

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03819846.0

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C11B 1/00 (2006.01)

A23D 9/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年8月19日

[11] 授权公告号 CN 100529088C

[22] 申请日 2003.6.20 [21] 申请号 03819846.0

[30] 优先权

[32] 2002.6.21 [33] US [31] 10/176,149

[86] 国际申请 PCT/US2003/019445 2003.6.20

[87] 国际公布 WO2004/001001 英 2003.12.31

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.21

[73] 专利权人 加利福尼亚基因公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 J·J·菲拉蒂

[56] 参考文献

WO0114538A2 2001.3.1

CN1384882A 2002.12.11

审查员 王颖

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李波 王景朝

权利要求书2页 说明书84页 附图13页

[54] 发明名称

用于生产具有改变的多不饱和脂肪酸的植物的核酸序列和方法

[57] 摘要

本发明涉及核酸分子和核酸构建体,以及与脂肪酸合成相关的其他试剂,特别是饱和脂肪和不饱和脂肪的比例。另外,本发明涉及掺入了所述试剂的植物,其中,所述植物具有改变的饱和脂肪与不饱和脂肪的比例。具体地讲,本发明涉及掺入了所述试剂的植物,其中,所述植物具有改变的单不饱和脂肪酸与多不饱和脂肪酸的比例。

1. 一种生产具有降低的多不饱和脂肪酸组成的大豆种子的大豆植物的方法，包括：用包含与下述核酸序列可操作地连接的启动子的重组核酸分子转化大豆植物：(a) 第一个核酸序列，所述核酸序列包含 SEQ ID NO: 1 的 275-350 个连续的核苷酸，或其完全互补序列，和 (b) 第二个核酸序列，所述核酸序列包含 *FAD3* 内含子核酸序列的 275-350 个连续的核苷酸，或其完全互补序列；并且生长所述大豆植物，其中，所述大豆植物产生的大豆种子与具有和所述大豆植物类似的遗传背景但缺少所述重组核酸分子的大豆植物的大豆种子相比具有降低的多不饱和脂肪酸组成，其中所述类似的遗传背景指被比较的生物体的核遗传物质具有 50%或以上相同的。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述第二个重组核酸序列包含选自 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 的序列。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述第二个重组核酸序列包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述具有降低的多不饱和脂肪酸组成的大豆种子的亚麻酸水平比具有和所述大豆植物类似的遗传背景但缺少所述重组核酸分子的大豆植物的大豆种子低。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述具有降低的多不饱和脂肪酸组成的大豆种子的油酸水平比具有和所述大豆植物类似的遗传背景但缺少所述重组核酸分子的大豆植物的大豆种子高。

6. 权利要求 4 的方法，其中所述具有降低的多不饱和脂肪酸组成的大豆种子的所述亚麻酸水平为 7% 或以下。

7. 从具有重组核酸分子的转化的大豆植物的大豆种子提取的油，所述重组核酸分子包含与下述核酸序列可操作地连接的启动子：(a) 第一个核酸序列，所述核酸序列包含 SEQ ID NO: 1 的 275-350 个连续的核苷酸，或其完全互补序列，和 (b) 第二个核酸序列，所述核酸序列包含 *FAD3* 内含子核酸序列的 275-350 个连续的核苷酸，或其完全互

补序列，其中所述油与从具有与所述转化的大豆植物类似的遗传背景但缺少所述重组核酸分子的大豆植物的大豆种子提取的油相比包含提高的油酸水平，其中所述类似的遗传背景指被比较的生物体的核遗传物质具有 50%或以上相同的。

8. 权利要求 7 的油，其中所述具有降低的多不饱和脂肪酸组成的大豆种子的亚麻酸水平比具有和所述大豆植物类似的遗传背景但缺少所述重组核酸分子的大豆植物的大豆种子低。

9. 重组核酸分子，其包含 (a) 第一个核酸序列，所述核酸序列包含 SEQ ID NO: 1 的 275-350 个连续的核苷酸，或其完全互补序列，和 (b) 第二个核酸序列，所述核酸序列包含 *FAD3* 内含子核酸序列的 275-350 个连续的核苷酸，或其完全互补序列。

10. 权利要求 9 的重组核酸分子，其中所述第二个重组核酸序列包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14。

11. 包含权利要求 9 的重组核酸分子的细菌细胞。

12. 一种生产具有增加的油酸组成的大豆种子的大豆植物的方法，包括：用包含与下述核酸序列可操作地连接的启动子的重组核酸分子转化大豆植物：(a) 第一个核酸序列，所述核酸序列包含 SEQ ID NO: 1 的 275-350 个连续的核苷酸，或其完全互补序列，和 (b) 第二个核酸序列，所述核酸序列包含 *FAD3* 内含子核酸序列的 275-350 个连续的核苷酸，或其完全互补序列；并且生长所述大豆植物，其中，所述大豆植物产生的种子与具有和所述大豆植物类似的遗传背景但缺少所述重组核酸分子的大豆植物的大豆种子相比具有增加的油酸组成，其中所述类似的遗传背景指被比较的生物体的核遗传物质具有 50%或以上相同的。

用于生产具有改变的多不饱和脂肪酸的植物的核酸序列和方法

发明领域

本发明涉及核酸分子和核酸构建体，以及与脂肪酸合成相关的其他试剂，特别是饱和脂肪和不饱和脂肪的比例。另外，本发明涉及掺入了所述试剂的植物，其中，所述植物具有改变的饱和脂肪与不饱和脂肪的比例。具体地讲，本发明涉及掺入了所述试剂的植物，其中，所述植物具有改变的单不饱和脂肪酸与多不饱和脂肪酸的比例。

背景

植物油具有多种用途。需要从生物合成的或天然植物来源中获得新型植物油组成以及获得油组成的改进的方法。根据希望的油用途，需要各种不同的脂肪酸组成。

高等植物似乎是通过共同的代谢途径——脂肪酸合成酶 (FAS) 途径合成脂肪酸。在发育中的种子中，脂肪酸连接在甘油主链上，形成三酰甘油酯，作为能量来源而储存，以便进一步萌发。FAS 途径位于质体中。第一个关键步骤是通过乙酰-CoA: ACP 转酰酶 (ATA) 的催化由乙酰-CoA 和 ACP 形成乙酰-ACP (酰基载体蛋白)。乙酰-ACP 延长成 16-和 18-碳脂肪酸，包括以下反应顺序的循环作用：与来自丙二酰-ACP 的二碳单位缩合，形成 β -酮酰-ACP (β -酮酰-ACP 合成酶)，酮-官能团还原成醇 (β -酮酰-ACP 还原酶)，脱水形成烯酰-ACP (β -酮酰-ACP 脱水酶)，以及最终还原烯酰-ACP，以便形成延长的饱和酰基-ACP (烯酰-ACP 还原酶)。 β -酮酰-ACP 合成酶 I 能催化从 C4:0 延长到棕榈酰-ACP (C16:0)，而 β -酮酰-ACP 合成酶 II 能催化最终延长至硬脂酰-ACP (C18:0)。常见的植物不饱和脂肪酸，如油酸，亚油酸和亚麻酸存在于储存的三酰甘油酯中，它是在由可溶性质体 Δ -9 去饱和酶 (通常又被称为“硬脂酰-ACP 去饱和酶”) 催化的反应中通过硬脂酰-ACP 的去饱和作用形成油酰-ACP (C18:1) 形成的。分子氧是去饱和作用所必须的，其中，还原的铁氧还蛋白起着电子共同供体的作用。其他去饱和作用是通过膜结合的

Δ -12 去饱和酶和 Δ -15 去饱和酶的顺序作用实现的。因此，所述“去饱和酶”产生了多不饱和脂肪酸。

获得能够产生导致 FAS 的表型的核酸序列、将脂肪酸去饱和、和/或将脂肪酸掺入甘油主链上以便产生油的过程遇到了各种障碍，包括，但不局限于感兴趣的代谢因子的鉴定，具有有用的动力学特征的酶来源的选择和表征，将感兴趣的蛋白纯化到可以对它进行氨基酸测序的水平，利用氨基酸序列数据获得能够用作探针的核酸序列，以便回收需要的 DNA 序列，以及制备构建体，并且转化并且分析所得到的植物。

因此，需要用于改变脂肪酸组成的其他核酸目标和方法。具体地讲，需要生产多种不同的脂肪酸组成的构建体和方法。

发明概述

本发明提供了基本上纯化的核酸分子，它包括与选自下组的核酸序列具有至少 70% 序列同一性的核酸序列：SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 4, 它们的互补序列，和任意一个的片段。

本发明还提供了包括具有 SEQ ID NO: 12 的序列的核酸分子的至少 15 个连续的核苷酸的核酸分子；包括具有 SEQ ID NO: 13 的序列的核酸分子的至少 15 个连续的核苷酸的核酸分子；包括具有 SEQ ID NO: 14 的序列的核酸分子的至少 15 个连续的核苷酸的核酸分子；和包括具有 SEQ ID NO: 4 的序列的核酸分子的至少 15 个连续的核苷酸的核酸分子。

本发明还提供了重组核酸分子，它包括作为可操作地连接的成分的以下成分：(a) 启动子，它能在植物细胞中发挥作用，以便导致 mRNA 分子的产生；和 (b) 能在高严格条件下与选自下组的核酸序列杂交的核酸序列：SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 4, 它们的互补序列，和任意一个的片段。

本发明还提供了转化的大豆植物，它具有包括以下成分的核酸分子：(a) 可操作地与具有第一种核酸序列的第一种核酸分子连接的第一启动子，所述第一种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85% 或更高的同一性：SEQ ID NOs: 1-SEQ ID NO: 2, 它们的互补序列，和任意一个的片段，和 (b) 具有第二种核酸序列的第二种核酸分子，所述第二种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85% 或更高的同一性：SEQ ID NO: 4

- SEQ ID NO:14, 它们的互补序列, 和任意一个的片段, 其中, 所述第二种核酸分子可操作地与多顺反子构型的第一启动子连接或与第二启动子连接。

本发明还提供了包括双链 RNAi 构建体的转化的大豆植物, 其中, 第一启动子可操作地与具有第一种核酸序列的第一种核酸分子连接, 所述第一种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性: SEQ ID NOs:1-SEQ ID NO:2, 它们的互补序列, 和任意一个的片段, 其中具有第二种核酸序列的第二种核酸分子可操作地与第一种核酸分子连接, 所述第二种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性: SEQ ID NO:4 - SEQ ID NO:14, 它们的互补序列, 和任意一个的片段。

本发明还提供了包括双链 RNAi 构建体的转化的大豆植物, 其中, 第一启动子可操作地与具有第一种核酸序列的第一种核酸分子连接, 所述第一种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性: SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:2, 它们的互补序列, 和任意一个的片段, 其中, 具有第二种核酸序列的第二种核酸分子可操作地与 dsRNAi 构型的第二启动子连接, 所述第二种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性: SEQ ID NO:4 - SEQ ID NO:14, 它们的互补序列, 和任意一个的片段。

本发明还提供了具有两种或两种以上核酸分子的转化的大豆植物, 其中, 每一种核酸分子可操作地与启动子连接, 并且, 其中, 每一种核酸分子具有这样的核酸序列, 它与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性: SEQ ID NOs:1, 2, 4-14, 它们的互补序列, 和任意一个的片段。

本发明提供了转化的大豆植物, 其中, 选择性地降低了由选自下组的基因编码的转录物的水平: *FAD2-1A*, *FAD2-1B*, *FAD2-2B*, *FAD3-1A*, *FAD3-1B*, *FAD3-1C*, 而保持由选自下组的不同基因编码的转录物的水平至少部分不受影响: *FAD2-1A*, *FAD2-1B*, *FAD2-2B*, *FAD3-1A*, *FAD3-1B*, *FAD3-1C*。

本发明还提供了生产具有降低的亚麻酸含量的种子的大豆植物的方法, 包括: 用包括以下成分的核酸分子转化大豆植物: (a) 可操作地与具有第一种核酸序列的第一种核酸分子连接的第一启动子, 所述第一

种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性: SEQ ID NOs: 1, 2, 它们的互补序列, 和任意一个的片段, 和 (b) 具有第二种核酸序列的第二种核酸分子, 所述第二种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性: SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 14, 它们的互补序列, 和任意一个的片段, 其中, 所述第二种核酸分子可操作地与第一启动子或第二启动子连接; 并且生长所述植物, 其中, 所述植物产生的种子的亚麻酸比具有类似的遗传背景但缺少所述核酸分子的植物少。

本发明还提供了生产具有提高的油酸含量的种子的大豆植物的方法, 包括: 用包括以下成分的核酸分子转化大豆植物: (a) 可操作地与具有第一种核酸序列的第一种核酸分子连接的第一启动子, 所述第一种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性: SEQ ID NOs: 1, 2, 它们的互补序列, 和任意一个的片段, 和 (b) 具有第二种核酸序列的第二种核酸分子, 所述第二种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性: SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 14, 它们的互补序列, 和任意一个的片段, 其中, 所述第二种核酸分子可操作地与第一启动子或第二启动子连接; 并且生长所述植物, 其中, 所述植物产生的种子的油酸比具有类似的遗传背景但缺少所述核酸分子的植物多。

本发明还提供了生产具有改变的油组成的种子的植物的方法, 包括: 用包括作为可选择地连接的部分的以下成分的核酸分子转化植物: 第一启动子和具有第一种核酸序列的第一种核酸分子, 所述第一种核酸序列与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性: SEQ ID NOs: 1, 2, 4 - 14, 它们的互补序列, 和任意一个的片段; 并且生长所述植物, 其中, 所述植物产生的种子与具有类似的遗传背景但缺少所述核酸分子的植物相比具有改变的油组成。

本发明还提供了生产具有改变的单不饱和脂肪酸与多不饱和脂肪酸比例的种子的植物的方法, 包括: 用包括作为可选择地连接的部分的以下成分的构建体转化植物: 两种或两种以上核酸分子, 每一种都具有与选自下组的核酸序列具有 85%或更高的同一性的核酸序列: SEQ ID NOs: 1, 2, 4-14, 它们的互补序列, 和任意一个的片段, 其中, 每一种核酸分子可操作地与启动子连接; 并且生长所述植物, 其中, 所述植

物产生的种子与具有类似的遗传背景但缺少所述两种或两种以上核酸分子的植物相比具有改变的单不饱和脂肪酸与多不饱和脂肪酸比例。

附图简述

- 图 1 是构建体 pCGN5468 的示意图。
- 图 2 是构建体 pCGN5469 的示意图。
- 图 3 是构建体 pCGN5471 的示意图。
- 图 4 是构建体 pCGN5485 的示意图。
- 图 5 是构建体 pCGN5486 的示意图。
- 图 6 是构建体 pCGN5462 的示意图。
- 图 7 是构建体 pCGN5466 的示意图。
- 图 8 是构建体 pCGN5464 的示意图。
- 图 9 是构建体 pCGN5473 的示意图。
- 图 10 是构建体 pMON68521 的示意图。
- 图 11 是构建体 pMON68519 的示意图。
- 图 12 是构建体 pCGN5455 的示意图。
- 图 13 是构建体 pCGN5459 的示意图。

发明详述

核酸序列的说明

- SEQ ID NO: 1 表示 *FAD2-1A* 内含子 1 的核酸序列。
- SEQ ID NO: 2 表示 *FAD2-1B* 内含子 1 的核酸序列。
- SEQ ID NO: 3 表示部分 *FAD2-2* 基因组克隆的核酸序列。
- SEQ ID NO: 4 表示 *FAD2-2B* 内含子 1 的核酸序列。
- SEQ ID NO: 5 表示 *FAD3-1A* 内含子 1 的核酸序列。
- SEQ ID NO: 6 表示 *FAD3-1A* 内含子 2 的核酸序列。
- SEQ ID NO: 7 表示 *FAD3-1A* 内含子 3A 的核酸序列。
- SEQ ID NO: 8 表示 *FAD3-1A* 内含子 4 的核酸序列。
- SEQ ID NO: 9 表示 *FAD3-1A* 内含子 5 的核酸序列。

- SEQ ID NO: 10 表示 *FAD3-1A* 内含子 3B 的核酸序列。
SEQ ID NO: 11 表示 *FAD3-1A* 内含子 3C 的核酸序列。
SEQ ID NO: 12 表示 *FAD3-1B* 内含子 3C 的核酸序列。
SEQ ID NO: 13 表示 *FAD3-1B* 内含子 4 的核酸序列。
SEQ ID NO: 14 表示 *FAD3-1C* 内含子 4 的核酸序列。
SEQ ID NO: 15 表示 *FAD2-1A* 基因序列的 cDNA 序列。
SEQ ID NOs: 16 和 17 表示 *FAD2-1A* PCR 引物的核酸序列。
SEQ ID NO: 18 表示部分 *FAD2-1A* 基因组克隆的核酸序列。
SEQ ID NO: 19 表示部分 *FAD2-1B* 基因组克隆核酸序列。
SEQ ID NOs: 20 和 21 表示 *FAD3-1A* PCR 引物的核酸序列。
SEQ ID NO: 22 表示 *FAD2-1B* 启动子的核酸序列。
SEQ ID NO: 23 表示部分 *FAD3-1A* 基因组克隆的核酸序列。
SEQ ID NOs: 24-39 表示 PCR 引物的核酸序列。

定义

在本文中，术语“基因”被用于表示核酸序列，它包括 5'非翻译区，包括与所述基因产物的表达相关的启动子区，与所述基因产物表达相关的任何内含子和外显子区以及 5'或 3'非翻译区。

在本文中，“*FAD2*”，“ $\Delta 12$ 去饱和酶”或“ ω -6 去饱和酶”基因是编码一种酶的基因，这种酶能够催化将双键插入脂肪酰基部分的从羧基末端开始计算的第十二号位置。

本文在提到蛋白和核酸时，普通大写字母的使用，例如，“*FAD2*”表示酶，蛋白，多肽，或肽，而斜体大写字母的使用，例如，“*FAD2*”表示核酸，包括，但不局限于基因，cDNAs，和 mRNAs。

在本文中，术语“*FAD2-1*”被用于表示在种子组织中以特异性方式天然表达的 *FAD2* 基因。

在本文中，术语“*FAD2-2*”被用于表示这样的 *FAD2* 基因：(a) 它是与 *FAD2-1* 基因不同的基因，和 (b) 它是在包括种子在内的多种组织中天然表达的。

在本文中，“*FAD3*”，“ $\Delta 15$ 去饱和酶”或“ ω -3 去饱和酶”基因是

编码一种酶的基因，这种酶能够催化将双键插入脂肪酰基部分的从羧基末端开始计算的第十五号位置。

在本文中，术语“*FAD3-1*”被用于表示 *FAD3* 基因，它能在包括种子在内的多种组织中天然表达。

在本文中，基因名词后面的大写字母 (A, B, C) 被用于表示家族的成员，即 *FAD2-1A* 是与 *FAD2-1B* 不同的基因家族成员。

在本文中，“中等油大豆种子”是种子的油组成中具有 50%-75% 的油酸的种子。

在本文中，“高油大豆种子”是种子的油组成中具有超过 75% 的油酸的种子。

术语“非编码”表示不编码被表达的蛋白的部分或全部的核酸分子序列。非编码序列包括，但不局限于内含子，启动子区，3'非翻译区，和 5'非翻译区。

在本文中，术语“内含子”表示该术语的通常含义，它表示一段核酸分子，通常是 DNA，它不编码被表达蛋白的部分或全部，并且，在内源条件下，被转录成 RNA 分子，不过，它在所述 RNA 被翻译成蛋白之前被从内源 RNA 中剪接掉。

在本文中，术语“外显子”表示该术语的正常含义，它表示一段核酸分子，通常是 DNA，它编码表达的蛋白的一部分或全部。

在本文中，“可操作地连接”于一个或多个核酸序列的启动子能够驱动一个或多个核酸序列的表达，包括以多顺反子构型排列的多个编码或非编码核酸序列。

“多顺反子基因”或“多顺反子 mRNA”是任何基因或 mRNA，它包括转录的核酸序列，该序列相当于一个以上要定向表达的基因的核酸序列的。应当理解的是，所述多顺反子基因或 mRNAs 可以包括相当于内含子，5'UTRs，3'UTRs 的序列，或它们的组合，并且重组多顺反子基因或 mRNA 可以，例如，但不局限于，包括相当于来自一个基因的一个或多个 UTRs 和来自第二个基因的一个或多个内含子的序列。

在本文中，术语核酸序列的互补序列表示沿所述序列整个长度的

互补序列。

在本文中，所提出的任何范围都包括该范围的终点，除非另有说明。

试剂

本发明的试剂优选是在任意一种结构特征方面是“生物学活性的”，如核酸分子与另一种核酸分子杂交的能力方面，或蛋白被抗体结合的能力（或与另一种分子竞争这种结合）。另外，所述特征可能是催化性的，因此，包括所述试剂介导化学反应或应答的能力。所述试剂优选是“基本上纯化的”。在本文中，术语“基本上纯化的”表示基本上与在它的天然环境条件下与它正常相关的所有其他分子分离的分子。更优选，基本上纯化的分子是制剂中主要类型的分子。基本上纯化的分子可能是超过 60% 不含，超过 75% 不含，优选超过 90% 不含，更优选超过 95% 不含存在于天然混合物中的其他分子（溶剂除外）。术语“基本上纯化的”并不是要包括存在于它们的天然环境条件下的分子。

本发明的试剂还可以是重组体。在本文中，术语“重组体”表示任何试剂（例如，包括，但不局限于 DNA，肽），它是对核酸分子进行人工操作的结果，或间接产生的结果。

应当理解的是，本发明的试剂可以用有利于检测所述试剂的试剂标记（例如，荧光标记，Prober 等，*Science* 238: 336-340 (1987)；Albarella 等，EP 144914；化学标记，Sheldon 等，美国专利 4, 582, 789；Albarella 等，美国专利 4, 563, 417；修饰过的标记，Miyoshi 等，EP 119448）。

核酸分子

本发明的试剂包括核酸分子，在本发明的一个方面，所述核酸分子包括核酸序列，在所述核酸序列被导入细胞或生物体之后，能够选择性地降低由 *FAD2* 或 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由第二种 *FAD2* 或 *FAD3* 编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响。在本发明的一个优选方面，所述核酸分子包括核酸序列，在所述核酸序列被导入细胞或生物体之后，能够选择性地降低由 *FAD2* 或 *FAD3*

基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由第二种 *FAD2* 或 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平基本上不受影响。在本发明的一个高度优选的方面，所述核酸分子包括核酸序列，在所述核酸序列被导入细胞或生物体之后，能够选择性地降低由 *FAD2* 或 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由第二种 *FAD2* 或 *FAD3* 编码的蛋白和/或转录物的水平实质上不受影响。

在一个优选方面，核酸分子选择性地降低一个基因相对于另一个基因的水平的能力，是通过比较 mRNA 转录物的水平进行的。在本发明的另一个优选方面，本发明的核酸分子包括选自下组的核酸序列：SEQ ID NOs: 1 - 15, 18, 19, 22, 23, 它们的互补序列，和任意一个的片段。在本发明的另一个优选方面，本发明的核酸分子包括选自下组的核酸序列：SEQ ID NOs: 16, 17, 20, 21, 24 - 39, 它们的互补序列，和任意一个的片段。

在本发明的一个方面，本发明的核酸被称为导入的核酸分子。如果核酸分子在通过人工操作，无论是如何间接操作插入细胞或生物体，该核酸分子就被称为“导入的”。导入的核酸分子的例子包括，但不局限于，通过转化，转染，注射，和投射导入细胞的核酸，以及通过包括，但不局限于接合，胞吞作用，和吞噬作用导入生物体的核酸。所述细胞或生物体可以是，或可以来自植物，植物细胞，藻类细胞，藻类，真菌细胞，真菌，或细菌细胞。

在本文中，“实质上不受影响”表示诸如蛋白或 mRNA 转录物的试剂的水平没有因为特定的事件而改变，或所改变的程度不会影响所述试剂的生理学功能。在一个优选方面，所述实质上不受影响的试剂的水平为缺少能选择性地降低另一种试剂的核酸分子的细胞或生物体中的水平的 20% 以内，更优选 10% 以内，更优选 5% 以内。

在本文中，“基本上不受影响”表示诸如蛋白或 mRNA 转录物的试剂的水平，其中，所述试剂的基本上不受影响的水平为缺少能够选择性地降低另一种试剂的水平的核酸分子的细胞或生物体中的水平的 49% 以内，更优选 35% 以内，更优选 24% 以内。

在本文中，“部分不受影响”表示诸如蛋白或 mRNA 转录物的试剂的水平，其中，所述试剂的部分不受影响的水平是在缺少能够选择性地降低另一种试剂的水平核酸分子的细胞或生物体中的水平的 80% 以内，更优选 65% 以内，甚至更优选 50% 以内。

在本文中，诸如蛋白或 mRNA 的试剂的“选择性降低”是相对缺少能够选择性地降低所述试剂水平的核酸分子的细胞或生物体而言的。在一个优选方面，所述试剂的水平选择性地降低了至少 50%，优选超过 75%，更优选至少超过 90% 或 95%。

在对试剂的水平进行比较时，这种比较优选是在具有类似遗传背景的生物体之间进行。在一个优选方面，类似的遗传背景是这样的遗传背景，其中，被比较的生物体的核遗传物质具有 50% 或以上相同的。在一个更优选的方面，类似的遗传背景是这样的遗传背景，其中，被比较的生物体的核遗传物质 75% 或以上，甚至更优选 90% 或以上相同的。在另一个甚至更优选的方面，类似的遗传背景是这样的遗传背景，其中，被比较的生物体是植物，并且所述植物是同基因的，利用植物转化技术原始导入的任何遗传物质除外。

在本发明的实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD2* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，同时保持由第二个 *FAD2* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。在一个优选方面，核酸分子选择性地降低选择一个基因相对另一个基因的水平的能力是通过比较 mRNA 转录物的水平进行的。在本文中，mRNA 转录物包括加工过的和未加工过的 mRNA 转录物。

在另一种实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD2-1* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD2-2* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。在一种不同的实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD2-2* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD2-1* 基因编码的蛋白和/或转录物的

水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。

在另一种实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后能选择性地降低由 *FAD2* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。在优选实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD2-1* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。

在一种不同的实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由另一个 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。

在另一种实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD3-1C* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD3-1B* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。在另一种实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD3-1C* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD3-1A* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。

在一种不同的实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD3-1B* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD3-1C* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。在一种不同的实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD3-1B* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD3-1A* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。

在另一种实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD3-1A* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD3-1B* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本

上不受影响，或实质上不受影响。在另一种实施方案中，一种核酸分子在导入细胞或生物体之后，能选择性地降低由 *FAD3-1A* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD3-1C* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响，基本上不受影响，或实质上不受影响。

本发明的其他优选的实施方案是在整个长度上与本发明的核酸分子的同源性至少为 50%，60%，或 70% 的核酸分子，以及与所述核酸分子互补的核酸分子。更优选的是包括这样一个区域的核酸分子，该区域在它的整个长度上与本发明的核酸分子的同源性为至少 80% 或 85%，以及与所述核酸分子互补的核酸分子。就此而言，在整个长度上至少 90% 同一的核酸分子是特别优选的，至少 95% 同一的核酸分子是尤其优选的。另外，具有至少 97% 同一性的核酸分子是高度优选的，而具有至少 98% 和 99% 同一性的核酸分子是特别高度优选的，具有至少 99% 同一性的核酸分子是最高度优选的。

本发明还提供了包括可以通过以下方法获得的核酸分子序列的核酸分子：在严格杂交条件下，用具有所述核酸分子序列或它的片段的探针筛选含有序列表中所示出的核酸分子序列的完整基因的合适文库；并且分离所述核酸分子序列。例如，可用于获得所述核酸分子的片段包括本文所披露的探针和引物。

可以将本发明的核酸分子用作 RNA，cDNA，或基因组 DNA 的杂交探针，用于分离全长 cDNAs 或基因组克隆，以及分离与序列表中所示出的核酸分子的序列具有高度序列相似性的其他基因的 cDNA 或基因组克隆。

本发明的核酸分子可以通过利用本文所披露的核酸分子或它们的片段筛选从植物物种或其他合适的生物体中获得的 cDNA 或基因组文库方便地获得。所述方法与用于制备所述文库的方法一样为本领域技术人员所公知。在一种实施方案中，所述序列是通过以下方法获得的：将本发明的核酸分子与基因文库的成员一起温育，并且回收能与所述核酸分子杂交的克隆。在第二种实施方案中，可以利用染色体步移或反向 PCR 的方法获得所述序列。在第三种实施方案中，可以将本发明的核酸分子

的序列用于筛选文库或数据库，使用本领域所公知的生物信息技术。例如，参见 *Bioinformatics*, Baxevanis & Ouellette, eds., Wiley-Interscience (1998)。

可以将多种方法中的任意一种用于获得一种或多种本发明的核酸分子。可以将自动化核酸合成仪用于这一目的，并且制备具有同样存在于细胞或生物体中的序列的核酸分子。作为所述合成方法的替代，可以将所披露的核酸分子用于确定一对引物，可以将所述引物用于聚合酶链反应，以便扩增并且获得任何需要的核酸分子或片段。

正如本领域所充分了解的，“同一性”是两种或两种以上多肽序列或两种或两种以上核酸分子序列之间的关系，正如通过比较所述序列所确定的。在本领域中，“同一性”还表示多肽或核酸分子序列之间的序列相关程度，它是通过所述序列串之间的匹配确定的。“同一性”可以通过已知方法方便地计算，这些方法包括，但不局限于披露于以下文献中的方法：*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M. and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., Stockton Press, New York (1991); and Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math*, 48:1073 (1988)。确定同一性的方法被设计成能够提供测试序列之间的最大程度的匹配。另外，确定同一性的方法被编辑成公开提供的程序。可用于确定两种序列之间的同一性的计算机程序包括，但不局限于 GCG (Devereux, J., 等, *Nucleic Acids Research* 12(1):387 (1984); 包括五种 BLASTX 程序的软件包，三种被设计用于核苷酸序列查询 (BLASTN, BLASTX, 和 TBLASTX)，两种被设计用于蛋白序列查询 (BLASTP 和 TBLASTN) (Coulson, *Trends in Biotechnology*, 12:76-80

(1994); Birren 等, *Genome Analysis*, 1: 543-559 (1997)). BLASTX 程序可以从 NCBI 和其他来源公开获得 (*BLAST Manual*, Altschul, S., 等, NCBI NLM NIH, Bethesda, MD 20894; Altschul, S., 等, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990)). 还可将众所周知的 Smith Waterman 算法用于确定同一性。

用于多肽序列比较的参数通常包括以下参数:

算法: Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: 443-453 (1970)

比较矩阵: BLOSSUM62, 来自 Hentikoff 和 Hentikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10915-10919 (1992)

空位罚分: 12

空位长度罚分: 4

一种可以使用上述参数的程序是可以从 Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin 公开获得的“空位”程序。末端空位的上述参数以及无罚分是用于肽比较的默认参数。

用于核酸分子序列比较的参数包括以下参数:

算法: Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Bio.*, 48: 443-453 (1970)

比较矩阵: 匹配 - +10; 错配 = 0

空位罚分: 50

空位长度罚分: 3

在本文中, “% 同一性” 是利用上述参数作为核酸分子序列比较的默认参数和来自 GCG 的“空位”程序 10.2 版确定的。

本发明还涉及能与本发明的核酸分子杂交的核酸分子。具体地讲, 本发明涉及能在严格条件下与上述核酸分子杂交的核酸分子。在本文中, 术语“严格条件”和“严格杂交条件”表示杂交通常是在序列之间存在至少 95%, 优选至少 97% 的同一性时发生的。严格杂交条件的一种例子是在 42°C 下, 在包括 50% 甲酰胺, 5×SSC (150 mM NaCl, 15 mM 柠檬酸三钠), 50 mM 磷酸三钠 (pH 7.6), 5×Denhardt's 溶液, 10% 硫酸葡聚糖, 和 20 微克/毫升变性的, 剪切过的鲑鱼精子 DNA 的溶液中过夜温育, 然后在大约 65°C 下, 在 0.1×SSC 中洗涤所述杂交支持物。其他

杂交和洗涤条件是众所周知的，并且披露于以下文献中：Sambrook 等，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor, NY (1989)，特别是第 11 章。

在核酸序列的表达能够选择性地降低植物中由 *FAD2-1* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，和由至少一种 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD2-2* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分、基本上或实质上不受影响的实施方案中，优选的 *FAD2-1* 核酸序列选自下组：(1) 在核酸分子的整个长度上与选自下组的核苷酸序列具有至少 50%，60%，70%，80%，90%，95%，97%，98%，99%或 100%序列同一性的核酸序列：SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 和它们的片段，其中，所述核酸序列在严格条件下不能与具有 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列的核酸分子杂交；(2) 包括同样存在于大豆 *FAD2-1* 基因内含子中的序列的核酸分子；和(3) 在核酸分子的整个长度上与(2)的核酸分子具有至少 50%，60%，70%，80%，90%，95%，97%，98%，99%或 100%序列同一性的核酸分子。

在核酸序列的表达能够选择性地降低植物中由 *FAD2-2* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，和由至少一种 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平，而保持由 *FAD2-1* 基因编码的蛋白和/或转录物的水平部分、基本上或实质上不受影响的实施方案中，优选的 *FAD2-2* 核酸序列选自下组：(1)在核酸分子的整个长度上与 SEQ ID NO:4 和它的片段的核苷酸序列具有至少 50%，60%，70%，80%，90%，95%，97%，98%，99%或 100% 序列同一性的核酸序列，其中，所述核酸序列在严格条件下不能与具有选自下组的核苷酸序列的核酸分子杂交：SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2；(2) 包括同样存在于大豆 *FAD2-2* 基因内含子中的序列的核酸分子；和(3) 在核酸分子的整个长度上与(2)的核酸分子具有至少 50%，60%，70%，80%，90%，95%，97%，98%，99%或 100%序列同一性的核酸分子。

在核酸序列表达时能够选择性地减少 *FAD3* 基因的实施方案中，优选的 *FAD3* 核酸序列选自下组：(1) 在核酸分子的整个长度上与选自下组

的核苷酸序列具有至少 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%或 100% 序列同一性的核酸序列: SEQ ID NOs:5-14, 和它们的片段, 其中, 所述核酸序列在严格条件下不能与具有选自下组的核苷酸序列的核酸分子杂交: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 和 SEQ ID NO:4; (2) 包括同样存在于大豆 *FAD3*基因内含子中的序列的核酸分子;和 (3) 在核酸分子的整个长度上与 (2) 的核酸分子具有至少 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%或 100%序列同一性的核酸分子。

本发明的核酸分子的一种亚型包括片段核酸分子。片段核酸分子可以由本发明的核酸分子的主要部分, 或实际上是它的大部分组成, 正如所专门披露的。另外, 所述片段可以包括更小的寡核苷酸(具有大约 15 -大约 400 个连续的核苷酸残基, 更优选, 大约 15 -大约 30 个连续的核苷酸残基, 或大约 50 -大约 100 个连续的核苷酸残基, 或大约 100 -大约 200 个连续的核苷酸残基, 或大约 200 -大约 400 个连续的核苷酸残基, 或大约 275 -大约 350 个连续的核苷酸残基)。

在另一方面, 片段核酸分子具有这样的核酸序列, 它是本发明核酸分子的至少 15, 25, 50, 或 100 个连续的核苷酸。在优选实施方案中, 所述核酸分子的核酸序列是具有选自下组的核酸序列的核酸分子的至少 15, 25, 50, 或 100 个连续的核苷酸: SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:14 和它们的互补序列。

一种或多种本发明的核酸分子的片段可以是探针, 并且特别是 PCR 探针。PCR 探针是能够启动聚合酶活性, 同时, 与另一个核酸分子形成双链结构的核酸分子。本领域存在各种用于确定 PCR 探针结构的方法和 PCR 技术。计算机进行的检索使用以下程序 (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi), STSPipeline (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/www-STS-Pipeline), 或 GeneUp (Pesole 等, *BioTechniques* 25:112-123 (1998)), 例如, 可用于鉴定可能的 PCR 引物。

本发明的核酸分子或它们的片段在某些场合下能够特异性地与其他核酸分子杂交。本发明的核酸分子包括能特异性地与具有选自下组的

核酸序列的核酸分子杂交的核酸分子：SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:14，它们的互补序列，和任意一个的片段。

在本文中，如果两种核酸分子能够形成反向平行的，双链核酸结构，就将这两种核酸分子说成是能够彼此特异性杂交。

本发明的核酸分子还可以编码同源物核酸分子。在本文中，同源物核酸分子或它的片段是第二个物种中的对应的核酸分子或它的片段（例如，玉米 *FAD2-1* 内含子核酸分子是拟南芥 *FAD2-1* 内含子核酸分子的同源物）。同源物还可以通过分子进化或 DNA 混排技术制备，以便所述分子保留了原始多肽的至少一种功能或结构特征（例如，参见美国专利 5,811,238）。

在另一种实施方案中，所述同源物是从选自下组的植物中获得的：苜蓿，拟南芥，大麦，芸薹，油菜，花椰菜，甘蓝，canola，柑桔，棉花，大蒜，燕麦葱属，亚麻，观赏植物，加州希蒙得木，玉米，花生，胡椒，马铃薯，油菜籽，水稻，黑麦，高粱，草莓，甘蔗，甜菜，番茄，小麦，白杨，松树，冷杉，桉树，苹果树莴苣，小扁豆，葡萄，香蕉，茶，草坪草，向日葵，菜豆属，海甘蓝，芥菜，蓖麻，芝麻，棉籽，亚麻籽，红花，和油棕。更具体地讲，优选的同源物是从选自下组的植物中获得的：canola，玉米，芸薹，油菜，大豆，海甘蓝，芥菜，蓖麻，花生，芝麻，棉籽，亚麻籽，油菜籽，红花，油棕，亚麻，和向日葵。在一种更优选的实施方案中，所述同源物是从选自下组的植物中获得的：canola，油菜籽，玉米，芸薹，油菜，大豆，向日葵，红花，油棕，和花生。

植物构建体和植物转化体

可以将一种或多种本发明的核酸分子用于植物转化或转染。可以将外源遗传物质转入植物细胞，并且让所述植物细胞再生成完整的可育或不育的植物或植物部分。外源遗传物质是任何遗传物质，它可以是天然存在的或从能够插入任何生物体中的任何来源获得的。

植物可以具有一个以上 *FAD2* 或 *FAD3* 基因的家庭（即，编码具有特殊活性的酶的基因，这些基因存在于所述植物基因组内的不同位点

上)。在本文中，“*FAD2* 基因家族成员”是存在于所述植物的遗传物质中的任何 *FAD2* 基因。在本文中，“*FAD3* 基因家族成员”是存在于所述植物的遗传物质中的任何 *FAD3* 基因。在一种实施方案中，还可以根据所述核酸序列的相似性对所述基因家族成员进行额外的分类。在本实施方案的一个优选方面，基因家族成员在所述基因的编码序列部分具有至少 60%，更优选至少 70%，更优选至少 80%的核酸序列同一性。

在本发明的一方面，植物包括双链 RNAi 构建体，其中，第一启动子可操作地与具有第一种核酸序列的第一种核酸分子连接，所述第一种核酸序列与选自下组的核酸序列具有至少大约 85%的同一性：SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:2，它们的互补序列，和任意一个的片段，具有第二种核酸序列的第二种核酸分子可操作地与所述第一种核酸分子连接，所述二种核酸序列与选自下组的核酸序列具有至少大约 85%的同一性：SEQ ID NO:4 - SEQ ID NO:14，它们的互补序列，和任意一个的片段。

本发明还提供了包括双链 RNAi 构建体的植物，其中，第一启动子可操作地与具有第一种核酸序列的第一种核酸分子连接，所述第一种核酸序列与选自下组的核酸序列具有至少大约 85%的同一性：SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:2，它们的互补序列，，和任意一个的片段，其中具有第二种核酸序列的第二种核酸分子可操作地与 dsRNAi 构型的第二启动子连接，所述二种核酸序列与选自下组的核酸序列具有至少大约 85%的同一性：SEQ ID NO:4 - SEQ ID NO:14，它们的互补序列，和任意一个的片段。

在本发明的一种实施方案中，选择性地降低了所述基因的一个家族成员的蛋白或转录物的表达水平，同时保持第二个家族成员的蛋白或转录物的水平部分不受影响。在本发明的优选实施方案中，选择性地降低了所述基因的一个家族成员的蛋白或转录物的表达水平，同时保持第二个家族成员的蛋白或转录物的水平基本上不受影响。在本发明的高度优选的实施方案中，选择性地降低了所述基因的一个家族成员的蛋白或

转录物的表达水平，同时保持第二个家族成员的蛋白或转录物的水平实质性不受影响。

在特别优选的实施方案中，本发明的植物包括核酸序列，在所述序列表达时能够选择性地降低所述植物中由某些 *FAD2* 和 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持至少一个其他 *FAD2* 或 *FAD3* 基因的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响。在特别优选的实施方案中，本发明的植物包括核酸序列，在所述序列表达时能够选择性地降低所述植物中由某些 *FAD2* 和 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持至少一个其他 *FAD2* 或 *FAD3* 基因的蛋白和/或转录物的水平基本上不受影响。在特别优选的实施方案中，本发明的植物包括核酸序列，在所述序列表达时能够选择性地降低所述植物中由某些 *FAD2* 和 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持至少一个其他 *FAD2* 或 *FAD3* 基因的蛋白和/或转录物的水平实质上不受影响。

在更特别优选的实施方案中，本发明的大豆植物包括核酸序列，在其表达时能够选择性地降低所述植物中由 *FAD2-1* 基因和至少一个 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD2-2* 基因的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响。在更特别优选的实施方案中，本发明的大豆植物包括核酸序列，在其表达时能够选择性地降低所述植物中由 *FAD2-1* 基因和至少一个 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD2-2* 基因的蛋白和/或转录物的水平基本上不受影响。在更特别优选的实施方案中，本发明的大豆植物包括核酸序列，在其表达时能够选择性地降低所述植物中由 *FAD2-1* 基因和至少一个 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD2-2* 基因的蛋白和/或转录物的水平实质上不受影响。

在另一种更特别优选的实施方案中，本发明的大豆植物包括核酸序列，在其表达时能够选择性地降低所述植物中由 *FAD2-1* 基因和至少两个，三个或三个以上 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD2-2* 基因的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响。在另一种更特别优选的实施方案中，本发明的大豆植物包括核酸序列，在其表

达时能够选择性地降低所述植物中由 *FAD2-1* 基因和至少两个，三个或三个以上 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD2-2* 基因的蛋白和/或转录物的水平基本上不受影响。在另一种更特别优选的实施方案中，本发明的大豆植物包括核酸序列，在其表达时能够选择性地降低所述植物中由 *FAD2-1* 基因和至少两个，三个或三个以上 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD2-2* 基因的蛋白和/或转录物的水平实质上不受影响。

在优选实施方案中，本发明的大豆植物包括选自下组的外源核酸序列：*FAD3* 内含子或它的片段，更优选选自下组的核酸分子：SEQ ID NOs: 5-14，或它们的片段。

在特别优选的实施方案中，本发明的大豆植物包括核酸序列，在它表达时能够选降低所述植物中由 *FAD3-1C* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD3-1B* 基因的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响。在特别优选的实施方案中，本发明的大豆植物包括核酸序列，在它表达时能够降低所述植物中由 *FAD3-1C* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD3-1B* 基因的蛋白和/或转录物的水平基本上不受影响。在特别优选的实施方案中，本发明的大豆植物包括核酸序列，在它表达时能够降低所述植物中由 *FAD3-1C* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD3-1B* 基因的蛋白和/或转录物的水平实质上不受影响。

在核酸序列表达时能够选择性地降低植物中由 *FAD2-1* 基因和至少一个 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD2-2* 基因的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响、基本上不受影响、或实质上不受影响的实施方案中，优选的 *FAD2-1* 核酸序列选自下组：(1) 在所述核酸分子的整个长度上与选自下组的核苷酸序列具有至少 50%，60%，70%，80%，90%，95%，97%，98%，99%或 100% 序列同一性的核酸序列：SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 和它们的片段，其中，所述核酸序列在严格条件下不能与具有 SEQ ID NO: 4 的核苷酸序列的核酸分子杂交；(2) 包括同样存在于大豆 *FAD2-1* 基因内含子中的序列的核酸分子，

和(3)在核酸分子的整个长度上与(2)的核酸分子具有至少50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%或100%序列同一性的核酸分子。

在核酸序列表达时能够选择性地降低植物中由 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平的实施方案中, 优选的 *FAD3* 核酸序列选自下组: (1) 在核酸分子的整个长度上与选自下组的核苷酸序列具有至少50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%或100%序列同一性的核酸序列: SEQ ID NOs: 5-14, 和它们的片段, 其中, 所述核酸序列在严格条件下不能与具有选自下组的核苷酸序列的核酸分子杂交: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, 和 SEQ ID NO: 4; (2) 包括同样存在于大豆 *FAD3* 基因内含子中的序列的核酸分子; 和 (3) 在核酸分子的整个长度上与(2)的核酸分子具有至少50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%或100%序列同一性的核酸分子。

在优选实施方案中, 本发明大豆种子的油组成为: 50% 或以上的油酸, 10% 或以下的亚麻酸。在更优选的实施方案中, 本发明大豆种子的油组成为: 60% 或以上的油酸, 7% 或以下的亚麻酸。在特别优选的实施方案中, 本发明大豆种子的油组成为: 65% 或以上的油酸, 5% 或以下的亚麻酸, 优选 4% 或以下的亚麻酸, 更优选 3% 或以下的亚麻酸。在本文中, 在植物或诸如种子的植物部分中的所有油的%组成是通过相对摩尔百分比确定的。

在另一种优选实施方案中, 本发明大豆种子的油组成为: 50%-90% 的油酸, 和 10% 或以下的亚麻酸。在更优选的实施方案中, 本发明大豆种子的油组成为: 60%-80% 的油酸, 和 7% 或以下的亚麻酸。在特别优选的实施方案中, 本发明大豆种子的油组成为: 65%-75% 的油酸, 和 5% 或以下的亚麻酸, 优选 4% 或以下的亚麻酸, 更优选 3% 或以下的亚麻酸。

在另一种优选实施方案中, 本发明大豆种子的油组成为: 50%-90% 的油酸, 8%-16% 的棕榈酸和 10% 或以下的亚麻酸。在一种更优选实施方案中, 本发明大豆种子的油组成为: 60%-80% 的油酸, 6%-12% 的棕榈酸和 7% 或以下的亚麻酸。在一种特别优选的实施方案中, 本发明大豆

种子的油组成为：65%-75%的油酸，8%-11%的棕榈酸和5%或以下的亚麻酸，优选4%或以下的亚麻酸，更优选3%或以下的亚麻酸。

在一种特别优选的实施方案中，本发明大豆种子的油组成为：65%-75%的油酸，和5%或以下的亚麻酸，优选4%或以下的亚麻酸，更优选3%或以下的亚麻酸，其中，在核酸序列表达时能够选择性地降低所述植物中由 *FAD2-1* 基因和至少一个 *FAD3* 基因编码的蛋白和/或转录物的表达水平，同时保持 *FAD2-2* 基因的蛋白和/或转录物的水平部分不受影响、基本上不受影响、或实质上不受影响，*FAD2-1* 核酸序列选自下组：(1)在核酸分子的整个长度上与选自下组的核苷酸序列具有至少50%，60%，70%，80%，90%，95%，97%，98%，99%或100%序列同一性的核酸序列：SEQ ID NO:1，SEQ ID NO:2和它们的片段，其中，所述核酸序列在严格条件下不能与具有SEQ ID NO:4的核苷酸序列的核酸分子杂交；(2)包含同样存在于大豆 *FAD2-1* 基因内含子中的序列的核酸分子；和(3)在核酸分子的整个长度上与(2)的核酸分子具有至少50%，60%，70%，80%，90%，95%，97%，98%，99%或100%序列同一性的核酸分子；并且所述 *FAD3* 核酸序列选自下组：(1)在核酸分子的整个长度上与选自下组的核苷酸序列具有至少50%，60%，70%，80%，90%，95%，97%，98%，99%或100%的序列同一性核酸序列：SEQ ID NOs:5-14，其中，所述核酸序列在严格条件下不能与具有选自下组的核苷酸序列的核酸分子杂交：SEQ ID NO:1，SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4；(2)包含同样存在于大豆 *FAD3* 基因内含子中的序列的核酸分子；和(3)在核酸分子的整个长度上与(2)的核酸分子具有至少50%，60%，70%，80%，90%，95%，97%，98%，99%或100%的序列同一性核酸分子。

在另一种实施方案中，本发明大豆种子的油组成为：80%或以上，更优选90%或以上的油酸，5%或以下的亚麻酸，优选4%或以下的亚麻酸，更优选3%或以下的亚麻酸。

在优选实施方案中，本发明大豆种子的油组成为：80%或以上，更优选90%或以上的油酸，5%或以下的亚麻酸，优选4%或以下的亚麻酸，更优选3%或以下的亚麻酸，其中，所述核酸序列能够减少

FAD2-1, *FAD2-2* 和至少一个 *FAD3* 基因的表达。在这一方面的特别优选的实施方案中, 所述核酸序列选自下组: SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:14, 它们的互补序列, 和任意一个的片段。

在本发明的优选实施方案中, 本发明大豆种子的油组成为: 50%或以上的油酸, 更优选 60%或以上, 70%或以上, 80%或以上, 或 90%或以上的油酸。

在本发明的另一种优选实施方案中, 本发明大豆种子的油组成为: 10%或以下的亚麻酸, 更优选 5%或以下, 4%或以下, 或 3% 或以下的亚麻酸。

还可以从诸如单子叶植物或双子叶植物的其他物种中获得类似的遗传物质, 所述植物包括, 但不局限于 canola, 玉米, 大豆, 拟南芥, 菜豆, 花生, 苜蓿, 小麦, 水稻, 燕麦, 高粱, 油菜籽, 黑麦, 大麦, 粟, 羊茅, 多年生黑麦草, 甘蔗, 酸果蔓, 番木瓜, 香蕉, 红花, 油棕, 亚麻, 香瓜, 苹果, 黄瓜, 石槲兰, 剑兰, 菊花, 百合, 棉花, 桉树, 向日葵, 芸薹, 油菜, 草坪草, 甜菜, 咖啡和薯蓣 (Christou, INO: *Particle Bombardment for Genetic Engineering of Plants*, Biotechnology Intelligence Unit. Academic Press, San Diego, California (1996)), 优选 canola, 玉米, 芸薹, 油菜, 油菜籽, 大豆, 海甘蓝, 芥菜, 蓖麻, 花生, 芝麻, 棉籽, 亚麻籽, 红花, 油棕, 亚麻, 和向日葵, 更优选 canola, 油菜籽, 玉米, 芸薹, 油菜, 大豆, 向日葵, 红花, 油棕, 和花生。在更优选的实施方案中, 将所述遗传物质转入 canola。在另一种更优选的实施方案中, 将所述遗传物质转入油菜。在另一种特别优选的实施方案中, 将所述遗传物质转入大豆。

可以在诸如植物的整个生物体中提高或降低诸如转录物或蛋白的产物的含量, 或局限在所述生物体的一个或多个特定的器官或组织。例如, 可以提高或降低植物的一个或多个组织和器官中的产物的含量, 包括, 但不局限于根, 块茎, 干, 叶, 茎, 果实, 浆果, 坚果, 树皮, 豆荚, 种子和花。优选的器官是种子。

可以通过利用为此而设计的 DNA 载体或构建体将外源遗传物质转入宿主细胞。所述载体的设计属于本领域的公知技术(参见, *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Clark (ed.), Springer, New York (1997))。

构建体或载体可以包括植物启动子, 以便表达所选择的核酸分子。在优选实施方案中, 本文所披露的任何核酸分子都能可操作地连接在启动子区上, 该启动子区能在植物细胞中起作用, 导致 mRNA 分子的生产。例如, 可以使用能够在植物细胞中起作用以导致 mRNA 分子生产的任何启动子, 如, 但不局限于本文所披露的启动子。在优选实施方案中, 所述启动子是植物启动子。

在文献中业已披露了在植物细胞中有活性的多种启动子。这些启动子包括, 但不局限于, 胭脂碱合成酶 (NOS) 启动子 (Ebert 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 84: 5745-5749 (1987)), 章鱼碱合成酶 (OCS) 启动子 (它被携带在根癌土壤杆菌的肿瘤诱导质粒上), 花椰菜花叶病毒启动子, 如花椰菜花叶病毒 (CaMV) 19S 启动子 (Lawton 等, *Plant Mol. Biol.* 9: 315-324 (1987)) 和 CaMV 35S 启动子 (Ode11 等, *Nature* 313: 810-812 (1985)), 玄参花叶病毒 35S-启动子 (美国专利号 5, 378, 619), 来自核糖-1, 5-二-磷酸羧化酶小亚基 (ssRUBISCO) 的光诱导型启动子, Adh 启动子 (Walker 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 84: 6624-6628 (1987)), 蔗糖合成酶启动子 (Yang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 87: 4144-4148 (1990)), R 基因复合体启动子 (Chandler 等, *The Plant Cell* 1: 1175-1183 (1989)) 以及叶绿素 a/b 结合蛋白基因启动子。业已将所述启动子用于制备在植物中得到表达的 DNA 构建体; 例如, 参见, PCT 公开号 WO 84/02913。优选将 CaMV 35S 启动子用于植物。可以将已知的或发现能导致 DNA 在植物细胞中转录的启动子用于本发明。

特别优选的启动子还可用于在种子或果实中表达本发明的核酸分子。实际上, 在优选实施方案中, 所使用的启动子是种子特异型启动子。所述启动子的例子包括来自诸如以下基因的 5' 调控区, 如 napin

(Kridl 等, *Seed Sci. Res.* 1:209:219 (1991)), 菜豆蛋白 (Bustos 等, *Plant Cell*, 1(9):839-853 (1989)), 大豆胰蛋白酶抑制剂 (Riggs 等, *Plant Cell* 1(6):609-621 (1989)), ACP (Baerson 等, *Plant Mol. Biol.*, 22(2):255-267 (1993)), 硬脂酰-ACP 去饱和酶 (Slocombe 等, *Plant Physiol.* 104(4):167-176 (1994)), 大豆 b-conglycinin 的 a' 亚基 (soy 7s, (Chen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:8560-8564 (1986))), 和油质蛋白 (例如, 参见 Hong 等, *Plant Mol. Biol.*, 34(3):549-555 (1997))。其他例子包括 β -conglycinin 的启动子 (Chen 等, *Dev. Genet.* 10: 112-122 (1989)) 和 FAE 启动子 (PCT 公开号 WO 01/11061)。用于在种子中表达的优选启动子是 7S 和 napin 启动子。

可以使用的其他启动子披露于以下文献中, 例如, 美国专利 5, 378, 619; 5, 391, 725; 5, 428, 147; 5, 447, 858; 5, 608, 144; 5, 608, 144; 5, 614, 399; 5, 633, 441; 5, 633, 435; 和 4, 633, 436。另外, 可以使用组织特异性增强子 (Fromm 等, *The Plant Cell* 1:977-984 (1989))。

构建体或载体还可以在感兴趣的区域包括核酸序列, 它能全面或部分起作用, 以便终止所述区域的转录。业已分离了多种这样的序列, 包括 Tr7 3'序列和 NOS 3'序列 (Ingelbrecht 等, *The Plant Cell* 1:671-680 (1989); Bevan 等, *Nucleic Acids Res.* 11:369-385 (1983))。还可以在本发明的植物表达构建体上提供调控转录终止区。所述转录终止区可以由编码感兴趣的基因的 DNA 序列提供或者是源于不同基因来源的常见的转录终止区, 例如, 与所述转录起始区天然相关的转录终止区。本领域技术人员可以理解的是, 能够终止植物细胞中的转录的任何常见的转录终止区都可用于本发明的构建体中。

载体或构建体还可以包括调控因子。调控因子的例子包括 Adh 内含子 1 (Callis 等, *Genes and Develop.* 1:1183-1200 (1987)), 蔗糖合成酶内含子 (Vasil 等, *Plant Physiol.* 91:1575-1579 (1989))。

和 TMV ω 因子 (Gallie 等, *The Plant Cell* 1: 301-311 (1989))。如果需要, 可以包括这些和其他调控因子。

载体或构建体还可以包括选择标记。还可以将选择标记用于选择包含所述外源遗传物质的植物或植物细胞。所述标记的例子包括, 但不局限于: *neo* 基因 (Potrykus 等, *Mol. Gen. Genet.* 199: 183-188 (1985)), 它编码卡那霉素抗性, 并且可以利用卡那霉素, RptII, G418, *hpt* 进行选择; *bar* 基因, 它编码 bialaphos 抗性; 突变型 EPSP 合成酶基因 (Hinchee 等, *Bio/Technology* 6: 915-922 (1988); Reynaerts 等, *Selectable and Screenable Markers. In Gelvin and Schilperoort. Plant Molecular Biology Manual, Kluwer, Dordrecht* (1988); Reynaerts 等, *Selectable and screenable markers. In Gelvin and Schilperoort. Plant Molecular Biology Manual, Kluwer, Dordrecht* (1988)), *aadA* (Jones 等, *Mol. Gen. Genet.* (1987)), 它编码草甘膦抗性; 腈水解酶基因, 它能产生对溴苯腈的抗性 (Stalker 等, *J. Biol. Chem.* 263: 6310-6314 (1988)); 突变型乙酰乳酸合成酶基因 (ALS), 它能赋予咪唑啉酮或磺脲抗性 (欧洲专利申请 54, 204 (Sept. 11, 1985)), ALS (D'Halluin 等, *Bio/Technology* 10: 309-314 (1992)), 和氨甲喋呤抗性 DHFR 基因 (Thillet 等, *J. Biol. Chem.* 263: 12500-12508 (1988))。

载体或构建体还可以包括筛选标记。可以用筛选标记监测表达。典型的筛选标记包括: β -葡糖醛酸酶或 *uidA* 基因 (GUS), 它们所编码的酶的各种生色底物是已知的 (Jefferson, *Plant Mol. Biol, Rep.* 5: 387-405 (1987); Jefferson 等, *EMBO J.* 6: 3901-3907 (1987)); R-基因座基因, 它编码的产物能调节花青甙色素 (红色) 在植物组织中的生产 (Dellaporta 等, *Stadler Symposium* 11: 263-282 (1988)); β -内酰胺酶基因 (Sutcliffe 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 75: 3737-3741 (1978)), 编码它的各种生色底物是已知的酶的基因 (例如, PADAC, 生色的头孢菌素); 荧光素酶基因 (Ow 等, *Science* 234: 856-859 (1986)); *xyIE* 基因 (Zukowsky 等, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. (U. S. A.) 80: 1101-1105 (1983)), 它编码邻苯二酚双加氧酶, 它能转化生色的邻苯二酚; α -淀粉酶基因 (Ikata 等, *Bio/Technol.* 8: 241-242 (1990)); 酪氨酸酶基因 (Katz 等, *J. Gen. Microbiol.* 129: 2703-2714 (1983)), 它编码能够将酪氨酸氧化成 DOPA 和多巴醌的酶, 后者又缩合成黑色素; α -半乳糖苷酶, 它能转化生色的 α -半乳糖底物。

术语“选择标记基因或筛选标记基因”还包括编码这样的可分泌标记的基因, 它的分泌可以作为鉴定或选择转化的细胞的手段而进行检测。其例子包括编码可分泌的抗原的标记, 所述抗原可以通过抗体相互作用鉴定, 或者甚至是可分泌的酶, 它可以通过催化方式检测。可分泌的蛋白可分成多种类型, 包括小的, 可扩散的蛋白, 这些蛋白是可以检测的(例如, 通过 ELISA), 可以在细胞外溶液中检测的小的活性酶(例如, α -淀粉酶, β -内酰胺酶, 脲基葡萄糖转移酶), 或被插入或限制在细胞壁中的蛋白(例如, 包括前导序列的蛋白, 如存在于延伸或烟草 PR-S 的表达单位中的蛋白)。其他可能的选择和/或筛选标记基因对本领域技术人员来说是显而易见的。

应当理解的是, 可以用单个构建体将本发明的两种或两种以上核酸分子导入植物, 并且, 所述构建体可以包括一个以上启动子。在构建体被设计成表达两种核酸分子的实施方案中, 优选的是, 这两种启动子是 (i) 两种组成型启动子, (ii) 两种种子特异性启动子, 或 (iii) 一种组成型启动子和一种种子特异性启动子。优选的种子特异性和组成型启动子分别是 napin 和 CaMV 启动子。在实施例 8 中提供了典型的组合。应当理解的是, 两种或两种以上的核酸分子可以利用单个启动子, 优选种子特异性或组成型启动子物理连接和表达。

还应当理解的是, 可以利用两种或两种以上不同的构建体将本发明的两种或两种以上的核酸导入植物。另外, 可以将本发明的两种或两种以上的核酸导入两种不同的植物, 并且可以让所述植物杂交, 以便产生能表达两种或两种以上核酸的单一植物。在 RNAi 实施方案中, 可以理解的是, 可以利用一种构建体或两种构建体将有义和反义链导入同一

种植物。另外，可以将所述有义和反义链导入两种不同的植物中，并且让两种植物杂交，以便产生能同时表达有义和反义链的单一植物。

能够以永久或瞬时方式将本发明的任意一种核酸分子和构建体导入植物或植物细胞。本发明的优选的核酸分子和构建体在上面的详细说明和实施例中进行了披露。本发明的另一种实施方案涉及生产转基因植物的方法，该方法总体上包括以下步骤：选择合适的植物或植物细胞，用重组载体转化所述植物或植物细胞，和获得转化过的宿主细胞。

在优选实施方案中，所述植物或植物细胞是或源于与生产用于食用和工业用途的植物油相关的植物。特别优选的是温带油籽作物。感兴趣的植物包括，但不局限于，油菜籽 (canola 和高芥酸品种)，玉米，大豆，海甘蓝，芥菜，蓖麻，花生，芝麻，棉花，亚麻籽，红花，油棕，亚麻，向日葵，和椰子。本发明同样可应用于单子叶或双子叶植物，并且可方便地应用于新的和/或改良的转化和调控技术。

用于将 DNA 导入植物细胞的方法和技术为本领域技术人员所熟知，并且，实际上可以将核酸分子导入细胞的任何方法都适用于本发明。合适方法的非限定性例子包括：化学方法，物理方法，如显微注射，电穿孔，基因枪，微粒轰击，和真空渗入；病毒载体；和受体介导的机制。还可以使用其他细胞转化方法，并且包括，但不局限于通过直接将 DNA 转入花粉，通过将 DNA 直接注射到植物的生殖器官，或通过将 DNA 直接注射到未成熟胚胎的细胞中然后使脱水的胚胎再水化等方法将 DNA 导入植物。

农杆菌介导的转移是用于将基因导入植物细胞的广泛采用的系统。例如，参见 Fraley 等，*Bio/Technology* 3: 629-635 (1985)；Rogers 等，*Methods Enzymol.* 153: 253-277 (1987)。要转移的 DNA 区域是通过边缘序列限定的，并且通常将干预 DNA 插入植物基因组。Spielmann 等，*Mol. Gen. Genet.* 205: 34 (1986)。现代的农杆菌转化载体是能够在大肠杆菌和农杆菌中复制的，可以进行方便的操作。Klee 等，In: *Plant DNA Infectious Agents*, Hohn 和 Schell (eds.)，Springer-Verlag, New York, pp. 179-203 (1985)。

来自单一植物原生质体转化体或来自各种转化过的外植体的植物的再生,发育和培养为本领域所熟知。一般参见 Maliga 等, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press (1995); Weissbach 和 Weissbach, In: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, CA (1988)。本发明的植物可以是育种程序的一部分或通过育种程序产生,并且还可以通过单性生殖繁殖。用于生产单性生殖的植物的方法为本领域所公知,例如,参见,美国专利 5,811,636。

共抑制是表达水平的降低,通常是特定内源基因或基因家族的 RNA 水平上的降低,这是通过表达能转录与内源基因转录物具有相同链型的 mRNA 的同源有义构建体而完成的 (Napoli 等, *Plant Cell* 2:279-289 (1990); van der Krol 等, *Plant Cell* 2:291-299 (1990))。共抑制可以来自用单个拷贝的核酸分子进行的稳定转化,该核酸分子与存在于所述细胞中的核酸序列同源 (Prollis and Meyer, *Plant J.* 2:465-475 (1992))或用多个拷贝的核酸分子转化所导致的,这些核酸分子与存在于细胞中的核酸序列同源 (Mittlesten 等, *Mol. Gen. Genet.* 244:325-330 (1994))。与同源启动子连接的多个基因,即使它们不同也能导致所连接基因的共抑制 (Vaucheret, *C.R. Acad. Sci. III* 316:1471-1483 (1993); Flavell, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 91:3490-3496 (1994)); van Blokland 等, *Plant J.* 6:861-877 (1994); Jorgensen, *Trends Biotechnol.* 8:340-344 (1990); Meins 和 Kunz, In: *Gene Inactivation and Homologous Recombination in Plants*, Paszkowski (ed.), pp. 335-348, Kluwer Academic, Netherlands (1994)) (Kinney, *Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement, Proceedings of a Symposium 19-23 June 1995* (由 IAEA 和 FA 共同主办)), pages 101-113 (IAEA-SM 340-49)。

应当理解的是,可以将本发明的一种或多种核酸分子导入植物细胞,并且用合适的启动子转录,通过这种转录导致了内源蛋白的共抑

制。所述核酸分子可操作地连接在多顺反子构型的相同启动子上或连接在不同启动子上。

反义方法是通过靶定所述遗传物质抑制或减弱基因功能的方法 (Mol 等, *FEBS Lett.* 268:427-430 (1990))。反义方法的目的是利用与靶基因互补的序列以阻断其表达, 并且产生突变细胞系或生物体, 其中, 选择性地降低或消除了单一的所选择蛋白的水平。与其他‘反向遗传’方法相比, 反义技术具有若干优点。可以通过选择反义基因的启动子或通过外部施加或显微注射定时操作失活的位点以及它的发展效果。反义可以操作其特异性, 这是通过选择靶基因的独特区或与其他相关基因拥有同源性的区而实现的 (Hiatt 等, In: *Genetic Engineering*, Setlow (ed.), Vol. 11, New York: Plenum 49-63 (1989))。

反义 RNA 技术包括将与目标 mRNA 互补的 RNA 导入细胞, 由此产生了特殊的 RNA:RNA 双链体, 它是通过反义底物和目标 mRNA 之间的碱基配对形成的 (Green 等, *Annu. Rev. Biochem.* 55:569-597 (1986))。在一种实施方案中, 该方法包括反义基因序列的导入和表达。所述序列是这样的序列, 其中, 部分或所有正常基因序列受反向取向的启动子的控制, 以便将‘错误的’或互补链转录成非编码反义 RNA, 该 RNA 能够与目标 mRNA 杂交, 并且干扰它的表达 (Takayama 和 Inouye, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25:155-184 (1990))。通过标准方法构建反义载体, 并且通过包括, 但不局限于以下方法的方法导入细胞: 转化, 转染, 电穿孔, 显微注射, 和感染。转化的类型和载体的选择决定了转染是瞬时的或稳定的。用于反义基因的启动子可以影响反义抑制的水平, 时序, 组织, 特异性, 或诱导性。

业已报导了还可以通过将双链 RNA 导入细胞而破坏内源基因的功能 (Fire 等, *Nature* 391: 806-811 (1998))。例如, 业已在秀丽新杆线虫中证实了这种破坏, 并且通常被称为 RNA 干扰, 或 RNAi (Fire 等, *Nature* 391: 806-811 (1998))。业已报导了在秀丽新杆线虫通过双链 RNA 破坏基因表达能诱导通过转录后机制实现的抑制作用

(Montgomery 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:15502-15507 (1998)). 业已报导了有关植物的通过双链 RNA 实现基因沉默的证据 (Waterhouse 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13959-13964 (1998)).

还报导了可以将内含子-剪接的发夹结构用于实现转录后基因抑制 (Smith 等, *Nature* 407: 319-320 (2000)). 报导表明, 转录后基因沉默可以用具有发卡结构的内含子-剪接的 RNA 以几乎 100% 的效率诱导 (Smith 等, *Nature* 407: 319-320 (2000)).

应当理解的是, 本发明的一种或多种核酸可以修饰, 以便实现 RNAi 或另一种模式的转录后基因抑制。

本发明还提供了植物的部分, 特别是生殖或储存部分。植物部分包括, 但不局限于种子, 胚乳, 胚珠, 花粉, 根, 块茎, 干, 叶, 茎, 果实, 浆果, 坚果, 树皮, 豆荚, 种子和花。在本发明的特别优选的实施方案中, 所述植物部分是种子。

本发明还提供了超过 10, 000, 更优选 20, 000, 甚至更优选 40, 000 粒种子的容器, 其中, 超过 10%, 更优选 25%, 更优选 50%, 甚至更优选 75% 或 90% 的种子是来自本发明植物的种子。

本发明还提供了超过 10 kg, 更优选 25 kg, 甚至更优选 50 kg 种子的容器, 其中, 超过 10%, 更优选 25%, 更优选 50%, 甚至更优选 75% 或 90% 的种子是来自本发明植物的种子。

可以对本发明的任意的植物或其部分进行处理, 以便进行加工, 以便生产饲料, 粗粉, 蛋白, 或油制剂。用于这一目的的特别优选的植物部分是种子。在优选实施方案中, 所述饲料, 粗粉, 蛋白, 或油制剂被设计成用于家畜动物或人类, 或这两者。生产饲料, 粗粉, 蛋白, 或油制剂的方法为本领域所公知。例如, 参见美国专利 4, 957, 748, 5, 100, 679, 5, 219, 596, 5, 936, 069, 6, 005, 076, 6, 146, 669, 和 6, 156, 227。在优选实施方案中, 所述蛋白制剂是高蛋白制剂。所述高蛋白制剂的蛋白含量优选大于 5% w/v, 更优选大于 10% w/v, 更优选大于 15% w/v。在优选的油制剂中, 所述油制剂是高油制剂, 来自本发明植物或植物部分的含油量大于 5% w/v, 更优选大于 10% w/v,

更优选大于 15% w/v。在优选实施方案中，所述油制剂是液体，并且它的体积大于 1, 5, 10 或 50 升。本发明提供了用本发明的植物生产的油或通过本发明的方法制备的油。这样的油可具有增强的氧化稳定性。另外，这样的油可以是所得到的任何产物的次要或主要成分。另外，所述油可以与其他油混合。在优选实施方案中，由本发明的植物生产的油或通过本发明的方法制备的油占任何产品的油成分体积或重量的 0.5%，1%，5%，10%，25%，50%，75% 或 90% 以上。在另一种实施方案中，所述油制剂可以是混合的，并且可以占该混合物体积的 10%，25%，35%，50% 或 75% 以上。用本发明植物生产的油可以与一种或多种有机溶剂或石油馏出物混合。

在一种实施方案中，本发明的油具有这样的油组成：50% 或以上的油酸，10% 或以下的亚麻酸。在另一种实施方案中，本发明的油具有这样的油组成：60% 或以上的油酸，7% 或以下的亚麻酸。在另一种实施方案中，本发明的油具有这样的油组成：65% 或以上的油酸，5% 或以下的亚麻酸，优选 4% 或以下的亚麻酸，更优选 3% 或以下的亚麻酸。

在另一种实施方案中，本发明的油具有这样的油组成：50% - 90% 油酸，和 10% 或以下的亚麻酸。在另一种实施方案中，本发明的油具有这样的油组成：60% - 80% 油酸，和 7% 或以下的亚麻酸。在另一种实施方案中，本发明的油具有这样的油组成：65% - 75% 油酸，和 5% 或以下的亚麻酸，优选 4% 或以下的亚麻酸，更优选 3% 或以下的亚麻酸。

在另一种实施方案中，本发明的油具有这样的油组成：80% 或以上，更优选 90% 或以上的油酸，5% 或以下的亚麻酸，优选 4% 或以下的亚麻酸，更优选 3% 或以下的亚麻酸。在另一种实施方案中，本发明的油具有这样的油组成：50% 或以上的油酸，更优选 60% 或以上，70% 或以上，80% 或以上，或 90% 或以上的油酸。在另一种实施方案中，本发明的油具有这样的油组成：10% 或以下的亚麻酸，优选 5% 或以下，4% 或以下，或 3% 或以下的亚麻酸。

本发明的植物可以是育种程序的一部分或通过育种程序产生。育种方法的选择取决于植物繁殖方式，要改良的性状的遗传力，以及商业

应用的栽培品种的类型（例如 F_1 杂交栽培品种，纯系栽培品种等）。下面提供了用于培育本发明植物的特定的，非限定性方法。可以利用有助于任何杂交后代选择的标记改善育种程序。还应当理解的是，任何商业或非商业的栽培品种都可以在育种程序中使用。本发明的植物可以是育种程序的一部分或通过育种程序产生。育种方法的选择取决于植物繁殖方式，要改良的性状的遗传力，以及商业应用的栽培品种的类型（例如 F_1 杂交栽培品种，纯系栽培品种等）。下面提供了用于培育本发明植物的特定的，非限定性方法。可以利用有助于任何杂交后代选择的标记改善育种程序。还应当理解的是，任何商业或非商业的栽培品种都可以在育种程序中使用。

在育种的一种非限定例子中，可以将大豆 *FAD2-1A* 内含子抑制系用于对低亚麻酸大豆 *FAD3* 突变系授粉，该突变系来自自发突变，或来自，但不局限于以下方法，如基因组中定向诱导的局部损伤 (TILLING) (McCallum 等, *Nature Biotech*, 18:455-457 (2000))，通过 RNA/DNA 嵌合寡核苷酸进行的基因取代，同源重组，T-DNA 或转座子诱变。来自包括一个或多个表达的 *FAD2* 内含子区和 *FAD3* 突变（包括剔除）的大豆种子的 RNA 可以用 Northern 印迹筛选（如实施例 5 所述），以便确定 *FAD2-1*，*FAD2-2*，*FAD3-1A*，*FAD3-1C* 和 *FAD3-1B* 转录物的水平。预计所得到的植物具有两个亲本的性状。可以筛选具有不可检测的或低水平的 *FAD2* 或 *FAD3* 转录物的大豆植物的脂肪酸组成。

本发明的植物可以是育种程序的部分或通过育种程序产生。例如，将大豆 *FAD3-1A*，*FAD3-1B*，和/或 *FAD3-1C* 内含子抑制系用于对具有较高含量的油酸的大豆植物授粉，该大豆植物包括 *FAD2* 突变系，该突变系来自自发突变，或来自非限定性方法，例如，TILLING，通过 RNA/DNA 嵌合寡核苷酸进行的基因取代，同源重组，T-DNA 或转座子诱变。来自包括一个或多个表达的 *FAD3* 内含子区和 *FAD2* 突变（包括剔除）的大豆种子的 RNA 可以通过 Northern 印迹筛选（如实施例 5 所述），以便确定 *FAD2-1*，*FAD2-2*，*FAD3-1A*，*FAD3-1B*，和 *FAD3-1C* 转录物的水平。可以筛选具有不可检测的或低水平的 *FAD2* 或 *FAD3* 转录

物的大豆植物的脂肪酸组成。预计所得到的植物具有两个亲本的性状。

新的栽培品种的培育需要品种的发育和选择，所述品种的杂交，以及优良杂交体的选择。杂交种子可以通过特定雄性可育亲本之间的手工杂交生产或通过使用雄性不育系统生产。针对某些单一的基因性状选择杂交体，如豆荚颜色，花的颜色，种子产量，柔毛颜色，或除草剂抗性，这些性状表明了所述种子确实是杂交体。有关亲本系的其他资料以及杂交体的表型影响育种者做出是否继续进行特定杂交的决定。例如，所述杂交体生产中的亲本可以是大豆 *FAD2-1A* 内含子抑制系，大豆 *FAD3-1A*，*FAD3-1B* 和/或 *FAD3-1C* 内含子抑制系或包括 *FAD2-1A*，*FAD3-1A*，*FAD3-1B* 和/或 *FAD3-1C* 的任意所需组合的内含子抑制系。例如，上述亲本中的任意一个可以与具有提高的油酸水平和/或降低的亚麻酸水平的任何天然存在的或人工产生的突变系杂交。

业已利用回交育种将诸如转基因的编码简单遗传的，高度可遗传性状的基因转入作为轮回亲本的理想纯合栽培品种或自交系。被转移的性状来源被称为供体亲本。预计所得到的植物具有轮回亲本（例如栽培品种）的性状和从供体亲本转移来的需要的性状。在所述初步杂交之后，选择具有所述供体亲本性状的个体，并且与所述轮回亲本重复杂交（回交）。预计所得到的亲本具有轮回亲本（例如栽培品种）的性状和从供体亲本中转移来的需要的性状。在所述回交生产中的供体亲本可以是，例如，大豆 *FAD2-1A* 内含子抑制系或大豆 *FAD3-1A*，*FAD3-1B* 和/或 *FAD3-1C* 内含子抑制系或包括以任意所需方式组合的 *FAD2-1A*，*FAD3-1A*，*FAD3-1B* 和/或 *FAD3-1C* 的内含子抑制系。例如，所述轮回亲本可以是具有提高的油酸和/或降低的亚麻酸水平的天然存在的或人工生产的突变系。

计算机可读的介质

在 SEQ ID NO: 1 - 15, 18, 19, 22, 23 中提供的核苷酸序列，或它们的片段或它们的互补序列，或与在 SEQ ID NO: 1 - 15, 18, 19, 22, 23 中提供的核苷酸序列，或它们的片段或它们的互补序列至少 50%，60%，或 70%相同，优选 80%，85%相同，或特别优选 90%，或 95%

相同，或特别高度优选 97%，98%，或 99%相同的核苷酸序列，可以在多种介质中“提供”以便于利用。所述介质还能够以允许技术人员检查所述序列的形式的亚型提供。

在本实施方案的一种用途中，本发明的核苷酸序列可以记录在计算机可读的介质上。在本文中，“计算机可读的介质”表示可以通过计算机直接读取或进入的任何介质。所述介质包括，但不局限于磁存储介质，如软盘，硬盘，存储介质，和磁带；光存储介质，如 CD-ROM；电储存介质，如 RAM 和 ROM；以及上述储存类型的组合，如磁/光存储介质。技术人员能够很容易理解如何将目前已知的计算机可读的介质用于生产在它上面记录了包含本发明的核苷酸序列的计算机可读介质的制品。

在本文中，“记录”表示将信息储存在计算机可读的介质上的过程。技术人员可以对任何目前已知的用于将信息记录在计算机可读介质上的方法进行改良，以便生产包括本发明的核苷酸信息的介质。技术人员可以获得多种数据保存结构，用于生产在它上面记录了本发明的核苷酸序列的计算机可读介质。数据保存结构的选择通常基于被选择用于获取保存的信息的方式。另外，可以将多种数据处理程序和格式用于将本发明的核苷酸序列信息保存在计算机可读的介质中。所述序列信息能够以 word 处理的文本文件形式存在，以商业化的软件形式格式化，如 Word Perfect 和 Microsoft Word，或以 ASCII 文件形式存在，保存在数据库应用中，如 DB2，Sybase 或 Oracle 等。技术人员可以方便地改良多种数据处理结构格式中的任意一种（例如文本文件或数据库）以便获得在它上面记录了本发明核苷酸序列信息的计算机可读的介质。

通过提供本发明的一种或多种核苷酸序列，技术人员可以正常获得所述序列信息，用于多种目的。计算机软件可通过公开渠道获得，这使得技术人员能够获取在计算机可读的介质上提供的序列信息。在 Sybase 系统上采用了实施 BLAST (Altschul 等, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)) 和 BLAZE (Brutlag 等, *Comp. Chem.* 17: 203-207 (1993)) 检索算法的软件可用于鉴定基因组中的非编码区和其他本发明

的核酸分子，该基因组包括与来自其他生物体的非-编码区的同源性。可以将所述非编码区用于影响在商业上有重要价值的蛋白的表达，如用于氨基酸生物合成，代谢，转录，翻译，RNA 加工，核酸和蛋白降解，蛋白修饰，和 DNA 复制，限制，修饰，重组，和修复的酶。

本发明还提供了系统，特别是基于计算机的系统，所述系统包括本文所披露的序列信息。将所述系统设计成能鉴定有重要商业价值的本发明的核酸分子的片段。在本文中，“基于计算机的系统”表示硬件装置，软件装置，以及用于分析本发明的核苷酸序列信息的数据存储装置。本发明的基于计算机的系统的最低硬件装置包括中央处理器 (CPU)，输入装置，输出装置，和数据存储装置。技术人员很容易理解的是，现有的基于计算机的系统中的任意一种都适用于本发明。

正如本文所指出的，本发明的基于计算机的系统包括在它上面保存了本发明的核苷酸序列的数据存储装置，以及必需的硬件装置和用于支持和执行检索装置的软件装置。在本文中，“数据存储工具”表示可以保存本发明的核苷酸序列信息的存储器，或存储器存取工具，它可以存取在它上面记录了本发明的核苷酸序列信息的产品。在本文中，“检索工具”表示在基于计算机的系统上执行，以便将目标序列或目标结构基序与保存在所述数据存储工具上的序列信息进行比较的一种或多种程序。利用检索工具鉴定与特定的目标序列或目标基序匹配的本发明序列的片段或区。公开了多种已知的算法，并且有多种商业化的用于执行检索工具的软件可以获得，并且可用于本发明的基于计算机的系统中。所述软件的例子包括，但不局限于，MacPattern (EMBL)，BLASTIN，和 BLASTIX (NCBIA)。可以对用于进行同源性检索的算法或执行软件包之一进行改进，以便用于本发明的基于计算机的系统。

靶序列的最优选的序列长度为大约 10-100 个氨基酸，或大约 30-300 个核苷酸残基。不过，众所周知的是，在检索商业上具有重要价值的本发明的核酸分子的片段，如与基因表达和蛋白加工相关的序列片段期间，所述目标序列可以具有更短的长度。

在本文中，“目标结构基序”或“目标基序”表示任何合理选择的序列或序列的组合，其中，所述序列是根据在目标基序折叠时形成的三维构型选择的。本领域有多种已知的目标基序。蛋白目标基序包括，但不局限于酶活性位点和信号序列。核酸目标基序包括，但不局限于启动子序列，顺式因子，发卡结构，以及诱导型表达因子（蛋白结合序列）。

因此，本发明还提供了用于接收目标序列的输入装置，用于保存按上述方法用检索工具鉴定的本发明序列的目标序列的数据存储装置，以及用于输出鉴定的同源序列的输出装置。所述输入和输出装置的多种结构格式可用于在本发明的基于计算机的系统中输入和输出信息。输出装置的优选格式通过改变与目标序列或目标基序的同源性程度对本发明的序列片段进行分级。这种方法为技术人员提供了序列分级，这些序列包括各种数量的目标序列或目标基序，并且鉴定在所鉴定的片段中所包含的同源性程度。

可以将多种比较工具用于比较目标序列或目标基序和数据存储装置，以便鉴定本发明的序列片段序列。例如，可以使用采用了 BLAST 和 BLAZE 算法的执行软件 (Altschul 等, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990))，以便鉴定本发明的核酸分子内的非编码区。技术人员很好理解的是可以将能公开获得的同源检索程序中的任意一种用作本发明基于计算机的系统的检索工具。

以下实施例是说明性质的，并非要以任何方式限定本发明。

实施例

实施例 1 去饱和酶基因组序列克隆

1A. 大豆 $\Delta 12$ 去饱和酶 (*FAD2-1*)

通过利用大豆 *FAD2-1* cDNA 探针筛选大豆基因组文库，鉴定大豆 *FAD2-1A* 序列。鉴定了三个推测的大豆 *FAD2-1* 克隆，并且进行噬斑纯化。将这三个大豆 *FAD2-1* 克隆中的两个连接到 pBluescript II KS+ (Stratagene) 上，并且测序。两个基因组克隆 (14-1 和 11-12) 是相同的，并且与大豆 *FAD2-1* cDNA 中的相应的序列完全匹配。在 SEQ ID NO: 15

中提供了完整的 *FAD2-1A* 克隆的序列。

在获得全长的克隆之前,使用根据 5' 非翻译序列 (引物 12506, 5'-ATACAA GCCACTAGGCAT-3', SEQ ID NO:16) 和 cDNA 内 (引物 11698: 5'-GATTGGCCATGCAATGAGGGAAAAGG-3', SEQ ID NO:17) 设计的 PCR 引物对 *FAD2-1A* 基因组克隆的一部分进行 PCR 扩增。将所得到的 PCR 产物克隆到载体 pCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA.) 中, 并且测序。通过使用 Macvector 中的 Pustell 比较程序与大豆 cDNA 序列进行比较, 鉴定具有内含子区 (SEQ ID NO:1) 的大豆 *FAD2-1A* 部分基因组克隆 (SEQ ID NO:18)。所述 *FAD2-1A* 内含子序列 (SEQ ID NO:1) 始于 ATG 起始密码子之后, 并且具有 420 个碱基的长度。

同样鉴定并且克隆了第二个 *FAD2-1* 基因家族成员, 并且在本文中被称为 *FAD2-1B*。通过利用 Macvector 中的 Pustell 比较程序与大豆 cDNA 序列进行比较, 鉴定了编码区 (碱基对 1783-1785 和 2191-2463) 和内含子区 (碱基对 1786-2190) 的大豆 *FAD2-1B* 部分基因组克隆 (SEQ ID NO:19)。*FAD2-1B* 内含子序列 (SEQ ID NO:2) 始于 ATG 起始密码子之后, 并且具有 405 个碱基的长度。*FAD2-1B* 部分基因组克隆 (SEQ ID NO:19) 上的其他区包括启动子 (碱基对 1-1704) (SEQ ID NO:22) 和 5'UTR (碱基对 1705-1782)。

1B. 大豆 $\Delta 15$ 去饱和酶 (*FAD3*)

部分大豆 *FAD3-1A* 基因组序列是利用大豆 DNA 进行 PCR 扩增的, 使用了引物 10632, 5'-CUACUACUACUACTCGAGACAAAGCCTTTAGCCTATG-3' (SEQ ID NO:20), 和 10633: 5'-CAUCAUCAUGGATCCCATGTCTCTCTATGCAAG-3' (SEQ ID NO:21)。按照生产商的指导使用了 Expand Long Template PCR 系统 (Roche Applied Sciences, Indianapolis)。将所得到的 PCR 产物克隆到载体 pCR 2.1 (Invitrogen) 中, 并且测序。通过利用 Macvector 中的 Pustell 程序与大豆 *FAD3-1A* cDNA 序列进行比较, 证实了大豆 *FAD3-1A* 部分基因组克隆序列 (SEQ ID NO:23) 和内含子区。

从鉴定的部分基因组大豆 *FAD3-1A* 序列 (SEQ ID NO: 23) 中鉴定了七个内含子: *FAD3-1A* 内含子#1 (SEQ ID NO: 5), *FAD3-1A* 内含子#2 (SEQ ID NO: 6), *FAD3-1A* 内含子#3A (SEQ ID NO: 7), *FAD3-1A* 内含子#4 (SEQ ID NO: 8), *FAD3-1A* 内含子#5 (SEQ ID NO: 9), *FAD3-1A* 内含子#3B (SEQ ID NO: 10), 和 *FAD3-1A* 内含子#3C (SEQ ID NO: 11)。 *FAD3-1A* 内含子#1 的长度为 191 个碱基对, 并且位于 294 和 484 号位置之间, *FAD3-1A* 内含子#2 的长度为 346 个碱基对, 并且位于 577 和 922 号位置之间, *FAD3-1A* 内含子#3A 的长度为 142 个碱基对, 并且位于 991 和 1132 号位置之间, *FAD3-1A* 内含子#3B 的长度为 98 个碱基对, 并且位于 1224 和 1321 号位置之间, *FAD3-1A* 内含子#3C 的长度为 115 个碱基对, 并且位于 1509 和 1623 号位置之间, *FAD3-1A* 内含子#4 的长度为 1228 个碱基对, 并且位于 1707 和 2934 号位置之间, 而 *FAD3-1A* 内含子#5 的长度为 625 个碱基对, 并且位于 3075 和 3699 号位置之间。

用大豆 DNA 对部分大豆 *FAD3-1B* 基因组序列进行 PCR 扩增, 使用了引物 19386, 5'-GGTAACAGAGAAAGAAACATTTGAGC-3' 和 19369: 5'-GCATGCTAACAAAAGTAAGTGC-3'。按照生产商的指导使用了 Expand Long Template PCR 系统 (Roche Applied Sciences, Indianapolis)。将所得到的 PCR 产物克隆到载体 pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) 上, 并且测序。通过利用 Sequencher 中的 Pustell 程序与大豆 *FAD3-1B* cDNA 序列进行比较, 证实了大豆 *FAD3-1B* 部分基因组克隆序列和内含子区。从所鉴定的部分基因组大豆 *FAD3-1B* 序列中, 鉴定了七个内含子: *FAD3-1B* 内含子#1, *FAD3-1B* 内含子#2, *FAD3-1B* 内含子#3A, *FAD3-1B* 内含子#4 (SEQ ID NO: 13), *FAD3-1B* 内含子#5, *FAD3-1B* 内含子#3B, 和 *FAD3-1B* 内含子#3C (SEQ ID NO: 12)。

实施例 2 表达构建体

2A. pCGN5468, pCGN5469, pCGN5471, pCGN5485 和 pCGN5486 的构建

通过 PCR 扩增 *FAD2-1A* 内含子序列 (SEQ ID NO: 1), 用 *FAD2-*

1A 部分基因组克隆 (SEQ ID NO: 18) 作模板, 并且使用了引物 12701 (5'-ACGAATTCCTCGAGGTA AAA TTAAATTGTGCCTGC-3' (SEQ ID NO: 24)) 和 12702 (5'-GCGAGATCTATCG ATCTGTGTCAAAGTATAAAC-3' (SEQ ID NO: 25))。将所得到的扩增产物克隆到载体 pCR 2.1 (Invitrogen) 上, 并且测序。然后将 *FAD2-1A* 内含子沿有义和反义方向克隆到表达盒 pCGN3892。载体 pCGN3892 包括大豆 7S 启动子和豌豆 *rbcS* 3'。然后将两种基因融合体分别连接到 pCGN9372 上, 它是一种包括由 FMV 启动子调控的 CP4 基因的载体。将所得到的表达构建体 (pCGN5469 有义 (图 2) 和 pCGN5471 反义 (图 3)) 用于转化大豆, 使用下面所披露的 biolistic 方法。

通过 PCR 扩增 *FAD2-1B* 内含子序列 (SEQ ID NO: 2), 用 *FAD2-1B* 部分基因组克隆 (SEQ ID NO: 19) 作模板, 并且使用引物 13883 (5'-GCGATCGATGTATGATGCTAAATTAATTGTGCCTG-3' (SEQ ID NO: 28)) 和 13876 (5'-GCGGAATTCCTGTGTCAAAGTATAAAGAAG-3' (SEQ ID NO: 29))。将所得到的扩增产物克隆到载体 pCR 2.1 (Invitrogen) 上, 并且测序。将 *FAD2-1B* 内含子分别沿有义或反义方向融合到质粒 pCGN5468 (图 1) (包括与 *FAD2-1A* 内含子 (有义) 融合的大豆 7S 启动子和豌豆 *rbcS* 3') 或 pCGN5470 (包括与 *FAD2-1A* 内含子 (反义) 融合的大豆 7S 启动子和豌豆 *RBCS* 3') 中的 *FAD2-1A* 内含子的 3' 末端。然后将所得到的内含子组合融合体分别连接到 pCGN9372 上, 它是一种包括受 FMV 启动子调控的 CP4 基因的载体。将所得到的表达构建体 (pCGN5485 (图 4), *FAD2-1A* & *FAD2-1B* 内含子有义; 和 pCGN5486 (图 5), *FAD2-1A* & *FAD2-1B* 内含子反义) 用于转化大豆, 使用下文所披露的 biolistic 方法。

2B. *FAD3-1A* 内含子的 PCR 扩增

对从大豆 *FAD3-1A* 基因组克隆中鉴定的七个内含子中的四个进行 PCR 扩增, 用 *FAD3-1A* 部分基因组克隆作模板, 并且使用以下引物: *FAD3-1A* 内含子 #1, 引物 12568: 5'-GATCGATGCCCGGGTAATAATTTTTGTGT-3' (SEQ ID NO: 30) 和 12569:

5'-CACGCCTCGAGTGTTC AATTCAATCAATG-3' (SEQ ID NO: 31); *FAD3-1A* 内含子#2, 引物 12514: 5'-CACTCGAGTTAGTTCATACTGGCT-3' (SEQ ID NO: 32) 和 12515: 5'-CGCATCGATTGCAAAATCCATCAA-3' (SEQ ID NO: 33); *FAD3-1A* 内含子#4, 引物 10926: 5'-CUACUACUACUACTCGAGCGTAAATAGTGGGTGAACAC-3' (SEQ ID NO: 34) 和 10927: 5'-CAUCAUCAUCAUCTCGAGGAATTCGTCCATTTTAGTACACC-3' (SEQ ID NO: 35); *FAD3-1A* 内含子#5, 引物 10928: 5'-CUACUACUACUACTCGAGGCGCGT ACATTTTATTGCTTA-3' (SEQ ID NO: 36) 和 10929: 5'-CAUCAUCAUCAUCT CGAGGAATTCCTGCAGTGAATCCAAATG-3' (SEQ ID NO: 37)。将所得到的每一个内含子的 PCR 产物克隆到载体 pCR 2.1 (Invitrogen) 中, 并且测序。

2C. *pCGN5455*, *pCGN5459*, *pCGN5456*, *pCGN5460*, *pCGN5466*, 和 *pCGN5473* 的构建

分别沿有义或反义方向将 *FAD3-1A* 内含子#1, #2, #4 和#5 连接到 pCGN3892 上。pCGN3892 包括大豆 7S 启动子和豌豆 RBCS 3'。将所述融合体连接到 pCGN9372 中, 它是一种包括受 FMV 启动子调控的 CP4 基因的载体, 用于转入大豆。将所得到的表达构建体 (*pCGN5455* (图 12), *FAD3-1A* 内含子#4 有义; *pCGN5459* (图 13), 包括 *FAD3-1A* 内含子#4 反义; *pCGN5456*, *FAD3* 内含子#5 有义; *pCGN5460*, *FAD3-1A* 内含子#5 反义; *pCGN5466* (图 7), 包括 *FAD3-1A* 内含子#2 反义; *pCGN5473* (图 9), 包括 *FAD3-1A* 内含子#1 反义) 用于转化大豆, 使用下文所披露的 biolistic 方法。

还利用第二个 *FAD3* 基因家族成员 (*FAD3-1B*) 对内含子#3C 和#4 进行了 PCR 扩增。用大豆 DNA 对大豆 *FAD3-1B* 内含子#3C 和#4 进行 PCR 扩增, 使用了以下引物, 5' CATGCTTTCTGTGCTTCTC 3' (SEQ ID NO: 26) 和 5' GTTGATCCAACCATAGTCG 3' (SEQ ID NO: 27)。将所得到的 PCR 产物克隆到载体 pCR 2.1 (Invitrogen) 中, 并且测序。在 SEQ ID NOs: 12 和 13 分别提供了 *FAD3-1B* 内含子#3C 和#4 的序列。

对来自三个大豆 *FAD3* 基因家族成员 *FAD3-1A*, *FAD3-1B* 和 *FAD3-1C*

的内含子 #4 进行 PCR 扩增。对来自 *FAD3-1A* 基因的内含子#4 进行 PCR 扩增，用 *FAD3-1A* 部分基因组克隆作模板，并且使用引物 10926：5'-CUACUACUACUACTCGAGCGTAAATAGTGGGTGAACAC-3' (SEQ ID NO: 34) 和 10927：5'-CAUCAUCAUCAUCTCGAGGAATTCGTCCATTTTAGTACACC-3' (SEQ ID NO: 35)。对来自 *FAD3-1B* 基因的内含子#4 进行 PCR 扩增，用大豆基因组 DNA 作模板，并且使用引物#17823：GTATCCCATTTAACAC 和#17824：CTGTGAAATTACATATAG。对来自 *FAD3-1C* 基因的内含子#4 进行 PCR 扩增，用大豆基因组 DNA 作模板，并且使用引物#17826：GCCCGCTCGAGCTGTCCATTTTTGTACAC 和 #17825：CCGGCGCTCGAGGTAACAAAAATAAATAGAAAATAGTGAGTG。将所得到的每一个内含子的 PCR 产物克隆到载体 pCR 2.1 (Invitrogen) 中，并且测序。将 *FAD3-1A* 内含子，#4 沿有义方向连接到 pCGN3892 中。所得到的表达盒 pCGN5453 包括与 *FAD3-1A* 内含子#4 融合的 7S α' 启动子和豌豆 RBCS 3'。

2D. pMON68521 的构建

为了构建 pMON68521 (图 10)，用 EcoRI 消化 pCGN5453 (与 *FAD3-1A* 内含子#4 融合的 7S α' 启动子，具有豌豆 RBCS 3') 和 KWHIT 032858 (包括 *FAD3-1B* 内含子#4 的 PCR2.1)，并且连接在一起，以便形成 KWHIT03004 (与 *FAD3-1A* 内含子#4 和 *FAD3-1B* 内含子#4 融合的 7S α' 启动子，具有豌豆 RBCS 3')。用 XhoI 消化 KWHIT03004，并且用 EcoRI 消化 KAWHIT032980 (PCR2.1 中的 *FAD3-1C* 内含子#4)，并且将这两种消化质粒的末端补平，并且随后连接。所得到的质粒是 KAWHIT030005 (与 *FAD3-1A* 内含子#4，*FAD3-1B* 内含子#4，和 *FAD3-1C* 内含子#4 融合的 7S α' 启动子，具有豌豆 RBCS 3')。用 SacI 消化 KAWHIT030005，并且用 T4 聚合酶的 Klenow 片段将它的末端补平，以便产生平端。用 EcoRI 消化 pCGN5468 (图 1，包括与 *FAD2-1A* 内含子融合的 7S α' 启动子，具有豌豆 RBCS 3')，并且用 T4 聚合酶的 Klenow 片段补平它的末端，以便形成平端。将 KAWHIT030005 和 pCGN5468 的平端连接在一起，以便

形成 KWHIT03001 (与 *FAD2-1A* 内含子, *FAD3-1A* 内含子#4, *FAD3-1B* 内含子#4, *FAD3-1C* 内含子#4 融合的 7S α' 启动子, 具有豌豆 RBCS 3')。用 NotI 消化 KWHIT03001 和 pMON 70276 (FMV-EF-1/CP4), 将它们连接在一起, 形成 pMON68521 (图 10, 与 *FAD2-1A* 内含子, *FAD3-1A* 内含子#4, *FAD3-1B* 内含子#4, *FAD3-1C* 内含子#4 融合的 7S α' 启动子, 具有豌豆 RBCS 3'和 FMV-EF-1/CP4, 具有豌豆 RBCS 3')。将 pMON68521 转化入根癌土壤杆菌的 ABI 菌株, 并且共培养到大豆中。

2B. pMON68519 的构建

在构建质粒 pMON68519 (图 11) 时, 用 EcoRI 消化 pCGN5453 (包括与 *FAD3-1A* 内含子#4 融合的 7S α' 启动子, 具有豌豆 RBCS 3') 和 KWHIT 032858 (包括 *FAD1B* 内含子#4 的 pCR2.1), 并且连接在一起, 以便形成 KWHIT03004 (包括与 *FAD3-1A* 内含子#4 和 *FAD3-1B* 内含子#4 融合的 7S α' 启动子, 具有豌豆 RBCS 3')。用 XhoI 消化 KWHIT03004, 并且用 EcoRI 消化 KAWHIT032980 (包括 PCR2.1 中的 *FAD3-1C* 内含子#4)。将这两种消化过的质粒的末端补平, 并且随后将所述质粒连接在一起。所得到的质粒被称为 KAWHIT030005 (包括与 *FAD3-1A* 内含子#4, *FAD3-1B* 内含子#4, 和 *FAD3-1B* 内含子#4 融合的 7S α' 启动子, 具有豌豆 RBCS 3')。用 SacI 消化 KAWHIT030005, 然后用 T4 聚合酶的 Klenow 片段处理所述 DNA, 以便产生平端。用 XhoI 消化 pCGN7770 (包括 *Napin* 启动子和 *Napin* 3'), 并且用 T4 聚合酶的 Klenow 片段补平末端。将质粒 KAWHIT030005 和 pCGN7770 的平端连接在一起, 以便形成 KWHIT03007 (包括与 *FAD2-1A* 内含子, the *FAD3-1A* 内含子#4, *FAD3-1B* 内含子#4, *FAD3-1C* 内含子#4 融合的 *Napin* 启动子, 具有 *Napin* 3')。

然后用 NotI 消化 KWHIT03007, 并且用 T4 聚合酶的 Klenow 片段补平末端, 形成平端。将与 *FAD2-1A* 内含子, *FAD3-1A* 内含子#4, *FAD3-1B* 内含子#4, *FAD3-1C* 内含子#4 融合的具有 *Napin* 3' 的 *Napin* 启动子 (KWHIT03007) 的平端连接于用 EcoRV 消化过的 pMON68504。pMON68504 包括与 2 tDNA 载体 pMON41162 内的 7s A' 启动子融合的大豆 *FAD2-1A*

内含子，所述载体包括受 FMV 启动子调控的 CP4 基因，具有豌豆 RBCS 3'。KWHIT03007 和 pMON6850 之间的平端连接得到了质粒 pMON68519。将 pMON68519 转化入根癌土壤杆菌的 ABI 菌株，并且共培养到大豆中。

实施例 3 植物转化和分析

将包括用于有义和反义抑制 $\Delta 12$ 和 $\Delta 15$ 去饱和酶基因的表达构建体的线性 DNA 片段稳定地导入大豆 (Asgrow 品种 A3244 或 A4922A32)，这是通过使用 McCabe 等的粒子轰击方法 (1988), *Bio/Technology*, 6: 923-926, 或通过与根癌土壤杆菌菌株 ABI (Martinelli, 美国专利号 6, 384, 310) 共培养而完成的。通过在含有草甘膦的培养基上选择而鉴定转化的大豆植物。

通过气相层析分析来自用所述内含子表达构建体转化的大豆品系的种子的脂肪酸组成。R1 合并种子和 R1 单种子的油组成表明了与来自非转化大豆的种子相比，来自转基因大豆品系的种子的油的单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸的组成发生了改变。表 I, II, 和 III 提供了用所述构建体获得的结果的概况。以上数据表明，去饱和酶基因的非-编码区的有义和反义表达导致了脂肪酸组成的改变。所述数据还表明，可以将内含子用于获得多种具有改变了的脂肪酸组成的品系。可以根据需要的相对脂肪酸组成用所述品系进行选择。由于每一个内含子能够以不同的程度改变每一种脂肪酸的含量，可以理解的是，能够根据需要的组成使用内含子的组合。

表 I

			油酸	亚油酸	亚麻酸
<i>FAD2</i>	取向	事件			
野生型 (对照)		5469-5 null R1 合并物	18.15%	55.59%	7.97%
		10 粒种子的平均值	13.89%	55.89%	9.067%
		5469-27 null R1 合并物	19.15%	54.62%	9.32%
		A4922	15.75%	56.1%	8.75%
		5471-13 null R1 合并物	17.02%	56.49%	9.08%
		10 粒种子的平均值	13.86%	56.14%	9.49%
		A4922	14.95%	55.95%	9.07%
全长 cDNA (对照)	有义	5462-133 R1 合并物	84%	2.17%	1.55%
		最佳 5462-133 R1 种子	84%	0.59%	1.76%

			油酸	亚油酸	亚麻酸
<i>FAD2</i>	取向	事件			
内含子 1	有义	5469-6 R1 合并物	29.93%	46.53%	
		5469-8 R1 合并物	36.5%	42.11%	5.98%
		最佳 5469-6 R1 种子	44.41%	29.34%	6.68%
		最佳 5469-8 R1 种子	41.26%	33.16%	5.74%
		5469-14 R1 合并物	61.06%	16.42%	7.75%
		5469-20 R1 合并物	48.89%	31.61%	4.89%
		5469-22 R1 合并物	80%	2.97%	4.78%
		最佳 5469-14 R1 种子	62.21%	11.97%	8.81%
		5485-3 R1 合并物	63.54%	14.09%	7.32%
		5485-53 R1 合并物	47.58%	27.64%	7.81%
	反义	5471-8 R1 合并物	31.05%	43.62%	7.07%
		5471-2 R1 合并物	27.98%	48.88%	6.83%
		5471-26 R1 合并物	32.66%	44.54%	6.76%
		最佳 5471-8 R1 种子	57.4%	23.37%	5.73%
		最佳 5471-2 R1 种子	28.08%	46.14%	6.52%
		最佳 5471-26 R1 种子	43.3%	34.15%	5.6%
		5486-33 R1 合并物	32.37%	43.66%	6.87%
		5486-12 R1 合并物	27.32%	46.97%	6.4%
		5486-40 R1 合并物	26.79%	48.72%	6.55%
		<i>FAD3</i>			
野生型 (对照)		5473-7 null R1 合并物	15.65%	56.74%	9.55%
		A4922 R1 合并物	19.84%	56.79%	7.48%
全长 cDNA (对照)	有义	5464-50 R1 合并物	18.06%	62.03%	2.75%
		最佳 5464-50 R1 种子	17.08%	62.44%	1.72%
内含子 1	反义	5473-8 R1 合并物	33.47%	45.97%	5.54%
		5473-1 R1 合并物	33.34%	42.67%	7.59%
内含子 2	反义	5466-20 R1 合并物	28.43%	48.83%	6.37%
		5466-16 R1 合并物	27.61%	49.92%	5.96%
内含子 4	有义	5455-19 R1 合并物	40.35%	39.97%	4.61%
		5455-10 R1 合并物	35.14%	43.59%	5.53%
		5455-57 R1 合并物	38.04%	42.44%	5.24%
		5455-76 R1 合并物	37.24%	42.42%	5.37%
		5455-107 R1 合并物	36.44%	42.72%	5.62%
		最佳 5455-57 R1 种子	45.36%	35.55%	4.92%
		最佳 5455-76 R1 种子	35.3%	43.54%	5.53%
		最佳 5455-107 R1 种子	45.56%	34.85%	5.12%
	反义	5459-2 R1 合并物	34.5%	43.87%	5.59%
		5459-6 R1 合并物	33.78%	44.12%	5.62%
		5459-20 R1 合并物	28.26%	49.48%	5.5%
		最佳 5459-2 R1 种子	61.45%	23.45%	3.38%
		最佳 5459-6 R1 种子	53.51%	29.68%	3.53%
		最佳 5459-20 R1 种子	30%	50.55%	4.15%
内含子 5	有义	5456-38 R1 合并物	28.23%	49.59%	6.74%
		5456-62 R1 合并物	28.94%	48.66%	6.25%
		最佳 5456-62 R1 种子	29.5%	43.69%	5.4%
	反义	5460-9 R1 合并物	29.78%	48.57%	5.54%
		5460-21 R1 合并物	28.37%	49.79%	5.54%
		最佳 5460-21 R1 种子	35.18%	40.52%	5.33%

表 II 含有 pMON68521 的种子的油组成数据
R1 单种子数据

构建体	菌株 ID	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON68521	GM_A32162	12.0	3.4	42.8	35.5	5.3
PMON68521	GM_A32162	11.5	2.6	39.4	40.0	5.2
PMON68521	GM_A31619	10.4	2.8	39.1	40.4	5.8
PMON68521	GM_A32162	11.9	2.6	36.7	41.9	5.8
PMON68521	GM_A32162	12.2	2.5	34.9	43.0	6.3
PMON68521	GM_A32162	13.0	2.8	30.4	46.6	6.0
PMON68521	GM_A31610	12.4	1.9	28.3	49.8	7.1
PMON68521	GM_A32162	11.9	2.9	26.5	51.6	6.1
PMON68521	GM_A31792	13.2	3.3	25.3	50.2	7.2
PMON68521	GM_A31395	12.5	3.7	25.1	50.2	6.7
PMON68521	GM_A31393	13.1	3.5	24.1	51.9	5.6
PMON68521	GM_A31615	14.0	2.2	24.0	52.5	6.7
PMON68521	GM_A32209	12.5	3.5	23.7	51.5	7.6
PMON68521	GM_A31612	11.8	3.0	23.7	51.1	9.5
PMON68521	GM_A32209	12.6	3.3	23.6	52.2	7.2
PMON68521	GM_A32209	12.4	3.2	23.0	53.1	7.2
PMON68521	GM_A31489	12.3	3.2	22.5	54.0	6.9
PMON68521	GM_A32252	12.7	4.4	22.3	52.4	7.1
PMON68521	GM_A32162	12.6	3.1	22.2	54.9	6.2
PMON68521	GM_A32089	13.5	3.2	22.2	52.4	7.9
PMON68521	GM_A31393	12.6	4.3	22.2	53.0	5.7
PMON68521	GM_A31610	12.5	2.7	21.8	55.5	6.9
PMON68521	GM_A31610	12.6	2.4	21.7	55.8	6.9
PMON68521	GM_A31656	12.7	3.6	21.6	53.2	8.0
PMON68521	GM_A31612	12.3	3.6	21.6	54.0	7.2
PMON68521	GM_A31610	13.2	2.6	21.0	56.2	6.5
PMON68521	GM_A31604	13.5	3.1	20.4	55.3	7.0
PMON68521	GM_A31610	13.2	2.6	20.4	56.7	6.4
PMON68521	GM_A31489	12.8	3.1	20.1	55.5	7.1
PMON68521	GM_A31525	12.2	3.0	20.1	57.2	6.3
A3244		13.9	4.1	15.8	56.3	9.0
A3244		13.7	4.1	14.2	57.6	9.3
A3244		13.6	4.3	14.1	57.4	9.7
A3244		13.9	4.1	14.1	56.9	10.0
A3244		13.8	4.4	13.6	57.6	9.8
A3244		14.2	4.8	13.6	56.8	9.5
A3244		14.2	4.3	13.2	56.5	10.8
A3244		14.0	4.2	13.1	57.0	10.6
A3244		14.0	4.5	12.9	57.3	10.3

表 III 含有 pMON68519 种子的油组成数据
R1 单种子数据

构建体	菌株 ID	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON68519	GM_A29911	13.0	4.8	40.7	34.4	5.2
PMON68519	GM_A29911	12.3	3.8	38.8	37.5	5.8
PMON68519	GM_A29911	12.3	3.3	34.0	42.6	6.5
PMON68519	GM_A32856	12.9	3.5	33.6	42.2	6.5
PMON68519	GM_A32856	12.6	3.1	33.3	43.4	6.4
PMON68519	GM_A32856	13.0	3.1	31.3	45.4	6.1
PMON68519	GM_A32856	12.7	3.2	28.9	47.3	6.6
PMON68519	GM_A29911	12.9	4.0	28.7	46.5	6.7
PMON68519	GM_A29911	12.2	3.1	28.1	47.4	6.8
PMON68519	GM_A32856	13.3	3.2	26.5	48.7	7.1
PMON68519	GM_A32856	13.2	3.2	26.5	49.3	6.8
PMON68519	GM_A29911	13.1	3.2	26.1	49.4	7.1
PMON68519	GM_A32856	13.2	3.6	25.9	48.9	7.1
PMON68519	GM_A32857	13.3	3.1	23.3	52.2	7.4
PMON68519	GM_A29911	12.8	3.5	23.3	52.5	6.6
PMON68519	GM_A29911	12.6	3.1	21.4	51.9	9.0
PMON68519	GM_A29911	13.4	3.6	20.1	53.6	7.9
A3244		13.2	4.3	16.5	55.7	9.7
A3244		13.5	3.2	16.3	56.8	9.2
A3244		13.7	3.4	15.4	57.7	9.2
A3244		13.9	3.3	15.1	57.9	9.1
A3244		13.8	3.6	14.3	58.3	9.2
A3244		13.5	3.4	13.6	58.2	10.4
A3244		13.5	3.9	12.5	58.4	11.2
A3244		14.6	3.8	12.1	58.2	10.8
A3244		14.5	3.9	11.8	57.8	11.4

实施例 4

通过与根癌土壤杆菌菌株 ABI 共培养 (Martinell, 美国专利号 6, 384, 301) 或通过 McCabe 等的粒子轰击方法 (1988), *Bio/Technology*, 6: 923-926 将包括抑制 $\Delta 12$ 和 $\Delta 15$ 去饱和酶基因的 dsRNAi 构建体的线性 DNA 片段稳定地导入大豆 (Asgrow 品种 A3244 或 A4922A32)。导入的构建体包括: (1) 7S 启动子- *FAD2-1A* 有义内含子- *FAD3-1A* 有义内含子- *FAD3-1B* 有义内含子- 可剪接的 *FAD3* 内含子#5 - *FAD3-1B* 反义内含子- *FAD3-1A* 反义内含子- *FAD2-1A* 反义内含子- 豌豆 *rbcS*; (2) 7S 启动子- *FAD3-1A* 有义内含子- *FAD3-1B* 有义内含子- 可

剪接的 *FAD3* 内含子#5 - *FAD3-1B* 反义内含子- *FAD3-1A* 反义内含子 - 豌豆 *rbcS*; (3) 7S 启动子- *FAD2-1A* 有义内含子- *FAD3-1A* 有义内含子-可剪接的 *FAD3* 内含子#5 - *FAD3-1A* 反义内含子- *FAD2-1A* 反义内含子-豌豆 *rbcS*. *FAD2-1A*, *FAD2-1B*, *FAD2-2B*, *FAD3-1A*, *FAD3-1B* 和 *FAD3-1C* 内含子的典型序列可以从以下文献中查阅到,但不局限于这些文献: 美国专利申请流水号 10/176, 149, 申请日为 2002 年 6 月 21 日, 和美国专利申请流水号 09/638, 508, 申请日为 2000 年 8 月 11 日, 和美国临时申请流水号 60/151, 224, 申请日为 1999 年 8 月 26 日, 和美国临时申请流水号 60/172, 128, 申请日为 1999 年 12 月 17 日。通过在含有草甘膦的培养基上选择鉴定转化的大豆植物。

分析来自包括内含子 RNAi 抑制构建体的转化过的大豆种子的脂肪酸组成。根据所需相对脂肪酸组成选择特定的品系。

实施例 5

5A.

从纯合的 R2 种子中分离 RNA, 所述 R2 种子来自两个 *FAD2-1* 内含子抑制系 (5469-14 和 5469-22), 来自两个 *FAD2-1* cDNA 抑制系 (正对照) (5462-87 和 5462-133), 以及来自阴性对照 (野生型种子和来自每一个内含子抑制事件的非分离体 (null segregant) 的种子)。用 *FAD2-1* cDNA 探测含有所述 RNA 样品的 Northern 凝胶。与阴性对照相比, 在内含子抑制系和 cDNA 抑制系中 *FAD2-1A* 转录物水平显著降低。用组成型 *FAD2-2* cDNA 探测相同的 Northern 印迹, 并且在 *FAD2-1* 内含子抑制系和对照之间没有发现 *FAD2-2* 转录物水平的显著差异。相反, cDNA 抑制系中的 *FAD2-2* 转录物显著减少。以上 Northern 数据表明, *FAD2-1A* 内含子能特异性地抑制 *FAD2-1* 转录物的积累, 而不能抑制 *FAD2-2* 转录物的积累。对部分 *FAD2-2* 基因组克隆 (SEQ ID NO: 3) 进行 PCR 扩增, 并且序列分析发现了位于该基因 5' 非翻译区中的 4.7 KB 内含子。 *FAD2-2* 内含子的序列 (SEQ ID NO: 4) 与 *FAD2-1* 内含子没有同源性。

5B.

从纯合的 R2 种子中分离 RNA, 所述 R2 种子来自四个 *FAD3-1A* 内含子#4 抑制系, 来自三个 *FAD3-1B* 内含子#4 抑制系, 来自阴性对照种子(未转化过的野生型种子)和来自每一个内含子抑制事件的非分离体)。用 *FAD3-1A* 3'UTR 区探测包括所述 RNA 样品的 Northern 凝胶。与野生型或零对照相比,*FAD3-1A* 内含子#4 抑制系中的内源 *FAD3-1A* 转录物水平显著降低。用 *FAD3-1B* 3' UTR 区探测相同的 Northern 印迹, 并且与 *FAD3-1A* 内含子#4 抑制系, 野生型或零对照相比, 在内源 *FAD3-1B* 转录物水平方面没有显著差异。*FAD3-1A* 内含子#4 (SEQ ID NO: 8) 的序列与 *FAD3-1B* 内含子#4 (SEQ ID NO: 13) 的序列没有同源性。

实施例 6

Southern 印迹数据表明, 至少存在两个 *FAD3* 基因家族成员。为了确定其他 *FAD3* 基因家族成员的序列, 并且确定是否存在其他成员, 将 *FAD3-1A* 基因序列用于对 Monsanto 大豆 DNA 序列数据库进行查询 BLAST 检索。将来自不同的 *FAD3* 基因家族成员的候选 ESTs 用于设计引物。利用这种方法, 设计了基于推测的 *FAD3* 序列的两套引物。分离了来自两个其他 *FAD3* 基因家族成员的内含子#4 区。所述引物是根据相当于 *FAD3-1A* 基因的内含子#4 的位置的区域中的 211565.1.r1040 EST (被称为 *FAD3-1B*), (5' 引物#15024: 5'-CATGCTTTCTGTGCTTCTC-3' (SEQ ID NO: 26) 和 3' 引物#15027: 5'-GTTGATCCAACCATAGTCG-3' (SEQ ID NO: 27)) 设计的。将所述引物用于 PCR, 扩增 *FAD3-1B* 内含子#4 (SEQ ID NO: 13), 在测序时, 它与 *FAD3-1A* 内含子#4 (SEQ ID NO: 8) 没有序列同源性。*FAD3-1B* 基因还包括内含子#3C (SEQ ID NO: 12), 它同样与 *FAD3-1A* 内含子#3C (SEQ ID NO: 11) 没有任何同源性。

另一个额外的内含子#4 是用第二个 EST, gsv701051989.H1 (被命名为 *FAD3-1C*) 通过 PCR 扩增的, 使用了以下引物对: 5'引物#16241: 5'-CACCATGGTCATCATCAGAAAC (SEQ ID NO: 38) 和 3' 引物#16242:

TCACGATCCACAGTTGTGAGAC (SEQ ID NO: 39)。 *FAD3-1C* 内含子#4 (SEQ ID NO: 14) 与 *FAD3-1A* 内含子#4 (SEQ ID NO: 8) 具有 50% 的同源性，并且与 *FAD3-1B* 内含子#4 (SEQ ID NO: 13) 没有同源性。 *FAD3-1C* EST 与 *FAD3-1B* EST 类似，也包括位于所述基因的相同区域的内含子#4 剪接位点。

实施例 7 *FAD2-1A/FAD3-1A* 转化的植物

7A.

将大豆 *FAD2-1A* 内含子抑制系用于对大豆 *FAD3-1A* 内含子抑制系授粉，后者是按照实施例 3 中提供的方法制备的。通过 Northern 印迹 (如实施例 5 所述) 从含有表达的 *FAD2-1A* 内含子区和 *FAD3-1A* 内含子区的大豆种子中筛选 RNA，以便确定 *FAD2-1*，*FAD2-2*，*FAD3-1A* 和 *FAD3-1B* 转录物的水平。筛选具有不可检测的或低水平的 *FAD2-1* 和 *FAD3-1A* 转录物的大豆植物的脂肪酸组成，如实施例 3 所述。

7B.

同样将大豆 *FAD2-1A* 内含子抑制系用于对通过突变产生的低亚麻酸大豆 *FAD3* 突变系进行授粉。通过 Northern 印迹筛选来自包括一个或多个表达的 *FAD2* 内含子区和 *FAD3* 突变 (包括剔除) 的大豆种子的 RNA (如实施例 5 所述)，以便确定 *FAD2-1*，*FAD2-2*，*FAD3-1A*，*FAD3-1C* 和 *FAD3-1B* 转录物的水平。筛选具有不可检测的或低水平的 *FAD2* 和 *FAD3* 转录物的大豆植物的脂肪酸组成，如实施例 3 所述。

7C.

将具有 *FAD3-1A*，*FAD3-1B*，和 *FAD3-1C* 内含子抑制的大豆系用于对具有升高水平的油酸的，含有来自自发突变的 *FAD2* 突变系的大豆植物授粉。将具有 *FAD3-1A* 和 *FAD3-1B* 内含子抑制的大豆品系，具有 *FAD3-1A* 和 *FAD3-1C* 内含子抑制的品系，具有 *FAD3-1B* 和 *FAD3-1C* 内含子抑制的品系，具有 *FAD3-1A* 内含子抑制的品系，具有 *FAD3-1B* 内含子抑制的品系，和具有 *FAD3-1C* 内含子抑制品系分别用于对具有升高

含量油酸的，含有来自自发突变的 *FAD2* 突变系的大豆植物授粉。通过实施例 5 所述的 Northern 印迹筛选来自包括一个或多个表达的 *FAD3* 内含子区和 *FAD2* 突变的大豆种子的 RNA，以便确定 *FAD2-1*，*FAD2-2*，*FAD3-1A*，*FAD3-1B* 和 *FAD3-1C* 转录物的水平。筛选具有不可检测的或低水平的 *FAD2* 或 *FAD3* 转录物的大豆植物的脂肪酸组成，如实施例 3 所述。

实施例 8 单一的 *FAD2/FAD3* 构建体

构建了如表 IV 所示出的包括有义和反义 *FAD2* 和 *FAD3* 内含子以及能够产生 dsRNA 的 *FAD2* 和 *FAD3* 内含子的线性 DNA 片段。

表 IV

构建体编号	启动子 1	结构核酸 1 (有义, 反义, dsRNA)	启动子 2	结构核酸 2 (有义, 反义, dsRNA)
1	CaMV	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1A</i> 内含子 1
2	CaMV	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1A</i> 内含子 1
3	CaMV	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1A</i> 内含子 4
4	CaMV	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1A</i> 内含子 4
5	CaMV	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1B</i> 内含子 4
6	CaMV	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1B</i> 内含子 4
7	CaMV	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1C</i> 内含子 4
8	CaMV	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1C</i> 内含子 4
9	CaMV	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD2-2B</i> 内含子 1
10	CaMV	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD2-2B</i> 内含子 1
11	napin	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	napin	<i>FAD3-1A</i> 内含子 1
12	napin	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	napin	<i>FAD3-1A</i> 内含子 1
13	napin	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	napin	<i>FAD3-1A</i> 内含子 4
14	napin	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	napin	<i>FAD3-1A</i> 内含子 4
15	napin	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	napin	<i>FAD3-1B</i> 内含子 4
16	napin	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	napin	<i>FAD3-1B</i> 内含子 4
17	napin	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	napin	<i>FAD3-1C</i> 内含子 4
18	napin	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	napin	<i>FAD3-1C</i> 内含子 4
19	napin	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	napin	<i>FAD2-2B</i> 内含子 1
20	napin	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	napin	<i>FAD2-2B</i> 内含子 1
21	7S	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1A</i> 内含子 1
22	7S	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1A</i> 内含子 1
23	7S	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1A</i> 内含子 4
24	7S	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1A</i> 内含子 4
25	7S	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1B</i> 内含子 4
26	7S	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1B</i> 内含子 4
27	7S	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1C</i> 内含子 4
28	7S	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD3-1C</i> 内含子 4
29	7S	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD2-2B</i> 内含子 1
30	7S	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	CaMV	<i>FAD2-2B</i> 内含子 1
31	CaMV	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	7S	<i>FAD3-1A</i> 内含子 1
32	CaMV	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	7S	<i>FAD3-1A</i> 内含子 1
33	CaMV	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	7S	<i>FAD3-1A</i> 内含子 4
34	CaMV	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	7S	<i>FAD3-1A</i> 内含子 4
35	CaMV	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	7S	<i>FAD3-1B</i> 内含子 4
36	CaMV	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	7S	<i>FAD3-1B</i> 内含子 4
37	CaMV	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	7S	<i>FAD3-1C</i> 内含子 4
38	CaMV	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	7S	<i>FAD3-1C</i> 内含子 4
39	CaMV	<i>FAD2-1A</i> 内含子 1	7S	<i>FAD2-2B</i> 内含子 1
40	CaMV	<i>FAD2-1B</i> 内含子 1	7S	<i>FAD2-2B</i> 内含子 1

正如表中所示出的，在表中所列出的每一种构建体根据该构建体中结构核酸的性质和取向可能具有若干种构型。例如，构建体 30 可以具有如下构型：(1) 7S 启动子- *FAD2-1B* 内含子 1 (有义) - CaMV 启动子- *FAD2-2B* 内含子 1 (有义)；(2) 7S 启动子- *FAD2-1B* 内含子 1 (有义) - CaMV 启动子- *FAD2-2B* 内含子 1 (反义)；(3) 7S 启动子- *FAD2-1B* 内含子 1 (有义) - CaMV 启动子- *FAD2-2B* 内含子 1 (dsRNA)；(4) 7S 启动子- *FAD2-1B* 内含子 1 (反义) - CaMV 启动子- *FAD2-2B* 内含子 1 (有义)；(5) 7S 启动子- *FAD2-1B* 内含子 1 (反义) - CaMV 启动子- *FAD2-2B* 内含子 1 (反义)；(6) 7S 启动子- *FAD2-1B* 内含子 1 (反义) - CaMV 启动子- *FAD2-2B* 内含子 1 (dsRNA)；(7) 7S 启动子- *FAD2-1B* 内含子 1 (dsRNA) - CaMV 启动子- *FAD2-2B* 内含子 1 (有义)；(8) 7S 启动子- *FAD2-1B* 内含子 1 (dsRNA) - CaMV 启动子- *FAD2-2B* 内含子 1 (反义)；或 (9) 7S 启动子- *FAD2-1B* 内含子 1 (dsRNA) - CaMV 启动子- *FAD2-2B* 内含子 1 (dsRNA)。

可以通过前面所披露的方法，包括 McCabe 等的粒子轰击方法 (1988) *Bio/Technology*, 6:923-926 或农杆菌介导的转化 (Martinell, 美国专利号 6, 384, 301) 将所述结构导入大豆 (例如, Asgrow 品种 A4922 或 Asgrow 品种 A3244)。通过在含有草甘膦的培养基上选择，鉴定转化过的大豆植物。通过气相层析，分析来自用所述构建体转化过的大豆制品系的种子的脂肪酸组成。

实施例 9

通过前面所披露的方法，包括 McCabe 等的粒子轰击方法 (1988) *Bio/Technology*, 6:923-926 或农杆菌介导的转化 (Martinell, 美国专利号 6, 384, 301) 将包括用于 *FAD2-1* 和 *FAD2-2* 内含子的有义和反义表达的构建体的线性 DNA 片段稳定地导入大豆 (例如, Asgrow 品种 A4922 或 Asgrow 品种 A3244)。导入了以下构建体：(1) *FAD2-1A* 内含子 (有义) - *FAD2-2* 内含子 (反义)；(2) *FAD2-1A* 内含子 (有义) - *FAD2-2* 内含子 (有义)；(3) *FAD2-1A* 内含子 (反义) - *FAD2-2* 内含子 (反

义); (4) *FAD2-1A* 内含子(反义) - *FAD2-2* 内含子(有义); (5) *FAD2-1B* 内含子(有义) - *FAD2-2* 内含子(反义); (6) *FAD2-1B* 内含子(有义) - *FAD2-2* 内含子(有义); (7) *FAD2-1B* 内含子(反义) - *FAD2-2* 内含子(反义); 和 (8) *FAD2-1B* 内含子(反义) - *FAD2-2* 内含子(有义)。通过在含有草甘膦的培养基上选择, 鉴定转化过的大豆植物。通过气相层析, 分析来自用所述构建体转化过的大豆制品系的种子的脂肪酸组成。转化过的植物的种子具有高水平的油酸(超过 80%)。

通过 McCabe 等的方法(1988) *Bio/Technology*, 6: 923-926 将含有用于 *FAD2-1*, *FAD2-2*, 和 *FAD3* 内含子的有义和反义表达的构建体的其他线性 DNA 片段稳定地导入大豆(Asgrow 品种 A4922)。典型的构建体包括: (1) *FAD2-1A* 内含子(有义或反义) - *FAD2-2* 内含子(有义或反义) - *FAD3-1A* 内含子 1 (有义或反义); (2) *FAD2-1A* 内含子(有义或反义) - *FAD2-2* 内含子(有义或反义) - *FAD3-1A* 内含子 4 (有义或反义); (3) *FAD2-1A* 内含子(有义或反义) - *FAD2-2* 内含子(有义或反义) - *FAD3-1B* 内含子 4 (有义或反义); 和 (4) *FAD2-1A* 内含子(有义或反义) - *FAD2-2* 内含子(有义或反义) - *FAD3-1C* 内含子 4 (有义或反义)。通过在含有草甘膦的培养基上选择, 鉴定转化过的大豆植物。通过气相层析, 分析来自用所述构建体转化过的大豆制品系的种子的脂肪酸组成。转化过的植物的种子具有高含量的油酸(超过 80%)。

序列表

<110> Calgene LLC

<120> 用于生产具有改变的多不饱和脂肪酸的植物的核酸序列和方法

<130> 16518.129

<160> 39

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 420

<212> DNA

<213> 大豆

<400> 1

```

gtaaattaaa ttgtgcctgc acctegggat atttcatgtg gggttcatea tattgttga      60
ggaaaagaaa ctcccgaat tgaattatgc atttatatat ctttttcat ttctagattt      120
cctgaaggct taggtgtagg cacctagcta gtagctacaa taccagcact tctctctatt      180
gataaacaat tggtgtaat gccgcagtag aggaogatca caacatttcg tgctggttac      240
ttttgtttt atggteatga ttcaactctc tctaactctc ccattcattt tgtagttgtc      300
attatcttta gatttttcaac tacctggttt aaaattgagg gattgtagtt ctgttggtac      360
atattacaca ttcagcaaaa caactgaaac tcaactgaac ttgtttatac ttgacacag      420

```

<210> 2

<211> 405

<212> DNA

<213> 大豆

<400> 2

```

gtatgatgct aaattaaatt gtgcctgcac ccaggatat ttcattgtgg attcatcatt      60
tattgaggaa aactctccaa attgaatogt gcatttatat ttttttcca tttctagatt      120
tcttgaagge ttatggtata ggcacctaca attatcagea cttctctcta ttgataaaca      180
attggtgta ataccacagt agagaacgat cacaacattt tgtgctggtt accttttgtt      240
ttatggteat gatttcactc tctctaactc gtaacttccc tcattcatt ttgtaactct      300

```

catathttttc acttctctggt tgaaaattgt agttctcttg gtacatacta gtattagaca 360
 ttcagcaaca acaactgaac tgaacttctt tatactttga cacag 405

 <210> 3
 <211> 6220
 <212> DNA
 <213> 大豆

 <400> 3
 agcttggtag cgagctcgga tccactagta acggccgcca gtgtgotgga attcgcttc 60
 tctctcaacc tctctttcac acathtttctg tgcctctctaa caaacattct cgttcacact 120
 ttcaggtact tttctctctt tatctcttta tctttattct ttctacttt attgcttaaa 180
 ccaatgctat ctatgcttcg atctctcctt cttathtttcc acttcccttt totocttga 240
 tctaaccgtt ttgcctctcc gcctctcgat tgactgagta catctacgat tctctgttct 300
 ttcatttcat agathttctc tgathtttgga taacttggtt tctgttgcgg cctattctta 360
 catatactga ttgttttagca taaatgaact tgcttgttta gcactatctg catathtttcg 420
 tcacgcactt cttctcgatc taaggatgaa tctctathttt cctccgtatt athttctctga 480
 tctcttgttc tgtgctaatg ctccagaaaa tggcagcatt gtctctctct ttgctgtata 540
 agtgtttgtg ttgtgaatct ggaagcgtt ttgcctgagg taacttgcca cttcaactat 600
 tatcthttcag atctctgtaa tttattagct gctattaatt tgtgtgtgca gtgtcaaaact 660
 gaagcaacag actgcttaga agttagaatt tgactgactg ttctctcttg athtttttct 720
 ttcthtttctt tctwactcg gcctathttaa tgatcthttat aatagatta gtggaccact 780
 tggttagttg gtgagttatg aatattcgaa tttctacca caagttgggt taaaaaaatc 840
 tctgcaacta cacgaggatt tttathttta tttagaggaa actathtctgt catcthtttt 900
 cctattacac tttctatca gttgttttga aatatacacc ttaggaatat aatattaccc 960
 cttctggtct taatataaat atathtttaat tatttatatt ttathttaatg aaattathttt 1020
 taaaactctt tcathttaata gaathttttaa taaagttaaa gacthtttatt gtgtagagtt 1080

taacgaagtt aattagtttt ettagtaaat gtaaaatag cttttttgt tgtttataat 1140
 ggagattgga aaaaatatac ttttaatttt ttcaagtgat gaataattat ggatgttttg 1200
 tcaatatttt tgtcttgcta tacaactttc agtcttgeca ttaaataatt ttgaatgtgt 1260
 tattgatata tctgaacaat attagagac gaacataaat tttatatatt ttatataatt 1320
 tctttttatt acctttttat tatcaatttt gaaatttggg taatatctgt gtttcatttt 1380
 gaggtctcaa atttgatata aggaggttea aaatgogttg ctagccattt taaagattag 1440
 caggagagga aatgtttctg gacttaaatt taaaatagc ttatttgttt ttcaagagag 1500
 agagatcaat atttatataa tacacttgaa ttaatatata ccattgttgc aaaaaaaaaa 1560
 aatatttagt tgattgtgtg acaatatttt atattaaata taattagtta atttagttca 1620
 agttgagtta catttttaca taccattctt agcgcocact tttttatatt tatttgtagg 1680
 aataactttt catctgtatc aattttcccc gtctaataaa aagggtttga ctttttctta 1740
 taatagagtt tttttttttt tgotttaagt tattgtaaaa taattatttt attttttttg 1800
 cttttgtaa ttatgtatat ttaatgtttt aataggaaaa aaatgttacc aaaagcacta 1860
 aaagactaaa attaaacaac cataatttgc aaagatgaaa ataaaaaaaa aattttgtaa 1920
 agataaaaaa tgaataaaaa tagttaaatt ataggaattt aaaagctatt taaatcaaca 1980
 aaagttaaag tttctgtaa aaaagttcaa tttttttttt tattattgaa aaagttaaag 2040
 ctaatgagcg ttcgatttgg gttagtatgt agtatattatt attttcaaga ttttgattt 2100
 tattgtcgat gttctgatt tgaatataat tattttccat tcaacttggg attttataag 2160
 aaaaaaaaaag gtacagaaaa aatcaagcgc tttttttatt tcaattagtg gaggtttcac 2220
 tgaatgggt aaagaatcta ttttgcaatc acaattatta ccggtattca actgcaacaa 2280
 ggaacaaaaat tctttctgta aatatacgga gaggaatcta ttttgacttg ttgaatttat 2340
 ggtaaagtag aatttagaat ttaattatga gttgaagtaa tttgaataa tttatatgtt 2400
 aatataaaa tttgtacta agttttattc ataacttga ttctataata caaacatata 2460
 taagttcaaa aataatttta attaaaatta attttatcaa tttttattca aacacgagtc 2520

taatttgctt gatgaattaa gaaaataagg aagaaaatat taaaaactag gagagaagtt 2580
 aaagagaatt tcatotttat tattctcagt tgtttcaaaa ataatagaaag gatagctata 2640
 taatactgta actgagocaa gaacatattt gccgtccgag taaccttttc ttttottggt 2700
 ccgttttctc cgccgatgaa gagaggggaag ggaatgtatc ttgtattta tgttttcaaa 2760
 gagttcgtgc ataaaattgg tttaatcaaa tttttcataa gattattatt ttatgatttt 2820
 ttaaaataaa ttagtaacta tattccgtaa gtcgtacaca gttatatgta gtaagtaaat 2880
 tatattttaa taattattat cttaaaattt tottaagaac ttggttaaaa tatttttgggt 2940
 tgaaaaagtt tatgataact ttttttgggt gaaaaaagt ttacgattat otaactcgta 3000
 cttagattat ttotaattgg gatttattga agggtttttt aagtaaagaa attgtttctt 3060
 atggtttctt ttttattgga caaatttacg tagcaaaagag tgtttcttaa aaacaagaca 3120
 tgtatccttt gaaaaaaaaac tatttctttg aaataaaaaa taatatttat ctggcacata 3180
 ataatgttaa aattaaatca taattaggta aaaataaaat aaatataaaa gtatgagttt 3240
 gttaaagtttt ttataatttt ttattattaa agtaaaatta tgtatgattt ttttataatg 3300
 atatgatatt ttagggatca caaaaaataa tgttgtgaat acaaaagtaa ctcaaaaaat 3360
 tcatttagta aattttcatt ggagatgcta ttattatgct ttctgattgc tttgtcoaaa 3420
 aaataaagaa tgttttttta tttgaaaatt gaaaatttct gggtcattgt aagatcttgt 3480
 agacggtaac gtggccctaa agtttgtgta ggggtgttgc atgcaccgat cattaattac 3540
 tcgatatgga aaacgactga aataatttaa tttgatgttg ctaatattgg ccatccctct 3600
 catcattatt gtttttttat ttgtaacatg acatattctt gtgggtccgc tacggattgg 3660
 gtgtttgttg ccaaaaaata caaaatatct gtggaacaag gataaacagt cttgtttggt 3720
 taattgattg attgatgagt ttgcaagcta tatttttaat ttattttaat taaacttttg 3780
 tgttttagtt ctacaatttt attcatcttg attttttttt tacttggcaa aatcatgatt 3840
 ttttaatttt tacttatggt gaaaacaaat ttattgctaa aaaaacattt attctttttt 3900
 tagagaaaaa acaaatgtgt gatatgtagt gaatcaaatg aaaattttta acataatata 3960

gaatacteta caaatcaatt ttgagtttct ttatcatttt atttatttat tgacatactt 4020
 ctactttotg caaagaccet gaotcgtgga agatataggg aaggttatgg aagttagtgt 4080
 attgtcatat ctagctatct ttgctaattg aaaaagcett ccctttgttt acagatctgg 4140
 ataaggttgc atgtttattc ttttcaactg tgaatggttc tttgcatctt ttttagtata 4200
 tgagattaat gttttaatta ggaagaagct tttagaacat caccogaatc caattcgttt 4260
 tggttttctgt gatcttgatg taaatctata ctaatttggg ttgggcagaa gaaaatgttc 4320
 tttgctcaag tectotagga cgaaaatata aatataacag ggtatatcag atctctatct 4380
 ttctgtgggt aatgatagca tgtttctggt gttttcttat tcttcattgg tcatgataac 4440
 ctgctaattc tatttgccac gattgagatg aaaaggtaat gaactagtaa acaataatga 4500
 gaagaatatg tcgctactat tgttgaaaag gttacgccag geacttgagt atgatgcact 4560
 attttaatta atgcattttt tttgctttga tgagaacgca cattgttcat tctgattcgg 4620
 tgagtttaga aactattgct gataatcctt gatttaagat tttagtcttg ttcattgtca 4680
 ttaaaagtgt tgtaaaaaaa tgcactgata tgtcatgtgc agattgtgtg aagatggggg 4740
 cgggtggcgc aactgatggt cctcctgcc aacaggaagtc agaggttgac cctttgaagc 4800
 ggggtgccatt tgaaaaacct ccatttagtc tcagccaaat caagaaggtc attccacctc 4860
 actgtttcca gegtctggt ttcogtcat tctctatgt tgtttacgac ctcaccatag 4920
 ccttctgect ctattatggt gccaccatt acttccacct ccttcccagc cctctctctt 4980
 tcttggcatg gccaatctac tgggctgtec aaggttgcat ccttactgga gtttgggtca 5040
 ttgccatga gtgtggccac catgcattca gtgactacca gttgcttgat gatattgttg 5100
 gccttgtect ccactcgggt ctctagtc cactactttc atggaaatac agccatcgcc 5160
 gtcaccacct caaactgggt tctcttgagc gggatgaagt atttgtgcca aagcagaagt 5220
 cctgtatcaa gtggtactct aaatacetta acaatcctcc aggcagagtc ctcactcttg 5280
 ctgtcaccct cacactgggt tggccttgt acttggcttt aatgtttct ggaaggcett 5340
 atgatagatt tgettgccac tatgacccat atggtoocat ttactctgat cgtgaacgac 5400

ttcaaata tatatcagat gcaggagtac ttgcagtatg ctatggcctt ttcogtcttg 5460
 ceatggcaaa aggacttgcc tgggtggtgt gtgtttatgg agttccattg ctagtggtca 5520
 atggattttt ggtggtgatt acattcttgc agcatactca ccttgcattg ccacattaca 5580
 cttoctctga gtgggactgg ttgagaggag otttagcaac agtggataga gattatggaa 5640
 tcoetgaacaa ggtcttccat aatattacag acactcatgt agcacatcac ttgttctcca 5700
 caatgccaca ttatcatgca atggaggcta caaaggcaat aaaaccattt ttgggagagt 5760
 attatcggtt tgatgagact ccatttctca aggcaatgtg gagagaggca agagagtgtg 5820
 tttatgtgga gccagatcaa agtaccgaga gcaaagggtg attttggtag aacaataagt 5880
 tgtgatgatt aatgtagccg aggcttcttt gaactttccc ttgtgactgt ttagtateat 5940
 ggttgcctat tgggaataat tttgttgaac cctgatgttg gtagtaagta tctagacagt 6000
 tgcatacggg tttgtttac agaataagat atagcctctc tgaacagttt gattattgca 6060
 ccattggttg caatcggtgc atgtcgacca agtttctcaa gactgtggag aagcttattc 6120
 ttgttccagt tcttgaatcc aagttgttac cgtattctgt aagccgaatt ctgcagatat 6180
 ccacacact ggoggecgt cgagcatgca tctagagggc 6220

<210> 4
 <211> 4597
 <212> DNA
 <213> 大豆

<400> 4
 gtactttct ctccttatct ctttatcttt attcttctct actttattgc ttaaaccaat 60
 gctatctatg ettogatctc gccttcttat ttccacttc cctttctctg cttgatctaa 120
 ccgtttctgc cctccgcgtc tggattgact gactacatct acgattctct gttctttcat 180
 ttcatagatt togtctgatt ttggetaact tggttctgt tgggcccgat tcttacctat 240
 actgattggt tagcataaat gaacttgctt gtttagcact atctgcatat tttcgtcaag 300
 catctcttcc ggatctaaag atgaatctcc ttttctctcc gtattatttc tegtatctct 360
 tgttctgtgc taatgctcca gaaaatggca gcattgtctt cttctttgct gtataagtgt 420

ttgtgtgtg aatctggaag cgatthtgcg tgaggtaact tgcgacttca actattatct 480
 ttcagatctc gttaattht tagctgotat taatthtgtgt gtgcagtgtc aaactgaage 540
 acacgactgc ttagaagtta gaatthtgact gactgttccct ctttgattth tttctttctt 600
 ttctthtgcw actcggccta tttaatgato tttataaata gattagtgga ccacttggtt 660
 agttgggtgag ttatgaatat tcgaatthtc taccacaagt tgggttaaaa aatctctgc 720
 aactacaoga ggatthtthta ttttatttag aggaaactat tctgtcatcc tttttccgat 780
 tacactthtc tatcagttgt ttgaaatat acaccttagg aatataatat taccctthtc 840
 ggtcttaata taaatatatt ttaatttht atattthatt taatgaant atthttaaaa 900
 tactthcatt taatagaant tttataaag ttaaagaact ttattgtgta gagtttaacg 960
 aagttaatta gttttcttag taaatgtaa atatgcctth tttgtttht ataatggaga 1020
 ttggaaaaaa tatactthta tttthtcaa gtgatgaata attatggatg tttgtcaat 1080
 atthtthtct tctatacaa ctttctgtct tgccattaaa taatthtgaa tgtgttattg 1140
 atatctctga acaatthta gagaogaaca taaattht atattthata taatthctth 1200
 ttattacctt ttattatca atthtgaaat ttggttaata tctgtgtthc atthtgaggt 1260
 ctcaaatthg atataaggag gttcaaatg cgttgctagc cattthtaag attagcagga 1320
 gaggaaatgt ttotggactt aaatthaaa tatgcttatt tgtthtcaa gagagagaga 1380
 tcaatthta tataatacac ttgaattaat atacaccatt gttgcaaaaa aaaaaaata 1440
 ttagtthgatt gtgtgacaat atthtatatt aatataant agttaatthta gttcaagttg 1500
 agttacattt ttacatacca ttcttagccg ccactthtth atattthatt gtaggaataa 1560
 cttthcatct gtatcaattt tcccgtcta ataaaaaggg tttgacttht tcttataata 1620
 gagttthtth tttthtgcct taagttattg taaaataant atthtattth tttgcttht 1680
 gtaaattatg tatattthaat gttthtaatg gaaaaaatg ttatcaaaag cactaaaaga 1740
 ctaaaatthaa acaaccataa tttgcaaaga tgaataaaa aaaataant thgaaagata 1800
 aaaaatgaaa taaaatagtt aaattatagg aatthtaaaag ctattthaat caacaaaagt 1860

taaagtttct gtaaaaaag ttcaatTTTT ttttttatta ttgaaaaagt taaagetaat 1920
gagcgttoga tttgggtag tatgtagtat ttattatTTT caagatTTTg gatTTTattg 1980
tcgatgttcc tgatttgaat ataattatTT tccattcaac ttgtgatTTT ataagaaaa 2040
aaaaggtaca gaaaaaatca agcgcTTTT ttttttcaat tagtggaggt ttcactgaaa 2100
tgggtaaaga atctatTTTg caatcacaat tattaccggt attcaactgc aacaaggaac 2160
aaaattcctt tcgtaaatat acggagagga atctatTTTg acttgttgaa tttatggtaa 2220
agtagaattt agaatttaat tatgagttga agtaatTTTg aataatttat atgttaaata 2280
taaaatTTTg tactaagttt tttcataac tttgattcct taatacaaac atacataagt 2340
tcaaaaaata ttttaattaa aattaatTTT atcaatTTTt attcaaacac gagtctaatt 2400
tgcttgatga attaagaaaa taaggaagaa aatattaaaa actaggagag aagttaaaga 2460
gaatttcacc tttattatcc tcagttgttt caaaaataat gaaagatag ctatataata 2520
ctgtaactga gccagaaca ttttgcctg cogagtaacc tttcttttc ttgttccgtt 2580
ttctccgccg atgaagagag ggaagggaaat gtatctttgt atttatgttt tcaaagagtt 2640
cgtgcataaa attggtttaa tcaaatTTTt cataagatta ttattttatg attttttaa 2700
ataaattagt aactatattc cgttaagtcgt acacagttat atgtagtaag taaattatat 2760
tttaataatt attatcttaa aattttctta agaacttggg taaaatattt ttgtttgaaa 2820
aagtttatga taactTTTT ttgttgaaaa aaagtttacg attatctaac tegtacttag 2880
attatttcta attgggattt attgaagggt tttttaagta aagaaattgt ttcttatggt 2940
ttctttttta ttggacaaat ttacgtagca aagagtgttt cttaaaaaca agacatgtat 3000
cctttgaaaa aaaactatTT ctttgaaata aaaaataata tttatctggc acataataat 3060
gttaaaatta aatcataatt aggtaaaaat aaaataaata taaaagtatg agtttgtaa 3120
gttttttata attttttatt attaaagtaa aattatgtat gatTTTTta taatgatatg 3180
atattttagg gatcacaaaa aataatgtgg tgaatacaaa agtaactcaa aaaattcatt 3240
tagtaaattt tcattggaga tgctattatt atgctttctg attgctttgt ccaaaaaata 3300

aagaatgttt ttttatttga aaattgaaaa tttctgggtc atgttaagat cttgtagacg 3360
gtaacgtogg cctaaagttg tgtgaggggt gttgcatgca cogatcatta attactcgat 3420
atggaaaacg actgaaataa ttaatttga tgttgctaatt attggccatc cctctcatca 3480
ttattgtttt tttatttga acatgacata ttcttggggg tccgctacgg attgggtggt 3540
tgttgcaaaa aaatacaaaa tatctgtgga acaaggataa acagtcttgt ttgtttaatt 3600
gattgattga tgagtttga agctatattt ttaatttatt ttaattaaac ttttgtggtt 3660
tagttctaca attttattca tcttgatttt ttttttactt ggcaaaaatca tgatttttta 3720
atttttactt atgttgaaaa caaatttatt gctaaaaaaa catttattct ttttttagag 3780
aaaaacaaa ttttgatat gtagtgaatc aaatgaaaat ttaaacata atatagaata 3840
ctctacaaat caatttgag tttctttatc attttattta tttattgaca taactctact 3900
ttctgcaaag accctgactc gtggaagata tagggaaggt tatggaagtt agtgattgt 3960
catatctage tatcttggct aattgaaaa gccttccctt tgtttacaga tctggataag 4020
gttgcattgt tattcttttc aactgtgaat ggttctttgc atctttttta gtatatgaga 4080
ttaatgtttt aattaggaag aagcttttag aacatcaccc gaatccaatt cgttttggtt 4140
tctgtgatct tgatgtaaat ctataactaat ttggtttggg cagaagaaaa tgttctttgc 4200
tcaagtcctc taggacgaaa atataaatat aacagggtat atcagatctc tattctctg 4260
tgggtaatga tagcatgttt ctgttgtttt ottattcttc attggctatg ataacctgct 4320
aattctattt gccacgattg agatgaaaag gtaatgaact agtaacaat aatgagaaga 4380
atatgtcget actattgttg aaacggttac gccaggcact tgagtatgat gcactatttt 4440
aattaatgca ttttttttgc ttgatgaga aocacattg ttcattctga ttoggtgagt 4500
ttagaaacta ttgctgataa tcttgattt aagatttttag tcttgttcat gttcattaaa 4560
agtgttgtaa aaaaatgcac tgatatgtca tgtgcag 4597

<210> 5

<211> 191

<212> DNA
<213> 大豆

<400> 5
gtaataattt ttgtgittct tactcttttt ttttttttt tgtttatgat atgaatctca 60
cacattgttc tgttatgtca tttcttcttc atttggcttt agacaactta aatttgagat 120
ctttattatg tttttgetta tatggtaaag tgattcttca ttatttcatt ctteattgat 180
tgaattgaac a 191

<210> 6
<211> 346
<212> DNA
<213> 大豆

<400> 6
ttagttcata ctggcttttt tgtttgttca tttgtcattg aaaaaaaac ttttgttgat 60
tcaattattt ttatagtgtg tttggaagcc cgtttgagaa aataagaaat cgcactgtga 120
atgtgaaagt tataactatt tagcttcatc tgtcgttgca agttctttta ttggttaaat 180
ttttatagcg tgotaggaaa ccattcgag aaaataagaa atcacatctg gaatgtgaaa 240
gttataactg ttagcttctg agtaaacgtg gaaaaaccac attttggatt tggaacccaa 300
ttttatttga taaatgacaa ccaaattgat tttgatgat tttgca 346

<210> 7
<211> 142
<212> DNA
<213> 大豆

<400> 7
gtatgtgatt aattgcttct cctatagttg ttcttgatc aattacattt tatttatttg 60
gtaggtccaa gaaaaaggg aatctttatg ctctctgagg ctgttcttga acatggctct 120
ttttatgtg tcattatctt ag 142

<210> 8
<211> 1228
<212> DNA

<213> 大豆

<400> 8

taacaaaaat aatagaaaa tagtgggtga acacttaaat gogagatagt aatacctaaa 60
 aaaagaaaaa aatataggta taataataa tataacttic aaaataaaaa gaaatcatag 120
 agtctagcgt agtgtttgga gtgaaatgat gttcacctac cactactcaa agattttggt 180
 gtgtccetta gttcattctt attatcttac atatcttact tgaaaagact ttttaattat 240
 tcattgagat cttaaagtga ctgttaaatt aaaataaaaa acaagtttgt taaaacttea 300
 aataataag agtgaaggga gtgtcattg tctctctctt tttattgctt tattaatcac 360
 gttctctctt tctttttttt tttctctctt tctctctctt ccattatcaa gttcatgtga 420
 agcagtggcg gatctatgta aatgagtggg gggcaattgc accoacaaga ttttattttt 480
 tattgtaca ggaataataa aataaaactt tgccccata aaaataaat atttttctt 540
 aaaataatgc aaaataata taagaaataa aaagagaata aattattatt aattttatta 600
 tttgtactt tttatttagt ttttttagcg gttagatttt ttttcatga cattatgtaa 660
 tcttttaaaa goatgtaata tttttatttt gtgaaaataa atataaatga tcatattagt 720
 ctcaaatgt ataaactaat aataatttta tcaactaaaag aaattctaatt ttagtccata 780
 aataagtaaa acaagtgaca attatatttt atatttactt aatgtgaaat aatacttgaa 840
 cattataata aaacttaatg acaggagata ttacatagtg ccataaagat attttaaaaa 900
 ataaaatcat taatacactg tactactata taatattoga tatatatttt taacatgatt 960
 ctcaatagaa aaattgtatt gatttatattt tattagacat gaatttcaa gccccgtttt 1020
 tcatttatag ctcttacctg tgatctattg ttttctctcg ctgtttttgt tggtaaggg 1080
 acttagatgt cacaatatta atactagaag taatatatta tgaaaacatg taccttacct 1140
 caacaaagaa agtgtggtaa gtggcaacac acgtgttgca tttttgcccc agcaataaca 1200
 cgtgtttttg tgggtacta aatggac 1228

<210> 9

<211> 625

<212> DNA

<213> 大豆

<400> 9

```

gtacatttta ttgcttattc acctaaaaac aatacaatta gtacatttgt tttatctctt    60
ggaagttagt cattttcagt tgcattgattc taatgctctc tccattctta aatcatgttt    120
tcacaccacac ttcatttaaa ataagaacgt ggggtgtatt ttaattteta ttcactaaca    180
tgagaaatta acttatttca agtaataatt ttaaaatatt tttatgotat tattttatta    240
caaataatta tgtatattaa gtttattgat tttataataa ttatattaaa attatatcga    300
tattaatfff tgattcactg atagtgtfff atattgttag tactgtgcat ttattftaaa    360
attggcataa ataatatatg taaccagctc actatactat actgggagct tgggtggtgaa    420
aggggttecc aacctcctt totagggtga catgctttga tacttctggt accttcttat    480
atcaatataa attatatttt gotgataaaa aaacatggtt aaccattaaa ttctfttttt    540
aaaaaaaaaa ctgtatctaa actftgtatt attaaaaaga agtctgagat taacaataaa    600
ctaacaactca tttggattca ctgca                                          625

```

<210> 10

<211> 98

<212> DNA

<213> 大豆

<400> 10

```

ggtgagtgat tttttgactt ggaagacaac aacacattat tattataata tggttcaaaa    60
caatgacttt ttctttatga tgtgaactcc atftttta                               98

```

<210> 11

<211> 115

<212> DNA

<213> 大豆

<400> 11

```

ggttaactaaa ttaectctac attgttactt tttctcctt tttttatta tticaattct    60
ccaattggaa atttgaataa gttaccataa ttatgtaatt gtttgatcat gtgca        115

```

<210> 12
 <211> 148
 <212> DNA
 <213> 大豆

<220>
 <223> FAD3-1B 内含子 3c

<400> 12
 gtaatctcac tetcacactt totttataca tegcaogcca gtgtgggta ttgcaacct 60
 acaccgaagt aatgccctat aattaatgag gttaacacat gtccaagtcc aatattttgt 120
 tcacttattt gaacttgaac atgtgtag 148

<210> 13
 <211> 361
 <212> DNA
 <213> 大豆

<220>
 <223> FAD3-1B 内含子 4

<400> 13
 gtatcccatt taacacaatt tgtttcatta acattttaag agaatttttt tttcaaaata 60
 gttttogaaa ttaagcaaat accaagcaaa ttgtagatc tacgcttgta ottgttttaa 120
 agtcaaattc atgaccfaat tgtctcaca agtccaaacc gtccactatt ttattttoac 180
 ctactttata gcccaatttg ccatttggtt acttcagaaa agagaacccc attttagta 240
 aatatattat ttatgaatta tggtagtctc aacataaac atacttatgt gcagttttgc 300
 catccttcaa aagaaggtag aaacttactc catgttactc tgtctatag taatttcaca 360
 g 361

<210> 14
 <211> 1037
 <212> DNA
 <213> 大豆

<400> 14
 gtaacaaaaa taaatagaaa atagtgagtg aacacttaaa tgtagatac taccttcttc 60

ttcttttttt ttttttttt gaggttaatg ctagataata gctagaaaga gaaagaaaga 120
 caaatatagg taaaaataaa taatataacc tgggaagaag aaaacataaa aaaagaaata 180
 atagagtota cgtaatgttt ggatttttga gtgaaatggt gttcaoctac cattactcaa 240
 agattctggt gtetaogtag tgtttggact ttggagtga atggtgttca cctaccatta 300
 ctgagattct gttgtgtccc ttagttactg tottatatc ttaggtata ttctttattt 360
 tacatccttt tcacatctta cttgaaaaga ttttaattat teattgaaat attaacgtga 420
 cagttaaatt aaaataataa aaaattcgtt aaaacttcaa ataaataaga gtgaaaggat 480
 catcattttt cttctttctt ttattgcggt attaateatg cttctctctt ttttttctt 540
 cgtttccac ccatatcaaa ttcattgtga gtatgagaaa atcagattc aatggaaagc 600
 tacaggaacy tttttgttt tgtttttata atcggaatta atttatactc cattttttca 660
 caataaatgt tacttagtgc cttaaagata atatttgaaa aattaaaaaa attattaata 720
 cactgtaacta ctatataata tttgacatat atttaacatg attttctatt gaaaatttgt 780
 atttattatt ttttaataaa aaccataag gcattaattt acaagacca tttttcattt 840
 atagctttac ctgtgatcat ttatagcttt aagggaetta gatgttacia tcttaattac 900
 aagtaaatat ttatgaaaaa catgtgtctt acccettaac cttacctcaa caaagaaagt 960
 gtgataagtg gcaacacacg tgttgctttt ttgcccage aataaacagt gtttttgtgg 1020
 tgtacaaaaa tggacag 1037

<210> 15
 <211> 4497
 <212> DNA
 <213> 大豆

<400> 15
 cttgcttggg aacaacgtcg tcaagttatt attttgtct ttttttttt atcatattc 60
 ttattttggt ccaagtatgt catattttga tccatcttga caagtagatt gtcattgtag 120
 aataggaata tcactttaaa ttttaagca ttgattagtc tgtaggcaat attgtctctt 180

tottoctoct tattaatatt ttttattctg ccttcaatca ccagttatgg gagatggatg 240
 taatactaaa taccatagtt gttctgcttg aagtttagtt gtatagttgt tetgcttgaa 300
 gtttagttgt gtgtaatggt tcageggttg cttccoctgt aactgotaca atggtagtga 360
 atatataatt tttgcattgt tcattttttt cttttactta atottcattg ctttgaaatt 420
 aataaaacaa aaagaaggac cgaatagttt gaagtttgaa ctattgecta ttcattgtaac 480
 ttattcacc c aatcttatat agttttttctg gtagagatca ttttaaattg aaggatataa 540
 attaagagga aataacttga tgtgatgtgt ggcaatttgg aagatcatgc gtagagagtt 600
 taatggcagg ttttgcaaat tgacctgtag tcataattac actgggacct ctctggagttt 660
 tgtgcocttt tgttgctgct gtgtttggtt ctgcatgtta gcctcacaca gatatttagt 720
 agttgttgtt ctgcatataa gcctcacacg tatactaaac gagtgaacct caaaatcatg 780
 gccttacacc tattgagtga aattaatgaa cagtgcattg gagtatgtga ctgtgacaca 840
 acccccggtt ttcattatgc aatgtgotac tgtggtgatt aaccttgcta cactgtctgc 900
 cttgtttggt tccttatgta tattgatacc ataaattatt actagtatat cattttatat 960
 tgtccatacc attacgtgtt tatagttctt ttatgacatg taattgaatt ttttaattat 1020
 aaaaaataat aaaacttaat tacgtactat aaagagatgc tottgactag aattgtgac 1080
 tctagtttc ctaaccatat actaatattt gcttgattg atagccctc cgttcccaag 1140
 agtataaaac tgcattgaat aatacaagcc actaggcatg gtaaattaaa ttgtgctgc 1200
 acctogggat atttcatgtg gggttcatca tatttgttga ggaaaagaaa ctcccgaat 1260
 tgaattatgc atttatatat ccttttcat ttctagattt cctgaagget taggtgtagg 1320
 cacctagcta gtagctacaa taccagcact tctctctatt gataaacaat tggctgtaat 1380
 gcgcagtag aggacgatca caacatttgc tgcctgttac tttttgttt atggctatga 1440
 tttcactctc tctaactctc ccattcattt ttagttgtc attatcttta gattttcac 1500
 tacctggttt aaaattgagg gattgtagtt ctgttggtac atattacaca ttcagcaaaa 1560
 caactgaaac tcaactgaa ttgtttatac tttgacacag ggtctagcaa aggaaacaac 1620

aatgggaggt agaggtcgtg tggcaaagtg gaagttcaag ggaagaagcc tctctcaagg 1680
gttccaaaca caaagccacc attcaactgtt ggccaactca agaaagcaat tccaccacac 1740
tgctttcagc gctccctect caottcattc tcttatgttg tttatgacct ttcatttgcc 1800
ttcattttct acattgccac cacctacttc cacctocttc ctcaaccett ttcctcatt 1860
gcatggccaa tctattgggt tctccaaggt tgccttctca ctgggtgtgtg ggtgattgct 1920
cacgagtgtg gtcaccatgc cttcagcaag taccaatggg ttgatgatgt tgtgggtttg 1980
acccttcaot caacactttt agtcccttat ttctcatgga aaataagcca tgcctccat 2040
cactccaaca caggttccct tgaccgtgat gaagtgtttg tcccaaaacc aaaatccaaa 2100
gttgcattgt tttccaagta cttaaacaac cctctaggaa gggctgtttc tctctctgc 2160
aacctcaca taggggtggc tatgtattta gccttcaatg tctctggtag accctatgat 2220
agttttgcaa gccactacca cccttatgct cccatatatt ctaaccgtga gaggettctg 2280
atctatgtct ctgatgttg tttgttttct gtgacttact ctctctaccg tgttgcaacc 2340
ctgaaagggt tggtttgget gctatgtgtt tatgggggtgc ctttgcctat tgtgaacggt 2400
tttcttga ctatcacata ttgcagcac acacactttg ccttgcctca ttacgattca 2460
tcagaatggg actggctgaa gggagctttg gcaactatgg acagagatta tgggattctg 2520
aacaagggtt ttcactacat aactgatact catgtggctc accatctctt ctctacaatg 2580
ccacattacc atgcaatgga ggcaaccaat gcaatcaage caatattggg tgagtactac 2640
caatttgatg acacaccatt ttacaaggca ctgtggagag aagcgagaga gtgcctctat 2700
gtggagccag atgaaggac atccgagaag ggcgtgtatt ggtacaggaa caagtattga 2760
tggagcaacc aatgggcat agtgggagtt atggaagttt tgcattgat tagtacataa 2820
ttagtagaat gttataaata agtggatttg ccgcgtaatg actttgtgtg tattgtgaaa 2880
cagcttgttg cgtcatggt tataatgtaa aaataattct ggtattaatt acatgtggaa 2940
agtgttctgc ttatagcttt ctgcctaaaa tgcacgtgc acgggacaat atcattggtg 3000
atTTTTTaa aatctgaatt gaggctactc ataatactat ccataggaca tcaaagacat 3060

gttgcattga ctttaagcag aggttcatct agaggattac tgoatagget tgaactacaa 3120
 gtaatttaag ggacgagagc aacttttagct ctaccacgtc gttttacaag gttattaaaa 3180
 tcaaattgat cttattaaaa ctgaaaattt gtaataaaat gotattgaaa aattaaaaata 3240
 tagcaaacac ctaaattgga ctgattttta gattcaaat taataattaa tctaaattaa 3300
 acttaaat tataatata gtettgtaat atatcaagtt tttttttta ttattgagtt 3360
 tggaaacata taataaggaa cattagttaa tattgataat ccactaagat cgaacttagta 3420
 ttacagtatt tggatgatt gtatgagata tcaaacctt actcttatca taatagagac 3480
 aaaagttaat actgatggg gagaaaaaa aatgttattg ggagcatatg gtaagataag 3540
 acggataaaa atatgctgca gcctggagag ctaatgtatt ttttggtgaa gttttcaagt 3600
 gacaactatt catgatgaga acacaataat attttotact tacctatccc acataaaata 3660
 ctgattttta taatgatgat aaataatgat taaaatattt gattctttgt taagagaaat 3720
 aaggaaaaca taaatattct catggaaaaa tcagcttgta ggagtagaaa ctttctgatt 3780
 ataattttta tcaagttta ttcattcttt taattttatt attagtacaa aatcattctc 3840
 ttgaatttag agatgtatgt ttagotaa tagtaatttt ttatttttat aataaaatc 3900
 aagcagtcaa atttcatcca aataatcgtg ttcgtgggtg taagtcagtt attccttctt 3960
 atettaatat acacgcaaag gaaaaaataa aaataaaatt cgaggaagcg cagcagcagc 4020
 tgataccacg ttggttgacg aaactgataa aaagcgtgt cattgtgtct ttgtttgac 4080
 atcttcacaa tcacatctcc agaacacaaa gaagagtgac ccttcttctt gttattccac 4140
 ttgogttagg tttctacttt cttctctctc tctctctctc tcttctctcc tcatttttcc 4200
 ctcaaacat caatcaattt tcattcagat tcgtaaattt ctcgattaga tcacggggtt 4260
 aggtctccca ctttatcttt tcccaagcct ttctctttcc ccttttccct gtctgcccac 4320
 taaaattcag gatcgaaaa gaactgggtt ettgaatttc actctagatt ttgacaaatt 4380
 cgaagtgtgc atgcactgat gcgaccact cccctttttt tgcattaaac aattatgaat 4440
 tgaggttttt cttgogatca tcattgcttg aattgaatca tattaggttt agattct 4497

<210> 16	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 16	
atacaagcca ctaggcat	18
<210> 17	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 17	
gattggccat gcaatgaggg aaaagg	26
<210> 18	
<211> 778	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(778)	
<223> 在所有 n 位置不确定	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 18	
atacaagcca ctaggcatgg taaattaaat tgtgcctgca cctcgggata tttcatgtgg	60
ggttcatcat atttgttgag gaaaagaaac tccogaaatt gaattatgca tttatatatc	120
ctttttcatt tctagatttc ctgaaggctt aggtgtaggc acctagctag tagctacaat	180
atcagcactt ctctctattg ataaacaatt ggctgtaatg ccgcagtaga ggacgatcac	240
aacatttctg getggttact tttgtttta tggatcatgat tteactctct ctaatctctc	300

cattoatfff gtagttgtca ttatcttttag atttttcact acctggttta aaattgaggg 360
 attgtagttc tgttgggtaca tattacacat tcagcaaac aactgaaact caactgaact 420
 tgtttatact ttgacacagg gtctagcaaa ggaacaaca atgggaggta gaggtcgtgt 480
 ggccaaagtg gaagttcaag ggaagaagcc tctctcaagg gttccaaaca caaagccacc 540
 attcaactgtt ggccaaactca agaaagcaat tccaccacac tgccttcage gctccctcct 600
 cactteatte tctatgttg tttatgacct ttcatttgc ttcattttct acattgccac 660
 cacctacttc cacctcttc ctcaaccctt ttcctcatt gcattggccaa tcaagccgaa 720
 ttctgcagat atcoatcaca tggcggcggg tggngnaggn ntntanaggg cccaatte 778

<210> 19
 <211> 2463
 <212> DNA
 <213> 大豆

<400> 19
 actatagggc acgcgtggte gaoggeccgg gctggctctc ggtgtgactc agccccaagt 60
 gaegccaacc aaacogctcc taactaaggt gtagaagaaa cagatagtat ataagtatac 120
 catataagag gagagtgagt ggagaagcac ttctcctttt tttttctctg ttgaaattga 180
 aagtgttttc cgggaaataa ataaaataa ttaaaatctt acacacteta ggtaggtact 240
 tctaatttaa tccacacttt gactctatat atgttttaaa aataattata atgogtactt 300
 acttctcat tataactaat ttaacatcga tgattttatt ttctgtttct cttctttcca 360
 cctacataca tcccaaaatt tagggtgcaa ttttaagttt attaacacat gtttttagct 420
 goatgctgcc tttgtgtgtg ctcaccaaaf tgcattcttc tctttatag ttgtatttga 480
 attttcacac catatgtaa caagattacg tacgtgtcca tgatcaaata caaatgctgt 540
 cttatactgg caatttgata aacagecgtc cattttttct tttctcttt aactatatac 600
 gctctagaat ctctgaagat tctctgcca tcgaatttct ttcttggtaa caacgctctc 660
 gttatgttat tattttatc tatttttatt ttatcatata tattttttat tttgttcgaa 720

gtatgtcata ttttgatcgt gacaattaga ttgtcatgta ggagtaggaa taccacttta 780
 aaacattgat tagtctgtag gcaatattgt cttcttttcc ctcctttatt aatatatttt 840
 gtogaagttt taccacaagg ttgattcgt tttttgtcc cttctcttg ttctttttac 900
 ctcaggattt ttagtcttcc atggattata agatcaactga gaagtgtatg catgtaatac 960
 taagcaccat agctgttctg cttgaattta ttgtgtgta aattgtaatg tttcagogtt 1020
 ggettttccct gtagctgcta caatggact gtatatctat tttttgcatt gttttcattt 1080
 tttcttttac ttaacttcca ttgctttgaa attaataaaa caatataata tagtttgaac 1140
 ttgaaactat tgcctattca tgtaattaac ttaticactg actcttattg tttttctggt 1200
 agaattcatt ttaaattgaa ggataaatta agaggcaata cttgtaaatt gacctgtcat 1260
 aattacacag gacctgttt tgtgcctttt tgcctctgtc tttggttttg catgttagcc 1320
 tcacacagat atttagtagt tgttctgcat acaagcctca cacgtatact aaaccagtgg 1380
 acctcaaagt catggcctta cacctattgc atgogagtct gtgacacaac cctggtttc 1440
 catattgcaa tgtgctaogc cgtctcctt gttgtttcc atatgtatat tgataccatc 1500
 aaattattat atcatttata tggctcggac cattaactgt actctttatg acatgtaatt 1560
 gagtttttta attaaaaaaa tcaatgaaat ttaactactg agcatcatat agagataatt 1620
 gactagaaat ttgatgactt attcttccct aatcatattt tcttgattg atagccccgc 1680
 tgcctctttt aaactccga gagagtataa aactgcatcg aatattacaa gatgcactct 1740
 tgcacaaatga agggggggaa atgatactac aagccactag gcatggtatg atgctaaatt 1800
 aaattgtgcc tgcaccccag gatatttcat gtgggattca toatttattg aggaaaactc 1860
 tccaaattga atogtgcatt tatatttttt ttccatttct agatttcttg aaggcttatg 1920
 gtataggcac ctacaattat cagcacttct ctctattgat aaacaattgg ctgtaatacc 1980
 acagtagaga acgatcacia cattttgtgc tggttacctt ttgttttatg gtcatgattt 2040
 cactctctct aatctgtcac ttccctccat tcattttgta cttctctat ttttcaactc 2100
 ctggttgaaa attgtagtcc tcttggtaca tactagtatt agacattcag caacaacaac 2160

tgaactgaac ttctttatac ttgacacag ggtctagcaa aggaaacaat aatgggaggt 2220
 ggaggccgtg tggccaaagt tgaaattcag cagaagaagc ctctctcaag ggttccaaac 2280
 acaaagocac cattcactgt tggccaactc aagaaagcca ttccaccgca ctgctttcag 2340
 cgttccctcc tcacttcatt gtctatggt gtttatgacc tttcattgce tttcatttcc 2400
 tacattgcca ccacctactt ccacctctc cctcacccct tttccctcat tgcattgcca 2460
 atc 2463

<210> 20
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 20
 cuacuacuac uactogagac aaagccttta gcctttagcc tatg 44

<210> 21
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 21
 caucaucauc auggatccca tgtctcteta tgcaag 36

<210> 22
 <211> 1704
 <212> DNA
 <213> 大豆

<400> 22
 actatagggc acgcgtggtc gaaggeccgg getggtcctc ggtgtgactc agcccccaagt 60
 gaagccaacc aaacgcgtcc taactaaggt gtagaagaaa cagatagtat ataagtatac 120
 catataagag gagagtgagt ggagaagcac ttctctttt tttttctctg ttgaaattga 180

aagtgttttc egggaataa ataaaaataa ttaaaatctt acacactcta ggtaggtact 240
tetaatntaa tccacacttt gactctatat atgttttaaa aataattata atgcgtactt 300
acttctcat tataactaat ttaacatcga tgattttatt ttctgtttct cttctttcca 360
cctacataca tcccaaaatt tagggtgcaa ttttaagttt attaacacat gtttttagct 420
gcatgctgcc tttgtgtgtg ctcaccaaatt tgcattcttc totttatatt ttgtatttga 480
atnttcacac catattgtaa caagattacg tacgtgtcca tgatecaata caaatgctgt 540
cttatactgg caatttgata aacagccgtc cattttttct tttctcttt aactatata 600
gctctagaat ctctgaagat tctctgcca tgaattttct ttcttgtaa caacgtctc 660
gttatgttat tattttatc tattttatt ttatcatata tattcttat tttgttogaa 720
gtatgtcata ttttgatcgt gacaattaga ttgtcatgta ggagtaggaa tateactta 780
aaacattgat tagtctgtag gcaatattgt cttcttttct ctcctttatt aatataattt 840
gtogaagttt taccacaagg ttgattoct tttttgtcc cttctctctg ttctttttac 900
ctcaggtatt ttagtcttct atggattata agatcactga gaagtgtatg catgtaatac 960
taagcaccat agctgttctg cttgaattta tttgtgtgta aattgtaatg tttcagcgtt 1020
ggetttccct gtagctgcta caatggact gtatatctat tttttgcatt gttttcattt 1080
ttctttttac ttaattctca ttgctttgaa attaataaaa caatataata tagtttgaac 1140
tttgaactat tgctattca tgtaattaac ttattcactg actcttattg tttttctggt 1200
agaattcatt ttaaattgaa ggataaatta agaggcaata cttgtaatt gacctgctat 1260
aattacacag gacctgttt tgtgcctttt tgtctctgct tttggttttg catgttagcc 1320
tcacacagat atttagtagt tgttctgcat acaagcctca cactatact aaaccagtgg 1380
acctcaaggt catggctta cacctattgc atgcagctct gtgacacaac cctggtttc 1440
catattgcaa tgtgctaacc cgtctctctt gttgtttcc atatgtatat tgataccatc 1500
aaattattat atcatttata tggctctggac cattacgtgt actctttatg acatgtaatt 1560
gagtttttta attaaaaaaa tcaatgaaat ttaactacgt agcatcatat agagataatt 1620

gactagaaat ttgatgactt attctttctt aatcatatth tcttgattg atagccccgc 1680
tgtecccttt aaactcccga gaga 1704

<210> 23
<211> 4010
<212> DNA
<213> 大豆

<400> 23
acaaagcctt tagcctatgc tgccaataat ggataccaac aaaagggttc ttctttgat 60
tttgatceta gcgctcctcc accgtttaag attgcagaaa tcagagcttc aataccaaaa 120
cattgctggg tcaagaatcc atggagatcc ctcagttatg ttctcagga tgtgcttga 180
attgotgcat tggtgctgc agcaatcacc ttcgacaact ggettctctg gctaactctat 240
tgccccattc aaggcacaat gttctgggct ctctttgttc ttggacatga ttgtaataa 300
tttttggtt tcttactctt ttttttttt ttttgttat gatatgaatc tcacacattg 360
ttctgttatg tcattcttc ttcatttgc tttagacaac ttaaatttga gatcttatt 420
atgtttttgc ttatatggta aagtgattct tcattatttc attcttcatt gattgaattg 480
aacagtggcc atggaagctt ttcagatagc cctttgctga atagcctggg gggacacatc 540
ttgcattcct caattcttgt gccataccat ggatggttag ttcatactgg cttttttgtt 600
tgttcaattg tcattgaaaa aaaatctttt gttgattcaa ttatttttat agtgtgtttg 660
gaagcccggt tgagaaaaata agaaatcgca tctggaatgt gaaagttata actatttagc 720
ttcatctgtc gttgcaagtt cttttattgg ttaaattttt atagcgtgct aggaaaccca 780
ttcgagaaaa taagaaatca catctggaat gtgaaagtta taactgttag cttctgagta 840
aacgtggaat aaccacattt tggatttga accaaatttt atttgataaa tgacaaccaa 900
attgattttg atggattttg caggagaatt agccacagaa ctcaccatga aaaccatgga 960
cacattgaga aggatgagtc atgggttcca gtatgtgatt aattgctctc cctatagttg 1020
ttcttgatc aattacattt tatttatttg gtaggtccaa gaaaaaggg aatctttatg 1080

cttcotgagg ctgttcttga acatggctct tttttatgtg tcattatctt agttaacaga 1140
 gaagatttac aagaatctag acagcatgac aagactcatt agattcaactg tgccatttcc 1200
 atgtttgtgt atccaattta tttggtagt gattttttga ottggaagac aacaacacat 1260
 tattattata atatggttea aaacaatgac ttttcttta tgatgtgaac tccatttttt 1320
 agttttcaag aagccccgga aaggaaggct ctcacttcaa tccctacagc aatctgttcc 1380
 caccagtgga gagaaaagga atagcaatat caacactgtg ttgggetacc atgttttctc 1440
 tgettatcta tctctcattc attaactagt ccacttotag tgotcaagct ctatggaatt 1500
 ccatattggg taactaaatt actcctacat tgttactttt tctcctttt ttttattatt 1560
 tcaattctcc aattggaat ttgaaatgt taccataatt atgtaattgt ttgatcatgt 1620
 gcagatgttt gttatgtgge tggactttgt cacacttgg catcacatg gtcaccacca 1680
 gaaactgcct tggtaaccgg gcaaggtaac aaaaataaat agaaaatagt gggatgaacac 1740
 ttaaatgcga gatagtaata cctaaaaaaa gaaaaaata taggtataat aaataatata 1800
 actttcaaaa taaaaagaaa tcatagagtc tagcgtatgt tttggagtga aatgatgttc 1860
 acctaccatt actcaaagat tttgttgggt ccttagttc attcttatta ttttacatat 1920
 cttacttgaa aagacttttt aattattcat tgagatctta aagtactgt taaattaaaa 1980
 taaaaacaa gtttgtaaa acttcaaata aataagagt aagggagtgt catttgtctt 2040
 cttcttttta ttgcgttatt aatcacgttt ctctctctt ttttttttt cttctctgct 2100
 ttccaccat tatcaagttc atgtgaagca gtggcggatc tatgtaaatg agtggggggc 2160
 aattgcacc acaagatttt attttttatt tgtacaggaa taataaata aaactttgcc 2220
 ccataaaaa ataaatattt tttcttaaaa taatgcaaaa taaatataag aaataaaaag 2280
 agaataaatt attaataatt ttattatttt gtacttttta tttagttttt ttagcggtta 2340
 gatttttttt tcatgacatt atgtaatctt ttaaaagcat gtaatatttt tattttgtga 2400
 aaataaatat aatgatcat attagtctca gaatgtataa actaataata attttatcac 2460
 taaaagaaat tctaatttag tccataaata agtaaaacaa gtgacaatta tattttatat 2520

ttacttaatg tgaataata cttgaacatt ataataaac ttaatgacag gagatattac	2580
atagtgecat aaagatattt taaaaataa aatcattaat acaactgtact actatataat	2640
attcgatata tatttttaac atgattotca atagaaaaat tgtattgatt atattttatt	2700
agacatgaat ttacaagecc ogtttttcat ttatagctct tacctgtgat ctattgtttt	2760
gcttgcgtgt ttttgttggt caagggactt agatgtcaca atattaatac tagaagtaaa	2820
tatttatgaa aacatgtacc ttacctcaac aaagaaagtg tggttaagtgg caacacacgt	2880
gttgcatttt tggcccagca ataacaogtg tttttgtggt gtactaaaat ggacaggaat	2940
ggagtatttt aagaggtgge ctcaccactg tggatogtga ctatggttg atcaataaca	3000
ttccocatga cattggcacc catgttatcc accatctttt cccccaaatt cctcattatc	3060
acctcgttga agcggtagat tttattgett attcaactaa aaacaataca attagtacat	3120
ttgttttate tottggaaagt tagtcatttt cagttgcatg attctaatge tctctccatt	3180
cttaaatcat gttttcacac ccacttcatt taaaataaga acgtgggtgt tattttaatt	3240
tctatcact aacatgagaa attaacttat ttcaagtaat aattttaaa tatttttatg	3300
ctattatttt attacaaata attatgtata ttaagtttat tgattttata ataattatat	3360
taaaattata tcgatattaa tttttgatc actgatagtg ttttatattg ttagtactgt	3420
gcatttattt taaaattggc ataaataata tatgtaacca gctcactata ctatactggg	3480
agcttgggtg tgaagggtg tcccaccct cctttctagg tgtacatgct ttgatacttc	3540
tggtaccttc ttatatcaat ataaattata ttttgetgat aaaaaaacat ggtaaccat	3600
taaattcttt ttttaaaaa aaaactgtat ctaaactttg tattattaaa aagaagtctg	3660
agattaacaa taaactaaca ctcatttggg ttcaactgcag acacaagcag caaaaccagt	3720
tottggagat tactaccgtg agccagaaag atctgcgcca ttaccatttc atctaataaa	3780
gtatttaatt cagagtatga gacaagacca ctctgtaagt gacactggag atgttgttta	3840
ttatcagact gattctctgc tctcactc gcaacgagac tgagtttcaa actttttggg	3900
ttattattta ttgattctag ctactcaaat tactttttt ttaatgttat gttttttgga	3960

gtttaeagt ttctgaacaa cttgcaaatt acttgcatag agagacatgg 4010

<210> 24
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物

<400> 24
 acgaattcct cgaggtaaata taaattgtgc ctgc 34

<210> 25
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物

<400> 25
 gcgagatcta tcgatctgtg tcaaagtata aac 33

<210> 26
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物

<400> 26
 catgctttct gtgcttctc 19

<210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物

<400> 27

gttgatccaa ccatagtcg	19
<210> 28	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 28	
gogatgatg tatgatgcta aattaaattg tgcoctg	36
<210> 29	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 29	
goggaattcc tgtgtcaaag tataaagaag	30
<210> 30	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 30	
gatgatgcc cgggtaata atttttgtgt	30
<210> 31	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 31	

cacgectcga gtgttcaatt caatcaatg 29

<210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 32
 cactcgagtt agttcatact ggct 24

<210> 33
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 33
 cgcategatt gcaaaatoca tcaaa 25

<210> 34
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 34
 cuacuacuac uactcgagcg taaatagtgg gtgaacac 38

<210> 35
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 35

caucaucauc auctogagga attcgtccat tttagtacac c 41

<210> 36
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 36
 cuacuacuac uactegaggc gcgtacattt tattgctta 39

<210> 37
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 37
 caucaucauc auctogagga attctgcagt gaatccaaat g 41

<210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 38
 caccatggtc atcatcagaa ac 22

<210> 39
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 39

tcacgatcca cagttgtgag ac

22

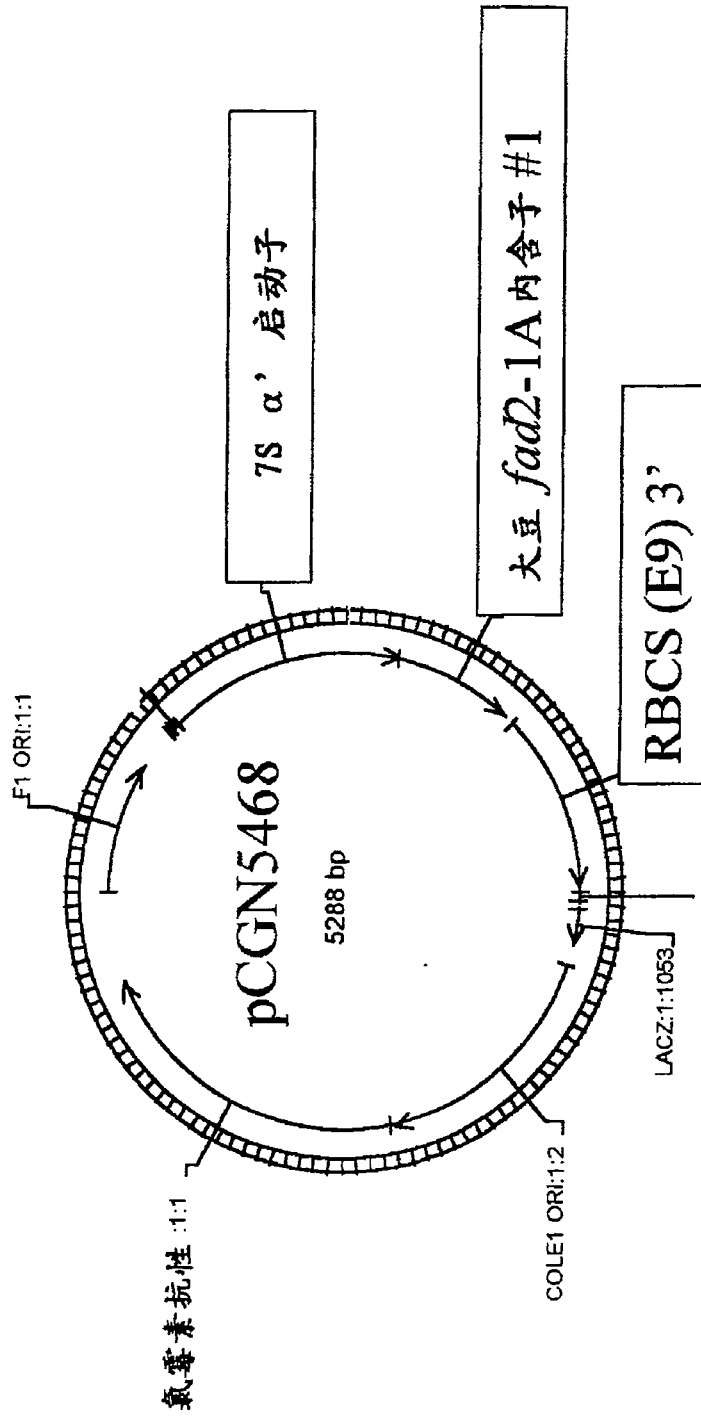


图 1

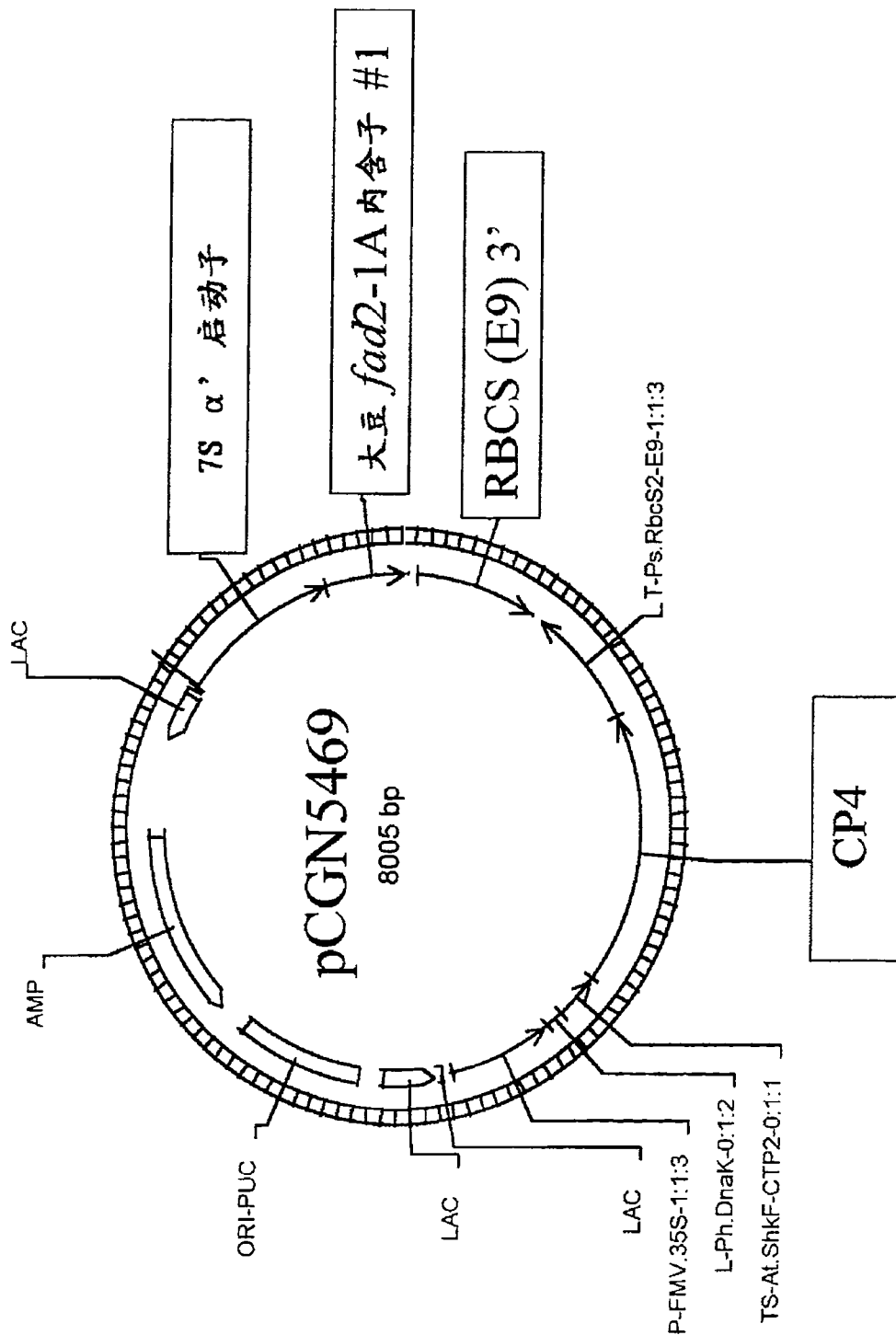


图 2

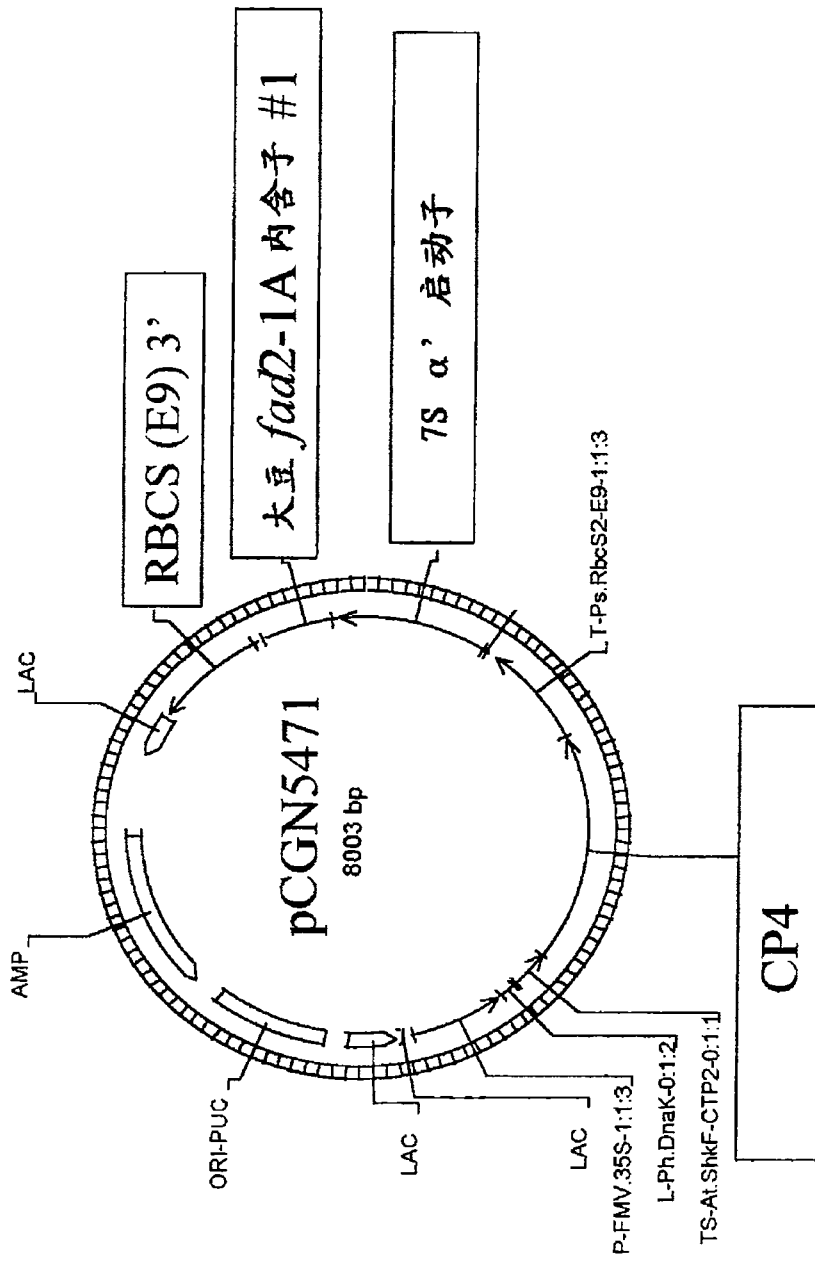


图 3

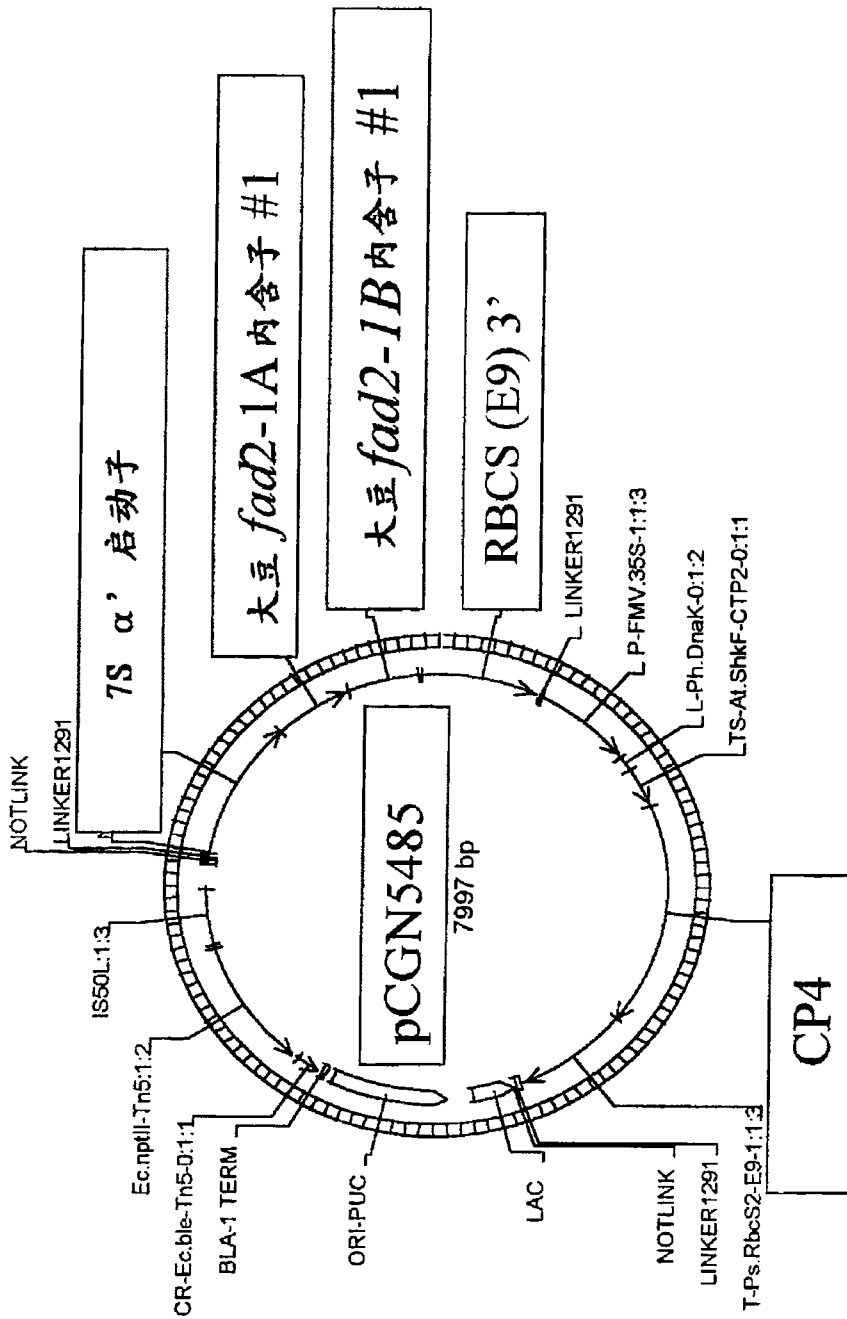


图 4

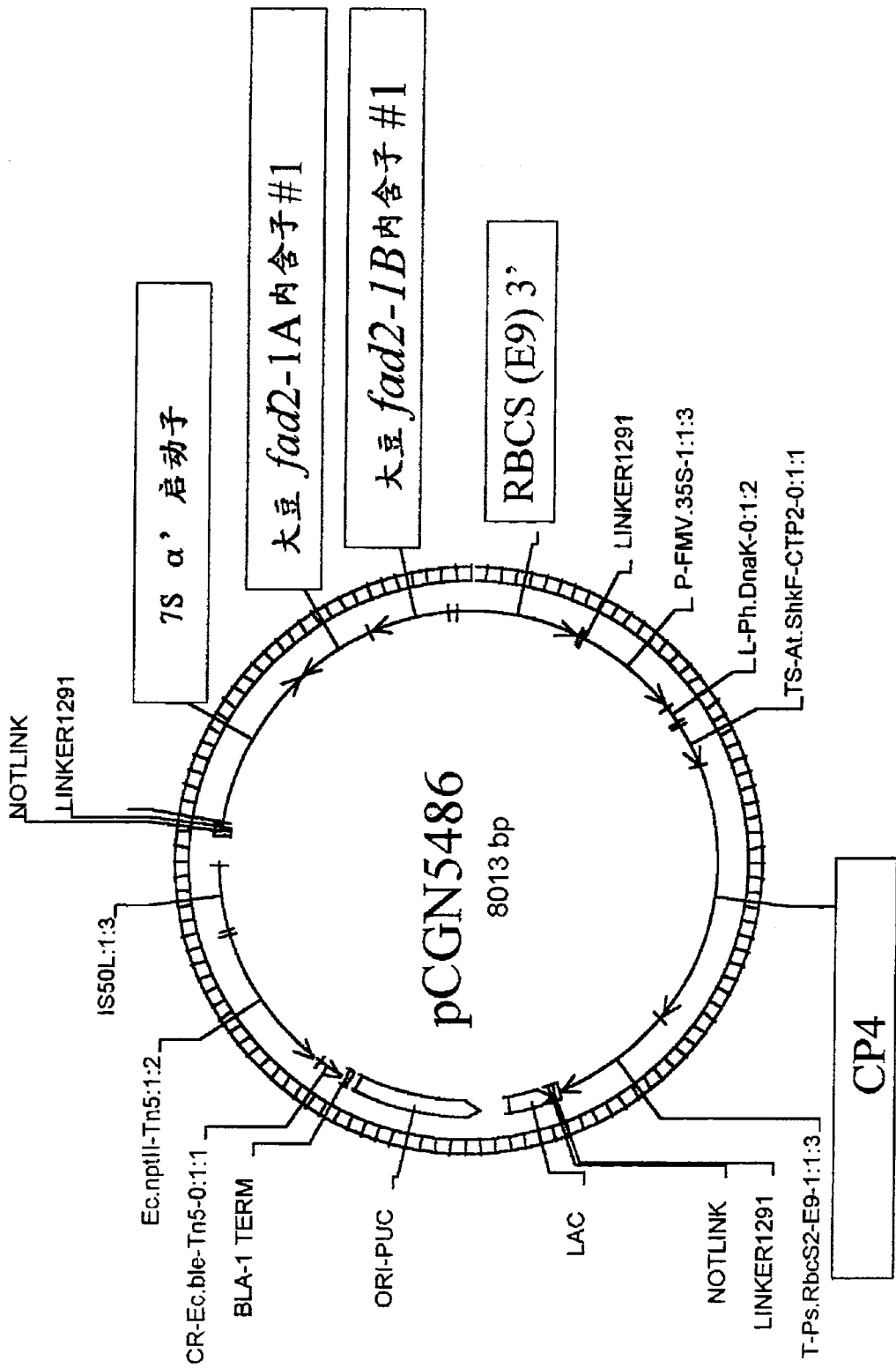


图 5

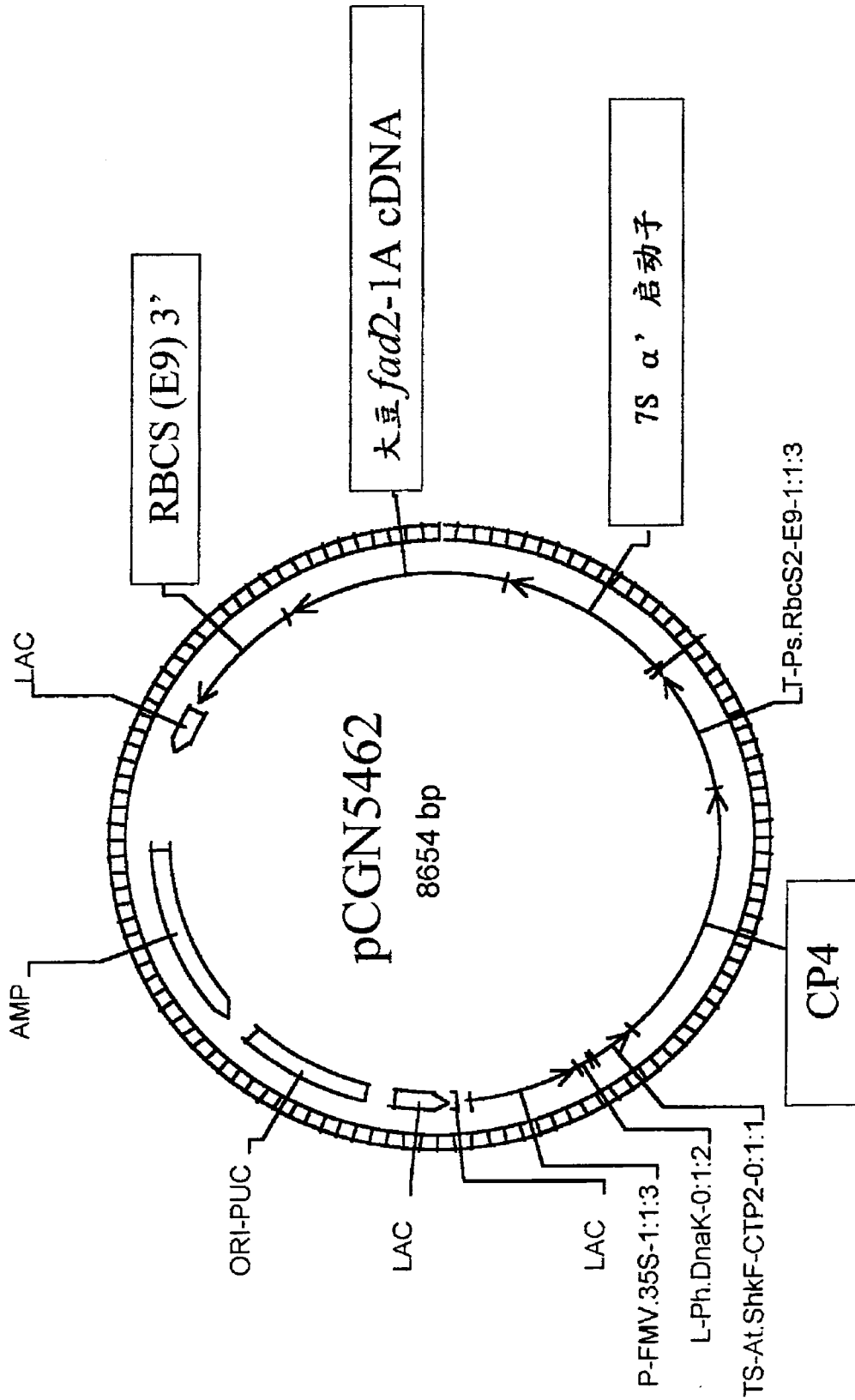


图 6

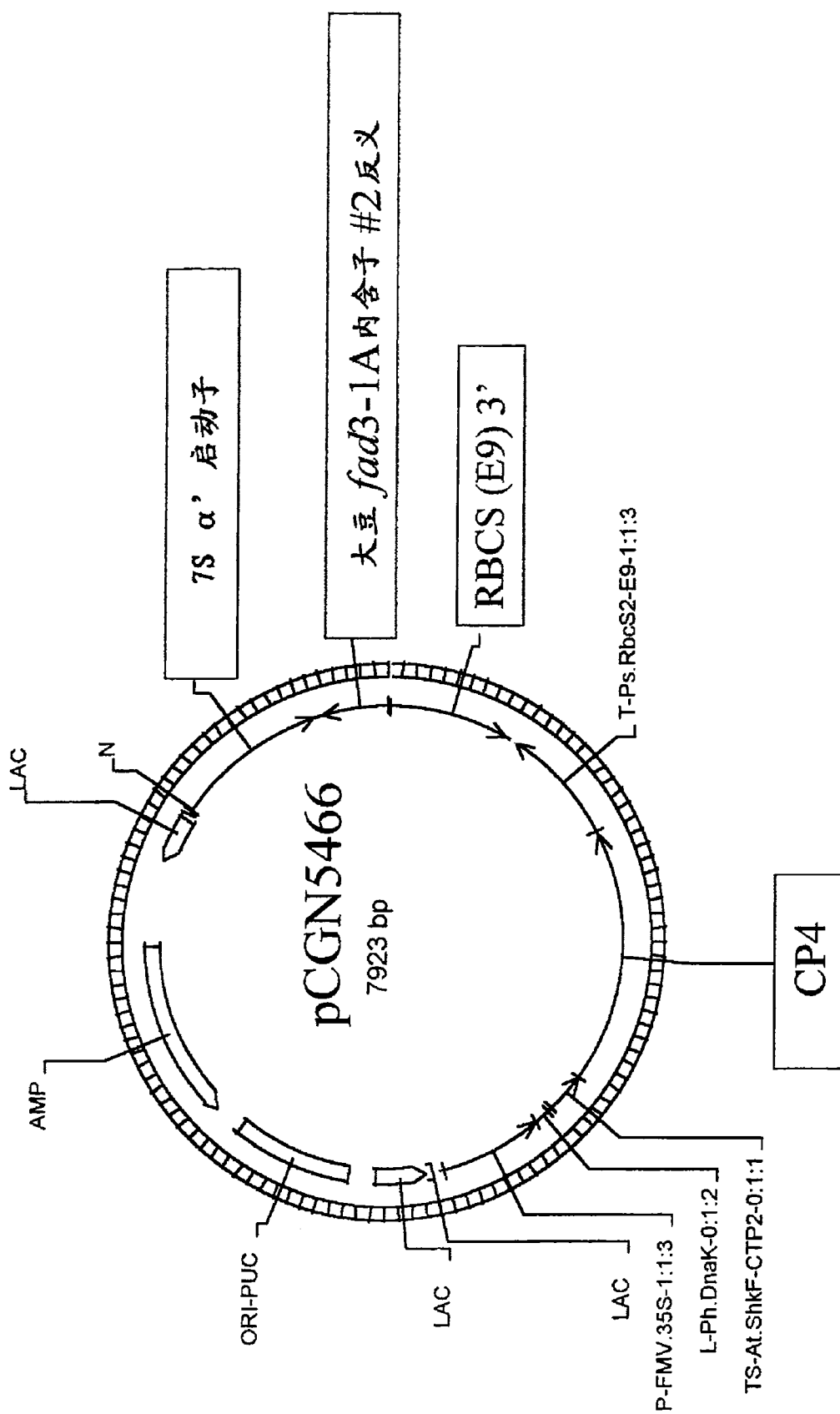


图 7

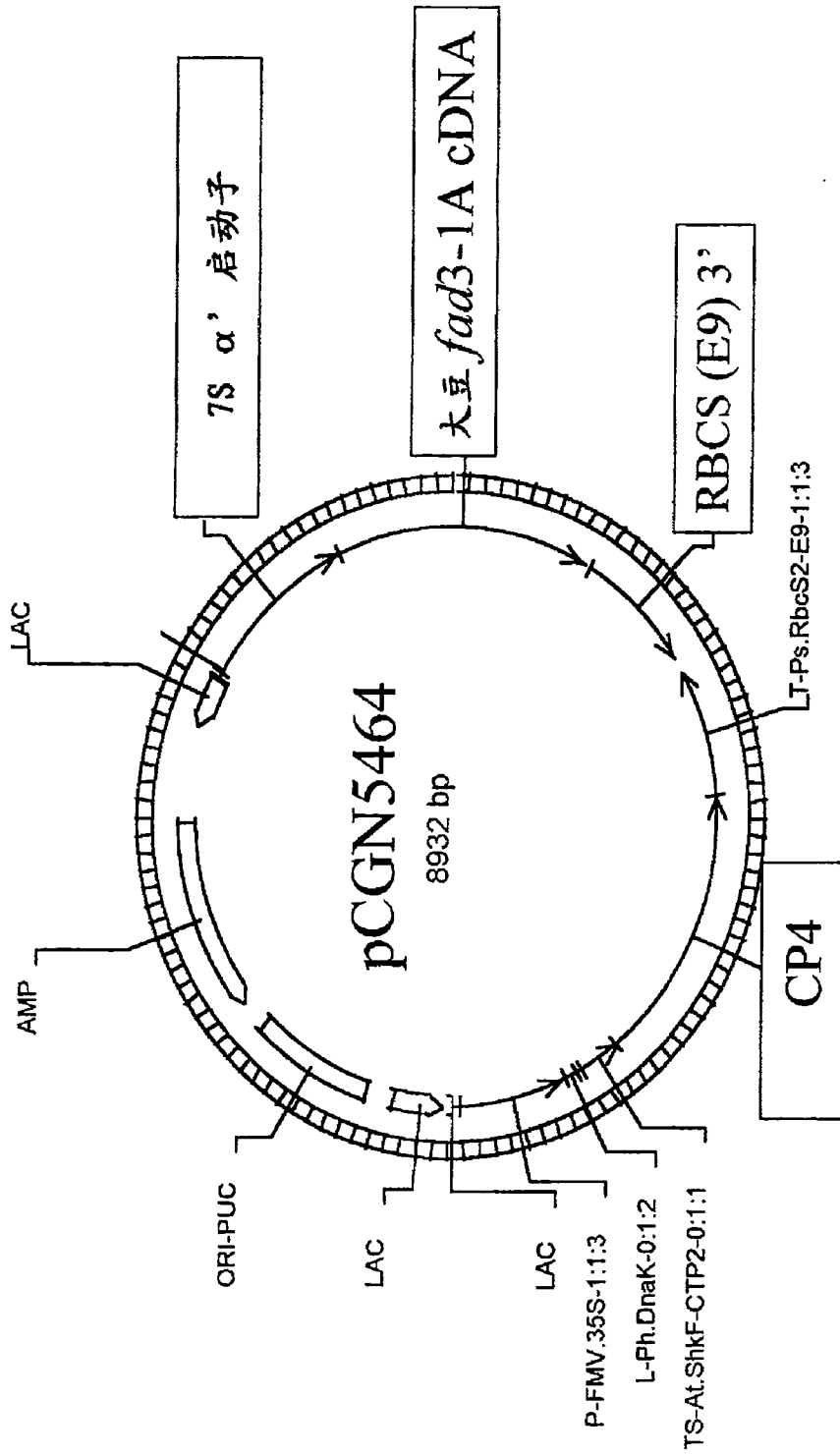


图 8

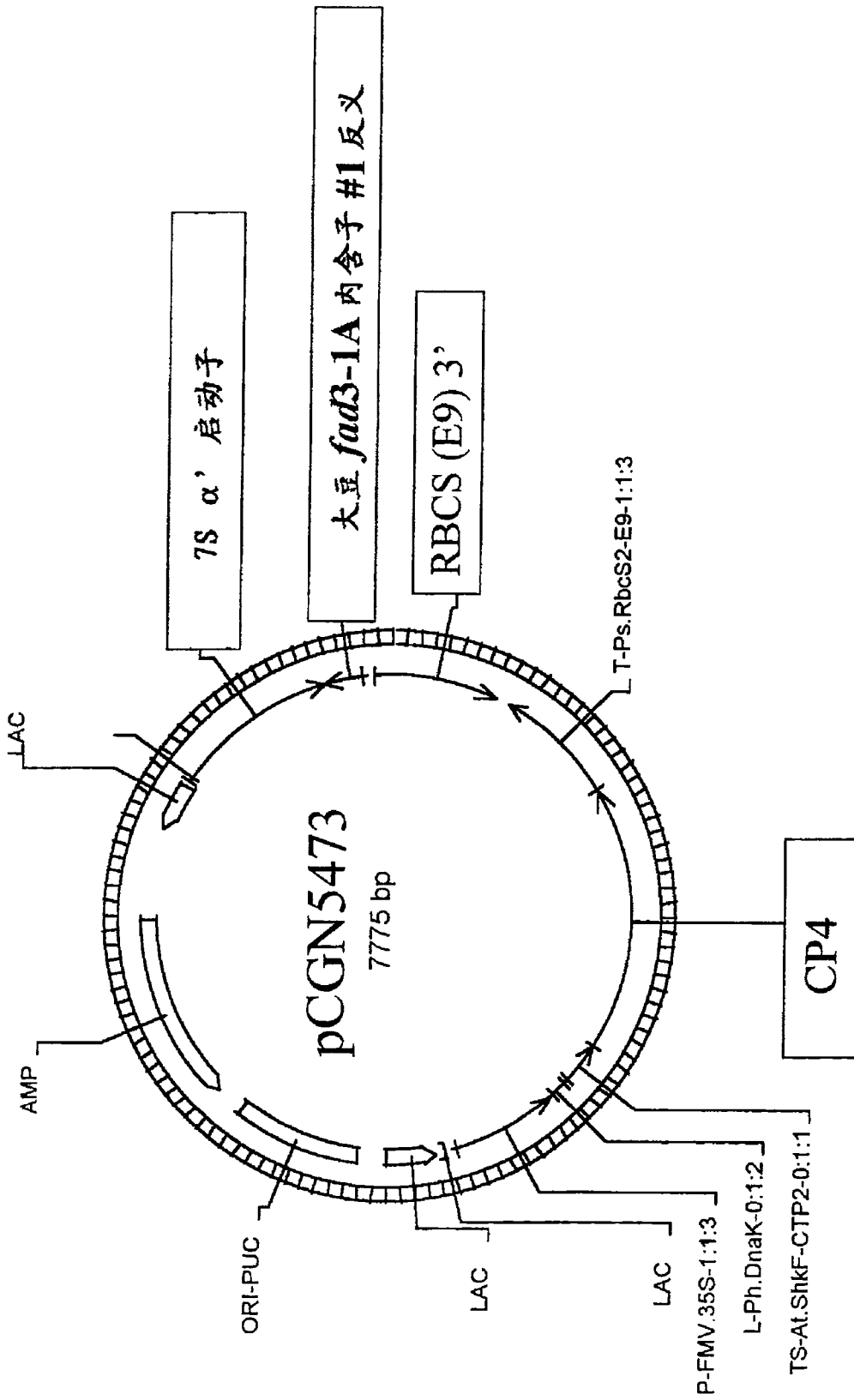


图 9

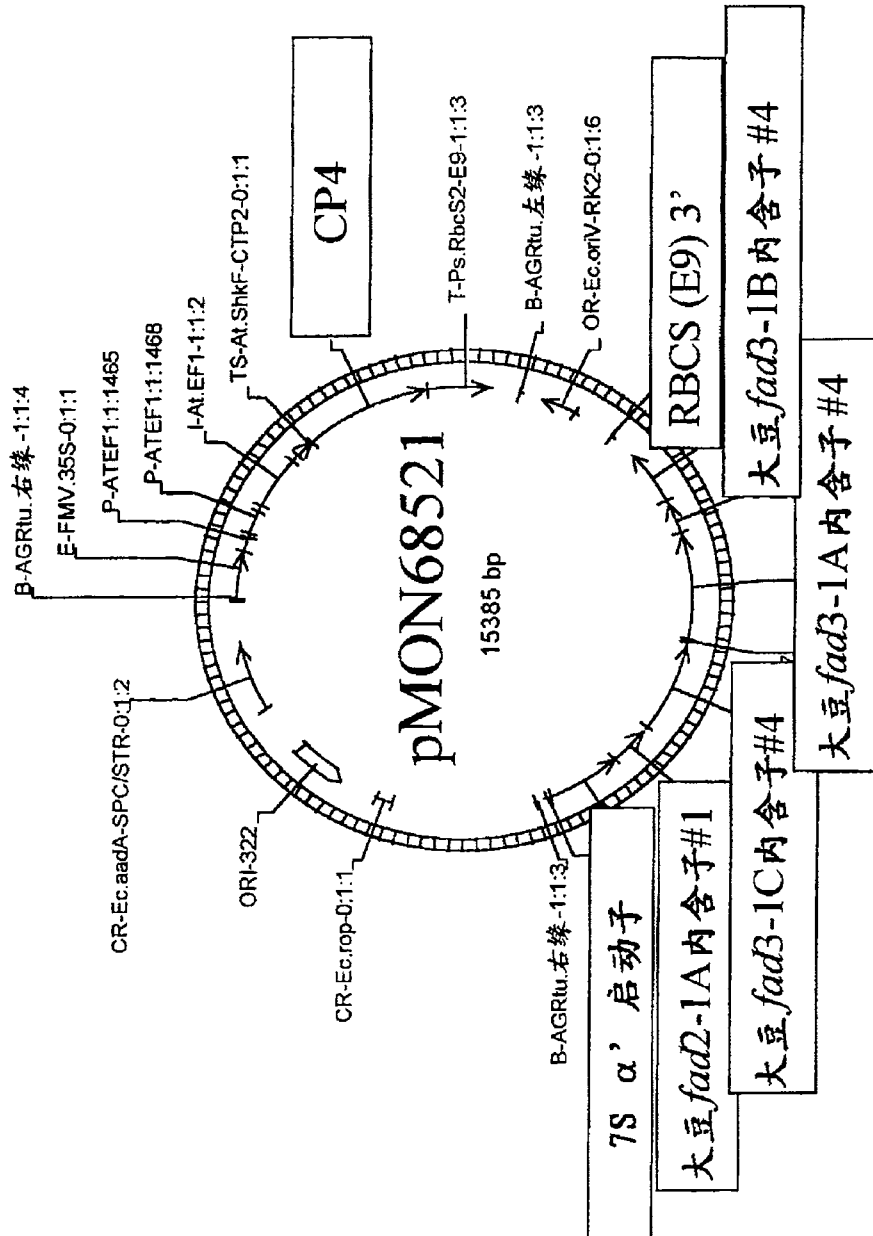


图 10

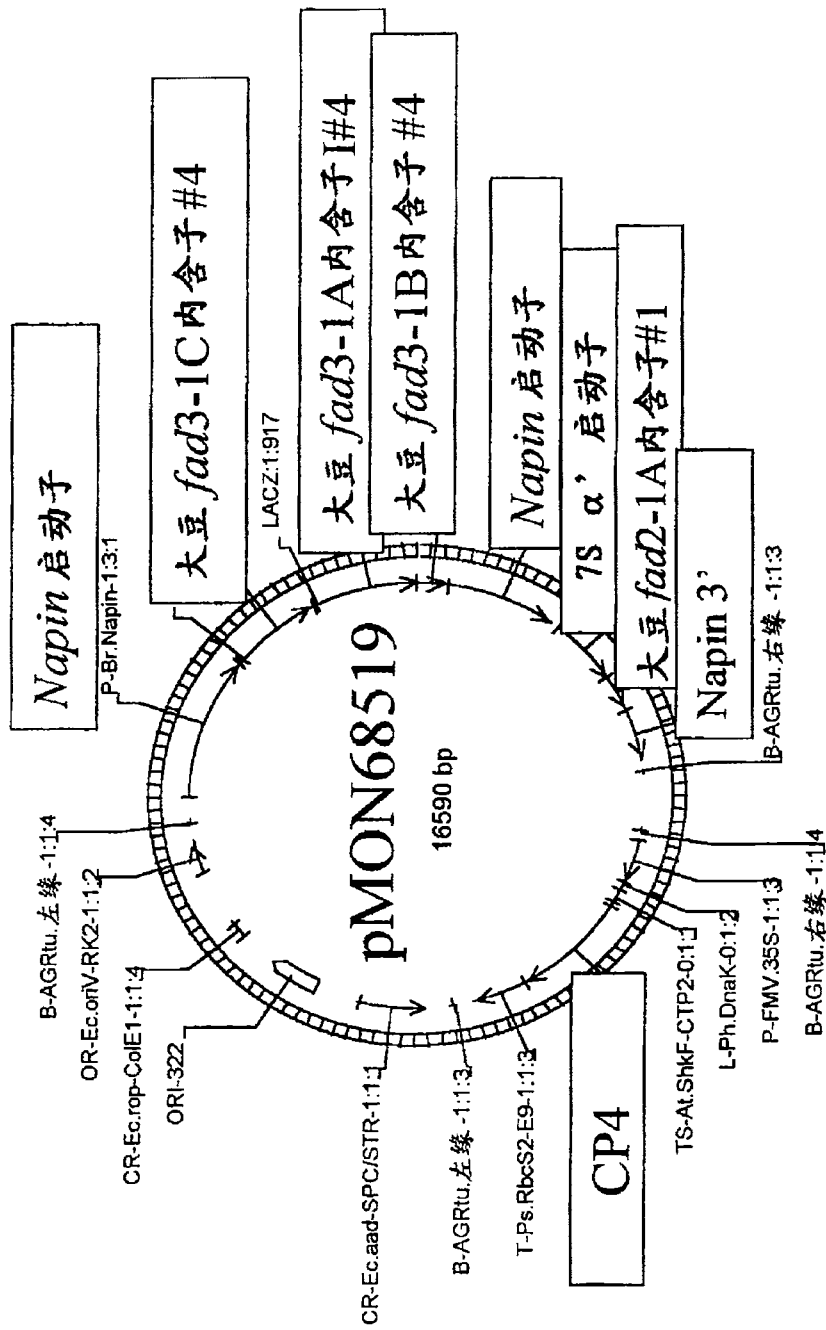


图 11

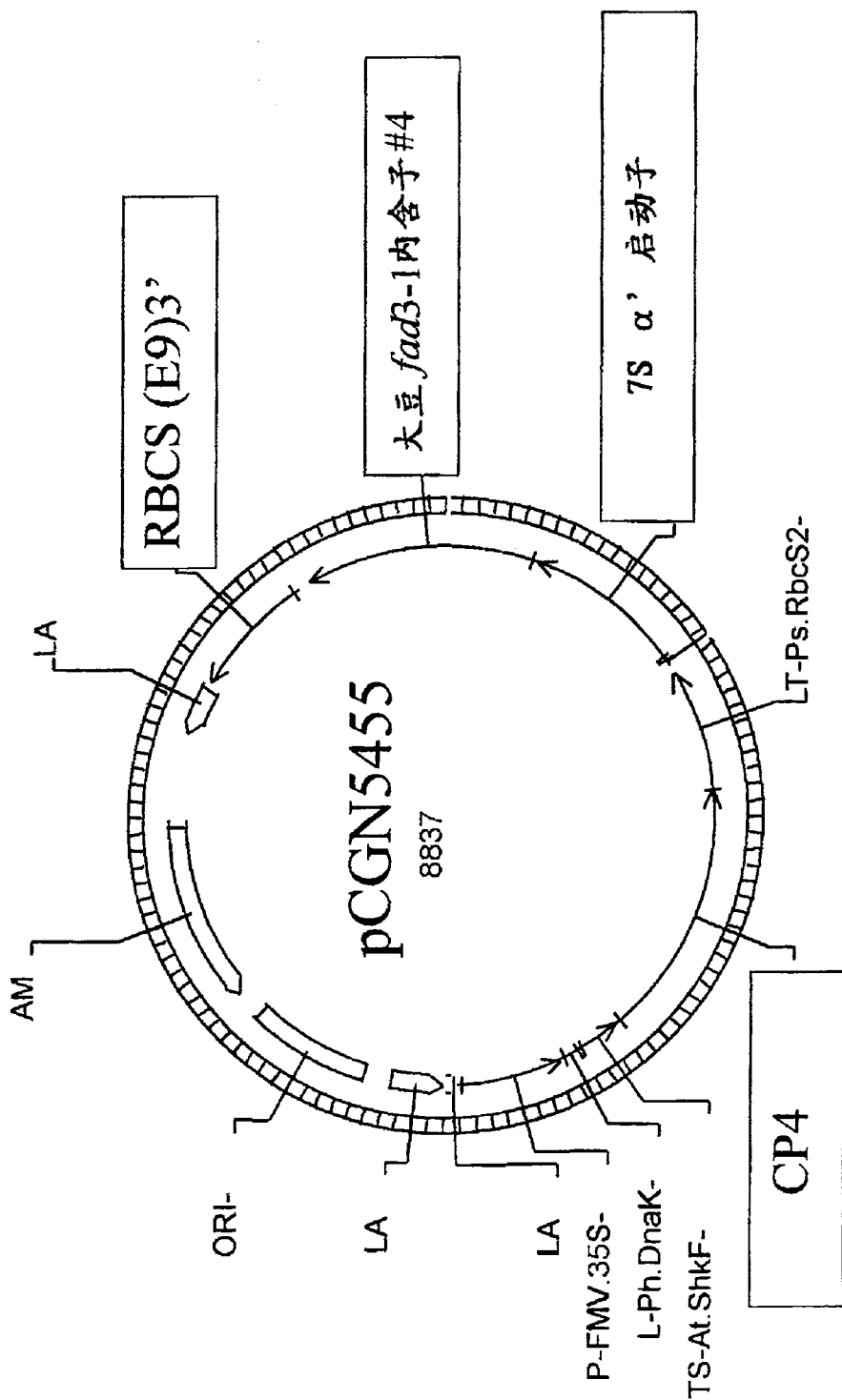


图 12

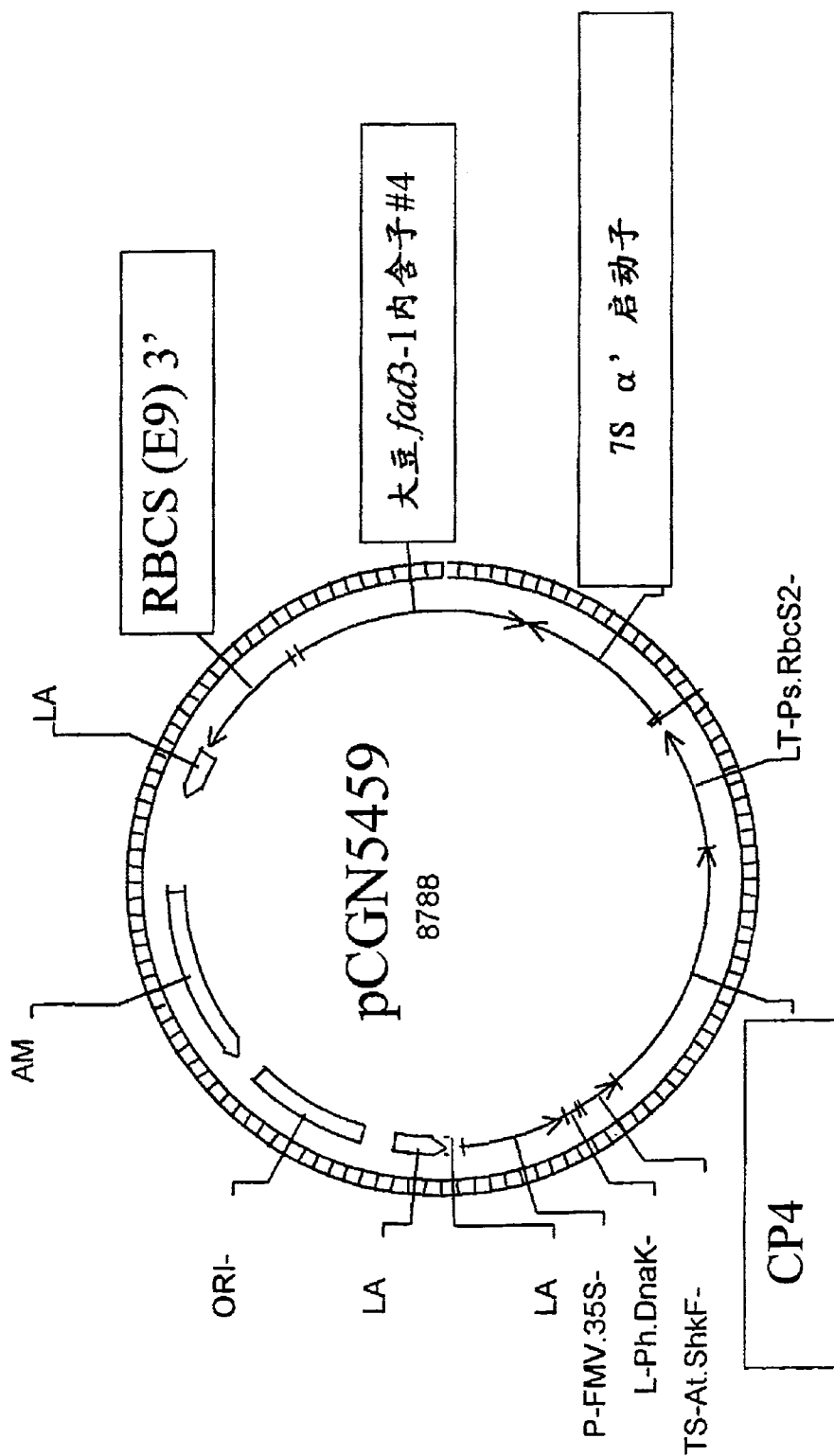


图 13