参考可以用于表达重组蛋白，哺乳动物表达系统实例包括 COS-7 系猴子肾脏成纤维细胞，见“SV40 转化猴细胞支持早期 SV40 突变体的复制” (Gluzman) 描述，和其他能表达相容性载体的细胞系，如，C127, 3T3, CHO, HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体包括复制起始，合适的启动子和增强子，和其他必须的核糖体结合区，多腺苷酸区，剪接供区和受区，转录末端序列，和 5' 侧向非转录区。来源于 SV40 剪接的 DNA 序列，和多腺



昔酸区可以用于提供需要的非转录基因成分。

包含需要的多核苷酸的宿主细胞可以在常规营养培养基中培养，该培养基为激活启动子，选择转化体或扩增基因进行适当的修饰。培养条件，如温度 pH 值以及类似物，以前用于选择表达的宿主细胞，对本领域的普通技术人员来说是明显的。然后鉴定为具有特异酶活性的克隆进行测序以鉴别编码具有编码增强活性的酶的多核苷酸序列。

在另外一个方面，方法可以用于从一个或多个操纵子或基因束或它们的部分产生新地编码生物化学通路的多核苷酸。例如，细菌或许多真核细胞具有一个调节基因的协调机制，该基因的产物参与相关过程。基因集中在在单一染色体或和与另外一个紧紧相邻，结构上指“基因束”，在单个调控序列的控制之下共同转录，包括单个启动子发动了整个束的转录。因此，一个基因束是一组相邻基因，它们通常与它们的功能或者相同或者相关。一个由基因束编码的生物化学通路的一个实例是聚酮化合物。聚酮化合物是具有极端丰富生物活性资源的分子，包括抗生素（如四环素族和红霉素），抗癌制剂（柔红霉素），免疫抑制剂（FK506 和雷帕霉素），和兽药产品（莫能星）。许多聚酮化合物（由聚酮化合物合成酶产生）是有价值的治疗制剂。聚酮化合物合成酶是多功能酶，催化大量的长度不同，功能和成环作用的方式不同的碳链的生物合成。聚酮化合物合成酶基因进入基因束，至少一种类型（命为 I 类）的聚酮化合物合成酶有拥有大量的基因和酶，复杂的基因调控和这些基因/蛋白的体外研究。

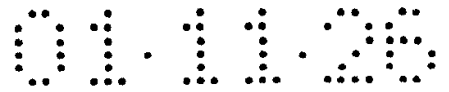
基因束 DNA 可以从不同生物分离，连接进入载体，尤其是那些含有表达调控序列的载体，可以控制和调节连接基因束的可探测蛋白的产生或来自连接的基因束的蛋白相关排列活性。使用含允许大量外源 DNA 引入的载体尤其适于这些基因束的使用，通过这里的实例描述，包括大肠杆菌的 f-因子（或生育力因子）。大肠杆菌的 f-因子是在结合过程中的一个影响其本身高频率转移的质粒，对获得和稳定繁殖大量 DNA 片段是理想的，如混合微生物样品的基因束。一旦连接进入合适的载体，两个或多个行不同肌醇六磷酸酶基因束的载体被引入合适的宿主细胞。基因束共有的部分同源序列区域将促进导致序列重组的过程，获得杂交基因束。新的杂交基因束然后在起始基因束进行筛选未发现活性的增加。

因此，在一个实施方案中，本发明涉及产生一种生物活性杂交多核苷酸和筛选这样的增加活性的多肽的方法，通过：

1) 引导至少第一个多核苷酸以可操作的连接和第二个多核苷酸以可操作的连接进入合适的宿主细胞，所述的至少第一个多核苷酸和第二个多核苷酸分享至少一个部分序列同源的区域；

2) 使宿主细胞在促进序列重组的条件下生长，在可操作连接处获得一个杂交多核苷酸；

3) 表达一个杂交多核苷酸编码的杂交多肽；



- 4) 在促进鉴定增加的生物活性的条件下筛选杂交多肽；和
- 5) 分离编码杂交多肽的一个多核苷酸。

筛选不同的酶活性的方法对本领域内的那些技术人员是已知的，且通过本特例讨论。当分离发明的多肽和多核苷酸时这种方法可以使用。

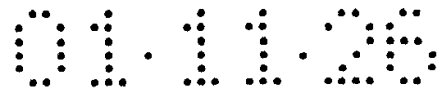
可在此使用的表达载体的代表性实例，将提到病毒微粒，杆状病毒群，噬菌体，质粒，噬菌粒，粘粒，磷粒，人造细菌染色体，病毒 DNA（如牛痘，腺病毒，禽痘病毒，假性狂犬病和 SV40 衍生物），P1-依赖的人造染色体，酵母质粒，酵母人造染色体，和其他任何人造宿主的特异载体（如芽胞杆菌属，曲霉属和酵母）。因此，例如，DNA 可以包括在任何表达多肽的表达载体中。这种载体包括染色体，非染色体和合成 DNA 序列。大量的合适载体对本领域中的那些技术人员是已知的，可以通过商业获得。以下载体可以通过实例获得：细菌：pQE 载体（Qiagen），pBluescript 质粒，pNH 载体， λ ZAP 载体（Stratagene）；ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T（Pharmacia）；真核细胞：pXT1, pSG5（Stratagene），pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40（Pharmacia）。然而，只要它们在宿主细胞内是可以复制和有活性的，任何其他质粒或载体都可以使用。本发明使用了低拷贝数目或高拷贝数目的载体。

本发明优选使用的载体类型包含 f-因子来源的复制。大肠杆菌的 F-因子（或生育力因子）是一个在结合过程中影响高频转移和细菌染色体本身的低频转移的质粒。优选的实例是使用克隆载体，指作为“磷粒”或人工细菌染色体（BAC）载体。这些来源于大肠杆菌的 f-因子能稳定整合基因组 DNA 的大片段。当从混合非培养环境样品中整合 DNA 时，可能实现大基因组片段成为稳定的“环境 DNA 库”形式。

发明使用的另外一类载体是粘粒载体。粘粒载体最初为了克隆和传代大量基因组 DNA 片段设计。克隆进入粘粒载体详细描述在“分子克隆：实验手册”（Sambrook 等,1989）。

表达载体的 DNA 序列可操作性的与指导 RNA 合成的合适表达控制序列（启动子）连接。特殊命名的细菌启动子包括 *lacI*, *lacZ*, *T3*, *T7*, *gpt*, 拉姆达 P_R , P_L 和 *trp*。真核启动子包括立即早期 CMV, HSV 胸腺嘧啶激酶, 早期和晚期 SV40, 反转录病毒的 LTR, 和小鼠金属硫因-I。选择合适的载体和启动子在本领域的普通技术人员的水平之内。表达载体还包括翻译起始和转录终点的核糖体结合区。载体还包括扩增表达的合适序列。启动子区可以用 CAT（氯霉素转移酶）载体或其他有选择标记的载体从任何可用的基因中选择。另外，优选的表达载体包含一个或多个可选择的标志基因提供转化宿主细胞的表型特性，如二氢叶酸还原酶或新霉素抗性的真核细胞培养，或大肠杆菌四环素或氨苄青霉素抗性。

体内基因重新分配集中于“分子间”过程，总体是指“重组”，在细菌中常常指“RecA 依赖”现象。发明依赖于一个宿主细胞的重组和基因的重新分配的重



组过程，或细胞介导还原过程的能力，该过程通过缺失来减少细胞内准重复序列的复杂性。这一“还原性基因重新分配”的过程发生在“分子中”，RecA-不依赖的过程中。

因此，在本发明的另一个方面，变体多核苷酸可以通过还原性基因重新分配方法产生。该方法包括含连续序列（起始编码序列）构建体的产生，它们插入合适的载体，继之引入合适的宿主细胞。个体分子同一性的基因重新分配通过拥有同源区的构建体中连续序列之间的组合过程发生，或准-重复单位之间。基因重新分配过程重组和/或减少重复序列的复杂性和程度，导致新分子种类的产生。可以应用许多处理作用增加基因重组比率。这些包括用紫外光处理，或DNA化学性损伤，和/或使用宿主细胞系显示的“基因不稳定性”的增强水平。因此，基因重新分配过程包括同源重组或准重复序列的自然特性以指导它们的进化。

重复或“准重复”序列在基因的不稳定性上具有重要作用。在本发明中，“准重复”是不限于它们起始单位结构的重复。准-重复单位可以表现为构建体的序列排列；相似序列的连续单位。一旦连接后，连续序列之间的连接基本上看不见，所得构建体的准-重复属性在分子水平继续。细胞降低所得构建体复杂性的缺失过程在准-重复序列之间起作用。准重复单位提供实际上无限的模板，在模板上可发生滑脱作用。含准-重复的构建体因此有效的提供了几乎在准重复单位内的任何地方缺失（和潜在的插入）发生的充足的分子弹性。

当准重复序列在相同的方向都连接时，例如头至尾或相反的方向，细胞不能区别个体单位。结果，还原过程可以通过序列发生。与之相反，例如，当显示头至头的单位时，而不是头至尾，反转表明了邻近单位的终点，所以缺失的形成将对分离单位的失去有利。因此，本方法优选是序列在相同的方向。准重复序列的随机方向会导致基因重新分配效率的丧失，而一致的序列方向会提供最高的效率。然而，虽然相同方向具有较少的邻近序列会降低效率，但是它仍然会提供充足的弹性有效的获得新分子。在准-重复序列内的相同方向制造构建体会有较高的效率。

序列可以使用任何方法在头至尾方向装配，包括以下：

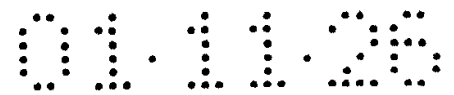
a) 可以使用包括制造单链时提供方向的多-A 头和多-T 尾的引物。这可以通过具有从RNA制造引物的最初少量碱基来实现，因此易于移走RNaseH。

b) 可以使用包含唯一限制剪切位点的引物。需要多个位点，唯一序列的集合，和重复合成和连接步骤。

c) 引物的内在少量碱基可以巯基化，使用核酸外切酶产生合适的尾分子。

回收基因重新分配序列依赖于具有降低的RI的克隆载体的识别。重新分配的基因编码序列然后通过扩增回收。产物被重新克隆和表达。降低的RI克隆载体的回收可以被以下影响：

- 1) 当构建体的复杂性降低时载体的使用仅仅可稳定的保留，
- 2) 通过物理程序物理性回收变短的载体。在这一实例中，使用标准质粒分离方法



和尺寸分离获得克隆载体，分离使用琼脂糖凝胶或用标准程序将低分子量去除的柱。

3) 当插入尺寸降低时，可以选择回收含切断基因的载体。

4) 使用直接选择技术和一个表达载体和合适的选择。

来自相关生物的编码序列（如基因）可以阐明高度同源和编码多种蛋白产品。这些类型的序列作为准-重复在本发明中尤其有用。然而，虽然下面的实例阐明几乎相同起源编码序列（准-重复）的基因重新分配，但是这一过程不局限于这些几乎相同的重复。

以下实例阐明了发明的一种方法。描述了来源于 3 种独特种类的编码核酸序列（准-重复）。每一序列编码一个独特特性的蛋白。每一序列的不同在于在序列的独特位置一个或多个碱基对，称为“A”，“B”和“C”。准-重复序列被分别或共同扩增和连接进入随机的集合体，因此在众多的连接分子中所有可能的排列和组合都是可行的。准-重复单位数目可以被集合条件控制。构建体中准-重复单位平均数目用重复索引（RI）定义。

一旦形成，构建体可以，或不可以根据公开发表的方案在琼脂糖凝胶上按大小分开，插入克隆载体，转染进入合适的宿主细胞。然后细胞传代和“还原性基因重排”发生。还原性基因重排过程的比率可以引入 DNA 的损伤来刺激，如果需要的话。RI 的减少是否通过一种“分子间机制”在重复序列之间的缺失来介导的，或是通过“分子内机制”的类似重组事件的介导不重要。最终结果是分子的基因重新分配进入所有可能的组合中。

选择性的，本方法包括筛选移动库的文库成员的附加步骤以识别具有结合或相互作用，或催化特殊反应（如催化链烷盐水解）能力的单一移动文库成员。

从这些库里识别的多肽可以用于治疗，诊断，研究和相关目的（如催化剂，增加水溶液的容积渗透克分子浓度的溶质，等等），和/或可以用于一种或多种移动和/或选择的加性循环。

在另外一个方面，在基因重组或重新分配之前或之中，本发明的多核苷酸或这里描述的方法产生的多核苷酸可以用作制剂或促进突变体引入起始多核苷酸的方法。这些突变的引入增加了获得的杂交多核苷酸和它们编码的多肽的多样性。促进突变形成的制剂或过程包括，但不局限于：（+）-CC-1065，或合成的类似物如（+）-CC-1065-（N3-腺苷酸，见 Sun 和 Huley,1992）；N-乙酰或去乙酰 4'-氟-4-氨二苯加合物，能抑制 DNA 合成（见，例如，van de Poll 等,1992）；或 N-乙酰或去乙酰 4-氨二苯加合物，能抑制 DNA 合成（同样见，van de Poll 等,1992，pp.751-758）；三价铬，一种三价铬盐，多环的芳香族碳水化合物（“PHA”）DNA 加合物，能抑制 DNA 复制，如 7-溴甲基-苯[a]蒽（“BMA”），tris（2, 3, 二溴丙基）磷酸盐（“Tris-BP”），1, 2-二溴-3-氯丙烷（“DBCP”），二溴丙烯醛（2BA），苯[a]蒽-7, 8-二氢化二醇-9-10-环氧化物（“BPDE”），一种铂（II）

卤素盐，N-羟基-2-氨基-3-甲基咪唑[4, 5-f] 喹啉（“N-羟基-IQ”），和 N-羟基-2-氨基-1-甲基-6-苯咪唑[4, 5-f] 吡啶（“N-羟基-PhIP”）。减慢和停止 PCR 扩增的优选方法包括紫外光 (+) -CC-1065 和 (+) -CC-1065- (N3-腺苷酸)。特殊的包括方法是 DNA 加合物或多核苷酸包括多核苷酸或多核苷酸池的 DNA 加合物，它可以通过一个过程释放或去除，这一过程包括在进一步的过程之前将包括多核苷酸的溶液加热。

在另外一个方面，本发明涉及产生具有生物活性重组蛋白的方法，该方法在本发明的为产生杂交或重新分配的多核苷酸提供的条件下，处理包括编码野生型蛋白的双链模板多核苷酸的样品。

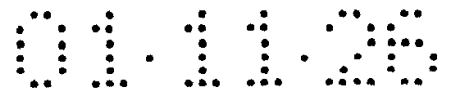
发明还提供了使用专用密码子引物（包含简并的 N, N, N 序列）将点突变进入多核苷酸，以便产生一类子代多肽，其中完全范围的单个氨基酸替代在每一氨基酸位置展示（基因区饱和的突变基因（GSSM））。使用的寡探针包括相邻的第一个同源序列，简并的 N, N, N 序列，优选但不必需的第二个同源序列。使用这种寡探针的下游子代翻译产物包括所有可能的沿着多肽的氨基酸区的氨基酸变化，因为简并的 N, N, N 序列包括所有 20 种氨基酸的密码子。

在一个方面，这种简并的寡体（包括一个简并的 N, N, G/T 基因盒）用于进行每一母代多核苷酸模板起始密码子全范围的密码子替代。在另一方面，至少两个简并 N, N, G/T 基因盒被使用-或用相同的寡探针或不用，在母代多核苷酸模板上至少两个起始密码子进行全范围的密码子替代。因此，一种以上的 N, N, G/T 序列包含在一个寡探针之中，在超过一个区域引入氨基酸突变。这些 N, N, G/T 序列可以直接相邻，或被一种或多种附加的核苷酸序列分离。在另一方面，对引入附加和缺失可用的寡探针可以单独或与含 N, N, G/T 序列的密码子一起使用，以引入任何氨基酸附加，缺失，和/或替代的结合或突变。

在一个特定实例中，用含相邻 N, N, G/T 三联体寡体，如简并 (N, N, G/T)_n 序列的寡探针同时使两个或多个相邻氨基酸位置突变是可能的。

在另外一个方面，本发明提供使用含较 N, N, G/T 序列简并少的简并基因盒。例如，在一些例子中需要使用（如寡体）简并三联体序列，简并三联体包括只有一个 N，其中所述 N 可以在三联体的第一第二或第三的位置。任何其他碱基包括它的任何组合和突变可以用于保留三联体中的两个位置。另外，在一些例子中需要使用（如寡体）简并 N, N, N 三联体序列或一个 N, N, G/C 三联体序列。

然而，可以发现因为一些理由使用本发明公开的简并三联体（如 N, N, G/T 或 N, N, G/C 三联体序列）是有帮助的。在一个方面，本发明提供了系统性和相对简单的方法产生全范围的可能氨基酸（总数为 20 个氨基酸）替代为多肽中的每一氨基酸位置。因此，为了 100 个氨基酸多肽，本发明提供了系统性和相对简单的方法产生 2000 个不同种类（如，每一位置 20 个可能的氨基酸乘 100 个氨基酸位置）。可以发现提供了，通过使用含简并 N, N, G/T 或 N, N, G/C 三联体序



列的寡探针，编码 20 个可能氨基酸的 32 个个体序列。因此，在一个母代多核苷酸序列的反应管中使用一个这类寡探针用于饱和基因突变，产生 32 个不同子代多核苷酸编码的 20 个不同多肽。作为对照，在区域介导的基因突变中使用非简并寡探针导致每一反应管中只有一种子代多肽产品。

本发明还提供了使用非简并寡体，它可以选择性的与公开的简并寡体一起使用。可以发现在一些情况下，使用非简并寡体在工作多肽中产生特异突变点是有帮助的。这提供了一种方法产生特异的无义点突变，导致了相应的氨基酸改变的点突变，引起终止密码子产生的点突变和多肽片段的相应表达。

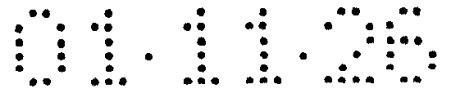
因此，在一个实施方案中，每一饱和突变基因反应管包含编码至少 20 个子代多肽分子的多核苷酸，以至于所有 20 个氨基酸显示在一个与母代多核苷酸突变密码子位置相对应的特异氨基酸位置上。从每一饱和突变基因反应管产生的 32 倍简并子代多肽可以用于克隆扩增（如，用一个表达载体克隆进入合适的大肠杆菌宿主中）和进行表达筛选。当个体子代多肽通过筛选识别表现可取的特性变化时（与母代多肽比较），可以测序识别包含它们的相关可取的氨基酸替代。

可以发现基因突变中在使用这里公开的饱和基因突变在母代多肽的每一氨基酸位置上，发现可取的氨基酸变化可以在超过一个氨基酸位置。一个或多个新子代分子可以在包含所有或部分这些可取的氨基酸替代的组合中产生。例如，如果 2 个特异可取的氨基酸变化鉴定在多肽三个氨基酸位置的任一时，每一位置突变包括三个可能（起始氨基酸没有变化，两个可能的改变中的每一个）和三个位置。因此，有 $3 \times 3 \times 3$ 或 27 种总的可能，包括 7 种以前检查出来的 6 个单独的点突变（如三个位置，每个有 2 个）和任何位置没有变化。

在另一方面，位点饱和突变基因可以与筛选一起共同用于移动，嵌合，重组和其他突变方法。本发明提供以重复方式使用任何基因突变过程，包括突变基因饱和。在一个实例中，重复使用任何基因突变方法与筛选一起使用。

因此，在一个非限定性实例中，本发明的多核苷酸和多肽来源于加性基因突变过程结合的饱和基因突变，如两个或多个相关多核苷酸引入合适的宿主细胞的过程，通过重组和还原性基因重新分配产生一个杂交多核苷酸的方法。

除了沿着整个基因序列进行的基因突变过程，基因突变可以用于替换多核苷酸序列中任何数目碱基的每一个，其中突变的碱基数目优选从 15 至 100000 的每一整数。因此，除了沿着分子的每一位置的基因突变，可以将每一或分散数目的碱基（优选总数从 15 至 100000）进行基因突变。优选的，分离核苷酸用于沿着多核苷酸序列的每一位置或位置组进行基因突变。三个位置一组进行基因突变是一个密码子。突变优选使用突变基因引物引入，引物包含外源基因盒，也指作为一个突变基因盒。优选的基因盒可以具有从 1 至 500 个碱基。在这样的基因盒中每一核苷酸位置是 N, A, C, G, T, A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T, C/G/T, A/G/T, A/C/T, A/C/G, 或 E, 其中 E 是非 A, C, G, 或 T 的任何碱基（E 可以



指设计寡体)。

一般意义上来说,饱和基因突变包括突变基因盒(其中每一基因盒优选大约1-500碱基长度)的完全突变,基因盒在限定的多核苷酸序列进行突变(其中突变的序列优选大约从15至100000碱基长度)。因此,一组突变(从1至100突变范围)引入每一基因盒进行突变。在一个周期的饱和基因突变过程中,一组引入一个基因盒的突变可以与引入第二个基因盒的第二组突变不同或相同。这类组别通过缺失,附加,特殊密码子组,和特殊核苷酸基因盒组进行实例。

突变的限定序列包括完整的基因,通路,cDNA,完整的开放可读框架(ORF),和完整的启动子,增强子,抑制子/转化激活子,复制起始,内含子,操纵子,或任何多核苷酸功能基团。一般的,这一目的的“限定序列”可以是任何多核苷酸,即15个碱基-多核苷酸序列,15个碱基和15000个碱基之间长度的多核苷酸序列(本发明特异命名了之间的每一整数)。选择密码子组的考虑包括简并突变基因盒编码的氨基酸类型。

在一个优选的实例中,一组突变可以引入突变基因盒,这一发明特异提供了简并密码子替代(使用简并寡探针)在每一位置编码2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,和20个氨基酸,和因此编码的多肽库。

本发明还包括多核苷酸,其中成熟酶的编码序列可以在相同的可读框架中融合至多核苷酸序列,可以帮助酶从宿主细胞表达和分泌,例如,控制酶从细胞中转运的引导序列。具有引导序列的酶是一个蛋白前体的实例,可以通过宿主细胞切断引导序列形成一个成熟形式的酶。多核苷酸还编码蛋白原,其实例是成熟蛋白加附加5'氨基酸残基。另外一种具有原序列的成熟蛋白实例是无活性形式蛋白的蛋白原。一旦原体序列被切断,活性成熟蛋白就形成了。

因此,例如,本发明的多核苷酸可以编码成熟的酶,或具有原体序列的酶或具有原体序列和前体序列的酶(如引导序列)。

6.1.4-分离方法: 本发明肌醇六磷酸酶编码序列通过制备大肠杆菌B基因组DNA,和例如从基因组DNA(通过,例如,PCR扩增),编码肌醇六磷酸酶活性的DNA回收来鉴定。这些回收方法在本领域中是已知的。一种方法,例如,包括设计扩增引物回收编码序列,从基因组DNA扩增基因,亚克隆DNA进入载体,所得构建体转化进入宿主系,表达肌醇六磷酸酶用于评价。这些过程在本领域中是已知的,并且Sambrook等,1989已提供了方法(本文整体引入作为参考)。

在一个优选的实施方案中,本发明的酶,通过以下技术从大肠杆菌B基因组DNA中分离:

大肠杆菌B基因组DNA是商购获得(Sigma:Catalog#D-2001,St.louis,New Jersey)。

以下引物用于直接从基因组DNA扩增基因:

5'引物 gtttctgaattcaaggaggaatttaaATGAAAGCGATCTTAATCCCATT(SEQ ID

NO:3); 和

3'引物 gttctggtaccTTACAAACTGCACGCCGGTAT(SEQ ID NO:4)

Pfu 聚合酶使用根据制造商说明 (Stratagene Cloning Systems, Inc, La Jolla, CA)。

PCR 产物和 pQE60 载体(Qiagen)根据制造商说明用 EcoRI 和 BglII 限制内切酶消化 (New England Biolabs)。在 M15 pREP4 宿主细胞 (Qiagen) 的连接和转化进入和表达产生 c-term 6X-His 标记蛋白。

6.1.5-活性测定: 然后可以测定分离的核酸序列和其他酶, 以保留本发明酶的生物活性特性, 例如, 在一个检测肌醇六磷酸酶活性的测定 (食品化学规程第 4 版)。这些酶包括肌醇六磷酸酶的切断形式, 和变体如缺失和插入变体。

这种体外测定的实例是检测肌醇六磷酸酶活性的以下测定: 肌醇六磷酸酶的测定是 150 μ l 酶预备液与 600 μ l 2mM 植酸钠在添加 1mM CaCl_2 的 100mM Tris HCl 缓冲液 pH7.5 中 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 分钟。孵育后通过加入 750 μ l 5%三氯乙酸终止反应。磷酸盐释放测定在加入 1500 μ l 显色试剂 (4 体积 1.5%钼酸铵在 5.5%硫酸和 1 体积 2.7%硫酸亚铁: Shimizu, 1992) 后用 700nm 磷酸盐标准分光光度测定法。一单位的酶活性定义为每分钟释放 1 μ mol 测定条件需要的酶的数量。特异活性可以用每毫克蛋白表达的酶活性单位来表示。

本发明的酶具有植酸盐水解为肌醇和游离磷酸盐相关的酶活性。

6.2-新肌醇六磷酸酶的产生

6.2.1-产生的方法-一般概述: 本发明的酶和多核苷酸优选以分离形式提供, 优选是纯化的同源基因。发明的肌醇六磷酸酶多肽可以使用任何标准方法获得。例如, 肌醇六磷酸酶多肽可以在标准重组表达系统 (见下) 中产生, 化学合成 (这一方法限于少量肌醇六磷酸酶肽片段), 或从它们自然表达的生物中纯化产生。可用的重组表达方法包括使用哺乳动物宿主, 微生物宿主, 和植物宿主。

本肌醇六磷酸酶分子的重组表达可以与一个或多个附加分子结合获得如, 例如, 其他酶。这一方法可用于产生组合产物, 如包含本肌醇六磷酸酶分子和一个或多个附加分子的植物或植物部分-优选所述的肌醇六磷酸酶分子和所述的附加分子用于联合的应用中。获得的重组表达分子可以用于同源基因和/或纯化形式或选择性的相对未纯化形式 (如可食用的植物部分, 当与其他食物混合催化植酸盐降解时是可用的)。

总之, 在一个非限定性实施方案中, 本发明提供了一个宿主内表达的重组酶。在另外一个非限定性实施方案中, 本发明提供了实质上纯的肌醇六磷酸酶。因此, 本发明的酶可以是一个重组酶, 一个自然酶, 或一个合成酶, 优选是一个重组酶。

6.2.2-重组表达: 本发明还涉及包括本发明多核苷酸的载体, 本发明载体的基因工程宿主细胞, 通过重组技术产生本发明的酶。

宿主细胞用含本发明的多核苷酸载体进行基因工程 (如转导或转化或转染)。

这些载体可以是，例如，一个克隆载体或一个表达载体。载体可以是，例如，质粒的形式，病毒微粒，噬菌体，朊病毒等等。工程宿主细胞可以在为适于激活启动子而改良的常规营养介质内培养，和/或选择转化或扩增本发明的基因。培养条件，如温度，pH 和类似物，以前用于选择表达的宿主细胞所使用的，对普通的技术人员是明显的。

本发明的多核苷酸可以通过重组技术产生酶。因此，例如，多肽可以包括在许多表达酶的表达载体的任何一个。这种载体包括染色体，非染色体和合成 DNA 序列，如，SV40 衍生物；细菌质粒，噬菌体 DNA；杆状病毒群；酵母质粒；来源于重组质粒和噬菌体 DNA 的载体，病毒 DNA 如牛痘，腺病毒，禽痘病毒和伪狂犬病。然而，任何其他的载体都可以使用只要它在宿主内可复制的和具有活力的。

合适的 DNA 序列可以通过一些步骤插入载体中。一般地，DNA 序列通过领域中已知的过程插入合适的限制内切酶区域。这一方法除外的是使用平端分子，它可以通过使用限制消化和不依赖限制消化方法产生。另外，插入可以通过叫“不依赖连接酶”方法掺入一个载体。在一个特殊方面，“不依赖连接酶”方法通过在室温下使用拓扑异构酶-介导的连接反应来实例，例如根据商业获得的试剂盒叫 TOPO-TA Cloning®(Introgen Corporation, Carlsbad, CA)。另外的酶，包括拓扑异构酶的异构体或更远涉及的重组酶（如重组酶），也可以用于介导这类“不依赖连接酶”的掺入。在另外一个特殊方面，“不依赖连接酶”方法通过使用宿主修复机制来实例。这些步骤和其他一些被认为是在本领域的专业技术人员的范围内。

表达载体的 DNA 序列可操作性的与合适的表达控制序列（启动子）连接介导 mRNA 合成。作为这些启动子的代表实例，可以提到：LTR 或 SV40 启动子，大肠杆菌 lac 或 trp，噬菌体拉姆达 P_L 启动子和其他已知控制原核或真核细胞或它们的病毒表达的启动子。表达载体还包括用于翻译起始的核糖体结合区和转录终止子。载体还包括扩增表达的合适序列。

另外，优选的表达载体包含一种或多种可选择的标志基因提供选择转化宿主细胞的表型特性，如真核细胞培养物的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性，或如大肠杆菌中的四环素抗性或氨苄青霉素。

如这里和上面描述的含合适 DNA 序列的载体和合适的启动子或控制序列，可以用于转化合适的宿主，允许宿主表达蛋白。

作为合适宿主的代表实例，可以提到：细菌细胞，如大肠杆菌，链霉素，枯草杆菌；细菌细胞，如酵母；昆虫细胞如果蝇 S2 和 *Spodoptera Sf9*；动物细胞如 CHO，COS 或小牛黑色素瘤，腺病毒；植物细胞，等等。从在此的讲授，选择合适的宿主被认为在本领域专业技术人员的范围之内。

更特殊的是，本发明还包括重组构建体，后者包括一种或多种序列，上面已有广泛描述。构建体包括载体，如质粒或病毒载体，发明的序列已经被插入其中，

在一个正向或相反方向。在本实施方案的优选方面，构建体进一步包括调节序列，包括，例如，启动子，可操作的与序列连接。一个或多个附加插入物也可以被掺入导致一种或多种附加分子的表达，如另外一种肌醇六磷酸酶或蛋白酶，优选的上述一种或多种附加分子可用于在联合应用中与本肌醇六磷酸酶结合。

大量的合适载体和启动子对本领域中的专业技术人员是已知的，商业中可以获得。“质粒”命名是通过小写的 p 在前和/或其后是大写字母和/或数字。这里的初始质粒既可以商业获得，非限制的公开购买，也可以根据出版公开的步骤从获得的质粒中构建。另外，与那些所描述的同等的质粒在本领域中是已知的，对于普通的专业技术人员是很明显的。

以下的载体是以实例的方式提供的；细菌的：pQE70, pQE60, pQE-9(Qiagen), pBluescript II(Stratagene);pTRC99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T(Pharmacia); 真核生物的：pXT1, pSG5(Stratagene)pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40(Pharmacia)。但是，任何其他质粒或其他载体只要可以在宿主中复制和具有活力均可以使用。

启动子区可以采用 CAT(氯霉素转移酶)载体或其他具有可选择标记物的载体选自任何需要的基因。两个合适的载体为 pKK232-8 和 pCM7。特殊命名的细菌启动子包括 lacI, lacZ, T3, gpt, λ P_R, P_L 和 trp。真核细胞启动子包括前早期 CMV, HSV 胸苷激酶，早期和晚期 SV40, 来自逆转录病毒的 LTRs 和鼠金属硫蛋白-I。合适载体和启动子的选择很好地在本领域普通技术水平范围内。

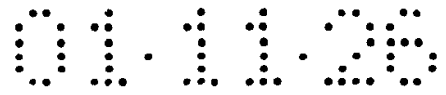
在进一步的实施方案中，本发明涉及含有上述构建物的宿主细胞。宿主细胞可以是一个较高级的真核细胞，如一个哺乳动物细胞，或一个较低级的真核细胞，如一个酵母细胞，或宿主细胞可以是一个原核细胞，如一个细菌细胞。通过磷酸钙转染，DEAE-右旋糖苷介导的转染，或电穿孔(Davis,1986) 将构建物导入宿主细胞可以是有效的。

宿主细胞中的构建物可以采用常规的方式来产生由重组序列编码的基因产物。可以选择的是，本发明的酶可以通过常规的肽合成仪来合成地产生。

成熟的蛋白可以在合适启动子的控制下在哺乳动物细胞，酵母，细菌或其他细胞中表达。无细胞的翻译系统也可以采用来源于本发明 DNA 构建物的 RNA 来生产这样的蛋白。原核细胞和真核宿主细胞中使用的合适的克隆和表达载体得到了描述(如，Sambrook 等，1989，其中公开的在此引用作为参考)。

真核细胞转录编码本发明酶的 DNA 可以通过在载体中插入一个增强子序列而增加。增强子是 DNA 的顺式反应元件，通常大约为 10 至 300bp，作用于启动子而增强其转录。实例包括位于复制起点 bp100 至 270 后侧的 SV40 增强子，一个细胞巨病毒早期启动子增强子，在复制区起点后侧的多瘤病毒增强子，和腺病毒增强子。

一般来说，重组表达载体将包括复制区起点和选择性标记物以保证宿主细胞的转化，如，大肠杆菌的氨比西林抗性基因和 *S. cerevisiae* TRP1 基因，和来源于高



度表达基因的启动子，用来引导下游结构序列的转录。这样的启动子可以来源于编码如 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)， λ -因子，酸性磷酸酶或热休克蛋白，以及其他的糖分解酶的操纵子。异源结构序列与翻译的起始点和终止序列，以及优选地一个能够引导翻译酶分泌的引导序列在适当的时期进行装配。可以选择的是，异源序列可以编码一个融合蛋白，该蛋白包括一个具有所需特性的 N-末端鉴定肽，如表达的重组产物的稳定或简单纯化。

细菌中有用的表达载体通过在具有功能性启动子的读码运行期内插入编码所需蛋白的结构性 DNA 序列，以及合适的翻译起始点和终止信号。载体将包括一个或多个显性选择标记物和一个复制起始点以保证载体的维持，以及如果需要提供在宿主内的扩增。虽然其他也可以作为选择，适合转化的原核细胞宿主包括大肠杆菌，枯草芽胞杆菌，鼠伤寒沙门氏菌和假单胞菌属，链霉菌属和葡萄球菌属中的多种菌属。

作为一个代表性但非限制性的实例，细菌用的有用表达载体由一个选择性标记物和来源于市售质粒的细菌复制起始点组成，市售质粒包括已知克隆载体 pBR322(ATCC 37017) 的基因元件。这样的市售载体包括，例如，pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 瑞典)和 GEM1(Promega Biotec, Madison, WI, 美国)。这些 pBR322 “主干” 区与适当的启动子和将表达的结构序列结合。

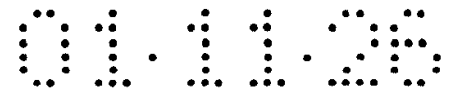
在一个合适宿主菌株的转化和宿主的生长达到适当的细菌密度后，选择的启动子通过适当的方式进行诱导(如，温度转变或化学诱导)，且细胞继续培养一段时间。

细胞常规的收集采用离心，用物理或化学方式破裂，为进一步纯化保留得到的原始提取物。

在表达蛋白中使用的微生物细胞可以通过方便的方法进行破裂，包括冷冻-复温的重复，超声作用，机械性破坏，或采用细胞溶解剂，这样的方法对本领域专业技术人员是已知的。

也可以使用不同的哺乳动物细胞培养系统表达重组蛋白。哺乳动物表达系统的实例包括猴肾成纤维细胞的 COS-7 细胞系，如 Gluzman(1981)所描述的，和其他能够表达相容性载体的细胞系，如，C127,3T3,CHO,HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体将包括一个复制起始点，一个合适的启动子和增强子，以及任何需要的核糖体结合位点，多腺苷酸化位点，剪接供体和受体位点，转录终止序列，和 5'-侧向非转录序列。来源于 SV40 剪接和多腺苷酸化位点的 DNA 序列可能用于提供所需的非转录基因元件。

酶可以重组细胞培养物中回收和纯化，其方法包括硫酸铵或乙醇沉淀法，酸提取，阴离子或阳离子交换层析，磷酸纤维素层析，疏水作用层析，亲和层析，羟磷灰石层析和植物凝集素层析。如果需要可以使用蛋白折叠步骤，以完成成熟蛋白的构型。最后，也可以使用高效液相(HPLC)来进行最后的纯化步骤。



本发明的酶可能是一个天然纯化的产物，或一个化学合成的产物，或通过重组技术从原核细胞或真核细胞宿主(如培养的细菌，酵母，高等植物，昆虫和哺乳动物细胞)产生的。在重组生产方法依靠使用的宿主，本发明的酶可能被糖基化或非糖基化。发明的酶可能不包括一个起始的蛋氨酸残基。

在一个优选的实施方案中，本发明的酶是一个肌醇六磷酸酶，它是热稳定的，具有热抵抗性，可以催化肌醇六磷酸盐的酶性水解，即该酶能够复性，并在一个简短(即 5 到 30 秒)或较长的时期，如几分钟或几小时，暴露于直至大约 50°C 或稍微超过 50°C 的温度后恢复活性。

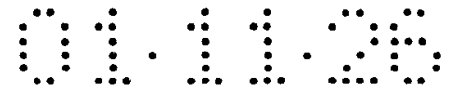
本发明进一步由在此包含的文献进行描述；但是，可以理解的是，本发明不限于这样的实例。所有的部分或数量，如果没有特殊说明，均由重量来表示。

在发明的一个方面，提供了一个产生一个肌醇六磷酸酶的方法，如在图 1 中所显示。该方法包括在允许核酸表达，和选择性分离编码核酸的酶的条件下使一个宿主细胞生长，该细胞包含一个编码酶(如 SEQ ID:1)的多核苷酸。培养宿主细胞的方法在实例中描述，并被本领域专业技术人员所熟知。

6.2.3-转基因植物和植物器官的使用：在一个特定的实施方案中，本发明提供了在转基因植物或植物器官中肌醇六磷酸酶的表达和产生它的方法。提供 DNA 构建物用来在调控序列的控制下用编码肌醇六磷酸酶的基因来转化植物，该调控序列能够引导肌醇六磷酸酶的表达。这些调控序列包括能够引导植物中的转录，以构成性或阶段性和/或组织特异的方式。

表达的方式部分依靠使用植物或其一部分。本发明提供的转基因植物和植物器官可用于许多工业的方法中，该方法可以直接，如用于动物的饲养，或可以选择的，表达的肌醇六磷酸酶可能被提取，如果需要，在应用前进行纯化。可以选择的是，重组的宿主植物或植物的一部分可以直接使用。在一个特定的方面，本发明提供了采用含有大量肌醇六磷酸酶的种子催化肌醇六磷酸盐水解反应的方法。方法涉及将转基因，非野生型种子的优选以一种基本形式或破碎的形式与含有肌醇六磷酸盐的底物接触，并允许酶包含在种子中以增加反应率。通过直接将种子加入到含有肌醇六磷酸盐的底物中，发明提供了一个提取和纯化酶的昂贵和有问题的方法的解决方法。在一个特殊—但不限于的实例中，本发明也提供了处理的方法，其中将酶以含有大量酶的种子的形式提供给缺乏足够酶供应的生物体。在一个优选的实施方案中，将酶给予生物体的时间选择与含有肌醇六磷酸盐粮食的消耗相适应。

肌醇六磷酸酶在植物中的表达可以通过许多的方法实现。具体地，如可以获得转化大量植物种属，包括双子叶属(如烟草，马铃薯，番茄，矮牵牛花，芸苔)的技术。可以选择的是，如在植物中表达外源基因的战略是可以获得的。仍然可以选择的是，已经鉴定的来自植物基因的调控序列对于嵌合基因的构建是有用的，该嵌合基因可以在植物和植物细胞中功能性的表达(如 Klee 等，1987；Clark 等，1990；



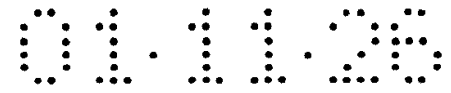
Smith 等, 1990)。

基因构建物导入植物可以采用几种技术来实现, 这些技术包括用膨胀土壤杆菌或土壤杆菌生根基因来转化。因此可以转化的非限制性的植物组织的实例包括原生物, 小孢子或花粉, 和如叶, 茎, 根, 下胚轴和胚轴的外植体。DNA 可以直接通过微注射, 电穿孔, 微粒轰击和直接 DNA 摄取的方法导入原生物和植物细胞或组织中。

蛋白可以在植物中通过多种表达系统产生。例如, 如花椰菜嵌合病毒的 35S 启动子(Guilley 等, 1982)的构成性启动子事实上在转基因植物的所有器官中浓集表达的蛋白中是有用的。可以选择的是, 高度组织特异性和/或时期特异性启动子的使用对于本发明是有用的(Higgins, 1984;Shotwell,1989), 其目的是使表达朝向所希望的组织或/或朝向所希望的进展期。进一步关于本发明的在植物中表达肌醇六磷酸酶分子的详细描述也进行了公开, 例如, 在 USPN 5,770,413(Van Ooijen 等)和 USPN 5,593,963(Van Ooijen 等), 虽然公开发表的可获取文献中的资料不能讲授本申请的发明的分子, 但却能讲授真菌肌醇六磷酸酶的使用。

总之, 与本发明有关的是, 许多方法可以用于实现在一个转基因植物或一部分植物中重组表达肌醇六磷酸酶。这样一个转基因植物和植物的一部分可以用作重组表达的肌醇六磷酸酶的来源, 它可以直接加入到含有肌醇六磷酸盐的来源物中。可以选择的是, 重组的植物表达的肌醇六磷酸酶可以从植物来源中提取出来, 如果需要, 在于肌醇六磷酸酶底物接触前进行纯化。

6.2.4-可用植物的实例: 在本发明的内容中, 可选择的植物包括, 但不限于产生, 可食用花朵如菜花(芸苔 oleracea), 朝鲜蓟(朝鲜蓟 scolymus)的作物, 如苹果(苹果属, 如 domesticus), 香蕉(Musa, 如 acuminata), 草莓(如黑醋栗, 虎耳草科醋栗属, 如 rubrum), 樱桃(如甜樱桃, 李属, 如 avium), 黄瓜(香瓜属, 如 sativus), 葡萄(vitis, 如 vinifera), 柠檬(柑橘柠檬), 甜瓜(melo 甜瓜), 坚果(如核桃, 胡桃属, 如 regia; 花生, 地花生), 橙(柑橘属, 如 maxima), 桃(李属如 persica), 梨(pyra, 如 communis), 李子(李属如 domestica), 草莓(fragaria, 如 moschata), 番茄(番茄属, 如 esculentum), 叶, 如苜蓿(苜蓿属, 如 sativa), 卷心菜(如芸苔属 oleracea), 菊苣(cichorium, 如 endivia), 韭葱(葱属, 如 porrum), 莴苣(莴苣属, 如 sativa), 菠菜(菠菜, 如 oleraceae), 烟草(烟草属, 如烟草), 根, 如竹笋(竹笋, 如 arundinacea), 甜菜(Beta, 如 vulgaris), 胡萝卜(daucus, 如 carota), 木薯(木薯属, 如 esculenta), 芜菁(芸苔属, 如 rapa), 萝卜(raphanus, 如 sativus), 薯蓣属(薯蓣属, 如 esculenta), 番薯(番薯属 batatas)和种子, 如豆类(菜豆属, 如 vulgaris), 豌豆(pisum, 如 sativum), 大豆(glycin, 如 max), 小麦(小麦属, 如 aestivum), 大麦(大麦属, 如 vulgare), 玉米(玉蜀黍属, 如 mays), 稻米(oryza, 如 sativa), 油菜籽(芸苔 napus), 栗(黍 L.), 向日葵(helianthus annus), 燕麦(avena sativa), 块茎, 如大头菜(芸苔, 如 oleraceae), 马铃薯(茄属, 如 tuberosum)和类似物。



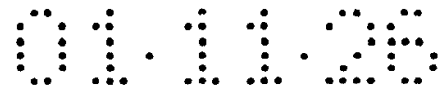
可以理解的是，其他植物和非植物表达系统可以在本发明的内容中使用。植物种属的选择是根据植物或其部分的使用目的来基本的确定，并以要转化的植物种属为根据。

6.2.5-植物转化的方法：几种技术可以用来将含有肌醇六磷酸酶编码的 DNA 序列的表达构建物导入目标植物中。这样的技术包括但不限于采用钙/聚乙二醇法，电穿孔和微注射或(包被的)微粒轰击(Potrykus,1990)进行的原生质转化。除了这些所谓的直接 DNA 转化方法,涉及载体的转化系统可以广泛的获得,如病毒载体(如,来自花椰菜嵌合病毒(CaMV))和细菌载体(如,来自土壤细菌属)(Potrykus,1990)。在选择和/或筛选后,被转化的原生质,细胞或植物的一部分可以在整个植物中再生,采用的方法在本领域是为人熟知的(Horsch 等, 1985)。转化和/或再生技术的选择对于本发明是不重要的。

6.2.6-双子叶植物的方法：对于双子叶植物,本发明的一个优选实施方案采用了双重载体系统的原理(Hoekema 等, 1983; EP 0120516 Schilperoort 等),其中使用了土壤杆菌菌株,该菌株含有一个具有毒性基因的病毒质粒和一个含有要转移基因构建物的相容质粒。这个载体可以在大肠杆菌和土壤杆菌中复制,来源于双重载体 Bin19(Bevan,1984),其细节可以改变,这与本发明无关。在本实例中使用的双重载体包含在 T-DNA 的左和右边界序列之间,一个编码卡那霉素抗性(Bevan,1984)的相同的 NPTII 基因和一个在所需基因构建物中克隆的多克隆位点。

6.2.7-单子叶植物的方法：单子叶植物作物的转化和再生不是一个标准的步骤。但是,最近的科学进展显示从原理上,单子叶植物是可以接受转化的,从转化的细胞可以再生出多产的转基因植物。对这些作物的再生产组织培养系统的建立和将基因物质导入植物细胞中的强有力的方法,将有助于转化。最近选择单子叶植物转化的方法是外植体或悬浮细胞的微型发射轰击作用,和直接 DNA 的摄取或原生质的电穿孔。例如,转基因大米植物已经可以采用细菌的 hph 基因获得,该基因编码一个作为选择性标记物的潮霉素抗性。基因通过电穿孔的方法导入(Shimamoto 等, 1993)。转基因玉米植物已经可以通过导入链霉素 hygrosopicus 棒状基因到通过微型发射轰击作用产生的玉米悬浮培养液的胚细胞(GordonKamm 等, 1990)中来获得,该基因编码 phosphinothricin 乙酰基转移酶(一个可以灭活除草剂 Phosphinothricin 的酶)。已经有报道将基因物质导入如小麦和大麦的其他单子叶作物的糊粉原生质中(Lee 等, 1989)。小麦植物已经从胚悬液培养物中再生,该培养物是仅从为形成胚悬液培养物所使用的老块和结节胼胝组织中选择的(Vasil 等, 1972; Vasil 等, 1974)。这些作物转化系统的结合使本发明可以应用于单子叶植物。这些方法也可以应用于双子叶植物的转化和再生。

6.2.8-在植物中表达的方法：肌醇六磷酸酶构建物的表达涉及一些细节,如通过植物聚合酶的基因转录, mRNA 的翻译等,这些对于重组 DNA 技术领域专业技术人员是熟知的。下面仅讨论本发明正确含义的相关细节。已知或发现导致肌



醇六磷酸酶表达的调控序列可能在本发明中使用。使用的调控序列的选择依赖于感兴趣的目的作物和/或目的器官。这些调控序列可能从植物或植物病毒中获得，或可能是化学合成的。这些调控序列是在引导植物转录中有活性的启动子，是构成性或时期性和/或组织特异性，这取决于使用植物或植物的一部分。这些启动子包括，但不限于显示构成性表达的启动子，如花椰菜嵌合病毒(CaMV)(Guilley 等, 1982)的 35S 启动子，叶特异性表达的启动子，如核酮糖二磷酸羧化酶小亚单位基因的启动子(Coruzzi 等, 1984)，种子特异表达的启动子，如来自芸苔 *napus*(Ryan 等, 1989)的 cruciferin A 启动子，结节特异表达的启动子，如来自马铃薯的 I 型 patatin 启动子(Koster-Topfer 等, 1989; Wenzler 等, 1989)或果实特异表达启动子，如来自番茄的多聚半乳糖醛酸酶(PG)的启动子(Bird 等, 1988)。

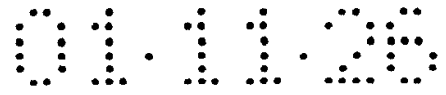
其他调控序列如终止序列和多聚腺苷酸化信号，包括任何在植物中发挥作用的此类序列，在其中的选择可以为专业人员所掌握。这样序列的一个实例是 *tumefaciens* 土壤杆菌的胭脂碱合酶(nos)基因 3'-侧向区域(Bevan, 见前)。调控序列可能也包括增强子序列，如在 CaMV 35S 启动子中发现的，和 mRNA 稳定序列，如苜蓿(AIMV)RNA4(Brederode 等, 1980)的引导序列或已相似的方式发挥功能的任何其他序列。

肌醇六磷酸酶应该在允许稳定表达蛋白的环境中进行表达。可以在本发明中使用细胞内区室如胞液，内质网，空胞，蛋白体或胞质周围空间来建立这样一个稳定的环境，依靠肌醇六磷酸酶的生物物理参数。这样的参数包括，但不限于最佳 pH，对蛋白水解酶的敏感性或对优选区室的克分子浓度的敏感性。

为在细胞胞浆中获得表达，已表达的酶不应含有一个分泌肽或其他任何目的序列。为在叶绿体和线粒体中表达，表达的酶应该含有特异的进入这些细胞器的所谓转运肽。可以与为实现这样目的感兴趣的酶结合的目的序列是已知的(Smeekens 等, 1990; Vanden Broeck 等, 1985; Wolter 等, 1988)。如果在空胞中需要该酶的活性，要存在一个分泌信号肽以及一个特异的的目的序列，该序列可以引导该酶导入这些空胞中(Tague 等, 1990)。对在种子中的蛋白体也是一样。编码感兴趣酶的 DNA 序列应该以下面的方式进行修饰，即该酶可以在细胞中需要的部位发挥作用。

为在细胞外表达肌醇六磷酸酶，本发明的表达构建物使用一个分泌信号序列。虽然优选使用与植物宿主种属同源(天然)的信号序列，异源性的信号序列，即那些来源于其他植物种属或微生物来源的序列也可以使用。这样的信号序列对本领域专业技术人员是熟知的。在本发明的内容中可能使用的合适的信号序列在 Blobel 等, 1979; Von Heijne, 1986; Garcia 等, 1987; Sijmons 等, 1990; Ng 等, 1994; 和 Powers 等, 1996 中公开。

本发明的相关 DNA 构建物的所有部分可能被修饰，如果需要，可以采用本领域专业技术人员熟知的方法影响其控制特性。可以指出，含有经本发明获得的肌



醇六磷酸酶的植物可以用于获得具有更高肌醇六磷酸酶水平的植物或植物器官。例如，可能通过使用 somoclonal 变异技术或杂交技术来获取这样的植物或植物器官。这样的技术对于本领域专业技术人员是熟知的。

6.2.9-新的肌醇六磷酸酶和其他分子的双重表达：在一个实施方案中，本发明提供了一种实现肌醇六磷酸酶和其他分子高效过量表达的方法(及其产物)。在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种在木霉属中实现肌醇六磷酸酶和 pH2.5 酸性磷酸酶的高效过量表达系统(及其产物)的方法。这个系统可以产生酶组合物，它在动物饲养工业中具有特殊的用途。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特殊的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 EP 0659215(WO 9403612 A1)(Nevalainen 等)，虽然公开发表的可获取文献中的资料不能讲授本申请中发明的分子。

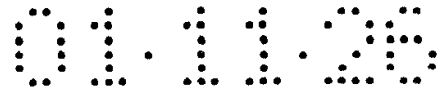
6.2.10-新的肌醇六磷酸酶及其稳定的液体配方的可溶性制剂：在一个实施方案中，本发明提供了一种产生具有肌醇六磷酸酶活性的稳定的水溶液制剂的方法，该制剂可增加酶活性对热灭活的抵抗力，并在延长储存期间保留其肌醇六磷酸酶活性。液体制剂的稳定是通过添加尿素和/或如山梨醇和甘油的多元醇作为稳定剂。也提供了单胃动物的饲料制剂和使用上述稳定的水溶液制剂来进行生产的方法。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 EP 0626010(WO 9316175 A1)(Barendse 等)，虽然公开发表的可获取文献中的资料不能讲授本申请中发明的分子。

6.3-新的肌醇六磷酸酶的使用

6.3.1-肌醇六磷酸盐的一般应用，水解和肌醇的产生：在一个实施方案中，本发明提供了一种水解肌醇六磷酸盐的方法，该法包括将肌醇六磷酸盐与一个或多个在此公开的新的肌醇六磷酸酶分子接触。相应地，本发明提供了一种催化肌醇六磷酸盐水解为肌醇和磷酸盐，从植酸复合体中释放无机离子的方法。该方法包括将一个肌醇六磷酸盐底物和有效降解量的本发明的酶接触，该酶如在 SEQ ID NO:2 中显示的酶。术语“有效降解”的量是指与未与酶接触的肌醇六磷酸盐相比，降解至少 50%肌醇六磷酸盐，优选至少降解 80%的肌醇六磷酸盐所需酶的量。

在另一个实施方案中，本发明提供了在肌醇六磷酸盐中水解磷酸单酯键的方法。该方法包括施用有效量的本发明的肌醇六磷酸酶分子（例如 SEQ ID NO:2）以产生肌醇和游离磷酸盐。“有效”量是指与未与酶接触的肌醇六磷酸盐相比，水解至少 50%的磷酸单酯键，优选水解至少 80%的键所需酶的量。

在一个特定的方面，当需要时，为了在肌醇六磷酸盐分子和/或其他底物来源的分子中产生化学性改变(如水解)，肌醇六磷酸酶分子可以用来与其他试剂结合，如其它催化剂。根据这一方面，优选肌醇六磷酸酶分子和添加的试剂不能互相抑制，更优选肌醇六磷酸酶分子和添加的试剂具有整体的加性效应，更优选肌醇六



磷酸酶和添加的试剂具有整体的协同效应。

底物肌醇六磷酸盐分子的相关来源包括食品，潜在的食品，食品的副产品(在体外和体内的副产品，如体内体外反应产物和动物排泄产物)，食品的前体和任何其他肌醇六磷酸盐的物质来源。

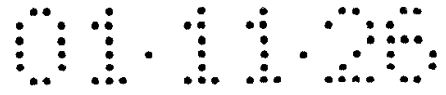
6.3.2-给予生物体：在一个非限制性的方面，重组的肌醇六磷酸酶可以通过生物体来消耗，并在消耗的过程保持活性。在另一个实例中，转基因的方法可以用来实现重组肌醇六磷酸酶的表达—优选以一个可控的方式进行(以时间特异性和组织特异性的方式控制转基因分子的表达的方法是可以获得的)。

在一个特定的实例中，在来源物质(一个转基因植物来源或重组原核生物宿主)中的肌醇六磷酸酶活性可能在消耗的过程中增加；这种活性的增加，例如可能发生在以蛋白原形式的前体肌醇六磷酸酶分子转变为更成熟形式的活性更加明显的蛋白的过程中，其中所述的转变可能，例如来自肌醇六磷酸酶来源的摄取和消化。肌醇六磷酸盐底物的水解可在肌醇六磷酸酶和肌醇六磷酸盐接触过程中的任何时候发生；例如，这可能发生在摄取(injection)前，或摄取后，或底物或酶，或两者的摄取之前和之后都摄取。另外要重视的是肌醇六磷酸盐底物可与—除了肌醇六磷酸酶以外—一个或多个添加的试剂，如另一个酶接触，这也可以直接或从其来源物质纯化后应用。

令人欣赏的是，一种肌醇六磷酸酶来源物质(多种)可以直接与一种肌醇六磷酸盐来源物质(多种)接触；如，一种肌醇六磷酸酶来源(多种)和一种肌醇六磷酸盐来源(多种)的其中一种或两者一起在体外或体内研磨或咀嚼时。可以选择的是肌醇六磷酸酶可以从一种来源物质(多种)中纯化，或肌醇六磷酸盐底物可以在肌醇六磷酸酶与肌醇六磷酸盐底物接触前从一种来源物质(多种)中纯化。要重视的是纯化和未纯化的试剂的结合—包括一种酶(多种)或一种底物(多种)或两者—都可以使用。

适合的是，超过一种来源物质可以用作肌醇六磷酸酶活性的来源。这在作为实现从一种来源物质(多种)中定时释放一种试剂(多种)的一种方法中是有用的，其中的释放是从各自的来源物质分别释放不同的试剂，例如，如同摄取(injected)来源物质在体内被消化或来源物质在体外应用时被处理一样。可以遇到这样的问题，超过一种肌醇六磷酸酶活性的来源物质的使用也可用来在一定条件和波动的范围内获得肌醇六磷酸酶活性，如 pH 值，温度，盐度和时间间隔范围—例如，在一种应用的不同处理步骤中。不同来源物质的使用也可用于获得不同的试剂，如通过肌醇六磷酸酶/或肌醇六磷酸盐和/或其他物质的一种或多种形式所实例的。

适合的是，一个单一的来源物质，如一个转基因植物种属(或植物的一部分)，可以是肌醇六磷酸酶和肌醇六磷酸盐的来源物质；该酶和底物可分别隔离在所述的单一来源之内的区室中—如，分泌相对非分泌的，分别表达和/或分别富含在不同植物部分或器官或组织，或同一植物部分或器官或组织中的亚细胞区室中。在此含有的肌醇六磷酸酶分子的纯化可能包括将一个或多个所需的植物部分或器官



或组织或亚细胞区室分离和/或进一步处理。

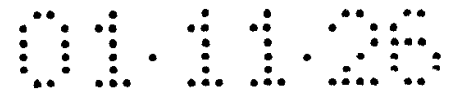
在一个特定的方面，本发明提供了一种采用含有大量酶的种子催化体内和/或体外反应的方法。这种方法包括将转基因，非野生型种子，优选以研磨的方式加入到一个反应混合物中，使酶在种子中增加反应率。通过直接将种子加入到反应混合物中，该法提供了一种对提取和纯化酶的更昂贵和烦琐方法的解决办法。也提供了处理的方法，其中缺乏足量酶供应的生物体中使用种子形式的酶，该种子来自一种或多种植物种属，优选含有大量酶的转基因植物种属。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特殊的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 USPN 5,543,576(Van Ooijen 等)和 USPN 5,714,474(Van Ooijen 等)，虽然公开发表的可获取文献中的资料不能讲授本申请中发明的分子并讲授真菌肌醇六磷酸酶的使用。

在一个非限制性的方面，本肌醇六磷酸酶分子可用于产生重组消化系统的生命形式(或微生物或植物)和将所述的重组消化系统的生命形式给予动物。施用可以任选单独进行或与其他酶和/或其他可以在一个消化系统中提供酶活性的生命形式联合给予，其中所述的其他酶和所述的生命形式可能是重组的或以其他方式。例如，施用可能是与 xylanolytic 细菌联合使用。

6.3.3-谷类的浸泡：在一个非限制性的方面，本发明提供了一个在含有二氧化硫的温水中浸泡谷物或高粱谷粒的方法，温水中存在含有一个或多个植酸钙镁降解酶的酶制剂，其量优选的量为将存在于谷物或高粱中的植酸钙镁基本被降解。酶制品可包括肌醇六磷酸酶和/或酸性磷酸酶和任选其他植物材料降解酶。浸泡的时间可以是 12 至 18 小时。浸泡通过中间的研磨步骤，减少浸泡时间来中止。在一个优选的实施方案中，谷物或高粱谷粒浸泡在含有二氧化硫的温水中来消除或大幅度减少植酸和肌醇六磷酸盐，温水中存在包括一个或多个如肌醇六磷酸酶和酸性磷酸酶的植酸钙镁降解酶的酶制剂。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特殊的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 USPN 4,914,029(Caransa 等)和 EP 0321004(Vaara 等)，但公开发表的可获取文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子。

6.3.4-发酵面团的制备：在一个非限制性的方面，本发明提供了一种获得具有所需物理特性如非粘性和有弹性的面包团和高质量如比容的面包产品的方法，该方法包括将肌醇六磷酸酶分子加入到面包团中。在一个优选的实施方案中，本发明的肌醇六磷酸酶分子加入到正在制作中的面包团制品中，随后成型和烘烤。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特殊的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 JP 03076529(Hara 等)，但公开发表的可获取文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子并且是讲授的真菌肌醇六磷酸酶的使用。

6.3.5-含大豆食品的生产：在一个非限制性的方面，本发明提供了产生改良的

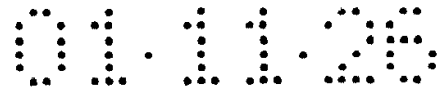


大豆食品的方法。大豆与本发明的肌醇六磷酸酶分子混合以去除大豆中的植酸，因此产生的大豆食品在提供消化生物体的重要微量营养物和蛋白的消化性方面有所改善。在一个优选的实施方案中，在豆奶的产生中，将本发明的肌醇六磷酸酶分子加入或开始与大豆接触以减少植酸含量。在一个非限制性的实例中，应用的方法可以通过将豆奶与酶在加热的条件下振动或通过在一个振动容器中采用固定酶进行混合型反应。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特殊的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 JP 59155049(Kamikubo 等)，但公开发表的可获取文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子。

6.3.6-液体食品包括米酒的生产：在一个方面，本发明提供了一种生产饮用水或液体形式动物饲养的混合产物的方法，该方法包括采用矿物质混合物和维生素混合物，也包括本发明的新的肌醇六磷酸酶分子。在一个优选的实施方案中，为消耗生物体形成必须营养物的正确的给予和组成的混合物，而没有任何重要矿物质/维生素的沉淀和破坏的危险，而同时最佳的应用是由在饲料中植酸结合的磷酸盐组成的。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特定的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 EP 0772978(Bendixen 等)，但公开发表的可获取文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子。

适合的是，本发明的肌醇六磷酸酶分子也可以用于产生其他酒精和非酒精的基于使用土壤和/或谷物和/或其他植物的可饮用的食品(或饮料)。这些可饮用的食品包括酒，葡萄酒，混合的酒精饮料(如冷酒器，其他酒精咖啡如爱尔兰咖啡等等)，啤酒，仿制啤酒，果汁，榨汁，匀浆和浓汤。在一个优选的实例中，这里公开的肌醇六磷酸酶分子可用于产生可用于产生这样可饮用食品的真菌和/或谷物和/或其他植物的转基因副本。在另一个优选的实例中。这里公开的肌醇六磷酸酶分子用作制造过程中和/或在这样可饮用的食品的最终容量中的其他成分。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。但是，由于本发明的新颖性—这些公开发表的文献没有讲授这里公开的发明的分子。

在另一个非限制性的实例中，本发明提供了一种获得植酸钙镁量较少和肌醇较多的精制米酒的方法。这样的米酒可—通过直接和/或心理效应—具有预防肝脏疾病，动脉硬化和其他疾病的作用。在一个优选的实施方案中，米酒是从日本大米青酒曲通过作为原料的增加具有高度肌醇六磷酸酶活性的大米日本青酒曲产生的。要重视的是本发明的肌醇六磷酸酶分子可能用于产生具有增强活性的有用的真菌(优选一个转基因真菌)和/或被外源性的加入以增加青酒曲真菌的效应。菌株加入到一种煮沸的大米中，青酒曲通过常规的步骤产生。在一个优选的实例中，使用制备的青酒曲，全部大米在两个时期进行制备，米酒在 15°C 的固定米酒温度下产生以得到目的精制米酒，其中植酸钙镁较少，肌醇量较多。关于这种方法的

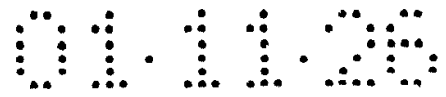


其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特殊的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 JP 06153896(Soga 等)和 JP 06070749(Soga 等)，但公开发表的可获取文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子。

6.3.7-矿物质吸收剂的生产：在一个非限制性的方面，本发明提供了获得能够促进矿物质吸收的吸收剂的方法，该方法包括以较低的代价摄取钙，而不被胃液或肠液消化。在一个优选的实施方案中，所述的矿物质吸收剂含有植酸的部分水解产物作为活性成分。优选地，植酸的部分水解产物是通过用本发明的新的肌醇六磷酸酶分子水解植酸或其盐产生的。用所述肌醇六磷酸酶进行的处理可单独发生和/或联合处理(抑制或增加最后的效应)，随后在一定范围内抑制水解作用而不释放所有的磷酸根。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特殊的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 JP 04270296(Hoshino)，但公开发表的可获取文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子。

6.3.8-与其他肌醇六磷酸酶和/或酸性磷酸酶联合使用：在一个非限制性的方面，本发明提供了一种产生具有添加剂或优选的协同肌醇六磷酸盐水解活性成分的酶组合物的方法；所述的组合物包括新的本发明的肌醇六磷酸酶分子和一种或多种添加的试剂，形成一种可联合使用的组合物。在一个优选的实施方案中，本发明的联合处理可以使用至少两种不同位置特异性的肌醇六磷酸酶来实现，即 1-,2-,3-,4-,5-和 6-肌醇六磷酸酶的任何组合。通过联合不同位置特异性的肌醇六磷酸酶，可以获得加性的或协同的效应。如食物和饲料的组合物或包括联合使用的肌醇六磷酸酶的食物和饲料添加剂也包括在本发明中作为制备的方法。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特定的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 WO 9830681(Ohmann 等)，但公开发表的可获取文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子。

在另一个优选的实施方案中，本发明的联合处理是用酸性磷酸酶来实现，该酶在 pH2.5 具有肌醇六磷酸盐水解活性，以较低的比例对应于 pH2.5:5.0 的活性资料，从大约 0.1:1.0 至 10:1，优选从大约 0.5:1.0 至 5:1，更优选从大约 0.8:1.0 至 3:1，更优选从大约 0.8:1 至 2:1。所述的酶组合物优选在热处理后显示更高的协同性肌醇六磷酸盐水解活性。所述的酶组合物可用于处理食品(可饮用的和固体食品，饲料和饲料产品)以提高肌醇六磷酸盐的水解。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特殊的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 USPN 5,554,99(Vanderbeke 等)和，USPN 5,443,979(Vanderbeke 等)，但公开发表的可获取文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子，只讲授真菌(特殊的曲霉菌)肌醇六磷酸酶的应用。



6.3.9-与作用于多糖(如木糖胶酶)的酶联合使用: 在一个非限制性的方面, 本发明提供了一种产生作用于多糖的组合物的方法(及其产物), 该组合物由本发明的新的肌醇六磷酸盐作用酶和一种或多种添加的酶组成。这些多糖选自阿聚糖, 果聚糖, 岩藻聚糖, 半乳聚糖, 聚半乳糖醛酸, 葡萄糖, 甘露聚糖, 木聚糖, 左聚糖, 墨角藻聚糖, 爱尔兰苔胶, 半乳卡洛糖, 果胶, 果胶酸, 支链淀粉, 出芽短梗霉聚糖, 动物淀粉, 支链淀粉, 纤维素, 羧甲基纤维素 羟丙基甲基纤维素, 葡聚糖, 石耳素, 壳多糖, 琼脂糖, 角质素, 软骨素, 皮肤素 (dermatan), 透明质酸, 褐藻酸和多糖, 含有至少一个赤藓糖, 蔗糖, 核糖, 阿拉伯糖, 木糖, 来苏糖, 阿洛糖, 阿卓糖, 葡萄糖, 甘露糖, 古洛糖, 艾杜糖, 半乳糖, 塔罗糖, 赤藓酮糖, 核酮糖, 木酮糖, 阿洛酮糖, 果糖, 山梨糖, 塔格糖, 葡萄糖醛酸, 葡萄糖酸, 葡萄糖二酸, 半乳糖醛酸, 甘露糖醛酸, 葡萄糖胺, 半乳糖胺和神经氨糖酸。

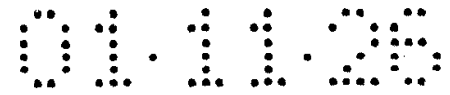
在一个特定的方面, 本发明提供了一种产生具有协同肌醇六磷酸盐水解活性的组合物, 该组合物包括一种或多种本发明的新的肌醇六磷酸酶分子, 一种纤维素酶(包括优选但不排除木聚糖酶), 选择性的使用一种蛋白酶和选择性的使用一种或多种添加的试剂。在优选的实施方案中, 这样的组合物可用于处理食品, 木材产品, 如纸产品和清洁液和固体。

在一个非限制性的实例中, 本发明的肌醇六磷酸酶分子可与多纤维素酶体成分联合使用。已知许多可分解纤维素的细菌酶分子可组成不连续的多酶复合体, 称为多纤维素酶体。多纤维素酶体的多个亚单位由大量的功能区组成, 它们可以互相作用, 可与纤维质底物作用。这些亚单位之一包括特色的新的一类非催化性支架多肽, 可以选择性的整合多种纤维素酶和木聚糖酶亚单位成为粘着复合体。多纤维素酶体杂合体和多纤维素酶体区的嵌合构建物的精心应用应该能够更好的使用纤维素的生物量, 并可能提供在研究, 医药和工业中广阔范围的新应用。

在另一个非限制性的实例中, 本发明的肌醇六磷酸酶分子可用于一单独或联合使用一生物制浆和生物漂白领域, 其中需要还原传统在制浆和造纸工业中使用的环境有害化学物质。废水的处理代表了另一个广阔的应用领域, 其中生物酶显示不仅可有效去除颜色, 而且可有效地将潜在有害物质生物转化为有用的生物产品。

在另一个非限制性的实例中, 本发明的肌醇六磷酸酶分子可用于产生生命形式, 该形式可以在生物体的消化系统处理中提供至少一种酶活性一单独或联合应用。特定的相关的待处理的生物体包括非反刍生物体。具体地, 要重视的是这种方法可以单独进行或与其他生物分子(例如木聚糖酶)联合应用以产生一个表达多数生物分子的重组宿主。也要重视的是, 本发明的肌醇六磷酸酶分子和/或表达本发明肌醇六磷酸酶分子的重组宿主的施用可单独或与其他生物分子, 和/或可以在消化系统中提供酶活性的生命形式联合施用, 其中所述的其它的酶和所述的生命形式可以是重组或其他方式的。例如, 可以与分解木聚糖的细菌联合施用。

例如, 除了肌醇六磷酸盐以外, 许多生物体也不能完全消化半纤维素。半纤维

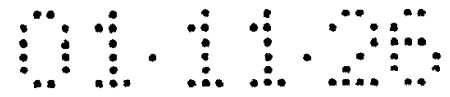


素或木聚糖是植物中的主要成分(35%)。对于反刍动物，大约 50%的饮食中的木聚糖被降解，但在非反刍动物和人的下消化道中仅有小量的木聚糖被降解。在瘤胃中，主要的木聚糖分解菌属是溶纤维丁酸弧菌和栖瘤胃拟杆菌。在人的直肠中，卵圆形的拟杆菌和脆弱拟杆菌亚种“a”是主要的木聚糖分解细菌。木聚糖是化学复合体，它们的降解需要多种酶。溶纤维丁酸弧菌可制造细胞外木聚糖酶，而拟杆菌属具有细胞结合的木聚糖酶活性。来自消化道细菌的木聚糖分解酶的生物化学特性还没有完全完成。木糖苷酶基因已经从溶纤维丁酸弧菌 113 中克隆。采用从溶纤维丁酸弧菌 49 克隆的木聚糖酶基因进行 DNA 杂交得到的数据表明这个基因存在其他溶纤维丁酸弧菌菌株中。一个从栖瘤胃拟杆菌中克隆的木聚糖酶转移到并高度表达于脆弱拟杆菌和 uniformis 拟杆菌中。来自卵圆形的拟杆菌的阿拉伯糖苷酶和木糖苷酶基因已经被克隆，两种活性似乎都是通过单一的双重功能的新的酶来催化的。

相应地，适合的是，本发明的肌醇六磷酸酶分子可用于 1)转移进合适的宿主中(如脆弱拟杆菌或 uniformis 拟杆菌)；2)在得到的重组宿主中获得适当的表达；和 3)将所述的重组宿主施用于生物体中以提高所处理的生物体降解肌醇六磷酸盐的能力。在基因和生物化学领域的进一步研究将为在肠道水平控制消化提供知识和深入洞察，并提高对结肠纤维素消化的认识。

关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员已知的。在一个特定的非限制性的实例中，这些公开发表的文献包括 USPN 5,624,678(Bedford 等), USPN 5,683,911(Bodie 等), USPN 5,720,971(Beauchemin 等), USPN 5,759,840(Dunh 等), USPN 5,770,012(Cooper), USPN 5,786,316(Baeck 等), USPN 5,817,500(Hansen 等) 和 期刊 文章 (Jeffries,1996; Prade, 1996;Bayer 等,1994;Duarte 等,1994;Hespell 和 Whitehead, 1990;Wong 等, 1998), 但这些文献没有讲授本申请中发明的分子，也没有讲授所有在生产食品，木材产品如纸产品和清洁液和固体中肌醇六磷酸酶分子的添加。相反，本发明讲授了肌醇六磷酸酶分子—优选本发明的肌醇六磷酸酶分子可以被加入到公开的一种试剂(多种)中，以获得具有加性肌醇六磷酸酶活性的制品。优选地，所述的一种试剂(多种)和加入的肌醇六磷酸酶分子不会互相抑制，更优选地，所述的一种试剂(多种)和加入的肌醇六磷酸酶分子将具有整体上的加性效应，更优选地，所述的一种试剂(多种)和加入的肌醇六磷酸酶分子将具有整体上的协同效应。

6.3.10-与维生素 D 联合使用：在一个非限制性的方面，本发明提供了一种增强植酸磷的使用和治疗和防止动物，特别是家禽胫骨软骨发育不良的方法(及其产品)，其实现方法是通过给予动物一种含有羟化维生素 D₃ 衍生物的饲料组合物。维生素 D₃ 衍生物优选在饲料中给予动物，为了增强植酸磷的使用，该饲料含有较低的钙和磷水平。相应地，维生素 D₃ 衍生物优选与本发明的新的肌醇六磷酸酶分子联合使用以进一步增强植酸磷的使用。关于这种方法的其他细节可在公开发表的



文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特定的非限制性的实例中，这些公开发表的文献包括 USPN 5,516,525(Edwards 等), 和 USPN 5,366,736(Edwards 等), USPN 5,316,770(Edwards 等), 但公开发表的可获取文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子。

6.3.11-与产乳酸细菌联合使用: 在一个非限制性的方面, 本发明提供了一种获得食品的方法(及其产品): 1)包括可以在生物体内以肌醇形式很容易吸收和应用的植酸钙镁; 2)能够以排泄的方式减少磷; 和 3)相应地可用于改善环境的污染。所述的食物由含有植酸钙镁的谷物, 产乳酸微生物和本发明的新的肌醇六磷酸酶分子的混合物组成。在一个优选的实施方案中, 所述的食物通过将一种含有植酸钙镁的谷物(优选, 如米糠)和一种有效微生物群, 该微生物具有嗜酸性的特性, 可产生乳酸, 而不产生丁酸, 没有致病性, 以及一种肌醇六磷酸酶混合产生。有效的微生物组的实例包括, 如属于放线菌群的链霉菌属(ATCC 3004)和属于乳酸菌群的乳酸杆菌属(IFO 3073)。进一步, 添加有效微生物群的优选的添加量基于谷物原料就细菌重量而言为 0.2wt.%. 关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特定的非限制性的实例中, 这些公开发表的文献包括 JP 08205785(Akahori 等), 但公开发表的可获取文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子。

6.3.12-与蛋白酶一起溶解蛋白: 在一个非限制性的方面, 本发明提供了一种改善蔬菜蛋白溶解度的方法。更具体地, 发明涉及在蔬菜蛋白来源中溶解蛋白的方法, 该法包括用有效量的一种或多种肌醇六磷酸酶—包括本发明的肌醇六磷酸酶分子—来处理蔬菜蛋白来源, 和用有效量的一种或多种蛋白水解酶来处理蔬菜蛋白来源。在另一个方面, 发明提供了动物饲料添加剂, 它包括一种肌醇六磷酸酶和一种或多种蛋白水解酶。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特定的非限制性的实例中, 这些公开发表的文献包括 EP 0756457(WO9528850 A1)(Nielsen 和 Knap), 但公开发表的文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子。

在一个非限制性的方面, 本发明提供了一种产生一种植物蛋白制品的方法, 该法包括将蔬菜蛋白来源物质分散在 pH 范围在 2 至 6 的水中, 并混合本发明的肌醇六磷酸酶分子。含有可溶性蛋白的酸性提取物被分离, 并进行干燥产生所需特性的固体蛋白。一种或多种蛋白酶也可以用来改善蛋白的特性。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特殊的非限制性实例中, 这些公开发表的文献包括 USPN 3,966,971(Morehouse 等), 但公开发表的文献中的资料没有讲授本申请中发明的分子。

6.3.13-采用新的肌醇六磷酸酶, 皂甙和壳聚糖三重处理混合肥料: 在一个非限制性的方面, 本发明提供了一种方法(及其产品), 以激活土壤和/或混合肥料中惰性磷, 提高氮化合物的利用率, 并通过在混合肥料中加入三种试剂, 肌醇六磷酸

酶，皂甙和壳聚糖来抑制致病霉菌的繁殖。在一个非限制性的实施方案中，该法包括的处理混合肥料的方法有：1)在媒质中加入含肌醇六磷酸酶的微生物—优选过度表达本发明的新的肌醇六磷酸酶分子的重组宿主—如以 100ml 媒质/100kg 湿重混合肥料；2)也可以选择性的加入一个含有肌醇六磷酸酶的植物来源—如麦麸—如以 0.2 至 1kg/100kg 湿重混合肥料；3)加入一种皂甙来源—如泥煤，艾蒿和丝兰植物—如以 0.5 至 3.0kg；4)加入含有壳聚糖的物质—如虾，螃蟹等的壳粉—如以 100 至 300g/kg 湿重混合肥料。在另一个非限制性的实施方案中，使用重组来源和三个试剂，肌醇六磷酸酶，皂甙和壳聚糖。关于这种方法的其他细节可在公开发表的文献中获得和/或是专业技术人员所了解的。在一个特殊的非限制性的实例中，这些公开发表的可获取文献包括 JP07277865(Toya Taisuke)，但公开发表的可获取文献中的参考资料没有讲授本申请中发明的分子。

6.3.14-用作杂交探针和扩增模板：本发明全长基因的片断可被用作一个 cDNA 或一个基因组文库的杂交探针用来分离全长 DNA，和分离其他与基因序列高度相似的或相似生物学活性的 DNAs。这种类型的探针具有至少 10，优选至少 15，更优选至少 30 个碱基，可以含有，例如至少 50 个或更多的碱基。该探针也可被用来鉴定对应于全长转录物的一个 DNA 克隆，和含有完全基因的一个基因组克隆或多个克隆，完全基因包括调控和启动子区，外显子和内含子。

本发明提供了鉴定核酸分子的方法，该分子编码除 SEQ ID NO:1 外的肌醇六磷酸酶多肽家族成员。在这些方法中，一个样品，如一个核酸文库，如 cDNA 文库，含有一个编码肌醇六磷酸酶多肽的核酸，用一个肌醇六磷酸酶特异探针来筛选，如一个肌醇六磷酸酶特异的核酸探针。肌醇六磷酸酶特异的核酸探针是可特异与编码肌醇六磷酸酶多肽或其互补序列杂交的核酸分子(如含有 DNA 或 RNA 核苷酸的分子，或组合物或其修饰物)。发明的本方法内容中的术语“肌醇六磷酸酶特异探针”，是指与编码肌醇六磷酸酶多肽的核酸或其互补序列结合，其可检测程度超过与编码其他酶的核酸或其互补序列的结合。

本发明加速了肌醇六磷酸酶特异的核酸探针产生。获得这样探针的方法可以基于图 1 中显示的氨基酸序列来设计。含有至少 12，如至少 15，25，35，50，100 或 150 个核苷酸的探针，可以采用几种标准方法中的任何一种(见，如 Ausubel 等，*见上*)来生产。例如，优选地，探针可以采用 PCR 扩增的方法来产生。在这些方法中，引物的设计对应于肌醇六磷酸酶的保守序列(见图 1)，可以包括肌醇六磷酸酶特异氨基酸，且得到的 PCR 产物被用作探针来筛选一个核酸文库，如一个 cDNA 文库。

本发明可用于分离基本类似于编码如图 1(SEQ ID NO:1)所示的肌醇六磷酸酶的分 离核酸分子的核酸序列。分离的核酸序列基本上是相似的，如果：(i)它们能够在严格的条件下与 SEQ ID NO:1 杂交，此后进行描述；或(ii)由于基因编码的退化(如退化为 SEQ ID NO:1)，它们编码一个如 SEQ ID NO:2 中所显示的肌醇六磷酸

酶多肽。

退化的 DNA 序列编码 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列，但在核苷酸编码序列中有一些变异。如此所使用的，“基本相似”是指与本发明的序列具有相似特性的序列。基本相似的核苷酸序列可以通过杂交或序列对比来鉴定。基本相似的酶序列可以通过下列方法的一种或多种来鉴定：蛋白水解消化，凝胶电泳分析和/或微序列分析。

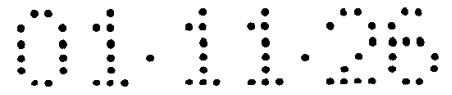
一种分离编码肌醇六磷酸酶核酸分子的方法是以天然和人工设计的探针采用本领域认可的程序(见，如 Ausubel 等，见上) 探测一个基因组基因文库。对于本领域的技术人员要重视的是，SEQ ID NO:1 或其片断(包括至少 15 个连续的核苷酸)是一个特别有用的探针。其他用于此目的的特别有用的探针是 SEQ ID NO:1 序列的杂交片断(即包括至少 15 个连续的核苷酸)。

这些探针可以被、并优选地用一种分析检测试剂进行标记，以促进探针的识别。有用的试剂包括但不限于放射活性，荧光染料或能够催化形成可检测产物的酶。这个探针因此可被用以从其他动物来源中分离 DNA 互补拷贝，或筛选这种来源的相关序列。

关于可与在此公开的特异核酸序列杂交的核酸序列，杂交可以在简化的严格条件，中等严格条件或十分严格条件下进行。作为寡核苷酸杂交的实例，一种含有固定变性核苷酸的聚合膜首先在一种溶液中预杂交 30 分钟，该溶液包括 0.9M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 5.0mM Na₂EDTA, 0.5%SDS, 10X Denhardt's 和 0.5mg/mL 聚核糖腺苷酸。然后将大约 2X10⁷cpm(特异活性 4-9 X10⁸cpm/ug)的 ³²P 末端标记的寡核苷酸探针加入到溶液。在孵育 12—16 小时后，室温下在含有 0.5%SDS 的 1XSET(150mM NaCl,20mM Tris-HCl, pH 7.8, 1mM Na₂EDTA)中洗膜 30 分钟，然后在新鲜的 1 X SET 中在 T_m-10°C 下清洗寡核苷酸探针 30 分钟。然后膜暴露于放射自显影胶片上以检测杂交信号。

发明的核酸分子可在产生肌醇六磷酸酶基因产物(如肌醇六磷酸酶 RNAs 和肌醇六磷酸酶多肽)的标准方法中被用作模板。另外，编码肌醇六磷酸酶多肽(及其片断)的核酸分子和相关的核酸—如(1)含有与编码肌醇六磷酸酶多肽或其片断(如含有至少 12, 15, 20 或 25 个核苷酸的片断)互补，或杂交的序列的核酸；和(2)含有与编码肌醇六磷酸酶多肽的核酸，或其片断(如含有至少 12, 15, 20 或 25 个核苷酸的片断)互补序列杂交的核酸—可用于方法。例如，如在此所进一步详细描述，这样的核酸分子可用在下列的方法中：合成肌醇六磷酸酶核酸的 PCR 方法，在一个样品中检测一个肌醇六磷酸酶核酸存在的方法，鉴定编码新的肌醇六磷酸酶家族成员的核酸的筛选方法。杂交作用为基础的应用包括南方 (Southern) 型，北方 (Northern) 型，RNA 保护和任何将核酸作为杂交合作者的杂交步骤。

本发明的多核苷酸的片断或部分可被用于合成本发明的全长多核苷酸。相应地，本发明酶的片断或部分可被用于通过肽合成来产生全长的酶；因此，片断可



以用作产生全长酶的中间体。断裂片断的大小分离一般采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶进行，如文献(如 Goeddel 等，1980)中所描述的。

6.3.15-在定向进化中的使用：本发明提供了酶及其片断，其他衍生物和类似物，和用于定向进化的相应核苷酸。如在此公开的多数模板的使用和发现与单一模板蛋白的定向进化相比，可能明显增加了定向进化的潜在产量。因此，发现的需求是基于这样的前提，大自然提供了一笔财富，即在截然不同但相关的分子分组的成员中具有潜在的难以获得的或不可预测的特性，这些特性的开发可能极大的促进定向进化。因此，在一个方面，相关但截然不同的分子可能作为一个所需特性的定向进化的唯一起始模板。在另一个方面，它们可能作为结构-功能资料的储存库，这些信息包括但不限于，多种一致的基序。两种作用都有助于排除逻辑上不切实际的任务，这些任务致力于立即开发任何给定分子过宽范围的突变变换。例如，在 100 个氨基酸蛋白上的全范围突变变换，包括超过 10^{130} 个可能性(假设每个位点有 20 个氨基酸可能性)，从实用性上考虑这个数字太大了。

相应地，特别是因为逻辑上和技术上的限制，在进行“定向进化”时需要一种方法以发现和利用多数具有进化前差异的相关起始模板。这些模板然后进行多种诱变处理，包括，通过非限制性实例的方法，DNA 突变发生和组合酶形成，一种在共同待批的 USPN 5,830,696 (Short 等)中进一步详述的方法。

产生的新分子的酶活性然后用多种方法筛选，包括通过非限制性实例的方法：
a) 分子生物包被； b) 重组克隆筛选； 和 c) 提取筛选。

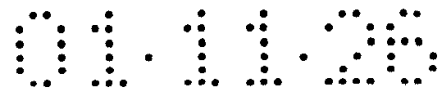
6.3.16-在抗体生产中使用：本发明提供了酶，及其片断、其他衍生物和类似物，和表达它们的细胞，它们可以作为免疫原以产生其抗体。这些抗体可以是，例如，多克隆或单克隆抗体。本发明也包括了嵌合的，单链和人源化抗体，以及 Fab 片断，或一个 Fab 表达文库的产物。在本领域已知的各种步骤可被用于这样的抗体和片断的产生。

对应于本发明序列的酶产生的抗体可以通过将酶直接注射给一种动物或将酶给予一种动物来获得，优选非人动物。然后这样获得的抗体将与酶本身结合。以这种方式，即使仅编码酶的一个片断的序列也可被用于产生与整个天然酶结合的抗体。这种的抗体然后可用于从表达该酶的细胞中分离酶。

为了制备单克隆抗体，可以使用任何通过连续细胞系培养提供抗体产物的技术。实例包括可以产生人单克隆抗体的杂交瘤技术(Kohler 和 Milstein, 1975)，三瘤 (trioma) 技术，人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor 等，1983)和 EBV 杂交瘤技术(Cole 等，1985，77-96 页)。

描述的产生单链抗体的技术 (USPN 4,946,778 Ladner 等) 可以用来产生本发明的免疫原性酶产物的单链抗体。而且，转基因鼠也可被用来表达本发明的免疫原性酶产物的人源化抗体。

产生的抗本发明酶的抗体可被用于从其他生物体和样品中筛选相似的酶。这种



筛选技术是本领域所熟知的。抗体也可被用作探针来筛选从这个或其他生物体中产生的基因文库，以便鉴别这个或交叉的反应活性。

在上述系统中产生的多肽的分离和纯化可以采用适合特殊系统的常规方法进行。例如，可以使用用于抗体，如单克隆或多克隆抗体，的制备性层析和免疫学分离。

如上所述，可以用于产生肌醇六磷酸酶特异抗体的抗原包括肌醇六磷酸酶多肽，如任何在图 1 多肽片断中显示的肌醇六磷酸酶。用于免疫动物的多肽或肽可用标准的重组，化学合成，或纯化方法来获得。如在本领域中所熟知的，为了增加免疫原性，抗原可以与一种载体蛋白结合。通常使用的载体包括钥孔血兰素 (KLH)，甲状球蛋白，牛血清白蛋白(BSA)，和破伤风类毒素。然后偶联的肽用来免疫动物(如，小鼠，大鼠或兔)。除了这样的载体，已知的佐剂可以与抗原一起使用来加速强免疫反应的诱导。

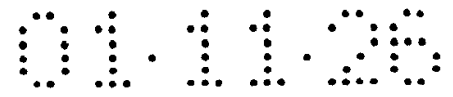
肌醇六磷酸酶特异的多克隆和单克隆抗体可以被纯化，例如通过与含有肌醇六磷酸酶多肽，如产生抗体的肌醇六磷酸酶多肽(或其片断)，的基质结合，并从中洗脱。其他抗体纯化和浓缩的方法是本领域所熟知的，可以用本发明的肌醇六磷酸酶特异抗体进行(见，如 Coligan 等，1996)。

对应于肌醇六磷酸酶特异性抗原的抗遗传型抗体也包括在本发明中，并可以采用标准的方法来产生。这些抗体是肌醇六磷酸酶特异性抗体，因此可以模仿肌醇六磷酸酶特异的抗原决定簇。本发明也包括肌醇六磷酸酶多肽片断的其他应用，该多肽保留了至少一个肌醇六磷酸酶特异活性或抗原决定簇。肌醇六磷酸酶活性可以通过检测肌醇六磷酸酶对肌醇和游离磷酸的催化来进行检测。这样的片断可容易地通过比较图 1 中发现的肌醇六磷酸酶序列来鉴定。

在一个非限制性实例中，一个包含如至少 8—10 个氨基酸的肌醇六磷酸酶多肽片断可以用作免疫原来产生肌醇六磷酸酶特异的抗体。片断可以包含，例如，一个肌醇六磷酸酶保守的氨基酸序列，这个氨基酸序列可以包含肌醇六磷酸酶保守的氨基酸。在另一个非限制性的实例中，上述的肌醇六磷酸酶片断可被用于免疫测定，如 ELISAs，来检测样品中肌醇六磷酸酶特异抗体的存在。

6.3.17-在转基因中使用：

可以使用多种制备本发明的转基因动物的方法。一般来说，可以采用三种这样的方法。在一种这样的方法中，一个处于单倍体核期(一个“单细胞胚胎”)的胚胎从雌性中获得，转基因被微注射到胚胎中，此时转基因将在染色体上整合到所得到的成熟动物的胚细胞和体细胞中。在另一种这样的方法中，分离胚胎干细胞，在其中通过电穿孔，质粒转染或微注射合并转基因，然后将干细胞再导入胚胎中，在其中定植，形成种系。哺乳动物种属微注射的方法在美国专利第 4,873,191 中描述。在另一种这样的方法中，胚胎细胞可以用含有转基因的逆转录病毒来感染，其中胚胎的胚细胞具有在染色体上整合的转基因。当制备转基因的动物是鸟禽类



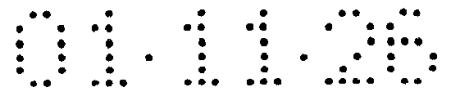
时，因为鸟禽类受精卵一般在输卵管的第一个 24 小时进行细胞分裂，由于单倍体核不能进入，微注射入受精卵的单倍体核中是有问题的。因此，在总体上述的制备转基因动物的方法中，逆转录病毒感染优选对于鸟禽类种属，例如在美国专利第 5,162,215 中所述的。但是，如果微注射用于鸟禽类种属，可以使用 Love 等 (Biotechnology, 1994 年 1 月 12 日)公开发表的步骤，其中胚胎在前一次产卵 2.5 小时后从处死的雌性鸟禽类中获得，转基因微注射入胚盘的细胞质中，胚胎培养在宿主的壳中直至成熟。当制备转基因的动物是牛或猪时，微注射可以用卵的不透明来中止，这样使核很难通过常规的相差显微镜来鉴定。为了克服这样的问题，可以首先离心卵来分隔单倍体核以便更好的观察。

发明中“非人动物”指牛，猪，羊和鸟禽类动物(如母牛，猪，绵羊，鸡)。本发明的“转基因非人动物”是通过将“转基因”导入非人动物种系中产生的。在不同发育期的胚胎靶细胞可以用于产生靶基因。依靠胚胎靶细胞的发育期来使用不同的方法。受精卵是微注射的最好靶目标。将受精卵用作基因转移靶目标的主要优点是在大多数情况下，注射的 DNA 将在首次分裂前整合到宿主基因中 (Brinster 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:4438-4442, 1985)。其结果，转基因非人动物的所有细胞将带有合并的转基因。一般来说，这也将转基因有效传递到首建者后代中反映，因为 50%的受精卵将藏有转基因。

术语“转基因”用来描述一种在其所有细胞内包括外源基因物质的动物。一种“转基因”可以通过交叉配种两种嵌合体动物来产生，该动物在复制中使用的细胞中包括外源基因物质。得到的后代的 25%将是转基因的，即在其所有细胞的两个等位基因中均包括外源性基因物质，得到动物的 50%将在其一个等位基因中包括外源性基因物质，25%将不包括外源基因物质。

在本发明的实践中有用的微注射方法中，转基因不要任何载体 DNA 而被消化和纯化，如通过凝胶电泳。优选的是，转基因包括一个运转相关启动子，后者与参与转录的细胞蛋白相互作用，最后导致结构性表达。在这一方面中使用的启动子包括来自细胞巨化病毒(CMV)，莫洛尼白血病病毒(MLV)和疱疹病毒，以及那些来自编码金属硫蛋白，骨架肌动蛋白，P-烯醇丙酮酸羧化酶(PEPCK)，磷酸甘油酸盐(PGK)，DHFR 和胸苷激酶的启动子。也可以使用病毒长末端重复区(LTRs)的启动子，如罗斯肉瘤病毒。当制备转基因的动物是鸟禽类时，优选的启动子包括鸡 β -球蛋白基因，鸡溶菌酶基因和禽类白细胞增生病毒。在胚胎干细胞的质粒转染中有用的构建物将采用本领域中已知的其他调控元件，如刺激转录的增强子元件，剪接受体，终止和聚腺苷酸化信号，和允许翻译的核糖体结合位点。

逆转录病毒感染也可如上所述用于将转基因导入到一个非人动物中。发育中的非人胚胎可以在体外培养到胚泡期。在此时间内，分裂球可以是逆转录感染的目标(Jaenich, R., Proc.Natl. Acad.Sci. USA 73:1260-1264, 1976)。分裂球的有效感染可以通过酶性处理去除透明带来获得(Hogan 等(1986)在处理鼠胚, Cold Spring Harbor



Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。用来导入转基因的病毒载体系统典型地是载有转基因的复制缺陷逆转录病毒(Jahner 等, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82:6927-6931, 1985; Van der Putten 等, Proc. Natl.Acad.Sci USA 82:6148-6152,1985)。转染可以通过在产生病毒的细胞单层上培养分裂球来很容易和有效地获得。(Van der Putten, 见上; Stewart 等, EMBO J. 6:383-388,1987)。可以选择地, 感染可以在后面的时期进行。病毒或产生病毒的细胞可以被注射到囊胚腔中(D.Jahner 等, Nature 298:623-628,1982)。大多数先建立的是转基因的嵌合体, 因为整合仅发生在形成转基因非人动物的一个细胞亚群中。进一步, 首建者可能含有各种在基因组不同位置的转基因逆转录病毒插入体, 一般将在后代中分开。另外, 也可能将转基因通过对发育中的胚胎进行子宫内感染导入种系中, 虽然有效性较低(D.Jahner 等, 见前)。

转基因导入的第三种类型靶细胞是胚胎干细胞(ES)。ES 细胞可以从体外培养的预先植入的胚胎中获得, 并与胚胎融合(M.J.Evans 等, Nature 292:154-156,1981;M.O.Bradley 等, Nature 309:255-258,1984;Gossler 等, Proc.Natl.Acad.Sci USA 83:9065-9069,1986; 和 Robertson 等, Nature 322:445-448,1986)。转基因可以通过 DNA 转染或逆转录病毒介导的转导被有效地导入 ES 细胞中。这种转化的 ES 细胞此后与来自非人动物的胚泡结合。然后 ES 定植胚胎, 并形成所得嵌合体动物的种系。(综述见 Jaenisch,R.,Science 240:1468-1474,1988)。

“转化”指一种通过重组核酸技术的方法, 被导入了(或进入其前体细胞)异源核酸分子的细胞。“异源”是指一个核酸序列, 来源于其他物种或在其来源形式或细胞中原本表达形式上被修饰。

“转基因”指通过技巧插入到一个细胞中的 DNA 任何部分, 并成为生物体基因组的一部分(即稳定的整合或作为稳定的染色体外成分), 该机体是从该细胞发育而来的。这样一个转基因可能包括一个与转基因生物体部分或全部异源(即外来的)的基因, 或可代表与生物体内源基因同源的一个基因。包括在这个定义中的是一个通过提供一个 RNA 序列建立的转基因, 该序列被转录进入 DNA, 然后插入到基因组中。本发明的转基因包括编码肌醇六磷酸酶或具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的 DNA 序列, 并包括可在转基因非人动物中表达的多核苷酸。这里所用的术语“转基因”另外包括任何基因组已经被改变的生物体, 通过体外处理早期胚胎或受精卵, 或通过任何转基因技术, 诱导特异基因敲除。在此所用的“基因敲除”是指在体内靶向地破坏基因, 并完全丧失功能, 它可以通过本领域熟悉的任何转基因技术来实现。在一个实施方案中, 具有基因敲除的转基因动物中, 靶基因已经通过同源性重组将一个插入部分靶向到该基因而成为非功能性。如此所使用的, 术语“转基因”包括任何本领域熟悉的转基因技术, 它可以产生一种生物体, 该生物体载有一个导入的转基因或其中一个内源基因已变为“非功能性”

或“敲除”。

在本发明的实践中使用的转基因是一个包括编码肌醇六磷酸酶或具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的 DNA 序列。在一个实施方案中，一个具有如 SEQ ID NO:1 中所示序列的多核苷酸或编码具有如 SEQ ID NO:2 中所示序列的多肽的序列是一个转基因，如在此所定义的术语一样。如果合适，编码具有肌醇六磷酸酶活性蛋白的 DNA 序列，但在核酸序列上与因基因组代码退化者不同，也可在此使用，以可能缩短的形式，等位基因突变体和种间同源物。

在胚胎被微注射，与转染的胚胎干细胞进行定植或被与含有转基因的一个逆转录病毒感染(除了在此其他部分阐述的本发明在禽类的实例)后，胚胎被植入一个假孕雌性的输卵管中。其后代妊娠通过 Southern 斑点杂交分析检测血或采用转基因特异探针检测组织样品。PCR 对这种目的的实施特别有用。阳性妊娠(G0)进行杂交产生后代(G1)，它可以通过组织样品的 Northern 斑点杂交来分析转基因的表达。

因此，本发明包括增加转基因动物磷摄取和/在转基因生物体中减少污染量大约 15%，典型的大约 20%，更典型的大约 20%至大约 50%的方法。

考虑在本发明的实践中使用的动物一般被认为是家养动物，包括宠物(如犬，猫，鸟禽类等)和那些用于食品加工的动物，即，鸟禽类如肉食和产蛋鸡和火鸡，羊如羔羊，牛如肉牛和奶牛，鱼和猪。对于本发明的目的，当这个动物具有异源 DNA 序列，或一个或多个其他的在染色体上整合到动物的胚细胞中的，正常为动物内源性的 DNA(在此全部是指“转基因”)的这些动物被称为“转基因”的。转基因动物(包括其后代)也将具有偶然整合到体细胞染色体上的转基因。

6.3.18-在基因传递中的使用：

在一些情况下，局部输送和表达本发明的肌醇六磷酸酶序列可能是有优势的(如，在一种特殊的组织或细胞类型中)。例如，在动物消化道中肌醇六磷酸酶或消化性酶的局部表达将分别有助于，例如，肌醇六磷酸酶和磷的消化和摄取。例如，核酸序列可能直接输送到唾液腺，组织和细胞中和/或消化道的上皮细胞层。这样的输送方法在本领域中是已知的，包括电穿孔，病毒载体和直接 DNA 摄取。任何具有肌醇六磷酸酶活性的多肽可以在本发明的方法中应用(如，那些在本节 6.3.18 中特别描述的，以及在发明中其他章节中所描述的)。

例如，本发明的一个核酸构建物将包括适合在一种宿主组织中摄入靶细胞形式的核酸分子。核酸分子可能以裸 DNA 或 RNA 分子的形式，其中分子可能包括一个或多个结构基因，一个或多个调控基因，反义链，能够形成三倍体的链，或类似物。一般，核酸构建物将包括至少一个在合适调控区的转录和翻译控制下的结构基因。更常见的是，本发明的核酸构建物将包括加入一个输送载体中以提高转染效率的核酸，其中的输送载体将分散于更大的颗粒中，该颗粒包括一种干燥的亲水赋形剂材料。

一种这样的输送载体由病毒载体组成，如逆转录病毒，腺病毒和腺相关病毒，

它们已经被灭活以防止自我复制，但保持了与靶宿主细胞结合的天然病毒能力，将基因物质输送到靶宿主细胞的细胞质中，并促进结构或已被掺入到颗粒中的其他基因的表达。介导基因转移的合适的逆转录病毒载体在 Kahn 等，(1992)CIRC.RES. 71:1508-1517 中描述，它的公开在此加入作为参考。一个合适的腺病毒基因传递在 Rosenfeld 等(1991)SCIENCE 252:431-434 中描述，它的公开在此加入作为参考。逆转录病毒和腺病毒传递系统在 Friedman(1989)SCIENCE 244:1275-1281 中均有描述，它的公开在此加入作为参考。

第二种核酸传递载体由脂质体转染囊泡组成，包括阴离子和阳离子脂质体构建物。阴离子脂质体的使用需要核酸包被在脂质体中。阳离子脂质体不需要核酸包被其中，而代之以通过核酸和脂质体的简单混合就可以形成。阳离子脂质体热烈地结合到阴性电荷的核酸分子，包括 DNA 和 RNA，产生复合体，在许多细胞类型中产生适当的转染效率。见，Farhood 等(1992)BIOCHEM. BIOPHYS.ACTA. 1111:239-246，它的公开在此加入作为参考。形成脂质体囊泡的一种特别优选的材料是 lipofectin，它由二油酸磷脂酰乙醇胺(DOPE)和二油酸羟丙基-N-三乙氨基乙醇(DOTMA)组成，如在 Felgner 和 Ringold(1989) NATURE 337:387-388 中所述，它的公开在此引入作为参考。

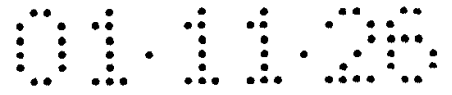
也可能将这两种传递系统联合。例如，Kahn 等(1992)，见上，讲授了一种逆转录病毒载体可与一种阳离子 DEAE-葡聚糖囊泡结合以进一步增强转化效率。也可能将核蛋白并入病毒和/或脂质体传递囊泡中，以进一步改善转染效率。见，Kaneda 等(1989)SCIENCE 243:375-378，它的公开在此引入作为参考。

6.3.19-在饮食辅剂中的使用：

在另一个实施方案中，提供了一种含有作为单一活性成分或与一种或多种其他制剂和/或酶组合的酶的消化性辅剂(如在待批的申请，美国系列号第_____中所描述的，题目为“饮食辅剂及其使用方法”，2000年5月25日提交，其公开部分在此整体引入作为参考)。在家畜或家养动物的消化辅剂中使用酶和其他制剂不仅改善了动物的健康和预期寿命，还有助于增加家畜的健康，并从家畜中产生食品。

目前，一些类型的家畜饲料(如某些家禽饲料)大量地添加了大量矿物质(如无机磷)，酶，生长因子，药物，和其他输送给家畜的制剂。这些添加物，例如，可以替代了许多在谷物中存在的卡路里和天然营养物。

通过从饲料本身减少或消除无机磷添加物和其他添加物(如微量矿物盐，生长因子，酶，抗生素)，饲料将能够带来更多的营养和能量。相应地，剩余的饮食中将含有更多可利用的能量。例如，谷物—含油种子餐膳食一般每公斤饮食含有大约 3,200kcal 可代谢能量，矿物盐不提供任何可代谢能量。因此去除不需要的矿物质，以谷物代替之将增加饮食中可利用的能量。因此本发明将不同于通常使用的含有肌醇六磷酸酶的饲料。例如，在一个实施方案中，使用了一种可以抵抗生物体胃肠道消化的生物相容性物质。



在许多生物体中，包括，例如，家禽或鸟类，如，例如鸡，火鸡，鹅，鸭，鸚鵡，孔雀，鸵鸟，野鸡，鹌鹑，鸽，鹁鹑，几维，潜鸟，澳州鸚鵡，美冠鸚鵡，金丝雀，企鵝，火烈鸟和鸽子，消化道包括储存和使用硬的生物相容物体(如，岩石和含壳鱼的壳)的胗来帮助消化种子或其他鸟食用的种子。这个生物体大家族的典型的消化道，包括含有称为嗉囊的袋的食道，食物在其中保存较短的时间。从嗉囊，食物下移到真正的胃中，或前胃中，在此盐酸和胃蛋白酶开始消化的过程。下一步，食物转移到胗中，胗为卵圆形、厚壁且具有强有力的肌肉。胗的主要功能是研磨和破碎食物颗粒—一个通过鸟类吞入小量精细的碎石和砂砾来辅助的过程。从胗，食物转移到十二指肠中。鸟类的小肠与哺乳动物类似。有两个大约 4—6 英寸长的盲袋或盲肠在小肠和大肠的连接处。大肠很短，大多由长度约为 3—4 英寸的直肠组成。直肠排空到泄殖腔中，粪便通过排泄口排出。

在胗内食用的（或另外引入的）和存在的硬质、生物相容的物体提供了一个传递各种酶、化学的、治疗性的和抗生素药剂的有用载体。这些硬物质的寿命周期为数小时至数天，并在一段时间后通过。因此，本发明提供了包被的、饱和的（如饱和的基质和膜）重建饮食辅剂以输送有用的消化或治疗药物到一种生物体中。这种饮食辅剂包括特定地被生物体摄取以辅助胗内消化的物质（如岩石或沙砾）。本发明提供了其上包被或其内饱和了药剂的生物相容物体，它可用于生物体的消化辅剂或用于输送治疗性或药用物质或化学制剂。

在第一个实施方案中，本发明提供了具有生物相容成分的饮食辅剂，其生物相容成分设计为释放辅助消化的药剂，其中生物相容成分设计为经口食用并在生物体的消化道（如胃）内释放。“生物相容”是指该物质在与宿主机体（如鸟）接触时不引起足以导致该物质排斥或使其失效的有害反应。这种失效性的发生可通过如，在该物质周围形成纤维性结构限制饱和的药剂弥散到宿主机体内，或形成因毒性或感染而导致机体死亡率或发病率增加的物质。生物相容的物质可以是非生物可降解的或是生物可降解的。在一个实施方案中，生物相容的成分对胃肠道的降解或消化具有抵抗性。在另一个实施方案中，生物相容的成分具有岩石或石头的密度。

用于本发明的非生物可降解的材料是一种允许饮食辅剂附着或饱和的物质。这种非生物可降解的材料包括，例如，热塑性塑料如丙烯酸类、变性聚丙烯睛、聚酰胺、聚碳酸酯、聚酯、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚砜、聚醚砜和聚偏二氟乙烯。合成橡胶也是可用的材料并包括，例如，聚酰胺、聚酯、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚氨酯、聚乙烯醇和硅树脂(如以硅为基础的或含二氧化硅)。本发明提供了可以包括这些原料的生物相容的成分，它们可以被诸如混合或层化以形成混合物、聚合物或它们两者的组合。

如这里所用，一种“生物可降解的”材料是指将在体内浸蚀或降解以形成较小化学物的成分。降解可通过如酶的、化学的或物理的方法而发生。考虑在本发

明中使用的合适的生物可降解材料包括聚（交酯）类、聚（甘油酯）类、聚（乳酸）类、聚（乙醇酸）类、聚原酸酯类、聚醚酯类、聚己酸内酯、聚酰胺酯、聚碳酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚氨酯、聚丙烯酸酯。这些材料可被混合或层化以形成混合物、聚合物或它们两者的组合。

几种不同的生物相容物质可同时地或以各种组合的方式(如，在另一种之前的一种物质)被摄取或另外提供给同一种生物体。另外，生物相容的物质可被设计为缓慢通过消化道。例如，大的或脂肪物质倾向于更慢地通过消化道，因而可以使用具有大体积的生物相容材料以防止快速通过消化道。这种大物质可以是非生物可降解与生物可降解物质的结合体。例如，一种小的非生物可降解的物质被生物可降解的物质包围，这样经过一段时间，生物可降解部分将被降解，使非生物可降解部分得以通过消化道。此外，公认的是，任何数目的调味料可供给生物相容的物质以辅助食用。

任何数目的试剂单独或与其它试剂结合，可被包被在生物相容的物质上，后者包括例如多肽（如酶、抗体、细胞因子或治疗性小分子）和抗生素。特殊的有用试剂的例子列于下面表 1 和 2。还考虑到，细胞可被封装进本发明的生物相容材料内，并用于输送酶或治疗药。例如，可以设计多孔的物质，其孔的大小足以让细胞在其中生长和通过，然后这些多孔材料可被服用进消化道。例如，生物相容的物质可包括大多数的微生态环境（如不同的孔隙度、pH 等）以为大多数细胞类型提供支持。细胞可以是经基因工程设计的以输送特殊的药物、酶或化学药物到机体。细胞可以是真核的或原核的。

表 1

治疗分类	化学药品	描述
抗生素类	阿莫西林及其混合物 Mastox 注射剂（阿莫西林和邻氯青霉素）	治疗由革兰氏+和革兰氏-细菌引起的细菌性疾病
	阿莫西林及其混合物 BioloX 注射剂（阿莫西林和邻氯青霉素）	治疗由革兰氏+和革兰氏-细菌引起的细菌性疾病
	呋喃西林+尿素 Nefrea 丸	治疗生殖器感染
	甲氧苄氨嘧啶+磺胺甲基异恶唑 Trizol 丸	治疗呼吸道感染、胃肠道感染、泌尿-生殖器感染
	灭滴灵和呋喃唑酮 Metofur 丸	治疗细菌性和原虫性疾病
	酞磺胺噻唑，果胶和高岭土 Pectolin 丸，悬液	治疗细菌性和非特异性腹泻，杆菌性痢疾和犊牛白痢

抗 寄 生 虫 药	杀外寄生物药 (Germex 软膏 γ 苯基六氯化合物, 普鲁黄 素半硫酸盐和溴棕三甲铵)	杀外寄生物药和防腐剂
	内杀寄生虫剂> 阿苯达唑及其化合物 Alben(阿苯达唑)悬液 (阿苯达唑 2.5%) 附加悬液 (阿苯达唑 5%) Forte 丸 (阿苯达唑 1.5 Gm) 片 (阿苯达唑 600 Mg) 粉 (阿苯达唑 5%, 15%)	预防和治疗蛔虫、绦虫和肝吸虫 感染
	Alpraz(阿苯达唑和吡喹酮)片	预防和治疗狗和猫中蛔虫和绦虫 感染
	羟氯扎胺及其化合物 Clozan(羟氯扎胺)丸, 悬液	预防和治疗肝吸虫感染
	Tetzan(羟氯扎胺和盐酸四咪唑)丸, 悬液	预防和治疗蛔虫和肝吸虫感染
	Fluzan(羟氯扎胺和盐酸左旋咪唑)丸、悬液	预防和治疗蛔虫感染和增强免疫
	左旋咪唑 Nemasol 注射剂 Wormnil 粉剂	预防和治疗蛔虫感染和增强免疫
	芬苯达唑 Fenzole 片剂 (芬苯达唑 150 Mg.) 丸剂 (芬苯达唑 1.5 Gm.) 粉剂 (芬苯达唑 2.5%w/w)	预防和治疗蛔虫和绦虫感染
滋 补 剂	复合维生素 B、氨基酸和肝提取物 Heptogen 注射剂	治疗食欲减退, 肝炎, 体弱, 神 经痛性痉挛衰弱和生长萎缩
	果糖酸钙与 Vit.B ₁₂ 和 Vit D ₃ Hylactin 注射剂	预防和治疗低钙血症, 患病状态 的支持治疗 (特别是体温过低) 和治疗早期佝偻病
动 物 饲 料 补 充 剂	基本矿物、硒和维生素 E Gynolactin 丸	在与乳品有关的动物和马中治疗 导致不育的发情和重复繁殖。
	基本矿物、维生素 E 和碘 Hylactin 粉剂	不育, 不适当泌乳, 免疫下降, 生长萎缩和体弱。
	基本电解质与维生素 C Elctra-C 粉剂	腹泻, 脱水, 在运输前后, 在极 端温度 (高或低) 和其它应激情 况下。
	Pyrenox Plus (双氯芬酸钠+对乙酰氨基酚) 丸, 注射剂	治疗乳腺炎, 外科手术后发热性 疼痛和炎症, 子宫脱垂, 跛行和 关节炎。

表 2. 治疗制剂

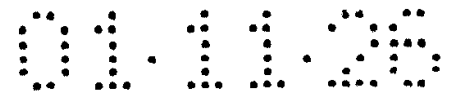
产品	说明
Acutrim[®] (苯丙醇胺)	每日一次食欲抑制剂片
The Baxter[®] Infusor	为可控的静脉内传送抗凝剂、抗生素、化疗药和其 它广泛使用的药物。

Catapres-TTS[®] (长压宁透皮治疗系统)	每周一次透皮系统, 治疗高血压。
Covera HS[™] (盐酸维拉帕米)	每日一次, 控制作用延长释放 (COER-24) 片, 治疗高血压和心绞痛。
DynaCirc CR[®] (isradipine)	每日一次, 延长释放片, 治疗高血压。
Efidac 24[®] (马来酸.氯苯朴尔敏)	每日一次, 延长释放片, 缓解变态反应症状。
Estraderm[®] (雌二醇透皮系统)	每周二次透皮系统, 治疗某些绝经后症状和预防骨质疏松。
Glucotrol XL[®] (格列甲嗪)	每日一次, 延长释放片, 用作膳食添加剂以控制非胰岛素依赖的糖尿病患者的高血糖症。
IVOMEC SR[®] 丸 (伊维菌素)	第一胃传递系统, 以全季节控制牛的重要内部和外部寄生虫。
Minipress XL[®] (哌唑嗪)	每日一次, 延长释放片, 治疗高血压。
NicoDerm[®] CQ[™] (尼古丁透皮系统)	透皮系统用作每日一次帮助戒烟以缓解尼古丁撤除症状。
Procardia XL[®] (硝苯吡啶)	每日一次, 延长释放片, 治疗心绞痛和高血压。
Sudafed[®] 24 小时 (伪麻黄碱)	每日一次鼻减充血剂, 缓解感冒、鼻窦炎、干草热和其它呼吸过敏症。
Transderm-Nitro[®] (硝酸甘油透皮系统)	每日一次透皮系统, 防止因冠状动脉疾病引起的心绞痛。
Transderm Scop[®] (东莨菪碱透皮系统)	透皮系统, 防止运动病伴随的恶心和呕吐。
Volmax (舒喘宁)	延长释放片, 缓解可逆性阻塞性气道疾病患者的支气管痉挛。
Actisite[®]	(盐酸四环素) 牙周纤维用作成年牙周炎患者刮治术和根部整平的辅剂, 以减少牙周袋深度和探查时的出血。
ALZET[®]	实验室研究的渗透泵。
Amphotec[®] (两性霉素 B 硫酸胆固醇复合注射剂)	AMPHOTEC [®] 是杀真菌治疗, 用于治疗侵袭性曲菌病, 在肾功能不全或不能接受毒性而排除使用有效剂量两性霉素 B 的患者中, 以及先前两性霉素 B 治疗失败的曲菌病患者。
BiCitra[®] (柠檬酸钠和柠檬酸)	碱化药物, 用于那些需要长期维持碱性尿的情况。
Ditropan[®] (盐 酸 oxybutynin)	用于缓解膀胱不稳定伴随的非抑制性神经原性或反流性神经原性膀胱症状 (即尿急、尿频、尿泄漏、动力性尿失禁、排尿困难)。
Ditropan[®] XL (盐 酸 oxybutynin)	是每日一次, 控制释放片, 适用于治疗伴有动力性尿失禁、尿急和尿频症状的膀胱活动反应。
DOXIL[®] (盐酸阿霉素脂质体注射剂)	
Duragesic[®] (芬太尼透皮系统) CII	72 小时透皮系统, 在用较小的方法, 如对乙酰氨基酚-鸦片结合剂、非甾体止疼药或有短效鸦片的

	PRN 药，不能控制疼痛而需要持续的鸦片止痛药的病人中，控制慢性疼痛。
Elmiron® (戊聚糖聚硫酸钠 (pentosan polysulfate sodium))	适用于缓解间质性膀胱炎伴随的膀胱疼痛或不适。
ENACT AirWatch™	哮喘监测和管理系统。
Ethyol® (amifostine)	适用于减少进展性卵巢癌或非小细胞肺癌患者重复给予顺铂所伴随的累积肾毒性。 适用于在进行术后放射治疗的头颈部患者中减少中到重度口干症的发生率，其中放射野包括腮腺的实质部分。
Mycelex® Troche (克霉唑)	用于口咽部白色念珠菌病的局部治疗。也适用于在包括化疗、放疗、或在治疗白血病、实体瘤或肾移植中使用类固醇治疗的情况下，预防性地减少免疫抑制患者口咽部白色念珠菌病的发生率。
Neutra-Phos® (磷酸钾和钠)	膳食 / 营养补充剂
PolyCitra®-K 口服溶液和 Polycitra®-K 结晶 (柠檬酸钾和柠檬酸)	碱化药物，用于那些需要长期维持碱性尿的情况，如尿道内有尿酸和胱氨酸结石的患者，特别是当不希望或禁忌给予钠盐时。
PolyCitra®-K 糖浆和 LC (三柠檬酸)	碱化药物，用于那些需要长期维持碱性尿的情况，如尿道内有尿酸和胱氨酸结石的患者。
Progestasert® (黄体酮)	子宫内黄体酮避孕系统
Testoderm® Testoderm® with Adhesive 和 Testoderm® TTS CHH	睾酮透皮系统 Testoderm®产品适用于伴随内源性睾酮不足或缺失情况下男性的替代治疗：(1) 原发性性腺机能减退 (先天的或获得的) 或 (2) 促性腺激素分泌不足的性腺机能减退 (先天的或获得的)。
Viadur™ (醋酸 leuprolide 植入片)	每年一次植入片，用于前列腺癌的姑息性治疗。

某些药物可被设计成在一定的条件下 (如在一定的 pH 下、存在激活剂等) 活化或失活。另外，在本发明的成分中应用酶原是有利的。例如，酶原可被一种蛋白酶活化 (如在消化道内存在的或人工导入机体消化道的唾液蛋白酶)。预期，用本发明的生物相容成分传递的药物可通过添加激动剂而被活化或失活，后者可由机体摄取或另外传递给机体。另一种在消化道内控制药物的机制是一种环境敏感剂，它在消化道的适当部位被活化。例如，一种药物可在低 pH 失活但在中性 pH 活化。因而，该药物将在胃管内无活性但在肠道内活化。可选择地，药物可对存在微生物特异因子 (如存在于肠道的微生物) 反应而变得有活性。

总之，本发明的潜在益处包括，例如 (1) 在动物 (包括鱼) 每日饲料或谷物中使用矿物补充料 (如无机磷补充剂)、酶或治疗药物的需要减少或可能消除，从而增加饲料中的热量和营养素，和 (2) 增强家养和非家养动物的健康和生长，包



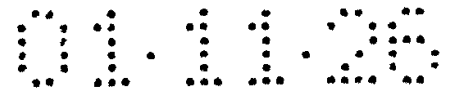
括如家禽、猪、牛、马、犬和猫科动物。

大量的酶可被用于本发明的方法和成分。这些酶包括食用食物的完全消化或完全代谢、经消化道传递给动物的化合物、前体药物或其它药物或化合物的活化或诱导所必需的酶。可被传递或掺入本发明成分中的酶的例子包括，例如，饲料强化酶包括 α -半乳糖苷酶, β -半乳糖苷酶、特别是乳糖酶, 肌醇六磷酸酶, β -葡聚糖酶、特别是内- β -1,4-葡聚糖酶和内- β -1,3(4)-葡聚糖酶, 纤维素酶, 木糖苷酶, 半乳聚糖酶、特别是阿拉伯糖内-1,4- β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖内-1,3- β -半乳糖苷酶, 葡聚糖内切酶、特别是内-1,2- β -葡聚糖酶、内-1,3- α -葡聚糖酶和内-1,3- β -葡聚糖酶, 果胶降解酶、特别是果胶酶, 果胶甲酯酶, 果胶裂合酶, 多聚半乳糖醛酸酶, 阿拉伯糖酶, 鼠李糖半乳糖酶, 鼠李聚糖半乳糖醛酸乙酰酯酶, 鼠李聚糖半乳糖醛酸- α -鼠李糖苷酶, 果胶酸裂合酶, 和 α -galacturonisidases, 甘露聚糖酶, β -甘露糖苷酶, 甘露聚糖乙酰酯酶, 木聚糖乙酰酯酶, 蛋白酶, 木聚糖酶, 树胶木聚糖酶和脂肪分解酶如脂肪酶、磷脂酶和角质酶。在 SEQ ID NO: 1 和 2 及下面表 3 陈述的肌醇六磷酸酶是优选的。表 3 中描述的序列是具有如这里所述的氨基酸取代和核苷酸取代的 SEQ ID NO: 1 和 2。

表 3

名称	来源	氨基酸序列	核酸序列
大肠杆菌 B(参考)	大肠杆菌 B	S10; P26; D176; M298; A299; G312; 1428	
868PH1	野牛大肠杆菌	1428T	
872PH1	袋鼠大鼠大肠杆菌	D176G; G312S M298K; A299T	GAC(176)GGC;GGT(312)AGT; ATG(298)AAG;GCA(299)ACA
875PH2	大肠杆菌 W	A160S;D176G;M298K;A299T	GCG(160)TCG;GAC(176)GGC; ATG(298)AAG;GCA(299)ACA
873PH1	小牛大肠杆菌	1428R	
大肠杆菌 B	大肠杆菌 B	K298M;T299A	AAG(298)ATG;ACA(299)GCA
K12 appA	大肠杆菌 K12	M298K;A299T	ATG(298)AAG;GCA(299)ACA

用于本发明的酶可被修饰以增强其活性、输送、激活和降解。这种修饰可在体内或体外进行, 并使用如下更充分描述的本领域一般知道的方法和步骤。这种方法通常采用自动化机器合成的、或克隆表达的、或用重组 DNA 技术控制的多核苷酸或多肽序列。



在一个优选的实施方案中，本发明成分中使用的酶是对热稳定、耐热并催化肌醇六磷酸酶水解的肌醇六磷酸酶，即该酶能够在短暂的（即 5 至 30 秒）或较长时间，如数分钟或数小时，暴露于 50°C 以上温度后复性或获得活性。

“饲料”和“食物”分别是指任何天然或人工的饮食、膳食或类似物，或打算或适于分别被动物和人类吃、服、摄取的这些膳食的成份。这里所用的“饮食辅剂”是指，例如，含有供给动物或机体治疗药或消化剂药物的组合物。“饮食辅剂”典型地不是机体热量的来源，换句话说，饮食辅剂典型地不是机体能量的来源，而是在典型的“饲料”或“食物”之外服用的组合物。

药物或酶（如肌醇六磷酸酶）可分别在体外或体内发挥作用，即在服用前或在机体的胃或胃管中。而且也可能联合作用。

尽管任何酶可被掺进饮食辅剂中，这里参考肌醇六磷酸酶作为本发明方法和成分的范例。本发明的饮食辅剂包括酶（如肌醇六磷酸酶）。总体上，含有肌醇六磷酸酶成分的饮食辅剂为液体或干性的。

液体组分不需要含有除酶（如肌醇六磷酸酶）以外的任何成分，优选为高纯度形式。然而，通常还加入稳定剂如甘油、山梨醇或单丙烯乙二醇。液体组分也可含其它添加剂如盐、糖、防腐剂、pH 调节剂、蛋白、肌醇六磷酸盐(肌醇六磷酸酶底物)。代表性的液体组分是水或油质的淤泥。液体组分可被加入生物相容的成份中以缓慢释放。优选地，酶加入生物相容材料（如生物可降解的或非生物可降解的）的饮食辅剂结构中，包括其中添加了重组体细胞者，如多孔玻璃细珠。

干性组分可以是喷雾干燥的组分，在这种情况下该组分不需含干性状态的酶以外的任何成分。然而，干性组分通常是所谓的颗粒，易于与食物或塑料混合，或更优选地，形成一种预混合的成分。酶颗粒的粒度大小优选为与混合物中其它成分相当。或者为将酶掺入动物饲料中提供了一种安全和方便的方法。优选地，这些颗粒是生物相容的，更优选地，他们是非生物可降解的生物相容颗粒。

被酶包被的凝集颗粒可采用凝聚技术在一种高速剪切混合器内制备，吸收颗粒通过具有载体材料核心而制备以吸收 / 被酶包被。优选地，载体材料是生物相容的非生物可降解材料，以模拟动物胗内石头和沙砾的作用。用于凝聚技术的代表性填充材料包括盐，如硫酸钠。其它填充料是高岭土、滑石粉、硅酸铝镁和纤维素纤维。粘合剂如糊精也可随意地包含在凝集颗粒中。载体材料可以是任何生物相容的材料包括生物可降解的和非生物可降解的材料（如岩石、石头、陶瓷、各种多聚物）。颗粒被覆盖混合物随意地包被。这种混合物包括涂布剂，优选疏水性涂布剂如氢化棕榈油和牛脂，如果需要的其它添加剂如碳酸钙或高岭土。

此外，饮食辅剂成分（如肌醇六磷酸酶饮食辅剂成分）可含有其它替代物如着色剂、芳香化合物、稳定剂、维生素、矿物、其它饲料或食品强化酶等。代表性的添加剂通常包括一种或多种化合物如维生素、矿物或饲料强化酶和适当的载体和 / 或赋形剂。

在一个实施方案中，本发明的饮食辅剂成分另外包括有效量的一种或多种饲料强化酶，特别是下面的饲料强化酶： α -半乳糖苷酶， β -半乳糖苷酶、特别是乳糖酶，其它肌醇六磷酸酶， β -葡聚糖酶、特别是内- β -1,4-葡聚糖酶和内- β -1,3(4)-葡聚糖酶，纤维素酶，木糖苷酶，半乳聚糖酶、特别是阿拉伯糖内-1,4- β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖内-1,3- β -半乳糖苷酶，葡聚糖内切酶、特别是内-1,2- β -葡聚糖酶、内-1,3- α -葡聚糖酶和内-1,3- β -葡聚糖酶，果胶降解酶、特别是果胶酶，果胶甲酯酶，果胶裂合酶，多聚半乳糖醛酸酶，阿拉伯糖酶，鼠李糖半乳糖酶，鼠李聚糖半乳糖醛酸乙酰酯酶，鼠李聚糖半乳糖醛酸- α -鼠李糖苷酶，果胶酸裂合酶，和 α -galacturonisidases，甘露聚糖酶， β -甘露糖苷酶，甘露聚糖乙酰酯酶，木聚糖乙酰酯酶，蛋白酶，木聚糖酶，arabinoxylanases 和脂肪分解酶如脂肪酶、磷脂酶和角质酶。

本发明的饮食辅剂是在进食前或同时补充给单胃动物的。在一个实施方案中，本发明的饮食辅剂是与饮食同时补充给单胃动物的。在另一种实施方案中，饮食辅剂以颗粒或稳定的液体形式添加进饮食中。

本发明的饮食辅剂中，酶的有效剂量是从大约 10—20,000；优选大约 10-15,000，更优选大约 10-10,000，特别是大约 100-5,000，尤其是大约 100-2,000FYT/kg 饮食辅剂。

本发明的肌醇六磷酸酶其它特殊用途的实例是大豆加工和肌醇及其衍生物的生产。

本发明还涉及一种降低动物肥料中肌醇六磷酸盐水平的方法，这里的动物喂食了含本发明的有效剂量肌醇六磷酸酶的饮食辅剂。如在本申请开始中所阐述的，由此的一个重要作用是减少了环境的肌醇六磷酸盐污染。

在另一个实施方案中，饮食辅剂是磁性载体。例如，一种有酶（如肌醇六磷酸酶）分布在其内、其上或其间的磁性载体(如多孔的磁珠)，可分布在一种高肌醇六磷酸盐的区域内，并在一段时间后被磁体收集。这种小珠的分布和重回收减少了额外的污染并使小珠可以重新利用。此外，这种磁珠的体内应用使得饮食辅剂定位于消化道内的一点，例如肌醇六磷酸酶活性可以发挥的地方。例如，在动物食用磁载体饮食辅剂后，通过在动物胃旁边并列一种磁体可以将本发明的含消化酶的饮食辅剂定位在动物胃。磁体在一段时间后可被撤走，使得饮食辅剂通过消化道。此外，磁载体在处死后适合去除或辅助收集。

当饮食辅剂是多孔颗粒时，这种颗粒典型地为期望缓慢释放的物质充满以形成缓释颗粒。这种缓释颗粒不仅可通过将期望释放的物质摄取多孔颗粒而制备，而且可通过将需要的物质首先溶入第一分散相而制备。在此情况下，采用要释放的物质首先溶入第一分散相方法而制备的缓释颗粒也在本发明的范畴和精神内。例如，中空的多孔颗粒可被缓释物质充满，如医用药、农药或酶。特别是，当充满酶的中空多孔颗粒是由生物可降解的聚合物制造时，颗粒本身可用作农药或肥

料，且它们对环境没有副作用。在一个实施方案中，多孔颗粒实际上是有磁性的。

中空的多孔颗粒可被用作生物反应器支架，特别是酶支架。因此，采用缓释方法制备饮食辅剂是有益的，例如，通过将作用物酶包裹在微囊泡如脂质体内，药剂在数天的过程中从其中释放，优选地大约 3-20 天。可选择地，药物（如酶）可被设计为缓慢释放，例如加入缓释聚合物中，从中药物（如酶）剂量在数天过程中缓慢释放，例如 2 至 30 天，而且其范围可以与动物生命平行。

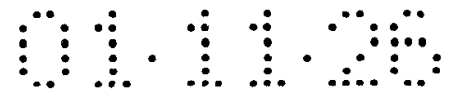
如本领域已知的，脂质体一般来自磷脂或其他脂类物质。脂质体由分散在水性介质中的单-或多层含水液体结晶形成。任何可形成脂质体的非毒性、生理学可接受和可代谢脂类均可应用。本脂质体形式的成分除药物外可包含稳定剂、防腐剂、赋形剂等。优选的脂类是磷脂和磷脂酰胆碱（卵磷脂），包括天然和合成的。形成脂质体的方法为本领域所知。见，例如，Prescott 主编，细胞生物学方法，XIV 卷，Academic Press, New York, N.Y. (1976), 33 页及以下等。

在制备食品或饲料制剂或添加剂方法中应用本发明的肌醇六磷酸酶也在本发明的范畴内，即肌醇六磷酸酶仅在加工过程中发挥其肌醇六磷酸酶活性，而在最终食品或饲料产品中无活性。例如此方面与生面团制作和烘焙相关。因而，肌醇六磷酸酶或重组体酵母表达的肌醇六磷酸酶可被加入磁性载体之内、之上或之间，分布在生面团或食品媒介中，并被磁体收回。

本发明的饮食辅剂可用生物相容的（如生物可降解的或非生物可降解的）载体单独给予动物，或与其它消化添加剂一起使用。由此，本发明的饮食辅剂可以容易地作为顶肥给予，或直接将其混合进动物饲料，或通过单独口服、注射或经皮方式与饲料分开供给，或与其它生长相关的可食用化合物组合，在组合中每种化合物的比例依据特定的机体或要解决的问题和所希望的反应程度而定。应当理解，在任何给定情况下给予的特殊饮食剂量将根据要给予的特定化合物、要处理的问题、受者的状态和其它可能改变有效成分活性或受者反应的相关实际而被调整，正如本领域中那些技术人员所熟知的那样。大体上，可使用单次每日剂量或分开的每日剂量，如本领域熟知的。

如果与动物饲料分开给予，饮食辅剂的形式可通过将其与非毒性药学可接受的可食用载体结合而制成速释或缓释剂型，如本领域熟知的。这种可食用载体可以是固体或液体，如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、大豆碎片、花生油、橄榄油、芝麻油和丙二醇。如果使用固体载体，化合物的药剂形式可能是片剂、胶囊、粉剂、锭剂或糖锭或以微型可分散形式的顶肥。如果使用液体载体，药剂形式可能是软凝胶胶囊、或糖浆或液体悬液、乳剂或溶液。药剂形式还可包含佐剂，如防腐剂、稳定剂、润湿或乳化剂、溶液辅剂等。它们也可包含其它有治疗价值的物质。

因此，本发明的显著优点包括，例如 1) 轻松生产带有生物相容组分的活性成分；2) 由于其涉及的聚合物和/或可能使用的活性成分种类而具有多功能性；3) 高产量和装载效率；和 4) 提供在体内释放活性、完整活性药物的持续释放制剂，



因而在延伸的时间范围内提供活性药物的控制释放。此外，另一个优点在机体消化道内（如胃）局部传递药物。如这里所用的短语“包含在其中”代表一种方法，以将药物设计为用于在药物延伸的时间范围内控制释放的结构。

在本发明的持续释放或缓释结构中，将使用有效剂量的药物（如酶或抗生素）。如这里所用的，持续释放或缓释是指药物在延伸的时间范围内从一种生物相容的材料中释放。持续释放可以是连续的或不连续的、线性的或非线性的，它可以采用一种或多种生物可降解或非生物可降解的结构、装载药物、选择赋形剂或其它修饰而实现。然而，要认识到，可能希望提供“快速”释放结构，准备一旦被机体食用就迅速释放。还要理解，“释放”并不一定指药物从生物相容载体中释放。更确切地，在一个实施方案中，缓释包括存在于生物相容组分上的药物缓慢激活或连续激活。例如，肌醇六磷酸酶不必从生物相容组分上释放而起效。在此实施方案中，肌醇六磷酸酶在生物相容组分上固定不动。

动物饲料可以是通常用于满足动物饮食需要的任何含蛋白的有机膳食。许多这种含蛋白膳食典型地主要包括玉米、大豆粉或玉米/大豆粉混合。例如，喂食家禽的代表性商业销售产品包括 Land O'Lakes AG Services 的家禽饲料产品 Egg Maker Complete、和 Agwa, Inc 的产品 Country Game & Turkey Grower（也见 Philip Minnaar 和 Maria Minnaar 的 The Emu Farmer 的手册）。这些商业销售的产品都是动物饲料的代表性例子，本饮食辅剂和/或肌醇六磷酸酶可被掺入其中以减少或消除在这种组成中需要摄入的磷、锌、镁和铁的补充量。

本发明可应用于许多动物的饮食，这里定义为包括哺乳动物（包括人）、家禽和鱼。特别是，该饮食可被用于商业上重要的哺乳动物如猪、牛、绵羊、山羊、实验室啮齿动物（大鼠、小鼠、仓鼠和沙鼠）、被毛动物如貂和狐狸、动物园动物如猴和猿、家养哺乳动物如猫和狗。代表性的商业上重要的鸟禽类包括鸡、火鸡、鸭、鹅、野鸡、鹌鹑、鸵鸟、潜鸟、几维、鸽子、鸚鵡、澳洲鸚鵡、大冠鸚鵡、金丝雀、企鵝、火烈鸟和鹤鹑。商业养殖的鱼如鳟鱼也受益于这里公开的饮食辅剂。其它能受益的鱼包括，例如食用鱼（特别是在鱼池或鱼缸培育环境下，如热带鱼）、金鱼和其它观赏性鲤鱼、鲈鱼、鳟鱼、鲑鱼、鲨鱼、鳊鱼、比目鱼、鳎鱼、罗非鱼、青鳉、虹鳉、任一种帆鳍鲈、新月鱼、剑尾鱼、斑鱼和泥鳅。

除非另外声明，如 Sambrook, Fritsch 和 Maniatus, 1989 描述的方法进行转化。下面的实例是想举例说明，并不是限制本发明。虽然实例中描述的方法是可被用以执行本发明某一方面者的代表，但本领域技术人员已知的其它方法也可使用。

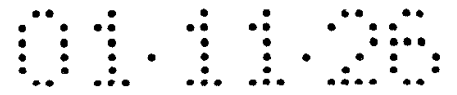
实例 1

肌醇六磷酸酶的分离、细菌表达和纯化

大肠杆菌 B 基因组 DNA 从 Sigma 获得（目录号#D-2001），St. Louis, New Jersey.

下面的引物用于对直接来自基因组 DNA 基因的 PCR 扩增。

5' 引物 gtttctgaattcaaggaggaatttaaATGAAAGCGATCTTAATCCCATT(SEQ



IN NO:3);和

3'引物 gtttctggatccTTACAAACTGCACGCCGGTAT(SEQ IN NO:4)

PCR 反应中的 Pfu 聚合物酶和扩增按照制造商手册进行 (Stratagene Cloning Systems, Inc., La Jolla, CA)。

PCR 产物被纯化, 纯化的产物和 pQE60 载体(Qiagen)均按照制造商手册用 EcoRI 和 BglIII 限制性核酸内切酶 (New England Biolabs) 消化。用标准的方法进行过夜进行连接反应以产生 pQE60。

扩增的序列在框架内插入编码 RBS 的序列中。然后, 连接反应的混合物通过电穿孔被用来转化大肠杆菌菌株 M15/pREP4 (Qiagen, Inc.)。M15/pREP4 含质粒 pREP4 的多个拷贝, 后者表达 lacI 阻遏物, 还赋予卡那霉素抗性 (Kan^r)。质粒 DNA 被分离并通过限制性分析确认。含所需构建物的克隆在补充了 Amp (100 μg/ml) 和 Kan (25 μg/ml) 的 LB 培养基的液体培养基内过夜生长。O/N 培养物被用来以 1:100 至 1:250 的比例接种给大培养基。该细胞生长至光密度 600 (O.D.⁶⁰⁰) 0.4 至 0.6 之间。然后加入 IPTG (“异丙基-B-D-硫基半乳糖苷”) 至终浓度为 1mM。IPTG 通过失活 lacI 阻遏物、清除 P/O 先导而诱导基因表达的增加。细胞再生长 3 至 4 小时。然后通过离心收获细胞。

上面陈述的引物序列还可通过上面描述的杂交技术用于从沉淀物质中分离靶基因。

根据上面的讲述, 对本发明的许多修改和变化是可能的, 因此, 在所附的权利要求范围内, 本发明可不特定描述实施。还要理解, 虽然本发明已经如上被进行了详细的描述, 但前面的描述是举例说明, 并不是限制本发明的范围。另一方面, 本发明的优点和修改在下面权利要求的范围内。所有出版物、专利申请、专利和其它这里提到的文献被整体引用作为参考。

本发明也提供从所有其它大肠杆菌菌株 (是有毒或无毒, 包括 K12, W, C) 以及所有细菌分离和应用肌醇六磷酸酶分子 (核酸及其编码的酶)。这些包括所有属于以下的已知种属和菌株:

栖热袍菌属 (Thermotogales)

绿色非硫磺细菌

藻青菌属 & 叶绿体

低 G+C 革兰氏-阳性细菌

梭菌属

高 G+C 革兰氏-阳性细菌

Gytophaga/屈挠细菌/类杆菌属组

丝状杆菌 (Fibrobacteria)

Spriochaetes

浮霉状菌属 (Planctomyces) /衣原体属组

紫色细菌 (Proteobacteria) 包括以下亚门:

δ & ϵ 包括:

乙酸氧化脱硫单胞菌 (*Desulfuromonas acetoxidans*)

可变脱硫八叠球菌 (*Desulfosarcina variabilis*)

斯氏蛭弧菌

侵蚀侏囊菌 (*Nannocystis exedens*)

橙色标桩菌 (*Stigmatella aurantiaca*)

黄色粘球菌 (*Myxococcus xanthus*)

脱硫脱硫弧菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*)

sp.卵硫菌 (*Thiovulum* sp.)

空肠弯曲杆菌

产琥珀酸沃林菌

幽门缠绕杆菌

α 包括:

Methylobacterium extorquens

印度拜叶林无氏菌 (*Beijerinckia indica*)

普通生丝微菌 (*Hyphomicrobium vulgare*)

土壤膨胀杆菌

流产布氏杆菌

五日热罗卡利马体

海红菌 (*Rhodopseudomonas marina* subsp. *agilis*)

Zea mays-线粒体

立式立克次体

立式埃里希体

尖音库蚊沃尔巴克氏体 (*Wolbachia pipientis*)

边缘无形体

长赤细菌 (*Erythrobacter longus*)

需盐红螺菌 (*Rhodospirillum salexigens*)

荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)

生脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*)

深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)

γ 包括:

沙氏外硫红螺菌 (*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*)

酒色着色菌 (*Chromatium vinosum*)

甲烷甲基单胞菌 (*Methylomonas methanica*)

人心杆菌
嗜麦芽黄单胞菌
伯氏柯克斯体
嗜肺军团菌嗜肺亚属
线型海洋螺菌 (*Oceanospirillum linum*)
乙酸钙不动杆菌
绿脓假单胞菌
流感嗜血杆菌
副溶血弧菌
普通变形杆菌
胡萝卜欧文菌
大肠杆菌包括:

β 包括:

齿蚀艾肯菌
淋病奈瑟球菌
Vitreoscilla stercoraria
青色素杆菌
粪产碱杆菌
胶状红长命菌 (*Rubrivivax gelatinosus*)
羧基酮假单胞菌
欧洲亚硝化单胞菌
迂回螺菌

这种肌醇六磷酸酶分子可用已知的方法从这些细菌中分离，包括库筛选方法如表
达筛选，杂交方法，PCR（如，见 Sambrook,1989）。

7. 引用的文献

（本申请中引用的所有文献的讲授内容在这里以文献整体加入作为参考，除非另
外说明。）

Association of Official Analytical Chemists:Official Methods of Analysis.Associatoin
of Official Analytical Chemists, Washington,DC.,1970.

Ausubel FM 等。分子生物学现代方法。Greene Publishing Assoc.,Media,PA.©
1987,©1989,©1992.

Barnes WM:从 λ 噬菌体模板高保真和高产量的对直至 35—kb DNA 的 PCR 扩增。

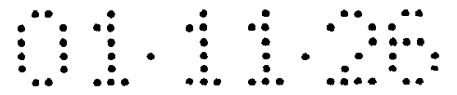
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 91(6):2216-2220,1994.

Bayer EA,Morag E,Lamed R:Cellulosome—珍品—生物学技术的发现。 *Trends*
Biotechnol 12(9):379-86,(Sep)1994

Bevan M:植物转化的二元土壤杆菌载体。 *Nucleic Acids Research*
12(22):8711-21,1984.

- Bird 等. *Plant Mol Biol* 11:651,1988.
- Blobel G,Walter P,Chang CN,Goldman BM,Erickson AH,Lingappa VR:蛋白质跨膜转位:信号假说和其他。 *Symp Soc Exp Biol* 33:9-36,1979.
- Brederode FT,Koper-Zawrthoff EC,Bol JF: 苜蓿花叶病毒RNA 4的完全核苷酸序列。 *Nucleic Acids Research* 8(10):2213-23,1980.
- Clark WG,Register JC 3d,Nejdat A,Eichholtz DA,Sanders PR,Fraley RT,Beachy RN:在转基因烟草植物中 TMV 包被蛋白的组织特异性表达影响包被蛋白介导的病毒检测水平。 *Virology* 179(2):640-7,(December)1990.
- Cole 等: 单克隆抗体和癌症治疗。 A.R.Liss,New York.©1985.
- Coligan JE 等: 免疫学现代方法。 J.Wiley & Sons,New York. ©1996.
- Coruzzi G,Brogliè R,Edwards C,Chua NH:编码核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶小亚单位的豌豆核基因的组织特异和光调节的表达。 *EMBO J* 3(8):1671-9,1984.
- Cosgrove DJ:微生物起源的磷酸肌醇磷酸酶。在肌醇、scyllo-肌醇和D-手-肌醇的六磷酸盐被细菌(假单胞菌属)肌醇六磷酸酶去磷酸化中磷酸肌醇中间产物。 *Aust J Biol Sci* 23(6):1207-1220,1970.
- Dassa E,Cahu M,Desjoyaux-Cherel B,Boquet PL:大肠杆菌的最适 pH 为 2.5 的酸性磷酸酶。生理学和生物化学研究。 *J Biol Chem* 257(12):6669-76,(Jun 25)1982.
- Davis LG 等。分子生物学基本方法。 Elsevier,New York, ©1986.
- Duarte JC,Costa-Ferreira M:曲霉菌病和 lignocellulosics: 酶学和生物技术学应用。 *FEMS Microbiol Rev* 13(2-3):377-86,(Mar)1994.
- 食品化学药品集, 第4版。 Committee on Food Chemicals Codex,Food and Nutrition Board,Institute of Medicine,National Academy of Science.出版发行: National Academy Press,Washington,DC, ©1996.
- Garcia PD,Ghrayeb J,Inouye M, Walter P:大肠杆菌外膜脂蛋白野生型和突变信号肽与哺乳动物信号识别颗粒等效的相互作用。 *J Biol Chem* 262(20):9463-8,(July 15)1987.
- Gluzman Y:SV-40 转化的猴细胞支持早期 SV40 突变体的复制。 *Cell* 23(1):175-182,1981.
- Goeddel DV,Shepard HM, Yelverton E,Leung D,Crea R, Sloma A,Pestka S:用大肠杆菌合成人成纤维细胞干扰素。 *Nucleic Acids Research* 8(18):4057-4074,1980.
- Gordong-Kamm WJ,Spencer TM,Mangano ML,Adams TR,Daines RJ,Start WG,O'Brien JV,Chambers SA,Adams Jr.WR,Willets NG,Rice TB,Mackey CJ,Krueger RW,Kausch AP,Lemaux PG.*Plant Cell* 2:603,1990.
- Graf E: 肌醇六磷酸盐:化学和应用。 Pilatus Press,Minneapolis.1986.
- Greiner R,Haller E,Konietzny U,Jany KD:从 terrigena 克雷白菌属纯化和定性肌醇六磷酸酶。 *Arch Biochem Biophys* 341(2):201-6,(May 15)1997.
- Greiner R,Konietzny U:构建一个生物反应器以产生肌醇六磷酸酶特殊的分解产物。

- J Biotechnol* 48(1-2):153-9,(July 18)1996.
- Greiner R,Konietzny U,Jany KD:从大肠杆菌纯化和定性两个肌醇六磷酸酶。 *Arch Biochem Biophys* 303(1):107-13,(May 15)1993.
- Guilley H,Dudley RK,Jonard G,Balazs E,Richards KE: 花椰菜花叶嵌合病毒 DNA 的转录: 测定引物序列和确定转录体特征。 *Cell* 30(3):763-73,1982.
- Hespell RB,Whitehead TR:胃肠道细菌降解木聚糖的生理学和遗传学。 *J Dairy Sci* 73(10):3013-22,(Oct)1990.
- Hoekema A,Hirsch PR,Hooykaas PJJ,Schilperoort RA. *Nature* 303:179,1983.
- Horsch RB,Fry JE,Hoffmann NL,Eichholtz D,Rogers SG,Fraley RT. *Science* 227:1229,1985.
- Igarashi M,Hollander VP:来自大鼠肝脏的酸性磷酸酶。纯化,结晶化和特性。 *J Biol Chem* 243(23):6084-9,(Dec.10)1968.
- 生物化学和分子生物学国际联盟,分类目录委员会:酶术语 1992:生物化学和分子生物学国际联盟分类目录委员会对术语和酶分类的建议/对 NC-IUBMB 作准备 Edwin C.Webb.Academic Press,c1992.
- Jeffries TW:微生物木聚糖酶的生物化学和遗传学。 *Curr Opin Biotechnol* 7(3):337-42,(Jun.)1996.
- Klee HJ,Muskopf YM,Gasser CS: 编码 5-enolpyruvylshikimate-3-磷酸合成酶的阿布斯属 *thaliana* 基因的克隆: 序列分析和操纵以获得抗草甘磷的植物。 *Mol Gen Genet* 210(3):437-42,(Dec)1987.
- Kohler G,Milstein C:分泌事先确定特性的抗体的融合细胞的连续培养。 *Nature* 256(5517):495-497,1975.
- Koster-Topfer M,Frommer WB,Rocha-Sosa M,Rosahl S,Schell J,Willmitzer L:在转基因马铃薯和烟草植物中,一种 II 类 patatin 启动子在发育的控制下。 *Mol Gen Genet* 219(3):390-6,(Nov)1989.
- Kozbor. *Immunology Today* 4:72,1983.
- Lee B,Murdoch K,Topping J,Kreis M,Jones MG:从大麦和小麦发育的颖果中分离的糊粉原生质体中短暂的基因表达。 *Plant Mol Biol* 13(1):21-9,1989.
- 国家研究委员会: 家禽的营养需求 (第九修订版)。 National Academy Press,Washington,DC,1994.
- Nayini NR,Markakis P: *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 17:24-26,1984.
- NCBI,National Library of Medicine.National Institutes of Health:BLAST 序列相似性搜索 (web 地址=www.ncbi.nlm.nih.gov) .
- Nelson TS,Shieh TR,Wodzinski RJ,Ware JH:补充肌醇六磷酸酶对鸡肌醇六磷酸酶应用的影响。 *J Nutr* 101(10):1289-1293,1971.
- Ng DT,Walter P:跨内质网的蛋白转位。 *Curr Opin Cell Biol* 6(4):510-6,(Aug),1994.
- Potrykus I:植物和细胞培养的基因传递方法。 *Ciba Found Symp* 154:198-208;讨论 208-12,1990.



- Powar VK, Jagannathan V: 来自枯草杆菌的肌醇六磷酸盐特异的磷酸酶的纯化和特性。 *J Bacteriol* 151(3):1102-1108, 1982.
- Powers T, Walter P: 初生多肽伴随的复合物调节信号鉴别颗粒和核糖体之间的相互作用。 *Curr Biol* 6(3):331-8, (March 1), 1996.
- Prade RA: 木聚糖酶: 从生物学到生物工艺学。 *Biotechnol Genet Eng Rev*; 13:101-31, 1996.
- Ryan AJ, Royal CL, Hutchinson J, Shaw CH: 含油种子油菜 (芸苔属 *napus* c.v. jet neuf) 的 12S 种子储存蛋白的基因组序列。 *Nucl Acids Res* 17(9):3584, 1989.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: 用热稳定 DNA 聚合酶的引物导向的 DNA 酶扩增。 *Science* 239(4839):487-491, 1988.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: 分子克隆: 实验室手册, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, ©1989.
- SAS: 统计学在: SAS 使用者指南 (1984 版)。 SAS Institute, Carey, NC, 1984.
- Schoner FJ, Hope PP, Schwarz G, Wiesche H: 微生物肌醇六磷酸酶和无机磷在性能和肉仔鸡内磷、钙和粗灰粉保留上的对比效应。 *J Anim Physiol Anim Nutr* 66:248, 1991.
- Schoner FJ, Hope PP, Schwarz G, Wiesche H: 微生物肌醇六磷酸酶和无机磷在肉仔鸡内的作用: 性能和在各种钙水平上的矿物保留。 *J Anim Physiol Anim Nutr* 69:235, 1993.
- Shieh TR, Wodzinski RJ, Ware JH: 在曲霉菌 *ficuum* 内无机磷对酸性磷酸酶形成的调节。 *J Bacteriol* 100(3):1161-5, (Dec) 1969.
- Shimamoto K, Miyazaki C, Hashimoto H, Izawa T, Itoh K, Terada R, Inagaki Y, Iida S: 用 Ac 转座酶基因共转染的玉米可传递元件 Ds 在转基因大米植物中的反式激活和稳定整合。 *Mol Gen Genet* 239(3):354-60, (June) 1993.
- Shimizu M: 生物科学, 生物工艺学和生物化学 56:1266-1269, 1992.
- Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ, Hoekema A: 在转基因植物中生产正确加工的人血清白蛋白。 *Biotechnology (NY)* 8(3):217-21, 1990.
- Simons PC, Versteegh HA, Jongbloed AW, Kemme PA, Slump P, Bos KD, Wolter MG, Beudeker RF, Verschoor GJ: 在肉仔鸡和猪内用微生物肌醇六磷酸酶改善磷的利用率。 *Br J Nutr* 64(2):525-540, 1990.
- Smeekens S, Weisbeek P, Robinson C: 蛋白运输进入和在叶绿体内。 *Trends Biochem Sci* 15(2):73-6, 1990.
- Smith AG, Gasser CS, Budelier KA, Fraley RT: 从马铃薯内识别和确定雄蕊和孢子囊营养细胞组织特异基因的特征。 *Mol Gen Genet* 222(1):9-16, (June) 1990.
- Tague BW, Dickinson CD, Chrispeels MJ: 植物空泡蛋白植物血球凝集素的一个短区

- 靶向转化酶到酵母空泡。 *Plant Cell* 2(6):533-46,(June)1990.
- Tingey SV,Walker EL,Corruzzi GM: 豌豆谷氨酰胺合成酶基因编码在叶、根和结节内不同表达的独特多肽。 *EMBO J* 6 (1): 1-9, 1987.
- Ullah AH:来自曲霉菌 *ficuum* 的细胞外肌醇六磷酸酶的生产、快速纯化和水解特性。 *Prep Biochem* 18(4):443-458,1988.
- Ullah AH,Gibson DM: 来自曲霉菌 *ficuum* NRRL 3115 的细胞外肌醇六磷酸酶 (E.C.3.1.3.8): 纯化和特征描述。 *Prep Biochem* 17(1):63-91,1987.
- Van den Broeck G,Timko MP,Kausch AP,Cashmore AR, Van Montagu M,Herrera-Estrella L:通过融合到来自核糖体 1, 5-二磷酸羧化酶小亚单位的转运肽上, 将外部蛋白靶向到叶绿体。 *Nature* 313(6001):358-63,1985.
- Vasil IK,Vasil V:植物细胞和组织培养内的全能性和胚胎形成。 *In Vitro* 8(3):117-27,(Nov-Dec)1972.
- Vasil V,Vasil IK:从原生质和玉米原生质培养基上, 烟草和矮牵牛花植物的再生。 *In Vitro* 10:83-96,(Jul-Aug)1974.
- Von Heijne G:接近 N-末端 topogenic 蛋白序列的比较解剖。 *J Mol Biol* 189(1):239-42,1986.
- *Walter P,Blobel G.*Biochem Soc Symp* 47:183,1986.
- Wenzler H,Mignery G,Fisher L,Park W:在转基因烟草植物叶子中, 蔗糖调控的嵌合马铃薯块茎基因的表达。 *Plant Mol Biol* 13(4):347-54,1989.
- Wolter FP,Fritz CC,Willmitzer L,Schell J,Schreier PH: 茄属植物块茎中的 *rbcS* 基因: 在进化过程中保守转运肽和外显子移动。 *Proc Natl Acad Sci USA* 85(3):846-50,(Feb.)1988.
- Wong KK,Tan LU,Saddler JN:微生物中 β -1, 4-木聚糖酶的多样性: 功能和应用。 *Microbiol Rev* 52(3):305-17,(Sept.)1988.
- Yamada K 等: 农业和生物化学 32:1275-1282,1968.
- USPN 3,297,548; 1964 年 7 月 28 日归档; 1967 年 1 月 10 日发行。Ware JH,Bluff L,Shieh TK:酸性肌醇六磷酸酶的制备。
- USPN 4,946,778; 1989 年 1 月 19 日归档; 1990 年 8 月 7 日发行。Ladner RC,Bird RE,Hardman K:单一多肽链结合分子。
- EPO 120,516; 1984 年 2 月 21 日归档; 1984 年 10 月 3 日发行。Schilperoort RA,Hoekema A,Hooykaas RJJ:外源 DNA 掺入双子叶植物基因组的步骤; 土壤细菌膨胀细菌及其产生过程; 改变基因特性的植物和植物细胞; 制备方法。
- EPO 321,004; 1988 年 10 月 28 日归档; 1992 年 1 月 22 日发行。Vaara T,Vaara M,Simell M,Lehmussaari A,Caransa A:用新酶制剂浸泡谷类的步骤。
- IPN WO 91/05053; 1990 年 9 月 27 日归档; 1991 年 4 月 18 日发行。VanGorcom R 等: 微生物肌醇六磷酸酶的克隆和表达。

序列表

<110> 戴弗萨公司

<120> 重组细菌肌醇六磷酸酶及其应用

<130> DIVER1370W03

<140> 未知

<141> 2000-05-25

<150> 09/318,528

<151> 1999-05-25

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1323

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1323)

<400> 1

atg aaa gcg atc tta atc cca ttt tta tct ctt ctg att ccg tta acc	48
Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr	
1 5 10 15	
ccg caa tct gca ttc gct cag agt gag ccg gag ctg aag ctg gaa agt	96
Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser	
20 25 30	
gtg gtg att gtc agt cgt cat ggt gtg cgt gct cca acc aag gcc acg	144
Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr	
35 40 45	
caa ctg atg cag gat gtc acc cca gac gca tgg cca acc tgg ccg gta	192
Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val	
50 55 60	
aaa ctg ggt tgg ctg aca ccg cgn ggt ggt gag cta atc gcc tat ctc	240
Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu	
65 70 75 80	
gga cat tac caa cgc cag cgt ctg gta gcc gac gga ttg ctg gcg aaa	288
Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys	
85 90 95	
aag ggc tgc ccg cag tct ggt cag gtc gcg att att gct gat gtc gac	336
Lys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp	
100 105 110	
gag cgt acc cgt aaa aca ggc gaa gcc ttc gcc gcc ggg ctg gca cct	384
Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro	
115 120 125	

gac tgt gca ata acc gta cat acc cag gca gat acg tcc agt ccc gat	432
Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp	
130 135 140	
ccg tta ttt aat cct cta aaa act ggc gtt tgc caa ctg gat aac gcg	480
Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala	
145 150 155 160	
aac gtg act gac gcg atc ctc agc agg gca gga ggg tca att gct gac	528
Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp	
165 170 175	
ttt acc ggg cat cgg caa acg gcg ttt cgc gaa ctg gaa cgg gtg ctt	576
Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu	
180 185 190	
aat ttt ccg caa tca aac ttg tgc ctt aaa cgt gag aaa cag gac gaa	624
Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu	
195 200 205	
agc tgt tca tta acg cag gca tta cca tcg gaa ctc aag gtg agc gcc	672
Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala	
210 215 220	
gac aat gtc tca tta acc ggt gcg gta agc ctc gca tca atg ctg acg	720
Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr	
225 230 235 240	
gag ata ttt ctc ctg caa caa gca cag gga atg ccg gag ccg ggg tgg	768
Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp	
245 250 255	
gga agg atc acc gat tca cac cag tgg aac acc ttg cta agt ttg cat	816
Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His	
260 265 270	
aac gcg caa ttt tat ttg cta caa cgc acg cca gag gtt gcc cgc agc	864
Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser	
275 280 285	
cgc gcc acc ccg tta ttg gat ttg atc atg gca gcg ttg acg ccc cat	912
Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Met Ala Ala Leu Thr Pro His	
290 295 300	
cca ccg caa aaa cag gcg tat ggt gtg aca tta ccc act tca gta ctg	960
Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu	
305 310 315 320	
ttt att gcc gga cac gat act aat ctg gca aat ctc ggc ggc gca ctg	1008
Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu	
325 330 335	
gag ctc aac tgg acg ctt ccc ggt cag ccg gat aac acg ccg cca ggt	1056
Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly	
340 345 350	

ggt gaa ctg gtg ttt gaa cgc tgg cgt cgg cta agc gat aac agc cag 1104
 Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
 355 360 365
 tgg att cag gtt tcg ctg gtc ttc cag act tta cag cag atg cgt gat 1152
 Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp
 370 375 380
 aaa acg ccg ctg tca tta aat acg ccg ccc gga gag gtg aaa ctg acc 1200
 Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr
 385 390 395 400
 ctg gca gga tgt gaa gag cga aat gcg cag ggc atg tgt tcg ttg gca 1248
 Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala
 405 410 415
 ggt ttt acg caa atc gtg aat gaa gca cgc ata ccg gcg tgc agt ttg 1296
 Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 420 425 430
 aga tct cat cac cat cac cat cac taa 1323
 Arg Ser His His His His His His
 435 440

<210> 2
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌

<400> 2
 Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr
 1 5 10 15
 Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser
 20 25 30
 Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr
 35 40 45
 Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val
 50 55 60
 Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys
 85 90 95
 Lys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp
 100 105 110
 Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125
 Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
 130 135 140
 Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
 145 150 155 160
 Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
 165 170 175
 Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 180 185 190
 Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu
 195 200 205
 Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
 210 215 220

Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
 225 230 235 240
 Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp
 245 250 255
 Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
 260 265 270
 Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser
 275 280 285
 Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Met Ala Ala Leu Thr Pro His
 290 295 300
 Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu
 325 330 335
 Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly
 340 345 350
 Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
 355 360 365
 Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp
 370 375 380
 Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr
 385 390 395 400
 Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala
 405 410 415
 Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 420 425 430
 Arg Ser His His His His His His
 435 440

<210> 3
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物序列

<400> 3
 gtttctgaat tcaaggagga atttaaataa aagcgatctt aatcccatt 49

<210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物序列

<400> 4
 gtttctggat ccttacaac tgcacgccgg tac 33

说明书附图

图 1

(SEQ ID NO: 1-核苷酸序列和 SEQ ID NO: 2-氨基酸序列)
在肠埃希杆菌 B 肌醇六磷酸酶序列

1
 ATG AAA GCG ATC TTA ATC CCA TTT TTA TCT CTT CTG ATT CCG TTA ACC CCG
 Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr Pro
 CAA TCT GCA TTC GCT CAG AGT GAG CCG GAG CTG AAG CTG GAA AGT GTG GTG
 Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val
 ATT GTC AGT CGT CAT GGT GTG CGT GCT CCA ACC AAG GCC ACG CAA CTG ATG
 Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met
 CAG GAT GTC ACC CCA GAC GCA TGG CCA ACC TGG CCG GTA AAA CTG GGT TGG
 Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp
 CTG ACA CCG CGN GGT GGT GAG CTA ATC GCC TAT CTC GGA CAT TAC CAA CGC
 Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg
 CAG CGT CTG GTA GCC GAC GGA TTG CTG GCG AAA AAG GGC TGC CCG CAG TCT
 Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser
 GGT CAG GTC GCG ATT ATT GCT GAT GTC GAC GAG CGT ACC CGT AAA ACA GGC
 Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly
 GAA GCC TTC GCC GCC GGG CTG GCA CCT GAC TGT GCA ATA ACC GTA CAT ACC
 Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr
 CAG GCA GAT ACG TCC AGT CCC GAT CCG TTA TTT AAT CCT CTA AAA ACT GGC
 Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly
 GTT TGC CAA CTG GAT AAC GCG AAC GTG ACT GAC GCG ATC CTC AGC AGG GCA
 Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala
 GGA GGG TCA ATT GCT GAC TTT ACC GGG CAT CGG CAA ACG GCG TTT CGC GAA
 Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu
 CTG GAA CGG GTG CTT AAT TTT CCG CAA TCA AAC TTG TGC CTT AAA CGT GAG
 Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu
 AAA CAG GAC GAA AGC TGT TCA TTA ACG CAG GCA TTA CCA TCG GAA CTC AAG
 Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys
 GTG AGC GCC GAC AAT GTC TCA TTA ACC GGT GCG GTA AGC CTC GCA TCA ATG
 Val Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met
 CTG ACG GAG ATA TTT CTC CTG CAA CAA GCA CAG GGA ATG CCG GAG CCG GGG
 Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly
 TGG GGA AGG ATC ACC GAT TCA CAC CAG TGG AAC ACC TTG CTA AGT TTG CAT
 Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His

AAC GCG CAA TTT TAT TTG CTA CAA CGC ACG CCA GAG GTT GCC CGC AGC CGC
Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg

GCC ACC CCG TTA TTG GAT TTG ATC ATG GCA GCG TTG ACG CCC CAT CCA CCG
Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Met Ala Ala Leu Thr Pro His Pro Pro

CAA AAA CAG GCG TAT GGT GTG ACA TTA CCC ACT TCA GTA CTG TTT ATT GCC
Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala

GGA CAC GAT ACT AAT CTG GCA AAT CTC GGC GGC GCA CTG GAG CTC AAC TGG
Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp

ACG CTT CCC GGT CAG CCG GAT AAC ACG CCG CCA GGT GGT GAA CTG GTG TTT
Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe

GAA CGC TGG CGT CGG CTA AGC GAT AAC AGC CAG TGG ATT CAG GTT TCG CTG
Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu

GTC TTC CAG ACT TTA CAG CAG ATG CGT GAT AAA ACG CCG CTG TCA TTA AAT
Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn

ACG CCG CCC GGA GAG GTG AAA CTG ACC CTG GCA GGA TGT GAA GAG CGA AAT
Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn

GCG CAG GGC ATG TGT TCG TTG GCA GGT TTT ACG CAA ATC GTG AAT GAA GCA
Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala

CGC ATA CCG GCG TGC AGT TTG AGA TCT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA 1323
Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu Arg Ser His His His His His His End

图 2

pH/温度曲线和稳定性

