

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12N 15/52

C12N 9/00

C12N 15/63

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93121697.4

[45]授权公告日 1999年1月6日

[11]授权公告号 CN 1041535C

[22]申请日 93.12.3 [24]颁证日 98.11.14

[21]申请号 93121697.4

[30]优先权

[32]92.12.3 [33]AU [31]PL6206

[32]92.12.16 [33]AU [31]PL6380

[73]专利权人 友尼瑟驰有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

[72]发明人 托马斯·斯坦利·斯图尔特

玛丽亚·维加·弗洛里斯

威廉·詹姆斯·O·沙利文

审查员 47 24

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 刘国平

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 编码氨甲酰磷酸合成酶 II 的核苷酸序列

[57]摘要

本发明提供了编码恶性疟原虫氨甲酰磷酸合成酶 II 的核苷酸序列。氨甲酰磷酸合成酶 II 催化嘧啶从头生物合成途径的第一步定型和限速步骤。恶性疟原虫仅仅依赖于嘧啶从头生物合成,因为它不能补救嘧啶。而且认为成熟的人红细胞不需要嘧啶核酸。因此,该酶代表主要的化学治疗位点。本发明涉及编码氨甲酰磷酸合成酶 II 的序列在重组制备氨甲酰磷酸合成酶 II 中的用途,还涉及由该序列设计的反义分子、核糖酶及其他基因失活剂。

权 利 要 求 书

1、编码恶性疟原虫氨甲酰磷酸合成酶II的核酸分子，该核酸分子包括如表1中残基1-7176、或1-750、或751-1446、或1447-2070、或2071-3762、或3763-5571、或5572-7173、或1-3360、或2071-6666、或2071-7173所示序列或由于密码子简并而与上述序列有所不同的序列。

2、如权利要求1所述的核酸分子，其中该核酸分子包括如表1中-1225-7695所示序列或由于密码子简并而与上述序列有所不同的序列。

3、分离的多肽，该多肽包括如表1中1-2391、483-690、691-1254、1858-2391、1-1120、691-2222或691-2391所示的氨基酸序列。

4、一种根据权利要求1或2的核酸分子的mRNA序列设计的核酶。

5、如权利要求4所述的核酶，其根据表1中残基751-1446或3763-5571所示核酸序列的mRNA序列设计而成。

6、如权利要求1或2的核酸分子的反义寡核苷酸。

说 明 书

编码氨甲酰磷酸合成酶 II 的核苷酸序列

本发明涉及编码恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 的氨甲酰磷酸合成酶 II 的核苷酸序列, 用重组DNA技术生产该酶的方法, 以及该序列和酶在治疗学上的用途。

由于对传统药物具有抗性的人疟原虫、主要是恶性疟原虫的演化, 目前迫切需要开发新的治疗疟疾的化学治疗剂。对疫苗进行研究似乎是非常可能的替代方法。但是经过多年研究之后, 到目前为止尚未有临床可接受的产品。而与此同时, 抗蚊媒介昆虫的杀虫剂效力的下降却在增长。目前, 多于三分之二的世界人口—约5亿人—被认为生活在疟区 (Miller, 1989)。在世界卫生组织 (WHO) 所列世界10种最流行疾病中它排在第8位 (每年感染2亿7千万人口), 在10种最致命疾病中排在第9位, 每年夺取2百万以上生命 (Cox; 1991; Marshall, 1991)。尽管主要限于贫困国家, 但是目前在美国 (Marshall, 1991) 和澳大利亚 (Johnson, 1991) 都有报道, 而且旅行者疟疾病例不断增加 (Steffen 和 Behrens, 1992)。

疟原虫、恶性疟原虫及其宿主的比较生物化学研究表明许多代谢途径不同。这些区别之一就是该寄生虫仅仅依赖于嘧啶从头合成, 因为它不能补救预先形成的嘧啶 (Sherman, 1979)。而且认为成熟的人血红细胞不需要嘧啶核苷酸 (Gerro 和 O'Sulli

v a n , 1 9 9 0)。 主要努力方向是开发嘧啶生物合成途径的抑制剂(H a m m o n d 等人, 1985; S c o t t 等人, 1986; P r a p u n w a t t a n a 等人, 1988; Q u e e n 等人, 1990; K r u n h k r a i 等人, 1992), 进一步证实该途径作为化学治疗位置的可能性。可以预期目前对关键嘧啶酶的分子生物学研究不仅可以作为更好地理解寄生虫生物化学的有效工具, 也可以作为探索寄生虫与哺乳动物酶之间具体差异的有效工具。

谷氨酰胺依赖性氨甲酰磷酸合成酶(CSP II, EC 6. 3. 5. 5)催化真核生物的嘧啶从头生物合成途径的第一步定型和限速步骤(J o n e s , 1 9 8 0)。而且由于它催化涉及三个催化单元和七种底物及中间体这样一个复杂的反应, 从生物化学观点来看它是一种非常值得研究的酶。CPS II 与其他嘧啶酶的结构关系随不同生物体而改变, 这使其成为进行研究的一个好的主题。

可以从疟疾培养物得到的少量原料阻碍了分离足以进行分析量的纯蛋白质。而其固有的不稳定性更增加了纯化CPS的困难。用P . b e r g h e i (一种啮齿动物疟疾)粗提物进行研究显示了具有CPS活性的一种高分子量蛋白, 据推测它与A T C a s e 有关(H i l l 等人, 1981), 这种状况也发现于酵母中(M a k o f f 和R a d f o r d , 1 9 7 8)。然而, K r u n g k r a i 及其同事目前的分析(1990)测定了CPS II 和A T C a s e 各自在P . b e r g h a i 中的活性。尽管到目前的研究为止已经在恶性疟原虫中测得了CPS活性(R e y e s 等人, 1982), 但是未指出其大小, 也没有指出其在该途径中与其他酶键合。

CPS II 的谷氨酰胺依赖性活性可以分成两步: (1) 谷氨酰胺酶 (GLNase) 反应, 使谷氨酰胺 (Gln) 水解并将氨转移至氨甲酰磷酸合成酶的位点; 和 (2) 合成酶反应, 在该反应中从两分子三磷酸腺苷 (ATP)、碳酸氢盐和氨合成氨甲酰磷酸。第二种活性涉及三部分反应: (a) 碳酸氢盐被 ATP 活化; (b) 活化的羧基磷酸与氨反应形成氨甲酸盐; 和 (c) 氨甲酸盐的 ATP 依赖性磷酰化作用形成氨甲酰磷酸 (Powers 和 Meister, 1978)。因此, 在 CPS II 中有两个主要的区, 谷氨酰胺的酰胺转移酶区 (GAT) 和氨甲酰磷酸合成酶区 (CPS) 或简单合成酶区。谷氨酰胺酶区 (GLNase) 是 GAT 的亚区, 而在合成酶区中有两个 ATP—结合亚区。

考虑到 CPS 谷氨酰胺的酰胺转移酶区与其他酰胺转移酶之间的相似性, 已经提出这些亚单位由表示 GLNase 区的共同祖代基因 (=20 kDa) 趋异进化而产生, 而且 CPS GAT 区 (=42 kDa, 它包括仅存在于 CPS 中的推断结构区) 的特殊进化一定包括其他序列的融合和/或插入 (Werner 等人, 1985)。已经提出该哺乳动物 CPS I 基因的 GAT 可以通过在该祖代基因的 5' 末端与未知基因的简单基因融合来形成 (Nyunooya 等人, 1985)。

假定各种生物体较大合成酶区的基因进行了祖代激酶基因的基因复制, 得到具有相应两半的多肽 (Simmer 等人, 1990)。与大肠杆菌的亚单位结构和酵母的精氨酸特异性 CPS 不同, 有人提出编码 GAT 和合成酶区的基因进一步融合形成了对高级真核生物嘧啶生物合成具有特异性的单基因。相反, Simmer 及其同事 (1990) 提出精氨酸特异性 CPS (象酵母中的 *cpa1* 和 *c*

p a 2 一样)以及大鼠线粒体CPS I 是由噬啮嵌合体消融而产生的。

本发明人已经分离出了编码恶性疟原虫CPS II 酶(p f C P S II)的完整基因, 并确定了其特征。本文报道的是包括5' 和3' 未转译区的cDNA序列。如此, 本发明人已经识别了各个谷氨酰胺酶和合成酶区。与酵母、D. d i s c o i d e u m 和哺乳动物中的CPS II 基因不同, 没有证据表明与随后的酶, 精氨酸转氨甲酰酶(ATCase)键合。这与H i l l 等人(1981)有关P. b e r g h e i 酶的报告形成对照。然而本发明人已经发现了在天然恶性疟原虫基因中的两种大插入物, 而这在从前未描述过。

因此, 本发明第一方面在于编码恶性疟原虫氨甲酰磷酸合成酶II的核酸分子, 该核酸分子包括实质上如表1中1—7176、或1—750、或751—1446、或1447—2070、或2071—3762、或3763—5571、或5572—7173、或1—3360、或2071—6666、或2071—7173所示序列, 或功能等同序列。

在本发明优选的具体方案中, 该核酸分子包括表1中—1225—7695所示的序列或功能等同序列。

本发明第二方面在于分离的多肽, 该多肽包括实质上如表1中1—2391、483—690、691—1254、1858—2391、1—1120、691—2222或691—2391所示的氨基酸序列。

本文所用术语“功能等同序列”是指该核酸序列中包括了少数变化, 这种变化因密码简并所引起, 而不会导致该序列编码不同的多肽。

本发明第三方面在于生产恶性疟原虫氨甲酰磷酸合

成酶 II 的方法，该方法包括在本发明第一方面的核酸序列能够表达的条件下培养用该核酸分子转化的细胞，并回收该表达的氨甲酰磷酸合成酶 II。

该细胞可以是细菌或真核细胞。优选细胞的例子包括大肠杆菌、酵母和 *Dictyostelium discoideum*。

正如本领域专业人员所容易理解的，阐明 CPS II 的核苷酸序列使得产生一系列治疗剂成为可能。这些包括反义核苷酸、核酶以及用其他途径使 RNA 和 DNA 序列成为靶向，例如形成三联体。

正如可以从表 1 中所列序列看出的，该恶性疟原虫 CPS II 基因包括在其他氨甲酰磷酸合成酶基因中未发现的两个插入序列。第一个插入序列分离出了推断结构区和谷氨酰胺酶区，而第二个插入序列分离出了两个该合成酶亚单位的 ATP 结合亚区 CPS a 和 CPS b。

表 1. 恶性疟原虫氨甲酰磷酸合成酶 II 基因的核苷酸与推断的氨基酸序列

-1225	GAATTCCTTCAGCCAAAAAATGACAACGCAAATTTTAAGAAAAGAAAAACAATCGACT	-1166
-1165	CGTCTTTGAATGAGGTTAGAAATTCGATACGTGAAAGGGACTTAAGAAGGCTTAACAGAG	-1106
-1105	AAAAGAGTAAATCTTATAAGCATTGGAAGGAAAAATAATAAAATAAAAAATAAAAAAG	-1046
-1045	ATAAAAAATATTTATATTTGATATGTAGTATATATAATGATTATTCATATTAATAACATA	-986
-985	GATAAAAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTATATTTATTAACAATACATTTAAGTTA	-926
-925	TTTTATGTTTGTGTGTTTCAT	-866
-865	TTGTTTATAAAATTACTTGAAATATAAACTTATTAATATATTTCCAATTAATATGAATA	-806
-805	CAATTATTAATATTTTGATGTGTACACATTAATATAGTTTTACACTTCTTATAATAAAAC	-746
-745	CATCCTATATATTATACACAATATATAATACTCCCAATATTGTGGTTCCTATAATTTTA	-686
-685	TTTATATATTTATTTATTAATTTATTCATTTATTTATTTTTTTTCTTAGTTTATAAAATA	-626
-625	GTAATTCCTACTAATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAATT	-566
-565	TACATATGAAAAATGAACTTGTATATGTAAATTTATAAATATTTTAAACATAAATATAAA	-506
-505	TGTATAAAAAAAAAAAGAAAAATGGGAAAAATAATATAGATATATATATAAATATATA	-446
-445	TATATATATAATTATTGGGGATATTCTCIGAATCATAGGTCTTAAACAGTTTATTCTTT	-386
-385	TAACATCACAAAGTTGTTATTTAAAAGTATATATATCTTATTGGTTCCTATATAAACTAT	-326
-325	AGTATTCTATAATATATTCTGTATATTTCAATTTATCATTTGTAAGCAATCCCTATTTAT	-266
-265	TATAATTATTATTTTTTTTTTTTATAAAAGAGGTATAAAACAGTTTATTCAATTTTTTTCC	-206
-205	TAAAGGAGCAACCTTCAGTCAATTTACATTTCCACCGGTTGGTTGGCACAACATAATGT	-146
-145	TACAGCTAAAAAAGAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATATATAT	-86
-85	ATATATATATATATACATAATATGTACAATGCTACCATACAAGTATATAAATTTTTCAAC	-26
-25	ATTGTTGTGATGTTGCATTTTTCTT	-1

表 1 (续)

1	ATGTATATTTCTTTTAAATATAATTTATATATATATATATATATATATATATATATATTT	60
1	M Y I S F K Y N L Y I Y I Y I Y I Y I F	20
61	GTTCTTATAGATTTTAAACAGTTGGGAGGTTAATTCTTGAAGATGGTAACGAATTTGT	120
21	V L I D F K T V G R L I L E D G N E F V	40
121	GGGTACAGTGTAGGTTACGAAGGGTGTAAGGAAATAATAGTATATCATGTCATAAGGAG	180
41	G Y S V G Y E G C K G N N S I S C H K E	60
181	TATAGAAATATTATTAATAATGATAATAGCAAGAATAGTAATAATTCATTTTGTAAATAAT	240
61	Y R N I I N N D N S K N S N N S F C N N	80
241	GAAGAAAACAATTTGAAAGATGATTTATTATATAAAAAATAGTCGATTAGAAAATGAAGAT	300
81	E E N N L K D D L L Y K N S R L E N E D	100
301	TTTATTGTTACAGGTGAAGTTATATTTAATACAGCTATGGTTGGATATCCTGAAGCTTTA	360
101	F I V T G E V I F N T A M V G Y P E A L	120
361	ACGGACCCAAGTTATTTTGGTCAAATATTAGTTTTAACATTTTCCTTCTATTGGTAATTAT	420
121	T D P S Y F G Q I L V L T F P S I G N Y	140
421	GGTATTGAAAAAGTAAAACATGATGAAACGTTTGGATTAGTACAAAATTTTGAAGTAAT	480
141	G I E K V K H D E T F G L V Q N F E S N	160
481	AAAATTCAAGTACAAGGTTTAGTTATTTGTGAATATTCGAAGCAATCATATCATTACAAT	540
161	K I Q V Q G L V I C E Y S K Q S Y H Y N	180
541	TCTTATATTACCTTAAGTGAATGGTTAAAGATTTATAAAAATTCATGTATAGGTGGTATA	600
181	S Y I T L S E W L K I Y K I P C I G G I	200
601	GATACAAGAGCCTTAACAAAACCTTTTAAGAGAAAAAGGTAGTATGTTAGGTAAAATAGTT	660
201	D T R A L T K L L R E K G S M L G K I V	220
661	ATATATAAAAACAGACAACATATTAATAAATTATATAAAGAAATTAATCTTTTTGATCCT	720
221	I Y K N R Q H I N K L Y K E I N L F D P	240
721	GGTAATATAGATACTCTAAAATATGTATGTAATCATTTTATACGTGTTATTAAGTTGAAT	780
241	G N I D T L K Y V C N H F I R V I K L N	260

表 1 (续)

781	AATATTACATATAATTATAAAAAATAAGGAAGAATTTAATTATACCAATGAAATGATTACT	840
261	<u>N I T Y N Y K N K E E F N Y T N E M I T</u>	280
841	AATGATTCTTCAATGGAAGATCATGATAATGAAATTAATGGTAGTATTTCTAATTTTAAT	900
281	<u>N D S S M E D H D N E I N G S I S N F N</u>	300
901	AATTGTCCAAGTATCTCTAGTTTTGATAAAAGTGAATCGAAAAATGTTATTAATCATACA	960
301	<u>N C P S I S S F D K S E S K N V I N H T</u>	320
961	TTGTTAAGAGATAAAATGAACCTAATAACTTCATCTGAAGAATATCTGAAAGATCTTCAT	1020
321	<u>L L R D K M N L I T S S E E Y L K D L H</u>	340
1021	AATTGTAATTTTAGTAATAGTAGTGATAAAAAATGATTCTTTTTTTAAGTTATATGGTATA	1080
341	<u>N C N F S N S S D K N D S F F K L Y G I</u>	360
1081	TGTGAATATGATAAATATTTAATTGACCTTGAAGAAAATGCTAGCTTTTCATTATAATAAT	1140
361	<u>C E Y D K Y L I D L E E N A S F H Y N N</u>	380
1141	GTAGATGAATATGGATATTATGATGTTAATAAAAAATACAAATATTCTATCTAATAATAAA	1200
381	<u>V D E Y G Y Y D V N K N T N I L S N N K</u>	400
1201	ATAGAACAAAACAACAATAACGAAAATAACAAAATAACAAAATAACAACAATAACGAG	1260
401	<u>I E Q N N N N E N N K N N K N N N N N E</u>	420
1261	GTTGATTATATAAAGAAAGATGAGGATAATAATGTCAATAGTAAGGTCTTTTATAGCCAA	1320
421	<u>V D Y I K K D E D N N V N S K V F Y S Q</u>	440
1321	TATAATAATAATGCACAAAATAATGAACATACCGAATTTAATTTAAATAATGATTATTCT	1380
441	<u>Y N N N A Q N N E H T E F N L N N D Y S</u>	460
1381	ACTTATATTAGAAAAGAAAATGAAAATGAAGAATTCCTTAATTTGGTAAACAAAAGAAAA	1440
461	<u>T Y I R K K M K N E E F L N L V N K R K</u>	480
1441	GTAGACCATAAAGAAAAAATTATTGTTATTGTTGATTGTGGTATTAATAAATAGTATAATC	1500
481	<u>V D H K E K I I V I V D C G I K N S I I</u>	500
1501	AAAAATTTAATAAGACACGGTATGGATCTTCCATTAACATATATTATTGTACCTTATTAT	1560
501	<u>K N L I R H G M D L P L T Y I I V P Y Y</u>	520

表 1 (续)

1561	TACAATTTAATCATATAGATTATGATGCAGTTCTTTTATCTAATGGTCCTGGAGATCCT	1620
521	Y N F N H I D Y D A V L L S N G P G D P	540
1621	AAAAAGTGTGATTTTCCTTATAAAAAATTTGAAAGATAGTTAACAAAAATAAAATTATA	1680
541	K K C D F L I K N L K D S L T K N K I I	560
1681	TTTGGTATTTGTTTAGGTAATCAACTATTAGGTATATCATTAGGTTGTGACACATATAAA	1740
561	F G I C L G N Q L L G I S L G C D T Y K	580
1741	ATGAAATATGGTAATAGAGGTGTTAATCAACCCGTAATACAATTAGTAGATAATATATGT	1800
581	M K Y G N R G V N Q P V I Q L V D N I C	600
1801	TACATTACCTCACAAAATCATGGATACTGTTTAAAGAAAAAATCAATTTTAAAAAGAAAA	1860
601	Y I T S Q N H G Y C L K K K S I L K R K	620
1861	GAGCTTGGGATTAGTTATATAAATGCTAATGATAAATCTATAGAAGGTATTTACATAAA	1920
621	E L A I S Y I N A N D K S I E G I S H K	640
1921	AATGGAAGATTTTATAGTGTCCAGTTTCATCCTGAGGGTAATAATGGTCCTGAAGATACA	1980
641	N G R F Y S V Q F H P E G N N G P E D T	660
1981	TCATTTTATTTAAGAATTTTCTTTTAGATATCTTTAATAAGAAAAACAATATAGAGAA	2040
661	S F L F K N F L L D I F N K K K Q Y R E	680
2041	TATTTAGGATATAATATTATTTATATAAAAAAGAAAGTGCTTCTTTTAGGTAGTGGTGGT	2100
681	Y L G Y N I I Y I K K K V L L L G S G G	700
2101	TTATGTATAGGACAAGCAGGAGAATTCGATTATTCAGGAACACAAGCAATTAAAAGTTTA	2160
701	L C I G Q A G E F D Y S G T Q A I K S L	720
2161	AAAGAATGTGGTATATATGTTTATATTAGTTAATCCTAACATAGCAACTGTTCAAACATCA	2220
721	K E C G I Y V I L V N P N I A T V Q T S	740
2221	AAAGGTTTGGCAGATAAGGTATACTTTTTACCAGTTAATTGTGAATTTGTAGAAAAAATT	2280
741	K G L A D K V Y F L P V N C E F V E K I	760
2281	ATTA AAAAGGAAAAACCTGATTTTATTTTATGTACATTTGGTGGTCAGACAGCTTTAAAT	2340
761	I K K E K P D F I L C T F G G Q T A L N	780

表 1 (续)

2341	TGTGCTTTAATGTTAGATCAAAAAAAAAAGTATTGAAAAAGAATAATTGTCAATGTTTAGGT	2400
781	C A L M L D Q K K V L K K N N C Q C L G	800
2401	ACATCTTTAGAATCTATAAGAATAACAGAAAATAGAACATTATTTGCTGAAAAATTA AAA	2460
801	T S L E S I R I T E N R T L F A E K L K	820
2461	GAAATTAATGAAAGAATAGCTCCATATGGTAGTGCAAAAAATGTTAATCAAGCTATTGAT	2520
821	E I N E R I A P Y G S A K N V N Q A I D	840
2521	ATAGCTAATAAAATAGGATATCCAATATTAGTACGTACAACATTTTCGTTAGGAGGATTA	2580
841	I A N K I G Y P I L V R T T F S L G G L	860
2581	AATAGTAGTTTCATAAATAATGAAGAAGAACTTATCGAAAAATGTAATAAAATATTTTAA	2640
861	N S S F I N N E E E L I E K C N K I F L	880
2641	CAAAGTATAATGAAATATTTATAGATAAAATCATTACAAGGATGGAAAGAAATAGAATAT	2700
881	Q T D N E I F I D K S L Q G W K E I E Y	900
2701	GAATTATTAAGAGATAATAAAAAATAATTGTATAGCTATATGTAATATGGAAATATAGAT	2760
901	E L L R D N K N N C I A I C N M E N I D	920
2761	CCATTAGGTATACATACAGGAGATAGTATAGTTGTTGCACCTTCACAAACATTAAGTAAT	2820
921	P L G I H T G D S I V V A P S Q T L S N	940
2821	TATGAATATTATAAATTTAGAGAAAATAGCATTAAAGGTAATTACACATTTAAATATTATA	2880
941	Y E Y Y K F R E I A L K V I T H L N I I	960
2881	GGAGAATGTAATATACAATTTGGTATAAATCCACAAACAGGAGAATATTGTATTATTGAA	2940
961	G E C N I Q F G I N P Q T G E Y C I I E	980
2941	GTTAATGCTAGGCTTAGTAGAAAGTTCAGCATTAGCTTCTAAAGCTACTGGTTATCCACTT	3000
981	V N A R L S R S S A L A S K A T G Y P L	1000
3001	GCTTATATATCAGCAAAAAATAGCCTTGGGATATGATTTGATAAGTTTAAAAAATAGCATA	3060
1001	A Y I S A K I A L G Y D L I S L K N S I	1020
3061	ACTAAAAAACAACCTGCCTGTTTTGAACCCTCTCTAGATTACATTACAACAAAAATACCA	3120
1021	T K K T T A C F E P S L D Y I T T K I P	1040

表 1 (续)

3121	CGATGGGATTTAAATAAAATTTGAGTTTGCTTCTAATACAATGAATAGTAGTATGAAAAGT	3180
1041	R W D L N K F E F A S N T M N S S M K S	1060
3181	GTAGGAGAAGTTATGTCTATAGGTAGAACCTTTGAAGAATCTATACAAAAATCTTTAAGA	3240
1061	V G E V M S I G R T F E E S I Q K S L R	1080
3241	TGTATTGATGATAATTATTTAGGATTTAGTAATACGTATTGTATAGATTGGGATGAAAAG	3300
1081	C I D D N Y L G F S N T Y C I D W D E K	1100
3301	AAAATTATTGAAGAATTAATAATCCATCACCAAAAAGAATTGATGCTATACATCAAGCT	3360
1101	K I I E E L K N P S P K R I D A I H Q A	1120
3361	TTCCATTTAAATATGCCTATGGATAAAATACATGAGCTGACACATATTGATTATTGGTTC	3420
1121	F H L N M P M D K I H E L T H I D Y W F	1140
3421	TTACATAAATTTTATAATATATAATTTACAAAATAAGTTGAAAACGTTAAAATTAGAG	3480
1141	L H K F Y N I Y N L Q N K L K T L K L E	1160
3481	CAATTATCTTTTAATGATTTGAAGTATTTTAAGAAGCATGGTTTTAGTGATAAGCAAATA	3540
1161	Q L S F N D L K Y F K K H G F S D K Q I	1180
3541	GCTCACTACTTATCCTTCAACACAAGCGATAATAATAATAATAATAATAATATTAGCTCA	3600
1181	A H Y L S F N T S D N N N N N N N N I S S	1200
3601	TGTAGGTTACAGAAAATGATGTTATGAAATATAGAGAAAAGCTAGGATTATTTCCACAT	3660
1201	C R V T E N D V M K Y R E K L G L F P H	1220
3661	ATTAAAGTTATTGATACCTTATCAGCCGAATTCGGGCTTTAACTAATTATTATATTTA	3720
1221	I K V I D T L S A E F P A L T N Y L Y L	1240
3721	ACTTATCAAGGTCAAGAACATGATGTTCTCCATTAAATATGAAAAGGAAAAAGATATGC	3780
1241	T Y Q G Q E H D V L P L N M <u>K R K K I C</u>	1260
3781	ACGCTTAATAATAAACGAAATGCAAATAAGAAAAAAGTCCATGTCAAGAACCACTTATAT	3840
1261	<u>T L N N K R N A N K K K V H V K N H L Y</u>	1280
3841	AATGAAGTAGTTGATGATAAGGATACACAATTACACAAAAGAAAATAATAATAATAATAAT	3900
1281	<u>N E V V D D K D T Q L H K E N N N N N N</u>	1300

表 1 (续)

3901	ATGAATTCTGGAATGTAGAAAATAAATGTAATTGAATAAAGAATCCTATGGCTATAAT	3960
1301	<u>M N S G N V E N K C K L N K E S Y G Y N</u>	1320
3961	AATTCTTCTAATTGTATCAATACAAATAATATTAATATAGAAAATAATATTTGTCATGAT	4020
1321	<u>N S S N C I N T N N I N I E N N I C H D</u>	1340
4021	ATATCTATAAAACAAAAATATAAAAGTTACAATAAACAATTCCAATAATTCTATATCGAAT	4080
1341	<u>I S I N K N I K V T I N N S N N S I S N</u>	1360
4081	AATGAAAATGTTGAAACAAACTTAAATTGTGTATCTGAAAGGGCCGGTAGCCATCATATA	4140
1361	<u>N E N V E T N L N C V S E R A G S H H I</u>	1380
4141	TATGGTAAAGAAGAAAAGAGTATAGGATCTGATGATACAAATATTTTAAGTGCACAAAAT	4200
1381	<u>Y G K E E K S I G S D D T N I L S A Q N</u>	1400
4201	TCAAATAATAACTTTTCATGTAATAATGAGAATATGAATAAAGCAAACGGTTGATGTTAAT	4260
1401	<u>S N N N F S C N N E N M N K A N V D V N</u>	1420
4261	GTACTAGAAAATGATACGAAAAAACGAGAAGATATAAATACTACAACAGTATTTATGGAA	4320
1421	<u>V L E N D T K K R E D I N T T T V F M E</u>	1440
4321	GGTCAAAATAGTGTATTATAATAATAAGAATAAAGAGAATAGTTCITTTATTGAAAGGTGAT	4380
1441	<u>G Q N S V I N N K N K E N S S L L K G D</u>	1460
4381	GAAGAAGATATTGTGATGGTAAATTTAAAAAAGGAAAATAATTATAATAGTGAATTAAT	4440
1461	<u>E E D I V M V N L K K E N N Y N S V I N</u>	1480
4441	AATGTAGATTGTAGGAAAAAGGATATGGATGGAAAAATATAAATGATGAATGTAAAACA	4500
1481	<u>N V D C R K K D M D G K N I N D E C K T</u>	1500
4501	TATAAGAAAAATAAATAAAGATATGGGATTAATAATAATATAGTAGATGAGTTATCC	4560
1501	<u>Y K K N K Y K D M G L N N N I V D E L S</u>	1520
4561	AATGGAACATCACATTCAACTAATGATCATTATATTAGATAATTTAATACATCAGAT	4620
1521	<u>N G T S H S T N D H L Y L D N F N T S D</u>	1540
4621	GAAGAAATAGGGAATAATAAAAAATATGGATATGTAITTTATCTAAGGAAAAAAGTATATCT	4680
1541	<u>E E I G N N K N M D M Y L S K E K S I S</u>	1560

表 1 (续)

4681	AATAAAAACCCTGGTAATTCCTTATTATGTTGTAGATTCCGTATATAATAATGAATACAAA	4740
1561	<u>N K N P G N S Y Y V V D S V Y N N E Y K</u>	1580
4741	ATTAATAAGATGAAAGAGTTAATAGATAACGAAAATTTAAATGATGAATATAATAATAAT	4800
1581	<u>I N K M K E L I D N E N L N D E Y N N N</u>	1600
4801	GTTAATATGAATTGTTCTAATTATAATAATGCTAGTGCATTTGTAATGGAAAGGATAGA	4860
1601	<u>V N M N C S N Y N N A S A F V N G K D R</u>	1620
4861	AATGATAATTTAGAAAATGATTGTATTGAAAAAATATGGATCATAACATAACAAACATTAT	4920
1621	<u>N D N L E N D C I E K N M D H T Y K H Y</u>	1640
4921	AATCGTTTAAACAATCGTAGAAGTACAAATGAGAGGATGATGCTTATGGTAAACAATGAA	4980
1641	<u>N R L N N R R S T N E R M M L M V N N E</u>	1660
4981	AAAGAGAGCAATCATGAGAAGGGCCATAGAAGAAATGGTTTAAATAAAAAAATAAAGAA	5040
1661	<u>K E S N H E K G H R R N G L N K K N K E</u>	1680
5041	AAAAATATGGAAAAAATAAGGGAAAAAATAAAGACAAAAAGAATTATCATTATGTTAAT	5100
1681	<u>K N M E K N K G K N K D K K N Y H Y V N</u>	1700
5101	CATAAAAGGAATAATGAATATAATAGTAACAATATTGAATCGAAGTTTAAATAATTATGTT	5160
1701	<u>H K R N N E Y N S N N I E S K F N N Y V</u>	1720
5161	GATGATATAAATAAAAAAGAATATTATGAAGATGAAAATGATATATATTATTTTACACAT	5220
1721	<u>D D I N K K E Y Y E D E N D I Y Y F T H</u>	1740
5221	TCGTCACAAGGTAACAATGACGATTTAAGTAATGATAATTATTTAAGTAGTGAAGAATTG	5280
1741	<u>S S Q G N N D D L S N D N Y L S S E E L</u>	1760
5281	AATACTGATGAGTATGATGATGATTATTATTATGATGAAGATGAAGAAGATGACTATGAC	5340
1761	<u>N T D E Y D D D Y Y Y D E D E E D D Y D</u>	1780
5341	GATGATAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGGGAGGATGAGGAGGATAATGAT	5400
1781	<u>D D N D D D D D D D D G E D E E D N D</u>	1800
5401	TATTATAATGATGATGGTTATGATAGCTATAATTCCTTATCATCTTCAAGAATATCAGAT	5460
1801	<u>Y Y N D D G Y D S Y N S L S S S R I S D</u>	1820

表 1 (续)

5461	GTATCATCTGTTATATATATTCAGGGAACGAAAATATATTTAATGAAAAATATAATGATATA	5520
1821	<u>V S S V I Y S G N E N I F N E K Y N D I</u>	1840
5521	GGTTTTAAAAATAATCGATAATAGGAATGAAAAAGAGAAAGAGAAAAAGAAATGTTTTATT	5580
1841	<u>G F K I I D N R N E K E K E K K K C F I</u>	1860
5581	GTATTAGGTTGTGGTTGTTATCGTATTGGTAGTTCGTAGAAATTTGATTGGAGTGCTATA	5640
1861	V L G C G C Y R I G S S V E F D W S A I	1880
5641	CATTGTGTAAAGACCATAAGAAAATTAACCATAAAGCTATATTAATAAATTGTAACCCA	5700
1881	H C V K T I R K L N H K A I L I N C N P	1900
5701	GAAACTGTAAGTACAGATTATGATGAAAGTGATCGTCTATATTTTGATGAAATAACAACA	5760
1901	E T V S T D Y D E S D R L Y F D E I T T	1920
5761	GAAGTTATAAAATTTATATATAACTTTGAAAATAGTAATGGTGTGATTATAGCTTTTGGT	5820
1921	E V I K F I Y N F E N S N G V I I A F G	1940
5821	GGACAAACATCAAATAATTTAGTATTTAGTTTTATATAAAAATAATGTAAATATATTAGGA	5880
1941	G Q T S N N L V F S L Y K N N V N I L G	1960
5881	TCAGTGCACAAAGTGTGATTGTTGTGAAAATAGGAATAAATTTCCGCACTTATGTGATT	5940
1961	S V H K V L I V V K I G I N F R T Y V I	1980
5941	CTTAAAATTGATCAACCGAAATGGAATAAATTTACAAAATTATCCAAGGCTATACAATTT	6000
1981	L K I D Q P K W N K F T K L S K A I Q F	2000
6001	GCTAATGAGGTAAAATTTCCCTGTATTAGTAAGACCATCGTATGTATTATCTGGTGCAGCT	6060
2001	A N E V K F P V L V R P S Y V L S G A A	2020
6061	ATGAGAGTTGTAAATTGTTTTGAAGAATTA AAAA ACTTTTTAATGAAGGCAGCTATTGTT	6120
2021	M R V V N C F E E L K N F L M K A A I V	2040
6121	AGTAAAGATAATCCTGTTGTAATATCAAAAATTTATTGAGAATGCTAAAGAAATAGAAATA	6180
2041	S K D N P V V I S K F I E N A K E I E I	2060
6181	GATTGTGTTAGTAAAATGGTAAAATAATTAATTATGCTATATCTGAACATGTTGAAAAT	6240
2061	D C V S K N G K I I N Y A I S E H V E N	2080

表 1 (续)

6241	GCTGGTGTACATTTCAGGTGATGCAACATTAATATTACCTGCACAAAATATATATGTTGAA	6300
2081	A G V H S G D A T L I L P A Q N I Y V E	2100
6301	ACACATAGGAAAATAAAGAAAATATCCGAAAAGATTTCAAAATCATTAAATATATCTGGT	6360
2101	T H R K I K K I S E K I S K S L N I S G	2120
6361	CCATTTAATATACAATTTATATGTCATCAAAAATGAAATAAAAATTATTGAATGTAATTTA	6420
2121	P F N I Q F I C H Q N E I K I I E C N L	2140
6421	AGAGCATCTAGAACTTTTCCATTTATATCAAAAAGCTCTAAATCTAAACTTTATAGATTTA	6480
2141	R A S R T F P F I S K A L N L N F I D L	2160
6481	GCTACAAGGATATTAATGGGTTATGACGTCAAACCAATTAATATATCATTAAATTGATTTA	6540
2161	A T R I L M G Y D V K P I N I S L I D L	2180
6541	GAATAFACAGCTGTAAAAGCACCGATTTTCTCATTAAATAGATTACATGGATCAGATTGT	6600
2181	E Y T A V K A P I F S F N R L H G S D C	2200
6601	ATACTAGGTGTAGAAATGAAATCTACAGGTGAAGTAGCATGTTTTGGTTTAAATAAATAT	6660
2201	I L G V E M K S T G E V A C F G L N K Y	2220
6661	GAAGCTTTATTAATAATCATTAAATAGCTACAGGTATGAAGTTACCCAAAAAATCAACTT	6720
2221	E A L L K S L I A T G M K L P K K S I L	2240
6721	ATAAGTATTAATAAATTTAAATAATAAATTAGCTTTTGAAGAACCGTTCCAATTATTATTT	6780
2241	I S I K N L N N K L A F E E P F Q L L F	2260
6781	TTAATGGGATTTACAATATATGCGACTGAAGGTACGTATGATTTCTACTCTAAATTTTIA	6840
2261	L M G F T I Y A T E G T Y D F Y S K F L	2280
6841	GAATCTTTAATGTTAATAAAGGTTCTAAATTTTCATCAAAGACTTATTAAGTTTCATAAT	6900
2281	E S F N V N K G S K F H Q R L I K V H N	2300
6901	AAAAATGCAGAAAATATATCACCAAATACAACAGATTTAATTATGAATCATAAAGTTGAA	6960
2301	K N A E N I S P N T T D L I M N H K V E	2320
6961	ATGGTTATTAATATAACTGATACATTAATAAACAAGGTTAGTTCAAATGGTTATAAATTT	7020
2321	M V I N I T D T L X T K V S S N G Y K I	2340

表 1 (续)

7021	AGAAGATTAGCATCAGATTTCCAGGTTCCITTAATAACTAATATGAAACTTTGTTCTCTT	7080
2341	R R L A S D F Q V P L I T N M K L C S L	2360
7081	TTTATTGACTCATTATATAGAAAATTCTCAAGACAAAAGGAAAGAAAATCATTCTATACC	7140
2361	F I D S L Y R K F S R Q K E R K S F Y T	2380
7141	ATAAAGAGTTATGACGAATATATAAGTTTGGTATAA	7176
2381	I K S Y D E Y I S L V *	2392
7177	GCAAGAAATTATTCAATAAAATTCGATTTAACACTTATTTATGTATTTATTAACCTTC	7236
7237	ATTCCATAACAACATGAAAAGTATAAATATATAAATAGTAATATATAATATATAATATAT	7296
7297	ATATATATATATATATATATATATATTTATTTATTTAATTATATTTACGTTTAAATATTAATAA	7356
7357	ATGTTTTTATTAATATGATCATTAAATTTATATTGATTTATTTTTTTATAAATTTTTGTT	7416
7417	ATATATACAAATTTTATTTATTCACTCATATGTATAAACCAAATGGTTTTTTCAATTTA	7476
7477	CAAATAATTTTATAATTTTAATAAATTTATTAATTATAAAAAAATAAAAAATATATAAAC	7536
7537	ATTAAAATGTATAAATTCITTTAATTATATAATAATTTATAAATGTTATGATTTTTTTAA	7596
7597	AAAATTCAACGAAAAAAAAAGAGGAAGTATATACAAAAGGGACTATATATATGTATATA	7656
7657	TATATATATATATATATGTTTTTTTTCCITATTCTAGA	7695

GAT区由两个亚区组成:推断的结构区(1—750)和谷氨酰胺酶区(1447—2070)。这两个亚区被第一个插入序列(751—1446, 有下划线的)分开。合成酶亚单位的两个ATP结合亚区CPSa (2071—3762)和CPSb (5572—7173)被第二个插入序列(3763—5571, 有下划线的)分开。

由于在其他氨甲酰磷酸合成酶基因中未发现这些插入序列, 因此它们代表治疗的主要目标, 包括但不限于反义核苷酸、核酶和形成核苷酸的三联体, 因为降低了与基因宿主同源染色体进行有害反应的可能性。

已知反义RNA分子适用于调节细胞内的基因表达。与部分CPS II互补的反义RNA分子可以从CPS II序列产生。这些反义分子可以用作检测是否细胞中存在CPS II基因的诊断探针, 也可以用作调节CPS II基因表达的治疗剂。用CPS II序列制备的反义核苷酸包括与CPS II mRNA互补并能干扰其体内功能的核苷酸和含有恰好能在活细胞内转录以产生反义核苷酸的CPS II序列成分的基因。该基因可以包括细胞、病毒、病原体信使mRNA(聚合酶II)或结构RNA基因(聚合酶I和III)的启动子成分或合成启动子成分。在“基因调节:反义RNA和DNA的生物学”(R. P. Erickson和J. G. Izant, Raven Press 1992)中回顾了反义设计。还可参见US5208149, 其中包括有关反义核苷酸设计的更多例子。这些参考文献的说明书均引入本文作为参考。

本文所用术语“核苷酸”包括但不限于所有天然产生的脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸以及任何核苷酸类似物的寡聚物。核苷酸类似物包括所有能与另一个核苷酸形成序列特异性复合物(例如双链核酸分子或异源双链

核酸分子)的化合物(包括甲基膦酸类或硫代磷酸类),而且它可以具有有利的扩散或稳定性质。该核苷酸的定义包括通过磷酸二酯键、肽键或任何其他共价键连接的天然碱基或类似碱基。这些核苷酸可以通过在活细胞中活体内的任何结合来合成、体外酶促合成或化学合成。

适用于调节CPS II基因表达的核酶包括具有专一性和催化区的CPS II序列以促使CPS II mRNA 体外或体内分裂的核苷酸。该催化区包括锤头、发夹、 δ -病毒成分、核糖体RNA基因内区及其衍生物。有关核酶设计的更多资料可见于下列文献:Haseloff, J. & Gerlach, W. L. (1988) *Nature* 334, 585; Kruger, K, Grabowski, P. J, Zaugg, A. J, Sands, J, Gottschling, D. E. & Cech, T. R (1982) *Cell* 31, 147; 国际专利申请WO 88/04300, US4987071和US5254678。这些参考文献的说明书均引入本文作为参考。该催化成分可以增强通过促进降解或一些其他机理进行的CPS II靶mRNA的人工调节。

三螺旋寡核苷酸可以用于抑制从基因组转录。本文对CPS II基因提出的给定序列将能够设计寡核苷酸,它们将形成三联体,因而抑制CPS II基因的转录。有关适用于三联体形成的寡核苷酸产生的资料可见于Griffin等人的*Science* 245:967-971 (1989), 该参考文献的说明书引入本文作为参考。

三联体剂包括所有能够通过与DNA或染色质形成复合物与CPS II基因结合的核苷酸。该相互反应可以实现

三链H o o g s t e e n 结构的形成或其他机理，例如依赖于CPS II 序列信息的链侵入。

因此，本发明第四方面在于能够分裂氨甲酰磷酸合成酶 II mRNA的核酶，该核酶包括从本发明第一方面的核酸分子得到的mRNA部分互补的序列。

在本发明此方面优选的具体方案中，该核酶包括从本发明第一方面的核酸分子的第一或第二种插入序列得到的mRNA部分互补的序列。

本发明的第五方面在于能够阻碍本发明第一方面的核酸分子表达的反义寡核苷酸。

如上所述，本发明一方面涉及通过重组技术生产CPS II 的方法。通过该方法产生的蛋白质和本发明的多肽适用于尝试体外药物结合研究，以开发其他的抗疟疗法。

为了更清楚地理解本发明的性质，将参照下列实施例和图对克隆恶性疟原虫CPS II 基因的方法进行说明。

实施例

筛选基因(其中的氨基酸序列先前未检测出)的常规方法是通过异源探测，即使用密切相关生物体目的酶的基因片段。这已经被7位工作者用恶性疟原虫证明是不成功的，主要是因为其基因组的高A—T含量。经过用酵母u r a 2 基因片段分离恶性疟原虫CPS II 基因的最初无效尝试之后(S o u c i e t 等人，1989)，本发明人选择了用聚合酶链反应(PCR)(S a i k i 等人，1988)放大部分CPS II 基因，以使用放大的产物作为筛选用探针。

本发明人使用从保存的CPS基因的氨基端GAT区和第一半合成酶区序列设计的寡核苷酸分离并克隆了PCR产

物。核苷酸测序证实已经得到了部分CPS II 基因。用限制性酶使全部寄生虫DNA分裂，并用CPS II 特异性基因探针进行S o u t h e r n 分析。测定与基因探针杂交的DNA片段大小，然后用相应带的DNA构建“小文库”。用这种方法筛选pfCPS II 基因的较小克隆群。

为了分离全长pfCPS II 基因，使用已知序列的不同片段构建一系列小文库，以使用“基因巡察”获得该基因5' 和3' 末端的未知侧面区信息。所使用的策略总结于图1中。

在首先的S o u t h e r n 分析中，用H i n d III 和E c o R I 消化全部恶性疟原虫DNA，并用p f C P S II 453bp PCR产物进行杂交。3 . 0 k b H i n d III 和较小的E c o R I 片段与该探针进行杂交。随后筛选H i n d III p T Z 1 8 U 小基因库导致含有3 . 0 k b p f C P S II 基因片段 CPS2 的重组体分离。将453bp PCR产物定位于该片段的中间。

用CPS2的5' 和3' 末端的两个区分离每端邻近的序列，以得到更多的基因序列。CPS2的5' 端H i n d III / E c o R I 片段是分离进一步的1.5kb片段CPS1 的工具，该CPS1由基因的全部5' 区和一些非编码序列组成。

借助于CPS2 3' 端的已知序列，得到550b p 逆PCR (IPCR; T r i g l i a 等人, 1988) 产物。

该IPCR产物用于筛选3' 区侧CPS2。通过小文库技术分离含有CPS3的3.3kb H i n d III 重组体和相关的3.3kb X b a I 克隆(未示于图1中)。使用CPS3 3' 端的 200bp X b a I / H i n d III 片段进行1.3kb X b a I 片段CPS4 的克隆，该CPS4含有推测的终止密码子和一些3' 非编码区。

这四种基因片段(CPS1、CPS2、CPS3和 CPS4)结合(

除去其重叠部分)得到总共8.8k b 的序列, 它由约7.0 k b 的编码序列和1.8k b 的侧面序列组成。

该恶性疟原虫CPS II 基因的完整核苷酸序列与其5' 和3' 侧面序列一起示于表1中。

对于本领域专业人员来说显而易见的是, 由本发明人分离的该基因及其侧序展现了一系列治疗恶性疟原虫感染的新途径。本发明利用重组DNA 技术能够产生一定量的恶性疟原虫氨甲酰磷酸合成酶 II。该酶的特征使其能够用作化学治疗位点。

该基因的分离还使得能够产生反义分子、核酶或其他基因失活剂, 它可用于防止寄生虫在感染个体中的增殖。

对于本领域专业人员显而易见的是, 在不背离本发明广义描述的精神和范围条件下, 对如具体实施方案所示的本发明可以进行各种改变和/ 或修改。因此, 本发明的具体实施方案将被认为是对所有方面的说明, 而非限制。

参考文献

Cox, F.E.G. (1991) Malaria vaccines: while we are waiting. *Parasitology Today* 7: 189-190

Gero, A.M. and O'Sullivan, W.J. (1991) Purines and pyrimidines in malarial parasites. *Blood Cells* 16: 467-498

Hammond, D. J. Burchell, J.R. and Pudney, M. (1985) Inhibition of pyrimidine biosynthesis de novo in *Plasmodium falciparum* by 2-(4-t-butylcyclohexyl)-3-hydroxy-1, 4-naphthoquinine in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol* 14: 97-109

Hill, B., Kilsby, J. Rogerson, G.W., McIntosh, R.T. and Ginger, C.D. (1981). The Enzymes of pyrimidine biosynthesis in a range of parasitic protozoa and helminths. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2: 123-134.

Johnson, C. Malaria back to plague us. *Sydney Morning Herald*, November 13, 1991.

Jones, M.E. (1980) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes and regulation of UMP biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 253-279.

Krungkrai, J. Cerami, A. and Henderson, G.B. (1990) Pyrimidine biosynthesis in parasitic protozoa: purification of a monofunctional dihydroorotase from *Plasmodium berghei* and *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* 29: 6270-6275.

Krungkrai, J. Krungrak, S.R. and Phakanont, K. (1992) Antimalarial activity of orotate analogs that inhibit dihydroorotase and dihydroorotate dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1295-1301.

Marshal, S. (1991) Malaria parasite gaining ground against science. *Science* 2: 190.

Nyunoya, H., Broglie, K.E., Widgren, W.E. and Lusty C.J. (1985) Characterization and derivation of the gene coding for mitochondrial carbamyl phosphate synthetase I of rat. *J. Biol. Chem.* 260: 9346-9356.

Frapunwattana, P., O'Sullivan, W.J. and Yuthavong, Y. (1988) Depression of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase activity in in vitro culture by tetracycline. Mol. Biochem. 27: 119-124.

Queen, S.A., Vander Jagt, D.L. and Reyes, P. (1990) In vitro susceptibilities of Plasmodium falciparum to compounds which inhibit nucleotide metabolism. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1393-1398.

Reyes, P., Rathod, P.K., Sanchez, D.J. Mrema, J.E.K., Rieckmann, K.H. and Heidrich, H.G. (1982) Enzymes of purine and pyrimidine metabolism from the human malaria parasite, Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. 5: 275-290.

Rubino S.D., Nyunoya, H. and Lusty, C.J. (1986) JBC 261(24):11320-11327.

Saiki, R.K., Gelfand, D.R., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A. (1988) Science 239:487-491.

Scott, H.V., Gero, A.M. and O'Sullivan, W.J. (1986) In vitro inhibition of Plasmodium falciparum by pyrazofurin, an inhibitor of pyrimidine biosynthesis de novo. Mol. Biochem. Parasitol. 18: 3-15.

Sherman, I.W. (1979) Biochemistry of Plasmodium (malarial parasites) Microbiol. Rev. 43: 453-495.

Simmer, J.P., Kelly, R.E., Rinker, Jr., A.G., Scully, J.L. and Evans D.R. (1990) Mammalian carbamyl phosphate synthetase (CPS). J. Biol. Chem 265: 10395-10402.

Simmer, J.P., Kelly, R.E., Austin, G.R., Jr., Scully, J.L. and Evans, D.R. (1990) JBC 265(18):10395-10402.

Souciet, J.L., Nagy, M., Le Gouaz, M., Lacroute, F. and Potier, S. (1989) Gene (Amst.) 79: 59-70.

Triglia, T., Peterson, M.G. and Kemp, D.J. (1988) PNAS 16:8186.

Werner, M., Feller, A. and Pierard, A. (1985)
Nucleotide sequence of yeast gene CPA1 encoding the small
subunit of arginine-pathway carbamoyl-phosphate
synthetase. Eur. J. Biochem. 146: 371-381.

说明书附图

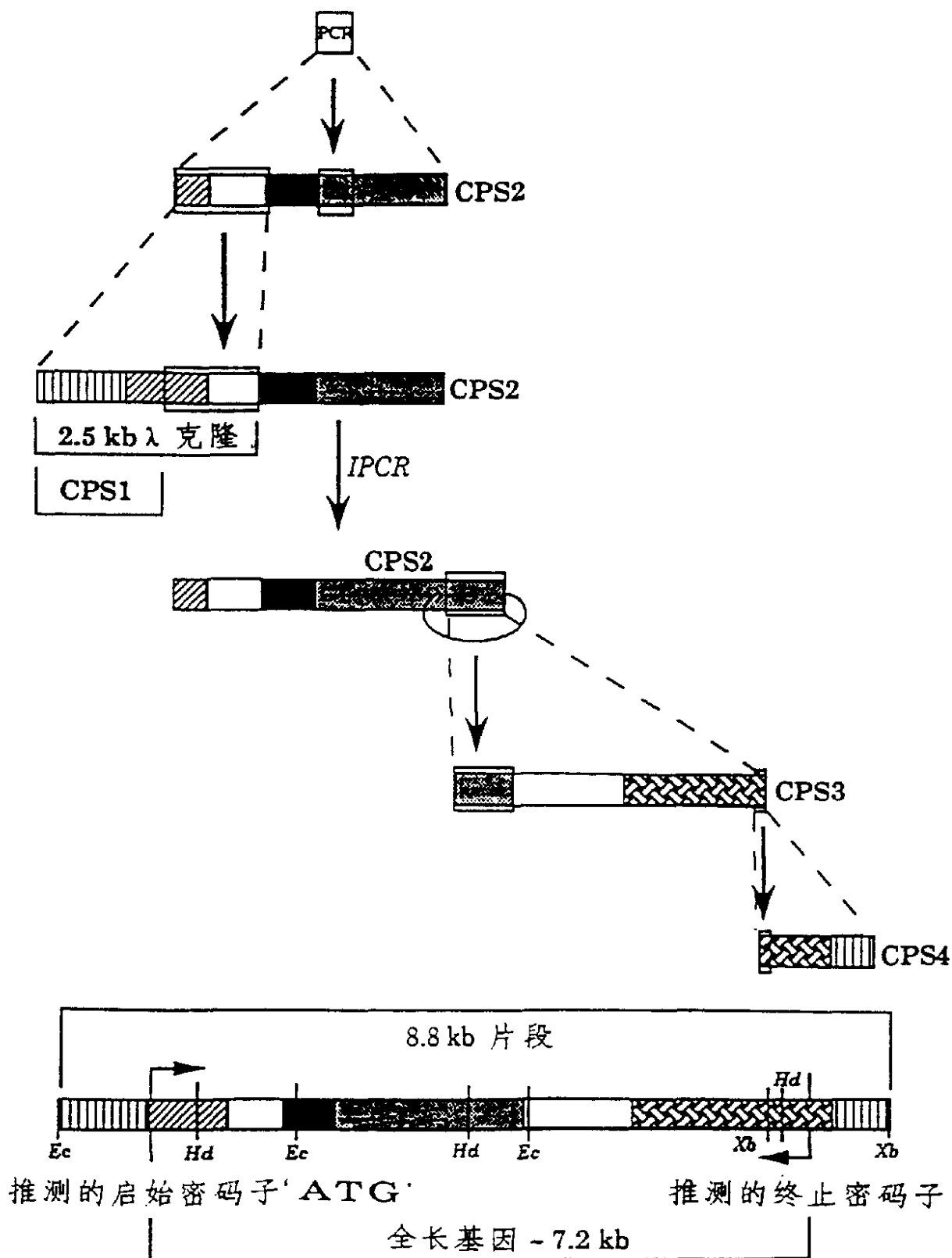


图1