



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113980730 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 27

(21) 申请号 202111259171.2

(22) 申请日 2015.06.18

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113980730 A

(43) 申请公布日 2022.01.28

(30) 优先权数据  
20140104761 2014.12.18 AR  
2014902471 2014.06.27 AU  
PCT/AU2014/050433 2014.12.18 AU  
14/575,756 2014.12.18 US

(62) 分案原申请数据  
201510342019.9 2015.06.18

(73) 专利权人 联邦科学技术研究组织  
地址 澳大利亚澳大利亚首都领地  
专利权人 粮食研究发展公司  
纽希德营养澳大利亚私人有限公司

(72) 发明人 J·R·皮特里 S·P·辛格  
P·什雷斯塔 J·T·麦卡利斯特  
M·D·迪瓦恩 R·C·德菲特

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
72002

专利代理师 左路 林晓红

(51) Int.Cl.  
C12N 15/82 (2006.01)  
C11B 1/00 (2006.01)  
C12N 15/53 (2006.01)  
C12N 15/54 (2006.01)  
A01H 5/10 (2018.01)  
A01H 6/20 (2018.01)

(56) 对比文件  
CN 102459627 A,2012.05.16  
WO 2013185184 A2,2013.12.19  
Puya G Yazdi.A review of the biologic  
and pharmacologic role of  
docosapentaenoic acid.《Puya G Yazdi》  
.2013,第2卷256.  
Gunveen Kaur等.Docosapentaenoic acid  
(22:5n-3): A review of its biological  
effects.《Progress in Lipid Research》  
.2011,第50卷28-34.

审查员 赵雪

权利要求书6页 说明书76页  
序列表55页 附图3页

(54) 发明名称  
包含二十二碳五烯酸的提取的植物脂质

(57) 摘要  
本发明涉及包含二十二碳五烯酸的提取的植物脂质,和用于产生提取的植物脂质的方法。

1. 来自遗传修饰的欧洲油菜 (*Brassica napus*) 或印度芥菜 (*Brassica juncea*) 种子的提取的植物脂质, 包含酯化形式的脂肪酸, 所述脂肪酸包含油酸、棕榈酸、包括亚油酸 (LA) 的  $\omega$  6 脂肪酸、包括  $\alpha$ - 亚麻酸 (ALA) 和二十二碳五烯酸 (DPA) 的  $\omega$  3 脂肪酸, 以及十八碳四烯酸 (SDA)、二十碳五烯酸 (EPA) 和二十碳四烯酸 (ETA) 中的一种或多种, 其中棕榈酸在提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 2% 与 16% 之间, 其中如果存在的话, 肉豆蔻酸 (C14:0) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平小于 1%, 并且其中至少 70% 以三酰甘油 (TAG) 形式酯化的 DPA 处于所述 TAG 的 sn-1 或 sn-3 位置, 其中所述遗传修饰的欧洲油菜或印度芥菜种子包含编码  $\Delta$  12- 去饱和酶、酰基-CoA  $\Delta$  6- 去饱和酶、酰基-CoA  $\Delta$  5- 去饱和酶、 $\Delta$  6- 延伸酶、 $\Delta$  5- 延伸酶, 以及  $\omega$  3- 去饱和酶或  $\Delta$  15- 去饱和酶或  $\omega$  3- 去饱和酶和  $\Delta$  15- 去饱和酶的外源多核苷酸。

2. 权利要求 1 的脂质, 其中所述脂质具有以下特征中的至少一个:

- i) 棕榈酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 2% 与 15% 之间;
- ii) 肉豆蔻酸 (C14:0) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 0.1%;
- iii) 油酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 1% 与 30% 之间;
- iv) 亚油酸 (LA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 4% 与 35% 之间;
- v)  $\alpha$ - 亚麻酸 (ALA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 4% 与 40% 之间;
- vi)  $\gamma$ - 亚麻酸 (GLA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于 4%;
- vii) 十八碳四烯酸 (SDA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于 10%;
- viii) 二十碳四烯酸 (ETA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平小于 6%;
- ix) 二十碳三烯酸 (ETra) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平小于 4%;
- x) 二十碳五烯酸 (EPA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 4% 与 15% 之间;
- xi) DHA 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平小于 2%;
- xii) 脂质在其脂肪酸含量中包含小于 0.1% 的  $\omega$  6- 二十二碳五烯酸 ( $22:5^{\Delta 4, 7, 10, 13, 16}$ );
- xiii) 总饱和脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 4% 与 25% 之间;
- xiv) 总单不饱和脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 4% 与 40% 之间;
- xv) 总多不饱和脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 20% 与 75% 之间;
- xvi) 总  $\omega$  6 脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 6% 与 50% 之间;
- xvii) 总新  $\omega$  6 脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于 10%, 其中所述新  $\omega$  6 脂肪酸是提取的脂质中除了 LA 之外  $\omega$  6 脂肪酸的总量;
- xviii) 总  $\omega$  3 脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 36% 与 65% 之间;
- xix) 总新  $\omega$  3 脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 21% 与 45% 之间, 其中所述新  $\omega$  3 脂肪酸是提取的脂质中除了 ALA 之外  $\omega$  3 脂肪酸的总量;
- xx) 在所提取的脂质的脂肪酸含量中总  $\omega$  6 脂肪酸: 总  $\omega$  3 脂肪酸的比率为 1.0 与 3.0 之间;
- xxi) 在所提取的脂质中总新  $\omega$  6 脂肪酸: 总新  $\omega$  3 脂肪酸的比率为 1.0 与 3.0 之间;
- xxii) 在所提取的脂质中的总脂肪酸具有小于 1.5% C20:1;
- xxiii) 脂质的 TAG 含量为至少 70% (重量/重量);
- xxiv) 所述脂质包含二酰甘油 (DAG), 其中所述 DAG 包括 DPA; 和
- xxv) DPA 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 1% 与 16% 之间。

3. 权利要求2的脂质,其中DHA的水平小于所述提取的脂质的总脂肪酸含量的2%。

4. 来自遗传修饰的欧洲油菜种子的欧洲油菜种子油,所述种子油包含酯化形式的脂肪酸,所述脂肪酸包含油酸,棕榈酸,包括亚油酸(LA)的 $\omega 6$ 多不饱和脂肪酸,包括 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、十八碳四烯酸(SDA)和二十碳四烯酸(ETA)的 $\omega 3$ 多不饱和脂肪酸,其中棕榈酸在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为2%与16%之间,其中肉豆蔻酸(C14:0)不存在,或以小于所述种子油的总脂肪酸含量的1%的水平存在,其中EPA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为4%与15%之间,并且其中至少70%以三酰甘油(TAG)形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置,其中所述遗传修饰的欧洲油菜种子包含编码 $\Delta 12$ -去饱和酶、酰基-CoA  $\Delta 6$ -去饱和酶、酰基-CoA  $\Delta 5$ -去饱和酶、 $\Delta 6$ -延伸酶、 $\Delta 5$ -延伸酶,以及 $\omega 3$ -去饱和酶或 $\Delta 15$ -去饱和酶或 $\omega 3$ -去饱和酶和 $\Delta 15$ -去饱和酶的外源多核苷酸。

5. 来自遗传修饰的欧洲油菜种子的欧洲油菜种子油,所述种子油包含酯化形式的脂肪酸,所述脂肪酸包含油酸,棕榈酸,包括亚油酸(LA)的 $\omega 6$ 多不饱和脂肪酸,包括 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、十八碳四烯酸(SDA)和二十碳四烯酸(ETA)的 $\omega 3$ 多不饱和脂肪酸,其中棕榈酸在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为2%与16%之间,其中肉豆蔻酸(C14:0)不存在,或以小于所述种子油的总脂肪酸含量的1%的水平存在,其中DPA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平高于DHA的水平,并且其中至少70%以三酰甘油(TAG)形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置,其中所述遗传修饰的欧洲油菜种子包含编码 $\Delta 12$ -去饱和酶、酰基-CoA  $\Delta 6$ -去饱和酶、酰基-CoA  $\Delta 5$ -去饱和酶、 $\Delta 6$ -延伸酶、 $\Delta 5$ -延伸酶,以及 $\omega 3$ -去饱和酶或 $\Delta 15$ -去饱和酶或 $\omega 3$ -去饱和酶和 $\Delta 15$ -去饱和酶的外源多核苷酸。

6. 来自遗传修饰的欧洲油菜种子的欧洲油菜种子油,所述种子油包含总脂肪酸含量,所述总脂肪酸含量包含酯化形式的脂肪酸,所述脂肪酸包含油酸,棕榈酸,包括亚油酸(LA)的 $\omega 6$ 多不饱和脂肪酸,包括 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、十八碳四烯酸(SDA)和二十碳四烯酸(ETA)的 $\omega 3$ 多不饱和脂肪酸,其中棕榈酸在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为2%与16%之间,其中肉豆蔻酸(C14:0)不存在,或以小于所述种子油的总脂肪酸含量的1%的水平存在,其中至少70%以三酰甘油(TAG)形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置,并且其中ALA、SDA、ETA、EPA、DPA、DHA和二十碳三烯酸(ETrA)各以一个水平存在于所述总脂肪酸含量中,各水平以总脂肪酸含量的百分比表示,其中DPA和DHA的百分比的和除以ALA、SDA、ETA、EPA、DPA、DHA和ETrA的百分比的和以百分比表示,为15.3%与60.5%之间,其中所述遗传修饰的欧洲油菜种子包含编码 $\Delta 12$ -去饱和酶、酰基-CoA  $\Delta 6$ -去饱和酶、酰基-CoA  $\Delta 5$ -去饱和酶、 $\Delta 6$ -延伸酶、 $\Delta 5$ -延伸酶,以及 $\omega 3$ -去饱和酶或 $\Delta 15$ -去饱和酶或 $\omega 3$ -去饱和酶和 $\Delta 15$ -去饱和酶的外源多核苷酸。

7. 权利要求4-6任一项的种子油,其中DHA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平小于2%。

8. 权利要求4-6任一项的种子油,其中DHA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平小于0.5%。

9. 权利要求4-6任一项的种子油,其中DHA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为

0.5%与2.0%之间。

10. 权利要求4-6任一项的种子油,其中在所述种子油的总脂肪酸含量中存在小于4%的水平 $\gamma$ -亚麻酸(GLA)。

11. 权利要求4-6任一项的种子油,其中所述种子油中至少80%以TAG形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置。

12. 权利要求11的种子油,其中所述种子油中至少90%以TAG形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置。

13. 权利要求4-6任一项的种子油,其中DPA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为0.05%与8%之间。

14. 权利要求4-6任一项的种子油,其具有以下特征:

- i) 油酸在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为1%与60%之间,
- ii) LA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为4%与35%之间,
- iii) 在所述种子油的总脂肪酸含量中存在小于4%的水平 $\gamma$ -亚麻酸(GLA),和
- iv) 在所述种子油的总脂肪酸含量中存在4%与25%之间的水平的总饱和脂肪酸。

15. 权利要求4-6任一项的种子油,其中DPA和DHA的百分比的和除以ALA、SDA、ETA、EPA、DPA、DHA和二十碳三烯酸(ETrA)的百分比的和以百分比表示,为17%与55%之间。

16. 权利要求4-6任一项的种子油,其中DPA和DHA的百分比的和除以ALA、SDA、ETA、EPA、DPA、DHA和二十碳三烯酸(ETrA)的百分比的和以百分比表示,为15.3%与18.7%之间。

17. 一种产生权利要求1的提取的植物脂质的方法,包括以下步骤:

i) 获得包含脂质的欧洲油菜或印度芥菜种子,所述脂质包含酯化形式的脂肪酸,所述脂肪酸包含油酸、棕榈酸、包括亚油酸(LA)的 $\omega$ 6脂肪酸、包括 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)和二十二碳五烯酸(DPA)的 $\omega$ 3脂肪酸,以及十八碳四烯酸(SDA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十碳四烯酸(ETA)中的一种或多种,其中棕榈酸在脂质的总脂肪酸含量中的水平为2%与16%之间,其中如果存在的话,肉豆蔻酸(C14:0)在脂质的总脂肪酸含量中的水平小于1%,其中至少70%以三酰甘油(TAG)形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置,其中所述种子包含编码 $\Delta$ 12-去饱和酶、 $\Delta$ 6-去饱和酶、 $\Delta$ 5-去饱和酶、 $\Delta$ 6-延伸酶、 $\Delta$ 5-延伸酶,以及 $\omega$ 3-去饱和酶或 $\Delta$ 15-去饱和酶或 $\omega$ 3-去饱和酶和 $\Delta$ 15-去饱和酶的外源性多核苷酸,并且其中每种多核苷酸可操作地连接至能够在所述种子的细胞内指导所述多核苷酸表达的一个或多个启动子,和

ii) 从所述种子提取脂质。

18. 权利要求17的方法,其中所提取的脂质具有权利要求2或3中所限定的特征的一种或多种。

19. 一种产生权利要求4-6任一项的种子油的方法,包括以下步骤:

i) 获得包含种子油的欧洲油菜种子,所述种子油包含酯化形式的脂肪酸,所述脂肪酸包含油酸,棕榈酸,包括亚油酸(LA)的 $\omega$ 6脂肪酸,包括 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)、二十二碳五烯酸(DPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、十八碳四烯酸(SDA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十碳四烯酸(ETA)的 $\omega$ 3脂肪酸,其中棕榈酸在脂质的总脂肪酸含量中的水平为2%与16%之间,其中如果存在的话,肉豆蔻酸(C14:0)在脂质的总脂肪酸含量中的水平小于1%,其中至少70%以三酰甘油(TAG)形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置,其中所述种子包含编码 $\Delta$

12-去饱和酶、 $\Delta 6$ -去饱和酶、 $\Delta 5$ -去饱和酶、 $\Delta 6$ -延伸酶、 $\Delta 5$ -延伸酶,以及 $\omega 3$ -去饱和酶或 $\Delta 15$ -去饱和酶或 $\omega 3$ -去饱和酶和 $\Delta 15$ -去饱和酶的外源性多核苷酸,其中每种多核苷酸可操作地连接至能够在所述种子的细胞内指导所述多核苷酸表达的一个或多个启动子,并且其中 (a) EPA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为4%与15%之间,或 (b) 其中DPA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平高于DHA的水平,或 (c) 其中ALA、SDA、ETA、EPA、DPA、DHA和二十碳三烯酸 (ETrA) 各以一个水平存在于所述总脂肪酸含量中,各水平以总脂肪酸含量的百分比表示,其中DPA和DHA的百分比的和除以ALA、SDA、ETA、EPA、DPA、DHA和ETrA的百分比的和以百分比表示,为15.3%与60.5%之间,以及

ii) 从所述种子提取种子油。

20. 权利要求19的方法,其中DHA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平小于2%。

21. 权利要求20的方法,其中DHA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平小于0.5%。

22. 权利要求20的方法,其中DHA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为0.5%与2.0%之间。

23. 权利要求19的方法,其中在所述种子油的总脂肪酸含量中存在小于4%的水平的 $\gamma$ -亚麻酸 (GLA)。

24. 权利要求19的方法,其中至少80%以三酰甘油 (TAG) 形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置。

25. 权利要求24的方法,其中至少90%以TAG形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置。

26. 权利要求19的方法,其中DPA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为0.05%与8%之间。

27. 权利要求19的方法,其中所述种子油具有以下特征:

i) 油酸在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为1%与60%之间,

ii) LA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为4%与35%之间,

iii) 在所述种子油的总脂肪酸含量中存在小于4%的水平的 $\gamma$ -亚麻酸 (GLA), 和

iv) 在所述种子油的总脂肪酸含量中存在4%与25%之间的水平的总饱和脂肪酸。

28. 权利要求19的方法,其中DPA和DHA的百分比的和除以ALA、SDA、ETA、EPA、DPA、DHA和二十碳三烯酸 (ETrA) 的百分比的和以百分比表示,为17%与55%之间。

29. 权利要求19的方法,其中DPA和DHA的百分比的和除以ALA、SDA、ETA、EPA、DPA、DHA和二十碳三烯酸 (ETrA) 的百分比的和以百分比表示,为15.3%与18.7%之间。

30. 权利要求19的方法,其中以下的一或多者适用:

i) 相对于亚油酸 (LA),  $\Delta 6$ -去饱和酶优先将 $\alpha$ -亚麻酸 (ALA) 去饱和;

ii)  $\Delta 6$ -延伸酶也具有 $\Delta 9$ -延伸酶活性;

iii)  $\Delta 12$ -去饱和酶也具有 $\Delta 15$ -去饱和酶活性;

iv)  $\Delta 6$ -去饱和酶也具有 $\Delta 8$ -去饱和酶活性;

v)  $\Delta 15$ -去饱和酶也具有对GLA的 $\omega 3$ -去饱和酶活性;

vi)  $\omega 3$ -去饱和酶也具有对LA的 $\Delta 15$ -去饱和酶活性;

vii)  $\omega 3$ -去饱和酶将LA和/或GLA去饱和;

viii)  $\omega 3$ -去饱和酶使GLA去饱和比LA多;

ix) 所述去饱和酶中的一种或多种或所有对酰基-CoA底物具有比对应酰基-PC底物更大的活性;

x)  $\Delta 6$ -去饱和酶对ALA具有比对LA更大的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性;

xi)  $\Delta 6$ -去饱和酶对ALA-CoA具有比连接到PC的sn-2位置的ALA更大的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性;

xii)  $\Delta 6$ -去饱和酶对ALA具有比对LA大至少2倍的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性、大至少3倍的活性、大至少4倍的活性或者大至少5倍的活性;

xiii)  $\Delta 6$ -去饱和酶对ALA-CoA具有比连接到PC的sn-2位置的ALA大至少5或10倍的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性;以及

xiv)  $\Delta 6$ -去饱和酶对ETA没有可检测的 $\Delta 5$ -去饱和酶活性。

31. 权利要求19的方法, 其中所述外源性多核苷酸共价连接于T-DNA分子中, 所述T-DNA分子整合到所述种子的细胞的基因组中, 并且其中整合到所述种子的细胞的基因组中的此类T-DNA分子的数量是一个、两个或三个。

32. 权利要求19的方法, 其中所述方法进一步包括处理提取的脂质以增加作为总脂肪酸含量的百分比的DPA的水平, 其中所述处理包括分馏、蒸馏或酯基转移如产生DPA的甲酯或乙酯, 或所述方法的组合。

33. 一种产生遗传修饰的欧洲油菜或印度芥菜植物或来自其的种子的方法, 所述植物可以用于产生权利要求1或2的提取的植物脂质, 所述方法包括:

a) 测定DPA在由来自多个欧洲油菜或印度芥菜植物的一或多个种子产生的脂质中的水平, 多个植物中的每个植物包含编码 $\Delta 12$ -去饱和酶、 $\Delta 6$ -去饱和酶、 $\Delta 5$ -去饱和酶、 $\Delta 6$ -延伸酶、 $\Delta 5$ -延伸酶, 以及 $\omega 3$ -去饱和酶或 $\Delta 15$ -去饱和酶或 $\omega 3$ -去饱和酶和 $\Delta 15$ -去饱和酶的一种或多种外源性多核苷酸, 其中每种多核苷酸可操作地连接至能够指导所述多核苷酸在种子的细胞内表达的一个或多个启动子, 以及

b) 从所述多个植物鉴别遗传修饰的欧洲油菜或印度芥菜植物, 其可用于产生权利要求1或2的提取的植物脂质, 以及

c) 从所鉴别的植物产生后代植物或其种子。

34. 一种产生种子的方法, 所述方法包括:

a) 使欧洲油菜或印度芥菜植物生长, 所述植物包含 (i) 编码 $\Delta 12$ -去饱和酶、 $\Delta 6$ -去饱和酶、 $\Delta 5$ -去饱和酶、 $\Delta 6$ -延伸酶、 $\Delta 5$ -延伸酶, 以及 $\omega 3$ -去饱和酶或 $\Delta 15$ -去饱和酶或 $\omega 3$ -去饱和酶和 $\Delta 15$ -去饱和酶的一种或多种外源性多核苷酸, 其中每种多核苷酸可操作地连接至能够指导所述多核苷酸在所述植物的发育种子中表达的一个或多个启动子, 和 (ii) 所述植物的种子中的种子油中酯化形式的脂肪酸, 其中所述脂肪酸包含油酸、棕榈酸、包括亚油酸(LA)的 $\omega 6$ 脂肪酸、包括 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)和二十二碳五烯酸(DPA)的 $\omega 3$ 脂肪酸, 以及十八碳四烯酸(SDA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十碳四烯酸(ETA)中的一种或多种, 其中棕榈酸在脂质的总脂肪酸含量中的水平为2%与16%之间, 其中如果存在的话, 肉豆蔻酸(C14:0)在脂质的总脂肪酸含量中的水平小于1%, 并且其中至少70%以三酰甘油(TAG)形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置, 以及

b) 从所述植物收获种子。

35. 一种产生种子的方法, 所述方法包括:

a) 使欧洲油菜植物生长,所述植物包含(i) 编码 $\Delta 12$ -去饱和酶、 $\Delta 6$ -去饱和酶、 $\Delta 5$ -去饱和酶、 $\Delta 6$ -延伸酶、 $\Delta 5$ -延伸酶,以及 $\omega 3$ -去饱和酶或 $\Delta 15$ -去饱和酶或 $\omega 3$ -去饱和酶和 $\Delta 15$ -去饱和酶的一种或多种外源性多核苷酸,其中每种多核苷酸可操作地连接至能够指导所述多核苷酸在所述植物的发育种子中表达的一个或多个启动子,和(ii)所述植物的种子中的种子油中酯化形式的脂肪酸,其中所述脂肪酸包含油酸,棕榈酸,包括亚油酸(LA)的 $\omega 6$ 脂肪酸,包括 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、十八碳四烯酸(SDA)和二十碳四烯酸(ETA)的 $\omega 3$ 脂肪酸,其中棕榈酸在脂质的总脂肪酸含量中的水平为2%与16%之间,其中如果存在的话,肉豆蔻酸(C14:0)在脂质的总脂肪酸含量中的水平小于1%,其中至少70%以三酰甘油(TAG)形式酯化的DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置,并且其中(a) EPA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平为4%与15%之间,或(b) 其中DPA在所述种子油的总脂肪酸含量中的水平高于DHA的水平,或(c) 其中ALA、SDA、ETA、EPA、DPA、DHA和二十碳三烯酸(ETrA)各以一个水平存在于所述总脂肪酸含量中,各水平以总脂肪酸含量的百分比表示,其中DPA和DHA的百分比的和除以ALA、SDA、ETA、EPA、DPA、DHA和ETrA的百分比的和以百分比表示,为15.3%与60.5%之间,以及

b) 从所述植物收获种子。

36. 一种组合物,包含权利要求1或2的脂质。

37. 一种组合物,包含权利要求4-6任一项的种子油。

38. 原料、化妆品或化学剂,包含权利要求1或2的脂质。

39. 原料、化妆品或化学剂,包含权利要求4-6任一项的种子油。

40. 一种生产原料的方法,所述方法包括将权利要求1或2的脂质与至少一种其它食品成分混合。

41. 一种生产原料的方法,所述方法包括将权利要求4-6任一项的种子油与至少一种其它食品成分混合。

## 包含二十二碳五烯酸的提取的植物脂质

[0001] 本申请是申请日为2015年6月18日,申请号为201510342019.9,发明名称为“包含二十二碳五烯酸的提取的植物脂质”的专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及包含二十二碳五烯酸的提取的植物脂质,和用于产生提取的植物脂质的方法。

### 背景技术

[0003]  $\omega$ -3长链多元不饱和脂肪酸(LC-PUFA)现在被广泛公认为是用于人和动物健康的重要化合物。这些脂肪酸可从膳食来源中获得或者可通过转化亚油酸(LA, 18:2  $\omega$ 6)或 $\alpha$ -亚麻酸(ALA, 18:3  $\omega$ 3)脂肪酸来获得,这两种脂肪酸均被认为是人膳食中的必需脂肪酸。虽然人和很多其它脊椎动物能够将从植物来源获得的LA或ALA转化为C22,但他们以极低的速率进行此转化。此外,最现代的社会具有不平衡的膳食,其中至少90%多元不饱和脂肪酸(PUFA)为 $\omega$ 6脂肪酸,而不是被认为理想的4:1比率或更少的 $\omega$ 6: $\omega$ 3脂肪酸(Trautwein, 2001)。人的LC-PUFA如二十碳五烯酸(EPA, 20:5  $\omega$ 3)和二十二碳六烯酸(DHA, 22:6  $\omega$ 3)的直接膳食来源大部分来自鱼或鱼油。因此,健康专业人员推荐在人膳食中常规地包括含有显著水平的LC-PUFA的鱼。逐渐地,鱼来源的LC-PUFA油并入例如食物产品和婴儿配方中。然而,由于全球和国家渔业的下降,需要这些有利的增强健康的油的替代来源。

[0004] 与动物相反,显花植物缺乏合成具有长于18个碳的链长度的多元不饱和脂肪酸的能力。具体地说,农作物和园艺植物连同其它被子植物不具有合成源于ALA的较长链 $\omega$ 3脂肪酸如EPA、二十二碳五烯酸(DPA, 22:5  $\omega$ 3)和DHA所需要的酶。因此,植物生物技术中的重要目标为对产生大量LC-PUFA的农作物植物进行工程化,从而提供这些化合物的替代来源。

#### [0005] LC-PUFA生物合成路径

[0006] LC-PUFA在有机体如微藻、苔藓和真菌中的生物合成通常作为一系列氧依赖性去饱和和延伸反应(图1)出现。在这些有机体中产生EPA的最常见路径包括 $\Delta$ 6-去饱和、 $\Delta$ 6-延伸和 $\Delta$ 5-去饱和(称为 $\Delta$ 6-去饱和路径),而较不常见的路径使用 $\Delta$ 9-延伸、 $\Delta$ 8-去饱和和 $\Delta$ 5-去饱和(称为 $\Delta$ 9-去饱和路径)。这些连续的去饱和反应和延伸反应可以 $\omega$ 6脂肪酸底物LA(如图1的左上部分( $\omega$ 6)示意性示出的)或者 $\omega$ 3底物ALA开始,直到EPA(如图1的右下部分( $\omega$ 3)示出的)。如果对 $\omega$ 6底物LA进行初始 $\Delta$ 6-去饱和,三种酶的系列的LC-PUFA产物将为 $\omega$ 6脂肪酸ARA。LC-PUFA合成有机体可使用如图1的 $\Delta$ 17-去饱和酶步骤所示的 $\omega$ 3-去饱和酶将 $\omega$ 6脂肪酸转化为 $\omega$ 3脂肪酸,以用于将花生四烯酸(ARA, 20:4  $\omega$ 6)转化为EPA。 $\omega$ 3-去饱和酶家族的一些成员可作用于范围为LA至ARA的多种底物。植物 $\omega$ 3-去饱和酶常明确催化LA至ALA的 $\Delta$ 15-去饱和,而真菌和酵母 $\omega$ 3-去饱和酶对于ARA  $\Delta$ 17-去饱和为EPA可为特异的(Pereira等, 2004a; Zank等, 2005)。一些报道表明可存在非特异性 $\omega$ 3-去饱和酶,其可将各种各样的 $\omega$ 6底物转化为其对应 $\omega$ 3产物(Zhang等, 2008)。

[0007] 在这些有机体中,通过EPA的 $\Delta$ 5-延伸来产生DPA,然后通过 $\Delta$ 4-去饱和来产生DHA



(图1),从而进行EPA至DHA的转化。与此相反,哺乳动物使用所谓的“Sprecher”路径,所述路径通过独立于 $\Delta 4$ -去饱和酶的三个独立反应将DPA转化为DHA(Sprecher等,1995)。

[0008] 通常可见于植物、苔藓、微藻和低等动物如秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中的前端去饱和酶主要接受与磷脂酰胆碱(PC)底物的sn-2位置酯化的脂肪酸底物。这些去饱和酶因此被称为酰基-PC、脂质连接的前端去饱和酶(Domergue等,2003)。相比之下,高等动物前端去饱和酶通常接受酰基-CoA底物,其中脂肪酸底物连接至CoA,而不是PC(Domergue等,2005)。已知一些微藻去饱和酶和一种植物去饱和酶使用与CoA酯化的脂肪酸底物(表2)。

[0009] 每个PUFA延伸反应由通过多组分蛋白质复合物催化的四个步骤组成:首先,缩合反应引起来自丙二酰-CoA的2C单元添加至脂肪酸,从而引起 $\beta$ -酮酯酰中间体的形成。然后,这通过NADPH还原,然后脱水以产生烯酰基中间体。最终对此中间体进行第二次还原以产生延伸的脂肪酸。通常认为,这四个反应的缩合步骤为底物特异性的,而其它步骤则不是。实际上,这意味着只要引入对PUFA特异的缩合酶(通常称为“延伸酶”),原生植物延伸机构就能够延伸PUFA,尽管原生植物延伸机构在延伸非原生PUFA底物中的效率可能较低。在2007年,公布酵母延伸循环脱水酶的鉴别和表征(Denic和Weissman,2007)。

[0010] 植物、苔藓和微藻的PUFA去饱和天然发生于主要在酰基-PC库中的脂肪酸底物,而延伸发生于酰基-CoA库中的底物。通过磷脂酶(PLA)进行来自酰基-PC分子的脂肪酸至CoA载体的转移,同时通过溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶(LPCAT)进行酰基-CoA脂肪酸至PC载体的转移(Singh等,2005)。

[0011] 工程化地产生LC-PUFA

[0012] 使用需氧 $\Delta 6$ -去饱和/延伸路径进行大部分LC-PUFA代谢工程化。在1996年第一次报道使用来自集胞藻属(*Synechocystis*)藻青菌的 $\Delta 6$ -去饱和酶在烟草中生物合成 $\gamma$ -亚麻酸(GLA,18:3 $\omega$ 6)(Reddy和Thomas,1996)。最近,已在农作物如红花(在种子油中的73% GLA;Knauf等,2006)和大豆(28% GLA;Sato等,2004)中产生GLA。LC-PUFA如EPA和DHA的产生由于所涉及的增加数目的去饱和和延伸步骤而涉及更复杂的工程化。通过Qi等(2004)第一次报道陆生植物中的EPA产生,他们将编码来自球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)的 $\Delta 9$ -延伸酶、来自眼虫藻(*Euglena gracilis*)的 $\Delta 8$ -去饱和酶以及来自高山被孢霉(*Mortierella alpina*)的 $\Delta 5$ -去饱和酶的基因引入到拟南芥属中,从而产生高达3%EPA。此工作随后由Abbadi等(2004)进行,他们报道在使用编码来自小立碗藓(*Physcomitrella patens*)的 $\Delta 6$ -去饱和酶和 $\Delta 6$ -延伸酶以及来自三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)的 $\Delta 5$ -去饱和酶的基因的亚麻仁籽中产生高达0.8%EPA。

[0013] DHA产生的第一次报道是在WO 04/017467中,其中描述3%DHA在大豆胚而不是种子中产生,这通过引入编码异枝水霉(*Saprolegnia diclina*) $\Delta 6$ -去饱和酶、高山被孢霉 $\Delta 6$ -去饱和酶、高山被孢霉 $\Delta 5$ -去饱和酶、异枝水霉 $\Delta 4$ -去饱和酶、异枝水霉 $\Delta 17$ -去饱和酶、高山被孢霉 $\Delta 6$ -延伸酶以及路氏巴夫藻(*Pavlova lutheri*) $\Delta 5$ -延伸酶的基因来实现。在也产生DHA的胚中的最大EPA水平为19.6%,这指示EPA转化为DHA的效率较差(WO 2004/071467)。这个发现与由Robert等(2005)公布的发现类似,其中从EPA至DHA的转变较低,其中在使用斑马鱼 $\Delta 5/6$ -去饱和酶、秀丽隐杆线虫 $\Delta 6$ -延伸酶以及盐生巴夫藻(*Pavlova salina*) $\Delta 5$ -延伸酶和 $\Delta 4$ -去饱和酶的拟南芥属中产生3%EPA和0.5%DHA。而且在2005年,

Wu等公布在使用畸雌腐霉 (*Pythium irregulare*)  $\Delta$ 6-去饱和酶、破囊壶菌 (*Thraustochytrid*)  $\Delta$ 5-去饱和酶、小立碗藓  $\Delta$ 6-延伸酶、金盏菊 (*Calandula officianalis*)  $\Delta$ 12-去饱和酶、破囊壶菌  $\Delta$ 5-延伸酶、致病疫霉 (*Phytophthora infestans*)  $\Delta$ 17-去饱和酶、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) LC-PUFA延伸酶、破囊壶菌  $\Delta$ 4-去饱和酶以及破囊壶菌 LPCAT 的印度芥菜 (*Brassica juncea*) 中产生 25% ARA、15% EPA 和 1.5% DHA (Wu等, 2005)。在 Venegas-Caleron 等 (2010) 和 Ruiz-Lopez 等 (2012) 中提供产生合成  $\omega$ 3 LC-PUFA 的油籽农作物的努力的总结。如通过 Ruiz-Lopez 等 (2012) 指示的, 目前为止对于在转基因植物中产生 DHA 所获得的结果没有接近鱼油中所见的水平。

[0014] 因此, 仍需要 LC-PUFA 在重组细胞中的更有效的产生, 具体地为 DPA 在含油种子植物的种子中的产生。

## 发明内容

[0015] 很少有机体产生具有大于 1% - 2% 的 DPA 的油, 并且因此存在 (如果有的话) 大规模地由天然来源产生 DPA 的有限选项。本发明人已确定用于产生具有高水平 DPA 的脂质的方法和植物。

[0016] 因此, 在第一个方面, 本发明提供一种产生提取的植物脂质的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0017] i) 获得植物部分, 其脂质包含酯化形式的脂肪酸, 所述脂肪酸包含油酸、棕榈酸、包括亚油酸 (LA) 的  $\omega$ 6 脂肪酸、包括  $\alpha$ -亚麻酸 (ALA) 和二十二碳五烯酸 (DPA) 的  $\omega$ 3 脂肪酸以及任选地十八碳四烯酸 (SDA)、二十碳五烯酸 (EPA) 和二十碳四烯酸 (ETA) 中的一种或多种, 其中 DPA 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 7% 与 35% 之间, 其中棕榈酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 2% 与 16% 之间, 并且其中肉豆蔻酸 (C14:0) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平小于 1%; 以及

[0018] ii) 从所述植物部分提取脂质;

[0019] 其中 DPA 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 7% 与 35% 之间。在一个实施方案中, DPA 的水平为 7% 与 20% 之间或者为 20.1% 与 30% 之间, 优选地为 20.1% 与 35% 之间, 更优选地为 30% 与 35% 之间。在一个实施方案中, DPA 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为 8% 与 20% 之间或者 10% 与 20% 之间, 优选地为 11% 与 20% 之间或者为 12% 与 20% 之间。所述植物部分优选地为芸苔属某种的种子或亚麻荠种子。

[0020] 获得植物部分或重组细胞的步骤可包括从产生所述植物部分的植物中收获所述植物部分 (优选为种子)、从此类细胞的培养物中回收重组细胞或者通过从生产者或供应商购买或通过进口来获得所述植物部分或重组细胞。所述方法可包括确定脂质在植物部分或重组细胞的样品中的脂肪酸组成或者提取的脂质的脂肪酸组成的步骤。

[0021] 在一个实施方案中, 提取的脂质, 优选地为芸苔属某种种子油或亚麻荠种子油, 具有以下特征中的一个或多个或所有:

[0022] i) 棕榈酸在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为 2% 与 15% 之间;

[0023] ii) 肉豆蔻酸 (C14:0) 在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为约 0.1%;

[0024] iii) 油酸在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为 1% 与 30% 之间;

[0025] iv) 亚油酸 (LA) 在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为 4% 与 20% 之间;

- [0026] v)  $\alpha$ -亚麻酸 (ALA) 在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为4%与40%之间;
- [0027] vi)  $\gamma$ -亚麻酸 (GLA) 在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为0.05%与7%之间;
- [0028] vii) 十八碳四烯酸 (SDA) 在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为0.05%与10%之间;
- [0029] viii) 二十碳四烯酸 (ETA) 在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平小于6%;
- [0030] ix) 二十碳三烯酸 (ETrA) 在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平小于4%;
- [0031] x) 所提取的植物脂质在其脂肪酸含量中包含小于0.1%的 $\omega$ 6-二十二碳五烯酸 (22:5 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16</sup>);
- [0032] xi) 新 $\omega$ 6脂肪酸在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平小于10%;
- [0033] xii) 总 $\omega$ 6脂肪酸:总 $\omega$ 3脂肪酸在所提取的植物脂质的脂肪酸含量中的比率为1.0与3.0之间或者0.1与1之间;
- [0034] xiii) 新 $\omega$ 6脂肪酸:新 $\omega$ 3脂肪酸在所提取的植物脂质的脂肪酸含量中的比率为1.0与3.0之间、0.02与0.1之间或者0.1与1之间;
- [0035] xiv) 所提取的植物脂质的脂肪酸组成是基于至少10%的油酸至DPA的转化效率;
- [0036] xv) 所提取的植物脂质的脂肪酸组成是基于至少15%的LA至DPA的转化效率;
- [0037] xvi) 所提取的植物脂质的脂肪酸组成是基于至少17%的ALA至DPA的转化效率;
- [0038] xvii) 所提取的植物脂质中的总脂肪酸具有小于1.5% C20:1;
- [0039] xviii) 所提取的植物脂质的三酰甘油 (TAG) 含量为至少70%;
- [0040] xix) 所提取的植物脂质包含含有DPA的二酰甘油 (DAG);
- [0041] xx) 所提取的植物脂质包含小于10%游离 (未酯化的) 脂肪酸和/或磷脂,或者基本上不包含它们;
- [0042] xxi) 以TAG形式酯化的至少70%DPA处于所述TAG的sn-1或sn-3位置;
- [0043] xxii) 在所提取的植物脂质中最丰富的含有DPA的TAG种类为DPA/18:3/18:3 (TAG58:11);以及
- [0044] xxiii) 所提取的植物脂质包含三-DPA TAG (TAG 66:15)。
- [0045] 在一个实施方案中,二十碳五烯酸 (EPA) 在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为0.05%与10%之间。
- [0046] 在另一个实施方案中,DHA在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于2%,优选地为小于1%,或者为0.1%与2%之间,更优选地为未检测到。所提取的植物脂质优选地为芸苔属某种种子油或亚麻荠种子油。
- [0047] 在另一个实施方案中,提取的脂质,优选地为芸苔属某种种子油或亚麻荠种子油,具有以下性质中的一个或多个或具有所有以下特征
- [0048] i) 棕榈酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为约2%与18%之间、约2%与16%之间、约2%与15%之间或者约3%与约10%之间;
- [0049] ii) 肉豆蔻酸 (C14:0) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于6%、小于3%、小于2%、小于1%或约0.1%;

[0050] iii) 油酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为约1%与约30%之间、约3%与约30%之间、约6%与约30%之间、1%与约20%之间、约30%与约60%之间、约45%至约60%、约30%或者约15%与约30%之间;

[0051] iv) 亚油酸 (LA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为约4%与约35%之间、约4%与约20%之间、约4%与17%之间或者约5%与约10%之间;

[0052] v)  $\alpha$ -亚麻酸 (ALA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为约4%与约40%之间、约7%与约40%之间、约10%与约35%之间、约20%与约35%之间、约4%与16%之间或者约2%与16%之间;

[0053] vi)  $\gamma$ -亚麻酸 (GLA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于4%、小于约3%、小于约2%、小于约1%、小于约0.5%、0.05%与7%之间、0.05%与4%之间、0.05%与约3%之间或者0.05%与约2%之间;

[0054] vii) 十八碳四烯酸 (SDA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于约10%、小于约8%、小于约7%、小于约6%、小于约4%、小于约3%、约0.05%与约7%之间、约0.05%与约6%、约0.05%与约4%之间、约0.05%与约3%之间、约0.05%与约10%之间或者0.05%与约2%之间;

[0055] viii) 二十碳四烯酸 (ETA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于6%、小于约5%、小于约4%、小于约1%、小于约0.5%、0.05%与6%之间、0.05%与约5%之间、0.05%与约4%之间、0.05%与约3%之间或者0.05%与约2%之间;

[0056] ix) 二十碳三烯酸 (ETrA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于4%、小于约2%、小于约1%、0.05%与4%之间、0.05%与3%之间或者0.05%与约2%之间或者0.05%与约1%之间;

[0057] x) 二十碳五烯酸 (EPA) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为4%与15%之间、小于4%、小于约3%、小于约2%、0.05%与10%之间、0.05%与5%之间、0.05%与约3%之间或者0.05%与约2%之间;

[0058] xi) DPA在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为约8%、约9%、约10%、约12%、约14%、约16%、约18%、约20%、约22%、约24%、约26%、约28%、约31%、7%与20%之间、20.1%与29%之间、20.1%与28%之间、20.1%与约27%之间、20.1%与约26%之间、20.1%与约25%之间、20.1%与约24%之间、21%与35%之间、21%与30%之间、21%与28%之间、21%与约26%之间或者21%与约24%之间;

[0059] xii) 脂质在其脂肪酸含量中包含  $\omega$  6-二十二碳五烯酸 (22:5 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16</sup>);

[0060] xiii) 脂质在其脂肪酸含量中包含小于0.1%的  $\omega$  6-二十二碳五烯酸 (22:5 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16</sup>);

[0061] xiv) 脂质在其脂肪酸含量中包含小于0.1%的SDA、EPA和ETA中的一种或多种或所有;

[0062] xv) 总饱和脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为约4%与约25%之间、约4%与约20%之间、约6%与约20%之间或者约6%与约12%之间;

[0063] xvi) 总单一不饱和脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为约4%与约40%之间、约4%与约35%之间、约8%与约25%之间、8%与约22%之间、约15%与约40%之间或者约15%与约35%之间;

[0064] xvii) 总多元不饱和脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为约20%与约75%之间、30%与75%之间、约50%与约75%之间、约60%、约65%、约70%、约75%或者约60%与约75%之间;

[0065] xviii) 总 $\omega$ 6脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为约35%与约50%之间、约20%与约35%之间、约6%与20%之间、小于20%、小于约16%、小于约10%、约1%与约16%之间、约2%与约10%之间或者约4%与约10%之间;

[0066] xix) 新 $\omega$ 6脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于约10%、小于约8%、小于约6%、小于4%、约1%与约20%之间、约1%与约10%之间、0.5%与约8%之间或者0.5%与4%之间;

[0067] xx) 总 $\omega$ 3脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为36%与约65%之间、36%与约70%之间、40%与约60%之间、约30%与约60%之间、约35%与约60%之间、40%与约65%之间、约30%与约65%之间、约35%与约65%之间、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%或约70%;

[0068] xxi) 新 $\omega$ 3脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为21%与约45%之间、21%与约35%之间、约23%与约35%之间、约25%与约35%之间、约27%与约35%之间、约23%、约25%、约27%、约30%、约35%、约40%或约45%;

[0069] xxii) 在所提取的脂质的脂肪酸含量中总 $\omega$ 6脂肪酸:总 $\omega$ 3脂肪酸的比率为约1.0与约3.0之间、约0.1与约1之间、约0.1与约0.5之间、小于约0.50、小于约0.40、小于约0.30、小于约0.20、小于约0.15、约1.0、约0.1、约0.10至约0.4或者约0.2;

[0070] xxiii) 在所提取的脂质的总脂肪酸含量中新 $\omega$ 6脂肪酸:新 $\omega$ 3脂肪酸的比率为约1.0与约3.0之间、约0.02与约0.1之间、约0.1与约1之间、约0.1与约0.5之间、小于约0.50、小于约0.40、小于约0.30、小于约0.20、小于约0.15、约0.02、约0.05、约0.1、约0.2或约1.0;

[0071] xxiv) 脂质的脂肪酸组成是基于通过 $\Delta$ 12-去饱和酶将油酸转化为LA的效率,所述效率为至少约60%、至少约70%、至少约80%、约60%与约98%之间、约70%与约95%之间或者约75%与约90%之间;

[0072] xxv) 脂质的脂肪酸组成是基于通过 $\Delta$ 6-去饱和酶将ALA转化为SDA的效率,所述效率为至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、约30%与约70%之间、约35%与约60%之间或者约50%与约70%之间;

[0073] xxvi) 脂质的脂肪酸组成是基于通过 $\Delta$ 6-延伸酶将SDA转化为ETA的效率,所述效率为至少约60%、至少约70%、至少约75%、约60%与约95%之间、约70%与约88%之间或者约75%与约85%之间;

[0074] xxvii) 脂质的脂肪酸组成是基于通过 $\Delta$ 5-去饱和酶将ETA转化为EPA的效率,所述效率为至少约60%、至少约70%、至少约75%、约60%与约99%之间、约70%与约99%之间或者约75%与约98%之间;

[0075] xxviii) 脂质的脂肪酸组成是基于通过 $\Delta$ 5-延伸酶将EPA转化为DPA的效率,所述效率为至少约80%、至少约85%、至少约90%、约50%与约99%之间、约85%与约99%之间、约50%与约95%之间或者约85%与约95%之间;

[0076] xxix) 脂质的脂肪酸组成是基于将油酸转化为DPA的效率,所述效率为至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、约20%、约25%、约30%、约10%与约50%之

间、约10%与约30%之间、约10%与约25%之间或者约20%与约30%之间;

[0077] xxx) 脂质的脂肪酸组成是基于将LA转化为DPA的效率,所述效率为至少约15%、至少约20%、至少约22%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约15%与约50%之间、约20%与约40%之间或者约20%与约30%之间;

[0078] xxxi) 脂质的脂肪酸组成是基于将ALA转化为DPA的效率,所述效率为至少约17%、至少约22%、至少约24%、至少约30%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约22%与约70%之间、约17%与约55%之间、约22%与约40%之间或者约24%与约40%之间;

[0079] xxxii) 在所提取的脂质中的总脂肪酸具有小于1.5%C20:1、小于1%C20:1或约1%C20:1;

[0080] xxxiii) 脂质的三酰甘油(TAG)含量为至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、约70%与约99%之间或者约90%与约99%之间;

[0081] xxxiv) 所述脂质包含二酰甘油(DAG),所述DAG优选包括DPA;

[0082] xxxv) 所述脂质包含小于约10%、小于约5%、小于约1%或者约0.001%与约5%之间、不含(非酯化的)脂肪酸和/或磷脂,或者基本上不含;

[0083] xxxvi) 以TAG形式酯化的至少70%、至少72%或至少80%DPA处于TAG的sn-1或sn-3位置;

[0084] xxxvii) 在脂质中最丰富的含DPA的TAG物质为DPA/18:3/18:3(TAG 58:11);以及

[0085] xxxviii) 所述脂质包含三-DPATAG(TAG 66:15)。

[0086] 在另一个实施方案中,提取的脂质为油、优选地为芸苔属某种种子油或亚麻荠种子油的形式,其中按重量计油的至少约90%、最少约95%、至少约98%或者约95%与约98%之间为脂质。

[0087] 在一个实施方案中,DPA在所提取的脂质或油中的水平没有增加,或者大致上与在提取之前DPA在植物部分的脂质或油中的水平相同。换言之,在提取之后,并未进行相对于其它脂肪酸增加DPA在脂质或油中的水平的程序。如将清楚的是,脂质或油可随后通过分馏或其它程序进行处理,以改变脂肪酸组成。

[0088] 在另一个实施方案中,提取的脂质另外包含一种或多种甾醇,优选为植物甾醇。

[0089] 在另一个实施方案中,提取的脂质为油的形式,并且包含小于约10mg甾醇/g油、小于约7mg甾醇/g油、约1.5mg与约10mg甾醇/g油之间或者约1.5mg与约7mg甾醇/g油之间。

[0090] 可处于提取的脂质中的甾醇的实例包含但不一定限于,菜油甾醇/24-甲基胆固醇、 $\Delta 5$ -豆甾醇、齿孔醇、 $\beta$ -谷甾醇/24-乙基胆固醇、 $\Delta 5$ -燕麦甾醇/异岩藻甾醇、 $\Delta 7$ -豆甾醇/豆甾-7-烯- $3\beta$ -醇以及 $\Delta 7$ -燕麦甾醇中的一种或多种或所有。

[0091] 在一个实施方案中,植物种类为表11所列出的一种,如油菜,并且甾醇的水平与表11中所列出的所述特定植物种类的水平近似相同。植物种类可为欧洲油菜、芥菜(印度芥菜)或大麻(*C. sativa*)并且分别包含近似野生型欧洲油菜、芥菜或大麻的提取的油中发现的甾醇水平。

[0092] 在一个实施方案中,提取的植物脂质包含菜油甾醇/24-甲基胆固醇、 $\Delta 5$ -豆甾醇、齿孔醇、 $\beta$ -谷甾醇/24-乙基胆固醇、 $\Delta 5$ -燕麦甾醇/异岩藻甾醇、 $\Delta 7$ -豆甾醇/豆甾-7-烯-3

$\beta$ -醇以及  $\Delta^7$ -燕麦甾醇中的一种或多种或所有,或者其具有与野生型菜籽油基本上相同的甾醇含量。

[0093] 在一个实施方案中,提取的脂质具有基本上与野生型菜籽油、芥菜油或大麻油相同的甾醇含量。

[0094] 在一个实施方案中,提取的脂质包含小于约0.5mg胆固醇/g油、小于约0.25mg胆固醇/g油、约0mg与约0.5mg胆固醇/g油之间或者约0mg与约0.25mg胆固醇/g油之间,或者基本上不含胆固醇。

[0095] 在一个实施方案中,所述植物部分为种子,优选为含油种子。此类种子的实例包括但不限于,芸苔属物种、陆地棉、亚麻、向日葵属物种、红花、大豆、玉蜀黍、拟南芥、两色蜀黍、高粱、燕麦、三叶草属物种、油棕、本氏烟、大麦、狭叶羽扇豆、亚洲栽培稻、非洲栽培稻、亚麻荠或深海两节荠,优选为芸苔属物种种子、亚麻荠种子或者大豆(黄豆)种子,更优选地为欧洲油菜、印度芥菜或亚麻荠种子。在一个实施方案中,植物部分为种子,优选为含油种子,例如芸苔属物种(如欧洲油菜或者印度芥菜)、陆地棉、亚麻、向日葵属物种、红花、大豆、玉蜀黍、油棕、本氏烟、狭叶羽扇豆、亚麻荠或深海两节荠,优选为欧洲油菜、印度芥菜或亚麻荠种子。在一个实施方案中,所述种子为油菜种子、芥菜种子、大豆种子、亚麻荠种子或拟南芥种子。在一个替代实施方案中,所述种子为除拟南芥种子之外和/或除亚麻荠种子之外的种子。在一个实施方案中,所述植物部分是芸苔属物种种子。在一个实施方案中,所述种子为除大豆种子之外的种子。在一个实施方案中,所述种子从在标准条件下生长的植物(例如,如实施例1所述的)中获得或者从在标准条件下在田地或温室中生长的植物中获得。在另一个实施方案中,所述种子包含每克种子至少约18mg、至少约22mg、至少约26mg、约18mg与约100mg之间、约22mg与约70mg之间、约80mg、约30mg与约80mg之间或者约24mg与约50mg之间的DPA。

[0096] 在另一个实施方案中,包含外源性多核苷酸的植物部分的总油含量为缺乏外源性多核苷酸的对应植物部分的总油含量的至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、约50%与约80%之间或者约80%与约100%之间。

[0097] 在另一个实施方案中,所述方法另外包括处理所述脂质以增加作为相对于总脂肪酸含量的百分比的DPA的水平。例如,所述处理包括酯基转移。例如,可处理所述脂质如菜籽油,以将油中的脂肪酸转化为烷基酯如甲酯或乙酯,然后可将其分馏以富集脂质或油用于DPA。在实施方案中,在此类处理之后脂质的脂肪酸组成包含至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%DPA。

[0098] 在另一方面,本发明提供包含酯化形式的脂肪酸的提取的植物脂质,优选地为芸苔属某种种子油或亚麻荠种子油,所述脂肪酸包含油酸、棕榈酸、包含亚油酸(LA)的 $\omega$ 6脂肪酸、包含 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)和二十二碳五烯酸(DPA)的 $\omega$ 3脂肪酸以及任选十八碳四烯酸(SDA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十碳四烯酸(ETA)中的一种或多种,其中DPA在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为7%与20%之间或7%与35%之间,优选地为20.1%与35%之间,棕榈酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为2%与16%之间,并且肉豆蔻酸(C14:0)在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平小于1%。在一个实施方案中,DPA在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为8%与20%之间或10%与20%之间,优选地为11%与20%之间或12%与20%之间。在一个实施方案中,DHA在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的

水平小于2%,优选地为小于1%,或者在0.1%与2%之间,更优选地为未检测到。在一个实施方案中,所提取的植物脂质包含按重量计小于0.1%,优选地为不可检测的C21:5 $\omega$ 3脂肪酸。

[0099] 在一个优选的实施方案中,提取的脂质具有本文所定义的(例如以上所定义的)特征中的一个或多个。

[0100] 在一个实施方案中,二十碳五烯酸(EPA)在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为0.05%与10%之间。

[0101] 在一个实施方案中,二十二碳六烯酸(DHA)在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于2%。

[0102] 在一个优选的实施方案中,脂质或油,优选为种子油,更优选地为芸苔属某种种子油或亚麻荠种子油,具有以下特征:在脂质或油的总脂肪酸含量中,DPA的水平为7%与35%之间或7%与20%之间,优选地为20.1%与30%之间或者20.1%与35%之间,优选为30%与35%之间,棕榈酸的水平为2%与16%之间,肉豆蔻酸的水平小于6%,油酸的水平为1%与30%之间,LA的水平为4%与35%之间,ALA为存在的,总饱和脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为4%与25%之间,在所提取的脂质的脂肪酸含量中总 $\omega$ 6脂肪酸:总 $\omega$ 3脂肪酸的比率为0.05与3.0之间,并且脂质的三酰甘油(TAG)含量为至少70%,并且任选地,所述脂质基本上不含胆固醇和/或所述脂质包含三-DPATAG(TAG 66:15)。更确切地说,脂质或油,优选地为种子油,另外具有以下特征中的一个或多个或所有:至少70%的DPA在三酰甘油(TAG)的sn-1或sn-3位置上酯化,ALA以总脂肪酸含量的4%与40%之间的水平存在,GLA为存在的和/或GLA的水平小于总脂肪酸含量的4%,SDA的水平为0.05%与约10%之间,ETA的水平小于4%,EPA的水平为0.05%与10%之间,总单一不饱和脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为4%与35%之间,总多元不饱和脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为20%与75%之间,在所提取的脂质的脂肪酸含量中新 $\omega$ 6脂肪酸:新 $\omega$ 3脂肪酸的比率为0.03与3.0之间,优选小于0.50,脂质的脂肪酸组成是基于:通过 $\Delta$ 12-去饱和酶将油酸转化为LA的至少60%的效率、通过 $\Delta$ 6-延伸酶将SDA转化为ETA酸的至少60%的效率、通过 $\Delta$ 5-延伸酶将EPA转化为DPA的50%与95%之间的效率、将油酸转化为DPA的至少10%的效率。最优选地,至少81%的DPA在三酰甘油(TAG)的sn-1或sn-3位置酯化。在此实施方案中,DPA在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平优选地为小于2%,更优选地为小于1%,或者为0.1%与2%之间,最优选地为未检测到。

[0103] 在另一个优选的实施方案中,脂质或油,优选为种子油,更优选地为芸苔属某种种子油或亚麻荠种子油,具有以下特征:在脂质或油的总脂肪酸含量中,DPA的水平为7%与20%之间或7%与35%之间,优选地为20.1%与30%之间或者20.1%与35%之间,优选地为30%与35%之间,棕榈酸的水平为2%与16%之间,肉豆蔻酸的水平小于6%并且优选小于1%,油酸的水平为1%与30%之间,LA的水平为4%与35%之间,ALA为存在的,GLA为存在的,SDA的水平为0.05%与10%之间,ETA的水平为小于6%,EPA的水平为0.05%与10%之间。在此实施方案中,DHA在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平优选地为小于2%,更优选地为小于1%,或者为0.1%与2%之间,最优选地为未检测到。

[0104] 在另一个实施方案中,所述种子包含每克种子至少约18mg、至少约22mg、至少约26mg、约18mg与约100mg之间、约22mg与约70mg之间、约80mg、约30mg与约80mg之间或者约



24mg与约50mg之间的DPA。

[0105] 在以上方面的另一个实施方案中,所述植物部分如种子包含编码以下几组酶之一的外源多核苷酸;

[0106] i)  $\omega$ 3-去饱和酶、 $\Delta$ 6-去饱和酶、 $\Delta$ 5-去饱和酶、 $\Delta$ 6-延伸酶以及 $\Delta$ 5-延伸酶;

[0107] ii)  $\Delta$ 15-去饱和酶、 $\Delta$ 6-去饱和酶、 $\Delta$ 5-去饱和酶、 $\Delta$ 6-延伸酶以及 $\Delta$ 5-延伸酶;

[0108] iii)  $\Delta$ 12-去饱和酶、 $\Delta$ 6-去饱和酶、 $\Delta$ 5-去饱和酶、 $\Delta$ 6-延伸酶以及 $\Delta$ 5-延伸酶;

[0109] iv)  $\Delta$ 12-去饱和酶、 $\omega$ 3-去饱和酶和/或 $\Delta$ 15-去饱和酶、 $\Delta$ 6-去饱和酶、 $\Delta$ 5-去饱和酶、 $\Delta$ 6-延伸酶以及 $\Delta$ 5-延伸酶;

[0110] v)  $\omega$ 3-去饱和酶、 $\Delta$ 8-去饱和酶、 $\Delta$ 5-去饱和酶、 $\Delta$ 9-延伸酶以及 $\Delta$ 5-延伸酶;

[0111] vi)  $\Delta$ 15-去饱和酶、 $\Delta$ 8-去饱和酶、 $\Delta$ 5-去饱和酶、 $\Delta$ 9-延伸酶以及 $\Delta$ 5-延伸酶;

[0112] vii)  $\Delta$ 12-去饱和酶、 $\Delta$ 8-去饱和酶、 $\Delta$ 5-去饱和酶、 $\Delta$ 9-延伸酶以及 $\Delta$ 5-延伸酶;

[0113] viii)  $\Delta$ 12-去饱和酶、 $\omega$ 3-去饱和酶和/或 $\Delta$ 15-去饱和酶、 $\Delta$ 8-去饱和酶、 $\Delta$ 5-去饱和酶、 $\Delta$ 9-延伸酶以及 $\Delta$ 5-延伸酶;

[0114] 并且其中每种多核苷酸可操作地连接至能够在植物部分的细胞内指导所述多核苷酸表达的一个或多个启动子。优选地,所述植物部分如种子不具有编码 $\Delta$ 4-去饱和酶的多核苷酸或者不具有 $\Delta$ 4-去饱和酶多肽。

[0115] 在一个实施方案中, $\Delta$ 12-去饱和酶也具有 $\omega$ 3-去饱和酶和/或 $\Delta$ 15-去饱和酶活性,即,通过单一多肽赋予所述活性。或者,所述 $\Delta$ 12-去饱和酶不具有 $\omega$ 3-去饱和酶活性并且不具有 $\Delta$ 15-去饱和酶活性,即所述 $\Delta$ 12-去饱和酶为与具有 $\omega$ 3-去饱和酶活性和/或 $\Delta$ 15-去饱和酶的多肽不同的多肽。

[0116] 在以上方面的另一个实施方案中,植物部分如种子或重组细胞具有以下特征中的一个或多个或所有:

[0117] i)  $\Delta$ 12-去饱和酶在植物部分的一种或多种细胞中或在重组细胞中以至少60%、至少70%、至少80%、60%与95%之间、70%与90%之间或者75%与85%之间的效率将油酸转化为亚油酸;

[0118] ii)  $\omega$ 3-去饱和酶在植物部分的一种或多种细胞中或在重组细胞中以至少65%、至少75%、至少85%、65%与95%之间、75%与91%之间或者80%与91%之间的效率将 $\omega$ 6脂肪酸转化为 $\omega$ 3脂肪酸;

[0119] iii)  $\Delta$ 6-去饱和酶在植物部分的一种或多种细胞中或在重组细胞中以至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、30%与70%之间、35%与60%之间或者50%与70%之间的效率将ALA转化为SDA;

[0120] iv)  $\Delta$ 6-去饱和酶在植物部分的一种或多种细胞中或在重组细胞中以小于5%、小于2.5%、小于1%、0.1%与5%之间、0.5%与2.5%之间或者0.5%与1%之间的效率将亚油酸转化为 $\gamma$ -亚麻酸;

[0121] v)  $\Delta$ 6-延伸酶在植物部分的一种或多种细胞中或在重组细胞中以至少60%、至少70%、至少75%、60%与95%之间、70%与80%之间或者75%与80%之间的效率将SDA转化为ETA;

[0122] vi)  $\Delta$ 5-去饱和酶在植物部分的一种或多种细胞中或在重组细胞中以至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、60%与95%之间、70%与95%之间或者75%与

95%之间的效率将ETA转化为EPA;

[0123] vii)  $\Delta 5$ -延伸酶在植物部分的一种或多种细胞中或在重组细胞中以至少80%、至少85%、至少90%、50%与90%之间或者85%与95%之间的效率将EPA转化为DPA;

[0124] ix) 在植物部分的一种或多种细胞中或在重组细胞中油酸转化为DPA的效率为至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、20%、25%、30%、10%与50%之间、10%与30%之间、10%与25%之间或者20%与30%之间;

[0125] x) 在植物部分的一种或多种细胞中或在重组细胞中LA转化为DPA的效率为至少15%、至少20%、至少22%、至少25%、至少30%、25%、30%、35%、15%与50%之间、20%与40%之间或者20%与30%之间;

[0126] xi) 在植物部分的一种或多种细胞中或在重组细胞中ALA转化为DPA的效率为至少17%、至少22%、至少24%、至少30%、30%、35%、40%、17%与55%之间、22%与35%之间或者24%与35%之间;

[0127] xii) 植物部分的一种或多种细胞或者重组细胞包含至少25%、至少30%、25%与40%之间或者27.5%与37.5%之间的比缺乏外源多核苷酸的对应细胞更多的 $\omega 3$ 脂肪酸;

[0128] xiii)  $\Delta 6$ -去饱和酶优选地将 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)相对于亚油酸(LA)去饱和;

[0129] xiv)  $\Delta 6$ -延伸酶也具有 $\Delta 9$ -延伸酶活性;

[0130] xv)  $\Delta 12$ -去饱和酶也具有 $\Delta 15$ -去饱和酶活性;

[0131] xvi)  $\Delta 6$ -去饱和酶也具有 $\Delta 8$ -去饱和酶活性;

[0132] xvii)  $\Delta 8$ -去饱和酶也具有 $\Delta 6$ -去饱和酶活性或者不具有 $\Delta 6$ -去饱和酶活性;

[0133] xviii)  $\Delta 15$ -去饱和酶也具有对GLA的 $\omega 3$ -去饱和酶活性;

[0134] xix)  $\omega 3$ -去饱和酶也具有对LA的 $\Delta 15$ -去饱和酶活性;

[0135] xx)  $\omega 3$ -去饱和酶将LA和/或GLA二者去饱和;

[0136] xxi)  $\omega 3$ -去饱和酶优选地将GLA相对于LA去饱和;

[0137] xxii) 所述去饱和酶中的一种或多种或所有,优选为 $\Delta 6$ -去饱和酶和/或 $\Delta 5$ -去饱和酶,对酰基-CoA底物具有比对应酰基-PC底物更大的活性;

[0138] xxiii)  $\Delta 6$ -去饱和酶对作为脂肪酸底物的ALA具有比对LA更大的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性;

[0139] xxiv)  $\Delta 6$ -去饱和酶对作为脂肪酸底物的ALA-CoA具有比对作为脂肪酸底物的连接到PC的sn-2位置的ALA更大的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性;

[0140] xxv) 相对于LA,  $\Delta 6$ -去饱和酶对作为底物的ALA具有大至少2倍的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性、大至少3倍的活性、大至少4倍的活性或者大至少5倍的活性;

[0141] xxvi)  $\Delta 6$ -去饱和酶对作为脂肪酸底物的ALA-CoA具有比对作为脂肪酸底物的连接到PC的sn-2位置的ALA更大的活性;

[0142] xxvii)  $\Delta 6$ -去饱和酶对作为脂肪酸底物的ALA-CoA具有比对作为脂肪酸底物的连接到PC的sn-2位置的ALA大至少5倍的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性或者大至少10倍的活性;

[0143] xxviii) 所述去饱和酶为前端去饱和酶;以及

[0144] xxix)  $\Delta 6$ -去饱和酶对ETA没有可检测的 $\Delta 5$ -去饱和酶活性。

[0145] 在以上方面的另一个实施方案中,植物部分如种子或重组细胞具有以下特征中的一个或多个或所有:

[0146] i)  $\Delta 12$ -去饱和酶包含具有如SEQ ID NO:4所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:4至少50%相同的氨基酸序列的氨基酸;

[0147] ii)  $\omega 3$ -去饱和酶包含具有如SEQ ID NO:6所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:6至少50%相同的氨基酸序列的氨基酸;

[0148] iii)  $\Delta 6$ -去饱和酶包含具有如SEQ ID NO:10所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:10至少50%相同的氨基酸序列的氨基酸;

[0149] iv)  $\Delta 6$ -延伸酶包含具有如SEQ ID NO:19所提供的序列、其生物活性片段(如SEQ ID NO:20)或者与SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20至少50%相同的氨基酸序列的氨基酸;

[0150] v)  $\Delta 5$ -去饱和酶包含具有如SEQ ID NO:24所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:24至少50%相同的氨基酸序列的氨基酸;

[0151] vi)  $\Delta 5$ -延伸酶包含具有如SEQ ID NO:31所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:31至少50%相同的氨基酸序列的氨基酸。

[0152] 在以上方面的一个实施方案中,植物部分(如种子)或者重组细胞另外包含编码以下各项的外源多核苷酸:二酰甘油酰基转移酶(DGAT)、单酰甘油酰基转移酶(MGAT)、甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)、酰基-CoA:溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶(LPCAT)、磷脂酶A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)、磷脂酶C(PLC)、磷脂酶D(PLD)、CDP-胆碱二酰甘油胆碱磷酸转移酶(CPT)、磷脂酰胆碱二酰甘油酰基转移酶(PDAT)、磷脂酰胆碱:二酰甘油胆碱磷酸转移酶(PDCT)、酰基-CoA合成酶(ACS)或其两种或更多种的组合。

[0153] 在以上方面的另一个实施方案中,植物部分(如种子)或重组细胞另外包含在植物部分的细胞中下调选自以下的外源性酶的产生和/或活性的引入性突变或外源性多核苷酸:FAE1、DGAT、MGAT、GPAT、LPAAT、LPCAT、PLA<sub>2</sub>、PLC、PLD、CPT、PDAT、如FATB的硫酯酶或者 $\Delta 12$ -去饱和酶或者其两种或更多种的组合。

[0154] 在另一个实施方案中,所述启动子中的至少一个或所有为种子特异性启动子。在一个实施方案中,从油生物合成或积累基因如编码油质蛋白的基因中或者从种子储藏蛋白基因如编码conlinin的基因中获得所述启动子中的至少一个或所有。

[0155] 在另一个实施方案中,外源性多核苷酸在整合到植物部分的细胞或者重组细胞的基因组中的DNA分子(优选为T-DNA分子)中共价连接,并且优选地为其中整合到植物部分的细胞或重组细胞的基因组中的此类DNA分子的数量不超过一个、两个或三个,或者为两个或三个。

[0156] 在另一个实施方案中,所述植物部分包含至少两种不同的外源性多核苷酸,它们各自编码具有相同或不同氨基酸序列的 $\Delta 6$ -去饱和酶。

[0157] 在另一个实施方案中,包含外源性多核苷酸的植物部分的总油含量为缺乏外源性多核苷酸的对应植物部分的总油含量的至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、50%与80%之间或者80%与100%之间。在另一个实施方案中,包含外源性多核苷酸的种子具有缺乏外源性多核苷酸的对应种子的重量的至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、50%与80%之间或者80%与100%之间的种子重量。

[0158] 在以上方面的另一个实施方案中,脂质为油的形式,优选为来自含油种子的种子油,并且其中按重量计脂质的至少90%、至少95%、至少98%或者95%与98%之间为三酰甘油。

[0159] 还提供一种用于产生提取的植物脂质的方法,所述方法包括以下步骤:

[0160] i) 获得包含脂质的植物部分,优选地为芸苔属某种种子或亚麻荠种子,所述脂质包含酯化形式的脂肪酸,其中对于提取的脂质,所述脂质具有如本文所定义的脂肪酸组成。在一个实施方案中,所述脂肪酸包含油酸、棕榈酸、含有亚油酸(LA)的 $\omega$ 6脂肪酸、含有 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)和二十二碳五烯酸(DPA)的 $\omega$ 3脂肪酸以及十八碳四烯酸(SDA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十碳四烯酸(ETA)中的一种或多种,其中(i)DPA在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为7%与35%之间或者为7%与20%之间,优选地为20.1%与30%之间或者20.1%与35%之间,更优选地为30%与35%之间,(ii)棕榈酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为2%与16%之间,(iii)肉豆蔻酸(C14:0)在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于6%,优选小于1%,(iv)油酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为1%与30%之间,(v)亚油酸(LA)在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为4%与35%之间,(vi) $\alpha$ -亚麻酸(ALA)在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为4%与40%之间,(vii)二十碳三烯酸(ETrA)在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为小于4%,(viii)总饱和脂肪酸在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为4%与25%之间,(ix)在所提取的脂质的脂肪酸含量中总 $\omega$ 6脂肪酸:总 $\omega$ 3脂肪酸的比率为0.05与1之间,(x)脂质的三酰甘油(TAG)含量为至少70%,并且(xi)以TAG形式酯化的至少70%DPA处于TAG的sn-1或sn-3位置;以及

[0161] ii) 从所述植物部分提取脂质:

[0162] 其中DPA在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为7%与35%之间或者为7%与20%之间,优选地为20.1%与30%之间或者20.1%与35%之间,优选地为30%与35%之间。优选地,以TAG形式酯化的至少81%或至少90%DPA处于TAG的sn-1或sn-3位置。优选地,DHA在所提取的植物脂质的总脂肪酸含量中的水平优选地为小于2%,更优选地为小于1%或者为0.1%与2%之间,最优选地为未检测到。

[0163] 还提供使用本发明的方法产生的脂质或含有所述脂质的油。

[0164] 在另一方面,本发明提供一种用于产生多元不饱和脂肪酸甲酯或乙酯的方法,所述方法包括在所提取的植物脂质中或者在提取过程期间将三酰甘油分别与甲醇或乙醇反应,其中提取的植物脂质包含以TAG形式酯化的脂肪酸,所述脂肪酸包含油酸、棕榈酸、含有亚油酸(LA)的 $\omega$ 6脂肪酸、含有 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)的 $\omega$ 3脂肪酸以及任选地十八碳四烯酸(SDA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十碳四烯酸(ETA)中的一种或多种,其中DPA在所提取的脂质的总脂肪酸含量中的水平为7%与35%之间或者为7%与20%之间,优选地为20.1%与30%之间或者20.1%与35%之间,优选为30%与35%之间,从而产生多元不饱和脂肪酸甲酯或乙酯。

[0165] 在一个优选的实施方案中,用于以上方面的方法中的脂质在所提取的脂质或油的背景下具有本文所定义的特征中的一个或多个。

[0166] 在另一方面,本发明提供一种包含以下的含油种子植物:

[0167] a) 在其种子中的脂质,所述脂质包含酯化形式的脂肪酸;以及

[0168] b) 编码以下几组酶之一的外源性多核苷酸;

[0169] i)  $\Delta$ 12-去饱和酶、真菌 $\omega$ 3-去饱和酶和/或真菌 $\Delta$ 15-去饱和酶、 $\Delta$ 6-去饱和酶、 $\Delta$ 5-去饱和酶、 $\Delta$ 6-延伸酶以及 $\Delta$ 5-延伸酶,或者

[0170] ii)  $\Delta$ 12-去饱和酶、真菌 $\omega$ 3-去饱和酶和/或真菌 $\Delta$ 15-去饱和酶、 $\Delta$ 8-去饱和酶、

$\Delta 5$ -去饱和酶、 $\Delta 9$ -延伸酶以及  $\Delta 5$ -延伸酶,

[0171] 其中每种多核苷酸可操作地连接至能够指导所述多核苷酸在植物的发育种子中表达的一个或多个种子特异性启动子,其中所述脂肪酸包含油酸、棕榈酸、含有亚油酸(LA)和  $\gamma$ -亚麻酸(GLA)的  $\omega 6$ 脂肪酸、含有 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)、十八碳四烯酸(SDA)和二十二碳五烯酸(DPA)的  $\omega 3$ 脂肪酸、以及任选地二十碳五烯酸(EPA)和/或二十碳四烯酸(ETA),并且其中DPA在脂质的总脂肪酸含量中的水平为7%与20%之间或者为7%与35%之间,20.1%与30%之间或者20.1%与35%之间,优选为30%与35%之间。

[0172] 含油种子植物的实例包括但不限于,芸苔属物种、陆地棉、亚麻、向日葵属物种、红花、大豆、玉蜀黍、拟南芥、两色蜀黍、高粱、燕麦、三叶草属物种、油棕、本氏烟、大麦、狭叶羽扇豆、亚洲栽培稻、非洲栽培稻、亚麻荠或者深海两节芥。在一个实施方案中,所述植物为芸苔属物种植物、亚麻荠植物或者大豆(黄豆)植物。在一个实施方案中,含油种子植物为油菜、印度芥菜、大豆、亚麻荠或拟南芥植物。在一个替代实施方案中,所述含油种子植物为除拟南芥之外和/或除亚麻荠之外的。在一个实施方案中,所述含油种子植物为除大豆(黄豆)之外的植物。在一个实施方案中,含油种子植物处于田地中或者在田地中生长或者在标准条件下在温室中生长,例如如实施例1所述的。

[0173] 在一个实施方案中,所述去饱和酶中的一种或多种能够使用酰基-CoA底物。在一个优选的实施方案中, $\Delta 6$ -去饱和酶、 $\Delta 5$ -去饱和酶和 $\Delta 8$ -去饱和酶(如果存在的话)中的一种或多种能够使用酰基-CoA底物,优选地为i)  $\Delta 6$ -去饱和酶和 $\Delta 5$ -去饱和酶或者ii)  $\Delta 5$ -去饱和酶和 $\Delta 8$ -去饱和酶中的每一种均能够使用酰基-CoA底物。在一个实施方案中, $\Delta 12$ -去饱和酶和/或 $\omega 3$ -去饱和酶能够使用酰基-CoA底物。酰基-CoA底物优选为ALA-CoA、ETA-CoA、DPA-CoA、ETrA-CoA、LA-CoA、GLA-CoA或ARA-CoA。

[0174] 在一个实施方案中,植物(优选地为欧洲油菜、印度芥菜或亚麻荠植物)的成熟的、收获的种子的DPA含量为每克种子至少约28mg,优选为每克种子至少约32mg、每克种子至少约36mg、每克种子至少约40mg,更优选为每克种子至少约44mg或者每克种子至少约48mg、每克种子约80mg或者每克种子约30mg与约80mg之间。

[0175] 在另一方面,本发明提供一种能够产生包含DPA的种子的欧洲油菜、印度芥菜或亚麻荠植物,其中所述植物的成熟的、收获的种子的DPA含量为每克种子至少约28mg,优选为每克种子至少约32mg、每克种子至少约36mg、每克种子至少约40mg,更优选为每克种子至少约44mg或每克种子至少约48mg、每克种子约80mg或者每克种子约30mg与约80mg之间。

[0176] 在另一方面,本发明提供一种本发明的植物的包含外源性多核苷酸的植物细胞。

[0177] 还提供具有以下特征中的一种或多种的植物部分(优选为种子)或重组细胞

[0178] i) 来自本发明的植物;

[0179] ii) 包含如本文所定义的脂质;或者

[0180] iii) 可用于本发明的方法中。

[0181] 在一个实施方案中,包含DPA的收获的欧洲油菜、印度芥菜或亚麻荠种子的含湿量为按重量计4%与15%之间,优选为按重量计4%与8%之间,更优选为按重量计4%与6%之间的,其中种子的DPA含量为每克种子至少约28mg,优选为每克种子至少约32mg、每克种子至少约36mg、每克种子至少约40mg,更优选为每克种子至少约44mg或者每克种子至少约48mg、每克种子约80mg或者每克种子约30mg与约80mg之间。

[0182] 在一个实施方案中,本发明的细胞、本发明的含油种子植物、本发明的欧洲油菜、印度芥菜或亚麻荠植物、本发明的植物部分或者本发明的种子可用于产生包括本文所定义的特征中的一个或多个或所有的提取的脂质。

[0183] 在又另一方面,本发明提供一种产生可用于产生本发明的提取的植物脂质的植物的方法,所述方法包括

[0184] a) 测定DPA在由来自多种植物或重组细胞的一种或多种植物部分(如种子)或者重组细胞产生的脂质中的水平,每种植物或重组细胞包含编码以下几组酶之一的一种或多种外源性多核苷酸;

[0185] i)  $\omega$  3-去饱和酶、 $\Delta$  6-去饱和酶、 $\Delta$  5-去饱和酶、 $\Delta$  6-延伸酶以及  $\Delta$  5-延伸酶;

[0186] ii)  $\Delta$  15-去饱和酶、 $\Delta$  6-去饱和酶、 $\Delta$  5-去饱和酶、 $\Delta$  6-延伸酶以及  $\Delta$  5-延伸酶;

[0187] iii)  $\Delta$  12-去饱和酶、 $\Delta$  6-去饱和酶、 $\Delta$  5-去饱和酶、 $\Delta$  6-延伸酶以及  $\Delta$  5-延伸酶;

[0188] iv)  $\Delta$  12-去饱和酶、 $\omega$  3-去饱和酶或  $\Delta$  15-去饱和酶、 $\Delta$  6-去饱和酶、 $\Delta$  5-去饱和酶、 $\Delta$  6-延伸酶以及  $\Delta$  5-延伸酶;

[0189] v)  $\omega$  3-去饱和酶、 $\Delta$  8-去饱和酶、 $\Delta$  5-去饱和酶、 $\Delta$  9-延伸酶以及  $\Delta$  5-延伸酶;

[0190] vi)  $\Delta$  15-去饱和酶、 $\Delta$  8-去饱和酶、 $\Delta$  5-去饱和酶、 $\Delta$  9-延伸酶以及  $\Delta$  5-延伸酶;

[0191] vii)  $\Delta$  12-去饱和酶、 $\Delta$  8-去饱和酶、 $\Delta$  5-去饱和酶、 $\Delta$  9-延伸酶以及  $\Delta$  5-延伸酶;或者

[0192] viii)  $\Delta$  12-去饱和酶、 $\omega$  3-去饱和酶或  $\Delta$  15-去饱和酶、 $\Delta$  8-去饱和酶、 $\Delta$  5-去饱和酶、 $\Delta$  9-延伸酶以及  $\Delta$  5-延伸酶,其中每种多核苷酸可操作地连接至能够指导所述多核苷酸在植物部分的细胞内表达的一个或多个启动子;以及

[0193] b) 鉴别来自多种植物或重组细胞的植物或重组细胞,其可用于在植物部分的一种或多种中产生本发明的提取的植物脂质或细胞脂质;以及

[0194] c) 任选地,由确定的植物或重组细胞或者其种子产生后代植物或重组细胞。

[0195] 优选地,后代植物为从鉴别的植物中去除的至少第二或第三代,并且优选地对于一种或多种多核苷酸为纯合的。更优选地,一种或多种多核苷酸存在于后代植物的仅单一插入基因座。即,本发明提供可用作鉴别来自多种转化的候选植物或种子的植物或其种子的筛选方法的这种方法,其中所述鉴别的植物或其后代植物产生本发明的脂质,优选在其种子中。如果这种植物或后代植物或其种子产生本发明的脂质,具体地为具有指定的DPA水平,则选择所述植物或后代植物或其种子,或者如果它不产生本发明的脂质,则不选择它。

[0196] 在一个实施方案中,基因构建体、分离的和/或外源性多核苷酸、载体、遗传构建体或外源性多核苷酸的组合稳定整合到植物或植物部分(如种子)的基因组中。优选地,基因构建体、分离的和/或外源性多核苷酸、载体、遗传构建体或外源性多核苷酸的组合稳定整合到植物或植物部分(如种子)的基因组中,在基因组的单一基因座处,并且优选地对于插入为纯合的。更优选地,植物、植物部分或种子另外的特征在于,它缺乏除一个或多个T-DNA分子之外的外源性多核苷酸。即,没有外源性载体序列整合到除T-DNA序列之外的基因组中。

[0197] 在一个实施方案中,在步骤a)之前,所述方法包括将所述一种或多种外源性多核苷酸引入到植物的一种或多种细胞中。

[0198] 还提供一种使用本发明的方法产生的植物和此类植物的种子。

[0199] 在一个实施方案中,本发明的植物为雄性和雌性可育的,优选具有相对于对应的野生型植物为至少70%或者优选为与其大致相同的雄性和雌性生育力水平。在一个实施方案中,通过本发明的植物产生的花粉或者由本发明的种子产生的植物为90%-100%活力的,如通过使用生存力染色法进行染色来确定的。例如,花粉生存力可如实施例1所述地进行评定。

[0200] 在另一方面,本发明提供一种产生种子的方法,所述方法包括:

[0201] a) 优选在作为至少1000或2000或3000株此类植物群体的部分的田地中或者在以标准种植密度种植的至少1公顷或2公顷或3公顷的区域中,或者在标准条件下的温室中,使本发明的植物或者产生本发明的部分的植物生长;

[0202] b) 从这种或这些植物中收获种子;以及

[0203] c) 任选地,从种子中提取脂质,优选地为以至少60kg或70kg或80kg DPA/公顷的总DPA产率产生油。

[0204] 在一个实施方案中,本发明的植物、植物细胞、植物部分或种子或重组细胞具有以下特征中的一种或多种:

[0205] i) 所述油为本文所定义的;或者

[0206] ii) 植物部分或种子或重组细胞能够用于本发明的方法中。

[0207] 例如,所述种子可用于产生本发明的植物。所述植物可在标准条件下在田地或温室中生长,例如如实施例1所述的。

[0208] 在另一方面,本发明提供使用本发明的方法由本发明的细胞、本发明的含油种子植物、本发明的芸苔属物种、欧洲油菜、印度芥菜、大豆或亚麻荠植物、本发明的植物部分、本发明的种子或者本发明的植物、植物细胞、植物部分或种子产生的或由其获得的脂质或油。优选地,纯化所述脂质或油以去除污染物如核酸(DNA和/或RNA)、蛋白质和/或碳水化合物或色素如叶绿素。还可纯化所述脂质或油以例如通过去除游离脂肪酸(FFA)或磷脂来富集TAG的比例。

[0209] 在一个实施方案中,通过从含油种子中提取油来获得所述脂质或油。来自含油种子的油的实例包括但不限于,菜籽油(欧洲油菜、芜菁(*Brassica rapa* ssp.))、芥子油(印度芥菜)、其它芸苔属油、葵花油(向日葵(*Helianthus annuus*))、亚麻子油(亚麻)、大豆油(大豆)、红花油(红花)、玉米油(玉蜀黍)、烟草油(普通烟草)、花生油(花生)、棕榈油、棉籽油(陆地棉)、椰子油(椰子)、鳄梨油(鳄梨(*Persea americana*))、橄榄油(油橄榄(*Olea europaea*))、腰果油(腰果(*Anacardium occidentale*))、澳洲坚果油(澳洲坚果(*Macadamia integrifolia*))、杏仁油(巴旦杏(*Prunus amygdalus*))或者拟南芥种子油(拟南芥)。

[0210] 在另一方面,本发明提供使用本发明的方法由本发明的细胞、本发明的含油种子植物、本发明的芸苔属物种、欧洲油菜、印度芥菜、大豆或亚麻荠植物、本发明的植物部分、本发明的种子或者本发明的植物、植物细胞、植物部分或种子产生的或由其获得的脂肪酸。优选地,所述脂肪酸为DPA。所述脂肪酸可处于具有如本文所述的脂肪酸组成的脂肪酸混合物中,或者可以富集以使得脂肪酸包含混合物的至少40%或至少90%的脂肪酸含量。在一个实施方案中,脂肪酸为非酯化的。或者,脂肪酸与(例如像)甲基、乙基、丙基或丁基酯化。

[0211] 还提供由本发明的种子获得的种子粉。优选的种子粉包括但不限于,芸苔属物种、欧洲油菜、印度芥菜、亚麻荠或大豆种子粉。在一个实施方案中,种子粉包含如本文所

定义的一种或多种外源性多核苷酸和/或遗传构建体。在一个优选的实施方案中,种子粉在提取大部分脂质或油之后保留一些在从中获得种子粉的种子中产生的脂质或油,但是以低水平(例如,小于2重量%)保留。种子粉可用作动物饲料或用作食品生产中的成分。

[0212] 在另一方面,本发明提供一种包含本发明的脂质或油、本发明的脂肪酸、根据本发明的细胞、本发明的含油种子植物、本发明的芸苔属物种、欧洲油菜、印度芥菜、大豆或亚麻荠植物、本发明的植物部分、本发明的种子或本发明的种子粉中的一种或多种的组合物。在实施方案中,所述组合物包含适用于药学、食品或农业用途的载体、种子处理化合物、化肥、另一种食品或饲料成分或添加的蛋白质或维生素。

[0213] 还提供包含本发明的脂质或油、本发明的脂肪酸、根据本发明的细胞、本发明的含油种子植物、本发明的芸苔属物种、欧洲油菜、印度芥菜、大豆或亚麻荠植物、本发明的植物部分、本发明的种子、本发明的种子粉或本发明的组合物中的一种或多种的原料、化妆品或化学剂。优选的原料为包含本发明的脂质和油的婴儿配方。

[0214] 在另一方面,本发明提供一种生产原料、优选地为婴儿配方的方法,所述方法包括将本发明的脂质或油、本发明的脂肪酸、根据本发明的细胞、本发明的含油种子植物、本发明的芸苔属物种、欧洲油菜、印度芥菜、大豆或亚麻荠植物、本发明的植物部分、本发明的种子、本发明的种子粉或本发明的组合物中的一种或多种与至少一种其它食品成分混合。所述方法可包括将饲料共混、烹煮、烘烤、挤压、乳化或另外配制或者将饲料包装或分析饲料中脂质或油的量的步骤。

[0215] 在另一方面,本发明提供一种治疗或预防得益于PUFA(优选DPA)的病状的方法,所述方法包括向受试者施用本发明的脂质或油、本发明的脂肪酸、根据本发明的细胞、本发明的含油种子植物、本发明的芸苔属物种、欧洲油菜、印度芥菜、大豆或亚麻荠植物、本发明的植物部分、本发明的种子、本发明的种子粉、本发明的组合物或本发明的饲料中的一种或多种。在一个优选的实施方案中,以包含PUFA乙酯的药物组合物形式施用PUFA。所述受试者可为人或者除人之外的动物。

[0216] 可得益于PUFA的病状的实例包括但不限于,升高的血清甘油三酯水平、升高的血清胆固醇水平(如,升高的LDL胆固醇水平)、心律失常、血管成形、炎症、哮喘、银屑病、骨质疏松症、肾结石、AIDS、多发性硬化、类风湿关节炎、克罗恩病、精神分裂症、癌症、胎儿乙醇综合征、注意缺陷多动症、囊性纤维化、苯丙酮尿症、单相抑郁症、进攻性敌意、肾上腺脑白质营养不良、冠心病、高血压、糖尿病、肥胖症、阿耳茨海默病、慢性阻塞性肺病、溃疡性结肠炎、血管成形术后再狭窄、湿疹、高血压、血小板聚集、消化道出血、子宫内膜异位、月经前期综合征、肌痛性脑脊髓炎、病毒感染后慢性疲劳或眼部疾病。

[0217] 还提供本发明的脂质或油、本发明的脂肪酸、根据本发明的细胞、本发明的含油种子植物、本发明的芸苔属物种、欧洲油菜、印度芥菜、大豆或亚麻荠植物、本发明的植物部分、本发明的种子、本发明的种子粉、本发明的组合物或本发明的饲料中的一种或多种用于制造用于治疗或预防可得益于PUFA(优选为DPA)的病状的药剂的用途。

[0218] 所述药剂的产生可包括将本发明的油与药学上可接受的载体混合,以用于治疗如本文所述的病状。所述方法可包括首先纯化所述油和/或酯基转移和/或分馏所述油,以增加DPA的水平。在一个具体的实施方案中,所述方法包括处理所述脂质或油如菜籽油,以将油中的脂肪酸转化为烷酯如甲酯或乙酯。可进行进一步处理如分馏或蒸馏以富集脂质或油



用于DPA。在一个优选的实施方案中,所述药剂包括DPA乙酯。在一个甚至更优选的实施方案中,药剂中的DPA乙酯水平为30%与50%之间或者至少80%或至少90%或约85%或约95%。所述药剂可另外包含EPA或DHA乙酯,如30%与50%之间或者至少90%的药剂总脂肪酸含量。此类药剂适用于施用给人或动物受试者以用于治疗如本文所述的医学病状。

[0219] 在又一个方面中,本发明提供一种产生种子料斗的方法,其包括:

[0220] a) 割晒、堆放和/或收割包含本发明的种子的植物地面部分;

[0221] b) 脱粒和/或风选植物部分以将种子与其余植物部分分离;以及

[0222] c) 筛选和/或分选步骤b) 中分离的种子,将筛选和/或分选出的种子装入到料斗中,从而产生种子料斗。

[0223] 在一个实施方案中,在相关时,本发明的或适用于本发明的脂质或油(优选种子油)具有近似于实施例部分的表中所提供的那些的脂肪水平。

[0224] 除非另外明确陈述,否则本文任何实施方案都应被视为向任何其它实施方案施加必要的变更。

[0225] 本发明在范围上不受限于本文所述的特定实施方案,所述实施方案仅意图出于示例目的。功能上等同的产物、组合物以及方法明显在如本文所描述的本发明的范围内。

[0226] 在本说明书中,除非另外具体地说明或上下文另外要求,否则提及单个步骤、物质的组合物、步骤的组或物质组合物的组应视为涵盖那些步骤、物质组合物、步骤的组或物质组合物的组中的一个和多个(即一个或多个)。

[0227] 在下文中,本发明是借助于以下非限制性实施例且参照附图加以描述。

## 附图说明

[0228] 图1. 需氧DPA生物合成路径。

[0229] 图2. 在pJP3416-GA7的左边界与右边界之间的T-DNA插入区域图。RB指示右边界;LB,左边界;TER,转录终止子/多腺苷酸化区域;PRO,启动子;编码区被指示在箭头上方,启动子和终止子在箭头下方。Micpu- $\Delta$ 6D,细小微胞藻(*Micromonas pusilla*) $\Delta$ 6-去饱和酶;Pyrco- $\Delta$ 6E,心形塔胞藻(*Pyramimonas cordata*) $\Delta$ 6-延伸酶;Pavsa- $\Delta$ 5D,盐生巴夫藻(*Pavlova salina*) $\Delta$ 5-去饱和酶;Picpa- $\omega$ 3D,毕赤酵母 $\omega$ 3-去饱和酶;Pavsa- $\Delta$ 4D,盐生巴夫藻 $\Delta$ 4-去饱和酶;Lack1- $\Delta$ 12D,芽殖酵母(*Lachancea kluyveri*) $\Delta$ 12-去饱和酶;Pyrco- $\Delta$ 5E,心形塔胞藻 $\Delta$ 5-延伸酶。NOS指示根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)胭脂碱合酶转录终止子/多腺苷酸化区域;FP1,欧洲油菜截短的napin启动子;FAE1,拟南芥FAE1启动子;凝集素,大豆凝集素转录终止子/多腺苷酸化区域;Cn11和Cn12指示亚麻conlinin1或conlinin2启动子或终止子。MAR指示来自普通烟草的Rb7基质结合区。

[0230] 图3. 在pJP3404的左边界与右边界之间的T-DNA插入区域图。标签为如图2中。

[0231] 图4. 在pJP3367的左边界与右边界之间的插入区域图。标签为如图2中。

[0232] 图5. (A) 具有环和侧链编号的碱性植物甾醇结构。(B) 一些植物甾醇的化学结构。

[0233] 图6. 在pJP3662的左边界与右边界之间的T-DNA插入区域图。RB指示右边界;LB,左边界;TER,转录终止子/多腺苷酸化区域;PRO,启动子;编码区被指示在箭头上方,启动子和终止子在箭头下方。Micpu- $\Delta$ 6D,细小微胞藻 $\Delta$ 6-去饱和酶;Pyrco- $\Delta$ 6E,心形塔胞藻 $\Delta$ 6-

延伸酶;Pavsa- $\Delta$ 5D,盐生巴夫藻 $\Delta$ 5-去饱和酶;Picpa- $\omega$ 3D,毕赤酵母 $\omega$ 3-去饱和酶;Lack1- $\Delta$ 12D,芽殖酵母 $\Delta$ 12-去饱和酶;Pyrco- $\Delta$ 5E,心形塔胞藻 $\Delta$ 5-延伸酶。NOS指示根癌土壤杆菌胭脂碱合酶转录终止子/多腺苷酸化区域;FP1,欧洲油菜截短的napin启动子;FAE1,拟南芥FAE1启动子;凝集素,大豆凝集素转录终止子/多腺苷酸化区域;Cn11指示亚麻conlinin1启动子或终止子。MAR指示来自普通烟草的Rb7基质结合区。

[0234] 序列表说明

[0235] SEQ ID NO:1-pJP3416-GA7核苷酸序列。

[0236] SEQ ID NO:2-pGA7-mod\_B核苷酸序列。

[0237] SEQ ID NO:3-用于在植物中表达芽殖酵母 $\Delta$ 12去饱和酶的密码子优化的开放阅读框。

[0238] SEQ ID NO:4-芽殖酵母 $\Delta$ 12-去饱和酶。

[0239] SEQ ID NO:5-用于在植物中表达毕赤酵母 $\omega$ 3去饱和酶的密码子优化的开放阅读框。

[0240] SEQ ID NO:6-毕赤酵母 $\omega$ 3去饱和酶。

[0241] SEQ ID NO:7-编码细小微胞藻(*Micromonas pusilla*) $\Delta$ 6-去饱和酶的开放阅读框。

[0242] SEQ ID NO:8-用于在植物中表达细小微胞藻 $\Delta$ 6-去饱和酶的密码子优化的开放阅读框(版本1)。

[0243] SEQ ID NO:9-用于在植物中表达细小微胞藻 $\Delta$ 6-去饱和酶的密码子优化的开放阅读框(版本2)。

[0244] SEQ ID NO:10-细小微胞藻 $\Delta$ 6去饱和酶。

[0245] SEQ ID NO:11-编码绿色鞭毛藻(*Ostreococcus lucimarinus*) $\Delta$ 6-去饱和酶的开放阅读框。

[0246] SEQ ID NO:12-用于在植物中表达绿色鞭毛藻 $\Delta$ 6-去饱和酶的密码子优化的开放阅读框。

[0247] SEQ ID NO:13-绿色鞭毛藻 $\Delta$ 6-去饱和酶。

[0248] SEQ ID NO:14-海洋微藻(*Ostreococcus tauri*) $\Delta$ 6-去饱和酶。

[0249] SEQ ID NO:15-编码心形塔胞藻 $\Delta$ 6-延伸酶的开放阅读框。

[0250] SEQ ID NO:16-用于在植物中表达心形塔胞藻 $\Delta$ 6-延伸酶的密码子优化的开放阅读框(在3'端截短并且编码功能化延伸酶)(版本1)。

[0251] SEQ ID NO:17-用于在植物中表达心形塔胞藻 $\Delta$ 6-延伸酶的密码子优化的开放阅读框(在3'端截短并且编码功能化延伸酶)(版本2)。

[0252] SEQ ID NO:18-用于在植物中表达心形塔胞藻 $\Delta$ 6-延伸酶的密码子优化的开放阅读框(在3'端截短并且编码功能化延伸酶)(版本3)。

[0253] SEQ ID NO:19-心形塔胞藻 $\Delta$ 6-延伸酶。

[0254] SEQ ID NO:20-截短的心形塔胞藻 $\Delta$ 6-延伸酶。

[0255] SEQ ID NO:21-编码盐生巴夫藻 $\Delta$ 5-去饱和酶的开放阅读框。

[0256] SEQ ID NO:22-用于在植物中表达盐生巴夫藻 $\Delta$ 5-去饱和酶的密码子优化的开放阅读框(版本1)。

- [0257] SEQ ID NO:23-用于在植物中表达盐生巴夫藻  $\Delta 5$ -去饱和酶的密码子优化的开放阅读框 (版本2)。
- [0258] SEQ ID NO:24-盐生巴夫藻  $\Delta 5$ -去饱和酶。
- [0259] SEQ ID NO:25-编码心形塔胞藻  $\Delta 5$ -去饱和酶的开放阅读框。
- [0260] SEQ ID NO:26-心形塔胞藻  $\Delta 5$ -去饱和酶。
- [0261] SEQ ID NO:27-编码心形塔胞藻  $\Delta 5$ -延伸酶的开放阅读框。
- [0262] SEQ ID NO:28-用于在植物中表达心形塔胞藻  $\Delta 5$ -延伸酶的密码子优化的开放阅读框 (版本1)。
- [0263] SEQ ID NO:29-用于在植物中表达心形塔胞藻  $\Delta 5$ -延伸酶的密码子优化的开放阅读框 (版本2)。
- [0264] SEQ ID NO:30-用于在植物中表达心形塔胞藻  $\Delta 5$ -延伸酶的密码子优化的开放阅读框 (版本3)。
- [0265] SEQ ID NO:31-心形塔胞藻  $\Delta 5$ -延伸酶。
- [0266] SEQ ID NO:32-编码球等鞭金藻  $\Delta 9$ -延伸酶的开放阅读框。
- [0267] SEQ ID NO:33-球等鞭金藻  $\Delta 9$ -延伸酶。
- [0268] SEQ ID NO:34-编码赫氏圆石藻 (*Emiliana huxleyi*) CCMP1516  $\Delta 9$ -延伸酶的开放阅读框。
- [0269] SEQ ID NO:35-用于在植物中表达赫氏圆石藻  $\Delta 9$ -延伸酶的密码子优化的开放阅读框。
- [0270] SEQ ID NO:36-赫氏圆石藻 CCMP1516  $\Delta 9$ -延伸酶。
- [0271] SEQ ID NO:37-编码 *Pavlova pinguis*  $\Delta 9$ -延伸酶的开放阅读框。
- [0272] SEQ ID NO:38-*Pavlova pinguis*  $\Delta 9$ -延伸酶。
- [0273] SEQ ID NO:39-编码盐生巴夫藻  $\Delta 9$ -延伸酶的开放阅读框。
- [0274] SEQ ID NO:40-盐生巴夫藻  $\Delta 9$ -延伸酶。
- [0275] SEQ ID NO:41-编码盐生巴夫藻  $\Delta 8$ -去饱和酶的开放阅读框。
- [0276] SEQ ID NO:42-盐生巴夫藻  $\Delta 8$ -去饱和酶。
- [0277] SEQ ID NO:43至51-寡核苷酸引物/探针。

## 具体实施方式

### [0278] 一般性技术和定义

[0279] 除非另外明确定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都应视为具有与由本领域(例如在细胞培养、分子遗传学、脂肪酸合成、转基因植物、蛋白质化学以及生物化学中)普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0280] 除非另外指示,否则本发明中利用的重组蛋白、细胞培养和免疫技术是为本领域技术人员所熟知的标准程序。此类技术在如以下之资源的文献中加以描述并且说明: J.Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984); J.Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989); T.A.Brown (编辑者), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, 第1卷和第2卷, IRL Press (1991); D.M.Glover和B.D.Hames (编辑

者),DNA Cloning:A Practical Approach,第1-4卷,IRL Press(1995年和1996年);F.M.Ausubel等(编辑者),Current Protocols in Molecular Biology,Greenhouse Pub.Associates and Wiley-Interscience(1988,包括迄今为止所有更新版本);Ed Harlow和David Lane(编辑者),Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory,(1988);以及J.E.Coligan等(编辑者),Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons(包括迄今为止所有更新版本)。

[0281] 术语“和/或”,例如“X和/或Y”应理解为是指“X和Y”或“X或Y”,且将用以对于两种含义或对于任一含义提供明确的支持。

[0282] 除非相反陈述,否则如本文所用的术语“约”是指指定值的 $\pm 10\%$ 、更优选 $\pm 5\%$ 、甚至更优选 $\pm 1\%$ 。

[0283] 在整篇本说明书中,用词“包含(comprise)”或变化形式(如“comprises”或“comprising”)应理解为暗示包括所述要素、整数或步骤、或成组要素、整数或步骤,而非排除任何其它要素、整数或步骤、或成组要素、整数或步骤。

[0284] 所选择的定义

[0285] 如本文所用的术语“提取的植物脂质”和“分离的植物脂质”是指已例如通过压碎从植物或其部分(如种子)中提取的脂质组合物。所述提取的脂质可为通过例如压碎植物种子获得的相对粗的组合物或者其中已去除大部分(如果不是全部的话)源于植物材料的水、核酸、蛋白质和碳水化合物中的一种或多种或每一种的更纯组合物。纯化方法的实例描述如下。在一个实施方案中,提取的或分离的植物脂质包含按组合物重量计至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%(w/w)脂质。所述脂质在室温下可为固体或液体,当为液体时它被视为油。在一个实施方案中,本发明的提取的脂质未与由另一种来源产生的另一种脂质如DPA(例如,来自鱼油的DPA)共混。在一个实施方案中,在提取之后,油酸与DPA、棕榈酸与DPA、亚油酸与DPA以及总 $\omega 6$ 脂肪酸:总 $\omega 3$ 脂肪酸中的一种或多种或所有的比率在与完整种子或细胞内的比率相比时没有显著改变(例如,不大于10%或5%改变)。在另一个实施方案中,未将提取的植物脂质暴露于如氢化或分馏的程序,当与完整种子或细胞内的比率相比时,所述程序可改变油酸与DPA、棕榈酸与DPA、亚油酸与DPA以及总 $\omega 6$ 脂肪酸:总 $\omega 3$ 脂肪酸中的一种或多种或所有的比率。当油中包含本发明的提取的植物脂质时,所述油可另外包含非脂肪酸分子如甾醇。

[0286] 如本文所用的术语“提取的植物油”和“分离的植物油”是指包含提取的植物脂质或分离的植物脂质并且在室温下为液体的物质或组合物。所述油从植物或其部分(如种子)中获得。所述提取或分离的油可为通过例如压碎植物种子获得的相对粗的组合物或者其中已去除大部分(如果不是全部的话)源于植物材料的水、核酸、蛋白质和碳水化合物中的一种或多种或每一种的更纯组合物。所述组合物可包含为脂质或非脂质的其它组分。在一个实施方案中,油组合物包含至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%(w/w)提取的植物脂质。在一个实施方案中,本发明的提取的油未与由另一种来源产生的另一种油如DPA(例如,来自鱼油的DPA)共混。在一个实施方案中,在提取之后,油酸与DPA、棕榈酸与DPA、亚油酸与DPA以及总 $\omega 6$ 脂肪酸:总 $\omega 3$ 脂肪酸中的一种或多种或所有的比率在与完整种子或细胞内的比率相比时没有显著改变(例如,不大于10%或5%的改变)。在另一个实施方案中,未将提取的植物油暴露于如氢化或分馏的程序,当与完整种子或细

胞内的比率相比时,所述程序可改变油酸与DPA、棕榈酸与DPA、亚油酸与DPA以及总 $\omega$ 6脂肪酸:总 $\omega$ 3脂肪酸中的一种或多种或所有的比率。本发明的提取的植物油可包含非脂肪酸分子如甾醇。

[0287] 如本文所用的“油”为主要包含脂质并且在室温下为液体的组合物。例如,本发明的油优选包含按重量计至少75%、至少80%、至少85%或至少90%脂质。通常,纯化的油包含按油中的脂质重量计至少90%三酰甘油(TAG)。油的少量组分如二酰甘油(DAG)、游离脂肪酸(FFA)、磷脂和甾醇可如本文所述地存在。

[0288] 如本文所用的术语“脂肪酸”是指通常具有长脂肪族尾部的饱和或不饱和的羧酸(或有机酸)。通常脂肪酸具有至少8个碳原子长度、更优选为至少12个碳长度的碳碳连接链。本发明的优选脂肪酸具有18-22个碳原子(C18、C20、C22脂肪酸)、更优选为20-22个碳原子(C20、C22)以及最优选为22个碳原子(C22)的碳链。大部分天然发生的脂肪酸具有偶数个碳原子,因为其生物合成涉及具有两个碳原子的乙酸酯。脂肪酸可处于游离状态(非酯化)或处于酯化形式如甘油三酯、二酰甘油、单酰甘油、酰基-CoA(硫酯)结合或其它结合形式的部分。脂肪酸可酯化为磷脂,如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇或二磷脂酰甘油形式。在一个实施方案中,脂肪酸与甲基或乙基酯化,例如C20或C22 PUFA的甲酯或乙酯。优选的脂肪酸为EPA、DPA或DHA的甲酯或乙酯或者混合物EPA和DHA或者EPA、DPA和DHA或者EPA和DPA。

[0289] “饱和的脂肪酸”不包含沿着链的任何双键或其它官能团。术语“饱和的”是指氢,即所有碳(除羧酸[-COOH]基之外)包含尽可能多的氢。换言之, $\Omega$ ( $\omega$ )端包含3个氢(CH<sub>3</sub>-)并且链中的每个碳包含2个氢(-CH<sub>2</sub>-)。

[0290] “不饱和脂肪酸”具有饱和脂肪酸的类似形式,除了沿着链存在一个或多个烯烃官能团之外,其中每个烯烃用双键“-CH=CH-”部分(即,与另一个碳双键结合的碳)取代所述链的单键“-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-”部分。链中结合双键的任一端的两个贴近的碳原子出现顺式或反式构型,优选为顺式构型。在一个实施方案中,本发明的脂质或油具有脂肪酸组合物,所述组合物包含少于1%具有反式构型的碳碳双键的脂肪酸(反式脂肪酸)。

[0291] 如本文所用的术语“单元不饱和脂肪酸”是指在其碳链上包含至少12个碳原子并且在所述链中仅包含一个烯基(碳碳双键)的脂肪酸。如本文所用的术语“多元不饱和脂肪酸”或“PUFA”是指在其碳链上包含至少12个碳原子和至少两个烯基(碳碳双键)的脂肪酸。

[0292] 如本文所用的术语“长链多元不饱和脂肪酸”和“LC-PUFA”是指在其碳链上包含至少20个碳原子和至少两个碳碳双键的脂肪酸并因此包括VLC-PUFA。如本文所用的术语“极长链多元不饱和脂肪酸”和“VLC-PUFA”是指在其碳链上包含至少22个碳原子和至少三个碳碳双键的脂肪酸。通常,脂肪酸碳链中的碳原子数目是指未支化的碳链。如果碳链为支化的,则碳原子数目排除侧基中的那些碳原子。在一个实施方案中,长链多元不饱和脂肪酸为 $\omega$ 3脂肪酸,即,在从脂肪酸的甲基端开始的第三个碳碳键具有去饱和作用(碳碳双键)。在另一个实施方案中,长链多元不饱和脂肪酸为 $\omega$ 6脂肪酸,即,在从脂肪酸的甲基端开始的第六个碳碳键具有去饱和作用(碳碳双键)。在另一个实施方案中,长链多元不饱和脂肪酸选自自由以下组成的组:花生四烯酸(ARA, 20:4  $\Delta$  5, 8, 11, 14;  $\omega$  6)、二十碳四烯酸(ETA, 20:4  $\Delta$  8, 11, 14, 17,  $\omega$  3)、二十碳五烯酸(EPA, 20:5  $\Delta$  5, 8, 11, 14, 17;  $\omega$  3)、二十二碳五烯酸

(DPA, 22:5 $\Delta$ 7, 10, 13, 16, 19,  $\omega$ 3) 或者二十二碳六烯酸 (DHA, 22:6 $\Delta$ 4, 7, 10, 13, 16, 19,  $\omega$ 3)。LC-PUFA还可为二高- $\gamma$ -亚油酸 (DGLA) 或二十碳三烯酸 (ETrA, 20:3 $\Delta$ 11, 14, 17,  $\omega$ 3)。显而易见的是, 根据本发明产生的LC-PUFA可为任何或所有以上的混合物并且可包括其它LC-PUFA或任何这些LC-PUFA的衍生物。在一个优选的实施方案中,  $\omega$ 3脂肪酸为至少DPA, 优选为DPA和DHA或者EPA、DPA和DHA。如从植物中提取的, DPA以总脂肪酸组合物的7%与20%之间或7%与35%之间、优选地为20.1%-30%之间或20.1%与35%之间, 优选30%与35%之间的水平存在于脂质或油中。例如, DPA以总脂肪酸组合物的30.1%与35%之间的水平存在。在一个实施方案中, DPA的水平大于EPA的水平。

[0293] 此外, 如本文所用的术语“长链多元不饱和脂肪酸”(LC-PUFA) 和“极长链多元不饱和脂肪酸”(VLC-PUFA) 是指处于游离状态(非酯化的)或处于酯化形式的脂肪酸, 如甘油三酯(三酰甘油)、二酰甘油、单酰甘油、酰基-CoA结合或其它结合形式的部分。在甘油三酯中, LC-PUFA或VLC-PUFA(如DPA)可在sn-1/3或sn-2位置上酯化, 或者甘油三酯可包含选自LC-PUFA和VLC-PUFA酰基的两个或三个酰基。例如, 甘油三酯可在sn-1和sn-3两个位置上包含DPA。脂肪酸可酯化为磷脂, 如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇或二磷脂酰甘油形式。因此, LC-PUFA作为混合物形式存在于细胞的脂质中或从细胞、组织或有机体中提取的纯化油或脂质中。在优选的实施方案中, 本发明提供包含至少75%或至少85%三酰甘油的油, 其中其余部分作为其它形式的脂质(如提及的那些)存在, 其中至少所述三酰甘油包含LC-PUFA。随后, 可例如通过用强碱水解来释放游离脂肪酸或者通过酯基转移作用、分馏等进一步纯化或处理油。

[0294] 如本文所用的, “总 $\omega$ 6脂肪酸”或“总 $\omega$ 6脂肪酸含量”等是指在所提取的脂质、油、重组细胞、植物部分或种子中的酯化和非酯化的所有 $\omega$ 6脂肪酸的总量, 如上下文所确定的, 其表示为占总脂肪酸含量的百分比。这些 $\omega$ 6脂肪酸包括(如果存在的话)LA、GLA、DGLA、ARA、EDA和 $\omega$ 6-DPA, 并且排除任何 $\omega$ 3脂肪酸和单元不饱和脂肪酸。存在于本发明的植物、种子、脂质或油中的 $\omega$ 6脂肪酸全部包括在多元不饱和脂肪酸(PUFA)的类别中。

[0295] 如本文所用的, “新 $\omega$ 6脂肪酸”或“新 $\omega$ 6脂肪酸含量”等是指在所提取的脂质、油、重组细胞、植物部分或种子中的酯化和非酯化的排除LA的所有 $\omega$ 6脂肪酸的总量, 如上下文所确定的, 其表示为占总脂肪酸含量的百分比。这些新 $\omega$ 6脂肪酸为在本发明的细胞、植物、植物部分和种子中通过表达引入到细胞中的遗传构建体(外源性多核苷酸)来产生的脂肪酸, 并且包括(如果存在的话)GLA、DGLA、ARA、EDA和 $\omega$ 6-DPA, 但排除LA和任何 $\omega$ 3脂肪酸以及单元不饱和脂肪酸。示例性总 $\omega$ 6脂肪酸含量和新 $\omega$ 6脂肪酸含量通过将样品中的脂肪酸转化为FAME并通过GC进行分析来确定, 如实施例1所述的。

[0296] 如本文所用的, “总 $\omega$ 3脂肪酸”或“总 $\omega$ 3脂肪酸含量”等是指在所提取的脂质、油、重组细胞、植物部分或种子中的酯化和非酯化的所有 $\omega$ 3脂肪酸的总量, 如上下文所确定的, 其表示为占总脂肪酸含量的百分比。这些 $\omega$ 3脂肪酸包括(如果存在的话)ALA、SDA、ETrA、ETA、EPA、DPA和DHA, 并且排除任何 $\omega$ 6脂肪酸和单元不饱和脂肪酸。存在于本发明的植物、种子、脂质或油中的 $\omega$ 3脂肪酸全部包括在多元不饱和脂肪酸(PUFA)的类别中。

[0297] 如本文所用的, “新 $\omega$ 3脂肪酸”或“新 $\omega$ 3脂肪酸含量”等是指在所提取的脂质、油、重组细胞、植物部分或种子中的酯化和非酯化的排除ALA的所有 $\omega$ 3脂肪酸的总量, 如上下文所确定的, 其表示为占总脂肪酸含量的百分比。这些新 $\omega$ 3脂肪酸为在本发明的细胞、植

物、植物部分和种子中通过表达引入到细胞中的遗传构建体(外源性多核苷酸)来产生的 $\omega$ 3脂肪酸,并且包括(如果存在的话)SDA、ETrA、ETA、EPA、DPA和DHA,但排除ALA和任何 $\omega$ 6脂肪酸以及单元不饱和脂肪酸。示例性总 $\omega$ 3脂肪酸含量和新 $\omega$ 3脂肪酸含量通过将样品中的脂肪酸转化为FAME并通过GC进行分析来确定,如实施例1所述的。

[0298] 如技术人员将了解的,在本发明的方法中作为步骤的术语“获得植物部分”可包括获得用于在所述方法中使用的一种或多种植物部分。获得植物部分包括如使用机械收割机从植物中收获植物部分或者从供应商购买植物部分或者接收植物部分。在另一个实施例中,获得植物部分可为从拥有收获植物部分的一些其他人获取植物。

[0299] 可用于本发明中的去饱和酶、延伸酶和酰基转移酶蛋白以及编码它们的基因为本领域已知的那些中的任一种或者为其同系物或衍生物。此类基因和编码的蛋白质大小的实例在表1中列出。已显示参与LC-PUFA生物合成的去饱和酶全部属于所谓“前端”去饱和酶组。优选的蛋白质或蛋白质的组合为通过在本文中提供为SEQ ID NO:1和2的遗传构建体所编码的那些。

[0300] 如本文所用的,术语“前端去饱和酶”是指在脂质的酰基链的羧基与预先存在的饱和部分之间引入双键的一类酶的成员,其结构性特征在于N-端细胞色素b5结构域连同包含三个高度保守的组氨酸盒的典型脂肪酸去饱和酶结构域的存在(Napier等,1997)。

[0301] 用于本发明的任何延伸酶或去饱和酶的活性可通过在细胞例如像植物细胞中或者优选在体细胞胚或转基因植物中表达编码所述酶的基因并且确定所述细胞、胚或植物与其中不表达酶的可比较性细胞、胚或植物相比是否具有增加的产生LC-PUFA的能力来测试。

[0302] 在一个实施方案中,用于本发明的去饱和酶和/或延伸酶中的一种或多种可从微藻中纯化,即,氨基酸序列与可从微藻中纯化的多肽相同。

[0303] 虽然某些酶在本文中特别描述为“双功能”,但是这个术语的缺乏不一定暗示特定酶不具有除特别定义的活性之外的活性。

[0304] 去饱和酶

[0305] 如本文所用的,术语“去饱和酶”是指能够将碳碳双键引入通常为酯化形式的脂肪酸底物(例如像,酰基-CoA酯)的酰基中的酶。酰基可与磷脂酯化,如磷脂酰胆碱(PC),或者与酰基载体蛋白(ACP)酯化,或者在一个优选的实施方案中,与CoA酯化。因此,去饱和酶通常分为三组。在一个实施方案中,去饱和酶为前端去饱和酶。

[0306] 如本文所用的“ $\Delta$ 4-去饱和酶”是指进行去饱和酶反应的蛋白质,所述反应将碳碳双键引入在从脂肪酸底物的羧基端开始的第4个碳碳键处。“ $\Delta$ 4-去饱和酶”至少能够将DPA转化为DHA。优选地,“ $\Delta$ 4-去饱和酶”能够将DPA-CoA转化为DHA-CoA,即,它为酰基-CoA去饱和酶。在一个实施方案中,“ $\Delta$ 4-去饱和酶”能够将在PC的sn-2位置处酯化的DPA转化为DHA-PC。优选地, $\Delta$ 4-去饱和酶对DPA-CoA具有比对DPA-PC更大的活性。从DPA产生DHA的去饱和步骤通过除哺乳动物之外的有机体中的 $\Delta$ 4-去饱和酶催化,并且编码此酶的基因已从淡水原生生物物种眼虫藻和海洋物种壶菌属物种中分离(Qiu等,2001;Meyer等,2003)。在一个实施方案中, $\Delta$ 4-去饱和酶包含盐生巴夫藻 $\Delta$ 4-去饱和酶或壶菌属物种 $\Delta$ 4-去饱和酶、其生物活性片段或者与盐生巴夫藻 $\Delta$ 4-去饱和酶至少80%相同的氨基酸序列的氨基酸。

[0307] 表1. 涉及LC-PUFA生物合成的克隆基因

[0308]

酶	有机体类型	物种	登记号	蛋白质大小 (aa's)	参考文献
Δ4-去饱和酶	原生生物	眼虫藻( <i>Euglena gracilis</i> )	AY278558	541	Meyer 等, 2003
	藻类	路氏巴夫藻( <i>Pavlova lutherii</i> )	AY332747	445	Tonon 等, 2003
		球等鞭金藻	AAV33631	433	Pereira 等, 2004b
		盐生巴夫藻	AAV15136	447	Zhou 等, 2007
	破囊壶菌属	金黄色破囊壶菌 ( <i>Thraustochytrium aureum</i> )	AAN75707 AAN75708 AAN75709 AAN75710	515	不适用
		壶菌属物种 ATCC21685	AAM09688	519	Qiu 等, 2001
Δ5-去饱和酶	哺乳动物	智人	AF199596	444	Cho 等, 1999b Leonard 等, 2000b
	线虫类	秀丽隐杆线虫( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	AF11440, NM_069350	447	Michaelson 等, 1998b; Watts 和 Browse, 1999b
	真菌	高山被孢霉	AF067654	446	Michaelson 等, 1998a; Knutzon 等, 1998
		畸雌腐霉	AF419297	456	Hong 等, 2002a
		盘基网柄菌( <i>Dictyostelium discoideum</i> )	AB022097	467	Saito 等, 2000
		异枝水霉		470	WO02081668
	硅藻	三角褐指藻	AY082392	469	Domergue 等, 2002
	藻类	壶菌属物种	AF489588	439	Qiu 等, 2001
		金黄色破囊壶菌		439	WO02081668
		球等鞭金藻		442	WO02081668
	苔藓	地钱( <i>Marchantia polymorpha</i> )	AY583465	484	Kajikawa 等, 2004

[0309]

酶	有机体类型	物种	登记号	蛋白质大小 (aa's)	参考文献
Δ6-去饱和酶	哺乳动物	智人	NM_013402	444	Cho 等, 1999a; Leonard 等, 2000
		小家鼠( <i>Mus musculus</i> )	NM_019699	444	Cho 等, 1999a
	线虫类	秀丽隐杆线虫	Z70271	443	Napier 等, 1998
	植物	琉璃苣( <i>Borago officinales</i> )	U79010	448	Sayanova 等, 1997
		蓝蓟属( <i>Echium</i> )	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto 等, 2002
		高穗报春( <i>Primula vialii</i> )	AY234127	453	Sayanova 等, 2003
		<i>Anemone leveillei</i>	AF536525	446	Whitney 等, 2003
	苔藓	角齿藓( <i>Ceratodon purpureus</i> )	AJ250735	520	Sperling 等, 2000
		地钱	AY583463	481	Kajikawa 等, 2004
		小立碗藓( <i>Physcomitrella patens</i> )	CAA11033	525	Girke 等, 1998
	真菌	高山被孢霉	AF110510 AB020032	457	Huang 等, 1999; Sakuradani 等, 1999
		畸雌腐霉	AF419296	459	Hong 等, 2002a
		卷枝毛霉( <i>Mucor circinelloides</i> )	AB052086	467	NCBI*
		根霉属物种	AY320288	458	Zhang 等, 2004
		异枝水霉		453	WO02081668
	硅藻	三角褐指藻	AY082393	477	Domergue 等, 2002
	细菌	集胞藻属( <i>Synechocystis</i> )	L11421	359	Reddy 等, 1993
	藻类	金黄色破囊壶菌		456	WO02081668
双功能 Δ5/Δ6-去饱和酶	鱼	斑马鱼( <i>Danio rerio</i> )	AF309556	444	Hastings 等, 2001
C20 Δ8-去饱和酶	藻类	眼虫藻	AF139720	419	Wallis 和 Browse, 1999

[0310]

和酶					
	植物	琉璃苣	AAG43277	446	Sperling 等, 2001



[0311]

酶	有机体类型	物种	登记号	蛋白质大小 (aa's)	参考文献
Δ6-延伸酶	线虫类	秀丽隐杆线虫	NM_069288	288	Beaudoin 等, 2000
	苔藓	小立碗藓	AF428243	290	Zank 等, 2002
		地钱	AY583464	290	Kajikawa 等, 2004
	真菌	高山被孢霉	AF206662	318	Parker-Barnes 等, 2000
	藻类	路氏巴夫藻( <i>Pavlova lutheri</i> )**		501	WO 03078639
		壶菌属	AX951565	271	WO 03093482
PUFA-延伸酶		壶菌属物种**	AX214454	271	WO 0159128
	哺乳动物	智人	AF231981	299	Leonard 等, 2000b ; Leonard 等, 2002
		褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	AB071985	299	Inagaki 等, 2002
		褐家鼠**	AB071986	267	Inagaki 等, 2002
		小家鼠	AF170907	279	Tvrđik 等, 2000
		小家鼠	AF170908	292	Tvrđik 等, 2000
	鱼	斑马鱼	AF532782	291 (282)	Agaba 等, 2004。
		斑马鱼**	NM_199532	266	Lo 等, 2003
	蠕虫	秀丽隐杆线虫	Z68749	309	Abbott 等, 1998 Beaudoin 等, 2000
	藻类	金黄色破囊壶菌**	AX464802	272	WO 0208401-A2
		路氏巴夫藻**		320	WO 03078639
	藻类	球等鞭金藻	AF390174	263	Qi 等, 2002
Δ9-延伸酶		眼虫藻		258	WO 08/128241

[0312]

Δ5-延伸酶	藻类	海洋微藻	AAV67798	300	Meyer 等, 2004
		心形塔胞藻		268	WO 2010/057246
		巴夫藻物种 <i>CCMP459</i>	AAV33630	277	Pereira 等, 2004b
		盐生巴夫藻	AAV15135	302	Robert 等, 2009
	硅藻	假微型海链藻	AAV67800	358	Meyer 等, 2004
	鱼	虹鳟( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	CAM55862	295	WO 06/008099
	苔藓	地钱	BAE71129	348	Kajikawa 等, 2006

[0313] \*<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>\*\*功能未得到证实/未得到证明

[0314] 如本文所用的“Δ5-去饱和酶”是指进行去饱和酶反应的蛋白质,所述反应将碳碳双键引入在从脂肪酸底物的羧基端开始的第5个碳碳键处。在一个实施方案中,脂肪酸底物为ETA并且酶产生EPA。优选地,“Δ5-去饱和酶”能够将ETA-CoA转化为EPA-CoA,即,它为酰基-CoA去饱和酶。在一个实施方案中,“Δ5-去饱和酶”能够将在PC的sn-2位置处酯化的ETA转化。优选地,Δ5-去饱和酶对ETA-CoA具有比对ETA-PC更大的活性。Δ5-去饱和酶的实例在Ruiz-Lopez等(2012)和Petrie等(2010a)以及本文的表1中列出。在一个实施方案中,Δ5-去饱和酶包含具有如SEQ ID NO:24所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:24至少80%相同的氨基酸序列的氨基酸。在另一个实施方案中,Δ5-去饱和酶包含具有如SEQ ID NO:26所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:26至少53%相同的氨基酸序列的氨基酸。在另一个实施方案中,Δ5-去饱和酶来自壶菌属物种或者赫氏圆石藻。

[0315] 如本文所用的“Δ6-去饱和酶”是指进行去饱和酶反应的蛋白质,所述反应将碳碳双键引入在从脂肪酸底物的羧基端开始的第6个碳碳键处。在一个实施方案中,脂肪酸底物为ALA并且所述酶产生SDA。优选地,“Δ6-去饱和酶”能够将ALA-CoA转化为SDA-CoA,即,它为酰基-CoA去饱和酶。在一个实施方案中,“Δ6-去饱和酶”能够将在PC的sn-2位置处酯化的ALA转化。优选地,Δ6-去饱和酶对ALA-CoA具有比对ALA-PC更大的活性。所述Δ6-去饱和酶还可具有作为Δ5-去饱和酶的活性,被称为Δ5/Δ6双功能去饱和酶,只要它对ALA的Δ6-去饱和酶活性比对ETA的Δ5-去饱和酶活性更大。Δ6-去饱和酶的实例在Ruiz-Lopez等

(2012)和Petrie等(2010a)以及本文的表1中列出。优选的 $\Delta 6$ -去饱和酶来自细小微胞藻、畸雌腐霉或海洋微藻。

[0316] 在一个实施方案中, $\Delta 6$ 去饱和酶另外的特征在于,具有以下中至少两种,优选所有三种并且优选在植物细胞中:i)对作为脂肪酸底物的 $\alpha$ -亚麻酸(ALA,18:3 $\Delta 9$ 、12、15, $\omega 3$ )比对亚油酸(LA,18:2 $\Delta 9$ 、12, $\omega 6$ )更大的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性;ii)对作为脂肪酸底物的ALA-CoA比对作为脂肪酸底物的连接至PC的sn-2位置的ALA更大的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性;以及iii)对ETrA的 $\Delta 8$ -去饱和酶活性。此类 $\Delta 6$ -去饱和酶的实例提供于表2中。

[0317] 在一个实施方案中, $\Delta 6$ 去饱和酶对 $\omega 3$ 底物具有比对应 $\omega 6$ 底物更大的活性,并且具有对ALA的活性,以便以至少30%、更优选为至少40%或最优选地至少50%(当在重组细胞如植物细胞中由外源性多核苷酸表达时)或者至少35%(当在酵母细胞中表达时)的效率产生十八碳四烯酸(十八碳四烯酸,SDA,18:4 $\Delta 6$ 、9、12、15, $\omega 3$ )。在一个实施方案中, $\Delta 6$ -去饱和酶对作为脂肪酸底物的ALA具有比对LA更大的活性,例如至少约2倍大的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性。在另一个实施方案, $\Delta 6$ -去饱和酶对作为脂肪酸底物的ALA-CoA具有比对作为脂肪酸底物的连接到PC的sn-2位置的ALA更大的活性,例如大至少约5倍的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性或者大至少10倍的活性。在另一个实施方案中, $\Delta 6$ -去饱和酶具有对脂肪酸底物ALA-CoA和对连接至PC的sn-2位置的ALA二者的活性。

[0318] 表2.证明具有对酰基-CoA底物的活性的去饱和酶

	酶	有机体 类型	物种	登记号	蛋白质 大小 (aa's)	参考文献
[0319]	$\Delta 6$ -去 饱和酶	藻类	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30479	449	Hoffmann 等, 2008
		海洋微藻		AAW70159	456	Domergue 等, 2005

[0320]			细小微胞藻	EEH58637		Petrie 等, 2010a (SEQ ID NO:7)
	Δ5-去饱和酶	藻类	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30478	482	Hoffmann 等, 2008
		植物	<i>Anemone leveillei</i>	不适用		Sayanova 等, 2007
	ω3-去饱和酶	真菌	瓜果腐霉 ( <i>Pythium aphanidermatum</i> )	FW362186.1	359	Xue 等, 2012; WO2008/054565
		真菌(卵菌纲)	大豆疫霉 ( <i>Phytophthora sojae</i> )	FW362214.1	363	Xue 等, 2012; WO2008/054565
		真菌(卵菌纲)	猝死病菌 ( <i>Phytophthora ramorum</i> )	FW362213.1	361	Xue 等, 2012; WO2008/054565

[0321] 在一个实施方案中,  $\Delta 6$ -去饱和酶对ETA没有可检测的  $\Delta 5$ -去饱和酶活性。在另一个实施方案中,  $\Delta 6$ -去饱和酶包含具有如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14所提供的序列、其生物活性片段或与SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14至少77%相同的氨基酸序列的氨基酸。在另一个实施方案中,  $\Delta 6$ -去饱和酶包含具有如SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14所提供的序列、其生物活性片段或与SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14之一或二者至少67%相同的氨基酸序列的氨基酸。所述  $\Delta 6$ -去饱和酶还可具有  $\Delta 8$ -去饱和酶活性。

[0322] 如本文所用的“ $\Delta 8$ -去饱和酶”是指进行去饱和酶反应的蛋白质,所述反应将碳碳双键引入在从脂肪酸底物的羧基端开始的第8个碳碳键处。 $\Delta 8$ -去饱和酶至少能够将ETrA转化为ETA。优选地,“ $\Delta 8$ -去饱和酶”能够将ETrA-CoA转化为ETA-CoA,即,它为酰基-CoA去饱和酶。在一个实施方案中,“ $\Delta 8$ -去饱和酶”能够将在PC的sn-2位置处酯化的ETrA转化。优选地,  $\Delta 8$ -去饱和酶对ETrA-CoA具有比对ETrA-PC更大的活性。所述  $\Delta 8$ -去饱和酶还可具有作为  $\Delta 6$ -去饱和酶的活性,称为  $\Delta 6/\Delta 8$  双功能去饱和酶,只要它对ETrA的  $\Delta 8$ -去饱和酶活性比对ALA的  $\Delta 6$ -去饱和酶活性更大。 $\Delta 8$ -去饱和酶的实例在表1中列出。在一个实施方案中,  $\Delta 8$ -去饱和酶包含具有如SEQ ID NO:42所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:42至少80%相同的氨基酸序列的氨基酸。

[0323] 如本文所用的“ $\omega 3$ -去饱和酶”是指进行去饱和酶反应的蛋白质,所述反应将碳碳双键引入在从脂肪酸底物的甲基端开始的第3个碳碳键处。因此,  $\omega 3$ -去饱和酶可将LA转化为ALA并且将GLA转化为SDA(所有C18脂肪酸)或者将DGLA转化为ETA和/或将ARA转化为EPA(C20脂肪酸)。一些  $\omega 3$ -去饱和酶(第I组)仅具有对C18底物的活性,如植物和蓝藻  $\omega 3$ -去饱和酶。此类  $\omega 3$ -去饱和酶也为  $\Delta 15$ -去饱和酶。其它  $\omega 3$ -去饱和酶具有对C20底物的活性而

没有对C18底物的活性(第II组)或具有对C18底物的一些活性(第III组)。此类 $\omega$ 3-去饱和酶也为 $\Delta$ 17-去饱和酶。优选的 $\omega$ 3-去饱和酶为将LA转化为ALA、将GLA转化为SDA、将DGLA转化为ETA并且将ARA转化为EPA的第III组类型,如毕赤酵母 $\omega$ 3-去饱和酶(SEQ ID NO:6)。 $\omega$ 3-去饱和酶的实例包括通过Pereira等(2004a)(异枝水霉 $\omega$ 3-去饱和酶,第II组)、Horiguchi等(1998)、Berberich等(1998)以及Spychalla等(1997)(秀丽隐杆线虫 $\omega$ 3-去饱和酶,第III组)所述的那些。在一个优选的实施方案中, $\omega$ 3-去饱和酶为真菌 $\omega$ 3-去饱和酶。如本文所用的,“真菌 $\omega$ 3-去饱和酶”是指来自真菌来源(包括卵菌纲来源)的 $\omega$ 3-去饱和酶或氨基酸序列与其至少95%相同的变体。编码多种 $\omega$ 3-去饱和酶的基因已从真菌来源中分离,例如像致病疫霉(登记号CAJ30870,W02005083053)、异枝水霉(登记号AAR20444,Pereira等,2004a以及美国专利号7211656)、畸雌腐霉(W02008022963,第II组)、高山被孢霉(Sakuradani等,2005;登记号BAD91495;W02006019192)、假微型海链藻(Armbrust等,2004;登记号XP\_002291057;W02005012316)、芽殖酵母(也称为克鲁弗酵母(*Saccharomyces kluyveri*);Oura等,2004;登记号AB118663)。Xue等(2012)描述能够有效地将 $\omega$ 6脂肪酸底物转化为对应 $\omega$ 3脂肪酸(优选对于C20底物)的来自卵菌纲瓜果腐霉、大豆疫霉和猝死病菌的 $\omega$ 3-去饱和酶,即它们具有比 $\Delta$ 15-去饱和酶活性更强的 $\Delta$ 17-去饱和酶活性。这些酶缺乏 $\Delta$ 12-去饱和酶活性,但是可使用酰基-CoA和磷脂部分二者中的脂肪酸作为底物。

[0324] 在一个更优选的实施方案中,真菌 $\omega$ 3-去饱和酶为毕赤酵母(也称为*Komagataella pastoris*) $\omega$ 3-去饱和酶/ $\Delta$ 15-去饱和酶(Zhang等,2008;登记号EF116884;SEQ ID NO:6)或与其至少95%相同的多肽。

[0325] 在一个实施方案中, $\omega$ 3-去饱和酶至少能够转化以下之一:ARA至EPA、DGLA至ETA、GLA至SDA、ARA至EPA和DGLA至ETA二者、ARA至EPA和GLA至SDA二者或者所有这三种。

[0326] 在一个实施方案中, $\omega$ 3-去饱和酶对具有至少三个碳碳双键的C20脂肪酸(优选ARA)具有 $\Delta$ 17去饱和酶活性。在另一个实施方案中, $\omega$ 3-去饱和酶对具有三个碳碳双键的C18脂肪酸(优选为GLA)具有 $\Delta$ 15-去饱和酶活性。优选地为,两种活性均存在。

[0327] 如本文所用的“ $\Delta$ 12-去饱和酶”是指进行去饱和酶反应的蛋白质,所述反应将碳碳双键引入在从脂肪酸底物的羧基端开始的第12个碳碳键处。 $\Delta$ 12-去饱和酶通常将油酰基-磷脂酰胆碱或油酰基-CoA分别转化为亚油酰基-磷脂酰胆碱(18:1-PC)或亚油酰基-CoA(18:1-CoA)。使用PC连接的底物的子类被称为磷脂依赖性 $\Delta$ 12-去饱和酶,后一种子类被称为酰基-CoA依赖性 $\Delta$ 12-去饱和酶。植物和真菌 $\Delta$ 12-去饱和酶通常属于前一种子类,而动物 $\Delta$ 12-去饱和酶属于后一种子类,例如,通过Zhou等(2008)所述的由从昆虫克隆的基因编码的 $\Delta$ 12-去饱和酶。很多其它 $\Delta$ 12-去饱和酶序列可容易通过检索序列数据库来确定。

[0328] 如本文所用的“ $\Delta$ 15-去饱和酶”是指进行去饱和酶反应的蛋白质,所述反应将碳碳双键引入在从脂肪酸底物的羧基端开始的第15个碳碳键处。编码 $\Delta$ 15-去饱和酶的多种基因已从植物和真菌物种中克隆。例如,US5952544描述编码植物 $\Delta$ 15-去饱和酶(FAD3)的核酸。这些酶包含特征为植物 $\Delta$ 15-去饱和酶的氨基酸基元。W0200114538描述编码大豆FAD3的基因。很多其它 $\Delta$ 15-去饱和酶序列可容易通过检索序列数据库来确定。

[0329] 如本文所用的“ $\Delta$ 17-去饱和酶”是指进行去饱和酶反应的蛋白质,所述反应将碳碳双键引入在从脂肪酸底物的羧基端开始的第17个碳碳键处。如果 $\Delta$ 17-去饱和酶作用于C20底物以在 $\omega$ 3键处引入去饱和作用,则它也被视为 $\omega$ 3-去饱和酶。

[0330] 在一个优选的实施方案中,  $\Delta 12$ -去饱和酶和/或  $\Delta 15$ -去饱和酶为真菌  $\Delta 12$ -去饱和酶或真菌  $\Delta 15$ -去饱和酶。如本文所用的,“真菌  $\Delta 12$ -去饱和酶”或“真菌  $\Delta 15$ -去饱和酶”是指来自真菌来源(包括卵菌纲来源)的  $\Delta 12$ -去饱和酶或  $\Delta 15$ -去饱和酶、或氨基酸序列与其至少95%相同的变体。编码多种去饱和酶的基因已从真菌来源中分离。US 7211656描述来自异枝水霉的  $\Delta 12$ 去饱和酶。W02009016202描述来自 *Helobdella robusta*、二色蜡蘑(*Laccaria bicolor*)、霸王莲花青螺(*Lottia gigantea*)、原型微鞘藻(*Microcoleus chthonoplastes*)、领鞭毛虫(*Monosiga brevicollis*)、黑条叶斑病菌(*Mycosphaerella fijiensis*)、禾生球腔菌(*Mycosphaerella graminicola*)、*Naegleria gruberi*、鞭毛藻丛赤壳菌(*Nectria haematococca*)、*Nematostella vectensis*、布拉克须霉(*Phycomyces blakesleeanus*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、小立碗藓、绵腐卧孔菌(*Postia placenta*)、江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)以及雪霉微座孢(*Microdochium nivale*)的真菌去饱和酶。W02005/012316描述来自假微型海链藻和其它真菌的  $\Delta 12$ -去饱和酶。W02003/099216描述编码从粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)以及高山被孢霉中分离的真菌  $\Delta 12$ -去饱和酶和  $\Delta 15$ -去饱和酶的基因。W02007133425描述从以下各项中分离的真菌  $\Delta 15$ 去饱和酶:克鲁弗酵母、高山被孢霉、构巢曲霉、粗糙脉孢菌、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)以及稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)。优选的  $\Delta 12$ 去饱和酶来自大豆疫霉(Ruiz-Lopez等,2012)。

[0331] 真菌  $\Delta 12$ -去饱和酶和真菌  $\Delta 15$ -去饱和酶的不同子类为双功能真菌  $\Delta 12/\Delta 15$ -去饱和酶。编码这些的基因已从串珠镰孢菌(登记号DQ272516,Damude等,2006)、卡氏棘阿米巴(登记号EF017656,Sayanova等,2006)、海洋派琴虫(*Perkinsus marinus*) (W02007042510)、麦角菌(*Claviceps purpurea*) (登记号EF536898,Meesapyodsuk等,2007)以及灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*) (登记号AF269266,Zhang等,2007)中克隆。

[0332] 在另一个实施方案中,  $\omega 3$ -去饱和酶具有对酰基-CoA底物的至少一些活性,优选为比对应酰基-PC底物更大的活性。如本文所用的,“对应酰基-PC底物”是指在磷脂酰胆碱(PC)的sn-2位置酯化的脂肪酸,其中所述脂肪酸为与酰基-CoA底物中相同的脂肪酸。例如,酰基-CoA底物可为ARA-CoA并且对应酰基-PC底物为sn-2ARA-PC。在一个实施方案中,所述活性为大至少两倍的。优选地,  $\omega 3$ -去饱和酶具有对酰基-CoA底物和其对应酰基-PC底物二者的至少一些活性并且具有对C18和C20底物二者的活性。在以上列出的克隆的真菌去饱和酶中已知此类  $\omega 3$ -去饱和酶的实例。

[0333] 在另一个实施方案中,  $\omega 3$ -去饱和酶包含具有如SEQ ID NO:6所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:6至少60%相同、优选与SEQ ID NO:6至少90%或至少95%相同的氨基酸序列的氨基酸。

[0334] 在另一个实施方案中,用于本发明的去饱和酶对酰基-CoA底物具有比对应酰基-PC底物更大的活性。在另一个实施方案中,用于本发明的去饱和酶对酰基-PC底物具有比对应酰基-CoA底物更大的活性,但是对两种底物均具有一些活性。如以上所列出的,“对应酰基-PC底物”是指在磷脂酰胆碱(PC)的sn-2位置酯化的脂肪酸,其中所述脂肪酸为与酰基-CoA底物中相同的脂肪酸。在一个实施方案中,所述更大活性为大至少两倍的。在一个实施方案中,去饱和酶为  $\Delta 5$ 或  $\Delta 6$ -去饱和酶或者  $\omega 3$ -去饱和酶,它们的实例被提供为但

是不限于表2所列出的那些。为了测试去饱和酶作用于何种底物,即酰基-CoA或酰基-PC底物,可在酵母细胞中进行测定,如Domergue等(2003)和(2005)所述的。当延伸酶(在与去饱和酶一起表达时)在植物细胞内具有至少约90%的酶促转化效率(其中所述延伸酶催化去饱和酶产物的延伸)时,也可推断去饱和酶的酰基-CoA底物容量。在此基础上,由GA7构建体表达的 $\Delta 5$ -去饱和酶和 $\Delta 4$ -去饱和酶(实施例2和3)和其变体(实施例5)能够将其对应酰基-CoA底物ETA-CoA和DPA-CoA去饱和。

#### [0335] 延伸酶

[0336] 生物化学证据表明脂肪酸延伸由4个步骤组成:缩合、还原、脱水以及第二次还原。在本发明的背景下,“延伸酶”是指在延伸复合物的其它成员存在下在适合的生理学条件下对缩合步骤进行催化的多肽。已显示对于对应酰基链的延伸仅需要延伸蛋白复合物的缩合组分(“延伸酶”)在细胞中的异源或同源表达。因此,引入的延伸酶能够从转基因宿主中成功地恢复还原和脱水活性,以进行成功的酰基延伸。关于脂肪酸底物的链长度和去饱和度的延伸反应特异性被认为驻留于缩合组分中。此组分也被认为在延伸反应中是速率限制的。

[0337] 如本文所用的,“ $\Delta 5$ -延伸酶”至少能够将EPA转化为DPA。 $\Delta 5$ -延伸酶的实例包括W02005/103253中所公开的那些。在一个实施方案中, $\Delta 5$ -延伸酶具有对EPA的活性,以便以至少60%、更优选至少65%、更优选至少70%或最优选至少80%或90%的效率产生DPA。在另一个实施方案中, $\Delta 5$ -延伸酶包含如SEQ ID NO:31所提供的氨基酸序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:31至少47%相同的氨基酸序列。在另一个实施方案中, $\Delta 6$ -延伸酶是来自海洋微藻或绿色鞭毛藻(US2010/088776)。

[0338] 如本文所用的,“ $\Delta 6$ -延伸酶”至少能够将SDA转化为ETA。 $\Delta 6$ -延伸酶的实例包括表1中所列出的那些。在一个实施方案中,所述延伸酶包含具有如SEQ ID NO:19所提供的序列、其生物活性片段(如提供为SEQ ID NO:20的片段)或者与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20之一或二者至少55%相同的氨基酸序列的氨基酸。在一个实施方案中, $\Delta 6$ -延伸酶是来自小立碗藓(Zank等,2002;登记号AF428243)或假微型海链藻(Ruiz-Lopez等,2012)。

[0339] 如本文所用的,“ $\Delta 9$ -延伸酶”至少能够将ALA转化为ETra。 $\Delta 9$ -延伸酶的实例包括表1中所列出的那些。在一个实施方案中, $\Delta 9$ -延伸酶包含具有如SEQ ID NO:33所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:33至少80%相同的氨基酸序列的氨基酸。在另一个实施方案中, $\Delta 9$ -延伸酶包含具有如SEQ ID NO:36所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:36至少81%相同的氨基酸序列的氨基酸。在另一个实施方案中, $\Delta 9$ -延伸酶包含具有如SEQ ID NO:38所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:38至少50%相同的氨基酸序列的氨基酸。在另一个实施方案中, $\Delta 9$ -延伸酶包含具有如SEQ ID NO:40所提供的序列、其生物活性片段或者与SEQ ID NO:40至少50%相同的氨基酸序列的氨基酸。在另一个实施方案中, $\Delta 9$ -延伸酶对 $\omega 6$ 底物具有比对应 $\omega 3$ 底物更大的活性或者相反的。

[0340] 如本文所用的,术语“对 $\omega 6$ 底物具有比对应 $\omega 3$ 底物更大的活性”是指在 $\omega 3$ 去饱和酶作用下酶对不同的底物的相对活性。优选地, $\omega 6$ 底物为LA并且 $\omega 3$ 底物为ALA。

[0341] 具有 $\Delta 6$ -延伸酶和 $\Delta 9$ -延伸酶活性的延伸酶至少能够(i)将SDA转化为ETA并且(ii)将ALA转化为ETra并且具有比 $\Delta 9$ -延伸酶活性更大的 $\Delta 6$ -延伸酶活性。在一个实施方案中,所述延伸酶对SDA具有至少50%、更优选至少60%的转化效率以产生ETA和/或对ALA

具有至少6%或更优选至少9%的转化效率以产生ETrA。在另一个实施方案中,所述延伸酶具有比 $\Delta 9$ -延伸酶活性大至少约6.5倍的 $\Delta 6$ -延伸酶活性。在另一个实施方案中,所述延伸酶没有可检测的 $\Delta 5$ -延伸酶活性

[0342] 其它酶

[0343] 如本文所用的,术语“1-酰基-甘油-3-磷酸酰基转移酶”(LPAAT),也称为溶血磷脂酸-酰基转移酶或者酰基CoA-溶血磷脂酸酯-酰基转移酶,它是指在sn-2位置上使sn-1-酰基-甘油-3-磷酸酯(sn-1 G-3-P)酰化以形成磷脂酸(PA)的蛋白质。因此,术语“1-酰基-甘油-3-磷酸酰基转移酶活性”是指(sn-1 G-3-P)在sn-2位置上的酰化以产生PA(EC 2.3.1.51)。

[0344] 引入重组细胞、转基因植物或其部分中的转基因也可编码DGAT。如本文所用的,术语“二酰甘油酰基转移酶”(EC 2.3.1.20; DGAT)是指将脂肪酰基从酰基-CoA转移至二酰甘油底物,以产生三酰甘油的蛋白质。因此,“二酰甘油酰基转移酶活性”是指酰基-CoA转移至二酰甘油以产生三酰甘油。存在三种已知类型的DGAT,分别称为DGAT1、DGAT2和DGAT3。DGAT1多肽通常具有10个跨膜域,DGAT2通常具有2个跨膜域,而DGAT3通常为可溶的。DGAT1多肽的实例包括由来自烟曲霉菌(*Aspergillus fumigates*) (登记号XP\_755172)、拟南芥(CAB44774)、蓖麻(AAR11479)、油桐(ABC94472)、*Vernonia galamensis* (ABV21945, ABV21946)、卫矛(*Euonymus alatus*) (AAV31083)、秀丽隐杆线虫(AAF82410)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*) (NP\_445889)、智人(NP\_036211)的DGAT1基因编码的多肽以及其变体和/或突变体。DGAT2多肽的实例包括由来自拟南芥(登记号NP\_566952)、蓖麻(AAY16324)、油桐(ABC94474)、拉曼被孢霉(*Mortierella ramanniana*) (AAK84179)、智人(Q96PD7、Q58HT5)、牛(*Bos taurus*) (Q70VD8)、小家鼠(AAK84175)、微单胞菌属CCMP1545的DGAT2基因编码的多肽以及其变体和/或突变体。DGAT3多肽的实例包括由来自花生(落花生(*Arachis hypogaea*), Saha等,2006)的DGAT3基因编码的多肽以及其变体和/或突变体。

[0345] 多肽/肽

[0346] 在多肽背景下的术语“重组”是指在与天然状态(如果天然地产生)相比以改变的量或改变的速率由细胞产生或在无细胞表达系统中产生时的多肽。在一个实施方案中,所述细胞为不天然产生所述多肽的细胞。然而,所述细胞可为包含引起改变的量的多肽产生的非内源性基因的细胞。本发明的重组多肽包括在细胞、组织、器官或有机体或无细胞表达系统中的多肽,其中产生所述多肽,即未从其中产生它的转基因(重组)细胞的其它组分中纯化或与其分离的多肽或者在此类细胞或无细胞系统中产生的随后从至少一些其它组分中纯化的多肽。

[0347] 术语“多肽”和“蛋白质”通常互换使用。

[0348] 多肽或多肽类别可通过其氨基酸序列与参考氨基酸序列的相同程度(%同一性)或者通过与一种参考氨基酸序列具有比与另一种序列更大的%同一性来定义。多肽与参考氨基酸序列的%同一性通常通过使用空位创建罚分=5和空位延伸罚分=0.3的参数进行GAP分析(Needleman和Wunsch,1970;GCG程序)来确定。查询序列的长度为至少15个氨基酸,并且GAP分析在至少15个氨基酸的区域上比对两个序列。更优选地,查询序列的长度为至少50个氨基酸,并且GAP分析在至少50个氨基酸的区域上比对两个序列。更优选地,查询序列的长度为至少100个氨基酸并且GAP分析在至少100个氨基酸的区域上比对两个序列。甚至

更优选地,查询序列的长度为至少250个氨基酸,并且GAP分析在至少250个氨基酸的区域上比对两个序列。甚至更优选地,GAP分析在其整个长度上比对两个序列。多肽或多肽类别可具有与参考多肽相同的酶活性或与其不同的活性或缺乏参考多肽的活性。优选地,所述多肽的酶活性为参考多肽活性的至少10%、至少50%、至少75%或至少90%。

[0349] 如本文所用的,“生物活性”片段为本文所定义的多肽的一部分,其保持全长参考多肽的定义的活性,例如具有去饱和酶和/或延伸酶活性或其它酶活性。如本文所用的生物活性片段排除全长多肽。生物活性片段可为任何大小的部分,只要它们保持所定义的活性。优选地,生物活性片段保持全长蛋白质活性的至少10%、至少50%、至少75%或至少90%。

[0350] 关于定义的多肽或酶,将了解的是,高于本文所提供的那些的%同一性数字将涵盖优选的实施方案。因此,在适用的情况下,鉴于最小%同一性数字,优选的是,多肽/酶包含与相关指定的SEQ ID NO至少60%、更优选至少65%、更优选至少70%、更优选至少75%、更优选至少76%、更优选至少80%、更优选至少85%、更优选至少90%、更优选至少91%、更优选至少92%、更优选至少93%、更优选至少94%、更优选至少95%、更优选至少96%、更优选至少97%、更优选至少98%、更优选至少99%、更优选至少99.1%、更优选至少99.2%、更优选至少99.3%、更优选至少99.4%、更优选至少99.5%、更优选至少99.6%、更优选至少99.7%、更优选至少99.8%以及甚至更优选至少99.9%相同的氨基酸序列。

[0351] 本文所定义的多肽的氨基酸序列变体/突变体可通过将适当核苷酸改变引入本文所定义的核酸中或者通过体外合成所需的多肽来制备。此类变体/突变体在氨基酸序列内包含例如残基的缺失、插入或取代。可做出缺失、插入和取代的组合以获得最终的构建体,只要最终的肽产物具有所需的酶活性。

[0352] 突变的(改变的)肽可使用本领域已知的任何技术进行制备。例如,本文所定义的多核苷酸可经过体外诱变或DNA改组技术,如Harayama (1998) 广泛描述的。源于突变/改变的DNA的产物可容易使用本文所述的技术进行筛选,以便确定它们是否具有例如去饱和酶或延伸酶活性。

[0353] 在设计氨基酸序列突变体时,突变位点的位置和突变的性质将取决于待改变的一个或多个特征。突变的位点可例如通过(1) 首先用保守氨基酸选择取代并且然后用更多基团选择取代(这取决于所实现的结果)、(2) 缺失目标残基或者(3) 与所定位的位点相邻地插入其它残基来单独或连续地改变。

[0354] 氨基酸序列缺失的范围通常为约1至15个残基,更优选为约1至10个残基并且通常为约1至5个连续的残基。

[0355] 取代突变体在多肽分子中去除至少一个氨基酸残基和在其位置中插入不同残基。对于取代诱变的最感兴趣的位点包括在天然发生的去饱和酶或延伸酶中为非保守性的位点。这些位点优选以相对保守的方式取代,以便保持酶活性。此类保守性取代在“示例性取代”的标题下的表3中示出。

[0356] 在一个优选的实施方案中,当与天然发生的多肽相比时,突变体/变体多肽仅具有或具有不超过一个或两个或三个或四个保守性氨基酸改变。保守性氨基酸改变的详情提供于表3中。如技术人员将意识到的是,可合理地预测此类小的改变当在重组细胞中表达时不会改变多肽的活性。

[0357] 多肽可以多种方式产生,包括根据本领域已知的方法产生和回收天然多肽或重组



多肽。在一个实施方案中,重组多肽通过在有效产生多肽的条件下培养能够表达多肽的细胞(如本文所定义的宿主细胞)来产生。产生多肽的更优选的细胞为植物中的细胞,特别是植物的种子中的细胞。

[0358] 表3. 示例性取代。

[0359]

原始 残基	示例性 取代
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

[0360] 多核苷酸

[0361] 本发明还提供可为例如基因、分离的多核苷酸、嵌合遗传构建体如T-DNA分子或嵌合DNA的多核苷酸的用途。它可为双链或单链的基因组或合成来源的DNA或RNA,并且可与碳水化合物、脂质、蛋白质或其它材料组合以执行本文所定义的特定活性。术语“多核苷酸”在本文中可与术语“核酸分子”互换使用。“分离的多核苷酸”一词,意指(如果从天然来源获得)从以天然状态与其关联或连接的多核苷酸序列中分离的多核苷酸或者非天然发生的多核苷酸。优选地,分离的多核苷酸至少60%不含与其天然相关的其它组分,更优选为至少75%不含其它组分并且更优选为至少90%不含其它组分。

[0362] 在一个实施方案中,所述多核苷酸为非天然发生的。非天然发生的多核苷酸的实例包括但不限于已突变的那些(如通过使用本文所述的方法)以及其中编码蛋白质的开放

阅读框可操作地连接至不与其天然相关的启动子的多核苷酸(如在本文所述的构建体中)。

[0363] 如本文所用的,术语“基因”以其最广义的语境来理解并且包括脱氧核糖核苷酸序列,其包含结构基因的转录区和(如果翻译的话)蛋白质编码区并且包含5'端和3'端二者上与编码区相邻地定位的任一端上至少约2kb距离的序列,并且它涉及基因的表达。在这点上,所述基因包括与给定的基因天然相关的控制信号如启动子、增强子、终止子和/或多腺苷酸化信号或者在此情况基因被称为“嵌合基因”的异源控制信号。位于蛋白质编码区的5'端并存在于mRNA上的序列被称为5'非翻译序列。位于蛋白质编码区的3'端或下游并存在于mRNA上的序列称为3'非翻译序列。术语“基因”涵盖基因的cDNA和基因组形式。基因的基因组形式或克隆包含编码区,其可穿插有称为“内含子”或“间插区”或“间插序列”的非编码序列。内含子为转录到核RNA(hnRNA)中的基因区段。内含子可包含调节元件如增强子。内含子从核或原始转录物中去除或“剪除”;因此,内含子不存在于信使RNA(mRNA)转录物中。mRNA在翻译期间起作用以指定新生多肽中的氨基酸的序列或顺序。术语“基因”包括编码本文所述的所有蛋白质或蛋白质的一部分的合成或融合分子以及以上任一种的互补核苷酸序列。

[0364] 如本文所用的,“嵌合DNA”或“嵌合遗传构建体”是指在其天然位置不是天然DNA分子的任何DNA分子,在本文中也称为“DNA构建体”。通常,嵌合DNA或嵌合基因包含在自然界中并未发现可操作地连接在一起的,即相对于彼此为异源的调节或转录序列或蛋白质编码序列。因此,嵌合DNA或嵌合基因可包含源于不同来源的调节序列和编码序列或者源于相同来源但以不同于自然界中所发现的方式排列的调节序列和编码序列。

[0365] 术语“内源性”在本文中用于指示通常在例如处于相同发育阶段的未修饰的植物(如研究中的植物)中存在或产生的物质。“内源性基因”是指有机体的基因组中的天然位置的天然基因。如本文所用的,“重组核酸分子”、“重组多核苷酸”或其变型是指已通过重组DNA技术构建或修饰的核酸分子。术语“外来多核苷酸”或“外源性多核苷酸”或“异源性多核苷酸”等是指通过实验操作引入细胞的基因组中的任何核酸。外来基因或外源性基因可为插入非天然有机体中的基因、引入天然宿主内的新位置中的天然基因或者嵌合基因。“转基因”为已通过转化程序引入基因组中的基因。术语“遗传修饰”、“转基因”以及其变型包括通过转化或转导将基因引入细胞中、使细胞内的基因突变以及改变或调整已进行这些操作的细胞或有机体或其后代中的基因调节。如本文所用的“基因组区域”是指处于基因组内的位置,其中转基因或转基因组(在本文中也称为簇)已插入到细胞或其祖代中。此类区域仅包含已通过人为干涉如通过本文所述的方法并入的核苷酸。

[0366] 在多核苷酸的背景下,术语“外源性”是指与其天然状态相比以改变的量存在于细胞中的多核苷酸。在一个实施方案中,所述细胞为并不天然地包含所述多核苷酸的细胞。然而,所述细胞可为包含引起改变的量的编码的多肽产生的非内源性多核苷酸的细胞。外源性多核苷酸包括未与转基因(重组)细胞或无细胞表达系统(其中存在多核苷酸)的其它组分分离的多核苷酸以及在此类细胞或无细胞系统中产生然后从至少一些其它组分中纯化的多核苷酸。外源性多核苷酸(核酸)可为存在于自然界中的连续延伸的核苷酸,或者包含来自不同来源(天然发生和/或合成)的连接为形成单个多核苷酸的两个或更多个连续延伸的核苷酸。通常,此类嵌合多核苷酸包含编码多肽的可操作地连接至适合驱动开放阅读框在感兴趣的细胞内转录的启动子的至少一个开放阅读框。

[0367] 如本文所用的,术语“不同的外源性多核苷酸”或其变型意指每种多核苷酸的核苷

酸序列有至少一个、优选多个核苷酸不同。所述多核苷酸编码可以或不可以在细胞内翻译为蛋白质的RNA。在一个实例中,优选的为每种多核苷酸编码具有不同活性的蛋白质。在另一个实例中,每种外源性多核苷酸与其它外源性多核苷酸少于95%、少于90%或少于80%相同。优选地,外源性多核苷酸编码功能蛋白质/酶。此外,优选的为,不同外源性多核苷酸为非重叠的,因为每种多核苷酸为例如不会与另一个外源性多核苷酸重叠的染色体外转移核酸的不同区域。至少,每种外源性多核苷酸具有转录起始位点和终止位点以及指定的启动子。单个外源性多核苷酸可以或不包含内含子。

[0368] 关于定义的多核苷酸,将了解的是,高于以上所提供的那些的%同一性数字将涵盖优选的实施方案。因此,在适用的情况下,鉴于最小%同一性数字,优选的是,多核苷酸包含与相关指定的SEQ ID NO至少60%、更优选至少65%、更优选至少70%、更优选至少75%、更优选至少80%、更优选至少85%、更优选至少90%、更优选至少91%、更优选至少92%、更优选至少93%、更优选至少94%、更优选至少95%、更优选至少96%、更优选至少97%、更优选至少98%、更优选至少99%、更优选至少99.1%、更优选至少99.2%、更优选至少99.3%、更优选至少99.4%、更优选至少99.5%、更优选至少99.6%、更优选至少99.7%、更优选至少99.8%以及甚至更优选至少99.9%相同的多核苷酸序列。

[0369] 本发明的多核苷酸可在严格条件下与编码本发明的多肽的多核苷酸选择性杂交。如本文所用的,严格条件为以下那些:(1)在杂交期间在42℃下采用变性剂,如甲酰胺,例如具有0.1% (w/v) 牛血清白蛋白、0.1% 聚蔗糖、0.1% 聚乙烯吡咯烷酮、pH 6.5 50mM磷酸钠缓冲液和750mM NaCl、75mM柠檬酸钠的50% (v/v) 甲酰胺;或者(2)在42℃下采用在0.2 x SSC和0.1% SDS中的50% 甲酰胺、5xSSC (0.75M NaCl、0.075M柠檬酸钠)、50mM磷酸钠 (pH 6.8)、0.1% 焦磷酸钠、5x邓哈特 (Denhardt's) 溶液、超声的鲑鱼精子DNA (50g/ml)、0.1% SDS和10% 硫酸葡聚糖和/或(3)在50℃下采用低离子强度和高温来洗涤,例如0.015M NaCl/0.0015M柠檬酸钠/0.1% SDS。

[0370] 当与天然发生的分子相比时,多核苷酸可具有一个或多个突变,它们为核苷酸残基的缺失、插入或取代。相对于参考序列具有突变的多核苷酸可为天然发生的(也就是说,从天然来源中分离的)或合成的(例如,通过对核酸进行定点诱变或DNA改组,如以上所述的)。因此,清楚的是,多核苷酸可为来自天然发生的来源或者为重组的。优选的多核苷酸为具有编码区的那些,所述编码区被密码子优化为用于在植物细胞内进行翻译,如本领域已知的。

#### [0371] 重组载体

[0372] 本发明的一个实施方案包括含有本文所定义的至少一个多核苷酸分子的重组载体,所述多核苷酸分子插入能够将所述多核苷酸分子递送到宿主细胞内的任何载体中。重组载体包括表达载体。重组载体包含异源多核苷酸序列,即未天然地发现与本文所定义的多核苷酸分子相邻的多核苷酸序列,优选源于除一种或多种多核苷酸分子所来源的物种之外的物种。所述载体可为RNA或DNA并且通常为质粒。质粒载体通常包括在原核细胞内提供表达盒的轻易选择、扩增和转化的另外的核酸序列,例如,pUC-来源的载体、pSK-来源的载体、pGEM-来源的载体、pSP-来源的载体、pBS-来源的载体或优选含有一个或多个T-DNA区域的二元载体。另外的核酸序列包含提供载体的自主复制的复制起点、优选编码抗生素或除草剂抗性的选择性标记基因、提供插入核酸构建体中编码的核酸序列或基因的多个位点的

多个独特克隆位点以及增强原核和真核(特别是植物)细胞的转化的序列。重组载体可包含多于一种本文所定义的多核苷酸,例如,三种、四种、五种或六种本文所定义的多核苷酸的组合,优选为本文所述的嵌合遗传构建体,每种多核苷酸可操作地连接至在感兴趣的细胞内为可操作的表达控制序列。优选地,表达控制序列包括或全部为异源启动子,即相对于它们所控制的编码区为异源的。多于一个本文所定义的多核苷酸,例如各自编码不同的多肽的3、4、5或6个多核苷酸,优选7或8个多核苷酸,优选一起共价连接在单个重组载体内,优选在单个T-DNA分子内,然后可作为单个分子引入到细胞内以形成根据本发明的重组细胞,并且优选整合到例如转基因植物的重组细胞的基因组中。所述整合到基因组中可为整合到转基因植物的核基因组中或质体基因组中。因此,如此连接的多核苷酸将作为单一遗传基因座一起遗传到重组细胞或植物的后代中。重组载体或植物可包含两个或更多个此类重组载体,每个重组载体包含多个多核苷酸,例如其中每个重组载体包含3、4、5或6个多核苷酸。

[0373] 如本文所用的“可操作地连接”是指两个或更多个核酸(例如,DNA)区段之间的功能关系。通常,它是指转录调节元件(启动子)与转录序列的功能关系。例如,如果启动子刺激或调整适当细胞内的编码序列的转录,则启动子可操作地连接至编码区,如本文所定义的多核苷酸。通常,可操作地连接至转录序列的启动子转录调节元件为与转录序列物理相邻的,即它们为顺式作用。然而,一些转录调节元件如增强子不需要与增强转录的编码序列物理相邻或者与其紧密相邻地定位。

[0374] 当存在多个启动子时,每个启动子可独立地为相同或不同的。优选地,至少3个以及高至最大6个不同启动子序列在重组载体中用于控制外源性多核苷酸的表达。

[0375] 重组分子如嵌合DNA或遗传构建体还可包含(a)编码信号肽序列以使本文所定义的表达的多肽能够从产生多肽或提供表达的多肽的定位(例如,提供多肽在细胞内质网(ER)内的保留或转移到质体中)的细胞中分泌的一个或多个分泌信号和/或(b)包含引起核酸分子表达为融合蛋白的融合序列。适合信号区段的实例包括能够指导本文所定义的多肽的分泌或定位的任何信号区段。重组分子还可包括本文所定义的核酸分子的核酸序列周围和/或之内的间插序列和/或未翻译序列。

[0376] 为了促进转化株的鉴别,核酸构建体理想地包含作为外来或外源多核苷酸的可选择或可筛选标记基因,或者除外来或外源多核苷酸之外包含可选择或可筛选标记基因。“标记基因”一词意指赋予表达标记基因的细胞不同表型并因此允许此类转化的细胞与不具有所述标记的细胞区别的基因。可选择标记基因赋予人们可基于对选择剂(例如,除草剂、抗菌剂、辐射、热量或损害未转化的细胞的其它处理)的抗性“选择”的性质。可筛选标记基因(或报道基因)赋予人们可通过观察或测试、即通过“筛选”进行鉴别的性质(例如, $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、荧光素酶、GFP或不存于未转化的细胞内的其它酶活性)。标记基因和感兴趣的核苷酸序列不一定连接。标记的实际选择并不重要,只要它与选择的细胞如植物细胞组合来起作用(即,选择性)。

[0377] 细菌的可选择标记的实例为赋予抗生素抗性如氨苄西林、红霉素、氯霉素或四环素抗性、优选卡那霉素抗性的标记。用于选择植物转化株的示例性可选择标记包括但不限于,编码潮霉素B抗性的hyg基因;赋予对卡那霉素、巴龙霉素、G418抗性的新霉素磷酸转移酶(nptII)基因;来自大鼠肝脏的赋予对谷胱甘肽来源的除草剂抗性的谷胱甘肽-S-转移酶基因,例如,如EP256223所述的;在过表达时赋予对谷氨酰胺合酶抑制剂如草丁膦抗性的谷

氨酰胺合酶基因,例如,如W0 87/05327所述的;来自绿色产色链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)的赋予对选择剂草丁膦抗性的酰基转移酶基因,例如,如EP 275957所述的;赋予对N-磷酸甲基甘氨酸耐受性的编码5-烯醇莽草酸酯-3-磷酸合酶(EPSPS)的基因,例如,如Hinchee等(1988)所述的;赋予针对双丙氨膦抗性的bar基因,例如,如W09I/02071所述的;来自臭鼻克雷伯菌(*Klebsiella ozaenae*)的赋予对溴草腈抗性的腈水解酶基因如bxn(Stalker等,1988);赋予对甲氨蝶呤抗性的二氢叶酸还原酶(DHFR)(Thillet等,1988);赋予对咪唑啉酮、磺酰脲类或其它ALS-抑制化学剂抗性的突变乙酰乳酸合酶基因(ALS)(EP 154,204);赋予对5-甲基色氨酸抗性的突变邻氨基苯甲酸酯合酶基因;或者赋予对除草剂抗性的茅草枯脱卤素酶基因。

[0378] 优选的可筛选标记包括但不限于,编码其多种发色底物已知的 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶(GUS)的uidA基因、绿色荧光蛋白基因(Niedz等,1995)或其衍生物;允许生物发光检测的荧光素酶(luc)基因(Ow等,1986)以及本领域已知的其它基因。如本说明书中使用的“报道分子”一词意指通过其化学性质提供可分析鉴别信号的分子,所述信号通过参考蛋白质产品来促进启动子活性的确定。

[0379] 优选地,核酸构建体稳定地并入细胞如植物细胞的基因组中。因此,核酸可包含允许分子并入基因组中,优选为T-DNA分子的右边界和左边界序列中的适当元件,或者所述构建体置于可并入细胞染色体中的适当载体中。

#### [0380] 表达

[0381] 如本文所用的,表达载体为能够转化宿主细胞并且能够影响一个或多个指定的多核苷酸分子的表达的DNA载体。本发明的表达载体可指导植物细胞内的基因表达。适用于本发明的表达载体包含调节序列如转录控制序列、翻译控制序列、复制起点以及与重组细胞相容并且控制本发明的多核苷酸分子的表达的其它调节序列。具体地说,适用于本发明的多核苷酸或载体包含转录控制序列。转录控制序列为控制转录起始、延伸和终止的序列。特别重要的转录控制序列为控制转录起始的那些序列,如启动子和增强子序列。适合的转录控制序列包括可在本发明的重组细胞中的至少一个中起作用的任何转录控制序列。所使用的调节序列的选择取决于感兴趣的目标有机体如植物和/或目标器官或组织。此类调节序列可从任何真核有机体如植物或植物病毒中获得,或者可化学合成。多种此类转录控制序列为本领域技术人员已知的。特别优选的转录控制序列在组成性或阶段性地指导植物的转录中为启动子活性的和/或根据所使用的植物或其部分为组织特异性的。

[0382] 适用于稳定转染植物细胞或适用于建立转基因植物的多种载体已描述于例如Pouwels等,Cloning Vectors:A Laboratory Manual,1985,增刊1987;Weissbach和Weissbach,Methods for Plant Molecular Biology,Academic Press,1989;以及Gelvin等,Plant Molecular Biology Manual,Kluwer Academic Publishers,1990。通常,植物表达载体包括例如在5'和3'调节序列和显性可选择标记的转录控制下的一个或多个克隆的植物基因。此类植物表达载体还可包含启动子调节区(例如,控制可诱导或构成的、环境或发育调节的或者细胞或组织特异性的表达的调节区)、转录起始位点、核糖体结合位点、RNA加工信号、转录终止位点和/或多腺苷酸化信号。

[0383] 已描述在植物细胞内有活性的多种组成型启动子。用于在植物内组成型表达的适合启动子包括但不限于,花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子、玄参花叶病毒(FMV)35S、甘蔗

杆状病毒启动子、鸭跖草黄斑驳病毒启动子、来自核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基的光诱导型启动子、水稻胞质丙糖磷酸异构酶启动子、拟南芥的腺嘌呤磷酸核糖基转移酶启动子、水稻肌动蛋白1基因启动子、甘露碱合酶和章鱼碱合酶启动子、Adh启动子、蔗糖合酶启动子、R基因复合体启动子以及叶绿素 $\alpha/\beta$ 结合蛋白基因启动子。

[0384] 出于在植物的源组织如叶、种子、根或茎中表达的目的,优选的为用于本发明的启动子在这些特定的组织中具有相对高的表达。出于此目的,可从具有组织-或细胞-特异性或增强的表达的基因的多个启动子中选择。在文献中报道的此类启动子的实例包括来自豌豆的叶绿体谷氨酰胺合酶GS2启动子、来自小麦的叶绿体果糖-1,6-二磷酸酶启动子、来自土豆的核光合ST-LS1启动子、来自拟南芥的丝氨酸/苏氨酸激酶启动子和葡糖淀粉酶(CHS)启动子。也报道在光合活性组织内有活性的为核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶启动子和Cab启动子。

[0385] 响应于环境、激素、化学和/或发育信号而调节的多种植物基因启动子也可用于在植物细胞内表达基因,包括通过以下各项调节的启动子:(1)热量;(2)光(例如,豌豆RbcS-3A启动子、玉米RbcS启动子);(3)激素,如脱落酸;(4)创伤(例如,WunI);或者(5)化学剂,如茉莉酮酸甲酯、水杨酸、类固醇激素、醇、安全剂(Safener)(W097/06269),或者它也可有利地采用(6)器官特异性启动子。

[0386] 如本文所用的,术语“植物种子特异性启动子”或其变型是指当与其它植物组织相比时优先指导植物的发育种子中的基因转录的启动子,所述植物优选为芸苔属物种、亚麻荠或者大豆植物。在一个实施方案中,种子特异性启动子在植物的发育种子中的表达相对于植物的叶和/或茎中强至少5倍,并且优选地在发育种子的胚中的表达相对于其它植物组织更强。优选地,启动子仅指导感兴趣的基因在发育的种子中的表达,和/或感兴趣的基因在植物的其它部分(如叶)中的表达通过RNA印迹分析和/或RT-PCR不能检测。通常,启动子在种子生长和发育期间,具体地为贮藏化合物在种子中合成和积累阶段期间驱动基因表达。此类启动子可在整个植物贮藏器官或仅其部分中如种皮或一个或多个子叶中,优选在胚中,在双子叶植物的种子或单子叶植物的种子的胚乳或糊粉层中驱动基因表达。

[0387] 用于种子特异性表达的优选启动子包括i)来自编码涉及种子中的脂肪酸生物合成和积累的酶(如脂肪酸去饱和酶和延伸酶)的基因的启动子、ii)来自编码种子贮藏蛋白的基因的启动子以及iii)来自编码涉及种子中的碳水化合物生物合成和积累的酶的基因的启动子。适合的种子特异性启动子为油菜napin基因启动子(US5,608,152)、蚕豆(*Vicia faba*) USP启动子(Baumlein等,1991)、拟南芥油质蛋白启动子(W098/45461)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)菜豆素启动子(US5,504,200)、芸苔属Bce4启动子(W091/13980)或来自蚕豆的豆球蛋白LeB4启动子(Baumlein等,1992)以及引起单子叶植物如玉米、大麦、小麦、黑麦、水稻等中的种子特异性表达的启动子。适合的显著启动子为大麦lpt2或lpt1基因启动子(W095/15389和W095/23230)或W099/16890中所描述的启动子(来自大麦醇溶蛋白(hordein)基因、水稻谷蛋白基因、水稻oryzin基因、水稻谷醇溶蛋白(prolamin)基因、小麦醇溶蛋白(gliadin)基因、小麦谷蛋白基因、玉米醇溶蛋白(zein)基因、燕麦谷蛋白基因、高粱kasirin基因、黑麦黑麦碱基因的启动子)。其它启动子包括通过Broun等(1998)、Potenza等(2004)、US20070192902和US20030159173所述的那些。在一个实施方案中,种子特异性启动子优先在所确定的种子部分如胚、一个或多个子叶或胚乳中表达。此类特异性启动子的

实例包括但不限于,FP1启动子(Ellerstrom等,1996)、豌豆豆球蛋白启动子(Perrin等,2000)、豆植物凝集素启动子(Perrin等,2000)、编码亚麻2S贮藏蛋白的基因的conlinin 1和conlinin 2启动子(Cheng等,2010)、来自拟南芥的FAE1基因的启动子、欧洲油菜的球蛋白样蛋白质基因的BnGLP启动子、来自亚麻的过氧化物还原酶基因的LPXR启动子。

[0388] 5'非翻译前导序列可源于经过选择来表达本发明的多核苷酸的异源基因序列的启动子,或者优选为相对于所产生的酶的编码区为异源的,并且需要时可特异性修饰以便增加mRNA的翻译。关于对转基因的优化表达的评述,参见Koziel等(1996)。5'非翻译区也可从植物病毒RNA(烟草花叶病毒、烟草蚀纹病毒、玉米矮小花叶病毒、苜蓿花叶病毒以及其它)、从适合真核基因、植物基因(小麦和玉米叶绿素a/b结合蛋白基因前导序列)或从合成的基因序列中获得。本发明不限于其中非翻译区源于伴随启动子序列的5'非翻译序列的构建体。前导序列还可源于不相关的启动子或编码序列。适用于本发明的上下文的前导序列包含玉米Hsp70前导序列(US5,362,865和US5,859,347)和TMV  $\omega$  元件。

[0389] 转录的终止通过嵌合载体中可操作地连接至感兴趣的多核苷酸的3'非翻译DNA序列来实现。重组DNA分子的3'非翻译区包含在植物内起作用以引起腺苷酸核苷酸添加到RNA的3'端的多腺苷酸化信号。3'非翻译区可从在植物细胞内表达的多个基因中获得。胭脂氨酸合酶3'非翻译区、来自豌豆小亚基Rubisco基因的3'未翻译区、来自大豆7S种子贮藏蛋白基因或亚麻conlinin基因的3'未翻译区通常用于这方面。含有土壤杆菌属肿瘤诱导(Ti)的质粒基因的多腺苷酸化信号的3'转录非翻译区也为适合的。

[0390] 重组DNA技术可用于通过操纵例如宿主细胞内多核苷酸分子拷贝的数目、那些多核苷酸分子转录的效率、所得转录物翻译的效率以及翻译后修饰的效率来提高转化的多核苷酸分子的表达。适用于增加本文所定义的多核苷酸分子的表达的重组技术包括但不限于,将所述多核苷酸分子整合到一个或多个宿主细胞染色体中、将稳定性序列添加到mRNA中、取代或修饰转录控制信号(例如,启动子、操纵子、增强子)、取代或修饰翻译控制信号(例如,核糖体结合位点、Shine-Dalgarno序列)、修饰多核苷酸分子以与宿主细胞的密码子使用相对应以及缺失使转录物不稳定的序列。

#### [0391] 转基因植物

[0392] 如本文所用的术语“植物”作为名词是指全株植物,但是用作形容词时是指存在于植物例如像植物器官(例如,叶、茎、根、花)、单个细胞(例如,花粉)、种子、植物细胞等中、从中获得、源于其中或与其相关的任何物质。术语“植物部分”是指包含植物DNA的所有植物部分,包括营养结构,例如像叶或茎、根、花器官或结构、花粉、种子、种子部分(例如胚、胚乳、盾片或种皮)、植物组织(例如像,脉管组织)、其细胞以及后代,只要植物部分合成根据本发明的脂质。

[0393] “转基因植物”、“遗传修饰的植物”或其变型是指含有相同物种、种类或品种的野生型植物中并未发现的基因构建体(“转基因”)的植物。如本发明的上下文中所定义的转基因植物包括使用重组技术进行遗传修饰以引起本文所定义的脂质或至少一种多肽在所希望的植物或植物器官中产生的植物和其后代。转基因植物细胞和转基因植物部分具有对应的含义。如本文所提及的“转基因”具有生物技术领域的标准含义并且包括通过重组DNA或RNA技术产生或改变的并引入到植物细胞中的基因序列。转基因可包括源于植物细胞或者源于除植物细胞之外的细胞的基因序列,所述植物细胞可为与转基因所引入的植物细胞相



同的物种、种类或品种或者为不同的物种、种类或品种。通常,转基因通过人工操作例如通过转化引入到细胞如植物,而且可使用本领域技术人员所知道的任何方法。

[0394] 术语“种子”和“谷物”在本文中可互换使用。“谷物”是指成熟谷物,如收获的谷物或仍在植物上但已准备好收获的谷物,但是根据上下文也可以是指吸涨或发芽之后的谷物。成熟谷物或种子通常具有少于约18%-20%,优选少于10%的含湿量。芸苔属种子如油菜种子在成熟时通常具有约4%-8%的含湿量,优选约4%至6%之间的含湿量。如本文所用的“发育种子”是指在成熟之前的种子,通常可见于受精或开花之后植物的生殖结构中,但是也可以是指成熟(与植物分离)之前的此类种子。

[0395] 如本文所用的,术语“获得植物部分”或“获得种子”分别是指获得植物部分或种子的任何方式,包括从田地或封闭室如温室或生长室内的植物中收获植物部分或种子或者通过从植物部分或种子的供应商处购买或接收。温室中的标准生长条件包括22℃-24℃的日间温度和16℃-18℃晚间温度,使用自然光照。种子可适用于种植,即能够发芽并产生后代植物,或者替代地以一种方式加工使得不再能够发芽,例如,适用于食品或原料应用的压碎、抛光或研磨的种子或用于提取本发明的脂质的种子。

[0396] 如本文所用的,术语“植物贮藏器官”是指专门以例如蛋白质、碳水化合物、脂肪酸和/或油的形式贮藏能量的植物部分。植物贮藏器官的实例为种子、果实、块状根以及块茎。优选的植物贮藏器官为种子。

[0397] 如本文所用的,术语“表型正常”是指在与未修饰植物或植物器官相比时生长和繁殖的能力没有显著减小的遗传修饰的植物或植物器官,具体地为贮藏器官如种子、块茎或果实。在一个实施方案中,表型正常的遗传修饰的植物或植物器官包括编码沉默阻抑物的可操作地连接至植物贮藏器官特异性启动子的外源性多核苷酸,并且具有基本上与不包含所述多核苷酸的同基因植物或器官相同地生长或繁殖的能力。优选地,当在相同条件下生长时,生物质、生长速率、发芽率、贮藏器官大小、种子大小和/或所产生的活力种子数目不小于缺乏所述外源性多核苷酸的植物的90%。此术语不涵盖可与野生型植物不同但不影响植物商业目的的可用性的植物特征,例如像,幼苗叶子的芭蕾舞样表型。

[0398] 通过本发明提供的或者涵盖用于实践本发明的植物包括单子叶植物和双子叶植物。在优选的实施方案中,本发明的植物为农作物植物(例如,谷类和豆类、玉米、小麦、马铃薯、木薯、水稻、高粱、小米、木薯、大麦或豌豆)或其它豆类。植物可生长,以产生可食用根、块茎、叶、茎、花或果实。植物可为蔬菜或观赏性植物。本发明的或适用于本发明的植物可为:玉米(玉蜀黍(*Zea mays*))、油菜(欧洲油菜、芜菁亚种)、芥菜(印度芥菜)、亚麻(亚麻(*Linum usitatissimum*))、苜蓿(紫花苜蓿(*Medicago sativa*))、水稻(亚洲栽培稻(*Oryza sativa*))、黑麦(*Secale cereale*)、高粱(两色蜀黍、高粱)、向日葵(向日葵(*Helianthus annuus*))、小麦(小麦(*Triticum aestivum*))、大豆(大豆(*Glycine max*))、烟草(普通烟草)、马铃薯(马铃薯(*Solanum tuberosum*))、花生(落花生)、棉花(陆地棉)、甘薯(甘薯(*Lopmoeba batatus*))、木薯(木薯(*Manihot esculenta*))、咖啡(咖啡某些种)、椰子(椰子(*Cocos nucifera*))、菠萝(凤梨(*Anana comosus*))、柑橘属树(柑橘属某些种)、可可(Theobroma cacao)、茶(野茶树(*Camellia senensis*))、香蕉(芭蕉属某些种)、鳄梨(鳄梨(*Persea americana*))、无花果(无花果(*Ficus casica*))、番石榴(番石榴(*Psidium guajava*))、芒果(芒果(*Mangifer indica*))、橄榄(油橄榄(*Olea europaea*))、番木瓜(番木瓜(*Carica*



papaya))、腰果(腰果(*Anacardium occidentale*))、澳洲坚果(澳洲坚果(*Macadamia intergrifolia*))、杏仁(巴旦杏(*Prunus amygdalus*))、甜菜(甜菜(*Beta vulgaris*))、燕麦或大麦。

[0399] 在一个优选的实施方案中,所述植物为被子植物。

[0400] 在一个实施方案中,所述植物为含油种子植物,优选为含油种子农作物。如本文所用的,“含油种子植物”为用于从植物的种子中商业生产油的植物物种。含油种子植物可为油菜(如油菜(*canola*))、玉米、向日葵、大豆、高粱、亚麻(亚麻籽)或甜菜。此外,含油种子植物可为其它芸苔属、棉花、花生、罂粟、芥菜、蓖麻子、芝麻、向日葵、红花、亚麻荠属、两节荠属或产生坚果的植物。所述植物可在其果实中产生高水平的油,如橄榄、油棕或椰子。本发明可用于的园艺植物为莴苣、菊苣或蔬菜芸苔属(包括卷心菜、西兰花或花椰菜)。本发明可用于烟草、葫芦、胡萝卜、草莓、番茄或胡椒。

[0401] 在另一个优选的实施方案中,用于产生本发明的转基因植物的非转基因植物产生油,特别是在种子中,其具有i)少于20%、少于10%或少于5%18:2脂肪酸和/或ii)少于10%或少于5%18:3脂肪酸。

[0402] 在一个优选的实施方案中,转基因植物或其部分对于已引入的每个基因(转基因)为纯合的,以使得其后代不会分离所需的表型。转基因植物对于一个或多个引入的转基因为杂合的,优选对于所述转基因为均匀杂合的,例如像在由杂种种子生长的F1后代中。此类植物可提供本领域已熟知的优点如杂种优势或者可用于植物育种或回交。

[0403] 在一个实施方案中,外源性多核苷酸编码一组多肽,所述多肽为畸雌腐霉 $\Delta 6$ -去饱和酶、破囊壶菌属 $\Delta 5$ -去饱和酶或者球石藻(*Emiliana huxleyi*) $\Delta 5$ -去饱和酶、小立碗藻 $\Delta 6$ -延伸酶、破囊壶菌属 $\Delta 5$ -延伸酶或者海洋微藻 $\Delta 5$ -延伸酶以及致病疫霉 $\omega 3$ -去饱和酶或者畸雌腐霉 $\omega 3$ -去饱和酶。

[0404] 在一个实施方案中,本发明的或用于本发明的植物在田地中优选作为基本上相同的至少1,000、1,000,000或2,000,000株植物群生长或者在至少1公顷或2公顷面积中生长。植物密度根据植物物种、植物种类、气候、土壤条件、化肥使用率以及本领域已知的其它因素而不同。例如,油菜通常以每公顷120-150万株植物的种植密度生长。植物如本领域已知地进行收获,这可包括割晒、堆放和/或收割植物,然后脱粒和/或风选植物材料,以将种子从其余植物部分(通常为谷壳的形式)中分离。或者,种子可以单一方法(即整合)从田地中的植物中收获。

[0405] 植物转化

[0406] 转基因植物可使用本领域已知的技术产生,如A.Slater等,Plant Biotechnology-The Genetic Manipulation of Plants,Oxford University Press (2003)以及P.Christou和H.Klee,Handbook of Plant Biotechnology,John Wiley and Sons (2004)通常所述的那些。

[0407] 如本文所用的,术语“稳定转化”、“稳定转化的”以及其变型是指外源性核酸分子整合到细胞的基因组中,以使得它们在细胞分裂期间转移到后代细胞内而对于其存在不需要进行明确选择。稳定的转化株或其后代可通过本领域已知的任何方式(如DNA印迹)对染色体DNA或遗传DNA的原位杂交进行选择。优选地,植物转化如本文的实施例所述地进行。

[0408] 土壤杆菌属-介导的转移为用于将基因引入植物细胞中的广泛可用的系统,因为

DNA可引入全株植物组织或植物器官的细胞中或组织培养物的外植体中,以用于瞬时表达DNA或用于将DNA稳定整合到植物细胞基因组中。使用土壤杆菌属-介导的植物整合载体将DNA引入到植物细胞中为本领域已熟知的(参见,例如,US 5177010、US 5104310、US 5004863或US 5159135),包括使用土壤杆菌属或可将DNA转移到植物细胞中的其它细菌的花浸渍法。待转移的DNA区域通过边界序列限定,并且间插DNA (T-DNA) 通常插入到植物基因组中。此外,T-DNA的整合为相对精确的过程,几乎不引起重排。在其中土壤杆菌属介导的转化为有效的那些植物种类中,它由于基因转移的温和和限定的性质而为选择的方法。优选的土壤杆菌属转化载体能够在大肠杆菌和土壤杆菌中复制,以允许便利的操作,如(Klee等,于:Plant DNA Infectious Agents,Hohn和Schell编辑,Springer-Verlag,NewYork,第179-203页(1985)所述的。

[0409] 可使用的加速方法包括例如微粒轰击法等。用于将转化的核酸分子递送到植物细胞的方法的一个实例为微粒轰击法。这种方法已通过Yang等,Particle Bombardment Technology for Gene Transfer,Oxford Press,Oxford,England(1994)评述。非生物颗粒(微弹)可用核酸包覆并通过推进力递送到细胞中。示例性颗粒包括含有钨、金、铂等的那些颗粒。除了它是繁殖转化的单子叶植物的有效方式之外,微弹轰击的一个特定优点在于既不需要分离原生质体,也不需要土壤杆菌属感染的易感性。

[0410] 在另一个替代的实施方案中,质体可为稳定转化的。公开用于在高等植物中质体转化的方法包括粒子枪递送含有可选择标记的DNA及通过同源重组将DNA靶向质体基因组(US5,451,513、US5,545,818、US5,877,402、US5,932,479和W099/05265)。

[0411] 细胞转化的其它方法也可以使用并且包括但不限于,通过直接将DNA转移到花粉中、通过将DNA直接注入到植物的生殖器官中或者通过将DNA直接注入到未成熟胚的细胞中,然后将脱水的胚再水化来将DNA引入到植物中。

[0412] 由单个植物原生质体转化株或由不同转化的外植体再生、发育和栽种植物为本领域已熟知的(Weissbach等,In:Methods for Plant Molecular Biology,Academic Press, San Diego,Calif.,(1988)。这种再生和生长过程通常包括选择转化的细胞、通过胚发育的常见阶段培养那些个体化的细胞至生根的小植株阶段的步骤。转基因胚和种子类似地进行再生。之后将所得的转基因生根嫩枝种植在适当植物生长培养基如土壤中。

[0413] 含有外来、外源基因的植物的发育或再生为本领域已熟知的。优选地,再生的植物为自花授粉的,以提供纯合的转基因植物。此外,从再生植物中获得的花粉与农业学重要品系的种子生长的植物杂交。相反地,来自这些重要品系的植物的花粉用于对再生的植物授粉。使用本领域技术人员已熟知的方法栽种含有所需外源性核酸的本发明的转基因植物。

[0414] 为了验证转基因在转基因细胞和植物中的存在,可使用本领域技术人员已知的方法进行聚合酶链反应(PCR)扩增或DNA印迹分析。转基因的表达产物可根据产物的性质以多种方式中的任一种进行检测,并且包括蛋白质印迹和酶测定。一旦获得转基因植物,它们就可以生长来产生具有所需表型的植物组织或部分。可收获植物组织或植物部分和/或可收集种子。种子可用于作用于使组织或部分具有所需特征的另外的植物生长的来源。

[0415] 使用土壤杆菌属或其它转化方法形成的转基因植物通常在一个染色体上包含单一遗传基因座。此类转基因植物对于一个或多个添加的基因可被称为半合的。更优选的是对于一个或多个添加的基因为纯合的转基因植物;即,含有两个添加的基因的转基因植物,

一个基因处于染色体对的每个染色体上的相同基因座。纯合转基因植物可通过对半合的转基因植物自花授粉、使所产生的种子中的一些发芽并且针对感兴趣的基因分析所得植物来获得。

[0416] 还应理解,含有两个独立分开的外源基因或基因座的两种不同转基因植物也可杂交(交配),以产生包含两组基因或基因座的后代。适当F1后代的自交可产生对于两种外源基因或基因座均为纯合的植物。还涵盖与亲本植物的回交和与非转基因植物的异型杂交,如营养繁殖。通常用于不同特性和农作物的其它育种方法的描述可见于Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. 编辑, American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987)。

[0417] 增加的外源RNA水平和稳定的表达

[0418] 沉默阻抑物

[0419] 在一个实施方案中,植物细胞、植物或植物部分包含编码沉默阻抑物蛋白的外源性多核苷酸。

[0420] 转录后基因沉默 (PTGS) 为可靶向细胞和病毒mRNA二者以使其降解的核苷酸序列特异性防御机制,PTGS出现于用外来(异源)或内源性DNA稳定或瞬时转化的植物或真菌中,并且导致与所引入的核酸具有序列相似性的RNA分子积累的减少。

[0421] 广泛地认为,沉默阻抑物与感兴趣的转基因的共表达将增加存在于由转基因转录的细胞中的RNA的水平。虽然这已经证明对于体外的细胞为正确的,但是在很多全株植物共表达研究中观察到显著的副作用。更确切地说,如Mallory等(2002)、Chapman等(2004)、Chen等(2004)、Dunoyer等(2004)、Zhang等(2006)、Lewsey等(2007)和Meng等(2008)所述的,通常在组成型启动子下表达沉默阻抑物的植物通常表型异常至一定程度,使得它们不适用于商业生产。

[0422] 最近,发现通过限制沉默阻抑物表达至植物种子或其部分中可增加RNA分子水平和/或使RNA分子水平在数代内稳定(WO2010/057246)。如本文所用的,“沉默阻抑物蛋白”或SSP为可在植物细胞内表达的任何多肽,这可增加植物细胞内来自不同转基因的表达产物的水平,特别是从初始转化的植物开始在重复的几代内。在一个实施方案中,SSP为病毒沉默阻抑物或其突变体。大量病毒沉默阻抑物为本领域已知的并且包括但不限于,P19、V2、P38、Pe-Po和RPV-P0。

[0423] 如本文所用的,术语“稳定的表达(stabilising expression)”、“稳定表达的(stably expressed)”、“稳定的表达(stabilised expression)”以及其变型是指当与缺乏编码沉默阻抑物的外源性多核苷酸的同基因植物相比时,在后代植物中(在重复的几代,例如,至少三代、至少五代或至少10代)基本上相同或更高的RNA分子水平。然而,这个或这些术语不排除在重复的几代内RNA分子的水平当与前一代相比存在一些损失的可能性,例如每代不小于10%的损失。

[0424] 阻抑物可选自任何来源,例如,植物、病毒、哺乳动物等。获得阻抑物的病毒列表以及来自每种特定病毒的阻抑物的蛋白质(例如B2, P14等)或编码区名称参见WO2010/057246。可使用阻抑物的多种拷贝。不同阻抑物可一起使用(例如,串联)。

[0425] RNA分子

[0426] 基本上需要在植物种子中表达的任何RNA分子均可与沉默阻抑物共表达。编码的

多肽可涉及油、淀粉、碳水化合物、营养物等的代谢,并且可负责蛋白质、肽、脂肪酸、脂质、蜡、油、淀粉、糖、碳水化合物、香料、气味、毒素、类胡萝卜素、激素类、聚合物、类黄酮、贮藏蛋白、酚酸、生物碱、木质素、单宁酸、纤维素、糖蛋白、糖脂等的合成,优选为TAG的生物合成或组装。

[0427] 在一个具体的实例中,所产生的植物增加用于在植物中产生油的酶的水平,所述植物如芸苔属,例如油菜或向日葵、红花、亚麻、棉花、大豆、亚麻荠或玉米。

[0428] 产生的LC-PUFA的水平

[0429] 在重组细胞或植物部分如种子中产生的LC-PUFA或LC-PUFA的组合的水平为重要的。所述水平可表示为相对于总脂肪酸的组成(以百分比计),所述总脂肪酸为特定的LC-PUFA或相关LC-PUFA的组,例如 $\omega$ 3 LC-PUFA或 $\omega$ 6LC-PUFA、或VLC-PUFA或可通过本领域已知的方法确定的其它脂肪酸。所述水平还可表示为LC-PUFA含量,例如像,以包含重组细胞的材料干重计的LC-PUFA百分比,例如以种子重量计的LC-PUFA百分比。将了解的,在含油种子中产生的LC-PUFA就LC-PUFA含量而言相当高于不是生长用于油生产的蔬菜或谷物中的含量,但是二者均可具有类似的LC-PUFA组成,并且二者可用作人或动物消耗的LC-PUFA的来源。

[0430] LC-PUFA的水平可通过本领域已知的任何方法确定。在一个优选的方法中,从细胞、组织或器官中提取总脂质并且在通过气相色谱法(GC)进行分析之前将脂肪酸转化为甲酯。此类技术描述于实施例1中。色谱图中的峰位置可用于确定每种特定的脂肪酸并且对每个峰下面积取积分以确定其量。如本文所用的,除非相反地说明,否则样品中的特定脂肪酸百分比确定为所述脂肪酸的峰下面积,确定为色谱图中的脂肪酸的总面积百分比。这基本上与重量百分比(w/w)相对应。脂肪酸的性质可通过GC-MS证实。总脂质可通过本领域已知的技术分离以纯化各级分,如TAG级分。例如,可以分析规模进行薄层色谱法(TLC),以从其它脂质级分如DAG、酰基-CoA或磷脂中分离TAG,以便具体确定TAG的脂肪酸组成。

[0431] 在一个实施方案中,在所提取的脂质的脂肪酸中的ARA、EPA、DPA和DHA总量为细胞中的总脂肪酸的约21%与约40%之间。在另一个实施方案中,细胞中的总脂肪酸具有少于1% C20:1。在优选的实施方案中,细胞中的可提取的TAG以本文所提及的水平构成所述脂肪酸。还涵盖定义如本文所述的脂质的特征的每个可能的组合。

[0432] 在重组细胞、植物或植物部分如种子中产生LC-PUFA的水平也可表示为特定底物脂肪酸转化为一种或多种产物脂肪酸的百分比,这在本文中也称为“转化效率”或“酶效率”。此参数是基于从细胞、植物、植物部分或种子中提取的脂质中的脂肪酸组成,即所形成的LC-PUFA(包括源于它的其它LC-PUFA)作为相对于一种或多种底物脂肪酸(包括源于它的所有其它脂肪酸)的百分比的量。转化百分比的通式为: $100 \times (\text{产物LC-PUFA和源于它的所有产物的百分比总量}) / (\text{底物脂肪酸和源于它的所有产物的百分比总量})$ 。关于DPA,例如,这可表示为DPA水平(作为脂质的总脂肪酸含量中的百分比)与底物脂肪酸(例如,OA、LA、ALA、SDA、ETA或EPA)和包括源于底物的DPA的所有产物的水平的比率。可针对路径中的单一酶步骤或者路径的部分或全部表示转化百分比或转化效率。

[0433] 在本文中根据以下式计算特定转化效率:

[0434]  $1.OA \text{ 比 } DPA = 100 \times (\% DHA + \% DPA) / (OA、LA、GLA、DGLA、ARA、EDA、ALA、SDA、ETrA、ETA、EPA、DPA \text{ 以及 } DHA \text{ 的总 } \%)$ 。

[0435] 2. LA比DPA =  $100 \times (\% \text{DHA} + \% \text{DPA}) / (\text{LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA以及DHA的总}\%)$ 。

[0436] 3. ALA比DPA =  $100 \times (\% \text{DHA} + \% \text{DPA}) / (\text{ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%)$ 。

[0437] 4. EPA比DPA =  $100 \times (\% \text{DHA} + \% \text{DPA}) / (\text{EPA, DPA和DHA的总}\%)$ 。

[0438] 5. DPA比DHA ( $\Delta 4$ -去饱和酶效率) =  $100 \times (\% \text{DHA}) / (\text{DPA和DHA的总}\%)$ 。

[0439] 6.  $\Delta 12$ -去饱和酶效率 =  $100 \times (\text{LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%) / (\text{OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%)$ 。

[0440] 7.  $\omega 3$ -去饱和酶效率 =  $100 \times (\text{ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%) / (\text{LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%)$ 。

[0441] 8. OA比ALA =  $100 \times (\text{ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%) / (\text{OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%)$ 。

[0442] 9.  $\Delta 6$ -去饱和酶效率(对于 $\omega 3$ 底物ALA) =  $100 \times (\text{SDA, ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%) / (\text{ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA和DHA的}\%)$ 。

[0443] 10.  $\Delta 6$ -延伸酶效率(对于 $\omega 3$ 底物SDA) =  $100 \times (\text{ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%) / (\text{SDA, ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%)$ 。

[0444] 11.  $\Delta 5$ -去饱和酶效率(对于 $\omega 3$ 底物ETA) =  $100 \times (\text{EPA, DPA和DHA的总}\%) / (\text{ETA, EPA, DPA和DHA的总}\%)$ 。

[0445] 12.  $\Delta 5$ -延伸酶效率(对于 $\omega 3$ 底物EPA) =  $100 \times (\text{DPA和DHA的总}\%) / (\text{EPA, DPA和DHA的总}\%)$ 。

[0446] 本发明的脂质(优选含油种子)的脂肪酸组成的特征也在于总脂肪酸含量中的 $\omega 6$ 脂肪酸: $\omega 3$ 脂肪酸的比率,对于总 $\omega 6$ 脂肪酸:总 $\omega 3$ 脂肪酸或对于新 $\omega 6$ 脂肪酸:新 $\omega 3$ 脂肪酸。术语总 $\omega 6$ 脂肪酸、总 $\omega 3$ 脂肪酸、新 $\omega 6$ 脂肪酸和新 $\omega 3$ 脂肪酸具有如本文所定义的含义。由以如本文所举例的方式从细胞、植物、植物部分或种子中提取的脂质中的脂肪酸组成计算所述比率。希望在脂质中具有比 $\omega 6$ 脂肪酸更大的 $\omega 3$ 脂肪酸水平,并且因此小于1.0的 $\omega 6$ : $\omega 3$ 比率为优选的。0.0的比率指示完全没有定义的 $\omega 6$ 脂肪酸;0.03的比率如实施例5所述地实现的。此类较低比率可通过组合使用具有 $\omega 3$ 底物偏好的 $\Delta 6$ -去饱和酶与 $\omega 3$ -去饱和酶(具体地为真菌 $\omega 3$ -去饱和酶,如本文所举例的毕赤酵母 $\omega 3$ -去饱和酶)一起来实现。

[0447] 每重量种子的LC-PUFA产量也可基于种子中的总油含量和油中的%DPA来计算。例如,如果油菜种子的油含量为约40% (w/w) 并且油的总脂肪酸含量的约12%为DPA,则种子的DPA含量为约4.8%或每克种子约48mg。在约21%的DPA含量下,油菜种子或亚麻荠种子具有每克种子约84mg的DPA含量。本发明因此提供欧洲油菜、印度芥菜和亚麻荠植物以及从中获得的种子,它们包含每克种子至少约80mg或至少约84mg DPA。种子具有含湿量,所述含湿量为收获的成熟种子在干燥之后的标准(4%-15%含湿量)。本发明还提供一种用于获得油的方法,所述方法包括获得所述种子并且从所述种子中提取油;以及油的用途和获得种子的方法,所述方法包括从根据本发明的植物中收获种子。

[0448] 如果每公顷的种子产量为已知的或者可评估的,则也可计算每公顷产生DPA的量。例如,在澳大利亚,油菜通常每公顷产出约2.5吨种子,这在40%油含量下产出约1000kg油。在总油中为20.1%DPA时,这提供每公顷约200kg DPA。如果油含量减少50%,则这仍提供约

100kg DPA/ha。

[0449] 迄今为止的证据表明在酵母或植物中异地表达的一些去饱和酶与一些延伸酶组合具有相对低的活性。这可通过在LC-PUFA合成中使去饱和酶具备使用酰基-CoA形式的脂肪酸作为底物的能力来缓解,并且这也被认为在重组细胞中特别在植物细胞中为有利的。用于有效的DPA合成的特别有利的组合为真菌 $\omega$ 3-去饱和酶例如像毕赤酵母 $\omega$ 3-去饱和酶(SEQ ID NO:6)和具有针对 $\omega$ 3酰基底物偏好的 $\Delta$ 6-去饱和酶例如像细小微胞藻 $\Delta$ 6-去饱和酶(SEQ ID NO:7)或其具有至少95%氨基酸序列同一性的变体。

[0450] 如本文所用的,术语“基本上不含”意指组合物(例如脂质或油)几乎不包含(例如,小于约0.5%、小于约0.25%、小于约0.1%或小于约0.01%)或不包含定义的组分。在一个实施方案中,“基本上不含”意指所述组分使用常规分析技术不能检测到,例如特定脂肪酸(如 $\omega$ 6-二十二碳五烯酸)使用如实施例1所列出的气相色谱法不能检测。

[0451] 在一个实施方案中,所提取的脂质、所提取的油、其植物或部分如种子(本发明的或者用于本发明的过程/方法中的)、原料或本发明的组合物不包含全顺式-6,9,12,15,18-二十一碳五烯酸(n-3 HPA)。

#### [0452] 油的产生

[0453] 本领域通常实践的技术可用于提取、加工和分析通过本发明的细胞、植物、种子等产生的油。通常,煮熟、挤压并提取植物种子以产生粗油,然后将其脱胶、精炼、漂白并脱臭。通常,用于压碎种子的技术为本领域已知的。例如,含油种子可通过用水喷洒它们以将含湿量提高至例如8.5%来调和并且使用具有0.23mm至0.27mm的辊缝设定的光辊剥壳。根据种子的类型,不能在压碎之前添加水。施加热量使酶失去活性,促进进一步细胞破裂,使油滴合并,并且使蛋白质颗粒成团,所有这些均有助于提取过程。

[0454] 在一个实施方案中,大部分种子油通过穿过螺杆压榨机来释放。然后使用热示踪柱,例如用己烷对从螺杆压榨机排出的滤饼进行溶剂提取。或者,通过压榨操作产生的粗油可经过具有沟槽管线排出管顶部的沉降槽,以去除在挤压操作期间榨出油的固体。澄清的油可穿过板框过滤器以去除任何剩余的细固体颗粒。如果需要,则可将从提取过程中回收的油与澄清的油组合,以产生共混的粗油。

[0455] 一旦从粗油中剥离溶剂,则将压榨和提取的部分合并并且使其经受正常的油加工程序。如本文所用的,术语“纯化的”当与本发明的脂质或油结合来使用时通常意指提取的脂质或油已经受增加脂质/油组分的纯度的一个或多个加工步骤。例如,纯化步骤可包含由以下组成的组中的一种或多种或所有:对提取的油进行脱胶、脱臭、脱色、干燥和/或分馏。然而,如本文所用的,术语“纯化的”不包括酯基转移过程或改变本发明的脂质或油的脂肪酸组成以便增加作为总脂肪酸含量百分比的DPA含量的其它过程。换句话表示,纯化的脂质或油的脂肪酸组成基本上与未纯化的脂质或油的脂肪酸组成相同。

#### [0456] 脱胶

[0457] 脱胶为油的精炼中的早期步骤,并且其主要目的为从所述油中去除大部分磷脂,所述磷脂可作为总提取的脂质的约1%-2%存在。在70°C至80°C下将通常含有磷酸的约2%的水添加到粗油中,引起伴随着微量金属和色素的大部分磷脂分离。去除的不溶材料主要为磷脂和三酰甘油的混合物并且也被称为卵磷脂。脱胶可通过将浓磷酸添加到粗种子油中以将不能水合的磷脂转化为水合形式并且螯合所存在的次要金属来进行。通过离心作用将

胶从种子油中分离。

#### [0458] 碱精炼

[0459] 碱精炼为用于处理粗油的精炼过程之一,有时也被称为中和。它通常在脱胶之后并且在漂白之前。在脱胶之后,种子油可通过添加足够量的碱溶液以滴定所有的脂肪酸和磷酸并且去除因此形成的肥皂来处理。适合的碱材料包括氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、氢氧化锂、氢氧化钙、碳酸钙以及氢氧化铵。此过程通常在室温下进行并且去除游离脂肪酸级分。肥皂通过离心作用或者通过提取到用于肥皂的溶剂中来去除,并且中和的油用水洗涤。如果需要,则可用适合的酸如盐酸或硫酸中和油中的任何过量的碱。

#### [0460] 漂白

[0461] 漂白为一个精炼过程,其中油在漂白土(0.2%-2.0%)存在下并且在氧气缺乏下通过用氮气或蒸汽操作或者在真空中在90℃-120℃下加热10-30分钟。在油加工中的这个步骤被设计为去除不需要的色素(类胡萝卜素、叶绿素、棉子酚等),并且所述过程也去除氧化产物、微量金属、硫化物以及微量肥皂。

#### [0462] 脱臭

[0463] 脱臭为在高温(200℃-260℃)和低压(0.1-1mm Hg)下处理油和脂肪。这通常通过以约0.1ml/分钟/100ml种子油的速率将蒸汽引入种子油中来实现。在鼓泡约30分钟之后,允许种子油在真空中冷却。通常将种子油转移到玻璃容器中并且在冷冻下保存之前用氦气吹扫。此处理改进种子油的颜色并且去除大部分易挥发物质或有气味的化合物,包括任何剩余的游离脂肪酸、单酰甘油和氧化产物。

#### [0464] 冻凝

[0465] 冻凝为有时在油的商业生产中使用的过程,其用于通过在低于环境温度下结晶来将油和脂肪分离到固体(硬脂精)和液体(油精)级分中。它最初用于棉籽油,以产生无固体产物。它通常用于减少油的饱和脂肪酸含量。

#### [0466] 酯基转移

[0467] 如本文所用的,“酯基转移”意指在TAG内和在TAG之间交换脂肪酸或者将脂肪酸转移到另一种醇中以形成酯的过程。这最初涉及从TAG中释放脂肪酸以作为游离脂肪酸或者它可直接产生脂肪酸酯,优选脂肪酸甲酯或乙酯。在TAG与醇如甲醇或乙醇的酯基转移反应中,醇的烷基与TAG的酰基(包括DPA)形成酯键。当与分馏过程组合时,酯基转移可用于改变脂质的脂肪酸组成(Marangoni等,1995)。酯基转移可使用化学(例如,强酸或强碱催化的)或酶促方式,后者使用对于TAG上的脂肪酸可为位置特异性(sn-1/3或sn-2特异性的)的脂肪酶或者对一些脂肪酸具有优于其它脂肪酸的偏好(Speranza等,2012)。增加LC-PUFA在油中的浓度的脂肪酸分馏可通过本领域已知的任何方法来实现,所述方法例如像冷冻结晶、使用尿素的复合物形成、分子蒸馏、超临界流体提取、逆流色谱以及银离子络合。使用尿素的复合物形成用于简单并有效地减少油中的饱和脂肪酸和单元不饱和脂肪酸的水平的首选方法(Gamez等,2003)。初始,油的TAG通过在酸或碱催化反应条件下进行水解分成通常为脂肪酸酯形式的组成型脂肪酸,借此1mol TAG与至少3mol醇(例如,用于乙酯的乙醇或用于甲酯的甲醇)反应,其中使用过量的醇能够分离所形成的烷酯和还形成的甘油,或者通过脂肪酶进行分解。然后,通常通过处理不改变脂肪酸组成的这些游离脂肪酸或脂肪酸酯可与尿素的乙醇溶液混合,以形成复合物。饱和脂肪酸和单元不饱和脂肪酸易于与尿素复合

并且在冷却时结晶出来,并且随后可通过过滤去除。非尿素复合的级分因此富含LC-PUFA。

#### [0468] 原料

[0469] 本发明包括可用作原料的组合物。出于本发明的目的,“原料”包括用于人或动物消耗的任何食品或制品,当它们进入身体时,(a) 用于滋养或构建组织或供应能量;和/或(b) 维持、恢复或支撑足够的营养状态或代谢功能。本发明的原料包括用于婴儿和/或儿童的营养组合物,例如像婴儿配方和本发明的种子粉。

[0470] 本发明的原料包含例如本发明的细胞、本发明的植物、本发明的植物部分、本发明的种子、本发明的提取物、本发明的方法的产物、本发明的发酵过程的产物或连同一种或多种适合的载体的组合物。术语“载体”以其最广泛的含义用于涵盖可以或不具有营养价值的任何组分。如熟练技术人员将了解的,所述载体必须适用于(或者以足够低的浓度用于)原料中,以使得它对消耗原料的有机体不具有有害作用。

[0471] 本发明的原料包含油、脂肪酸酯或通过使用本文所公开的方法、细胞或植物直接或间接产生的脂肪酸。所述组合物可呈固体或液体形式。另外,所述组合物可包含对于特定使用所需要的量的可食用常量营养素、蛋白质、碳水化合物、维生素和/或矿物质。这些成分的量将根据组合物是意图用于正常个体还是用于具有指定需要的个体,如罹患代谢障碍的个体等而发生改变。

[0472] 具有营养价值的适合载体的实例包括但不限于,常量营养素如可食用脂肪、碳水化合物和蛋白质。此类可食用脂肪的实例包括但不限于,椰子油、琉璃苣油、真菌油、黑加仑油、豆油以及甘油一酯和甘油二酯。此类碳水化合物的实例包括(但不限于):葡萄糖、可食用乳糖和水解淀粉。另外,可用于本发明的营养组合物中的蛋白质的实例包括(但不限于)大豆蛋白、电渗析乳清、电渗析脱脂牛奶、牛奶乳清或这些蛋白质的水解产物。

[0473] 关于维生素和矿物质,以下各项可添加到本发明的原料组合物:钙、磷、钾、钠、氯、镁、锰、铁、铜、锌、硒、碘以及维生素A、E、D、C和B复合物。其它的此类维生素和矿物质也可添加。

[0474] 用于本发明的原料组合物中的组分可为半纯化或纯化的来源。半纯化或纯化一词意指已通过纯化自然材料或通过重新合成制备的材料。

[0475] 本发明的原料组合物也可添加到食品中,甚至在不需要膳食补充时。例如,所述组合物可添加到任何类型的食品中,包括(但不限于):人造黄油、改性黄油、奶酪、奶、酸奶、巧克力、糖果、点心、色拉油、烹调油、烹调脂肪、肉、鱼以及饮料。

[0476] 另外,根据本发明产生的脂肪酸或者转化为包含并表达主题基因的宿主细胞也可用作动物食品补充剂,以将动物组织、蛋或奶脂肪酸组成改变成对于人或动物消耗所希望的一种或多种。此类动物的实例包括羊、牛、马、家禽(如鸡)等。

[0477] 此外,本发明的原料可用于水产业,以增加鱼或甲壳类(例如像,用于人或动物消耗的对虾)中的脂肪酸水平。优选的鱼为鲑鱼。

[0478] 本发明的优选原料为植物、种子以及可直接用作人或其它动物的食物或原料的其它植物部分如叶和茎。例如,动物可直接啃食在田地中生长的此类植物或者以控制喂养的方式进食更多测量的量。本发明包括使用此类植物或植物部分作为原料以用于增加人和其它动物中的LC-PUFA水平。

[0479] 在一个实施方案中,原料为包含本发明的脂质或油的婴儿配方。如本文所用的“婴



儿配方”意指满足婴儿的至少一部分营养需要量的非天然存在的组合物。“婴儿”意指从出生到不超过一岁大的年龄范围的人受试者并且包括0至12个月的矫正年龄的婴儿。短语“矫正年龄”意指婴儿的实足年龄减去婴儿早产出生的时间量。因此,如果婴儿足月出生,则矫正年龄是婴儿的年龄。如本文所用的“非天然存在的”意指所述产品不可见于自然界中而是通过人为干预产生。如本文所用的本发明的婴儿配方排除了纯人母乳(Koletzko等, 1988)和通过非人动物产生的纯奶汁,但是本发明的婴儿配方可包含源于奶汁的组分,如奶汁蛋白质或碳水化合物,例如乳清蛋白或乳糖。本发明的婴儿配方排除了天然存在的肉类如牛肉、海豹肉、鲸鱼肉或鱼,但是本发明的婴儿配方克包含来自这些来源的组分如蛋白质。本发明的婴儿配方一直包含含有水平优选为按总脂肪酸含量计0.05%与0.5%之间的本发明的DPA的脂质。所述DPA可作为TAG、作为磷脂或作为未酯化脂肪酸或其混合物存在。本发明的脂质或油可使用本领域已知的程序并入婴儿配方中。例如,技术人员可通常使用WO 2008/027991、US20150157048、US2015094382和US20150148316中所述的程序来生产本发明的婴儿配方,其中除在此所述的多元不饱和脂肪酸中的一种或多种之外或代替它们添加DPA。

[0480] 在一个实例中,婴儿配方包含DPA(即如本文所述的 $\omega$ -3DPA),任选地和益生元,确切地为聚葡萄糖(PDX)和半乳寡聚糖(GOS)、来自非人来源的乳铁蛋白、以及其它长链多元不饱和脂肪酸(LC-PUFA)。在一些实施方案中,营养组合物还包含SDA和/或 $\gamma$ -亚麻酸(GLA)。在某些实施方案中,婴儿配方包含多至约7g/100千卡脂肪或脂质来源,更优选地为约3g/100千卡至约7g/100千卡脂肪或脂质来源,其中所述脂肪或脂质来源包含至少约0.5g/100千卡以及更优选地为约1.5g/100千卡至约7g/100千卡;多至约7g/100千卡的蛋白质或蛋白质等效来源,更优选地为约1g/100千卡至约7g/100千卡蛋白质来源或蛋白质等效来源;以及至少约5g/100千卡碳水化合物,更优选地为约5g至约25g/100千卡碳水化合物。所述婴儿配方还克包含以下各项中的一个或多个或所有:1)至少约10mg/100千卡乳铁蛋白,更优选地为约10mg/100千卡至约200mg/100千卡乳铁蛋白;2)约0.1g/100千卡至约1g/100千卡包含PDX和GOS的益生元组合物;以及3)至少约5mg/100千卡包含DHA的额外LC-PUFA(即,除DPA之外的LC-PUFA),更优选地为约5mg/100千卡至约75mg/100千卡包含DHA的额外LC-PUFA。

[0481] 在一个实施方案中,在婴儿配方的总脂肪酸含量中的DPA:DHA比率为1:3与2:1之间。EPA也可存在但是优选地为不存在的。如果存在,在总脂肪酸含量中的EPA:DPA比率优选地为小于1:2,更优选地为小于1:5。ARA也可不存在的但是优选地为存在的,优选地,在总脂肪酸含量中的ARA:DPA比率为1:3与2:1之间。最优选地,在婴儿配方中每种LC-PUFA的水平为与人母乳中所见的近似相同的,所述人母乳天然地基于母亲年龄、遗传因素、膳食摄入和营养状态而显示变化。例如,参见Koletzko等(1988)。在一个优选的实施方案中,婴儿配方不包含可检测水平的二十一碳五烯酸(HPA, 21:5 $\omega$ 3)。

[0482] 婴儿配方可以是指例如液体、粉末、凝胶、糊剂、固体、浓缩物、悬浮剂、或即用形式的肠制剂、口服配方食品、婴儿用配方食品。

[0483] 适用于本公开的益生元可包含聚葡萄糖、聚葡萄糖粉末、乳果糖、低聚乳果糖、棉子糖、低聚葡萄糖糖、菊粉、低聚果糖、低聚异麦芽糖、大豆低聚糖、低聚乳果糖、低聚木糖、壳寡糖、低聚甘露糖、低聚阿拉伯糖、唾液酸化(siallyl)低聚糖、低聚岩藻糖、低聚半乳糖

以及低聚龙胆糖。

[0484] 乳铁蛋白也可被包含在本公开的营养组合物中。乳铁蛋白为含有1-4聚糖的约80kD单链多肽,这取决于物种。不同物种的乳铁蛋白的3-D结构为非常类似的,但并不相同。每种乳铁蛋白包含两个同源叶,称为N-叶和C-叶,它们分别是指分子的N-末端和C-末端部分。

[0485] 蛋白质或蛋白质等效来源可用于本领域,如脱脂乳、乳清蛋白、酪蛋白、大豆蛋白、水解蛋白、氨基酸等。适用于实施本公开的牛乳蛋白来源包括但不限于,乳蛋白粉末、乳蛋白浓缩物、乳蛋白分离物、脱脂乳固体、脱脂乳、脱脂奶粉、乳清蛋白、乳清蛋白分离物、乳清蛋白浓缩物、甜乳清、酸乳清、酪蛋白、酸性酪蛋白、酪蛋白酸盐(例如,酪蛋白酸钠、酪蛋白酸钙钠、酪蛋白酸钙)以及其任何组合。

[0486] 适合的碳水化合物来源可任意用于本领域,例如乳糖、葡萄糖、果糖、玉米糖浆固体、麦芽糖糊精、蔗糖、淀粉、大米糖浆固体等。在营养组合物中的碳水化合物组分的量为至少约5g/100千卡并且通常可在约5g与约25g/100千卡之间变化。在一些实施方案中,碳水化合物的量为约6g与约22g/100千卡之间。在其它实施方案中,碳水化合物的量为约12g与约14g/100千卡之间。在一些实施方案中,玉米糖浆固体为优选的。此外,水解、部分水解和/或广泛水解的碳水化合物由于其易消化性而希望包含在营养组合物中。确切地说,水解的碳水化合物不太可能含有变应原性表位。适用于本文的碳水化合物材料的非限制性实例包括水解或完整的、天然或化学修饰的、源于玉米、木薯、大米或土豆的、糯性或非糯性形式的淀粉。适合的碳水化合物的非限制性实例包括各种水解的淀粉,其特征为水解玉米淀粉、麦芽糖糊精、麦芽糖、玉米糖浆、右旋糖、玉米糖浆固体、葡萄糖、以及各种其它葡萄糖聚合物以及其组合。其它适合的碳水化合物的非限制性实例包括通常被称为蔗糖、乳糖、果糖、高果糖玉米糖浆、难消化性寡糖如低聚果糖以及其组合的那些碳水化合物。

[0487] 优选地,一种或多种维生素和/或矿物质可以足以供应受试者的每日营养需要的量添加到婴儿配方中。本领域普通技术人员将理解的是,维生素和矿物质需要将例如基于儿童的年龄改变。营养组合物可任选地包含但不限于,以下维生素或其衍生物中的一种或多种:维生素B1(硫胺、硫胺素焦磷酸酯、TPP、硫胺素三磷酸酯、TTP、盐酸硫胺素、硝酸硫胺素)、维生素B2(核黄素、黄素单核苷酸、FMN、黄素腺嘌呤二核苷酸、FAD、核黄素、卵黄素)、维生素B3(尼克酸、烟酸、烟酰胺、烟碱酰胺、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、NAD、烟酸单核苷酸、NicMN,吡啶-3-羧酸)、色氨酸维生素B3-前体、维生素B6(吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、盐酸吡哆醇)、泛酸(泛酸酯、泛醇)、叶酸盐(叶酸、叶酸类似物(fblacin)、蝶酰谷氨酸)、维生素B12(钴胺素、甲基钴胺素、脱氧腺苷钴胺素、氰钴胺、羟钴胺、腺苷钴胺素)、生物素、维生素C(抗坏血酸)、维生素A(视黄醇、乙酸视黄酯、棕榈酸视黄酯、具有其它长链脂肪酸的视黄酯、视黄醛、视黄酸、视黄醇酯)、维生素D(钙化醇、胆钙化醇、维生素3,1,25,-二羟基维生素D)、维生素E( $\alpha$ -生育酚、乙酸 $\alpha$ -生育酚酯、琥珀酸 $\alpha$ -生育酚酯、烟酸 $\alpha$ -生育酚酯、 $\alpha$ -生育酚)、维生素K(维生素K1、叶绿基甲萘醌、萘醌、维生素K2、甲基萘醌-7、维生素K3、甲基萘醌-4、甲萘醌、甲基萘醌-8、甲基萘醌-8H、甲基萘醌-9、甲基萘醌-9H、甲基萘醌-10、甲基萘醌-11、甲基萘醌-12、甲基萘醌-13)、胆碱、肌醇、 $\beta$ -胡萝卜素及其任何组合。此外,所述营养组合物可任选地包含但不限于,以下矿物质或其衍生物中的一种或多种:硼、钙、乙酸钙、葡萄糖酸钙、氯化钙、乳酸钙、磷酸钙、硫酸钙、氯化物、铬、氯化铬、铬吡啶甲酸铬、铜、硫酸铜、葡糖酸铜、

硫酸铜、氟化物、铁、羧基铁、三价铁、富马酸亚铁、正磷酸铁、铁研磨、多糖铁、碘化物、碘、镁、碳酸镁、氢氧化镁、氧化镁、硬脂酸镁、硫酸镁、锰、钼、磷、钾、磷酸钾、碘化钾、氯化钾、乙酸钾、硒、硫、钠、多库酯钠、氯化钠、硒酸钠、钼酸钠、锌、氧化锌、硫酸锌及其混合物。矿物质化合物的非限制衍生物包括任何矿物质化合物的盐、碱性盐、酯以及螯合物。所述矿物质可以盐的形式添加到营养组合物中,所述盐如磷酸钙、甘油磷酸钙、柠檬酸钠、氯化钾、磷酸钾、磷酸镁、硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸铜、硫酸镁以及亚硒酸钠。可如本领域已知地添加额外维生素和矿物质。

[0488] 在一个实施方案中,本发明的或者使用本发明生产的婴儿配方不包含含有DPA的人或动物母乳或其提取物。

[0489] 在另一个实施方案中, $\omega$ -6DPA在婴儿配方的总脂肪酸含量中的水平小于2%,优选小于1%,或者为0.1%与2%之间,更优选地为不存在的。

#### [0490] 组合物

[0491] 本发明还涵盖包含使用本发明的方法产生的脂肪酸和/或所得油(优选为脂肪酸乙酯的形式)中的一种或多种的组合物,特别为药物组合物。

[0492] 药物组合物可包含脂肪酸和/或油中的一种或多种与标准的、已熟知的、无毒的药学上可接受的载体、助剂或媒剂如磷酸盐缓冲盐水、水、乙醇、多元醇、植物油、湿润剂或乳剂(如水/油乳剂)组合。所述组合物可呈液体或固体形式。例如,所述组合物可为片剂、胶囊、可摄取的液体或粉剂、可注射的或外用的软膏或霜剂的形式。适合的流动性可例如通过在分散的情况下维持所需的颗粒大小并通过使用表面活性剂来维持。可能也希望包括等渗剂,例如糖、氯化钠等。除此类惰性稀释剂之外,组合物也可以包括助剂,如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0493] 除活性化合物之外,悬浮液可包含悬浮剂,如乙氧基化异硬脂醇、聚氧化乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶、或这些物质的混合物。

[0494] 固体剂型如片剂和胶囊可使用本领域已熟知的技术制备。例如,根据本发明产生的脂肪酸可用常规片剂基质如乳糖、蔗糖和玉米淀粉与粘合剂(如阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶)、崩解剂(如马铃薯淀粉或藻酸)以及润滑剂(如硬脂酸或硬脂酸镁)组合来压片。胶囊可通过将这些赋形剂连同抗氧化剂和一种或多种相关脂肪酸并入明胶胶囊中来制备。

[0495] 对于静脉施用,根据本发明产生的脂肪酸或其衍生物可并入商业制剂中。

[0496] 特定脂肪酸的典型剂量为0.1mg至20g,每日服用一至五次(每日高达100g),并且范围优选为每日约10mg至约1、2、5或10g(以一个或多个剂量服用)。如本领域已知的,脂肪酸(特别为LC-PUFA)的最小量约300mg/天为希望的。然而,将了解,任何量的脂肪酸将有益于受试者。

[0497] 本发明的药物组合物的可能的施用路径包括例如肠内(例如,口服和直肠)和胃肠外。例如,液体制备物可口服或直肠施用。另外,均匀混合物可完全分散于水中,在无菌条件下与生理学上可接受的稀释剂、防腐剂、缓冲剂或推进剂混合,以形成喷雾剂或吸入剂。

[0498] 向患者施用的组合物的剂量可通过本领域普通技术人员确定并且这取决于多种因素,如患者体重、患者年龄、患者总体健康、患者既往病史、患者免疫状态等。

[0499] 另外,本发明的组合物可用于化妆用目的。它可添加到预先存在的化妆品组合物

中,以使得形成混合物或者根据本发明产生的脂肪酸可用作化妆品组合物中的单一“活性”成分。

#### [0500] 实施例

##### [0501] 实施例1.材料和方法

##### [0502] 基因在植物细胞的瞬时表达系统中的表达

[0503] 外源性遗传构建体在植物细胞的瞬时表达系统中表达,基本上如Voinnet等(2003)和Wood等(2009)所述的。将包含从强组成型启动子如CaMV 35S启动子表达的编码区的质粒引入到根癌土壤杆菌菌株AGL1中。将用于表达p19病毒沉默抑制物的嵌合基因35S:p19分开地引入到AGL1中,如WO 2010/057246所述的。重组土壤杆菌细胞在28℃下在补充有50mg/L卡那霉素和50mg/L利福平的LB肉汤中生长至稳定阶段。然后,通过在室温下在5000g下离心作用15min来沉淀细菌,随后将细菌在含有10mM MES pH 5.7、10mM MgCl<sub>2</sub>和100μM乙酰丁香酮的浸润缓冲液中重悬至OD<sub>600</sub>=1.0。然后将细胞在28℃下在振摇的情况下孵育3小时,之后在渗透到叶组织之前将含有35S:p19和感兴趣的一种或多种测试嵌合构建体的等体积土壤杆菌培养物混合。在获取叶盘并将其冷冻干燥以用于脂肪酸的GC分析之前,通常使植物在渗透之后另外生长五天。

[0504] 通过在甲醇/HCl/二氯甲烷(10/1/1 v/v)溶液中将样品孵育2小时,同时以已知量的十六烷酸作为内部标准来产生冷冻干燥样品中的总叶子脂质的脂肪酸甲酯(FAME)。以己烷/DCM提取FAME,将其浓缩至小体积的己烷中并将其注入GC中。基于已知量的内部标准对存在于脂质级分中的单个和总体脂肪酸的量进行定量。

##### [0505] 脂肪酸的气相色谱(GC)分析

[0506] 通过气相色谱法使用装备有30m SGE-BPX70柱(70%氰丙基聚亚苯基硅-硅氧烷、0.25mm内径、0.25mm膜厚度)、FID、分流/不分流注射器以及Agilent Technologies 7693系列自动进样器和注射器的Agilent Technologies 7890A GC(Palo Alto,California,USA)分析FAME。氦气用作载气。以分流模式(50:1比例)在150℃箱温下注入样品。在注入之后,将箱温在150℃下保持1min,然后以3℃·min<sup>-1</sup>将其升高至210℃,再次以50℃·min<sup>-1</sup>升高至240℃,并且最后在240℃下保持1.4min。基于对已知量的外部标准GLC-411(Nucheck)和C17:0-ME内部标准的响应使用Agilent Technologies ChemStation软件(Rev B.04.03(16),Palo Alto,California,USA)对峰进行定量。

##### [0507] 脂质的液相色谱-质谱(LC-MS)分析

[0508] 在添加已知量的三-C17:0-TAG作为内部定量标准之后,从冷冻干燥的发育种子、开花后十二天的种子(daf)以及成熟种子中提取总脂质。将提取的脂质以每5mg干燥材料溶解于丁醇:甲醇(1:1 v/v)中的1mL 10mM丁基化苯甲醇中,并且使用Agilent 1200系列LC和6410b电喷雾离子化三重四级杆LC-MS进行分析。使用以0.2mL/min的流速运行二元梯度的Ascentis Express RP-Amide柱(50mm x 2.1mm,2.7μm,Supelco)色谱分离脂质。流动相为:A.在H<sub>2</sub>O:甲醇:四氢呋喃(50:20:30 v/v/v)中的10mM甲酸铵;B.在H<sub>2</sub>O:甲醇:四氢呋喃(5:20:75,v/v/v)中的10mM甲酸铵。多反应监控(MRM)列表基于以下主要脂肪酸:使用30V碰撞能量和60V碎裂电压的16:0、18:0、18:1、18:2、18:3、18:4、20:1、20:2、20:3、20:4、20:5、22:4、22:5、22:6。基于氨化的前体离子和来自22:6中性丢失的产物离子鉴别单个MRM TAG。使用10μM三硬脂精外部标准对TAG进行定量。

#### [0509] 使用LC-MS进行脂质谱测定

[0510] 使用连接至Agilent 6410B电喷射电离QQQ-MS(Agilent,Palo Alto,California,USA)的Agilent 1200系列LC分析提取的总脂质。使用以0.2mL/min流速运用二元梯度的Ascentis Express RP-Amide 50mm x 2.1mm,2.7 $\mu$ m HPLC柱(Sigma-Aldrich,Castle Hill,Australia)色谱分离5 $\mu$ L注入物中的每种总脂质提取物。流动相为:A.在H<sub>2</sub>O:甲醇:四氢呋喃(50:20:30,v/v/v.)中的10mM甲酸铵;B.在H<sub>2</sub>O:甲醇:四氢呋喃(5:20:75,v/v/v.)中的10mM甲酸铵。通过多反应监控(MRM)使用30V碰撞能量和60V碎裂能量分析所选择的中性脂质(TAG和DAG)和磷脂(PL,包括PC、PE、PI、PS、PA、PG)。中性脂质靶向以下主要脂肪酸:16:0(棕榈酸)、18:0(硬脂酸)、18:1 $\omega$ 9(油酸,OA)、18:2 $\omega$ 6(亚油酸,LA)、18:3 $\omega$ 3( $\alpha$ -亚麻酸,ALA)、18:4 $\omega$ 3(十八碳四烯酸,SDA)、20:1、20:2、20:3、20:4 $\omega$ 3、20:5 $\omega$ 3、22:4 $\omega$ 3、22:5 $\omega$ 3、22:6 $\omega$ 3,同时分别扫描含有具有0-3、0-4、0-5、4-6双键的C<sub>16</sub>、C<sub>18</sub>、C<sub>20</sub>和C<sub>22</sub>物质的磷脂。

[0511] 基于氨化的前体离子和来自20:1、SDA、EPA和DHA中性丢失的产物离子鉴别单个MRM TAG。使用50 $\mu$ M三硬脂精和二硬脂精作为外部标准对TAG和DAG进行定量。使用10 $\mu$ M二-18:0-PC、二-17:0-PA、二-17:0-PE、17:0-17:1-PG、二-18:1-PI和二-17:0-PS外部标准(Avanti Polar Lipids,Alabaster,Alabama,USA)对PL进行定量。通过Agilent 6520Q-TOF MS/MS进一步确认所选择的TAG、DAG和PL物质。

#### [0512] 种子脂肪酸谱和油含量的确定

[0513] 在种子油含量待确定的情况下,将种子在干燥器中干燥24h并且将大约4mg种子转移到具有特氟龙内衬的螺旋盖的2ml玻璃小瓶中。将溶解于0.1ml甲苯中的0.05mg十七烷酸甘油三酯(triheptadecanoin)作为内部标准添加到所述小瓶中。

[0514] 通过将0.7ml 1N甲醇HCl(Supelco)添加到含有种子材料的小瓶中,短暂涡旋并在80℃下孵育2h来制备种子FAME。在冷却至室温之后,将0.3ml 0.9%NaCl(w/v)和0.1ml己烷添加到小瓶中并且在Heidolph Vibramax 110中良好混合10min。将FAME收集到0.3ml玻璃衬管中并且通过具有如先前所提及的火焰离子化检测器(FID)的GC进行分析。

[0515] 首先在存在于商业标准GLC-411(NU-CHEK PREP,INC.,USA)中的已知量的相同FAME的峰面积响应的基础上校正单个FAME的峰面积。GLC-411含有等量的31种脂肪酸(按重量计%),范围为C8:0至C22:6。在不存在于标准中的脂肪酸的情况下,发明人获得最类似的FAME的峰面积响应。例如,16:1d9的FAME的峰面积响应用于16:1d7并且C22:6的FAME响应用于C22:5。校正的面积用于通过与内部标准质量比较来计算样品中的每种FAME的质量。油主要以TAG形式保存并且其重量基于FAME重量进行计算。甘油的总摩尔数通过计算每种FAME的摩尔数并将FAME的总摩尔数除以三来确定。TAG使用以下关系计算为甘油和脂肪酰基部分的和:按重量计油%=100x((41x总摩尔数FAME/3)+(总g FAME-(15x总mol FAME)))/g种子,其中41和15分别为甘油部分和甲基的分子量。

#### [0516] 油样品的甾醇含量的分析

[0517] 使用4mL在80%MeOH中的5%KOH皂化大约10mg油与添加的作为内部标准的等份C24:0一元醇一起的样品并且在80℃下在特氟龙内衬的螺旋盖的玻璃管中加热2h。在反应混合物冷却之后,添加2mL Milli-Q水,并且通过振摇和涡旋将甾醇提取到2mL己烷:二氯甲烷(4:1 v/v)中。将混合物离心作用并且移去甾醇提取物并用2mL Milli-Q水洗涤。然后,在振摇和离心作用之后移去甾醇提取物。使用氮气流蒸发提取物并且使用200mL BSTFA并且

在80℃下加热2h将甾醇甲硅烷基化。

[0518] 对于甾醇的GC/GC-MS分析,在氮气流下在40℃下在加热块上干燥甾醇-OTMSi衍生物,并且然后将其重新溶解于氯仿或己烷中,之后立即进行GC/GC-MS分析。通过气相色谱法(GC)使用装配有Supelco Equity™-1融合石英毛细管柱(15m x 0.1mm内径,0.1μm膜厚度)、FID、分流/不分流注入器以及Agilent Technologies 7683B Series自动进样器和注入器的Agilent Technologies 6890A GC(Palo Alto,California,USA)分析甾醇-OTMS衍生物。氦气为载气。以不分流模式在120℃箱温下注入样品。在注入之后,箱温升以10℃min<sup>-1</sup>升高至270℃并最终在5℃min<sup>-1</sup>升高至300℃。使用Agilent Technologies ChemStation软件(Palo Alto,California,USA)对峰进行定量。GC结果经受单个组分区域的±5%的误差。

[0519] 在Finnigan Thermoquest GCQ GC-MS和Finnigan Thermo Electron Corporation GC-MS上进行GC-质谱(GC-MS)分析;两个系统均装配有柱上进样器和Thermoquest Xcalibur软件(Austin,Texas,USA)。每个GC均装配有与以上所述类似的极性的毛细管柱。使用质谱数据并且通过将保留时间数据与对于真正的和实验室标准所获得的那些数据进行比较来鉴别单个组分。与样品批次同时进行全程序空白分析。

[0520] RT-PCR条件

[0521] 通常根据制造商说明书使用Superscript III One-Step RT-PCR系统(Invitrogen)以25μL体积使用10pmol正向引物和30pmol反向引物、最终浓度2.5mM的MgSO<sub>4</sub>、具有缓冲液的400ng总RNA以及核苷酸组分进行逆转录-PCR(RT-PCR)扩增。典型的温度状况为:对于要发生的逆转录,45℃持续30分钟的1个循环;然后94℃持续2分钟的1个循环,然后为94℃持续30秒、52℃持续30秒、70℃持续1分钟的40个循环;然后72℃持续2分钟的1个循环,之后将反应混合物冷却至5℃。

[0522] 通过用35S-LEC2诱导产生欧洲油菜体细胞胚

[0523] 使用氯气对欧洲油菜(cv.Oscar)种子进行灭菌,如(Attila Kereszt等,2007)所述的。使灭菌的种子在具有0.8%琼脂的调整至pH 5.8的1/2强度MS培养基(Murashige和Skoog,1962)中发芽,并且在24℃下在荧光照明(50μE/m<sup>2</sup>s)下以18/6h(白天/夜晚)光周期生长6-7天。将具有2-4mm柄长度的子叶叶柄从这些幼苗中无菌地分离并且将其用作外植体。转化的根癌土壤杆菌菌株AGL1的培养物(一种含有种子特异性二元载体并且第二种具有35S-LEC2构建体)从来自新板的单一菌落中接种并且在具有适当抗生素的10mL LB培养基中生长并且在28℃下在以150rpm搅动下生长过夜。细菌细胞通过在4000rpm下离心作用5分钟来收集,然后用含有2%蔗糖的MS培养基洗涤并且将其重悬于10mL相同培养基中,并且在添加乙酰丁香酮至100μM之后在适当的用于选择的抗生素的情况下生长4小时。在添加到植物组织之前两小时,添加亚精胺,到最终浓度1.5mM并且用新鲜培养基将细菌的最终密度调节至OD<sub>600nm</sub>=0.4。两种细菌培养物,一种携带种子特异性构建体并且另一种携带35S-AtLEC2,将它们以1:1至1:1.5的比率混合。

[0524] 用20mL根癌土壤杆菌培养物感染新鲜分离的欧洲油菜籽叶叶柄6分钟。用无菌滤纸吸干子叶叶柄以去除过量的根癌土壤杆菌,并且然后将其转移到共培养培养基中(具有1mg/L TDZ、0.1mg/L NAA、补充有L-半胱氨酸(50mg/L)、抗坏血酸(15mg/L)和MES(250mg/L)的100μM乙酰丁香酮的MS培养基)。用微孔胶带密封板并且在黑暗中在24℃下孵育48h。将共培养外植体转移到选择前的培养基中(含有1mg/L TDZ、0.1mg/L NAA、3mg/L AgNO<sub>3</sub>、250mg/L

L头孢噻肟以及50mg/L特美汀的MS)并且在24℃下以16h/8h光周期培养4-5天。然后根据种子特异性载体上的可选择标记基因,将外植体转移到选择培养基中(含有1mg/L TDZ、0.1mg/L NAA、3mg/L AgNO<sub>3</sub>、250mg/L头孢噻肟以及50mg/L特美汀的MS)并且在24℃下以16h/8h光周期培养2-3周。将具有绿色胚性愈伤组织的外植体转移到无激素MS培养基(具有3mg/L AgNO<sub>3</sub>、250mg/L头孢噻肟、50mg/L特美汀和选择剂的MS)并且另外培养2-3周。使用GC分析在选择培养基上从存活的外植体中分离的鱼雷期或子叶期胚的总脂质中的脂肪酸组成。

#### [0525] 通过数字PCR确定转基因的拷贝数目

[0526] 为了确定转基因植物中的转基因拷贝数目,如以下地使用数字PCR方法。此方法还可用于确定植物对于本文所述的遗传构建体是否为转基因的。从每株单独的植物中收获约一平方厘米的叶组织并且将其置于收集的微管(Qiagen)中。然后将样品冷冻干燥24h至48h。对于破坏样品以进行DNA提取,将不锈钢滚珠轴承添加到每种干燥的样品中并且在Qiagen Tissue研磨器上振摇所述管。将375μL提取缓冲液(0.1M Tris-HCl pH8、0.05M EDTApH8和1.25% SDS)添加到每个管中,在65℃下将混合物孵育1h,并且然后冷却,之后将187μL 6M乙酸铵(4℃)添加到每个管中,同时彻底混合。然后将样品以3000rpm离心作用30min。将来自每个管的上清液移入到各自包含220μL异丙醇的新的微管中,以在室温下使DNA沉淀5min。通过将管以3000rpm离心作用30min来收集DNA,用320μL 70%乙醇洗涤DNA沉淀并且干燥,之后将DNA重悬于225μL水中。通过以3000rpm离心作用20min来沉淀未溶解的材料,并且将150μL每种上清液转移到96孔板上,以用于长期保存。

[0527] 对于有效的和定量的数字PCR(ddPCR),在扩增反应之前通过限制性酶消化DNA,以确保转基因的多个拷贝或多个插入物实体上分开。因此,用一起在20μL体积中的EcoRI和BamHI、使用10x EcoRI缓冲液、5μL DNA和每种样品约4个单位的每种酶消化等份的DNA制备物,在37℃下孵育过夜。

[0528] 使用Primer3软件设计在这些PCR反应中使用的引物,以确认参考基因和靶基因的引物没有预计会相互作用的或者此类相互作用在所使用的条件下不成问题。在测定中使用的参考基因为油菜Hmg(高迁移率组)基因,其存在于每个油菜基因组的一个基因处(Weng等,2004)。由于油菜为异源四倍体,则明白的是,在欧洲油菜中存在4个拷贝的Hmg基因,即两个基因中的每一个的2个等位基因。参考基因反应使用成对的引物和双重标记探针,如下:有义引物,Can11 GCGAAGCACATCGAGTCA (SEQ ID NO:43);反义引物,Can12 GGTGAGGTGGTAGCTGAGG (SEQ ID NO:44);探针,Hmg-P35'-Hex/TCTCTAC/zen/CCGTCTCACATGACGC/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO:45)。扩增产物大小为73bp。

[0529] 在检测PPT可选择标记基因区域以筛选所有转基因植物的一个靶基因扩增反应中,有义引物为Can17,ATACAAGCACGGTGGATGG (SEQ ID NO:46);反义引物为Can18TGGTCTAACAGGTCTAGGAGGA (SEQ ID NO:47);探针为PPT-P35'-/FAM/TGGCAAAGA/zen/GATTCGAGCTTCCTGC/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO:48)。此靶基因扩增产物的大小为82bp。在一些情况下,与检测T-DNA的部分插入物平行地进行第二靶基因测定。此第二测定使用有义引物Can23 CAAGCACCGTAGTAAGAGAGCA (SEQ ID NO:49)、反义引物Can24 CAGACAGCCTGAGGTTAGCA (SEQ ID NO:50);探针D6des-P3 5'-/FAM/TCCCCACTT/zen/CTTAGCGAAAGGAACGA/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO:51)检测Δ6-去饱和酶基因的区域。此靶基

因扩增产物的大小为89bp。反应通常使用2 $\mu$ L消化的DNA制备物。每种样品的反应组合物:参考有义引物(10pM),1 $\mu$ L;参考反义引物(10pM),1 $\mu$ L;参考基因探针(10pM),0.5 $\mu$ L;靶基因有义引物(10pM),1 $\mu$ L;靶基因反义引物(10 pM),1 $\mu$ L;靶基因探针(10 pM),0.5 $\mu$ L;ddPCR试剂混合物,12.5 $\mu$ L;水5.5 $\mu$ L,总体积为25 $\mu$ L。

[0530] 然后将混合物放置到QX100微滴发生器中,所述微滴发生器将每种样品分为20000纳升大小的微滴。这在8-孔盒中进行,直到所有样品均加工并转移到96-孔PCR板上为止。然后使用可穿刺箔、使用板密封机热封此板。然后,在以下反应条件下处理样品:95 $^{\circ}$ C,10min,以2.5 $^{\circ}$ C/s升温;然后94 $^{\circ}$ C、以2.5 $^{\circ}$ C/s升温30s的39个循环;61 $^{\circ}$ C,1min,以2.5 $^{\circ}$ C/s升温;98 $^{\circ}$ C,10min,随后冷却至12 $^{\circ}$ C。在微滴中的DNA扩增反应之后,将板置于QX100微滴读取器中,所述读取器使用两色检测系统(设定为检测FAM或Hex)单独地分析各个微滴。微滴数字PCR数据作为1-D曲线查看(其中每个微滴来自在荧光密度图中标注的样品)或作为2-D曲线查看(其中荧光(FAM)针对每个微滴的荧光(Hex)作图)。软件测量每种样品中的每个荧光团的阳性和阴性微滴(FAM或Hex)的数目。然后软件将阳性微滴的分数拟合Poisson算法,以确定以拷贝/ $\mu$ L输入为单位的靶DNA分子的浓度。使用下式计算拷贝数目变化:CNV = (A/B) \* Nb,其中A=靶基因浓度,B=参考基因浓度,并且Nb=4,为基因组中的参考基因拷贝数目。

#### [0531] 花粉生活力的评估

[0532] 以2mg/ml将荧光素二乙酸酯(FDA)溶解于丙酮中,以提供储备溶液。仅在使用之前通过将数滴FDA储备溶液添加到2ml蔗糖溶液(0.5M)中直到实现饱和(如通过持续混浊的外观所指示的)为止来制备FDA稀释液。

[0533] 将碘化丙啶(PI)以1mg/ml溶解于无菌蒸馏水中,以提供储备溶液。仅在使用之前,将100 $\mu$ L储备溶液添加到10ml无菌蒸馏水中,以制备工作溶液。为了检查活力和无活力花粉的比率,以2:3比率混合PI和FDA储备溶液。

[0534] 使转基因和野生型油菜和芥菜植物在标准条件下在22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C的每天16h光周期的温室中生长。在第二天早上9-10am标记并收集准备好在下一天开花的成熟花蕾。用FDA/PI混合物对来自开放的花的花粉染色并且使用Leica MZFLIII荧光显微镜观察。具有480/40nm激发滤光片的GFP-2(510nm长通发射滤光片)(传送红光和绿光)用于检测有活力的和无活力的花粉。受到PI染色的无活力花粉在荧光显微镜下表现为红色,而有活力花粉在用PI和FDA染色时表现为亮绿色。

#### [0535] 实施例2.转基因DHA路径在亚麻荠种子中的稳定表达

[0536] 将二元载体pJP3416-GA7(参见图2和SEQ ID NO:1)引入到根癌土壤杆菌菌株AGL1并且使用用于转化的花浸渍法将来自转化的土壤杆菌属的培养物的细胞用于处理亚麻荠开花植物(Lu和Kang,2008)。在植物生长并成熟之后,收获来自处理的植物的T<sub>1</sub>种子,将其播种到土壤中,并且通过用除草剂BASTA喷洒来处理所得的植物,以选择对于存在于pJP3416-GA7的T-DNA上的bar可选择标记基因为转基因的或者表达所述标记基因的植物。在允许它们自花授粉之后,对除草剂耐受的存活T<sub>1</sub>植物生长至成熟,并且收获所得的T<sub>2</sub>种子。获得五种转基因植物,其中仅三种包含整个T-DNA。

[0537] 从来自含有整个T-DNA的三种植物中的每一种的大约二十个种子集合中提取脂质。集合的样品中的两种包含极低的、几乎不可检测的水平DHA,但第三种集合包含约4.7%DHA。因此,从来自此植物的10个单独的T<sub>2</sub>种子中提取脂质并且通过GC分析脂肪酸组



成。此转化品系的单独的种子的脂肪酸组成数据也示出在表4中。从总的种子脂质谱(表4)中汇编的数据示出在表5中。

[0538] 表4.来自用pJP3416-GA7的T-DNA转化的转基因T<sub>2</sub>亚麻荠种子中的总种子脂质的脂肪酸组成。对于集合的种子批次(FD5.46)并且对于从最高至最低DHA排列(左到右)的10个单一种子示出脂肪酸组成。

脂肪酸	FD5.46 集合的	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
14:0	0	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2
16:0	11.6	12.1	12.3	12.1	13.2	12.3	12.8	11.9	11.4	11.5	11.7
16:1	0.2	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2
16:3	0.3	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18:0	3.7	3.3	3.2	3.2	3.0	3.1	3.2	3.3	3.1	3.2	3.2
18:1	10.8	8.0	8.0	8.6	8.5	9.4	11.0	10.2	8.3	9.4	8.6
18:1d11	1.7	1.3	1.4	1.4	1.7	1.4	1.5	1.3	1.3	1.3	1.3
18:2	24.7	18.2	19.5	19.2	18.5	20.1	23.8	32.2	30.3	29.8	31.6
18:3ω3	27.4	26.7	26.6	27.3	28.9	28.2	27.4	28.3	29.2	29.5	28.2
18:3ω6	0.2	1.4	0.3	0.3	0.4	0.2	0.5	0.0	0.5	0.4	0.6
20:0	1.6	1.4	1.3	1.4	1.2	1.4	1.4	1.8	2.1	1.9	2.0
18:4ω3	2.2	6.8	6.4	5.7	7.2	5.7	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0
20:1d11	5.3	4.4	4.6	4.8	3.3	4.1	3.5	4.4	6.1	5.8	5.5
20:1iso	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.5	0.6	0.5	0.5

20:2ω6	0.8	0.8	0.9	0.8	0.6	0.8	0.7	1.3	1.5	1.4	1.4
20:3ω3	0.6	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6
22:0	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6
20:4ω3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
22:1	1.1	1.1	1.2	1.1	0.5	0.9	0.8	1.6	2.2	1.9	2.0
20:5ω3	0.7	1.3	1.6	1.5	1.6	1.1	1.7	0.0	0.0	0.0	0.1
22:2ω6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.2	0.2
22:4ω6+22:3ω3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.0	0.3	0.0	0.4	0.6	0.5	0.5
24:0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.3	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4
24:1	0.3	0.4	0.4	0.3	0.0	0.3	0.0	0.5	0.6	0.5	0.5
22:5ω3	0.3	1.1	1.2	1.1	1.1	0.9	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0
22:6ω3	4.7	9.0	8.5	8.3	8.3	7.1	4.9	0.0	0.0	0.0	0.0

[0541] 表5.从来自转基因种子的总种子脂质谱中汇编的数据如表4所示。计算不包括表4中的‘次要脂肪酸’。

参数	FD5.46 集合的	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
总 w3 (对于总 FA 的%)	36.1	46	45.4	45	48.2	44.2	40.1	28.9	29.9	30.2	28.9
总 w6 (对于总 FA 的%)	25.8	20.4	20.7	20.3	19.5	21.1	25	33.7	32.6	31.8	33.8
w3 / w6 比率	1.40	2.25	2.19	2.22	2.47	2.09	1.60	0.86	0.92	0.95	0.86
w6 / w3 比率	0.71	0.44	0.46	0.45	0.40	0.48	0.62	1.17	1.09	1.05	1.17
总的新 w3 (对于总 FA 的%)	8.1	18.5	18	16.9	18.6	15.2	12	0	0	0	0.1
总的新 w6 (对于总 FA 的%)	1.1	2.2	1.2	1.1	1	1	1.2	1.5	2.3	2	2.2
新 w3 / w6 比率	7.36	8.41	15.00	15.36	18.60	15.20	10.00				0.05
新 w6 / w3 比率	0.14	0.12	0.07	0.07	0.05	0.07	0.10				22.00
OA 至 EPA 的效率	8.2%	15.6%	15.5%	15.1%	15.1%	12.8%	10.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
OA 至 DHA 的效率	6.7%	12.3%	11.6%	11.5%	11.4%	10.0%	7.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
LA 至 EPA 的效率	9.2%	17.2%	17.1%	16.7%	16.2	13.9	11.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%

[0543]

					%	%					
<b>LA 至 DHA 的效率</b>	7.6%	13.6%	12.9%	12.7%	12.3%	10.9%	7.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<b>ALA 至 EPA 的效率</b>	15.8%	24.8%	24.9%	24.2%	22.8%	20.6%	18.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%
<b>ALA 至 DHA 的效率</b>	13.0%	19.6%	18.7%	18.4%	17.2%	16.1%	12.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<b>总饱和物</b>	17.6	17.8	17.8	17.6	18	17.8	18.1	18.2	17.7	17.8	18.1
<b>总单不饱和物</b>	19.8	15.5	16	16.6	14.3	16.6	16.8	18.7	19.3	19.6	18.6
<b>总多元不饱和物</b>	62.5	66.6	66.4	65.6	67.7	65.6	65.1	63	63.1	62.5	63.2
<b>总 C20</b>	9.6	9.3	9.8	9.9	8.1	8.9	8.5	8.6	11	10.3	10.1
<b>总 C22</b>	5.4	10.3	10	9.7	9.4	8.3	5.7	0.6	0.9	0.7	0.7
<b>C20/C22 比率</b>	1.78	0.90	0.98	1.02	0.86	1.07	1.49	14.33	12.22	14.71	14.43

[0544] DHA存在于10个单独的种子中的六个中。四个其它的种子不具有DHA并且基于亲本植物中的T-DNA插入物的半合子状态推测为不具有T-DNA的无效分离体。从具有最高水平的DHA的单一种子中提取的脂质具有9.0%DHA,而EPA、DPA和DHA的百分比总和为11.4%。在此种子中由于转化(SDA、ETrA、ETA、EPA、DPA、DHA)产生的新 $\omega$ 3脂肪酸的百分比总和为19.3%,而新 $\omega$ 6脂肪酸(GLA、EDA、DGLA、ARA以及任何 $\omega$ 6延伸产物)的对应总和为2.2%-仅GLA和EDA检测为新 $\omega$ 6脂肪酸。

[0545] 发现总 $\omega$ 6FA(包括LA)与 $\omega$ 3FA(包括ALA)的比率为0.44。在具有最高DHA水平的种子中,新 $\omega$ 6FA(排除LA)与新 $\omega$ 3FA(排除ALA)的比率为0.12。总饱和脂肪酸的水平为约17.8%并且单元不饱和脂肪酸的水平为约15.5%。总 $\omega$ 6-脂肪酸的水平为约20.4%并且 $\omega$ 3-脂肪酸的水平为约46%。总体转化效率计算为:0A至EPA=15.6%,0A至DHA=12.3%,LA至EPA=17.2%,LA至DHA=13.6%,ALA至EPA=24.8%,ALA至DHA=19.6%。

[0546] 在T4代获得来自此品系的纯合种子。在整个T4代观察到平均7.3%DHA的事件FD5-46-18-110中产生高达10.3%DHA。建立后一代(T5)以进一步测试PUFA产生在多代的稳定性,特别为DHA。发现所观察到的最大DHA水平在第五代稳定的,虽然集合的种子DHA含量并不稳定,直到T<sub>4</sub>代由于多个转基因的基因座的存在而稳定。T<sub>5</sub>种子批次也在MS培养基中体外发芽,旁边为亲本亚麻荠种子,其中没有观察到发芽效率或速度的明显差异。其它代的转基因品系(T6代、T7代)没有显示种子DHA水平的任何减少。转基因植物为完全雄性和雌性可育的,并且花粉显示关于野生型植物的约100%生活力。具有不同水平的DHA的种子的油含量的分析不能确定DHA水平与油含量之间的相关性,这与拟南芥中所看见的相关性相反。

[0547] 在若干另外的转基因品系中,来自独立的事件的单一种子的DHA含量超过12%。发现这些品系的转基因:无效基因比率为约3:1与15:1之间。对来自每个构建体的顶部DHA样品的代表性脂肪酸谱的分析仅发现1.2-1.4%GLA,其中没有检测到其它新 $\omega$ 6PUFA。相比之下,发现新 $\omega$ 3 PUFA(SDA) $\omega$ 3 LC-PUFA(ETA、EPA、DPA、DHA)积累至18.5%,其中DHA水平为总脂肪酸含量的9.6%。 $\Delta$ 6-去饱和为总脂肪酸含量的32%并且EPA为0.8%。 $\Delta$ 5-延伸效率为93%并且 $\Delta$ 6-延伸效率为60%。在GA7品系的极性种子脂质级分中检测到DHA。

[0548] 注意,所观察到的分离比率(~3:1至~15:1)指示需要一个或至多两个转基因的基因座在亚麻荠中产生鱼油样水平的DHA。这对于便于培育转基因特性以及对于转基因稳定性具有重要意义。

[0549] 将纯合种子种植于若干温室中,以生成总计超过600株单独的植物。使用多种方法从种子中提取油,所述方法包括索格利特提取、丙酮提取和己烷提取。

[0550] 对转基因亚麻荠种子油进行<sup>13</sup>C NMR区域专一性分析,以确定 $\omega$ 3 LC-PUFA在TAG上

的位置分布。选择具有近似相等EPA和DHA的事件,以使对这些脂肪酸的响应最大化,并且发现sn-1,3与sn-2的比率对于EPA为0.75:0.25并且对于DHA为0.86:0.14,其中无偏差分布为0.66:0.33。即,75%EPA和86%DHA位于TAG的sn-1,3位置上。这指示两种脂肪酸优选位于亚麻荠TAG的sn-1,3位置上,尽管对EPA的偏好弱于对DHA的偏好。DHA主要见于sn-1,3上的发现与先前报道的拟南芥种子的结果类似(Petrie等,2012)。

[0551] 实施例3.对编码植物种子中的DHA路径的T-DNA的修饰

[0552] 为了提高欧洲油菜中的DHA产生的水平使其超过W02013/185184所述的水平,如W02013/185184所述地构建二元载体pJP3416-GA7-modA、pJP3416-GA7-modB、pJP3416-GA7-modC、pJP3416-GA7-modD、pJP3416-GA7-modE以及pJP3416-GA7-modF并在转基因植物中测试它们。这些二元载体为pJP3416-GA7构建体的变体,并且被设计为具体地通过改善 $\Delta 6$ -去饱和酶和 $\Delta 6$ -延伸酶的功能来进一步增加DHA在植物种子中的合成。已观察到SDA在用GA7构建体转化的一些种子中积累,这是由于与 $\Delta 5$ -延伸酶相比的相对低的 $\Delta 6$ 延伸效率,因此在其它修饰中,在T-DNA中切换两个延伸酶基因的位置。

[0553] 在pJP3416-GA7中的两个延伸酶编码序列在T-DNA的位置中切换,以通过首先将新P.cordata  $\Delta 6$ -延伸酶盒克隆到pJP3416-GA7的SbfI位点之间以置换P.cordata  $\Delta 5$ -延伸酶盒,从而产生pJP3416-GA7-modA。通过将驱动细小微胞藻 $\Delta 6$ -去饱和酶的FP1启动子与conlinin Cn12启动子(pLuCn12)交换来产生pJP3416-GA7-modB,从而进一步修饰此构建体。这种修饰试图增加 $\Delta 6$ -去饱和酶表达并因此增加酶的效率。认为Cn12启动子在欧洲油菜中可能比截短的启动子产生更高的转基因表达。

[0554] 生成八种转基因pJP3416-GA7-modB拟南芥事件和15种转基因pJP3416-GA7-modG拟南芥事件。在集合的pJP3416-GA7-modB种子中观察到3.4%与7.2%之间的DHA,并且在集合的T2 pJP3416-GA7-modG种子中观察到0.6%与4.1%之间的DHA。将若干种最高pJP3416-GA7-modB的事件播种到可选择培养基中并且从下一代中获取存活的幼苗。分析种子的DHA含量。由于集合的T1种子代表转基因分离的植物并且包括任何所有无效的分离体,预期的是来自后代植物的纯合种子具有增加的水平的DHA,其高达种子油中的总脂肪酸含量的30%。使用其它修饰的构建体转化拟南芥。尽管仅获得少量转化的品系,没有产生高于modB构建体的DHA水平。

[0555] pJP3416-GA7-modB构建体也用于生成转化的栽培变种Oscar和一系列培育品种(表示为NX002、NX003、NX005、NX050、NX052以及NX054)的欧洲油菜植物。获得总计1558株转化的植物,包括Oscar转化的77株独立的转化植物(T0)和培育品系的762株独立的植物,包括189株NX005,其为由于FAD2基因中的突变而在其种子油中具有高油酸含量的品系。其它培育品系具有较高水平的LA和ALA。丢弃如通过数字PCR方法(实施例1)确定的展示多于4个T-DNA拷贝的转基因植物;按照这个标准丢弃约25%的T0植物。如通过数字PCR方法确定的,约53% T0转基因植物具有1或2个T-DNA拷贝,12%具有约3个拷贝并且24%具有4个或更多个拷贝。在自花授粉之后从约450株转基因品系中收获种子(T1种子),所述自花授粉通过在开花期间将植物装袋以避免异系繁殖来实现。在成熟时从其余转基因植物中收获T1种子。约1%-2%植物品系为雄性或雌性可育的,并且产生无活性种子,丢弃这些T0植物。

[0556] 测试种子集合(每个集合20个T1种子)的集合的种子油中的DHA水平,并且选择显示最高水平的品系。具体地说,选择具有集合的T1种子的总脂肪酸含量的至少2%的DHA水

平的品系。以这种方式选择约15%的转基因品系;丢弃其它85%。这些中的一些指示品系CT132-5(在栽培变种Oscar中)、CT133-15、-24、-63、-77、-103、-129以及-130(在NX005中)。选择的NX050中的品系包括CT136-4、-8、-12、-17、-19、-25、-27、-49以及-51。浸泡来自所选择的品系的二十种种子(包括CT132.5)和来自CT133.15的11种种子,并且在两天之后,从来自每个单独种子的一半子叶中提取油。保留具有胚轴的另一半子叶,并且在培养基上培养以维持特定后代的品系。确定油中的脂肪酸组成;在表6中示出CT132.5的数据。在所分析的20种种子中的10种中的DHA水平的范围为总脂肪酸含量的7%-20%,如通过GC分析确定的。其它种子具有少于7%DHA并且可包含来自pJP3416-GA7-modB的T-DNA的部分(不完整)拷贝。转基因品系似乎包含在遗传上不连接的多个转基因插入物。转基因品系CT133.15的种子展示范围为0-5%的DHA水平。没有DHA的种子可能为无效分离体。这些数据证实modB构建体在油菜种子中进行良好的DHA产生。

[0557] 单独地测试在自花授粉之后从多种T1植物中的每一种(从所选择的转化品系)中获得的二十个或40个单独的种子(T2种子)的脂肪酸组成。鉴别出包含大于20%的DHA的种子(表7)。两种代表性样品CT136-27-18-2和CT136-27-18-19分别具有21.2%和22.7%DHA。这些种子中的总 $\omega$ 3脂肪酸含量作为总脂肪酸含量的百分比为约60%,并且 $\omega$ 6含量少于10%。测试来自每一种T1植物的另外几组20个或40个T2种子的脂肪酸组成。鉴别出包含高达34.3%DHA的种子,例如在种子C T136-27-47-25中(表9)。从CT136-27-47-25获得的种子油的脂肪酸组成示出在表9中。脂肪酸组成包括34.3%DHA与约1.5%DPA、0.6%EPA和0.5%ETA一起。SDA水平为约7.5%,ALA为21.9%并且LA为约6.9%。新 $\omega$ 6 PUFA展示1.1%GLA,但没有可检测的 $\omega$ 6-C20或-C22 LC-PUFA。总饱和脂肪酸:9.6%;单元不饱和脂肪酸,12.5%;总PUFA,75.2%;总 $\omega$ 6-PUFA(包括LA),7.2%;总 $\omega$ 3-PUFA,66.9%;总 $\omega$ 6: $\omega$ 3脂肪酸的比率,9.3:1;新 $\omega$ 6:新 $\omega$ 3脂肪酸,37:1。从油酸到DHA的每个酶促步骤的效率如下: $\Delta$ 12-去饱和酶,90%; $\Delta$ 15/ $\omega$ 3-去饱和酶,89%; $\Delta$ 6-去饱和酶,67%; $\Delta$ 6-延伸酶,83%; $\Delta$ 5-去饱和酶,99%; $\Delta$ 5-延伸酶,98%; $\Delta$ 4-去饱和酶,96%。油酸转化为DHA的总体效率为约50%。因此,清楚的是,可鉴别并选择产生范围为种子油的总脂肪酸含量的20.1%-35%的DHA的种子,包括在总脂肪酸含量中具有20.1%与30%之间的DHA或者30%与35%之间的DHA的种子。

[0558] 在一些种子中油含量从野生型种子中的约44%降低至一些产生DHA的种子中的约31%-39%,但是在其它产生DHA的种子中与野生型水平类似。

[0559] 将在T2种子中产生至少10%的水平的DHA的不同的转化植物品系杂交并且将F1后代自交,以便产生对于多个T-DNA插入物为纯合的F2后代。分析来自纯合种子的种子油并且种子油中高达总脂肪酸含量的30%或35%为DHA。

[0560] 通过 $^{13}\text{C}$  NMR区域专一性测定分析从CT136-27-18-2和CT136-27-18-19中获得的油中的TAG,以用于确定DHA在TAG分子的甘油主链上的位置分布。DHA优选连接在sn-1,3位置上。多于70%,确切的为多于90%的DHA处于sn-1,3位置上。

[0561] 也将pJP3416-GA7-modB和pJP3416-GA7-modF构建体用于生成转化的亚麻荠植物,如实施例2所述的。获得至少24株独立转化的植物(T0)并且通过后代分析更仔细地进行检查。从这些转基因品系中收获种子(T1种子)。测试种子集合的种子油中的DHA水平,并且选择显示最高DHA水平(在6%与9%之间)的6种品系。分析来自每种品系的20个T1种子中的

DHA水平-大部分种子展示范围为总脂肪酸含量的6%-14%的DHA水平,如通过GC分析确定的。确定油中的脂肪酸组成;在表8中示出若干种转基因种子的数据。

[0562] 在若干另外的转基因品系中,来自独立的事件的单一种子的DHA含量超过12%。发现这些品系的转基因:无效基因比率为约3:1(这与单一转基因的基因座相对应)或者15:1(这与两个转基因的基因座相对应)。对来自具有最高水平DHA的每个构建体的样品的代表性脂肪酸谱的分析仅发现1.2%-1.4%GLA,其中没有检测到其它新 $\omega$ 6 PUFA。相比之下,对于modF构建体,新 $\omega$ 3 PUFA(SDA)和 $\omega$ 3 LC-PUFA(ETA、EPA、DPA、DHA)积累至总计25.8%,并且对于modG构建体积累至21.9%,这与GA7-转化的种子的18.5%相比较。来自这些种子的油中的DHA水平分别为9.6%、12.4%和11.5%。发现 $\Delta$ 6-去饱和在GA7-转化的种子中低于在modF-和modG-转化的种子(32%对比47%和43%)中,并且这导致在modF和modG种子中相对于GA7的ALA减少。另一个值得注意的不同为EPA在modF种子中的积累(3.3%对比其它两种转基因种子中的0.8%),并且这反映为在modF(80%)种子中观察到的 $\Delta$ 5-延伸相对于GA7和modG种子(93%和94%)的减少。这些种子中的 $\Delta$ 6-延伸存在稍微的增加(66%对比60%和61%),尽管实际上SDA的量由于稍微更有活性的 $\Delta$ 6-去饱和而有所增加。在GA7品系的极性种子脂质级分中检测到DHA。

[0563] 分析用modB构建体T-DNA转染的70株独立的欧洲油菜育种品系NX54转基因植物的T1种子中的脂质的脂肪酸组成。观察到这些转基因植物之一产生在种子油中具有DPA而不具有DHA的种子。此品系(CT-137-2)的T1种子产生约4%DPA而在T1集合的种子中没有任何可检测的DHA。本发明人推断这通过使 $\Delta$ 4-去饱和酶基因在经由自发突变产生的该特别插入的T-DNA中失活来引起。在约50T1种子中,由此转基因品系中发芽并且由每一个中出现子叶,以分析其余油中的脂肪酸组成。然后使展示多于5%DPA的所选择的幼苗生长至成熟并且收获T2种子。在这些种子中观察到多于7%DPA。。

[0564] 表示为B0003-514的另一种转基因品系在T2种子中展示约10%-16%DPA。选择含有15.8%DPA、0.2%-0.9%DHA和0.1%-2.5%EPA的种子。T2种子群显示高:中值:无DPA的1:2:1分离度,这指示用于该转基因品系中的DPA产生的单一基因位点的存在。

[0565] 用弱碱处理来自具有约10%DPA的种子的油,以水解脂肪酸。通过色谱法处理所水解的混合物以富集DPA,并且在级分中的总脂肪酸含量的重量基础上获得含有72%DPA的级分。

[0566] 通过螺旋压榨机从产生LC-PUFA的种子样品中提取油,从而产生种子粉。

[0567] 从欧洲油菜DPA品系中产生T4种子并且对脂肪酸曲线进行分析。在集合的成熟种子样品中观察到多至13%DPA。

[0568] 表6. 含有modB构建体的发芽T1转基因欧洲油菜种子的一半子叶的脂肪酸谱。观察到高达18.1%DHA,其中多种样品包含大于10%DHA。



[0569]

种子	14:0	16:0	16:1d37	16:1	16:3	18:0	18:1	18:1d11	18:2	18:3n6	18:3n3	20:0	18:4n3	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
1	0.1	4.2	0.1	0.1	0.2	1.8	29.9	2.5	9.9	0.1	38.4	0.5	0.8	1.0	0.0	0.1	2.1	0.3	2.8	0.3	0.1	0.2	0.2	0.5	3.9
2	0.1	4.7	0.1	0.1	0.2	4.0	23.0	2.3	7.4	0.3	29.3	1.0	4.3	1.1	0.0	0.1	1.9	0.4	6.9	1.0	0.0	0.3	0.1	1.7	9.5
3	0.1	3.7	0.2	0.1	0.2	1.8	55.1	1.9	4.7	0.2	15.2	0.8	1.8	1.4	0.0	0.1	0.3	0.5	11.3	0.0	0.0	0.3	0.2	0.0	0.0
4	0.1	4.6	0.2	0.2	0.2	2.9	22.1	1.8	6.6	0.4	26.5	1.0	7.2	1.0	0.0	0.1	0.8	0.5	11.2	1.9	0.0	0.2	0.2	1.7	8.7
5	0.1	4.0	0.1	0.1	0.2	1.7	27.4	2.1	8.1	0.3	26.4	0.6	2.8	1.0	0.0	0.1	1.5	0.3	7.6	1.5	0.0	0.1	0.1	1.8	12.2
6	0.1	3.5	0.1	0.1	0.2	1.6	59.8	2.0	4.3	0.1	18.5	0.6	0.5	1.3	0.0	0.0	0.7	0.3	6.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0
7	0.1	6.0	0.3	0.3	0.3	1.7	16.6	2.6	23.9	1.0	23.2	0.6	5.4	0.8	0.0	0.2	0.6	0.4	2.6	1.1	0.0	0.3	0.3	1.7	9.9
8	0.1	4.9	0.1	0.1	0.2	2.7	12.9	1.4	11.7	0.3	34.3	0.9	5.0	0.9	0.0	0.2	2.4	0.5	4.1	1.3	0.0	0.2	0.2	1.8	13.8
9	0.1	3.9	0.1	0.1	0.1	2.4	41.6	1.7	21.5	0.0	23.4	0.7	0.0	1.2	0.0	0.1	2.2	0.4	0.0	0.0	0.1	0.3	0.2	0.0	0.0
10	0.1	3.7	0.2	0.1	0.1	2.1	30.9	1.7	19.2	0.4	23.6	0.7	2.1	1.1	0.0	0.1	1.5	0.4	3.6	0.6	0.0	0.2	0.1	0.7	6.9
11	0.1	5.7	0.4	0.3	0.2	3.8	41.2	2.4	26.7	2.1	7.2	1.3	0.3	1.2	0.0	0.2	0.3	0.8	4.8	0.0	0.0	0.6	0.3	0.0	0.0
12	0.1	4.6	0.0	0.1	0.2	2.4	25.5	1.7	16.1	0.3	28.9	0.8	3.9	1.1	0.0	0.1	1.9	0.4	3.9	0.6	0.0	0.2	0.0	1.1	6.2
13	0.1	4.3	0.1	0.1	0.1	4.2	19.4	1.6	9.2	0.1	45.5	1.0	0.2	1.1	0.0	0.1	5.2	0.4	2.6	0.3	0.2	0.2	0.1	0.4	3.4
14	0.1	6.3	0.2	0.2	0.2	4.0	10.5	2.3	8.4	0.3	31.1	1.3	3.9	0.8	0.0	0.1	2.3	0.6	4.6	1.8	0.1	0.3	0.2	2.5	18.1
15	0.1	5.1	0.1	0.2	0.2	3.3	16.8	2.4	11.2	0.3	28.8	1.0	4.5	0.9	0.0	0.1	2.1	0.6	3.2	1.5	0.1	0.3	0.1	1.8	15.1
16	0.1	4.4	0.1	0.1	0.2	4.0	16.2	1.5	11.6	0.2	33.5	0.9	2.8	1.1	0.0	0.2	3.7	0.4	4.6	0.7	0.1	0.3	0.1	1.3	12.1
17	0.2	7.2	0.2	0.2	0.2	4.9	15.0	2.1	8.9	0.3	25.9	1.4	5.1	0.9	0.0	0.0	1.6	0.8	4.9	2.1	0.0	0.6	0.3	2.2	15.0
18	0.1	4.0	0.1	0.1	0.2	2.3	64.8	1.2	7.2	0.1	12.5	1.0	3.5	1.5	0.0	0.1	0.0	0.7	0.0	0.0	0.5	0.2	0.0	0.0	0.0
19	0.1	3.9	0.1	0.1	0.2	4.6	36.9	1.7	7.1	0.2	28.6	1.2	1.8	1.2	0.0	0.1	1.4	0.5	4.3	0.4	0.0	0.4	0.1	0.8	4.3
20	0.1	4.8	0.1	0.1	0.2	6.0	18.5	1.2	12.8	0.2	34.8	1.4	2.4	1.1	0.0	0.1	3.4	0.6	3.2	0.4	0.1	0.3	0.1	0.7	7.6

[0570]

表7. 含有modB构建体的T2转基因欧洲油菜种子的脂肪酸谱。

样品 (T2种子)	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:5n3	C22:6n3	总 $\omega 3$ (%)	总 $\omega 6$ (%)	$\omega 6$ 比 $\omega 3$ 比率	总 PUFA 含量 (%)
CT136-27-18-1	0.1	5.0	2.6	25.4	3.6	6.7	0.2	37.5	1.4	1.0	0.1	2.1	0.8	0.4	0.9	10.2	53.4	7.1	0.13	60.5
CT136-27-18-2	0.2	7.1	2.8	16.9	4.3	5.5	0.4	29.1	5.4	0.8	0.1	1.2	0.5	0.5	1.9	21.2	59.8	6.1	0.10	66.0
CT136-27-18-3	0.1	5.4	2.5	26.5	3.8	6.4	0.4	26.4	4.7	1.0	0.1	0.7	1.1	0.6	1.2	17.3	52.0	6.9	0.13	58.9
CT136-27-18-4	0.1	5.3	2.4	34.7	4.0	5.9	0.3	30.3	1.3	1.1	0.1	1.1	1.5	0.3	0.4	9.3	44.4	6.3	0.14	50.7
CT136-27-18-5	0.1	4.8	2.7	34.5	3.8	5.6	0.3	23.5	3.9	1.2	0.1	0.7	1.1	0.5	1.1	14.2	45.1	6.0	0.13	51.1
CT136-27-18-6	0.1	5.0	2.1	54.3	3.8	5.7	0.2	18.2	0.6	1.5	0.1	1.1	0.7	0.1	0.2	4.4	25.5	6.1	0.24	31.5
CT136-27-18-7	0.1	5.3	2.1	43.8	4.2	5.6	0.4	18.3	2.2	1.3	0.2	0.6	1.5	0.4	0.5	11.6	35.2	6.2	0.18	41.4
CT136-27-18-8	0.1	5.4	2.7	25.8	4.1	6.7	0.4	26.6	5.7	1.0	0.1	0.6	1.3	0.6	1.2	15.8	51.9	7.1	0.14	59.0
CT136-27-18-9	0.1	4.6	1.6	53.8	3.7	17.5	0.5	9.2	0.5	1.6	0.3	0.6	0.4	0.1	0.1	3.7	14.5	18.3	1.26	32.8
CT136-27-18-10	0.1	4.8	2.4	44.1	3.7	5.4	0.4	19.1	2.3	1.1	0.1	0.6	1.5	0.5	0.8	11.4	36.1	5.9	0.16	42.0
CT136-27-18-11	0.1	5.1	2.2	48.3	4.1	10.9	0.7	12.5	1.2	1.3	0.2	0.5	1.5	0.3	0.3	9.1	25.3	11.8	0.47	37.1
CT136-27-18-12	0.1	5.3	2.7	23.3	3.7	6.0	0.4	27.9	4.9	0.9	0.1	0.7	1.3	0.8	1.5	18.5	55.7	6.6	0.12	62.2
CT136-27-18-13	0.1	5.5	3.4	30.7	5.6	5.1	0.4	23.1	3.5	1.1	0.1	1.2	1.1	0.6	1.2	14.9	45.8	5.5	0.12	51.3
CT136-27-18-14	0.1	5.4	2.3	23.9	3.5	6.0	0.4	30.1	3.7	1.0	0.1	1.0	0.7	0.6	1.2	18.2	55.5	6.6	0.12	62.1
CT136-27-18-15	0.1	5.0	2.3	45.4	4.0	5.3	0.4	16.2	2.3	1.2	0.1	0.5	1.9	0.6	0.7	12.3	34.4	5.8	0.17	40.3
CT136-27-18-16	0.1	4.8	2.7	37.9	4.1	6.2	0.4	22.0	2.4	1.0	0.1	0.7	1.4	0.5	0.8	13.1	41.0	6.7	0.16	47.7
CT136-27-18-17	0.1	4.5	2.3	38.8	3.3	7.6	0.3	26.8	0.9	1.4	0.2	1.6	0.9	0.2	0.7	8.6	39.9	8.0	0.20	47.9
CT136-27-18-18	0.1	5.1	2.3	29.0	3.6	5.7	0.4	26.5	3.8	1.1	0.2	0.8	0.8	0.6	1.0	17.4	50.8	6.3	0.12	57.1
CT136-27-18-19	0.1	5.8	2.3	19.7	4.2	6.7	0.7	23.7	7.7	0.9	0.1	0.4	0.7	0.6	1.7	22.7	57.6	7.5	0.13	65.1
CT136-27-18-20	0.1	5.7	2.9	23.2	4.0	5.6	0.3	35.8	2.4	1.0	0.1	1.3	1.1	0.5	1.0	13.0	55.1	6.1	0.11	61.2

[0571]

[0572] 在任何样品中均没有检测到ARA (C20:4  $\omega$  6)。样品还包含约0.2%或0.3% C16:1、约0.1%至0.3% C16:3、约0.7%与1.0%之间的C20:0、约0.3% C22:0并且一些样品包含微量水平(<0.1%)的C20:1  $\Delta$  13、C22:3  $\omega$  3、C24:0和C24:1

[0573] 表8. 含有modB或modF构建体的T1转基因亚麻荠种子的脂肪酸谱。所述样品还包含约0.1%的C14:0、C16:1、C20:4n-6以及C22:2n-6中的每一种或者没有检测到这些脂肪酸。

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:3n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	C22:1	20:5n3	22:5n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
123-8	7.3	5.2	7.9	1.0	7.7	0.7	29.9	2.3	6.0	7.1	0.4	0.7	0.0	0.9	0.4	1.3	1.0	4.6	0.1	0.2	0.3	1.5	13.3
123-12	8.3	5.3	7.2	1.2	8.7	0.9	27.2	2.5	5.7	6.9	0.5	0.7	0.0	0.9	0.5	1.5	1.2	5.0	0.1	0.2	0.4	1.5	13.2
5-8	8.3	3.5	9.4	1.3	8.1	1.1	29.0	1.0	9.3	7.9	0.4	0.6	0.0	0.8	0.2	0.4	0.8	3.4	0.1	0.2	0.4	0.9	12.6
5-9	8.1	3.5	9.4	1.2	8.4	1.2	29.2	1.0	9.0	8.1	0.3	0.6	0.0	0.8	0.2	0.5	0.8	3.5	0.1	0.1	0.3	0.9	12.6
17-10	8.7	4.1	8.4	1.3	5.5	1.2	26.1	1.6	11.8	7.2	0.3	0.0	0.4	0.8	0.3	0.4	0.7	5.5	0.0	0.2	0.3	1.3	13.5
17-26	8.8	5.5	5.0	1.3	7.6	0.9	27.8	2.7	10.1	6.2	0.3	0.0	0.7	1.1	0.6	0.5	1.0	4.7	0.1	0.3	0.4	1.0	13.1

[0574]

[0575] 表9. 用来自GA7-modB的T-DNA转化的欧洲油菜T2种子的种子油的脂肪酸组成

[0576]

C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:1n7	C18:2n6	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	C18:4n3	C20:1n9	C20:2n6 + C21:0	C20:3n3	C20:4n3	C20:5n3	C22:5n6	C22:5n3	C22:6n3
6.3	2.4	8.4	3.1	6.9	1.1	21.9	0.7	7.5	0.7	0.1	0.5	0.5	0.6	0.2	1.5	34.3

[0577] 种子油样品还包含0.1% C14:0; 0.2% C16:1; 0.1% C20:3 ω 6; 没有C22:1和C22:2 ω 6; 0.1% C24:0和0.2% C24:1、2.6% 其它脂肪酸。

[0578] 虽然此实验的焦点为证明含油种子农作物物种中的DHA和DPA产生,但是以上所述的不同从构建体设计角度来看也很有趣。首先,在modF构建体中转换Δ 6-和Δ 5-延伸酶编码区位置导致预期的谱改变,其中由于较低Δ 5-延伸而积累更多的EPA。观察到伴随的Δ 6-延伸的增加,但是这不会引起较低的SDA水平。这是由于Δ 6-去饱和在modF转化的种子中的增加,这通过添加额外的细小微胞藻Δ 6-去饱和酶表达盒以及通过用更高活性的亚麻conlinin2启动子置换截短的napin启动子(FP1)所引起。关于modG构建体观察到的Δ 6-去饱和的稍低的增加通过利用在GA7中高度表达的Δ 5-延伸酶盒所引起。转换Δ 6-去饱和酶和Δ 5-延伸酶编码区的位置引起较大的Δ 6-去饱和。在这种情况下Δ 5-延伸酶活性由于用Cn12启动子置换FP1启动子而有所减小。

[0579] 这些数据证实modB、modF和modG构建体在亚麻荠属种子如拟南芥和油菜中DHA的产生良好。

[0580] 本发明人认为,总体来说,限速酶活性在DHA路径中的效率在多拷贝T-DNA转化株中与单拷贝T-DNA转化株相比为更大的,或者可通过插入编码在路径中可能为限速的酶的T-DNA多个基因来增加。在用GA7构建体转化的拟南芥属种子中可见多拷贝转化株的可能的证据,其中产生最高DHA的事件具有插入到宿主基因组中的三个T-DNA。多个基因可为相同的或者优选为编码相同多肽的不同变体,或者处于具有重叠表达模式的不同启动子的控制下。例如,增加的表达可通过表达多个Δ 6-去饱和酶编码区来实现,甚至在产生相同蛋白质的情况下。例如,在pJP3416-GA7-modF和pJP3416-GA7-modC中,存在两个版本的M.pusilla Δ 6-去饱和酶并且通过不同启动子进行表达。编码序列具有不同密码子使用并因此具有不同核苷酸序列,以减少可能的沉默或共抑制作用但是导致相同蛋白质的产生。

[0581] 实施例4. 来自产生DHA的转基因拟南芥种子的TAG的分析

[0582] 通过NMR确定DHA在来自转化的拟南芥种子中的TAG上的位置分布。通过首先在己烷下压碎种子,之后将压碎的种子转移到含有10mL己烷的玻璃管中来从约200mg种子中提取总脂质。将所述管在约55℃下在水浴中升温,并且然后涡旋并离心作用。去除己烷溶液并且用另外的4x10mL重复所述程序。将提取物合并,通过旋转蒸发进行浓缩,并且提取的脂质中的TAG通过经过短硅胶柱使用20mL的己烷中的7%乙醚从极性脂质中纯化。定量地确定在纯化的TAG上的酰基位置分布,如先前所述的(Petrie等,2010a和2010b)。

[0583] 分析显示总种子油中的大部分DHA位于TAG的sn-1/3位置上,其中极少发现处于sn-2位置上。这与来自产生ARA的种子的TAG相反,所述种子表明50%ARA(20:4 Δ 5,8,11,14)位于转基因菜籽油的sn-2位置,而预期仅33%处于随机分布中(Petrie等,2012)。

[0584] 也通过三重四级杆LC-MS分析来自转基因拟南芥种子的总脂质,以确定主要的含DHA的三酰甘油(TAG)物质。发现最丰富的含DHA的TAG物质为DHA-18:3-18:3(TAG58:12;命名法并未描述位置分布),其中第二最丰富的为DHA-18:3-18:2(TAG 58:11)。在总种子油中

观察到三-DHA TAG (TAG 66:18), 虽然是以很低但可检测的水平观察到的。其它主要含DHA的TAG物质包括DHA-34:3 (TAG 56:9)、DHA-36:3 (TAG 58:9)、DHA-36:4 (TAG 58:10)、DHA-36:7 (TAG 58:13) 以及DHA-38:4 (TAG 60:10)。两种主要的含DHA的TAG的性质通过Q-TOF MS/MS进一步确认。

[0585] 实施例5. 测定油中的甾醇含量和组成

[0586] 来自从Australia的商业来源购买的12种植物油样品中的植物甾醇通过GC和GC-MS分析表征为0-三甲基硅醚 (OTMSi-醚) 衍生物, 如实施例1所述的。通过保留数据、解释质谱以及文献和实验室标准质谱数据进行比较来鉴别甾醇。通过使用5 $\beta$  (H) - 胆烷 (Cholan) -24-醇内部标准对甾醇进行定量。一些鉴别出的甾醇的基本植物甾醇结构和化学结构示出在图5和表10中。

[0587] 分析的植物油来自: 芝麻 (芝麻 (Sesamum indicum))、橄榄 (油橄榄)、向日葵 (向日葵 (Helianthus annuus))、蓖麻 (蓖麻 (Ricinus communis))、油菜 (欧洲油菜)、红花 (红花 (Carthamus tinctorius))、花生 (落花生)、亚麻 (亚麻 (Linum usitatissimum)) 以及黄豆 (大豆)。在所有油样品中, 减小的相对丰度的主要的植物甾醇为:  $\beta$ -谷甾醇 (范围为总甾醇含量的28%-55%)、 $\Delta$ 5-燕麦甾醇 (异岩藻甾醇) (3%-24%)、菜油甾醇 (2%-33%)、 $\Delta$ 5-豆甾醇 (0.7%-18%)、 $\Delta$ 7-豆甾醇 (1%-18%) 以及  $\Delta$ 7-燕麦甾醇 (0.1%-5%)。鉴别出多种其它少数甾醇, 这些甾醇为: 胆固醇、菜籽甾醇、海绵甾醇、菜油甾烷醇 (campestanol) 以及齿孔醇。也检测四种C29:2和两种C30:2甾醇, 但是需要进一步研究以完成这些少数组分的鉴别。此外, 若干其它未鉴别出的甾醇存在于一些油中, 但是由于其极低的丰度, 质谱并不强烈至足以能够鉴别其结构。

[0588] 以减小的量表示为mg/g油的甾醇含量为: 菜籽油 (6.8mg/g)、芝麻油 (5.8mg/g)、亚麻油 (4.8-5.2mg/g)、向日葵油 (3.7-4.1mg/g)、花生油 (3.2mg/g)、红花油 (3.0mg/g)、大豆油 (3.0mg/g)、橄榄油 (2.4mg/g)、蓖麻油 (1.9mg/g)。甾醇组成%和总甾醇含量提供于表11中。

[0589] 表10. 鉴别出的甾醇的IUPAC/系统名称。

甾醇编号	通用名	IUPAC /系统名称
1	胆固醇	胆甾-5-烯-3 $\beta$ -醇
2	菜籽甾醇	24-甲基胆-5,22E-二烯-3 $\beta$ -醇
3	海绵甾醇/ 24-亚甲基胆固醇	24-甲基胆-5,24(28)E-二烯-3 $\beta$ -醇
4	菜油甾醇/ 24-甲基胆固醇	24-甲基胆甾-5-烯-3 $\beta$ -醇
5	菜油甾烷醇/24-甲基胆甾烷醇	24-甲基胆甾烷-3 $\beta$ -醇
7	$\Delta$ 5-豆甾醇	24-乙基胆-5,22E-二烯-3 $\beta$ -醇
9	麦角甾-7-烯-3 $\beta$ -醇	24-甲基胆甾-7-烯-3 $\beta$ -醇
11	齿孔醇	4,4,14-三甲基麦角甾-8,24(28)-二烯-3 $\beta$ -醇
12	$\beta$ -谷甾醇/ 24-乙基胆固醇	24-乙基胆甾-5-烯-3 $\beta$ -醇
13	D5-燕麦甾醇/异岩藻甾醇	24-乙基胆-5,24(28)Z-二烯-3 $\beta$ -醇
19	D7-豆甾醇/豆甾-7-烯-3 $\beta$ -醇	24-乙基胆甾-7-烯-3 $\beta$ -醇
20	D7-燕麦甾醇	24-乙基胆 7,24(28)-二烯-3 $\beta$ -醇

[0591] 表11. 测定的植物油的甾醇含量和组成。



[0592]

甾醇编号*	甾醇通用名	芝麻	橄榄	向日葵	向日葵 冷压	蓖麻	油菜	红花	红花 冷压	花生	亚麻(亚麻籽)	亚麻(亚麻籽)	大豆
1	胆固醇	0.2	0.8	0.2	0.0	0.1	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4	0.4	0.2
2	菜籽甾醇	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0
3	海绵甾醇/ 24-亚甲基胆固醇	1.5	0.1	0.3	0.1	1.1	2.4	0.2	0.1	0.9	1.5	1.4	0.8
4	菜油甾醇/ 24-甲基胆固醇	16.2	2.4	7.4	7.9	8.4	33.6	12.1	8.5	17.4	15.7	14.4	16.9
5	菜油甾醇/ 24-甲基胆固醇	0.7	0.3	0.3	0.1	0.9	0.2	0.8	0.8	0.3	0.2	0.2	0.7
6	C29:2*	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.1	0.5	0.5	0.0	1.2	1.3	0.1
7	$\Delta^5$ -豆甾醇	6.4	1.2	7.4	7.2	18.6	0.7	7.0	4.6	6.9	5.1	5.8	17.6
8	未知	0.5	1.3	0.7	0.6	0.8	0.7	0.7	1.3	0.4	0.7	0.6	1.3
9	麦角甾醇-7-烯-3 $\beta$ -醇	0.1	0.1	1.9	1.8	0.2	0.4	2.7	4.0	1.4	1.4	1.4	1.0
10	未知	0.0	1.3	0.9	0.8	1.2	0.9	1.8	0.7	1.2	0.7	0.5	0.7
11	齿孔醇	1.6	1.8	4.1	4.4	1.5	1.0	1.9	2.9	1.2	3.5	3.3	0.9
12	$\beta$ -谷甾醇/ 24-乙基胆固醇	55.3	45.6	43.9	43.6	37.7	50.8	40.2	35.1	57.2	29.9	28.4	40.2

[0593]

13	$\Delta^5$ -燕麦甾醇/异岩藻甾醇	8.6	16.9	7.2	4.1	19.3	4.4	7.3	6.3	5.3	23.0	24.2	3.3
14	三萜醇	0.0	2.4	0.9	1.1	0.0	0.0	1.6	1.9	0.0	0.0	0.0	0.9
15	三萜醇	0.0	0.0	0.7	0.6	0.0	0.0	2.8	1.8	0.0	0.0	0.3	0.0
16	C29:2*	0.0	0.5	0.7	0.7	1.5	1.2	2.8	1.9	2.0	1.0	0.7	0.5
17	C29:2*	1.0	0.9	2.3	2.4	0.6	0.4	1.3	1.9	0.9	1.0	1.0	1.0
18	C30:2*	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
19	$\Delta^7$ -豆甾醇/豆甾醇-7-烯-3 $\beta$ -醇	2.2	7.1	9.3	10.9	2.3	0.9	10.5	18.3	1.1	7.9	8.7	5.6
20	$\Delta^7$ -燕麦甾醇	1.3	0.1	4.0	3.6	0.6	0.2	2.0	4.7	0.7	0.4	0.4	0.6
21	未知	0.7	7.1	0.9	0.8	0.0	0.4	0.3	0.4	0.0	3.0	3.6	0.0
22	未知	0.3	0.0	0.3	0.9	0.0	0.0	1.2	1.3	0.2	0.1	0.0	0.3
23	未知	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.5
24	未知	0.0	3.1	0.9	1.3	0.6	0.4	0.2	0.4	0.7	1.7	1.9	0.8
25	未知	0.9	0.4	0.3	0.5	0.3	0.1	0.5	0.7	0.3	0.1	0.1	0.6
26	C30:2	2.2	6.0	4.6	5.7	1.4	0.6	1.0	1.2	1.2	1.2	1.1	5.2
27	未知	0.0	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	0.3
	总计	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	总甾醇(mg/g 油)	5.8	2.4	4.1	3.7	1.9	6.8	3.2	3.0	3.2	4.8	5.2	3.0

[0594] C29:2\*和C30:2\*分别表示具有两个双键的C29甾醇和具有两个双键的C30甾醇

[0595] 在所有种子油样品中,主要植物甾醇通常为 $\beta$ -谷甾醇(范围为总甾醇含量的30%-57%)。在所述油中存在广泛范围的比例的其它主要甾醇:菜油甾醇(2%-17%)、 $\Delta^5$ -豆甾醇(0.7%-18%)、 $\Delta^5$ -燕麦甾醇(4%-23%)、 $\Delta^7$ -豆甾醇(1%-18%)。来自不同物种的油具有不同的甾醇谱,其中一些具有十分特别的谱。在菜籽油的情况下,它具有最高比例的菜油甾醇(33.6%),而其它物种样品通常具有较低水平,例如在花生油中可达17%。红花油具有相对高比例的 $\Delta^7$ -豆甾醇(18%),同时此甾醇在其它物种油中通常较低,在向日葵油中可达9%。因为它们对于每种物种为特别的,因此甾醇谱可用于帮助鉴别特定蔬菜或植物油并且检查它们的真实性或与其它油的掺杂。

[0596] 比较两种样品向日葵和红花中的每一种,在每种情况下,一种通过冷压种子并且没有精炼而产生,而另一种不是冷压和精炼的。尽管观察到一些不同,两种来源的油具有类似甾醇组成和总甾醇含量,这表明加工和精炼对这两个参数几乎没有影响。所述样品中的甾醇含量改变三倍并且范围为1.9mg/g至6.8mg/g。菜籽油具有最高的甾醇含量并且蓖麻油具有最低甾醇含量。

[0597] 实施例6.转基因亚麻荠种子的进一步分析

[0598] 脂肪酸组成

[0599] 通常对于产生DHA和/或DPA的种子,本发明人观察到,如通过种子中的所有脂质的直接甲基转移化确定的种子中的总脂质的脂肪酸组成与TAG级分的脂肪酸组成类似。这是因为存在于种子中的总脂质的多于90%以TAG形式出现。

#### [0600] 种子中的甾醇组成

[0601] 为了确定提取的脂质中的甾醇含量和组成,使用4mL 80%MeOH中的5%KOH将来自富含TAG的己烷提取物和极性富含脂质的CM提取物的约10mg总脂质的样品皂化并且在80℃下在特氟龙内衬的螺旋盖的玻璃试管中加热2h。在反应混合物冷却之后,添加2mL Milli-Q水,并且通过振摇和涡旋将甾醇和醇提取到2mL己烷:二氯甲烷(4:1v/v)中三次。将混合物离心并且通过振摇和离心使用2mL Milli-Q水洗涤有机相中的每种提取物。在获得顶部含甾醇的有机层之后,使用氮气流蒸发溶剂并且使用200μL双(三甲基甲硅烷基)-三氟乙酰胺(BSTFA, Sigma-Aldrich),通过在80℃下在密封的GC小瓶中加热2h来使甾醇和醇甲硅烷基化。通过这种方法,将游离的羟基转化为其三甲基硅烷基醚。在加热块(40℃)上在氮气流下干燥甾醇和醇-OTMSi衍生物并且将其重新溶解于二氯甲烷(DCM)中,之后立即进行如上所述的GC/GC-MS分析。

[0602] 转基因和对照种子二者中的主要甾醇为24-乙基胆固醇(谷甾醇,总甾醇的43%-54%)、24-甲基胆固醇(菜油甾醇,20%-26%)以及较低水平的胆固醇(5%-8%)、菜籽甾醇(2%-7%)、异岩藻甾醇( $\Delta^5$ -燕麦甾醇,4%-6%)、豆甾醇(0.5%-3%)、胆甾-7-烯-3 $\beta$ -醇(0.2%-0.5%)、24-甲基胆甾烷醇(菜油甾烷醇,0.4%-1%)和24-脱氢胆甾醇(0.5%-2%) (表12)。这九种甾醇占总甾醇的86%-95%,其中其余的组分为仅部分确定碳和双键数目的甾醇。总体甾醇谱在转基因种子与对照种子的己烷和CM提取物之间为类似的。

#### [0603] 脂肪醇分析

[0604] 与甾醇一样,对种子中的脂肪醇进行衍生化和分析。在己烷和CM提取物二者中鉴别来自C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>的一系列脂肪醇,其中伴随异支化脂肪醇。对于转基因和对照种子观察到类似的谱,其中观察到单个组分的一些变化。源自叶绿素的叶绿醇为主要的脂肪族醇,并且在转基因和对照种子的己烷级分中分别占总脂肪醇的47%和37%。奇碳链的醇在CM提取物(总脂肪醇含量的37%-38%)中以比己烷提取物(16%-23%)中更高的水平存在。异-17:0(16%-38%)多于17:0(0.3%-5.7%)。存在的另一种奇碳链醇为19:0(4.5%-6.5%)。检测到的其它醇包括异-16:0、16:0、异-18:0、18:1、18:0,其中也存在少量水平的异-20:0、20:1、20:0、异-22:0、22:1以及22:0。

[0605] 表12. 转基因和对照亚麻荠属种子的甾醇组成(占总甾醇的%)

	转基因种子		对照种子	
	己烷	CM	己烷	CM
<b>甾醇</b>				
24-脱氢胆固醇	0.8	1.8	0.5	1.4
胆固醇	5.7	7.6	4.7	7.2
菜籽甾醇	4.4	6.5	1.9	4.2
胆甾-7-烯-3 $\beta$ -醇	0.2	0.5	0.3	0.4
菜油甾醇	24.5	20.8	25.7	21.7
菜油甾烷醇	0.4	1.1	0.4	0.9
豆甾醇	1.0	2.6	0.5	1.6
谷甾醇	54.3	43.7	53.8	42.9
$\Delta 5$ -燕麦甾醇(异岩藻甾醇)	4.2	5.2	4.7	5.5
总计	95.5	89.6	92.6	85.9
<b>其它</b>				
UN1 C28 1db	0.6	1.2	0.7	1.2
UN2 C29 1db	1.2	2.0	1.2	2.4
UN3 C29 2db	0.9	1.8	1.3	2.4
UN4 C28 1db	0.3	0.9	0.6	1.1
UN5 C30 2db	1.2	1.8	1.4	1.8
UN6 C29 1db + C30 2db	0.3	2.7	2.2	5.2
其它的总和	4.5	10.4	7.4	14.1
<b>总计</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

[0607] 缩写:UN表示未知的甾醇,在C之后的数字指示碳原子数目并且db指示双键的数目

[0608] 实施例7.在芥菜种子中产生LC-PUFA

[0609] 使用用于产生DHA的GA7-modB构建体(实施例3)产生转基因芥菜植物,如下所述的。使用氯气对长昼长敏感品种的芥菜种子进行灭菌,如Kereszt等(2007)所述的。使灭菌的种子在用0.8%琼脂固化的调整至pH 5.8的1/2强度MS培养基(Murashige和Skoog,1962)中发芽,并且在24℃下在荧光照明(50 $\mu$ E/m<sup>2</sup>s)下以16/8小时(白天/夜晚)的光周期生长6-7天。将具有2-4mm柄的子叶叶柄从这些幼苗中无菌地分离并且将其用作外植体。用二元构建体GA7转化根癌土壤杆菌菌株AGL1。开始土壤杆菌培养并且进行处理以用于感染,如Belide等(2013)所述的。对于所有的转化株,用10ml根癌土壤杆菌培养物感染约50株新鲜分离的子叶叶柄6分钟。用无菌滤纸吸干感染的叶柄以去除过量的根癌土壤杆菌,并且将其转移到共培养培养基中(含有1.5mg/L BA、0.01mg/L NAA和100 $\mu$ M乙酰丁香酮的MS,其也补充有L-半胱氨酸(50mg/L)、抗坏血酸(15mg/L)和MES(250mg/L)。用微孔带密封所有的板并且在黑暗中在24℃下孵育以便共培养48小时。然后将外植体转移到选择前培养基(含有1.5mg/L BA、0.01mg/L NAA、3mg/L AgNO<sub>3</sub>、250mg/L头孢噻肟和50mg/L特美汀的MS-琼脂)并且在24℃下以16/8h光周期培养4-5天,之后将外植体转移到选择培养基(含有1.5mg/L BA、0.01mg/L NAA、3mg/L AgNO<sub>3</sub>、250mg/L头孢噻肟、50mg/L特美汀和5mg/L PPT的MS-琼脂)并且在24℃下以16/8h光周期培养4周。将具有绿色愈伤组织的外植体转移到新芽再生培养基(含有2.0mg/L BA、3mg/L AgNO<sub>3</sub>、250mg/L头孢噻肟、50mg/L特美汀和5mg/L PPT的MS-琼脂)并且培养另外2周。将小的再生芽转移到无激素MS培养基(含有3mg/L AgNO<sub>3</sub>、250mg/L头孢噻肟、50mg/L特美汀和5mg/L PPT的MS-琼脂)并且培养另外2-3周。

[0610] 将至少1.5cm大小的可能的转基因新芽分离并转移到根诱导培养基(含有0.5mg/L NAA、3mg/L  $\text{AgNO}_3$ 、250mg/L 头孢噻肟和50mg/L 特美汀的MS-琼脂)并且培养2-3周。将通过PCR确认并具有丰富的根的转基因新芽转移到温室的土壤中并且在16/8h(白天/夜晚)的光周期下在22℃下生长。获得三种确认的转基因植物。转化的植物在温室中生长,允许自花授粉,并且收获T1种子。分析来自单个T1种子的种子油的脂肪酸组成;一些数据示出在表16中。若干种T1种子以总脂肪酸含量的10%至约18%的水平产生DHA,包括JT1-4-A-13、JT1-4-A-5和JT1-4-B-13(表13)。使T1种子发芽并且分析由每个种子中出现的一个子叶的剩余油中的脂肪酸组成。维持剩余的每株幼苗并且使其生长至成熟,以提供T2种子。

[0611] 鉴别并选择对于单一T-DNA插入物为纯合的转基因植物。表示为JT1-4-17的一种选择的品系的植物具有单一T-DNA插入物并且产生仅具有第水平DPA的DHA,而表示为JT1-4-34的第二种选择的品系的那些也具有单一T-DNA插入物但产生DPA而没有产生DHA。本发明人推断初始转化株包含两个单独的T-DNA,一个使其产生DHA并且另一个使其产生DPA而不产生DHA。将在其种子中产生DHA的印度芥菜植物与在其种子中产生DPA的植物杂交。F1后代包括对于两个T-DNA插入物均为杂合的植物。观察到来自这些后代植物的种子产生约20%DHA和约6%DPA,总计26%的DHA+DPA含量。所述F1植物为自花授粉的并且对于两个T-DNA插入物为纯合的后代预期产生高达35%DHA和DPA。

[0612] 在表示为JT1-4-34-11的集合的T3后代种子的脂质中观察到约18%DPA。类似地,在来自T3 JT1-4-17-20的后代的集合的种子的脂质中观察到约17.5%DHA。在表17和表18中为JT1-4 T1集合的种子、T1单一种子、T2集合的种子、T2单一种子以及T3集合的种子、T3单一种子的脂肪酸组成。JT1-4 T3分离子JT-1-4-34-11具有18%的集合的T3种子DPA含量,并且来自此特定分离子的单一种子具有约26%的DPA含量,各自均作为总脂肪酸含量的百分比。

[0613] 计算来自具有17.9%DPA的种子的油的以下参数:总饱和脂肪酸,6.8%;总单元不饱和脂肪酸,36.7%;总多元不饱和脂肪酸,56.6%;总 $\omega$ 6脂肪酸,7.1%;新 $\omega$ 6脂肪酸,所有的0.4%为GLA;总 $\omega$ 3脂肪酸,46.5%;新 $\omega$ 3脂肪酸,24.0%;总 $\omega$ 6:总 $\omega$ 3脂肪酸比率,6.5;新 $\omega$ 6:新 $\omega$ 3脂肪酸比率,60;通过 $\Delta$ 12-去饱和酶将油酸转化为LA的效率,61%;通过 $\Delta$ 6-去饱和酶将ALA转化为SDA的效率,51%;通过 $\Delta$ 6-延伸酶将SDA转化为ETA酸的效率,90%;通过 $\Delta$ 5-去饱和酶将ETA转化为EPA的效率,87%;通过 $\Delta$ 5-延伸酶将EPA转化为DPA的效率,98%。

[0614] 为了在具有modB构建体的印度芥菜中产生更多转基因植物,重复五次转化并且使16个假定的转基因新芽/幼苗再生。进行T1种子分析以测定DPA和DHA含量。

[0615] 表13. 用来自GA7的T-DNA转化的芥菜T1种子的种子油的脂肪酸组成。

[0616]

T1种子编号	C16:0	16:1d9	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:5n3	C22:6n3
JT1-4-A-1	5.0	0.2	2.7	23.5	3.4	17.0	0.7	24.8	0.7	2.0	1.1	0.2	0.8	4.0	0.6	2.4	9.9
JT1-4-A-3	5.6	0.3	2.7	20.8	3.7	16.0	0.6	24.4	0.7	2.0	0.9	0.2	1.1	4.5	0.7	3.1	11.4
JT1-4-A-4	4.6	0.4	2.8	36.2	3.4	10.6	0.3	24.5	0.8	9.9	1.7	0.2	0.3	0.5	0.0	2.5	0.0
JT1-4-A-5	5.0	0.2	3.2	20.3	3.6	13.7	0.7	25.9	0.7	2.0	0.9	0.2	1.3	4.4	1.5	1.6	13.5
JT1-4-A-7	5.6	0.3	3.0	26.2	4.0	8.9	0.3	26.6	0.6	1.8	1.0	0.1	1.8	3.7	1.3	2.2	11.3
JT1-4-A-9	7.1	0.3	3.6	17.7	4.3	17.9	0.7	23.1	1.0	2.1	0.8	0.2	1.5	3.6	0.8	2.0	11.9
JT1-4-A-10	5.1	0.2	4.2	22.3	3.4	19.5	0.7	21.7	0.8	1.5	0.9	0.2	1.7	7.8	0.9	1.0	6.5
JT1-4-A-12	5.2	0.3	3.0	28.2	4.0	9.2	0.3	27.4	0.6	1.9	0.9	0.1	1.5	3.2	1.1	1.8	10.2
JT1-4-A-13	5.4	0.2	3.0	16.7	4.1	9.9	0.6	29.9	0.7	2.2	1.0	0.2	1.7	2.0	1.1	2.0	17.9
JT1-4-A-14	5.1	0.4	3.1	30.0	4.0	11.5	0.3	27.7	0.7	2.2	1.0	0.1	0.6	2.4	0.8	1.3	7.8
JT1-4-B-1	5.5	0.2	2.7	18.9	4.0	17.6	0.8	24.1	0.8	2.2	1.0	0.2	1.2	4.6	0.9	2.2	11.5
JT1-4-B-2	5.5	0.2	2.7	20.2	4.0	14.3	0.5	25.5	0.7	1.7	0.9	0.2	1.6	8.7	1.3	2.2	8.5
JT1-4-B-3	5.3	0.3	3.6	34.1	3.5	35.0	0.6	9.3	0.8	0.2	1.4	0.4	0.6	0.9	0.1	0.3	2.1
JT1-4-B-4	5.3	0.3	3.1	25.2	3.6	17.0	0.7	24.1	0.7	1.9	1.0	0.2	0.8	4.3	0.5	2.3	7.8
JT1-4-B-6	5.6	0.3	2.5	19.5	3.8	15.2	0.5	27.7	0.6	2.1	0.9	0.2	1.1	3.7	0.6	3.3	11.1
JT1-4-B-7	5.9	0.5	2.0	29.9	4.0	11.2	0.3	26.2	0.6	11.5	1.4	0.2	0.3	0.4	0.0	4.1	0.1
JT1-4-B-8	6.2	0.5	1.9	33.1	4.0	30.0	0.5	12.7	0.6	0.3	1.3	0.4	1.4	0.9	0.1	4.4	0.0
JT1-4-B-9	4.9	0.2	3.4	24.6	3.0	18.5	0.3	26.2	0.8	1.3	1.1	0.2	2.0	5.5	0.6	0.8	5.2
JT1-4-B-10	5.2	0.3	2.7	19.0	4.0	12.0	0.6	30.5	0.7	1.6	1.0	0.2	1.7	4.9	1.1	3.0	10.2
JT1-4-B-11	4.8	0.2	3.0	23.7	3.1	18.1	0.6	23.5	0.7	1.6	1.2	0.2	1.5	4.5	0.8	1.6	9.6
JT1-4-B-12	5.0	0.2	2.6	19.6	3.4	12.5	0.6	26.9	0.8	3.1	1.1	0.2	0.9	5.6	0.9	3.5	11.7
JT1-4-B-13	5.6	0.3	2.8	20.9	3.9	11.9	0.4	27.0	0.7	2.0	1.0	0.2	1.7	2.3	0.7	4.1	13.5
JT1-4-B-14	5.1	0.3	3.1	25.5	3.3	16.7	0.7	23.9	0.8	1.8	1.2	0.2	0.9	2.6	0.4	2.9	9.2
JT1-4-B-15	5.6	0.3	2.7	19.5	4.1	14.0	0.8	24.6	0.7	2.7	0.9	0.2	0.7	9.4	1.3	2.5	8.5

[0617] 种子油样品还包含0.1%C14:0;0.1-0.2%C16:3;0.0-0.1%的C20:1Δ13、C20:3ω6和C20:4ω6中的每一种;0.3-0.4%C22:0;无C22:1和C22:2ω6;0.2%C24:0和0.2-0.4%C24:1。

[0618] 表14.来自用GA7-modB的T-DNA转染的印度芥菜T1种子(集合)的脂质的脂肪酸组成。所述脂质还包含约0.1%各14:0、16:3、20:1d13和16:2,未检测到22:1。

[0619]

	C16:0		C16:1	C18:0	C18:1		C18:1d11	1	C18:2	C18:3n6		C18:3n3		C20:0	18:4n3		C20:1d11	1	C20:2n6	C20:3n6		C20:4n6		C20:5n3		C22:0	20:4n3		20:5n3		C22:2n6		22:3n3		C24:0	C24:1	22:5n3		C22:6n3	
JT1-2	4.2	0.3	2.5	42.4	3.2	27.7	0.1	16.4	0.6	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0										
JT1-3	4.5	0.3	2.7	44.6	3.1	26.8	0.1	14.8	0.7	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0											
JT1-4	5.1	0.3	3.2	26.8	3.5	17.4	0.5	22.8	0.7	2.5	1.1	0.2	0.0	0.0	1.2	0.3	2.9	0.7	0.0	0.1	0.2	0.3	<b>2.8</b>	<b>7.2</b>																
JT1-5	4.7	0.4	2.4	41.6	3.4	28.4	0.1	15.8	0.7	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0											
JT1-6	4.8	0.4	2.3	37.3	3.3	30.2	0.4	13.2	0.7	0.2	1.4	0.3	0.0	0.0	0.7	0.3	0.6	0.1	0.0	0.3	0.2	0.5	<b>2.6</b>	0.0																

[0620] 表15.来自用GA7-modB的T-DNA转染的印度芥菜T1(单一)种子的种子油的脂肪酸组成。

[0621]

T1种子编号	C16:0	16:1d9	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:5n3	C22:6n3
JT1-4-A-1	5.0	0.2	2.7	23.5	3.4	17.0	0.7	24.8	0.7	2.0	1.1	0.2	0.8	4.0	0.6	2.4	9.9
JT1-4-A-2	4.3	0.3	2.6	37.2	3.2	11.0	0.3	22.1	0.7	0.9	1.3	0.2	1.4	3.2	0.3	9.4	0.0
JT1-4-A-3	5.6	0.3	2.7	20.8	3.7	16.0	0.6	24.4	0.7	2.0	0.9	0.2	1.1	4.5	0.7	3.1	11.4
JT1-4-A-4	4.6	0.4	2.8	36.2	3.4	10.6	0.3	24.5	0.8	9.9	1.7	0.2	0.3	0.5	0.0	2.5	0.0
JT1-4-A-5	5.0	0.2	3.2	20.3	3.6	13.7	0.7	25.9	0.7	2.0	0.9	0.2	1.3	4.4	1.5	1.6	13.5
JT1-4-A-6	4.8	0.4	3.4	37.9	3.7	7.4	0.4	19.9	0.9	1.4	1.4	0.1	0.8	1.9	0.4	13.9	0.0
JT1-4-A-7	5.6	0.3	3.0	26.2	4.0	8.9	0.3	26.6	0.6	1.8	1.0	0.1	1.8	3.7	1.3	2.2	11.3
JT1-4-A-8	4.8	0.4	2.9	40.3	3.4	7.8	0.3	22.2	0.8	1.4	1.3	0.1	0.8	2.4	0.4	9.6	0.0
JT1-4-A-9	7.1	0.3	3.6	17.7	4.3	17.9	0.7	23.1	1.0	2.1	0.8	0.2	1.5	3.6	0.8	2.0	11.9
JT1-4-A-10	5.1	0.2	4.2	22.3	3.4	19.5	0.7	21.7	0.8	1.5	0.9	0.2	1.7	7.8	0.9	1.0	6.5
JT1-4-A-11	5.0	0.5	2.8	37.6	4.0	7.1	0.4	19.2	0.7	1.9	1.4	0.2	0.5	1.6	0.3	15.5	0.0
JT1-4-A-12	5.2	0.3	3.0	28.2	4.0	9.2	0.3	27.4	0.6	1.9	0.9	0.1	1.5	3.2	1.1	1.8	10.2
JT1-4-A-13	5.4	0.2	3.0	16.7	4.1	9.9	0.6	29.9	0.7	2.2	1.0	0.2	1.7	2.0	1.1	2.0	17.9
JT1-4-A-14	5.1	0.4	3.1	30.0	4.0	11.5	0.3	27.7	0.7	2.2	1.0	0.1	0.6	2.4	0.8	1.3	7.8



[0622]

JT1-4-A-15	5.1	0.4	2.5	34.2	3.6	6.9	0.6	20.4	0.7	1.6	1.1	0.2	0.6	4.7	0.9	15.2	0.0
JT1-4-B-1	5.5	0.2	2.7	18.9	4.0	17.6	0.8	24.1	0.8	2.2	1.0	0.2	1.2	4.6	0.9	2.2	11.5
JT1-4-B-2	5.5	0.2	2.7	20.2	4.0	14.3	0.5	25.5	0.7	1.7	0.9	0.2	1.6	8.7	1.3	2.2	8.5
JT1-4-B-3	5.3	0.3	3.6	34.1	3.5	35.0	0.6	9.3	0.8	0.2	1.4	0.4	0.6	0.9	0.1	0.3	2.1
JT1-4-B-4	5.3	0.3	3.1	25.2	3.6	17.0	0.7	24.1	0.7	1.9	1.0	0.2	0.8	4.3	0.5	2.3	7.8
JT1-4-B-5	5.5	0.5	2.2	30.1	4.6	10.2	0.5	21.7	0.6	1.4	1.1	0.2	0.9	2.4	0.5	16.1	0.0
JT1-4-B-6	5.6	0.3	2.5	19.5	3.8	15.2	0.5	27.7	0.6	2.1	0.9	0.2	1.1	3.7	0.6	3.3	11.1
JT1-4-B-7	5.9	0.5	2.0	29.9	4.0	11.2	0.3	26.2	0.6	11.5	1.4	0.2	0.3	0.4	0.0	4.1	0.1
JT1-4-B-8	6.2	0.5	1.9	33.1	4.0	30.0	0.5	12.7	0.6	0.3	1.3	0.4	1.4	0.9	0.1	4.4	0.0
JT1-4-B-9	4.9	0.2	3.4	24.6	3.0	18.5	0.3	26.2	0.8	1.3	1.1	0.2	2.0	5.5	0.6	0.8	5.2
JT1-4-B-10	5.2	0.3	2.7	19.0	4.0	12.0	0.6	30.5	0.7	1.6	1.0	0.2	1.7	4.9	1.1	3.0	10.2
JT1-4-B-11	4.8	0.2	3.0	23.7	3.1	18.1	0.6	23.5	0.7	1.6	1.2	0.2	1.5	4.5	0.8	1.6	9.6
JT1-4-B-12	5.0	0.2	2.6	19.6	3.4	12.5	0.6	26.9	0.8	3.1	1.1	0.2	0.9	5.6	0.9	3.5	11.7
JT1-4-B-13	5.6	0.3	2.8	20.9	3.9	11.9	0.4	27.0	0.7	2.0	1.0	0.2	1.7	2.3	0.7	4.1	13.5
JT1-4-B-14	5.1	0.3	3.1	25.5	3.3	16.7	0.7	23.9	0.8	1.8	1.2	0.2	0.9	2.6	0.4	2.9	9.2
JT1-4-B-15	5.6	0.3	2.7	19.5	4.1	14.0	0.8	24.6	0.7	2.7	0.9	0.2	0.7	9.4	1.3	2.5	8.5

[0623] 种子油样品还包含0.1%C14:0;0.1%-0.2%C16:3;0.0-0.1%各C20:1 $\Delta$ 13、C20:3 $\omega$ 6和C20:4 $\omega$ 6;0.3%-0.4%C22:0;没有C22:1和C22:2 $\omega$ 6;0.2%C24:0和0.2%-0.4%C24:1。

[0624] 表16.来自用GA7-modB的T-DNA转染的印度芥菜的T2单一种子的种子油的脂肪酸组成。

[0625]

编号	C16:0	16:1d9	16:3	C18:0	C18:1	C18:1d1	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4	C20:1d1	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:5n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	C22:2n6	C22:3n3	C24:0	22:5n6	22:4n3?	C24:1	22:5n3	C22:6n3
JT-1-4-19	4.4	0.3	0.2	1.7	36.3	2.9	8.3	0.5	22.0	0.5	1.4	1.2	0.1	0.0	0.0	0.4	0.3	4.2	0.6	0.0	0.1	0.1	0.0	1.8	0.3	12.1	0.0
JT-1-4-19	5.6	0.4	0.1	1.9	39.1	3.1	8.4	0.4	18.9	0.6	1.2	1.3	0.1	0.0	0.0	0.5	0.3	2.5	0.4	0.0	0.1	0.2	0.0	1.5	0.4	12.6	0.0
JT-1-4-19	5.5	0.4	0.2	1.8	42.3	3.2	9.9	0.3	24.0	0.6	5.9	1.5	0.2	0.0	0.0	0.2	0.4	0.5	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.4	0.4	1.5	0.0
JT-1-4-19	4.7	0.3	0.1	2.3	42.1	2.8	10.0	0.2	27.1	0.6	4.1	1.6	0.2	0.0	0.0	0.2	0.3	0.5	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.6	0.3	1.4	0.0
JT-1-4-19	5.6	0.4	0.1	1.5	36.8	3.7	9.4	0.3	19.6	0.5	0.6	1.4	0.2	0.0	0.0	1.4	0.3	1.9	0.3	0.0	0.2	0.2	0.0	1.6	0.4	13.1	0.0
JT-1-4-19	4.6	0.3	0.1	1.7	36.3	2.7	7.2	0.3	22.6	0.5	1.0	1.5	0.1	0.0	0.0	0.7	0.3	2.1	0.3	0.0	0.1	0.2	0.0	2.2	0.3	14.4	0.0
JT-1-4-19	4.9	0.3	0.1	1.8	38.3	3.1	7.4	0.3	20.2	0.5	0.8	1.3	0.1	0.0	0.0	0.8	0.3	2.7	0.5	0.0	0.2	0.2	0.0	1.7	0.3	13.7	0.0
JT-1-4-19	4.7	0.3	0.1	1.7	36.2	3.0	8.2	0.4	20.9	0.5	0.7	1.3	0.2	0.0	0.0	0.9	0.3	2.9	0.5	0.0	0.2	0.2	0.0	2.0	0.3	14.2	0.0
JT-1-4-19	4.8	0.3	0.1	2.2	41.0	3.0	9.8	0.2	27.0	0.5	4.2	1.8	0.2	0.0	0.0	0.3	0.3	0.5	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.7	0.3	2.2	0.0
JT-1-4-19	5.8	0.5	0.1	1.7	36.6	3.7	9.1	0.3	21.3	0.6	0.9	1.4	0.2	0.0	0.0	0.8	0.3	1.5	0.3	0.0	0.1	0.2	0.0	1.2	0.4	12.7	0.0
JT-1-4-19	4.8	0.4	0.1	2.1	47.1	2.9	7.4	0.2	23.9	0.6	4.8	1.7	0.1	0.0	0.0	0.2	0.3	0.5	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.5	0.3	1.5	0.0
JT-1-4-19	5.1	0.4	0.1	1.7	37.4	3.3	7.7	0.3	20.7	0.6	0.9	1.4	0.1	0.0	0.0	0.8	0.3	2.5	0.4	0.0	0.1	0.2	0.0	1.6	0.4	13.6	0.0
JT-1-4-19	4.7	0.3	0.1	1.8	37.3	2.7	7.9	0.4	20.6	0.5	1.1	1.3	0.1	0.0	0.0	0.5	0.3	4.3	0.6	0.0	0.1	0.1	0.0	2.2	0.3	12.3	0.0
JT-1-4-19	4.9	0.3	0.2	2.0	37.9	3.0	7.1	0.4	20.1	0.5	1.1	1.3	0.1	0.0	0.0	0.6	0.3	4.1	0.5	0.0	0.1	0.1	0.0	2.1	0.3	12.6	0.0
JT-1-4-19	4.7	0.3	0.1	1.6	35.7	3.2	6.9	0.3	22.4	0.5	0.7	1.4	0.1	0.0	0.0	1.3	0.3	3.0	0.5	0.0	0.2	0.1	0.0	1.9	0.3	14.0	0.0
JT-1-4-34	4.7	0.4	0.1	1.8	37.6	3.4	7.8	0.3	23.7	0.5	0.6	1.5	0.2	0.0	0.0	1.2	0.2	1.7	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	1.8	0.3	11.4	0.0
JT-1-4-34	5.3	0.4	0.1	1.6	35.3	3.5	8.1	0.5	21.1	0.5	0.8	1.2	0.1	0.0	0.0	0.7	0.3	3.1	0.5	0.0	0.2	0.1	0.0	1.9	0.3	13.9	0.0
JT-1-4-34	4.9	0.3	0.1	1.7	39.4	3.3	7.7	0.3	21.1	0.5	0.7	1.4	0.2	0.0	0.0	0.8	0.3	2.0	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	1.7	0.3	12.3	0.0
JT-1-4-34	5.0	0.3	0.1	1.8	38.5	3.1	7.8	0.4	20.5	0.5	0.8	1.3	0.2	0.0	0.0	0.8	0.2	2.3	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	2.0	0.3	13.1	0.0
JT-1-4-34	5.1	0.3	0.1	1.8	39.5	2.9	9.0	0.2	22.2	0.6	0.6	1.5	0.2	0.0	0.0	1.0	0.3	1.7	0.2	0.0	0.1	0.2	0.0	1.6	0.3	10.2	0.0
JT-1-4-34	4.8	0.3	0.1	1.8	38.2	3.2	7.8	0.4	21.1	0.5	0.7	1.4	0.2	0.0	0.0	0.7	0.3	2.1	0.4	0.0	0.2	0.1	0.0	1.7	0.3	13.3	0.0
JT-1-4-34	5.0	0.3	0.1	2.0	39.7	2.9	7.9	0.4	20.2	0.5	0.7	1.3	0.1	0.0	0.0	0.7	0.3	2.3	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	1.9	0.3	12.2	0.0
JT-1-4-34	4.7	0.3	0.1	1.6	36.0	3.3	8.3	0.3	23.7	0.5	0.6	1.5	0.2	0.0	0.0	1.2	0.3	1.7	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	1.8	0.3	12.7	0.0
JT-1-4-34	6.2	0.5	0.2	2.1	32.0	4.4	7.2	0.6	19.4	0.6	1.2	1.2	0.2	0.0	0.0	0.6	0.4	2.2	0.5	0.0	0.3	0.2	0.0	1.6	0.4	17.6	0.0

[0627] 表17.来自用GA7-modB的T-DNA转染的印度芥菜的T3单一种子的种子油的脂肪酸组成。

[0628]

JT-1-4-34-11	4.8	0.4	0.1	2.8	38.4	3.7	5.7	0.4	18.0	0.7	1.0	1.5	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.3	1.4	0.4	0.0	0.3	0.0	1.4	0.5	16.3	0.0
JT-1-4-34-11	4.3	0.4	0.1	3.0	43.3	3.6	5.2	0.2	18.5	0.7	0.8	1.7	0.1	0.1	0.0	0.0	1.4	0.3	1.2	0.3	0.0	0.2	0.0	1.2	0.3	12.4	0.0
JT-1-4-34-11	4.6	0.4	0.1	2.8	33.1	4.1	5.1	0.4	18.5	0.7	1.2	1.4	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.3	1.6	0.5	0.0	0.3	0.0	1.4	0.4	20.8	0.0
JT-1-4-34-11	4.5	0.4	0.1	2.9	39.5	3.3	6.3	0.4	18.5	0.8	1.2	1.5	0.1	0.1	0.0	0.0	1.0	0.3	1.7	0.3	0.0	0.2	0.0	1.8	0.3	14.2	0.0
JT-1-4-34-11	4.9	0.5	0.2	2.8	32.2	3.9	4.7	0.3	20.7	0.8	1.2	1.4	0.1	0.2	0.0	0.0	2.0	0.3	1.4	0.5	0.0	0.3	0.0	1.2	0.4	19.4	0.0
JT-1-4-34-11	4.3	0.3	0.1	3.0	38.1	3.2	5.8	0.3	19.4	0.7	1.1	1.5	0.1	0.1	0.0	0.0	1.2	0.3	1.5	0.4	0.0	0.2	0.0	1.3	0.4	16.0	0.0
JT-1-4-34-11	5.4	0.5	0.2	3.2	29.3	4.0	4.6	0.4	18.6	0.9	1.7	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.2	0.4	1.6	0.7	0.0	0.3	0.0	1.4	0.5	22.9	0.0
JT-1-4-34-11	5.2	0.5	0.2	3.7	34.5	4.1	4.5	0.3	17.2	1.0	1.4	1.4	0.1	0.1	0.0	0.0	1.5	0.4	1.4	0.6	0.0	0.3	0.0	1.2	0.5	19.4	0.0
JT-1-4-34-11	5.3	0.5	0.1	3.4	33.4	3.7	4.6	0.3	17.6	0.9	1.7	1.2	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.4	1.5	0.6	0.0	0.2	0.0	1.2	0.5	20.7	0.0
JT-1-4-34-11	4.6	0.4	0.1	3.0	39.5	3.5	5.1	0.3	17.8	0.8	0.8	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	1.4	0.4	1.3	0.4	0.0	0.3	0.0	1.3	0.4	16.1	0.0
JT-1-4-34-11	4.3	0.4	0.1	3.1	41.7	3.5	5.6	0.2	19.0	0.7	0.9	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	1.3	0.3	1.4	0.3	0.0	0.2	0.0	1.5	0.3	12.7	0.0
JT-1-4-34-11	4.8	0.5	0.2	2.8	33.8	4.0	5.3	0.4	18.2	0.7	1.4	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.2	0.3	1.6	0.6	0.0	0.3	0.0	1.3	0.4	20.1	0.0
JT-1-4-34-11	4.4	0.4	0.1	3.5	40.3	3.5	5.2	0.2	19.1	0.7	1.0	1.5	0.1	0.1	0.0	0.0	1.6	0.3	1.4	0.4	0.0	0.2	0.0	1.4	0.3	13.8	0.0

[0629]	JT-1-4-34-11	4.8	0.4	0.1	3.2	36.1	3.7	5.9	0.3	19.9	0.7	1.4	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.3	1.9	0.5	0.0	0.2	0.0	1.7	0.3	15.4	0.0
	JT-1-4-34-11	4.0	0.3	0.1	2.8	37.2	3.2	4.9	0.3	19.6	0.8	0.9	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	1.5	0.4	1.3	0.5	0.0	0.3	0.0	1.1	0.4	17.9	0.0
	JT-1-4-34-11	4.5	0.4	0.1	3.8	36.7	3.2	4.5	0.2	19.0	0.9	1.1	1.4	0.1	0.1	0.0	0.0	1.8	0.4	1.2	0.5	0.0	0.2	0.0	1.0	0.5	17.8	0.0
	JT-1-4-34-11	5.2	0.4	0.2	2.8	27.8	3.7	5.3	0.5	18.3	0.8	1.7	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.0	0.4	1.9	0.7	0.0	0.3	0.0	1.7	0.5	24.7	0.0
	JT-1-4-34-11	5.4	0.6	0.2	2.8	31.7	4.1	4.6	0.3	18.5	0.8	1.3	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.4	0.4	1.4	0.6	0.0	0.2	0.0	1.3	0.4	21.8	0.0
	JT-1-4-34-11	6.4	0.6	0.1	2.7	30.3	3.5	4.1	0.4	16.1	0.8	2.1	1.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.9	0.4	1.4	0.7	0.0	0.2	0.0	1.1	0.5	25.8	0.0
	JT-1-4-34-11	4.3	0.3	0.1	3.2	39.2	3.3	5.7	0.2	20.1	0.7	0.9	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	1.7	0.3	1.3	0.3	0.0	0.2	0.0	1.3	0.3	14.1	0.0
	JT-1-4-34-21	4.2	0.4	0.1	2.3	39.9	3.9	5.9	0.3	20.2	0.6	0.9	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.3	1.5	0.3	0.0	0.3	0.0	1.8	0.4	13.3	0.0
	JT-1-4-34-21	4.4	0.4	0.1	2.7	38.8	3.9	5.7	0.4	18.5	0.6	1.3	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	0.8	0.3	1.8	0.4	0.0	0.3	0.0	1.7	0.3	15.6	0.0
	JT-1-4-34-21	4.2	0.4	0.1	2.0	42.4	3.6	6.0	0.4	19.1	0.5	1.0	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	0.9	0.2	1.5	0.3	0.0	0.3	0.0	1.6	0.3	12.9	0.0

[0630] 为了进一步产生包含DPA并不包含DHA的种子, modB构建体形成的变型的遗传构建体缺乏 $\Delta 4$ -去饱和酶基因,如下所示的。合成具有适当限制性位点的两个DNA片段, EPA-DPA片段1和EPA-DPA片段2(Geneart, Germany)。通过将EPA-DPA片段1的AatII-MluI片段克隆到早期用于构建含有 $\Delta 6$ 去饱和酶盒的modB的载体11ABHZHC\_GA7-frag\_d6D\_pMS的AscI-AatII位点中来生成中间体克隆载体pJP3660。然后通过将pJP3660的PmeI-PspOMI片段克隆到modB的PmeI-PspOMI位点中来生成pJP3661。然后通过将EPA-DPA片段2的BsiWI-PspOMI片段克隆到pJP3661的BsiWI-PspOMI位点中来构建图6中的DPA载体pJP3662。此载体包含编码将油酸转化为DPA-n3和对应 $\omega$ -6脂肪酸的酶的脂肪酸生物合成基因。

[0631] 所得构建体用于转染印度芥菜和欧洲油菜。产生在种子脂质的总脂肪酸含量中具有多至35%DPA的后代种子。

[0632] 在通过NMR检查从产生DHA的植物种子中提取的油时,观察到至少95%DHA存在于TAG分子的sn-1,3位置。在通过NMR检查从产生DPA的植物种子中提取的油时,观察到至少90%DPA存在于TAG分子的sn-1,3位置。

[0633] 实施例8.转化的植物和田地试验的进一步分析

[0634] 对用来自GA7-modB构建体的T-DNA转化的选择的T2欧洲油菜植物进行DNA印迹杂交分析。用若干种用于DNA印迹杂交分析的限制性酶消化从植物组织样品中提取的DNA。将与T-DNA部分相对应的放射性探针杂交到在严格条件下洗涤的印迹上,并且所述印迹暴露于胶片,以检测杂交带。一些样品展示与植物中的单一T-DNA插入物相对应的每种限制性消化的单一杂交带,而其它样品显示两个带并且另外的其它样品显示与4至6个插入物相对应的多个T-DNA带。通过DNA印迹分析观察到的多个杂交带与转基因植物中的T-DNA拷贝数良好相关,所述拷贝数如通过数字PCR方法确定的,高达约3个或4个拷贝数。在高于约5的拷贝数下,数字PCR方法为不太可靠的。

[0635] 一些选择的品系在与不同遗传背景的一系列约30种不同的欧洲油菜品种杂交时用作花粉供体。进行进一步回交,以证实多个T-DNA插入物是否为遗传连接,并且允许遗传未连接的转基因的基因座聚集。因此,选择含有单一转基因的基因座的品系。

[0636] 使用与T-DNA的左边界和右边界相邻的引物对转基因品系进行单一引物的PCR反应,并且丢弃显示T-DNA反向重复的存在的任何品系。

[0637] 若干种转基因品系显示延迟开花,而其它品系具有减少的种子集并且因此在温室中生长之后减少每株植物的种子产量,这与减小的雄性或雌性生育力相一致。在这些植物中查看花部形态并且观察到,在一些情况下,延迟花粉从花药上裂开并释放,以使得花柱在出现裂开之前拉长,从而花药远离柱头。可通过人工授粉恢复全部生育力。此外,通过用活体染色剂FDA和PI(实施例1)染色确定裂开的花粉生活力,并且在一些品系中显示降低,而在大部分转基因品系中,花粉生活力与野生型对照一样为约100%。作为可能在一些植物中引起减少的种子产量的另一种测试,对一些T3和T4植物的花芽(包括花药和柱头/花柱)的

脂肪酸含量和组成进行测试。在所提取的脂质中没有检测到DHA,这指示遗传构建体中的基因在植物发育期间并不在花芽中表达,并且作为种子产量减小的原因而将此排除。

[0638] 通过NMR测量油含量并且确定T2种子的总脂肪酸含量中的DHA水平。丢弃具有少于6%DHA的转基因品系。通过数字PCR方法确定来自T1、T2和T3代植物的叶样品中的T-DNA拷贝数目(实施例1)。

[0639] 将选择的T3和T4种子批次播种到Australia的Victoria的两个位置的田地中,各自以约10颗种子/m的播种密度播种10m的行。所选择的种子批次包括显示约8%-11%的集合的种子DHA水平和高达约19%的单个T2种子DHA水平的B003-5-14来源的品系,其中T0植物T-DNA拷贝数目为3。所选择的种子批次还包括显示超过20%的T2种子DHA水平和1或2的T2植物T-DNA拷贝数目的B0050-19和B0050-27来源的品系。确定每种植物的种子产量并且与在相同条件下生长的野生型对照进行比较。将其它种子样品播种在较大面积中,以使所选择的转基因品系形成大数目。基于来自温室中生长的植物的种子中的DHA含量,预期收获的种子中的总DHA含量为至少24mg/g种子。

[0640] 本领域技术人员应了解的是,可在不脱离如广泛描述的本发明的精神或范围的情况下对如特定实施方案中所示的本发明做出众多变化和/或修改。因此,本发明实施方案在所有方面都应视为说明性而非限制性的。

[0641] 本文所讨论和/或参照的所有出版物都整体并入本文。

[0642] 对文件、法案、材料、装置、物品等的已包括在本说明书中的任何论述都仅出于提供本发明的情形的目的。不应视为认可的是任何或所有这些事项因为在本申请的各权利要求的优先日期之前存在而形成成为先前技术基础的一部分或是与本发明相关的领域中的普通常识。

#### [0643] 参考文献

- [0644] Abbadi et al. (2004) Plant Cell 16:2734-2748.
- [0645] Abbott et al. (1998) Science 282:2012-2018.
- [0646] Abdullah et al. (1986) Biotech. 4:1087.
- [0647] Agaba et al. (2004) Marine Biotechnol. (NY) 6:251-261.
- [0648] Alvarez et al. (2000) Theor Appl Genet 100:319-327.
- [0649] Armbrust et al. (2004) Science 306:79-86.
- [0650] Baumlein et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 225:459-467.
- [0651] Baumlein et al. (1992) Plant J. 2:233-239.
- [0652] Beaudoin et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6421-6426.
- [0653] Belide et al. (2013) Plant Cell Tiss Organ Cult. 113:543-553.
- [0654] Berberich et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:297-306.
- [0655] Broun et al. (1998) Plant J. 13:201-210.
- [0656] Chadman et al. (2004) Gen. Dev. 18:1179-1186.
- [0657] Chen et al. (2004) The Plant Cell 16:1302-1313.
- [0658] Cheng et al. (1996) Plant Cell Rep. 15:653-657.
- [0659] Cheng et al. (2010) Transgenic Res 19:221-229.
- [0660] Chikwamba et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:11127-11132.



- [0661] Cho et al. (1999a) J. Biol. Chem. 274:471-477.
- [0662] Cho et al. (1999b) J. Biol. Chem. 274:37335-37339.
- [0663] Clough and Bent (1998) Plant J. 16:735-43.
- [0664] Damude et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103:9446-9451.
- [0665] Denic and Weissman (2007) Cell 130:663-677.
- [0666] Domergue et al (2002) Eur. J. Biochem. 269:4105-4113.
- [0667] Domergue et al. (2002) Eur. J. Biochem. 269:4105-4113.
- [0668] Domergue et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:35115-35126.
- [0669] Domergue et al. (2005) Biochem. J. 1 389:483-490.
- [0670] Dunoyer et al. (2004) The Plant Cell 16:1235-1250.
- [0671] Ellerstrom et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:1019-1027.
- [0672] Fujimura et al. (1985) Plant Tissue Culture Lett. 2:74.
- [0673] Gamez et al. (2003) Food Res International 36:721-727.
- [0674] Garcia-Maroto et al. (2002) Lipids 37:417-426.
- [0675] Girke et al. (1998) Plant J. 15:39-48.
- [0676] Grant et al. (1995) Plant Cell Rep. 15:254-258.
- [0677] Hamilton and Baulcombe (1999) Science 286:950-952.
- [0678] Hamilton et al. (1997) Gene 200:107-16.
- [0679] Harayama (1998) Trends Biotechnol. 16:76-82.
- [0680] Hastings et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14304-14309.
- [0681] Hinchee et al. (1988) Biotechnology 6:915-922.
- [0682] Hoffmann et al. (2008) J Biol. Chem. 283:22352-22362.
- [0683] Hong et al. (2002a) Lipids 37:863-868.
- [0684] Horiguchi et al. (1998) Plant Cell Physiol. 39:540-544.
- [0685] Horvath et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:1914-1919.
- [0686] Huang et al. (1999) Lipids 34:649-659.
- [0687] Inagaki et al. (2002) Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:613-621.
- [0688] Johansen and Carrington (2001) Plant Physiol. 126:930-938.
- [0689] Kajikawa et al. (2004) Plant Mol. Biol. 54:335-52.
- [0690] Kajikawa et al. (2006) FEBS Lett 580:149-154.
- [0691] Kereszt et al. (2007) Nature Protoc 2:948-952.
- [0692] Koletzko et al. (1988) Am. J. Clin. Nutr. 47:954-959.
- [0693] Knutzon et al. (1998) J. Biol Chem. 273:29360-6.
- [0694] Kozziel et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:393-405.
- [0695] Leonard et al. (2000) Biochem. J. 347:719-724.
- [0696] Leonard et al. (2000b) Biochem. J. 350:765-770.
- [0697] Leonard et al. (2002) Lipids 37:733-740.
- [0698] Lewsey et al. (2007) Plant J. 50:240-252.
- [0699] Lo et al. (2003) Genome Res. 13:455-466.

- [0700] Lu and Kang(2008)Plant Cell Rep.27:273-8.
- [0701] Mallory et al.(2002)Nat.Biotech.20:622-625.
- [0702] Marangoni et al.(1995)Trends in Food Sci.Technol.6:329-335.
- [0703] Meesapyodsuk et al.(2007)J Biol Chem 282:20191-20199.
- [0704] Meng et al.(2008)J.Gen.Virol.89:2349-2358.
- [0705] Meyer et al.(2003)Biochem.42:9779-9788.
- [0706] Meyer et al.(2004)Lipid Res 45:1899-1909.
- [0707] Michaelson et al.(1998a)J.Biol.Chem.273:19055-19059.
- [0708] Michaelson et al.(1998b)FEBS Lett.439:215-218.
- [0709] Murashige and Skoog(1962)Physiologia Plantarum 15:473-497.
- [0710] Napier et al.(1998)Biochem.J.330:611-614.
- [0711] Needleman and Wunsch(1970)J.Mol.Biol.48:443-453.
- [0712] Niedz et al.(1995)Plant Cell Reports 14:403.
- [0713] Ow et al.(1986)Science 234:856-859.
- [0714] Parker-Barnes et al.(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:8284-8289.
- [0715] Pereira et al.(2004a)Biochem.J.378:665-671.
- [0716] Pereira et al.(2004b)Biochem.J.384:357-366.
- [0717] Perrin et al.(2000)Mol Breed 6:345-352.
- [0718] Petrie et al.(2010a)Metab.Eng.12:233-240.
- [0719] Petrie et al.(2010b)Plant Methods 11:6:8.
- [0720] Petrie et al.(2012)Transgenic Res.21:139-147.
- [0721] Potenza et al.(2004)In Vitro Cell Dev Biol-Plant 40:1-22.
- [0722] Prasher et al(1985)Biochem.Biophys.Res.Communi.127:31-36.
- [0723] Qi et al.(2002)FEBS Lett.510:159-165.
- [0724] Qi et al.(2004)Nat.Biotech.22:739-745.
- [0725] Qiu et al.(2001)J.Biol.Chem.276:31561-31566.
- [0726] Reddy and Thomas(1996)Nat.Biotech.14:639-642.
- [0727] Reddy et al.(1993)Plant Mol.Biol.22:293-300.
- [0728] Robert et al.(2005)Func.Plant Biol.32:473-479.
- [0729] Robert et al.(2009)Marine Biotech 11:410-418.
- [0730] Ruiz-Lopez et al.(2012)Transgenic Res.21:139-147.
- [0731] Saha et al.(2006)Plant Physiol.141:1533-1543.
- [0732] Saito et al.(2000)Eur.J.Biochem.267:1813-1818.
- [0733] Sakuradani et al.(1999)Gene 238:445-453.
- [0734] Sato et al.(2004)Crop Sci.44:646-652.
- [0735] Sakuradani et al.(2005)Appl.Microbiol.Biotechnol.66:648-654.
- [0736] Sayanova et al.(2006)J Biol Chem 281:36533-36541.
- [0737] Sayanova et al.(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.94:4211-4216.
- [0738] Sayanova et al.(2003)FEBS Lett.542:100-104.

- [0739] Sayanova et al. (2006) *Planta* 224:1269-1277.
- [0740] Sayanova et al. (2007) *Plant Physiol* 144:455-467.
- [0741] Singh et al. (2005) *Curr. Opin. in Plant Biol.* 8:197-203.
- [0742] Speranza et al. (2012) *Process Biochemistry* (In Press).
- [0743] Sperling et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:3801-3811.
- [0744] Sperling et al. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* 388:293-8.
- [0745] Sprecher et al. (1995) *J. Lipid Res.* 36:2471-2477.
- [0746] SDychalla et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1142-1147.
- [0747] Stalker et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314.
- [0748] Thillet et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:12500-12508.
- [0749] Tonon et al. (2003) *FEBS Lett.* 553:440-444.
- [0750] Toriyama et al. (1986) *Theor. Appl. Genet.* 205:34.
- [0751] Trautwein (2001) *European J. Lipid Sci. and Tech.* 103:45-55.
- [0752] Tvrdik (2000) *J. Cell Biol.* 149:707-718.
- [0753] Venegas-Caleron et al. (2010) *Prog. Lipid Res.* 49:108-119.
- [0754] Voinnet et al. (2003) *Plant J.* 33:949-956.
- [0755] Wallis and Browse (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 365:307-316.
- [0756] Watts and Browse (1999b) *Arch. Biochem. Biophys.* 362:175-182.
- [0757] Weiss et al. (2003) *Int. J. Med. Microbiol.* 293:95:106.
- [0758] Weng et al. (2004) *Plant Molecular Biology Reporter* 22:289-300.
- [0759] Whitney et al. (2003) *Planta* 217:983-992.
- [0760] Winans (1988) *J. Bacteriol.* 170:4047-54.
- [0761] Wood (2009) *Plant Biotechnol J.* 7:914-24.
- [0762] Wu et al. (2005) *Nat. Biotech.* 23:1013-1017.
- [0763] Yang et al. (2003) *Planta* 216:597-603.
- [0764] Zank et al. (2002) *Plant J.* 31:255-268.
- [0765] Zank et al. (2005) WO 2005/012316
- [0766] Zhang et al. (2004) *FEBS Lett.* 556:81-85.
- [0767] Zhang et al. (2006) 20:3255-3268.
- [0768] Zhang et al. (2007a) *FEBS Letters* 581:315-319.
- [0769] Zhang et al. (2008) *Yeast* 25:21-27.
- [0770] Zhou et al. (2007) *Phytochem.* 68:785-796.
- [0771] Zhou et al. (2008) *Insect Mol Biol* 17:667-676.

- [0001] 序列表
- [0002] <110>联邦科学技术研究组织
- [0003] 粮食研究发展公司
- [0004] 纽希德私人有限公司
- [0005] <120> 包含二十二碳五烯酸的提取的植物脂质
- [0006] <130> 516027
- [0007] <150> AU 2014902471
- [0008] <151> 2014-06-27
- [0009] <150> AU 2013905033
- [0010] <151> 2014-12-18
- [0011] <150> US 14/575,756
- [0012] <151> 2014-12-18
- [0013] <160> 51
- [0014] <170> PatentIn 3.5版
- [0015] <210> 1
- [0016] <211> 21527
- [0017] <212> DNA
- [0018] <213> 人工序列
- [0019] <220>
- [0020] <223> pJP3416-GA7核苷酸序列.
- [0021] <400> 1
- [0022] tcctgtggtt ggcattgcaca tacaattgga cgaacggata aaccttttca cgccctttta 60
- [0023] aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttaccgcca atatattcctg 120
- [0024] tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagt gatctccag 180
- [0025] tcacgacgtt gtaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcccgat ctagtaacat 240
- [0026] agatgacacc gcgcgcgata atttatccta gtttgccgcgc tatattttgt tttctatcgc 300
- [0027] gtattaaatg tataattgcg ggactctaata cataaaaacc catctcataa ataacgtcat 360
- [0028] gcattacatg ttaattatta cgtgcttaac gtaattcaac agaaattata tgataatcat 420
- [0029] cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt ttgaacgatc 480
- [0030] ggccgcgcctc attagtgage cttctcagcc ttcccgtaa cgtagtagtg ctgtcccacc 540
- [0031] ttatcaaggt tagagaaagt agccttccaa gcaccgtagt aagagagcac cttgtagttg 600
- [0032] agtccccact tcttagcgaa aggaacgaat cttctgctaa cctcaggctg tctgaattga 660
- [0033] ggcatatcag ggaagagggt gtggataaacc tgacagttaa ggtatcccat aagccagttc 720
- [0034] acgtatcctc tagaaggatc gatatcaacg gtgtgatcaa cagcgtagtt aaccaagaa 780
- [0035] aggtgcttat cagatggaac aacaggagg tgagtatgag aagtagagaa gtgagcgaaa 840
- [0036] aggtacatgt aagcgatcca gtttccgaaa gtgaaccacc agtaagcaac aggccaagag 900
- [0037] tatccagtag caagcttgat aacagcggtt ctaacaacat gagaaacgag catccaagaa 960
- [0038] gcctcttcgt agttcttctt acggagaact tgtctagggt ggagaacgta gatccagaaa 1020
- [0039] gcttgaacaa gaagtccaga ggtaacagga acgaaagtcc aagcttgaag tctagcccaa 1080
- [0040] gctctagaga atcctctagg tctgttatcc tcaacagcag tgttgaagaa agccacagca 1140
- [0041] ggagtggat caagatccat atcgtgtcta accttttgag gggtagcatg gtgcttgta 1200

[0042]	tgcatctggt tccacatctc accagaagta gaaagtccga atccacaagt catagcctga	1260
[0043]	agtctcttgt ccacgtaaac agatccggtg agagagttat gtccaccctc atgttgaacc	1320
[0044]	catccacatc tagtccgaa gaaagcaccg taaacaacag aagcaatgat aggggtatcca	1380
[0045]	gcgtacataa gagcagttcc aagagcgaat gtagcaagaa gctcgagaag tctgtaagcc	1440
[0046]	acatgggtga tagaaggctt gaagaatcca tctctctcaa gctcagcacg ccatctagcg	1500
[0047]	aaatcctcaa gcataggagc atcctcagac tcagatctct tgatctcagc aggtctagaa	1560
[0048]	ggcaaagctc taagcatctt ccaagccttg agagaacgca tgtggaattc tttgaaagcc	1620
[0049]	tcagtagcat cagcaccagt gttagcaagc atgtagaaga tcacagatcc accagggtgc	1680
[0050]	ttgaagttag tcacatcgta ctcaacgtcc tcaactctaa cccatctagt ctcgaaagta	1740
[0051]	gcagcaagct catgaggctc aagagtctta agatcaacag gagcagtaga agcatcctta	1800
[0052]	gcatcaagag cctcagcaga agatttagac ctggttaagt gagatctagg agaagatctt	1860
[0053]	ccatcagtct taggagggca catggtatgg taattgtaaa tgtaattgta atgttgtttg	1920
[0054]	ttgtttgttg ttgttggtta ttgttgtaaa agatcctcgt gtatgttttt aatcttgttt	1980
[0055]	gtatcgatga gttttggttt gagtaaagag tgaagcggat gagttaattt ataggctata	2040
[0056]	aaggagattt gcatggcgat cacgtgtaat aatgcatgca cgcattgtat tgtatgtgtg	2100
[0057]	tgctgtgaga gagaagctct taggtgtttg aaggagtgta caagtggcga agaaaaacaa	2160
[0058]	ttctccgagg ctgcatgcta tgtgtaacgt gtagctaatag ttctggcatg gcattctatg	2220
[0059]	aacgattctt tttaaaaaca aggtaaaaac ttaacttcat aaaattaaaa aaaaaaacgt	2280
[0060]	ttactaagtt ggtttaaaag gggatgagac tagtagattg gttggttggt ttccatgtac	2340
[0061]	cagaaggctt accctattag ttgaaagttg aaactttgtt ccctactcaa ttccatgttg	2400
[0062]	tgtaaatgta tgtatatgta atgtgtataa aacgtagtac ttaaatgact aggagtgggt	2460
[0063]	cttgagaccg atgagagatg ggagcagaac taaagatgat gacataatta agaacgaatt	2520
[0064]	tgaaaggctc ttaggtttga atcctattcg agaattgttt tgtcaaagat agtggcgatt	2580
[0065]	ttgaacccaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccggtta cgttcattgca aatagaaagt	2640
[0066]	ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca atcctggctg	2700
[0067]	tgtacaaaac tacaaataat atattttaga ctatttggcc ttaactaaac ttccactcat	2760
[0068]	tatttactga ggtagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccagaa atactcatga	2820
[0069]	tcccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc cctcaaattt	2880
[0070]	taatgcacat gtaatcatag tttagcacia ttcaaaaata atgtagtatt aaagacagaa	2940
[0071]	attttagaac ttttttttgg cgttaaaaga agactaagtt tatacgtaca ttttatttta	3000
[0072]	agtggaaaac cgaaattttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat ttctgcaatg	3060
[0073]	tactattttg ctattttggc aactttcagt ggactactac tttattacaa tgtgtatgga	3120
[0074]	tgcatgagtt tgagtataca catgtctaaa tgcatgcttt gtaaaacgta acggaccaca	3180
[0075]	aaagaggatc catacaaata catctcatag ctctctccat tattttccga cacaacaga	3240
[0076]	gcattttaca acaattacca acaacaacaa acaacaacaa acattacaat tacatttaca	3300
[0077]	attaccatac catggaattc gccagcctc ttgttgctat ggctcaagag caatacgtcg	3360
[0078]	ctatcgatgc tgttggtgct cctgctatct tctctgtac tgattctatc ggatggggac	3420
[0079]	ttaagcctat ctcttctgct actaaggact tgctcttctg tgagtctcct acacctctca	3480
[0080]	tcctttcttt gcttgcttac ttgctatcg ttggatctgg actcgtttac agaaaggttt	3540
[0081]	tccttagaac cgtgaaggga caagatccat tccttttgaa ggctcttatg cttgctcaca	3600
[0082]	acgtgttcct tatcggaatt tctctttaca tgtgcctcaa gcttggttac gaggcttacg	3660
[0083]	ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaacctgc tcaactgag atggctaagg	3720

[0084]	ttatctggat cttctacgtg agcaagatct acgagttcat ggataccttc atcatgctcc	3780
[0085]	tcaagggaat tgtaaccag gtagcttcc ttcacgttta ccatcacgga tctatctctg	3840
[0086]	gaatctggtg gatgattact tacgtctctc ctgggtggtga tgcttacttc tctgtctctc	3900
[0087]	ttaactcttg ggttcacgtg tgtatgtaca cctactatct tatggctgcc gtgcttccta	3960
[0088]	aggacagaaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact caaatgcaga	4020
[0089]	tggtccagtt cttcatgaac cttctccagg ctgtttacct tctctactct tcatctcctt	4080
[0090]	accctaagtt tatcgtcag ctctcgttg tgtacatggg tactcttctc atgcttttcg	4140
[0091]	gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgcgc gccgcgcgc	4200
[0092]	atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg atcgttagtg	4260
[0093]	attgtcattg ttatatataa taatgttact ttccacaact tatcgtaatg catgtgaaac	4320
[0094]	tataacacat taatctact tgtcatatga taacactctc cccatttaaa actcttgtca	4380
[0095]	atttaaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaata tattataaat tcaatcactc	4440
[0096]	ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa ataccttatac taatttagtc	4500
[0097]	tgaatagaat aattagattc tagtctcatc cccttttaaa ccaacttagt aaacgttttt	4560
[0098]	ttttttaatt ttatgaagtt aagtttttac cttgttttta aaaagaatcg ttcataagat	4620
[0099]	gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag aattgttttt	4680
[0100]	cttcgccact tgtcactccc ttcaaaccac taagagcttc tctctcacag cacacacata	4740
[0101]	caatcacatg cgtgcatgca ttattacacg tgatcgccat gcaaatctcc tttatagcct	4800
[0102]	ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat acaacaaga	4860
[0103]	ttaaaaacat acacaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaacaaac	4920
[0104]	attacaatta catttacaat taccatacca tgctccaag ggactcttac tcttatgctg	4980
[0105]	ctctccttc tgctcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac aagaaagagc	5040
[0106]	ttgttatcgg agatagggtt tacgatgtta ccaacttctg taagagacac cctggtggaa	5100
[0107]	agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag ttccatgtta	5160
[0108]	gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctcttccttc tegtctgtt cacaaggat	5220
[0109]	actctccaag aagggtgat cttatcgtg atttccaaga gttaccaag caacttgagg	5280
[0110]	ctgagggaat gttcagacct tctcttcctc atgttgctta cagacttgct gaggttatcg	5340
[0111]	ctatgcatgt tgctggtgct gctcttatct ggcatggata cactttcgtt ggaatcgcta	5400
[0112]	tgcttgaggt tggtcagga agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga cattactctc	5460
[0113]	tcactgaaa cattgctttc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga cttggatgtg	5520
[0114]	gaatgtctgg tgcttggtgg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact cctcaaaagc	5580
[0115]	ttcagcacga tggtgatctt gatacccttc ctctcgttg tttccatgag agaatcgctg	5640
[0116]	ctaagggtta gtctcctgct atgaaggtt ggctttctat gcaagctaag cttttcgtc	5700
[0117]	ctgttaccac tcttctgtt gctcttggtt ggcagcttta ccttcacct agacacatgc	5760
[0118]	tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgctcggaat cagatacga cttgttggt	5820
[0119]	accttgctgc taactacggt gctggatagc ttctcgttg ttaccttctt tacgttcagc	5880
[0120]	ttggagctat gtacatcttc tgcaacttcg ctgtttctca tactcacctc cctgttggtg	5940
[0121]	agcctaacga gcatgctact tgggttgagt acgtgctaa ccacactact aactgttctc	6000
[0122]	catcttggtg gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag caccacctt	6060
[0123]	accttctat gcctcaattc agacacccta agatcgctcc tagagttaag cagcttttcg	6120
[0124]	agaagcacgg acttcactac gatgttagag gatacttcga ggctatggct gatactttcg	6180
[0125]	ctaaccttga taacgttgcc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga gatcgttcaa	6240

[0126]	acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg atgattatca 6300
[0127]	tataatttct gttgaattac gttaagcacg taataattaa catgtaatgc atgacgttat 6360
[0128]	ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa 6420
[0129]	acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcg cgtgtcatct atgttactag 6480
[0130]	atcggtcgat taaaaatccc aatttatattt ggtctaattt agtttggtat tgagtaaaac 6540
[0131]	aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct ttaagacttt 6600
[0132]	ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat 6660
[0133]	ttcgttaaat atgaagtgt ccatTTTTat taactttaaa taattggtg tacgatcact 6720
[0134]	ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt catatgtcaa 6780
[0135]	aatctatcaa aattcttata tatctttt cgaatttgaag tgaaatttcg ataatttaaa 6840
[0136]	attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt ttataactta attactaaat 6900
[0137]	ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa 6960
[0138]	tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta 7020
[0139]	aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat 7080
[0140]	taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaacc ggcaaaaccg 7140
[0141]	aaccaatcca aaccgatata gttggtttg tttgattttg atataaaccg aaccaactcg 7200
[0142]	gtccatttgc acccctaate ataatagtct taatatttca agatattatt aagttaacgt 7260
[0143]	tgtcaatate ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt 7320
[0144]	aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaa atatcccaag 7380
[0145]	tattaataat ttctgctagg aagaaggta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa 7440
[0146]	agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatattt taaaaaata 7500
[0147]	cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tattttttgt tcttaacaa gcacccctc 7560
[0148]	taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaattt 7620
[0149]	ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtgatagaa cccacacgag catgtgcttt 7680
[0150]	ccatttaatt ttaaaaacca agaaacatac atacataaca ttccatcagc ctctctctct 7740
[0151]	ttttattacg gttaatgact taaaacacat cttattatcc catccttaac acctagcagt 7800
[0152]	gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg ctgcccctgg 7860
[0153]	agctggcatc ggctaggctg ggtgccgcac tgtcccgga ggtccctagc gacttgttta 7920
[0154]	gattgatggg accacctctc aacttctgc tgcgttcct gctgctggat gtctgcctc 7980
[0155]	atctggccga ttgcacgctc cagtcccctg catgtgcaact cgtctctcaa ttgcttaaga 8040
[0156]	tcacgcgagc agtatcgaa gtgctggctc tgttgccctc ctccacggcc ttggtttag 8100
[0157]	tagtagctgc cgccgccctt ctggactttt tcccacagga accgccgaat aattcgaat 8160
[0158]	aaccacacga gcatgtgctt tcatttattt taaaaacca gaaacataca taacatttca 8220
[0159]	tcagctctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctt 8280
[0160]	ttacagctgt tactaact taaaacacat tcattcatt attattatta ttatccatcc 8340
[0161]	ttaaaccta gcagtgtctt tgtacgatct cataatgat cacccttca tcaggtatcc 8400
[0162]	ttaggttca ctccaacgtt gttgcagta cggaacatgt acacaccatc atggttctca 8460
[0163]	acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaacc acatgttctc atcgggtgtgt 8520
[0164]	ctgtagtgct ctcccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc atggtagaat 8580
[0165]	gggatccttg aaacgtagtg atggagcaca tgagtctcga tgatgtcatg gaagatgatt 8640
[0166]	ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa agtccactct 8700
[0167]	tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac gaaaacaagc 8760

[0168]	cagtggttaa caaggatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca gaatccgaaa	8820
[0169]	accttgtaag cgggtgtaaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc agaaagaacg	8880
[0170]	atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg agacttgaag	8940
[0171]	aacttagaaa caccagggtg aggttggtcca gtagcgtag tagcaaggta aagagaaaagt	9000
[0172]	cctccaagct gttggaacaa gagagcgaac acagagtaga taggagtttc ctacgcgata	9060
[0173]	tcgtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcgggtga aggaacgaaa	9120
[0174]	accatatctc tggatcatgtg tccagtagcc ttatgggtgt tagcatgaga gaacttccag	9180
[0175]	ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaaccatc caacgggtatc gttaacccat	9240
[0176]	ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat tccgaatccg	9300
[0177]	aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa ttcgtagggg	9360
[0178]	agaagaggga tgtaggtaag tccaacgtaa gcgtagcag agatagccac gatattctctc	9420
[0179]	accacgtaag acatagactt cagcagagat ctctcgtaac agtgcttagg gatagcgtca	9480
[0180]	aggatatcct tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt ttccgaaggat atcgatagcg	9540
[0181]	gtcttttgct gcttgaaaga tgcaacgttt ccagaacgcc taacgggtctt agtagatccc	9600
[0182]	tcaaggatct cagatccaga caggttaacc ttagacatgg tatggtaatt gtaaattgaa	9660
[0183]	ttgtaattgt gtttgtgtgt tgggtgtgtt ggtaattgtt gtaaaatttt tgggtggtgat	9720
[0184]	tggttcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggttttgt gagattgggg	9780
[0185]	atgggtgggt tatatagtagg agactgagga atgggggtcgt gagtgttaac tttgcatggg	9840
[0186]	ctacacgtgg gttcttttgg gcttacacgt agtattattc atgcaaatgc agccaatata	9900
[0187]	tatacgggat ttttaataatg tgtgggaata caatatgccg agtattttac taattttggc	9960
[0188]	aatgacaagt gtacatttgg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat ttggattatt	10020
[0189]	tttattctct taccttggcc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca gaattgaatg	10080
[0190]	gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat taacgtcgaa	10140
[0191]	ggaaaatact gattctctca agcatacga caagggtaaa taacatagtc accagaacat	10200
[0192]	aataaacaaa aagtgcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt caggttcata	10260
[0193]	ttggaaacat cattatccta gtcttgtgac catccttcct cctgctctag ttgagaggcc	10320
[0194]	ttgggactaa cgagagggtca gttgggtag cagatcctta tcttgacta gcctttctgg	10380
[0195]	tgtttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga agatgactct	10440
[0196]	tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc tggcttgcaa	10500
[0197]	tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgtt gctgatttag	10560
[0198]	agctcccggt tgggtgattt gacttcgatt tcagtttagg cttgttgaaa tttttcaggt	10620
[0199]	tccattgtga agcctttaga gcttgagctt ccttccatgt taatgccttg atcgaatact	10680
[0200]	cctagagaaa agggagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat ttttttcaa	10740
[0201]	cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatac ttatactgac	10800
[0202]	aagtaatagt cttaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg ggttttccga	10860
[0203]	catccataac gacccgaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg ttcttcttgt	10920
[0204]	catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc tccgaaaaat	10980
[0205]	attcgaacgg caagttatgg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc aggacctatt	11040
[0206]	gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtggtgtgca gcaaaccaat gaccgaaatc	11100
[0207]	catcacatga cggacgtcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc tatctttcag	11160
[0208]	agtcgtgagc tccacaccgg attccggcaa ctacgtgttg ggcaggcttc gccgtattag	11220
[0209]	agatatgttg aggcagaccc atctgtgcca ctctgacaat tacgagagtt gttttttttg	11280



[0210]	tgattttcct agtttctcgt tgatgggtgag ctcatattct acatcgtatg gtctctcaac	11340
[0211]	gtcgtttcct gtcattctgat atccccgcat ttgcatccac gtgcgccgcc tcccgtgcca	11400
[0212]	agtccttagg tgtcatgcac gccaaattgg tgggtggcg ggctgccctg tgcttcttac	11460
[0213]	cgatgggtgg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt gacggtttgg	11520
[0214]	tgtgggttga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attctttggc agaaaacaat	11580
[0215]	tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat tccaacagag	11640
[0216]	ttacatctct taagaaataa tgtaaccctt ttagacttta tataatttga attaaaaaaa	11700
[0217]	taatttaact tttagacttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca ctctattatt	11760
[0218]	tatatcgaac ctatttgtat gtctcccctc taaataaact tggatttgtg tttacagaac	11820
[0219]	ctataatcaa ataataata ctcaactgaa gtttgtgcag ttaattgaag ggattaacgg	11880
[0220]	ccaaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat ttccatcaat	11940
[0221]	atcatgcgag ttcttcttct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga cacctgcact	12000
[0222]	tcattgtcct tattacgtgt taaaaaatga aacctatgca tccatgcaaa ctgaagaatg	12060
[0223]	gcgcaagaac cttcccctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac catctccgc	12120
[0224]	tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat ccatccaaaa	12180
[0225]	gatacccact tttaacaaca ttaccaacaa caacaacaa caaacaacat tacaattaca	12240
[0226]	tttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct tctactggtg	12300
[0227]	ttcatgctgg tgttactgac tcttctgctt tcaccagaaa ggatgttgct gatagacctg	12360
[0228]	atctcaccat cgttggagat tctgtttacg atgctaaggc tttcagatct gagcatcctg	12420
[0229]	gtggtgctca ttctgtttct ttgttcggag gaagagatgc tactgaggtt ttcatggaat	12480
[0230]	accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttga tctcttgctt	12540
[0231]	ctactgagga acctgttgct gctgatgagg gataccttca actttgtgct aggatcgcta	12600
[0232]	agatggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctctgcttc ttactgggtt aaggctggac	12660
[0233]	ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgctgga aagagacttc	12720
[0234]	tcccttctat cgttcttga ttgcttttcg ctcttatcgg tcttaacatc cagcatgatg	12780
[0235]	ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgctt ctgttaacct tgctcttga ctttgtcagg	12840
[0236]	attggatcgg aggatctatg atccttggc ttcaagagca tggtgttatg caccacctcc	12900
[0237]	acactaacga tggtgataag gatcctgatc aaaaggctca cgggtgctctt agactcaagc	12960
[0238]	ctactgatgc ttggtcacct atgcattggc ttcagcatct ttaccttttg cctggtgaga	13020
[0239]	ctatgtacgc tttaagctt ttgttctcgc acatctctga gcttggttatg tggcggtggg	13080
[0240]	agggtgagcc tatctctaag cttgctggat acctctttat gccttctttg cttctcaagc	13140
[0241]	ttacctctg ggctagattc gttgctttgc ctctttacct tgctccttct gttcatactg	13200
[0242]	ctgtgtgtat cgctgctact gttatgactg gatctttcta cctcgcttctc ttcttcttca	13260
[0243]	tctcccacaa cttcgagggt gttgcttctg ttggacctga tggatctatc acttctatga	13320
[0244]	ctagagggtgc tagcttcctt aagagacaag ctgagacttc ttctaactgt ggaggacctc	13380
[0245]	ttcttgcctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcacttg ttccctagag	13440
[0246]	ttcaccatgg attctaccct agacttgctc ctcttggtta ggctgagctt gaggctagag	13500
[0247]	gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtctaacct tgcttctacc ctacagacata	13560
[0248]	tgtacgctct tggaagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct tatgtgacgt	13620
[0249]	gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa agtgagaatg	13680
[0250]	agggggaagg gaaatgtgta atgagccagt agccgggtgg gctaattttg tatcgatttg	13740
[0251]	tcaataaatc atgaattttg tggtttttat gtgttttttt aaatcatgaa ttttaatttt	13800

[0252]	tataaaataa	tctccaatcg	gaagaacaac	attccatatac	catgcatgga	tgttttcttta	13860
[0253]	cccaaatcta	gttcttgaga	ggatgaagca	tcaccgaaca	gttctgcaac	tatccctcaa	13920
[0254]	aagctttaa	atgaacaaca	aggaacagag	caacgttcca	aagatcccaa	acgaaacata	13980
[0255]	ttatctatac	taatactata	ttattaatta	ctactgccc	gaatcacaat	ccctgaatga	14040
[0256]	ttcctattaa	ctacaagcct	tggtggcggc	ggagaagtga	tcggcgcggc	gagaagcagc	14100
[0257]	ggactcggag	acgaggcctt	ggaagatctg	agtcgaacgg	gcagaatcag	tatttttcctt	14160
[0258]	cgacgttaat	tgatcctaca	ctatgtaggt	catatccatc	gttttaattt	ttggccacca	14220
[0259]	ttcaattctg	tcttgccctt	agggatgtga	atatgaacgg	ccaaggtgaag	agaataaaaa	14280
[0260]	taatccaaat	taaagcaaga	gaggccaagt	aagataatcc	aaatgtacac	ttgtcattgc	14340
[0261]	caaaattagt	aaaatactcg	gcatattgta	ttcccacaca	ttattaaaat	accgtatatg	14400
[0262]	tattggctgc	atttgcattg	ataatactac	gtgtaagccc	aaaagaaccc	acgtgtagcc	14460
[0263]	catgcaaagt	taacactcac	gaccccatc	ctcagtctcc	actatataaa	cccaccatcc	14520
[0264]	ccaatctcac	caaaccacc	acacaactca	caactcactc	tcacacctta	aagaaccaat	14580
[0265]	caccaccaa	aattttacaa	caattaccaa	caacaacaaa	caacaacaa	cattacaatt	14640
[0266]	acatttaca	ttaccatacc	atgagcgtg	ttaccgttac	tggtatctgat	cctaagaaca	14700
[0267]	gaggatcttc	tagcaacacc	gagcaagagg	ttccaaaagt	tgctatcgat	accaacggaa	14760
[0268]	acgtgttctc	tgttcctgat	ttcaccatca	aggacatcct	tggtgctatc	cctcatgagt	14820
[0269]	gttacgagag	aagattggct	acctctctct	actacgtgtt	cagagatatac	ttctgcatgc	14880
[0270]	ttaccaccgg	ataccttacc	cataagatcc	tttaccctct	cctcatctct	tacacctcta	14940
[0271]	acagcatcat	caagttcact	ttctgggccc	tttacctta	cgttcaagga	cttttcggaa	15000
[0272]	ccggaatctg	ggttctcgct	catgagtgtg	gacatcaagc	tttctctgat	tacggaatcg	15060
[0273]	tgaacgattt	cggttgatgg	acccttcact	cttaccttat	ggttccttac	ttcagctgga	15120
[0274]	agtactctca	tggaagcac	cataaggcta	ctggacacat	gaccagagat	atggttttcg	15180
[0275]	ttctgccac	caaagaggaa	ttcaagaagt	ctaggaactt	cttcggtaac	ctcgtgagt	15240
[0276]	actctgagga	ttctccactt	agaacccttt	acgagcttct	tggtcaacaa	cttggaggat	15300
[0277]	ggatcgctta	cctcttcgtt	aacgttacag	gacaacctta	ccctgatgtt	ccttcttgga	15360
[0278]	aatggaacca	cttctggctt	acctctccac	ttttcgagca	aagagatgct	ctctacatct	15420
[0279]	tcctttctga	tcttggaatc	ctcaccagg	gaatcgttct	tactctttgg	tacaagaaat	15480
[0280]	tcggaggatg	gtcccttttc	atcaactggt	tcgttcctta	catctgggtt	aaccactggc	15540
[0281]	tcgttttcat	cacattcctt	cagcacactg	atcctactat	gcctcattac	aacgctgagg	15600
[0282]	aatggacttt	cgctaagggt	gctgctgcta	ctatcgatag	aaagttcgga	ttcatcgga	15660
[0283]	ctcacatctt	ccatgatatac	atcgagactc	atgtgcttca	ccactactgt	tctaggatcc	15720
[0284]	cattctacaa	cgctagacct	gcttctgagg	ctatcaagaa	agttatggga	aagcactaca	15780
[0285]	ggtctagcga	cgagaacatg	tggaagtcac	tttggaagtc	tttcaggtct	tgccaatacg	15840
[0286]	ttgacggtga	taacggtgtt	ctcatgttcc	gtaacatcaa	caactgcgga	gttgagctg	15900
[0287]	ctgagaagta	atgaaggggt	gatcgattat	gagatcgtac	aaagacactg	ctaggtgtta	15960
[0288]	aggatggata	ataataataa	taatgagatg	aatgtgtttt	aagttagtgt	aacagctgta	16020
[0289]	ataaagagag	agagagagag	agagagagag	agagagagag	agagagagag	agagaggctg	16080
[0290]	atgaaatgtt	atgtatgttt	cttggttttt	aaaataaatg	aaagcacatg	ctcgtgtggt	16140
[0291]	tctatcgaat	tattcggcgg	ttcctgtggg	aaaaagtcca	gaagggccgc	cgcagctact	16200
[0292]	actacaacca	aggccgtgga	ggagggcaac	agagccagca	cttcgatagc	tgctgcatg	16260
[0293]	atcttaagca	attgaggagc	gagtgcacat	gcaggggact	ggagcgtgca	atcgccaga	16320

[0294]	tgaggcagga catccagcag cagggacagc agcaggaagt tgagaggtgg tcccatcaat	16380
[0295]	ctaaacaagt cgctagggac cttccgggac agtgcggcac ccagcctagc cgatgccagc	16440
[0296]	tccaggggca gcagcagtct gcatggtttt gaagtgggtga tcgatgagat cgtataaaga	16500
[0297]	cactgctagg tgttaaggat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa ccgtaataaa	16560
[0298]	aagagagaga ggctgatgga atgttatgta tgtatgtttc ttggttttta aaattaaatg	16620
[0299]	gaaagcacat gtcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata tttgggtctaa	16680
[0300]	tttagtttgg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aaatataaat atatagtttt	16740
[0301]	tatatatatg cttttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct agaaatat	16800
[0302]	gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt tattaacttt	16860
[0303]	aaataattgg ttgtacgac actttcttat caagtgttac taaaatgcgt caatctcttt	16920
[0304]	gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt ttcgaatttg	16980
[0305]	aagtgaatt tcgataattt aaaattaaat agaacatac attatttagg tatcatattg	17040
[0306]	atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa cgaaaaatta	17100
[0307]	gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc tataagaata	17160
[0308]	ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaa ttaattttta ctaacacata tatttactta	17220
[0309]	tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaa aaaccagaaa	17280
[0310]	atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt tggtttgatt	17340
[0311]	ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcacccta atcataatag ctttaatat	17400
[0312]	tcaagatatt attaagttaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa tgaatcaagc	17460
[0313]	ctatatggt gtaatatgaa tttaaaagca gtcgatgtg gtggtaatat gtaatttact	17520
[0314]	tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg ttagctacga	17580
[0315]	tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa atatacgaag	17640
[0316]	gaacaaatat ttttaaaaa atacgcaatg acttggaaca aaagaaagt atatatTTTT	17700
[0317]	tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt ctttgcag taactattat	17760
[0318]	gctcccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa aatagtcctg	17820
[0319]	caggctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct attagttgaa	17880
[0320]	agttgaaact ttgttcccta ctcaattcct agtttgttaa atgtatgtat atgtaatgtg	17940
[0321]	tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc	18000
[0322]	agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg ttgtaatcct	18060
[0323]	attcgagaat gtttttgtca aagatagtg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa	18120
[0324]	atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggctc aggatctgat tgtaatttta	18180
[0325]	gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt	18240
[0326]	ttagactatt tggccttaac taaactcca ctcatattt actgaggta gagaatagac	18300
[0327]	ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca gagggtagc	18360
[0328]	caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag	18420
[0329]	cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt tttggcgta	18480
[0330]	aaagaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa ttttccatcg	18540
[0331]	aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt	18600
[0332]	tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt	18660
[0333]	ctaaatgcat gctttgtaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct	18720
[0334]	catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcatt ttacaacaat taccaacaac	18780
[0335]	aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcgc	18840

[0336]	tatccctgct gctcttgcgt gaactcttgg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga	18900
[0337]	tatcccagct tctgagaaag ttctgctta cttcatgcag gttgagtact ggggacctac	18960
[0338]	tatcggaact attggatacc tctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag	19020
[0339]	atctcaacct ttcggactca agaacgctat gctcgtttac aacttctacc agaccttctt	19080
[0340]	caacagctac tgcactacc ttttcgttac ttctcatagg gctcaggac ttaaggttg	19140
[0341]	gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggta tctggcttca	19200
[0342]	ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga cacttcttc atggtgatga ggaagaagtt	19260
[0343]	cgaccagctt tctttccttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catggttcgt	19320
[0344]	tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgta acaccttcgt	19380
[0345]	gcacgtgatc atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagttaact gtttctggaa	19440
[0346]	gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta	19500
[0347]	caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttcttac cttcaactct gggttatggt	19560
[0348]	gaacatgttc gttctcttcg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta aggggtctaa	19620
[0349]	gaagcagtga taaggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagt taataagacg	19680
[0350]	actctcacta ctgcatcgt agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac	19740
[0351]	aacttatcgt aatgcattg aaactataac acattaatcc tacttgtcat atgataacac	19800
[0352]	tctccccatt taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttctttaaat gattaaaaaa	19860
[0353]	aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa	19920
[0354]	aaaaatactt atactaattt agtctgaata gaataattag attctagcct gcaggcgccg	19980
[0355]	cgcgatccc atggagtcaa agattcaaat agaggacct acagaactcg ccgtaaagac	20040
[0356]	tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa	20100
[0357]	catggtggag cagcacacac ttgtctactc caaaaatatac aaagatacag tctcagaaga	20160
[0358]	ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctc tcgattcca	20220
[0359]	ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaagggt gctcctacaa	20280
[0360]	atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtgtcc	20340
[0361]	caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc	20400
[0362]	ttcaaagcaa gtgattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatcca	20460
[0363]	ctatcttcg caagacctt cctctatata aggaagtca tttcatttg agagaacacg	20520
[0364]	ggggactgaa ttaaatatga gccctgagag gcgtctgtt gaaatcagac ctgctactgc	20580
[0365]	tgctgatatg gctgctgtt gtgatatcgt gaaccactac atcgagactt ctaccgttaa	20640
[0366]	cttcagaact gagcctcaa ctcctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga	20700
[0367]	tagataccct tggcttgttg ctgaggtga ggggtgtgtt gctggaatcg cttacgtgg	20760
[0368]	accttgaag gctagaaacg cttacgattg gactgttgag tctaccgtt acgtttcaca	20820
[0369]	cagacatcag agacttgac ttggatctac cttttact cacttctca agtctatgga	20880
[0370]	agctcaggga ttcaagtctg ttgttgcgt tctcgactc cctaacgatc cttctgttag	20940
[0371]	acttcatgag gctcttgat acactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca	21000
[0372]	cggtggatgg catgatgtt gattctggca aagagattc gagcttctg ctctctctag	21060
[0373]	acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgatc gttcaaacat ttggcaataa	21120
[0374]	agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg	21180
[0375]	aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt	21240
[0376]	tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgca tagaaaacaa aatatagcgc	21300
[0377]	gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatca ctagtgatgt	21360

[0378] acggttaaaa ccacccagc acattaaaaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 21420  
 [0379] cgtcaatttg ttacaccac aatatacct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 21480  
 [0380] gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagtcc 21527  
 [0381] <210> 2  
 [0382] <211> 23512  
 [0383] <212> DNA  
 [0384] <213> 人工序列  
 [0385] <220>  
 [0386] <223> pGA7- mod\_B核苷酸序列  
 [0387] <400> 2  
 [0388] tcctgtggtt ggcatgcaca tacaatgga cgaacggata aaccttttca cgccctttta 60  
 [0389] aatatccgat tattctaata aacgtctttt tctcttaggt ttaccgcca atatatactg 120  
 [0390] tcaaacactg atagttaa aa ctgaaggcgg gaaacgaca tctgctagt gatctcccag 180  
 [0391] tcacgacgtt gtaaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcggtac cgcccgttcg 240  
 [0392] actcagatct tccaaggcct cgtctccgag tccgctgctt ctgcgcgcgc cgatcacttc 300  
 [0393] tccgccgcca acaaggcttg tagttaatag gaatcattca gggattgtga ttccgggcag 360  
 [0394] tagtaattaa taatatagta ttagtataga taatatgttt cgtttgggat ctttggaacg 420  
 [0395] ttgctctgtt cttgtgtgtt cattttaaag cttttgaggg atagttgcag aactgttcgg 480  
 [0396] tgatgcttca tcctctcaag aactagattt gggtaaagaa acatccatgc atggatatgg 540  
 [0397] aatgttggtt ttccgatttg agattatttt ataaaattta aaattcatga tttaaaaaaa 600  
 [0398] cacataaaaa ccacaaaatt catgatttat tgacaatacg atacaaaatt agcaccaccg 660  
 [0399] gctactggct cttacacat tccccctcc cctcattctc actttgtggc tttattatta 720  
 [0400] ttattattac atatatttta ccgttattat ttcacgtcac ataagctgt taattaatca 780  
 [0401] ttagtgagcc ttctcagcct ttccgttaac gtagtagtgc tgtccacct tatcaagggt 840  
 [0402] agagaaagta gcctccaag caccgtagta agagagcacc ttgtagttga gtccccactt 900  
 [0403] cttagcga aa ggaacgaatc ttctgctaac ctgagctgt ctgaattgag gcatatcagg 960  
 [0404] gaagaggttg tggataacct gacagttaag gtatccata agccagttca cgtatcctct 1020  
 [0405] agaaggatcg atatcaacgg tgtgatcaac agcgtagtta acccaagaaa ggtgcttatt 1080  
 [0406] agatggaaca acaggaggt gagtatgaga agtagagaag tgagcga aaa ggtacatgta 1140  
 [0407] agcgatccag tttccgaaag tgaaccacca gtaagcaaca ggccaagagt atccagtagc 1200  
 [0408] aagcttgata acagcggttc taacaacatg agaaacgagc atccaagaag cctcttcgta 1260  
 [0409] gttcttctta cggagaactt gtctagggtg gagaacgtag atccagaaag cttgaacaag 1320  
 [0410] aagtccagag gtaacaggaa cgaaagtcca agcttgaagt ctagcccaag ctctagagaa 1380  
 [0411] tcctctaggt ctgttatcct caacagcagt gttgaagaaa gccacagcag gagggtatc 1440  
 [0412] aagatccata tcgtgtctaa ctttttgagg ggtagcatgg tgcttggtat gcacttggtt 1500  
 [0413] ccacatctca ccagaagtag aaagtcgaa tccacaagtc atagcctgaa gtctcttgct 1560  
 [0414] cacgtaaaca gatccggtaa gagagttagt tccacctca tgttgaacct atccacatct 1620  
 [0415] agtccgaag aaagcaccgt aaacaacaga agcaatgata gggtatccag cgtacataag 1680  
 [0416] agcagttcca agagcgaatg tagcaagaag ctgagaag ctgtaagcca catgggtgat 1740  
 [0417] agaaggttg aagaatccat ctctctcaag ctgagcacgc catctagcga aatcctcaag 1800  
 [0418] cataggagca tcctcagact cagatctctt gatctcagca ggtctagaag gaaagctct 1860  
 [0419] aagcatcttc caagccttga gagaacgcat gtggaattct ttgaaagcct cagtagcatc 1920

[0420]	agcaccagtg ttagcaagca tgtagaagat cacagatcca ccagggtgct tgaagttagt	1980
[0421]	cacatcgtac tcaacgtcct caactctaac ccatctagtc tcgaaagtag cagcaagctc	2040
[0422]	atgaggctca agagtcttaa gatcaacagg agcagtagaa gcatecttag catcaagagc	2100
[0423]	ctcagcagaa gatttagacc tggtaagtgg agatctagga gaagatcttc catcagtcct	2160
[0424]	aggagggcac atggtatggt aattgtaaat gtaattgtaa tgttggttgt tgtttgttgt	2220
[0425]	tgttggtaat tgttgtaaaa ttaattaagt gggtatcttt tggatggata agcaagtagt	2280
[0426]	gatgatgttc taggtgaagt gatgggggtg ttttatagcg ggagatggtg aaatggatgg	2340
[0427]	tcgccacata agaaatggag gggaagggtt cttgcgccat tcttcagttt gcatggatgc	2400
[0428]	atgggtttca ttttgtaaca cgtaataagg acaatgaagt gcaggtgtct ctcaagtttc	2460
[0429]	agaggggata tgtggacaga agaagaacgg cgatgatatt gatggaaatg gccatctagt	2520
[0430]	gtgaatctat tcggttgata atactagtc attttggccg ttaatccctt caattaactg	2580
[0431]	cacaaacttc agttgagtat tgattatttg attataggtt ctgtaaacac aataccaagt	2640
[0432]	ttatttagag gggagacata caaatagttt cgatataaat aatagagtgg ttaaacttag	2700
[0433]	ttattaaaac tatatataaa gtctaaaagt taaattattt ttttaattgc aaatatataa	2760
[0434]	agtctaaagg ggttacatta tttcttaaga gatgtaactc tgttggaatc tgacttaatc	2820
[0435]	cgtctcatca ctctggttc cagttctaat ctaatgaatt gttttctgcc aaagaatttg	2880
[0436]	aagcaagaag taaattgatc aatgccgtca acccacacca aaccgtcaac ccactacat	2940
[0437]	cgccgcggag acccccaaac tcaacctcca cccatcggtg agaagcacag ggcagcccg	3000
[0438]	accaccacca atttgcgctg catgacacct agggacttgg cacgggaggc ggcgcacgtg	3060
[0439]	gatgcaaatg acgggatatc agatgacagg aaacgacgtt gagagaccat acgatgtaga	3120
[0440]	atatgagctc accatcaacg agaaactagg aaaatcacaa aaaaaacaac tctcgtaatt	3180
[0441]	gtacgagtgg cacagatggg tctgcctcaa catatctcta atacggcgaa gcctgccccaa	3240
[0442]	cacgtagtgt ccggaatccg gtgtggagct cagcactctg aaagataggc gcttcctgtt	3300
[0443]	tcgtttcgct caccacttgg acgtccgtca tgtgatggat ttcggtcatt ggtttgctga	3360
[0444]	caaccacatt ctgaagctcc atgagatgag tcttcacaat aggtcctgct caataccgtg	3420
[0445]	gagttaggtg tgcaagtcca taacttgccg ttcgaatatt ttgcggagcc agtcggacgg	3480
[0446]	gaattggcga gctcggctga cacctataaa ggccatgaca agaagaacca aaagtcttc	3540
[0447]	cctaagtctt tcatgaggct tcgggtcggt atggatgtcg gaaaaccctt cttgaaggaa	3600
[0448]	cgagacgtta ttatgcatga cggtaagact attactgtc agtataagta tgaaagatta	3660
[0449]	cctgtcttct gctttgtttg tggattgatt ggacacgttg aaaaaaatg tgcacttcga	3720
[0450]	tttcaatact cagagatcga cttccctttt ctctaggagt attcgatcaa ggcattaaca	3780
[0451]	tggaaggaag ctcaagctct aaaggcttca caatggaacc tgaaaaattt caacaagcct	3840
[0452]	aaactgaaat cgaagtcaaa tcaccaacc gggagctcta aatcagcaaa cactcctcct	3900
[0453]	ccacagtatc caatcatcgt gcacgatgct ccaggatttg caagccaggt attgcaagct	3960
[0454]	aggagtagga tagagacctt aaacgtcgtt ggtgtgaaga gtcactttca gacctaatgg	4020
[0455]	agatagatgt agacggcggc acgaagactc tgaaacacca gaaaggctag tccaggataa	4080
[0456]	ggatctgcta tccaactga cctctcgta gtcccaaggc ctctcaacta gagcaggagg	4140
[0457]	aaggatggtc acaagactag gataatgatg tttccaatat gaacctgaat gtccatagct	4200
[0458]	aattttttta gtcttgcttc tgcacttttt gtttattatg ttctgggtgac tatgttattt	4260
[0459]	acccttgctc gtatgcttga gggtagccta gtagattggt tggttggttt ccatgtacca	4320
[0460]	gaaggcttac cctattagtt gaaagttgaa actttgttcc ctactcaatt cctagttgtg	4380
[0461]	taaagtgtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aaatgactag gagtggttct	4440

[0462]	tgagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag aacgaatttg	4500
[0463]	aaaggtctct aggtttgaat cctattcgag aatgtttttg tcaaagatag tggcgatttt	4560
[0464]	gaaccaaaaga aaacatttaa aaaatcagta tccggttacg ttcattgcaa tagaaagtgg	4620
[0465]	tctaggatct gattgtaatt ttagacttaa agagtctctt aagattcaat cctggctgtg	4680
[0466]	tacaaaacta caaataatat attttagact atttggcctt aactaaactt ccactcatta	4740
[0467]	tttactgagg ttagagaata gacttgcgaa taaacacatt cccgagaaat actcatgatc	4800
[0468]	ccataattag tcagagggtg tgccaatcag atctaagaac acacattccc tcaaatttta	4860
[0469]	atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa agacagaaat	4920
[0470]	ttgtagactt ttttttggcg ttaaaagaag actaagttaa tacgtacatt ttattttaag	4980
[0471]	tggaaaaccg aaattttcca tcgaaatata tgaatttagt atatatattt ctgcaatgta	5040
[0472]	ctattttgct attttggcaa ctttcagtgg actactactt tattacaatg tgtatggatg	5100
[0473]	catgagtttg agtatacaca tgtctaaatg catgctttgt aaacgtaac ggaccacaaa	5160
[0474]	agaggatcca tacaataca tctcatagct tcttcatta ttttcgaca caaacagagc	5220
[0475]	attttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaacaaac attacaatta catttacaat	5280
[0476]	taccatacca tggcctctat cgctatccct gctgctcttg ctggaactct tggatacgtt	5340
[0477]	acctacaatg tggctaaccg tgatatccca gcttctgaga aagtctctgc ttacttcatg	5400
[0478]	caggttgagt actggggacc tactatcgga actattggat acctctctt catctacttc	5460
[0479]	ggaaagcgta tcatgcagaa cagatctcaa ctttcggac tcaagaacgc tatgctcgtt	5520
[0480]	tacaacttct accagacctt cttcaacagc tactgcatct accttttcgt tacttctcat	5580
[0481]	agggtcagg gacttaaggt ttggggaaac atccctgata tgactgctaa ctcttgggga	5640
[0482]	atctctcagg ttatctggtc tctactaac aacaagtacg ttgagcttct cgacaccttc	5700
[0483]	ttcatggtga tgaggaagaa gttcgaccag ctttctttcc ttcacatcta ccaccacact	5760
[0484]	cttctcatct ggtcatgggt cgttggtatg aagcttgagc ctgttggaga ttgctacttc	5820
[0485]	ggatcttctg ttaacacctt cgtgcacgtg atcatgtact cttactacgg acttgctgct	5880
[0486]	cttggagtta actgtttctg gaagaagtac atcaccaga tccagatgct tcagttctgt	5940
[0487]	atctgtgctt ctactctat ctacaccgct tacgttcaga ataccgctt ctggcttctt	6000
[0488]	tacctcaac tctgggttat ggtgaacatg ttcgttctt tgcceaactt ctaccgtaag	6060
[0489]	aggtacaagt ctaagggtgc taagaagcag tgataaggcg cgcggcgcgc cgggccgccg	6120
[0490]	ccatgtgaca gatcgaagga agaaagtgtg ataagacgac tctactact cgatcgctag	6180
[0491]	tgattgtcat tgttatatat aataatgtta tctttcaca cttatcgtaa tgcattgtga	6240
[0492]	actataacac attaatccta cttgtcatat gataacactc tccccattta aaactcttgt	6300
[0493]	caatttaaag atataagatt ctttaaataa ttaaaaaaaa tatattataa attcaatcac	6360
[0494]	tctactaat aaattattaa ttattattta ttgattaaaa aaatacttat actaatttag	6420
[0495]	tctgaataga ataattagat tctagtctca tccccattta aaccaactta gtaaactgtt	6480
[0496]	ttttttttaa ttttatgaag ttaagttttt acctgttttt taaaaagaat cgttcataag	6540
[0497]	atgccatgcc agaacattag ctacacgtta cacatagcat gcagccgcgg agaattgttt	6600
[0498]	ttcttcgcca cttgtcactc cttcaaaaca cctaagagct tctctctcac agcacacaca	6660
[0499]	tacaatcaca tgcgtgcatg cattattaca cgtgatcgcc atgcaaatct cttttatagc	6720
[0500]	ctataaatta actcatccgc ttactcttt actcaaacca aaactcatcg atacaaacaa	6780
[0501]	gattaaaaac atacacgagg atcttttaca acaattacca acaacaaca acaacaaca	6840
[0502]	acattacaat tacatttaca attaccatac catgcctcca agggactctt actcttatgc	6900
[0503]	tgtcctcctt tctgtcaac ttacgaagt tgatactcct caagagcacg acaagaaaga	6960

[0504]	gcttggtatc ggagataggg cttacgatgt taccaacttc gttaagagac accctgggtg	7020
[0505]	aaagatcatt gcttaccaag ttggaactga tgctaccgat gcttacaagc agttccatgt	7080
[0506]	tagatctgct aaggctgaca agatgcttaa gtctcttcct tctcgtcctg ttcacaagg	7140
[0507]	atactctcca agaagggtg atcttatcgc tgatttccaa gagttcacca agcaacttga	7200
[0508]	ggctgaggga atgttcgagc cttctcttcc tcatgttgct tacagacttg ctgaggttat	7260
[0509]	cgctatgcat gttgctgggt ctgctcttat ctggcatgga tacactttcg ctggaatcgc	7320
[0510]	tatgcttga gttgttcagg gaagatgtgg atggcttatg catgagggtg gacattactc	7380
[0511]	tctcactgga aacattgctt tcgacagagc tatccaagtt gcttggttac gacttggtg	7440
[0512]	tggaatgtct ggtgcttggg ggcgtaacca gcataacaag caccatgcta ctcctcaaaa	7500
[0513]	gcttcagcac gatgttgatc ttgataccct tcctctcgtt gctttccatg agagaatcgc	7560
[0514]	tgctaaaggt aagtctcctg ctatgaaggc ttggctttct atgcaagcta agcttttcgc	7620
[0515]	tcctgttacc actctcttgg ttgctcttgg atggcagctt taccttcac ctagacacat	7680
[0516]	gctcaggact aagcactacg atgagcttgc tatgctcgga atcagatacg gacttggttg	7740
[0517]	ataccttgct gctaactacg gtgctggata cgttctcgtt tgttacctc ttacgttca	7800
[0518]	gcttgagct atgtacatct tctgcaactt cgctgtttct catactcacc tcctgttgt	7860
[0519]	tgagcctaac gagcatgcta cttgggttga gtacgtgct aaccacacta ctaactgttc	7920
[0520]	tccatcttgg tgggtgtgatt ggtggatgtc ttaccttaac taccagatcg agcaccacct	7980
[0521]	ttaccttct atgcctcaat tcagacaccc taagatcgtt cctagagtta agcagctttt	8040
[0522]	cgagaagcac ggacttcact acgatgttag aggatacttc gaggctatgg ctgatacttt	8100
[0523]	cgctaacctt gataacgttg cccatgctcc tgagaagaaa atgcagtaat gagatcggtc	8160
[0524]	aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggtcttg cgatgattat	8220
[0525]	catataattt ctgttgaatt acgttaagca cgtaataatt aacatgtaat gcatgacgtt	8280
[0526]	atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcgataga	8340
[0527]	aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gcggtgtcat ctatgttact	8400
[0528]	agatcggtcg attaaaaatc ccaattatat ttggtctaatt ttagtttggg attgagtaaa	8460
[0529]	acaaattcga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact	8520
[0530]	ttttatagaa ttttcttta aaaatatcta gaaatatttg cgactcttct ggcatgtaat	8580
[0531]	atttcgttaa atatgaagtg ctccattttt attaacctta aataattggg tgtacgatca	8640
[0532]	ctttcttacc aagtgttact aaaatgcgtc aatctctttg ttcttccata ttcatatgtc	8700
[0533]	aaaatctatc aaaattctta tatatctttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta	8760
[0534]	aaattaaata gaacatatca ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa	8820
[0535]	atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata	8880
[0536]	aatatcatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg	8940
[0537]	taaaaaaat taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag	9000
[0538]	attaaaataa tattcatcta acaaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaac ccggcaaac	9060
[0539]	cgaaccaatc caaaccgata tagttggttt ggtttgattt tgatataaac cgaaccaact	9120
[0540]	cggtccattt gcaccctaa tcataatagc tttaatattt caagatatta ttaagttaac	9180
[0541]	gttgcaata tcctggaaat ttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat	9240
[0542]	ttaaaagcag ctcatgttg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca	9300
[0543]	agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac	9360
[0544]	aaagaaccat aaagtattg aagctcgaat tatacgaagg aacaaatatt tttaaaaaaa	9420
[0545]	tacgcaatga cttggaacaa aagaaagtga tatatttttt gttcttaaac aagcatcccc	9480



[0546]	tctaaagaat ggcagttttc ctttgcattgt aactattatg ctcccttcgt tacaaaaatt	9540
[0547]	ttggactact attgggaact tcttctgaaa atagtgatag aacccacacg agcatgtgct	9600
[0548]	ttccatttaa ttttaaaaac caagaaacat acatacataa cattccatca gcctctctct	9660
[0549]	ctttttatta cggttaatga cttaaaacac atcttattat cccatcccta acacctagca	9720
[0550]	gtgtctttat acgatctcat cgatcaccac ttcaaaacca tgcagactgc tgctgcccct	9780
[0551]	ggagctggca tcggctaggc tgggtgccgc actgtcccgg aaggtcccta gcgacttggt	9840
[0552]	tagattgatg ggaccacctc tcaacttctt gctgctgtcc ctgctgctgg atgtctgtcc	9900
[0553]	tcctctggcc gattgcacgc tccagtcccc tgcattgtca ctgctctctc aattgtctaa	9960
[0554]	gatcatcgca gcagctatcg aagtgtggc tctgttgccc tctccacagg ccttggttgt	10020
[0555]	agtagtagct gccgccgcc ttctggactt tttccacag gaaccgccga ataattcgat	10080
[0556]	agaaccacac gagcatgtgc tttcatttat tttaaaaacc aagaaacata cataacattt	10140
[0557]	catcagctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctt	10200
[0558]	tattacagct gttacactaa cttaaaacac attcatctca ttattattat tattatccat	10260
[0559]	ccttaacacc tagcagtgtc tttgtacgat ctcataatcg atcaccctt catcaggtat	10320
[0560]	ccttaggctt cactccaacg ttgttgacgt tacggaacat gtacacacca tcatggttct	10380
[0561]	caacgaactg gcaagatctc caagttttcc aaaggctaac ccacatgttc tcatcggtgt	10440
[0562]	gtctgtagtg ctctcccata actttcttga tgcactcggg agcttctcta gcatggtaga	10500
[0563]	atgggacct tgaacgtag tgatggagca catgagctc gatgatgtca tggaagatga	10560
[0564]	ttccgaggat tccgaactct ctatcgatag tagcagcagc acccttagcg aaagtccact	10620
[0565]	cttgagcatc gtaatgagge atagaagaat cgggtgtgtg aaggaaggta acgaaaacaa	10680
[0566]	gccagtgggt aacaaggatc caaggacaga accatgtgat gaaagtaggc cagaatccga	10740
[0567]	aaaccttgta agcgggtgta acagaagtga gggtagcaag gattccaaga tcagaaagaa	10800
[0568]	cgatgtacca gtagtccttc ttatcgaaaa cagggtctga aggccagtag tgagacttga	10860
[0569]	agaacttaga aacaccaggg taagggtgtc cagtagcgtt agtagcaagg taaagagaaa	10920
[0570]	gtcctccaag ctgttggaac aagagagcga aaacagagta gataggagt tctcagcga	10980
[0571]	tatcgtgaag gctggttaact tgggtgcttct ctttgaattc ctcggcggtg taaggaacga	11040
[0572]	aaaccatata tctggtcatg tgtccagtag ccttatgggt cttagcatga gagaacttcc	11100
[0573]	agctgaagta aggaaccata acaagagagt ggagaacca tccaacggt tctgtaacct	11160
[0574]	atccgtagtt agagaaagca gaatgtccac actcatgtcc aaggatccag attccgaatc	11220
[0575]	cgaacaaga gatagagaac acgtaagcag accaagcagc gaatctaagg aattcgtag	11280
[0576]	ggagaagagg gatgtaggta agtccaacgt aagcgatagc agagatagcc acgatatctc	11340
[0577]	tcaccacgta agacatagac ttcacgagag atctctcgt acagtgtta gggatagcgt	11400
[0578]	caaggatata cttgatgggt taatctggca cttgaaaac gtttccgaag gtatcgatag	11460
[0579]	cggctctttg ctgcttgaaa gatgcaacgt ttccagaac cctaacggtc ttagtagatc	11520
[0580]	cctcaaggat ctcatgcca gacacggtaa ccttagacat ggtatggtaa ttgtaaatgt	11580
[0581]	aattgtaatt ttgtttgttg tttgtgttg ttggttaatt ttgtaaaatt tttggtggtg	11640
[0582]	attggttctt taagggtgtg gagtgagttg tgagttgtg ggtgggttg gtgagattgg	11700
[0583]	ggatggtggg tttatatagt ggagactgag gaatggggtc gtgagtgtta actttgcatg	11760
[0584]	ggctacacgt ggttctttt gggcttacac gtagtattat tcatgcaaat gcagccaata	11820
[0585]	catatacggg attttaataa tgtgtgggaa tacaatatgc cgagtatttt actaattttg	11880
[0586]	gcaatgacaa gtgtacattt ggattatctt acttggcctc tcttgcttta atttgatta	11940
[0587]	tttttattct cttaccttg ccgttcatat tcacatccct aaaggcaaga cagaattgaa	12000

[0588]	tggtggccaa aaattaaaac gatggatatg acctacatag tgtaggatca attaacgtcg	12060
[0589]	aaggaaaata ctgattctct caagcatacg gacaagggtg aataacatag tcaccagaac	12120
[0590]	ataataaaca aaaagtgcag aagcaagact aaaaaaatta gctatggaca ttcaggttca	12180
[0591]	tattggaaac atcattatcc tagtcttggt accatccctc ctctgtctct agttgagagg	12240
[0592]	ccttgggact aacgagaggt cagttgggat agcagatcct tctctggac tagcctttct	12300
[0593]	ggtgtttcag agtcttcgtg ccgccgtcta catctatctc cattaggtct gaagatgact	12360
[0594]	cttcacacca acgacgttta aggtctctat cctactccta gcttgcaata cctggccttg	12420
[0595]	aataacctgga gcatcgtgca cgatgattgg atactgtgga ggaggagtgt ttgctgattt	12480
[0596]	agagctcccg gttgggtgat ttgacttcca ttccagtta ggcttggtga aatttttcag	12540
[0597]	gttccattgt gaagccttta gagcttgagc ttcttccat gttaatgcct tgatcgaata	12600
[0598]	ctcctagaga aaagggaagt cgatctctga gtattgaaat cgaagtgcac attttttttc	12660
[0599]	aacgtgtcca atcaatccac aaacaaagca gaagacaggt aatctttcat acttatactg	12720
[0600]	acaagtaata gtcttaccgt catgcataat aacgtctcgt tcttcaaga ggggttttcc	12780
[0601]	gacatccata acgaccgaa gcctcatgaa agcattaggg aagaactttt ggttcttctt	12840
[0602]	gtcatggcct ttataggtgt cagccgagct cgccaattcc cgtccgactg gctccgcaa	12900
[0603]	atattcgaac ggcaagttat ggacttgcaa ccataactcc acggtattga gcaggaccta	12960
[0604]	ttgtgaagac tcatctcatg gagcttcaga atgtggtgt cagcaaacca atgaccgaaa	13020
[0605]	tccatcacat gacggacgtc cagtgggtga gcgaaacgaa acaggaagcg cctatcttct	13080
[0606]	agagtcgtga gctccacacc ggattccggc aactacgtgt tgggcaggct tcgccgtatt	13140
[0607]	agagatatgt tgaggcagac ccactgtgac cactcgtaca attacgagag ttgttttttt	13200
[0608]	tgtgattttc ctagtttctc gttgatggtg agctcatatt ctacatcgta tggctctctca	13260
[0609]	acgtcgtttc ctgtcatctg atatcccgtc atttgcatcc acgtgcgccg cctcccgtgc	13320
[0610]	caagtcccta ggtgtcatgc acgccaatt ggtggtggtg cgggctgccc tgtgttctt	13380
[0611]	accgatgggt ggaggttgag tttgggggtc tccgcggcga tggtagtggg ttgacggttt	13440
[0612]	ggtgtgggtt gacggcattg atcaatttac ttcttgcttc aaattctttg gcagaaaaca	13500
[0613]	attcattaga ttagaactgg aaaccagagt gatgagacgg attaagtcag attccaacag	13560
[0614]	agttacatct cttaagaaat aatgtaaccc ctttagactt tatatatttg caattaaaaa	13620
[0615]	aataatttaa cttttagact ttatatatag ttttaataac taagtttaac cactctatta	13680
[0616]	tttatatcga aactatttgt atgtctcccc tctaaataaa cttggtattg tgtttacaga	13740
[0617]	acctataatc aaataatcaa tactcaactg aagtttgtgc agttaattga agggattaac	13800
[0618]	ggccaaaatg cactagtatt atcaaccgaa tagattcaca ctagatggcc atttccatca	13860
[0619]	atatcatcgc cgttcttctt ctgtccacat atcccctctg aaacttgaga gacacctgca	13920
[0620]	cttcattgtc cttattacgt gttacaaaat gaaacccatg catccatgca aactgaagaa	13980
[0621]	tggcgcaaga acccttcccc tccatttctt atgtggcgac catccatttc accatctccc	14040
[0622]	gctataaaac acccccatca cttcacctag aacatcatca ctacttgctt atccatcaa	14100
[0623]	aagataccca cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaacaaac attacaatta	14160
[0624]	catttacaat taccatacca tgccacctag cgctgctaag caaatgggag cttctactgg	14220
[0625]	tgttcatgct ggtgttactg actcttctgc tttaccaga aaggatgttg ctgatagacc	14280
[0626]	tgatctcacc atcgttgag attctgttta cgatgctaag gctttcagat ctgagcatcc	14340
[0627]	tgggtgtgct catttcgttt ctttgctcg aggaagagat gctactgagg ctttcatgga	14400
[0628]	ataccataga agggcttggc ctaagtctag aatgtctaga ttccacgttg gatctcttgc	14460
[0629]	ttctactgag gaacctgttg ctgctgatga gggatacctt caactttgtg ctaggatcgc	14520

[0630]	taagatggtg cttctgttt cttctggatt cgctcctgct tcttactggg ttaaggctgg	14580
[0631]	acttatcctt ggatctgcta tcgctcttga ggcttacatg ctttacgctg gaaagagact	14640
[0632]	tctcccttct atcgttcttg gatggctttt cgctcttata ggtcttaaca tccagcatga	14700
[0633]	tgctaaccat ggtgctttgt ctaagtctgc ttctgttaac cttgctcttg gactttgtca	14760
[0634]	ggattggatc ggaggatcta tgatcctttg gcttcaagag catgttggtta tgcaccacct	14820
[0635]	ccacactaac gatgttgata aggatcctga tcaaaaggct cacggtgctc ttagactcaa	14880
[0636]	gcctactgat gcttggtcac ctatgcattg gcttcagcat ctttaccttt tgccgtggtga	14940
[0637]	gactatgtac gctttcaagc ttttgttcc tgcacatctc gagcttggtta tgtggcggtg	15000
[0638]	ggagggtgag cctatctcta agcttgctgg atacctcttt atgccttctt tgcttctcaa	15060
[0639]	gcttaccttc tgggctagat tcgttgcttt gcctctttac cttgctcctt ctgttcatac	15120
[0640]	tgctgtgtgt atcgctgcta ctgttatgac tggatcttcc tacctcgctt tcttcttctt	15180
[0641]	catctccac aacttcgagg gtgttgcttc tgttggaacct gatggatcta tcacttctat	15240
[0642]	gactagaggt gctagcttcc ttaagagaca agctgagact tcttctaacg ttggaggacc	15300
[0643]	tcttcttgct actcttaacg gtggactcaa ctaccaaatt gagcatcact tgttccttag	15360
[0644]	agttcaccat ggattctacc ctagacttgc tcctcttggt aaggctgagc ttgaggctag	15420
[0645]	aggaatcgag tacaagcact accctactat ctggctaac cttgcttcta ccctcagaca	15480
[0646]	tatgtacgct cttggaagaa ggcctagatc taaggctgag taatgacaag cttatgtgac	15540
[0647]	gtgaaataat aacggtaaaa tatatgtaat aataataata ataaagccac aaagtgagaa	15600
[0648]	tgagggaag gggaaatgtg taatgagcca gtagccggtg gtgctaattt tgtatcgtat	15660
[0649]	tgtcaataaa tcatgaattt tgtggtttt atgtgtttt ttaaatacatg aattttaaat	15720
[0650]	tttataaaat aatctccaat cggaagaaca acattccata tccatgcatg gatgtttctt	15780
[0651]	tacccaaatc tagttcttga gaggatgaag catcacgaa cagttctgca actatccctc	15840
[0652]	aaaagcttta aaatgaacaa caaggaacag agcaacgttc caaagatccc aaacgaacaa	15900
[0653]	tattatctat actaatacta tattattaat tactactgcc cggaatcaca atccctgaat	15960
[0654]	gattcctatt aactacaagc cttgttggcg gcggagaagt gatcggcgcg gcgagaagca	16020
[0655]	gcggactcgg agacgaggcc ttggaagatc tgagtcgaac gggcagaatc agtattttcc	16080
[0656]	ttcgacgtta attgatccta cactatgtag gtcatatcca tcgttttaat ttttgccac	16140
[0657]	cattcaattc tgtcttgctt ttagggatgt gaatatgaac ggccaaggta agagaataaa	16200
[0658]	aataatccaa attaaagcaa gagaggccaa gtaagataat ccaaatagtac acttgtcatt	16260
[0659]	gccaaaatta gtaaaatact cggcatattg tattcccaca cattattaaa ataccgtata	16320
[0660]	tgtattggct gcatttgcac gaataatact acgtgtaagc ccaaaagaac ccacgtgtag	16380
[0661]	cccatgcaaa gttaacactc acgaccccat tcctcagtct ccactatata aaccaccat	16440
[0662]	ccccaatctc accaaacca ccacacaact cacaactcac tctcacacct taaagaacca	16500
[0663]	atcaccacca aaaattttac aacaattacc aacaacaaca aacaacaaac aacattacaa	16560
[0664]	ttacatttac aattaccata ccatgagcgc tgttaccgtt actggatctg atcctaagaa	16620
[0665]	cagaggatct tctagcaaca ccgagcaaga ggttccaaaa gttgctatcg ataccaacgg	16680
[0666]	aaacgtgttc tctgttctg atttcacat caaggacatc cttggagcta tccctcatga	16740
[0667]	gtgttacgag agaagattgg ctacctctc ctactacgtg ttcagagata tcttctgcat	16800
[0668]	gcttaccacc ggatacctta ccataagat cttttaccct ctctcatct cttacacctc	16860
[0669]	taacagcatc atcaagttca ctttctgggc cttttacact tacgttcaag gacttttcgg	16920
[0670]	aaccggaatc tgggttctcg ctcatgagtg tggacatcaa gctttctctg attacggaat	16980
[0671]	cgtgaacgat ttcgttgat ggacccttca ctcttacct atggttctt acttcagctg	17040

[0672]	gaagtactct catggaaagc accataaggc tactggacac atgaccagag atatggtttt	17100
[0673]	cgttcctgcc accaaagagg aattcaagaa gtctaggaac ttcttcggtg acctcgctga	17160
[0674]	gtactctgag gattctccac ttagaacctt ttacgagctt cttgttcaac aacttggagg	17220
[0675]	atggatcgct tacctcttcg ttaacgttac aggacaacct taccctgatg ttccttcttg	17280
[0676]	gaaatggaac cacttctggc ttacctctcc acttttcgag caaagagatg ctctctacat	17340
[0677]	cttcctttct gatcttggaa tcctcaccca gggaatcgtt cttactcttt ggtacaagaa	17400
[0678]	attcggagga tggtcctttt tcatcaactg gtctgttcct tacatctggg ttaaccactg	17460
[0679]	gctcgttttc atcacattcc ttacgacac tgatcctact atgcctcatt acaacgctga	17520
[0680]	ggaatggact ttcgctaagg gtgctgctgc tactatcgat agaaagtctg gattcatcgg	17580
[0681]	acctcacatc ttccatgata tcatcgagac tcatgtgctt caccactact gttctaggat	17640
[0682]	cccattctac aacgctagac ctgcttctga ggctatcaag aaagtatttg gaaagcacta	17700
[0683]	caggtctagc gacgagaaca tgtggaagtc actttggaag tctttcaggt cttgccaata	17760
[0684]	cgttgacggt gataacggtg ttctcatgtt ccgtaacatc aacaactgcg gagttggagc	17820
[0685]	tgctgagaag taatgaaggg gtgatcgatt atgagatcgt acaaagacac tgctaggtgt	17880
[0686]	taaggatgga taataataat aataatgaga tgaatgtgtt ttaagttagt gtaacagctg	17940
[0687]	taataaagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagaggc	18000
[0688]	tgatgaaatg ttatgtatgt ttcttggttt ttaaaataaa tgaaagcaca tgctcgtgtg	18060
[0689]	gttctatcga attattcggc ggttcctgtg ggaaaaagtc cagaagggcc gccgcagcta	18120
[0690]	ctactacaac caaggccgtg gaggagggca acagagccag cacttcgata gctgctgcga	18180
[0691]	tgatcttaag caattgagga gcgagtgcac atgcagggga ctggagcgtg caatcggccca	18240
[0692]	gatgaggcag gacatccagc agcagggaca gcagcaggaa gttgagaggt ggtcccatca	18300
[0693]	atctaaacaa gtcgctaggg accttcggg acagtgcggc acccagccta gccgatgcca	18360
[0694]	gctccagggg cagcagcagt ctgcatggtt ttgaagtggg gatcgatgag atcgtataaa	18420
[0695]	gacactgcta ggtgttaagg atgggataat aagatgtgtt ttaagtcatt aaccgtaata	18480
[0696]	aaaagagaga gaggctgatg gaatgttatg tatgtatgtt tcttggtttt taaaattaaa	18540
[0697]	tggaagcac atgctcgtgt gggttctatc tcgattaaaa atcccaatta tatttggtct	18600
[0698]	aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt cgaaccaaac caaaatataa atatatagtt	18660
[0699]	tttatatata tgcctttaag actttttata gaattttctt taaaaatat ctagaaatat	18720
[0700]	ttgcgactct tctggcatgt aatatttcgt taaatatgaa gtgctccatt tttattaact	18780
[0701]	ttaaataatt ggttgtagc tcaacttctt atcaagtgtt actaaaatgc gtcaatctct	18840
[0702]	ttgttcttcc atattcatat gtcaaaatct atcaaaatc ttatatatct ttttcgaatt	18900
[0703]	tgaagtgaat tttcgataat ttaaaattaa atagaacata tcattattta ggtatcatat	18960
[0704]	tgatttttat acttaattac taaatttggt taactttgaa agtgtacatc aacgaaaaat	19020
[0705]	tagtcaaagc actaaaataa ataaatatca tgtgttatta agaaaattct cctataagaa	19080
[0706]	tattttaata gatcatatgt ttgtaaaaaa aattaatttt tactaacaca tatatttact	19140
[0707]	tatcaaaaat ttgacaaagt aagattaaaa taatattcat ctaacaaaaa aaaaaccaga	19200
[0708]	aaatgctgaa aaccggcaa aaccgaacca atccaaaccg atatagttgg tttggtttga	19260
[0709]	ttttgatata aaccgaacca actcgggtcca tttgcacccc taatcataat agctttaata	19320
[0710]	tttcaagata ttattaagtt aacgttgta atatcctgga aattttgcaa aatgaatcaa	19380
[0711]	gcctatatgg ctgtaatatg aatttaaaag cagctcgatg tgggtgtaat atgtaattta	19440
[0712]	cttgattcta aaaaaatatc ccaagtatta ataatttctg ctaggaagaa ggtagctac	19500
[0713]	gatttacagc aaagccagaa tacaaagaac cataaagtga ttgaagctcg aaatatacga	19560

[0714]	aggaacaaat atttttaaaa aaatacgcaa tgacttggaa caaaagaaag tgatatatatt	19620
[0715]	tttgttctta aacaagcatc ccctctaaag aatggcagtt ttcctttgca tgtaactatt	19680
[0716]	atgtccctt cgttacaaaa attttggact actattggga acttcttctg aaaatagtcc	19740
[0717]	tgcaggctag tagattggtt ggttggtttc catgtaccag aaggcttacc ctattagttg	19800
[0718]	aaagttgaaa ctttgttccc tactcaattc ctagttgtgt aaatgtatgt atatgtaatg	19860
[0719]	tgtataaaac gtagtactta aatgactagg agtggttctt gagaccgatg agagatggga	19920
[0720]	gcagaactaa agatgatgac ataattaaga acgaatttga aaggctctta ggtttgaatc	19980
[0721]	ctattcgaga atgtttttgt caaagatagt ggcgattttg aaccaaagaa aacattttaa	20040
[0722]	aaatcagtat ccggttacgt tcatgcaaat agaaagtggc ctaggatctg attgtaattt	20100
[0723]	tagacttaaa gagtctctta agattcaatc ctggctgtgt acaaaactac aaataatata	20160
[0724]	ttttagacta tttggcctta actaaacttc cactcattat ttactgaggt tagagaatag	20220
[0725]	acttgcgaaat aaacacattc ccgagaaata ctcatgatcc cataattagt cagagggtat	20280
[0726]	gccaatcaga tctaagaaca cacattccct caaattttaa tgcacatgta atcatagttt	20340
[0727]	agcacaattc aaaaataatg tagtattaaa gacagaaatt tgtagacttt tttttggcgt	20400
[0728]	taaaagaaga ctaagtttat acgtacattt tatttttaagt ggaaaaccga aattttccat	20460
[0729]	cgaaatatat gaatttagta tatatatattc tgcaatgtac tattttgcta ttttggcaac	20520
[0730]	tttcagtgga ctactacttt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtatacacat	20580
[0731]	gtctaaatgc atgctttgta aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaatacat	20640
[0732]	ctcatagctt cctccattat tttccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca	20700
[0733]	acaacaaaca acaacaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaatttgct	20760
[0734]	caacctctcg ttgctatggc tcaagagcag tacgctgcta tcgatgctgt tgttgctcct	20820
[0735]	gctatcttct ctgctaccga ctctattgga tggggactca agcctatctc ttctgctact	20880
[0736]	aaggatctcc ctctcgttga atctcctacc cctcttatcc tttctctcct cgcttacttc	20940
[0737]	gctatcggtt gttctggact cgtttaccgt aaagtgttcc ctagaaccgt taagggacag	21000
[0738]	gatcctttcc ttctcaagge tcttatgctc gctcacaacg ttttcttat cggactcagc	21060
[0739]	ctttacatgt gcctcaagct cgtttaccgag gcttacgtga acaagtactc cttctgggga	21120
[0740]	aacgcttaca accctgctca aaccgagatg gctaaggatga tctggatctt ctacgtgtcc	21180
[0741]	aagatctacg agttcatgga caccttcatc atgcttctca agggaaacgt taaccaggtt	21240
[0742]	tccttctctc atgtttacca ccacggatct atctctggaa tctggtggat gatcacttat	21300
[0743]	gctgctccag gtggagatgc ttacttctct gctgctctca actcttgggt tcatgtgtgc	21360
[0744]	atgtacacct actacttcat ggctgctgtt cttcctaagg acgaaaagac caagagaaag	21420
[0745]	tacctttggt ggggaagata ctttaccag atgcaaatgt tccagttctt catgaacctt	21480
[0746]	ctccaggtg tttacctcct ctactcttct tctccttacc ctaagttcat tgctcaactc	21540
[0747]	ctcgttgttt acatggttac cctcctcatg cttttcggaa acttctacta catgaagcac	21600
[0748]	cacgcttcta agtgataagg gccgccgcca tgtgacagat cgaaggaaga aagtgtata	21660
[0749]	agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tatatataat aatgttatct	21720
[0750]	ttcacaactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt gtcatatgat	21780
[0751]	aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtaa tttaaagata taagattctt taaatgatta	21840
[0752]	aaaaaaatat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta ttatttattg	21900
[0753]	attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct agcctgcagg	21960
[0754]	gcgccgcgg atcccatgga gtcaaagatt caaatagagg acctaacaga actcgccgta	22020
[0755]	aagactggcg aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc	22080

[0756]	gtcaacatgg tggagcacga cacacttgct tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca	22140
[0757]	gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga	22200
[0758]	ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc	22260
[0759]	tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt	22320
[0760]	ggccccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc	22380
[0761]	acgtcttcaa agcaagtga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa	22440
[0762]	tcccactatc cttcgcaaga cctttctct atataaggaa gttcatttca tttggagaga	22500
[0763]	acacggggga ctgaattaaa tatgagccct gagaggcgtc ctgttgaaat cagacctgct	22560
[0764]	actgctgctg atatggctgc tgtttgtgat atcgtgaacc actacatcga gacttctacc	22620
[0765]	gttaacttca gaactgagcc tcaaacctct caagagtga tcgatgatct tgagagactc	22680
[0766]	caagatagat acccttggtc tgttgctgag gttgagggtg ttgttgctgg aatcgcttac	22740
[0767]	gctggacctt ggaaggctag aaacgcttac gattggactg ttgagtctac cgtttacgtt	22800
[0768]	tcacacagac atcagagact tggacttga tctacccttt acactcacct tctcaagtct	22860
[0769]	atggaagctc aggattcaa gtctgttgtt gctgttatcg gactccctaa cgatccttct	22920
[0770]	gttagacttc atgaggctct tggatacact gctagaggaa ctcttagagc tgctggatac	22980
[0771]	aagcacggtg gatggcatga tgttggtatc tggcaaagag atttcgagct tctgtctcct	23040
[0772]	cctagacctg ttagaccagt tactcagatc tgaatttgcg tgatcgttca aacatttggc	23100
[0773]	aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc	23160
[0774]	tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat	23220
[0775]	gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgataga aacaaaatat	23280
[0776]	agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta gatcactagt	23340
[0777]	gatgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt	23400
[0778]	ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca acagctcccc	23460
[0779]	gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccatcagt cc	23512
[0780]	<210> 3	
[0781]	<211> 1254	
[0782]	<212> DNA	
[0783]	<213> 人工序列	
[0784]	<220>	
[0785]	<223> 用于在植物中表达芽殖酵母 ( <i>Lachancea kluyveri</i> ) 12 去饱和酶的密码子优化的开放阅读框	
[0786]	<400> 3	
[0787]	atgagcgtg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc	60
[0788]	gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa acgtgttctc tgttctctgat	120
[0789]	ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt gttacgagag aagattggct	180
[0790]	acctctctct actacgtgtt cagagatata ttctgcatgc ttaccaccgg ataccttacc	240
[0791]	cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacacctcta acagcatcat caagttcact	300
[0792]	ttctgggccc tttaactta cgttcaagga cttttcggaa ccggaatctg ggttctcgtc	360
[0793]	catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg tgaacgattt cgttggatgg	420
[0794]	acccttcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga agtactctca tggaaagcac	480
[0795]	cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg ttcctgccac caaagaggaa	540
[0796]	ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctcgtgagt actctgagga ttctccactt	600

[0797] agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat ggatcgctta cctcttcggt 660  
 [0798] aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt cttcttga aatggaacca cttctggctt 720  
 [0799] acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct tcttttctga tcttggaatc 780  
 [0800] ctcaccagg gaatcgttct tactcttgg tacaagaaat tcggaggatg gtcccttttc 840  
 [0801] atcaactggc tcgttcctta catctgggtt aaccactggc tcgttttcat cacattcctt 900  
 [0802] cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt 960  
 [0803] gctgctgcta ctatgatag aaagtccgga ttcatcggac ctcacatctt ccatgatatc 1020  
 [0804] atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctagatcc cattctacaa cgctagacct 1080  
 [0805] gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg 1140  
 [0806] tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg ttgacggtga taacggtgtt 1200  
 [0807] ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg ctgagaagta atga 1254  
 [0808] <210> 4  
 [0809] <211> 416  
 [0810] <212> PRT  
 [0811] <213> 芽殖酵母  
 [0812] <400> 4  
 [0813] Met Ser Ala Val Thr Val Thr Gly Ser Asp Pro Lys Asn Arg Gly Ser  
 [0814] 1 5 10 15  
 [0815] Ser Ser Asn Thr Glu Gln Glu Val Pro Lys Val Ala Ile Asp Thr Asn  
 [0816] 20 25 30  
 [0817] Gly Asn Val Phe Ser Val Pro Asp Phe Thr Ile Lys Asp Ile Leu Gly  
 [0818] 35 40 45  
 [0819] Ala Ile Pro His Glu Cys Tyr Glu Arg Arg Leu Ala Thr Ser Leu Tyr  
 [0820] 50 55 60  
 [0821] Tyr Val Phe Arg Asp Ile Phe Cys Met Leu Thr Thr Gly Tyr Leu Thr  
 [0822] 65 70 75 80  
 [0823] His Lys Ile Leu Tyr Pro Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Ser Ile  
 [0824] 85 90 95  
 [0825] Ile Lys Phe Thr Phe Trp Ala Leu Tyr Thr Tyr Val Gln Gly Leu Phe  
 [0826] 100 105 110  
 [0827] Gly Thr Gly Ile Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gln Ala Phe  
 [0828] 115 120 125  
 [0829] Ser Asp Tyr Gly Ile Val Asn Asp Phe Val Gly Trp Thr Leu His Ser  
 [0830] 130 135 140  
 [0831] Tyr Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Gly Lys His  
 [0832] 145 150 155 160  
 [0833] His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro Ala  
 [0834] 165 170 175  
 [0835] Thr Lys Glu Glu Phe Lys Lys Ser Arg Asn Phe Phe Gly Asn Leu Ala  
 [0836] 180 185 190  
 [0837] Glu Tyr Ser Glu Asp Ser Pro Leu Arg Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Val  
 [0838] 195 200 205

[0839]	Gln Gln Leu Gly Gly Trp Ile Ala Tyr Leu Phe Val Asn Val Thr Gly		
[0840]	210	215	220
[0841]	Gln Pro Tyr Pro Asp Val Pro Ser Trp Lys Trp Asn His Phe Trp Leu		
[0842]	225	230	235 240
[0843]	Thr Ser Pro Leu Phe Glu Gln Arg Asp Ala Leu Tyr Ile Phe Leu Ser		
[0844]	245	250	255
[0845]	Asp Leu Gly Ile Leu Thr Gln Gly Ile Val Leu Thr Leu Trp Tyr Lys		
[0846]	260	265	270
[0847]	Lys Phe Gly Gly Trp Ser Leu Phe Ile Asn Trp Phe Val Pro Tyr Ile		
[0848]	275	280	285
[0849]	Trp Val Asn His Trp Leu Val Phe Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp		
[0850]	290	295	300
[0851]	Pro Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Glu Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly		
[0852]	305	310	315 320
[0853]	Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Lys Phe Gly Phe Ile Gly Pro His Ile		
[0854]	325	330	335
[0855]	Phe His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Cys Ser Arg		
[0856]	340	345	350
[0857]	Ile Pro Phe Tyr Asn Ala Arg Pro Ala Ser Glu Ala Ile Lys Lys Val		
[0858]	355	360	365
[0859]	Met Gly Lys His Tyr Arg Ser Ser Asp Glu Asn Met Trp Lys Ser Leu		
[0860]	370	375	380
[0861]	Trp Lys Ser Phe Arg Ser Cys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Asn Gly Val		
[0862]	385	390	395 400
[0863]	Leu Met Phe Arg Asn Ile Asn Asn Cys Gly Val Gly Ala Ala Glu Lys		
[0864]	405	410	415
[0865]	<210> 5		
[0866]	<211> 1251		
[0867]	<212> DNA		
[0868]	<213> 毕赤酵母(Pichia pastoris)		
[0869]	<400> 5		
[0870]	atgtctaagg ttaccgtgtc tggatctgag atccttgagg gatctactaa gaccgttagg	60	
[0871]	cgttctggaa acgttgcatc tttcaagcag caaaagaccg ctatcgatac cttcggaac	120	
[0872]	gttttcaagg tgccagatta caccatcaag gatatacctg acgctatccc taagcactgt	180	
[0873]	tacgagagat ctctcgtgaa gtctatgtct tacgtggtga gagatatcgt ggctatctct	240	
[0874]	gctatcgctt acgttggact tacctacatc cctcttctcc ctaacgaatt ccttagattc	300	
[0875]	gctgcttggt ctgcttacgt gttctctatc tcttgtttcg gattcggaat ctggatcctt	360	
[0876]	ggacatgagt gtggacattc tgctttctct aactacggat gggttaacga taccgttgga	420	
[0877]	tgggttctcc actctcttgt tatggttctt tacttcagct ggaagttctc tcatgctaag	480	
[0878]	caccataagg ctactggaca catgaccaga gatatggttt tcgttcctta caccgccgag	540	
[0879]	gaattcaaag agaagacca agttaccagc cttcacgata tcgctgagga aactcctatc	600	
[0880]	tactctgttt tcgctctctt gtccaacag cttggaggac tttctcttta ccttgctact	660	



[0881] aacgctactg gacaacctta ccctgggtgtt tctaagttct tcaagtctca ctactggcct 720  
 [0882] tctagccctg ttttcgataa gaaggactac tggtagatcg ttctttctga tcttggaatc 780  
 [0883] cttgctaccc tcaattctgt ttacaccgct tacaaggttt tcggattctg gcctactttc 840  
 [0884] atcacatggt tctgtccttg gatccttggt aaccactggc ttgttttcgt taccttcctt 900  
 [0885] cagcacaccg attcttctat gcctcattac gatgctcaag agtggacttt cgctaagggt 960  
 [0886] gctgctgcta ctatcgatag agagttcgga atcctcgga tcatcttcca tgacatcatc 1020  
 [0887] gagactcatg tgctccatca ctacgtttca aggatcccat tctaccatgc tagagaagct 1080  
 [0888] accgagtgc tcaagaaagt tatgggagag cactacagac acaccgatga gaacatgtgg 1140  
 [0889] gttagccttt ggaaaacttg gagatcttgc cagttcgttg agaaccatga tgggtgtgtac 1200  
 [0890] atgttccgta actgcaacaa cgttggagtg aagcctaagg atacctgatg a 1251  
 [0891] <210> 6  
 [0892] <211> 415  
 [0893] <212> PRT  
 [0894] <213> 毕赤酵母  
 [0895] <400> 6  
 [0896] Met Ser Lys Val Thr Val Ser Gly Ser Glu Ile Leu Glu Gly Ser Thr  
 [0897] 1 5 10 15  
 [0898] Lys Thr Val Arg Arg Ser Gly Asn Val Ala Ser Phe Lys Gln Gln Lys  
 [0899] 20 25 30  
 [0900] Thr Ala Ile Asp Thr Phe Gly Asn Val Phe Lys Val Pro Asp Tyr Thr  
 [0901] 35 40 45  
 [0902] Ile Lys Asp Ile Leu Asp Ala Ile Pro Lys His Cys Tyr Glu Arg Ser  
 [0903] 50 55 60  
 [0904] Leu Val Lys Ser Met Ser Tyr Val Val Arg Asp Ile Val Ala Ile Ser  
 [0905] 65 70 75 80  
 [0906] Ala Ile Ala Tyr Val Gly Leu Thr Tyr Ile Pro Leu Leu Pro Asn Glu  
 [0907] 85 90 95  
 [0908] Phe Leu Arg Phe Ala Ala Trp Ser Ala Tyr Val Phe Ser Ile Ser Cys  
 [0909] 100 105 110  
 [0910] Phe Gly Phe Gly Ile Trp Ile Leu Gly His Glu Cys Gly His Ser Ala  
 [0911] 115 120 125  
 [0912] Phe Ser Asn Tyr Gly Trp Val Asn Asp Thr Val Gly Trp Val Leu His  
 [0913] 130 135 140  
 [0914] Ser Leu Val Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His Ala Lys  
 [0915] 145 150 155 160  
 [0916] His His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro  
 [0917] 165 170 175  
 [0918] Tyr Thr Ala Glu Glu Phe Lys Glu Lys His Gln Val Thr Ser Leu His  
 [0919] 180 185 190  
 [0920] Asp Ile Ala Glu Glu Thr Pro Ile Tyr Ser Val Phe Ala Leu Leu Phe  
 [0921] 195 200 205  
 [0922] Gln Gln Leu Gly Gly Leu Ser Leu Tyr Leu Ala Thr Asn Ala Thr Gly

[0923]	210	215	220
[0924]	Gln Pro Tyr Pro Gly Val Ser Lys Phe Phe Lys Ser His Tyr Trp Pro		
[0925]	225	230	235 240
[0926]	Ser Ser Pro Val Phe Asp Lys Lys Asp Tyr Trp Tyr Ile Val Leu Ser		
[0927]		245	250 255
[0928]	Asp Leu Gly Ile Leu Ala Thr Leu Thr Ser Val Tyr Thr Ala Tyr Lys		
[0929]		260	265 270
[0930]	Val Phe Gly Phe Trp Pro Thr Phe Ile Thr Trp Phe Cys Pro Trp Ile		
[0931]		275	280 285
[0932]	Leu Val Asn His Trp Leu Val Phe Val Thr Phe Leu Gln His Thr Asp		
[0933]	290	295	300
[0934]	Ser Ser Met Pro His Tyr Asp Ala Gln Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly		
[0935]	305	310	315 320
[0936]	Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Glu Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ile Phe		
[0937]		325	330 335
[0938]	His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Val Ser Arg Ile		
[0939]		340	345 350
[0940]	Pro Phe Tyr His Ala Arg Glu Ala Thr Glu Cys Ile Lys Lys Val Met		
[0941]		355	360 365
[0942]	Gly Glu His Tyr Arg His Thr Asp Glu Asn Met Trp Val Ser Leu Trp		
[0943]		370	375 380
[0944]	Lys Thr Trp Arg Ser Cys Gln Phe Val Glu Asn His Asp Gly Val Tyr		
[0945]	385	390	395 400
[0946]	Met Phe Arg Asn Cys Asn Asn Val Gly Val Lys Pro Lys Asp Thr		
[0947]		405	410 415
[0948]	<210> 7		
[0949]	<211> 1392		
[0950]	<212> DNA		
[0951]	<213> 细小微胞藻(Micromonas pusilla)		
[0952]	<400> 7		
[0953]	atgtgcccgc cgaagacgga cggccgatcg tccccgcat cgccgctgac gcgcagcaaa	60	
[0954]	tcctccgcgg aggcgctcga cgccaaggac gcgtcgaccg cgcccgtcga tctcaaaacg	120	
[0955]	ctcgagccgc acgagctcgc ggcgacgttc gagacgcgat ggggtgcgct ggaggacgtc	180	
[0956]	gagtacgacg tcacaaactt caaacaccg ggaggcagcg tgatattcta catgctcgcg	240	
[0957]	aacacgggcg cggacgccac ggaggcgttc aaggagtcc acatgcgac gcttaaggcg	300	
[0958]	tggaagatgc tcagagcgct gccgtcgcgc cccgcggaga tcaaacgcag cgagagcgag	360	
[0959]	gacgcgccga tgttggagga tttcgcgcgg tggcgcgcgg agctcgaacg cgacgggttc	420	
[0960]	tttaagccct cgataacgca cgtcgcgtat cggttactcg agctcctcgc gaccttcgcc	480	
[0961]	ctcggcaccg ccctcatgta cgccgggtac ccgatcatcg cgtccgtcgt gtacggcgcg	540	
[0962]	ttcttcggcg ctcggtgcgg ttgggtccag cagcaggcg ggcacaactc gctcacgggg	600	
[0963]	tccgtctacg tcgacaagcg cctccaagcg atgacgtcgc ggttcgggct gtccacgagc	660	
[0964]	ggggagatgt ggaaccagat gcacaataag caccacgcga cgccgcagaa agtgaggcac	720	

[0965] gacatggacc tggacacgac ccccgcggtg gcgtttttta acaccgccgt ggaggacaac 780  
[0966] cggccgaggg ggttctcccg cgcgtgggct cggcttcagg cgtggacgtt cgtcccgggtg 840  
[0967] acctccgggc tgctcgtcca ggcggttctgg atctacgtcc tgcacccgcg gcagggtgttg 900  
[0968] cgaaagaaga actacgagga ggcgctcgtg atgctcgtct ctcacgtcgt caggaccgcg 960  
[0969] gtgattaaac tcgcgacggg gtactcgtgg cccgctcgcgt actggtggtt caccttcggc 1020  
[0970] aactggatcg cgtacatgta cctcttcgcg cacttctcca cgagccacac gcacctccc 1080  
[0971] gtcgtgccct cggataagca cctgagctgg gtgaactacg cggtcgatca caccgtggac 1140  
[0972] atcgaccgct cgcgcgggta cgtgaactgg ttgatgggat atctgaactg ccaggtcatt 1200  
[0973] catcacctgt tcccggacat gccgcagttt cgccagccgg aggtgagccg gcggttcgtc 1260  
[0974] ccgttcgcga agaagtgggg gctgaactac aagggtcgtg cctattacgg cgcctggaag 1320  
[0975] gcgacgttct cgaacttga taaggctcgg cagcactact acgtcaacgg caaggcggag 1380  
[0976] aaggcgact ga 1392  
[0977] <210> 8  
[0978] <211> 1395  
[0979] <212> DNA  
[0980] <213> 人工序列  
[0981] <220>  
[0982] <223> 用于在植物中表达细小微胞藻6-去饱和酶的密码子优化的开放阅读框 (版本1)  
[0983] <400> 8  
[0984] atgtgccctc ctaagactga tggaagatct tctcctagat ctccacttac caggctctaaa 60  
[0985] tcttctgctg aggtctctga tgctaaggat gcttctactg ctctctgtga tcttaagact 120  
[0986] cttgagcctc atgagcttgc tgctactttc gagactagat gggtttagagt tgaggacgtt 180  
[0987] gagtacgatg tgactaactt caagcaccct ggtggatctg tgatcttcta catgcttgct 240  
[0988] aacactggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaattcc acatgcgttc tctcaaggct 300  
[0989] tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360  
[0990] gatgctccta tgcttgagga tttcgctaga tggcgtgctg agcttgagag agatggattc 420  
[0991] ttcaagcctt ctatcaccca tgtggcttac agacttctcg agcttcttgc tacattcgct 480  
[0992] cttggaactg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg cttctgttgt ttacgggtgct 540  
[0993] ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacataactc tcttaccgga 600  
[0994] tctgtttacg tggacaagag acttcaggtc atgacttggt gattcggact ttctacttct 660  
[0995] ggtgagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcaaaa ggtagacac 720  
[0996] gatatggatc ttgataccac tcctgctgtg gctttcttca acactgctgt tgaggataac 780  
[0997] agacctagag gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacttt cgttctgtt 840  
[0998] acctctggac ttcttggtca agctttctgg atctacgttc tccaccctag acaagttctc 900  
[0999] cgtaagaaga actacgaaga ggcttcttgg atgctcgttt ctcatgttgt tagaaccgct 960  
[1000] gttatcaagc ttgctactgg atactcttgg cctgttgctt actggtggtt cactttcggg 1020  
[1001] aactggatcg cttacatgta cttttctgct cacttctcta cttctcatac tcacctccct 1080  
[1002] gttgttccat ctgataagca cttttcttgg gttaactacg ctgttgatca caccgttgat 1140  
[1003] atcgatcctt ctagaggata cgtgaactgg cttatgggat accttaactg tcaggttatc 1200  
[1004] caccacctct tccctgatat gcctcaattc agacagcctg aggttagcag aagattcggt 1260  
[1005] ctttcgcta agaagtgggg actcaactac aagggtcgtc cttactacgg tgcttggaag 1320  
[1006] gctactttct ctaaccttga taaggctgga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag 1380

[1007]	aaggctcact aatga 1395
[1008]	<210> 9
[1009]	<211> 1395
[1010]	<212> DNA
[1011]	<213> 人工序列
[1012]	<220>
[1013]	<223> 用于在植物中表达细小微胞藻6-去饱和酶的密码子优化的开放阅读框 (版本2)
[1014]	<400> 9
[1015]	atgtgtcctc ctaagaccga tggaagatct tctcctagat ctcctctcac caggtctaag 60
[1016]	tcatctgctg aggctcttga tgctaaggat gcttctaccg ctcctgttga tcttaagacc 120
[1017]	cttgagcctc atgaacttgc tgctaccttc gagactagat gggttagggt tgaggatgtt 180
[1018]	gagtacgacg tgaccaactt caaacatcct ggtggaagcg tgatcttcta catgcttgc 240
[1019]	aacactgggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaatttc acatgcgtag cctcaaggct 300
[1020]	tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360
[1021]	gatgctccta tgcttgagga tttcgctagg tggagagctg aacttgagag ggacggattc 420
[1022]	ttcaagcctt ctatcaccca tgttgcttac cgtcttttgg agcttcttgc tactttcget 480
[1023]	cttgaaccg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg ctagecgttg gtacgggtgc 540
[1024]	ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacacaactc tcttaccgga 600
[1025]	tctgtgtacg tggataagag acttcaggct atgacttgcg gattcggact ttctaccagc 660
[1026]	ggagagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcagaa agttagacac 720
[1027]	gacatggatc ttgataccac tctgctgtg gctttcttca acaccgctgt ggaggataat 780
[1028]	agacctaggg gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacctt cgttcctgtt 840
[1029]	acttctggac ttctcgttca ggctttctgg atctacgttc tccatcctag acagggtgctc 900
[1030]	aggaagaaga actacgagga agcttcttgg atgctcgttt ctcacgttgt tagaaccgct 960
[1031]	gttatcaagc ttgctaccgg atactcttgg cctgttgctt actggtggtt cactttcggga 1020
[1032]	aactggatcg cttacatgta cctcttcgct cacttctcta cttctcacac tcacctccct 1080
[1033]	gttgttccat ctgacaagca ccttagctgg gttaactacg ctgttgatca caccgttgac 1140
[1034]	atcgatcctt ctctgtgata cgttaaactgg cttatgggat accttaactg ccaggttatc 1200
[1035]	caccatctct tccctgatat gcctcaattc agacagcctg aggtgtcaag aagattcgtc 1260
[1036]	cctttcgtca agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttgaag 1320
[1037]	gctactttca gcaacctga caaagtggga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag 1380
[1038]	aaggctcact gatga 1395
[1039]	<210> 10
[1040]	<211> 463
[1041]	<212> PRT
[1042]	<213> 细小微胞藻
[1043]	<400> 10
[1044]	Met Cys Pro Pro Lys Thr Asp Gly Arg Ser Ser Pro Arg Ser Pro Leu
[1045]	1                      5                      10                      15
[1046]	Thr Arg Ser Lys Ser Ser Ala Glu Ala Leu Asp Ala Lys Asp Ala Ser
[1047]	20                      25                      30
[1048]	Thr Ala Pro Val Asp Leu Lys Thr Leu Glu Pro His Glu Leu Ala Ala

[1049]	35	40	45
[1050]	Thr Phe Glu Thr Arg Trp Val Arg Val Glu Asp Val Glu Tyr Asp Val		
[1051]	50	55	60
[1052]	Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Phe Tyr Met Leu Ala		
[1053]	65	70	75
[1054]	Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Met Arg		
[1055]	85	90	95
[1056]	Ser Leu Lys Ala Trp Lys Met Leu Arg Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala		
[1057]	100	105	110
[1058]	Glu Ile Lys Arg Ser Glu Ser Glu Asp Ala Pro Met Leu Glu Asp Phe		
[1059]	115	120	125
[1060]	Ala Arg Trp Arg Ala Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser		
[1061]	130	135	140
[1062]	Ile Thr His Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Leu Ala Thr Phe Ala		
[1063]	145	150	155
[1064]	Leu Gly Thr Ala Leu Met Tyr Ala Gly Tyr Pro Ile Ile Ala Ser Val		
[1065]	165	170	175
[1066]	Val Tyr Gly Ala Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu		
[1067]	180	185	190
[1068]	Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Ser Val Tyr Val Asp Lys Arg Leu		
[1069]	195	200	205
[1070]	Gln Ala Met Thr Cys Gly Phe Gly Leu Ser Thr Ser Gly Glu Met Trp		
[1071]	210	215	220
[1072]	Asn Gln Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His		
[1073]	225	230	235
[1074]	Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala		
[1075]	245	250	255
[1076]	Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Arg Ala Trp Ala Arg Leu		
[1077]	260	265	270
[1078]	Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Leu Leu Val Gln Ala		
[1079]	275	280	285
[1080]	Phe Trp Ile Tyr Val Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Lys Lys Asn		
[1081]	290	295	300
[1082]	Tyr Glu Glu Ala Ser Trp Met Leu Val Ser His Val Val Arg Thr Ala		
[1083]	305	310	315
[1084]	Val Ile Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Trp Pro Val Ala Tyr Trp Trp		
[1085]	325	330	335
[1086]	Phe Thr Phe Gly Asn Trp Ile Ala Tyr Met Tyr Leu Phe Ala His Phe		
[1087]	340	345	350
[1088]	Ser Thr Ser His Thr His Leu Pro Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu		
[1089]	355	360	365
[1090]	Ser Trp Val Asn Tyr Ala Val Asp His Thr Val Asp Ile Asp Pro Ser		

[1091]	370	375	380
[1092]	Arg Gly Tyr Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile		
[1093]	385	390	395
[1094]	His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser		
[1095]	405	410	415
[1096]	Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Gly Leu Asn Tyr Lys Val		
[1097]	420	425	430
[1098]	Leu Ser Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Ser Asn Leu Asp Lys		
[1099]	435	440	445
[1100]	Val Gly Gln His Tyr Tyr Val Asn Gly Lys Ala Glu Lys Ala His		
[1101]	450	455	460
[1102]	<210> 11		
[1103]	<211> 1449		
[1104]	<212> DNA		
[1105]	<213> 绿色鞭毛藻 (Ostreococcus lucimarinus)		
[1106]	<400> 11		
[1107]	atgtgcgtcg aaacgaccga aggcacatcg cgaacgatgg cgaacgaacg caccgagctcg	60	
[1108]	tcgtcgtcgc tgagcgaagg cggaacgccg acgggtgacgg tcgggatggg aagcgaagac	120	
[1109]	gcggggaaga agactcgaaa cgcgagcgtc acggcgtgga cgaaagagtt ggagccgcac	180	
[1110]	gcgatcgcca agacgttcga acggcggtac gtgacgatcg aaggcgtgga atacgatgtg	240	
[1111]	acggatttta agcatcccg aggatcggtt atttattaca tgctgtcgaa caccggagcg	300	
[1112]	gacgcgacgg aggcttttaa agagtttcat tatcggtcga aaaaggcgcg caaggcgttg	360	
[1113]	gcggcgttgc cgcataagcc agtggacgcg gcgacgcggg aaccgatcga agatgaggcg	420	
[1114]	atgctgaagg atttcgcgca gtggcgcaag gaattggagc gtgagggatt ttttaagccc	480	
[1115]	tcgccggcgc acgtggcgta tcgattcgcc gagctcgcgg cgatgttcgc gctcggcacg	540	
[1116]	gcgttgatgc acgcgcgttg gcacgtcgtc tccgtgatcg tgtactcgtg tttcttcggc	600	
[1117]	gcgcgatgcg gttgggtgca gcacgagggt gggcacaatt cgttgactgg aaacatttgg	660	
[1118]	tgggacaagc gaatccaagc cttcgccgcg gggttcggct tggcgtcgag tggcgacatg	720	
[1119]	tggaacaaca tgcacaacaa gcatcacgcg acgccccaaa aggtgcgaca cgatatggat	780	
[1120]	ctcgacacca ctcccacggt ggcgttcttc aactccgcgg ttgaagaaaa tcgccgcg	840	
[1121]	ggattcagta agttgtggtt gcgccttcaa gcgtggacct tcgtgcccgt gacgtccggt	900	
[1122]	atggttttgt tcttctggat gttcgtcttg caccgcgta acgcgctgcg acgcaaaagc	960	
[1123]	ttcgaagaag cggttggat gttttccgcg caccgtcattc gcacggcggt tatcaaagcc	1020	
[1124]	gtcaccggt actcctggat cgctcgtac ggcttggtcg cggcgacgat gtgggcgagc	1080	
[1125]	ggatgttact tgttcgcgca cttttccacg tctcacacgc acttgatgt cgtgccgagc	1140	
[1126]	gataaacacc tctcgtgggt gcgatacgcc gtcgatcaca cgatcgacat caatccgaac	1200	
[1127]	aacagcgtcg tcaactggtt gatgggttac ttgaactgcc aagtcatcca tcacctgttc	1260	
[1128]	ccggatatgc ctacgttccg ccaacccgaa gtctcccgcg gattcgtccc gtttgcgaag	1320	
[1129]	aagtggaact taaactacaa ggtcttgacg tattatgggg cctggaagc gacgttcggc	1380	
[1130]	aactgaacg acgtcgggaa gcactattac gtgcacggat ctcagcgcgt caaatcaaag	1440	
[1131]	tcggcgtga	1449	
[1132]	<210> 12		

[1133]	<211> 1449
[1134]	<212> DNA
[1135]	<213> 人工序列
[1136]	<220>
[1137]	<223> 用于在植物中表达绿色鞭毛藻6-去饱和酶的密码子优化的开放阅读框
[1138]	<400> 12
[1139]	atgtgtgttg agactactga gggaacctct agaactatgg ctaacgagag gacctcttct 60
[1140]	tcttcttcac tctctgaggg tggaaactcct actgttactg tgggaatggg atctgaggat 120
[1141]	gctggaaaga aaaccagaaa cgcttctgtt actgcttggg ccaaagagct tgagcctcac 180
[1142]	gctatcgcta agaccttga gagaagatac gttaccatcg aggggtgtga gtacgatgtg 240
[1143]	accgatttca aacaccttgg tggatctgtg atctactaca tgctctctaa cactgggtgct 300
[1144]	gatgctactg aggccttcaa agagtccac taccgttcta agaaggctag aaaggctctt 360
[1145]	gctgctcttc ctcaacaagg tgttgatgct gctactagag agcctattga ggacgaggct 420
[1146]	atgcttaagg atttcgctca gtggagaaaa gagttggaga gagagggtt cttcaagcct 480
[1147]	tctcctgctc atgttgctta ccgtttcgct gaactcgtg ctatgttcgc tcttgggaacc 540
[1148]	gctcttatgc atgctagatg gcacgttgc agcgttatcg tgtactcctg tttcttcgga 600
[1149]	gctagatgtg gatgggttca acatgagggt ggacacaact ctcttaccgg aaacatctgg 660
[1150]	tgggataaga gaatccaagc tttcgctgct ggattcggac ttgcttcttc tggtgacatg 720
[1151]	tggacaaca tgcacaaca gcacatgct actcctcaga aagtgagaca cgatatggat 780
[1152]	cttgatacca cccctaccgt tgctttcttc aactctgtg tggaggaaaa cagacctagg 840
[1153]	ggattctcta agctttggct cagacttcaa gcttgacct tcgttcctgt tacctctgga 900
[1154]	atgggtgctc tcttctggat gttcgttctc catcctagaa acgctctccg tcgtaagtct 960
[1155]	ttcgaagagg ctgcttggat gttctctgct cacgttatca gaaccgctgt tatcaaggct 1020
[1156]	gttaccgat actcttggat cgctagctac ggacttttcg ctgctactat gtgggcttct 1080
[1157]	ggatgctacc ttttcgctca cttctctact tctcacacc accctgatgt tgttccatct 1140
[1158]	gataagcacc ttagctgggt taggtacgct gttgatcaca ccatcgacat caaccctaac 1200
[1159]	aactctgttg tgaactggct tatgggatac cttaactgcc aggttatcca ccatctcttc 1260
[1160]	cctgatatgc ctcaattcag acagcctgag gtgtcaagaa gattcgtccc tttcgctaag 1320
[1161]	aagtgaacc tcaactacaa ggtgctcact tactacggtg cttggaaggc tactttcggg 1380
[1162]	aacctcaacg atgttggaag gcactactac gttcacggat ctgagagagt gaagagcaag 1440
[1163]	agcgcttga 1449
[1164]	<210> 13
[1165]	<211> 482
[1166]	<212> PRT
[1167]	<213> 绿色鞭毛藻
[1168]	<400> 13
[1169]	Met Cys Val Glu Thr Thr Glu Gly Thr Ser Arg Thr Met Ala Asn Glu
[1170]	1 5 10 15
[1171]	Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Glu Gly Gly Thr Pro Thr Val
[1172]	20 25 30
[1173]	Thr Val Gly Met Gly Ser Glu Asp Ala Gly Lys Lys Thr Arg Asn Ala
[1174]	35 40 45

[1175]	Ser Val Thr Ala Trp Thr Lys Glu Leu Glu Pro His Ala Ile Ala Lys
[1176]	50 55 60
[1177]	Thr Phe Glu Arg Arg Tyr Val Thr Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val
[1178]	65 70 75 80
[1179]	Thr Asp Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Tyr Tyr Met Leu Ser
[1180]	85 90 95
[1181]	Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Tyr Arg
[1182]	100 105 110
[1183]	Ser Lys Lys Ala Arg Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro His Lys Pro Val
[1184]	115 120 125
[1185]	Asp Ala Ala Thr Arg Glu Pro Ile Glu Asp Glu Ala Met Leu Lys Asp
[1186]	130 135 140
[1187]	Phe Ala Gln Trp Arg Lys Glu Leu Glu Arg Glu Gly Phe Phe Lys Pro
[1188]	145 150 155 160
[1189]	Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Phe
[1190]	165 170 175
[1191]	Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met His Ala Arg Trp His Val Ala Ser Val
[1192]	180 185 190
[1193]	Ile Val Tyr Ser Cys Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His
[1194]	195 200 205
[1195]	Glu Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg
[1196]	210 215 220
[1197]	Ile Gln Ala Phe Ala Ala Gly Phe Gly Leu Ala Ser Ser Gly Asp Met
[1198]	225 230 235 240
[1199]	Trp Asn Asn Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg
[1200]	245 250 255
[1201]	His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Thr Val Ala Phe Phe Asn Ser
[1202]	260 265 270
[1203]	Ala Val Glu Glu Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Lys Leu Trp Leu Arg
[1204]	275 280 285
[1205]	Leu Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Met Val Leu Phe
[1206]	290 295 300
[1207]	Phe Trp Met Phe Val Leu His Pro Arg Asn Ala Leu Arg Arg Lys Ser
[1208]	305 310 315 320
[1209]	Phe Glu Glu Ala Ala Trp Met Phe Ser Ala His Val Ile Arg Thr Ala
[1210]	325 330 335
[1211]	Val Ile Lys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Trp Ile Ala Ser Tyr Gly Leu
[1212]	340 345 350
[1213]	Phe Ala Ala Thr Met Trp Ala Ser Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe
[1214]	355 360 365
[1215]	Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
[1216]	370 375 380



[1217]	Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp His Thr Ile Asp Ile Asn Pro Asn
[1218]	385 390 395 400
[1219]	Asn Ser Val Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
[1220]	405 410 415
[1221]	His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
[1222]	420 425 430
[1223]	Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val
[1224]	435 440 445
[1225]	Leu Thr Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Gly Asn Leu Asn Asp
[1226]	450 455 460
[1227]	Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His Gly Ser Gln Arg Val Lys Ser Lys
[1228]	465 470 475 480
[1229]	Ser Ala
[1230]	<210> 14
[1231]	<211> 456
[1232]	<212> PRT
[1233]	<213> 绿色鞭毛藻
[1234]	<400> 14
[1235]	Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile
[1236]	1 5 10 15
[1237]	Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser
[1238]	20 25 30
[1239]	Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
[1240]	35 40 45
[1241]	Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His
[1242]	50 55 60
[1243]	Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp
[1244]	65 70 75 80
[1245]	Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg
[1246]	85 90 95
[1247]	Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val
[1248]	100 105 110
[1249]	Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu
[1250]	115 120 125
[1251]	Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg
[1252]	130 135 140
[1253]	Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr
[1254]	145 150 155 160
[1255]	Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly
[1256]	165 170 175
[1257]	Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr
[1258]	180 185 190

[1259]	Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe	
[1260]	195	200 205
[1261]	Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His	
[1262]	210	215 220
[1263]	His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr	
[1264]	225	230 235 240
[1265]	Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg	
[1266]	245	250 255
[1267]	Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro	
[1268]	260	265 270
[1269]	Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro	
[1270]	275	280 285
[1271]	Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu	
[1272]	290	295 300
[1273]	Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe	
[1274]	305	310 315 320
[1275]	Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser	
[1276]	325	330 335
[1277]	Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp	
[1278]	340	345 350
[1279]	Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp	
[1280]	355	360 365
[1281]	His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met	
[1282]	370	375 380
[1283]	Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro	
[1284]	385	390 395 400
[1285]	Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys	
[1286]	405	410 415
[1287]	Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys	
[1288]	420	425 430
[1289]	Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His	
[1290]	435	440 445
[1291]	Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala	
[1292]	450	455
[1293]	<210> 15	
[1294]	<211> 894	
[1295]	<212> DNA	
[1296]	<213> 心形塔胞藻(Pyramimonas cordata)	
[1297]	<400> 15	
[1298]	atggagttcg ctcagcctct tgtggctatg gcacaggagc agtatgccgc aattgacgcg 60	
[1299]	gtggtagccc ctgcaatttt ctcagctacc gacagcatcg gttggggctct taagcccatt 120	
[1300]	agcagcgcga caaaggatct tcctctcgtt gagagtccga cgccgctcat actgagcctg 180	

- [1301] ttggcctatt ttgcgatcgt cggctctggg ctggtgtacc gcaaagtatt ccctcgcaca 240
- [1302] gtaaaggggc aagacccctt cctgctgaag gcgctcatgc ttgcgcacaa cgtgttcctc 300
- [1303] attggcctca gtctatacat gtgcttgaag cttgtctacg aggcttacgt caacaagtac 360
- [1304] tccttctggg gaaacgccta caaccccgca cagaccgaga tggcgaaggt catctggatt 420
- [1305] ttctacgtct ccaagatcta tgagttcatg gacacgttca tcatgctctt gaagggaac 480
- [1306] gtcaaccagg tctctttcct gcatgtgtac catcatggct ccatctctgg tatctggtgg 540
- [1307] atgatcacct acgtgcccc tggcgggtgac gcgtacttct cggcggcgct caactcgtgg 600
- [1308] gtgcacgtgt gcatgtacac gtactacttc atggcggcgg tgctgcccac ggacgagaag 660
- [1309] accaagcgca agtacctctg gtggggccgc tacctgacct agatgcagat gttccagttc 720
- [1310] ttcatgaacc tgctccaggc ggtctacctc ctctactcct ctagccccta cccaagttc 780
- [1311] atcgcccagc tgctggtggt gtacatggtc acgtgctga tgctcttcgg caacttctac 840
- [1312] tacatgaagc accacgcgag caagaagcag aagctggcca gcaagaagca gtag 894
- [1313] <210> 16
- [1314] <211> 870
- [1315] <212> DNA
- [1316] <213> 人工序列
- [1317] <220>
- [1318] <223> 用于在植物中表达心形塔胞藻6-延伸酶的密码子优化的开放阅读框(在3'端截短并且编码功能性延伸酶)(版本1)
- [1319] <400> 16
- [1320] atggaattcg ccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgtgc tatcgatgct 60
- [1321] gttgttgctc ctgctatctt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc 120
- [1322] tcttctgcta ctaaggactt gcctcttggt gagtctccta cacctctcat cttttctttg 180
- [1323] cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctggtttaca gaaaggtttt ccctagaacc 240
- [1324] gtgaagggac aagatccatt ctttttgaag gctcttatgc ttgctcacia cgtgttcctt 300
- [1325] atcggaacttt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggcttacgt taacaagtac 360
- [1326] tctttctggg gaaacgctta caacctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc 420
- [1327] ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaat 480
- [1328] gttaaccagg ttagcttctt tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctggtgg 540
- [1329] atgattactt acgtgctcc tgggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg 600
- [1330] gttcacgtgt gtatgtacac ctactatttt atggctgccg tgcttcctaa ggacgagaaa 660
- [1331] actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aaatgcagat gttccagttc 720
- [1332] ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctt ctctactctt catctcctta ccctaagttt 780
- [1333] atcgctcagc tctcgtggt gtacatggtt actcttctca tgcttttcgg aaacttctac 840
- [1334] tacatgaagc accacgctag caagtgatga 870
- [1335] <210> 17
- [1336] <211> 870
- [1337] <212> DNA
- [1338] <213> 人工序列
- [1339] <220>
- [1340] <223> 用于在植物中表达心形塔胞藻6-延伸酶的密码子优化的开放阅读框(在3'端截短并且编码功能性延伸酶)(版本2)

- [1341] <400> 17
- [1342] atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgtgc tatcgatgct 60
- [1343] gttgttgctc ctgctatctt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc 120
- [1344] tcttctgcta ctaaggactt gcctcttggt gagtctccta cacctctcat cctttctttg 180
- [1345] cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctcgtttaca gaaaggtttt ccctagaacc 240
- [1346] gtgaaggagc aagatccatt ccttttgaag gctcttatgc ttgctcaca cgtgttcctt 300
- [1347] atcggaacttt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggcttacgt taacaagtac 360
- [1348] tctttctggg gaaacgctta caaccctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc 420
- [1349] ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaat 480
- [1350] gttaaccagg ttagcttcct tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctggtgg 540
- [1351] atgattactt acgtgctcc tgggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg 600
- [1352] gttcacgtgt gtatgtacac ctactatctt atggctgccg tgcctcctaa ggacgagaaa 660
- [1353] actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aaatgcagat gttccagttc 720
- [1354] ttcatgaacc ttctccagge tgtttacctt ctctactctt catctcctta ccctaagttt 780
- [1355] atcgctcagc tectcggtgt gtacatggtt actcttctca tgcctttcgg aaacttctac 840
- [1356] tacatgaagc accacgctag caagtgatga 870
- [1357] <210> 18
- [1358] <211> 870
- [1359] <212> DNA
- [1360] <213> 人工序列
- [1361] <220>
- [1362] <223> 用于在植物中表达心形塔胞藻6-延伸酶的密码子优化的开放阅读框(在3'端截短并且编码功能性延伸酶)(版本3)
- [1363] <400> 18
- [1364] atggaatttg ctcaacctct cgttgctatg gctcaagagc agtacgtgc tategatgct 60
- [1365] gttgttgctc ctgctatctt ctctgctacc gactctattg gatggggact caagcctatc 120
- [1366] tcttctgcta ctaaggatct ccctctcgtt gaatctccta cccctcttat cctttctctc 180
- [1367] ctcgcttact tcgctatcgt tggttctgga ctcgtttacc gtaaagtgtt ccctagaacc 240
- [1368] gttaaggagc aggatccttt ccttctcaag gctcttatgc tcgctcaca cgttttcctt 300
- [1369] atcggaactca gcctttacat gtgcctcaag ctcgtttacg aggcttacgt gaacaagtac 360
- [1370] tccttctggg gaaacgctta caaccctgct caaaccgaga tggctaaggt gatctggatc 420
- [1371] ttctacgtgt ccaagatcta cgagttcatg gacaccttca tcatgcttct caagggaac 480
- [1372] gttaaccagg ttctcttcct ccatgtttac caccacggat ctatctctgg aatctggtgg 540
- [1373] atgatcactt atgctgctcc aggtggagat gcttacttct ctgctgctct caactcttgg 600
- [1374] gttcatgtgt gcatgtacac ctactacttc atggctgctg ttcttcctaa ggacgaaaag 660
- [1375] accaagagaa agtacctttg gtggggaaga taccttacc agatgcaat gttccagttc 720
- [1376] ttcatgaacc ttctccagge tgtttactc ctctactctt cttctcctta ccctaagttc 780
- [1377] attgctcaac tectcggtgt ttacatggtt accctctca tgcctttcgg aaacttctac 840
- [1378] tacatgaagc accacgcttc taagtataa 870
- [1379] <210> 19
- [1380] <211> 297
- [1381] <212> PRT

[1382]	<213> 心形塔胞藻																		
[1383]	<400> 19																		
[1384]	Met	Glu	Phe	Ala	Gln	Pro	Leu	Val	Ala	Met	Ala	Gln	Glu	Gln	Tyr	Ala			
[1385]	1				5					10					15				
[1386]	Ala	Ile	Asp	Ala	Val	Val	Ala	Pro	Ala	Ile	Phe	Ser	Ala	Thr	Asp	Ser			
[1387]					20					25					30				
[1388]	Ile	Gly	Trp	Gly	Leu	Lys	Pro	Ile	Ser	Ser	Ala	Thr	Lys	Asp	Leu	Pro			
[1389]					35					40					45				
[1390]	Leu	Val	Glu	Ser	Pro	Thr	Pro	Leu	Ile	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Tyr	Phe			
[1391]		50						55					60						
[1392]	Ala	Ile	Val	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Tyr	Arg	Lys	Val	Phe	Pro	Arg	Thr			
[1393]	65						70				75					80			
[1394]	Val	Lys	Gly	Gln	Asp	Pro	Phe	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Met	Leu	Ala	His			
[1395]					85					90					95				
[1396]	Asn	Val	Phe	Leu	Ile	Gly	Leu	Ser	Leu	Tyr	Met	Cys	Leu	Lys	Leu	Val			
[1397]					100					105					110				
[1398]	Tyr	Glu	Ala	Tyr	Val	Asn	Lys	Tyr	Ser	Phe	Trp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Asn			
[1399]					115					120					125				
[1400]	Pro	Ala	Gln	Thr	Glu	Met	Ala	Lys	Val	Ile	Trp	Ile	Phe	Tyr	Val	Ser			
[1401]		130						135					140						
[1402]	Lys	Ile	Tyr	Glu	Phe	Met	Asp	Thr	Phe	Ile	Met	Leu	Leu	Lys	Gly	Asn			
[1403]	145					150					155					160			
[1404]	Val	Asn	Gln	Val	Ser	Phe	Leu	His	Val	Tyr	His	His	Gly	Ser	Ile	Ser			
[1405]					165					170					175				
[1406]	Gly	Ile	Trp	Trp	Met	Ile	Thr	Tyr	Ala	Ala	Pro	Gly	Gly	Asp	Ala	Tyr			
[1407]					180					185					190				
[1408]	Phe	Ser	Ala	Ala	Leu	Asn	Ser	Trp	Val	His	Val	Cys	Met	Tyr	Thr	Tyr			
[1409]		195						200					205						
[1410]	Tyr	Phe	Met	Ala	Ala	Val	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Lys	Thr	Lys	Arg	Lys			
[1411]		210						215					220						
[1412]	Tyr	Leu	Trp	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu	Thr	Gln	Met	Gln	Met	Phe	Gln	Phe			
[1413]	225					230					235				240				
[1414]	Phe	Met	Asn	Leu	Leu	Gln	Ala	Val	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Ser	Ser	Ser	Pro			
[1415]					245					250					255				
[1416]	Tyr	Pro	Lys	Phe	Ile	Ala	Gln	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Met	Val	Thr	Leu			
[1417]					260					265					270				
[1418]	Leu	Met	Leu	Phe	Gly	Asn	Phe	Tyr	Tyr	Met	Lys	His	His	Ala	Ser	Lys			
[1419]					275					280					285				
[1420]	Lys	Gln	Lys	Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Gln										
[1421]		290						295											
[1422]	<210> 20																		
[1423]	<211> 288																		

[1424]	<212>	PRT
[1425]	<213>	心形塔胞藻
[1426]	<400>	20
[1427]	Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala	
[1428]	1	5 10 15
[1429]	Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser	
[1430]	20	25 30
[1431]	Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro	
[1432]	35	40 45
[1433]	Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe	
[1434]	50	55 60
[1435]	Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr	
[1436]	65	70 75 80
[1437]	Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His	
[1438]	85	90 95
[1439]	Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val	
[1440]	100	105 110
[1441]	Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn	
[1442]	115	120 125
[1443]	Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser	
[1444]	130	135 140
[1445]	Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn	
[1446]	145	150 155 160
[1447]	Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser	
[1448]	165	170 175
[1449]	Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr	
[1450]	180	185 190
[1451]	Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr	
[1452]	195	200 205
[1453]	Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys	
[1454]	210	215 220
[1455]	Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe	
[1456]	225	230 235 240
[1457]	Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro	
[1458]	245	250 255
[1459]	Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu	
[1460]	260	265 270
[1461]	Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys	
[1462]	275	280 285
[1463]	<210>	21
[1464]	<211>	1278
[1465]	<212>	DNA

[1466]	<213> 盐生巴夫藻 ( <i>Pavlova salina</i> )
[1467]	<400> 21
[1468]	atgccgccgc gcgatagcta ctcgtagcc gcccgccgt cggcccagct gcacgaggtc 60
[1469]	gataccccgc aggagcatga taagaaggag ctcgatcatc gtgaccgcgc gtacgacgtg 120
[1470]	accaactttg tgaagcgcca cccgggtggc aagatcatcg cataccaggt tggcacagat 180
[1471]	gcgacggacg cgtacaagca gttccatgtg cggcttgcca aggcggacaa gatgctcaag 240
[1472]	tcgctgcctt cgcgccgggt gcacaagggc tactcgcccc gccgcgtga cctcattgcc 300
[1473]	gacttccagg agttcaccaa gcagctggag gcggagggca tgtttgagcc gtcgctgccg 360
[1474]	cacgtggcat accgcctggc ggaggtgatc gcgatgcacg tggccggcgc cgcgctcatc 420
[1475]	tggcacgggt acaccttcgc gggcattgcc atgctcggcg ttgtgcaggg ccgctgcggc 480
[1476]	tggctcatgc acgaggcgcg cactactcgc ctacagggca acattgcttt tgaccgtgcc 540
[1477]	atccaagtcg cgtgctacgg ctttggctgc ggcatgtcgg gcgcgtggtg gcgcaaccag 600
[1478]	cacaacaagc accacgcgac gccgcagaag ttgcagcacg acgtcgacct cgacaccctc 660
[1479]	ccgctcgtcg cttccacga gcgcatagcc gccaaagtga agagccccgc gatgaaggcg 720
[1480]	tggcttagta tgcaggcgaa gctcttcgcg ccagtacca cgctgctggt cgcgctgggc 780
[1481]	tggcagctgt acctgcaccc gcgccatatg ctgcgcacca agcactacga cgagctcgcg 840
[1482]	atgctcggca ttcgctacgg cttgtcggc tacctcgcgg cgaactacgg cgcgggttac 900
[1483]	gtgctcgcgt gctacctgct gtacgtcag ctcggcgcca tgtacatctt ctgcaacttt 960
[1484]	gccgtgtcgc acacacacct gccggtgtc gagcctaacg agcacgcaac gtgggtggag 1020
[1485]	tacgccgca accacacgac caactgctcg ccctcgtggt ggtgcgactg gtgatgtcg 1080
[1486]	tacctcaact accagatga gcaccacctc taccgtcca tgccgcagtt ccgccaccg 1140
[1487]	aagattgcgc cgcgggtgaa gcagctcttc gagaagcacg gcctgcacta cgacgtgcgt 1200
[1488]	ggctacttcg aggccatggc ggacacgttt gccaaccttg acaacgtcgc gcacgcgccg 1260
[1489]	gagaagaaga tgcagtga 1278
[1490]	<210> 22
[1491]	<211> 1281
[1492]	<212> DNA
[1493]	<213> 人工序列
[1494]	<220>
[1495]	<223> 用于在植物中表达盐生巴夫藻5-去饱和酶的密码子优化的开放阅读框 (版本1)
[1496]	<400> 22
[1497]	atgcctccaa gggactctta ctcttatgct gtcctcctt ctgctcaact tcacgaagtt 60
[1498]	gatactcctc aagagcacga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtt 120
[1499]	accaacttcg ttaagagaca ccctgggtga aagatcattg cttaccaagt tggaactgat 180
[1500]	gctaccgatg cttacaagca gttccatgtt agatctgcta aggctgacaa gatgcttaag 240
[1501]	tctcttcctt ctcgctcgtg tcacaaggga tactctcaa gaagggtga tcttatcgct 300
[1502]	gatttccaag agttcaccaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgagcc ttctcttctc 360
[1503]	catgttgctt acagacttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctggtgc tgctcttatc 420
[1504]	tggcatggat acacttgcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgtgga 480
[1505]	tggcttatgc atgagggtgg acattactct ctactggaa acattgcttt cgacagagct 540
[1506]	atccaagttg cttgttacgg acttggatgt ggaatgtctg gtgcttggtg gcgtaaccag 600
[1507]	cataacaagc accatgctac tctcaaaag cttcagcacg atgttgatct tgataccctt 660

[1508]	cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaaggtta agtctcctgc tatgaaggct	720
[1509]	tggctttcta tgcaagctaa gcttttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttgga	780
[1510]	tggcagcttt accttcatcc tagacacatg ctcaggacta agcactacga tgagcttgct	840
[1511]	atgctcggaa tcagatacgg acttggtgga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac	900
[1512]	gttctcgctt gttaccttct ttacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc	960
[1513]	gctgtttctc atactcacct ccctgttggt gaggcctaacg agcatgctac ttgggttgag	1020
[1514]	tacgtgcta accacactac taactgttct ccatcttggt ggtgtgattg gtggatgtct	1080
[1515]	taccttaact accagatcga gcaccacctt tacccttcta tgcctcaatt cagacacct	1140
[1516]	aagatcgctc ctagagttaa gcagcttttc gagaagcacg gacttcacta cgatgttaga	1200
[1517]	ggatacttcg aggctatggc tgatactttc gctaaccttg ataacgttgc ccatgctcct	1260
[1518]	gagaagaaaa tgcagtaatg a	1281
[1519]	<210>	23
[1520]	<211>	1281
[1521]	<212>	DNA
[1522]	<213>	人工序列
[1523]	<220>	
[1524]	<223>	用于在植物中表达盐生巴夫藻5-去饱和酶的密码子优化的开放阅读框(版本2)
[1525]	<400>	23
[1526]	atgcctccta gggactctta ctcttacgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaggtt	60
[1527]	gacactcctc aagagcacga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtg	120
[1528]	accaacttcg ttaagagaca ccctgggtga aagatcattg cttaccaagt gggaactgat	180
[1529]	gctaccgatg cttacaagca gttccatgtg agatctgcta aggctgacaa gatgctcaag	240
[1530]	tctctccctt ctagacctgt tcacaaggga tactctccta gaagagctga tcttatcgct	300
[1531]	gacttccaag agttcactaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgaacc ttctctccct	360
[1532]	catgttgctt accgtcttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctggtgc tgctcttatt	420
[1533]	tggcacggat acactttcgc tggaatcgct atgcttgag ttgttcaggg aagatgcgga	480
[1534]	tggcttatgc atgagggtgg aactactct cttaccggaa acattgcttt cgatagggt	540
[1535]	atccaagttg cttgttacgg acttggtgac ggaatgtctg gtgcttggtg gagaaaccag	600
[1536]	cataacaagc accatgctac tectcaaaag ctccagcacg atgttgatct tgataccctc	660
[1537]	cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaaggtta agtctcctgc tatgaaggct	720
[1538]	tggctctcca tgcaagctaa actcttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttgga	780
[1539]	tggcagcttt accttcaccc tagacacatg ctcagaacta agcactacga cgagcttgct	840
[1540]	atgcttggtg tcagatacgg acttggtgga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac	900
[1541]	gttcttgctt gctaccttct ctacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc	960
[1542]	gctgtttctc aactcatct ccctgttggt gaggcctaacg agcatgctac ttgggttgag	1020
[1543]	tacgtgcta accacactac taactgctct ccatcttggt ggtgtgattg gtggatgagc	1080
[1544]	tacctcaact accagatcga gcatcacctt tacccttcta tgcctcagtt caggcatcct	1140
[1545]	aagatcgctc ctagagttaa gcaactcttc gagaagcacg gacttcacta cgatgtgcgt	1200
[1546]	ggatacttcg aggctatggc tgatactttc gctaacctcg ataacgttgc tcatgctcct	1260
[1547]	gagaagaaaa tgcaatgatg a	1281
[1548]	<210>	24
[1549]	<211>	425



[1550]	<212> PRT															
[1551]	<213> 盐生巴夫藻															
[1552]	<400> 24															
[1553]	Met	Pro	Pro	Arg	Asp	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Ala	Pro	Pro	Ser	Ala	Gln
[1554]	1				5					10					15	
[1555]	Leu	His	Glu	Val	Asp	Thr	Pro	Gln	Glu	His	Asp	Lys	Lys	Glu	Leu	Val
[1556]				20					25					30		
[1557]	Ile	Gly	Asp	Arg	Ala	Tyr	Asp	Val	Thr	Asn	Phe	Val	Lys	Arg	His	Pro
[1558]			35					40					45			
[1559]	Gly	Gly	Lys	Ile	Ile	Ala	Tyr	Gln	Val	Gly	Thr	Asp	Ala	Thr	Asp	Ala
[1560]		50					55				60					
[1561]	Tyr	Lys	Gln	Phe	His	Val	Arg	Ser	Ala	Lys	Ala	Asp	Lys	Met	Leu	Lys
[1562]	65				70					75				80		
[1563]	Ser	Leu	Pro	Ser	Arg	Pro	Val	His	Lys	Gly	Tyr	Ser	Pro	Arg	Arg	Ala
[1564]				85					90					95		
[1565]	Asp	Leu	Ile	Ala	Asp	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr	Lys	Gln	Leu	Glu	Ala	Glu
[1566]			100						105					110		
[1567]	Gly	Met	Phe	Glu	Pro	Ser	Leu	Pro	His	Val	Ala	Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu
[1568]		115						120					125			
[1569]	Val	Ile	Ala	Met	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Ile	Trp	His	Gly	Tyr
[1570]		130					135					140				
[1571]	Thr	Phe	Ala	Gly	Ile	Ala	Met	Leu	Gly	Val	Val	Gln	Gly	Arg	Cys	Gly
[1572]	145				150					155				160		
[1573]	Trp	Leu	Met	His	Glu	Gly	Gly	His	Tyr	Ser	Leu	Thr	Gly	Asn	Ile	Ala
[1574]				165					170					175		
[1575]	Phe	Asp	Arg	Ala	Ile	Gln	Val	Ala	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Cys	Gly	Met
[1576]			180					185						190		
[1577]	Ser	Gly	Ala	Trp	Trp	Arg	Asn	Gln	His	Asn	Lys	His	His	Ala	Thr	Pro
[1578]		195					200						205			
[1579]	Gln	Lys	Leu	Gln	His	Asp	Val	Asp	Leu	Asp	Thr	Leu	Pro	Leu	Val	Ala
[1580]		210				215						220				
[1581]	Phe	His	Glu	Arg	Ile	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Ser	Pro	Ala	Met	Lys	Ala
[1582]	225				230					235				240		
[1583]	Trp	Leu	Ser	Met	Gln	Ala	Lys	Leu	Phe	Ala	Pro	Val	Thr	Thr	Leu	Leu
[1584]				245					250					255		
[1585]	Val	Ala	Leu	Gly	Trp	Gln	Leu	Tyr	Leu	His	Pro	Arg	His	Met	Leu	Arg
[1586]			260					265					270			
[1587]	Thr	Lys	His	Tyr	Asp	Glu	Leu	Ala	Met	Leu	Gly	Ile	Arg	Tyr	Gly	Leu
[1588]			275					280					285			
[1589]	Val	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ala	Asn	Tyr	Gly	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	Ala	Cys
[1590]		290					295					300				
[1591]	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Val	Gln	Leu	Gly	Ala	Met	Tyr	Ile	Phe	Cys	Asn	Phe

[1592]	305	310	315	320
[1593]	Ala Val Ser His Thr His Leu Pro Val Val Glu Pro Asn Glu His Ala			
[1594]		325	330	335
[1595]	Thr Trp Val Glu Tyr Ala Ala Asn His Thr Thr Asn Cys Ser Pro Ser			
[1596]		340	345	350
[1597]	Trp Trp Cys Asp Trp Trp Met Ser Tyr Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His			
[1598]		355	360	365
[1599]	His Leu Tyr Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Pro Lys Ile Ala Pro			
[1600]		370	375	380
[1601]	Arg Val Lys Gln Leu Phe Glu Lys His Gly Leu His Tyr Asp Val Arg			
[1602]		385	390	395
[1603]	Gly Tyr Phe Glu Ala Met Ala Asp Thr Phe Ala Asn Leu Asp Asn Val			
[1604]		405	410	415
[1605]	Ala His Ala Pro Glu Lys Lys Met Gln			
[1606]		420	425	
[1607]	<210> 25			
[1608]	<211> 1329			
[1609]	<212> DNA			
[1610]	<213> 心形塔胞藻			
[1611]	<400> 25			
[1612]	atgggaaagg gaggcaatgc tagcgtcctt actgcgaaga aggaggtgtt gatcgagggg	60		
[1613]	aagttttacg atgtcaccca cttcaggcac cccggtgggt cgatcatcaa gtttctctcg	120		
[1614]	ggttctggtg ctgacccac cgcttcttac cgcgagttcc acgttaggtc agcgaaggca	180		
[1615]	gacaagttct tgaagacgct gccctcccgc gaagccactc cccaggagct gaagcaggcg	240		
[1616]	gttgagttct ccaagctcaa cccgccctcc gcggagagtg cctctgctcc cctgaccgac	300		
[1617]	cttgccaagg tggaagcgt gaacaaggac ttcgaggtt tccgtgagca gctcattcag	360		
[1618]	gagggttct ttaagccaa tatcccgcat gtggtcaagc gcatcacgga agtcgtggcg	420		
[1619]	atgatggccg tagcctcctg gatgatggtg cagaccaacg ctcttgtgtg gaccctcgga	480		
[1620]	gttctgatcc gcggcattgc acagggccg tgcggttggc ttatgcacga gggcgccac	540		
[1621]	tatagtctta ctgggaagat ctccattgat aggcgtctgc aggagtcaat ttacggattc	600		
[1622]	ggctgtggaa tgtccggcgc ctggtggcgc aaccagcaca acaagcacca cgcaacccca	660		
[1623]	cagaagctgc agcatgacgt cgacctggag acccttctc tgatggcttt caacaacgct	720		
[1624]	gttaccgata gacgcaaggt gaagcctggt agtctccagg ctctgtggct caagtaccag	780		
[1625]	gccttctct tcttccccgt gacctccctt ctggctggcc tcggttgga caccgtctc	840		
[1626]	caccccaggc acagcttgcg caccaagcac tatttcgagc tgctctgcat ggctgctcgt	900		
[1627]	tacgcgagtt tcgctgctct tttcgctccc aagtacggac ttgcaggagc tgccgggctc	960		
[1628]	tacctgcca cttcgctgt cgggtgcaac tatattttca tcaacttctc ggtctctcac	1020		
[1629]	actcacctgc ccgtgagcgg tgcgagcgag tacctgcatt gggctgtgta ttcgccatc	1080		
[1630]	cacaccacta acatcaaac cagcatgctg tgcgattggt ggatgtcatt cctcaacttc	1140		
[1631]	cagatcgagc atcacctgtt ccttcaatg cccagttcc gccacaagat tatctccccg	1200		
[1632]	cgtgtaaagg cttgtttga gaagcacggt cttgtgtatg atgtgcgccc ctattggggg	1260		
[1633]	gccatggctg acaccttcaa gaacttgaat gacgttgga ctcacgcatc tcaactcaag	1320		

[1634]	gcgcactag 1329																		
[1635]	<210> 26																		
[1636]	<211> 442																		
[1637]	<212> PRT																		
[1638]	<213> 心形塔胞藻																		
[1639]	<400> 26																		
[1640]	Met	Gly	Lys	Gly	Gly	Asn	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Ala	Lys	Lys	Glu	Val			
[1641]	1				5					10					15				
[1642]	Leu	Ile	Glu	Gly	Lys	Phe	Tyr	Asp	Val	Thr	Asp	Phe	Arg	His	Pro	Gly			
[1643]					20					25					30				
[1644]	Gly	Ser	Ile	Ile	Lys	Phe	Leu	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	Ala			
[1645]					35					40					45				
[1646]	Ser	Tyr	Arg	Glu	Phe	His	Val	Arg	Ser	Ala	Lys	Ala	Asp	Lys	Phe	Leu			
[1647]					50					55					60				
[1648]	Lys	Thr	Leu	Pro	Ser	Arg	Glu	Ala	Thr	Pro	Gln	Glu	Leu	Lys	Gln	Ala			
[1649]	65					70					75					80			
[1650]	Val	Glu	Phe	Ser	Lys	Leu	Asn	Pro	Pro	Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Ser	Ala			
[1651]					85						90					95			
[1652]	Pro	Leu	Thr	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	Leu	Asn	Lys	Asp	Phe	Glu			
[1653]					100						105					110			
[1654]	Ala	Phe	Arg	Glu	Gln	Leu	Ile	Gln	Glu	Gly	Phe	Phe	Lys	Pro	Asn	Ile			
[1655]					115						120					125			
[1656]	Pro	His	Val	Val	Lys	Arg	Ile	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Met	Met	Ala	Val			
[1657]					130						135					140			
[1658]	Ala	Ser	Trp	Met	Met	Val	Gln	Thr	Asn	Ala	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Gly			
[1659]	145					150					155					160			
[1660]	Val	Leu	Ile	Arg	Gly	Ile	Ala	Gln	Gly	Arg	Cys	Gly	Trp	Leu	Met	His			
[1661]					165						170					175			
[1662]	Glu	Gly	Gly	His	Tyr	Ser	Leu	Thr	Gly	Lys	Ile	Ser	Ile	Asp	Arg	Arg			
[1663]					180						185					190			
[1664]	Leu	Gln	Glu	Ser	Ile	Tyr	Gly	Phe	Gly	Cys	Gly	Met	Ser	Gly	Ala	Trp			
[1665]					195						200					205			
[1666]	Trp	Arg	Asn	Gln	His	Asn	Lys	His	His	Ala	Thr	Pro	Gln	Lys	Leu	Gln			
[1667]					210						215					220			
[1668]	His	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Thr	Leu	Pro	Leu	Met	Ala	Phe	Asn	Asn	Ala			
[1669]	225					230					235					240			
[1670]	Val	Thr	Asp	Arg	Arg	Lys	Val	Lys	Pro	Gly	Ser	Leu	Gln	Ala	Leu	Trp			
[1671]					245						250					255			
[1672]	Leu	Lys	Tyr	Gln	Ala	Phe	Leu	Phe	Phe	Pro	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Val			
[1673]					260						265					270			
[1674]	Gly	Leu	Gly	Trp	Thr	Thr	Val	Leu	His	Pro	Arg	His	Ser	Leu	Arg	Thr			
[1675]					275						280					285			

[1676]	Lys His Tyr Phe Glu Leu Leu Cys Met Ala Ala Arg Tyr Ala Ser Phe	
[1677]	290	300
[1678]	Ala Ala Leu Phe Ala Pro Lys Tyr Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu	
[1679]	305	315
[1680]	Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Val Gly Cys Asn Tyr Ile Phe Ile Asn Phe	
[1681]	325	330
[1682]	Ser Val Ser His Thr His Leu Pro Val Ser Gly Ala Ser Glu Tyr Leu	
[1683]	340	350
[1684]	His Trp Val Val Tyr Ser Ala Ile His Thr Thr Asn Ile Lys Ser Ser	
[1685]	355	365
[1686]	Met Leu Cys Asp Trp Trp Met Ser Phe Leu Asn Phe Gln Ile Glu His	
[1687]	370	380
[1688]	His Leu Phe Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Lys Ile Ile Ser Pro	
[1689]	385	400
[1690]	Arg Val Lys Ala Leu Phe Glu Lys His Gly Leu Val Tyr Asp Val Arg	
[1691]	405	415
[1692]	Pro Tyr Trp Gly Ala Met Ala Asp Thr Phe Lys Asn Leu Asn Asp Val	
[1693]	420	430
[1694]	Gly Thr His Ala Ser His Ser Lys Ala His	
[1695]	435	440
[1696]	<210> 27	
[1697]	<211> 804	
[1698]	<212> DNA	
[1699]	<213> 心形塔胞藻	
[1700]	<400> 27	
[1701]	atggcgctcta ttgcgattcc ggctgcgctg gcagggactc ttggttatgt gacgtacaat	60
[1702]	gtcgcaaacc cagatattcc tgcattccgag aaggtgcctg cttactttat gcaggctcgag	120
[1703]	tattgggggc caacgattgg gaccatcggg tatcttctgt tcatctactt tggtaaacgg	180
[1704]	attatgcaaa acaggagcca gccgtttggc ctgaagaacg ctatgctggt gtacaacttc	240
[1705]	tatcagactt tcttcaactc gtactgcata tacctttttg tcacgtcgca ccgcgctcag	300
[1706]	gggctgaaag tttggggaaa catccccgat atgactgcca acagctgggg gatctcacag	360
[1707]	gtgatctggc tgcactacaa caacaagtac gttgagctgc tggacacgtt cttcatggtc	420
[1708]	atgcgcaaga agtttgacca gctttcgttc ctgcacattt accatcatac cctgttgatc	480
[1709]	tggtcttggg tcgtgggtgat gaaattggag cccgttgggg actgctactt tggctctagc	540
[1710]	gtcaacacgt ttgtgcacgt cattatgtac tcgtactatg gccttgccgc gctcgggggtg	600
[1711]	aattgcttct ggaagaagta cattacgcag attcagatgc tgcagttctg tatctgcgct	660
[1712]	tcgcactcga tttataccgc ctatgtgcag aacaccgcgt tctggttgcc ttacttgcag	720
[1713]	ctgtgggtga tggatgaacat gtctgtgttg ttccccaact tctatcgcaa gcgctacaag	780
[1714]	agcaagggtg ccaagaagca gtaa	804
[1715]	<210> 28	
[1716]	<211> 807	
[1717]	<212> DNA	

- [1718] <213> 人工序列  
[1719] <220>  
[1720] <223> 用于在植物中表达心形塔胞藻5-延伸酶的密码子优化的开放阅读框 (版本1)  
[1721] <400> 28  
[1722] atggcctcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat 60  
[1723] gtggctaacc ctgatatccc agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcaggttgag 120  
[1724] tactggggac ctactatcgg aactattgga tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt 180  
[1725] atcatgcaga acagatctca acctttcggg ctcaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc 240  
[1726] taccagacct tcttcaacag ctactgcacg taccttttcg ttactttctca tagggctcag 300  
[1727] ggacttaagg tttggggaaa catccctgat atgactgcta actcttgggg aatctctcag 360  
[1728] gttatctggc ttactacaa caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatgggtg 420  
[1729] atgaggaaga agttcgacca gctttcttct cttcacatct accaccacac tcttctcatc 480  
[1730] tggctcatggt tcgttggtat gaagcttgag cctgttgag attgctactt cggatcttct 540  
[1731] gttaacacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttgagatt 600  
[1732] aactgtttct ggaagaagta catcaccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct 660  
[1733] tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aataccgctt tctggttcc ttaccttcaa 720  
[1734] ctctgggtta tggatgaacat gttcgttctc ttcccaact tctaccgtaa gaggtacaag 780  
[1735] tctaagggtg ctaagaagca gtgataa 807  
[1736] <210> 29  
[1737] <211> 867  
[1738] <212> DNA  
[1739] <213> 人工序列  
[1740] <220>  
[1741] <223> 用于在植物中表达心形塔胞藻5-延伸酶的密码子优化的开放阅读框 (版本2)  
[1742] <400> 29  
[1743] atggaatttg ctcaacctct cgttgctatg gctcaagagc agtacgctgc tatcgatgct 60  
[1744] gttgttgctc ctgctatctt ctctgctacc gactctattg gatggggact caagcctatc 120  
[1745] tcttctgcta ctaaggatct ccctctcggt gaatctccta cccctcttat cctttctctc 180  
[1746] ctcgcttact tcgctatcgt tggttctgga ctggtttacc gtaaagtgtt ccctagaacc 240  
[1747] gttaagggaac aggatccttt ccttctcaag gctcttatgc tcgctcaca cgttttctct 300  
[1748] atcggactca gcctttacat gtgcctcaag ctggtttacg aggcttacgt gaacaagtac 360  
[1749] tccttctggg gaaacgctta caacctgct caaacgaga tggctaaggt gatctggatc 420  
[1750] ttctacgtgt ccaagatcta cgagttcatg gacaccttca tcatgcttct caagggaac 480  
[1751] gttaaccagg tttccttctt ccatgtttac caccacggat ctatctctgg aatctggttg 540  
[1752] atgatcactt atgctgctcc aggtggagat gcttacttct ctgctgctct caactcttgg 600  
[1753] gttcatgtgt gcatgtacac ctactacttc atggctgctg ttcttcctaa ggacgaaaag 660  
[1754] accaagagaa agtacctttg gtgggggaaga taccttacc agatgcaaat gttccagttc 720  
[1755] ttcatgaacc ttctccagge tgtttacctc ctctactctt cttctcctta ccctaagttc 780  
[1756] attgctcaac tctcgttgt ttacatggtt accctctca tgcttttcgg aaacttctac 840  
[1757] tacatgaagc accacgcttc taagtga 867  
[1758] <210> 30  
[1759] <211> 807

[1760]	<212> DNA
[1761]	<213> 人工序列
[1762]	<220>
[1763]	<223> 用于在植物中表达心形塔胞藻5-延伸酶的密码子优化的开放阅读框 (版本3)
[1764]	<400> 30
[1765]	atggcttcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt gacctacaac 60
[1766]	gtggctaacc ctgatatccc tgcttctgag aaggttccag cttacttcat gcaagtggag 120
[1767]	tactggggac ctactatcgg aactatcggg tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt 180
[1768]	atcatgcaaa acagaagcca gcctttcggg cttagaacg ctatgctcgt gtacaacttc 240
[1769]	taccagacct tcttcaacag ctactgcacg tacctcttcg ttacctctca tagggctcag 300
[1770]	ggacttaaag tttggggaaa catccctgat atgaccgcta actcttgggg aatctctcag 360
[1771]	gttatctggc tccactacaa caacaagtac gtggagcttc tcgatacctt cttcatgggtg 420
[1772]	atgaggaaga agttcgacca gctttcttct cttcacatct accaccacac tcttctcacc 480
[1773]	tggtcatggt tcgtgggttat gaagctcgag cctgttggag attgctactt cggatctagc 540
[1774]	gttaacacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt 600
[1775]	aactgcttct ggaagaagta catcaccag atccagatgc ttcagttctg tatctgcgct 660
[1776]	tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aacactgctt tctggcttcc ttaccttcag 720
[1777]	ctctgggtga tggtaacat gtctgtgctc ttcgctaact tctaccgtaa aaggtacaag 780
[1778]	agcaagggtg ctaagaagca gtgataa 807
[1779]	<210> 31
[1780]	<211> 267
[1781]	<212> PRT
[1782]	<213> 心形塔胞藻
[1783]	<400> 31
[1784]	Met Ala Ser Ile Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu Gly Tyr
[1785]	1 5 10 15
[1786]	Val Thr Tyr Asn Val Ala Asn Pro Asp Ile Pro Ala Ser Glu Lys Val
[1787]	20 25 30
[1788]	Pro Ala Tyr Phe Met Gln Val Glu Tyr Trp Gly Pro Thr Ile Gly Thr
[1789]	35 40 45
[1790]	Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Ile Tyr Phe Gly Lys Arg Ile Met Gln Asn
[1791]	50 55 60
[1792]	Arg Ser Gln Pro Phe Gly Leu Lys Asn Ala Met Leu Val Tyr Asn Phe
[1793]	65 70 75 80
[1794]	Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Ser Tyr Cys Ile Tyr Leu Phe Val Thr Ser
[1795]	85 90 95
[1796]	His Arg Ala Gln Gly Leu Lys Val Trp Gly Asn Ile Pro Asp Met Thr
[1797]	100 105 110
[1798]	Ala Asn Ser Trp Gly Ile Ser Gln Val Ile Trp Leu His Tyr Asn Asn
[1799]	115 120 125
[1800]	Lys Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Phe Phe Met Val Met Arg Lys Lys
[1801]	130 135 140

[1802]	Phe Asp Gln Leu Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Leu Leu Ile	
[1803]	145	150 155 160
[1804]	Trp Ser Trp Phe Val Val Met Lys Leu Glu Pro Val Gly Asp Cys Tyr	
[1805]	165	170 175
[1806]	Phe Gly Ser Ser Val Asn Thr Phe Val His Val Ile Met Tyr Ser Tyr	
[1807]	180	185 190
[1808]	Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val Asn Cys Phe Trp Lys Lys Tyr Ile	
[1809]	195	200 205
[1810]	Thr Gln Ile Gln Met Leu Gln Phe Cys Ile Cys Ala Ser His Ser Ile	
[1811]	210	215 220
[1812]	Tyr Thr Ala Tyr Val Gln Asn Thr Ala Phe Trp Leu Pro Tyr Leu Gln	
[1813]	225	230 235 240
[1814]	Leu Trp Val Met Val Asn Met Phe Val Leu Phe Ala Asn Phe Tyr Arg	
[1815]	245	250 255
[1816]	Lys Arg Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Lys Lys Gln	
[1817]	260	265
[1818]	<210> 32	
[1819]	<211> 792	
[1820]	<212> DNA	
[1821]	<213> 球等鞭金藻 (Isochrysis galbana)	
[1822]	<400> 32	
[1823]	atggccctcg caaacgacgc gggagagcgc atctgggcgg ctgtgaccga cccggaatc	60
[1824]	ctcattggca ctttctcgta cttgctactc aaaccgctgc tccgcaattc cgggctgggt	120
[1825]	gatgagaaga agggcgcata caggacgtcc atgatctggt acaacgttct gctggcgctc	180
[1826]	ttctctgcgc tgagcttcta cgtgacggcg accgccctcg gctgggacta tggtagggc	240
[1827]	gcgtggctgc gcaggcaaac cggcgacaca ccgcagccgc tcttccagt cccgtccccg	300
[1828]	gtttgggact cgaagctctt cacatggacc gccaaaggcat tctattactc caagtacgtg	360
[1829]	gagtacctcg acacggcctg gctggtgctc aagggcaaga ggggtctcctt tctccaggcc	420
[1830]	ttccaccact ttggcgcgcc gtgggatgtg tacctcgga ttcggctgca caacgagggc	480
[1831]	gtatggatct tcatgtttt caactcgtc attcacacca tcatgtacac ctactacggc	540
[1832]	ctcaccgccg ccgggtataa gttcaaggcc aagccgctca tcaccgcgat gcagatctgc	600
[1833]	cagttcgtgg gcggcttctt gttggtctgg gactacatca acgtccccg cttcaactcg	660
[1834]	gacaaaggga agttgttcag ctgggcttcc aactatgcat acgtcggctc ggtcttcttg	720
[1835]	ctcttctgcc actttttcta ccaggacaac ttggcaacga agaaatcggc caaggcgggc	780
[1836]	aagcagctct ag	792
[1837]	<210> 33	
[1838]	<211> 263	
[1839]	<212> PRT	
[1840]	<213> 球等鞭金藻	
[1841]	<400> 33	
[1842]	Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr	
[1843]	1	5 10 15

[1844]	Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
[1845]	20 25 30
[1846]	Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
[1847]	35 40 45
[1848]	Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
[1849]	50 55 60
[1850]	Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
[1851]	65 70 75 80
[1852]	Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
[1853]	85 90 95
[1854]	Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
[1855]	100 105 110
[1856]	Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
[1857]	115 120 125
[1858]	Val Leu Lys Gly Lys Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe
[1859]	130 135 140
[1860]	Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly
[1861]	145 150 155 160
[1862]	Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr
[1863]	165 170 175
[1864]	Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro
[1865]	180 185 190
[1866]	Leu Ile Thr Ala Met Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu
[1867]	195 200 205
[1868]	Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys
[1869]	210 215 220
[1870]	Leu Phe Ser Trp Ala Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
[1871]	225 230 235 240
[1872]	Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser
[1873]	245 250 255
[1874]	Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
[1875]	260
[1876]	<210> 34
[1877]	<211> 801
[1878]	<212> DNA
[1879]	<213> 赫氏圆石藻 (Emiliana huxleyi)
[1880]	<400> 34
[1881]	atgctcgatc ggcctcgtc cgacgcggcc atctggtctg cgggtgtccga tccggaaatc 60
[1882]	ctgatcggca ctttctccta cctgctgctc aagccgctgc tacgcaactc agggctcgtg 120
[1883]	gacgagcgga aaggcgcta ccggacctcg atgatctggt acaacgtggt gctcgcgctc 180
[1884]	ttctccgcga cgagcttcta cgtgactgcg accgcgctcg ggtgggacaa gggcaccggc 240
[1885]	gagtggctcc gcagtctcac gggcgacagc ccgcagcagc tgtggcaatg cccgtcgagg 300



[1886]	gtatgggact ccaagctgtt cctgtggacg gccaaaggcct tctactactc aaagtacgtg	360
[1887]	gagtacctcg acacggcgtg gctcgtcctc aaggggaaga aggtctcctt cctgcagggc	420
[1888]	ttccaccact ttggcgcgcc gtgggacgtg tacctgggca ttgggctgaa gaacgagggc	480
[1889]	gtgtggatct tcatgttctt caactcgttc atccacacgg tcatgtacac gtactacggc	540
[1890]	ctcaccgccg cgggctacaa gatccgcggc aagccgatca tcaccgcgat gcaaataagc	600
[1891]	cagttcgtcg gcggctttgt cctagtgtgg gactacatca acgtgccgtg cttccacggc	660
[1892]	gacgccgggc aggtcttcag ctgggtcttt aactatgctt acgtcggtc cgtctttctg	720
[1893]	ctgtttgcc acttcttcta catggacaac atcgcaagg ccaaggccaa gaaggccgtc	780
[1894]	gctaccgcga aggcgctgtg a	801
[1895]	<210>	35
[1896]	<211>	801
[1897]	<212>	DNA
[1898]	<213>	人工序列
[1899]	<220>	
[1900]	<223>	用于在植物中表达赫氏圆石藻9-延伸酶的密码子优化的开放阅读框
[1901]	<400>	35
[1902]	atgcttgata gagcttcac tcatgctgct atttggagcg ctgtttctga tcctgagatc	60
[1903]	cttatcgga ccttctctta ctttttgctt aagcctctcc tcagaaactc tggacttggt	120
[1904]	gatgagagaa agggagctta ccgtacttct atgatctggt acaacgttgt tcttgctctt	180
[1905]	ttctctgcta cctctttcta cgttactgct actgctcttg gatgggataa gggaactggt	240
[1906]	gagtggctta gatctcttac tgggtattct cctcaacaac ttgggcagt cccttctaga	300
[1907]	gtttgggaca gcaaaactct cttgtggact gctaaagcct tctactactc caagtacgtt	360
[1908]	gagtaccttg atactgcttg gcttgtctc aagggaaaga aggtttcatt cctccagga	420
[1909]	ttccatcatt tcgggtctcc atgggatgtt taccttgga tcaggcttaa gaacgagga	480
[1910]	gtttggatct tcatgttctt caacagcttc atccactg ttatgtacac ttactacga	540
[1911]	cttactgctg ctggatacaa gatcagagga aagcctatca tcaccgctat gcaaatctct	600
[1912]	caattcgttg gtggattcgt tcttgtgtgg gactacatca acgttccttg ttccatgct	660
[1913]	gatgctggac aagttttctc ttgggtgttc aactacgctt atgtgggac tgttttctt	720
[1914]	ctttctgcc acttcttcta catggacaac attgctaagg ctaaggctaa aaaggctgtt	780
[1915]	gctaccagaa aggtctttg a	801
[1916]	<210>	36
[1917]	<211>	266
[1918]	<212>	PRT
[1919]	<213>	赫氏圆石藻
[1920]	<400>	36
[1921]	Met Leu Asp Arg Ala Ser Ser Asp Ala Ala Ile Trp Ser Ala Val Ser	
[1922]	1 5 10 15	
[1923]	Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro	
[1924]	20 25 30	
[1925]	Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Arg Lys Gly Ala Tyr Arg	
[1926]	35 40 45	
[1927]	Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Val Leu Ala Leu Phe Ser Ala Thr	

[1928]	50	55	60
[1929]	Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Lys Gly Thr Gly		
[1930]	65	70	75 80
[1931]	Glu Trp Leu Arg Ser Leu Thr Gly Asp Ser Pro Gln Gln Leu Trp Gln		
[1932]	85	90	95
[1933]	Cys Pro Ser Arg Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Leu Trp Thr Ala Lys		
[1934]	100	105	110
[1935]	Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu		
[1936]	115	120	125
[1937]	Val Leu Lys Gly Lys Lys Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe		
[1938]	130	135	140
[1939]	Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu Lys Asn Glu Gly		
[1940]	145	150	155 160
[1941]	Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Val Met Tyr		
[1942]	165	170	175
[1943]	Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Lys Pro		
[1944]	180	185	190
[1945]	Ile Ile Thr Ala Met Gln Ile Ser Gln Phe Val Gly Gly Phe Val Leu		
[1946]	195	200	205
[1947]	Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe His Ala Asp Ala Gly Gln		
[1948]	210	215	220
[1949]	Val Phe Ser Trp Val Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu		
[1950]	225	230	235 240
[1951]	Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Met Asp Asn Ile Ala Lys Ala Lys Ala		
[1952]	245	250	255
[1953]	Lys Lys Ala Val Ala Thr Arg Lys Ala Leu		
[1954]	260	265	
[1955]	<210> 37		
[1956]	<211> 819		
[1957]	<212> DNA		
[1958]	<213> Pavlova pinguis		
[1959]	<400> 37		
[1960]	atggttgccg caccatcac gctcgagtgg ctgctttcgc cgaagctcaa ggatgcagtg	60	
[1961]	ttcggtgggg aggtgctcta cttctccatt gcctacctgt ttcttgccgc cattttgaag	120	
[1962]	cgcaccccggt tgggtggacac gcggaagggc gcgtataaga gtggtatgat cgcgtacaac	180	
[1963]	gtgatcatgt gcgtgttctc gctggtgtgc ttcattctgcc agctcgcagc cctgggctat	240	
[1964]	gacatgggct acttgctcgt ggtgcgtgac ctacacaggg acgagattgt cccctctac	300	
[1965]	caggacgtgt ccccgctccc cgccttctcc aacaagctct tcaagtattc gtctattgcc	360	
[1966]	ttccactact ccaagtatgt tgagtacatg gacaccgcat ggctggtgat gaagggaag	420	
[1967]	cccgtgtcct tgctccaggc cttccaccac tttggcgccg cctgggacac ctactttggc	480	
[1968]	atcaccttcc agaacgagg catctactgt ttcgtggtgc tcaacgcct catccacacg	540	
[1969]	atcatgtacg catactacgc ggccactgcg gcgggtctca agttctcact gaagttcgtc	600	

[1970] atcacgctca tgcagatcac ccaattcaac gtgggcttcg taatgggtga tcactacatc 660  
 [1971] accctggagt acttccgcaa ctcaccggag ctcgtcttct cctacctttt caactatgcg 720  
 [1972] tacgtctgca cggttctcct cctcttcatg cagttcttct acatggacaa ctttggcaag 780  
 [1973] aagaagcccg ctgccgccgc gggcaagaag aagaagtag 819  
 [1974] <210> 38  
 [1975] <211> 272  
 [1976] <212> PRT  
 [1977] <213> Pavlova pinguis  
 [1978] <400> 38  
 [1979] Met Val Ala Pro Pro Ile Thr Leu Glu Trp Leu Leu Ser Pro Lys Leu  
 [1980] 1 5 10 15  
 [1981] Lys Asp Ala Val Phe Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser Ile Ala Tyr  
 [1982] 20 25 30  
 [1983] Leu Phe Leu Ala Pro Ile Leu Lys Arg Thr Pro Leu Val Asp Thr Arg  
 [1984] 35 40 45  
 [1985] Lys Gly Ala Tyr Lys Ser Gly Met Ile Ala Tyr Asn Val Ile Met Cys  
 [1986] 50 55 60  
 [1987] Val Phe Ser Leu Val Cys Phe Ile Cys Gln Leu Ala Ala Leu Gly Tyr  
 [1988] 65 70 75 80  
 [1989] Asp Met Gly Tyr Leu Gln Trp Val Arg Asp Leu Thr Gly Asp Glu Ile  
 [1990] 85 90 95  
 [1991] Val Pro Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe Ser Asn Lys  
 [1992] 100 105 110  
 [1993] Leu Phe Lys Tyr Ser Ser Ile Ala Phe His Tyr Ser Lys Tyr Val Glu  
 [1994] 115 120 125  
 [1995] Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Met Lys Gly Lys Pro Val Ser Leu  
 [1996] 130 135 140  
 [1997] Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr Tyr Phe Gly  
 [1998] 145 150 155 160  
 [1999] Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Ile Tyr Val Phe Val Val Leu Asn Ala  
 [2000] 165 170 175  
 [2001] Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Gly  
 [2002] 180 185 190  
 [2003] Leu Lys Phe Ser Leu Lys Phe Val Ile Thr Leu Met Gln Ile Thr Gln  
 [2004] 195 200 205  
 [2005] Phe Asn Val Gly Phe Val Met Val Tyr His Tyr Ile Thr Leu Glu Tyr  
 [2006] 210 215 220  
 [2007] Phe Arg Asn Ser Pro Glu Leu Val Phe Ser Tyr Leu Phe Asn Tyr Ala  
 [2008] 225 230 235 240  
 [2009] Tyr Val Cys Thr Val Leu Leu Leu Phe Met Gln Phe Phe Tyr Met Asp  
 [2010] 245 250 255  
 [2011] Asn Phe Gly Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ala Gly Lys Lys Lys Lys

[2012]	260	265	270
[2013]	<210> 39		
[2014]	<211> 840		
[2015]	<212> DNA		
[2016]	<213> 盐生巴夫藻		
[2017]	<400> 39		
[2018]	atggcgactg aagggatgcc ggcgataacg ctggactggc tgctctcgcc cgggctgaag	60	
[2019]	gatgccgtaa ttggcgggga ggtgctctac ttttcgcttg ggtatctgct gctcgagccc	120	
[2020]	atcctcaagc gctcaccgtt tgtggacaag cgcaaggcg cataccgcaa cggcatgatac	180	
[2021]	gcgtacaaca tcctcatgtg cggtttctcg ctggtatgct tcgtgtgcca gatggcggcg	240	
[2022]	ctcggccttg atcgcgcca cctgcagttt gtccgcgacc tcacgggcga cagcgtggtg	300	
[2023]	cagctctacc aggacgtgag cccatcccct gcattcgca acaagctctt ccggtactca	360	
[2024]	gcggtggcgt tccactactc aaagtacgtg gactacatgg acacagcgtg gcttgtgctg	420	
[2025]	aagggaagc ccgtctcgtt cctgcagggc ttccaccact tcggcgccgc gtgggacacc	480	
[2026]	tactttggca tcacgtttca gaacgagggc acctacgtct ttgtgctgct caacgcattc	540	
[2027]	atccacacaa tcatgtacac ctactacggc gcgacggcag cgggcatcaa aatctcgatg	600	
[2028]	aagccgctga tcaccctcat gcagatcacg cagttcctgc tgggcttcgc gctcgtctac	660	
[2029]	ccgtacattg acctcgcta cttccgtgcg tcgcccagac tcgtgtggag ctacctgttc	720	
[2030]	aactatgcgt acgtactcat ggtgctcttc ctcttcatgc gcttcttcta ccacgacaac	780	
[2031]	tttagcaagc acaagccaat ctgcgcgcatc gactccagca accgcatgaa aaccgagtag	840	
[2032]	<210> 40		
[2033]	<211> 279		
[2034]	<212> PRT		
[2035]	<213> 盐生巴夫藻		
[2036]	<400> 40		
[2037]	Met Ala Thr Glu Gly Met Pro Ala Ile Thr Leu Asp Trp Leu Leu Ser		
[2038]	1 5 10 15		
[2039]	Pro Gly Leu Lys Asp Ala Val Ile Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser		
[2040]	20 25 30		
[2041]	Leu Gly Tyr Leu Leu Leu Glu Pro Ile Leu Lys Arg Ser Pro Phe Val		
[2042]	35 40 45		
[2043]	Asp Lys Arg Lys Gly Ala Tyr Arg Asn Gly Met Ile Ala Tyr Asn Ile		
[2044]	50 55 60		
[2045]	Leu Met Cys Gly Phe Ser Leu Val Cys Phe Val Cys Gln Met Ala Ala		
[2046]	65 70 75 80		
[2047]	Leu Gly Leu Asp Arg Gly His Leu Gln Phe Val Arg Asp Leu Thr Gly		
[2048]	85 90 95		
[2049]	Asp Ser Val Val Gln Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe		
[2050]	100 105 110		
[2051]	Ala Asn Lys Leu Phe Arg Tyr Ser Ala Val Ala Phe His Tyr Ser Lys		
[2052]	115 120 125		
[2053]	Tyr Val Glu Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Leu Lys Gly Lys Pro		

[2054]	130	135	140
[2055]	Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr		
[2056]	145	150	155 160
[2057]	Tyr Phe Gly Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Thr Tyr Val Phe Val Leu		
[2058]	165	170	175
[2059]	Leu Asn Ala Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Ala Thr		
[2060]	180	185	190
[2061]	Ala Ala Gly Ile Lys Ile Ser Met Lys Pro Leu Ile Thr Leu Met Gln		
[2062]	195	200	205
[2063]	Ile Thr Gln Phe Leu Leu Gly Phe Ala Leu Val Tyr Pro Tyr Ile Asp		
[2064]	210	215	220
[2065]	Leu Gly Tyr Phe Arg Ala Ser Pro Glu Leu Val Trp Ser Tyr Leu Phe		
[2066]	225	230	235 240
[2067]	Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Met Val Leu Phe Leu Phe Met Arg Phe Phe		
[2068]	245	250	255
[2069]	Tyr His Asp Asn Phe Ser Lys His Lys Pro Ile Ser Arg Ile Asp Ser		
[2070]	260	265	270
[2071]	Ser Asn Arg Met Lys Thr Glu		
[2072]	275		
[2073]	<210> 41		
[2074]	<211> 1284		
[2075]	<212> DNA		
[2076]	<213> 盐生巴夫藻		
[2077]	<400> 41		
[2078]	atgggacgcg gcggagacag cagtgggcag gcgcatccgg cggcggagct ggcggtcccc	60	
[2079]	agcgaccgcg cggaggtgag caacgtgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc	120	
[2080]	aagcgcgtgg atgtgaccaa gttccaacgc acgcacccgg gtggtagcaa ggtcttccgg	180	
[2081]	atcttccagg accgcgatgc gacggagcag ttcgagtcct accactcgaa gcgcgcgatc	240	
[2082]	aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgtc cgcgcgacac gcccttgccc	300	
[2083]	tcccagtcac cgatggggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt	360	
[2084]	tactacgatc catgcccgct cgatgagctg ttcaagctca gcctcgtgct cctcccgacc	420	
[2085]	tttgcgggca tgtacatgct caaggcgggc gtcggctccc cgctctgcgg cgccctcatg	480	
[2086]	gtgagctttg gctggtacct cgatggctgg ctgcgcacg actatctgca ccaactccgtc	540	
[2087]	ttcaaggggt ccgtcgacg caccgtcggg tggaacaacg cggcgggcta ctctctcggc	600	
[2088]	ttcgtgcagg ggtatgcggt cgagtgggtg cgcgcgcggc ataacacgca ccacgtgtgc	660	
[2089]	accaatgagg acggctcgga ccccgacatc aaaacggcgc cgctgctcat atacgtgcgc	720	
[2090]	aacaagccga gcatcgccaa gcgcctgaac gccttcacg gctaccagca gtactactat	780	
[2091]	gtgccggtga tggcaatcct cgacctgtac tggcggctcg agtcgatcgc ctacgtcgcg	840	
[2092]	atgcgcctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctgcgactcg tcgcgcacta cgccatcgtc	900	
[2093]	gcgtgggtct ttgcgggcaa ctaccacctg ctcccgtcgc tgacggttct gcgcgggttt	960	
[2094]	ggcactggga tcaccgtttt cgcgacgcac tacggtgagg acattctcga cgcggaccag	1020	
[2095]	gtgcgtcaca tgacgtcgt cgagcagacg gcactcacct cgcgcaacat ctcgggcggc	1080	

[2096] tggctcgtga acgtgctcac cggcttcac tcaactgcaga cggagcacca cctgttcccg 1140  
 [2097] atgatgccaa cggcaacct catgactatc cagcccgagg tgcgcgcctt cttcaagaag 1200  
 [2098] cacggacttg agtaccgga gggcaacctc attgagtgcg tgcggcagaa catcgtgcg 1260  
 [2099] cttgcattcg agcacctgct ttga 1284  
 [2100] <210> 42  
 [2101] <211> 427  
 [2102] <212> PRT  
 [2103] <213> 盐生巴夫藻  
 [2104] <400> 42  
 [2105] Met Gly Arg Gly Gly Asp Ser Ser Gly Gln Ala His Pro Ala Ala Glu  
 [2106] 1 5 10 15  
 [2107] Leu Ala Val Pro Ser Asp Arg Ala Glu Val Ser Asn Ala Asp Ser Lys  
 [2108] 20 25 30  
 [2109] Ala Leu His Ile Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe  
 [2110] 35 40 45  
 [2111] Gln Arg Thr His Pro Gly Gly Ser Lys Val Phe Arg Ile Phe Gln Asp  
 [2112] 50 55 60  
 [2113] Arg Asp Ala Thr Glu Gln Phe Glu Ser Tyr His Ser Lys Arg Ala Ile  
 [2114] 65 70 75 80  
 [2115] Lys Met Met Glu Gly Met Leu Lys Lys Ser Glu Asp Ala Pro Ala Asp  
 [2116] 85 90 95  
 [2117] Thr Pro Leu Pro Ser Gln Ser Pro Met Gly Lys Asp Phe Lys Ala Met  
 [2118] 100 105 110  
 [2119] Ile Glu Arg His Val Ala Ala Gly Tyr Tyr Asp Pro Cys Pro Leu Asp  
 [2120] 115 120 125  
 [2121] Glu Leu Phe Lys Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Thr Phe Ala Gly Met  
 [2122] 130 135 140  
 [2123] Tyr Met Leu Lys Ala Gly Val Gly Ser Pro Leu Cys Gly Ala Leu Met  
 [2124] 145 150 155 160  
 [2125] Val Ser Phe Gly Trp Tyr Leu Asp Gly Trp Leu Ala His Asp Tyr Leu  
 [2126] 165 170 175  
 [2127] His His Ser Val Phe Lys Gly Ser Val Ala Arg Thr Val Gly Trp Asn  
 [2128] 180 185 190  
 [2129] Asn Ala Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Phe Val Gln Gly Tyr Ala Val Glu  
 [2130] 195 200 205  
 [2131] Trp Trp Arg Ala Arg His Asn Thr His His Val Cys Thr Asn Glu Asp  
 [2132] 210 215 220  
 [2133] Gly Ser Asp Pro Asp Ile Lys Thr Ala Pro Leu Leu Ile Tyr Val Arg  
 [2134] 225 230 235 240  
 [2135] Asn Lys Pro Ser Ile Ala Lys Arg Leu Asn Ala Phe Gln Arg Tyr Gln  
 [2136] 245 250 255  
 [2137] Gln Tyr Tyr Tyr Val Pro Val Met Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Trp Arg

[2138]	260	265	270
[2139]	Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Val Ala Met Arg Leu Pro Lys Met Leu Pro		
[2140]	275	280	285
[2141]	Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Val Ala Trp Val Phe		
[2142]	290	295	300
[2143]	Ala Gly Asn Tyr His Leu Leu Pro Leu Val Thr Val Leu Arg Gly Phe		
[2144]	305	310	315 320
[2145]	Gly Thr Gly Ile Thr Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu Asp Ile Leu		
[2146]	325	330	335
[2147]	Asp Ala Asp Gln Val Arg His Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Leu		
[2148]	340	345	350
[2149]	Thr Ser Arg Asn Ile Ser Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly		
[2150]	355	360	365
[2151]	Phe Ile Ser Leu Gln Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr		
[2152]	370	375	380
[2153]	Gly Asn Leu Met Thr Ile Gln Pro Glu Val Arg Ala Phe Phe Lys Lys		
[2154]	385	390	395 400
[2155]	His Gly Leu Glu Tyr Arg Glu Gly Asn Leu Ile Glu Cys Val Arg Gln		
[2156]	405	410	415
[2157]	Asn Ile Arg Ala Leu Ala Phe Glu His Leu Leu		
[2158]	420	425	
[2159]	<210> 43		
[2160]	<211> 18		
[2161]	<212> DNA		
[2162]	<213> 人工序列		
[2163]	<220>		
[2164]	<223> 寡核苷酸引物		
[2165]	<400> 43		
[2166]	gcgaagcaca tcgagtca 18		
[2167]	<210> 44		
[2168]	<211> 20		
[2169]	<212> DNA		
[2170]	<213> 人工序列		
[2171]	<220>		
[2172]	<223> 寡核苷酸引物		
[2173]	<400> 44		
[2174]	ggttgaggtg gtagctgagg 20		
[2175]	<210> 45		
[2176]	<211> 26		
[2177]	<212> DNA		
[2178]	<213> 人工序列		
[2179]	<220>		

---

[2180]	<223> 寡核苷酸探针
[2181]	<220>
[2182]	<221> misc_feature
[2183]	<222> (1) .. (1)
[2184]	<223> N = Hex
[2185]	<220>
[2186]	<221> misc_feature
[2187]	<222> (9) .. (9)
[2188]	<223> N = Zen
[2189]	<220>
[2190]	<221> misc_feature
[2191]	<222> (26) .. (26)
[2192]	<223> N = 3IABkFQ
[2193]	<400> 45
[2194]	ntctctacnc cgtctcacat gacgcn 26
[2195]	<210> 46
[2196]	<211> 19
[2197]	<212> DNA
[2198]	<213> 人工序列
[2199]	<220>
[2200]	<223> 寡核苷酸引物
[2201]	<400> 46
[2202]	atacaagcac ggtggatgg 19
[2203]	<210> 47
[2204]	<211> 22
[2205]	<212> DNA
[2206]	<213> 人工序列
[2207]	<220>
[2208]	<223> 寡核苷酸引物
[2209]	<400> 47
[2210]	tggtctaaca ggtctaggag ga 22
[2211]	<210> 48
[2212]	<211> 29
[2213]	<212> DNA
[2214]	<213> 人工序列
[2215]	<220>
[2216]	<223> 寡核苷酸探针
[2217]	<220>
[2218]	<221> misc_feature
[2219]	<222> (1) .. (1)
[2220]	<223> N = FAM
[2221]	<220>



[2222] <221> misc\_feature  
[2223] <222> (11) .. (11)  
[2224] <223> N = Zen  
[2225] <220>  
[2226] <221> misc\_feature  
[2227] <222> (29) .. (29)  
[2228] <223> N = 3IABkFQ  
[2229] <400> 48  
[2230] ntggcaaaga ngatttcgag cttcctgcn 29  
[2231] <210> 49  
[2232] <211> 22  
[2233] <212> DNA  
[2234] <213> 人工序列  
[2235] <220>  
[2236] <223> 寡核苷酸引物  
[2237] <400> 49  
[2238] caagcacgt agtaagagag ca 22  
[2239] <210> 50  
[2240] <211> 20  
[2241] <212> DNA  
[2242] <213> 人工序列  
[2243] <220>  
[2244] <223> 寡核苷酸引物  
[2245] <400> 50  
[2246] cagacagcct gaggttagca 20  
[2247] <210> 51  
[2248] <211> 29  
[2249] <212> DNA  
[2250] <213> 人工序列  
[2251] <220>  
[2252] <223> 寡核苷酸探针  
[2253] <220>  
[2254] <221> misc\_feature  
[2255] <222> (1) .. (1)  
[2256] <223> N = FAM  
[2257] <220>  
[2258] <221> misc\_feature  
[2259] <222> (11) .. (11)  
[2260] <223> N = Zen  
[2261] <220>  
[2262] <221> misc\_feature  
[2263] <222> (29) .. (29)

- 
- [2264] <223> N = 3IABkFQ  
[2265] <400> 51  
[2266] ntccccactt ncttagcgaa aggaacgan 29

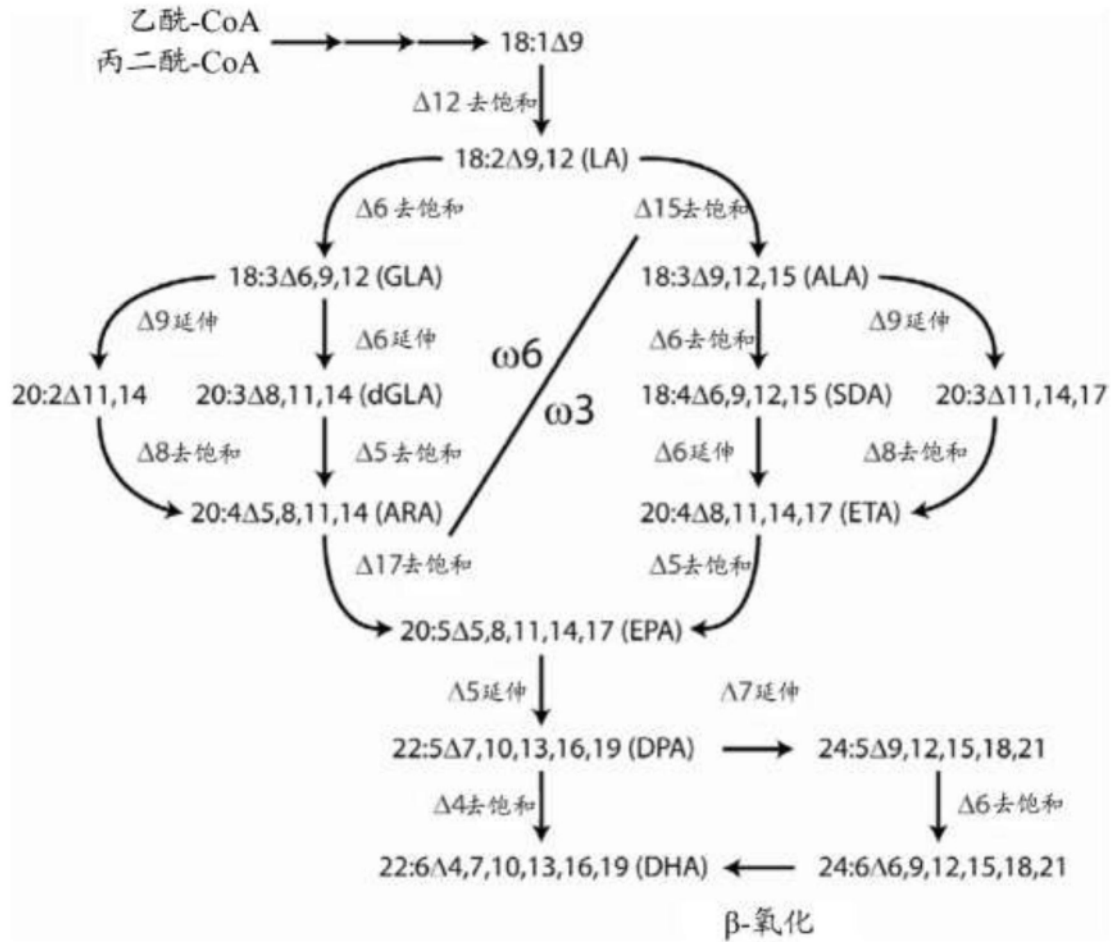


图1

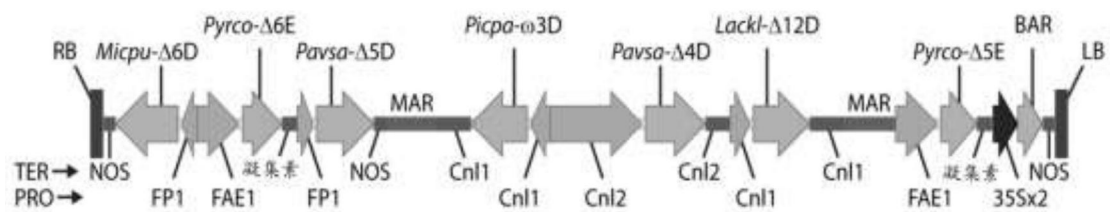


图2

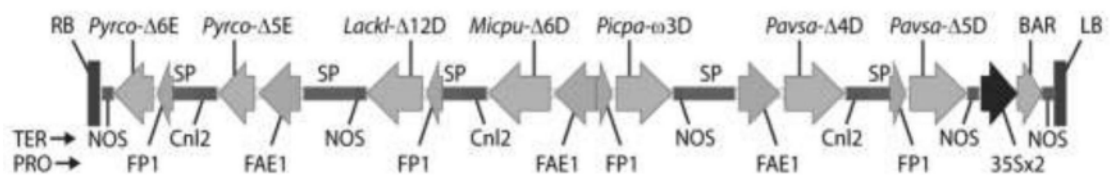


图3

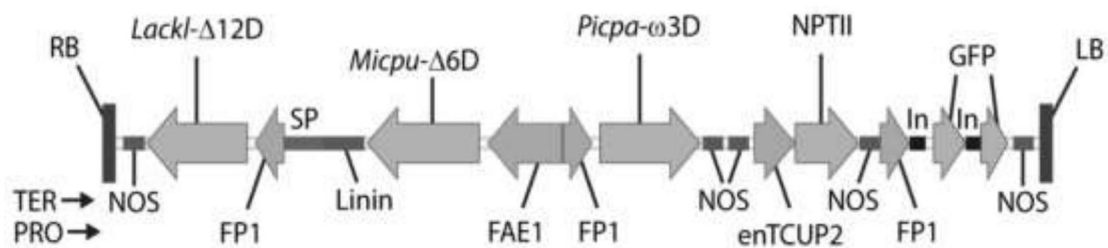
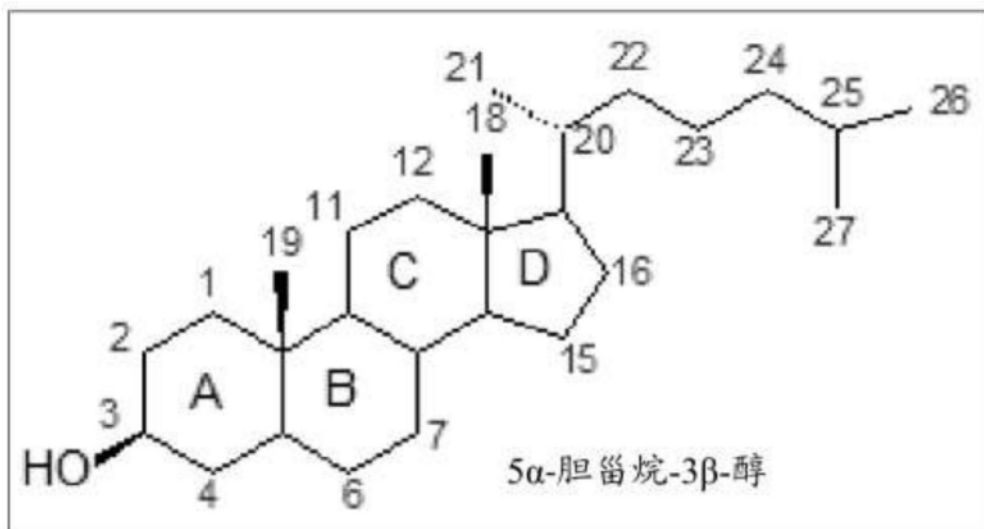


图4



B)

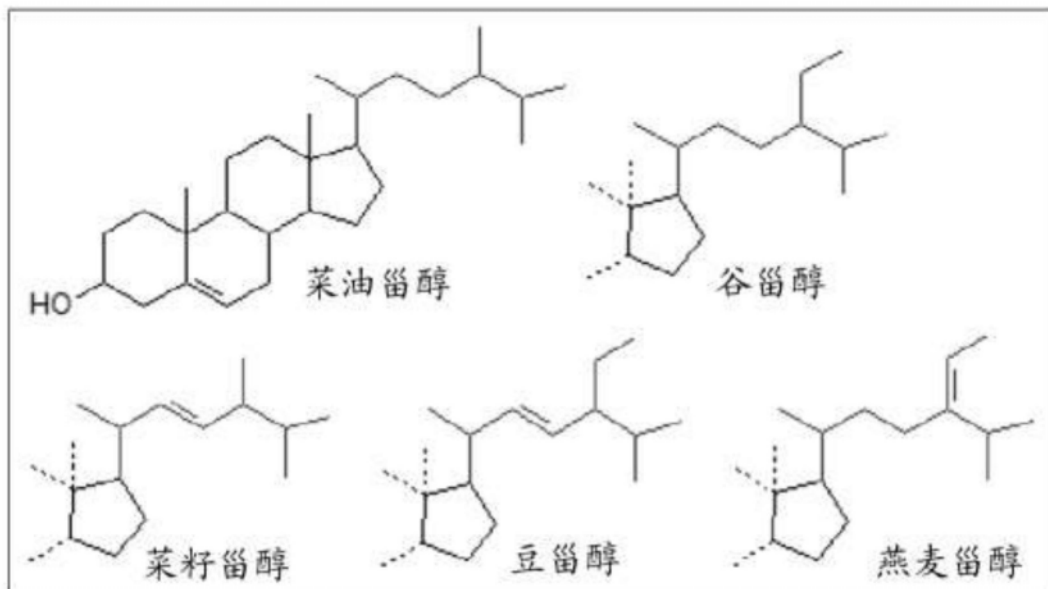


图5

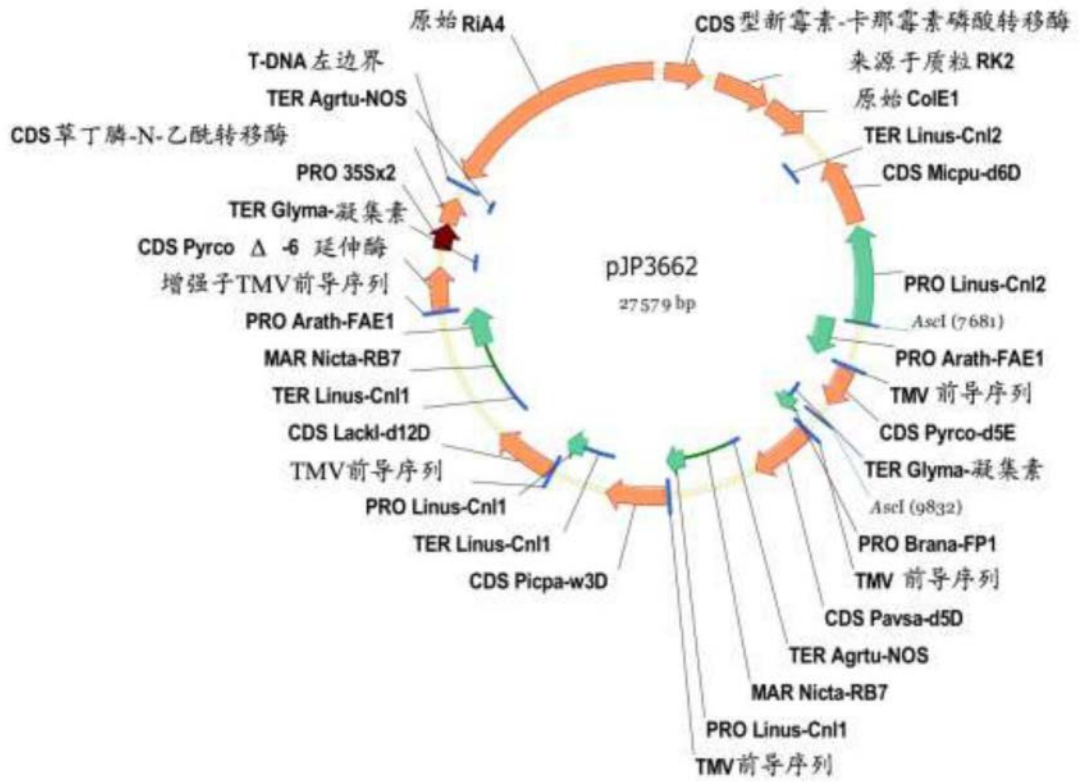


图6