



(51) МПК

C12N 15/53 (2006.01)*C12N 9/02* (2006.01)*C12N 15/11* (2006.01)*C12P 7/64* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2008149701/10, 17.05.2007**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.05.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
17.05.2006 US 60/801,172(43) Дата публикации заявки: **27.06.2010** Бюл. № 18(45) Опубликовано: **10.12.2012** Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 02081668 A2, 17.10.2002. WO 9846764, 22.10.1998. RU 2181772 C2, 27.04.2002. WO 2004/087902 A, 14.10.2004. CA 2559360 A1, 09.09.2005. SHAMSUDIN L. "Lipid and fatty acid contents in red tides from tropical fish ponds of the coastal water of South China Sea", vol 104, no 1, 1996, pp.36-42. CHEN CHIH-YU et al. "Screening of red algae filaments as a (см. прод.)**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **17.12.2008**(86) Заявка РСТ:
US 2007/012233 (17.05.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/136877 (29.11.2007)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мишу, рег.№ 364**

(72) Автор(ы):

**ДЕЙМЬЮД Говард Г. (US),
ЧЖУ Цюйинн Цюнь (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**Е.И.ДЮПОН ДЕ НЕМУР ЭНД
КОМПАНИ (US)**

**(54) ДЕЛЬТА-5-ДЕСАТУРАЗА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Представлен выделенный полинуклеотид для экспрессии дельта-5-десатуразы, включающий нуклеотидную последовательность: 1) кодирующую полипептид дельта-5-десатуразы, причем полипептид обладает по меньшей мере 80% идентичности SEQ ID NO:2; 2) кодирующую

полипептид дельта-5-десатуразы, причем нуклеотидная последовательность обладает по меньшей мере 90% идентичности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3; 3) кодирующую полипептид дельта-5-десатуразы, причем нуклеотидная последовательность гибридизуется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3; 4) комплемент нуклеотидной

последовательности 1)-3). Описаны рекомбинантная ДНК-конструкция, клетка-хозяин, трансгенное растение с масличными семенами, трансгенное семя, содержащие указанный полинуклеотид. Предложены способы: трансформации клетки-хозяина, экспрессии полиненасыщенных жирных кислот с длинными цепями в клетке растения, получения по меньшей мере одной полиненасыщенной жирной кислоты в растении, с использованием указанного полинуклеотида. Описана

возможность применения указанных трансгенных семян для получения пищевых продуктов для питания людей, кормов для животных, получения масла и лецитина. Изобретение позволяет получить измененный профиль полиненасыщенных жирных кислот по сравнению с профилем полиненасыщенных жирных кислот нетрансформированного растения. 15 н. и 9 з.п. ф-лы, 12 табл., 15 ил., 20 пр.

(56) (продолжение):

potential alternative source of eicosapentaenoic acid". Marine Biotechnology (New York), vol.4, no 2, March 2002, pp.1436-2228. ЛОСЬ Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот. Успехи биологической химии, т.41, 2001, с.163-198.

RU 2 4 6 9 0 9 2 C 2

RU 2 4 6 9 0 9 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 15/53 (2006.01)*C12N 9/02* (2006.01)*C12N 15/11* (2006.01)*C12P 7/64* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2008149701/10, 17.05.2007**(24) Effective date for property rights:
17.05.2007

Priority:

(30) Convention priority:
17.05.2006 US 60/801,172(43) Application published: **27.06.2010 Bull. 18**(45) Date of publication: **10.12.2012 Bull. 34**(85) Commencement of national phase: **17.12.2008**(86) PCT application:
US 2007/012233 (17.05.2007)(87) PCT publication:
WO 2007/136877 (29.11.2007)

Mail address:

**129090, Moskva, ul.B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364**

(72) Inventor(s):

**DEJM'JuD Govard G. (US),
ChZhU Tsujinn Tsjun' (US)**

(73) Proprietor(s):

E.I.DJuPON DE NEMUR EhND KOMPANI (US)**(54) DELTA-5-DESATURASE AND ITS USE FOR PRODUCING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: what is presented is a recovered polynucleotide for expression of delta-5-desaturase containing a nucleotide sequence: 1) coding a polypeptide of delta-5-desaturase with the polypeptide having at least 80% identity SEQ ID NO:2; 2) coding the polypeptide of delta-5-desaturase with the nucleotide sequence having at least 90% identity SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3; 3) coding the polypeptide of delta-5-desaturase with the nucleotide sequence being shock-hybridised with the nucleotide sequence presented in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3; 4) a complement of the nucleotide sequence 1)-3). There are described a recombinant DNA structure, a

host cell, an oilseed transgenic plant, a transgenic seed containing said polynucleotide. The following methods are presented: host cell transformation, expression of long-chain polyunsaturated fatty acids in a plant cell, production of at least one polyunsaturated fatty acid in a plant with the use of said polypeptide. Usability of said transgenic seeds for producing human foodstuff, animal feed, oil and lecithin is described.

EFFECT: invention enables producing a changed profile of polyunsaturated fatty acids as compared with a profile of polyunsaturated fatty acids of a non-transformed plant.

24 cl, 11 tbl, 22 dwg, 20 ex

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 60/801172, поданной 17 мая 2006, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к идентификации фрагментов нуклеиновых кислот, кодирующих фермент дельта-5-десатуразу жирных кислот, и применению этой десатуразы для получения полиненасыщенных жирных кислот (PUFA) с длинными цепями.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Важность PUFA бесспорна. Например, некоторые PUFA являются важными биологическими компонентами здоровых клеток и признаются «существенными» жирными кислотами, которые не могут быть синтезированы *de novo* у млекопитающих, а вместо этого должны быть получены или вместе с пищей, или с помощью дальнейшего уменьшения насыщенности и элонгации линолевой кислоты (LA; 18:2 омега-6) или α -линолевой кислоты (ALA; 18:3 омега-3); составными частями плазматических мембран клеток, в которых их можно обнаружить в таких формах, как фосфолипиды или триацилглицерины необходимыми для правильного развития (особенно при развитии головного мозга детей младшего возраста) и для формирования и восстановления ткани; и предшественниками нескольких биологически активных эйкозаноидов, важных для млекопитающих (например, простациклинов, эйкозаноидов, лейкотриенов, простагландинов). Кроме того, прием в большом количестве PUFA омега-3 с длинными цепями вызывает эффекты защиты сердечно-сосудистой системы (Dyerberg, J. et al., Amer. J. Clin. Nutr., 28: 958-966 (1975); Dyerberg, J. et al., Lancet, 2(8081): 117-119 (July 15, 1978); Shimokawa, H., World Rev. Nutr. Diet., 88: 100-108 (2001); von Schacky, C. and Dyerberg, J., World Rev. Nutr. Diet., 88: 90-99 (2001)). И в многочисленных других исследованиях подтверждается польза для здоровья в широком диапазоне, предоставляемая введением PUFA омега-3 и/или омега-6, против множества симптомов и заболеваний (например, астмы, псориаза, экземы, диабета, рака).

Ряд различных хозяев, включающих растения, водоросли, грибы и дрожжи, исследуются в качестве средств для коммерческого получения PUFA. С помощью генной инженерии продемонстрировано, что природные способности некоторых хозяев (даже тех, которые природно ограничены в продукции жирных кислот LA и ALA) можно в значительной степени изменить для получения в результате продукции на высоком уровне различных PUFA омега-3/омега 6 с длинными цепями. Независимо от того, является ли это результатом естественных возможностей или рекомбинантной технологии, для продукции арахидоновой кислоты (ARA; 20:4 омега-6), эйкозапентаеновой кислоты (EPA; 20:5 омега-3) и докозагексаеновой кислоты (DHA; 22:6 омега-3) может быть необходима экспрессия дельта-5-десатуразы.

Большинство идентифицированных до настоящего времени ферментов дельта-5-десатураз имеют первичную способность превращать дигомо-гамма-линоленовую кислоту (DGLA; 20:3 омега-6) в ARA, при этом вторичной активностью является превращение эйкозатетраеновой кислоты (ETA; 20:4 омега-3) в EPA (причем из EPA после реакции с дополнительной $C_{20/22}$ -элонгазой и дельта-4-десатуразой впоследствии синтезируется DHA). Дельта-5-десатураза играет роль как в пути с

участием дельта-6-десатуразы/дельта-6-элонгазы (который главным образом обнаружен в водорослях, мхах, грибах, нематодах и у людей и который характеризуется продукцией гамма-линоленовой кислоты (GLA; 18:3 омега-6) и/или стеариδοновой кислоты (STA; 18:4 омега-3)), так и в пути с участием дельта-9-элонгазы/дельта-8-десатуразы (который функционирует в некоторых организмах, таких как жгутиковые, и который характеризуется продукцией эйкозодиеновой кислоты (EDA; 20:2 омега-6) и/или эйкозатриеновой кислоты (ETrA; 20:3 омега-3)) (фиг.1).

Основываясь на том, какую роль ферменты дельта-5-десатуразы играют в синтезе, например, ARA, EPA и DHA, прилагалось значительное усилие для идентификации и характеристики этих ферментов из различных источников. В качестве таковых, многочисленные дельта-5-десатуразы были раскрыты как в открытых источниках информации (например, № доступа в GenBank - AF199596; № AF226273, № AF320509, № AB072976, № AF489588, № AJ510244, № AF419297, № AF07879, № AF067654 и № AB022097), так и в патентных источниках информации (например, патенты США № 5972664 и 6075183). Также в находящейся в совладении и в процессе одновременного рассмотрения заявке, имеющей № предварительной заявки 60/801119 (поданной 17 мая 2006), раскрываются аминокислотная и нуклеотидная последовательности фермента дельта-5-десатуразы из вида CCMP626 рода *Peridium*, в то время как в находящейся в совладении и в процессе одновременного рассмотрения заявке, имеющей № предварительной заявки 60/915733 (BB1614) (поданной 3 мая 2007), раскрываются аминокислотная и нуклеотидная последовательности фермента дельта-5-десатуразы из *Euglena anabaena*.

Настоящее изобретение относится к идентификации и выделению дополнительных генов, кодирующих дельта-5-десатуразы из *Euglena gracilis*, которые могли бы быть пригодны для гетерологичной экспрессии в ряде организмов-хозяев для применения в продукции жирных кислот омега-3/омега-6.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, включающему

(а) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий активностью дельта-5-десатуразы, причем полипептид обладает по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности аминокислотной последовательности, на основе способа выравнивания Clustal W, при сравнении с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2;

(b) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий активностью дельта-5-десатуразы, причем нуклеотидная последовательность обладает по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности, на основе способа выравнивания BLASTN, при сравнении с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3;

(с) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий активностью дельта-5-десатуразы, причем нуклеотидная последовательность гибридизуется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3; или

(d) комплемент нуклеотидной последовательности (а), (b) или (с), причем комплемент и нуклеотидная последовательность состоят из одинакового числа нуклеотидов и комплементарны на 100%.

Во втором варианте осуществления настоящее изобретение относится к

рекомбинантной ДНК-конструкции, включающей любой из выделенных полинуклеотидов по настоящему изобретению, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью.

В третьем варианте осуществления настоящее изобретение относится к клетке, содержащей в своем геноме рекомбинантную ДНК-конструкцию по настоящему изобретению. Такие клетки могут быть клетками растений или дрожжевыми клетками.

В четвертом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу трансформации клетки, включающему трансформацию клетки рекомбинантной конструкцией по настоящему изобретению или выделенным полинуклеотидом по настоящему изобретению и отбор тех клеток, которые трансформированы рекомбинантной конструкцией или выделенным полинуклеотидом.

В пятом варианте осуществления настоящее изобретение относится к трансгенному семени, содержащему в своем геноме рекомбинантную конструкцию по настоящему изобретению, или трансгенному семени, полученному от растения, полученного способом по настоящему изобретению. Также представляет интерес масло или побочные продукты, получаемые из таких трансгенных семян.

В шестом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения полиненасыщенных жирных кислот с длинными цепями в клетке растения, включающему

(а) трансформацию клетки рекомбинантной конструкцией по настоящему изобретению; и

(b) отбор тех трансформированных клеток, которые продуцируют полиненасыщенные жирные кислоты с длинными цепями.

В седьмом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения по меньшей мере одной полиненасыщенной жирной кислоты в клетке растения с масличными семенами, включающему

(а) трансформацию клетки растения с масличными семенами первой рекомбинантной ДНК-конструкцией, включающей выделенный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один полипептид дельта-5-десатуразы, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, и по меньшей мере одной дополнительной рекомбинантной ДНК-конструкцией, включающей выделенный полинуклеотид, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, кодирующий полипептид, выбираемый из группы, состоящей из дельта-4-десатуразы, дельта-5-десатуразы, дельта-6-десатуразы, дельта-8-десатуразы, дельта-12-десатуразы, дельта-15-десатуразы, дельта-17-десатуразы, дельта-9-десатуразы, дельта-9-элонгазы, C_{14/16}-элонгазы, C_{16/18}-элонгазы, C_{18/20}-элонгазы и C_{20/22}-элонгазы;

(b) регенерацию растения с масличными семенами из трансформированной клетки стадии (а); и

(с) отбор тех полученных от растений стадии (b) семян, которые имеют измененный уровень полиненасыщенных жирных кислот по сравнению с уровнем в семенах, полученных от не трансформированного растения с масличными семенами.

В восьмом варианте осуществления настоящее изобретение относится к растению с масличными семенами, содержащему в своем геноме рекомбинантную конструкцию по настоящему изобретению. Подходящие растения с масличными семенами включают, без ограничения, сою, виды Brassica, подсолнечник, кукурузу,

хлопок, лен и сафлор.

В девятом варианте осуществления настоящее изобретение относится к растению с масличными семенами, содержащему

(а) первую рекомбинантную ДНК-конструкцию, включающую выделенный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один полипептид дельта-5-десатуразы, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, и

(б) по меньшей мере одну дополнительную рекомбинантную ДНК-конструкцию, включающую выделенный полинуклеотид, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, кодирующий полипептид, выбираемый из группы, состоящей из дельта-4-десатуразы, дельта-5-десатуразы, дельта-6-десатуразы, дельта-8-десатуразы, дельта-12-десатуразы, дельта-15-десатуразы, дельта-17-десатуразы, дельта-9-десатуразы, дельта-9-элонгазы, $C_{14/16}$ -элонгазы, $C_{16/18}$ -элонгазы, $C_{18/20}$ -элонгазы и $C_{20/22}$ -элонгазы.

Также представляют интерес трансгенные семена, полученные из таких растений с масличными семенами, а также масло или побочные продукты, получаемые из этих трансгенных семян. Предпочтительным побочным продуктом является лецитин.

В десятом варианте осуществления настоящее изобретение относится к пищевому продукту или корму, включающему масло или семя по настоящему изобретению, или пищевому продукту или корму, включающему ингредиент, получаемый в процессе переработки семян.

В одиннадцатом варианте осуществления настоящее изобретение относится к потомству растений, полученному от растения, полученного способом по настоящему изобретению, или растения с масличными семенами по настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР И СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

На фиг. 1 иллюстрируется путь биосинтеза жирных кислот омега-3/омега-6.

На фиг. 2 показана хроматограмма липидного профиля экстракта клеток *Euglena gracilis*, описанного в примере 1.

На фиг. 3 показана часть выравнивания белков дельта-5-десатураз и белков дельта-8-десатураз и между ними, используя анализ Clustal W (программа MegAlignTM программного обеспечения DNASTAR).

На фиг. 4 графически представлена взаимосвязь между SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8 и 10, каждая из которых относится к дельта-5-десатуразе *Euglena gracilis*.

На фиг. 5А иллюстрируется стратегия клонирования, используемая для амплификации гена дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis* (EgD5). На фиг. 5В представлена карта плазмиды pZUF17, в то время как на фиг. 5С представлена карта плазмиды pDMW367.

На фиг. 6 предоставляются карты следующих плазмид: (А) pKUNF12T6E; (В) pEgD5S и (С) pDMW369.

На фиг. 7 показано сравнение последовательности ДНК гена дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis* (обозначенного «EgD5»; SEQ ID NO: 1) и синтетического гена (обозначенного «EgD5S»; SEQ ID NO: 3), оптимизированного в отношении кодонов для экспрессии в *Yarrowia lipolytica*.

На фиг. 8А и 8В показано выравнивание Clustal V (с использованием параметров по умолчанию) дельта-8-десатуразы *Pavlova lutheri* (SEQ ID NO: 18), дельта-8-десатуразы *Pavlova salina* (SEQ ID NO: 64), дельта-8-десатуразы *Euglena gracilis* (SEQ ID NO: 16) и двух различных дельта-6-десатураз жирных кислот *Rhizopus stolonifer* (SEQ

ID NO: 51 и 63).

На фиг. 9 представлена карта плазмиды pY98.

На фиг. 10A представлены профили жирных кислот *Yarrowia lipolytica*, который экспрессирует pY98 (SEQ ID NO: 76; включающую ген дельта-5-десатуразы *Mortierella alpina* (обозначенный «MaD5»)), или pDMW367 (SEQ ID NO: 23; включающую ген дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis*, обозначенный «EgD5») и которому обеспечивали различные субстраты. На фиг. 10B представлено сравнение специфичности MaD5 и EgD5 в отношении субстратов омега-3 и омега-6.

На фиг. 11 представлены карты следующих плазмид: (A) pKR916; (B) pKR1037 и (C) pKR328.

На фиг. 12A представлены средние профили жирных кислот для десяти случаев наличия наибольшей дельта-5-десатуразной активности, когда в зародыши сои трансформируют фермент *Mortierella alpina* (MaD5). На фиг. 12B представлены средние профили жирных кислот для десяти случаев наличия наибольшей дельта-5-десатуразной активности, когда в зародыши сои трансформируют фермент *Euglena gracilis* (EgD5). Жирные кислоты определяют как 16:0 (пальмитат), 18:0 (стеариновая кислота), 18:1 (олеиновая кислота), LA, ALA, EDA, SCI, DGLA, ARA, ERA, JUP, ETA и EPA. Жирные кислоты, перечисленные как «другие», включают 18:2 (5,9), GLA, STA, 20:0, 20:1(11), 20:2 (7,11) или 20:2 (8,11) и DPA. Относительное содержание каждой из этих «других» жирных кислот составляет менее 3% от жирных кислот в целом. Составы жирных кислот для отдельного зародыша выражали в виде весового процента (вес%) от жирных кислот в целом, а средний состав жирных кислот представляет собой среднее шести отдельных зародышей для каждого случая. На фиг. 12B показано, что активность EgD5 в зародышах сои является очень высокой, при этом среднее превращение (% правильной дельта-5-десатурации) составляет от 77% до 99% в десяти случаях наличия наибольшей дельта-5-десатуразной активности.

На фиг. 13 представлена активность дельта-5-десатуразы в отношении «правильных» субстратов («% правильной дельта-5-десатурации»), откладываемая по X-оси, в сравнении с активностью дельта-5-десатуразы в отношении «неправильных» субстратов («% неправильной дельта-5-десатурации»), откладываемой по Y-оси, для MaD5 (смотри фиг. 12A) и EgD5 (смотри фиг. 12B). По сравнению с MaD5 специфичность EgD5 в отношении субстратов больше в отношении «правильных» субстратов по сравнению с «неправильными» субстратами.

Полнее настоящее изобретение можно понять из следующего подробного описания и описаний сопроводительных последовательностей, составляющих часть настоящей заявки.

Следующие последовательности соответствуют 37 C.F.R. § 1.821-1.825 («требованиям к заявкам на патенты, содержащим сообщения о нуклеотидных последовательностях и/или аминокислотных последовательностях - правилам для последовательностей») и согласуются со стандартом ST.25 (1998) Всемирной организации по защите интеллектуальной собственности (WIPO) и требованиями к списку последовательностей Европейского патентного ведомства и РСТ (правилами 5.2 и 49.5 (a-bis), и разделом 208 и приложением С Административных инструкций). Для символов и формата, используемых для данных в виде нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, соблюдаются правила, изложенные в 37 C.F.R. § 1.822.

SEQ ID NO: 1-26, 48, 49, 51-54, 61-64, 67-72 и 75-76 представляют собой ORF,

кодирующие гены, или белки (или их части), или плазмиды, определенные в таблице 1.

		Таблица 1 Краткое изложение SEQ ID NO нуклеиновых кислот и белков	
	Описание и сокращение	Нуклеиновая кислота SEQ ID NO.	Белок SEQ ID NO.
5	Дельта-5-десатураза <i>Euglena gracilis</i> («EgD5»)	1 (1350 п.о.)	2 (449 АК)
10	Синтетическая дельта-5-десатураза, происходящая из <i>Euglena gracilis</i> , оптимизированная в отношении кодонов для экспрессии в <i>Yarrowia lipolytica</i> («EgD5S»)	3 (1350 п.о.)	2 (449 АК)
	Фрагмент EgD5 <i>Euglena gracilis</i> в pT-F10-1	4 (590 п.о.)	5 (196 АК)
15	Фрагмент EgD5 <i>Euglena gracilis</i> в pT-EgD5-5'C2	6 (797 п.о.)	-
	5' последовательность EgD5 <i>Euglena gracilis</i> , родственная SEQ ID NO: 4	7 (559 п.о.)	-
	Фрагмент EgD5 <i>Euglena gracilis</i> в pT-EgD5-5'2 nd	8 (273 п.о.)	-
20	5' последовательность EgD5 <i>Euglena gracilis</i> , родственная SEQ ID NO: 6	9 (20 п.о.)	-
	Фрагмент EgD5 <i>Euglena gracilis</i> в pT-EgD5-3'	10 (728 п.о.)	-
	3' последовательность EgD5 <i>Euglena gracilis</i> , родственная SEQ ID NO: 4	11 (464 п.о.)	-
25	Дельта-5-десатураза <i>Pythium irregulare</i> (№ доступа в GenBank - AAL13311)	-	12 (456 АК)
	Дельта-5-десатураза <i>Phytophthora megasperma</i> (№ доступа в GenBank - CAD53323)	-	13 (477 АК)
30	Дельта-5-десатураза <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (№ доступа в GenBank - AAL92562)	-	14 (469 АК)
	Дельта-5-десатураза <i>Dictyostelium discoideum</i> (№ доступа в GenBank - XP_640331)	-	15 (467 АК)
35	Дельта-8-десатураза <i>Euglena gracilis</i> (публикации PCT-заявок № WO 2006/012325 и WO 2006/012326)	-	16 (421 АК)
	Дельта-8-десатураза <i>Pavlova lutheri</i> (CCMP459)	17 (1269 п.о.)	18 (423 АК)
	Консервативный район 1	-	19 (7 АК)
40	Консервативный район 2	-	20 (7 АК)
	Дельта-8-десатураза сфинголипидов <i>Thalassiosira pseudonana</i> (№ доступа в GenBank - AAX14502)	-	21 (476 АК)
45	Плазмида pZUF17	22 (8165 п.о.)	-
	Плазмида pDMW367	23 (8438 п.о.)	-
	Плазмида pKUNF12T6E	24 (12649 п.о.)	-
50	Синтетический ген C _{18/20} -элонгазы, происходящий из <i>Thraustochytrium aureum</i> (патент США № 6677145), оптимизированный в отношении кодонов для экспрессии в <i>Yarrowia lipolytica</i> («EL2S»)	25 (819 п.о.)	26 (272 АК)

	Плазмида pEgD5S	48 (4070 п.о.)	-
	Плазмида pDMW369	49 (8438 п.о.)	-
5	Дельта-6-десатураза жирных кислот <i>Rhizopus stolonifer</i> (NCBI № доступа - AAX22052)	-	51 (459 AK)
	Дельта-8-десатураза <i>Pavlova lutheri</i> - часть вставки кДНК из клона eps1c.pk002.f22 (5'-конец вставки кДНК)	52 (695 п.о.)	-
10	Дельта-8-десатураза <i>Pavlova lutheri</i> - полностью секвенированная EST eps1c.pk002.f22:fis (полная последовательность вставки)	53 (1106 п.о.)	-
15	Дельта-8-десатураза <i>Pavlova lutheri</i> - трансляция нуклеотидов 1-864 полностью секвенированной EST eps1c.pk002.f22:fis (полной последовательности вставки; SEQ ID NO:53)	-	54 (287 AK)
	Дельта-8-десатураза <i>Pavlova lutheri</i> - полная 5'-концевая последовательность от прогулки по геному	61 (1294 п.о.)	-
20	Дельта-8-десатураза <i>Pavlova lutheri</i> - собранная последовательность	62 (1927 п.о.)	-
	Дельта-6-десатураза жирных кислот <i>Rhizopus stolonifer</i> (NCBI № доступа - ABB96724)	-	63 (459 AK)
25	Дельта-8-десатураза <i>Pavlova salina</i>	-	64 (427 AK)
	Дельта-5-десатураза <i>Mortierella alpina</i>	67 (1338 п.о.)	66 (446 AK)
	Плазмида pY5-22	69 (6473 п.о.)	-
30	Плазмида pY5-22GPD	70 (6970 п.о.)	-
	Промотор глицеральдегид-3- фосфат-дегидрогеназы <i>Yarrowia lipolytica</i> (GPD)	71 (968 п.о.)	-
	Плазмида PYZDE2-S	72 (8630 п.о.)	-
35	Плазмида PKR136	75 (6339 п.о.)	-
	Плазмида pY98	76 (8319 п.о.)	-
	Дельта-9-элонгаза <i>Euglena gracilis</i> («EgD9e»)	77 (774 п.о.)	-
40	Дельта-8-десатураза <i>Euglena gracilis</i> («EgD8»)	78 (1263 п.о.)	-
	Плазмида pKR906	81 (4311 п.о.)	-
	Плазмида pKR72	82 (7085 п.о.)	-
45	Плазмида pKS102	83 (2540 п.о.)	-
	Плазмида pKR197	84 (4359 п.о.)	-
	Плазмида pKR911	85 (5147 п.о.)	-
50	Плазмида pKR680	86 (6559 п.о.)	-
	Плазмида pKR913	87 (9014 п.о.)	-
	Плазмида pKR767	88 (5561 п.о.)	-

5	Плазмида pKR916	89 (11889 п.о.)	-
	Плазмида pKR974	90 (5661 п.о.)	-
	Плазмида pKR1032	91 (5578 п.о.)	-
	Плазмида pKR1037	92 (11907 п.о.)	-
	Плазмида pKR328	93 (8671 п.о.)	-
10	Дельта-5-десатураза <i>Saprolegnia diclina</i> («SdD5»)	94 (1413 п.о.)	-

SEQ ID NO: 27-30 соответствуют вырожденным олигонуклеотидным праймерам 5-1A, 5-1B, 5-1C и 5-1D соответственно, которые кодируют консервативный район 1.

15 SEQ ID NO: 31-34 соответствуют вырожденным олигонуклеотидным праймерам 5-5AR, 5-5BR, 5-5CR и 5-5DR соответственно, которые кодируют консервативный район 2.

SEQ ID NO: 35-40 соответствуют праймерам ODMW480, CDSIII 5', ODMW479, DNR CDS 5', YL791 и YL792 соответственно, используемым для 5'-RAGE.

20 SEQ ID NO: 41-43 соответствуют праймерам ODMW469, AUAP и ODMW470, соответственно, используемым для 3'-RAGE.

SEQ ID NO: 44-47 соответствуют праймерам YL794, YL797, YL796 и YL795 соответственно, используемым для амплификации полноразмерной кДНК EgD5.

25 SEQ ID NO: 50 соответствует праймеру T7, используемому для секвенирования библиотеки кДНК *Pavlova lutheri* (CCMP459).

SEQ ID NO: 55 и 56 соответствуют праймерам SeqE и SeqW соответственно, используемым для секвенирования клонов *Pavlova lutheri* (CCMP459).

30 SEQ ID NO: 57 и 58 соответствуют универсальному праймеру AP1 и праймеру GSP PvDES соответственно, используемым для амплификации геномной ДНК *Pavlova lutheri* (CCMP459).

SEQ ID NO: 59 и 60 соответствуют праймерам M13-28Rev и PavDESseq соответственно, используемым для секвенирования геномных вставок *Pavlova lutheri* (CCMP459).

35 SEQ ID NO: 65 и 66 соответствуют праймеру AP и олигонуклеотидному праймеру Smart IV соответственно, используемым для синтеза кДНК *Pavlova lutheri*.

SEQ ID NO: 73 и 74 соответствуют праймерам GPDsense и GPDantisense соответственно, используемым для амплификации промотора GPD.

40 SEQ ID NO: 79 и 80 соответствуют праймерам oEugEL1-1 и oEugEL1-2 соответственно, используемым для амплификации дельта-9-элонгазы *Euglena gracilis* (EgD9e).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

45 Все упоминаемые здесь патенты, заявки на патенты и публикации полностью включаются в настоящее описание посредством ссылки. Они, в частности, включают следующие находящиеся в процессе одновременного рассмотрения заявки правопреемников заявителей: патент США № 7125672, патент США № 7189559, патент США № 7192762, патент США № 7198937, патент США № 7202356, заявки на патенты США № 10/840579 и № 10/840325 (поданные 6 мая 2004), заявку на патент 50 США № 10/869630 (поданную 16 июня 2004), заявку на патент США № 10/882760 (поданную 1 июля 2004), заявки на патенты США № 10/985254 и № 10/985691 (поданные 10 ноября 2004), заявку на патент США № 11/024544 (поданную 29

декабря 2004), заявку на патент США № 11/166993 (поданную 24 июня 2005), заявку на патент США № 11/183664 (поданную 18 июля 2005), заявку на патент США № 11/185301 (поданную 20 июля 2005), заявку на патент США № 11/190750 (поданную 27 июля 2005), заявку на патент США № 11/198975 (поданную 8 августа 2005), заявку на патент США № 11/225354 (поданную 13 сентября 2005), заявку на патент США № 11/253882 (поданную 19 октября 2005), заявки на патенты США № 11/264784 и № 11/264737 (поданные 1 ноября 2005), заявку на патент США № 11/265761 (поданную 2 ноября 2005), заявку на патент США № 11/737772 (поданную 20 апреля 2007), заявку на патент США № 11/787772 (поданную 17 апреля 2007), заявку на патент США № 11/740298 (поданную 26 апреля 2007), заявки на патенты США № 60/801172 и № 60/801119 (поданные 17 мая 2006), заявку на патент США № 60/853563 (поданную 23 октября 2006), заявку на патент США № 60/855177 (поданную 30 октября 2006), заявки на патенты США № 11/601563 и № 11/601564 (поданные 16 ноября 2006), заявку на патент США № 11/635258 (поданную 7 декабря 2006), заявку на патент США № 11/613420 (поданную 20 декабря 2006), заявку на патент США № 60/909790 (поданную 3 апреля 2007), заявку на патент США № 60/911925 (поданную 16 апреля 2007), заявку на патент США № 60/910831 (поданную 10 апреля 2007) и заявку на патент США № 60/915733 (BB1614) (поданную 3 мая 2007). Они, кроме того, включают следующие находящиеся в процессе одновременного рассмотрения заявки правопреемников заявителей: публикацию заявки на патент № 2005/0136519, касающуюся продукции PUFA в растениях, и патент США № 7129089, касающийся промотора аннексина и его применения для экспрессии трансенов в растениях.

Как используются в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают формы множественного числа, если только из контекста ясно следует иное. Таким образом, например, ссылка на «растение» включает множество таких растений, ссылка на «клетку» включает одну или несколько клеток и их эквивалентов, известных квалифицированным в данной области техники специалистам, и т.д.

В соответствии с данным изобретением авторы идентифицируют новый фермент дельта-5-десатуразу *Euglena gracilis* и ген, кодирующий этот фермент, который можно использовать для манипуляции биохимическими путями для получения целебных PUFA. Таким образом, данное изобретение находит множество применений.

Полученные с помощью раскрытой здесь методологии PUFA, или их производные, можно использовать в качестве диетических заместителей, или добавок, в частности, составов для детей младшего возраста, для пациентов, подвергаемых внутривенному кормлению, или для профилактики или лечения нарушения питания. В альтернативном случае очищенные PUFA (или их производные) можно включить в кулинарные масла, жиры или маргарины, приготовленные так, что при стандартном использовании реципиент будет получать желаемое количество для добавки к рациону. PUFA можно также включить в составы для детей младшего возраста, дополнения к питанию или другие пищевые продукты, и они могут найти применение в качестве противовоспалительных или понижающих холестерин агентов. Необязательно композиции могут использоваться для фармацевтического применения (для человека или ветеринарного).

Дополнение рационов людей или животных PUFA, получаемых рекомбинантным способом, может привести к увеличению уровней добавленных PUFA, а также

продуктов их метаболизма. Например, лечение ЕРА может привести не только к увеличению уровней ЕРА, но также нижеследующих продуктов ЕРА, таких как эйкозаноиды (т.е. простагландины, лейкотриены, тромбоксаны). Сложные регуляторные механизмы могут сделать желательным объединение различных PUFA или добавление различных конъюгатов PUFA для того, чтобы предотвратить, контролировать или преодолеть такие механизмы для достижения желаемых уровней конкретных PUFA у индивидуума.

Определения

В настоящем описании используется ряд терминов и сокращений.

Предоставляются следующие определения.

«Открытая рамка считывания» - сокращенно ORF.

«Полимеразная цепная реакция» - сокращенно ПЦР.

«Американская коллекция типовых культур» - сокращенно ATCC.

«Полиненасыщенная жирная кислота(ы)» - сокращенно PUFA.

«Триацилглицерины» - сокращенно TAG.

Используемый здесь термин «изобретение» или «настоящее изобретение», как предусматривается, не ограничивается каким-либо одним конкретным вариантом осуществления по настоящему изобретению, а применяется обычно к любому и всем вариантам осуществления по настоящему изобретению, охарактеризованным в формуле изобретения и описании.

Термин «жирные кислоты» относится к длинноцепочечным алифатическим кислотам (алкановым кислотам) с варьирующими длинами цепей, от приблизительно C_{12} до C_{22} (хотя известны кислоты как с более длинными, так и более короткими цепями). Преобладающие длины цепей находятся между C_{16} и C_{22} . Структура жирных кислот представляется с помощью простой системы обозначений «X:Y», где X представляет собой общее число атомов углерода (C) в конкретной жирной кислоте, а Y представляет собой число двойных связей. Дополнительные детали, касающиеся дифференциации между «насыщенными жирными кислотами» и «ненасыщенными жирными кислотами», между «мононенасыщенными жирными кислотами» и «полиненасыщенными жирными кислотами» (или «PUFA») и между «жирными кислотами омега-6» (омега-6 или n-6) и «жирными кислотами омега-3» (омега-3 или n-3), предоставлены в публикации заявки на патент США № 2005/0136519.

Жирные кислоты описываются здесь с помощью простой системы обозначений «X:Y», где X представляет собой общее число атомов углерода (C) в конкретной жирной кислоте, а Y представляет собой число двойных связей. Число, следующее за обозначением жирной кислоты, указывает положение двойной связи от карбоксильного конца жирной кислоты с аффиксом «с» для цис-конфигурации двойной связи (например, пальмитиновая кислота (16:0), стеариновая кислота (18:0), олеиновая кислота (18:1, 9с), петроселиновая кислота (18:1, 6с), LA (18:2, 9с, 12с), GLA (18:3, 6с, 9с, 12с) и ALA (18:3, 9с, 12с, 15с). Если не указано иное, 18:1, 18:2 и 18:3 относятся к олеиновой кислоте, LA и ALA соответственно. Если специально не написано иное, предполагается, что двойные связи находятся в цис-конфигурации. Например, предполагается, что двойные связи в 18:2 (9,12) находятся в цис-конфигурации.

Номенклатура, используемая для описания PUFA в настоящем описании, продемонстрирована ниже в таблице 2. В колонке, озаглавленной «Сокращенное обозначение», используется ссылочная омега-система для указания числа атомов

углерода, числа двойных связей и положение двойной связи, ближайшей к омега-углероду, считая от омега-углерода (которому присваивают номер 1 для этой цели). В остальной части таблицы суммируются общепринятые названия жирных кислот омега-3 и омега-6 и их предшественников, сокращения, которые будут использоваться на протяжении описания, и химическое название каждого соединения.

Таблица 2 Номенклатура полиненасыщенных жирных кислот и предшественников			
Общепринятое название	Сокращение	Химическое название	Сокращенное обозначение
Миристиновая	-	Тетрадекановая	14:0
Пальмитиновая	пальмитат	Гексадекановая	16:0
Пальмитолеиновая	-	9-гексадеценная	16:1
Стеариновая	-	Октадекановая	18:0
Олеиновая	-	цис-9-октадеценная	18:1
Линолевая	LA	цис-9,12-октадекадиеновая	18:2 омега-6
γ-Линолевая	GLA	цис-6,9,12-октадекатриеновая	18:3 омега-6
Эйкозодиеновая	EDA	цис-11,14-эйкозодиеновая	20:2 омега-6
Дигомо-γ-линолевая	DGLA	цис-8,11,14-эйкозатриеновая	20:3 омега-6
Арахидоновая	ARA	цис-5,8,11,14-эйкозатетраеновая	20:4 омега-6
α-Линоленовая	ALA	цис-9,12,15-октадекатриеновая	18:3 омега-6
Стеаридоновая	STA	цис-6,9,12,15-октадекатетраеновая	18:4 омега-3
Эйкозатриеновая	ETra или ERA	цис-11,14,17-эйкозатриеновая	20:3 омега-3
Сциадоновая	SCI	цис-5,11,14-эйкозатриеновая	20:3b омега-6
Юнипероновая	JUP	цис-5,11,14,17-эйкозатетраеновая	20:4b омега-3
Эйкозатетраеновая	ETA	цис-8,11,14,17-эйкозатетраеновая	20:4 омега-3
Эйкозапентаеновая	EPA	цис-5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая	20:5 омега-3
Докозапентаеновая	DPA	цис-7,10,13,16,19-докозапентаеновая	22:5 омега-3
Докозагексаеновая	DHA	цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая	22:6 омега-3

Термины «триацилглицерин», «масло» или «TAG» относятся к нейтральным липидам, состоящим из трех ацильных остатков жирных кислот, этерифицированных до молекулы глицерина (и такие термины будут использоваться здесь взаимозаменяемо на протяжении описания по настоящему изобретению). Такие масла могут содержать длинноцепочечные PUFA, а также более короткие насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты и насыщенные жирные кислоты с более длинными цепями. Таким образом, «биосинтез масла», как правило, относится к синтезу TAG в клетке.

«Процент (%) PUFA в общей липидной и масляной фракциях» относится к проценту PUFA относительно жирных кислот в целом в этих фракциях. Термин «общая липидная фракция» или «липидная фракция» относится к сумме всех липидов (т.е. нейтральных и полярных) в содержащем или продуцирующем масле организме, включая, таким образом, те липиды, которые находятся в

фосфатидилхолиновой (PC) фракции, фосфатидилэтаноламиновой (PE) фракции и триацилглицериновой (TAG или масляной) фракции. Однако термины «липид» и «масло» будут использоваться взаимозаменяемо на протяжении этого описания.

Метаболический путь или биосинтетический путь, в биохимическом смысле, можно рассматривать как ряд химических реакций, происходящих в клетке, катализируемых ферментами, с достижением или образованием метаболического продукта, используемого или сохраняемого клеткой, или инициации другого метаболического пути (затем называемой этапом создания потока). Многие из этих путей являются сложными и включают модификацию шаг за шагом первоначального вещества с формированием продукта, имеющего точную химическую структуру, которая является желаемой.

Термин «путь биосинтеза PUFA» относится к метаболическому процессу, который превращает олеиновую кислоту в LA, EDA, GLA, DGLA, ARA, ALA, STA, ETrA, ETA, EPA, DPA и DHA. Этот процесс хорошо описан в литературе (например, смотри публикацию PCT-заявки № WO 2006/052870). Вкратце, в этот процесс вовлечена элонгация углеродной цепи благодаря добавлению атомов углерода и уменьшения насыщенности молекулы благодаря добавлению двойных связей, с помощью ряда специальных ферментов уменьшения насыщенности и элонгации (т.е. «ферментов пути биосинтеза PUFA»), присутствующих в мембране эндоплазматического ретикулума. Более конкретно «ферменты пути биосинтеза PUFA» относятся к любому из следующих ферментов (и генов, которые кодируют указанные ферменты), связанных с биосинтезом PUFA, включающих дельта-4-десатуразу, дельта-5-десатуразу, дельта-6-десатуразу, дельта-12-десатуразу, дельта-15-десатуразу, дельта-17-десатуразу, дельта-9-десатуразу, дельта-8-десатуразу, дельта-9-элонгазу, C_{14/16}-элонгазу, C_{16/18}-элонгазу, C_{18/20}-элонгазу и C_{20/22}-элонгазу.

Термин «путь биосинтеза жирных кислот омега-3/омега-6» относится к множеству генов, которые при экспрессии в соответствующих условиях кодируют ферменты, которые катализируют продукцию одной из двух или обеих жирных кислот омега-3 и омега-6. Как правило, гены, вовлеченные в путь биосинтеза жирных кислот омега-3/омега-6, кодируют ферменты пути биосинтеза PUFA. На фиг. 1 проиллюстрирован характерный путь, обеспечивающий превращение миристиновой кислоты через различные промежуточные химические соединения в DHA, который демонстрирует, каким образом обе жирные кислоты омега-3 и омега-6 могут быть продуцированы из общего источника. В природе путь делится на две части, причем одна часть будет создавать жирные кислоты омега-3, а другая часть - только жирные кислоты омега-6. Та часть, которая создает только жирные кислоты омега-3, будет упоминаться здесь как путь биосинтеза жирных кислот омега-3, в то время как та часть, которая создает только жирные кислоты омега-6, будет упоминаться здесь как путь биосинтеза жирных кислот омега-6.

Термин «функциональный», используемый здесь в контексте с путем биосинтеза жирных кислот омега-3/омега-6, означает, что некоторые (или все) гены в этом пути экспрессируют активные ферменты, приводящие к *in vivo* катализу или превращению субстрата. Следует понимать, что термин «путь биосинтеза жирных кислот омега-3/омега-6» или «функциональный путь биосинтеза жирных кислот омега-3/омега-6» не подразумевает, что необходимы все гены, перечисленные в вышеприведенном параграфе, поскольку для ряда продуктов жирных кислот будет только необходима экспрессия подмножества генов этого пути.

Термин «путь с участием дельта-6-десатуразы/дельта-6-элонгазы» относится к

пути биосинтеза PUFA, который минимально включает по меньшей мере одну дельта-6-десатуразу и по меньшей мере одну $C_{18/20}$ -элонгазу, делая, таким образом, возможным биосинтез DGLA и/или ETA из LA и ALA соответственно с GLA и/или STA в качестве промежуточных жирных кислот. При экспрессии других десатураз и элонгаз могут также синтезироваться ARA, EPA, DPA и DHA.

Термин «путь с участием дельта-9-элонгазы/дельта-8-десатуразы» относится к пути биосинтеза PUFA, который минимально включает по меньшей мере одну дельта-9-элонгазу и по меньшей мере одну дельта-8-десатуразу, делая, таким образом, возможным биосинтез DGLA и/или ETA из LA и ALA соответственно с EDA и/или ETrA в качестве промежуточных жирных кислот. При экспрессии других десатураз и элонгаз могут также синтезироваться ARA, EPA, DPA и DHA.

Термин «промежуточная жирная кислота» относится к любой жирной кислоте, продуцируемой в пути метаболизма жирных кислот, которая может далее превратиться в намеченный продукт в виде жирной кислоты в этом пути под действием других ферментов метаболического пути. Например, когда продуцируется EPA с использованием пути с участием дельта-9-элонгазы/дельта-8-десатуразы, могут продуцироваться EDA, ETrA, DGLA, ETA и ARA, которые считаются «промежуточными жирными кислотами», поскольку эти жирные кислоты могут далее превратиться в EPA под действием других ферментов метаболического пути.

Термин «побочная жирная кислота» относится к любой жирной кислоте, продуцируемой в пути метаболизма жирных кислот, которая не является ни намеченным продуктом этого пути, ни «промежуточной жирной кислотой» этого пути. Например, когда продуцируется EPA с использованием пути с участием дельта-9-элонгазы/дельта-8-десатуразы, могут также продуцироваться сциадоновая кислота (SCI) и юнипероновая кислота (JUP) под действием дельта-5-десатуразы или на EDA, или на ETrA соответственно. Считается, что они являются «побочными жирными кислотами», поскольку ни одна из них не может далее превратиться в EPA под действием других ферментов метаболического пути.

Термин «десатураза» относится к полипептиду, который может десатурировать, т.е. вводить двойную связь в одну или несколько жирных кислот с получением представляющей интерес жирной кислоты или предшественника. Несмотря на использование ссылочной омега-системы на протяжении описания для ссылки на конкретные жирные кислоты, более удобно указывать активность десатуразы, ведя счет с карбоксильного конца субстрата с использованием дельта-системы. Особый интерес здесь представляют дельта-5-десатуразы, которые катализируют превращение DGLA в ARA и/или ETA в EPA. Другие десатуразы включают: 1) дельта-17-десатуразы, которые десатурируют жирную кислоту между 17 и 18 атомами углерода, пронумерованными с концевой карбоксильной группы молекулы, и которые, например, катализируют превращение ARA в EPA и/или DGLA в ETA; 2) дельта-6-десатуразы, которые катализируют превращение LA в GLA и/или ALA в STA; 3) дельта-12-десатуразы, которые катализируют превращение олеиновой кислоты в LA; 4) дельта-15-десатуразы, которые катализируют превращение LA в ALA и/или GLA в STA; 5) дельта-4-десатуразы, которые катализируют превращение DPA в DHA; 6) дельта-8-десатуразы, которые катализируют превращение EDA в DGLA и/или ETrA в ETA; и 7) дельта-9-десатуразы, которые катализируют превращение пальмитата в пальмитолеиновую кислоту (16:1) и/или стеарата в олеиновую кислоту. В данной области техники дельта-15- и дельта-17-десатуразы также иногда упоминаются как «омега-3-десатуразы», «w-3-

десатуразы» и/или «омега-3-десатуразы» на основе их способности превращать жирные кислоты омега-6 в их аналоги омега-3 (т.е. превращать LA в ALA и ARA в EPA соответственно). В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению особенно желательно эмпирически определить специфичность конкретной десатуразы жирной кислоты с помощью трансформации подходящего хозяина геном для десатуразы жирной кислоты и определения ее эффекта на профиль жирных кислот хозяина.

Термин «дельта-5-десатураза» относится к ферменту, который десатурирует жирную кислоту между пятым и шестым атомами углерода, пронумерованными с концевое карбоксильного конца молекулы. Предпочтительно дельта-5-десатураза превращает дигомо-гамма-линоленовую кислоту [20:3, DGLA] в арахидоновую кислоту [20:4, ARA] или превращает эйкозатетраеновую кислоту [20:4, ETA] в эйкозапентаеновую кислоту [20:5, EPA].

Для целей по настоящему изобретению термин «EgD5» относится к ферменту дельта-5-десатуразе (SEQ ID NO: 2), выделенной из *Euglena gracilis*, кодируемой SEQ ID NO: 1 здесь. Аналогично термин «EgD5S» относится к синтетической дельта-5-десатуразе, происходящей из *Euglena gracilis*, которая оптимизирована в отношении кодонов для экспрессии в *Yarrowia lipolytica* (т.е. SEQ ID NO: 3 и 2).

Термины «эффективность превращения» и «процент превращения субстрата» относятся к эффективности, с которой конкретный фермент (например, десатураза) может превращать субстрат в продукт. Эффективность превращения определяют по следующей формуле: $([\text{продукт}]/[\text{субстрат} + \text{продукт}]) \times 100$, где продукт включает непосредственный продукт и все продукты в пути, происходящие из него.

Термин «элонгаза» относится к полипептиду, который может удлинять углеродную цепь жирной кислоты с получением кислоты, которая длиннее на 2 углерода субстрата в виде жирной кислоты, на который действует элонгаза.

Механизм этого процесса элонгации является многоступенчатым, связанным с синтазой жирных кислот, как описано в публикации заявки на патент США № 2005/0132442. Примерами реакций, катализируемых системами элонгаз, являются превращение GLA в DGLA, STA в ETA и EPA в DPA. Обычно субстратная избирательность элонгаз является довольно широкой, но разделяется как по длине цепи, так и по степени и типу ненасыщенности. Например, C_{14/16}-элонгаза будет использовать C₁₄ субстрат (например, миристиновую кислоту), C_{16/18}-элонгаза будет использовать C₁₆ субстрат (например, пальмитат), C_{18/20}-элонгаза (также известная как дельта-6-элонгаза, поскольку термины могут использоваться взаимозаменяемо) будет использовать C₁₈ субстрат (например, GLA, STA), и C_{20/22}-элонгаза будет использовать C₂₀ субстрат (например, EPA). Подобным образом, дельта-9-элонгаза способна катализировать превращение LA и ALA в EDA и ETrA соответственно. Важно отметить, что некоторые элонгазы имеют широкую специфичность, и, следовательно, один фермент может быть способен катализировать несколько реакций элонгазы (например, действуя как в качестве C_{16/18}-элонгазы, так и в качестве C_{18/20}-элонгазы).

Термин «содержащие или продуцирующие масло» относится к таким организмам, которые имеют тенденцию запасать свой энергетический источник в форме липида (Weete, In: Fungal Lipid Biochemistry, 2nd Ed., Plenum, 1980). Термин «содержащие или продуцирующие масло дрожжи» относится к таким организмам, отнесенным к дрожжам, которые могут продуцировать масло. Как правило, содержание масла или TAG в клетке содержащих или продуцирующих масло

микроорганизмов следует сигмоидальной кривой, причем концентрация липида увеличивается до достижения максимума в поздней логарифмической или ранней стационарной фазе роста и затем постепенно снижается во время поздней стационарной фазы и фазы гибели (Yongmanitchai and Ward, Appl. Environ. Microbiol., 57: 419-25 (1991)). Для содержащих или продуцирующих масло микроорганизмов не является необычной аккумуляция избытка, составляющего приблизительно 25% их сухого клеточного веса, в виде масла. Примеры содержащих или продуцирующих масло дрожжей включают, но без ограничения, следующие роды: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* и *Lipomyces*.

Термин «Euglenophyceae» относится к группе одноклеточных бесцветных или фотосинтетических жгутиковых, обнаруживаемых живущими в пресноводном, морском, почвенном и паразитическом окружениях. Класс характеризуется одиночными клетками, причем большинство из них являются свободноплавающими и имеют два жгутика (один из которых может быть не аварийным), возникающих из передней инвагинации, известной как вместилище. Фотосинтетические жгутиковые содержат от одной до множества хлоропластов, которые варьируют от небольших дисков до увеличенных в объеме пластин или лент. Бесцветные жгутиковые зависят от осмотрофии или фаготрофии для усвоения пищи. Приблизительно 1000 видов было идентифицировано или отнесено к приблизительно 40 родам и 6 порядкам. Примеры Euglenophyceae включают, но без ограничения, следующие роды: *Euglena*, *Eutreptiella* и *Tetruetrepia*.

Термин «консервативная замена аминокислоты» относится к замене аминокислотного остатка в данном белке другой аминокислотой без изменения химической или функциональной природы этого белка. Например, в данной области техники хорошо известно, что изменения в гене, которые приводят к продукции химически эквивалентной аминокислоты в данном сайте (но которые не оказывают влияние на структурные и функциональные свойства кодируемого, уложенного белка), являются общепринятыми. Для целей по настоящему изобретению «консервативные замены аминокислот» определяются как замены в пределах одной из следующих пяти групп:

- 1) небольших алифатических, неполярных или слабополярных остатков: Ala[A], Ser[S], Thr[T] (Pro[P], Gly[G]);
- 2) полярных, отрицательно заряженных остатков и их амидов: Asp[D], Asn[N], Glu[E], Gln[Q];
- 3) полярных, положительно заряженных остатков: His[H], Arg[R], Lys[K];
- 4) больших алифатических, неполярных остатков: Met[M], Leu[L], Ile[I], Val[V] (Cys[C]); и
- 5) больших ароматических остатков: Phe[F], Tyr[Y], Trp[W].

Консервативные аминокислотные замены обычно сохраняют 1) структуру остова полипептида в области замены; 2) заряд или гидрофобность молекулы в целевом сайте; или 3) большую часть боковой цепи. Кроме того, во многих случаях также не ожидается, что изменения N-концевой и C-концевой частей молекулы белка приведут к изменению активности белка.

Как здесь используется, «нуклеиновая кислота» означает полинуклеотид и включает одно- или двухцепочечный полимер из дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных оснований. Нуклеиновые кислоты могут также включать фрагменты и модифицированные нуклеотиды. Таким образом, термины «полинуклеотид», «последовательность нуклеиновой кислоты», «нуклеотидная

последовательность» или «фрагмент нуклеиновой кислоты» используются взаимозаменяемо и означают полимер РНК или ДНК, который является одно- или двухцепочечным, необязательно содержащим синтетические, неприродные или измененные нуклеотидные основания. На нуклеотиды (обычно обнаруживаемые в их 5'-монофосфатной форме) ссылаются с помощью обозначения одной буквой следующим образом: «А» для аденилата или дезоксиаденилата (для РНК или ДНК соответственно), «С» для цитидилата или дезоксцитидилата, «G» для гуанилата или дезоксигуанилата, «U» для уридилата, «Т» для дезокситимидилата, «R» для пуринов (А или G), «Y» для пиримидинов (С или Т), «K» для G или Т, «H» для А или С или Т, «I» для инозина и «N» для любого нуклеотида.

Термины «субфрагмент, являющийся функционально эквивалентным» и «функционально эквивалентный субфрагмент» используются здесь взаимозаменяемо. Эти термины относятся к части или подпоследовательности выделенного фрагмента нуклеиновой кислоты, в которой способность изменять экспрессию гена или порождать определенный фенотип сохраняется независимо от того, кодирует ли фрагмент или подфрагмент активный фермент или нет. Например, фрагмент или субфрагмент можно использовать для конструирования химерных генов для получения желаемого фенотипа в трансформированном растении. Химерные гены можно создать для использования в супрессии с помощью связывания фрагмента нуклеиновой кислоты или его субфрагмента, независимо от того, кодирует ли он активный фермент или нет, в смысловой или антисмысловой ориентации относительно последовательности промотора растения.

Термин «консервативный домен» или «мотив» означает совокупность аминокислот, являющихся консервативными в специфических положениях вдоль выровненной последовательности эволюционно родственных белков. Хотя аминокислоты в других положениях могут варьировать между гомологичными белками, аминокислоты, являющиеся в высокой степени консервативными в специфических положениях, указывают аминокислоты, являющиеся существенными для структуры, стабильности или активности белка. Поскольку их идентифицируют по их высокой степени консервативности в выровненных последовательностях семейства белков-гомологов, их можно использовать в качестве идентификаторов или «характерных признаков» для определения того, принадлежит ли белок с недавно определенной последовательностью семейству ранее идентифицированных белков.

Термины «гомология», «гомологичный», «в значительной степени схожий» или «соответствующий в значительной степени» используются здесь взаимозаменяемо. Они относятся к фрагментам нуклеиновых кислот, в которых замены одного или нескольких нуклеотидных оснований не нарушают способность фрагмента нуклеиновой кислоты опосредовать экспрессию гена или порождать определенный фенотип. Эти термины также относятся к модификациям фрагментов нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, таким как делеция или вставка одного или нескольких нуклеотидов, не изменяющих в значительной степени функциональных свойств результирующего фрагмента нуклеиновой кислоты относительно первоначального, немодифицированного фрагмента. Поэтому понятно, как это понятно квалифицированным в данной области техники специалистам, что настоящим изобретением охватываются не только конкретные, приведенные в качестве примеров последовательности.

Кроме того, квалифицированный специалист знает, что в значительной степени

схожие последовательности нуклеиновых кислот, охватываемые настоящим изобретением, также определяются по их способности гибридизоваться (в умеренно жестких условиях (например, в 0,5X SSC, 0,1% SDS при 60°C)) с последовательностями, приведенными здесь в качестве примеров, или с любой частью нуклеотидных последовательностей, раскрытых здесь, и функционально эквивалентны любой из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых здесь. Для скринирования от умеренно схожих фрагментов, таких как гомологичные последовательности из отдаленно родственных организмов, до в высокой степени схожих фрагментов, таких как гены, дублирующие функциональные ферменты из близкородственных организмов, условия жесткости можно отрегулировать. Условия жесткости определяют промывки после гибридизации.

Термин «избирательно гибридизуется» включает ссылку на гибридизацию, в жестких условиях гибридизации, последовательности нуклеиновой кислоты с точно установленной последовательностью нуклеиновой кислоты-мишенью в явно большей степени (например, в по меньшей мере 2 раза выше фона), чем степень ее гибридизации с не являющейся мишенью последовательностью нуклеиновой кислоты, и на значительное исключение не являющихся мишенями нуклеиновых кислот. Избирательно гибридизующиеся последовательности, как правило, идентичны на по меньшей мере 80% или 90%, вплоть до и включительно 100% (т.е. полностью комплементарны) друг с другом.

Термин «жесткие условия» или «жесткие условия гибридизации» включают ссылку на условия, при которых зонд избирательно гибридизуется со своей последовательностью-мишенью. Жесткие условия зависят от последовательности и будут различными при различных обстоятельствах. Путем контролирования жесткости гибридизации и/или условий промывок, можно идентифицировать последовательности-мишени, которые комплементарны на 100% зонду (гомологичное зондирование). В альтернативном случае жесткие условия можно установить так, чтобы сделать возможной некоторое несоответствие последовательностей, так что определяется меньшая степень схожести (гетерологичное зондирование). Как правило, размер зонда составляет приблизительно 1000 нуклеотидов, необязательно менее 500 нуклеотидов.

Как правило, жесткие условия будут такими условиями, при которых концентрация соли составляет менее приблизительно 1,5 М ионов Na, обычно приблизительно 0,01-1,0 М концентрация ионов Na (или других солей), при pH 7,0-8,3, а температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, из 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (например, из более 50 нуклеотидов). Жестких условий можно также достигнуть добавлением дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Примеры условий низкой жесткости включают гибридизацию с использованием буферного раствора, включающего 30-35% формамида, 1M NaCl, 1% SDS (натрия додецилсульфата), при 30°C и промывку в 1X-2X SSC (20X SSC = 3,0 M NaCl/0,3 M тринатрия цитрат) при 50-55°C. Примеры условий средней жесткости включают гибридизацию в 40-45% формамида, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,5X-1X SSC при 55-60°C. Примеры условий высокой жесткости включают гибридизацию в 50% формамида, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1X SSC при 60-65°C.

Специфичность, как правило, функционально зависит от промывок после гибридизации, при этом решающими факторами являются ионная сила и температура конечного промывочного раствора. Для гибридов ДНК:ДНК T_m можно

аппроксимировать из уравнения Meinkoth и др. (Anal. Biochem. 138: 267-284 (1984)): $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - 0,61 (\% \text{ формамида}) - 500/L$, где M представляет собой молярность одновалентных катионов, % G+C представляет собой процент нуклеотидов, включающих гуанозин и цитозин, в ДНК; % формамида представляет собой % формамида в растворе для гибридизации, и L представляет собой длину гибрида в парах оснований. T_m представляет собой температуру (при точно определенных ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной последовательности-мишени гибридизуется с полностью соответствующим зондом. T_m уменьшают на приблизительно 1°C для каждого 1% несовпадений; таким образом, T_m , условия гибридизации и/или промывок можно установить для гибридизации с последовательностями желаемой идентичности. Например, если искомыми являются последовательности, идентичные на $\geq 90\%$, T_m можно уменьшить на 10°C . Как правило, жесткие условия выбирают так, чтобы они были на приблизительно 5°C ниже температуры (точки) плавления (T_m) для конкретной последовательности и ее комплемента при заданных ионной силе и pH. Однако в существенно жестких условиях могут использоваться гибридизация и/или промывка при температуре на 1, 2, 3 или 4°C ниже температуры (точки) плавления (T_m); в умеренно жестких условиях могут использоваться гибридизация и/или промывка при температуре на 6, 7, 8, 9 или 10°C ниже температуры (точки) плавления (T_m); в условиях низкой жесткости могут использоваться гибридизация и/или промывка при температуре на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C ниже температуры (точки) плавления (T_m). Используя уравнение, композиции для гибридизации и промывок и требуемую T_m , специалисты со средним уровнем компетентности будут понимать, что изменения жесткости гибридизации и/или растворов для промывок по существу описаны. Если желаемая степень несоответствий приводит к T_m , составляющей меньше 45°C (водный раствор) или 32°C (раствор формамида), предпочтительно увеличить концентрацию SSC с тем, чтобы можно было использовать более высокую температуру. Подробное руководство для гибридизации нуклеиновых кислот можно найти у Tijssen (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, New York (1993)) и в Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Ausubel et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995). Условия гибридизации и/или промывок можно применять в течение по меньшей мере 10, 30, 60, 90, 120 или 240 минут.

«Существенная часть» аминокислотной или нуклеотидной последовательности является такой частью, которая включает достаточно аминокислотной последовательности полипептида или нуклеотидной последовательности гена для того, чтобы предположительно идентифицировать этот полипептид или ген, или с помощью немеханизированной оценки последовательности квалифицированным в данной области техники специалистом, или с помощью компьютерно-автоматизированного сравнения последовательностей и идентификации с использованием таких алгоритмов, как BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (базисный, поисковый способ локального выравнивания); Altschul, S.F., et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1993)). Как правило, для предположительного установления гомологии полипептидной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты известному белку или гену необходима последовательность из десяти или более последовательных аминокислот или тридцати или более нуклеотидов. Кроме того, что касается нуклеотидных последовательностей, в

зависимых от последовательностей способах идентификации (например, при гибридизации по Саузерну) и выделения генов (например, при *in situ* гибридизации бактериальных колоний или бактериофаговых бляшек) можно использовать специфичные для генов олигонуклеотидные зонды, включающие 20-30 последовательных нуклеотидов. Кроме того, короткие олигонуклеотиды из 12-15 оснований можно использовать в качестве праймеров для амплификации в ПЦР для того, чтобы получить конкретный фрагмент нуклеиновой кислоты, включающий праймеры. Соответственно, «существенная часть» нуклеотидной последовательности включает достаточно последовательности для того, чтобы специфически идентифицировать и/или выделить фрагмент нуклеиновой кислоты, включающий последовательность. В настоящей заявке сообщаются полные аминокислотные и нуклеотидные последовательности, кодирующие конкретные белки жгутиковых. Извлекая пользу из сообщенных здесь последовательностей, квалифицированный специалист может теперь использовать целиком или существенную часть раскрытых последовательностей для целей, известных квалифицированным в данной области техники специалистам. Соответственно, настоящее изобретение включает полные последовательности, представленные в сопроводительном списке последовательностей, а также существенные части этих последовательностей, определенные выше.

Термин «комплементарный» используется для описания взаимоотношения между нуклеотидными основаниями, которые способны гибридизоваться друг с другом. Например, что касается ДНК, аденозин комплементарен тимину, а цитозин комплементарен гуанину. Соответственно, настоящее изобретение также включает выделенные фрагменты нуклеиновых кислот, которые комплементарны полным последовательностям, представленным в сопроводительном списке последовательностей, а также в значительной степени схожие последовательности нуклеиновых кислот.

Термины «гомология» или «гомологичный» используются здесь взаимозаменяемо. Они относятся к фрагментам нуклеиновых кислот, в которых замены одного или нескольких нуклеотидных оснований не нарушают способность фрагмента нуклеиновой кислоты опосредовать экспрессию гена или порождать определенный фенотип. Эти термины также относятся к модификациям фрагментов нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, таким как делеция или вставка одного или нескольких нуклеотидов, не изменяющих в значительной степени функциональных свойств результирующего фрагмента нуклеиновой кислоты относительно первоначального, немодифицированного фрагмента. Поэтому понятно, как это понятно квалифицированным в данной области техники специалистам, что настоящим изобретением охватываются не только конкретные, приведенные в качестве примеров последовательности.

Кроме того, квалифицированный специалист знает, что гомологичные последовательности нуклеиновых кислот, охватываемые настоящим изобретением, также определяются по их способности гибридизоваться, в умеренно жестких условиях (например, в 0,5X SSC, 0,1% SDS при 60°C), с последовательностями, приведенными здесь в качестве примеров, или с любой частью нуклеотидных последовательностей, раскрытых здесь, и функционально эквивалентны любой из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых здесь.

«Вырожденность кода» относится к природе генетического кода, делающей возможной вариацию нуклеотидной последовательности без изменения

аминокислотной последовательности кодируемого полипептида. Соответственно, настоящее изобретение относится к любому фрагменту нуклеиновой кислоты, который кодирует всю или существенную часть аминокислотной

последовательности полипептида жгутиковых по настоящему изобретению, приведенной в SEQ ID NO: 2. Квалифицированный специалист хорошо знает о «кодоновом предпочтении», проявляемом конкретной клеткой-хозяином при использовании нуклеотидных кодонов для определения данной аминокислоты. Следовательно, при синтезе гена для увеличенной экспрессии в клетке-хозяине желательно конструировать ген так, чтобы частота использования кодонов в нем приближалась к частоте использования предпочтительных кодонов клетки-хозяина.

Термин «химически синтезированная», относящийся к последовательности ДНК, означает, что компоненты-нуклеотиды были собраны *in vitro*. Немеханизированный химический синтез ДНК можно выполнить, используя хорошо известные процедуры, или автоматизированный химический синтез можно выполнить, используя одну из ряда коммерчески доступных машин. «Синтетические гены» можно собрать из олигонуклеотидных конструктивных блоков, которые химически синтезируют, используя известные квалифицированным в данной области техники специалистам процедуры. Эти конструктивные блоки подвергают лигированию и отжигу с образованием сегментов гена, которые затем ферментативно собирают с созданием целого гена. Соответственно, гены могут быть разработаны для оптимальной экспрессии гена на основе оптимизации нуклеотидной последовательности так, чтобы она отражала кодоновое предпочтение клетки-хозяина. Квалифицированный специалист оценивает вероятность успешной экспрессии гена, если использование кодонов смещено в сторону тех кодонов, которые пользуется преимуществом у хозяина. Определение предпочтительных кодонов может быть основано на исследовании генов, происходящих из клетки-хозяина, при доступности информации о последовательности.

Термин «ген» относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который экспрессирует конкретный белок, и он может относиться только к кодирующей последовательности или может включать регуляторные последовательности, предшествующие (5'-некодирующие последовательности) кодирующей последовательности и следующие (3'-некодирующие последовательности) за такой последовательностью. «Природный ген» относится к обнаруживаемому в природе гену со своими собственными регуляторными последовательностями. «Химерный ген» относится к любому гену, не являющемуся природным геном, включающему регуляторные и кодирующие последовательности, не обнаруживаемые вместе в природе. Соответственно, химерный ген может включать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, происходящие из различных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, происходящие из одного и того же источника, но расположенные отличным образом по сравнению с расположением, обнаруживаемым в природе. «Эндогенный ген» относится к природному гену в его природном местонахождении в геноме организма. «Чужеродный» ген относится к гену, введенному в организм-хозяина путем переноса генов. Чужеродные гены могут включать природные гены, встроенные в неприродный организм, природные гены, введенные в новое месторасположение в природном хозяине, или химерные гены. «Трансген» представляет собой ген, введенный в геном с помощью процедуры трансформации. «Оптимизированный в отношении кодонов ген» представляет собой

ген, имеющий частоту использования кодонов, созданную для воспроизводства частоты использования предпочтительных кодонов клетки-хозяина.

«Кодирующая последовательность» относится к последовательности ДНК, кодирующей конкретную аминокислотную последовательность. «Подходящие регуляторные последовательности» относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным 5' (5'-некодирующие последовательности) от кодирующей последовательности, внутри кодирующей последовательности или 3' (3'-некодирующие последовательности) от кодирующей последовательности и оказывающим влияние на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию ассоциируемой кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, направляющие трансляцию последовательности, интроны, последовательности идентификации полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффектора и шпилечные структуры.

Термин «аллель» относится к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающих данный локус на хромосоме. Если все присутствующие в данном локусе на хромосоме аллели являются одинаковыми, такое растение является гомозиготным по данному локусу. Если присутствующие в данном локусе на хромосоме аллели отличаются, такое растение является гетерозиготным по данному локусу.

Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, способной контролировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. Как правило, кодирующая последовательность располагается 3' от последовательности промотора. Промоторы могут полностью происходить из природного гена, или они состоят из различных элементов, происходящих из различных промоторов, обнаруживаемых в природе, или даже включают синтетические сегменты ДНК. Квалифицированным в данной области техники специалистам понятно, что различные промоторы могут направлять экспрессию гена в различных типах тканей или клеток или на различных стадиях развития, или в ответ на различные условия окружающей среды или физиологические условия. Промоторы, которые вызывают экспрессию гена в большинстве типов клеток в большинстве периодов времени, обычно упоминаются как «конститутивные промоторы». Кроме того, понятно, что, поскольку в большинстве случаев точные границы регуляторных последовательностей не полностью определены, ДНК-фрагменты различных длин могут иметь идентичную промоторную активность.

Промоторная последовательность может состоять из проксимальных и более дистальных 5'-элементов, более дистальные 5'-элементы часто упоминаются как энхансеры. Соответственно, «энхансер» представляет собой последовательность ДНК, которая может стимулировать активность промотора, и он может быть природным элементом промотора или гетерологичным элементом, встроенным для увеличения уровня или тканеспецифичности промотора. Новые промоторы различных типов, применимые в клетках растений, постоянно обнаруживают; многочисленные примеры можно найти в сводке данных Okamuro, J.K. и Goldberg, R.B. (Biochemistry of Plants, 15: 1-82 (1989)).

«Направляющая трансляцию последовательность» относится к полинуклеотидной последовательности, расположенной между промоторной последовательностью гена и кодирующей последовательностью. Направляющая трансляцию последовательность присутствует в полностью процессированной мРНК 5' от последовательности начала трансляции. Направляющая трансляцию

последовательность может оказывать влияние на процессинг первичного транскрипта в мРНК, стабильность мРНК или эффективность трансляции. Примеры направляющих трансляцию последовательностей описаны (Turner, R. and Foster, G.D., Mol. Biotechnol., 3: 225-236 (1995)).

Термины «3'-некодирующие последовательности» и «терминатор транскрипции» относятся к последовательностям ДНК, расположенным 3' от кодирующей последовательности. Они включают последовательности идентификации полиаденилирования и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные оказывать воздействие на процессинг мРНК или экспрессию гена. Сигнал полиаденилирования обычно характеризуется влиянием на добавление участков полиадениловой кислоты к 3'-концу предшественника мРНК. 3'-Район может оказывать влияние на транскрипцию, процессинг и стабильность РНК или трансляцию ассоциируемой кодирующей последовательности.

«РНК-транскрипт» относится к продукту, являющемуся результатом катализируемой РНК-полимеразой транскрипции последовательности ДНК. Когда РНК-транскрипт является идеальной комплементарной копией последовательности ДНК, он упоминается как первичный транскрипт, или он может быть последовательностью РНК, являющейся результатом посттранскрипционного процессинга первичного транскрипта, и упоминается как зрелая РНК. «Информационная РНК» или «мРНК» относится к РНК без интронов, которая может транслироваться клеткой в белок. «кДНК» относится к двухцепочечной ДНК, комплементарной мРНК и происходящей из нее. «Смысловая» РНК относится к РНК-транскрипту, который включает мРНК и значит может транслироваться клеткой в белок. «Антисмысловая» РНК относится к РНК-транскрипту, который комплементарен полностью или части целевого первичного транскрипта или мРНК и который блокирует экспрессию целевого гена (патент США № 5107065; публикация РСТ-заявки № WO 99/28508). Антисмысловая РНК может быть комплементарна любой части транскрипта конкретного гена, т.е. 5'-некодирующей последовательности, 3'-некодирующей последовательности или кодирующей последовательности. «Функциональная РНК» относится к антисмысловой РНК, рибозимной РНК или другой РНК, которая не транслируется, но все же оказывает эффект на клеточные процессы.

Термин «функционально связанный» относится к связи последовательностей нуклеиновых кислот в одном фрагменте нуклеиновой кислоты так, что на функционирование одной из них оказывает влияние другая. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т.е. эта кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора). Кодирующие последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями в смысловой или антисмысловой ориентации.

Используемый здесь термин «экспрессия» относится к транскрипции и стабильной аккумуляции смысловой (мРНК) или антисмысловой РНК, происходящей из фрагментов нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Экспрессия может также относиться к трансляции мРНК в полипептид.

«Зрелый» белок относится к подвергнутому посттрансляционному процессингу полипептиду, т.е. полипептиду, из которого были исключены любые пре- или пропептиды, присутствующие в первичном продукте трансляции. Белок-«предшественник» относится к первичному продукту трансляции мРНК, т.е. с пре- и

пропептидами, все еще присутствующими. Пре- и пропептиды могут быть (но без ограничения) сигналами внутриклеточной локализации.

«Трансформация» относится к переносу молекулы нуклеиновой кислоты в организм-хозяина, что приводит к генетически стабильному наследованию.

Молекула нуклеиновой кислоты может быть плазмидой, которая реплицируется автономно, например, или она может интегрироваться в геном организма-хозяина. Организмы-хозяева, содержащие трансформированные фрагменты нуклеиновых кислот, упоминаются как «трансгенные», или «рекомбинантные», или

«трансформированные» организмы.

Термины «плазида», «вектор» и «кассета» относятся к экстрахромосомному элементу, часто несущему гены, не являющиеся частью главного метаболизма клетки, и находящемуся обычно в форме кольцевых двухцепочечных ДНК-фрагментов. Такие элементы могут быть автономно реплицирующимися последовательностями, интегрирующимися в геном последовательностями, фаговыми или нуклеотидными последовательностями, линейными или кольцевыми, одно- или двухцепочечной ДНК или РНК, происходящими из любого источника, в которых ряд нуклеотидных последовательностей соединен или рекомбинирован в уникальную конструкцию, способную ввести в клетку фрагмент промотора и последовательность ДНК для выбранного генного продукта вместе с соответствующей 3'-нетранслируемой последовательностью. «Экспрессирующая кассета» относится к специфическому вектору, содержащему чужеродный ген и имеющему помимо чужеродного гена элементы, позволяющие увеличение экспрессии этого гена в чужеродном хозяине.

Термин «процент идентичности», известный в данной области техники, представляет собой взаимосвязь между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полипептидными последовательностями, определяемую сравнением последовательностей. В данной области техники «идентичность» также означает степень связанности между полипептидными или полинуклеотидными последовательностями, например, определяемой с помощью сопоставления последовательностей символов таких последовательностей.

«Идентичность» и «схожесть» можно легко рассчитать с помощью известных способов, включающих, но без ограничения, способы, описанные в 1) Computational Molecular Biology (Lesk, A.M., Ed.) Oxford University: NY (1988); 2) Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D.W., Ed.) Academic: NY (1993); 3) Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A.M., and Griffin, H.G., Eds.) Humana: NJ (1994); 4) Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., Ed.) Academic (1987); и 5) Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., Eds.) Stockton: NY (1991).

Предпочтительные способы определения идентичности разработаны для получения наибольшего соответствия проверяемых последовательностей. Способы определения идентичности и схожести кодифицированы в публично доступных компьютерных программах. Выравнивания последовательностей и расчеты процентов идентичности можно проводить с использованием программы MegAlign™ комплекта вычислительных программ для биоинформатики LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Множественное выравнивание последовательностей проводят с использованием «способа выравнивания Clustal», который включает несколько выборов алгоритма, в том числе «способа выравнивания Clustal V», который соответствует способу выравнивания, обозначенному Clustal V (описанному Higgins and Sharp, CABIOS. 5: 151-153 (1989); Higgins, D.G. et al., Comput.

Appl. Biosci., 8: 189-191 (1992)) и обнаруживаемому в программе MegAlignTM комплекта вычислительных программ для биоинформатики LASERGENE (DNASTAR Inc.). При множественных выравниваниях величины, используемые по умолчанию, соответствуют штрафы за промежуток = 10 и штрафы за длину промежутка = 10. Используются по умолчанию параметрами для попарных выравниваний и расчета процента идентичности белковых последовательностей с использованием способа Clustal V являются (оптимальный), используемый при выравнивании, = 1, штрафы за промежуток = 3, окно = 5 и сохраняемые диагонали = 5. Для нуклеиновых кислот этими параметрами являются (оптимальный) размер слова, используемый при выравнивании = 2, штрафы за промежуток = 5, окно = 4 и сохраняемые диагонали = 4. После выравнивания последовательностей с использованием программы Clustal V можно получить «процент идентичности» путем просмотра таблицы «несходства последовательностей» в этой же программе. Кроме того, доступен «способ выравнивания Clustal W», и он соответствует способу выравнивания, обозначенному Clustal W (описанному Higgins and Sharp, CABIOS. 5: 151-153 (1989); Higgins, D.G. et al., Comput. Appl. Biosci., 8: 189-191 (1992)) и обнаруживаемому в версии 6.1 программы MegAlignTM комплекта вычислительных программ для биоинформатики LASERGENE (DNASTAR Inc.). Используемые по умолчанию параметры для множественного выравнивания соответствуют штрафы за промежуток = 10, штрафы за длину промежутка = 0,2, обусловленная запаздыванием дивергенция последовательностей (%) = 30, переходный вес ДНК = 0,5, белковая весовая матрица = ряд Гоннета, ДНК весовая матрица = IUB. После выравнивания последовательностей с использованием программы Clustal W можно получить «процент идентичности» путем просмотра таблицы «несходства последовательностей» в этой же программе.

«Способ выравнивания BLASTN» представляет собой алгоритм, предоставленный National Center for Biotechnology Information (NCBI) для сравнения нуклеотидных последовательностей с использованием параметров по умолчанию.

Квалифицированному в данной области техники специалисту вполне понятно, что множество степеней идентичности последовательностей пригодны при идентификации полипептидов из других видов, причем такие полипептиды имеют одинаковую или схожую функцию или активность. Подходящие фрагменты нуклеиновых кислот (выделенные полинуклеотиды по настоящему изобретению) кодируют полипептиды, которые идентичны на по меньшей 70%, предпочтительно на по меньшей мере 75% и более предпочтительно на по меньшей мере 80% аминокислотным последовательностям, сообщаемым здесь. Предпочтительные фрагменты нуклеиновых кислот кодируют аминокислотные последовательности, которые идентичны на по меньшей 85% аминокислотным последовательностям, представленным здесь. Более предпочтительные фрагменты нуклеиновых кислот кодируют аминокислотные последовательности, которые идентичны на по меньшей 90% аминокислотным последовательностям, представленным здесь. Наиболее предпочтительными являются фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности, которые идентичны на по меньшей 95% аминокислотным последовательностям, сообщаемым здесь. Хотя предпочтительные диапазоны описаны выше, при описании по настоящему изобретению может использоваться аминокислотная идентичность на любое целое число от 39% до 100%, такая как 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%,

66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99%.

5 Подходящие фрагменты нуклеиновых кислот не только гомологичны на указанный выше процент, но, как правило, кодируют полипептид, имеющий по меньшей мере 50 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 100 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 150 аминокислот, еще более предпочтительно по меньшей мере 200 аминокислот и наиболее предпочтительно по 10 меньшей мере 250 аминокислот.

Термин «консервативный домен» или «мотив» означает совокупность аминокислот, являющихся консервативными в специфических положениях вдоль выровненной последовательности эволюционно родственных белков. Хотя 15 аминокислоты в других положениях могут варьировать между гомологичными белками, аминокислоты, являющиеся в высокой степени консервативными в специфических положениях, указывают аминокислоты, являющиеся существенными для структуры, стабильности или активности белка. Поскольку их идентифицируют по их высокой степени консервативности в выровненных последовательностях 20 семейства белков-гомологов, их можно использовать в качестве идентификаторов или «характерных признаков» для определения того, принадлежит ли белок с недавно определенной последовательностью семейству ранее идентифицированных белков.

Термин «программное обеспечение для анализа последовательностей» относится 25 к любому алгоритму работы ЭВМ или программе, которые применимы для анализа нуклеотидных или аминокислотных последовательностей. «Программное обеспечение для анализа последовательностей» может быть коммерчески доступным или его можно независимо разработать. Типичное программное обеспечение для 30 анализа последовательностей будет включать, но без ограничения, 1) комплект программ GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); 2) BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990)); 3) DNASTAR (DNASTAR, Inc. Madison, WI); 4) Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI); и 5) программу FASTA, включающую алгоритм Смита-Уотермана (W.R. 35 Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Plenum: New York, NY). В контексте этой заявки будет понятно, что если для анализа используется программное обеспечение для анализа последовательностей, результаты анализа будут основаны на «используемых по 40 умолчанию величинах» программы, на которую приводится ссылка, если только не указано иное. Как здесь используются, «используемые по умолчанию величины» будут означать любую совокупность величин или параметров, первоначально загруженных с программным обеспечением при первой инициализации. Что касается используемого здесь алгоритма BLASTP, параметры по умолчанию будут включать 45 повторяемости аминокислот Robinson и Robinson (Robinson A.B., Robinson L.R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 8880-8884 (1991)), матрицу количественной оценки BLOSUM62 и счет за промежуток $\Delta(g)=11+g$.

Термин «части растения» включает дифференцированные и 50 недифференцированные ткани, включающие, но без ограничения, корни, стебли, ростки, листья, пыльцу, семена, ткани вздутый и различные формы клеток и культур (например, отдельные клетки, протопласты, зародыши и ткань каллюса). Ткани растения могут быть в растении или в органе, ткани растения или клеточной

культуре.

Термин «орган растения» относится к ткани растения или группе тканей, которые создают морфологически и функционально отличную часть растения.

Термин «геном» относится к следующему: 1) полному комплементу генетического материала (генов и некодирующих последовательностей), присутствующего в каждой клетке организма, или вируса, или органелле; 2) полному набору хромосом, наследуемому как (гаплоидная) единица от одного родителя.

Используемые здесь стандартные методы рекомбинантных ДНК и молекулярного клонирования хорошо известны в данной области техники и описываются Sambrook, J., Fritsch, E.F. и Maniatis, T., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (в дальнейшем «Maniatis»)) и Silhavy, T.J., Bannan, M.L. и Enquist, L.W. (Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1984)), и Ausubel, F.M. и др. (Current Protocols in Molecular Biology, опубликованные Greene Publishing Assoc. и Wiley-Interscience, Hoboken, NJ (1987)).

Термины «рекомбинантная конструкция», «экспрессирующая конструкция», «химерная конструкция», «конструкция» и «рекомбинантная ДНК-конструкция» используются здесь взаимозаменяемо. Рекомбинантная конструкция включает искусственную комбинацию фрагментов нуклеиновых кислот, т.е. регуляторных и кодирующих последовательностей, не обнаруживаемых вместе в природе.

Например, химерная конструкция может включать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, происходящие из различных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, происходящие из одного и того же источника, но размещенные отличным от обнаруживаемого в природе образом. Такая конструкция может использоваться сама по себе или она может использоваться в объединении с вектором. Если используется вектор, его выбор зависит от способа, который будет использоваться для трансформации клеток-хозяев, как это хорошо известно квалифицированным в данной области техники специалистам. Например, можно использовать плазмидный вектор. Квалифицированному специалисту хорошо известны генетические элементы, которые должны присутствовать на векторе для успешной трансформации, отбора и размножения клеток-хозяев, содержащих любой из выделенных фрагментов нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Квалифицированному специалисту также понятно, что различные независимые случаи трансформации будут приводить к различным уровням и характеристам экспрессии (Jones et al., EMBO J. 4: 2411-2418 (1985); De Almeida et al., Mol. Gen. Genetics 218: 78-86 (1989)), и, следовательно, необходимо скринировать множество случаев для того, чтобы получить линии, проявляющие желаемый уровень и характер экспрессии. Такое скринирование можно провести с помощью анализа ДНК по Саузерну, Норзерн-анализа экспрессии мРНК, анализа экспрессии белков иммуноблоттингом или фенотипического анализа, среди прочих.

Используемый здесь термин «экспрессия» относится к продукции функционального конечного продукта (например, мРНК или белка [или предшественника, или зрелого]).

Термин «введенный» означает предоставление нуклеиновой кислоты (например, экспрессирующей конструкции) или белка в клетку. Введенный включает ссылку на включение нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где нуклеиновая кислота может включиться в геном клетки, и включает ссылку на

временное предоставление нуклеиновой кислоты или белка клетке. Введенный включает ссылку на способы стабильной или временной трансформации, а также скрещивание половым путем. Таким образом, «введенный» в контексте включения фрагмента нуклеиновой кислоты (например, рекомбинантной ДНК-
 5 конструкции/экспрессирующей конструкции) в клетку означает «трансфекцию», или «трансформацию», или «трансдукцию» и включает ссылку на включение фрагмента нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где фрагмент нуклеиновой кислоты может включиться в геном клетки (например,
 10 хромосому, плазмиду, пластиду или митохондриальную ДНК), превратиться в автономный репликон или временно экспрессироваться (например, трансфицированная мРНК).

«Зрелый» белок относится к подвергнутому посттрансляционному процессингу полипептиду (т.е. полипептиду, из которого были исключены любые пре- или
 15 пропептиды, присутствующие в первичном продукте трансляции). Белок-«предшественник» относится к первичному продукту трансляции мРНК (т.е. с пре- и пропептидами, все еще присутствующими). Пре- и пропептиды могут быть, но без ограничения, сигналами внутриклеточной локализации.

«Стабильная трансформация» относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в геном организма-хозяина, включающий и ядерный, и органоидный геномы, что приводит к генетически стабильному наследованию. Напротив,
 20 «временная трансформация» относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в ядро, или ДНК-содержащую органеллу, организма-хозяина, что приводит к экспрессии гена без интеграции или стабильного наследования. Организмы-хозяева, содержащие трансформированные фрагменты нуклеиновых кислот, упоминаются как «трансгенные» организмы.

Как здесь используется, «трансгенное(ая)» относится к растению или клетке,
 30 которые содержат в своих геномах гетерологичный полинуклеотид. Предпочтительно гетерологичный полинуклеотид стабильно интегрируется в геном так, что полинуклеотид передается последующим поколениям. Гетерологичный полинуклеотид может интегрироваться в геном отдельно или в виде части экспрессирующей конструкции. Как здесь используется, трансгенное(ая) включает
 35 любую клетку, клеточную линию, каллус, ткань, часть растения или растение, генотип которых был изменен присутствием гетерологичной нуклеиновой кислоты, в том числе те из них, которые были первоначально таким образом изменены, а также те, которые были созданы с помощью полового скрещивания или неполового размножения первоначальной трансгенной клетки или растения. Используемым
 40 здесь термином «трансгенное(ая)» не охватывается изменение генома (хромосомного или экстрахромосомного) с помощью стандартных способов селекции растений или с помощью происходящих в природе явлений, таких как случайное перекрестное оплодотворение, нерекомбинантная вирусная инфекция,
 45 нерекомбинантная бактериальная трансформация, нерекомбинантная транспозиция или спонтанная мутация.

«Антисмысловое ингибирование» относится к продукции антисмысловых РНК-транскриптов, способных подавлять экспрессию целевого белка. «Косупрессия»
 50 относится к продукции смысловых РНК-транскриптов, способных подавлять экспрессию идентичных или в значительной степени схожих чужеродных или эндогенных генов (патент США № 5231020). Косупрессирующие конструкции в растениях ранее конструировали, фокусируясь на сверхэкспрессии

последовательности нуклеиновой кислоты, гомологичной эндогенной мРНК, в смысловой ориентации, что приводит к уменьшению всех РНК, гомологичных сверхэкспрессируемой последовательности (Vaucheret et al., Plant J. 16: 651-659 (1998); Gura, Nature 404: 804-808 (2000)). Общая эффективность этого явления очень низка, а степень уменьшения РНК широко варьирует. В более недавней работе описывается использование структур «шпилек», которые включают всю или часть кодирующей последовательности мРНК в комплементарной ориентации, которая приводит к возможной структуре «ножка-петля» экспрессированной РНК (публикация РСТ-заявки № WO 99/53050, опубликованной 21 октября 1999; публикация РСТ-заявки № WO 02/00904, опубликованной 3 января 2002). Это увеличивает частоту косупрессии в получаемых трансгенных растениях. В другой вариации описывается использование последовательностей вирусов растений для направления супрессии, или «глушения», проксимальных кодирующих последовательностей мРНК (публикация РСТ-заявки № WO 98/36083, опубликованной 20 августа 1998). Оба эти явления косупрессии были истолкованы механистически, хотя генетические данные начали объяснять эту сложную ситуацию (Elmayan et al., Plant Cell 10: 1747-1757 (1998)).

Обзор: биосинтез жирных кислот и триацилглицеринов в микроорганизмах

Обычно аккумуляция липидов в содержащих или продуцирующих масло микроорганизмах инициируется в ответ на отношение общего углерода к азоту в среде для роста. Этот процесс, приводящий к de novo синтезу свободного пальмитата (16:0) в содержащих или продуцирующих масло микроорганизмах, подробно описывается в публикации РСТ-заявки WO 2004/101757. Пальмитат является предшественником производных длинноцепочечных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, которые образуются под действием элонгаз и десатураз (фиг. 1)

ТАГ (первичные единицы запаса жирных кислот) образуются с помощью ряда реакций, которые включают: 1) этерификацию одной молекулы ацил-КоА с выходом глицерол-3-фосфата с помощью ацилтрансферазы для продуцирования лизофосфатидной кислоты; 2) этерификацию второй молекулы ацил-КоА с помощью ацилтрансферазы с выходом 1,2-диацилглицеролфосфата (обычно определяемого как фосфатидная кислота); 3) удаление фосфата с помощью фосфатазы фосфатидной кислоты с выходом 1,2-диацилглицерина (DAG); и 4) добавление третьей жирной кислоты под действием ацилтрансферазы с образованием ТАГ. В ТАГ может быть включен широкий диапазон жирных кислот, включающих насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты и жирные кислоты с короткими и длинными цепями.

Биосинтез жирных кислот омега

Метаболический процесс, в котором олеиновая кислота превращается в жирные кислоты омега-3/омега-6, включает элонгацию углеродной цепи благодаря добавлению атомов углерода и десатурацию молекулы благодаря добавлению двойных связей. Для этого требуется ряд специальных ферментов десатураз и элонгаз, присутствующих в мембране эндоплазматического ретикулума. Однако, как видно на фиг. 1 и описывается ниже, часто существует множество альтернативных путей продукции конкретных жирных кислот омега-3/омега-6.

В частности, для всех путей требуется первоначальное превращение олеиновой кислоты в LA, первую из жирных кислот омега-6, под действием дельта-12-десатуразы. Затем, используя «путь с участием дельта-6-десатуразы/дельта-6-элонгазы», жирные кислоты омега-6 образуются следующим образом: (1) LA

превращается в GLA под действием дельта-6-десатуразы; (2) GLA превращается в DGLA под действием $C_{18/20}$ -элонгазы; и (3) DGLA превращается в ARA под действием дельта-5-десатуразы. В альтернативном случае для образования жирных кислот омега-3 может использоваться «путь с участием дельта-6-десатуразы/дельта-6-элонгазы» следующим образом: 1) LA превращается в ALA, первую из жирных кислот омега-3, под действием дельта-15-десатуразы; (2) ALA превращается в STA под действием дельта-6-десатуразы; (3) STA превращается в ETA под действием $C_{18/20}$ -элонгазы; (4) ETA превращается в EPA под действием дельта-5-десатуразы; (5) EPA превращается в DPA под действием $C_{20/22}$ -элонгазы; и (6) DPA превращается в DHA под действием дельта-4-десатуразы. Не обязательно жирные кислоты омега-6 могут превращаться в жирные кислоты омега-3; например, ETA и EPA продуцируются из DGLA и ARA, соответственно под действием активности дельта-17-десатуразы.

В альтернативных путях биосинтеза жирных кислот омега-3/омега-6 используются дельта-9-элонгаза и дельта-8-десатураза. Более конкретно, LA и ALA могут превратиться в EDA и ETrA соответственно, под действием дельта-9-элонгазы; затем дельта-8-десатураза превращает EDA в DGLA и/или ETrA в ETA.

Предполагается, что конкретные функциональные возможности, требуемые быть выраженными в конкретном организме-хозяине для продукции жирных кислот омега-3/омега-6, будут зависеть от клетки-хозяина (и его природного профиля PUFA и/или профиля десатураз/элонгаз), доступности субстрата и желаемого конечного продукта(ов). Квалифицированный в данной области техники специалист сможет идентифицировать различные возможные гены, кодирующие каждый из ферментов, требуемых для биосинтеза жирных кислот омега-3/омега-6. Последовательности пригодных десатураз и элонгаз могут быть получены из любого источника, например, выделены из природного источника (например, бактерий, водорослей, грибов, растений, животных и т.п.), продуцированы полусинтетическим путем или синтезированы de novo. Хотя конкретный источник генов десатураз и элонгаз, вводимых в хозяина, не является критическим, соображения в отношении выбора конкретного полипептида, обладающего активностью десатуразы или элонгазы, включают: 1) субстратную специфичность полипептида; 2) то, является ли полипептид или его компонент ограничивающим скорость ферментом; 3) то, является ли десатураза или элонгаза существенной для синтеза желаемой PUFA; и/или 4) кофакторы, требуемые для полипептида. Экспрессированный полипептид предпочтительно имеет характеристики, совместимые с биохимическим окружением его нахождения в клетке-хозяине (смотри публикацию PCT-заявки WO 2004/101757 для дополнительных деталей).

В дополнительных вариантах осуществления также полезно принимать во внимание эффективность превращения для каждой конкретной десатуразы и/или элонгазы. Более конкретно, поскольку каждый фермент редко функционирует со 100% эффективностью превращения субстрата в продукт, конечный профиль липидов неочищенных масел, продуцируемых в клетке-хозяине, будет, как правило, представлять собой смесь различных PUFA, состоящих из желаемых жирных кислот омега-3/омега-6, а также различных верхних промежуточных PUFA. Таким образом, эффективность превращения для каждого фермента также является параметром для принятия во внимание при оптимизации биосинтеза желаемой жирной кислоты.

Имея в виду каждое из вышеотмеченных соображений, возможные гены, обладающие соответствующими активностями десатураз и элонгаз (например,

дельта-6-десатураз, C_{18/20}-элонгаз, дельта-5-десатураз, дельта-17-десатураз, дельта-15-десатураз, дельта-9-десатураз, дельта-12-десатураз, C_{14/16}-элонгаз, C_{16/18}-элонгаз, дельта-9-элонгаз, дельта-8-десатураз, дельта-4-десатураз и C_{20/22}-элонгаз), можно идентифицировать сообразно с публично доступными источниками информации (например, GenBank), патентными источниками информации и экспериментальным анализом организма, обладающего способностью продуцировать PUFA. Эти гены будут пригодны для введения в конкретный организм-хозяина для того, чтобы сделать возможным или увеличить синтез

Идентификация последовательности новой дельта-5-десатуразы из *Euglena gracilis*

В настоящем изобретении из *Euglena gracilis* выделена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 1), кодирующая дельта-5-десатуразу (SEQ ID NO: 2), обозначенную здесь «EgD5».

Сравнение последовательности нуклеотидных оснований и выведенной аминокислотной последовательности EgD5 с общедоступными базами данных показывает, что большая часть схожих известных последовательностей идентична на приблизительно 39% аминокислотной последовательности EgD5, представленной здесь, на протяжении длины 449 аминокислот, используя способ выравнивания Clustal W. Более предпочтительные аминокислотные фрагменты идентичны на по меньшей мере приблизительно 70%-80% последовательностям по настоящему изобретению, причем те последовательности, которые идентичны на по меньшей мере приблизительно 80%-90%, являются особенно подходящими, а те последовательности, которые идентичны на по меньшей мере приблизительно 90%-95%, являются наиболее предпочтительными. Аналогично, предпочтительными кодирующими EgD5 последовательностями нуклеиновых кислот, соответствующими ORF по настоящему изобретению, являются последовательности, которые кодируют активные белки и которые идентичны на по меньшей мере приблизительно 70%-80% последовательностям нуклеиновых кислот для EgD5, представленным здесь, причем те последовательности, которые идентичны на по меньшей мере приблизительно 80%-90%, являются особенно подходящими, а те последовательности, которые идентичны на по меньшей мере приблизительно 90%-95%, являются наиболее предпочтительными.

В альтернативных вариантах осуществления последовательность десатуразы EgD5 по настоящему изобретению можно оптимизировать в отношении кодонов для экспрессии в конкретном организме-хозяине. Как хорошо известно в данной области техники, это может быть полезным способом дальнейшей оптимизации экспрессии фермента в альтернативном хозяине, поскольку использование предпочтительных для хозяина кодонов может значительно увеличить экспрессию чужеродного гена, кодирующего полипептид. Как правило, предпочтительные для хозяина кодоны можно определить в конкретном представляющем интерес виде хозяина с помощью исследования использования кодонов в белках (предпочтительно белках, экспрессируемых в больших количествах) и определения того, какие кодоны используются с наибольшей частотой. Затем последовательность, кодирующую представляющий интерес полипептид, обладающий, например, активностью десатуразы, можно синтезировать целиком или частично, используя кодоны, предпочтительные для вида хозяина.

В одном предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению EgD5 оптимизировали в отношении кодонов для экспрессии в *Yarrowia*

lipolytica. Это стало возможным благодаря, во-первых, определению профиля использования кодонов *Y. lipolytica* (смотри, публикацию РСТ-заявки № WO 04/101757 и патент США № 7125672) и идентификации тех кодонов, которые являлись предпочтительными. Затем, для дальнейшей оптимизации экспрессии генов в *Y. lipolytica*, была определена консенсусная последовательность вокруг кодона инициации «ATG». Эта оптимизация привела к модификации 196 п.о. кодирующей области размером 1350 п.о. (14,5%) и оптимизации 189 кодонов из 449 кодонов в целом (42%). Ни одна из модификаций в оптимизированном в отношении кодонов гене («EgD5S»; SEQ ID NO: 3) не изменяла аминокислотную последовательность кодируемого белка (SEQ ID NO: 2). Как описывается в примере 11, оптимизированный в отношении кодонов ген на 36% более эффективно десатурировал DGLA до ARA, чем ген дикого типа, при экспрессии в *Y. lipolytica*.

Квалифицированный в данной области техники специалист сможет использовать приведенные здесь учения для создания различных других оптимизированных в отношении кодонов белков дельта-5-десатураз, подходящих для оптимальной экспрессии в альтернативных хозяевах (т.е. отличных от *Yarrowia lipolytica*) на основе последовательности EgD5 дикого типа. Соответственно, настоящее изобретение относится к любому оптимизированному в отношении кодонов белку дельта-5-десатуразы, происходящему из EgD5 дикого типа (т.е. кодируемому SEQ ID NO: 2). Это включает, но без ограничения, нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, которая кодирует синтетический белок дельта-5-десатуразы (т.е. EgD5S), которая была оптимизирована в отношении кодонов для экспрессии в *Yarrowia lipolytica*.

Идентификация и выделение гомологов

Любую из последовательностей десатураз по настоящему изобретению (т.е. EgD5, EgD5S) или их части можно использовать для поиска гомологов дельта-5-десатуразы в одних и тех же или разных видах бактерий, водорослей, грибов, жгутиковых или растений, используя программное обеспечение для анализа последовательностей. Как правило, такое компьютерное программное обеспечение сравнивает схожие последовательности по определению степеней гомологии к различным заменам, делециям и другим модификациям.

В альтернативном случае любую из последовательностей десатураз по настоящему изобретению или их части можно использовать в качестве реагентов для гибридизации для идентификации гомологов дельта-5-десатуразы. Основные компоненты теста на гибридизацию нуклеиновых кислот включают зонд, образец, предположительно содержащий представляющий интерес ген или фрагмент гена, и конкретный способ гибридизации. Зонды по настоящему изобретению представляют собой обычно одноцепочечные последовательности нуклеиновых кислот, комплементарные обнаруживаемым последовательностям нуклеиновых кислот. Зонды «способны гибридизоваться» с обнаруживаемыми последовательностями нуклеиновых кислот. Хотя размер зонда может варьировать от 5 оснований до десятков тысяч оснований, как правило, подходит размер зонда, составляющий приблизительно 15 оснований-приблизительно 30 оснований. Необходимо, чтобы одна часть молекулы зонда была комплементарна обнаруживаемой последовательности нуклеиновой кислоты. Кроме того, не требуется, чтобы комплементарность между зондом и последовательностью-мишенью была идеальной. В действительности гибридизация происходит между не вполне комплементарными молекулами, что является результатом того, что некоторая

фракция оснований в гибридизующемся районе не спаривается с соответствующим комплементарным основанием.

Способы гибридизации достаточно описаны. Как правило, зонд и образец должны быть смешаны в условиях, которые сделают возможной гибридизацию нуклеиновых кислот. Это включает приведение в контакт зонда и образца в присутствии неорганической или органической соли в соответствующей концентрации и температурных условиях. Зонд и нуклеиновые кислоты в качестве образца должны быть приведены в контакт в течение периода времени, достаточно длинного для того, чтобы могла произойти какая-либо возможная гибридизация между зондом и нуклеиновой кислотой в качестве образца. Концентрация зонда или мишени в смеси будет определяться временем, необходимым для того, чтобы произошла гибридизация. Чем выше концентрация зонда или мишени, тем короче требуемое время инкубации для гибридизации. Необязательно можно добавить разобщающий агент (например, гуанидиния хлорид, гуанидиния тиоцианат, натрия тиоцианат, лития тетрахлорацетат, натрия перхлорат, рубидия тетрахлорацетат, калия йодид, цезия трифторацетат). Если желательно, в смесь для гибридизации можно добавить формамид, обычно 30-50% (вес./вес.).

Можно использовать различные растворы для гибридизации. Как правило, они включают от приблизительно 20 до 60% в объемном отношении, предпочтительно 30%, полярного органического растворителя. В общепринятых растворах для гибридизации используется приблизительно 30-50% в весовом отношении формамида, приблизительно 0,15-1 М натрия хлорид, приблизительно 0,05-0,1 М буферы (например, натрия цитрат, Tris-HCl, PIPES или HEPES (pH в диапазоне приблизительно 6-9)), приблизительно 0,05-0,2% детергента (например, натрия додецилсульфата) или 0,5-20 мМ EDTA, фиколл (Pharmacia Inc.) (приблизительно 300-500 килодальтон), поливинилпирролидон (приблизительно 250-500 килодальтон) и сывороточный альбумин. Также в типичный раствор для гибридизации будут включаться немеченые нуклеиновые кислоты-носители от приблизительно 0,1 до 5 мг/мл, фрагментированная ядерная ДНК (например, ДНК из тимуса теленка или молоко лососевых, или РНК дрожжей) и необязательно от приблизительно 0,5 до 2% (вес/объем) глицина. Могут быть также включены другие добавки, такие как агенты объемного расширения, которые включают ряд полярных растворимых в воде или способных к набуханию агентов (например, полиэтиленгликоль), анионные полимеры (например, полиакрилат или полиметилакрилат) и анионные сахаридные полимеры (например, декстрана сульфат).

Гибридизацию нуклеиновых кислот можно адаптировать к множеству форматов анализа. Одним из наиболее подходящих форматов является формат сэндвич-анализа. Сэндвич-анализ можно, в частности, адаптировать к гибридизации в неденатурирующих условиях. Первичным компонентом сэндвич-анализа является твердая подложка. На твердой подложке адсорбирован иммобилизованный зонд в виде нуклеиновой кислоты, который является немеченым и комплементарен части последовательности, или такой зонд ковалентно связан с твердой подложкой.

В дополнительных вариантах осуществления любой из описанных здесь фрагментов нуклеиновых кислот для дельта-5-десатураз (или любой идентифицированный здесь гомолог) можно использовать для выделения генов, кодирующих гомологичные белки, из одного и того же и различных видов бактерий, водорослей, грибов, жгутиковых или растений. Выделение гомологичных генов с

использованием зависимых от последовательностей протоколов хорошо известно в данной области техники. Примеры зависимых от последовательностей протоколов включают, но без ограничения, 1) способы гибридизации нуклеиновых кислот; 2) способы амплификации ДНК и РНК, иллюстрируемые различными применениями методов амплификации нуклеиновых кислот [например, полимеразная цепная реакция (ПЦР), Mullis et al., патент США № 4683202; лигазная цепная реакция (LCR), Tabor, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 1074 (1985); или амплификации с замещением цепи (SDA), Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89: 392 (1992)]; и 3) способы конструирования библиотек и скринирования на комплементарность.

Например, гены, кодирующие схожие с описанными здесь дельта-5-десатурами белки или полипептиды, можно выделить непосредственно с использованием всей или части фрагментов нуклеиновых кислот по настоящему изобретению в качестве зондов для ДНК-гибридизации для скринирования библиотек, например, из любых желаемых дрожжей или грибов, используя методологию, хорошо известную квалифицированным в данной области техники специалистам (причем предпочтительными будут такие организмы, которые продуцируют АРА [или ее производные]). Специфические олигонуклеотидные зонды, основанные на последовательностях нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, можно сконструировать и синтезировать с помощью способов, известных в данной области техники (Maniatis, выше). Кроме того, последовательности целиком можно использовать непосредственно для синтеза ДНК-зондов с помощью способов, известных квалифицированному специалисту (например, произвольного мечения ДНК праймеров, ник-трансляции или способов концевого мечения), или РНК-зондов, используя доступные системы *in vitro* транскрипции. Кроме того, специфические праймеры можно сконструировать и использовать для амплификации части (или полного размера) последовательностей по настоящему изобретению. Получаемые в результате продукты амплификации можно пометить непосредственно во время реакций амплификации или пометить после реакций амплификации и использовать в качестве зондов для выделения полноразмерных фрагментов ДНК в условиях соответствующей жесткости.

Как правило, в способах амплификации типа ПЦР праймеры имеют различные последовательности и не комплементарны друг другу. В зависимости от желаемых условий проверки последовательности праймеров должны быть сконструированы так, чтобы обеспечить как эффективную, так и точную репликацию нуклеиновой кислоты-мишени. Способы конструирования ПЦР-праймеров являются общепринятыми и хорошо известными в данной области техники (Thein and Wallace, "The use of oligonucleotides as specific hybridization probes in the Diagnosis of Genetic Disorder", in Human Genetic Diseases: A Practical Approach, K.E. Davis Ed., (1986) pp. 33-50, IRL: Herndon, VA; и Rychlik, W., In Methods in Molecular Biology, White, B.A. Ed., (1993) Vol. 15, pp. 31-39, PCR Protocols: Current Methods and Applications. Humana: Totowa, NJ).

Как правило, два коротких сегмента последовательностей по настоящему изобретению можно использовать в ПЦР-протоколах для амплификации более длинных фрагментов нуклеиновых кислот, кодирующих гомологичные гены, с ДНК или РНК. ПЦР можно также проводить с использованием библиотеки клонированных фрагментов нуклеиновых кислот, причем последовательность одного праймера происходит из фрагментов нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, а в интересах последовательности другого праймера пользуются присутствием участков полиадениловой кислоты на 3'-конце предшественника

мРНК, кодирующего эукариотические гены.

В альтернативном случае последовательность второго праймера может основываться на последовательностях, происходящих из вектора для клонирования. Например, квалифицированный специалист может следовать RACE-
 5 протоколу (Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 8998 (1988)) для создания кДНК с использованием ПЦР для амплификации копий района между одним местом в транскрипте и 3'- или 5'-концом. Праймеры, ориентированные в 3'- и 5'-
 10 направлениях, можно сконструировать из последовательностей по настоящему изобретению. Используя коммерчески доступные 3'RACE- или 5'RACE-системы (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD), можно выделить специфичные 3' или 5' фрагменты кДНК (Ohara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86: 5673 (1989); Loh et al., Science, 243: 217 (1989)).

В других вариантах осуществления любой из описанных здесь фрагментов
 15 нуклеиновых кислот для дельта-5-десатураз (или любой идентифицированный здесь гомолог) можно использовать для создания новых и улучшенных десатураз жирных кислот. Как хорошо известно в данной области техники, для получения мутаций во встречающихся в природе генах десатураз можно использовать in vitro мутагенез и
 20 отбор, химический мутагенез, способы «перестановки генов» или другие способы. Альтернативно, улучшенные жирные кислоты можно синтезировать с помощью замены домена, причем функциональный домен из любого из описанных здесь фрагментов нуклеиновых кислот для дельта-5-десатураз заменяется
 25 функциональным доменом в альтернативном гене десатуразы, что приводит, таким образом, к новому белку.

Способы получения различных жирных кислот омега-3 и/или омега-6

Ожидается, что введение химерных генов, кодирующих описанные здесь дельта-5-десатуразы (например, EgD5, EgD5S или другие мутантные ферменты,
 30 оптимизированные в отношении кодонов ферменты или их гомологи) под контролем соответствующих промоторов приведет к увеличенной продукции ARA и/или EPA в трансформированном организме-хозяине соответственно. Как таковым, настоящим изобретением охватывается способ прямого получения PUFA,
 35 включающий подвергание субстрата в виде жирной кислоты (т.е. DGLA или ETA) действию описанных здесь ферментов десатураз (например, EgD5, EgD5S), так что субстрат превращается в желаемый продукт в виде жирной кислоты (т.е. ARA или EPA соответственно).

Более конкретно, целью по настоящему изобретению является обеспечение
 40 способа получения ARA в клетке-хозяине (например, содержащих или продуцирующих масло дрожжах, сое), в котором клетка-хозяин содержит

(i) выделенную нуклеотидную молекулу, кодирующую полипептид дельта-5-десатуразы, обладающий по меньшей мере 39% идентичности при сравнении с полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность, представленную
 45 в SEQ ID NO: 2, на основе алгоритмов BLASTP или способа выравнивания Clustal W;
 и

(ii) источник дигомо-γ-линолевой кислоты,
 50 причем клетку-хозяина выращивают в таких условиях, что дельта-5-десатураза экспрессируется, и DGLA превращается в ARA, и ARA необязательно выделяют.

Для квалифицированного в данной области техники специалиста понятно, что широкий диапазон субстратов дельта-5-десатуразы может сделать возможным использование фермента для превращения ETA в EPA. Соответственно, настоящим

изобретением обеспечивается способ получения ЕРА, в котором клетка-хозяин содержит

(i) выделенную нуклеотидную молекулу, кодирующую полипептид дельта-5-десатуразы, обладающий по меньшей мере 39% идентичности при сравнении с полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, на основе алгоритмов BLASTP или способа выравнивания Clustal W; и

(ii) источник эйкозатетраеновой кислоты,

причем клетку-хозяина выращивают в таких условиях, что дельта-5-десатураза экспрессируется, и ЕТА превращается в ЕРА, и ЕРА необязательно выделяют.

В альтернативном случае каждый ген дельта-5-десатуразы и его соответствующий ферментный продукт, описанный здесь, можно использовать опосредованно для продукции жирных кислот омега-3 (смотри публикацию заявки на патент США № 2005/0136519). Опосредованная продукция PUFA омега-3/омега-6 происходит, когда субстрат в виде жирной кислоты превращается опосредованно в желаемый продукт в виде жирной кислоты посредством промежуточной стадии(й) или через промежуточное соединение(я) пути. Таким образом, предусматривается, что описанные здесь дельта-5-десатуразы (например, EgD5, EgD5S или другие мутантные ферменты, оптимизированные в отношении кодонов ферменты или их гомологи) можно экспрессировать в соединении с дополнительными генами, кодирующими ферменты пути биосинтеза PUFA (например, дельта-6-десатуразы, C_{18/20}-элонгазы, дельта-17-десатуразы, дельта-15-десатуразы, дельта-9-десатуразы, дельта-12-десатуразы, C_{14/16}-элонгазы, C_{16/18}-элонгазы, дельта-9-элонгазы, дельта-8-десатуразы, дельта-4-десатуразы, C_{20/22}-элонгазы), для того, чтобы получить более высокие уровни продукции жирных кислот омега-3 с более длинными цепями (например, ЕРА, DPA и DHA). Конкретные гены, включаемые в конкретную экспрессирующую кассету, будут зависеть от клетки-хозяина (и его профиля PUFA и/или профиля десатураз/элонгаз), доступности субстрата и желаемого конечного продукта(ов).

В альтернативных вариантах осуществления может быть полезным разрушение природной дельта-5-десатуразы организма-хозяина основанное на полных последовательностях, описанных здесь, комплементе этих полных последовательностей, существенных частях этих последовательностей, оптимизированных в отношении кодонов десатуразах, происходящих из них, и таких последовательностях, которые в значительной степени гомологичны им.

Экспрессирующие системы, кассеты и векторы растений и трансформация растений

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантной конструкции, включающей какой-либо один из полинуклеотидов дельта-5-десатураз по настоящему изобретению, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, подходящей для экспрессии в растении. Промотор представляет собой последовательность ДНК, которая направляет клеточные механизмы растения на продукцию РНК с непрерывной кодирующей последовательности, находящейся 3' от промотора. Промоторная область оказывает влияние на скорость, стадию развития и тип клетки, в которой РНК-транскрипт гена продуцируется. РНК-транскрипт подвергается процессингу с продуцированием мРНК, которая служит в качестве матрицы для трансляции последовательности РНК в аминокислотную последовательность кодируемого полипептида. 5'-нетранслируемая лидерная последовательность

представляет собой район мРНК, находящийся 5' от кодирующей белок области, который может играть роль в инициации и трансляции мРНК. 3'-сигнал терминирования транскрипции/полиаденилирования представляет собой нетранслируемый район, находящийся 3' от кодирующей белок области, который функционирует в клетке растения с вызовом терминирования РНК-транскрипта и добавления нуклеотидов полиаденилатов с 3'-конца РНК.

Происхождение промотора, выбираемого для управления экспрессией кодирующей дельта-5-десатуразы последовательности, не является важным, пока он обладает достаточной транскрипционной активностью для осуществления по настоящему изобретению с помощью экспрессии способной транслироваться мРНК для желаемых фрагментов нуклеиновых кислот в желаемых тканях хозяина в подходящее время. Или гетерологичные, или не гетерологичные (т.е. эндогенные) промоторы можно использовать для осуществления на практике по настоящему изобретению. Например, подходящие промоторы включают, но без ограничения, промотор альфа штрих-соединителя бета-конглицинина, 3' промотор ингибитора трипсина Кунитца, промотор аннексина, промотор глицина Gy1, промотор бета-соединителя бета-конглицинина, промотор P34/Gly Bd m 30K, промотор альбумина, промотор Leg A1 и промотор Leg A2.

Промотор аннексина, или P34, описывается в публикации РСТ-заявки № WO 2004/071178 (опубликованной 26 августа 2004). Уровень активности промотора аннексина сравним с уровнями активности многих известных сильных промоторов, таких как (1) промотор CaMV 35S (Atanassova et al., Plant Mol. Biol. 37: 275-285 (1998); Battraw and Hall, Plant Mol. Biol. 15: 527-538 (1990); Holtorf et al., Plant Mol. Biol. 29: 637-646 (1995); Jefferson et al., EMBO J. 6: 3901-3907 (1987); Wilmink et al., Plant Mol. Biol. 28: 949-955 (1995)); (2) промоторы олеозина Arabidopsis (Plant et al., Plant Mol. Biol. 25: 193-205 (1994); Li, Texas A&M University Ph.D. dissertation, pp. 107-128 (1997)); (3) промоторы белков, добавляющих убиквитин Arabidopsis (Callis et al., J. Biol. Chem. 265(21): 12486-93 (1990)); (4) промотор гена убиквитина томатов (Rollfinke et al., Gene 211(2): 267-76 (1998)); (5) промотор белка теплового шока сои (Schoffl et al., Mol. Gen. Genet. 217(2-3): 246-53 (1989)); и (6) промотор гена гистона H3 кукурузы (Atanassova et al., Plant Mol. Biol. 37(2): 275-85 (1998)).

Другой полезной особенностью промотора аннексина является его профиль экспрессии в развивающихся семенах. Промотор аннексина наиболее активен в развивающихся семенах на ранних стадиях (раньше, чем 10 дней после опыления) и в большой степени неактивен на поздних стадиях. Профиль экспрессии промотора аннексина отличается от профиля экспрессии многих специфических для семян промоторов, например, промоторов накапливаемых в семенах белков, которые часто обеспечивают наибольшую активность на поздних стадиях развития (Chen et al., Dev. Genet. 10: 112-122 (1989); Ellerstrom et al., Plant Mol. Biol. 32: 1019-1027 (1996); Keddie et al., Plant Mol. Biol. 24: 327-340 (1994); Plant et al., (выше); Li (выше)).

Промотор аннексина имеет более обычный профиль экспрессии, но остается отличным от других известных специфических для семян промоторов. Таким образом, промотор аннексина будет очень привлекательным кандидатом, когда желательна сверхэкспрессия, или супрессия, гена в зародышах на ранней стадии развития. Например, может быть желательной сверхэкспрессия гена, регулирующего раннее развитие зародыша, или гена, вовлеченного в метаболизм до созревания семян.

После идентификации соответствующего промотора, подходящего для экспрессии

кодирующей конкретную дельта-5-десатуразу последовательности, промотор затем функционально связывают в смысловой ориентации, используя общепринятые способы, хорошо известные квалифицированным в данной области техники специалистам.

5 Используемые здесь стандартные методы рекомбинантных ДНК и молекулярного клонирования хорошо известны в данной области техники и описываются более полно Sambrook, J. и др. в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989) (в дальнейшем «Sambrook et al., 1989») или Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. и Struhl, K., Eds., в *Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley and Sons: New York, 1990 (в дальнейшем «Ausubel et al., 1990»).

15 После создания рекомбинантной конструкции ее затем можно ввести в предпочтительную клетку растения с помощью способов, хорошо известных специалистам со средним уровнем компетентности в данной области техники, (например, трансфекции, трансформации и электропорации). Клетки растения с масличными семенами являются предпочтительными клетками растений. Трансформированные клетки растения затем культивируют и регенерируют в 20 подходящих условиях, делающих возможной экспрессию PUFA с длинной цепью, которую затем необязательно выделяют и очищают.

Рекомбинантные конструкции по настоящему изобретению можно ввести в одну клетку растения или, альтернативно, каждую конструкцию можно ввести в 25 отдельные клетки растения.

Экспрессия в клетке растения может быть осуществлена временно или постоянно, как описано выше.

Желаемые длинноцепочечные PUFA можно экспрессировать в семени. Также в 30 объем этого изобретения входят семена или части растения, полученные из таких трансформированных растений.

Части растения включают дифференцированные и недифференцированные ткани, включающие, но без ограничения, корни, стебли, ростки, листья, пыльцу, семена, 35 ткани вздутий и различные формы клеток и культур (например, отдельные клетки, протопласты, зародыши и ткань каллюса). Ткани растения могут быть в растении или в органе, ткани растения или клеточной культуре.

Термин «орган растения» относится к ткани растения или группе тканей, которые создают морфологически и функционально отличную часть растения. Термин «геном» относится к следующему: 1) полному комплементу генетического 40 материала (генов и не кодирующих последовательностей), присутствующего в каждой клетке организма, или вируса, или органелле; и/или 2) полному набору хромосом, наследуемому как (гаплоидная) единица от одного родителя.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу трансформации клетки, включающему трансформацию клетки рекомбинантной 45 конструкцией по настоящему изобретению и отбор тех клеток, которые трансформированы рекомбинантной конструкцией по настоящему изобретению.

Также представляет интерес способ получения трансформированного растения, включающий трансформацию клетки растения полинуклеотидом дельта-5- 50 десатуразы по настоящему изобретению и регенерацию растения из трансформированной клетки растения.

Способы трансформации двудольных растений (главным образом с помощью использования *Agrobacterium tumefaciens*) и получения трансгенных растений были

опубликованы, среди прочих, для хлопка (патент США № 5004863; патент США № 5159135); сои (патент США № 5569834; патент США № 5416011); Brassica (патент США № 5463174); земляного ореха (Cheng et al., Plant Cell Rep. 15: 653-657 (1996); McKently et al. Plant Cell Rep. 14: 699-703 (1995)); папайи (Ling, K. et al. Bio/Technology 9: 752-758 (1991)) и гороха (Grant et al. Plant Cell Rep. 15: 254-258 (1995)). Для обзора других обычно используемых способов трансформации растений смотри Newell, C.A. (Mol. Biotechnol. 16: 53-65 (2000)). В одном из этих способов трансформации используют *Agrobacterium rhizogenes* (Tepfler, M. and Casse-Delbart, F. Microbiol. Sci. 4: 24-28 (1987)). Имеется публикация о трансформации сои с использованием прямой доставки ДНК, используя PEG-слияние (публикация РСТ-заявки № WO 92/17598), электропорацию (Chowrira, G.M. et al., Mol. Biotechnol. 3: 17-23 (1995); Christou, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 3962-3966 (1987)), микроинъекцию и бомбардировку частицами (McCabe, D.E. et al., Bio/Technology 6: 923 (1988); Christou et al., Plant Physiol. 87: 671-674 (1988)).

Имеется множество способов регенерации растения из ткани растения. Конкретный способ регенерации будет зависеть от исходной ткани растения и конкретного вида растения, подвергаемого регенерации. Регенерация, развитие и выращивание растения из одиночных трансформантов-протопластов растения или из различных трансформированных эксплантов хорошо известны в данной области техники (Weissbach and Weissbach, In Methods for Plant Molecular Biology, (eds.), Academic: San Diego, CA (1988)). Этот процесс регенерации и роста обычно включает стадии отбора трансформированных клеток и выращивание этих индивидуализированных клеток через обычные стадии развития зародышей через стадию роста с корнем. Аналогичным образом регенерируют трансгенные зародыши и семена. Получаемые в результате трансгенные ростки с корнями впоследствии высаживают в соответствующую среду для роста растений, такую как почва. Предпочтительно регенерируемые растения являются самоопыляемыми для обеспечения гомозиготных трансгенных растений. В противном случае пыльцу, полученную от регенерированных растений, переносят на выращиваемые из семян растения агрономически важных линий. В противоположном случае пыльцу от растений этих важных линий используют для опыления регенерированных растений. Трансгенное растение по настоящему изобретению, содержащее желаемый полипептид, выращивают с использованием способов, хорошо известных квалифицированному в данной области техники специалисту.

Помимо обсуждаемых выше процедур практикующие специалисты знают о стандартных ресурсных материалах, в которых описываются конкретные условия и процедуры для конструирования, манипуляции и выделения макромолекул (например, молекул ДНК, плазмид и т.п.), создания фрагментов рекомбинантных ДНК и рекомбинантных экспрессирующих конструкций и скринирования и выделения клонов. Смотри, например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor: NY (1989); Maliga et al., Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor: NY (1995); Birren et al., Genome Analysis: Detecting Genes, Vol. 1, Cold Spring Harbor: NY (1998); Birren et al., Genome Analysis: Analyzing DNA, Vol.2, Cold Spring Harbor: NY (1998); Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual, eds. Clark, Springer: NY (1997).

Примеры растений с масличными семенами включают, но без ограничения, сою, виды Brassica, подсолнечник, кукурузу, хлопок, лен и сафлор.

Примеры PUFA, имеющих по меньшей мере двадцать атомов углерода и четыре

или более углерод-углеродных двойных связей, включают, но без ограничения, жирные кислоты омега-3, такие как EPA, DPA и DHA, и жирную кислоту омега-6 ARA. В объем по настоящему изобретению входят семена, получаемые из таких растений, а также масло, полученное из таких семян.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к растению с масличными семенами, содержащему

(a) первую рекомбинантную ДНК-конструкцию, включающую выделенный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один полипептид дельта-5-десатуразы, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, и

(b) по меньшей мере одну дополнительную рекомбинантную ДНК-конструкцию, включающую выделенный полинуклеотид, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, кодирующий полипептид, выбираемый из группы, состоящей из дельта-4-десатуразы, дельта-5-десатуразы, дельта-6-десатуразы, дельта-8-десатуразы, дельта-9-десатуразы, дельта-9-элонгазы, дельта-12-десатуразы, дельта-15-десатуразы, дельта-17-десатуразы, C_{14/16}-элонгазы, C_{16/18}-элонгазы, C_{18/20}-элонгазы и C_{20/22}-элонгазы.

Дополнительные десатуразы обсуждаются, например, в патентах США № 6075183, 5968809, 6136574, 5972664, 6051754, 6410288 и публикациях РСТ-заявок № WO 98/46763, WO 98/46764, WO 00/12720 и WO 00/40705.

Выбор комбинации используемых кассет зависит отчасти от профиля PUFA и/или профиля десатураз/элонгаз клеток растения с масличными семенами, подвергаемых трансформации, и длинноцепочечных PUFA, которые следует экспрессировать.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения PUFA с длинными цепями в клетке растения, включающему

(a) трансформацию клетки рекомбинантной конструкцией по настоящему изобретению; и

(b) отбор тех трансформированных клеток, которые продуцируют PUFA с длинными цепями.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения по меньшей мере одной PUFA в клетке сои, включающему

(a) трансформацию клетки сои первой рекомбинантной ДНК-конструкцией, включающей

(i) выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид дельта-5-десатуразы, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, и

(ii) по меньшей мере одной дополнительной рекомбинантной ДНК-конструкцией, включающей выделенный полинуклеотид, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, кодирующий полипептид, выбираемый из группы, состоящей из дельта-4-десатуразы, дельта-5-десатуразы, дельта-6-десатуразы, дельта-8-десатуразы, дельта-9-десатуразы, дельта-9-элонгазы, дельта-12-десатуразы, дельта-15-десатуразы, дельта-17-десатуразы, C_{14/16}-элонгазы, C_{16/18}-элонгазы, C_{18/20}-элонгазы и C_{20/22}-элонгазы;

(b) регенерацию растения сои из трансформированной клетки стадии (a); и

(c) отбор тех полученных от растений стадии (b) семян, которые имеют измененный уровень PUFA по сравнению с уровнем в семенах, полученных от не трансформированного растения сои.

В других предпочтительных вариантах осуществления по меньшей мере одна

дополнительная рекомбинантная ДНК-конструкция кодирует полипептид, обладающий активностью дельта-9-элонгазы, например, дельта-9-элонгазы, выделенной или происходящей из *Isochrysis galbana* (№ доступа в GenBank - AF390174; IgD9e), или дельта-9-элонгазы, выделенной или происходящей из *Euglena gracilis*.

В других предпочтительных вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная рекомбинантная ДНК-конструкция кодирует полипептид, обладающий активностью дельта-8-десатуразы. Например, в публикации РСТ-заявки № WO 2005/103253 (опубликованной 22 апреля 2005) раскрываются аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты для фермента дельта-8-десатуразы из *Pavlova salina* (смотри также публикацию заявки на патент США № 2005/0273885). Sayanova и др. (FEBS Lett. 580: 1946-1952 (2006)) описывают выделение и характеристику кДНК из свободноживущей амёбы почвы *Acanthamoeba castellanii*, которая при экспрессии в *Arabidopsis* кодирует C₂₀-дельта-8-десатуразу. Также в находящейся в процессе одновременного рассмотрения заявке правопреемников заявителей, имеющей № предварительной заявки 60/795810, поданной 28 апреля 2006 (№ в реестре поверенного - ВВ-1566), раскрываются аминокислотная и нуклеотидная последовательности фермента дельта-8-десатуразы из *Pavlova lutheri* (CCMP459). В предварительной заявке США № 60/853563 (подданной 23 октября 2006; № в реестре поверенного - ВВ-1574) раскрываются аминокислотная и нуклеотидная последовательности фермента дельта-8-десатуразы из *Tetruetrepia pomquetensis* CCMP1491, вида CCMP389 рода *Eutreptiella* и *Eutreptiella cf. gymnastica* CCMP1594.

Экспрессирующие системы, кассеты и векторы микроорганизмов и трансформация микроорганизмов

Описанные в настоящем документе гены дельта-5-десатураз и продукты генов (т.е. EgD5 или другие мутантные ферменты, оптимизированные в отношении кодонов ферменты или их гомологи) можно также продуцировать в гетерологичных микробных клетках-хозяевах, в частности в клетках, содержащих или продуцирующих масло дрожжей (например, *Yarrowia lipolytica*).

Микробные экспрессирующие системы и экспрессирующие векторы, содержащие регуляторные последовательности, управляющие экспрессией на высоком уровне чужеродных белков, хорошо известны квалифицированным в данной области техники специалистам. Любые из них можно использовать для конструирования химерных генов для продукции любого из продуктов генов-последовательностей по настоящему изобретению. Эти химерные гены можно затем ввести в соответствующие микроорганизмы посредством трансформации с обеспечением экспрессии кодируемых ферментов на высоком уровне.

Векторы или ДНК-кассеты, применимые для трансформации подходящих микробных клеток-хозяев, хорошо известны в данной области техники. Конкретный выбор последовательностей, присутствующих в конструкции, зависит от желаемых продуктов экспрессии (выше), природы клетки-хозяина и предполагаемого способа отделения трансформированных клеток от нетрансформированных клеток. Как правило, однако, вектор или кассета содержит последовательности, направляющие транскрипцию и трансляцию релевантного гена(ов), селективируемый маркер и последовательность, делающую возможной автономную репликацию или хромосомную интеграцию. Подходящие векторы включают 5'-район гена, контролирующей инициацию транскрипции (например, промотор), и 3'-район фрагмента ДНК, контролирующей терминацию транскрипции (т.е. терминатор).

Наиболее предпочтительно, когда оба контролирующих района происходят из генов трансформированной микробной клетки-хозяина, хотя понятно, что такие контролирующие районы могут также происходить из генов, не являющихся природными относительно конкретного вида, выбранного в качестве хозяина продукции.

Контролирующие инициацию районы или промоторы, пригодные для стимуляции экспрессии ORF дельта-5-десатуразы в желаемой микробной клетке-хозяине, многочисленны и хорошо известны квалифицированным в данной области техники специалистам. Для настоящего изобретения подходит практически любой промотор, способный стимулировать экспрессию этих генов в выбранной клетке-хозяине. Экспрессия в микробной клетке-хозяине может осуществляться временно или постоянно. Временную экспрессию можно осуществить с помощью индукции активности регулируемого промотора, функционально связанного с представляющим интерес геном. Постоянную экспрессию можно осуществить с помощью использования конститутивного промотора, функционально связанного с представляющим интерес геном. В качестве примера, когда клетка-хозяин является клеткой дрожжей, обеспечиваются функциональные в клетках дрожжей районы, контролирующие транскрипцию и трансляцию, в частности из вида хозяина (например, смотри, публикации РСТ-заявок № WO 2004/101757 и WO 2006/052870 в отношении предпочтительных регулирующих инициацию транскрипции районов для использования в *Yarrowia lipolytica*). Любую из ряда регуляторных последовательностей можно использовать в зависимости от того, является ли желательной конститутивная или индуцируемая транскрипция, эффективности промотора при экспрессии представляющей интерес ORF, простоты конструкции и т.п.

Обнаружено, что нуклеотидные последовательности, окружающие кодон инициации «ATG», оказывают влияние на экспрессию в клетках дрожжей. Если желаемый полипептид плохо экспрессируется в дрожжах, нуклеотидные последовательности экзогенных генов можно модифицировать с включением последовательности для эффективной инициации трансляции в дрожжах для получения оптимальной экспрессии генов. Для экспрессии в дрожжах это можно осуществить с помощью сайт-направленного мутагенеза неэффективно экспрессируемого гена путем слияния его в рамке считывания с эндогенным геном дрожжей, предпочтительно высоко экспрессируемым геном. Альтернативно можно определить консенсусную последовательность инициации трансляции в хозяине и создать эту последовательность в гетерологичных генах для их оптимальной экспрессии в представляющем интерес хозяине.

Контролирующий терминацию район может происходить из 3'-района гена, из которого был получен контролирующий инициацию район, или из отличного гена. Большое количество контролирующих терминацию районов известно и функционирует удовлетворительно в ряде хозяев (при использовании как в одном и том же роде и виде, так и в роде, и виде, отличном от рода и вида, из которого они были получены). Контролирующий терминацию район обычно выбирают больше из-за удобства, а не из-за какого-либо конкретного свойства. Предпочтительно, когда микробным хозяином является клетка дрожжей, контролирующий терминацию район происходит из гена дрожжей (в частности, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Yarrowia* или *Kluyveromyces*). Также известно, что в дрожжах функционируют 3'-районы генов млекопитающих, кодирующих γ -интерферон и α -2-

интерферон. Контролирующие терминацию районы можно также получить из различных генов, природных относительно предпочтительных хозяев.

Необязательно сайт терминации может быть не нужен; однако наиболее предпочтительно, если его включают. Районы терминации, применимые в описании настоящего изобретения, включают, хотя, как подразумевается, без ограничения, ~100 п.о. 3'-района экстраклеточной протеазы *Yarrowia lipolytica* (XPR; № доступа в GenBank - M17741); терминаторы ацил-коА-оксидазы (Aco3: № доступа в GenBank - AJ001301 и № CAA04661; Pox3: № доступа в GenBank - XP_503244); терминатор Pex20 (№ доступа в GenBank - AF054613); терминатор Pex16 (№ доступа в GenBank - U75433); терминатор Lip1 (№ доступа в GenBank - Z50020); терминатор Lip2 (№ доступа в GenBank - AJ012632); и терминатор 3-оксоацил-коА-тиолазы (OCT; № доступа в GenBank - X69988).

Как известно квалифицированному в данной области техники специалисту, только встраивание гена в вектор для клонирования не гарантирует то, что он будет успешно экспрессироваться на требуемом уровне. В ответ на потребность в высокой скорости экспрессии было создано много специализированных экспрессирующих векторов с помощью манипулирования рядом различных генетических элементов, которые контролируют аспекты транскрипции, трансляции, стабильности белка, недостаток кислорода и секрецию из микробной клетки-хозяина. Более конкретно, некоторые из молекулярных особенностей, которыми можно манипулировать для контроля экспрессии генов, включают (1) природу релевантных последовательностей промотора и терминации транскрипции; (2) число копий клонированного гена и то, находится ли ген в плазмиде или он интегрирован в геном клетки-хозяина; (3) конечное расположение в клетке синтезированного чужеродного белка; (4) эффективность трансляции и правильную укладку белка в организме-хозяине; (5) внутреннюю стабильность мРНК и белка клонированного гена в клетке-хозяине; и (6) использование кодонов в клонированном гене, так чтобы частота использования кодонов в нем приближалась к частоте использования предпочтительных кодонов клетки-хозяина. В настоящее изобретение входит каждый из этих типов модификаций в качестве средств для дальнейшей оптимизации экспрессии дельта-5-десатуразы, описанной здесь.

После получения ДНК, кодирующей полипептид, подходящей для экспрессии в соответствующей микробной клетке-хозяине (например, в содержащих или продуцирующих масло дрожжах) (например, химерного гена, включающего промотор, ORF и терминатор), ее помещают в плазмидный вектор, способный автономно реплицироваться в клетке-хозяине, или она непосредственно интегрируется в геном клетки-хозяина. Интеграция экспрессирующих кассет может происходить произвольно в пределах генома хозяина или она может быть нацеленной благодаря использованию конструкций, содержащих районы гомологии с геномом хозяина, достаточной для нацеливания рекомбинации в локусе хозяина. Если конструкции нацелены на эндогенный локус, все или некоторые регулирующие транскрипцию и трансляцию районы могут быть обеспечены эндогенным локусом.

В настоящем изобретении предпочтительный способ экспрессии генов в *Yarrowia lipolytica* происходит с помощью интеграции линейной ДНК в геном хозяина; и интеграция во множество мест в пределах генома может быть особенно полезна, когда желательна экспрессия генов на высоком уровне [например, в локус Ura3 (№ доступа в GenBank - AJ306421), локус гена Leu2 (№ доступа в GenBank - AF260230), ген Lys5 (№ доступа в GenBank - M34929), локус гена Aco2 (№ доступа в GenBank -

AJ001300), локус гена Pox3 (Pox3; № доступа в GenBank - XP_503244; или Aco3: № доступа в GenBank - AJ001301), локус гена дельта-12-десатуразы (публикация РСТ-заявки № WO 2004/104167), локус гена Lip1 (№ доступа в GenBank - Z50020) и/или локус гена Lip2 (№ доступа в GenBank - AJ012632)].

В преимущественном случае ген Ura3 можно использовать многократно в комбинации с отбором с использованием 5-фтороротовой кислоты (5-фторурацил-6-карбоновой кислоты моногидрата; «5-FOA») (ниже) для того, чтобы легко сделать возможным интеграцию генетических модификаций в геном *Yarrowia*.

При экспрессии двух или более генов с отдельных реплицирующихся векторов желательно, чтобы каждый вектор содержал различные средства отбора и не был гомологичен другой конструкции(ям) для поддержания стабильной экспрессии и предотвращения образования гибридов элементов среди конструкций.

Экспериментально можно определить благоразумный выбор регуляторных районов, средств отбора и способа размножения введенной конструкции(й), вследствие чего все введенные гены будут экспрессироваться на необходимых уровнях с обеспечением синтеза желаемых продуктов.

Конструкции, содержащие представляющий интерес ген, можно вводить в микробную клетку-хозяина с помощью любого стандартного метода. Эти методы включают трансформацию например, трансформацию с использованием лития ацетата [Methods in Enzymology, 194: 186-187 (1991)], слияние протопластов, болистическое воздействие, электропорацию, микроинъекцию или любой другой метод, с помощью которого представляющий интерес ген вводится в клетку-хозяина. Более конкретные учения, применимые для содержащих или продуцирующих масло дрожжей (т.е. *Yarrowia lipolytica*), включают патенты США № 4880741 и 5071764 и Chen, D.C. и др. (Appl. Microbiol. Biotechnol., 48(2): 232-235 (1997)).

Для удобства, клетка-хозяин, которой манипулировали с помощью любого метода для приобретения ею последовательности ДНК (например, экспрессирующей кассеты), будет упоминаться здесь как «трансформированная» или «рекомбинантная». Таким образом, термин «трансформированная» и «рекомбинантная» используется здесь взаимозаменяемо. Трансформированный хозяин будет иметь по меньшей мере одну копию экспрессирующей конструкции и может иметь две или более копий, в зависимости от того, интегрирован ли ген в геном, амплифицирован ли или присутствует на экстрахромосомном элементе, имеющем множественное число копий.

Трансформированную клетку-хозяина можно идентифицировать с помощью различных методов отбора, описанных в публикациях РСТ-заявок № WO 2004/101757 и WO 2006/052870. Предпочтительными для использования здесь способами отбора являются устойчивость к канамицину, гигромицину и аминогликозиду G418, а также способность расти на среде без урацила, лейцина, лизина, триптофана или гистидина. В альтернативных вариантах осуществления для отбора дрожжевых мутантов Ura- используют 5-FOA. Соединение является токсичным для дрожжевых клеток, обладающих функционирующим геном URA3, кодирующим оротидин-5'-монофосфат-декарбоксилазу (OMP-декарбоксилазу); таким образом, 5-FOA, на основе токсичности, особенно полезен для отбора и идентификации мутантных штаммов дрожжей Ura- (Bartel, P.L. and Fields, S., Yeast 2-Hybrid System, Oxford University: New York, v. 7, pp. 109-147, 1997). Более конкретно, сначала можно выключить природный ген Ura3 с получением штамма, имеющего фенотип Ura-

причем отбор происходит на основе устойчивости к 5-FOA. Затем кластер множества химерных генов и новый ген Ura3 можно интегрировать в отличный локус генома *Yarrowia* для получения, таким образом, нового штамма, имеющего фенотип Ura⁺. Последующая интеграция приводит к продуцированию нового штамма Ura3⁻ (снова идентифицируемого с помощью отбора с использованием 5-FOA), когда введенный ген Ura3 выключается. Таким образом, ген Ura3 (в комбинации с отбором с использованием 5-FOA) можно использовать в качестве селектируемого маркера при множестве раундов трансформации.

После трансформации субстраты, подходящие для дельта-5-десатуразы по настоящему изобретению (и необязательно других ферментов PUFA, которые коэкспрессируются в клетке-хозяине), могут продуцироваться клеткой или природно, или трансгенно, или их можно обеспечить экзогенно.

Микробные клетки-хозяева для экспрессии генов и фрагментов нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут включать хозяев, которые растут на различном сырье, включающем простые или сложные углеводы, жирные кислоты, органические кислоты, масла и спирты, и/или углеводы, в широком диапазоне температур и величин pH. Основываясь на потребностях правопреемника заявителей, гены, описанные в настоящем изобретении, будут экспрессированы в продуцирующих или содержащих масло дрожжах (и, в частности, в *Yarrowia lipolytica*); однако предусматривается, что вследствие высокой консервативности транскрипции, трансляции и аппарата биосинтеза белков любая бактерия, дрожжевая клетка, водоросль и/или гриб будут подходящим микробным хозяином для экспрессии фрагментов нуклеиновых кислот по настоящему изобретению.

Предпочтительными микробными хозяевами, однако, являются продуцирующие или содержащие масло дрожжи. Эти организмы природно способны синтезировать и аккумулировать масло, причем масло может составлять более чем приблизительно 25% сухого веса клетки, более предпочтительно более чем приблизительно 30% сухого веса клетки и наиболее предпочтительно более чем приблизительно 40% сухого веса клетки. Роды, обычные определяемые как продуцирующие или содержащие масло дрожжи, включают, но без ограничения, *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* и *Lipomyces*. Более конкретно, иллюстративные синтезирующие масло дрожжи включают *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyii*, *L. lipoferus*, *Candida revkaufi*, *C. pulcherrima*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *Trichosporon pullans*, *T. cutaneum*, *Rhodotorula glutinus*, *R. graminis* и *Yarrowia lipolytica* (ранее определяемый как *Candida lipolytica*).

Наиболее предпочтительными являются продуцирующие или содержащие масло дрожжи *Yarrowia lipolytica*, и в дополнительном варианте осуществления наиболее предпочтительными являются штаммы *Y. lipolytica*, обозначенные ATCC #20362, ATCC #8862, ATCC #18944, ATCC #76982 и/или LGAM S(7)1 (Papanikolaou S., and Aggelis G., Bioresour. Technol. 82(1): 43-9 (2002)).

Исторически различные штаммы *Y. lipolytica* использовались для производства и продукции изоцитратлиазы, липаз, полигидроксиалканоатов, лимонной кислоты, эритрита, 2-оксоглутаровой кислоты, γ -декалактона, γ -додекалактона и пировиноградной кислоты. Конкретные учения, применимые для создания продукции ARA, EPA и DHA в *Y. lipolytica*, обеспечиваются в заявке на патент США № 11/264784 (WO 2006/055322), заявке на патент США № 11/265761 (WO 2006/052870) и заявке на патент США № 11/264737 (WO 2006/052871) соответственно.

Другие предпочтительные микробные хозяева включают продуцирующие или

содержащие масло бактерии, водоросли и другие грибы, и в пределах этой широкой группы микробных хозяев представляющими особый интерес являются микроорганизмы, которые синтезируют жирные кислоты омега-3/омега-6 (или микроорганизмы, которые можно генетически сконструировать для этой цели [например, другие дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae*]). Таким образом, например, трансформация *Mortierella alpina* (который коммерчески используется для продукции ARA) любым геном дельта-5-десатуразы по настоящему изобретению под контролем индуцируемого или регулируемого промотора может привести к получению организмов-трансформантов, способных синтезировать увеличенные количества DGLA. Способ трансформации *M. alpina* описывается Mackenzie и др. (Appl. Environ. Microbiol., 66: 4655 (2000)). Аналогично способы трансформации микроорганизмов Thraustochytriales описываются в патенте США № 7001772.

Основываясь на приведенных выше учениях, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения или ARA, или EPA соответственно, включающему

(а) получение содержащей или продуцирующей масло дрожжевой клетки, содержащей

(i) первую рекомбинантную ДНК-конструкцию, включающую выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид дельта-5-десатуразу, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, и

(ii) источник субстрата для десатуразы, состоящий или из DGLA, или из ETA соответственно, и

(b) выращивание дрожжевой клетки стадии (а) в присутствии подходящего подвергаемого ферментации источника углерода, причем ген, кодирующий полипептид дельта-5-десатуразу, экспрессируется, а DGLA превращается в ARA или ETA превращается в EPA соответственно, и

(с) необязательно выделение ARA или EPA соответственно стадии (b).

Может быть необходимой подача субстрата.

Конечно, поскольку продуцируемые в природе PUFA в продуцирующих или содержащих масло дрожжах ограничиваются 18:2 жирными кислотами (т.е. LA) и менее обычно 18:3 жирными кислотами (т.е. ALA), в более предпочтительных вариантах осуществления по настоящему изобретению будут генетически конструировать содержащие или продуцирующие масло дрожжи для экспрессии множества ферментов, необходимых для биосинтеза длинноцепочечных PUFA (делая, таким образом, возможной продукцию, например, ARA, EPA, DPA и DHA), помимо дельта-5-десатураз, описанных здесь.

В частности, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к содержащей или продуцирующей масло дрожжевой клетке, содержащей

(а) первую рекомбинантную ДНК-конструкцию, включающую выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид дельта-5-десатуразу, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, и

(b) по меньшей мере одну дополнительную рекомбинантную ДНК-конструкцию, включающую выделенный полинуклеотид, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, кодирующий полипептид, выбираемый из группы, состоящей из дельта-4-десатуразы, дельта-5-десатуразы, дельта-6-десатуразы, дельта-9-десатуразы, дельта-12-десатуразы, дельта-15-десатуразы, дельта-17-десатуразы, дельта-9-элонгазы, C_{14/16}-элонгазы, C_{16/18}-элонгазы, C_{18/20}-элонгазы и C_{20/22}-элонгазы.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления по настоящему изобретению по меньшей мере одна дополнительная рекомбинантная ДНК-конструкция кодирует полипептид, обладающий активностью дельта-9-элонгазы, например, дельта-9-элонгазы, выделенной или происходящей из *Isochrysis galbana* (№ 5 доступа в GenBank - AF390174; IgD9e или IgD9eS), или дельта-9-элонгазы, выделенной или происходящей из *Euglena gracilis*.

Конструирование метаболизма в виде биосинтеза жирных кислот омега-3 и/или омега-6 в микроорганизмах

Квалифицированным в данной области техники специалистам хорошо известны способы манипулирования биохимическими путями, и ожидают, что будут возможны многочисленные манипуляции для максимизирования биосинтеза жирных кислот омега-3 и/или омега-6 в содержащих или продуцирующих дрожжах и, в частности, в *Yarrowia lipolytica*. Для этой манипуляции может потребоваться создание 15 метаболизма непосредственно в пределах пути биосинтеза PUFA или дополнительная скоординированная манипуляция различных других метаболических путей.

В случае манипуляций в пределах пути биосинтеза PUFA может быть желательным 20 увеличение продукции LA для того, чтобы сделать возможной продукцию жирных кислот омега-6 и/или омега-3. Этого можно достичь введением и/или амплификацией генов, кодирующих дельта-9- и/или дельта-12-десатуразы. Для максимизирования продукции ненасыщенных жирных кислот омега-6, как хорошо известно квалифицированному в данной области техники специалисту, предпочтительна 25 продукция в организме-хозяине, который по существу лишен ALA; таким образом, предпочтительно хозяина выбирают или получают с помощью исключения или ингибирования активности десатуразы типа дельта-15 или омега-3, делающей возможным превращение LA в ALA. Альтернативно может быть желательным максимизирование продукции жирных кислот омега-3 (и минимизирования синтеза 30 жирных кислот омега-6). В этом случае можно использовать микроорганизм-хозяина, в котором активность дельта-12-десатуразы, делающей возможным превращение олеиновой кислоты в LA, исключена или ингибирована; впоследствии в хозяина вводят соответствующие экспрессирующие кассеты вместе с 35 соответствующими субстратами (например, ALA) для превращения в жирные кислоты омега-3 - производные ALA (например, STA, ETrA, ETA, EPA, DPA, DHA).

В альтернативных вариантах осуществления по настоящему изобретению биохимические пути, конкурирующие с путями биосинтеза жирных кислот омега-3 40 и/или омега-6 за энергию или углерод, или природные ферменты пути биосинтеза PUFA, мешающие продукции конкретного конечного продукта PUFA, можно элиминировать с помощью разрушения генов или супрессировать другим способом (например, с помощью антисмысловой мРНК).

В публикациях РСТ-заявок № WO 2006/055322, WO 2006/052870 и WO 2006/052871 45 представлено подробное обсуждение манипуляций в пределах пути биосинтеза PUFA в качестве способа увеличения ARA, EPA или DHA (и связанные с ними методы) соответственно в виде желаемых манипуляций в пути биосинтеза TAG и пути деградации TAG (и связанных с ними методов).

В контексте по настоящему изобретению может быть полезной модуляция 50 экспрессии пути биосинтеза жирных кислот с помощью одной из описанных выше стратегий. Например, настоящим изобретением обеспечиваются способы, посредством которых гены, кодирующие ключевые ферменты в биосинтетическом

пути с участием дельта-9-элонгазы/дельта-8-десатуразы, вводятся в содержащие или продуцирующие масло дрожжи для продукции жирных кислот омега-3 и/или омега-6. Особенно полезной будет экспрессия генов дельта-5-десатураз по настоящему изобретению в содержащих или продуцирующих масло дрожжах, которые не обладают природно путями биосинтеза жирных кислот омега-3 и/или омега-6, и координирование экспрессии этих генов для максимизирования продукции предпочтительных продуктов PUFA, используя различные средства создания метаболизма организма-хозяина.

Микробные процессы ферментации для получения PUFA

Трансформированную клетку-хозяина выращивают в условиях, которые оптимизируют экспрессию химерных генов десатураз и приводят к получению наибольшего и наиболее экономичного выхода желаемых PUFA. Как правило, условия сред, которые можно оптимизировать, включают тип и количество источника углерода, тип и количество источника азота, отношение углерода к азоту, количество различных минеральных ионов, уровень кислорода, температуру роста, pH, продолжительность фазы продукции биомассы, продолжительность фазы аккумуляции масла и время и способ сбора клеток. *Yarrowia lipolytica* обычно выращивают в сложной среде (например, среде дрожжевой экстракт-пептон-декстроза (YPD)) или в точно определенной минимальной среде, в которой отсутствует компонент, необходимый для роста, и которая, тем самым, форсирует отбор желаемых экспрессирующих кассет (например, в Основе азотного агара для классификации дрожжей (DIFCO Laboratories, Detroit, MI)).

Среда для ферментации в настоящем изобретении должна содержать подходящий источник углерода. О подходящих источниках углерода говорится в публикации РСТ-заявки № WO 2004/101757. Хотя предусматривается, что источник углерода, используемый в настоящем изобретении, может включать широкий выбор содержащих углерод источников, предпочтительными источниками углерода являются сахара, глицерин и/или жирные кислоты. Наиболее предпочтительными являются глюкоза и/или жирные кислоты, содержащие 10-22 атомов углерода.

Азот может обеспечиваться из неорганического (например, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) или органического (например, мочевины или глутамата) источника. Помимо подходящих источников углерода и азота среда для ферментации должна также содержать подходящие минеральные вещества, соли, кофакторы, буферы, витамины и другие компоненты, известные квалифицированным в данной области техники специалистам, подходящие для роста содержащих или продуцирующих масло хозяев и активации ферментативных путей, необходимых для продукции PUFA. Особое внимание уделяют нескольким ионам металлов (например, Mn^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2}), которые активируют синтез липидов и PUFA (Nakahara, T. et al., Ind. Appl. Single Cell Oils, D.J. Kyle and R. Colin, eds. pp. 61-97 (1992)).

Предпочтительными в настоящем изобретении средами для роста являются обычные, коммерчески приготовленные среды, такие как Основа азотного агара для классификации дрожжей (DIFCO Laboratories, Detroit, MI). Можно также использовать другие точно определенные или синтетические среды для роста, и квалифицированному в области микробиологии или науке ферментации специалисту известна соответствующая среда для роста трансформированных клеток-хозяев. Подходящий диапазон pH для ферментации обычно составляет приблизительно 4,0-8,0, причем в качестве диапазона для условий первоначально роста предпочтительным является pH 5,5-pH 7,5. Ферментацию можно проводить в

аэробных или анаэробных условиях, причем предпочтительными являются микроаэробные условия.

Как правило, для аккумуляции высоких уровней PUFA в содержащих или продуцирующих масло дрожжевых клетках требуется двустадийный процесс, поскольку метаболическое состояние должно быть «сбалансировано» между ростом и синтезом/запасом жиров. Таким образом, наиболее предпочтительно, когда двустадийный процесс ферментации необходим для продукции PUFA в содержащих или продуцирующих масло дрожжевых клетках (например, *Yarrowia lipolytica*). Этот подход, а также разработки для различных подходящих процессов ферментации (т.е. одноразовой загрузки, подпитываемой и непрерывной) и анализы во время роста описываются в публикации РСТ-заявки № WO 2004/101757.

Очистка и переработка масел, содержащих PUFA

PUFA можно обнаружить в хозяевах - микроорганизмах и растениях - в виде свободных жирных кислот или в этерифицированной форме, такой как ацилглицерины, фосфолипиды, сульфолипиды или гликолипиды, и их можно выделить из клеток-хозяев благодаря множеству средств, хорошо известных в данной области техники. Одним из обзоров методов выделения, анализа качества и стандартов-нормативов для липидов дрожжей является обзор Z. Jacobs (Critical Reviews in Biotechnology, 12(5/6): 463-491 (1992)). Краткий обзор последовательной переработки также доступен благодаря A. Singh и O. Ward (Adv. Appl. Microbiol., 45: 271-312 (1997)).

Вообще средства для очистки PUFA могут включать экстракцию органическими растворителями, обработку ультразвуком, селективную экстракцию с использованием газа в надкритическом состоянии (например, с использованием углекислого газа), омыление и физические средства, такие как сжатия, и их комбинации. Для дополнительных деталей приводится ссылка на учения публикации РСТ-заявки № WO 2004/101757. Способы выделения масел из семян хорошо известны в данной области техники (Young et al., Processing of Fats and Oils, In The Lipid Handbook, Gunstone et al., eds., Chapter 5 pp. 253-257; Chapman & Hall: London (1994)). Например, соевое масло получают используя ряд стадий, включающих экстракцию и очистку пищевых продуктов в виде масел из содержащих масла семян. Соевые масла и побочные продукты сои получают используя обобщенные стадии, показанные в таблице 3.

Таблица 3
Обобщенные стадии для получения соевого масла
и побочных продуктов

Стадия процесса	Процесс	Удаляемые примеси и/или получаемые побочные продукты
#1	семя сои	
#2	экстракция масла	мука
#3	рафинирование гидратацией	лецитин
#4	рафинирование с использованием щелочи или физическое рафинирование	смолы, свободные жирные кислоты, пигменты
#5	водная промывка	мыло
#6	обесцвечивание	краска, мыло, металл
#7	(гидрирование)	
#8	(фракционирование рафинированного масла охлаждением)	стеарин

#9	дезодорация	свободные жирные кислоты, токоферолы, стерины, летучие вещества
#10	продукты в виде масел	

Более конкретно, семена сои чистят, термически обрабатывают, подвергают обрушиванию и вальцуют, увеличивая, таким образом, эффективность экстракции масла. Экстракцию масла обычно выполняют с помощью экстракции растворителем (например, гексаном), но можно также выполнить с помощью комбинации физического сжатия и/или экстракции растворителем. Получаемое в результате масло называют неочищенным маслом. Неочищенное масло можно рафинировать гидратацией с помощью гидратации фосфолипидов и других полярных и нейтральных липидных комплексов, что облегчает их отделение от негидратируемой фракции триглицеридов (соевого масла). Получаемые в результате лецитиновые клеи можно далее переработать с получением коммерчески важных продуктов лецитина, используемых во множестве пищевых и промышленных продуктов в качестве агентов для образования эмульсий и разъединения (т.е. для предотвращения слипания или прилипания). Подвергнутое рафинированию гидратацией масло можно далее рафинировать для удаления примесей (главным образом свободных жирных кислот, пигментов и остающихся смол). Рафинирование выполняют путем добавления каустических агентов, которые реагируют со свободной жирной кислотой с образованием мыла и гидратов фосфатидов, и белков в неочищенном масле. Воду используют для вымывания остатков мыла, образованного во время рафинирования. Побочные продукты соапстока можно использовать непосредственно в кормах для животных или ацилировать для извлечения свободных жирных кислот. Краску удаляют благодаря адсорбции с использованием отбеливающей земли, которая удаляет большую часть соединений хлорофилла и каротеноидов. Рафинированное масло можно гидрировать, что приводит, таким образом, к жирам с различными свойствами плавления и строениями. Фракционирование рафинированного масла охлаждением (фракционирование) может использоваться для удаления стеарина из подвергнутого гидрированию масла благодаря кристаллизации в тщательно контролируемых условиях охлаждения. Дезодорация (главным образом через паровую дистилляцию под вакуумом) является последней стадией и предназначена для удаления соединений, которые придают маслу запах или вкус. Другие ценные побочные продукты, такие как токоферолы и стерины, можно удалить во время процесса дезодорации. Подвергнутый дезодорации дистиллят, содержащий эти побочные продукты, можно продать для производства природного витамина Е и других ценных фармацевтических продуктов. Рафинированные, обесцвеченные, (подвергнутые гидрированию, фракционированию) и подвергнутые дезодорации масла и жиры можно упаковать и продать непосредственно или далее переработать в более специализированные продукты. Более подробную ссылку на переработку семян сои, производство соевого масла и использование побочных продуктов можно найти у Erickson (Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization, The American Oil Chemical Society and United Soybean Board (1995)). При комнатной температуре соевое масло является жидкостью, поскольку в нем относительно мало насыщенных жирных кислот по сравнению с такими маслами, как кокосовое, пальмовое, косточковое пальмовое и какао-масло.

Содержащие PUFA масла из растений и микроорганизмов, которые были

рафинированы и/или очищены, можно гидрировать для того, чтобы получить в результате жиры с различными свойствами плавления и структурами. Для многих подвергнутых переработке жиров (включающих бутербродные пасты, кондитерские жиры, твердые масла, маргарины, кулинарные жиры и т.п.) необходимы

5 варьирующие степени твердости при комнатной температуре, и их можно получить только через изменение физических свойств исходного масла. Самым обычным образом этого можно достичь через каталитическое гидрирование.

Гидрирование представляет собой химическую реакцию, при которой водород

10 добавляется к ненасыщенным двойным связям в жирных кислотах с помощью катализатора, такого как никель. Например, в высокой степени олеиновое соевое масло содержит ненасыщенные олеиновые кислоты, LA и линоленовые жирные кислоты, и каждую из этих кислот можно гидрировать. Гидрирование имеет два основных эффекта. Во-первых, окислительная стабильность масла увеличивается в

15 результате восстановления доли ненасыщенных жирных кислот. Во-вторых, изменяются физические свойства масла, поскольку модификации жирных кислот увеличивают температуру плавления, приводя к полужидкому или твердому жиру при комнатной температуре.

Существует много параметров, оказывающих влияние на реакцию гидрирования, которая в свою очередь изменяет состав конечного продукта. Рабочие условия, включающие давление, температуру, тип и концентрацию катализатора, перемешивание и конструкцию реактора, находятся среди наиболее важных параметров, которые можно контролировать. Селективные условия гидрирования

25 можно использовать для гидрирования более ненасыщенных жирных кислот, отдавая предпочтение менее ненасыщенным жирным кислотам. Очень легкое или ручное гидрирование часто используется для увеличения стабильности жидких масел. Дальнейшее гидрирование превращает жидкое масло в физически твердый

30 жир. Степень гидрирования зависит от желаемых эксплуатационных показателей и свойств плавления, создаваемых для конкретного конечного продукта. Жидкие кулинарные жиры (используемые в производстве выпекаемых изделий, твердых жиров и кулинарных жиров, используемых для торговых операций жарения и обжаривания) и основы для производства маргарина находятся среди несчетного

35 числа возможных масляных и жировых продуктов, получаемых благодаря гидрированию. Более подробное описание гидрирования и подвергнутых гидрированию продуктов можно найти у Patterson, H.B.W., Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice. The American Oil Chemists' Society (1994).

Подвергнутые гидрированию масла стали довольно спорными из-за присутствия трансизомеров жирных кислот, являющихся результатом процесса гидрирования. С потреблением больших количеств трансизомеров были связаны пагубные для

40 здоровья эффекты, включающие увеличение отношений липопротеинов низкой плотности к липопротеинам высокой плотности в плазме крови и увеличение риска

45 коронарной болезни сердца.

Содержащие PUFA масла для использования в пищевых продуктах

В настоящее время на рынке поддерживается большое множество пищевых продуктов и продуктов питания, включающих жирные кислоты омега-3 и/или

50 омега-6 (в частности, ARA, EPA и DHA). Предусматривается, что масла из растений/семян, измененные семена и масла микроорганизмов по настоящему изобретению, содержащие PUFA, будут функционировать в пищевых продуктах и продуктах питания с приданием полезных для здоровья свойств настоящих

композиций. По сравнению с другими растительными маслами масла по настоящему изобретению, как полагают, функционируют схоже с другими маслами при пищевых применениях с физической точки зрения (например, частично гидрированные масла, такие как соевое масло, широко используются в качестве ингредиентов для мягких

5 бутербродных паст, маргарина и кулинарных жиров для жарения и обжаривания).
 Масла из растений/семян, измененные семена и масла микроорганизмов, содержащие жирные кислоты омега-3 и/или омега-6, описанные здесь, будут подходить для использования во множестве пищевых продуктов и продуктов
 10 питания, включающих, но без ограничения, пищевые аналоги, мясные продукты, зерновые продукты, выпеченные продукты, продукты для легкой закуски, молочные продукты. Кроме того, масла из растений/семян, измененные семена и масла микроорганизмов по настоящему изобретению можно использовать в композициях для придания полезных для здоровья свойств медицинским продуктам, включающим
 15 медицинские питательные вещества, добавки к рациону, составы для детей младшего возраста, а также фармацевтические продукты. Квалифицированный в области пищевой переработки и пищевого приготовления специалист понимает, каким образом количество и композицию масел из растений и микроорганизмов можно
 20 добавить к пищевым продуктам или продуктам питания. Такое количество будет упоминаться здесь как «эффективное количество», и оно будет зависеть от пищевого продукта или продукта питания, рациона, который продукт, как планируется, дополняет, или медицинского состояния, которое медицинский продукт или
 медицинское питательное вещество, как планируется, корректирует или лечит.

25 Пищевые аналоги можно получить с использованием процессов, хорошо известных квалифицированным в данной области техники специалистам. Можно отметить аналоги мяса, аналоги сыра, аналоги молока и т.п. Аналоги мяса, полученные из сои, содержат соевый белок или соевый творог и другие ингредиенты,
 30 смешанные вместе для имитации различных видов мяса. Эти альтернативы мяса продают в виде замороженных, консервированных или сухих продуктов. Обычно их можно использовать так же, как и пищевые продукты, которые они заменяют. Альтернативы мясу, изготовленные из сои, являются превосходными источниками белка, железа и витаминов В. Примеры аналогов мяса включают, но без
 35 ограничения, аналоги окорока, колбасные аналоги, аналоги бекона и т.п.

Пищевые аналоги группируют на имитации или заменители в зависимости от их функциональных и композиционных характеристик. Например, сыр-имитация должен только напоминать сыр, который он, как планируется, заменяет. Однако
 40 обычно продукт можно назвать сыром-заменителем только в том случае, если он в пищевом отношении эквивалентен сыру, который он заменяет, и удовлетворяет минимальным композиционным требованиям для этого сыра. Следовательно, часто сыр-заменитель будет иметь более высокие уровни белка, чем сыр-имитация, и в нем будет увеличена концентрация витаминов и минеральных веществ.

45 Аналоги молока или немолочные пищевые продукты включают, но без ограничения, молоко-имитацию и немолочные замороженные десерты (например, те, которые изготовлены из сои и/или содержащие соевый белок продукты).

Мясные продукты включают широкий выбор продуктов. В Соединенных Штатах
 50 «мясо» включает «мясо», получаемое от крупного рогатого скота, свиней и овец. Помимо мяса существуют изделия из домашней птицы, включающей кур, индюшек, гусей, цесарок, уток, и рыба, и моллюски. Существует широкий ассортимент мясных продуктов с добавками обогатителей и продуктов обработки мяса: рыба,

подвергнутая технической обработке и жаренная, и подвергнутая технической обработке и варке. Колбасы и горячие сосиски являются примерами продуктов обработки мяса. Таким образом, используемый здесь термин «мясные продукты» включает, но без ограничения, продукты обработки мяса.

Зерновой пищевой продукт представляет собой пищевой продукт, получаемый при переработке хлебных злаков. Хлебный злак включает любое растение семейства трав, которое дает пищевое зерно (семя). Наиболее популярными зерновыми являются ячмень, кукуруза, просо, овес, киноа, рис, рожь, сорго, род Triticale, пшеница и дикий рис. Примеры зерновых пищевых продуктов включают, но без ограничения, целое зерно, дробленое зерно, крупы, муку, отруби, зародыш, блюда из зернового продукта для завтрака, продукты экструзии, пасты и т.п.

Выпеченные продукты-товары включают любой из зерновых пищевых продуктов, упоминаемых выше, и подвергнутый выпечке или обработке способом, сходным с выпеканием (т.е. высушиванию или затвердению с помощью подвергания воздействию тепла). Примеры выпеченных продуктов-товаров включают, но без ограничения, хлеб, торты, пончики, батоны, пасты, панировочные сухари, выпеченные легкие закуски, маленькие галеты, маленькие крекеры, маленькие пирожные и маленькие претцели. Как упоминалось выше, в качестве ингредиента можно использовать масла по настоящему изобретению.

Пищевой продукт для легкой закуски включает любой из описываемых выше или ниже пищевых продуктов.

Жареный пищевой продукт включает любой из описываемых выше или ниже пищевых продуктов, подвергнутый жарке.

Целебный пищевой продукт включает любой пищевой продукт, который приносит пользу здоровью.

Напиток может быть жидкостью или в любой порошковой форме.

Например, можно указать негазированные напитки, такие как фруктовые соки, свежие, замороженные, консервированные или в виде концентрата; ароматные или простые молочные напитки и т.п. Составы для питания взрослых и детей младшего возраста хорошо известны в данной области техники и коммерчески доступны (например, Similac®, Ensure®, Jevity® и Alimentum® от Ross Products Division, Abbott Laboratories).

Составы для детей младшего возраста являются жидкостями или восстанавливаемыми порошками, которыми кормят детей младшего возраста и новорожденных. «Составы для детей младшего возраста» определяют здесь как энтеральный продукт питания, которым можно заменить грудное молоко человека при кормлении детей младшего возраста и который состоит из желаемого процента жира, смешанного с желаемыми процентами углеводов и белков в водном растворе (смотри, например, патент США № 4670285). На основе всемирных исследований состава, а также уровней, установленных группами экспертов, в среднем грудном молоке человека обычно содержится приблизительно 0,20%-0,40% жирных кислот в целом (считая, что приблизительно 50% калорий от жира), и, как правило, отношение DHA к ARA находится в диапазоне от приблизительно 1:1 до 1:2 (смотри, например, составы Enfamil LIPIL™ (Mead Johnson & Company) и Similac Advance™ (Ross Products Division, Abbott Laboratories)). Составы для детей младшего возраста должны играть особую роль в питании детей младшего возраста, поскольку они часто являются единственным источником питательных веществ для детей младшего возраста; и хотя кормление грудью является все еще самым лучшим питанием для

детей младшего возраста, состав для детей младшего возраста является достаточно близким вторым питанием, которое позволяет детям не только выживать, но и процветать.

Молочный продукт представляет собой продукт, получаемый из молока. Аналог молока или немолочный продукт получают из источника, отличного от молока, например, соевого молока, как обсуждалось выше. Эти продукты включают, но без ограничения, цельное молоко, сепарированное молоко, кисломолочные продукты, такие как йогурт или простокваша, сливки, масло, сгущенное молоко, дегидрированное молоко, используемый в кофе порошковый заменитель молока, используемый в кофе порошковый заменитель сливок, мороженое, сыр и т.п.

Дополнительными пищевыми продуктами, в которые можно было бы включить содержащие PUFA масла, являются, например, жевательные резинки, кондитерские изделия и глазури, желатины и пудинги, твердые и мягкие конфеты, джемы и желе, белый сахарный песок, заместители сахара, сладкие колбасы, украшения десерта и сиропы, и смешанные сухими порошковые смеси.

Содержащие PUFA масла для использования в целебных пищевых продуктах и фармацевтических препаратах

Целебный пищевой продукт представляет собой любой пищевой продукт, который приносит пользу здоровью, и включает функциональные продукты питания, медицинские продукты питания, медицинские питательные вещества и добавки к рациону. Кроме того, масла из растений/семян, измененные семена и масла микроорганизмов по настоящему изобретению можно использовать в стандартных фармацевтических композициях (например, содержащие длинноцепочечные PUFA масла можно легко включить в любой из упоминаемых выше пищевых продуктов для получения, таким образом, функционального или медицинского продукта питания). Более концентрированные композиции, содержащие PUFA, включают капсулы, порошки, таблетки, мягкие желатиновые оболочки, окружающие жидкое заполнение, растворимый каркас из желатина, жидкие концентраты и эмульсии, которые можно использовать к качестве добавок к рациону людей или животных, отличных от людей.

Содержащие PUFA масла для использования в кормах для животных

Корма для животных в общем определяют здесь как продукты, предназначенные для использования в качестве корма или для введения в корм для животных, отличных от людей. Масла из растений/семян, измененные семена и масла микроорганизмов по настоящему изобретению можно использовать в качестве ингредиентов в различных кормах для животных.

Более конкретно, хотя здесь без ограничения, ожидается, что масла по настоящему изобретению можно использовать в пищевых продуктах для домашних животных, пищевых продуктах для жвачных животных и домашней птицы и аквакультуральных пищевых продуктах. Пищевыми продуктами для домашних животных являются продукты, предназначенные для кормления домашнего животного (например, собаки, кошки, птицы, рептилии, грызуны). Эти продукты могут включать зерновые и лечебные пищевые продукты, упоминаемые выше, а также мясо и мясные субпродукты, содержащие соевой белок продукты, травяные и сенные продукты (например, люцерну, тимофеевку, овес или костер, овощи). Пищевые продукты для жвачных животных и домашней птицы являются продуктами, которые предназначены для кормления животного (например, индюшек, кур, крупного рогатого скота, свиней). Как и в случае упоминаемых выше

продуктов для домашних животных, эти продукты могут включать зерновые и лечебные пищевые продукты, содержащие соевой белок продукты, мясо и мясные субпродукты и травяные и сенные продукты, перечисленные выше.

5 Аквакультуральные пищевые продукты (или «аквакорма») являются продуктами, предназначенными для использования в аквафермерстве, т.е. которое относится к размножению, выращиванию или фермерству акватических животных и/или животных в пресной или морской воде.

ПРИМЕРЫ

10 Настоящее изобретение далее описывается в следующих примерах. Следует понимать, что эти примеры, хотя и показывающие предпочтительные варианты осуществления по настоящему изобретению, приведены только в качестве иллюстрации. Из приведенного выше обсуждения и этих примеров

15 квалифицированный в данной области специалист может выяснить существенные характеристики настоящего изобретения и без отклонения от сущности и объема изобретения может осуществить различные изменения и модификации по настоящему изобретению для его адаптации к различным применениям и условиям.

ОБЩИЕ СПОСОБЫ

20 Стандартные методы рекомбинантных ДНК и молекулярного клонирования, описываемые в примерах, хорошо известны в данной области техники и описываются 1) Sambrook, J., Fritsch, E.F. и Maniatis, T. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (Maniatis)); 2) T.J. Silhavy, M.L. Bannan и L.W. Enquist (Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984)), и 3) Ausubel, F.M. и др. (Current Protocols in Molecular Biology, опубликованные Greene Publishing Assoc. и Wiley-Interscience, Hoboken, NJ (1987)).

Материалы и методы, подходящие для поддержания и роста культур

30 микроорганизмов, хорошо известны в данной области техники. Методы, подходящие для применения в следующих примерах, можно найти представленными в Manual of Methods for General Bacteriology (Phillipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Phillips, Eds), American Society for Microbiology: Washington, DC. (1984)) или Thomas D. Brock

35 в Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 2nd ed., Sinauer Associates: Sunderland, MA (1989). Все реагенты, рестрикционные ферменты и материалы, используемые для роста и поддержания клеток микроорганизмов, получали от Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) или Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), если не указано иное.

40 Компетентные клетки *E.coli* (XL1-Blue) покупали у Stratagene Company (San Diego, CA).

Штаммы *E.coli* обычно выращивали при 37°C на чашках со средой Лурия-Бертани (LB).

Обычное молекулярное клонирование проводили в соответствии со

45 стандартными способами (Sambrook, выше). Последовательность ДНК создавали на автоматическом секвенсере ABI, используя технологию терминирующих красителей (патент США № 5366860; EP 272007) с использованием комбинации вектора и специфичных для вставки праймеров. Прочтение последовательностей выполняли на

50 секвенсере (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Все последовательности прочитывали по меньшей мере дважды в обоих направлениях. Сравнения генетических последовательностей выполняли с использованием программного обеспечения DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI).

Значение сокращений является следующим: «сек» означает секунду(ы), «мин» означает минуту(ы), «ч» означает час(ы), «д» означает день (дни), «мкл» означает микролитр(ы), «мл» означает миллилитр(ы), «л» означает литр(ы), «мкМ» означает микромолярный, «мМ» означает миллимолярный, «М» означает молярный, «ммоль»
 5 означает миллимоль(и), «мкмоль» означает микромоль(и), «г» означает грамм(ы), «мкг» означает микрограмм(ы), «нг» означает нанограмм(ы), «Е» означает единицу(ы), «п.о.» означает пару(ы) оснований, «т.о.» означает тысячу (тысячи) оснований.

10 Трансформация и культивирование *Yarrowia lipolytica*

Штамм ATCC #20362 *Yarrowia lipolytica* приобретали из Американской коллекции типовых культур (Rockville, MD). Штаммы *Y. lipolytica* обычно выращивали при 28°C на агаре YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% бактопептона, 2% глюкозы, 2% агара).

Трансформацию *Y. lipolytica* осуществляли согласно способу Chen, D.C. и др. (Appl. Microbiol. Biotechnol., 48(2): 232-235 (1997)), если не отмечено иное. Вкратце, *Yarrowia*
 15 штриховали на чашки YPD и выращивали при 30°C в течение приблизительно 18 ч. С чашки соскребали несколько больших петель клеток, и ресуспендировали их в 1 мл буфера для трансформации, содержащего 2,25 мл 50% PEG, средняя М.м. 3350; 0,125 мл 2 М ацетата Li, pH 6,0; 0,125 мл 2 М DTT и 50 мкг фрагментированной ДНК из
 20 молок лососевых. Затем приблизительно 500 нг линейаризованной плазмидной ДНК инкубировали в 100 мкл ресуспендированных клеток и сохраняли при 39°C в течение 1 ч с вихревым перемешиванием с интервалами в 15 мин. Клетки помещали на чашки со средой для отбора и сохраняли при 30°C в течение 2-3 дней.

Для отбора трансформантов обычно использовали минимальную среду («ММ»); ММ имеет следующий состав: 0,17% основы азотного агара для классификации
 25 дрожжей (DIFCO Laboratories, Detroit, MI) без сульфата аммония или аминокислот, 2% глюкозы, 0,1% пролина, pH 6,1. Добавляли, если уместно, добавки урацила до конечной концентрации, составляющей 0,01% (получая, таким образом, среду для
 30 отбора «ММУ», приготовленную с 20 г/л агара).

В альтернативном случае трансформанты отбирали на среде для отбора с использованием 5-фтороротовой кислоты («FOA»; также 5-фторурацил-6-карбоновой кислоты моногидрата), содержащей 0,17% основы азотного агара для
 35 классификации дрожжей (DIFCO Laboratories) без сульфата аммония или аминокислот, 2% глюкозы, 0,1% пролина, 75 мг/л урацила, 75 мг/л уридина, 900 мг/л FOA (Zymo Research Corp., Orange, CA) и 20 г/л агара.

Анализ жирных кислот *Yarrowia lipolytica*

Для анализа жирных кислот клетки собирали с помощью центрифугирования, и
 40 липиды экстрагировали, как описано Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917 (1959)). Эфиры метилового спирта и жирных кислот готовили с помощью трансэтерификации экстракта липидов с использованием натрия метилата (Roughan, G., and Nishida I., Arch Biochem Biophys., 276(1): 38-46 (1990)) и впоследствии
 45 анализировали с использованием Hewlett-Packard 6890 GC, снабженного колонкой 30-м × 0,25 мм (внутренний диаметр) HP-INNOWAX (Hewlett-Packard). Температура термостата была от 170°C (удерживаясь на этом значении в течение 25 мин) до 185°C с подъемом на 3,5°C/мин.

Для прямой базовой трансэтерификации собирали культуру *Yarrowia* (3 мл), промывали ее один раз в дистиллированной воде и сушили под вакуумом в Speed-Vac
 50 в течение 5-10 мин. К образцу добавляли натрия метилат (100 мкл 1%), и затем образец встряхивали и качали в течение 20 мин. После добавления 3 капель 1 М NaCl

и 400 мкл гексана образец встряхивали и центрифугировали. Верхний слой удаляли и анализировали с помощью GC, как описано выше.

ПРИМЕР 1

Условия роста *Euglena gracilis*, профиль липидов и выделение мРНК

Euglena gracilis получали из лаборатории Dr. Richard Triemer в Michigan State University (East Lansing, MI). Из 10 мл активно растущей культуры переносили 1 мл-аликвоту в 250 мл среды для *Euglena gracilis* (Eg) в 500-мл стеклянную колбу. Среда для Eg получали объединением 1 г натрия ацетата, 1 г бычьего экстракта (каталожный #U126-01, Difco Laboratories, Detroit, MI), 2 г Bacto®tryptone (каталожный #0123-17-3, Difco Laboratories) и 2 г дрожжевого экстракта Bacto® (каталожный #0127-17-9, Difco Laboratories) в 970 мл воды. После стерилизации фильтрованием асептически добавляли 30 мл супернатанта почвенной воды (каталожный #15-3790, Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC) с получением конечной среды для Eg. Культуры *Euglena gracilis* выращивали при 23°C с использованием цикла, состоящего из 16 ч света и 8 ч тьмы, в течение 2 недель без перемешивания.

Через 2 недели отбирали 10 мл культуры для липидного анализа и центрифугировали при 1800×g в течение 5 мин. Осадок промывали один раз водой и повторно центрифугировали. Получаемый в результате осадок сушили в течение 5 мин под вакуумом, ресуспендировали в 100 мкл триметилсульфония гидроксида (TMSH) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин со встряхиванием. После этого добавляли 0,5 мл гексана, и пробирки инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре со встряхиванием. Эфиры метилового спирта и жирных кислот (5 мкл вводили из слоя гексана) отделяли и определяли количество с использованием газового хроматографа Hewlett-Packard 6890, снабженного капиллярной колонкой с кварцевым стеклом Omegawax 320 (каталожный #24152, Supelco Inc., Bellefonte, PA). Программировали, чтобы температура термостата удерживалась при 220°C в течение 2,5 мин, увеличивалась до 240°C с подъемом на 20°C/мин и затем удерживалась в течение дополнительных 2,3 мин. Газ-носитель поставлялся генератором водорода Whatman. Времена удержания сравнивали со временами удержания метиловых эфиров стандартов, коммерчески доступных (каталожный #U-99-F, Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN), и результирующая хроматограмма показана на фиг. 2.

Остающуюся 2-недельную культуру (240 мл) осаждали центрифугированием при 1800×g в течение 10 мин, промывали один раз водой и повторно центрифугировали. Общую РНК экстрагировали из получаемого в результате остатка, используя реагент RNA STAT-60™ (TEL-TEST, Inc., Friendswood, TX) и следуя предоставленному производителем протоколу (использовать 5 мл реагента, растворить РНК в 0,5 мл воды). Таким образом из осадка было получено 1 мг общей РНК (2 мг/мл). Из 1 мг общей РНК выделяли мРНК с использованием набора для очистки мРНК (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), следуя предоставленному производителем протоколу. Таким образом было получено 85 мкг мРНК.

ПРИМЕР 2

Синтез кДНК *Euglena gracilis*

кДНК синтезировали непосредственно с мРНК *Euglena gracilis* следующим образом. В частности, мРНК праймировали адаптерным праймером AP (SEQ ID NO: 65) из набора для 3'-RACE Invitrogen (Carlsbad, CA) в присутствии олигонуклеотида Smart IV (SEQ ID NO: 66) из набора для библиотеки кДНК Creator™

SmartTM BD-Clontech (Mississauga, ON, Канада). Обратную транскрипцию проводили с использованием обратной транскриптазы Superscript II из набора для 3'-RACE в соответствии с протоколом для набора для библиотеки кДНК CreatorTM SmartTM.

Смесь синтеза 1-й цепи кДНК использовали в качестве матрицы для амплификации с помощью ПЦР, используя AP в качестве 3' праймера и CDSIII 5' праймер (SEQ ID NO: 36) в качестве 5' праймера (поставляемого с набором для библиотеки кДНК CreatorTM SmartTM BD-Clontech). Амплификацию проводили с использованием смеси кДНК-полимеразы Clontech Advantage при 94°C в течение 30 сек с последующими 20 циклами, состоящими из 94°C в течение 10 сек и 68°C в течение 6 мин. Осуществляли конечное удлинение при 68°C в течение 7 мин.

ПРИМЕР 3

Выделение части кодирующей области гена дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis*

В этом примере описывается идентификация части гена *Euglena gracilis*, кодирующего дельта-5-десатуразу (обозначенную здесь «EgD5» (SEQ ID NO: 1 и 2)), с помощью использования праймеров, происходящих из консервативных районов последовательностей других известных дельта-5- и дельта-8-десатураз.

При оценке того, на основе каких десатураз можно сконструировать вырожденные праймеры, подходящие для выделения дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis*, принимались во внимание различные соображения. В частности, заявители знали, что только последовательности дельта-5-, дельта-6- и дельта-8-десатураз включают консервативный мотив «HPGG» на своих N-концах (причем домен «HPGG» является частью домена хорошо известного цитохрома B5); напротив, дельта-9-десатуразы обладают мотивом «HPGG» домена цитохрома B5 на своих C-концах, в то время как у дельта-17-, так и у дельта-12-десатураз отсутствует домен цитохрома B5. Предположили, что в *Euglena gracilis* функционирует путь с участием дельта-9-элонгазы/дельта-8-десатуразы; поэтому среди десатураз, разделяющих N-концевой консервативный мотив «HPGG», только дельта-5- и дельта-8-десатуразы ожидалось в этом организме. Наконец, хотя известно только малое число последовательностей дельта-8-десатураз, публично доступны многочисленные дельта-5-десатуразы. Заявители отобрали те последовательности дельта-5-десатураз, которые менее гомологичны генам «традиционных» дельта-5-десатураз и которые также разделяют высокую гомологию друг к другу.

На основе отмеченного выше были подвергнуты выравниванию четыре дельта-5-десатуразы и две дельта-8-десатуразы, представленные ниже в таблице 3А, используя способ Clustal W (медленного, точного варианта Гоннета; Thompson et al., Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680 (1994)) программы MegAlignTM программного обеспечения DNASTAR.

Таблица 3А

Выравнивание дельта-5- и дельта-8-десатураз для идентификации районов консервативных аминокислот

Десатураза	Организм	Ссылка	SEQ ID NO:
дельта-5	<i>Pythium irregulare</i>	№ доступа в GenBank - AAL13311	12
дельта-5	<i>Phytophthora megasperma</i>	№ доступа в GenBank - CAD53323	13
дельта-5	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	№ доступа в GenBank - AAL92562	14
дельта-5	<i>Dictyostelium discoideum</i>	№ доступа в GenBank - XP_640331	15

дельта-8	<i>Euglena gracilis</i>	Публикации РСТ-заявок № WO 2006/012325 и WO 2006/012326	16
дельта-6	<i>Pavlova lutheri</i>	Пример 12 (ниже)	18

На фиг. 3 демонстрируется часть результирующего выравнивания, содержащую несколько протяжений последовательности консервативных аминокислот среди 6 различных организмов. На основе этого выравнивания были сконструированы два набора вырожденных олигонуклеотидов для амплификации части кодирующей области гена дельта-5-десатуразы из *Euglena gracilis*, соответствующих районам фиг. 3, которые обозначены «Консервативный район 1» и «Консервативный район 2». В частности, была создана последовательность консервативных аминокислот GHH(I/V)YTN (SEQ ID NO: 19), соответствующая консервативному району 1, тогда как последовательность консервативных аминокислот N(Y/F)Q(V/I)EHH (SEQ ID NO: 20) была создана для соответствия консервативному району 2. Для уменьшения вырожденности олигонуклеотидов были сконструированы 4 набора олигонуклеотидов (т.е. 5-1A, 5-1B, 5-1C и 5-1D), кодирующие консервативный район 1, и были сконструированы 4 набора олигонуклеотидов (т.е. 5-5AR, 5-5BR, 5-5CR и 5-5DR), кодирующие антисмысловую цепь консервативного района 2.

Таблица 4

Вырожденные олигонуклеотиды, используемые для амплификации гена дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis*

название олигонуклеотида	последовательность	SEQ ID NO
5-1A	GGHCAYCAYRTBTAYACAAA	SEQ ID NO:27
5-1B	GGHCAYCAYRTBTAYACCAA	SEQ ID NO:28
5-1C	GGHCAYCAYRTBTAYACGAA	SEQ ID NO:29
5-1D	GGHCAYCAYRTBTAYACTAA	SEQ ID NO:30
5-5AR	TGRTGVACAAYYTGRWARTT	SEQ ID NO:31
5-5BR	TGRTGVACTAYYTGRWARTT	SEQ ID NO:32
5-5CR	TGRTGVACCAYYTGRWARTT	SEQ ID NO:33
5-5DR	TGRTGVACGAYYTGRWARTT	SEQ ID NO:34

[Замечание

: для SEQ ID NO: 27-34 использовался следующий код вырожденности нуклеиновых кислот: R=A/G; Y=C/T; W=A/T; B=G/T/C; V=G/A/C; и N=A/C/T.]

На основе полноразмерных последовательностей дельта-5-десатураз таблицы 3 выдвинули гипотезу, что размер фрагмента гена дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis*, амплифицированный, как описано выше, должен был бы составлять приблизительно 600 п.о. (без приблизительно 210 аминокислот на его N-конце и 70 аминокислот на его C-конце).

В целом провели шестнадцать различных ПЦР-амплификаций, поскольку были проверены все комбинации праймеров (т.е. праймер 5-1A использовали с каждым из 5-5AR, 5-5BR, 5-5CR и 5-5DR, индивидуально; аналогично праймер 5-1B использовали с каждым из 5-5AR, 5-5BR, 5-5CR и 5-5DR, и т.д.). ПЦР-амплификации проводили в общем объеме 50 мкл, включающем ПЦР-буфер (содержащий 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 8,75), 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100), 100 мкг/мл BSA (конечная концентрация), 200 мкМ концентрацию каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 10 пмоль каждого праймера, 10 нг кДНК *E. gracilis* и 1 мкл Taq ДНК-полимеразы (Epicentre Technologies, Madison, WI). Условия термоциклера были заданы на 35 циклов при 95°C в течение 1 мин, при 56°C в течение 30 сек и при 72°C в течение 1 мин с последующим конечным удлинением

при 72°C в течение 10 мин.

Продукты ПЦР очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР Qiagen (Valencia, CA). Один фрагмент приблизительно ожидаемого размера затем очищали после гель-электрофореза в 1% (вес/объем) агарозе и затем клонировали в вектор pGEM-T-easy (Promega, Madison, WI). Подвергнутую лигированию ДНК использовали для трансформации клеток *E.coli* DH10B, и отбор трансформантов осуществляли на агаре LB (1% бактотриптона, 0,5% бакто-дрожжевого экстракта и 1% NaCl), содержащем ампициллин (100 мкг/мл). Анализ плазмидной ДНК из группы из 12 трансформантов подтвердил присутствие вставки ожидаемого размера (плазмиды были обозначены «pT-F10-1», «pT-F10-2», «pT-F10-3» и т.д. до «pT-F10-12»).

Анализ последовательностей показал, что плазида pT-F10-1 содержала фрагмент размером 590 п.о. (SEQ ID NO: 4), который кодирует 196 аминокислот (SEQ ID NO: 5) (в том числе аминокислоты, которые соответствуют консервативному району 1 и 2). Подлинность последовательности *Euglena* определяли с помощью проведения поисков BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (базисный, поисковый способ локального выравнивания); Altschul, S.F., et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1993)) на схожесть последовательностей, содержащихся в базе данных BLAST «nr» (включающей все не являющиеся лишними трансляции CDS GenBank, последовательности, происходящие из банка данных о 3-мерных структурах белков Brookhaven, базы данных о белковых последовательностях SWISS-PROT, базы данных EMBL и DDBJ). Последовательность анализировали на схожесть со всеми публично доступными последовательностями ДНК, содержащимися в базе данных «nr», используя алгоритм BLASTN, предоставленный National Center for Biotechnology Information (NCBI). SEQ ID NO: 4 анализировали на схожесть со всеми публично доступными белковыми последовательностями, содержащимися в базе данных «nr», используя алгоритм BLASTX (Gish, W. and States, D.J., Nature Genetics, 3: 266-272 (1993)), предоставленный NCBI.

Результаты сравнений BLASTX с выводом, касающимся последовательности, с которой наиболее схожа SEQ ID NO: 4, сообщаются в соответствии с % идентичности, % схожести и ожидаемым значением. «% Идентичности» определяют как процент аминокислот, являющихся идентичными между двумя белками. «% Схожести» определяют как процент аминокислот, являющихся идентичными или консервативными между двумя белками. «Ожидаемое значение» оценивает статистическую значимость соответствия, определяя число соответствий, с данной оценкой, которое ожидается при поиске в базе данных этого размера абсолютно случайно. Таким образом, транслированная аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 4 (т.е. SEQ ID NO: 5) идентична на 38% и схожа на 53% с аминокислотной последовательностью дельта-8-десатуразы сфинголипидов *Thalassiosira pseudonana* (№ доступа в GenBank - AAX14502; SEQ ID NO: 21), с ожидаемым значением 5E-28; кроме того, частичный фрагмент SEQ ID NO: 4 идентичен на 37% и схож на 52% с дельта-5-десатуразой жирных кислот *Phaeodactylum tricornutum* (№ доступа в GenBank - AAL92562, SEQ ID NO: 14), с ожидаемым значением 7E-28.

ПРИМЕР 4

Выделение 5' кодирующей области гена дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis*

Для выделения N-концевой части предполагаемой дельта-5-десатуразы, идентифицированной в примере 3, использовали модифицированный метод 5'-RACE,

основанный на протоколах для RACE от двух различных компаний (т.е. Invitrogen и BD-Clontech).

Вкратце, двухцепочечную кДНК *Euglena gracilis* (пример 2) использовали в качестве матрицы в эксперименте 5' RACE, включающем два отдельных раунда ПЦР-амплификации. В первом раунде ПЦР-амплификации олигонуклеотидные праймеры состояли из специфического для гена олигонуклеотида (т.е. ODMW480; SEQ ID NO: 35) и общего олигонуклеотидного 5' праймера CDDIII (SEQ ID NO: 36) из набора для библиотеки кДНК CreatorTM SmartTM BD-Clontech. ПЦР-амплификации проводили в общем объеме 50 мкл, включающем 25 мкл предварительно подготовленной смеси LA TaqTM (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, 520-2193, Япония), 10 пмоль каждого праймера и 1 мкл Taq ДНК-полимеразы (Epicentre Technologies, Madison, WI). Условия термоциклера были заданы на 35 циклов при 95°C в течение 1 мин, при 56°C в течение 30 сек и при 72°C в течение 1 мин с последующим конечным удлинением при 72°C в течение 10 мин.

Для второго раунда ПЦР-амплификации использовали 1 мкл продукта из ПЦР первого раунда в качестве матрицы. Праймеры состояли из специфического для гена олигонуклеотида (т.е. ODMW479; SEQ ID NO: 37) и общего 5' олигонуклеотида DNR CDS (SEQ ID NO: 38), поставляемого из набора для библиотеки кДНК CreatorTM SmartTM BD-Clontech. Амплификацию проводили, как описано выше.

Продукты ПЦР второго раунда подвергали электрофорезу в 1% (вес/объем) агарозе. Продукты между 400 п.о. и 800 п.о. затем очищали из геля и клонировали в вектор pGEM-T-easy (Promega, Madison, WI). Подвергнутую лигированию ДНК использовали для трансформации *E.coli* DH10B, и отбор трансформантов осуществляли на агаре LB, содержащем ампициллин (100 мкг/мл).

Анализ плазмидной ДНК из одного трансформанта, включающего 5'-район гена предполагаемой дельта-5-десатуразы, подтвердил присутствие ожидаемой плазмиды, обозначенной рТ-EgD5-5'C2. Анализ последовательностей показал, что рТ-EgD5-5'C2 содержала фрагмент размером 797 п.о. (SEQ ID NO: 6), которые перекрывались с 238 п.о. 5'-конца фрагмента размером 590 п.о. рТ-F10-1 (пример 3, SEQ ID NO: 4) и дополнительно обеспечивали 559 п.о. 5' последовательности (SEQ ID NO: 7) (фиг. 4). Последовательность рТ-EgD5-5'C2 также корректировала последовательность, соответствующую консервативному району 1, являющуюся результатом использования вырожденного олигонуклеотида для первоначальной ПЦР-амплификации фрагмента размером 590 п.о. в рТ-F10-1 (пример 3). Однако в удлинённом фрагменте размером 797 п.о. SEQ ID NO: 6 не было кодона инициации трансляции.

Второй раунд модифицированного метода 5'-RACE проводили, как описано выше, за исключением, что в качестве специфических для гена праймеров использовали олигонуклеотиды YL791 (SEQ ID NO: 39) и YL792 (SEQ ID NO: 40). Продукты между 200 п.о. и 400 п.о. затем очищали из геля и клонировали в вектор pGEM-T-easy (Promega, Madison, WI). Подвергнутую лигированию ДНК использовали для трансформации *E.coli* DH10B, и отбор трансформантов осуществляли на агаре LB, содержащем ампициллин (100 мкг/мл).

Анализ плазмидной ДНК из одного трансформанта, включающего 5'-район гена предполагаемой дельта-5-десатуразы, подтвердил присутствие ожидаемой плазмиды, обозначенной рТ-EgD5-5'2nd. Анализ последовательностей показал, что рТ-EgD5-5'2nd содержала фрагмент размером 273 п.о. (SEQ ID NO: 8), которые

перекрывались с 253 п.о. 5'-конца ДНК-фрагмента в рТ-EgD5-5'C2, описанной выше, и дополнительно обеспечивали 20 п.о. 5' последовательности (SEQ ID NO: 9). Семнадцать (17) п.о. из 20 п.о. кодировали N-концевую часть гена предполагаемой дельта-5-десатуразы, включающую кодон инициации трансляции, обеспечивая, таким образом, полную 5' последовательность гена.

ПРИМЕР 5

Выделение 3' кодирующей области гена дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis*

Для выделения С-концевой части предполагаемой дельта-5-десатуразы, идентифицированной в примере 3, использовали метод 3'-RACE. Методология была описана выше в примере 4; однако праймерами, используемыми как в первом, так и во втором раунде ПЦР-амплификации, были праймеры, показанные ниже в таблице 5.

Таблица 5 Олигонуклеотидные праймеры, используемые для 3'-RACE		
ПЦР-амплификация	Специфический для гена олигонуклеотид	Общий олигонуклеотид
1 раунд	ODMW469 (SEQ ID NO: 41)	AUAP (SEQ ID NO: 42)
2 раунд	YL470 (SEQ ID NO: 43)	AUAP (SEQ ID NO: 42)
Праймер AUAP поставлялся в наборе для 3'-RACE Invitrogen (Carlsbad, CA).		

После выделения и очистки продуктов (т.е. 400-800 п.о.) фрагменты клонировали в вектор рGEM-T-easy (Promega) и трансформировали в *E.coli* DH10B, как описано в примере 4.

Анализ плазмидной ДНК из одного трансформанта, включающего 3'-район гена дельта-5-десатуразы, подтвердил присутствие ожидаемой плазмиды, обозначенной рТ-EgD5-3'. Анализ последовательностей показал, что рТ-EgD5-3' содержала фрагмент размером 728 п.о. (SEQ ID NO: 10), которые перекрывались с 264 п.о. 3'-конца фрагмента размером 590 п.о. рТ-F10-1 (пример 3, SEQ ID NO: 4) и обеспечивали 464 п.о. дополнительной 3' последовательности (SEQ ID NO: 11). Первые 184 п.о. фрагмента размером 464 п.о., включенные в рТ-EgD5-3', кодировали С-концевую кодирующую область (в том числе стоп-кодон трансляции) гена предполагаемой дельта-5-десатуразы. Последовательность рТ-EgD5-3' также корректировала последовательность, соответствующую консервативному району 2, являющуюся результатом использования вырожденного олигонуклеотида для первоначальной ПЦР-амплификации фрагмента размером 590 п.о. рТ-F10-1 (пример 3).

После 2 раундов 5'-RACE и одного раунда 3'-RACE была определена последовательность ДНК полной кодирующей предполагаемую дельта-5-десатуразу области *Euglena gracilis* (EgD5). Как показано на фиг. 4, размер CDS EgD5 составлял 1350 п.о. (SEQ ID NO: 1), и она кодировала полипептид с 449 аминокислотами (SEQ ID NO: 2), на основе выравнивания SEQ ID NO: 4, 6, 8 и 10. Результаты поисков BLASTP с использованием полноразмерного гена EgD5 в качестве запрашиваемой последовательности показал, что он идентичен на 39% и схож на 56% с дельта-5-десатуразой жирных кислот *Phaeodactylum tricornutum* (№ доступа в GenBank - AAL92562, SEQ ID NO: 14), с ожидаемым значением 1E-80. Кроме того, полноразмерный ген EgD5 идентичен на 37% и схож на 55% с дельта-8-десатуразой сфинголипидов *Thalassiosira pseudonana* (№ доступа в GenBank - AAX14502, SEQ ID NO: 21), с ожидаемым значением 3E-75.

ПРИМЕР 6

Создание конструкции pDMW367, включающей EgD5

В этом примере описывается создание конструкции pDMW367, включающей химерный ген FBAIN::EgD5::Pex20-3' (фиг. 5C). Она предназначена для интеграции химерного гена в геном *Yarrowia lipolytica* и затем исследования функционирования дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis* в *Yarrowia lipolytica*.

Основываясь на полноразмерной кДНК EgD5 (SEQ ID NO: 1), в качестве праймеров для амплификации первой части EgD5 использовали олигонуклеотиды YL794 и YL797 (SEQ ID NO: 44 и 45 соответственно) (фиг. 5A).

Праймер YL794 содержал сайт для NcoI, а праймер YL797 содержал сайт для HindIII. Затем в качестве праймеров для амплификации второй части EgD5 использовали праймеры YL796 и YL795 (SEQ ID NO: 46 и 47 соответственно). Праймер YL796 содержал сайт для HindIII, а праймер YL797 содержал сайт для NotI. ПЦР-реакции, используя пары праймеров YL794/YL797 или YL796/YL795, с кДНК *Euglena gracilis* (пример 2) в качестве матрицы проводили отдельно в общем объеме 50 мкл, включающем ПЦР-буфер (содержащий 10 мМ KCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 20 мМ Tris-HCl (pH 8,75), 2 мМ MgSO₄, 0,1% Triton X-100), 100 мкг/мл BSA (конечная концентрация), 200 мкМ концентрацию каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 10 пмоль каждого праймера и 1 мкл Pfu ДНК-полимеразы (Stratagene, San Diego, CA). Условия термоциклера были заданы на 35 циклов при 95°C в течение 1 мин, при 56°C в течение 30 сек и при 72°C в течение 1 мин с последующим конечным удлинением при 72°C в течение 10 мин.

Отдельные продукты ПЦР очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР Qiagen. ПЦР-продукты из реакции, амплифицированные с помощью праймеров YL794/YL797, расщепляли NcoI и HindIII, в то время как ПЦР-продукты из реакции, амплифицированные с помощью праймеров YL796/YL795, расщепляли HindIII и NotI. NcoI/HindIII- и HindIII/NotI-расщепленные фрагменты ДНК очищали после гель-электрофореза в 1% (вес/объем) агарозе и затем направлено лигировали с NcoI/NotI-расщепленной конструкцией pZUF17 (фиг. 5B; SEQ ID NO: 22; содержащей синтетический ген дельта-17-десатуразы [«D17st»] из *Saprolegnia diclina* (публикация заявки на патент США № 2003/0196217 A1), оптимизированный в отношении кодонов для экспрессии в *Yarrowia lipolytica* (публикация РСТ-заявки № WO 2004/101757)). Продуктом этого лигирования была плазида pDMW367 (фиг. 5C; SEQ ID NO: 23), которая содержала, таким образом, следующие компоненты:

Таблица 6

Компоненты плазмиды pDMW367 (SEQ ID NO: 23)

Рестрикционные сайты и нуклеотиды в пределах SEQ ID NO: 23	Описание фрагмента и компонентов химерного гена
EcoRI/BsiWI (7416-1671)	FBAIN::EgD5::Pex20, включающий • FBAIN: промотор FBAIN <i>Yarrowia lipolytica</i> (публикация РСТ-заявки № WO 2005/049805; патент США № 7202356) • EgD5: дельта-5-десатураза <i>Euglena gracilis</i> (SEQ ID NO: 1, описанная здесь; обозначенная «Euglena D5DS» на фиг.) • Pex20: последовательность терминатора Pex20 гена Pex20 <i>Yarrowia</i> (№ доступа в GenBank - AF054613)
2707-1827	начало репликации плазмиды ColE1
3637-2777	ген устойчивости к ампициллину (Amp ^R) для отбора в <i>E.coli</i>

4536-5840	автономно реплицируемая последовательность Yarrowia (ARS18; № доступа в GenBank - A17608)
7373-5886	ген Ura3 Yarrowia (№ доступа в GenBank - AJ306421)

5

Термин «промотор FBAIN» или «промоторный район FBAIN» относится к 5' нетранслируемому району перед кодоном инициации трансляции «ATG» фермента фруктозо-бифосфат-альдолазы (Е.С. 4.1.2.13), кодируемой геном *fba1*, который необходим для экспрессии, плюс часть 5' кодирующей области, которая включает интрон гена *fba1*.

10

ПРИМЕР 7

Создание штамма M4 *Yarrowia lipolytica* для продукции приблизительно 8% DGLA от липидов в целом

15

В этом примере описывается создание штамма M4, происходящего из *Yarrowia lipolytica* ATCC #20362, способного продуцировать 8% DGLA относительно липидов в целом. Этот штамм создан для экспрессии пути с участием дельта-6-десатуразы/дельта-6-элонгазы посредством введения конструкции pKUNF-12T6E (фиг. 6A; SEQ ID NO: 24). Эта конструкция сконструирована для интеграции четырех химерных генов (включающих дельта-12-десатуразу, дельта-6-десатуразу и две C_{18/20}-элонгазы) в локус Ura3 штамма ATCC #20362 *Yarrowia lipolytica* дикого типа, делая, таким образом, возможной продукцию DGLA. Таким образом, pKUNF-12T6E содержала следующие компоненты:

20

25

Таблица 7 Описание плазмиды pKUNF-12T6E (SEQ ID NO: 24)	
Рестрикционные сайты и нуклеотиды в пределах SEQ ID NO: 24	Описание фрагмента и компонентов химерных генов
AscI/BsiWI (9420-8629)	5'-часть размером 784 п.о. гена Ura3 Yarrowia (№ доступа в GenBank - AJ306421)
SphI/PacI (12128-1)	3'-часть размером 516 п.о. гена Ura3 Yarrowia (№ доступа в GenBank - AJ306421)
Swal/BsiWI (6380-8629)	FBAIN::EL1S::Pex20, включающий • FBAIN: промотор FBAIN <i>Yarrowia lipolytica</i> (публикация PCT-заявки № WO 2005/049805; патент США № 7202356; обозначенный «Fba1+ intron» на фиг.) • EL1S: оптимизированный в отношении кодонов ген элонгазы 1 (публикация PCT-заявки № WO 2004/101753), происходящий из <i>Mortierella alpina</i> (№ доступа в GenBank - AX464731) • Pex20: последовательность терминатора Pex20 из гена Pex20 Yarrowia (№ доступа в GenBank - AF054613)
BglII/SwaI (4221-6380)	TEF::delta-6S::Lip1, включающий • TEF: промотор TEF <i>Yarrowia lipolytica</i> (№ доступа в GenBank - AF054508) • delta-6S: оптимизированный в отношении кодонов ген дельта-6-десатуразы (публикация PCT-заявки № WO 2004/101753), происходящий из <i>Mortierella alpina</i> (№ доступа в GenBank - AF465281) • Lip1: последовательность терминатора Lip1 из гена Lip1 Yarrowia (№ доступа в GenBank - Z50020)

35

40

45

50

5	PmeI/ClaI (4207-1459)	FBA::F.delta-12::Lip2, включающий • FBA: промотор FBA <i>Yarrowia lipolytica</i> (публикация PCT-заявки № WO 2005/049805; патент США 7202356; обозначенный «FBA1» на фиг.) • F.delta-12: ген дельта-12-десатуразы <i>Fusarium moniliforme</i> (публикация PCT-заявки № WO 2005/047485) • Lip2: последовательность терминатора Lip2 из гена Lip2 <i>Yarrowia</i> (№ доступа в GenBank - AJ012632)
10	ClaI/PacI (1459-1)	TEF::EL2Syn::XPR2, включающий • TEF: промотор TEF <i>Yarrowia lipolytica</i> (№ доступа в GenBank - AF054508) • EL2Syn: оптимизированный в отношении кодонов ген элонгазы (SEQ ID NO: 25), происходящий из <i>Thraustochytrium aureum</i> (патент США № 6677145) • XPR2: ~100 п.о. 3'-района гена Xpr <i>Yarrowia</i> (№ доступа в GenBank - M17741)
15		

Плазмиду pKUNF-12T6E расщепляли AscI/SphI и затем использовали для трансформации *Y. lipolytica* ATCC #20362 дикого типа согласно разделу «Общие способы». Клетки-трансформанты помещали на чашки со средой для отбора с FOA и сохраняли при 30°C в течение 2-3 дней. Устойчивые к FOA колонии отбирали и штриховали на чашках для отбора MM и MMU. Колонии, растущие на чашках MMU, но не чашках MM, отбирали в качестве штаммов Ura-. Отдельные колонии штаммов Ura- затем инокулировали в жидкую MMU при 30°C и встряхивали при 250 оборотов/мин в течение 2 дней. Клетки собирали центрифугированием, экстрагировали липиды, и эфиры метилового спирта и жирных кислот готовили с помощью трансэтерификации и впоследствии анализировали с помощью Hewlett-Packard 6890 GC.

Анализ GC показал присутствие DGLA в трансформантах, содержащих 4 химерных гена pKUNF-12T6E, но не в контрольном штамме *Yarrowia* дикого типа. Большинство отобранных 32 штаммов Ura- продуцировали приблизительно 6% DGLA от липидов в целом. Существовало 2 штамма (т.е. штаммы M4 и 13-8), которые продуцировали приблизительно 8% DGLA от липидов в целом.

ПРИМЕР 8

Функциональный анализ гена EgD5 в штамме M4 *Yarrowia lipolytica*

Плазмиду pDMW367 (пример 6; включающую химерный ген FBAIN::EgD5::Pex20) трансформировали в штамм M4 (пример 7), как описано в разделе «Общие способы». Трансформанты отбирали на чашках MM. Через 2 дня роста при 30°C 3 трансформанта, выросшие на чашках MM, отбирали и повторно штриховали на свежих чашках MM. После того, как они вырастали, эти штаммы индивидуально инокулировали в 3 мл жидкой MM при 30°C и встряхивали при 250 оборотов/мин в течение 2 дней. Клетки собирали центрифугированием, экстрагировали липиды, и эфиры метилового спирта и жирных кислот готовили с помощью трансэтерификации и впоследствии анализировали с помощью Hewlett-Packard 6890 GC.

Анализ GC показал, что во всех трех трансформантах продуцировалось приблизительно 5,6% DGLA и 2,8% ARA от липидов в целом, причем эффективность превращения DGLA в ARA во всех трех штаммах, как определено, составляла приблизительно 33% (в среднем). Эффективность превращения определяли по следующей формуле: $[(\text{продукт})/(\text{субстрат} + \text{продукт})] \times 100$, где «продукт» включает непосредственный продукт и все продукты в пути, происходящие от него. Таким

образом, эти экспериментальные данные продемонстрировали, что клонированная дельта-5-десатураза *Euglena gracilis*, описанная здесь как SEQ ID NO: 1 и 2, эффективно десатурирует DGLA в ARA.

ПРИМЕР 9

Синтез оптимизированного в отношении кодонов гена дельта-5-десатуразы («EgD5S») для экспрессии в *Yarrowia lipolytica*

Использование кодонов гена дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis* (SEQ ID NO: 1 и 2; EgD5) оптимизировали для экспрессии в *Yarrowia lipolytica* аналогично тому, как это описано в публикации РСТ-заявки № WO 2004/101753 и патенте США № 7125672. В частности, оптимизированный в отношении кодонов ген дельта-5-десатуразы (обозначенный «EgD5S», SEQ ID NO: 3) конструировали на основе кодирующей последовательности гена дельта-5-десатуразы EgD5 в соответствии с характером использования кодонов *Yarrowia* (публикация РСТ-заявки № WO 2004/101753), консенсусной последовательностью вокруг кодона инициации трансляции «ATG» и общими правилами стабильности РНК (Guhaniyogi, G. and J. Brewer, Gene, 265(1-2): 11-23 (2001)). Помимо модификации сайта инициации трансляции модифицировали 196 п.о. кодирующей последовательности размером 1350 п.о. (14,5%; фиг. 7), и оптимизировали 189 кодонов (42%). Содержание G+C уменьшилось с 55,5% в гене дикого типа (т.е. EgD5) до 54,4% в синтетическом гене (т.е. EgD5S). Сайты для NcoI и NotI были включены вокруг кодона инициации трансляции и после стоп-кодона EgD5S соответственно. Ни одна из модификаций в оптимизированном в отношении кодонов гене не изменяла аминокислотную последовательность кодируемого белка (SEQ ID NO: 2). Сконструированный ген EgD5S (SEQ ID NO: 3) был синтезирован GenScript Corporation (Piscataway, NJ) и клонирован в pUC57 (№ доступа в GenBank - Y14837) с созданием pEgD5S (фиг. 6B, SEQ ID NO: 48).

ПРИМЕР 10

Создание конструкции pDMW369, включающей EgD5S

В этом примере описывается создание плазмиды pDMW369, включающей химерный ген FBAIN::EgD5S::Pex20. Плазмиду pDMW369 (фиг. 6C; SEQ ID NO: 49) создавали путем замены NcoI/NotI-фрагмента pZUF17 (фиг. 5B; SEQ ID NO: 22) NcoI/NotI-фрагментом EgD5S из pEgD5S (фиг. 6B; SEQ ID NO: 48). Продуктом этого лигирования была pDMW369, которая содержала, таким образом, следующие компоненты:

Таблица 8 Компоненты плазмиды pDMW369 (SEQ ID NO: 49)	
Рестрикционные сайты и нуклеотиды в пределах SEQ ID NO: 49	Описание фрагмента и компонентов химерного гена
EcoRI/BsiWI (6063-318)	FBAIN::EgD5S::Pex20, включающий • FBAIN: промотор FBAIN <i>Yarrowia lipolytica</i> (публикация РСТ-заявки № WO 2005/049805; патент США № 7202356; обозначенный «FBA1+ intron» на фиг.) • EgD5S: оптимизированная в отношении кодонов дельта-5-десатураза (SEQ ID NO: 3, описанная здесь как EgD5S), происходящая из <i>Euglena gracilis</i> • Pex20: последовательность терминатора Pex20 гена Pex20 <i>Yarrowia</i> (№ доступа в GenBank - AF054613)
1354-474	начало репликации плазмиды ColE1
2284-1424	ген устойчивости к ампициллину (Amp ^R) для отбора в <i>E.coli</i>

3183-4476	автономно реплицируемая последовательность Yarrowia (ARS18; № доступа в GenBank - A17608)
6020-4533	ген Ura3 Yarrowia (№ доступа в GenBank - AJ306421)

5

ПРИМЕР 11

Экспрессия оптимизированной в отношении кодонов дельта-5-десатуразы («EgD5S») в штамме M4 *Yarrowia lipolytica*

10 Плазмиду pDMW369 (пример 10; включающую химерный ген FBAIN::EgD5S::Pex20) трансформировали в штамм M4 (пример 7), как описано в разделе «Общие способы». Трансформанты отбирали на чашках MM. Через 2 дня роста при 30°C 3 трансформанта, выросшие на чашках MM, отбирали и повторно штриховали на свежих чашках MM. После того как они выросли, эти штаммы индивидуально
15 инокулировали в 3 мл жидкой MM при 30°C и встряхивали при 250 оборотов/мин в течение 2 дней. Клетки собирали центрифугированием, экстрагировали липиды, и эфиры метилового спирта и жирных кислот готовили с помощью трансэтерификации и впоследствии анализировали с помощью Hewlett-Packard 6890 GC.

Анализ GC показал, что во всех трех трансформантах продуцировалось
20 приблизительно 3,3% DGLA и 2,7% ARA от липидов в целом, причем эффективность превращения DGLA в ARA в этих трех штаммах, как определено, составляла приблизительно 45% (в среднем, рассчитанная, как описано в примере 8). Таким образом, эти экспериментальные данные продемонстрировали, что синтетическая
25 дельта-5-десатураза *Euglena gracilis*, оптимизированная в отношении кодонов для экспрессии в *Yarrowia lipolytica* (EgD5S, представленная в SEQ ID NO: 3), на приблизительно 36% более эффективно десатурирует DGLA в ARA, чем ген EgD5 дикого типа (SEQ ID NO: 1).

ПРИМЕР 12

30 Выделение дельта-8-десатуразы *Pavlova lutheri* (CCMP459)

В этом примере описывается выделение дельта-8-десатуразы *Pavlova lutheri* (CCMP459), используемой в примере 3 и на фиг. 3 (также описанной в заявке на патент США № 11/737772, поданной 20 апреля 2007). Для этого потребовались
35 синтез кДНК *Pavlova lutheri* (CCMP459), конструирование библиотеки и секвенирование, идентификация гомологов дельта-8-десатуразы и клонирование полноразмерной дельта-8-десатуразы из геномной ДНК.

Синтез кДНК *Pavlova lutheri* (CCMP459), конструирование библиотеки и секвенирование

40 Библиотеку кДНК *Pavlova lutheri* (CCMP459) синтезировали, как описано в публикации РСТ-заявки № WO 2004/071467 (опубликованной 26 августа 2004). Вкратце, замороженные осадки Pav459 получали из Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP, West Boothbay Harbor, ME). Эти осадки разрушали в жидком азоте, и из Pav459 экстрагировали общую РНК с помощью
45 использования набора Qiagen RNeasy® Maxi (Qiagen, Valencia, CA) по инструкциям производителя. Из этой общей РНК выделяли мРНК, используя целлюлозный полимер с олиго-dT, которую затем использовали для конструирования библиотеки кДНК, используя вектор pSport1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Полученную таким
50 образом кДНК направленно клонировали (5' SalI/3' NotI) в вектор pSport1. Библиотека Pav459 содержала приблизительно $6,1 \times 10^5$ клонов в мл, при этом средний размер вставки в каждом клоне составлял приблизительно 1200 п.о. Библиотеку *Pavlova lutheri* называли eps1c.

Для секвенирования клоны сначала отбирали из архивированных в глицерине культур, выращенных/замороженных в 384-луночных планшетах с замораживающей средой, и инокулировали с использованием автоматического отборщика колоний QPix® (Genetix) в 96-луночные планшеты с глубокими лунками, содержащие LB + 100 мг/мл ампициллина. После выращивания в течение 20 ч при 37°C клетки осаждали с помощью центрифугирования и хранили при -20°C.

Плазмиды затем выделяли на робототехническом устройстве Eppendorf 5Prime, используя модифицированный мини-препаративный способ щелочного лизиса в 96-луночном формате (Eppendorf PerfectPrep®). Вкратце, после преципитации ацетатом для облегчения удаления клеточного дебриса использовали фильтр и вакуумный коллектор. Плазмидную ДНК затем связывали на втором планшете с фильтром непосредственно из фильтрата, промывали, сушили и извлекали.

Плазмиды подвергали секвенированию концевых последовательностей в 384-луночных планшетах, используя праймирующий вектор праймер T7 (SEQ ID NO: 50) и набор для секвенирования ABI BigDye версии 3 Prism. Для реакции секвенирования использовали 100-200 нг матрицы и 6,4 пмоль праймера, и 25 раз повторяли следующие реакционные условия: 96°C в течение 10 сек, 50°C в течение 5 сек и 60°C в течение 4 мин. После основанной на этаноле очистки продукты циклических реакций секвенирования растворяли и определяли на автоматических секвенсерах Perkin-Elmer ABI 3700.

Идентификация гомологов дельта-8-десатуразы из библиотеки кДНК *Pavlova lutheri* eps1c

Клоны кДНК, кодирующие гомологи дельта-8-десатуразы *Pavlova lutheri* (называемые, таким образом, дельта-8-десатуразами), идентифицировали путем проведения поисков BLAST на схожесть последовательностей, содержащихся в базе данных BLAST «nr» (как описано в примере 3). Р-величины (вероятность) наблюдения соответствия последовательности кДНК последовательности, содержащейся в подвергаемых поиску базах данных, не более чем случайно, рассчитываемые BLAST, сообщали здесь в виде величин «pLog», которые представляют собой отрицательную величину логарифма сообщаемой Р-величины. Следовательно, чем больше величина pLog, тем выше вероятность того, что последовательность кДНК и «хит» BLAST представляют собой гомологичные белки.

С помощью поиска BLASTX с использованием нуклеотидной последовательности из клона eps1c.pk002.f22 обнаружена схожесть белка, кодируемого кДНК, с дельта-6-десатуразой из *Rhizopus stolonifer* (SEQ ID NO: 51) (№ доступа в NCBI - AAX22052 (GI 60499699), локус AAX22052, CDS AY795075; Lu et al., не опубликованное сообщение). Последовательность части вставки кДНК из клона eps1c.pk002.f22 показана в SEQ ID NO: 52 (5'-конец вставки кДНК). Впоследствии была получена последовательность всей вставки (eps1c.pk002.f22::fis), и она показана в SEQ ID NO: 53.

Последовательность выведенной аминокислотной последовательности (от нуклеотида 1 SEQ ID NO: 53 до первого стоп-кодона в положении нуклеотида 864 SEQ ID NO: 53) показана в SEQ ID NO: 54. Секвенирование всей вставки осуществляли с использованием модифицированного протокола транспозиции.

Клоны, определенные для секвенирования всей вставки, отбирали из архивированных в глицерине штоков в виде отдельных колоний, и выделяли плазмидную ДНК с помощью щелочного лизиса. Плазмидные матрицы подвергали транспозиции с помощью набора для транспозиции Template Generation System (TGS II) (Finnzymes Oy, Espoo, Финляндия), следуя протоколу производителя.

Подвергнутую транспозиции ДНК трансформировали в электрокомпетентные клетки EH10B (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) с помощью электропорации. Из каждой реакции транспозиции произвольно отбирали множество трансформантов, готовили плазмидную ДНК, и матрицы секвенировали, как описано выше (ABI BigDye v.3.1), вне сайта транспозиционного события, используя уникальные праймеры SeqE (SEQ ID NO: 55) и SeqW (SEQ ID NO: 56).

Данные о последовательности собирали (программное обеспечение ABI Prism Collection) и компоновали с использованием программы для компоновки последовательности Phrap (P. Green, University of Washington, Seattle). Компоновки просматривались с помощью программы для редактирования последовательностей Consed (D. Gordon, University of Washington, Seattle) для окончательного прочтения.

Аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, оценивали с помощью BLASTP с получением величины pLog - 19,52 (E-величина - $3e-20$) в сравнении с дельта-6-десатуразой из *Mortierella alpina* (№ доступа в NCBI - BAC82361 (GI 34221934), локус BAC82361, CDS AB070557; Sakuradani and Shimizu, Biosci. Biotechnol. Biochem., 67: 704-711 (2003)). Основываясь на результатах BLASTP-сравнения с десатуразой *Mortierella alpina* и другими десатуразами жирных кислот, дельта-8-десатураза *Pavlova lutheri* и не была полноразмерной, и в ней отсутствовала последовательность на 5'-конце.

Клонирование полноразмерной дельта-8-десатуразы из геномной ДНК *Pavlova lutheri*

Геномную ДНК выделяли из *Pavlova lutheri* (CCMP459), используя набор для максимального приготовления Qiagen DNeasy® Plant Maxi Prep Kit в соответствии с протоколом производителя. Используя 1 колонку maxi на 1 г замороженного клеточного осадка, из 4 г культуры *Pavlova lutheri* выделяли в целом 122 мкг геномной ДНК. Конечная концентрация геномной ДНК составляла 22,8 нг/мкл. Библиотеки GenomeWalker синтезировали с использованием набора Universal GenomeWalker™ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), следуя протоколу производителя (протокол #PT3042-1, версия PRO3300). Вкратце, согласно протоколу проводилось четыре рестрикционных расщепления с использованием 300 нг геномной ДНК на реакцию. После очистки с использованием фенола осадки растворяли в 4 мкл воды, и согласно протоколу подвергались лигированию адаптеры.

Для первоначальной ПЦР использовали набор для ПЦР Advantage®-GC Genomic PCR (BD Biosciences Clontech), следуя протоколу производителя (протокол #PT3090-1, версия PR1X433). Для каждого рестрикционного расщепления 1 мкл библиотеки объединяли с 22,8 мкл воды ПЦР-степени, 10 мкл 5X реакционного буфера для ПЦР GC Genomic PCR, 2,2 мкл 25 mM Mg(CH₃CO₂)₂, 10 мкл GC-Melt (5 M), 1 мкл 50X смеси dNTP (10 mM каждого), 1 мкл смеси Advantage®-GC Genomic Pol. (50X), 1 мкл универсального праймера AP1 GenomeWalker™ (10 мкМ, SEQ ID NO: 57) и 1 мкл GSP PvDES (10 мкМ, SEQ ID NO: 58). После денатурации при 95°C 35 раз повторяли следующие условия реакции: 94°C в течение 30 сек, 68°C в течение 6 мин. После этих условий реакции в течение 6 мин осуществляли конечное удлинение при 68°C с последующим охлаждением до 15°C до момента удаления.

Первоначальную ПЦР-реакцию для каждой библиотеки анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле, и наблюдали полосы ДНК с молекулярными массами приблизительно 6 т.о., 3,5 т.о., 2,5 т.о. и 1,2 т.о. ДНК-

полосы для каждой библиотеки очищали с использованием набора для очистки ДНК из геля Zymoclean™ (Zymo Research, Orange, CA), следуя протоколу производителя. Получаемую в результате ДНК клонировали в вектор pGEM®-T Easy (Promega), следуя протоколу производителя, и вставки секвенировали с использованием

5 праймеров T7 (SEQ ID NO: 50) и M13-28Rev (SEQ ID NO: 59), как описано выше. Дополнительная последовательность затем была получена с использованием специфичного для гена праймера для секвенирования PavDES seq (SEQ ID NO: 60), полученного из вновь появившихся данных о последовательности.

10 Последовательность полного 5'-конца, полученная с помощью прогулки по геному, показана в SEQ ID NO: 61. Последовательность перекрывающихся областей геномной последовательности (SEQ ID NO: 61) и полностью секвенированную EST eps1c.pk002.f22: fis (SEQ ID NO: 53) выравнивали, используя Sequencher™ (версия 4.2, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) с использованием алгоритма компоновки Large

15 Gap. Интересно, что сравнение показало, что у EST, которая была первоначально секвенирована (SEQ ID NO: 53), отсутствовали 459 п.о. по сравнению с геномной последовательностью (SEQ ID NO: 61). По-видимому, эта пропущенная последовательность в EST является делецией, а не интроном, поскольку в геномной

20 ДНК на 5'-конце гена не наблюдалось четких сайтов сплайсинга интронов. Геномную последовательность для 5'-конца (SEQ ID NO: 61) объединяли с 3'-концом последовательности EST (SEQ ID NO: 53) с получением SEQ ID NO: 62. Используя программное обеспечение для анализа последовательностей EditSeq™ 6.1 (DNASTAR Inc., Madison, WI), определили ORF (SEQ ID NO: 17). Аминокислотная

25 последовательность, кодируемая SEQ ID NO: 17, показана в SEQ ID NO: 18.

Аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, оценивали с помощью BLASTP с получением величины pLog - 35,10 (E-величина - 8e-36) в сравнении с дельта-6-десатуразой из *Rhizopus stolonifer* (SEQ ID NO: 63) (№

30 доступа в NCBI - ABB96724 (GI 83027409), локус ABB96724, CDS DQ291156; Zhang et al., не опубликованное сообщение). Кроме того, дельта-8-десатураза *Pavlova lutheri* идентична на 78,0% последовательности дельта-8-десатуразы *Pavlova salina* (SEQ ID NO: 64), раскрытой в публикации PCT-заявки № WO 2005/103253 (опубликованной 22

35 апреля 2005), используя способ Jotun Hein. Расчеты процентов идентичности последовательностей, проведенные по способу Jotun Hein (Hein, J.J., Meth. Enz., 183: 626-645 (1990)), осуществляли с использованием версии 6.1 программы MegAlign™

40 комплекта вычислительных программ для биоинформатики LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI), используя параметры по умолчанию для попарного выравнивая ((оптимальный) размер слова, используемый при выравнивании = 2). Дельта-8-десатураза *Pavlova lutheri* идентична на 76,4% последовательности дельта-8-десатуразы *Pavlova salina*, используя способ Clustal V. Расчеты процентов идентичности последовательностей, проведенные с использованием способа Clustal

45 V (Higgins, D.G. and Sharp, P.M., Comput. Appl. Biosci., 5: 151-153 (1989); Higgins et al., Comput. Appl. Biosci., 8: 189-191 (1992)), осуществляли с использованием версии 6.1 программы MegAlign™ комплекта вычислительных программ для биоинформатики LASERGENE (DNASTAR Inc.), используя параметры по умолчанию для попарного выравнивая ((оптимальный) размер слова, используемый при

50 выравнивании = 1, штраф за промежуток = 3, окно = 5, сохраняемые диагонали = 5 и штраф за длину промежутка = 10). BLAST-оценки и вероятности указывают на то, что фрагмент SEQ ID NO: 17 кодирует целую дельта-8-десатуразу *Pavlova lutheri*.

На фиг. 8A и 8B демонстрируется выравнивание Clustal V (с использованием

параметров по умолчанию) SEQ ID NO: 18 (аминокислотной последовательности дельта-8-десатуразы *Pavlova lutheri*), SEQ ID NO: 64 (аминокислотной последовательности дельта-8-десатуразы *Pavlova salina*, выше), SEQ ID NO: 16 (аминокислотной последовательности дельта-8-десатуразы *Euglena gracilis*, раскрытой как SEQ ID NO: 2 в публикации РСТ-заявки № WO 2006/012325, опубликованной 2 февраля 2006), SEQ ID NO: 63 (аминокислотной последовательности дельта-6-десатуразы жирных кислот *Rhizopus stolonifer* (№ доступа в NCBI - ABB96724, выше) и SEQ ID NO: 51 (аминокислотной последовательности дельта-6-десатуразы жирных кислот *Rhizopus stolonifer* (№ доступа в NCBI - AAX22052, выше). Результаты выравнивания Clustal V показывают, что SEQ ID NO: 18 идентична на 76,4%, 22,6%, 22,2% и 22,2% SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 51 соответственно.

ПРИМЕР 13

Трансформация соматических культур зародышей сои

Условия культивирования

Образующую зародыши сои суспензионную культуру (распространенная версия Jack) поддерживали в 35 мл жидкой среды SB196 (ниже) на вращающейся качалке, 150 оборотов/мин, при 26°C с холодными белыми люминесцентными излучениями во время фотопериода 16:8 ч день/ночь при интенсивности света 60-85 мкЭрг/м²/сек. Культуры субкультивировали каждые 7 дней-2 недели путем инокуляции приблизительно 35 мг ткани в 35 мл свежей жидкой SB196 (предпочтительный интервал для субкультуры - каждые 7 дней).

Образующие зародыши сои суспензионные культуры трансформировали экспрессирующими плазмидами сои по способу пушечной бомбардировки частицами (Klein et al., Nature, 327: 70 (1987)) с использованием прибора DuPont Biolistic PDS1000/HE (гелиевая модификация) для всех трансформаций.

Иницирование образующей зародыши сои суспензионной культуры

Соевые культуры иницировали дважды в месяц с 5-7-днями между каждой инициацией. Стручки с незрелыми семенами от имеющихся растений сои через 45-55 дней после посадки собирают, отделяют от створок и помещают в подвергнутый стерилизации пурпурно-красный бокс. Семена сои стерилизуют с помощью встряхивания их в течение 15 мин в 5% растворе Клоракс с 1 каплей мыла «Айвори» (т.е. 95 мл подвергнутой автоклавированию дистиллированной воды плюс 5 мл Клоракса и 1 капля мыла, хорошо смешанные). Семена промывают двумя литровыми бутылками стерильной дистиллированной воды, и семена, которые меньше 4 мм, помещают на отдельные микроскопические предметные стекла. Маленький конец семени отрезают, и семядоли выдавливают из оболочки семени. Семядоли переносят в чашки, содержащие среду SB1 (25-30 семядолей на чашку). Чашки обертывают волокнистой лентой и хранят в течение 8 недель. Сразу после этого вторичные зародыши разрезают и помещают в жидкую среду SB196 на 7 дней.

Приготовление ДНК для бомбардировки

Для бомбардировки используют или интактную плазмиду, или ДНК-фрагмент плазмиды, содержащий представляющие интерес гены дельта-6-десатураз и селектируемый маркер. Фрагменты экспрессирующих плазмид сои, содержащие дельта-5-десатуразу по настоящему изобретению, получают с помощью выделения из геля расщепленных плазмид. Получаемые в результате ДНК-фрагменты разделяют с помощью гель-электрофореза в 1% агарозе SeaPlaque GTP (BioWhitaker Molecular Applications), и ДНК-фрагменты, содержащие кассеты генов, вырезают из

агарозного геля. ДНК очищают от агарозы с использованием расщепляющего фермента GELase, следуя протоколу производителя.

5 50 мкл-аликвоту стерильной дистиллированной воды, содержащую 3 мг частиц золота, добавляют к 5 мкл 1 мкг/мкл раствора ДНК (или интактной плазмиды, или ДНК-фрагмента, приготовленного, как описано выше), 50 мкл 2,5 М CaCl₂ и 20 мкл 0,1 М спермидина. Смесь встряхивают в течение 3 мин на уровне 3 встряхивателя с вихревым перемешиванием и центрифугируют в течение 10 сек в настольной микроцентрифуге. После промывки 400 мкл 100% этанола осадок суспендируют под 10 воздействием ультразвука в 40 мкл 100% этанола. Суспензию ДНК (5 мкл) распределяют на каждый подвижный диск диска прибора Biolistic PDS1000/HE. Каждая 5 мкл-аликвота содержит приблизительно 0,375 мг частиц золота на бомбардировку (т.е. на диск).

Приготовление ткани и бомбардировка ДНК

15 Приблизительно 150-200 мг суспензионной культуры 7-дневных зародышей помещают в пустые, стерильные чашки Петри 60×15 мм, и чашку покрывают пластиковой сеткой. Ткань подвергают бомбардировке 1 или 2 выстрелами на чашку с разрывающим мембрану давлением, установленным на 1100 фунтов на квадратный дюйм, и камеру разрезают до вакуума 27-28 дюймов ртутного столба. Ткань 20 помещают на расстоянии приблизительно 3,5 дюйма от удерживающего/останавливающего экрана.

Отбор трансформированных зародышей

25 Трансформированные зародыши отбирают с использованием гигромицина в качестве селективируемого маркера. В частности, после бомбардировки ткань помещают в свежую среду SB196 и культивируют, как описано выше. Через шесть дней после бомбардировки SB196 заменяют свежей SB196, содержащей 30 мг/л гигромицина. Среду для отбора освежают еженедельно. Через четыре-шесть недель 30 после отбора наблюдают рост зеленой трансформированной ткани из нетрансформированных, некротических зародышевых скоплений. Выделенную зеленую ткань извлекают и инокулируют в многолуночные планшеты для регенерации новых, клонально размноженных, трансформированных, образующих зародыши суспензионных культур.

Созревание зародышей

35 Зародыши культивируют в течение 4-6 недель при 26°C в SB196 под лампами холодного белого люминесцентного излучения (Phillips cool white Econowatt F40/CW/RS/EW) и лампами Argo (Phillips F40 Argo) (40 Вт) во время фотопериода 16:8 40 ч при интенсивности света 90-120 мкЭрг/м²/сек. Сразу после этого зародышевые скопления перемещают на твердую агаровую среду SB166 на 1-2 недели. Скопления затем субкультивируют в среде SB103 в течение 3 недель. Во время этого периода отдельные зародыши извлекают из скоплений и скринируют на изменения в их 45 составах жирных кислот, как описано выше.

Перечень ингредиентов сред

SB196 - жидкая среда для пролиферации FN Lite (на литр)

MS FeEDTA - 100x маточный раствор 1	10 мл
MS сульфат - 100x маточный раствор 2	10 мл
50 FN Lite галогениды - 100x маточный раствор 3	10 мл
FN Lite P, B, Mo - 100x маточный раствор 4	10 мл

Витамины B5 (1 мл/л)

1 мл

	2,4-D (10 мг/л конечная концентрация)		1 мл
	KNO ₃		2,83 г
	(NH ₄)SO ₄		0,463 г
	Аспарагин		1,0 г
5	Сахароза (1%)		10 г
	pH 5,8		
	<u>Маточные растворы</u>	<u>FN Lite</u>	
	1. Номер маточного раствора	1000 мл	500 мл
	MS FeEDTA - 100х маточный раствор		
10	Na ₂ EDTA*	3,724 г	1,862 г
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,784 г	1,392 г
	*Добавить первым, растворить в темной колбе при перемешивании.		
	2. MS сульфат - 100х маточный раствор		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	37,0 г	18,5 г
15	MnSO ₄ ·H ₂ O	1,69 г	0,845 г
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,86 г	0,43 г
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0025 г	0,00125 г
	3. FN Lite галогениды - 100х маточный раствор		
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	30,0 г	15,0 г
20	KI	0,083 г	0,0715 г
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0025 г	0,00125 г
	4. FN Lite P, B, Mo - 100х маточный раствор		
	KH ₂ PO ₄	18,5 г	9,25 г
	H ₃ BO ₃	0,62 г	0,31 г
25	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,025 г	0,0125 г

Твердая среда SB1 (на литр)

MS соли одной упаковки (Gibco/BRL - каталожный № - 11117-066)

1 мл 100X маточного раствора витаминов B5

30 31,5 г сахарозы

2 мл 2,4-D (20 мг/л конечная концентрация)

pH 5,7

2 г ТС агара

35 Твердая среда SB 166 (на литр)

MS соли одной упаковки (Gibco/BRL - каталожный № - 11117-066)

1 мл 100X маточного раствора витаминов B5

60 г мальтозы

750 мг MgCl₂ гексагидрата

40 5 г активированного угля

pH 5,7

2 г желрита

Твердая среда SB 103 (на литр)

45 MS соли одной упаковки (Gibco/BRL - каталожный № - 11117-066)

1 мл 1000X маточного раствора витаминов B5

60 г мальтозы

750 мг MgCl₂ гексагидрата

pH 5,7

50 2 г желрита

Твердая среда SB 74-4 (на литр)

B5 соли Gamborg одного флакона (Gibco/BRL - каталожный № 21153-036)

pH 5,7

5 г ТС агара

Маточный раствор 2,4-D

Получают заранее приготовленным от Phytotech, каталожный № D 295 - концентрация 1 мг/мл.

Маточный раствор витаминов B5 (на 100 мл)

Хранить в аликвотах при -20°C

10 г миоинозита

100 мг никотиновой кислоты

100 мг пиридоксина HCl

1 г тиамина

Если раствор не растворяется достаточно быстро, применяют нагревание низкой степени через горячую плитку-перемешиватель.

ПРИМЕР 14

Функциональный анализ дельта-5-десатуразы (SEQ ID NO: 1 и 2) в соматических зародышах сои

Зрелые соматические зародыши сои являются хорошей моделью зиготных зародышей. При нахождении в глобулярном зародышевом состоянии в жидкой культуре соматические зародыши сои содержат очень низкие количества триацилглицерина (TAG) или запасаемых белков, типичных для созревающих, зиготных зародышей сои. На этой стадии развития отношение общего триацилглицерина к общему полярному липиду (фосфолипидам и гликолипидам) составляет приблизительно 1:4, что является типичным для зиготных зародышей сои на стадии развития, с которой инициировалась культура соматических зародышей. Также на глобулярной стадии мРНК для главных белков семени, α' -субъединицы β -конглицинина, ингибитора 3 трипсина Кунитца и лектина семян, по существу отсутствуют. При переносе безгормонной среды для того, чтобы сделать возможной дифференциацию до состояния созревающих соматических зародышей, TAG становится самым обильным классом липидов. Также мРНК для α' -субъединицы β -конглицинина, ингибитора 3 трипсина Кунитца и лектина семян становятся очень обильными блоками информации в общей популяции мРНК. На этом основании система соматических зародышей сои ведет себя очень схоже с созревающими зиготными зародышами сои *in vivo* и является, следовательно, хорошей и быстрой модельной системой для анализа фенотипических эффектов модификации экспрессии генов в пути биосинтеза жирных кислот (смотри публикацию РСТ-заявки № WO 2002/00904, пример 3). Наиболее важным является то, что модельная система является также прогнозирующей в отношении состава жирных кислот семян от растений, происходящих от трансгенных зародышей.

Трансгенные соматические зародыши сои, содержащие дельта-5-десатуразу по настоящему изобретению, анализируют следующим образом. Из отдельных, созревших соматических зародышей сои с помощью трансэтерификации готовят эфиры метилового спирта и жирных кислот. Отдельные зародыши помещают в пробирку, содержащую 50 мкл триметилсульфония гидроксида (TMSH) и 0,5 мл гексана, и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре со встряхиванием. Эфиры метилового спирта и жирной кислоты (5 мкл вводят из слоя гексана) отделяют и определяют количество с использованием газового хроматографа Hewlett-Packard 6890, снабженного капиллярной колонкой с кварцевым стеклом Omegawax 320 (каталожный #24152, Supelco Inc.). Программируют, чтобы температура термостата удерживалась при 220°C в

течение 2,6 мин, увеличивалась до 240°C с подъемом на 20°C/мин и затем удерживалась в течение дополнительных 2,4 мин. Газ-носитель поставляется генератором водорода Whatman. Времена удержания сравнивают со временами удержания метиловых эфиров стандартов, коммерчески доступных (Nu-Chek Prep, Inc.). Обычно 5-10 зародышей на каждый случай анализируют с помощью GC, используя описанную выше методологию.

ПРИМЕР 15

Коэкспрессия других комбинаций кассет промотор/ген/терминатор в соматических зародышах сои

Квалифицированному в данной области техники специалисту понятно, что помимо описанных здесь кассет генов, промоторов и терминаторов можно синтезировать другие комбинации кассет промотор/ген/терминатор схожим с описанным здесь способом, но не ограничиваясь этим способом. Например, в публикациях РСТ-заявок № WO 2004/071467 и WO 2004/071178 описывается выделение ряда последовательностей промоторов и терминаторов транскрипции для использования в специфической для зародышей экспрессии в сое. Кроме того, в публикациях РСТ-заявок № WO 2004/071467, WO 2005/047479 и WO 2006/012325 описывается синтез множества комбинаций кассет промотор/ген/терминатор с помощью лигирования вместе отдельных промоторов, генов и терминаторов транскрипции в уникальных комбинациях. Как правило, для клонирования желаемого гена используют сайт для NotI, фланкированный подходящим промотором (например, промоторами, перечисленными, но без ограничения, в таблице 9) и терминатором транскрипции (например, терминаторами транскрипции, перечисленными, но без ограничения, в таблице 10). Сайты для NotI можно добавить к представляющему интерес гену, такому как гены, перечисленные, но без ограничения, в таблице 11, используя ПЦР-амплификацию с олигонуклеотидами, сконструированными для введения сайтов для NotI с 5' и 3' концов гена. Получаемый в результате продукт ПЦР затем расщепляют NotI и клонируют в подходящую кассету промотор/NotI/терминатор.

Кроме того, в публикациях РСТ-заявок № WO 2004/071467, WO 2005/047479 и WO 2006/012325 описывается дальнейшее связывание отдельных кассет генов в уникальных комбинациях вместе с подходящими кассетами селектируемых маркеров для того, чтобы получить желаемую фенотипическую экспрессию. Хотя это осуществляют, главным образом, с использованием сайтов для различных рестрикционных ферментов, квалифицированному в данной области техники специалисту понятно, что для получения желаемой комбинации промотор/ген/терминатор транскрипции можно использовать ряд методов. Действуя таким образом, можно получить любую комбинацию кассет специфическую для зародышей промотор/ген/терминатор транскрипции. Квалифицированному в данной области техники специалисту также понятно, что эти кассеты могут быть расположены на отдельных ДНК-фрагментах или множестве фрагментов, причем коэкспрессия генов является результатом котрансформации множества ДНК-фрагментов.

Таблица 9

Специфические для семян промоторы

Промотор	Организм	Ссылка на промотор
α' -субъединицы β -конглицинина	Соя	Beachy et al., EMBO J., 4: 3047-3053 (1985)

5	ингибитора трипсина Кунитца	Соя	Jofuku et al., Plant Cell, 1: 1079-1093 (1989)
	аннексина	Соя	Публикация РСТ-заявки № WO 2004/071467
	глицинина Gy1	Соя	Публикация РСТ-заявки № WO 2004/071467
	альбумина 2S	Соя	Патент США № 6177613
	легумина A1	Горох	Rerie et al., Mol. Gen. Genet., 225: 148-157 (1991)
10	β-субъединицы β-конглицинина	Соя	Публикация РСТ-заявки № WO 2004/071467
	BD30 (также называемого P34)	Соя	Публикация РСТ-заявки № WO 2004/071467
	легумина A2	Горох	Rerie et al., Mol. Gen. Genet., 225: 148-157 (1991)

15			Таблица 10 Терминаторы транскрипции
	Терминатор транскрипции	Организм	Ссылка
20	фазеолина 3'	фасоль	Публикация РСТ-заявки № WO 2004/071467
	ингибитора трипсина Кунитца 3'	соя	Публикация РСТ-заявки № WO 2004/071467
	BD30 (также называемого P34) 3'	соя	Публикация РСТ-заявки № WO 2004/071467
25	легумина A2 3'	горох	Публикация РСТ-заявки № WO 2004/071467
	альбумина 2S 3'	соя	Публикация РСТ-заявки № WO 2004/071467

30			Таблица 11 Гены пути биосинтеза PUFA
	Ген	Организм	Ссылка
35	Дельта-6-десатуразы	<i>Saprolegnia diclina</i>	Публикация РСТ-заявки № WO 2002/081668
	Дельта-6-десатуразы	<i>Mortierella alpina</i>	Патент США № 5968809
	Элонгазы	<i>Mortierella alpina</i>	Публикация РСТ-заявки № WO 2000/12720; патент США № 6403349
40	Дельта-5-десатуразы	<i>Mortierella alpina</i>	Патент США № 6075183
	Дельта-5-десатуразы	<i>Saprolegnia diclina</i>	Публикация РСТ-заявки № WO 2002/081668
	Дельта-15-десатуразы	<i>Fusarium moniliforme</i>	Публикация РСТ-заявки № WO 2005/047479
45	Дельта-17-десатуразы	<i>Saprolegnia diclina</i>	Публикация РСТ-заявки № WO 2002/081668
	Элонгазы	<i>Thraustochytrium aureum</i>	Публикация РСТ-заявки № WO 2002/08401; патент США № 6677145
	Элонгазы	Вид Pavlova	Pereira et al., Biochem. J., 384: 357-366 (2004)
50	Дельта-4-десатуразы	<i>Schizochytrium aggregatum</i>	Публикация РСТ-заявки № WO 2002/090493
	Дельта-9-элонгазы	<i>Isochrysis galbana</i>	Публикация РСТ-заявки № WO 2002/077213
	Дельта-9-элонгазы	<i>Euglena gracilis</i>	Заявка на патент США № 11/601563

5	Дельта-8-десатуразы	<i>Euglena gracilis</i>	Публикация РСТ-заявки № WO 2000/34439; патент США № 6825017; публикация РСТ-заявки № WO 2004/057001; публикация РСТ-заявки № WO 2006/012325
	Дельта-8-десатуразы	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Sayanova et al., FEBS Lett., 580: 1946-1952 (2006)
10	Дельта-8-десатуразы	<i>Pavlova salina</i>	Публикация РСТ-заявки № WO 2005/103253
	Дельта-8-десатуразы	<i>Pavlova lutheri</i>	Заявка на патент США № 11/737772

ПРИМЕР 16

Отбор с использованием хлорсульфурина (ALS) и регенерация растений

15 Отбор с использованием хлорсульфурина (ALS)

После бомбардировки ткань растения делят между 2 колбами со свежей средой SB196 и культивируют, как описано в примере 13. Через шесть-семь дней после бомбардировки SB196 заменяют свежей SB196, содержащей агент для отбора - 100 нг/л хлорсульфурина. Среду для отбора освежают еженедельно. Через 20 четыре-шесть недель после отбора наблюдают рост зеленой трансформированной ткани из нетрансформированных, некротических зародышевых скоплений. Выделенную зеленую ткань извлекают и инокулируют в многолуночные планшеты, содержащие SB196, для регенерации новых, клонально размноженных, трансформированных, образующих зародыши суспензионных культур.

25 Регенерация соматических зародышей сои в растения

Для получения целых растений из образующих зародыши суспензионных культур необходимо подвергнуть регенерации ткань. Зародыши подвергают созреванию, как описано в примере 13. После субкультивирования в среде SB103 в течение 3 недель из скоплений отбирают отдельные зародыши, и скринируют на изменения в составе 30 жирных кислот, как описано в примере 14. Следует отметить, что на этой стадии можно скринировать любой определяемый фенотип, являющийся результатом экспрессии представляющих интерес генов. Это включает, но без ограничения, изменения профиля жирных кислот, профиля и содержания белков, содержания 35 углеводов, скорости роста, жизнеспособности или способности развиваться нормально в растение сои.

Зрелые индивидуальные зародыши освобождают от влаги путем размещения их в пустую, маленькую чашку Петри (35×10 мм) в течение приблизительно 4-7 дней. 40 Чашки герметизируют волокнистой лентой (создавая камеру невысокой влажности). Освобожденные от влаги зародыши высаживают в среду SB71-4, в которой их оставляют прорасти в одинаковых с описанными выше культуральных условиях. Развившиеся ростки удаляют из среды для прорастания и промывают тщательно 45 водой, и затем высаживают в среду Redi-Earth в 24-ячеечном лотке-таре, покрытом прозрачным пластиковым колпаком. Через 2 недели колпак снимают, и растения закалывают в течение еще недели. Если ростки выглядят стойкими, их пересаживают в 10" горшки с Redi-Earth в количестве до 3 ростков на горшок. Через 10-16 недель собирают зрелые семена, откалывают края и анализируют на жирные кислоты, как 50 описано в примере 14.

Рецепты сред можно найти в примере 13, и маточный раствор хлорсульфурина представляет собой 1 мг/мл в 0,01N аммония гидроксида.

ПРИМЕР 17

Сравнение субстратной специфичности дельта-5-десатуразы *Mortierella alpina* (MaD5) с дельта-5-десатуразой *Euglena gracilis* (EgD5) в *Yarrowia lipolytica*

В данном примере описывается сравнение субстратной специфичности дельта-5-десатуразы *Mortierella alpina* (MaD5; SEQ ID NO: 67 и 68), которая описывается в патенте США № 6075183 и РСТ-публикациях № WO 2004/071467 и WO 2005/047479, с субстратной специфичностью EgD5 (SEQ ID NO: 2) в *Yarrowia lipolytica*.

Эта работа включала следующие стадии: (1) конструирование экспрессирующего вектора *Yarrowia* pY98, включающего MaD5; (2) трансформацию pY98 и pDMW367 в штамм Y2224 *Yarrowia*; и (3) сравнение профиля липидов в организмах-трансформантах, включающих pY98 или pDMW367, после подачи субстратов жирных кислот.

Конструирование экспрессирующего вектора *Yarrowia* pY98, включающего MaD5

Плазмида pY5-22 (SEQ ID NO: 69) является плазмидой-челноком, которая может реплицироваться как в *E.coli*, так и в *Yarrowia lipolytica*, содержащей следующие компоненты: автономно реплицируемую последовательность *Yarrowia* (ARS18; № доступа в GenBank - M91600); начало репликации плазмиды ColE1; ген устойчивости к ампициллину (Amp^R) для отбора в *E.coli*; ген Ura3 *Yarrowia* (№ доступа в GenBank - AJ306421) для отбора в *Yarrowia*; и химерную кассету TEF::NcoI/NotI::XPR, где «XPR» был ~100 п.о. 3'-района гена XPR *Yarrowia* (№ доступа в GenBank - M17741). Хотя конструкция плазмиды pY5-22 не описывается здесь подробно, ее получали из pY5 (ранее описанной в публикации РСТ-заявки № WO 2004/101757).

Плазмиду pY5-22GPD (SEQ ID NO: 70) создавали из плазмиды pY5-22 (SEQ ID NO: 69) путем замены промотора TEF промотором GPD *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID NO: 71), используя хорошо известные квалифицированному в данной области техники специалисту методы. «Промотор GPD» *Yarrowia* относится к 5' нетранслируемому району перед кодоном инициации трансляции «ATG» белка, кодируемого геном глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GPD) *Yarrowia lipolytica*, и необходим для экспрессии (публикация РСТ-заявки № WO 2005/003310). Более конкретно, промотор GPD *Yarrowia lipolytica* амплифицировали с плазмиды pYZDE2-S (SEQ ID NO: 72), которая была ранее описана в заявке на патент США № 11/737772 (содержание которой, таким образом, включено посредством ссылки), используя олигонуклеотиды GPDsense (SEQ ID NO: 73) и GPDantisense (SEQ ID NO: 74). Получаемый в результате фрагмент ДНК расщепляли SalI/NotI и клонировали в SalI/NotI-фрагмент pY5-22 (SEQ ID NO: 69), заменяя, таким образом, промотор TEF и сайт для NcoI/NotI промотором GPD и уникальным сайтом NotI и получая, таким образом, pY5-22GPD (SEQ ID NO: 70).

Ген дельта-5-десатуразы *Mortierella alpina* (SEQ ID NO: 67) высвобождали из pKR136 (SEQ ID NO: 75; которая была ранее описана в публикации РСТ-заявки № WO 2004/071467 (содержание которой, таким образом, включено посредством ссылки)) с помощью расщепления NotI и клонировали в сайт для NotI pY5-22GPD с получением pY98 (SEQ ID NO: 76; фиг. 9).

Трансформация pY98 (включающей MaD5) и pDMW367 (включающей EgD5) в штамм Y2224 *Yarrowia* и сравнение профиля липидов

Штамм Y2224 выделяли следующим образом: клетки *Yarrowia lipolytica* ATCC #20362 с чашки с агаром YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% бactoпептона, 2% глюкозы, 2% агара) штриховали на чашку MM (75 мг/л урацила и уридина, каждого, 6,7 г/л YNB с сульфатом аммония, без аминокислоты, и 20 г/л глюкозы),

содержащую 250 мг/л 5-FOA (Zymo Research). Чашки инкубировали при 28°C, и четыре результирующие колонии распределяли по отдельности по чашкам MM, содержащим 200 мг/л 5-FOA, и чашкам MM без урацила и уридина для подтверждения ауксотрофии Ura3 в отношении урацила.

Штамм Y2224 трансформировали pY98 (SEQ ID NO: 76; фиг. 9) и pDMW367 (SEQ ID NO: 23; фиг. 5C; пример 6), как описано в разделе «Общие способы».

Одиночные колонии трансформанта- *Yarrowia lipolytica*, содержащего pY98 (SEQ ID NO: 76) или pDMW367 (SEQ ID NO: 23), выращивали в 3 мл среды MM без урацила, дополненной 0,2% тергитола, при 30°C в течение 1 дня. После этого 1 мл переносили в 3 мл той же среды, или дополненной EDA, ETrA, DGLA, ETA, или не дополненной никакой жирной кислотой. Их инкубировали в течение 16 ч при 30°C, при 250 оборотах/мин, и затем получали с помощью центрифугирования осадки. Клетки промывали один раз водой, осаждали с помощью центрифугирования и сушили на воздухе. Осадки трансэтерифицировали (Roughan, G, and Nishida, I., Arch. Biochem. Biophys., 276(1): 38-46 (1990)) с использованием 500 мкл 1% натрия метилата в течение 30 мин при 50°C, после чего добавляли 500 мкл 1 М NaCl и 100 мкл гептана. После тщательного перемешивания и центрифугирования эфиры метилового спирта и жирных кислот (FAME) анализировали с помощью GC.

FAME (5 мкл вводили из слоя гексана) отделяли и определяли количество с использованием газового хроматографа Hewlett-Packard 6890, снабженного капиллярной колонкой с кварцевым стеклом Omegawax 320 (каталожный #24152, Supelco Inc.). Программировали, чтобы температура термостата удерживалась при 220°C в течение 2,6 мин, увеличивалась до 240°C с подъемом на 20°C/мин и затем удерживалась в течение дополнительных 2,4 мин. Газ-носитель поставлялся генератором водорода Whatman. Времена удержания сравнивали со временами удержания метиловых эфиров стандартов, коммерчески доступных (Nu-Chek Prep, Inc.).

Профили жирных кислот *Yarrowia lipolytica*, который экспрессирует pY98 (SEQ ID NO: 76) или pDMW367 (SEQ ID NO: 23) и которому подавались различные субстраты, показаны на фиг. 10A. На фиг. 10A затемнение указывает подаваемые субстраты и продуцируемые продукты; жирные кислоты определяют как 16:0 (пальмитат), 16:1, 18:0 (стеариновая кислота), 18:1 (олеиновая кислота), LA, GLA, ALA, STA, EDA, SCI (сциадоновая кислота или цис-5,11,14-эйкозатриеновая кислота; 20:3 омега-6), DGLA, ARA, ETrA, JUP (юнипероновая кислота или цис-5,11,14,17-эйкозатриеновая кислота; 20:4 омега-3), ETA и EPA. Составы жирных кислот выражали в виде весового процента (вес.%) от жирных кислот в целом.

Процент дельта-5-десатурации («% дельта-5-десатурации») EgD5 и MaD5 для каждого субстрата показан на фиг. 10B и рассчитывали делением вес% для продукта (или SCI, JUP, ARA или EPA) на сумму вес.% для субстрата и продукта (или EDA и SCI, ETrA и JUP, DGLA и ARA, или ETA и EPA соответственно) и умножением на 100 для выражения в виде %, в зависимости от подаваемого субстрата.

Активности EgD5 и MaD5 сравнивали, используя отношение процентов дельта-5-десатурации («отношения десатураций Eg/Ma») на фиг. 10B, и рассчитывали делением процента дельта-5-десатурации для EgD5 в отношении конкретного субстрата на процент дельта-5-десатурации для MaD5 в отношении того же субстрата.

Субстратная специфичность EgD5 и MaD5 в отношении правильного субстрата жирной кислоты омега-6 (т.е. DGLA) в сравнении с побочной жирной кислотой (т.е.

SCI) или в отношении правильного субстрата жирной кислоты омега-3 (т.е. ETA) в сравнении с побочной жирной кислотой (т.е. JUP) также продемонстрирована на фиг. 10B. В частности, субстратную специфичность («отношение продукт/побочный продукт») для субстратов омега-6 рассчитывали делением процента дельта-5-десатурации (% дельта-5-десатурации) для DGLA на процент дельта-5-десатурации (% дельта-5-десатурации) для EDA, и она продемонстрирована на тех же строках, что и результаты для DGLA. Субстратную специфичность («отношение продукт/побочный продукт») для субстратов омега-3 рассчитывали делением процента дельта-5-десатурации (% дельта-5-десатурации) для ETA на процент дельта-5-десатурации (% дельта-5-десатурации) для ETrA, и она продемонстрирована на тех же строках, что и результаты для ETA. Кроме того, определяли отношение субстратных специфичностей («отношение продукт/побочный продукт Eg/Ma») для субстратов омега-6 делением субстратной специфичности для EgD5 в отношении субстратов омега-6 (т.е. DGLA/EDA) на субстратную специфичность для MaD5. Отношение субстратных специфичностей («отношение продукт/побочный продукт Eg/Ma») для субстратов омега-3 рассчитывали делением субстратной специфичности для EgD5 в отношении субстратов омега-3 (т.е. ETA/ETrA) на субстратную специфичность для MaD5.

Предпочтение EgD5 и MaD5 в отношении субстратов омега-6 или омега-3 сравнивают с использованием отношения процента дельта-5-десатурации («отношения n-6/n-3») на фиг. 10B, и его рассчитывают с помощью деления процента дельта-5-десатурации для EgD5 и MaD5 в отношении конкретного субстрата омега-6 (или DGLA, или EDA) на процент дельта-5-десатурации в отношении соответствующего субстрата омега-3 (или ETA, или ETrA соответственно).

Из результатов, представленных на фиг. 10B, ясно, что EgD5 приблизительно в 2,6-2,9 раз более активна в Yarrowia, чем MaD5, когда в качестве субстратов используются DGLA, EDA и ETA. Исключением является активность в отношении ETrA, которая является приблизительно одинаковой для обоих ферментов. Субстратная специфичность EgD5 и MaD5 в отношении правильного субстрата жирной кислоты омега-6 (т.е. DGLA в сравнении с EDA) является приблизительно одинаковой в Yarrowia, но существует приблизительно 2,5-кратное предпочтение EgD5 в отношении ETA (в сравнении с ETrA) по сравнению с MaD5. Высокая активность и предпочтительная субстратная специфичность EgD5 в отношении ETA в сравнении с ETrA могут быть полезны при продуцировании длинноцепочечных PUFA. EgD5 также имеет предпочтение в отношении субстратов омега-6 (т.е. EGA и DGLA) по сравнению с субстратами омега-3 (т.е. ETrA и ETA) соответственно.

ПРИМЕР 18

Конструирование экспрессирующего вектора сои pKR916 для коэкспрессии дельта-5-десатуразы *Mortierella alpina* (MaD5) с дельта-9-элонгазой, происходящей из *Euglena gracilis*, (EgD9e) и дельта-8-десатуразой, происходящей из *Euglena gracilis*, (EgD8)

В данном примере описывается конструирование вектора сои для коэкспрессии MaD5 (SEQ ID NO: 67; пример 17) с EgD9e (SEQ ID NO: 77; которая описывается в заявке на патент США № 11/601563 (поданной 16 ноября 2006; № в реестре поверенного - BB-1562) и EgD8 (SEQ ID NO: 78; описанной как Eg5 в публикации PCT-заявки № WO 2006/012325).

Дельта-9-элонгаза *Euglena gracilis* (EgD9e)

Клон из библиотеки кДНК *Euglena* (eeg1c), названный eeg1c.pk001.n5f, содержащий дельта-9-элонгазу *Euglena gracilis* (EgD9e; SEQ ID NO: 77), использовали в качестве матрицы для амплификации EgD9e с использованием олигонуклеотидных праймеров oEugEL1-1 (SEQ ID NO: 79) и oEugEL1-2 (SEQ ID NO: 80) и ДНК-полимеразы VentR® (каталожный № M0254S, New England Biolabs Inc., Beverly, MA), следуя протоколу производителя. Получаемый в результате фрагмент ДНК клонировали в вектор для клонирования pCR-Blunt®, используя набор для клонирования продуктов ПЦР Zero Blunt® (Invitrogen Corporation), следуя протоколу производителя, с получением pKR906 (SEQ ID NO: 81).

Исходная плазмида pKR72 (№ доступа в ATCC - РТА-6019; SEQ ID NO: 82; последовательность размером 7085 п.о.), производная pKS123, которая ранее описана в публикации РСТ-заявки № WO 02/008269 (содержание которой, таким образом, включено посредством ссылки), содержит ген гигромицин В-фосфотрансферазы (HPT) (Gritz, L. and Davies, J., Gene, 25: 179-188 (1983)), фланкированный промотором Т7 и терминатором транскрипции Т7 (т.е. кассету промотор Т7/НРТ/терминатор Т7) и бактериальное начало репликации для отбора и репликации в бактериях (например, *E. coli*). Кроме того, pKR72 также содержит НРТ, фланкированный промотором 35S (Odell et al., Nature, 313: 810-812 (1985)) и 3' терминатором транскрипции NOS (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet., 1: 561-570 (1982)) (т.е. кассету 35S/НРТ/НOS3'), для отбора в растениях, таких как соя. pKR72 также содержит рестрикционный сайт для NotI, фланкированный промотором для α'-субъединицы β-конглицинина (Beachy et al., EMBO J., 4: 3047-3053 (1985)) и 3'-районом терминирования транскрипции гена фазеолина (Doyle et al., J. Biol. Chem., 261: 9228-9238 (1986)), что делает, таким образом, возможной сильную тканеспецифическую экспрессию в семенах сои генов, клонированных в сайт для NotI.

AscI-фрагмент плазмиды pKS102 (SEQ ID NO: 83), ранее описанной в публикации РСТ-заявки № WO 02/00905 (содержание которой, таким образом, включено посредством ссылки), содержащий кассету промотор Т7/hpt/терминатор Т7 и бактериальное начало репликации, объединяли с AscI-фрагментом плазмиды pKR72 (SEQ ID NO: 82), содержащим кассету промотор β-конглицинина/NotI/терминатор фазеолина, с получением pKR197 (SEQ ID NO: 84), ранее описанной в публикации РСТ-заявки № WO 04/071467 (содержание которой, таким образом, включено посредством ссылки).

Ген дельта-9-элонгазы *Euglena gracilis* высвобождали из pKR906 (SEQ ID NO: 81) с помощью расщепления NotI и клонировали в сайт для NotI pKR197 (SEQ ID NO: 84) с получением промежуточного вектора для клонирования pKR911 (SEQ ID NO: 85).

Дельта-8-десатураза *Euglena gracilis* (EgD8)

Плазмида pKR680 (SEQ ID NO: 86), которая ранее описана в публикации РСТ-заявки № WO 2006/012325 (содержание которой, таким образом, включено посредством ссылки), содержит ген дельта-8-десатуразы *Euglena gracilis* (EgD8; SEQ ID NO: 78, описываемой как Eg5 в WO 2006/012325), фланкированный промотором ингибитора трипсина сои Кунитца (Kti) (Jofuku et al., Plant Cell, 1: 1079-1093 (1989)) и 3'-районом терминирования Kti, выделение которого описывается в патенте США № 6372965, за которым следует терминатор транскрипции альбумина сои (Salb3'), который был ранее описан в публикации РСТ-заявки № WO 2004/071467 (т.е. кассету Kti/NotI/Kti3'Salb3').

Плазмиду pKR680 (SEQ ID NO: 86) расщепляли BsiWI, и фрагмент, содержащий EgD8, клонировали в сайт для BsiWI pKR911 (SEQ ID NO: 85) с

получением рKR913 (SEQ ID NO: 87).

Дельта-5-десатураза *Mortierella alpina* (MaD5)

Плазмида рKR767 (SEQ ID NO: 88), которая ранее описана в публикации РСТ-заявки № WO 2006/012325 (содержание которой, таким образом, включено
5 посредством ссылки), содержит ген дельта-5-десатуразы *Mortierella alpina* (MaD5; SEQ ID NO: 67), фланкированный промотором гена Gyl глицина сои и 3'-районом терминации транскрипции легумина A2 гороха (т.е. кассету Gyl/MaD5/legA2; конструирование которой описывается в WO 2006/012325).

10 Кассету Gyl/MaD5/legA2 высвобождали из рKR767 (SEQ ID NO: 88) с помощью расщепления SbfI, и получаемый в результате фрагмент клонировали в сайт для SbfI рKR913 (SEQ ID NO: 87) с получением рKR916 (SEQ ID NO: 89). Схематическое изображение рKR916 представлено на фиг. 11А. Таким образом дельта-9-элонгаза *Euglena gracilis* (обозначенная «eug el1» на фиг. 11А) была коэкспрессирована с
15 дельта-8-десатуразой *Euglena gracilis* (обозначенной «eug d8-sq5» на фиг. 11А) и дельта-5-десатуразой *Mortierella alpina* (обозначенной «DELTA 5 DESATURASE M ALPINA» на фиг. 11А) под контролем сильных, специфических для семени промоторов.

20 ПРИМЕР 19

Конструирование экспрессирующего вектора сои рKR1037 для коэкспрессии дельта-5-десатуразы *Euglena gracilis* (EgD5) с дельта-9-элонгазой, происходящей из *Euglena gracilis*, (EgD9e) и дельта-8-десатуразой, происходящей из *Euglena gracilis*, (EgD8)

25 В данном примере описывается конструирование вектора сои для коэкспрессии EgD5 (SEQ ID NO: 1; пример 5) с EgD9e (SEQ ID NO: 77; пример 18) и EgD8 (SEQ ID NO: 78; пример 18).

Исходная плазмида рKR974 (SEQ ID NO: 90) идентична рKR767 (SEQ ID NO: 88, пример 18), за исключением того, что NotI-фрагмент, содержащий MaD5,
30 заменен NotI-фрагментом, содержащим дельта-5-десатуразу *Saprolegnia diclina* (SdD5; SEQ ID NO: 94; которая описывается в публикации РСТ-заявки № WO 2004/071467). Кроме того, сайт для MfeI в терминаторе legA2 рKR767 (SEQ ID NO: 88) удален с помощью расщепления MfeI, заполнения сайта для MfeI и повторного лигирования
35 (т.е. СААТТГ превращался в СААТТААТТГ), и, следовательно, размер терминатора legA2 рKR974 (SEQ ID NO: 90) составляет 770 п.о. в сравнении с 766 п.о. для рKR767 (SEQ ID NO: 88).

Для того чтобы клонировать EgD5 в экспрессирующий вектор сои, было
40 необходимо ввести в 5'-конец гена рестрикционный сайт для NotI.

Квалифицированный в данной области техники специалист понимает, что существует множество путей введения рестрикционных сайтов в гены, такие как, но без ограничения, ПЦР или с помощью субклонирования в векторы, содержащие соответствующие сайты. В этом случае, для того чтобы ввести сайт для NotI в 5'-
45 конец EgD5 (SEQ ID NO: 1), рDMW367 (SEQ ID NO: 23) расщепляли MfeI и затем частично расщепляли NcoI. NcoI/MfeI-фрагмент, содержащий полноразмерный EgD5 (SEQ ID NO: 1), клонировали в сайт для NcoI/MfeI промежуточного вектора для клонирования, имеющего сайт для NotI непосредственно выше сайта для NcoI (т.е. GCGGCCGCAAACCATGG). Получаемую в результате плазмиду расщепляли NotI, и
50 фрагмент, содержащий EgD5 (SEQ ID NO: 1), клонировали в сайт для NotI рKR974 (SEQ ID NO: 90) с получением рKR1032 (SEQ ID NO: 91).

Кассету Gyl/EgD5/legA2 высвобождали из рKR1032 (SEQ ID NO: 91) с помощью

расщепления SbfI, и получаемый в результате фрагмент клонировали в сайт для SbfI pKR913 (SEQ ID NO: 87) с получением pKR1037 (SEQ ID NO: 92). Схематическое изображение pKR1037 (SEQ ID NO: 92) представлено на фиг. 11В. Таким образом дельта-9-элонгаза *Euglena gracilis* (обозначенная «eug el1» на фиг. 11В) была коэкспрессирована с дельта-8-десатуразой *Euglena gracilis* (помеченной «eug d8-sq5» на фиг. 11В) и дельта-5-десатуразой *Euglena gracilis* (обозначенной «eug d5 DS» на фиг. 11В) под контролем сильных, специфических для семени промоторов.

ПРИМЕР 20

Коэкспрессия дельта-9-элонгазы *Euglena gracilis*, дельта-8-десатуразы *Euglena gracilis* и дельта-17-десатуразы *Saprolegnia diclina* или с дельта-5-десатуразой *Mortierella alpina* (pKR916 & pKR328), или с дельта-5-десатуразой *Euglena gracilis* (pKR1037 & pKR328) в соматических зародышах сои

В данном примере описываются трансформация и экспрессия в соматических зародышах сои pKR916 (SEQ ID NO: 89, пример 18; содержащей EgD9e, EgD8 и MaD5) с pKR328 (SEQ ID NO: 93, фиг. 11С, ранее описанной в публикации РСТ-заявки № WO 04/071467), содержащей ген дельта-17-десатуразы *Saprolegnia diclina* (SdD17) и ген гигромицин-фосфотрансферазы для отбора на гидромицин. В данном примере, кроме того, описывается трансформация и экспрессия в соматических зародышах сои pKR1037 (SEQ ID NO: 92, пример 19; содержащей EgD9e, EgD8 и EgD5) с pKR328 (SEQ ID NO: 93, фиг. 11С).

Образующую зародыши сои суспензионную культуру (распространенная версия Jack) трансформировали AscI-фрагментом, содержащим экспрессирующую кассету pKR916 (SEQ ID NO: 89), и интактной плазмидой pKR328 (SEQ ID NO: 93), или AscI-фрагментом, содержащим экспрессирующую кассету pKR1037 (SEQ ID NO: 92), и интактной плазмидой pKR328 (SEQ ID NO: 93), как описано в примере 13.

Созревание зародышей происходило в жидкой среде для гистодифференциации и созревания сои (жидкой среде SHaM; Schmidt et al., Cell Biology and Morphogenesis, 24: 393 (2005)), используя модифицированную процедуру. Вкратце, после 4 недель отбора в SB196, как описано в примере 13, зародышевые скопления перемещали в 35 мл SB228 (жидкой среды SHaM) в 250-мл конической колбе Эрленмейера. Ткань сохраняли в жидкой среде SHaM на вращающемся встряхивателе при 130 оборотах/мин и 26°C с холодными белыми люминесцентными излучениями во время фотопериода 16:8 ч день/ночь при интенсивности света 60-85 мкЭрг/м²/сек в течение 2 недель до созревания зародышей. Зародыши, выращиваемые в течение 2 недель в жидкой среде SHaM, были эквивалентны по размеру и содержанию жирных кислот зародышам, культивируемым на SB166/SB103 в течение 5-8 недель, как описывается в примере 13.

Перечень ингредиентов сред

SB 228 - среда для гистодифференциации и созревания сои (SHaM) (на литр)

DDI H ₂ O	600 мл
FN-Lite макросоли для SHaM -	100 мл
10x маточный раствор	
MS микросоли - 1000x маточный раствор	1 мл
MS FeEDTA - 100x маточный раствор	10 мл
CaCl - 100x маточный раствор	6,82 мл
Витамины B5 - 1000x маточный раствор	1 мл
L-метионин	0,149 г
Сахароза	30 г
Сорбит	30 г

Довести объем до 900 мл

pH 5,8

Автоклавировать

5 Добавлять к охлажденной среде ($\leq 30^{\circ}\text{C}$):

* Глютамин (конечная концентрация 30 мМ) 4%

110 мл

10 *Примечание: Конечный объем после добавления глютамина будет составлять 1010 мл.

Поскольку глютамин относительно быстро разрушается, его можно предпочтительно добавлять непосредственно перед использованием среды. По истечении 2 недель после добавления глютамина основную среду можно хранить дольше без глютамина.

15 FN-Lite макросоли для SHaM - 10x маточный раствор #1 (на литр)

(NH₄)₂SO₄ (аммония сульфат) 4,63 г

KNO₃ (калия нитрат) 28,3 г

20 MgSO₄·7H₂O (магния сульфата гептагидрат) 3,7 г

KH₂PO₄ (калия фосфат, одноосновный) 1,85 г

Довести до объема

Автоклавировать

25 MS микросоли - 1000x маточный раствор #2 (на литр)

H₃BO₃ (борная кислота) 6,2 г

MnSO₄·H₂O (марганца сульфата моногидрат) 16,9 г

ZnSO₄·7H₂O (цинка сульфата гептагидрат) 8,6 г

30 Na₂MoO₄·2H₂O (натрия молибдата дигидрат) 0,25 г

CuSO₄·5H₂O (меди сульфата пентагидрат) 0,025 г

CoCl₂·6H₂O (кобальта хлорида гексагидрат) 0,025 г

KI (калия йодид) 0,8300 г

35 Довести до объема

Автоклавировать

FeEDTA - 100x маточный раствор #3 (на литр)

Na₂EDTA (натрия EDTA) 3,73 г

40 FeSO₄·7H₂O (железа сульфата гептагидрат) 2,78 г

* EDTA необходимо полностью растворить до добавления железа.

Довести до объема

45 Раствор является светочувствительным. Флакон(ы) следует обернуть фольгой, не пропускающей свет.

Автоклавировать

Ca - 100x маточный раствор #4 (на литр)

CaCl₂·2H₂O (кальция хлорида дигидрат) 44 г

50

Довести до объема

Автоклавировать

1000X маточный раствор витаминов B5 #5 (на литр)

Тиамин HCl	10 г
Никотиновая кислота	1 г
Пиридоксин HCl	1 г
Миоинозит	100 г

5

Довести до объема

Хранить замороженным

4% глутамин - маточный раствор #6 (на литр)

10

DDI вода, нагретая до 30°C

900 мл

L-глутамин

40 г

15

Постепенно добавлять при перемешивании и применении небольшого нагревания

Не превышать 35°C

Довести до объема

Стерилизовать фильтрованием

Хранить замороженным*

20

*Замечание: Нагреть оттаявший маточный раствор в бане на 31°C до полного растворения кристаллов.

После созревания в жидкой среде SHaM отдельные зародыши извлекали из скоплений, сушили и скринировали на изменения состава жирных кислот, как описано выше.

25

Подмножество соевых зародышей (т.е. шесть зародышей на каждый случай), трансформированных или pKR916 (SEQ ID NO: 89) и pKR328 (SEQ ID NO: 93), или pKR1037 (SEQ ID NO: 92) и pKR328 (SEQ ID NO: 93), собирали и отбирали в стеклянные пробирки для GC, и с помощью трансэтерификации готовили эфиры метилового спирта и жирных кислот. Для трансэтерификации 50 мкл триметилсульфония гидроксида (TMSH) и 0,5 мл гексана добавляли к зародышам в стеклянных пробирках и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре со встряхиванием. Эфиры метилового спирта и жирных кислот (5 мкл вводили из слоя гексана) отделяли и определяли количество с использованием газового хроматографа Hewlett-Packard 6890, снабженного капиллярной колонкой с кварцевым стеклом Omegawax 320 (каталожный #24152, Supelco Inc.). Программировали, чтобы температура термостата удерживалась при 220°C в течение 2,6 мин, увеличивалась до 240°C с подъемом на 20°C/мин и затем удерживалась в течение дополнительных 2,4 мин. Газ-носитель поставлялся генератором водорода Whatman. Времена удержания сравнивали со временами удержания метиловых эфиров стандартов, коммерчески доступных (Nu-Chek Prep, Inc.).

30

35

40

45

Таким образом проанализировали 60 случаев трансформации pKR916 (SEQ ID NO: 89) и pKR328 (SEQ ID NO: 93) и 45 случаев трансформации pKR1037 (SEQ ID NO: 92) и pKR328 (SEQ ID NO: 93). Средние профили жирных кислот для десяти случаев наличия наибольшей дельта-5-десатуразной активности для каждой трансформации (pKR916 и pKR328, pKR1037 и pKR328) продемонстрированы на фиг. 12A и фиг. 12B соответственно.

50

На фиг. 12A и 12B жирные кислоты определяют как 16:0 (пальмитат), 18:0 (стеариновая кислота), 18:1 (олеиновая кислота), LA, ALA, EDA, SCI, DGLA, ARA, ERA, JUP, ETA и EPA. Жирные кислоты, перечисленные как «другие», включают 18:

2 (5,9), GLA, STA, 20:0, 20:1(11), 20:2 (7,11) или 20:2 (8,11) и DPA. Относительное содержание каждой из этих «других» жирных кислот составляет менее 3% от жирных кислот в целом. Составы жирных кислот для отдельного зародыша выражали в виде

5 весового процента (вес.%) от жирных кислот в целом, а средний состав жирных кислот представляет собой среднее шести отдельных зародышей для каждого случая.

Активность дельта-5-десатуразы в отношении «правильных» субстратов (т.е. DGLA и ETA) выражали в виде процента дельта-5-десатурации («процента правильной дельта-5-десатурации»), рассчитываемого согласно следующей

10 формуле: $[\text{продукт}]/[\text{субстрат} + \text{продукт}] \times 100$. Более конкретно, процент дельта-5-десатурации для «правильных» субстратов определяли как $([\text{ARA} + \text{EPA}]/[\text{DGLA} + \text{ETA} + \text{ARA} + \text{EPA}]) \times 100$.

Активность дельта-5-десатуразы в отношении «неправильных» субстратов (т.е. EDA и ERA) также выражают в виде процента дельта-5-десатурации («процента

15 неправильной дельта-5-десатурации»), рассчитываемого как $([\text{SCI} + \text{JUP}]/[\text{EDA} + \text{ERA} + \text{SCI} + \text{JUP}]) \times 100$.

Сравнивали субстратные специфичности MaD5 и EgD5 в отношении «правильных» субстратов (т.е. DGLA и ETA) в сравнении с «неправильными» субстратами (т.е. EDA и ERA), и сравнение продемонстрировано на фиг. 13. На фиг. 13 активность дельта-5-

20 десатуразы в отношении «правильных» субстратов («% правильной дельта-5-десатурации») откладывают по X-оси, а активность дельта-5-десатуразы в отношении «неправильных» субстратов («% неправильной дельта-5-десатурации») откладывают по Y-оси для MaD5 (данные с фиг. 12A) и EgD5 (данные с фиг. 12B).

На фиг. 12B демонстрируется, что активность EgD5 в зародышах сои является очень высокой, при этом среднее превращение (% правильной дельта-5-десатурации) составляет от 77% до 99% в десяти случаях наличия наибольшей дельта-5-

25 десатуразной активности. По сравнению с MaD5 специфичность EgD5 в отношении субстратов (фиг. 13) больше в отношении «правильных» субстратов по сравнению с «неправильными» субстратами. С учетом высокой активности и субстратной специфичности EgD5 может быть полезна при продуцировании PUFA, таких как, но

30 без ограничения, EPA и DHA, в клетке-хозяине.

35 Формула изобретения

1. Выделенный полинуклеотид для экспрессии дельта-5-десатуразы, включающий

(а) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий

40 активностью дельта-5-десатуразы, причем полипептид обладает по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности, на основе способа выравнивания Clustal W, предоставленного программой MegAlign™ V6.1 комплекта вычислительных программ для биоинформатики DNASTAR LASERGENE (параметры по умолчанию: штраф за промежуток = 10, штраф за длину

45 промежутка = 0,2, обусловленная запаздыванием дивергенция последовательностей (%) = 30, переходный вес ДНК = 0,5, белковая весовая матрица = ряд Гоннета, ДНК весовая матрица = IUB), при сравнении с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:2;

(b) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий

50 активностью дельта-5-десатуразы, причем нуклеотидная последовательность обладает по меньшей мере 90% идентичности последовательности, на основе способа выравнивания Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN), предоставленного National Center for Biotechnology Information (параметры по

умолчанию: короткие запросы = автоматически устанавливаемые параметры для коротких последовательностей ввода, ожидаемый порог = 10, размер слова = 11, индексы соответствия/несоответствия = 2, -3, штрафы за пропуск = (наличие:5, удлинение:2) и фильтр = области низкой сложности), при сравнении с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3;

(с) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий активностью дельта-5-десатуразы, причем нуклеотидная последовательность гибридизуется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, где жесткие условия включают гибридизацию в 50% формамида, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в 0,1X SSC при 60°C; или

(d) комплемент нуклеотидной последовательности (a), (b) или (c), причем комплемент и нуклеотидная последовательность состоят из одинакового числа нуклеотидов и комплементарны на 100%.

2. Полинуклеотид по п.1, в котором нуклеотидная последовательность включает SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3.

3. Полинуклеотид по п.1, где аминокислотная последовательность полипептида включает

(a) SEQ ID NO:2; или

(b) аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотных последовательностей (a) по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой.

4. Рекombинантная ДНК-конструкция для экспрессии дельта-5-десатуразы, включающая полинуклеотид по пп.1, 2 или 3, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью.

5. Клетка-хозяин для экспрессии дельта-5-десатуразы, содержащая в своем геноме рекombинантную ДНК-конструкцию по п.4.

6. Клетка-хозяин по п.5, которая выбрана из группы, состоящей из растений и дрожжей.

7. Способ трансформации клетки-хозяина, включающий трансформацию клетки-хозяина рекombинантной конструкцией по п.4 и отбор тех клеток-хозяев, которые трансформированы рекombинантной конструкцией по п.4.

8. Способ по п.7, в котором клетка-хозяин представляет собой клетку растения.

9. Способ по п.8, в котором клеткой растения является клетка растения сои.

10. Трансгенное семя для экспрессии дельта-5-десатуразы, содержащее в своем геноме рекombинантную конструкцию по п.4.

11. Способ экспрессии полиненасыщенных жирных кислот с длинными цепями в клетке растения, включающий

(a) трансформацию клетки рекombинантной конструкцией по п.4;

(b) отбор тех трансформированных клеток, которые экспрессируют дельта-5-десатуразу, кодируемую рекombинантной конструкцией; и

(c) отбор тех трансформированных клеток со стадии (b), которые экспрессируют полиненасыщенные жирные кислоты с длинными цепями.

12. Способ получения по меньшей мере одной полиненасыщенной жирной кислоты в растении с масличными семенами, включающий (a) трансформацию клетки растения с масличными семенами рекombинантной конструкцией по п.4 и по меньшей мере одной дополнительной рекombинантной ДНК-конструкцией, включающей выделенный полинуклеотид, функционально связанный с по меньшей

мере одной регуляторной последовательностью, кодирующий полипептид, выбранный из группы, состоящей из дельта-4-десатуразы, дельта-5-десатуразы, дельта-6-десатуразы, дельта-8-десатуразы, дельта-12-десатуразы, дельта-15-десатуразы, дельта-17-десатуразы, дельта-9-десатуразы, дельта-9-элонгазы, C_{14/16}-элонгазы, C_{16/18}-элонгазы, C_{18/20}-элонгазы и C_{20/22}-элонгазы;

(b) регенерацию трансгенного растения с масличными семенами из трансформированной клетки стадии (a); и

(c) отбор таких полученных от растений стадии (b) семян, которые имеют измененный уровень по меньшей мере одной из полиненасыщенных жирных кислот по сравнению с уровнем в семенах, полученных от нетрансформированного растения с масличными семенами.

13. Способ по п.12, в котором растение с масличными семенами выбрано из группы, состоящей из сои, видов Brassica, подсолнечника, кукурузы, хлопка, льна и сафлора.

14. Трансгенное растение с масличными семенами для экспрессии дельта-5-десатуразы, полученное способом по п.8.

15. Растение с масличными семенами для экспрессии дельта-5-десатуразы, содержащее

(a) рекомбинантную ДНК-конструкцию по п.4, и

(b) по меньшей мере одну дополнительную рекомбинантную ДНК-конструкцию, включающую выделенный полинуклеотид, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, кодирующий полипептид, выбранный из группы, состоящей из дельта-4-десатуразы, дельта-5-десатуразы, дельта-6-десатуразы, дельта-8-десатуразы, дельта-12-десатуразы, дельта-15-десатуразы, дельта-17-десатуразы, дельта-9-десатуразы, дельта-9-элонгазы, C_{14/16}-элонгазы, C_{16/18}-элонгазы, C_{18/20}-элонгазы и C_{20/22}-элонгазы.

16. Растение с масличными семенами по п.14 или 15, которое выбрано из группы, состоящей из сои, видов Brassica, подсолнечника, кукурузы, хлопка, льна и сафлора.

17. Трансгенное семя для экспрессии дельта-5-десатуразы, полученное от трансгенного растения с масличными семенами по п.14, где трансгенное семя содержит рекомбинантную ДНК-конструкцию.

18. Трансгенное семя для экспрессии дельта-5-десатуразы, полученное от трансгенного растения с масличными семенами по п.15, где трансгенное семя содержит рекомбинантную ДНК-конструкцию.

19. Применение трансгенного семени по пп.10, 17 или 18 для получения пищевого продукта для питания людей.

20. Применение по п.19, в котором указанный пищевой продукт представляет собой крахмал, белок, крупу, муку или зерно.

21. Применение трансгенного семени по пп.10, 17 или 18 для получения корма для питания животных.

22. Применение трансгенного семени по п.17 или 18 для получения масла.

23. Применение по п.22, дополнительно включающее получение лецитина.

24. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, представленная в SEQ ID NO:3, где указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид дельта-5-десатуразу, и у которой по меньшей мере один кодон оптимизирован в отношении кодонов для экспрессии в видах Yarrowia.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> E.I. du Pont de Nemours & Company

<120> Дельта-5-десатураза и ее применение для получения полиненасыщенных жирных кислот

<130> BB1629

<150> US 60/801,172

<151> 2006-05-17

<160> 94

<170> Патент в версии 3.4

<210> 1

<211> 1350

<212> ДНК

<213> *Euglena gracilis*

<220>

<221> разный признак

<222> (1) .. (1350)

<223> дельта-5-десатураза

<400> 1

```

atggctctca gtcttaccac agaacagctg ttagaacgcc ctgatttggt tgcgattgat      60
ggcatcctct acgaccttga agggcttgcc aaagttcatc caggaggaga tttgattctc      120
gcttctggtg cctctgatgc ctccccctctc ttttattcaa tgcattccata cgtcaaaccg      180
gagaattcca aattgcttca acagttcgtc cgagggaagc atgaccgcac ctccaaggac      240
attgtctaca cgtatgattc tcccttcgca caagacgtta agcggacaat gcgcgagggtg      300
atgaaagggg ggaactggta cgcaaccctt ggcttctggc tgcgcaccgt tgggatcatc      360
gccgtgacgg ccttttgcca gtggcactgg gctaccacgg ggatggtgct gtggggcctg      420
ttgactggat tcatgcacat gcagatcggc ttatccatcc agcatgatgc gtcccacggg      480
gccatcagca agaagccttg ggtcaacgcc ctcttcgcct acggcattga cgtcatcgga      540
tcgtcccggg ggatttggct gcagtcgcac atcatgcggc accacaccta caccaaccag      600
cacggcctcg acctggatgc ggagtcggca gagccgttcc tgggtgtcca caactacccc      660
gccgcaaaca ccgcccgaaa gtggttccac cgcttccaag cttggtacat gtaccttggtg      720
ctggggggcat acgggggtatc gctgggtgtac aaccgcgtct acattttccg gatgcagcac      780
aatgacacca tcccagagtc tgtcacggcc atgcggggaga atggctttct gcggcgctac      840
cgcacacttg cattcgtgat gcgagctttc ttcattctcc ggaccgcatt cttgccctgg      900
tacctcactg ggacctcatt gctgatcacc attcctctgg tgcctactgc aactgggtgcc      960

```

```

ttcttgacgt tcttcttcat tttgtccac aattttgatg gctccgaacg gatccccgac 1020
aagaactgca aggttaagag ctctgagaag gacgttgagg ctgaccaaatt tgactgggtat 1080
cggggcgcagg tggagacgtc ctccacatac ggtggcccca tcgcatgtt cttcactggc 1140
ggtctcaatt tccagatcga gcaccacctc tttccccgga tgtcgtcttg gcactacccc 1200
ttcgtccagc aggcgggtccg ggagtgttgc gaacgccatg gagtgcgata tgttttctac 1260
cctaccatcg tcggcaacat catctccacc ctgaagtaca tgcataaggt ggggtgtcgtc 1320
cactgcgtga aggacgcaca ggattcctga 1350

```

<210> 2

<211> 449

<212> БЕЖОК

<213> Euglena gracilis

<400> 2

```

Met Ala Leu Ser Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu Glu Arg Pro Asp Leu
1           5           10           15

```

```

Val Ala Ile Asp Gly Ile Leu Tyr Asp Leu Glu Gly Leu Ala Lys Val
          20           25           30

```

```

His Pro Gly Gly Asp Leu Ile Leu Ala Ser Gly Ala Ser Asp Ala Ser
          35           40           45

```

```

Pro Leu Phe Tyr Ser Met His Pro Tyr Val Lys Pro Glu Asn Ser Lys
50           55           60

```

```

Leu Leu Gln Gln Phe Val Arg Gly Lys His Asp Arg Thr Ser Lys Asp
65           70           75           80

```

```

Ile Val Tyr Thr Tyr Asp Ser Pro Phe Ala Gln Asp Val Lys Arg Thr
          85           90           95

```

```

Met Arg Glu Val Met Lys Gly Arg Asn Trp Tyr Ala Thr Pro Gly Phe
          100          105          110

```

```

Trp Leu Arg Thr Val Gly Ile Ile Ala Val Thr Ala Phe Cys Glu Trp
115           120           125

```

```

His Trp Ala Thr Thr Gly Met Val Leu Trp Gly Leu Leu Thr Gly Phe
130           135           140

```

```

Met His Met Gln Ile Gly Leu Ser Ile Gln His Asp Ala Ser His Gly
145           150           155           160

```

Ala Ile Ser Lys Lys Pro Trp Val Asn Ala Leu Phe Ala Tyr Gly Ile
 165 170 175

Asp Val Ile Gly Ser Ser Arg Trp Ile Trp Leu Gln Ser His Ile Met
 180 185 190

Arg His His Thr Tyr Thr Asn Gln His Gly Leu Asp Leu Asp Ala Glu
 195 200 205

Ser Ala Glu Pro Phe Leu Val Phe His Asn Tyr Pro Ala Ala Asn Thr
 210 215 220

Ala Arg Lys Trp Phe His Arg Phe Gln Ala Trp Tyr Met Tyr Leu Val
 225 230 235 240

Leu Gly Ala Tyr Gly Val Ser Leu Val Tyr Asn Pro Leu Tyr Ile Phe
 245 250 255

Arg Met Gln His Asn Asp Thr Ile Pro Glu Ser Val Thr Ala Met Arg
 260 265 270

Glu Asn Gly Phe Leu Arg Arg Tyr Arg Thr Leu Ala Phe Val Met Arg
 275 280 285

Ala Phe Phe Ile Phe Arg Thr Ala Phe Leu Pro Trp Tyr Leu Thr Gly
 290 295 300

Thr Ser Leu Leu Ile Thr Ile Pro Leu Val Pro Thr Ala Thr Gly Ala
 305 310 315 320

Phe Leu Thr Phe Phe Phe Ile Leu Ser His Asn Phe Asp Gly Ser Glu
 325 330 335

Arg Ile Pro Asp Lys Asn Cys Lys Val Lys Ser Ser Glu Lys Asp Val
 340 345 350

Glu Ala Asp Gln Ile Asp Trp Tyr Arg Ala Gln Val Glu Thr Ser Ser
 355 360 365

Thr Tyr Gly Gly Pro Ile Ala Met Phe Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe
 370 375 380

Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Trp His Tyr Pro
 385 390 395 400

Phe Val Gln Gln Ala Val Arg Glu Cys Cys Glu Arg His Gly Val Arg
405 410 415

Tyr Val Phe Tyr Pro Thr Ile Val Gly Asn Ile Ile Ser Thr Leu Lys
420 425 430

Tyr Met His Lys Val Gly Val Val His Cys Val Lys Asp Ala Gln Asp
435 440 445

Ser

```
<210> 3
<211> 1350
<212> ДНК
<213> Euglena gracilis
```

```
<220>
<221>  разный признак
<223>  синтетическая дельта-5-десатураза (оптимизированная в отношении
        кодонов для Yarrowia lipolytica
```

<400>	3						
atggctctct	cccttactac	cgagcagctg	ctcgagcgcac	ccgacctggg	tgccatcgac		60
ggcattctct	acgatctgga	aggtcttgcc	aaggtccatc	ccggaggcga	cttgatcctc		120
gcttctgggtg	cctccgatgc	ttctcctctg	ttctactcca	tgcaccctta	cgtaagccc		180
gagaactcga	agctgcttca	acagttcgtg	cgaggcaagc	acgaccgaac	ctccaaggac		240
attgtctaca	cctacgactc	tccctttgca	caggacgtca	agcgaactat	gcgagaggtc		300
atgaaaggtc	ggaactggta	tgccacacct	ggattctggc	tgcaaccgt	tggcatcatt		360
gctgtcaccg	ccttttgca	gtggcactgg	gctactaccg	gaatggtgct	gtggggctctc		420
ttgactggat	tcatgcacat	gcagatcggc	ctgtccattc	agcacgatgc	ctctcatggg		480
gccatcagca	aaaagccctg	ggtcaacgct	ctctttgcct	acggcatcga	cgtcattgga		540
tcgtccagat	ggatctggct	gcagtctcac	atcatgcgac	atcacacct	caccaatcag		600
catgggtctcg	acctggatgc	cgagtccgca	gaaccattcc	ttgtgttcca	caactaccct		660
gctgccaa	ctgctcgaaa	gtggtttcac	cgattccagg	cctggtacat	gtacctcgtg		720
cttgagcct	acggcgtttc	gctgggtgtac	aaccctctct	acatcttccg	aatgcagcac		780
aacgacacca	ttcccga	tgtcacagcc	atgcgagaga	acggctttct	gcgacggtac		840
cgaacccttg	cattcgttat	gcgagctttc	ttcatctttc	gaaccgcctt	cttgccctgg		900
tatctcactg	gaacctccct	gctcatcacc	attcctctgg	tgcccaactgc	taccgggtgcc		960
ttcctcacct	tctttttcat	cttgtctcac	aacttcgatg	gctcggagcg	aatccccgac		1020

aagaactgca aggtcaagag ctccgagaag gacgttgaag cccatcagat cgactggtag 1080
 agagctcagg tggagacctc ttccacctac ggtggaccca ttgccatggt ctttactggc 1140
 ggtctcaact tccagatcga gcatcacctc tttcctcgaa tgtcgtcttg gcactatccc 1200
 ttcgtgcagc aagctgtccg agagtgttgc gaacgacacg gagttcggta cgtcttctac 1260
 cctaccattg tgggcaacat catttccacc ctcaagtaca tgcacaaagt cgggtgtggtt 1320
 cactgtgtca aggacgctca ggattcctaa 1350

<210> 4
 <211> 590
 <212> ДНК
 <213> *Euglena gracilis*

<400> 4
 ggccaccaca tctacaccaa ccagcacggc ctcgacctgg atgcggagtc ggcagagccg 60
 ttcttggtgt tccacaacta ccccgccgca aacaccgccc gaaagtgggt ccaccgcttc 120
 caagcttggt acatgtacct tgtgctgggg gcatacgggg tatcgctggt gtacaacccg 180
 ctctacattt tccgatgca gcacaatgac accatcccag agtctgtcac ggccatgcgg 240
 gaaaatggct ttctgcggcg ctaccgcaca cttgcattcg tgatgcgagc tttcttcac 300
 ttccggaccg cattcttgcc ctggtacctc actgggacct cattgctgat caccattcct 360
 ctggtgcca cgcgaactgg tgccttcttg acgttcttct tcattttgtc ccacaatttt 420
 gatggctccg aacggatccc cgacaagaac tgcaaggta agagctctga gaaggacgtt 480
 gaggtgacc aaattgactg gtatcggggc caggtggaga cgtcctccac atacggtggc 540
 cccatcgcca tgttcttcac tggcgggtctc aactaccaa tcgtccacca 590

<210> 5
 <211> 196
 <212> БЕЛОК
 <213> *Euglena gracilis*

<400> 5

Gly His His Ile Tyr Thr Asn Gln His Gly Leu Asp Leu Asp Ala Glu
 1 5 10 15

Ser Ala Glu Pro Phe Leu Val Phe His Asn Tyr Pro Ala Ala Asn Thr
 20 25 30

Ala Arg Lys Trp Phe His Arg Phe Gln Ala Trp Tyr Met Tyr Leu Val
 35 40 45

Leu Gly Ala Tyr Gly Val Ser Leu Val Tyr Asn Pro Leu Tyr Ile Phe

50	55	60
Arg Met Gln His Asn Asp Thr Ile Pro Glu Ser Val Thr Ala Met Arg		
65	70	75 80
Glu Asn Gly Phe Leu Arg Arg Tyr Arg Thr Leu Ala Phe Val Met Arg		
	85	90 95
Ala Phe Phe Ile Phe Arg Thr Ala Phe Leu Pro Trp Tyr Leu Thr Gly		
	100	105 110
Thr Ser Leu Leu Ile Thr Ile Pro Leu Val Pro Thr Ala Thr Gly Ala		
	115	120 125
Phe Leu Thr Phe Phe Phe Ile Leu Ser His Asn Phe Asp Gly Ser Glu		
	130	135 140
Arg Ile Pro Asp Lys Asn Cys Lys Val Lys Ser Ser Glu Lys Asp Val		
	145	150 155 160
Glu Ala Asp Gln Ile Asp Trp Tyr Arg Ala Gln Val Glu Thr Ser Ser		
	165	170 175
Thr Tyr Gly Gly Pro Ile Ala Met Phe Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr		
	180	185 190
Gln Ile Val His		
	195	

<210> 6
 <211> 797
 <212> ДНК
 <213> Euglena gracilis

<400> 6	
cacagaacag ctggttagaac gccctgattt ggttgcgatt gatggcatcc tctacgacct	60
tgaagggctt gccaaagttc atccaggagg agatttgatt ctgcttctg gtgcctctga	120
tgctccctt ctcttttatt caatgcatcc atacgtcaaa ccggagaatt ccaaattgct	180
tcaacagttc gtccgaggga agcatgaccg cacctcgaag gacattgtct acacgtatga	240
ttctcccttc gcacaagacg ttaagcggac aatgcgcgag gtgatgaaag ggaggaactg	300
gtacgcaacc cctggcttct ggctgcgcac cggtgggatc atcgccgtga cggccttttg	360
cgagtggcac tgggctacca cggggatggt gctgtggggc ctggtgactg gattcatgca	420
catgcagatc ggcttatcca tccagcatga tgcgtccac ggggccatca gcaaggagcc	480

ttgggtcaac gccctcttcg cctacggcat tgacgtcatc ggatcgcccc ggtggatttg 540
gctgcagtca cacatcatgc ggcaccacac ctacaccaac cagcacggcc tcgacctgga 600
tgcgagtcg gcagagccgt tcctggtgtt ccacagctac cccgccgcaa acaccgcccg 660
aaagtggttc caccgcttcc aagcttggtg catgtacctt gcgctggggg catacggggg 720
atcgctgggtg tacaacccgc tctacatddd ccggatgcag cacaatgaca ccatcccaga 780
gtctgtcacg gccatgc 797

<210> 7
<211> 559
<212> ДНК
<213> *Euglena gracilis*

<400> 7
cacagaacag ctgttagaac gccctgattt ggttgcgatt gatggcatcc tctacgacct 60
tgaagggctt gccaaagttc atccaggagg agatttgatt ctcgcttctg gtgcctctga 120
tgctccccct ctcttttatt caatgcatcc atacgtcaaa ccggagaatt ccaaattgct 180
tcaacagttc gtccgaggga agcatgaccg cacctcgaag gacattgtct acacgtatga 240
ttctcccttc gcacaagacg ttaagcggac aatgcgcgag gtgatgaaag ggaggaactg 300
gtacgcaacc cctggcttct ggctgcgcac cgctggggatc atcgccgtga cggccttttg 360
cgagtggcac tgggctacca cggggatggt gctgtggggc ctgctgactg gattcatgca 420
catgcagatc ggcttatcca tccagcatga tgcgtccac ggggccatca gcaaggagcc 480
ttgggtcaac gccctcttcg cctacggcat tgacgtcatc ggatcgcccc ggtggatttg 540
gctgcagtca cacatcatg 559

<210> 8
<211> 273
<212> ДНК
<213> *Euglena gracilis*

<400> 8
ggaatggctc tcagtcttac cacagaacag ctgttagaac gccctgattt ggttgcgatt 60
gatggcatcc tctacgacct tgaagggctt gccaaagttc atccaggagg agatttgatt 120
ctcgcttctg gtgcctctga tgctccccct ctcttttatt caatgcatcc atacgtcaaa 180
ccggagaatt ccaaattgct tcaacagttc gtccgaggga agcatgaccg cacctcgaag 240
gacattgtct acacgtatga ttctcccttc gca 273

<210> 9
<211> 20
<212> ДНК
<213> *Euglena gracilis*

<400> 9	
ggaatggctc tcagtcttac	20
<210> 10	
<211> 728	
<212> ДНК	
<213> <i>Euglena gracilis</i>	
<400> 10	
cctcactggg acctcattgc tgatcaccaat tcctctgggtg cccacygcaa ctgggtgcctt	60
cttgacgttc ttcttcattt tgtcccacaa ttttgatggc tccgaacgga tccccgacaa	120
gaactgcaag gttaagagct ctgagaagga cgttgaggct gaccaaattg actgggtatcg	180
ggcgaggtg gagacgtcct ccacatacgg tggccccatc gccatgttct tctactggcgg	240
tctcaatttc cagatcgagc accacctctt tccccggatg tcgtcttggc actaccctt	300
cgtccagcag gcggtccggg agtggtgcga acgccatgga gtgcgatatg ttttctaccc	360
taccatcgtc ggcaacatca tctccaccct gaagtacatg cataagggtg gtgtcgtcca	420
ctgcgtgaag gacgcacagg attcctgagg ggcaggggtga ccaagaacga tcatcgatgt	480
gttcttcttg ccctttgggtg ggggtactcg cagattgctc cactgaaccg tctcctaact	540
ctgaccctct ccaaccctgt gttgagtgtt tgctttatgc tccaaagtgg cttcttattt	600
ggtgaccctg ggggcagcgg cacctgtgcc atgcagctga taaccaggc tgctactcta	660
agttggatgg ccaatcgctt ggcatgata tccctgctca gcgttgcat ccaatgggtt	720
gcttatcc	728
<210> 11	
<211> 464	
<212> ДНК	
<213> <i>Euglena gracilis</i>	
<400> 11	
cctctttccc cggatgtcgt cttggcacta ccccttcgtc cagcaggcgg tccgggagtg	60
ttgcgaacgc catggagtgc gatatgtttt ctaccctacc atcgtcggca acatcatctc	120
caccctgaag tacatgcata aggtgggtgt cgtccactgc gtgaaggacg cacaggattc	180
ctgaggggca gggtgaccaa gaacgatcat cgatgtgttc ttctggccct ttgggtggggt	240
actcgccaga ttgctccact gaaccgtatc ctaactctga ccctctccaa ccctgtgttg	300
agtgtttgct ttatgctcca aagtggcttc ttatttgggtg acccgtgggg cagcggcacc	360
tgtgccatgc agctgataac ccaggctgct actctaagtt ggatggccaa tcgtctggca	420
ttgatatccc tgctcagcgt tgcattccaa tggtttgctt atcc	464

<210> 12
 <211> 456
 <212> БЕЛОК
 <213> Pythium irregulare (№ доступа в GenBank AAL13311)

<220>
 <221> РАЗНЫЙ ПРИЗНАК
 <223> дельта-5-десатураза

<400> 12

Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Gln Glu Val Ala Lys
 1 5 10 15

His Asn Thr Ala Lys Ser Ala Trp Val Ile Ile Arg Gly Glu Val Tyr
 20 25 30

Asp Val Thr Glu Trp Ala Asp Lys His Pro Gly Gly Ser Glu Leu Ile
 35 40 45

Val Leu His Ser Gly Arg Glu Cys Thr Asp Thr Phe Tyr Ser Tyr His
 50 55 60

Pro Phe Ser Asn Arg Ala Asp Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Lys Ile Gly
 65 70 75 80

Lys Leu Val Gly Gly Tyr Glu Phe Pro Val Phe Lys Pro Asp Ser Gly
 85 90 95

Phe Tyr Lys Glu Cys Ser Glu Arg Val Ala Glu Tyr Phe Lys Thr Asn
 100 105 110

Asn Leu Asp Pro Lys Ala Ala Phe Ala Gly Leu Trp Arg Met Val Phe
 115 120 125

Val Phe Ala Val Ala Ala Leu Ala Tyr Met Gly Met Asn Glu Leu Ile
 130 135 140

Pro Gly Asn Val Tyr Ala Gln Tyr Ala Trp Gly Val Val Phe Gly Val
 145 150 155 160

Phe Gln Ala Leu Pro Leu Leu His Val Met His Asp Ser Ser His Ala
 165 170 175

Ala Cys Ser Ser Ser Pro Ala Met Trp Gln Ile Ile Gly Arg Gly Val
 180 185 190

Met Asp Trp Phe Ala Gly Ala Ser Met Val Ser Trp Leu Asn Gln His

195	200	205
Val Val Gly His His Ile Tyr Thr Asn Val Ala Gly Ala Asp Pro Asp 210 215 220		
Leu Pro Val Asp Phe Glu Ser Asp Val Arg Arg Ile Val His Arg Gln 225 230 235 240		
Val Leu Leu Pro Ile Tyr Lys Phe Gln His Ile Tyr Leu Pro Pro Leu 245 250 255		
Tyr Gly Val Leu Gly Leu Lys Phe Arg Ile Gln Asp Val Phe Glu Thr 260 265 270		
Phe Val Ser Leu Thr Asn Gly Pro Val Arg Val Asn Pro His Pro Val 275 280 285		
Ser Asp Trp Val Gln Met Ile Phe Ala Lys Ala Phe Trp Thr Phe Tyr 290 295 300		
Arg Ile Tyr Ile Pro Leu Val Trp Leu Lys Ile Thr Pro Ser Thr Phe 305 310 315 320		
Trp Gly Val Phe Phe Leu Ala Glu Phe Thr Thr Gly Trp Tyr Leu Ala 325 330 335		
Phe Asn Phe Gln Val Ser His Val Ser Thr Glu Cys Glu Tyr Pro Cys 340 345 350		
Gly Asp Ala Pro Ser Ala Glu Val Gly Asp Glu Trp Ala Ile Ser Gln 355 360 365		
Val Lys Ser Ser Val Asp Tyr Ala His Gly Ser Pro Leu Ala Ala Phe 370 375 380		
Leu Cys Gly Ala Leu Asn Tyr Gln Val Thr His His Leu Tyr Pro Gly 385 390 395 400		
Ile Ser Gln Tyr His Tyr Pro Ala Ile Ala Pro Ile Ile Ile Asp Val 405 410 415		
Cys Lys Lys Tyr Asn Ile Lys Tyr Thr Val Leu Pro Thr Phe Thr Glu 420 425 430		
Ala Leu Leu Ala His Phe Lys His Leu Lys Asn Met Gly Glu Leu Gly 435 440 445		

Lys Pro Val Glu Ile His Met Gly
450 455

<210> 13
<211> 477
<212> БЕЛОК
<213> Phytophthora megasperma (№ доступа в GenBank CAD53323)

<220>
<221> РАЗНЫЙ ПРИЗНАК
<223> дельта-5-десатураза

<400> 13

Met Ala Pro Ile Glu Thr Val Lys Asp Ala Asn Glu Gly Leu His Gln
1 5 10 15

Arg Lys Gly Ala Ala Ala Ala Ser Lys Asp Thr Thr Thr Phe Thr Trp
20 25 30

Gln Asp Val Ala Lys His Asn Thr Ala Lys Ser Ala Trp Val Thr Ile
35 40 45

Arg Gly Val Val Tyr Asp Val Thr Glu Trp Ala Asp Arg His Pro Gly
50 55 60

Gly Arg Glu Leu Val Leu Leu His Ser Gly Arg Glu Cys Thr Asp Thr
65 70 75 80

Phe Asp Ser Tyr His Pro Phe Ser Asp Arg Ala Asp Lys Ile Leu Ala
85 90 95

Lys Tyr Ala Ile Gly Lys Leu Val Gly Gly Ser Glu Phe Pro Thr Tyr
100 105 110

Lys Pro Asp Thr Gly Phe Tyr Lys Glu Cys Cys Asp Arg Val Asn Gln
115 120 125

Tyr Phe Lys Asp Asn Lys Leu Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Ser Gly Leu
130 135 140

Trp Arg Met Ile Leu Val Ala Ile Val Gly Ala Val Ala Tyr Met Gly
145 150 155 160

Met Asn Gln Leu Leu Pro Gly Asn Ile Tyr Ala His Tyr Ala Trp Gly
165 170 175

Ala Leu Phe Gly Val Cys Gln Ala Leu Pro Leu Leu His Val Met His
 180 185 190

Asp Ala Ser His Ala Ala Ile Thr Ser Ser Pro Thr Gly Trp Arg Leu
 195 200 205

Ile Gly Arg Leu Ala Met Asp Trp Val Ala Gly Ala Asn Met Val Ser
 210 215 220

Trp Leu Asn Gln His Val Val Gly His His Ile Tyr Thr Asn Val Ala
 225 230 235 240

Gly Ala Asp Pro Asp Leu Pro Val Asp Phe Lys Ser Asp Val Arg Arg
 245 250 255

Ile Val Tyr Arg Gln Val Leu Leu Pro Ile Tyr Lys Tyr Gln His Leu
 260 265 270

Tyr Leu Pro Pro Leu Tyr Gly Val Leu Gly Leu Lys Phe Arg Val Gln
 275 280 285

Asp Val Phe Glu Thr Phe Val Thr Leu Thr Asn Gly Pro Leu Arg Val
 290 295 300

Asn Pro Leu Ser Val Gly Asp Trp Ala Glu Met Ile Leu Ser Lys Ala
 305 310 315 320

Phe Trp Val Phe Tyr Arg Ile Tyr Leu Pro Leu Ala Val Leu Gln Val
 325 330 335

Asp Pro Ala Arg Phe Trp Gly Val Phe Phe Leu Ala Glu Phe Ser Thr
 340 345 350

Gly Trp Tyr Leu Ala Phe Asn Phe Gln Val Ser His Val Ser Thr Ala
 355 360 365

Cys Glu Tyr Pro Gly Gly Asp Glu Glu Val Thr Ser Ile Asp Asp Glu
 370 375 380

Trp Ala Ile Ser Gln Val Lys Ser Ser Val Asp Tyr Gly His Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Ile Thr Thr Phe Leu Thr Gly Ala Leu Asn Tyr Gln Val Thr His
 405 410 415

His Leu Phe Pro Gly Val Ser Gln Tyr His Tyr Pro Ala Ile Ala Pro
 420 425 430

Leu Ile Leu Asp Val Cys His Lys Tyr Lys Val Lys Tyr Asn Val Leu
 435 440 445

Pro Asp Phe Thr Ala Ala Met Ala Gly His Phe Asp His Leu Val Ile
 450 455 460

Met Gly Lys Met Gly Lys Arg Val Thr Ile His Met Gly
 465 470 475

<210> 14

<211> 469

<212> БЕЛОК

<213> *Phaeodactylum tricornutum* (№ доступна в GenBank No. AAL92562)

<220>

<221> РАЗНЫЙ ПРИЗНАК

<223> дельта-5-десатураза

<400> 14

Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val
 1 5 10 15

Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser
 20 25 30

Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr
 35 40 45

Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe
 50 55 60

Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His
 65 70 75 80

Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp
 85 90 95

Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu
 115 120 125

Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu

130	135	140
Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala 145 150 155 160		
Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala 165 170 175		
Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly 180 185 190		
Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln 195 200 205		
His Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp 210 215 220		
Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp 225 230 235 240		
His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met 245 250 255		
Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile 260 265 270		
Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp 275 280 285		
Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala 290 295 300		
Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly 305 310 315 320		
Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val 325 330 335		
Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe 340 345 350		
Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu 355 360 365		
Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly 370 375 380		

Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu
 385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala
 405 410 415

Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr
 420 425 430

Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His
 435 440 445

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro
 450 455 460

Leu Thr Gly Arg Ala
 465

<210> 15
 <211> 467
 <212> БЕЛОК
 <213> Dictyostelium discoideum (№ доступа в GenBank XP_640331)

<220>
 <221> РАЗНЫЙ ПРИЗНАК
 <223> дельта-5-десатураза

<400> 15

Met Met Glu Thr Asn Asn Glu Asn Lys Glu Lys Leu Lys Leu Tyr Thr
 1 5 10 15

Trp Asp Glu Val Ser Lys His Asn Gln Lys Asn Asp Leu Trp Ile Ile
 20 25 30

Val Asp Gly Lys Val Tyr Asn Ile Thr Lys Trp Val Pro Leu His Pro
 35 40 45

Gly Gly Glu Asp Ile Leu Leu Leu Ser Ala Gly Arg Asp Ala Thr Asn
 50 55 60

Leu Phe Glu Ser Tyr His Pro Met Thr Asp Lys His Tyr Ser Leu Ile
 65 70 75 80

Lys Gln Tyr Glu Ile Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Glu His Pro Lys Tyr
 85 90 95

Val Glu Lys Ser Glu Phe Tyr Ser Thr Leu Lys Gln Arg Val Arg Lys
 100 105 110

His Phe Gln Thr Ser Ser Gln Asp Pro Lys Val Ser Val Gly Val Phe
 115 120 125

Thr Arg Met Val Leu Ile Tyr Leu Phe Leu Phe Val Thr Tyr Tyr Leu
 130 135 140

Ser Gln Phe Ser Thr Asp Arg Phe Trp Leu Asn Cys Ile Phe Ala Val
 145 150 155 160

Leu Tyr Gly Val Ala Asn Ser Leu Phe Gly Leu His Thr Met His Asp
 165 170 175

Ala Cys His Thr Ala Ile Thr His Asn Pro Met Thr Trp Lys Ile Leu
 180 185 190

Gly Ala Thr Phe Asp Leu Phe Ala Gly Ala Ser Phe Tyr Ala Trp Cys
 195 200 205

His Gln His Val Ile Gly His His Leu Tyr Thr Asn Val Arg Asn Ala
 210 215 220

Asp Pro Asp Leu Gly Gln Gly Glu Ile Asp Phe Arg Val Val Thr Pro
 225 230 235 240

Tyr Gln Ala Arg Ser Trp Tyr His Lys Tyr Gln His Ile Tyr Ala Pro
 245 250 255

Ile Leu Tyr Gly Val Tyr Ala Leu Lys Tyr Arg Ile Gln Asp His Glu
 260 265 270

Ile Phe Thr Lys Lys Ser Asn Gly Ala Ile Arg Tyr Ser Pro Ile Ser
 275 280 285

Thr Ile Asp Thr Ala Ile Phe Ile Leu Gly Lys Leu Val Phe Ile Ile
 290 295 300

Ser Arg Phe Ile Leu Pro Leu Ile Tyr Asn His Ser Phe Ser His Leu
 305 310 315 320

Ile Cys Phe Phe Leu Ile Ser Glu Leu Val Leu Gly Trp Tyr Leu Ala
 325 330 335

Ile Ser Phe Gln Val Ser His Val Val Glu Asp Leu Gln Phe Met Ala
 340 345 350

Thr Pro Glu Ile Phe Asp Gly Ala Asp His Pro Leu Pro Thr Thr Phe
 355 360 365

Asn Gln Asp Trp Ala Ile Leu Gln Val Lys Thr Thr Gln Asp Tyr Ala
 370 375 380

Gln Asp Ser Val Leu Ser Thr Phe Phe Ser Gly Gly Leu Asn Leu Gln
 385 390 395 400

Val Ile His His Cys Phe Pro Thr Ile Ala Gln Asp Tyr Tyr Pro Gln
 405 410 415

Ile Val Pro Ile Leu Lys Glu Val Cys Lys Glu Tyr Asn Val Thr Tyr
 420 425 430

His Tyr Lys Pro Thr Phe Thr Glu Ala Ile Lys Ser His Ile Asn Tyr
 435 440 445

Leu Tyr Lys Met Gly Asn Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Pro Val Asn
 450 455 460

Lys Asn Asp
 465

<210> 16
 <211> 421
 <212> БЕЛОК
 <213> *Euglena gracilis*

<220>
 <221> РАЗНЫЙ ПРИЗНАК
 <223> дельта-8-десатураза

<300>
 <302> Дельта-8-десатураза и ее применение для получения
 полиненасыщенных жирных кислот
 <310> WO2006012325
 <311> 2005-06-24
 <312> 2006-02-02
 <313> (1) .. (421)

<300>
 <302> Дельта-8-десатураза и ее применение для получения
 полиненасыщенных жирных кислот
 <310> WO2006012326
 <311> 2005-06-24
 <312> 2006-02-02
 <313> (1) .. (421)

<400> 16

Met Lys Ser Lys Arg Gln Ala Leu Pro Leu Thr Ile Asp Gly Thr Thr
 1 5 10 15

Tyr Asp Val Ser Ala Trp Val Asn Phe His Pro Gly Gly Ala Glu Ile
 20 25 30

Ile Glu Asn Tyr Gln Gly Arg Asp Ala Thr Asp Ala Phe Met Val Met
 35 40 45

His Ser Gln Glu Ala Phe Asp Lys Leu Lys Arg Met Pro Lys Ile Asn
 50 55 60

Pro Ser Ser Glu Leu Pro Pro Gln Ala Ala Val Asn Glu Ala Gln Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Arg Lys Leu Arg Glu Glu Leu Ile Ala Thr Gly Met Phe Asp
 85 90 95

Ala Ser Pro Leu Trp Tyr Ser Tyr Lys Ile Ser Thr Thr Leu Gly Leu
 100 105 110

Gly Val Leu Gly Tyr Phe Leu Met Val Gln Tyr Gln Met Tyr Phe Ile
 115 120 125

Gly Ala Val Leu Leu Gly Met His Tyr Gln Gln Met Gly Trp Leu Ser
 130 135 140

His Asp Ile Cys His His Gln Thr Phe Lys Asn Arg Asn Trp Asn Asn
 145 150 155 160

Leu Val Gly Leu Val Phe Gly Asn Gly Leu Gln Gly Phe Ser Val Thr
 165 170 175

Trp Trp Lys Asp Arg His Asn Ala His His Ser Ala Thr Asn Val Gln
 180 185 190

Gly His Asp Pro Asp Ile Asp Asn Leu Pro Leu Leu Ala Trp Ser Glu
 195 200 205

Asp Asp Val Thr Arg Ala Ser Pro Ile Ser Arg Lys Leu Ile Gln Phe
 210 215 220

Gln Gln Tyr Tyr Phe Leu Val Ile Cys Ile Leu Leu Arg Phe Ile Trp
 225 230 235 240

Cys Phe Gln Ser Val Leu Thr Val Arg Ser Leu Lys Asp Arg Asp Asn
245 250 255

Gln Phe Tyr Arg Ser Gln Tyr Lys Lys Glu Ala Ile Gly Leu Ala Leu
260 265 270

His Trp Thr Leu Lys Thr Leu Phe His Leu Phe Phe Met Pro Ser Ile
275 280 285

Leu Thr Ser Leu Leu Val Phe Phe Val Ser Glu Leu Val Gly Gly Phe
290 295 300

Gly Ile Ala Ile Val Val Phe Met Asn His Tyr Pro Leu Glu Lys Ile
305 310 315 320

Gly Asp Ser Val Trp Asp Gly His Gly Phe Ser Val Gly Gln Ile His
325 330 335

Glu Thr Met Asn Ile Arg Arg Gly Ile Ile Thr Asp Trp Phe Phe Gly
340 345 350

Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu Pro Arg
355 360 365

His Asn Leu Thr Ala Val Ser Tyr Gln Val Glu Gln Leu Cys Gln Lys
370 375 380

His Asn Leu Pro Tyr Arg Asn Pro Leu Pro His Glu Gly Leu Val Ile
385 390 395 400

Leu Leu Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln Pro
405 410 415

Ala Gly Lys Ala Leu
420

<210> 17
<211> 1269
<212> ДНК
<213> Pavlova lutheri

<220>
<221> разный признак
<223> дельта-8-десатураза

<400> 17

```

atgggcaagg gtggagacgg cggcgcgag gcggtgagcg ggaccgacgc gtctctcgct      60
gaggtgagct ccgtcgatag caagagcgtg cagctcgtgc tctacggcaa gcgcgtggat      120
gtcacaaagt tccagaaggc acacccgggc gggagcaagg tgttccgcat cttccaggag      180
cgcgacgcga cggagcagtt cgagtcttac cactcgccca aggccatcaa gatgatggag      240
ggcatgctca agaagtcgga ggatgcgccc gcttcctgct ccctgccctc gcggtccacc      300
atgggcacgg agttcaagga gatgattgag cgccacaaga gggctgggtct ctacgaccct      360
tgcccggttg acgagctggt caagctcacc atcgtccttg cgccatctt cgtgggcgcc      420
tatctcgtgc ggagcggcgt ctgcgccctc gggggcgcg cctccatggg ctttggcttc      480
tacctcgacg gctggcttgc tcacgactac ctgcatcacg cagtcttcaa gggctcggtc      540
aacacgctcg tcaaggcgaa caacgccatg ggatacgccc tcggcttcct ccagggctac      600
gacgtggcct ggtggcgcg gcgccataac acgcaccacg tgtgcaccaa cgaggatggt      660
tcggaccccg acatcaagac ggcgcccctg ctcatctacg tgcgagagaa cccgtccatt      720
gccaagcggc tcaacttctt ccagcgtggt cagcagtact actatgtgcc gaccatggcc      780
atcctcgacc tctactggcg cctggagtcc atcgcgtacg tggctgtgcg cctgcctaag      840
atgtggatgc aggcgcgcgc tcttgccgct cactacgcgc tcctgtgctg ggtcttcgca      900
gcgcatctca acctcatccc tctcatgatg gttgcacgcg gcttcgcgac gggcatcggt      960
gtctttgcaa cccactatgg tgaggacatc ctgcaccgcg agcacgtcga gggcatgacg     1020
ctcgtcgagc agaccgcaa gacctcccg aacatcacgg gcggctggct agtgaacgtg     1080
ctcacgggct tcatctccct gcagaccgag catcacctct tccccatgat gccaccggc     1140
aacctaata ga ctatccagcc cgaggtagcg gacttcttca agaagcatgg cctcgagtac     1200
cgcgagggga acctcttcca gtgcgtgcac cagaacatca aggctctcgc cttcgagcac     1260
ctcctccac

```

<210> 18

<211> 423

<212> БЕЛОК

<213> Pavlova lutheri

<400> 18

```

Met Gly Lys Gly Gly Asp Gly Gly Ala Gln Ala Val Ser Gly Thr Asp
1           5           10          15

```

```

Ala Ser Leu Ala Glu Val Ser Ser Val Asp Ser Lys Ser Val His Val
          20          25          30

```

```

Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe Gln Lys Ala His

```

35					40					45					
Pro	Gly	Gly	Ser	Lys	Val	Phe	Arg	Ile	Phe	Gln	Glu	Arg	Asp	Ala	Thr
50						55					60				
Glu	Gln	Phe	Glu	Ser	Tyr	His	Ser	Pro	Lys	Ala	Ile	Lys	Met	Met	Glu
65					70					75					80
Gly	Met	Leu	Lys	Lys	Ser	Glu	Asp	Ala	Pro	Ala	Ser	Val	Pro	Leu	Pro
				85					90					95	
Ser	Arg	Ser	Thr	Met	Gly	Thr	Glu	Phe	Lys	Glu	Met	Ile	Glu	Arg	His
			100					105					110		
Lys	Arg	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Pro	Cys	Pro	Leu	Asp	Glu	Leu	Phe	Lys
		115					120					125			
Leu	Thr	Ile	Val	Leu	Ala	Pro	Ile	Phe	Val	Gly	Ala	Tyr	Leu	Val	Arg
	130					135					140				
Ser	Gly	Val	Ser	Pro	Leu	Ala	Gly	Ala	Leu	Ser	Met	Gly	Phe	Gly	Phe
145					150					155					160
Tyr	Leu	Asp	Gly	Trp	Leu	Ala	His	Asp	Tyr	Leu	His	His	Ala	Val	Phe
				165					170					175	
Lys	Gly	Ser	Val	Asn	Thr	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Asn	Ala	Met	Gly	Tyr
			180					185					190		
Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Gly	Tyr	Asp	Val	Ala	Trp	Trp	Arg	Ala	Arg
		195					200					205			
His	Asn	Thr	His	His	Val	Cys	Thr	Asn	Glu	Asp	Gly	Ser	Asp	Pro	Asp
	210					215					220				
Ile	Lys	Thr	Ala	Pro	Leu	Leu	Ile	Tyr	Val	Arg	Glu	Asn	Pro	Ser	Ile
225					230					235					240
Ala	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Phe	Gln	Arg	Trp	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Tyr	Val
				245					250					255	
Pro	Thr	Met	Ala	Ile	Leu	Asp	Leu	Tyr	Trp	Arg	Leu	Glu	Ser	Ile	Ala
			260					265					270		
Tyr	Val	Ala	Val	Arg	Leu	Pro	Lys	Met	Trp	Met	Gln	Ala	Ala	Ala	Leu
		275					280					285			

Ala Ala His Tyr Ala Leu Leu Cys Trp Val Phe Ala Ala His Leu Asn
290 295 300

Leu Ile Pro Leu Met Met Val Ala Arg Gly Phe Ala Thr Gly Ile Val
305 310 315 320

Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu Asp Ile Leu Asp Arg Glu His Val
325 330 335

Glu Gly Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Lys Thr Ser Arg Asn Ile
340 345 350

Thr Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly Phe Ile Ser Leu Gln
355 360 365

Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr Gly Asn Leu Met Thr
370 375 380

Ile Gln Pro Glu Val Arg Asp Phe Phe Lys Lys His Gly Leu Glu Tyr
385 390 395 400

Arg Glu Gly Asn Leu Phe Gln Cys Val His Gln Asn Ile Lys Ala Leu
405 410 415

Ala Phe Glu His Leu Leu His
420

<210> 19
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Консервативный район #1 в пределах дельта-5- и дельта-8-десатураз

<220>
<221> РАЗНЫЙ ПРИЗНАК
<222> (4)..(4)
<223> X = Ile или Val

<400> 19

Gly His His Xaa Tyr Thr Asn
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консервативный район #2 в пределах дельта-5- и дельта-8-десатураз

<220>

<221> РАЗНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (2)..(2)

<223> X = Y или F

<220>

<221> РАЗНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (4)..(4)

<223> X = Val или Ile

<400> 20

Asn Xaa Gln Xaa Glu His His

1 5

<210> 21

<211> 476

<212> БЕЛЮК

<213> *Thalassiosira pseudonana* (№ доступа в GenBank AAX14502)

<220>

<221> РАЗНЫЙ ПРИЗНАК

<223> дельта-8-десатураза

<400> 21

Met Pro Pro Asn Ala Asp Ile Ser Arg Ile Arg Asn Arg Ile Pro Thr

1 5 10 15

Lys Thr Gly Thr Val Ala Ser Ala Asp Asn Asn Asp Pro Ala Thr Gln

20 25 30

Ser Val Arg Thr Leu Lys Ser Leu Lys Gly Asn Glu Val Val Ile Asn

35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Asp Ile Ala Asp Phe Val His Pro Gly Gly Glu Val

50 55 60

Val Lys Phe Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr Ile Gln Tyr Asn Met Ile

65 70 75 80

His Pro Tyr His Thr Gly Lys His Leu Glu Lys Met Lys Ala Val Gly

85 90 95

Lys Val Val Asp Trp Gln Ser Asp Tyr Lys Phe Asp Thr Pro Phe Glu

100 105 110

Arg Glu Ile Lys Ser Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Arg Glu
 115 120 125

Phe Gly Thr Thr Gly Tyr Phe Leu Arg Ala Phe Phe Tyr Ile Ala Leu
 130 135 140

Phe Phe Thr Met Gln Tyr Thr Phe Ala Thr Cys Thr Thr Phe Thr Thr
 145 150 155 160

Tyr Asp His Trp Tyr Gln Ser Gly Val Phe Ile Ala Ile Val Phe Gly
 165 170 175

Ile Ser Gln Ala Phe Ile Gly Leu Asn Val Gln His Asp Ala Asn His
 180 185 190

Gly Ala Ala Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Leu Leu Gly Phe Gly
 195 200 205

Thr Asp Leu Ile Gly Ser Asn Lys Trp Asn Trp Met Ala Gln His Trp
 210 215 220

Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ser Glu Lys Asp Pro Asp Ser Phe
 225 230 235 240

Ser Ser Glu Pro Met Phe Ala Phe Asn Asp Tyr Pro Ile Gly His Pro
 245 250 255

Lys Arg Lys Trp Trp His Arg Phe Gln Gly Gly Tyr Phe Leu Phe Met
 260 265 270

Leu Gly Leu Tyr Trp Leu Pro Thr Val Phe Asn Pro Gln Phe Ile Asp
 275 280 285

Leu Arg Gln Arg Gly Ala Gln Tyr Val Gly Ile Gln Met Glu Asn Asp
 290 295 300

Phe Ile Val Lys Arg Arg Lys Tyr Ala Val Ala Leu Arg Met Met Tyr
 305 310 315 320

Ile Tyr Leu Asn Ile Val Ser Pro Phe Met Asn Asn Gly Leu Ser Trp
 325 330 335

Ser Thr Phe Gly Ile Ile Met Leu Met Gly Ile Ser Glu Ser Leu Thr
 340 345 350

Leu Ser Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe Ile Asn Ser Asp Arg
 355 360 365

Asp Pro Thr Ala Asp Phe Lys Lys Thr Gly Glu Gln Val Cys Trp Phe
 370 375 380

Lys Ser Gln Val Glu Thr Ser Ser Thr Tyr Gly Gly Phe Ile Ser Gly
 385 390 395 400

Cys Leu Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His His Leu Phe Pro
 405 410 415

Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro Thr Val Arg Glu
 420 425 430

Val Cys Lys Lys His Gly Met Ser Tyr Ala Tyr Tyr Pro Trp Ile Gly
 435 440 445

Gln Asn Leu Val Ser Thr Phe Lys Tyr Met His Arg Ala Gly Ser Gly
 450 455 460

Ala Asn Trp Glu Leu Lys Pro Leu Ser Gly Ser Ala
 465 470 475

<210> 22
 <211> 8165
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220> /
 <223> Плазмида pZUF17
 \

<400> 22
 gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca 60
 ttaattgcgt tgcgctcact gcccgccttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat 120
 taatgaatcg gccaacgcgc ggggagagggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc 180
 tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcggt cggctgcggc gagcgggtatc agctcactca 240
 aaggcggtaa tacggttata cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 300
 aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg 360
 ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg 420
 acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt 480
 ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt 540
 tctcatagct cagcgtgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 600

tgtgtgcacg aaccccccg	tcagcccgac cgctgcgcct	tatccggtaa ctatcgtctt	660
gagtccaacc cggtaagaca	cgacttatcg ccactggcag	cagccactgg taacaggatt	720
agcagagcga ggtatgtagg	cggtgctaca gagttcttga	agtgggtggc taactacggc	780
tacactagaa ggacagtatt	tggtatctgc gctctgctga	agccagttac cttcggaaaa	840
agagttggta gctcttgatc	cggcaaacaa accaccgctg	gtagcgggtg tttttttggt	900
tgcaagcagc agattacgcg	cagaaaaaaa ggatctcaag	aagatccttt gatcttttct	960
acgggggtctg acgctcagtg	gaacgaaaac tcacgttaag	ggatttttgg catgagatta	1020
tcaaaaagga tcttcaccta	gaccttttta aattaaaaat	gaagttttaa atcaatctaa	1080
agtatatatg agtaaacttg	gtctgacagt taccaatgct	taatcagtga ggcacctatc	1140
tcagcgatct gtctatttctg	ttcatccata gttgcctgac	tccccgtcgt gtagataact	1200
acgatacggg agggcttacc	atctggcccc agtgctgcaa	tgataccgcg agaccacgc	1260
tcaccggctc cagattttatc	agcaataaac cagccagccg	gaagggccga gcgcagaagt	1320
ggtcctgcaa ctttatccgc	ctccatccag tctattaatt	gttgccggga agctagagta	1380
agtagttcgc cagttaatag	tttgcgcaac gttgttgcca	ttgctacagg catcgtggtg	1440
tcacgctcgt cgtttgggtat	ggcttcattc agctccgggt	cccaacgac aaggcgagtt	1500
acatgatccc ccatgttggtg	caaaaaagcg gttagctcct	tcggtcctcc gatcgttgctc	1560
agaagtaagt tggccgcagt	gttatcactc atgggttatgg	cagcactgca taattctctt	1620
actgtcatgc catccgtaag	atgcttttct gtgactgggtg	agtactcaac caagtcattc	1680
tgagaatagt gtatgcggcg	accgagttgc tcttgcccgg	cgtcaatacg ggataatacc	1740
gcgccacata gcagaacttt	aaaagtgtc atcattggaa	aacgttcttc ggggcgaaaa	1800
ctctcaagga tcttaccgct	gttgagatcc agttcgatgt	aaccactcg tgcaccaac	1860
tgatcttcag catcttttac	tttcaccagc gtttctgggt	gagcaaaaac aggaaggcaa	1920
aatgccgcaa aaaagggaat	aaggcgaca cggaaatgtt	gaatactcat actcttcctt	1980
tttcaatatt attgaagcat	ttatcagggt tattgtctca	tgagcggata catatttgaa	2040
tgtattttaga aaaataaaca	aataggggtt ccgcgcacat	ttccccgaaa agtgccacct	2100
gacgcgccct gtagcggcgc	attaagcgcg gcgggtgtgg	tggttacgcg cagcgtgacc	2160
gctacacttg ccagcgccct	agcgcgcgct cctttcgctt	tcttcccttc ctttctcgcc	2220
acgttcgccc gctttccccg	tcaagctcta aatcgggggc	tccctttagg gttccgattt	2280
agtgctttac ggcacctcga	ccccaaaaaa cttgattagg	gtgatggttc acgtagtggg	2340
ccatcgccct gatagacggt	ttttcgccct ttgacgttgg	agtcacggt ctttaatagt	2400
ggactcttgt tccaaactgg	aacaacactc aaccctatct	cgggtctattc ttttgattta	2460

taagggattt	tgccgatttc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaattt	2520
aacgcgaatt	ttaacaaaat	attaacgctt	acaattttcca	ttcgccattc	aggctgcgca	2580
actgttgga	agggcgatcg	gtgcgggcct	cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaagggg	2640
gatgtgctgc	aaggcgatta	agttgggtaa	cgccagggtt	ttcccagtca	cgacgttgta	2700
aaacgcggc	cagtgaattg	taatacgact	cactataggg	cgaattgggt	accgggcccc	2760
ccctcgaggt	cgatggtgtc	gataagcttg	atatcgaatt	catgtcacac	aaaccgatct	2820
tcgcctcaag	gaaaccta	tctacatccg	agagactgcc	gagatccagt	ctacactgat	2880
taattttcgg	gccaataatt	taaaaaaatc	gtgttatata	atattatatg	tatttatatat	2940
atacatcatg	atgatactga	cagtcatgtc	ccattgctaa	atagacagac	tccatctgcc	3000
gcctccaact	gatgtttctca	atatttaagg	ggatcatctcg	cattgtttta	taataaacag	3060
actccatcta	ccgcctccaa	atgatgttct	caaaatatat	tgtatgaact	tatttttatt	3120
acttagtatt	attagacaac	ttacttgctt	tatgaaaaac	acttcctatt	taggaaacaa	3180
tttataatgg	cagttcgttc	atttaacaat	ttatgtagaa	taaatgttat	aatgcgtat	3240
gggaaatcct	aatatggat	agcataaatg	atatctgcat	tgcctaattc	gaaatcaaca	3300
gcaacgaaaa	aatcccttg	tacaacataa	atagtcatcg	agaaatatca	actatcaaag	3360
aacagctatt	cacacgttac	tattgagatt	attattggac	gagaatcaca	cactcaactg	3420
tctttctctc	ttctagaaat	acaggtacaa	gtatgtacta	ttctcattgt	tcatacttct	3480
agtcatttca	tcccacatat	tccttggatt	tctctccaat	gaatgacatt	ctatcttgca	3540
aattcaacaa	ttataataag	atataccaaa	gtagcgggat	agtggcaatc	aaaaagcttc	3600
tctggtgtgc	ttctcgat	tatttttatt	ctaatgatcc	attaaaggta	tatatttatt	3660
tcttggtata	taatcctttt	gtttattaca	tgggctggat	acataaagg	attttgattt	3720
aattttttgc	ttaaattcaa	tccccctcg	ttcagtgtca	actgtaatgg	taggaaatta	3780
ccatactttt	gaagaagcaa	aaaaaatgaa	agaaaaaaaa	aatcgtattt	ccagggtaga	3840
cgttccgcag	aatctagaat	gcggtatgcg	gtacattggt	cttcgaacgt	aaaagttgcg	3900
ctccctgaga	tattgtacat	ttttgctttt	acaagtacaa	gtacatcgta	caactatgta	3960
ctactgttga	tgcacccaca	acagtttggt	ttgttttttt	ttgttttttt	tttttcta	4020
gattcattac	cgctatgtat	acctaactgt	actttagtag	agccgggtta	ttggcggttca	4080
attaatcata	gacttatgaa	tctgcacggg	gtgcgctgcg	agttactttt	agcttatgca	4140
tgctacttgg	gtgtaata	gggatctggt	cggaaatcaa	cggatgctca	atcgatttcg	4200
acagtaatta	attaagtc	acacaagtca	gctttcttcg	agcctcatat	aagtataagt	4260

agttcaacgt attagcactg taccagcat ctccgtatcg agaaacacaa caacatgccc 4320
 cattggacag atcatgcgga tacacagggt gtgcagtatc atacatactc gatcagacag 4380
 gtcgtctgac catcatacaa gctgaacaag cgctccatac ttgcacgctc tctatataca 4440
 cagttaaatt acatatccat agtctaacct ctaacagtta atcttctggt aagcctccca 4500
 gccagccttc tggatcgct tggcctcctc aataggatct cggttctggc cgtacagacc 4560
 tcggccgaca attatgatat ccgttccggt agacatgaca tcctcaacag ttcggtactg 4620
 ctgtccgaga gcgtctccct tgtcgtcaag acccaccctg ggggtcagaa taagccagtc 4680
 ctgagagtcg cccttaggtc ggttctgggc aatgaagcca accacaaact cggggtcggg 4740
 tcgggcaagc tcaatggtct gcttgagta ctgccagtg gccagagagc ccttgcaaga 4800
 cagctcggcc agcatgagca gacctctggc cagcttctcg ttgggagagg ggactaggaa 4860
 ctcttctgac tgggagttct cgtagtcaga gacgtcctcc ttcttctgtt cagagacagt 4920
 ttctcggca ccagctcgca ggccagcaat gattccggtt ccgggtacac cgtgggcgtt 4980
 ggtgatatcg gaccactcgg cgattcgggtg acaccgggtac tggtgcttga cagtgttgcc 5040
 aatatctgcy aactttctgt cctcgaacag gaagaaaccg tgcttaagag caagttcctt 5100
 gagggggagc acagtgccgg cgtaggtgaa gtcgtcaatg atgtcgatat gggttttgat 5160
 catgcacaca taaggccga ccttatcggc aagctcaatg agctccttgg tggtggtaac 5220
 atccagagaa gcacacaggt tggttttctt ggctgccacg agcttgagca ctgagcggc 5280
 aaaggcggac ttgtggacgt tagctcgagc ttcgtaggag ggcattttgg tgggaagag 5340
 gagactgaaa taaatttagt ctgcagaact ttttatcggg accttatctg gggcagtga 5400
 gtatatgtta tggtaatagt tacgagttag ttgaacttat agatagactg gactatacgg 5460
 ctatcgggtc aaattagaaa gaacgtcaat ggctctctgg gcgtcgcctt tgccgacaaa 5520
 aatgtgatca tgatgaaagc cagcaatgac gttgcagctg atattgttgt cggccaaccg 5580
 cgccgaaaac gcagctgtca gaccacagc ctccaacgaa gaatgtatcg tcaaagtgat 5640
 ccaagcacac tcatagttgg agtcgtactc caaaggcggc aatgacgagt cagacagata 5700
 ctgctcgact caggcgacga cggaattcct gcagcccatc tgcagaattc aggagagacc 5760
 gggttggcgg cgtatttgtg tccccaaaaa cagcccaaat tgccccggag aagacggcca 5820
 ggccgcctag atgacaaatt caacaactca cagctgactt tctgccattg cactagggg 5880
 ggggcctttt tatatggcca agccaagctc tccacgtcgg ttgggctgca cccaacaata 5940
 aatgggtagg gttgcaccaa caaagggatg ggatgggggg tagaagatac gaggataacg 6000
 gggctcaatg gcacaaataa gaacgaatac tgccattaag actcgtgatc cagcgactga 6060
 caccattgca tcatctaagg gcctcaaaac tacctcgga ctgctgcgct gatctggaca 6120

ccacagaggt	tccgagcact	ttaggttgca	ccaaatgtcc	caccaggtgc	aggcagaaaa	6180
cgctggaaca	gcgtgtacag	tttgtcttaa	caaaaagtga	gggcgctgag	gtcgagcagg	6240
gtggtgtgac	ttgttatagc	cttttagagct	gcgaaagcgc	gtatggattt	ggctcatcag	6300
gccagattga	gggtctgtgg	acacatgtca	tgttagtgta	cttcaatcgc	cccctggata	6360
tagccccgac	aataggccgt	ggcctcattt	ttttgccttc	cgcacatttc	cattgctcgg	6420
taccacacac	ttgctttctc	tgcacttgcc	aaccttaata	ctggtttaca	ttgaccaaca	6480
tcttacaagc	ggggggcttg	tctaggggat	atataaacag	tggctctccc	aatcggttgc	6540
cagtctcttt	tttccctttc	ttccccacag	attcgaaatc	taaactacac	atcacacaat	6600
gcctgttact	gacgtcctta	agcgaaagtc	cggtgtcatc	gtcggcgacg	atgtccgagc	6660
cgtgagtatc	cacgacaaga	tcagtgtcga	gacgacgcgt	tttgtgtaat	gacacaatcc	6720
gaaagtcgct	agcaacacac	actctctaca	caaactaacc	cagctctcca	tggctgagga	6780
taagaccaag	gtcgagttcc	ctaccctgac	tgagctgaag	cactctatcc	ctaacgcttg	6840
ctttgagtcc	aacctcggac	tctcgtctca	ctacactgcc	cgagcgatct	tcaacgcac	6900
tgcctctgct	gctctgctct	acgctgcccc	atctactccc	ttcattgccg	ataacgttct	6960
gtccacgct	ctggtttgcg	ccacctacat	ctacgtgcag	gggtgtcatct	tctggggttt	7020
ctttaccgtc	ggtcacgact	gtggtcactc	tgccttctcc	cgataccact	ccgtcaactt	7080
catcattggc	tgcacatgc	actctgccat	tctgactccc	ttcgagtcct	ggcgagtgc	7140
ccaccgacac	catcacaaga	acactggcaa	cattgataag	gacgagatct	tctaccctca	7200
tcggtccgtc	aaggacctcc	aggacgtgcg	acaatgggtc	tacaccctcg	gaggtgcttg	7260
gtttgtctac	ctgaaggctc	gatatgctcc	tcgaaccatg	tcccactttg	accctggga	7320
ccctctctctg	cttcgacgag	cctccgctgt	catcgtgtcc	ctcggagtct	gggctgcctt	7380
cttcgctgcc	tacgcctacc	tcacatactc	gctcggcttt	gccgtcatgg	gcctctacta	7440
ctatgctcct	ctctttgtct	ttgcttcgtt	cctcgtcatt	actaccttct	tgcacacaa	7500
cgacgaagct	actccctggc	acggtgactc	ggagtggacc	tacgtcaagg	gcaacctgag	7560
ctccgtcgac	cgatcgtaag	gagctttcgt	ggacaacctg	tctcaccaca	ttggcaccca	7620
ccagggtccat	cacttggtcc	ctatcattcc	ccactacaag	ctcaacgaag	ccaccaagca	7680
ctttgctgcc	gcttaccctc	acctcgtgag	acgtaacgac	gagcccatca	ttactgcctt	7740
cttcaagacc	gctcacctct	ttgtcaacta	cggagctgtg	cccagactgc	ctcagatttt	7800
caccctcaaa	gagtctgccg	ctgcagccaa	ggccaagagc	gactaagcgg	ccgcaagtgt	7860
ggatggggaa	gtgagtgtcc	ggttctgtgt	gcacaattgg	caatccaaga	tggatggatt	7920

caacacaggg atatagcgag ctacgtggtg gtgcgaggat atagcaacgg atatttatgt	7980
ttgacacttg agaatgtacg atacaagcac tgtccaagta caatactaaa catactgtac	8040
atactcatac tcgtacccgg gcaacggttt cacttgagtg cagtggctag tgctcttact	8100
cgtacagtgt gcaatactgc gtatcatagt ctttgatgta tatcgtattc attcatgtta	8160
gttgc	8165

<210> 23

<211> 8438

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плазмида pDMW367

<400> 23

catggctctc agtcttacc acaaacagct gttagaacgc cctgatttgg ttgcgattga	60
tggcatcctc tacgaccttg aagggtctgc caaagttcat ccaggaggag atttgattct	120
cgcttctggt gcctctgatg cctccccctc cttttattca atgcatccat acgtcaaacc	180
ggagaattcc aaattgcttc aacagttcgt ccgagggaag catgaccgca cctcgaagga	240
cattgtctac acgtatgatt ctcccttcgc acaagacgtt aagcggacaa tgccgcaggt	300
gatgaaaggg aggaactggt acgcaacccc tggcttctgg ctgcgaccg ttgggatcat	360
cgccgtgacg gccttttgcg agtggcactg ggctaccacg gggatggtgc tgtggggcct	420
gttgactgga ttcatgcaca tgcagatcgg cttatccatc cagcatgatg cgtcccacgg	480
ggccatcagc aagaagcctt ggggtcaacgc cctcttcgcc tacggcattg acgtcatcgg	540
atcgccccgg tggatttggc tgcagtcgca catcatgcgg caccacacct acaccaacca	600
gcacggcctc gacctggatg cggagtcggc agagccgttc ctggtgttcc acaactaccc	660
cgccgcaaac accgcccga aagtggtcca ccgcttccaa gcttggtaca tgtaccttgt	720
gctgggggca tacggggtat cgctggtgta caaccgctc tacattttcc ggatgcagca	780
caatgacacc atcccagagt ctgtcacggc catgcgggaa aatggcttcc tgccgagcta	840
ccgcacactt gcattcgtga tgcgagcttt cttcatcttc cggaccgcat tcttgccctg	900
gtacctcact gggacctcat tgctgatcac cattcctctg gtgcccaccg caactggtgc	960
cttcttgacg ttcttcttca ttttggtcca caattttgat ggctccgaac ggatccccga	1020
caagaactgc aagggttaaga gatctgagaa ggacgttgag gctgacaaa ttgactggta	1080
tcgggagcag gtggagacgt cctccacata cggtggtccc atcgccatgt tcttactgg	1140
cgggtctcaat ttccagatcg agcaccacct ctttccccgg atgtcgtctt ggactaccc	1200
cttcgtccag caggcggtcc gggagtgttg cgaacgcat ggagtgcgat atgttttcta	1260

ccctaccatc	gtcggcaaca	tcattctccac	cctgaagtac	atgcataagg	tgggtgtcgt	1320
ccactgcgtg	aaggacgcac	aggattccta	agcggccgca	agtgtggatg	gggaagtgag	1380
tgcccggttc	tgtgtgcaca	attggcaatc	caagatggat	ggattcaaca	cagggatata	1440
gcgagctacg	tgggtgtgcg	aggatatagc	aacggatatt	tatgtttgac	acttgagaat	1500
gtacgataca	agcactgtcc	aagtacaata	ctaaacatac	tgtacatact	catactcgta	1560
cccgggcaac	ggtttcactt	gagtgcagtg	gctagtgtct	ttactcgta	agtgtgcaat	1620
actgcgtatc	atagtctttg	atgtatatcg	tattcattca	tgtagttgc	gtacgagccg	1680
gaagcataaa	gtgtaaagcc	tggggtgcct	aatgagtgag	ctaactcaca	ttaattgcgt	1740
tgcgctcact	gcccgccttc	cagtcgggaa	acctgtcgtg	ccagctgcat	taatgaatcg	1800
gccaacgcgc	ggggagaggc	ggtttgcgta	ttgggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	1860
actcgctgcg	ctcggtcggt	cggtgcggc	gagcgggtatc	agctcactca	aaggcggtaa	1920
tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	1980
aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	tttccatagg	ctccgcccc	2040
ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgtcaa	gtcagagggtg	gcgaaacccg	acaggactat	2100
aaagatacca	ggcgcttccc	cctggaagct	ccctcgtgcg	ctctcctggt	ccgaccctgc	2160
cgcttaccgg	atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	cgtggcgctt	tctcatagct	2220
cacgctgtag	gtatctcagt	tcggtgtagg	tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	2280
aacccccctg	tcagcccgac	cgctgcgcct	tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtccaacc	2340
cggtaaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	2400
ggatatgtagg	cggtgctaca	gagttcttga	agtgggtggc	taactacggc	tacactagaa	2460
ggacagtatt	tggatatctgc	gctctgctga	agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	2520
gctcttgatc	cggcaaaaca	accaccgctg	gtagcgggtg	tttttttggt	tgcaagcagc	2580
agattacgcg	cagaaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	gatcttttct	acggggtctg	2640
acgctcagtg	gaacgaaaac	tcacgttaag	ggattttggt	catgagatta	tcaaaaagga	2700
tcttcaccta	gatcctttta	aattaaaaat	gaagttttta	atcaatctaa	agtatatatg	2760
agtaaaacttg	gtctgacagt	taccaatgct	taatcagtga	ggcacctatc	tcagcgatct	2820
gtctatctcg	ttcatccata	gttgccctgac	tccccgctcg	gtagataact	acgatacggg	2880
agggcttacc	atctggcccc	agtgtgcaa	tgataccgcg	agaccacgc	tcaccggctc	2940
cagatttatc	agcaataaac	cagccagccg	gaagggccga	gcgcagaagt	ggctctgcaa	3000
ctttatccgc	ctccatccag	tctattaatt	gttgccggga	agctagagta	agtagttcgc	3060

cagttaatag	tttgcgcaac	gttggtgcc	ttgctacagg	catcgtggtg	tcacgctcgt	3120
cgtttggtat	ggcttcattc	agctccggtt	cccaacgata	aaggcgagtt	acatgatccc	3180
ccatgttggtg	caaaaaagcg	gttagctcct	tcggctcctcc	gatcgttggtc	agaagtaagt	3240
tggccgcagt	gttatcactc	atgggttatgg	cagcactgca	taattctctt	actgtcatgc	3300
catccgtaag	atgctttttct	gtgactgggtg	agtactcaac	caagtcattc	tgagaatagt	3360
gtatgcggcg	accgagttgc	tcttgcccgg	cgtcaatacg	ggataatacc	gcgccacata	3420
gcagaacttt	aaaagtgtc	atcattggaa	aacgttcttc	ggggcgaaaa	ctctcaagga	3480
tcttaccgct	gttgagatcc	agttcgatgt	aaccactcg	tgcacccaac	tgatcttcag	3540
catcttttac	tttcaccagc	gtttctgggt	gagcaaaaac	aggaaggcaa	aatgccgcaa	3600
aaaagggaat	aagggcgaca	cggaaatgtt	gaatactcat	actcttcctt	tttcaatatt	3660
attgaagcat	ttatcagggg	tattgtctca	tgagcggata	catatttgaa	tgtatttaga	3720
aaaataaaca	aataggggtt	ccgcgcacat	ttccccgaaa	agtgccacct	gacgcgccct	3780
gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	cagcgtgacc	gctacacttg	3840
ccagcgcct	agcgcgcgt	cctttcgctt	tcttcccttc	ctttctcgcc	acgttcgccc	3900
gctttccccg	tcaagctcta	aatcgggggc	tccctttagg	gttccgattt	agtgtcttac	3960
ggcacctcga	ccccaaaaa	cttgattagg	gtgatgggtc	acgtagtggg	ccatcgccct	4020
gatagacggt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacgtt	ctttaatagt	ggactcttgt	4080
tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cggctctattc	ttttgattta	taagggattt	4140
tgccgatttc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaattt	aacgcgaatt	4200
ttaacaaaaat	attaacgctt	acaatttcca	ttcgccattc	aggctgcgca	actgttggga	4260
agggcgatcg	gtgcgggcct	cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaagggg	gatgtgctgc	4320
aaggcgatta	agttgggtaa	cgccaggggt	ttcccagtca	cgacgttgta	aaacgacggc	4380
cagtgaattg	taatacgact	cactataggg	cgaattgggt	accgggcccc	ccctcgaggt	4440
cgatggtgtc	gataagcttg	atatcgaatt	catgtcacac	aaaccgatct	tcgcctcaag	4500
gaaaccta	tctacatccg	agagactgcc	gagatccagt	ctacactgat	taattttcgg	4560
gccaataatt	taaaaaaatc	gtgttatata	atattatatg	tattatata	atacatcatg	4620
atgatactga	cagtcatgtc	ccattgctaa	atagacagac	tccatctgcc	gcctccaact	4680
gatgttctca	atatttaagg	ggatcatctc	cattgtttta	taataaacag	actccatcta	4740
ccgcctccaa	atgatgttct	caaaatatat	tgtatgaact	tatttttatt	acttagtatt	4800
attagacaac	ttacttgctt	tatgaaaaac	acttcctatt	taggaaacaa	tttataatgg	4860
cagttcgttc	atttaacaat	ttatgtagaa	taaatgttat	aaatgcgtat	gggaaatctt	4920

aaatatggat agcataaatg atatctgcat tgcctaattc gaaatcaaca gcaacgaaaa	4980
aaatcccttg tacaacataa atagtcacg agaaatatca actatcaaag aacagctatt	5040
cacacgttac tattgagatt attattggac gagaatcaca cactcaactg tctttctctc	5100
ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta ttctcattgt tcatacttct agtcatttca	5160
tcccacatat tccttggatt tctctccaat gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa	5220
ttataataag atataccaaa gtagcggat agtggcaatc aaaaagcttc tctggtgtgc	5280
ttctcgtatt tattttttatt ctaatgatcc attaaaggta tatatttatt tcttgttata	5340
taatccctttt gtttattaca tgggctggat acataaagggt attttgattt aattttttgc	5400
ttaaattcaa tccccctcg ttcagtgtca actgtaatgg taggaaatta ccatactttt	5460
gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaaa aatcgtattt ccagggtaga cgtccgcag	5520
aatctagaat gcggtatgcg gtacattgtt cttcgaacgt aaaagttgcg ctccctgaga	5580
tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa gtacatcgta caactatgta ctactgttga	5640
tgcattccaca acagtttgtt ttgttttttt ttgttttttt tttttctaatt gattcattac	5700
cgctatgtat acctacttgt acttgtagta agccgggtta ttggcggttca attaatcata	5760
gacttatgaa tctgcacggg gtgcgctgcg agttactttt agcttatgca tgctacttgg	5820
gtgtaatat gggatctgtt cggaaatcaa cggatgctca atcgatttcg acagtaatta	5880
attaagtcatt acacaagtca gctttcttcg agcctcatat aagtataagt agttcaacgt	5940
attagcactg taccacagcat ctccgtatcg agaaacacaa caacatgccc cattggacag	6000
atcatgcgga tacacaggtt gtgcagtatc atacatactc gatcagacag gtcgtctgac	6060
catcatataca gctgaacaag cgctccatac ttgcacgctc tctatataca cagttaaatt	6120
acatatccat agtctaacct ctaacagtta atcttctggt aagcctccca gccagccttc	6180
tggtatcgct tggcctcctc aataggatct cggttctggc cgtacagacc tcggccgaca	6240
attatgatat ccgttccggt agacatgaca tcctcaacag ttcggtactg ctgtccgaga	6300
gcgtctccct tgctgtcaag acccaccctg ggggtcagaa taagccagtc ctcagagtcg	6360
cccttaggtc ggttctgggc aatgaagcca accacaaact cggggtcgga tcgggcaagc	6420
tcaatggtct gcttggagta ctgcagtg gccagagagc ccttgcaaga cagctcggcc	6480
agcatgagca gacctctggc cagcttctcg ttgggagagg ggactaggaa ctcttgtac	6540
tgggagttct cgtagtcaga gacgtcctcc ttcttctgtt cagagacagt ttcctcggca	6600
ccagctcgca ggccagcaat gattccggtt ccgggtacac cgtgggcgtt ggtgatatcg	6660
gaccactcgg cgattcgggtg acaccggtac tgggtgcttga cagtgttgcc aatatctgcg	6720

aacttttctgt cctcgaacag gaagaaaccg tgcttaagag caagttcctt gagggggagc	6780
acagtgccgg cgtaggtgaa gtcgtcaatg atgtcgatat gggttttgat catgcacaca	6840
taaggtccga ctttatcggc aagctcaatg agctccttgg tggtaggtaac atccagagaa	6900
gcacacaggt tggttttctt ggctgccacg agcttgagca ctcgagcggc aaaggcggac	6960
ttgtggacgt tagctcgagc ttcgtaggag ggcatttttg tggtagaagag gagactgaaa	7020
taaatttagt ctgcagaact ttttatcggg accttatctg gggcagtga gatatgtta	7080
tggtaatagt tacgagttag ttgaacttat agatagactg gactatacgg ctatcgggcc	7140
aaattagaaa gaacgtcaat ggctctctgg gcgtcgctt tgccgacaaa aatgtgatca	7200
tgatgaaagc cagcaatgac gttgcagctg atattgttgt cggccaaccg cgccgaaaac	7260
gcagctgtca gacccacagc ctccaacgaa gaatgtatcg tcaaagtgat ccaagcacac	7320
tcatagttgg agtcgtactc caaaggcggc aatgacgagt cagacagata ctcgtcgact	7380
caggcgacga cggaattcct gcagcccatc tgcagaattc aggagagacc gggttggcgg	7440
cgtattttgtg tccccaaaaa cagccccaat tgccccggag aagacggcca ggccgcctag	7500
atgacaaatt caacaactca cagctgactt tctgccattg ccactagggg ggggcctttt	7560
tatatggcca agccaagctc tccacgtcgg ttgggctgca cccaacaata aatgggtagg	7620
gttgaccaa caaagggatg ggatgggggg tagaagatac gaggataacg gggctcaatg	7680
gcacaaataa gaacgaatac tgccattaag actcgtgatc cagcgactga caccattgca	7740
tcatctaagg gcctcaaaac tacctcggaa ctgctgcgct gatctggaca ccacagaggt	7800
tccgagcact ttaggttgca ccaaagtgc caccaggtgc aggcagaaaa cgctggaaca	7860
gcgtgtacag tttgtcttaa caaaaagtga gggcgctgag gtcgagcagg gtggtgtgac	7920
ttgttatagc ctttagagct gcgaaagcgc gtatggattt ggctcatcag gccagattga	7980
gggtctgtgg acacatgtca tgttagtgt cttcaatcgc cccttgata tagccccgac	8040
aataggccgt ggcctcattt ttttgccttc cgcacatttc cattgctcgg taccacacc	8100
ttgcttctcc tgcacttgcc aaccttaata ctggtttaca ttgaccaaca tcttacaagc	8160
ggggggcttg tctagggat atataaacag tggctctccc aatcggttgc cagtctcttt	8220
tttctttct tttccacag attcgaaatc taaactacac atcacacaat gcctgttact	8280
gacgtcctta agcgaaagtc cgggtgcatc gtcggcgacg atgtccgagc cgtgagtatc	8340
cacgacaaga tcagtgtcga gacgacgct tttgtgtaat gacacaatcc gaaagtcgct	8400
agcaacacac actctctaca caaactaacc cagctctc	8438

<210> 24

<211> 12649

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмида pKUNF12T6E

<220>
 <221> разный признак
 <222> (2507)..(2507)
 <223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
 <221> разный признак
 <222> (2512)..(2515)
 <223> n представляет собой а, с, г или т

<400> 24
 таaccctcac тaaagggaac aaaagctgga gctccaccgc ggacacaata tctgggtcaaa 60
 ttttcagttttc gttacataaa tcgttatgtc aaaggagtgt gggagggttaa gagaattatc 120
 accggcaaac tatctgttaa ttgctaggtta cctctagacg tccaccggg tcgcttggtg 180
 gccgaagagg ccggaatctc gggccgcggt ggcggccgct tagttggtct tggacttctt 240
 gggcttcttc aggtaggact ggacaaagaa gttgccgaac agagcgagca gggtagtcat 300
 gtacacgccg agcagctgga ccagagcctg agggtagtcg caggggaaga ggtagtcgta 360
 cagggactgc accagcatag ccatgaactg ggtcatctgc agagtgggtga tgtagggctt 420
 gatgggcttg acgaagccga agccctgaga ggaaaagaag tagtaggcgt acatgacggt 480
 gtggacgaag gagttgagga tgacggagaa gtaggcgtcg ccaccaggag cgtacttggc 540
 aatagcccac cagatggcga agatgggtggc atgggtgttac acgtgcagga aggagacctg 600
 gttgaacttc ttgcacagga tcatgatagc ggtgtccagg aactcgtagg ccttgagac 660
 gtagaacacg tagacgattc gggacatgcc ctgagcgtgg gactcgttgc ctttctccat 720
 gtcgttgccg aagaccttgt agccaccag gatagcctgt cggatggtct cgacgcacat 780
 gtagagggac agtccgaaga ggaacagggt gtggagcagc ttgatggtct tcagctcgaa 840
 gggcttctcc atctgcttca tgatgggaat gccgaagagc agcatggcca tgtagccgac 900
 ctcgaaggcg agcatggtgg agacgtccat catgggcaga ccgtcgggtca gagcgtaggg 960
 cttagctccg tccatccact ggtcgacacc ggtctcgact cgtccgacca cgtcgtccca 1020
 gacagaggag ttggccatgg tgaatgattc ttatactcag aaggaaatgc ttaacgattt 1080
 cgggtgtgag ttgacaagga gagagagaaa agaagaggaa aggtaattcg gggacggtgg 1140
 tcttttatac ccttggttaa agtcccaacc acaaagcaaa aaaattttca gtagtctatt 1200
 ttgcgtccgg catgggttac ccggatggcc agacaaagaa actagtacaa agtctgaaca 1260
 agcgtagatt ccagactgca gtaccctacg cccttaacgg caagtgtggg aaccggggga 1320

ggtttgatat	gtggggtgaa	gggggctctc	gccgggggttg	ggcccgtac	tgggtcaatt	1380
tggggtcaat	tggggcaatt	ggggctgttt	tttgggacac	aaatacgccg	ccaacccggt	1440
ctctcctgaa	ttctgcatcg	atcgaggaag	aggacaagcg	gctgcttctt	aagtttgtga	1500
catcagtatc	caaggcacca	ttgcaaggat	tcaaggcttt	gaacccgtca	tttgccattc	1560
gtaacgctgg	tagacagggt	gatcggttcc	ctacggcctc	cacctgtgtc	aatcttctca	1620
agctgcctga	ctatcaggac	attgatcaac	ttcggaagaa	acttttgtat	gccattcgat	1680
cacatgctgg	tttcgatttg	tcttagagga	acgcatatac	agtaatcata	gagaataaac	1740
gatattcatt	tattaaagta	gatagttgag	gtagaagttg	taaagagtga	taaatagcgg	1800
ccgcgcctac	ttaagcaacg	ggcttgataa	cagcgggggg	ggtgcccacg	ttgttgcggt	1860
tgcggaagaa	cagaacaccc	ttaccagcac	cctcggcacc	agcgtggggc	tcaaccact	1920
ggcacatacg	cgcactgcgg	tacatggcgc	ggatgaagcc	acgaggacca	tcctggacat	1980
cagcccggta	gtgcttgccc	atgatgggct	taatggcctc	ggtggcctcg	tccgcgttgt	2040
agaaggggat	gctgctgacg	tagtgggtga	ggacatgagt	ctcgatgatg	ccgtggagaa	2100
ggtggcgggc	gatgaagccc	atctcacggt	caatggtagc	agcggcacca	cggacgaagt	2160
tccactcgtc	gttgggtgtag	tggggaaggg	tagggtcggt	gtgctggagg	aaggtgatgg	2220
caacgagcca	gtggttaacc	cagaggtagg	gaacaaagta	ccagatggcc	atgttgtaga	2280
aaccgaactt	ctgaacgagg	aagtacagag	cagtggccat	cagaccgata	ccaatatcgc	2340
tgaggacgat	gagcttagcg	tcaactgttct	cgtacagagg	gctgcgggga	tcgaagtggg	2400
taacaccacc	gccgaggccg	ttatgcttgc	ccttgccgcg	accctcacgc	tggcgctcgt	2460
ggtagttgtg	gccggtaaca	ttggtgatga	ggtagttggg	ccagccnacg	annnnctcag	2520
taagatgagc	gagctcgtgg	gtcatctttc	cgagacgagt	agcctgctgc	tcgcgggttc	2580
ggggaacgaa	gaccatgtca	cgctccatgt	tgccagtggc	cttgtggtgc	tttcgggtggg	2640
agatttgcca	gctgaagtag	gggacaagga	gggaagagtg	aagaaccag	ccagtaatgt	2700
cgttgatgat	gcgagaatcg	gagaaagcac	cgtgaccgca	ctcatgggca	ataaccaga	2760
gaccagtacc	gaaaagaccc	tgaagaacgg	tgtacacggc	ccacagacca	gcgcggggcg	2820
gggtggaggg	gatataattcg	ggggtcacaa	agttgtacca	gatgctgaaa	gtggtagtca	2880
ggaggacaat	gtcgcggagg	atataaccgt	atcccttgag	agcggagcgc	ttgaagcagt	2940
gcttagggat	ggcattgtag	atgtccttga	tggtaaagtc	gggaacctcg	aactggttgc	3000
cgtaggtgtc	gagcatgaca	ccatactcgg	acttgggctt	ggcgatatca	acctcggaca	3060
tggacgagag	cgatgtggaa	gaggccgagt	ggcggggaga	gtctgaagga	gagacggcgg	3120

cagactcaga	atccgtcaca	gtagttgagg	tgacgggtgcg	tctaagcgca	gggttctgct	3180
tgggcagagc	cgaagtggac	gccatggaga	gctgggttag	tttgtgtaga	gagtgtgtgt	3240
tgctagcgac	tttcggattg	tgtcattaca	caaaacgcgt	cgtctcgaca	ctgatcttgt	3300
cgtggatact	cacggctcgg	acatcgtcgc	cgacgatgac	accggacttt	cgcttaagga	3360
cgtcagtaac	aggcattgtg	tgatgtgtag	tttagatttc	gaatctgtgg	ggaaagaaag	3420
gaaaaaagag	actggcaacc	gattgggaga	gccactgttt	atatataccc	tagacaagcc	3480
ccccgcttgt	aagatgttgg	tcaatgtaaa	ccagtattaa	ggttggaag	tgcaggagaa	3540
gcaaggtgtg	ggtaccgagc	aatggaaatg	tgcggaaggc	aaaaaaatga	ggccacggcc	3600
tattgtcggg	gctatatcca	gggggcgatt	gaagtacact	aacatgacat	gtgtccacag	3660
accctcaatc	tggcctgatg	agccaaatcc	atacgcgctt	tgcagctct	aaaggctata	3720
acaagtcaca	ccaccctgct	cgacctcagc	gccctcactt	tttgtaaga	caaactgtac	3780
acgctgttcc	agcgttttct	gcctgcacct	ggtgggacat	ttggtgcaac	ctaaagtgtc	3840
cggaacctct	gtggtgtcca	gatcagcgca	gcagttccga	ggtagttttg	aggcccttag	3900
atgatgcaat	ggtgtcagtc	gctggatcac	gagtcctaat	ggcagtattc	gttcttattt	3960
gtgccattga	gccccgttat	cctcgtatct	tctaccccc	atcccatccc	tttgttggtg	4020
caaccctacc	catttattgt	tgggtgcagc	ccaaccgacg	tggagagctt	ggcttggcca	4080
tataaaaagg	ccccccccta	gtggcaatgg	cagaaagtca	gctgtgagtt	gttgaatttg	4140
tcatctaggc	ggcctggccg	tcttctccgg	ggcaattggt	cctctatagt	actgcgtaca	4200
ctgttttaaac	agtgtacgca	gatctgcgac	gacggaattc	ctgcagccca	tctgcagaat	4260
tcaggagaga	ccgggttggc	ggcgtatttg	tgtcccaaaa	aacagcccca	attgccccaa	4320
ttgaccccaa	attgaccag	tagcgggccc	aaccccgccg	agagccccct	tcacccca	4380
tatcaaacct	cccccggttc	ccacacttgc	cgtaaagggc	gtaggggtact	gcagtctgga	4440
atctacgctt	gttcagactt	tgtactagtt	tctttgtctg	gccatccggg	taacccatgc	4500
cggacgcaaa	atagactact	gaaaattttt	ttgctttgtg	gttgggactt	tagccaaggg	4560
tataaaagac	caccgtcccc	gaattacctt	tctcttctct	ttctctctct	ccttgtcaac	4620
tcacaccga	aatcgtaag	catttccttc	tgagtataag	aatcattcac	catggctgcc	4680
gctccctctg	tgcgaaacctt	taccgagcc	gaggttctga	acgctgaggc	tctgaacgag	4740
ggcaagaagg	acgctgaggc	tcccttctctg	atgatcatcg	acaacaaggt	gtacgacgtc	4800
cgagagtctg	tccctgacca	tcctggaggc	tccgtgattc	tcacccacgt	tggcaaggac	4860
ggcaccgacg	tctttgacac	ctttcatccc	gaggtgctt	gggagactct	cgccaacttc	4920
tacgttggag	acattgacga	gtccgaccga	gacatcaaga	acgatgactt	tgccgctgag	4980

gtccgaaagc	tgcgaaacct	gttccagtct	ctcggctact	acgactcctc	taaggcctac	5040
tacgccttca	aggtctcctt	caacctctgc	atctggggac	tgtccaccgt	cattgtggcc	5100
aagtggggtc	agacctccac	cctcgccaac	gtgctctctg	ctgccctgct	cggcctgttc	5160
tggcagcagt	gcggatggct	ggctcacgac	tttctgcacc	accaggtctt	ccaggaccga	5220
ttctggggtg	atctcttcgg	agccttctctg	ggaggtgtct	gccagggctt	ctcctcttcc	5280
tgggtggaag	acaagcacia	cactcaccat	gccgctccca	acgtgcatgg	cgaggatcct	5340
gacattgaca	cccacctctt	cctgacctgg	tccgagcacg	ctctggagat	gttctccgac	5400
gtccccgatg	aggagctgac	ccgaatgtgg	tctcgattca	tggctctgaa	ccagacctgg	5460
ttctacttcc	ccattctctc	cttcgctcga	ctgtcttggg	gcctccagtc	cattctcttt	5520
gtgctgcca	acggtcaggc	tcacaagccc	tccggagctc	gagtgcccat	ctccctggtc	5580
gagcagctgt	ccctcgccat	gcactggacc	tggtagctcg	ctaccatgtt	cctgttcac	5640
aaggatcctg	tcaacatgct	cgtgtacttc	ctgggtgtctc	aggctgtgtg	cggaaacctg	5700
ctcgccatcg	tgttctccct	caaccacaac	ggtagtcctg	tgatctccaa	ggaggaggct	5760
gtcgacatgg	atttctttac	caagcagatc	atcactggctc	gagatgtcca	tcctggactg	5820
ttcgccaact	ggttcaccgg	tggcctgaac	taccagatcg	agcatcacct	gttcccttcc	5880
atgcctcgac	acaacttctc	caagatccag	cctgccgtcg	agacctgtg	caagaagtac	5940
aacgtccgat	accacaccac	tggtagatgc	gagggaactg	ccgaggtctt	ctcccgactg	6000
aacgaggtct	ccaaggccac	ctccaagatg	ggcaaggctc	agtaagcggc	cgcatgagaa	6060
gataaatata	taaatacatt	gagatattaa	atgcgctaga	ttagagagcc	tcatactgct	6120
cggagagaag	ccaagacgag	tactcaaagg	ggattacacc	atccatatcc	acagacacia	6180
gctggggaaa	ggttctatat	acactttccg	gaataccgta	gtttccgatg	ttatcaatgg	6240
gggcagccag	gatttcaggc	acttcgggtg	ctcgggggtga	aatggcgctc	ttggcctcca	6300
tcaagtcgta	ccatgtcttc	atttgctgtg	caaagtaaaa	cagaagcaga	tgaagaatga	6360
acttgaagtg	aaggaattta	aattgccccg	gagaagacgg	ccaggccgcc	tagatgacaa	6420
attcaacaac	tcacagctga	ctttctgcca	ttgccactag	gggggggcct	ttttatatgg	6480
ccaagccaag	ctctccacgt	cgggtgggct	gcaccaaca	ataaatgggt	agggttgac	6540
caacaaaggg	atgggatggg	gggtagaaga	tacgaggata	acggggctca	atggcacaaa	6600
taagaacgaa	tactgccatt	aagactcgtg	atccagcgac	tgacaccatt	gcacatcta	6660
agggcctcaa	aactacctcg	gaactgctgc	gctgatctgg	acaccacaga	ggttccgagc	6720
actttaggtt	gcaccaaatg	tcccaccagg	tgcaggcaga	aaacgctgga	acagcgtgta	6780

cagtttgtct taacaaaaag tgagggcgct gaggtcgagc aggggtggtgt gacttgttat	6840
agccttttaga gctgcgaaag cgcgtatgga tttggctcat caggccagat tgagggctctg	6900
tggacacatg tcatgttagt gtacttcaat cgccccctgg atatagcccc gacaataggc	6960
cgtggcctca tttttttgcc ttccgcacat ttccattgct cggtagccac accttgcttc	7020
tcctgcactt gccaacctta atactgggtt acattgacca acatcttaca agcggggggc	7080
ttgtctaggg tatatataaa cagtggctct cccaatcggg tgccagtctc ttttttcctt	7140
tctttcccca cagattcgaa atctaaacta cacatcacac aatgcctgtt actgacgtcc	7200
ttaagcgaaa gtccgggtgtc atcgtcggcg acgatgtccg agccgtgagt atccacgaca	7260
agatcagtgt cgagacgacg cgttttgtgt aatgacacaa tccgaaagtc gctagcaaca	7320
cacactctct acacaaacta acccagctct ccatggagtc cattgctccc ttcttgccct	7380
ccaagatgcc tcaggacctg ttcatggacc tcgccagcgc tatcgggtgtc cgagctgctc	7440
cctacgtcga tccccctggag gctgccctgg ttgcccaggc cgagaagtac attcccacca	7500
ttgtccatca cactcgaggc ttcttggttg ccgtggagtc tccccctggc cgagagctgc	7560
ctctgatgaa ccccttccac gtgctcctga tcgtgctcgc ctacctggtc accgtgtttg	7620
tgggtatgca gatcatgaag aactttgaac gattcgaggt caagaccttc tccctcctgc	7680
acaacttctg tctggtctcc atctccgct acatgtgcgg tggcatcctg tacgaggctt	7740
atcaggccaa ctatggactg tttgagaacg ctgccgatca caccttcaag ggtctcccta	7800
tggctaagat gatctggctc ttctacttct ccaagatcat ggagtttgtc gacaccatga	7860
tcatggtcct caagaagaac aaccgacaga tttcctttct gcacgtgtac caccactctt	7920
ccatcttcac catctggtgg ctggtcacct tcgttgctcc caacggtgaa gcctacttct	7980
ctgctgccct gaactccttc atccacgtca tcatgtacgg ctactacttt ctgtctgccc	8040
tgggcttcaa gcagggtgtc ttcataagtc tctacatcac tcgatcccag atgaccagtc	8100
tctgcatgat gtctgtccag tcttcctggg acatgtacgc catgaaggtc cttggccgac	8160
ctggataccc cttcttcate accgctctgc tctggttcta catgtggacc atgctcggtc	8220
tcttctacaa cttttaccga aagaacgcca agctcgccaa gcaggccaag gctgacgctg	8280
ccaaggagaa ggccagaaag ctccagtaag cggccgcaag tgtggatggg gaagtgagtg	8340
cccggttctg tgtgcacaaat tggcaatcca agatggatgg attcaacaca gggatatagc	8400
gagctacgtg gtggtgcgag gatatagcaa cggatattta tgtttgacac ttgagaatgt	8460
acgatacaag cactgtccaa gtacaatact aaacatactg tacatactca tactcgtacc	8520
cgggcaacgg tttcacttga gtgcagtggc tagtgctctt actcgtacag tgtgcaatac	8580
tgcgtatcat agtctttgat gtatatcgta ttcattcatg ttagttgcgt acgaagtcgt	8640

caatgatgtc gatatgggtt ttgatcatgc acacataagg tccgacctta tcggcaagct	8700
caatgagctc cttggtggtg gtaacatcca gagaagcaca caggttggtt ttcttggctg	8760
ccacgagctt gagcactcga gcggcaaagg cggacttggtg gacgttagct cgagcttcgt	8820
aggaggcat tttggtggtg aagaggagac tgaaataaat ttagtctgca gaacttttta	8880
tcggaacctt atctggggca gtgaagtata tgttatggta atagttacga gttagttgaa	8940
cttatagata gactggacta tacggctatc ggtccaaatt agaaagaacg tcaatggctc	9000
tctgggcgtc gcctttgccg acaaaaatgt gatcatgatg aaagccagca atgacgttgc	9060
agctgatatt gttgtcgcc aaccgcgccg aaaacgcagc tgtcagacc acagcctcca	9120
acgaagaatg tatcgtcaaa gtgatccaag cacactcata gttggagtcg tactccaaag	9180
gcggcaatga cgagtcagac agatactcgt cgaccttttc cttgggaacc accaccgtca	9240
gcccttctga ctacgtatt gtagccaccg acacaggcaa cagtccgtgg atagcagaat	9300
atgtcttgct ggtccatttc tcaccaactt taggcgtcaa gtgaatgttg cagaagaagt	9360
atgtgccttc attgagaatc ggtgttgctg atttcaataa agtcttgaga tcagtttggc	9420
gcgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg	9480
ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg	9540
atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa	9600
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc	9660
gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag	9720
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gtcctcctcgt	9780
gcgctctcct gttccgacct tgcgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg	9840
aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcggtcg	9900
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg cttatccgg	9960
taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac	10020
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggtg	10080
gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt	10140
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg	10200
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc	10260
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt	10320
ggcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt	10380
taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag	10440

tgaggcacct	atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcatcc	atagttgcct	gactccccgt	10500
cgtgtagata	actacgatac	gggagggcct	accatctggc	cccagtgcctg	caatgatacc	10560
gcgagaccca	cgctcaccgg	ctccagatth	atcagcaata	aaccagccag	ccggaagggc	10620
cgagcgcaga	agtggtcctg	caactttatc	cgctccatc	cagtctatta	attggtgccc	10680
ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgccg	aacgttggtg	ccattgctac	10740
aggcatcgtg	gtgtcacgct	cgctgtttgg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	10800
atcaaggcga	gttacatgat	cccccatggt	gtgcaaaaaa	gcgggttagct	ccttcgggtcc	10860
tccgatcggt	gtcagaagta	agttggccgc	agtgttatca	ctcatgggta	tggcagcact	10920
gcataattct	cttactgtca	tgccatccgt	aagatgcttt	tctgtgactg	gtgagtactc	10980
aaccaagtca	ttctgagaat	agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttgcc	cggcgtcaat	11040
acgggataat	accgcgccac	atagcagaac	tttaaaagtg	ctcatcattg	gaaaacgttc	11100
ttcggggcga	aaactctcaa	ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga	tgtaaccac	11160
tcgtgcaccc	aactgatctt	cagcatcttt	tactttcacc	agcgtttctg	ggtgagcaaa	11220
aacaggaagg	caaaatgccg	caaaaaaggg	aataagggcg	acacggaaat	gttgaatact	11280
catactcttc	ctttttcaat	attattgaag	catttatcag	ggttattgtc	tcagagcgcg	11340
atacatatth	gaatgtatth	agaaaaataa	acaaataggg	gttccgcgca	catttccccg	11400
aaaagtgcc	cctgatgcgg	tgtgaaatac	cgcacagatg	cgtaaggaga	aaataccgca	11460
tcaggaaatt	gtaagcggtta	atattttggt	aaaattcgcg	ttaaattttt	gttaaatacag	11520
ctcattttth	aaccaatagg	ccgaaatcgg	caaaatccct	tataaatcaa	aagaatagac	11580
cgagataggg	ttgagtgttg	ttccagtttg	gaacaagagt	ccactattaa	agaacgtgga	11640
ctccaacgtc	aaagggcgaa	aaaccgtcta	tcagggcgat	ggccactac	gtgaaccatc	11700
accctaata	agttttttgg	ggtcgaggtg	ccgtaaagca	ctaaatcgga	accctaaagg	11760
gagccccga	tttagagctt	gacggggaaa	gccggcgaa	gtggcgagaa	aggaagggaa	11820
gaaagcgaaa	ggagcggggc	ctagggcgct	ggcaagtgt	gcggtcacgc	tgcgcgtaac	11880
caccacaccc	gccgcgctta	atgcgcgcgt	acagggcgcg	tccattcgcc	attcaggctg	11940
cgcaactggt	gggaagggcg	atcggtgcgg	gcctcttcgc	tattacgcca	gctggcgaaa	12000
gggggatgtg	ctgcaaggcg	attaagttgg	gtaacgccag	ggttttccca	gtcacgacgt	12060
tgtaaaacga	cggccagtga	attgtaatac	gactcactat	agggcgaaat	gggcccagcg	12120
tcgcatgcag	tgggtgtatt	gtgactgggg	atgtagttga	gaataagtca	tacacaagtc	12180
agctttcttc	gagcctcata	taagtataag	tagttcaacg	tattagcact	gtaccagca	12240
tctccgtatc	gagaaacaca	acaacatgcc	ccattggaca	gatcatgcgg	atacacaggt	12300

tgtgcagtat catacatact cgatcagaca ggtcgtctga ccatcataca agctgaacaa 12360
 gcgctccata cttgcacgct ctctatatac acagttaaata tacatatcca tagtctaacc 12420
 tctaacagtt aatcttcttg taagcctccc agccagcctt ctggtatcgc ttggcctcct 12480
 caataggatc tcggttcttg ccgtacagac ctcgggccgac aattatgata tccgttccgg 12540
 tagacatgac atcctcaaca gttcggtact gctgtccgag agcgtctccc ttgtcgtcaa 12600
 gacccacccc gggggtcaga ataagccagt cctcagagtc gcccttaat 12649

<210> 25
 <211> 819
 <212> ДНК
 <213> *Thraustochytrium aureum*

<220>
 <221> разный признак
 <223> синтетическая элонгаза (оптимизированная в отношении кодонов для *Yarrowia lipolytica*)

<400> 25
 atggccaact cctctgtctg ggacgacgtg gtcggacgag tcgagaccgg tgtcgaccag 60
 tggatggacg gagctaagcc ctacgctctg accgacggtc tgcccatgat ggacgtctcc 120
 accatgctcg ccttcgaggt cggctacatg gccatgctgc tcttcggcat tcccatcatg 180
 aagcagatgg agaagccctt cgagctgaag accatcaagc tgctccacaa cctgttcctc 240
 ttcggactgt ccctctacat gtgcgtcgag accatccgac aggctatcct ggggtggctac 300
 aaggctcttcg gcaacgacat ggagaagggc aacgagtcct acgctcaggg catgtcccga 360
 atcgtctacg tgttctacgt ctccaaggcc tacgagttcc tggacaccgc tatcatgac 420
 ctgtgcaaga agttcaacca ggtctccttc ctgcacgtgt accaccatgc caccatcttc 480
 gccatctggt gggctattgc caagtacgct cctggtggcg acgcctactt ctccgtcatc 540
 ctcaactcct tcgtccacac cgtcatgtac gcctactact tcttttcctc tcagggcttc 600
 ggcttcgtca agcccatcaa gccctacatc accactctgc agatgacca gttcatgggt 660
 atgctgggtg agtccttgta cgactacctc tcccctgcg actaccctca ggctctgggtc 720
 cagctgctcg gcgtgtacat gatcaccctg ctgctctgt tcggcaactt ctttgtccag 780
 tcctacctga agaagcccaa gaagtccaag accaactaa 819

<210> 26
 <211> 272
 <212> БЕЛОК
 <213> *Thraustochytrium aureum*

<400> 26

Met Ala Asn Ser Ser Val Trp Asp Asp Val Val Gly Arg Val Glu Thr
1 5 10 15

Gly Val Asp Gln Trp Met Asp Gly Ala Lys Pro Tyr Ala Leu Thr Asp
20 25 30

Gly Leu Pro Met Met Asp Val Ser Thr Met Leu Ala Phe Glu Val Gly
35 40 45

Tyr Met Ala Met Leu Leu Phe Gly Ile Pro Ile Met Lys Gln Met Glu
50 55 60

Lys Pro Phe Glu Leu Lys Thr Ile Lys Leu Leu His Asn Leu Phe Leu
65 70 75 80

Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Val Glu Thr Ile Arg Gln Ala Ile
85 90 95

Leu Gly Gly Tyr Lys Val Phe Gly Asn Asp Met Glu Lys Gly Asn Glu
100 105 110

Ser His Ala Gln Gly Met Ser Arg Ile Val Tyr Val Phe Tyr Val Ser
115 120 125

Lys Ala Tyr Glu Phe Leu Asp Thr Ala Ile Met Ile Leu Cys Lys Lys
130 135 140

Phe Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ala Thr Ile Phe
145 150 155 160

Ala Ile Trp Trp Ala Ile Ala Lys Tyr Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
165 170 175

Phe Ser Val Ile Leu Asn Ser Phe Val His Thr Val Met Tyr Ala Tyr
180 185 190

Tyr Phe Phe Ser Ser Gln Gly Phe Gly Phe Val Lys Pro Ile Lys Pro
195 200 205

Tyr Ile Thr Thr Leu Gln Met Thr Gln Phe Met Ala Met Leu Val Gln
210 215 220

Ser Leu Tyr Asp Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Tyr Pro Gln Ala Leu Val
225 230 235 240

<220>
 <223> Праймер 5-5AR

 <400> 31
 tgrtgvacaa yytgrwartt 20

 <210> 32
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер 5-5BR

 <400> 32
 tgrtgvacata yytgrwartt 20

 <210> 33
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер 5-5CR

 <400> 33
 tgrtgvacca yytgrwartt 20

 <210> 34
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер 5-5DR

 <400> 34
 tgrtgvacga yytgrwartt 20

 <210> 35
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер ODMW480

 <400> 35
 ccgataccag tcaatttggt cagcctc 27

 <210> 36
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>

<223> CDSIII 5' Праймер

<400> 36

aagcagtggg atcaacgcag agt

23

<210> 37

<211> 28

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер ODMW479

<400> 37

cttaaccttg cagttcttgt cggggatc

28

<210> 38

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер DNR CDS 5'

<400> 38

саасгсагаг тggccattac gg

22

<210> 39

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер YL791

<400> 39

сacstcgcgc attgtccgct таасгтс

27

<210> 40

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер YL792

<400> 40

tgсgaaggga gaatcatacg tgtagac

27

<210> 41

<211> 26

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер ODMW469

<400> 41	
cttcatcttc cggaccgcat tcttgc	26
<210> 42	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер AUAP	
<400> 42	
ggccacgsgt cgaactagta	20
<210> 43	
<211> 28	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер ODMW470	
<400> 43	
cctcactggg acctcattgc tgatcacc	28
<210> 44	
<211> 32	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер YL794	
<400> 44	
tttccatggc tctcagtctt accacagaac ag	32
<210> 45	
<211> 27	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер YL797	
<400> 45	
gtacatgtac caagcttgga agcggtg	27
<210> 46	
<211> 27	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер YL796	

<400> 46		
caccgcttcc aagcttggtac catgtac		27
<210> 47		
<211> 39		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер YL795		
<400> 47		
tttgcgggccg ctttaggaatc ctgtgcgtcc ttcacgcag		39
<210> 48		
<211> 4070		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Плазмида pEgD5S		
<400> 48		
tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca		60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg		120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc		180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc		240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat		300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt		360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggg acctcgcgaa		420
tgcattctaga tccatggctc tctcccttac taccgagcag ctgctcgagc gacccgacct		480
ggttgccatc gacggcattc tctacgatct ggaaggctct gccaaaggctc atcccggagg		540
cgacttgatc ctcgcttctg gtgcctccga tgcttctctt ctgttctact ccatgcaccc		600
ttacgtcaag cccgagaact cgaagctgct tcaacagttc gtgcgaggca agcacgaccg		660
aacctccaag gacattgtct acacctacga ctctcccttt gcacaggacg tcaagcgaac		720
tatgcgagag gtcattgaaag gtcggaactg gtagtccaca cctggattct ggctgcgaac		780
cgttgccatc attgctgtca ccgccttttg cgagtggcac tgggctacta ccggaatggg		840
gctgtggggg ctcttgactg gattcatgca catgcagatc ggctgtcca ttcagcacga		900
tgctctcat ggtgccatca gcaaaaagcc ctgggtcaac gctctctttg cctacggcat		960
cgacgtcatt ggatcgcca gatggatctg gctgcagtct cacatcatgc gacatcacac		1020
ctacaccaat cagcatggtc tcgacctgga tgccgagtc gcagaacct tcttgtgtt		1080

ccacaactac	cctgctgcca	acactgctcg	aaagtggttt	caccgattcc	aggcctggta	1140
catgtacctc	gtgcttggag	cctacggcgt	ttcgctgggtg	tacaaccctc	tctacatctt	1200
ccgaatgcag	cacaacgaca	ccattcccga	gtctgtcaca	gccatgcgag	agaacggctt	1260
tctgcgacgg	taccgaaccc	ttgcattcgt	tatgcgagct	ttcttcatct	ttcgaaccgc	1320
cttcttgccc	tggtatctca	ctggaacctc	cctgctcatc	accattcctc	tggtgcccac	1380
tgctaccggt	gccttcctca	ccttcttttt	catcttgtct	cacaacttcg	atggctcgga	1440
gcgaatcccc	gacaagaact	gcaagggtcaa	gagctccgag	aaggacgttg	aagccgatca	1500
gatcgactgg	tacagagctc	aggtggagac	ctcttcacac	tacgggtggac	ccattgccat	1560
gttctttact	ggcgggtctca	acttcacagat	cgagcatcac	ctctttcctc	gaatgtcgtc	1620
ttggcactat	cccttcgtgc	agcaagctgt	ccgagagtgt	tgcaacgac	acggagtctg	1680
gtacgtcttc	taccctacca	ttgtgggcaa	catcatttcc	accctcaagt	acatgcacaa	1740
agtcgggtgtg	gttactgtg	tcaaggacgc	tcaggattcc	taagcggccg	catcggtacc	1800
cgggcccgtc	gactgcagag	gcctgcatgc	aagcttggcg	taatcatggt	catagctgtt	1860
tcctgtgtga	aattgttatc	cgctcacaat	tccacacaa	atacgagccg	gaagcataaa	1920
gtgtaaagcc	tgggggtgcct	aatgagtgtg	ctaactcaca	ttaattgctg	tgcgctcact	1980
gcccgtcttc	cagtcgggaa	acctgtcgtg	ccagctgcat	taatgaatcg	gccaacgcgc	2040
ggggagaggc	ggtttgcgta	ttgggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgctgcg	2100
ctcggtcggt	cggctgcggc	gagcgggtatc	agctcactca	aaggcggtaa	tacggttatc	2160
cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	2220
gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	2280
tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagaggtg	gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	2340
ggcgtttccc	cctggaagct	ccctcggtgcg	ctctcctggt	ccgaccctgc	cgcttaccgg	2400
atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	cgtggcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	2460
gtatctcagt	tcggtgtagg	tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	aacccccgt	2520
tcagcccagc	cgtgcgcct	tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtccaacc	cggtaagaca	2580
cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	ggtatgtagg	2640
cgggtgtaca	gagttcttga	agtgggtggc	taactacggc	tacactagaa	gaacagtatt	2700
tggtatctgc	gctctgctga	agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	2760
cggcaaaaaa	accaccgctg	gtagcgggtg	tttttttggt	tgcaagcagc	agattacgcg	2820
cagaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	gatcttttct	acggggtctg	acgctcagtg	2880
gaacgaaaac	tcacgttaag	ggatttttgg	catgagatta	tcaaaaagga	tcttcaccta	2940

```

gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg 3000
gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttctg 3060
ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc 3120
atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatac 3180
agcaataaac cagccagccg gaagggccga ggcgagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc 3240
ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag 3300
tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat 3360
ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg 3420
caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt 3480
gttatcactc atgggtatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag 3540
atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg 3600
accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt 3660
aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct 3720
gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac 3780
tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat 3840
aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat 3900
ttatcagggg tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca 3960
aatagggggt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat 4020
tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc 4070

```

<210> 49

<211> 8438

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плазмида pDMW369

<400> 49

```

ggccgcaagt gtggatgggg aagtgagtgc ccggttctgt gtgcacaatt ggcaatccaa 60
gatggatgga ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tggcgcgagg atatagcaac 120
ggatatattat gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta 180
aacatactgt acatactcat actcgtaccc gggcaacggg ttacttgag tgcagtggct 240
agtgctctta ctcgtagagt gtgcaatact gcgtatcata gtctttgatg tatatcgat 300
tcattcatgt tagttgcgta cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgccta 360

```

gagtga gcta	actcacatta	attgcgttgc	gtcactgcc	cgctttccag	tcgggaaacc	420
tgtcgtgcc	gctgcattaa	tgaatcggcc	aacgcgcggg	gagaggcgg	ttgcgtattg	480
ggcgctcttc	cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgcctc	ggtcgttcgg	ctgcggcgag	540
cggtatcagc	tcactcaaag	gcggtaatac	ggttatccac	agaatcaggg	gataacgcag	600
gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	660
tggcggtttt	ccataggctc	cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	720
agaggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	780
tcgtgcgcctc	tcctgttccg	accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	840
cgggaagcgt	ggcgctttct	catagctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggtcg	900
ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	cccccgttca	gcccgaaccgc	tgcgcccttat	960
ccggtaacta	tcgtcttgag	tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	1020
ccactggtaa	caggattagc	agagcgaggt	atgtaggcgg	tgctacagag	ttcttgaagt	1080
ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagga	cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	1140
cagttacctt	cggaaaaaga	gttggttagct	cttgatccgg	caaacaaacc	accgctggta	1200
gcgggtggttt	ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	tctcaagaag	1260
atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	ctcagtgga	cgaaaactca	cgtaagggga	1320
ttttggtcat	gagattatca	aaaaggatct	tcacctagat	ccttttaaat	taaaaatgaa	1380
gttttaaatc	aatctaaagt	atatatgagt	aaacttggtc	tgacagttac	caatgcttaa	1440
tcagtgaaggc	acctatctca	gcgatctgtc	tatttcgttc	atccatagtt	gcctgactcc	1500
ccgtcgtgta	gataactacg	atacgggagg	gcttaccatc	tggccccagt	gctgcaatga	1560
taccgcgaga	cccacgctca	ccggctccag	atztatcagc	aataaaccag	ccagccggaa	1620
gggccgagcg	cagaagtgg	cctgcaactt	tatccgcctc	catccagtct	attaattggt	1680
gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	ttaatagttt	gcgcaacggt	gttgccattg	1740
ctacaggcat	cgtggtgtca	cgctcgtcgt	ttggtatggc	ttcattcagc	tcgggttccc	1800
aacgatcaag	gcgagttaca	tgatccccc	tggtgtgcaa	aaaagcggtt	agctccttcg	1860
gtcctccgat	cgttgtcaga	agtaagttgg	ccgcagtggt	atcactcatg	gttatggcag	1920
cactgcataa	ttctcttact	gtcatgccat	ccgtaagatg	cttttctgtg	actggtgagt	1980
actcaaccaa	gtcattctga	gaatagtgt	tgccggcgacc	gagttgctct	tgcccggcgt	2040
caatacggga	taataccgcg	ccacatagca	gaactttaaa	agtgtcatc	attggaaaac	2100
gttcttcggg	gcgaaaactc	tcaaggatct	taccgctggt	gagatccagt	tcgatgtaac	2160
ccactcgtgc	acccaactga	tcttcagcat	cttttacttt	caccagcggt	tctgggtgag	2220

caaaaacagg	aaggcaaaat	gccgcaaaaa	agggaataag	ggcgacacgg	aaatgttgaa	2280
tactcatact	cttccttttt	caatattatt	gaagcattta	tcagggttat	tgtctcatga	2340
gcggatacat	at ttgaatgt	at tttagaaaa	ataaacaat	aggggttccg	cgcacatttc	2400
cccgaaaagt	gccacctgac	gcgccctgta	gcggcgcat	aagcgcgggc	ggtgtgggtg	2460
ttacgcgcag	cgtgaccgct	acacttgcca	gcgccctagc	gcccgcctct	ttcgctttct	2520
tcccttccct	tctcgccacg	ttcgccggct	ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	2580
ctttaggggt	ccgatttagt	gctttacggc	acctcgaccc	caaaaaactt	gattaggggtg	2640
atgggttcacg	tagtggggcca	tcgccctgat	agacggtttt	tcgccctttg	acgttgaggat	2700
ccacgttctt	taatagtga	ctcttggtcc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	2760
tctattcttt	tgatttataa	gggattttgc	cgatttcggc	ctattgggta	aaaaatgagc	2820
tgatttaaca	aaaatttaac	gcgaatttta	acaaaatatt	aacgcttaca	atttccattc	2880
gccattcagg	ctgcgcaact	gttggggaag	gcgatcggtg	cgggcctctt	cgctattacg	2940
ccagctggcg	aaagggggat	gtgctgcaag	gcgattaagt	tgggtaacgc	cagggttttc	3000
ccagtcacga	cggtgtaaaa	cgacggccag	tgaattgtaa	tacgactcac	tatagggcga	3060
attgggtacc	gggccccccc	tcgaggtcga	tggtgtcgat	aagcttgata	tcgaattcat	3120
gtcacacaaa	ccgatcttcg	cctcaaggaa	acctaattct	acatccgaga	gactgccgag	3180
atccagtcta	cactgattaa	ttttcggggc	aataatttaa	aaaaatcgtg	ttatataata	3240
ttatatgtat	tatatatata	catcatgatg	atactgacag	tcatgtccca	ttgctaaata	3300
gacagactcc	atctgccgcc	tccaactgat	gttctcaata	tttaaggggt	catctcgcat	3360
tgtttaataa	taaacagact	ccatctaccg	cctccaaatg	atgttctcaa	aatatattgt	3420
atgaacttat	ttttattact	tagtattatt	agacaactta	cttgctttat	gaaaaacact	3480
tcctat tttag	gaaacaattt	ataatggcag	ttcggttcatt	taacaattta	tgtagaataa	3540
atgttataaa	tgcgatatgg	aaatcttaaa	tatggatagc	ataaatgata	tctgcattgc	3600
ctaattcgaa	atcaacagca	acgaaaaaaaa	tcccttgtag	aacataaata	gtcatcgaga	3660
aatatcaact	atcaaagaac	agctattcac	acgttactat	tgagattatt	attggacgag	3720
aatcacacac	tcaactgtct	ttctctcttc	tagaaataca	ggtacaagta	tgtactattc	3780
tcattgttca	tacttctagt	catttcatcc	cacatattcc	ttggatttct	ctccaatgaa	3840
tgacattcta	tcttgcaa	tcaacaatta	taataagata	taccaaagta	gcggtatagt	3900
ggcaatcaaa	aagcttctct	ggtgtgcttc	tcgtatttat	ttttattcta	atgatccatt	3960
aaaggatat	at ttatttct	tgttatataa	tccttttggt	tattacatgg	gctggataca	4020

taaaggtatt	ttgatttaaat	tttttgetta	aattcaatcc	cccctcggtc	agtggtcaact	4080
gtaatggtag	gaaattacca	tacttttgaa	gaagcaaaaa	aaatgaaaga	aaaaaaaaaat	4140
cgtatttcca	ggttagacgt	tccgcagaat	ctagaatgcg	gtatgcggta	cattgttctt	4200
cgaacgtaaa	agttgcgctc	cctgagatat	tgtacatttt	tgctttttaca	agtacaagta	4260
catcgtaaaa	ctatgtacta	ctgttgatgc	atccacaaca	gtttgttttg	tttttttttg	4320
tttttttttt	ttctaattgat	tcattaccgc	tatgtatacc	tacttgtagt	tgtagtaagc	4380
cgggttattg	gcgttcaatt	aatcatagac	ttatgaatct	gcacggtgtg	cgctgcgagt	4440
tacttttagc	ttatgcatgc	tacttggtgtg	taatattggg	atctgttcgg	aaatcaacgg	4500
atgctcaatc	gatttcgaca	gtaattaatt	aagtcataca	caagtcagct	ttcttcgagc	4560
ctcatataag	tataagtagt	tcaacgtatt	agcactgtac	ccagcatctc	cgtatcgaga	4620
aacacaacaa	catgccccat	tggacagatc	atgcggatac	acaggttggtg	cagtatcata	4680
catactcgat	cagacaggtc	gtctgaccat	catacaagct	gaacaagcgc	tccatacttg	4740
cacgctctct	atatacacag	ttaaattaca	tatccatagt	ctaacctcta	acagttaatc	4800
ttctggtaag	cctcccagcc	agccttcttg	tatcgcttgg	cctcctcaat	aggatctcgg	4860
ttctggccgt	acagacctcg	gccgacaatt	atgatatccg	ttccggtaga	catgacatcc	4920
tcaacagttc	ggtactgctg	tccgagagcg	tctcccttgt	cgtcaagacc	caccccgggg	4980
gtcagaataa	gccagtcctc	agagtcgccc	ttaggtcggt	tctgggcaat	gaagccaacc	5040
acaaactcgg	ggtcggatcg	ggcaagctca	atgggtctgt	tggagtactc	gccagtggcc	5100
agagagccct	tgcaagacag	ctcgccagc	atgagcagac	ctctggccag	cttctcgttg	5160
ggagagggga	ctaggaactc	cttgtagctg	gagttctcgt	agtcagagac	gtcctccttc	5220
ttctgttcag	agacagtttc	ctcgccacca	gctcgcaggc	cagcaatgat	tccggttccg	5280
ggtacaccgt	ggcggttggt	gatatcggac	cactcggcga	ttcggtgaca	ccggtactgg	5340
tgcttgacag	tggtgccaat	atctgcgaac	tttctgtcct	cgaacaggaa	gaaaccgtgc	5400
ttaagagcaa	gttccttgag	ggggagcaca	gtgccggcgt	aggtgaagtc	gtcaatgatg	5460
tcgatatggg	ttttgatcat	gcacacataa	ggtccgacct	tatcggcaag	ctcaatgagc	5520
tccttggttg	tggtaacatc	cagagaagca	cacaggttgg	ttttcttggt	tgccacgagc	5580
ttgagcactc	gagcggcaaa	ggcggacttg	tggacgttag	ctcgagcttc	gtaggagggc	5640
atatttggtg	tgaagaggag	actgaaataa	atthagtctg	cagaactttt	tatcggaacc	5700
ttatctgggg	cagtgaagta	tatgttatgg	taatagttac	gagttagttg	aacttataga	5760
tagactggac	tatacggcta	tcggtccaaa	ttagaaagaa	cgtcaatggc	tctctgggcg	5820
tcgcctttgc	cgacaaaaat	gtgatcatga	tgaaagccag	caatgacgtt	gcagctgata	5880

ttgttgtcgg	ccaaccgcgc	cgaaaacgca	gctgtcagac	ccacagcctc	caacgaagaa	5940
tgtatcgtca	aagtgatcca	agcacactca	tagttggagt	cgtactccaa	aggcggcaat	6000
gacgagtcag	acagatactc	gtcgactcag	gcgacgacgg	aattcctgca	gccccatctgc	6060
agaattcagg	agagaccggg	ttggcgggcg	atttgtgtcc	caaaaaacag	cccccaattgc	6120
cccggagaag	acggccaggc	cgcctagatg	acaaattcaa	caactcacag	ctgactttct	6180
gccattgcc	ctaggggggg	gcctttttat	atggccaagc	caagctctcc	acgtcgggtg	6240
ggctgcaccc	aacaataaat	gggtaggggt	gcaccaacaa	agggatggga	tggggggtag	6300
aagatacgag	gataacgggg	ctcaatggca	caaataagaa	cgaatactgc	cattaagact	6360
cgtgatccag	cgactgacac	cattgcatca	tctaagggcc	tcaaaactac	ctcggaactg	6420
ctgcgctgat	ctggacacca	cagaggttcc	gagcacttta	ggttgacca	aatgtcccac	6480
caggtgcagg	cagaaaacgc	tggaacagcg	tgtacagttt	gtcttaacaa	aaagtgaggg	6540
cgctgaggtc	gagcaggggtg	gtgtgacttg	ttatagcctt	tagagctgcg	aaagcgcgta	6600
tggatttggc	tcatcaggcc	agattgaggg	tctgtggaca	catgtcatgt	tagtgtactt	6660
caatcgcccc	ctggatatag	ccccgacaat	aggccgtggc	ctcatttttt	tgccttccgc	6720
acatttccat	tgctcggtac	ccacaccttg	cttctcctgc	acttgccaac	cttaatactg	6780
gtttacattg	accaacatct	tacaagcggg	gggcttgtct	agggatatata	taaacagtgg	6840
ctctcccaat	cggttgccag	tctctttttt	cctttctttc	cccacagatt	cgaaatctaa	6900
actacacatc	acacaatgcc	tgttactgac	gtccttaagc	gaaagtccgg	tgtcatcgtc	6960
ggcgacgatg	tccgagccgt	gagtatccac	gacaagatca	gtgtcgagac	gacgcgtttt	7020
gtgtaatgac	acaatccgaa	agtcgctagc	aacacacact	ctctacacaa	actaaccag	7080
ctctccatgg	ctctctccct	tactaccgag	cagctgctcg	agcgaccgca	cctgggttgcc	7140
atcgacggca	ttctctacga	tctggaaggt	cttgccaagg	tccatcccgg	aggcgacttg	7200
atcctcgctt	ctggtgcctc	cgatgcttct	cctctgttct	actccatgca	cccttacgtc	7260
aagcccgaga	actcgaagct	gcttcaacag	ttcgtgcgag	gcaagcacga	ccgaacctcc	7320
aaggacattg	tctacaccta	cgactctccc	tttgacaggg	acgtcaagcg	aactatgcga	7380
gaggtcatga	aaggtcggaa	ctggatgcc	acacctggat	tctggctgcg	aaccgttggc	7440
atcattgctg	tcaccgcctt	ttgcgagtgg	cactgggcta	ctaccggaat	ggtgctgtgg	7500
ggtctcttga	ctggattcat	gcacatgcag	atcggcctgt	ccattcagca	cgatgcctct	7560
catggtgcc	tcagcaaaaa	gccctgggtc	aacgctctct	ttgcctacgg	catcgacgtc	7620
attggatcgt	ccagatggat	ctggctgcag	tctcacatca	tgcgacatca	cacctacacc	7680

```

aatcagcatg gtctcgacct ggatgccgag tccgcagaac cattccttgt gttccacaac 7740
taccctgctg ccaacactgc tcgaaagtgg tttcaccgat tccaggcctg gtacatgtac 7800
ctcgtgcttg gagcctacgg cgtttcgctg gtgtacaacc ctctctacat cttccgaatg 7860
cagcacaacg acaccattcc cgagtctgtc acagccatgc gagagaacgg ctttctgcga 7920
cggtagcgaa cccttgcatc cgttatgcga gctttcttca tctttcgaac cgccttcttg 7980
ccctggatc tcactggaac ctccctgtc atcaccattc ctctggtgcc cactgctacc 8040
ggtagccttc tcaccttctt tttcatcttg tctcacaact tcgatggctc ggagcgaatc 8100
cccgacaaga actgcaaggc caagagctcc gagaaggacg ttgaagccga tcagatcgac 8160
tggtacagag ctcagggtga gacctcttcc acctacgggtg gacctattgc catgttcttt 8220
actggcggtc tcaacttcca gatcgagcat cacctctttc ctggaatgtc gtcttggcac 8280
tatcccttcg tgcagcaagc tgtccgagag tggtgcgaac gacacggagt tcggtacgtc 8340
ttctacccta ccattgtggg caacatcatt tccacctca agtacatgca caaagtcggt 8400
gtggttcact gtgtcaagga cgctcaggat tcctaagc 8438

```

```

<210> 50
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Праймер Т7

```

```

<400> 50
ggaaacagct atgaccatg 19

```

```

<210> 51
<211> 459
<212> БЕЛОК
<213> Rhizopus stolonifer (№ доступа в GenBank AAX22052)

```

```

<400> 51

```

```

Met Ser Thr Leu Asp Arg Gln Ser Ile Phe Thr Ile Lys Glu Leu Glu
1          5          10          15

```

```

Ser Ile Ser Gln Arg Ile His Asp Gly Asp Glu Glu Ala Met Lys Phe
20          25          30

```

```

Ile Ile Ile Asp Lys Lys Val Tyr Asp Val Thr Glu Phe Ile Glu Asp
35          40          45

```

```

His Pro Gly Gly Ala Gln Val Leu Leu Thr His Val Gly Lys Asp Ala
50          55          60

```

Ser Asp Val Phe His Ala Met His Pro Glu Ser Ala Tyr Glu Val Leu
 65 70 75 80

Asn Asn Tyr Phe Val Gly Asp Val Gln Glu Thr Val Val Thr Glu Lys
 85 90 95

Ser Ser Ser Ala Gln Phe Ala Val Glu Met Arg Gln Leu Arg Asp Gln
 100 105 110

Leu Lys Lys Glu Gly Tyr Phe His Ser Ser Lys Leu Phe Tyr Ala Tyr
 115 120 125

Lys Val Leu Ser Thr Leu Ala Ile Cys Ile Ala Gly Leu Ser Leu Leu
 130 135 140

Tyr Ala Tyr Gly Arg Thr Ser Thr Leu Ala Val Val Ala Ser Ala Ile
 145 150 155 160

Thr Val Gly Ile Phe Trp Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe
 165 170 175

Gly His His Gln Cys Phe Glu Asp Arg Thr Trp Asn Asp Val Leu Val
 180 185 190

Val Phe Leu Gly Asn Phe Cys Gln Gly Phe Ser Leu Ser Trp Trp Lys
 195 200 205

Asn Lys His Asn Thr His His Ala Ser Thr Asn Val His Gly Gln Asp
 210 215 220

Pro Asp Ile Asp Thr Ala Pro Val Leu Leu Trp Asp Glu Tyr Ala Ser
 225 230 235 240

Ala Ala Tyr Tyr Ala Ser Leu Asp Gln Glu Pro Thr Met Val Ser Arg
 245 250 255

Phe Leu Ala Glu Gln Val Leu Pro His Gln Thr Arg Tyr Phe Phe Phe
 260 265 270

Ile Leu Ala Phe Ala Arg Leu Ser Trp Ala Leu Gln Ser Leu Ser Tyr
 275 280 285

Ser Phe Lys Lys Glu Ser Ile Asn Lys Ser Arg Gln Leu Asn Leu Phe
 290 295 300

Glu Arg Val Cys Ile Val Gly His Trp Ala Leu Phe Ala Phe Cys Ile
 305 310 315 320

Tyr Ser Trp Cys Ser Asn Val Tyr His Met Val Leu Phe Phe Leu Val
 325 330 335

Ser Gln Ala Thr Thr Gly Tyr Thr Leu Ala Leu Val Phe Ala Leu Asn
 340 345 350

His Asn Gly Met Pro Val Ile Thr Glu Glu Lys Ala Glu Ser Met Glu
 355 360 365

Phe Phe Glu Ile Gln Val Ile Thr Gly Arg Asp Val Thr Leu Ser Pro
 370 375 380

Leu Gly Asp Trp Phe Met Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His
 385 390 395 400

Val Phe Pro Asn Met Pro Arg His Asn Leu Pro Thr Val Lys Pro Met
 405 410 415

Val Lys Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Asp Ile Asn Tyr His Asp Thr Gly
 420 425 430

Phe Leu Lys Gly Thr Leu Glu Val Leu Gln Thr Leu Asp Ile Thr Ser
 435 440 445

Lys Leu Ser Leu Gln Leu Ser Lys Lys Ser Phe
 450 455

<210> 52
 <211> 695
 <212> ДНК
 <213> Pavlova lutheri

<400> 52
 agggccaagg gtgccaacca ccttccacgt gagactacac accgtaggcc gatgggcaag 60
 ggtggagacg gcggcgcgca ggcggtgagc gggaccgacg cgtctctcgc tgaggtgagc 120
 tccgtcgata gcaagagcgt gcacgtcgtg ctctacggca agcgcgtgga tgtcaciaag 180
 ttccagggct acgacgtggc ctggtggcgc gcgcgccata acacgcacca cgtgtgcacc 240
 aacgaggatg gttcggaccc ggacatcaag acggcgcccc tgctcatcta cgtgagagag 300
 aaccggtcca ttgccaagcg gctcaacttc ttccagcgct ggcagcagta ctactatgtg 360
 ccgaccatgg ccatcctcga cctctactgg cgcctggagt ccatcgcgta cgtggctgtg 420
 cgctgccta agatgtggat gcaggccgcc gctcttgccg ctactacgc gctcctgtgc 480

tgggtcttcg cagcgcatct caacctcatc cctctcatga tggttgcacg cggcttcgcg 540
 acgggcatcg ttgtctttgc aaccactat ggtgaggaca tcctcgaccg cgagcacgtc 600
 gagggcatga cgctcgtcga gcagaccgcc aagacctccc gtaacatcac gggcggctgg 660
 ctagtgaacg tgctcacggg cttcatctcc ctgca 695

<210> 53
 <211> 1106
 <212> ДНК
 <213> Pavlova lutheri

<400> 53
 agggccaagg gtgccaacca ccttccacgt gagactacac accgtaggcc gatgggcaag 60
 ggtggagacg gcggcgcgca ggcggtgagc gggaccgacg cgtctctcgc tgaggtgagc 120
 tccgtcgata gcaagagcgt gcacgtcgtg ctctacggca agcgcgtgga tgtcacaag 180
 ttccagggct acgacgtggc ctggtggcgc gcgcgccata acacgcacca cgtgtgcacc 240
 aacgaggatg gttcggaccc ggacatcaag acggcgcccc tgctcatcta cgtgcgagag 300
 aaccgtcca ttgccaagcg gctcaacttc ttccagcgtc ggcagcagta ctactatgtg 360
 ccgaccatgg ccatacctga cctctactgg cgcttgaggt ccatcgcgta cgtggctgtg 420
 cgctgccta agatgtggat gcaggccgcc gctcttgccg ctactacgc gctcctgtgc 480
 tgggtcttcg cagcgcatct caacctcatc cctctcatga tggttgcacg cggcttcgcg 540
 acgggcatcg ttgtctttgc aaccactat ggtgaggaca tcctcgaccg cgagcacgtc 600
 gagggcatga cgctcgtcga gcagaccgcc aagacctccc gtaacatcac gggcggctgg 660
 ctagtgaacg tgctcacggg cttcatctcc ctgcagaccg agcatcacct cttccccatg 720
 atgcccaccg gcaacctaat gactatccag cccgaggtag gcgacttctt caagaagcat 780
 ggcctcgagt accgcgaggg caacctcttc cagtgcgtgc accagaacat caaggctctc 840
 gccttcgagc acctcctcca ctgagcgtca ccaactaagc gtcctaagtg cacaggtact 900
 gtcttctgac cgatggccgc gcggctccct cggctggcag tggggccaac gagtggcctc 960
 gcgggatcgg gcacgatcgg gcctccatga aacttcagtg ttcagagaca agccgacaac 1020
 ctccgcatcg tgagaaatct tttaaagcag tatgttccat cacgccgctt ttgcagtcaa 1080
 taacattacc caaaaaaaaa aaaaaa 1106

<210> 54
 <211> 287
 <212> БЕЛОК
 <213> Pavlova lutheri

<400> 54

Arg Ala Lys Gly Ala Asn His Leu Pro Arg Glu Thr Thr His Arg Arg
 1 5 10 15
 Pro Met Gly Lys Gly Gly Asp Gly Gly Ala Gln Ala Val Ser Gly Thr
 20 25 30
 Asp Ala Ser Leu Ala Glu Val Ser Ser Val Asp Ser Lys Ser Val His
 35 40 45
 Val Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe Gln Gly Tyr
 50 55 60
 Asp Val Ala Trp Trp Arg Ala Arg His Asn Thr His His Val Cys Thr
 65 70 75 80
 Asn Glu Asp Gly Ser Asp Pro Asp Ile Lys Thr Ala Pro Leu Leu Ile
 85 90 95
 Tyr Val Arg Glu Asn Pro Ser Ile Ala Lys Arg Leu Asn Phe Phe Gln
 100 105 110
 Arg Trp Gln Gln Tyr Tyr Tyr Val Pro Thr Met Ala Ile Leu Asp Leu
 115 120 125
 Tyr Trp Arg Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Val Ala Val Arg Leu Pro Lys
 130 135 140
 Met Trp Met Gln Ala Ala Ala Leu Ala Ala His Tyr Ala Leu Leu Cys
 145 150 155 160
 Trp Val Phe Ala Ala His Leu Asn Leu Ile Pro Leu Met Met Val Ala
 165 170 175
 Arg Gly Phe Ala Thr Gly Ile Val Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu
 180 185 190
 Asp Ile Leu Asp Arg Glu His Val Glu Gly Met Thr Leu Val Glu Gln
 195 200 205
 Thr Ala Lys Thr Ser Arg Asn Ile Thr Gly Gly Trp Leu Val Asn Val
 210 215 220
 Leu Thr Gly Phe Ile Ser Leu Gln Thr Glu His His Leu Phe Pro Met
 225 230 235 240

Met Pro Thr Gly Asn Leu Met Thr Ile Gln Pro Glu Val Arg Asp Phe
245 250 255

Phe Lys Lys His Gly Leu Glu Tyr Arg Glu Gly Asn Leu Phe Gln Cys
260 265 270

Val His Gln Asn Ile Lys Ala Leu Ala Phe Glu His Leu Leu His
275 280 285

<210> 55
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер SeqE

<400> 55
cgacacactc caatctttcc 20

<210> 56
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер SeqW

<400> 56
ggtggctgga gttagacatc 20

<210> 57
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер AP1

<400> 57
gtaatacgcac tcactatagg gc 22

<210> 58
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер GSP PvDES

<400> 58
ctgcgaagac ccagcacagg 20

<210> 59

<211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер M13-28Rev

<400> 59
 gtaatacgcac tcactatagg gc 22

<210> 60
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер PavDes seq

<400> 60
 ttgtggcgct caatcatctc c 21

<210> 61
 <211> 1294
 <212> ДНК
 <213> Pavlova lutheri

<400> 61
 ctttgcgcagc gcggcgacaga cgattgcggc ccgtagtgat cgcgggtgcgc attgctgtgt 60
 ttctagtttt gctgacgccc ggcccgataa tgacaccttc tcccgtttga aataactaata 120
 agtaactata ttataatatt caaagggtggc gactatggat ctccttttct aaagttcagc 180
 ggaattggga atcggagaaa ttctgagata tgtcataatc acgtgctcta tctcgaatga 240
 accgcggccg gtgagcgatt actcgggaag ccaattccta ttaacgagtc aggggggagc 300
 tttgaggtga gtcggccacg cagagagagc aaggaatcat cctcatccgc cgttctcgag 360
 aaagagccaa ggggtgccaa caccctccac gtgagactac acaccgtagg ccgatgggca 420
 aggggtggaga cggcggcgcg caggcggcga gcgggaccga cgcattctctc gctgaggtga 480
 gctccgtcga tagcaagagc gtgcgcgtcg tgctctacgg caagcgcgtg gatgtcacia 540
 agttccagag ggcacacccg ggccggagca aggtgttccg catcttccag gagcgcgacg 600
 cgacggagca gttcgagtct taccactcgc ccaaggccat caagatgatg gagggcatgc 660
 tcaagaagtc ggaggatgcg cccgcttccg tgcccctgcc ctgcggtcc accatgggca 720
 cggagttcaa ggagatgatt gagcgccaca agagggctgg tctctacgac ccttgcccgt 780
 tggacgagct gttcaagctc accatcgctc ttgcgcccac cttcgtgggc gcctatctcg 840
 tgcggagcgg cgtctcgccc ctgcggggcg cgctctccat gggctttggc ttctacctcg 900
 acggctggct tgctcacrac tacctgcac acgcagtctt caagggctcg gtcaacacgc 960

tcgtcaaggc gaacaacgcc atgggatacg ccctcggctt cctccagggc tacgacgtgg 1020
 cctggtggcg cgcgcgccat aacacgcacc acgtgtgcac caacgaggat ggttcggacc 1080
 cggacatcaa gacggcgccc ctgctcatct acgtgcgaga gaaccggtcc attgccaagc 1140
 ggctcaactt cttccagcgc tggcagcagt actactatgt gccgaccatg gccatcctcg 1200
 acctctactg gcgcctggag tccatcgcgt acgtggctgt gcgcctgcct aagatgtgga 1260
 tgcaggccgc cgctcttgcc gctcactacg cgct 1294

<210> 62
 <211> 1927
 <212> ДНК
 <213> Pavlova lutheri

<400> 62
 ctttgcgagc gcggcgcgaga cgattgcggc ccgtagtgat cgcggtgcgc attgctgtgt 60
 ttctagtttt gctgacgccc ggcccgataa tgacaccttc tcccgtttga aatactaata 120
 agtaactata ttataatatt caaagggtggc gactatggat ctccttttct aaagttcagc 180
 ggaattggga atcggagaaa tttcgagata tgtcataatc acgtgctcta tctcgaatga 240
 accgcggccg gtgagcgatt actcgggaag ccaattccta ttaacgagtc aggggggac 300
 tttgaggtga gtcggccacg cagagagagc aaggaatcat cctcatccgc cgttctcgag 360
 aaagagccaa ggggtgccaa caccttccac gtgagactac acaccgtagg ccgatgggca 420
 aggggtggaga cggcggcgcg caggcggtga gcgggaccga cgcgtctctc gctgaggtga 480
 gctccgtcga tagcaagagc gtgcacgtcg tgctctacgg caagcgcgtg gatgtcacia 540
 agttccagaa ggcacacccg ggccgggagca aggtgttccg catcttccag gagcgcgacg 600
 cgacggagca gttcgagtct taccactcgc ccaaggccat caagatgatg gagggcatgc 660
 tcaagaagtc ggaggatgcg cccgcttccg tgcccctgcc ctgcgggtcc accatgggca 720
 cggagttcaa ggagatgatt gagcgccaca agagggtgg tctctacgac cttgccccgt 780
 tggacgagct gttcaagctc accatcgtcc ttgcgcccac cttcgtgggc gcctatctcg 840
 tgccggagcgg cgtctcgccc ctgcggggcg cgctctccat gggctttggc ttctacctcg 900
 acggctggct tgctcacgac tacctgcac acgcagtctt caagggtcgt gtcaacacgc 960
 tcgtcaaggc gaacaacgcc atgggatacg ccctcggctt cctccagggc tacgacgtgg 1020
 cctggtggcg cgcgcgccat aacacgcacc acgtgtgcac caacgaggat ggttcggacc 1080
 cggacatcaa gacggcgccc ctgctcatct acgtgcgaga gaaccggtcc attgccaagc 1140
 ggctcaactt cttccagcgc tggcagcagt actactatgt gccgaccatg gccatcctcg 1200
 acctctactg gcgcctggag tccatcgcgt acgtggctgt gcgcctgcct aagatgtgga 1260

```

tgcaggccgc cgctcttgcc gctcactacg cgctcctgtg ctgggtcttc gcagcgcatc 1320
tcaacctcat ccctctcatg atggttgcac gcggcttcgc gacgggcatc gttgtctttg 1380
caaccacta tggtagaggac atcctcgacc gcgagcacgt cgagggcatg acgctcgtcg 1440
agcagaccgc caagacctcc cgtaacatca cgggcggctg gctagtgaac gtgctcacgg 1500
gcttcatttc cctgcagacc gagcatcacc tcttccccat gatgccacc ggcaacctaa 1560
tgactatcca gcccagggtg cgcgacttct tcaagaagca tggcctcgag taccgcgagg 1620
gcaacctctt ccagtgcgtg caccagaaca tcaaggctct cgccttcgag cacctcctcc 1680
actgagcgtc accactcaag cgtcctaagt gcacaggtag tgtcttctga ccgatggccg 1740
cgcggtctcc tcggctggca gtggggccaa cgagtggcct cgcgggatcg ggcacgatcg 1800
ggcctccatg aaacttcagt gttcagagac aagccgacaa cctccgcatc gtgagaaatc 1860
ttttaagca gtatgttcca tcacgccgct tttgcagtca ataacattac ccaaaaaaaaa 1920
aaaaaaaaa 1927

```

<210> 63

<211> 459

<212> БЕЛОК

<213> *Rhizopus stolonifer* (№ доступа в GenBank ABB96724)

<400> 63

```

Met Ser Thr Leu Asp Arg Gln Ser Ile Phe Thr Ile Lys Glu Leu Glu
1          5          10          15

```

```

Ser Ile Ser Gln Arg Ile His Asp Gly Asp Glu Glu Ala Met Lys Phe
          20          25          30

```

```

Ile Ile Ile Asp Lys Lys Val Tyr Asp Val Thr Glu Phe Ile Glu Asp
          35          40          45

```

```

His Pro Gly Gly Ala Gln Val Leu Leu Thr His Val Gly Lys Asp Ala
          50          55          60

```

```

Ser Asp Val Phe His Ala Met His Pro Glu Ser Ala Tyr Glu Val Leu
65          70          75          80

```

```

Asn Asn Tyr Phe Val Gly Asp Val Gln Glu Thr Val Val Thr Glu Lys
          85          90          95

```

```

Ser Ser Ser Ala Gln Phe Ala Val Glu Met Arg Gln Leu Arg Asp Gln
          100          105          110

```

```

Leu Lys Lys Glu Gly Tyr Phe His Ser Ser Lys Leu Phe Tyr Ala Tyr

```

115					120					125														
Lys	Val	Leu	Ser	Thr	Leu	Ala	Ile	Cys	Ile	Ala	Gly	Leu	Ser	Pro	Leu									
130					135					140														
Tyr	Ala	Tyr	Gly	Arg	Thr	Ser	Thr	Leu	Ala	Val	Val	Ala	Ser	Ala	Ile									
145					150					155					160									
Thr	Val	Gly	Ile	Phe	Trp	Gln	Gln	Cys	Gly	Trp	Leu	Ala	His	Asp	Phe									
					165					170					175									
Gly	His	His	Gln	Cys	Phe	Glu	Asp	Arg	Thr	Trp	Asn	Asp	Val	Leu	Val									
					180					185					190									
Val	Phe	Leu	Gly	Asn	Phe	Cys	Gln	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Trp	Trp	Lys									
					195					200					205									
Asn	Lys	His	Asn	Thr	His	His	Ala	Ser	Thr	Asn	Val	His	Gly	Gln	Asp									
					210					215					220									
Pro	Asp	Ile	Asp	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Leu	Trp	Asp	Glu	Tyr	Ala	Ser									
					225					230					235					240				
Ala	Ala	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Leu	Asp	Gln	Glu	Pro	Thr	Met	Val	Ser	Arg									
					245					250					255									
Phe	Leu	Ala	Glu	Gln	Val	Leu	Pro	His	Gln	Thr	Arg	Tyr	Phe	Phe	Phe									
					260					265					270									
Ile	Leu	Ala	Phe	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser	Tyr									
					275					280					285									
Ser	Phe	Lys	Lys	Glu	Ser	Ile	Asn	Lys	Ser	Arg	Gln	Leu	Asn	Leu	Phe									
					290					295					300									
Glu	Arg	Val	Cys	Ile	Val	Gly	His	Trp	Ala	Leu	Ser	Ala	Phe	Cys	Ile									
					305					310					315					320				
Tyr	Ser	Trp	Cys	Ser	Asn	Val	Tyr	His	Met	Val	Leu	Phe	Phe	Leu	Val									
					325					330					335									
Ser	Gln	Ala	Thr	Thr	Gly	Tyr	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Phe	Ala	Leu	Asn									
					340					345					350									
His	Asn	Gly	Met	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Glu	Lys	Ala	Glu	Ser	Met	Glu									
					355					360					365									

Phe Phe Glu Ile Gln Val Ile Thr Gly Arg Asp Val Thr Leu Ser Pro
 370 375 380

Leu Gly Asp Trp Phe Met Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His
 385 390 395 400

Val Phe Pro Asn Met Pro Arg His Asn Leu Pro Thr Val Lys Pro Met
 405 410 415

Val Lys Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Asp Ile Asn Tyr His Asp Thr Gly
 420 425 430

Phe Leu Lys Gly Thr Leu Glu Val Leu Gln Thr Leu Asp Ile Thr Ser
 435 440 445

Lys Leu Ser Leu Gln Leu Ser Lys Lys Ser Phe
 450 455

<210> 64
 <211> 427
 <212> БЕЛОК
 <213> Pavlova salina

<300>
 <302> Синтез полиненасыщенных жирных кислот с длинными цепями
 рекомбинантными клетками
 <310> WO 2005/103253
 <311> 2005-04-22
 <312> 2005-11-03
 <313> (1) .. (427)

<400> 64

Met Gly Arg Gly Gly Asp Ser Ser Gly Gln Ala His Pro Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Leu Ala Val Pro Ser Asp Arg Ala Glu Val Ser Asn Ala Asp Ser Lys
 20 25 30

Ala Leu His Ile Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe
 35 40 45

Gln Arg Thr His Pro Gly Gly Ser Lys Val Phe Arg Ile Phe Gln Asp
 50 55 60

Arg Asp Ala Thr Glu Gln Phe Glu Ser Tyr His Ser Lys Arg Ala Ile
 65 70 75 80

Lys Met Met Glu Gly Met Leu Lys Lys Ser Glu Asp Ala Pro Ala Asp
 85 90 95

Thr Pro Leu Pro Ser Gln Ser Pro Met Gly Lys Asp Phe Lys Ala Met
 100 105 110

Ile Glu Arg His Val Ala Ala Gly Tyr Tyr Asp Pro Cys Pro Leu Asp
 115 120 125

Glu Leu Phe Lys Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Thr Phe Ala Gly Met
 130 135 140

Tyr Met Leu Lys Ala Gly Val Gly Ser Pro Leu Cys Gly Ala Leu Met
 145 150 155 160

Val Ser Phe Gly Trp Tyr Leu Asp Gly Trp Leu Ala His Asp Tyr Leu
 165 170 175

His His Ser Val Phe Lys Gly Ser Val Ala Arg Thr Val Gly Trp Asn
 180 185 190

Asn Ala Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Phe Val Gln Gly Tyr Ala Val Glu
 195 200 205

Trp Trp Arg Ala Arg His Asn Thr His His Val Cys Thr Asn Glu Asp
 210 215 220

Gly Ser Asp Pro Asp Ile Lys Thr Ala Pro Leu Leu Ile Tyr Val Arg
 225 230 235 240

Asn Lys Pro Ser Ile Ala Lys Arg Leu Asn Ala Phe Gln Arg Tyr Gln
 245 250 255

Gln Tyr Tyr Tyr Val Pro Val Met Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Trp Arg
 260 265 270

Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Val Ala Met Arg Leu Pro Lys Met Leu Pro
 275 280 285

Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Val Ala Trp Val Phe
 290 295 300

Ala Gly Asn Tyr His Leu Leu Pro Leu Val Thr Val Leu Arg Gly Phe
 305 310 315 320

Gly Thr Gly Ile Thr Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu Asp Ile Leu

325	330	335	
Asp Ala Asp Gln Val Arg His Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Leu			
340	345	350	
Thr Ser Arg Asn Ile Ser Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly			
355	360	365	
Phe Ile Ser Leu Gln Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr			
370	375	380	
Gly Asn Leu Met Thr Ile Gln Pro Glu Val Arg Ala Phe Phe Lys Lys			
385	390	395	400
His Gly Leu Glu Tyr Arg Glu Gly Asn Leu Ile Glu Cys Val Arg Gln			
405	410	415	
Asn Ile Arg Ala Leu Ala Phe Glu His Leu Leu			
420	425		
<210>	65		
<211>	37		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер AP		
<400>	65		
ggccacgcgt cgactagtac tttttttttt ttttttt			37
<210>	66		
<211>	39		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	олигонуклеотидный праймер Smart IV		
<400>	66		
aagcagtggg atcaacgcag agtggccatt acggccggg			39
<210>	67		
<211>	1338		
<212>	ДНК		
<213>	Mortierella alpina		
<400>	67		
atgggaacgg accaaggaaa aaccttcacc tgggaagagc tggcggccca taacaccaag			60
gacgacctac tcttggccat ccgcggcagg gtgtacgatg tcacaaagtt cttgagccgc			120

```

catcctggtg gagtggacac tctcctgctc ggagctggcc gagatgttac tccggtcttt      180
gagatgtatc acgcgttttg ggctgcagat gccattatga agaagtacta tgtcgggtaca      240
ctgggtctcga atgagctgcc catcttcccc gagccaacgg tgttccacaa aaccatcaag      300
acgagagtcg agggctactt tacggatcgg aacattgatc ccaagaatag accagagatc      360
tggggacgat acgctcttat ctttggatcc ttgatcgctt cctactacgc gcagctcttt      420
gtgcctttcg ttgtcgaacg cacatggctt cagggtggtg ttgcaatcat catgggattt      480
gcgtgcgcac aagtcggact caaccctctt catgatgcgt ctcacttttc agtgaccac      540
aaccctactg tctggaagat tctgggagcc acgcacgact ttttcaacgg agcatcgta      600
ctgggtgtgga tgtaccaaca tatgctcggc catcacccct acaccaacat tgctggagca      660
gatcccgacg tgtcgacgtc tgagcccgat gttcgctgta tcaagcccaa ccaaaagtgg      720
tttgtcaacc acatcaacca gcacatgttt gtccctttcc tgtacggact gctggcgctc      780
aagggtgcga ttcaggacat caacattttg tactttgtca agaccaatga cgctattcgt      840
gtcaatccca tctcgacatg gcacactgtg atgttctggg gcggcaaggc tttctttgtc      900
tggtatcgcc tgattgttcc cctgcagtat ctgcccctgg gcaaggtgct gctcttgctc      960
acggtcgcgg acatggtgtc gtcttactgg ctggcgctga ccttccaggc gaaccacgtt    1020
gttgaggaag ttcagtggcc gttgcctgac gagaacggga tcatccaaaa ggactgggca    1080
gctatgcagg tcgagactac gcaggattac gcacacgatt cgcacctctg gaccagcatc    1140
actggcagct tgaactacca ggctgtgcac catctgttcc ccaacgtgtc gcagcaccat    1200
tatcccgata ttctggccat catcaagaac acctgcagcg agtacaaggt tccatacctt    1260
gtcaaggata cgttttggca agcatttgct tcacatttgg agcacttgcg tgttcttgga    1320
ctccgtccca aggaagag                                     1338

```

```

<210> 68
<211> 446
<212> БЕЛОК
<213> Mortierella alpina

```

```
<400> 68
```

```

Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Glu Glu Leu Ala Ala
1           5           10           15

```

```

His Asn Thr Lys Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ile Arg Gly Arg Val Tyr
20           25           30

```

```

Asp Val Thr Lys Phe Leu Ser Arg His Pro Gly Gly Val Asp Thr Leu
35           40           45

```

Leu Leu Gly Ala Gly Arg Asp Val Thr Pro Val Phe Glu Met Tyr His
 50 55 60

Ala Phe Gly Ala Ala Asp Ala Ile Met Lys Lys Tyr Tyr Val Gly Thr
 65 70 75 80

Leu Val Ser Asn Glu Leu Pro Ile Phe Pro Glu Pro Thr Val Phe His
 85 90 95

Lys Thr Ile Lys Thr Arg Val Glu Gly Tyr Phe Thr Asp Arg Asn Ile
 100 105 110

Asp Pro Lys Asn Arg Pro Glu Ile Trp Gly Arg Tyr Ala Leu Ile Phe
 115 120 125

Gly Ser Leu Ile Ala Ser Tyr Tyr Ala Gln Leu Phe Val Pro Phe Val
 130 135 140

Val Glu Arg Thr Trp Leu Gln Val Val Phe Ala Ile Ile Met Gly Phe
 145 150 155 160

Ala Cys Ala Gln Val Gly Leu Asn Pro Leu His Asp Ala Ser His Phe
 165 170 175

Ser Val Thr His Asn Pro Thr Val Trp Lys Ile Leu Gly Ala Thr His
 180 185 190

Asp Phe Phe Asn Gly Ala Ser Tyr Leu Val Trp Met Tyr Gln His Met
 195 200 205

Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Ile Ala Gly Ala Asp Pro Asp Val
 210 215 220

Ser Thr Ser Glu Pro Asp Val Arg Arg Ile Lys Pro Asn Gln Lys Trp
 225 230 235 240

Phe Val Asn His Ile Asn Gln His Met Phe Val Pro Phe Leu Tyr Gly
 245 250 255

Leu Leu Ala Phe Lys Val Arg Ile Gln Asp Ile Asn Ile Leu Tyr Phe
 260 265 270

Val Lys Thr Asn Asp Ala Ile Arg Val Asn Pro Ile Ser Thr Trp His
 275 280 285

Thr Val Met Phe Trp Gly Gly Lys Ala Phe Phe Val Trp Tyr Arg Leu
290 295 300

Ile Val Pro Leu Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Lys Val Leu Leu Leu Phe
305 310 315 320

Thr Val Ala Asp Met Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ala Leu Thr Phe Gln
325 330 335

Ala Asn His Val Val Glu Glu Val Gln Trp Pro Leu Pro Asp Glu Asn
340 345 350

Gly Ile Ile Gln Lys Asp Trp Ala Ala Met Gln Val Glu Thr Thr Gln
355 360 365

Asp Tyr Ala His Asp Ser His Leu Trp Thr Ser Ile Thr Gly Ser Leu
370 375 380

Asn Tyr Gln Ala Val His His Leu Phe Pro Asn Val Ser Gln His His
385 390 395 400

Tyr Pro Asp Ile Leu Ala Ile Ile Lys Asn Thr Cys Ser Glu Tyr Lys
405 410 415

Val Pro Tyr Leu Val Lys Asp Thr Phe Trp Gln Ala Phe Ala Ser His
420 425 430

Leu Glu His Leu Arg Val Leu Gly Leu Arg Pro Lys Glu Glu
435 440 445

<210> 69
<211> 6473
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Плазмида pY5-22

<400> 69
ggtaggagctc cagcttttgt tcccttttagt gaggggtaat ttcgagcttg gcgtaatcat 60
ggtagcatagct gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac aattccacac aacgtacgag 120
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaatagagt gagctaactc acattaattg 180
cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa 240
tcggccaacg cgcggggaga ggcgggttgc gtattgggag ctcttcgctc tctcgtctca 300
ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg 360

taatacgggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc	420
agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc	480
cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac	540
tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc	600
tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata	660
gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc	720
acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca	780
acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	840
cgaggatatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta	900
gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	960
gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc	1020
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt	1080
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa	1140
ggatcttcac ctatgcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat	1200
atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga	1260
tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac	1320
gggagggctt accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg	1380
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg	1440
caactttatc cgctccatc cagtctatta attggtgccg ggaagctaga gtaagtagtt	1500
cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct	1560
cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat	1620
cccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc tccgatcggt gtcagaagta	1680
agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca	1740
tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat	1800
agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac	1860
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa	1920
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt	1980
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg	2040
caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat	2100
attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt	2160
agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgcgc	2220

cctgtagcgg	cgcatthaagc	gcggcgggtg	tggtgggttac	gcgagcgtg	accgctacac	2280
ttgccagcgc	cctagcgccc	gctcctttcg	ctttcttccc	ttcctttctc	gccacgttcg	2340
ccggctttcc	ccgtcaagct	ctaaatcggg	ggctcccttt	agggttccga	tttagtgctt	2400
tacggcacct	cgacccccaaa	aaacttgatt	agggtgatgg	ttcacgtagt	gggccatcgc	2460
cctgatagac	ggtttttctgc	cctttgacgt	tgaggtccac	gttctttaat	agtggactct	2520
tgttccaaac	tggaacaaca	ctcaacccta	tctcgggtcta	ttcttttgat	ttataagggg	2580
ttttgccgat	ttcggcctat	tggttaaaaa	atgagctgat	ttaacaaaaa	tttaacgcga	2640
attttaacaa	aatattaacg	cttacaattt	ccattcgcca	ttcaggctgc	gcaactgttg	2700
ggaagggcga	tcggtgcggg	cctcttcgct	attacgccag	ctggcgaaag	ggggatgtgc	2760
tgcaaggcga	ttaagttggg	taacgccagg	gttttcccag	tcacgacgtt	gtaaaacgac	2820
ggccagtga	ttgtaatacg	actcactata	gggcgaattg	ggtaccgggc	ccccctcga	2880
ggtcgatggt	gtcgataagc	ttgatatcga	attcatgtca	cacaaaccga	tcttcgcctc	2940
aaggaaacct	aattctacat	ccgagagact	gccgagatcc	agtctacact	gattaatttt	3000
cgggccaata	atttaaaaaa	atcgtgttat	ataatattat	atgtattata	tatatacatc	3060
atgatgatac	tgacagtcac	gtcccattgc	taaatagaca	gactccatct	gccgcctcca	3120
actgatgttc	tcaatattta	aggggtcatc	tcgcattggt	taataataaa	cagactccat	3180
ctaccgcctc	caaatagatgt	tctcaaaata	tattgtatga	acttattttt	attacttagt	3240
attattagac	aacttacttg	ctttatgaaa	aacacttcct	atttaggaaa	caatttataa	3300
tggcagttcg	ttcatttaac	aatttatgta	gaataaatgt	tataaatgcg	tatgggaaat	3360
cttaaatatg	gatagcataa	atgatatctg	cattgcctaa	ttcgaaatca	acagcaacga	3420
aaaaaatccc	ttgtacaaca	taaatagtca	tcgagaaata	tcaactatca	aagaacagct	3480
attcacacgt	tactattgag	attattattg	gacgagaatc	acacactcaa	ctgtctttct	3540
ctcttctaga	aatacaggta	caagtatgta	ctattctcat	tgttcatact	tctagtcatt	3600
tcaccccaca	tattccttgg	atttctctcc	aatgaatgac	attctatctt	gcaaattcaa	3660
caattataat	aagatatacc	aaagtagcgg	tatagtggca	atcaaaaagc	ttctctgggtg	3720
tgcttctcgt	atttattttt	attctaataga	tccattaaag	gtatatatatt	atttcttggt	3780
atataatcct	tttgtttatt	acatgggctg	gatacataaa	ggtattttga	tttaattttt	3840
tgcttaaatt	caatcccccc	tcgttcagtg	tcaactgtaa	tggtaggaaa	ttaccatact	3900
tttgaagaag	caaaaaaaaa	gaaagaaaaa	aaaaatcgta	tttccagggt	agacgttccg	3960
cagaatctag	aatgcggtat	gcggtacatt	gttcttcgaa	cgtaaaagtt	gcgctccctg	4020

agatattgta	catttttgc	tttacaagta	caagtacatc	gtacaactat	gtactactgt	4080
tgatgcatcc	acaacagttt	gttttgtttt	tttttgtttt	ttttttttct	aatgattcat	4140
taccgctatg	tatacctact	tgtacttgta	gtaagccggg	ttattggcgt	tcaattaatc	4200
atagacttat	gaatctgcac	ggtgtgcgct	gcgagttact	tttagcttat	gcatgctact	4260
tgggtgtaat	attgggatct	gttcggaaat	caacggatgc	tcaaccgatt	tcgacagtaa	4320
ttaattaagt	catacacaag	tcagctttct	tcgagcctca	tataagtata	agtagttcaa	4380
cgtattagca	ctgtaccacg	catctccgta	tcgagaaaca	caacaacatg	ccccattgga	4440
cagatcatgc	ggatacacag	gttgtgcagt	atcatacata	ctcgatcaga	caggctcgtct	4500
gaccatcata	caagctgaac	aagcgcctca	tacttgcacg	ctctctatat	acacagttaa	4560
attacatatc	catagtctaa	cctctaacag	ttaatcttct	ggtaagcctc	ccagccagcc	4620
ttctggtatc	gcttggcctc	ctcaatagga	tctcggttct	ggccgtacag	acctcggccg	4680
acaattatga	tatccgttcc	ggtagacatg	acatcctcaa	cagttcggta	ctgctgtccg	4740
agagcgtctc	ccttgtcgtc	aagaccaccc	ccgggggtca	gaataagcca	gtcctcagag	4800
tcgcccttag	gtcggttctg	ggcaatgaag	ccaaccacaa	actcggggtc	ggatcgggca	4860
agctcaatgg	tctgcttgga	gtactcgcca	gtggccagag	agcccttgca	agacagctcg	4920
gccagcatga	gcagacctct	ggccagcttc	tcgttgggag	aggggactag	gaactccttg	4980
tactgggagt	tctcgtagtc	agagacgtcc	tccttcttct	gttcagagac	agtttcctcg	5040
gcaccagctc	gcaggccagc	aatgattccg	gttcggggta	caccgtgggc	gttggtgata	5100
tcggaccact	cggcgattcg	gtgacaccgg	tactggtgct	tgacagtgtt	gccaatatct	5160
gcgaactttc	tgtcctcgaa	caggaagaaa	ccgtgcttaa	gagcaagttc	cttgaggggg	5220
agcacagtgc	cggcgtaggt	gaagtcgtca	atgatgtoga	tatgggtttt	gatcatgcac	5280
acataaggtc	cgaccttatc	ggcaagctca	atgagctcct	tgggtggtggt	aacatccaga	5340
gaagcacaca	ggttggtttt	cttggtcgcc	acgagcttga	gcactcgagc	ggcaaaggcg	5400
gacttggtga	cgttagctcg	agcttcgtag	gagggcattt	tgggtggtgaa	gaggagactg	5460
aaataaattt	agtctgcaga	actttttatc	ggaaccttat	ctggggcagt	gaagtatatg	5520
ttatggtaat	agttacgagt	tagttgaact	tatagataga	ctggactata	cggctatcgg	5580
tccaaattag	aaagaacgtc	aatggctctc	tgggcgtcgc	ctttgccgac	aaaaatgtga	5640
tcatgatgaa	agccagcaat	gacgttgacg	ctgatattgt	tgtcggccaa	ccgcgccgaa	5700
aacgcagctg	tcagaccac	agcctccaac	gaagaatgta	tcgtcaaagt	gatccaagca	5760
cactcatagt	tggagtcgta	ctccaaaggc	ggcaatgacg	agtcagacag	atactcgtcg	5820
actcaggcga	cgacggaatt	cctgcagccc	atctgcagaa	ttcaggagag	accgggttgg	5880

cggcgtatatt gtgtcccaaa aaacagcccc aattgcccc attgaccca aattgaccca 5940
 gtagcggggc caaccccggc gagagcccc ttcacccac atatcaaacc tccccgggtt 6000
 cccacacttg ccgttaaggg cgtagggtac tgcagtctgg aatctacgct tgttcagact 6060
 ttgtactagt ttctttgtct ggccatccgg gtaacccatg ccggacgcaa aatagactac 6120
 tgaaaattttt tttgctttgt ggttgggact ttagccaagg gtataaaaga ccaccgtccc 6180
 cgaattacct ttctcttct tttctctctc tccttgtaaa ctcacacccg aaatcggtta 6240
 gcatttcctt ctgagtataa gaatcattca ccatggatcc actagttcta gagcggccgc 6300
 caccgcggcc cgagattccg gcctcttcgg ccgccaagcg acccgggtgg acgtctagag 6360
 gtacctagca attaacagat agtttgccgg tgataattct cttaacctcc cacactcctt 6420
 tgacataacg atttatgtaa cgaaactgaa atttgaccag atattgtgtc cgc 6473

<210> 70

<211> 6970

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плазмида pY5-22GPD

<400> 70

tcgacgcagt aggatgtcct gcacgggtct ttttgtgggg tgtggagaaa ggggtgcttg 60
 gagatggaag ccggtagaac cgggctgctt gtgcttgagg atggaagccg gtagaaccgg 120
 gctgcttggg gggatttggg gccgctgggc tccaaagagg ggtaggcatt tcgttggggg 180
 tacgtaattg cggcatttgg gtcctgcgcg catgtcccat tggtcagaat tagtcgggat 240
 aggagactta tcagccaatc acagcgccgg atccacctgt aggttggggtt ggggtgggagc 300
 acccctccac agagtagagt caaacagcag cagcaacatg atagttgggg gtgtgcgtgt 360
 taaaggaaaa aaaagaagct tgggttatat tcccgctcta tttagagggt gcgggataga 420
 cgccgacgga gggcaatggc gccatggaac cttgcggata tcgatacgcc gcggcggact 480
 gcgtccgaac cagctccagc agcgtttttt ccgggccatt gagccgactg cgaccccgcc 540
 aacgtgtctt ggcccacgca ctcatgtcat gttggtgttg ggaggccact ttttaagtag 600
 cacaaggcac ctagctcgca gcaagggtgc cgaaccaaag aagcggctgc agtggtgcaa 660
 acggggcgga aacggcgga aaaagccacg ggggcacgaa ttgaggcacg ccctcgaatt 720
 tgagacgagt cacggcccca ttcgcccgcg caatggctcg ccaacgcccg gtcttttgca 780
 ccacatcagg ttacccaag ccaaactttt gtgttaaaaa gcttaacata ttataccgaa 840
 cgtaggtttg ggcgggcttg ctccgtctgt ccaaggcaac atttatataa gggctctgcat 900

cgccgggtca attgaatctt ttttcttctt ctcttctcta tattcattct tgaattaaac	960
acacatcaat ccgcgggccg caccgcggcc cgagattccg gcctcttcgg ccgccaagcg	1020
acccgggtgg acgtctagag gtacctagca attaacagat agtttgccgg tgataattct	1080
cttaacctcc cacactcctt tgacataacg atttatgtaa cgaaactgaa atttgaccag	1140
atattgtgtc cgcggtggag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aatttcgagc	1200
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca	1260
cacaacgtac gagccggaag cataaagtggt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa	1320
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag	1380
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc	1440
gcttcctcgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	1500
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	1560
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc	1620
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	1680
aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttcccctg gaagctccct cgtgcgctct	1740
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg	1800
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag	1860
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggtaactat	1920
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	1980
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac	2040
tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc	2100
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt	2160
tttgtttgca agcagcagat tacgcgaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	2220
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg	2280
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatac	2340
atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca	2400
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag	2460
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac	2520
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc	2580
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg ccgggaagct	2640
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc	2700
gtggtgtcac gtcgtcggtt tggatatggc tcattcagct ccggttccca acgatcaagg	2760

cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gctccttcgg tctccgatac	2820
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatgg ttatggcagc actgcataat	2880
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctgggtgagta ctcaaccaag	2940
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccgggcgtc aatacgggat	3000
aataccgcgc cacatagcag aacttttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg	3060
cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca	3120
cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga	3180
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat actcatactc	3240
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata	3300
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttcgc gcacatttcc ccgaaaagtg	3360
ccacctgacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtgggtgg tacygcgacg	3420
gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt	3480
ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc	3540
cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attaggggtga tggttcacgt	3600
agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgccctttga cgttggagtc cacgttcttt	3660
aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggc ctattctttt	3720
gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattgggttaa aaaatgagct gatttaacaa	3780
aaatttaacg cgaattttta caaaatatta acgcttaca tttccattcg ccattcaggc	3840
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtg gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	3900
aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	3960
gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggtaccg	4020
ggccccccct cgaggtcgat ggtgtcgata agcttgatat cgaattcatg tcacacaaac	4080
cgatcttcgc ctcaaggaaa cctaattcta catccgagag actgccgaga tccagtctac	4140
actgattaat tttcgggcca ataatttaaa aaaatcgtgt tatataatat tatatgtatt	4200
atatatatac atcatgatga tactgacagt catgtcccat tgctaaatag acagactcca	4260
tctgccgctt ccaactgatg ttctcaatat ttaaggggtc atctcgcatg gtttaataat	4320
aaacagactc catctaccgc ctccaaatga tgttctcaaa atatattgta tgaacttatt	4380
tttattactt agtattatta gacaacttac ttgctttatg aaaaacactt cctatttagg	4440
aaacaattta taatggcagt tcgttcattt aacaatttat gtagaataaa tgttataaat	4500
gcgtatggga aatcttaaat atggatagca taaatgatat ctgcattgcc taattcgaaa	4560

tcaacagcaa	cgaaaaaaaaat	cccttgtaga	acataaatag	tcacgagaa	atatcaacta	4620
tcaaagaaca	gctattcaca	cggtactatt	gagattatta	ttggacgaga	atcacacact	4680
caactgtctt	tctctcttct	agaaatacag	gtacaagtat	gtactattct	cattgttcat	4740
acttctagtc	atttcatccc	acatattcct	tggattttctc	tccaatgaat	gacattctat	4800
cttgcaaatt	caacaattat	aataagatat	accaaagtag	cggtatagtg	gcaatcaaaa	4860
agcttctctg	gtgtgcttct	cgtattttatt	tttattctaa	tgatccatta	aaggatatata	4920
tttatttctt	gttatataat	ccttttggtt	attacatggg	ctggatacat	aaaggatttt	4980
tgatttaatt	ttttgcttaa	attcaatccc	ccctcggttca	gtgtcaactg	taatggtagg	5040
aaattaccat	acttttgaag	aagcaaaaaa	aatgaaagaa	aaaaaaaaatc	gtatttccag	5100
gtagacggt	ccgcagaatc	tagaatgcgg	tatgcggtac	attgttcttc	gaacgtaaaa	5160
gttgcgctcc	ctgagatatt	gtacattttt	gcttttataa	gtacaagtac	atcgtacaac	5220
tatgtactac	tggtgatgca	tccacaacag	tttgttttgt	ttttttttgt	tttttttttt	5280
tctaattgatt	cattaccgct	atgtatacct	acttgtactt	gtagtaagcc	gggttattgg	5340
cgttcaatta	atcatagact	tatgaatctg	cacggtgtgc	gctgcgagtt	acttttagct	5400
tatgcatgct	acttgggtgt	aatattggga	tctgttcgga	aatcaacgga	tgctcaaccg	5460
atttcgacag	taattaatta	agtcatacac	aagtcagctt	tcttcgagcc	tcatataagt	5520
ataagtagtt	caacgtatta	gcactgtacc	cagcatctcc	gtatcgagaa	acacaacaac	5580
atgccccatt	ggacagatca	tgccgataca	cagggtgtgc	agtatcatac	atactcgatc	5640
agacaggctc	tctgaccatc	atacaagctg	aacaagcgct	ccataacttg	acgctctcta	5700
tatacacagt	taaattacat	atccatagtc	taacctctaa	cagttaatct	tctggtaagc	5760
ctcccagcca	gccttctggt	atcgcttggc	ctcctcaata	ggatctcggt	tctggccgta	5820
cagacctcgg	ccgacaatta	tgatatccgt	tccggtagac	atgacatcct	caacagttcg	5880
gtactgctgt	ccgagagcgt	ctcccttgtc	gtcaagaccc	accccggggg	tcagaataag	5940
ccagtcctca	gagtcgccct	taggtcggtt	ctgggcaatg	aagccaacca	caaactcggg	6000
gtcggatcgg	gcaagctcaa	tggctctgct	ggagtactcg	ccagtggcca	gagagccctt	6060
gcaagacagc	tcggccagca	tgagcagacc	tctggccagc	ttctcgttgg	gagaggggac	6120
taggaactcc	ttgtactggg	agttctcgta	gtcagagacg	tcctccttct	tctgttcaga	6180
gacagtttcc	tcggcaccag	ctcgcaggcc	agcaatgatt	ccggttcggg	gtacaccgtg	6240
ggcgttggtg	atatcggacc	actcggcgat	tcgggtgacac	cggtagtggt	gcttgacagt	6300
gttgccaata	tctgcgaact	ttctgtcttc	gaacaggaag	aaaccgtgct	taagagcaag	6360
ttccttgagg	gggagcacag	tgccggcgta	ggtgaagtcg	tcaatgatgt	cgatatgggt	6420

```

tttgatcatg cacacataag gtccgacctt atcggcaagc tcaatgagct ccttggtggt 6480
ggtaacatcc agagaagcac acagggttggg tttcttggct gccacgagct tgagcactcg 6540
agcggcacaag gcggaacttg gtacgttagc tcgagcttcg taggagggca ttttggtggt 6600
gaagaggaga ctgaaataaa tttagtctgc agaacttttt atcggaacct tatctggggc 6660
agtgaagtat atgttatggg aatagttacg agttagttga acttatagat agactggact 6720
atacggctat cgggtccaaat tagaaagaac gtcaatggct ctctgggcgt cgcctttgcc 6780
gacaaaaatg tgatcatgat gaaagccagc aatgacgttg cagctgatat tgttgcggc 6840
caaccgcgcc gaaaacgcag ctgtcagacc cacagcctcc aacgaagaat gtatcgtcaa 6900
agtgatccaa gcacactcat agttggagtc gtactccaaa ggcggcaatg acgagtcaga 6960
cagatactcg 6970

```

```

<210> 71
<211> 968
<212> ДНК
<213> Yarrowia lipolytica

```

```

<300>
<302> Промоторы глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы и фосфоглицератмутаза
экспрессии генов в содержащих или продуцирующих дрожжах
<310> US-2005-0014270-A1
<311> 2004-06-16
<312> 2005-01-20
<313> (1) .. (968)

```

```

<400> 71
tcgacgcagt aggatgtcct gcacgggtct ttttgtgggg tgtggagaaa ggggtgcttg 60
gagatggaag ccggtagaac cgggctgctt gtgcttgag atggaagccg gtagaaccgg 120
gctgcttggg gggatttggg gccgctgggc tccaaagagg ggtaggcatt tcgttggggg 180
tacgtaattg cggcatttgg gtctgcgcg catgtcccat tggtcagaat tagtccggat 240
aggagactta tcagccaatc acagcgccgg atccacctgt aggttgggtt ggggtgggagc 300
acccctccac agagtagagt caaacagcag cagcaacatg atagttgggg gtgtgcgtgt 360
taaaggaaaa aaaagaagct tgggttatat tcccgtcta tttagagggt gcgggataga 420
cgccgacgga gggcaatggc gccatggaac cttgcggata tcgatacgcc gcggcgact 480
gcgtccgaac cagctccagc agcgtttttt ccgggccatt gagccgactg cgaccccgcc 540
aacgtgtctt ggcccacgca ctcatgtcat gttggtgttg ggaggccact ttttaagtag 600
cacaaggcac ctagctcgca gcaagggtgc cgaaccaaag aagcggctgc agtggtgcaa 660
acggggcgga aacggcgga aaaagccagc ggggcacgaa ttgaggcacg ccctcgaatt 720
tgagacgagt cacggcccca ttcgcccgcg caatggctcg ccaacgcccg gtcttttgca 780

```

ccacatcagg ttaccccaag ccaaaccttt gtgttaaaaa gcttaacata ttataccgaa 840
 cgtaggtttg ggcgggcttg ctccgtctgt ccaaggcaac atttatataa gggctctgcat 900
 cgccggctca attgaatctt ttttcttctt ctcttctcta tattcattct tgaattaaac 960
 acacatca 968

<210> 72
 <211> 8630
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмида pYZDE2-S

<400> 72
 ggtggagctc cagcttttgt tccctttagt gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat 60
 ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacgtacgag 120
 ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaagtagt gagctaactc acattaattg 180
 cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa 240
 tcggccaacg cgcggggaga ggcgggttgc gtattgggag ctcttccgct tcttcgctca 300
 ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg 360
 taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 420
 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc 480
 cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 540
 tataaagata ccaggcggtt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct 600
 tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtaggcg ctttctcata 660
 gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcggttc ctccaagctg ggctgtgtgc 720
 acgaaccccc cggttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 780
 acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 840
 cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta 900
 gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 960
 gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc 1020
 agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 1080
 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 1140
 ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat 1200
 atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 1260

tctgtctatt	tcgttcatcc	atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	1320
gggagggcct	accatctggc	cccagtgtg	caatgatacc	gcgagacca	cgctcaccgg	1380
ctccagatth	atcagcaata	aaccagccag	ccggaagggc	cgagcgcaga	agtggtcctg	1440
caactttatc	cgctccatc	cagtctatta	attgttgccg	ggaagctaga	gtaagtagtt	1500
cgccagttaa	tagtttgccg	aacgttggtg	ccattgctac	aggcatcgtg	gtgtcacgct	1560
cgtcgttttg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	atcaaggcga	gttacatgat	1620
cccccatggt	gtgcaaaaaa	gcggttagct	ccttcgggtc	tccgatcgtt	gtcagaagta	1680
agttggccgc	agtgttatca	ctcatgggta	tggcagcact	gcataattct	cttactgtca	1740
tgccatccgt	aagatgcttt	tctgtgactg	gtgagtactc	aaccaagtca	ttctgagaat	1800
agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttgcc	cggcgtcaat	acgggataat	accgcgccac	1860
atagcagaac	tttaaaagtg	ctcatcattg	gaaaacgttc	ttcggggcga	aaactctcaa	1920
ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga	tgtaaccac	tcgtgcaccc	aactgatctt	1980
cagcatcttt	tactttcacc	agcgtttctg	ggtgagcaaa	aacaggaag	caaaatgccg	2040
caaaaaaggg	aataagggcg	acacggaaat	gttgaatact	catactcttc	ctttttcaat	2100
attattgaag	catttatcag	ggttattgtc	tcagtagcgg	atacatattt	gaatgtattt	2160
agaaaaataa	acaaataggg	gttccgcgca	catttccccg	aaaagtgcc	cctgacgcgc	2220
cctgtagcgg	cgcattaagc	gcggcgggtg	tgggtggttac	gcgcagcgtg	accgctacac	2280
ttgccagcgc	cctagcgcgc	gctcctttcg	ctttcttccc	ttcctttctc	gccacgttcg	2340
ccggctttcc	ccgtcaagct	ctaaatcggg	ggctcccttt	agggttccga	tttagtgctt	2400
tacggcacct	cgaccccaa	aaacttgatt	agggtgatgg	ttcacgtagt	gggccatcgc	2460
cctgatagac	ggtttttctc	cctttgacgt	tggagtccac	gttctttaat	agtggactct	2520
tgttccaaac	tggaacaaca	ctcaacccta	tctcgggtcta	ttcttttgat	ttataaggg	2580
ttttgccgat	ttcggcctat	tggttaaaaa	atgagctgat	ttaacaaaa	tttaacgcga	2640
attttaacaa	aatattaacg	cttacaattt	ccattcgcca	ttcaggctgc	gcaactgttg	2700
ggaagggcga	tcggtgcggg	cctcttcgct	attacgccag	ctggcgaaa	ggggatgtgc	2760
tgcaaggcga	ttaagttggg	taacgccagg	gttttcccag	tcacgacgtt	gtaaaacgac	2820
ggccagtga	ttgtaatacg	actcactata	gggcgaattg	ggtaccgggc	ccccctcga	2880
ggtcgatgg	gtcgataagc	ttgatatcga	attcatgtca	cacaaaccga	tcttcgcctc	2940
aaggaaacct	aattctacat	ccgagagact	gccgagatcc	agtctacact	gattaatttt	3000
cgggccaata	atttaaaaaa	atcgtgttat	ataatattat	atgtattata	tatatacatc	3060
atgatgatac	tgacagtc	gtcccattgc	taaatagaca	gactccatct	gccgcctcca	3120

actgatgttc tcaatattta aggggtcatc tcgcattgtt taataataaa cagactccat 3180
 ctaccgcctc caaatgatgt tctcaaaata tattgtatga acttattttt attacttagt 3240
 attattagac aacttacttg ctttatgaaa aacacttcct atttaggaaa caattttataa 3300
 tggcagttcg ttcattttaac aatttatgta gaataaatgt tataaatgcg tatgggaaat 3360
 cttaaatatg gatagcataa atgatatctg cattgcctaa ttcgaaatca acagcaacga 3420
 aaaaaatccc ttgtacaaca taaatagtca tcgagaaata tcaactatca aagaacagct 3480
 attcacacgt tactattgag attattattg gacgagaatc acacactcaa ctgtctttct 3540
 ctcttctaga aatacaggta caagtatgta ctattctcat tgttcatact tctagtcat 3600
 tcatcccaca tattccttgg atttctctcc aatgaatgac attctatctt gcaaattcaa 3660
 caattataat aagatatacc aaagtagcgg tatagtggca atcaaaaagc ttctctggtg 3720
 tgcttctcgt atttattttt attctaata tccattaaag gtatatattt atttcttgtt 3780
 atataatcct ttgttttatt acatgggctg gatacataaa ggtattttga tttaattttt 3840
 tgcttaaatt caatcccccc tcgttcagt tcaactgtaa tggtaggaaa ttaccatact 3900
 tttgaagaag caaaaaaat gaaagaaaa aaaaatcgta tttccagggt agacgttccg 3960
 cagaatctag aatgcggtat gcggtacatt gttcttcgaa cgtaaaaagt gcgctccctg 4020
 agatattgta cttttttgct tttaacaagta caagtacatc gtacaactat gtactactgt 4080
 tgatgcatcc acaacagttt gttttgtttt tttttgtttt ttttttttct aatgattcat 4140
 taccgctatg tataacctact tgtacttgta gtaagccggg ttattggcgt tcaattaatc 4200
 atagacttat gaatctgcac ggtgtgcgct gcgagttact tttagcttat gcatgctact 4260
 tgggtgtaat attgggatct gttcggaat caacggatgc tcaaccgatt tcgacagtaa 4320
 taatttgaat cgaatcggag cctaaaatga acccgagtat atctcataaa attctcggtg 4380
 agaggctctgt gactgtcagt acaagggtgcc ttcattatgc cctcaacctt accatacctc 4440
 actgaatgta gtgtacctct aaaaatgaaa tacagtgcc aagccaagg cactgagctc 4500
 gtctaacgga cttgatatac aaccaattaa aacaaatgaa aagaaataca gttctttgta 4560
 tcatttgtaa caattaccct gtacaaacta aggtattgaa atcccacaat attcccaaag 4620
 tccaccctt tccaaattgt catgcctaca actcatatac caagcactaa cctaccaaac 4680
 accactaaaa cccacaaaa tatatcttac cgaatataca gtaacaagct accaccacac 4740
 tcgttgggtg cagtcgccag cttaaagata tctatccaca tcagccacaa ctcccttctc 4800
 ttaataaacc gactacacc ttggctattg aggttatgag tgaatatact gtagacaaga 4860
 cactttcaag aagactgttt ccaaacgta ccactgtcct ccactacaaa cacacccaat 4920

ctgcttcttc tagtcaaggt tgctacaccg gtaaattata aatcatcatt tcattagcag 4980
 ggcagggccc tttttataga gtcttataca ctagcggacc ctgccggtag accaaccgcc 5040
 aggcgcgtca gtttgctcct tccatcaatg cgtcgtagaa acgacttact ccttcttgag 5100
 cagctccttg accttggttg caacaagtct ccgacctcgg aggtggagga agagcctccg 5160
 atatcggcgg tagtgatacc agcctcgacg gactccttga cggcagcctc aacagcgtca 5220
 ccggcgggct tcatgttaag agagaacttg agcatcatgg cggcagacag aatggtggca 5280
 atggggttga ccttctgctt gccgagatcg ggggcagatc cgtgacaggg ctcgtagaga 5340
 ccgaacgcct cgttggtgtc gggcagagaa gccagagagg cggagggcag cagaccaga 5400
 gaaccgggga tgacggaggc ctctcggag atgatatcgc caaacatgtt ggtggtgatg 5460
 atgataccat tcatcttgga gggctgcttg atgaggatca tggcggccga gtcgatcagc 5520
 tgggtggtga gctcgagctg ggggaattcg tccttgagga ctcgagtac agtctttcgc 5580
 caaagtcgag aggaggccag cacgttgccc ttgtcaagag accacacggg aagagggggg 5640
 ttgtgctgaa gggccaggaa ggcggccatt cgggcaattc gctcaacctc aggaacggag 5700
 taggtctcgg tgtcggaaagc gacgccagat ccgtcatcct cctttcgctc tccaaagtag 5760
 atacctccga cgagctctcg gacaatgatg aagtcggtgc cctcaacgtt tcggatgggg 5820
 gagagatcgg cgagcttggg cgacagcagc tggcagggtc gcaggttggc gtacaggttc 5880
 aggtcctttc gcagcttgag gagaccctgc tcgggtcgca cgtcggttcg tccgtcggga 5940
 gtggtccata cgggtgttggc agcgcctccg acagcaccga gcataataga gtcagccttt 6000
 cggcagatgt cgagagtagc gtcggtgatg ggctcgccct cctttctcaat ggcagctcct 6060
 ccaatgagtc ggtcctcaaa cacaaactcg gtgccggagg cctcagcaac agacttgagc 6120
 accttgacgg cctcggcaat cacctcgggg ccacagaagt cgccgccgag aagaacaatc 6180
 ttcttgaggt cagtcttggt cttcttagtt tcgggttcca ttgtggatgt gtgtggttgt 6240
 atgtgtgatg tgggtgtgtg agtgaaaatc tgtggttggc aaacgctctt gtatatatac 6300
 gcacttttgc ccgtgctatg tggaagacta aacctccgaa gattgtgact caggtagtgc 6360
 ggtatcggct agggaccaa accttgctga tgccgatagc gctatcgaac gtaccccagc 6420
 cggccgggag tatgtcggag gggacatacg agatcgtcaa gggtttgtgg ccaactggta 6480
 aatttaaagt atgtcgacgc agtaggatgt cctgcacggg tctttttgtg ggggtgtggag 6540
 aaaggggtgc ttggagatgg aagccggtag aaccgggctg cttgtgcttg gagatggaag 6600
 ccggtagaac cgggctgctt ggggggattt ggggcccgtg ggctccaaag aggggtaggc 6660
 atttcgttgg ggttacgtaa ttgcggcatt tgggtcctgc gcgcatgtcc cattggtcag 6720
 aattagtcgg gataggagac ttatcagcca atcacagcgc cggatccacc tgtaggttgg 6780

gttgggtggg agcaccctc cacagagtag agtcaaacag cagcagcaac atgatagttg	6840
ggggtgtgcg tgttaaagga aaaaaaagaa gcttgggtta tattcccgct ctatttagag	6900
gttgcgggat agacgccgac ggagggcaat ggcgccatgg aaccttgcg ataatcgatac	6960
gccgcggcgg actgcgtccg aaccagctcc agcagcgttt tttccgggcc attgagccga	7020
ctgcgacccc gccaacgtgt cttggccccc gcactcatgt catgttggtg ttgggaggcc	7080
actttttaag tagcacaagg cacctagctc gcagcaaggt gtccgaacca aagaagcggc	7140
tgcagtgggtg caaacggggc ggaaacggcg ggaaaaagcc acggggggcac gaattgaggc	7200
acgccctcga atttgagacg agtcacggcc ccattcgccc gcgcaatggc tcgccaacgc	7260
ccggtctttt gcaccacatc aggttacccc aagccaaacc tttgtgttaa aaagcttaac	7320
atattatacc gaacgtaggt ttgggcgggc ttgctccgtc tgtccaaggc aacatttata	7380
taagggtctg catcgccggc tcaattgaat cttttttctt cttctcttct ctatattcat	7440
tcttgaatta aacacacatc aatccatggc aaacagcagc gtgtgggatg atgtgggtgg	7500
ccgcgtggag accggcgtgg accagtggat ggatggcgcc aagccgtacg cactcaccga	7560
tgggctcccg atgatggacg tgtccaccat gctggcattc gaggtgggat acatggccat	7620
gctgctcttc ggcattccga tcatgaagca gatggagaag ccttttgagc tcaagaccat	7680
caagctcttg cacaacttgt ttctcttcgg actttccttg tacatgtgcg tggagaccat	7740
ccgccaggct atcctcggag gctacaaagt gtttggaac gacatggaga agggcaacga	7800
gtctcatgct cagggcatgt ctgcgcatgt gtacgtgttc tacgtgtcca aggcatacga	7860
gttcttggat accgccatca tgatcctttg caagaagttc aaccagggtt ccttcttgca	7920
tgtgtaccac catgcccactc atttttgcca tctggtgggc tatccgccaa gtacgttcca	7980
ggaggtgatg cgtacttttt cagtgatcct caactctttc gtgcacaccg tcatgtacgg	8040
catactactt cttctcctcc caagggttcg ggttcgtgaa gccaatcaag ccgtacatca	8100
ccacccttca gatgaccagc ttcattggca tgcttgtgca gtccttgtac gactacctct	8160
tcccatgcga ctaccacagc gctcttgtgc agctccttgg agtgtacatg atcaccttgc	8220
ttgccctctt cggcaacttt tttgtgcaga gctatcttaa aaagccaaaa aagagcaaga	8280
ccaactaaaa ctgcctgcat gatatgccgc tcgcggcggt tcgaattgac tcagaaagcg	8340
agttaaggcg acacgcaaac tctatatattt ttcaaactgt ttgccgtcac tcatcgcca	8400
tctgtttact acgtgtctgt tcaatgagca tgttcttgaa tctaaagaat ctcgaatgtt	8460
ttttaaaaaa agaattcgat atcaagctta cgcgtcgacc cgggtggacg tctagaggta	8520
cctagcaatt aacagatagt ttgccggtga taattctctt aacctccac actcctttga	8580

cataacgatt tatgtaacga aactgaaatt tgaccagata ttgtgtccgc 8630

<210> 73
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер GPDsense

<400> 73
 atacgagatc gtcaaggg 18

<210> 74
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер GPDantisense

<400> 74
 gcggccgcgg attgatgtgt gtttaa 26

<210> 75
 <211> 6339
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмида pKR136

<220>
 <221> разный признак
 <222> (4078)..(4078)
 <223> n представляет собой а, с, г или т

<400> 75
 ggccgcgaca caagtgtgag agtactaaat aaatgctttg gttgtacgaa atcattacac 60
 taaataaaat aatcaaagct tatatatgcc ttccgctaag gccgaatgca aagaaattgg 120
 ttctttctcg ttatcttttg ccacttttac tagtacgtat taattactac ttaatcatct 180
 ttgttttacgg ctcatatat ccgtagctcg agtcgacctg caggcatgca agcttggcgt 240
 aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca 300
 tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat 360
 taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt 420
 aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat tgggcgctct tccgcttcc 480
 cgctcactga ctgcgtgcgc tcggtcggtc ggctgcggcg agcgggtatca gctcactcaa 540
 aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa 600

aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggtt gctggcggttt ttccataggc	660
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg cgaaacccga	720
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc	780
cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcggttt	840
ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct	900
gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg	960
agccaacccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta	1020
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct	1080
acactagaag gacagtatctt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa	1140
gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt	1200
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta	1260
cgggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat	1320
caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa	1380
gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtga gcacctatct	1440
cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta	1500
cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca gaccacgct	1560
caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggccgag cgcagaagtg	1620
gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa	1680
gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtgggtg	1740
cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta	1800
catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca	1860
gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta	1920
ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct	1980
gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg	2040
cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac	2100
tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact	2160
gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa	2220
atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt	2280
ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat	2340
gtattttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg	2400

acgtctaaga	aaccattatt	atcatgacat	taacctataa	aaataggcgt	atcacgaggc	2460
cctttcgtct	cgcgcgtttc	ggtgatgacg	gtgaaaacct	ctgacacatg	cagctcccgg	2520
agacggtcac	agcttgctcg	taagcggatg	ccgggagcag	acaagcccgt	cagggcgcgt	2580
cagcgggtgt	tggcgggtgt	cggggctggc	ttactatg	ggcatcagag	cagattgtac	2640
tgagagtgc	ccatattg	tgtgaaatac	cgcacagatg	cgtaaggaga	aaataccgca	2700
tcaggcgcca	ttcgccattc	aggctgcgca	actgttggga	aggcgatcg	gtgcgggcct	2760
cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaagggg	gatgtgctgc	aaggcgatta	agttgggtaa	2820
cgccagggtt	ttcccagtca	cgacgttgta	aaacgacggc	cagtgaattc	gagctcggta	2880
ccgggggatc	ctctagacgt	acgtcctcga	agagaagggt	taataacaca	ttttttaaca	2940
tttttaacac	aaatttttagt	tatttaaaaa	tttattaaaa	aatttaaaat	aagaagagga	3000
actcttttaa	taaatctaac	ttacaaaatt	tatgattttt	aataagtttt	caccaataaa	3060
aaatgtcata	aaaatatgtt	aaaaagtata	ttatcaatat	tctctttatg	ataaataaaa	3120
agaaaaaaaa	aataaaaagt	aagtgaaaat	gagattgaag	tgactttagg	tgtgtataaa	3180
tatatcaacc	ccgccaacaa	tttattttaat	ccaaatatat	tgaagtatat	tattccatag	3240
cctttatttta	tttatatatt	tattatataa	aagctttatt	tgttctaggt	tgttcatgaa	3300
atattttttt	ggttttatct	ccgttgtaag	aaaatcatgt	gctttgtgtc	gccactcact	3360
attgcagctt	tttcatgcat	tggtcagatt	gacggttgat	tgtatttttg	ttttttatgg	3420
ttttgtgtta	tgacttaagt	cttcatctct	ttatctcttc	atcaggtttg	atgggttacct	3480
aatatgggtc	atgggtacat	gcatgggtta	attaggtggc	caactttggt	gtgaacgata	3540
gaattttttt	tatattaagt	aaactatttt	tatattatga	aataataata	aaaaaaatat	3600
tttatcatta	ttaacaaaat	catattagtt	aatttggtta	ctctataata	aaagaaatac	3660
tgtaacattc	acattacatg	gtaacatctt	tccacccttt	catttgtttt	ttgtttgatg	3720
actttttttc	ttgtttaaat	ttatttccct	tcttttaaat	ttggaataca	ttatcatcat	3780
atataaacta	aaatactaaa	aacaggatta	cacaaatgat	aaataataac	acaaatattt	3840
ataaatctag	ctgcaatata	tttaaaactag	ctatatcgat	attgtaaaat	aaaactagct	3900
gcattgatac	tgataaaaaa	atatcatgtg	ctttctggac	tgatgatgca	gtatactttt	3960
gacattgcct	ttattttatt	tttcagaaaa	gctttcttag	ttctgggttc	ttcattattt	4020
gtttcccatc	tccattgtga	attgaatcat	ttgcttcgtg	tcacaaatac	aatttagnta	4080
ggtacatgca	ttggtcagat	tcacggttta	ttatgtcatg	acttaagttc	atggtagtac	4140
attacctgcc	acgcatgcat	tatattgggt	agatttgata	ggcaaatttg	gttgtcaaca	4200
atataaatat	aaataatgtt	tttatattac	gaaataacag	tgatcaaaac	aaacagtttt	4260

atctttatta	acaagatttt	gtttttgttt	gatgacgttt	tttaatgttt	acgctttccc	4320
ccttcttttg	aatttagaac	actttatcat	cataaaatca	aataactaaa	aaattacata	4380
tttcataaat	aataacacaa	atatttttaa	aaaatctgaa	ataataatga	acaatattac	4440
atattatcac	gaaaattcat	taataaaaaat	attatataaa	taaaatgtaa	tagtagttat	4500
atgtaggaaa	aaagtactgc	acgcataata	tatacaaaaa	gattaaaatg	aactattata	4560
aataataaca	ctaaattaat	ggtgaatcat	atcaaaaata	tgaaaaagta	aataaaattt	4620
gtaattaact	tctatatgta	ttacacacac	aaataataaa	taatagtaaa	aaaaattatg	4680
ataaatattt	accatctcat	aagatattta	aaataatgat	aaaaatatag	attatTTTTT	4740
atgcaactag	ctagccaaaa	agagaacacg	ggtatatata	aaaagagtac	ctttaaattc	4800
tactgtactt	cctttattcc	tgacgttttt	atatcaagtg	gacatacgtg	aagattttta	4860
ttatcagtct	aaatatTTTca	ttagcaactta	atacttttct	gttttattcc	tatcctataa	4920
gtagtcccga	ttctcccaac	attgcttatt	cacacaacta	actaagaaag	tcttccatag	4980
cccccaagc	ggccgcatgg	gaacggacca	aggaaaaacc	ttcacctggg	aagagctggc	5040
ggcccataac	accaaggacg	acctactctt	ggccatccgc	ggcaggggtg	acgatgtcac	5100
aaagttcttg	agccgccatc	ctggtggagt	ggacactctc	ctgctcggag	ctggccgaga	5160
tgttactccg	gtctttgaga	tgtatcacgc	gtttggggct	gcagatgcca	ttatgaagaa	5220
gtactatgtc	ggtacactgg	tctcgaatga	gctgcccato	ttcccggagc	caacggtggt	5280
ccacaaaacc	atcaagacga	gagtcgaggg	ctactttacg	gatcggaaca	ttgatcccaa	5340
gaatagacca	gagatctggg	gacgatacgc	tcttatcttt	ggatccttga	tcgcttccta	5400
ctacgcgcag	ctctttgtgc	ctttcgttgt	cgaacgcaca	tggcttcagg	tggtgtttgc	5460
aatcatcatg	ggatttgctg	gcgcacaaat	cggactcaac	cctcttcatg	atgcgtctca	5520
cttttcagtg	accacaaacc	ccactgtctg	gaagattctg	ggagccacgc	acgacttttt	5580
caacggagca	tcgtacctgg	tgtggatgta	ccaacatatg	ctcggccatc	accctacac	5640
caacattgct	ggagcagatc	ccgacgtgtc	gacgtctgag	cccgatgttc	gtcgtatcaa	5700
gcccaccaa	aagtggtttg	tcaaccacat	caaccagcac	atgtttgttc	ctttcctgta	5760
cggactgctg	gcgttcaagg	tgcgcatcca	ggacatcaac	attttgtact	ttgtcaagac	5820
caatgacgct	attcgtgtca	atcccatctc	gacatggcac	actgtgatgt	tctggggcgg	5880
caaggctttc	tttgtctggg	atcgctgat	tgttcccctg	cagtatctgc	ccctgggcaa	5940
ggtgctgctc	ttgttcacgg	tcgcggaacat	ggtgtcgtct	tactggctgg	cgctgacctt	6000
ccaggcgaac	cacgttggtg	aggaagttca	gtggccggtg	cctgacgaga	acgggatcat	6060

ccaaaaggac tgggcagcta tgcaggtcga gactacgcag gattacgcac acgattcgca 6120
 cctctggacc agcatcactg gcagcttgaa ctaccaggct gtgcaccatc tgttcccca 6180
 cgtgtcgcag caccattatc ccgatattct ggccatcatc aagaacacct gcagcgagta 6240
 caaggttcca taccttgtca aggatacggt ttggcaagca tttgcttcac atttgagca 6300
 cttgcgtggt cttggactcc gtcccaagga agagtaggc 6339

<210> 76
 <211> 8319
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмида pY98

<400> 76
 ggccgccacc gcggcccgag attccggcct cttcgccgc caagcgacc gggaggacgt 60
 ctagaggtag ctagcaatta acagatagtt tgccggtagt aattctctta acctcccaca 120
 ctcttttgac ataacgattt atgtaacgaa actgaaattt gaccagatat tgtgtccgcg 180
 gtggagctcc agcttttggt cccttttagtg aggggttaatt tcgagcttgg cgtaatcatg 240
 gtcatactgt tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acgtacgagc 300
 cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc 360
 gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaataat 420
 cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggggcg tcttccgctt cctcgctcac 480
 tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggtc tcagctcact caaaggcggt 540
 aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaggcca 600
 gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc 660
 ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact 720
 ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcggt cgctctcctg ttccgacctt 780
 gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcg tttctcatag 840
 ctacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcggttcg tccaagctgg gctgtgtgca 900
 cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa 960
 cccggtgaaga cagacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 1020
 gaggtatgta ggcgggtgta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag 1080
 aaggacagta tttgggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg 1140
 tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt ggtttttttg tttgcaagca 1200
 gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc 1260

tgacgctcag	tggaacgaaa	actcacgtta	agggatTTTTg	gtcatgagat	tatcaaaaag	1320
gatcttcacc	tagatccttt	taaattaaaa	atgaagTTTT	aaatcaatct	aaagtatata	1380
tgagtaaact	tggctcgaca	gttaccaatg	cttaatcagt	gaggcaccta	tctcagcgat	1440
ctgtctatTT	cgttcatcca	tagttgcctg	actccccgtc	gtgtagataa	ctacgatacg	1500
ggagggctta	ccatctggcc	ccagtgtctg	aatgataccg	cgagaccac	gctcaccggc	1560
tccagattta	tcagcaataa	accagccagc	cggaagggcc	gagcgcagaa	gtggtcctgc	1620
aacttttatcc	gcctccatcc	agtctattaa	ttgttgccgg	gaagctagag	taagtagttc	1680
gccagttaat	agtttgcgca	acgttggtgc	cattgctaca	ggcatcgtgg	tgtcacgctc	1740
gtcgttttgg	atggcttcat	tcagctccgg	ttcccaacga	tcaaggcgag	ttacatgatc	1800
ccccatgttg	tgcaaaaaag	cggttagctc	cttcggctct	ccgatcgttg	tcagaagtaa	1860
gttggccgca	gtgttatcac	tcatggttat	ggcagcactg	cataattctc	ttactgtcat	1920
gccatccgta	agatgctttt	ctgtgactgg	tgagtactca	accaagtcac	tctgagaata	1980
gtgtatgcgg	cgaccgagtt	gctcttgccc	ggcgtcaata	cgggataata	ccgcgccaca	2040
tagcagaact	ttaaaagtgc	tcatcattgg	aaaacgttct	tcggggcgaa	aactctcaag	2100
gatcttaccg	ctgttgagat	ccagttcgat	gtaaccact	cgtgcacca	actgatcttc	2160
agcatctttt	actttcacca	gcgtttctgg	gtgagcaaaa	acaggaaggc	aaaatgccgc	2220
aaaaaaggga	ataagggcga	cacggaaatg	ttgaatactc	atactcttcc	tttttcaata	2280
ttattgaagc	atttatcagg	gttattgtct	catgagcgga	tacatatTTg	aatgtattta	2340
gaaaaataaa	caaatagggg	ttccgcgcac	atttccccga	aaagtgccac	ctgacgcgcc	2400
ctgtagcggc	gcattaagcg	cggcgggtgt	ggtgggttac	cgagcgtga	ccgctacact	2460
tgccagcgcc	ctagcgcccc	ctcctttcgc	ttctctccct	tcctttctcg	ccacgttcgc	2520
cggctttccc	cgtcaagctc	taaatcgggg	gtccctttta	gggttccgat	ttagtgtttt	2580
acggcacctc	gaccccaaaa	aacttgatta	gggtgatggg	tcacgtagtg	ggccatcgcc	2640
ctgatagacg	gtttttcgcc	ctttgacgtt	ggagtccacg	ttctttaata	gtggactctt	2700
gttccaaaact	ggaacaacac	tcaaccctat	ctcgggtctat	tcttttgatt	tataagggat	2760
tttgccgatt	tcggcctatt	ggttaaaaaa	tgagctgatt	taacaaaaat	ttaacgcgaa	2820
ttttaacaaa	atattaacgc	ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	2880
gaagggcgat	cggtgcgggc	ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	2940
gcaaggcgat	taagttgggt	aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	3000
gccagtgaat	tgtaatacga	ctcactatag	ggcgaattgg	gtaccggggc	cccctcgag	3060

gtcgaagggtg	tcgataagct	tgatatcgaa	ttcatgtcac	acaaaccgat	cttcgcctca	3120
aggaaaccta	attctacatc	cgagagactg	ccgagatcca	gtctacactg	attaattttc	3180
gggccaataa	tttaaaaaaa	tcgtgttata	taatattata	tgtattatat	atatacatca	3240
tgatgatact	gacagtcattg	tcccattgct	aaatagacag	actccatctg	ccgcctccaa	3300
ctgatgttct	caatatTTaa	ggggtcattct	cgcattgttt	aataataaac	agactccatc	3360
taccgcctcc	aaatgatgtt	ctcaaaaatat	attgtatgaa	cttatttttta	ttacttagta	3420
ttattagaca	acttacttgc	tttatgaaaa	acacttccta	tttaggaaac	aattttataat	3480
ggcagttcgt	tcatttaaca	atTTatgtag	aataaatgtt	ataaatgcgt	atgggaaatc	3540
ttaaatatgg	atagcataaa	tgatatctgc	attgcctaata	tcgaaatcaa	cagcaacgaa	3600
aaaaatccct	tgtacaacat	aaatagtcatt	cgagaaatat	caactatcaa	agaacagcta	3660
ttcacacgtt	actattgaga	ttattattgg	acgagaatca	cacactcaac	tgtctttctc	3720
tcttctagaa	atacaggtac	aagtatgtac	tattctcatt	gttcatactt	ctagtcattt	3780
catcccat	attccttTga	tttctctcca	atgaatgaca	ttctatcttg	caaattcaac	3840
aattataata	agatatacca	aagtagcggg	atagtggcaa	tcaaaaagct	tctctgggtg	3900
gcttctcgta	tttatttttta	ttctaattgat	ccattaaagg	tatatatttta	tttcttTgta	3960
tataatcctt	ttgtttatta	catgggctgg	atacataaag	gtattttgat	ttaatTTTTt	4020
gcttaaatc	aatccccct	cgttcagtgt	caactgtaata	ggtaggaaat	taccatactt	4080
ttgaagaagc	aaaaaaaaatg	aaagaaaaaa	aaaatcgtat	ttccagggtta	gacgttccgc	4140
agaatctaga	atgcggtatg	cgggtacattg	ttcttcgaac	gtaaaagttg	cgctccctga	4200
gatattgtac	atTTTTgctt	ttacaagtac	aagtacatcg	tacaactatg	tactactgtt	4260
gatgcattca	caacagtttg	ttttgttttt	ttttgttttt	tttttttcta	atgattcatt	4320
accgctatgt	atactactt	gtacttTtag	taagccgggt	tattggcggt	caattaatca	4380
tagacttatg	aatctgcacg	gtgtgcgctg	cgagttactt	ttagcttatg	catgctactt	4440
gggtgtaata	ttgggatctg	ttcggaatac	aacggatgct	caaccgattt	cgacagtaata	4500
taattaagtc	atacacaagt	cagctttctt	cgagcctcat	ataagtataa	gtagttcaac	4560
gtattagcac	tgtacccagc	atctccgtat	cgagaaacac	aacaacatgc	ccattTggac	4620
agatcatgcg	gatacacagg	ttgtgcagta	tcatacatat	tcgatcagac	aggTcgctctg	4680
accatcatat	aagctgaaca	agcgctccat	acttgcacgc	tctctatata	cacagttaaa	4740
ttacatatcc	atagtctaac	ctctaacagt	taatcttctg	gtaagcctcc	cagccagcct	4800
tctggtatcg	cttggcctcc	tcaataggat	ctcggttctg	gccgtacaga	cctcggccga	4860
caattatgat	atccgttccg	gtagacatga	catcctcaac	agttcggtac	tgctgtccga	4920

gagcgtctcc	cttgtcgtca	agacccaccc	cggggggtcag	aataagccag	tcctcagagt	4980
cgcccttagg	tcggttcttg	gcaatgaagc	caaccacaaa	ctcgggggtcg	gacggggcaa	5040
gctcaatggg	ctgcttgagg	tactcgccag	tggccagaga	gcccttgcaa	gacagctcgg	5100
ccagcatgag	cagacctctg	gccagcttct	cgttgggaga	ggggactagg	aactccttgt	5160
actgggagtt	ctcgtagtca	gagacgtcct	ccttcttctg	ttcagagaca	gtttcctcgg	5220
caccagctcg	caggccagca	atgattccgg	ttccgggtac	accgtgggcg	ttggtgatat	5280
cggaccactc	ggcgattcgg	tgacaccggg	actggtgctt	gacagtgttg	ccaatatctg	5340
cgaactttct	gtcctcgaac	aggaagaaac	cgtgcttaag	agcaagttcc	ttgaggggga	5400
gcacagtgcc	ggcgtaggtg	aagtcgtcaa	tgatgtcgat	atgggttttg	atcatgcaca	5460
cataagggtcc	gaccttatcg	gcaagctcaa	tgagctcctt	ggtgggtggta	acatccagag	5520
aagcacacag	gttggttttc	ttggctgcc	cgagcttgag	cactcgagcg	gcaaaggcgg	5580
acttgtggac	gttagctcga	gcttcgtagg	agggcatttt	ggtggtgaag	aggagactga	5640
aataaattta	gtctgcagaa	ctttttatcg	gaaccttata	tggggcagtg	aagtatatgt	5700
tatggtaata	gttacgagtt	agttgaactt	atagatagac	tggactatac	ggctatcggg	5760
ccaaattaga	aagaacgtca	atggctctct	gggcgtcgcc	tttgccgaca	aaaatgtgat	5820
catgatgaaa	gccagcaatg	acgttgacgc	tgatattggt	gtcggccaac	cgcgccgaaa	5880
acgcagctgt	cagaccaca	gcctccaacg	aagaatgtat	cgtcaaagtg	atccaagcac	5940
actcatagtt	ggagtcgtac	tccaaaggcg	gcaatgacga	gtcagacaga	tactcgtcga	6000
cgcagtagga	tgtcctgcac	gggtcttttt	gtgggggtgtg	gagaaagggg	tgcttgagga	6060
tggaagccgg	tagaaccggg	ctgcttggtg	ttggagatgg	aagccggtag	aaccgggctg	6120
cttgggggga	tttggggccg	ctgggctcca	aagaggggta	ggcatttcgt	tggggttacg	6180
taattgcggc	atttgggtcc	tgcgcgcatg	tcccattggg	cagaattagt	ccggatagga	6240
gacttatcag	ccaatcacag	cgccggatcc	acctgtaggt	tgggttgggg	gggagcacc	6300
ctccacagag	tagagtcaaa	cagcagcagc	aacatgatag	ttgggggtgt	gcgtgttaaa	6360
ggaaaaaaaa	gaagcttggg	ttatatccc	gctctattta	gaggttgcgg	gatagacgcc	6420
gacggagggc	aatggcgcca	tggaaccttg	cggatatcga	tacgccgcgg	cggactgcgt	6480
ccgaaccagc	tccagcagcg	ttttttccgg	gccattgagc	cgactgcgac	cccgccaacg	6540
tgtcttgggc	cacgcactca	tgtcatgttg	gtgttgggag	gccacttttt	aagtagcaca	6600
aggcacctag	ctcgcagcaa	ggtgtccgaa	ccaaagaagc	ggctgcagtg	gtgcaaacgg	6660
ggcggaacg	gcgggaaaaa	gccacggggg	cacgaattga	ggcacgccct	cgaatttgag	6720

acgagtcacg gccccattcg cccgcgcaat ggctcgccaa cgcccgggtct tttgcaccac 6780
 atcagggttac cccaagccaa acctttgtgt taaaaagctt aacatattat accgaacgta 6840
 ggtttgggcg ggcttgctcc gtctgtccaa ggcaacattt atataaggggt ctgcatcgcc 6900
 ggctcaattg aatctttttt cttcttctct tctctatatt cattcttgaa ttaaacacac 6960
 atcaatccgc ggccgcatgg gaacggacca aggaaaaacc ttcacctggg aagagctggc 7020
 ggcccataac accaaggacg acctactctt ggccatccgc ggcaagggtgt acgatgtcac 7080
 aaagttcttg agccgccatc ctggtggagt ggacactctc ctgctcgag ctggccgaga 7140
 tgttactccg gtctttgaga tgtatcacgc gtttggggct gcagatgcca ttatgaagaa 7200
 gtactatgtc ggtacactgg tctcgatga gctgccatc ttcccggagc caacgggtgtt 7260
 ccacaaaacc atcaagacga gaggcgagg ctactttacg gatcggaaca ttgatcccaa 7320
 gaatagacca gagatctggg gacgatacgc tcttatcttt ggatccttga tcgcttccta 7380
 ctacgcgcag ctctttgtgc ctttcgttgt cgaacgcaca tggcttcagg tgggtgtttgc 7440
 aatcatcatg ggatttgctg gcgcacaagt cggactcaac cctcttcatg atgcgtctca 7500
 cttttcagtg acccacaacc ccactgtctg gaagattctg ggagccacgc acgacttttt 7560
 caacggagca tcgtacctgg tgtggatgta ccaacatatg ctcggccatc acccctacac 7620
 caacattgct ggagcagatc ccgacgtgtc gacgtctgag cccgatgttc gtcgtatcaa 7680
 gcccaccaa aagtgggttg tcaaccacat caaccagcac atgtttgttc ctttcctgta 7740
 cggactgctg gcgttcaagg tgcgcattca ggacatcaac attttgtact ttgtcaagac 7800
 caatgacgct attcgtgtca atcccatctc gacatggcac actgtgatgt tctggggcgg 7860
 caaggctttc tttgtctggg atcgccatgat tgttcccctg cagtatctgc ccctgggcaa 7920
 ggtgctgctc ttgttcacgg tcgcggacat ggtgtcgtct tactggctgg cgctgacctt 7980
 ccaggcgaac cacgttggtg aggaagttca gtggccgttg cctgacgaga acgggatcat 8040
 ccaaaaggac tgggcagcta tgcaggtcga gactacgcag gattacgcac acgattcgca 8100
 cctctggacc agcatcactg gcagcttgaa ctaccaggct gtgcaccatc tgttcccaa 8160
 cgtgtcgag caccattatc ccgatattct ggccatcatc aagaacacct gcagcgagta 8220
 caaggttcca taccttgtca aggatacgtt ttggcaagca tttgcttcac atttgagca 8280
 cttgcgtgtt cttggactcc gtcccaagga agagtaggc 8319

<210> 77

<211> 774

<212> ДНК

<213> *Euglena gracilis*

<400> 77

atggaggtgg tgaatgaaat agtctcaatt gggcaggaag ttttacccaa agttgattat 60
 gcccaactct ggagtgatgc cagtcactgt gaggtgcttt acttgtccat cgcatttgtc 120
 atcttgaagt tcaactcttg cccctctggg ccaaaagggtc agtctcgtat gaagtttggt 180
 ttcaccaatt acaaccttct catgtccatt tattcgttgg gatcattcct ctcaatggca 240
 tatgccatgt acaccatcgg tgttatgtct gacaactgcg agaaggcttt tgacaacaac 300
 gtcttcagga tcaccacgca gttgttctat ttgagcaagt tcctggagta tattgactcc 360
 ttctatttgc cactgatggg caagcctctg acctggttgc aattcttcca tcatttgggg 420
 gcaccgatgg atatgtggct gttctataat taccgaaatg aagctgtttg gatTTTTgtg 480
 ctgttgaatg gtttcatcca ctggatcatg tacggttatt attggaccag attgatcaag 540
 ctgaagttcc ccatgccaaa atccctgatt acatcaatgc agatcattca attcaatgtt 600
 ggtttctaca ttgtctggaa gtacaggaac attccctgtt atcgccaaga tgggatgagg 660
 atgtttggct ggttcttcaa ttacttttat gttggcacag tcttgtgttt gttcttgaat 720
 ttctatgtgc aaacgtatat cgtcaggaag cacaaggag ccaaaaagat tcag 774

<210> 78

<211> 1263

<212> ДНК

<213> *Euglena gracilis*

<400> 78

atgaagtcaa agcgccaagc gcttccccctt acaattgatg gaacaacata tgatgtgtct 60
 gcctgggtca atttccaccc tgggtggtgcg gaaattatag agaattacca aggaagggat 120
 gccactgatg ccttcatggt tatgcactct caagaagcct tcgacaagct caagcgcag 180
 cccaaaatca atcccagttc tgagttgcca cccagggctg cagtgaatga agctcaagag 240
 gatttccgga agctccgaga agagttgatc gcaactggca tgtttgatgc ctccccctc 300
 tggactcat acaaaatcag caccacactg ggccttgag tgctgggtta tttcctgatg 360
 gttcagtatc agatgtatct cattggggca gtgttgcttg ggatgcacta tcaacagatg 420
 ggctggcttt ctcatgacat ttgccaccac cagactttca agaaccggaa ctggaacaac 480
 ctctgtgggac tggatatttg caatggtctg caagggtttt ccgtgacatg gtggaaggac 540
 agacacaatg cacatcattc ggcaaccaat gttcaagggc acgacctga tattgacaac 600
 ctccccctct tagcctggtc tgaggatgac gtcacacggg cgtcacccgat ttcccgaag 660
 ctcatcagc tccagcagta ctatttcttg gtcactctgta tcttgttgcg gttcatttgg 720
 tgtttccaga gcgtgttgac cgtgcgcagt ttgaaggaca gagataacca attctatcgc 780
 tctcagtata agaaggaggc cattggcctc gccctgcact ggaccttgaa gacctgttc 840

```

cacttattct ttatgcccag catcctcaca tcgctgttgg tgtttttcgt ttcggagctg      900
gttggcggct tcggcattgc gatcgtggtg ttcattgaacc actaccact ggagaagatc      960
ggggactcag tctgggatgg ccatggattc tcggttggcc agatccatga gaccatgaac     1020
attcggcgag ggattatcac agattggttt ttcggaggct tgaattacca gattgagcac     1080
catttgtggc cgaccctccc tcgccacaac ctgacagcgg ttagctacca ggtggaacag     1140
ctgtgccaga agcacaacct gccgtatcgg aaccgcgtgc cccatgaagg gttggtcatc     1200
ctgctgcgct atctggcggg gttcgcccgg atggcggaga agcaaccgcg ggggaaggct     1260
cta                                                                    1263

```

```

<210> 79
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Праймер оЕugEL1-1

```

```

<400> 79
agcgccgca ccatggagggt ggtgaatgaa                                     30

```

```

<210> 80
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Праймер оЕugEL1-2

```

```

<400> 80
tgcgccgct cactgaatct ttttggctcc                                     30

```

```

<210> 81
<211> 4311
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Плазмида рKR906

```

```

<400> 81
agcgccgca ccatggagggt ggtgaatgaa atagtctcaa ttgggcagga agttttaccc      60
aaagttgatt atgcccaact ctggagtgat gccagtcact gtgagggtgct ttacttgtcc     120
atcgcatctt tcactctgaa gttcactctt gggcccccttg gtccaaaagg tcagtctcgt     180
atgaagtttg ttttcaccaa ttacaacctt ctcatgtcca tttattcggt gggatcattc     240
ctctcaatgg catatgccat gtacaccatc ggtgttatgt ctgacaactg cgagaaggct     300
tttgacaaca acgtcttcag gatcaccacg cagttgttct atttgagcaa gttcctggag     360

```

tatattgact ccttctatth gccactgatg ggcaagcctc tgacctgggt gcaattcttc	420
catcatttgg gggcaccgat ggatatgtgg ctgttctata attaccgaaa tgaagctggt	480
tggatttttg tgctgttgaa tggtttctac cactggatca tgtacgggta ttattggacc	540
agattgatca agctgaagtt ccccatgcc aatccctga ttacatcaat gcagatcatt	600
caattcaatg ttggtttcta cattgtctgg aagtacagga acattccctg ttatcgccaa	660
gatgggatga ggatgtttgg ctggttcttc aattactttt atgttggcac agtcttgtgt	720
ttgttcttga atttctatgt gcaaacgtat atcgtcagga agcacaaggg agccaaaaag	780
attcagtgag cggcgcacc tgaattccag cacactggcg gccgttacta gtggatccga	840
gctcgggtacc aagcttgatg catagcttga gtattctaac gcgtcaccta aatagcttgg	900
cgtaatcatg gtcatactg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca	960
acatacagag cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagt agctaactca	1020
cattaattgc gttgcgtca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc	1080
attaatgaat cggccaacgc ggggggagag gcgggttgcg tattggggcg tcttccgctt	1140
cctcgtcac tgactcgtg cgtcgggtcg ttcgggtcg gcgagcggta tcagctcact	1200
caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa gcgaggaaag aacatgtgag	1260
caaaaggcca gcaaaagccc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata	1320
ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc	1380
cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg	1440
ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcg	1500
tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg	1560
gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggg aactatcgtc	1620
ttgagtccaa cccggtgaaga cagacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga	1680
ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg	1740
gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgtctgct gaagccagtt accttcggaa	1800
aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg	1860
tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt	1920
ctacgggggtc tgacgtcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat	1980
tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt agcacgtgtc	2040
agtctgtctc ctggccacg aagtgcacgc agttgccggc cgggtcgcgc agggcgaaact	2100
cccgccccca cggctgctcg ccgatctcgg tcatggccgg cccggaggcg tcccgggaagt	2160

tcgtggacac	gacctccgac	cactcggcgt	acagctcgtc	caggccgcgc	acccacaccc	2220
aggccagggg	gttgtccggc	accacctggg	cctggaccgc	gctgatgaac	agggtcacgt	2280
cgtccccggc	cacaccggcg	aagtcgtcct	ccacgaagtc	ccgggagaac	ccgagccggg	2340
cgggccagaa	ctcgaccgct	ccggcgacgt	cgcgcgcggt	gagcaccgga	acggcactgg	2400
tcaacttggc	catggtggcc	ctcctcacgt	gctattattg	aagcatttat	cagggttatt	2460
gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	ggggttccgc	2520
gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgtat	gcggtgtgaa	ataccgcaca	gatgcgtaag	2580
gagaaaatac	cgcatacagga	aattgtaagc	gttaataatt	cagaagaact	cgtcaagaag	2640
gcgatagaag	gcgatgcgct	gcgaatcggg	agcggcgata	ccgtaaagca	cgaggaagcg	2700
gtcagcccat	tcgccgccaa	gctcttcagc	aatatcacgg	gtagccaacg	ctatgtcctg	2760
atagcgggtc	gccacaccca	gccggccaca	gtcgatgaat	ccagaaaagc	ggccattttc	2820
caccatgata	ttcggcaagc	aggcatcgcc	atgggtcacg	acgagatcct	cgccgtcggg	2880
catgctcgcc	ttgagcctgg	cgaacagttc	ggctggcgcg	agcccctgat	gctcttcgtc	2940
cagatcatcc	tgatcgacaa	gaccgggttc	catccgagta	cgtgctcgct	cgatgcgatg	3000
tttcgcttgg	tggtcgaatg	ggcaggtagc	cggatcaagc	gtatgcagcc	gccgcattgc	3060
atcagccatg	atggatactt	tctcggcagg	agcaagggtga	gatgacagga	gatcctgccc	3120
cggcacttcg	cccaatagca	gccagtcctt	tcccgttca	gtgacaacgt	cgagcacagc	3180
tgcgcaagga	acgcccgtcg	tggccagcca	cgatagccgc	gctgcctcgt	cttgagtttc	3240
attcagggca	ccggacaggt	cggctcttgac	aaaaagaacc	gggcgcccct	gcgctgacag	3300
ccggaacacg	gcggcatcag	agcagccgat	tgtctgttgt	gccagtcac	agccgaatag	3360
cctctccacc	caagcggccg	gagaacctgc	gtgcaatcca	tcttgttcaa	tcatgcgaaa	3420
cgatcctcat	cctgtctctt	gatcagagct	tgatcccctg	cgccatcaga	tccttggcgg	3480
cgagaaagcc	atccagttta	ctttgcaggg	cttcccaacc	ttaccagagg	gcgccccagc	3540
tggcaattcc	ggttcgcttg	ctgtccataa	aaccgcccag	tctagctatc	gccatgtaag	3600
cccactgcaa	gctacctgct	ttctctttgc	gcttgcgttt	tcccttgtec	agatagccca	3660
gtagctgaca	ttcatccggg	gtcagcaccg	tttctgcgga	ctggctttct	acgtgaaaag	3720
gatctagggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgcctgac	atttatattc	cccagaacat	3780
caggttaatg	gcgtttttga	tgatcatttc	gcggtggctg	agatcagcca	cttcttcccc	3840
gataacggag	accggcacac	tggccatata	ggcggtcata	atgcgccagc	tttcatcccc	3900
gatatgcacc	accgggtaaa	gttcacggga	gactttatct	gacagcagac	gtgactggc	3960
cagggggatc	accatccgtc	gccccggcgt	gtcaataata	tcactctgta	catccacaaa	4020

cagacgataa cggctctctc ttttataggt gtaaacctta aactgccgta cgtataggct 4080
 gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa 4140
 aggggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg 4200
 ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaaat tgggccctct 4260
 agatgcatgc tcgagcggcc gccagtggtga tggatatctg cagaattcag g 4311

<210> 82

<211> 7085

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плазмида pKR72

<400> 82

gtacggatcc gtcgacggcg cgcccgatca tccggatata gttcctcctt tcagcaaaaa 60
 acccctcaag acccgtttag agggcccaag gggttatgct agttattgct cagcgggtggc 120
 agcagccaac tcagcttcct ttcgggcttt gttagcagcc ggatcgatcc aagctgtacc 180
 tcactattcc tttgccctcg gacgagtgtt ggggcgtcgg tttccactat cggcgagtac 240
 ttctacacag ccatcggtcc agacggccgc gcttctgcgg gcgatttggtg tacgcccgac 300
 agtcccggct ccggatcgga cgattgcgtc gcacgcaccc tgcgcccaag ctgcatcatc 360
 gaaattgccg tcaaccaagc tctgatagag ttggtcaaga ccaatgcgga gcatatacgc 420
 ccggagccgc ggcgatcctg caagctccgg atgcctccgc tcgaagtagc gcgtctgctg 480
 ctccatacaa gccaacacg gcctccagaa gaagatgttg gcgacctcgt attgggaatc 540
 cccgaacatc gcctcgctcc agtcaatgac cgctgttatg cggccattgt ccgtcaggac 600
 attgttgagg ccgaaatccg cgtgcacgag gtgccggact tcggggcagt cctcgggcca 660
 aagcatcagc tcacgagag cctgcgcgac ggacgcactg acggtgtcgt ccatcacagt 720
 ttgccagtga tacacatggg gatcagcaat cgcgcatatg aaatcacgcc atgtagtgtg 780
 ttgaccgatt ccttgcggtc cgaatgggccc gaaccgcgtc gtctgggctaa gatcggccgc 840
 agcgatcgca tccatagcct ccgcgaccgg ctgcagaaca gcgggcagtt cggtttcagg 900
 caggctcttg aacgtgacac cctgtgcacg gcgggagatg caatagggtca ggctctcgct 960
 gaattcccca atgtcaagca cttccggaat cgggagcgcg gccgatgcaa agtgccgata 1020
 aacataacga tctttgtaga aaccatcggc gcagctatctt acccgagga catatccacg 1080
 ccctcctaca tcgaagctga aagcacgaga ttcttcgccc tccgagagct gcacaggtc 1140
 ggagacgctg tcgaactttt cgatcagaaa cttctcgaca gacgtcgcgg tgagttcagg 1200

cttttccatg ggtatatctc cttcttaaag ttaaacaaaa ttatttctag agggaaaccg	1260
ttgtggtctc cctatagtga gtcgtattaa tttcgcggga tcgagatcga tccaattcca	1320
atcccacaaa aatctgagct taacagcaca gttgctcctc tcagagcaga atcgggtatt	1380
caacaccctc atatcaacta ctacgttgty tataacgggc cacatgccgg tatatacgat	1440
gactgggggt gtacaaaggc ggcaacaaac ggcgttcccc gagttgcaca caagaaattt	1500
gccactatta cagaggcaag agcagcagct gacgcgtaca caacaagtca gcaaacagac	1560
aggttgaact tcatccccaaggaggaaagct caactcaagc ccaagagctt tgctaaggcc	1620
ctaacaagcc caccaaagca aaaagcccac tggtctacgc taggaacca aaggcccagc	1680
agtgatccag ccccaaaaga gatctccttt gccccggaga ttacaatgga cgatttcctc	1740
tatctttacg atctaggaag gaagttcgaa ggtgaaggty acgacactat gttcaccact	1800
gataatgaga aggttagcct cttcaatttc agaaagaatg ctgaccaca gatgggttaga	1860
gaggcctacg cagcaggtct catcaagacg atctaccga gtaacaatct ccaggagatc	1920
aaataccttc ccaagaaggt taaagatgca gtcaaaagat tcaggactaa ttgcatcaag	1980
aacacagaga aagacatatt tctcaagatc agaagtacta ttccagtatg gacgattcaa	2040
ggcttgcttc ataaaccaag gcaagtaata gagattggag tctctaaaaa ggtagttcct	2100
actgaatcta aggccatgca tggagtctaa gattcaaatc gaggatctaa cagaactcgc	2160
cgtgaagact ggcgaacagt tcatacagag tcttttacga ctcaatgaca agaagaaaat	2220
cttcgtcaac atggtggagc acgacactct ggtctactcc aaaaatgtca aagatacagt	2280
ctcagaagac caaagggcta ttgagacttt tcaacaaagg ataatttcg gaaacctcct	2340
cggattccat tgcccagcta tctgtcactt catcgaaagg acagtagaaa aggaaggtyg	2400
ctcctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc attcaagatg cctctgccga	2460
cagtggctcc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc	2520
aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgacatctcc actgacgtaa gggatgacgc	2580
acaatcccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttgga	2640
gaggacacgc tcgagctcat ttctctatta cttcagccat aacaaaagaa ctcttttctc	2700
ttcttattaa accatgaaaa agcctgaact caccgcgacg tctgtcgaga agtttctgat	2760
cgaaaagtgc gacagcgtct ccgacctgat gcagctctcg gagggcgaag aatctcgtgc	2820
tttcagcttc gatgtaggag ggcgtggata tgtcctgcgg gtaaatagct gcgccgatgg	2880
tttctacaaa gatcgttatg tttatcggca ctttgcatcg gccgcgctcc cgattccgga	2940
agtgcctgac attggggaat tcagcgagag cctgacctat tgcattctcc gccgtgcaca	3000
gggtgtcacg ttgcaagacc tgcctgaaac cgaactgccc gctgttctgc agccggctgc	3060

ggaggccatg gatgcgatcg ctgcggccga tcttagccag acgagcgggt tcggcccatt	3120
cggaccgcaa ggaatcggtc aatacactac atggcgtgat ttcatatgcg cgattgctga	3180
tccccatgtg tatcactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt ccgtcgcgca	3240
ggctctcgat gagctgatgc tttgggcccga ggactgcccc gaagtccggc acctcgtgca	3300
cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac ggacaatggc cgcataacag cggtcattga	3360
ctggagcgag gcgatgttcg gggattccca atacgaggtc gccaacatct tcttctggag	3420
gccgtggttg gcttgtatgg agcagcagac gcgctacttc gagcggaggc atccggagct	3480
tgcaggatcg ccgcggctcc gggcgatatat gctccgcatt ggtcttgacc aactctatca	3540
gagcttggtt gacggcaatt tcgatgatgc agcttggggc cagggtcgat gcgacgcaat	3600
cgtccgatcc ggagccggga ctgtcgggcg tacacaaatc gcccgcagaa gcgcggccgt	3660
ctggaccgat ggctgtgtag aagtactcgc cgatagtggg aaccgacgcc ccagcactcg	3720
tccgagggca aaggaatagt gaggtacctt aagaaggagt gcgtcgaagc agatcgttca	3780
aacatttggc aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc	3840
atataatttc tgttgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta	3900
tttatgagat gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa	3960
aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta	4020
gatcgatgtc gaatcgatca acctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg	4080
tttgcgatc gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg	4140
gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg	4200
ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa	4260
ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc aaaaaatcg	4320
acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc	4380
tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc	4440
ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttct tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc	4500
ggtgtaggtc gttcgcctca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctt agcccgaccg	4560
ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc	4620
actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga	4680
gttcttgaag tgggtgccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc	4740
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaac	4800
caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg	4860

atctcaagaa gatcctttga tctttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc	4920
acgttaaggg attttgggtca tgacattaac ctataaaaaat aggcgtatca cgaggccctt	4980
tcgtctcgcg cgtttcggtg atgacgggtga aaacctctga cacatgcagc tcccgagac	5040
ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc	5100
gggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag	5160
agtgacccat atggacatat tgtcgttaga acgcgggtac aattaatata taaccttatg	5220
tatcatacac atacgattta ggtgacacta tagaacggcg cgccaagctt gttgaaacat	5280
ccctgaagtg tctcatttta ttttatttat tctttgtga taaaaaata aaataaaaga	5340
agctaagcac acggtcaacc attgctctac tgctaaaagg gttatgtgta gtgttttact	5400
gcataaatta tgcagcaaac aagacaactc aaattaaaaa atttcctttg cttgtttttt	5460
tgttgtctct gacttgactt tcttgtggaa gttggttgta taaggattgg gacaccattg	5520
tccttcttaa ttaatttta ttctttgctg ataaaaaaaa aaatttcata tagtgttaaa	5580
taataatttg ttaaataacc aaaaagtcaa atatgtttac tctcgtttaa ataattgaga	5640
ttcgtccagc aaggctaaac gattgtatag atttatgaca atatttactt ttttatagat	5700
aaatgttata ttataataaa tttatataca tatattatat gttatttatt attattttaa	5760
atccttcaat attttatcaa accaactcat aatttttttt ttatctgtaa gaagcaataa	5820
aattaaatag acccacttta aggatgatcc aacctttata cagagtaaga gagttcaaat	5880
agtacccttt catatacata tcaactaaaa tattagaaat atcatggatc aaaccttata	5940
aagacattaa ataagtggat aagtataata tataaatggg tagtatataa tatataaatg	6000
gatacaaact tctctcttta taattgttat gtctccttaa catcctaata taatacataa	6060
gtgggtaata tataatatat aaatggagac aaacttcttc cattataatt gttatgtctt	6120
cttaacactt atgtctcggt cacaatgcta aggttagaat tgtttagaaa gtcttatagt	6180
acacatttgt ttttgtacta tttgaagcat tccataagcc gtcacgatc agatgattta	6240
taataataag aggaaattta tcatagaaca ataagggtgca tagatagagt gttaatatat	6300
cataacatcc tttgtttatt catagaagaa gtgagatgga gctcagttat tatactgtta	6360
catggtcgga tacaatattc catgctctcc atgagctctt acacctacat gcattttagt	6420
tcatacttgc ggccgcagta tatcttaaat tctttaatac ggtgtactag gatattgaac	6480
tggttcttga tgatgaaaac ctgggccgag attgcagcta tttatagtca taggtcttgt	6540
taacatgcat ggacatttgg ccacggggtg gcatgcagtt tgacgggtgt tgaaataaac	6600
aaaaatgagg tggcggaaga gaatacgagt ttgaggttgg gttagaaaca acaaatgtga	6660
gggctcatga tgggttgagt tgggtgaatgt tttgggctgc tcgattgaca cctttgtgag	6720

tacgtgttgt	tgtgcatggc	ttttggggtc	cagttttttt	ttcttgacgc	ggcgatcctg	6780
atcagctagt	ggataagtga	tgtccactgt	gtgtgattgc	gtttttgttt	gaattttatg	6840
aacttagaca	ttgctatgca	aaggatactc	tcatttgtgt	ttgtcttctt	ttgttccttg	6900
gctttttctt	atgatccaag	agactagtca	gtgttgtggc	attcgagact	accaagatta	6960
attatgatgg	gggaaggata	agtaactgat	tagtacggac	tgttaccaaa	ttaattaata	7020
agcggcaaat	gaagggcatg	gatcaaaaagc	ttggatctcc	tgcaggatct	ggccggccgg	7080
atctc						7085

<210> 83
 <211> 2540
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмида pKS102

<400> 83	
cgatcatccg gatatagttc ctccttttcag caaaaaaccc ctcaagaccc gtttagaggc	60
cccaaggggt tatgctagtt attgctcagc ggtggcagca gccaaactcag cttcctttcg	120
ggctttgtta gcagccgat cgatccaagc tgtacctcac tattcctttg ccctcggacg	180
agtgctgggg cgctcggtttc cactatcggc gagtacttct acacagccat cggtcagac	240
ggccgcgctt ctgcgggcca tttgtgtacg cccgacagtc ccggctccgg atcggacgat	300
tgcgtcgcat cgaccctgcg cccaagctgc atcatcgaaa ttgccgtcaa ccaagctctg	360
atagagttgg tcaagaccaa tgcggagcat atacgcccgg agccgcggcg atcctgcaag	420
ctccggatgc ctccgctcga agtagcgcgt ctgctgctcc atacaagcca accacggcct	480
ccagaagaag atgttgggca cctcgtattg ggaatccccg aacatcgccct cgctccagtc	540
aatgaccgct gttatgcggc cattgtccgt caggacattg ttggagccga aatccgcgtg	600
cacgaggtgc cggacttcgg ggcagtcctc ggcccaaagc atcagctcat cgagagcctg	660
cgcgacggac gcactgacgg tgcgtccat cacagtttgc cagtataca catggggatc	720
agcaatcgcg catatgaaat cacgccatgt agtgtattga ccgattcctt gcggtccgaa	780
tgggccgaac ccgctcgtct ggctaagatc ggccgcagcg atcgcatcca tagcctccgc	840
gaccggctgc agaacagcgg gcagttcggg ttcaggcagg tcttgcaacg tgacaccctg	900
tgcacggcgg gagatgcaat aggtcaggct ctgctgaat tcccaaatgt caagcacttc	960
cggaatcggg agcgcggccg atgcaaagtg ccgataaaca taacgatctt tgtagaaacc	1020
atcgggcgcg ctattttaccc gcaggacata tccacgcctt cctacatcga agctgaaagc	1080

```

acgagattct tcgccctccg agagctgcat caggctcggag acgctgtcga acttttcgat 1140
cagaaacttc tcgacagacg tcgcggtgag ttcaggcttt tccatgggta tatctccttc 1200
ttaaagttaa acaaaattat ttctagaggg aaaccgttgt ggtctcccta tagtgagtcg 1260
tattaatttc gcgggatcga gatctgatca acctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg 1320
ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct 1380
cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca 1440
cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga 1500
accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc 1560
acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg 1620
cgtttcccc tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc gacctgccc cttaccggat 1680
acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcaatgctca cgctgtaggt 1740
atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc 1800
agccccaccg ctgcgcctta tccggtaaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg 1860
acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg 1920
gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg 1980
gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg 2040
gcaaacaaac caccgctggg agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca 2100
gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga 2160
acgaaaactc acgttaaggg attttgggtca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca 2220
cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcggtg atgacggtga aaacctctga cacatgcagc 2280
tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg 2340
gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgctggg gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga 2400
ttgtactgag agtgcaccat atggacatat tgctggttaga acgcggctac aattaataca 2460
taaccttatg tatcatcac atacgattta ggtgacacta tagaacggcg cgccaagctt 2520
ggatccgctc acggcgcgcc 2540

```

```

<210> 84
<211> 4359
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Плазмида pKR197

```

```

<400> 84
cgcgcccgat catccggata tagttcctcc tttcagcaaa aaaccctca agaccgctt 60

```

agaggcccca	aggggttatg	ctagttattg	ctcagcgggtg	gcagcagcca	actcagcttc	120
ctttcgggct	ttgttagcag	ccggatcgat	ccaagctgta	cctcactatt	cctttgccct	180
cggacgagtg	ctggggcgtc	ggtttccact	atcggcgagt	acttctacac	agccatcggg	240
ccagacggcc	gcgcttctgc	gggcgatttg	tgtacgcccg	acagtcccgg	ctccggatcg	300
gacgattgcg	tcgcatcgac	cctgcgcccc	agctgcatca	tcgaaattgc	cgtcaaccaa	360
gctctgatag	agttgggtcaa	gaccaatgcg	gagcatatac	gcccggagcc	gcggcgatcc	420
tgcaagctcc	ggatgcctcc	gctcgaagta	gcgcgtctgc	tgctccatac	aagccaacca	480
cggcctccag	aagaagatgt	tggcgacctc	gtattgggaa	tccccgaaca	tcgcctcgct	540
ccagtcaatg	accgctgtta	tgcggccatt	gtccgtcagg	acattgttgg	agccgaaatc	600
cgcgtgcacg	aggtgccgga	cttcggggca	gtcctcggcc	caaagcatca	gctcatcgag	660
agcctgcgcg	acggacgcac	tgacgggtgc	gtccatcaca	gtttgccagt	gatacacatg	720
gggatcagca	atcgcgcata	tgaaatcacg	ccatgtagtg	tattgaccga	ttccttgcgg	780
tccgaatggg	ccgaaccgcg	tcgtctggct	aagatcggcc	gcagcgatcg	catccatagc	840
ctccgcgacc	ggctgcagaa	cagcgggcag	ttcggtttca	ggcaggctct	gcaacgtgac	900
accctgtgca	cggcgggaga	tgcaataggt	caggctctcg	ctgaattccc	caatgtcaag	960
cacttccgga	atcgggagcg	cggccgatgc	aaagtgccga	taaacataac	gatctttgta	1020
gaaaccatcg	gcgcagctat	ttaccgcgag	gacatatcca	cgcctctcta	catcgaagct	1080
gaaagcacga	gattcttcgc	cctccgagag	ctgcatcagg	tcggagacgc	tgtcgaactt	1140
ttcgatcaga	aacttctcga	cagacgtcgc	ggtgagttca	ggcttttcca	tggttatatc	1200
tccttcttaa	agttaaacaa	aattatctct	agagggaaac	cgttgtgggc	tccttatagt	1260
gagtcgtatt	aatttcgcgg	gatcgagatc	tgatcaacct	gcattaatga	atcggccaac	1320
gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattgggc	gctcttccgc	ttcctcgctc	actgactcgc	1380
tgcgctcggg	cgttcggctg	cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	1440
tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	1500
ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	1560
agcatcacia	aatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcagga	ctataaagat	1620
accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	1680
ccggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcaa	tgctcacgct	1740
gtaggtatct	cagttcggtg	taggtcgttc	gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	1800
ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aaccgggtaa	1860

gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg	1920
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag	1980
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	2040
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtgggtttttt tgtttgcaag cagcagatta	2100
cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	2160
agtggaacga aaactcacgt taagggattht tgggtcatgac attaacctat aaaaataggc	2220
gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt tcgggtgatga cgggtgaaaac ctctgacaca	2280
tgcagctccc ggagacgggc acagcttggtc tgtaagcgga tgccggggagc agacaagccc	2340
gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggg gtccggggctg gcttaactat gcggcatcag	2400
agcagattgt actgagagtg caccatatgg acatattgtc gttagaacgc ggctacaatt	2460
aatacataac cttatgtatc atacacatac gatttaggtg aactataga acggcgcgcc	2520
aagcttggtg aaacatccct gaagtgtctc attttatttt atttattctt tgctgataaa	2580
aaaataaaaat aaaagaagct aagcacacgg tcaaccattg ctctactgct aaaagggtta	2640
tgtgtagtgt tttactgcat aaattatgca gcaaacaaga caactcaaat taaaaaattt	2700
cctttgcttg tttttttgtt gtctctgact tgactttctt gtggaagttg gttgtataag	2760
gattgggaca ccattgtcct tcttaattta attttattct ttgctgataa aaaaaaaaaat	2820
ttcatatagt gttaaataat aatttggtta ataaccaaaa agtcaaatat gtttactctc	2880
gtttaaataa ttgagattcg tccagcaagg ctaaacgatt gtatagattt atgacaatat	2940
ttactttttt atagataaat gttatattat aataaattta tatacatata ttatatgtta	3000
tttattatta ttttaaatcc ttcaatattt tatcaaacca actcataatt ttttttttat	3060
ctgtaagaag caataaaatt aaatagacct actttaagga tgatccaacc tttatacaga	3120
gtaagagagt tcaaatagta ccctttcata tacatatcaa ctaaaatatt agaaatatca	3180
tggatcaaac cttataaaga cattaaataa gtggataagt ataatatata aatgggtagt	3240
atataatata taaatggata caaacttctc tctttataat tggtatgtct ccttaacatc	3300
ctaataatat acataagtgg gtaatatata atatataaat ggagacaaac ttcttccatt	3360
ataattgtta tgtcttctta acacttatgt ctcggtcaca atgctaagggt tagaattgtt	3420
tagaaagtct tatagtacac atttgttttt gtactatttg aagcattcca taagccgtca	3480
cgattcagat gatttataat aataagagga aatttatcat agaacaataa ggtgcataga	3540
tagagtgtta atatatcata acatcccttg tttattcata gaagaagtga gatggagctc	3600
agttattata ctgttacatg gtccgataca atattccatg ctctccatga gctcttacac	3660
ctacatgcat tttagttcat acttgccggc gcagtatatc ttaaattctt taatacgggtg	3720

tactaggata ttgaactggt tcttgatgat gaaaacctgg gccgagattg cagctattta 3780
tagtcatagg tcttggttaac atgcatggac atttggccac ggggtggcat gcagtttgac 3840
gggtgttgaa ataaacaaaa atgaggtggc ggaagagaat acgagtttga ggttgggtta 3900
gaaacaacaa atgtgagggc tcatgatggg ttgagttggt gaatgttttg ggctgctcga 3960
ttgacacctt tgtgagtacg tgttggttg catggctttt ggggtccagt ttttttttct 4020
tgacgcggcg atcctgatca gctagtggat aagtgatgtc cactgtgtgt gattgcgttt 4080
ttgtttgaat tttatgaact tagacattgc tatgcaaagg atactctcat tgtgttttgt 4140
cttcttttgt tccttggtt tttcttatga tccaagagac tagtcagtgt tgtggcattc 4200
gagactacca agattaatta tgatggggga aggataagta actgattagt acggactggt 4260
accaaattaa ttaataagcg gcaaatgaag ggcatggatc aaaagcttgg atctcctgca 4320
ggatctggcc ggccggatct cgtacggatc cgtcgacgg 4359

<210> 85

<211> 5147

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плазмида pKR911

<400> 85

ggccgcaagt atgaactaaa atgcatgtag gtgtaagagc tcatggagag catggaatat 60
tgtatccgac catgtaacag tataataact gagctccatc tcacttcttc tatgaataaa 120
caaaggatgt tatgatatat taacactcta tctatgcacc ttattgttct atgataaatt 180
tcctcttatt attataaatc atctgaatcg tgacggctta tggaatgctt caaatagtag 240
aaaaacaaat gtgtactata agactttcta aacaattcta accttagcat tgtgaacgag 300
acataagtgt taagaagaca taacaattat aatggaagaa gtttgtctcc atttatatat 360
tatatattac ccacttatgt attatattag gatgttaagg agacataaca attataaaga 420
gagaagtttg tatccattta tatattatat actaccatt tatatattat acttatccac 480
ttatttaatg tctttataag gtttgatcca tgatatttct aatatttttag ttgatatgta 540
tatgaaaggg tactatttga actctcttac tctgtataaa ggttggatca tccttaaagt 600
gggtctattt aattttattg cttcttacag ataaaaaaaa aattatgagt tggtttgata 660
aaatattgaa ggatttaaaa taataataaa taacatataa tatatgtata taaatttatt 720
ataatataac atttatctat aaaaaagtaa atattgtcat aaatctatac aatcgtttag 780
ccttgctgga cgaatctcaa ttatttaaac gagagtaaac atatttgact ttttggttat 840

ttaacaaatt	attatttaac	actatatgaa	atTTTTTTTT	ttatcagcaa	agaataaaat	900
taaattaaga	aggacaatgg	tgtcccaatc	cttatacaac	caacttccac	aagaaagtca	960
agtcagagac	aacaaaaaaaa	caagcaaagg	aaatTTTTTT	atttgagttg	tcttgtttgc	1020
tgcataatTT	atgcagtaaa	acactacaca	taaccctTTT	agcagtagag	caatggttga	1080
ccgtgtgctt	agcttctTTT	atTTTatTTT	tttatcagca	agaataaaat	aaaataaaat	1140
gagacacttc	agggatgttt	caacaagctt	ggcgcgcctg	tctatagtgt	cacctaaatc	1200
gtatgtgtat	gatacataag	gttatgtatt	aattgtagcc	gcgttctaac	gacaatatgt	1260
ccatatgggtg	cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	atagttaagc	cagccccgac	1320
acccgccaac	acccgctgac	gcgccctgac	gggcttgtct	gctcccgga	tccgcttaca	1380
gacaagctgt	gaccgtctcc	gggagctgca	tgtgtcagag	gttttcaccg	tcatcaccga	1440
aacgcgcgag	acgaaagggc	ctcgtgatac	gcctatTTTT	ataggTTaat	gtcatgacca	1500
aaatccctta	acgtgagttt	tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaag	1560
gatcttcttg	agatcctTTT	tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaaca	aaaaaaccac	1620
cgctaccagc	ggtggtttgt	ttgccggatc	aagagctacc	aactctTTTT	ccgaaggtaa	1680
ctggcttcag	cagagcgcag	ataccaaata	ctgtccttct	agtgtagccg	tagttaggcc	1740
accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaate	ctgttaccag	1800
tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgtc	ttaccggggt	ggactcaaga	cgatagttac	1860
cggataaggc	gcagcggctg	ggctgaacgg	gggggttcgtg	cacacagccc	agcttgaggc	1920
gaacgaccta	caccgaactg	agatacctac	agcgtgagca	ttgagaaagc	gccacgcttc	1980
ccgaaggggag	aaaggcggac	aggatatccg	taagcggcag	ggtcggaaca	ggagagcgca	2040
cgaggggagct	tccaggggga	aacgcctggt	atcttttatag	tcctgtcggg	tttcgccacc	2100
tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	cgtcaggggg	gcggagccta	tggaaaaacg	2160
ccagcaacgc	ggcctTTTTa	cggttcctgg	ccttttgctg	gccttttgct	cacatgttct	2220
ttcctgctgt	atccccctgat	tctgtggata	accgtattac	cgcctttgag	tgagctgata	2280
ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgca	gcgagtcagt	gagcgaggaa	gcggaagagc	2340
gccaataacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttggccgat	tcattaatgc	aggttgatca	2400
gatctcgatc	ccgcgaaatt	aatacgactc	actataggga	gaccacaacg	gtttccctct	2460
agaaataatt	ttgtttaact	ttaagaagga	gatataccca	tggaaaagcc	tgaactcacc	2520
gcgacgtctg	tcgagaagtt	tctgatcgaa	aagttcgaca	gcgtctccga	cctgatgcag	2580
ctctcggagg	gcgaagaatc	tcgtgctttc	agcttcgatg	taggagggcg	tggatatgtc	2640
ctgcgggtaa	atagctgcgc	cgatggtttc	tacaaagatc	gttatgttta	tcggcacttt	2700

gcatcgggccg	cgctccccgat	tccggaagtg	cttgacattg	gggaattcag	cgagagcctg	2760
acctatttgca	tctccccgccg	tgcacagggg	gtcacgttgc	aagacctgcc	tgaaccggaa	2820
ctgcccgcgtg	ttctgcagcc	ggtcgcggag	gctatggatg	cgatcgctgc	ggccgatctt	2880
agccagacga	gcgggttcgg	cccattcgga	ccgcaaggaa	tcggtcaata	cactacatgg	2940
cgtgattttca	tatgcgcgat	tgctgatccc	catgtgtatc	actggcaaac	tgtgatggac	3000
gacaccgtca	gtgcgtccgt	cgcgcaggct	ctcgatgagc	tgatgctttg	ggccgaggac	3060
tgccccgaag	tccggcacct	cgtgcacgcg	gatttcgggt	ccaacaatgt	cctgacggac	3120
aatggccgca	taacagcggg	cattgactgg	agcgaggcga	tgttcgggga	ttcccaatac	3180
gaggtcgcca	acatcttctt	ctggaggccg	tggttggctt	gtatggagca	gcagacgcgc	3240
tacttcgagc	ggaggcatcc	ggagcttgca	ggatcgccgc	ggctccgggc	gtatatgctc	3300
cgcattggtc	ttgaccaact	ctatcagagc	ttggttgacg	gcaatttcga	tgatgcagct	3360
tgggcgcagg	gtcgatgcga	cgcaatcgtc	cgatccggag	ccgggactgt	cgggcgctaca	3420
caaatcgccc	gcagaagcgc	ggccgtcttg	accgatgggt	gtgtagaagt	actcgccgat	3480
agtggaaacc	gacgccccag	cactcgctccg	agggcaaagg	aatagtgagg	tacagcttgg	3540
atcgatccgg	ctgctaacaa	agcccgaaa	gaagctgagt	tggctgctgc	caccgctgag	3600
caataactag	cataacccct	tggggcctct	aaacgggtct	tgagggggtt	tttgcgtaa	3660
ggaggaacta	tatccggatg	atcgggcgcg	ccgtcgacgg	atccgtacga	gatccggccg	3720
gccagatcct	gcaggagatc	caagcttttg	atccatgccc	ttcatttgcc	gcttattaat	3780
taatttggtg	acagtccgta	ctaatacagt	acttatcctt	ccccatcat	aattaatctt	3840
ggtagtctcg	aatgccacaa	cactgactag	tctcttggat	cataagaaaa	agccaaggaa	3900
caaaagaaga	caaaacacaa	tgagagtatc	ctttgcatag	caatgtctaa	gttcataaaa	3960
ttcaaacaaa	aacgcaatca	cacacagtgg	acatcactta	tccactagct	gatcaggatc	4020
gccgcgtcaa	gaaaaaaaaa	ctggacccca	aaagccatgc	acaacaacac	gtactcacia	4080
agggtgtcaat	cgagcagccc	aaaacattca	ccaactcaac	ccatcatgag	ccctcacatt	4140
tgttggtttct	aacccaacct	caaactcgta	ttctcttccg	ccacctcatt	tttggtttatt	4200
tcaacacccg	tcaaactgca	tgccaccccg	tggccaaatg	tccatgcatg	ttaacaagac	4260
ctatgactat	aaatagctgc	aatctcggcc	caggttttca	tcatcaagaa	ccagttcaat	4320
atcctagtac	accgtattaa	agaatttaag	atatactgcg	gccgcacccat	ggagggtggg	4380
aatgaaatag	tctcaattgg	gcaggaagtt	ttacccaaaag	ttgattatgc	ccaactctgg	4440
agtgatgcca	gtcactgtga	ggtgctttac	ttgtccatcg	catttgatcat	cttgaagttc	4500

```

actcttggcc cccttgggtcc aaaaggtcag tctcgtatga agtttgtttt caccaattac 4560
aacctttctca tgtccattta ttcgttggga tcattcctct caatggcata tgccatgtac 4620
accatcggtg ttatgtctga caactgcgag aaggcttttg acaacaacgt cttcaggatc 4680
accacgcagt tgttctatth gagcaagttc ctggagtata ttgactcctt ctatttgcca 4740
ctgatgggca agcctctgac ctggttgcaa ttcttccatc atttgggggc accgatggat 4800
atgtggctgt tctataatta ccgaaatgaa gctgtttgga tttttgtgct gttgaatggt 4860
ttcatccact ggatcatgta cggttattat tggaccagat tgatcaagct gaagttcccc 4920
atgccaaaat ccctgattac atcaatgcag atcattcaat tcaatggttg tttctacatt 4980
gtctggaagt acaggaacat tccctgttat cgccaagatg ggatgaggat gtttggtggt 5040
ttcttcaatt acttttatgt tggcacagtc ttgtgtttgt tcttgaattt ctatgtgcaa 5100
acgtatatcg tcaggaagca caaggagacc aaaaagattc agtgagc 5147

```

```

<210> 86
<211> 6559
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Плазмида pKR680

```

```

<220>
<221> разный признак
<222> (4340)..(4340)
<223> n представляет собой a, c, g или t

```

```

<400> 86
ggccgcgaca caagtgtgag agtactaaat aaatgctttg gttgtacgaa atcattacac 60
taaataaaat aatcaaagct tatatatgcc ttccgctaag gccgaatgca aagaaattgg 120
ttctttctcg ttatcttttg ccacttttac tagtacgtat taattactac ttaatcatct 180
ttgttttacg ctcattatat ccggtctaga ggatccaagg ccgcgaagtt aaaagcaatg 240
ttgtcacttg tcgtactaac acatgatgtg atagtttatg ctagctagct ataacataag 300
ctgtctctga gtgtgttgta tattaataaa gatcatcact ggtgaatggt gatcgtgtac 360
gtaccctact tagtaggcaa tggaagcact tagagtgtgc tttgtgcatg gccttgccctc 420
tgttttgaga cttttgtaat gttttcgagt ttaaactctt gcctttgcgt acgtgggagg 480
atccccggg ctgcaggaat tctactggccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc 540
ctggcggttac ccaacttaat cgccttgca ccatcccc tttcgccagc tggcgtaata 600
gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgag cagcctgaat ggcgaatggc 660
gcctgatgag gtattttctc cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 720

```

ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac	780
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga	840
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac	900
gaaagggcct cgtgatacgc ctatTTTTat aggttaatgt catgataata atggtttctt	960
agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTct	1020
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat	1080
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttcctgtg cggccttatt ccctTTTTtg	1140
cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg	1200
aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc	1260
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat	1320
gtggcgcggt attatcccggt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact	1380
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca	1440
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact	1500
tactttctgac aacgatcggg ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg	1560
atcatgtaac tcgccttgat cgttggggaa cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg	1620
agcgtgacac cagcatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg	1680
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg	1740
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggt tattgctgat aaatctggag	1800
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggg aagccctccc	1860
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga	1920
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat	1980
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc	2040
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag	2100
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct	2160
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac	2220
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc	2280
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg	2340
ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt	2400
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt	2460
gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc	2520

tatgagaaag	cgccacgctt	cccgaaagga	gaaaggcgga	caggtatccg	gtaagcggca	2580
gggtcggaac	aggagagcgc	acgaggggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	2640
gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	2700
ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	cggccttttt	acggttcctg	gccttttgct	2760
ggccttttgc	tcacatgttc	tttcctgcgt	tatccccctga	ttctgtggat	aaccgtatta	2820
ccgcctttga	gtgagctgat	accgctcgcc	gcagccgaac	gaccgagcgc	agcgagtcag	2880
tgagcgagga	agcggaagag	cgccaatac	gcaaaccgcc	tctccccgcg	cgttggccga	2940
ttcattaatg	cagctggcac	gacaggtttc	ccgactggaa	agcgggcagt	gagcgcaacg	3000
caattaatgt	gagttagctc	actcattagg	caccccaggc	tttacacttt	atgcttccgg	3060
ctcgtatggt	gtgtggaatt	gtgagcggat	aacaattttca	cacaggaaac	agctatgacc	3120
atgattacgc	caagcttgca	tgctgcagc	tcgactcgac	gtacgtcctc	gaagagaagg	3180
gttaataaca	catttttttaa	cattttttaac	acaaattttta	gttattttaaa	aattttattaa	3240
aaaattttaaa	ataagaagag	gaactcttta	aataaatcta	acttacaaaa	tttatgattt	3300
ttaataagtt	ttcaccaata	aaaaatgtca	taaaaatatg	ttaaaaagta	tattatcaat	3360
attctcttta	tgataaataa	aaagaaaaaa	aaaataaaaag	ttaagtgaag	atgagattga	3420
agtgacttta	ggtgtgtata	aatatatcaa	ccccgccaac	aattttattta	atccaaatat	3480
attgaagtat	attattccat	agcctttatt	tatttatata	tttattatat	aaaagcttta	3540
tttgttctag	gttggtcatg	aaatattttt	ttgggttttat	ctccgttgta	agaaaatcat	3600
gtgctttgtg	tcgccactca	ctattgcagc	tttttcatgc	attggtcaga	ttgacgggtg	3660
attgtatttt	tgtttttttat	ggttttgtgt	tatgacttaa	gtcttcatct	ctttatctct	3720
tcacaggtt	tgatgggttac	ctaatatggt	ccatgggtac	atgcatgggt	aaattaggtg	3780
gccaaactttg	ttgtgaacga	tagaattttt	tttatattaa	gtaaactatt	tttatattat	3840
gaaataataa	taaaaaaaaat	attttatcat	tattaacaaa	atcatattag	ttaatttggt	3900
aactctataa	taaaagaaat	actgtaacat	tcacattaca	tggtaacatc	tttccaccct	3960
ttcatttggt	ttttgtttga	tgactttttt	tcttgtttaa	atttatttcc	cttcttttaa	4020
atttggaata	cattatcatc	atatataaac	taaaatacta	aaaacaggat	tacacaaatg	4080
ataaataata	acacaaatat	ttataaatct	agctgcaata	tatttaaact	agctatatcg	4140
atattgtaaa	ataaaactag	ctgcattgat	actgataaaa	aaatatcatg	tgctttctgg	4200
actgatgatg	cagtatactt	ttgacattgc	ctttatttta	tttttcagaa	aagctttctt	4260
agttctgggt	tcttcattat	ttgtttccca	tctccattgt	gaattgaatc	atttgcttcg	4320
tgtcacaaat	acaatttagn	taggtacatg	cattgggtcag	attcacgggt	tattatgtca	4380

tgacttaagt	tcatggtagt	acattacctg	ccacgcacgc	attatattgg	ttagatttga	4440
taggcaaatt	tggttgtcaa	caatataaat	ataaataatg	tttttatatt	acgaaataac	4500
agtgatcaaa	acaaacagtt	ttatctttat	taacaagatt	ttgtttttgt	ttgatgacgt	4560
tttttaagt	ttacgctttc	ccccctcttc	tgaatttaga	acactttatc	atcataaaat	4620
caaatactaa	aaaaattaca	tatttcataa	ataataacac	aaatattttt	aaaaaatctg	4680
aaataataat	gaacaatatt	acatattatc	acgaaaattc	attaataaaa	atattatata	4740
aataaaatgt	aatagtagtt	atatgtagga	aaaaagtact	gcacgcataa	tatatacaaa	4800
aagattaaaa	tgaactatta	taaataataa	cactaaatta	atggtgaatc	atatcaaaat	4860
aatgaaaaag	taaataaaat	ttgtaattaa	cttctatatg	tattacacac	acaaataata	4920
aataatagta	aaaaaaatta	tgataaatat	ttaccatctc	ataagatatt	taaaataatg	4980
ataaaaaatat	agattatttt	ttatgcaact	agctagccaa	aaagagaaca	cgggtatata	5040
taaaaagagt	accttttaaat	tctactgtac	ttcctttatt	cctgacgttt	ttatatcaag	5100
tggacatacg	tgaagatttt	aattatcagt	ctaaatattt	cattagcact	taatactttt	5160
ctgtttttatt	cctatcctat	aagtagtccc	gattctccca	acattgctta	ttcacacaac	5220
taactaagaa	agtcttccat	agccccccaa	gcggccgcgg	gaattcgatt	gaaatgaagt	5280
caaagcgcca	agcgcttccc	cttacaattg	atggaacaac	atatgatgtg	tctgcctggg	5340
tcaattttcca	ccctggtggt	gcggaaatta	tagagaatta	ccaaggaagg	gatgccactg	5400
atgccttcat	ggttatgcac	tctcaagaag	ccttcgacaa	gctcaagcgc	atgccccaaa	5460
tcaatcccag	ttctgagttg	ccaccccagg	ctgcagtga	tgaagctcaa	gaggatttcc	5520
ggaagctccg	agaagagttg	atcgcaactg	gcatgtttga	tgccctcccc	ctctggtact	5580
catacaaaat	cagcaccaca	ctgggccttg	gagtgtctgg	ttatttcctg	atggttcagt	5640
atcagatgta	tttcattggg	gcagtgttgc	ttgggatgca	ctatcaacag	atgggctggc	5700
tttctcatga	catttgccac	caccagactt	tcaagaaccg	gaactggaac	aacctcgtgg	5760
gactggtatt	tggcaatggt	ctgcaagggt	tttccgtgac	atggtggaag	gacagacaca	5820
atgcacatca	ttcggcaacc	aatgttcaag	ggcacgaccc	tgatattgac	aacctcccc	5880
tcttagcctg	gtctgaggat	gacgtcacac	gggcgtcacc	gatttcccgc	aagctcattc	5940
agttccagca	gtactatttc	ttggtcatct	gtatcttggt	gcggttcatt	tggtgtttcc	6000
agagcgtggt	gaccgtgcgc	agtttgaagg	acagagataa	ccaattctat	cgctctcagt	6060
ataagaagga	ggccattggc	ctcgccctgc	actggacctt	gaagaccctg	ttccacttat	6120
tcttttatgcc	cagcatcctc	acatcgctgt	tgggtgtttt	cgtttcggag	ctggttggcg	6180

gcttcggcat tgcgacgtg gtgttcatga accactaccc actggagaag atcggggact 6240
cagtctggga tggccatgga ttctcggtt gccagatcca tgagaccatg aacattcggc 6300
gagggattat cacagattgg tttttcggag gcttgaatta ccagattgag caccatttgt 6360
ggccgaccct ccctcgccac aacctgacag cggttagcta ccaggtgga cagctgtgcc 6420
agaagcaca cctgccgtat cggaaccgcg tgccccatga agggttggtc atcctgctgc 6480
gctatctggc ggtgttcgcc cggatggcgg agaagcaacc cgcggggaag gctctataag 6540
gaatcactag tgaattcgc 6559

<210> 87
<211> 9014
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Плазмида pKR913

<220>
<221> разный признак
<222> (7839)..(7839)
<223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 87
gtacgagatc cggccggcca gatcctgcag gagatccaag cttttgatcc atgcccttca 60
tttgccgctt attaattaat ttggtaacag tccgtactaa tcagttactt atccttcccc 120
catcataatt aatcttggtg gtctcgaatg ccacaacact gactagtctc ttggatcata 180
agaaaaagcc aaggaacaaa agaagacaaa acacaatgag agtatccttt gcatagcaat 240
gtctaagttc ataaaaattca aacaaaaacg caatcacaca cagtggacat cacttatcca 300
ctagctgatc aggatcgccg cgtaagaaa aaaaaactgg accccaaaag ccatgcacaa 360
caacacgtac tcacaaaggt gtcaatcgag cagcccaaaa cattcaccaa ctcaaccat 420
catgagccct cacatttgtt gtttctaacc caacctcaaa ctctgtattct cttccgccac 480
ctcatttttg tttatttcaa caccggtcaa actgcatgcc accccgtggc caaatgtcca 540
tgcatgttaa caagacctat gactataaat agctgcaatc tcggcccagg ttttcatcat 600
caagaaccag ttcaatatcc tagtacaccg tattaagaa ttttaagatat actgcgggcg 660
caccatggag gtggtgaatg aaatagtctc aattgggcag gaagttttac ccaaagttga 720
ttatgcccaa ctctggagtg atgccagtca ctgtgaggtg ctttacttgt ccatcgcat 780
tgtcatcttg aagttcactc ttggccccct tggtcacaaa ggtcagtctc gtatgaagtt 840
tgttttcacc aattacaacc ttctcatgtc cattttattcg ttgggatcat tcctctcaat 900
ggcatatgcc atgtacacca tcggtgttat gtctgacaac tgcgagaagg cttttgacaa 960

caacgtcttc	aggatcacca	cgcagttggt	ctatttgagc	aagttcctgg	agtatattga	1020
ctccttctat	ttgccactga	tgggcaagcc	tctgacctgg	ttgcaattct	tccatcattt	1080
gggggcaccg	atggatatgt	ggctgttcta	taattaccga	aatgaagctg	tttggatttt	1140
tgtgctgttg	aatggtttca	tccactggat	catgtacggt	tattattgga	ccagattgat	1200
caagctgaag	ttccccatgc	caaaatccct	gattacatca	atgcagatca	ttcaattcaa	1260
tgttggtttc	tacattgtct	ggaagtacag	gaacattccc	tgttatcgcc	aagatgggat	1320
gaggatgttt	ggctggttct	tcaattactt	ttatgttggc	acagtcttgt	gtttgttctt	1380
gaatttctat	gtgcaaacgt	atatcgtcag	gaagcacaag	ggagccaaaa	agattcagtg	1440
agcgcccgca	agtatgaact	aaaatgcatg	taggtgtaag	agctcatgga	gagcatggaa	1500
tattgtatcc	gaccatgtaa	cagtataata	actgagctcc	atctcacttc	ttctatgaat	1560
aaacaaagga	tgttatgata	tattaacact	ctatctatgc	accttattgt	tctatgataa	1620
atttcctctt	attattataa	atcatctgaa	tctgacggc	ttatggaatg	cttcaaatag	1680
tacaaaaaca	aatgtgtact	ataagacttt	ctaacaatt	ctaaccttag	cattgtgaac	1740
gagacataag	tgtaagaag	acataacaat	tataatggaa	gaagtttgtc	tccatttata	1800
tattatatat	taccacttta	tgtattatat	taggatgtta	aggagacata	acaattataa	1860
agagagaagt	ttgtatccat	ttatatatta	tatactaccc	atttatatat	tatacttatc	1920
cacttattta	atgtctttat	aaggtttgat	ccatgatatt	tctaataatt	tagttgatat	1980
gtatatgaaa	gggtactatt	tgaactctct	tactctgtat	aaaggttgga	tcacctttaa	2040
agtgggtcta	tttaatttta	ttgcttctta	cagataaaaa	aaaaattatg	agttggtttg	2100
ataaaatatt	gaaggattta	aaataataat	aaataacata	taatatatgt	atataaattt	2160
attataatat	aacattttatc	tataaaaaag	taaatattgt	cataaatcta	tacaatcggt	2220
tagccttgct	ggacgaatct	caattattta	aacgagagta	aacatatttg	actttttggg	2280
tatttaacaa	attattattt	aacactatat	gaaatttttt	tttttatcag	caaagaataa	2340
aattaaatta	agaaggacaa	tgggtgtcca	atccttatac	aaccaacttc	cacaagaaag	2400
tcaagtcaga	gacaacaaaa	aaacaagcaa	aggaaatttt	ttaatttgag	ttgtcttggt	2460
tgctgcataa	tttatgcagt	aaaacaactac	acataaccct	tttagcagta	gagcaatggg	2520
tgaccgtgtg	cttagcttct	tttattttat	ttttttatca	gcaaagaata	aataaaataa	2580
aatgagacac	ttcaggggatg	tttcaacaag	cttggcgcg	cgttctatag	tgtcacctaa	2640
atcgtagtg	tatgatacat	aaggttatgt	attaattgta	gccgcgttct	aacgacaata	2700
tgtccatatg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgatgc	cgcatagtta	agccagcccc	2760

gacacccgcc aacacccgct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt	2820
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgatcatcac	2880
cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga	2940
ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca	3000
aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac	3060
caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg	3120
taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag	3180
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac	3240
cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt	3300
taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag ccagcttgg	3360
agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa agcgcacgc	3420
ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcggg acaggagagc	3480
gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc	3540
acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa	3600
acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gtcacatgt	3660
tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gaggagctg	3720
ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcagtc agtgagcag gaagcggaa	3780
agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcaggttga	3840
tcagatctcg atcccgcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaca acggtttccc	3900
tctagaaata attttgttta actttaagaa ggagatatac ccatggaaaa gcctgaactc	3960
accgcgacgt ctgtcgagaa gtttctgac gaaaagttcg acagcgtctc cgacctgatg	4020
cagctctcgg agggcgaaga atctcgtgct ttcagcttcg atgtaggagg gcgtggatat	4080
gtcctgcggg taaatagctg cgcgatggt ttctacaaag atcgttatgt ttatcggcac	4140
tttgcatcgg ccgcgctccc gattccggaa gtgcttgaca ttggggaatt cagcgagagc	4200
ctgacctatt gcatctcccc ccgtgcacag ggtgtcacgt tgcaagacct gcctgaaacc	4260
gaactgcccc ctgttctgca gccggtcgcg gaggtatgg atgcgatcgc tgcggccgat	4320
cttagccaga cgagcggggt cggcccatc ggaccgcaag gaatcgggtc atacactaca	4380
tggcgtgatt tcatatgcgc gattgctgat ccccatgtgt atcactggca aactgtgatg	4440
gacgacaccg tcagtgcgtc cgtcgcgcag gctctcgatg agctgatgct ttgggccgag	4500
gactgccccg aagtccggca cctcgtgcac gcggatttcg gctccaacaa tgcctgacg	4560
gacaatggcc gcataacagc ggtcattgac tggagcgagg cgatgttcgg ggattcccaa	4620

tacgaggtcg	ccaacatctt	cttctggagg	ccgtggttgg	cttgtatgga	gcagcagacg	4680
cgctacttcg	agcggaggca	tccggagctt	gcaggatcgc	cgcggctccg	ggcgtatatg	4740
ctccgcattg	gtcttgacca	actctatcag	agcttggttg	acggcaatth	cgatgatgca	4800
gcttgggcgc	agggtcgatg	cgacgcaatc	gtccgatccg	gagccggggac	tgtcggggcgt	4860
acacaaatcg	cccgcagaag	cgcggccgtc	tggaccgatg	gctgtgtaga	agtactcgcc	4920
gatagtggaa	accgacgccc	cagcactcgt	ccgagggcaa	aggaatagtg	aggtacagct	4980
tggatcgatc	cggctgctaa	caaagcccga	aaggaagctg	agttggctgc	tgccaccgct	5040
gagcaataac	tagcataacc	ccttgggggc	tctaaacggg	tcttgagggg	ttttttgctg	5100
aaaggaggaa	ctatatccgg	atgatcgggc	gcgccgtcga	cggatccgta	cgcaaaggca	5160
aagatttaaa	ctcgaataca	ttacaaaagt	ctcaaacag	aggcaaggcc	atgcacaaag	5220
cacactctaa	gtgcttccat	tgcctactaa	gtagggtagc	tacacgatca	ccattcacca	5280
gtgatgatct	ttattaatat	acaacacact	cagagacagc	ttatgttata	gctagctagc	5340
ataaactatc	acatcatgtg	ttagtacgac	aagtgacaac	attgctttta	acttcgcggc	5400
cttggatcct	ctagaccgga	tataatgagc	cgtaaacaaa	gatgattaag	tagtaattaa	5460
tacgtactag	taaaagtggc	aaaagataac	gagaaagaac	caatttcttt	gcattcggcc	5520
ttagcgggaag	gcatatataa	gctttgatta	ttttatthag	tgtaatgatt	tcgtacaacc	5580
aaagcattta	tttagtactc	tcacacttgt	gtcgcggccg	cgaattcact	agtgattcct	5640
tatagagcct	tccccgcggg	ttgcttctcc	gccatccggg	cgaacaccgc	cagatagcgc	5700
agcaggatga	ccaacccttc	atggggcagc	gggttccgat	acggcaggth	gtgcttctgg	5760
cacagctgth	ccacctggta	gctaaccgct	gtcaggttgt	ggcgagggag	ggtcggccac	5820
aaatggtgct	caatctggta	attcaagcct	ccgaaaaacc	aatctgtgat	aatccctcgc	5880
cgaatgttca	tggtctcatg	gatctggcca	accgagaatc	catggccatc	ccagactgag	5940
tccccgatct	tctccagtgg	gtagtggthc	atgaacacca	cgatcgcaat	gccgaagccg	6000
ccaaccagct	ccgaaacgaa	aaacaccaac	agcgatgtga	ggatgctggg	cataaagaat	6060
aagtggaaaca	gggtcttcaa	ggtccagtgc	agggcgaggc	caatggcctc	cttcttatac	6120
tgagagcgat	agaattggth	atctctgtcc	ttcaaactgc	gcacggthca	cacgctctgg	6180
aaacacccaaa	tgaaccgcaa	caagatacag	atgaccaaga	aatagtactg	ctggaactga	6240
atgagctthc	gggaaatcgg	tgacgcccgt	gtgacgtcat	cctcagacca	ggctaagagg	6300
gggaggthgt	caatatcagg	gtcgtgccct	tgaacattgg	ttgccgaatg	atgtgcattg	6360
tgtctgtcct	tccaccatgt	cacggaaaaa	ccttgacagc	cattgccaaa	taccagtccc	6420

acgagggtgt	tccagttccg	gttcttgaaa	gtctgggtgg	ggcaaagtgc	atgagaaagc	6480
cagcccatct	gttgatagtg	catcccaagc	aacactgccc	caatgaaata	catctgatac	6540
tgaaccatca	ggaaataacc	cagcactcca	aggcccagtg	tggtgctgat	tttgtatgag	6600
taccagaggg	gggaggcatc	aaacatgcc	gttgcgatca	actcttctcg	gagcttccgg	6660
aaatcctctt	gagcttcatt	cactgcagcc	tgggggtggc	actcagaact	gggattgatt	6720
ttgggcatgc	gcttgagctt	gtcgaaggct	tcttgagagt	gcataaccat	gaaggcatca	6780
gtggcatccc	ttccttggt	attctctata	atttccgcac	caccaggggtg	gaaattgacc	6840
caggcagaca	catcatatgt	tgttccatca	attgtaagg	gaagcgcttg	gcgctttgac	6900
ttcatttcaa	tcgaattccc	gcggccgctt	ggggggctat	ggaagacttt	cttagttagt	6960
tgtgtgaata	agcaatgttg	ggagaatcgg	gactacttat	aggataggaa	taaaacagaa	7020
aagtattaag	tgctaataag	atatttagac	tgataattaa	aatcttcacg	tatgtccact	7080
tgatataaaa	acgtcaggaa	taaaggaagt	acagtagaat	ttaaagggtac	tctttttata	7140
tatacccgtg	ttctcttttt	ggctagctag	ttgcataaaa	aataatctat	atttttatca	7200
ttattttaaa	tatcttatga	gatggtaa	atttatcata	atttttttta	ctattattta	7260
ttatttgtgt	gtgtaataca	tatagaagtt	aattacaaat	tttatttact	ttttcattat	7320
tttgatatga	ttcaccatta	atttagtggt	attattttata	atagttcatt	ttaatctttt	7380
tgtatatatt	atgcgtgcag	tacttttttc	ctacatataa	ctactattac	attttattta	7440
tataatattt	ttattaatga	attttcgtga	taatatgtaa	tattgttcat	tattatttca	7500
gattttttta	aaatatttgt	gttattattt	atgaaatatg	taattttttt	agtatttgat	7560
tttatgatga	taaagtgttc	taaattcaaa	agaaggggga	aagcgtaaac	attaaaaaac	7620
gtcatcaaac	aaaaacaaaa	tcttggtta	aaagataaaa	ctgtttggtt	tgatcactgt	7680
tatttcgtaa	tataaaaaca	ttatttatat	ttatatgtgt	gacaaccaa	tttgcctatc	7740
aaatctaacc	aatataatgc	atgcgtggca	ggtaatgtac	taccatgaac	ttaagtcatg	7800
acataataaa	ccgtgaatct	gaccaatgca	tgtacctanc	taaattgtat	ttgtgacacg	7860
aagcaaatga	ttcaattcac	aatggagatg	ggaaacaaat	aatgaagaac	ccagaactaa	7920
gaaagctttt	ctgaaaaata	aaataaaggc	aatgtcaaaa	gtatactgca	tcatcagtc	7980
agaaagcaca	tgatatTTTT	ttatcagtat	caatgcagct	agttttattt	tacaatatcg	8040
atatagctag	tttaaatata	ttgcagctag	atttataaat	atttgtgtta	ttatttatca	8100
tttgtgtaat	cctgttttta	gtatttttagt	ttatatatga	tgataatgta	ttccaaattt	8160
aaaagaaggg	aaataaattt	aaacaagaaa	aaaagtcatc	aaacaaaaaa	caaagtaaag	8220
ggtggaaaga	tgttaccatg	taatgtgaat	gttacagtat	ttcttttatt	atagaggttaa	8280

caaattaact aatatgattt tgtaataat gataaaatat tttttttatt attatttcat 8340
 aatataaaaa tagtttactt aatataaaaa aaattctatc gttcacaaca aagttggcca 8400
 cctaatttaa ccatgcatgt acccatggac catattaggt aaccatcaaa cctgatgaag 8460
 agataaagag atgaagactt aagtcataac acaaaacat aaaaaacaaa aatacaatca 8520
 accgtcaatc tgaccaatgc atgaaaaagc tgcaatagtg agtggcgaca caaagcacat 8580
 gattttctta caacggagat aaaacaaaa aaatatttca tgaacaacct agaacaaata 8640
 aagcttttat ataataaata tataaataaa taaaggctat ggaataatat acttcaatat 8700
 atttgatta aataaattgt tggcgggggt gatatattta tacacaccta aagtcacttc 8760
 aatctcattt tcaacttaact tttatttttt ttttcttttt atttatcata aagagaatat 8820
 tgataatata ctttttaaca ttttttatg acatttttta ttggtgaaaa cttattaaaa 8880
 atcataaatt ttgtaagtta gatttattta aagagttcct cttcttattt taaatttttt 8940
 aataaatttt taaataacta aaatttgtgt taaaaatgtt aaaaaatgtg ttattaaccc 9000
 ttctcttcga ggac 9014

<210> 88
 <211> 5561
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмида pKR767

<400> 88
 catggtcaat caatgagacg ccaacttctt aatctattga gacctgcagg tctagaaggg 60
 cggatccccg ggtaccgagc tcgaattcac tggccgctgt tttacaacgt cgtgactggg 120
 aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc 180
 gtaatagcga agaggcccg accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg 240
 aatggcgccct gatgcggtat tttctcctta cgcactctgt cggatatttca caccgcatat 300
 ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacaccgcg 360
 caacaccgcg tgacgcgccc tgacgggctt gtctgtctcc ggcatccgct tacagacaag 420
 ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc agagggtttt accgtcatca ccgaaacgcg 480
 cgagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg ataataatgg 540
 tttcttagac gtcagggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat 600
 ttttctaaat acattcaa atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc 660
 aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattccct 720

tttttgcggc	attttgccct	cctgtttttg	ctcaccaga	aacgctggtg	aaagtaaaag	780
atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	gttacatcga	actggatctc	aacagcggta	840
agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	gatgagcact	tttaaagttc	900
tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgtattg	acgccgggca	agagcaactc	ggtcgccgca	960
tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	actcaccagt	cacagaaaag	catcttacgg	1020
atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	catgagtgat	aacactgcgg	1080
ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	aaccgctttt	ttgcacaaca	1140
tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	gctgaatgaa	gccataccaa	1200
acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtag	caatggcaac	aacgttgcg	aaactattaa	1260
ctggcgaaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	agactggatg	gaggcggata	1320
aagttgcagg	accacttctg	cgctcggccc	ttccggctgg	ctggtttatt	gctgataaat	1380
ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggta	tcattgcagc	actggggcca	gatggtaagc	1440
cctcccgtat	cgtagttatc	tacacgacgg	ggagtcaggc	aactatggat	gaacgaaata	1500
gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	gtaactgtca	gaccaagttt	1560
actcatatat	acttttagatt	gatttaaaac	ttcattttta	atttaaaagg	atctaggtga	1620
agatcctttt	tgataatctc	atgacccaaa	tcccttaacg	tgagttttcg	ttccactgag	1680
cgtcagaccc	cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	ctgcgcgtaa	1740
tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcggg	ggtttgtttg	ccggatcaag	1800
agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	agcgcagata	ccaaatactg	1860
tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	1920
acctcgctct	gctaatacctg	ttaccagtgg	ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	1980
ccgggttgga	ctcaagacga	tagttaccgg	ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	2040
gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	2100
gtgagctatg	agaaagcgcc	acgcttcccg	aagggagaaa	ggcggacagg	tatccggtaa	2160
gcggcagggg	cggaacagga	gagcgcacga	gggagcttcc	agggggaaac	gcctggtatc	2220
tttatagtcc	tgtcggggtt	cgccacctct	gacttgagcg	tcgatttttg	tgatgctcgt	2280
cagggggggc	gagcctatgg	aaaaacgcc	gcaacgcggc	ctttttacgg	ttcctggcct	2340
tttgctggcc	ttttgctcac	atgttctttc	ctgcgttatc	ccctgattct	gtggataacc	2400
gtattaccgc	ctttgagtga	gctgataccg	ctcgccgcag	ccgaacgacc	gagcgcagcg	2460
agtcagttag	cgaggaagcg	gaagagcgcc	caatacgcaa	accgcctctc	cccgcgcgtt	2520
ggccgattca	ttaatgcagc	tggcacgaca	ggtttcccga	ctggaaagcg	ggcagtgagc	2580

gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc	2640
ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaaacagct	2700
atgaccatga ttacgccaag cttgcatgcc tgcaggctag cctaagtacg tactcaaaat	2760
gccacaacaa aaaaaaaaaaag ttgctttaat aatgccaaaa caaattaata aaacacttac	2820
aacaccggat tttttttaat taaaatgtgc catttaggat aaatagttaa tatttttaat	2880
aattatttaa aaagccgtat ctactaaaat gatttttatt tggttgaaaa tattaatatg	2940
tttaaataca cacaatctat caaaattaaa ctaaaaaaaaa aataagtgtg cgtgggtaac	3000
attagtacag taatataaga ggaaaatgag aaattaagaa attgaaagcg agtctaattt	3060
ttaaattatg aacctgcata tataaaagga aagaaagaat ccaggaagaa aagaaatgaa	3120
accatgcatg gtccctcgt catcacgagt ttctgccatt tgcaatagaa aactgaaac	3180
acctttctct ttgtcactta attgagatgc cgaagccacc tcacaccatg aacttcatga	3240
ggtgtagcac ccaaggcttc catagccatg catactgaag aatgtctcaa gctcagcacc	3300
ctacttctgt gacgtgtccc tcattcacct tcctctcttc cctataaata accacgcctc	3360
aggttctccg cttcacaact caaacattct ctccattggg ccttaaacac tcatcagtca	3420
tcaccgcggc cgcattggga cggaccaagg aaaaaccttc acctgggaag agctggcggc	3480
ccataacacc aaggacgacc tactcttggc catccgcggc aggggtgtac atgtcacaaa	3540
gttcttgagc cgccatcctg gtggagtgga cactctcctg ctcgagctg gccgagatgt	3600
tactccggtc tttgagatgt atcacgcgtt tggggctgca gatgccatta tgaagaagta	3660
ctatgtcggg aactgggtct cgaatgagct gccatcttc ccggagccaa cgggtgtcca	3720
caaaaccatc aagacgagag tcgagggcta ctttacggat cggaacattg atcccaagaa	3780
tagaccagag atctggggac gatacgtctt tatctttgga tccttgatcg ctctacta	3840
cgcgagctc tttgtgcctt tcgttgtcga acgcacatgg cttcaggtgg tgtttgcaat	3900
catcatggga tttgcgtgcg cacaagtcgg actcaaccct cttcatgatg cgtctcactt	3960
ttcagtgacc cacaaccca ctgtctggaa gattctggga gccacgcacg actttttcaa	4020
cggagcatcg tacctgggtg ggatgtacca acatatgctc ggccatcacc cctacaccaa	4080
cattgctgga gcagatccc acgtgtcgac gtctgagccc gatgttcgtc gtatcaagcc	4140
caacaaaaag tggtttgtca accacatcaa ccagcacatg tttgttctt tcctgtacgg	4200
actgctggcg ttcaaggtgc gcattcagga catcaacatt ttgtactttg tcaagaccaa	4260
tgacgctatt cgtgtcaatc ccatctcgac atggcacact gtgatgttct ggggcggcaa	4320
ggctttcttt gtctggtatc gcctgattgt tcccctgcag tatctgcccc tgggcaagg	4380

```

gctgctcttg ttcacggtcg cggacatggt gtcgtcttac tggctggcgc tgaccttcca 4440
ggcgaaccac gttgttgagg aagttcagtg gccgttgccct gacgagaacg ggatcatcca 4500
aaaggactgg gcagctatgc aggtcgagac tacgcaggat tacgcacacg attcgcacct 4560
ctggaccagc atcactggca gcttgaacta ccaggctgtg caccatctgt tccccaacgt 4620
gtcgcagcac cattatcccc atattctggc catcatcaag aacacctgca gcgagtacaa 4680
ggttccatac cttgtcaagg atacgttttg gcaagcattt gcttcacatt tggagcactt 4740
gcgtgttctt ggactccgtc ccaaggaaga gtaggcggcc gcatttcgca ccaaataaat 4800
gaaagtaata atgaaaagtc tgaataagaa tacttaggct tagatgcctt tgttacttgt 4860
gtaaaataac ttgagtcagc tacctttggc ggaaacagaa taaataaaag gtgaaattcc 4920
aatgctctat gtataagtta gtaatactta atgtgttcta cggttgtttc aatatcatca 4980
aactctaatt gaaactttag aaccacaaat ctcaatcttt tcttaatgaa atgaaaaatc 5040
ttaattgtac catgtttatg ttaaaccact tacaattggg tggagaggag gaccaaccga 5100
tgggacaaca ttgggagaaa gagattcaat ggagatttgg ataggagaac aacattcttt 5160
ttcacttcaa tacaagatga gtgcaacact aaggatatgt atgagacttt cagaagctac 5220
gacaacatag atgagtgagg tgggtgattcc tagcaagaaa gacattagag gaagccaaaa 5280
tcgaacaagg aagacatcaa gggcaagaga caggaccatc catctcagga aaaggagctt 5340
tgggatagtc cgagaagttg tacaagaaat tttttggagg gtgagtgatg cattgctggg 5400
gactttaact caatcaaaat tgagaaagaa agaaaagggg gggggctcac atgtgaatag 5460
aagggaaacg ggagaatttt acagttttga tctaattggg atcccagcta gtggtaacat 5520
attcaccatg tttaaccttc acgtacgtct agaggatccc c 5561

```

<210> 89
 <211> 11889
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмида pKR916

<220>
 <221> разный признак
 <222> (7810)..(7810)
 <223> n представляет собой а, с, г или т

```

<400> 89
ggagatccaa gcttttgatc catgcccttc atttgccgct tattaattaa tttggttaaca 60
gtccgtacta atcagttact tatccttccc ccatcataat taatcttggg agtctcgaat 120
gccacaacac tgactagtct cttggatcat aagaaaaagc caaggaacaa aagaagacaa 180

```

aacacaaatga	gagtatcctt	tgcatagcaa	tgtctaagtt	cataaaaattc	aaacaaaaaac	240
gcaatcacac	acagtggaca	tcacttatcc	actagctgat	caggatcgcc	gcgtcaagaa	300
aaaaaaaactg	gacccccaaaa	gccatgcaca	acaacacgta	ctcaciaaagg	tgtcaatcga	360
gcagcccaaa	acattcacca	actcaaccca	tcattgagccc	tcacatttgt	tgttttctaac	420
ccaacctcaa	actcgtattc	tcttcgcgca	cctcattttt	gtttatttca	acacccgtca	480
aactgcatgc	caccccggtg	ccaaatgtcc	atgcatgtta	acaagaccta	tgactataaa	540
tagctgcaat	ctcggcccag	gttttcatca	tcaagaacca	gttcaatata	ctagtacacc	600
gtattaaaga	atttaagata	tactgcgggc	gcaccatgga	ggtggtgaat	gaaatagtct	660
caattgggca	ggaagtttta	cccaaagttg	attatgccca	actctggagt	gatgccagtc	720
actgtgaggt	gctttacttg	tccatcgcat	ttgtcatctt	gaagtccact	cttggccccc	780
ttggtccaaa	aggtcagtct	cgtatgaagt	ttgttttcac	caattacaac	cttctcatgt	840
ccatttattc	gttgggatca	ttcctctcaa	tggcatatgc	catgtacacc	atcgggtgtta	900
tgtctgacaa	ctgcgagaag	gcttttgaca	acaacgtctt	caggatcacc	acgcagttgt	960
tctatttgag	caagttcctg	gagtatattg	actccttcta	tttgccactg	atgggcaagc	1020
ctctgacctg	gttgcaattc	ttccatcatt	tgggggcacc	gatggatatg	tggctgttct	1080
ataattaccg	aaatgaagct	gtttggattt	ttgtgctgtt	gaatggtttc	atccactgga	1140
tcattgtacg	ttattattgg	accagattga	tcaagctgaa	gttcccatg	ccaaaatccc	1200
tgattacatc	aatgcagatc	attcaattca	atgttggttt	ctacattgtc	tggaagtaca	1260
ggaacattcc	ctgttatcgc	caagatggga	tgaggatgtt	tggctgggtc	ttcaattact	1320
tttatgttgg	cacagtcttg	tgtttgttct	tgaatttcta	tgtgcaaacg	tatatcgtca	1380
ggaagcacia	gggagccaaa	aagattcagt	gagcgccgc	aagtatgaac	taaaatgcat	1440
gtagggtgta	gagctcatgg	agagcatgga	atattgtatc	cgaccatgta	acagtataat	1500
aactgagctc	catctcactt	cttctatgaa	taaacaaagg	atgttatgat	atattaacac	1560
tctatctatg	caccttattg	ttctatgata	aatttcctct	tattattata	aatcatctga	1620
atcgtgacgg	cttatggaat	gcttcaaata	gtacaaaaac	aaatgtgtac	tataagactt	1680
tctaaacaat	tctaacctta	gcattgtgaa	cgagacataa	gtgttaagaa	gacataacaa	1740
ttataatgga	agaagtttgt	ctccatttat	atattatata	ttaccactt	atgtattata	1800
ttaggatgtt	aaggagacat	aacaattata	aagagagaag	tttgtatcca	tttatatatt	1860
atatactacc	catttatata	ttatacttat	ccacttattt	aatgtcttta	taagggttga	1920
tccatgatata	ttctaataatt	ttagttgata	tgtatatgaa	agggacttat	ttgaactctc	1980

ttactctgta taaaggttgg atcatcctta aagtgggtct atttaatttt attgcttctt	2040
acagataaaa aaaaaattat gagttggttt gataaaatat tgaaggattt aaaataataa	2100
taaataacat ataatatatg tatataaatt tattataata taacatttat ctataaaaaa	2160
gtaaatattg tcataaatct atacaatcgt ttagccttgc tggacgaatc tcaattattt	2220
aaacgagagt aaacatattt gactttttgg ttatttaaca aattattatt taacactata	2280
tgaaattttt ttttttatca gcaaagaata aaattaaatt aagaaggaca atgggtgtccc	2340
aatccttata caaccaactt ccacaagaaa gtcaagtcag agacaacaaa aaaacaagca	2400
aaggaaattt tttaatttga gttgtcttgt ttgctgcata atttatgcag taaaacacta	2460
cacataaccc ttttagcagt agagcaatgg ttgaccgtgt gcttagcttc ttttatttta	2520
tttttttatc agcaaagaat aaataaaata aaatgagaca cttcagggat gtttcaacaa	2580
gcttggcgcg ccgttctata gtgtcaccta aatcgtatgt gtatgatata taaggttatg	2640
tattaattgt agccgcgttc taacgacaat atgtccatat ggtgcactct cagtacaatc	2700
tgetctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacaccgcg caacaccgcg tgacgcgccc	2760
tgacgggctt gtctgctccc ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc	2820
tgcatgtgtc agaggttttc accgtcatca ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgtg	2880
atacgccctat ttttataggt taatgtcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc	2940
cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg	3000
cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg	3060
gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca	3120
aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg	3180
cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgcg	3240
tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga	3300
acgggggggtt cgtgcacaca gccagccttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac	3360
ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat	3420
ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc	3480
tggtatcttt atagtctgtg cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga	3540
tgctcgtcag gggggcgag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc	3600
ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg	3660
gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag	3720
cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc	3780
gcgcgttggc cgattcatta atgcagggtg atcagatctc gatcccgca aattaatacg	3840

actcactata	gggagaccac	aacggtttcc	ctctagaaat	aattttgttt	aactttaaga	3900
aggagatata	cccatggaaa	agcctgaact	caccgcgacg	tctgtcgaga	agtttctgat	3960
cgaaaagttc	gacagcgtct	ccgacctgat	gcagctctcg	gagggcgaag	aatctcgtgc	4020
tttcagcttc	gatgtaggag	ggcgtggata	tgtcctgcgg	gtaaatagct	gcgccgatgg	4080
tttctacaaa	gatcgttatg	tttatcggca	ctttgcatcg	gccgcgctcc	cgattccgga	4140
agtgcttgac	attggggaat	tcagcgagag	cctgacctat	tgcattctccc	gccgtgcaca	4200
gggtgtcacg	ttgcaagacc	tgctgaaac	cgaactgccc	gctgttctgc	agccggtcgc	4260
ggaggctatg	gatgcgatcg	ctgcggccga	tcttagccag	acgagcgggt	tcggcccatt	4320
cggaccgcaa	ggaatcggtc	aatacactac	atggcgtgat	ttcatatgcg	cgattgctga	4380
tccccatgtg	tatcactggc	aaactgtgat	ggacgacacc	gtcagtgcgt	ccgtcgcgca	4440
ggctctcgat	gagctgatgc	tttgggccga	ggactgcccc	gaagtccggc	acctcgtgca	4500
cgcggaattc	ggctccaaca	atgtcctgac	ggacaatggc	cgcataacag	cggtcattga	4560
ctggagcgag	gcgatgttcg	gggattccca	atacgaggtc	gccaacatct	tcttctggag	4620
gccgtggttg	gcttgtatgg	agcagcagac	gcgctacttc	gagcggaggc	atccggagct	4680
tgcaggatcg	ccgcggctcc	gggcgtatat	gctccgcatt	ggtcttgacc	aactctatca	4740
gagcttggtt	gacggcaatt	tcgatgatgc	agcttgggcg	cagggtcgat	gcgacgcaat	4800
cgtccgatcc	ggagccggga	ctgtcgggcg	tacacaaatc	gcccgcagaa	gcgcggccgt	4860
ctggaccgat	ggctgtgtag	aagtactcgc	cgatagtgga	aaccgacgcc	ccagcactcg	4920
tccgagggca	aaggaatagt	gaggtacagc	ttggatcgat	ccggctgcta	acaaagcccc	4980
aaaggaagct	gagttggctg	ctgccaccgc	tgagcaataa	ctagcataac	cccttggggc	5040
ctctaaacgg	gtcttgaggg	gttttttgct	gaaaggagga	actatatccg	gatgatcggg	5100
cgcgccgctc	acggatccgt	acgcaaaggc	aaagatttaa	actcgaaaac	attacaaaag	5160
tctcaaaaaca	gaggcaaggc	catgcacaaa	gcacactcta	agtgcctcca	ttgcctacta	5220
agtagggtag	gtacacgatc	accattcacc	agtgatgatc	tttattaata	tacaacacac	5280
tcagagacag	cttatgttat	agctagctag	cataaactat	cacatcatgt	gttagtacga	5340
caagtgacaa	cattgctttt	aacttcgcgg	ccttggatcc	tctagaccgg	atataatgag	5400
ccgtaaacaa	agatgattaa	gtagtaatta	atacgtacta	gtaaaagtgg	caaaagataa	5460
cgagaaagaa	ccaatttctt	tgcattcggc	cttagcggaa	ggcatatata	agctttgatt	5520
attttattta	gtgtaatgat	ttcgtacaac	caaagcattt	atttagtact	ctcacacttg	5580
tgtcgcggcc	gcgaattcac	tagtgattcc	ttatagagcc	ttccccgcgg	gttgcttctc	5640

cgccatccgg	gcgaacaccg	ccagatagcg	cagcaggatg	accaaccctt	catggggcag	5700
cgggttccga	tacggcaggt	tgtgcttctg	gcacagctgt	tccacctggt	agctaaccgc	5760
tgtcagggtt	tggcgagggg	gggtcggcca	caaagtgtgc	tcaatctggt	aattcaagcc	5820
tccgaaaaac	caatctgtga	taatccctcg	cgaatgttc	atggctctcat	ggatctggcc	5880
aaccgagaat	ccatggccat	cccagactga	gtccccgac	ttctccagt	ggtagtgggt	5940
catgaacacc	acgatcgcaa	tgccgaagcc	gccaaaccagc	tccgaaacga	aaaacaccaa	6000
cagcgatgtg	aggatgctgg	gcataaagaa	taagtggaac	agggcttca	aggtccagt	6060
cagggcgagg	ccaatggcct	ccttcttata	ctgagagcga	tagaattggt	tatctctgtc	6120
cttcaaactg	cgcacgggtca	acacgctctg	gaaacaccaa	atgaaccgca	acaagataca	6180
gatgaccaag	aaatagtact	gctggaactg	aatgagcttg	cgggaaatcg	gtgacgccc	6240
tgtgacgtca	tcctcagacc	aggctaagag	ggggaggttg	tcaatatcag	ggctctgccc	6300
ttgaacattg	gttgccgaat	gatgtgcatt	gtgtctgtcc	ttccaccatg	tcacggaaaa	6360
accttgacga	ccattgccaa	ataccagtcc	cacgaggttg	ttccagttcc	ggttcttgaa	6420
agtctggtgg	tggcaaatgt	catgagaaag	ccagcccatc	tgttgatagt	gcacccaag	6480
caacactgcc	ccaatgaaat	acatctgata	ctgaaccatc	aggaaataac	ccagcactcc	6540
aaggcccagt	gtggtgctga	ttttgtatga	gtaccagagg	ggggaggcat	caaacatgcc	6600
agttgcgac	aactcttctc	ggagcttccg	gaaatcctct	tgagcttcat	tcactgcagc	6660
ctgggggtgg	aactcagaac	tgggattgat	tttgggcatg	cgcttgagct	tgtcgaaggc	6720
ttcttgagag	tgcataacca	tgaaggcatc	agtggcatcc	cttccttggt	aattctctat	6780
aatttccgca	ccaccagggt	ggaaattgac	ccaggcagac	acatcatatg	ttgttccatc	6840
aattgtaagg	ggaagcgctt	ggcgctttga	cttcatttca	atcgaattcc	cgcggccgct	6900
tgggggggcta	tggaagactt	tcttagttag	ttgtgtgaat	aagcaatgtt	gggagaatcg	6960
ggactactta	taggatagga	ataaaacaga	aaagtattaa	gtgctaata	aatatttaga	7020
ctgataatta	aaatcttcac	gtatgtccac	ttgatataaa	aacgtcagga	ataaaggaag	7080
tacagtagaa	tttaaaggta	ctctttttat	atatacccg	gttctctttt	tggctagcta	7140
gttgcataaa	aaataatcta	tattttttatc	attatttttaa	atatcttatg	agatggtaaa	7200
tatttatcat	aatttttttt	actattat	attatttgtg	tgtgtaatac	atatagaagt	7260
taattacaaa	ttttatttac	tttttcatta	ttttgatatg	attcaccatt	aatttagtgt	7320
tattatttat	aatagttcat	tttaatcttt	ttgtatatat	tatgcgtgca	gtactttttt	7380
cctacatata	actactatta	catttttatt	atataatatt	tttattaatg	aattttcgtg	7440
ataatatgta	atattgttca	ttattatttc	agatttttta	aaaatatttg	tgttattatt	7500

tatgaaatat gtaatTTTTT tagtatttga ttttatgatg ataaagtgtt ctaaattcaa	7560
aagaaggggg aaagcgtaaa cattaaaaaa cgtcatacaa caaaaacaaa atcttggttaa	7620
taaagataaa actgtttgtt ttgatcactg ttatttcgta atataaaaac attattttata	7680
tttatattgt tgacaaccaa atttgcctat caaatctaac caatataatg catgcgtggc	7740
aggtaatgta ctaccatgaa ctttaagtcac gacataataa accgtgaatc tgaccaatgc	7800
atgtacctan ctaaattgta tttgtgacac gaagcaaagc attcaattca caatggagat	7860
gggaaacaaa taatgaagaa cccagaacta agaaagcttt tctgaaaaat aaaataaagg	7920
caatgtcaaa agtatactgc atcatcagtc cagaaagcac atgatatttt tttatcagta	7980
tcaatgcagc tagttttatt ttacaatatc gatatagcta gtttaaatat attgcagcta	8040
gattttataaa tatttgtgtt attattttatc atttgtgtaa tcctgttttt agtatttttag	8100
tttatatatg atgataatgt attccaaatt taaaagaagg gaaataaatt taaacaagaa	8160
aaaaagtcac caaacaaaaa acaaatgaaa ggggtggaaag atgttaccat gtaatgtgaa	8220
tgttacagta tttcttttat tatagagtta acaaattaac taatatgatt ttgttaataa	8280
tgataaaata ttttttttat tattatttca taatataaaa atagtttact taatataaaa	8340
aaaattctat cgttcacaac aaagttggcc acctaattha accatgcatg taccatgga	8400
ccatattagg taaccatcaa acctgatgaa gagataaaga gatgaagact taagtcataa	8460
cacaaaacca taaaaaaca aaatacaatc aaccgtcaat ctgaccaatg catgaaaaag	8520
ctgcaatagt gagtggcgac acaaagcaca tgattttctt acaacggaga taaaacaaaa	8580
aaaatatttc atgaacaacc tagaacaat aaagctttta tataataaat atataataa	8640
ataaaggcta tggaataata tacttcaata tatttggatt aaataaattg ttggcgggg	8700
tgatatattt atacacacct aaagtcactt caatctcatt ttcacttaac ttttattttt	8760
ttttctttt tatttatcat aaagagaata ttgataatat actttttaac atatttttat	8820
gacatttttt attggtgaaa acttattaaa aatcataaat tttgtaagtt agattttatt	8880
aaagagttcc tcttcttatt ttaaattttt taataaattt ttaaataact aaaatttgtg	8940
ttaaaaatgt taaaaaatgt gttattaacc cttctcttcg aggacgtacg agatccggcc	9000
ggccagatcc tgcaggtctc aatagattaa gaagttggcg tctcattgat tgaccatggg	9060
ggatcctcta gacgtacgtg aaggttaaac atggtgaata tgttaccact agctgggatg	9120
cccattagat caaaactgta aaattctccc gtttcccttc tattcacatg tgagccccct	9180
cccttttctt tctttctcaa ttttgattga gttaaagtca ccagcaatgc atcactcacc	9240
ctccaaaaaa tttcttgtac aacttctcgg actatcccaa agctcctttt cctgagatgg	9300

atggtcctgt	ctcttgccct	tgatgtcttc	cttggtcgat	tttggcttcc	tctaattgtct	9360
ttcttgctag	gaatcaccac	ctcactcatc	tatggtgtcg	tagcttctga	aagtctcata	9420
catatcctta	gtgttgcact	catcttgat	tgaagtga	aagaatgttg	ttctcctatc	9480
caaattctca	ttgaattctct	ttctcccaat	gttggtccat	cgggttggtcc	tcctctccaa	9540
ccaattgtaa	ggtgtttaac	ataaacatgg	tacaattaag	atctttcatt	tcattaagaa	9600
aagattgaga	tttgtgggtc	taaagtttca	attagagttt	gatgatattg	aaacaaccgt	9660
agaacacatt	aagtattact	aacttataca	tagagcattg	gaatttcacc	ttttatttat	9720
tctgtttccg	ccaaaggtag	atgactcaag	ttattttaca	caagtaacaa	aggcatctaa	9780
gcctaagtat	tcttattcag	acttttcatt	attactttca	ttgatttggg	gcgaaatgcg	9840
gccgcctact	cttccttggg	acggagttca	agaacacgca	agtgtcccaa	atgtgaagca	9900
aatgcttgcc	aaaacgtatc	cttgacaagg	tatggaacct	tgtactcgct	gcagggtgtc	9960
ttgatgatgg	ccagaatatc	gggataatgg	tgctgcgaca	cgttggggaa	cagatgggtgc	10020
acagcctggg	agttcaagct	gccagtgatg	ctgggtccaga	ggtgcgaatc	gtgtgcgtaa	10080
tcctgcgtag	tctcgacctg	catagctgcc	cagtcctttt	ggatgatccc	gttctcgtca	10140
ggcaacggcc	actgaacttc	ctcaacaacg	tggttcgcct	ggaaggtagc	cgccagccag	10200
taagacgaca	ccatgtccgc	gaccgtgaac	aagagcagca	ccttgcccag	gggcagatac	10260
tgcaggggaa	caatcaggcg	ataccagaca	aagaaagcct	tgccgcccc	gaacatcaca	10320
gtgtgccatg	tcgagatggg	attgacacga	atagcgtcat	tggtcttgac	aaagtacaaa	10380
atgttgatgt	cctgaatgcg	caccttgaac	gccagcagtc	cgtacaggaa	aggaacaaac	10440
atgtgctggg	tgatgtgggt	gacaaaccac	ttttgggtgg	gcttgatacg	acgaacatcg	10500
ggctcagacg	tcgacacgtc	gggatctgct	ccagcaatgt	tggtgtaggg	gtgatggccg	10560
agcatatggt	ggtacatcca	caccaggtac	gatgctccgt	tgaaaaagtc	gtgcgtggct	10620
cccagaatct	tccagacagt	ggggttgtgg	gtcactgaaa	agtgagacgc	atcatgaaga	10680
gggttgagtc	cgacttgtgc	gcacgcaa	cccatgatga	ttgcaaacac	cacctgaagc	10740
catgtgcgtt	cgacaacgaa	aggcacaaag	agctgcgcgt	agtaggaagc	gatcaaggat	10800
ccaaagataa	gagcgtatcg	tccccagatc	tctgggtctat	tcttgggatac	aatgttccga	10860
tccgtaaagt	agccctcgac	tctcgtcttg	atgggtttgt	ggaacaccgt	tggtccggg	10920
aagatgggca	gctcattcga	gaccagtgtg	ccgacatagt	acttcttcat	aatggcatct	10980
gcagcccaaa	acgcgtgata	catctcaaag	accggagtaa	catctcggcc	agctccgagc	11040
aggagagtgt	ccactccacc	aggatggcgg	ctcaagaact	ttgtgacatc	gtacaccctg	11100
ccgcggatgg	ccaagagtag	gtcgtccttg	gtgttatggg	ccgccagctc	ttcccagggtg	11160

aagggtttttc cttgggtccgt tcccatgctgg ccgctggatg gactgatgag tgtttaagga 11220
ccaatggaga gaatgtttga gttgtgaagc ggagaacctg aggcgtgggt atttataggg 11280
aagagaggaa ggtgaatgag ggacacgtca cagaagtagg gtgctgagct tgagacattc 11340
ttcagtatgc atggctatgg aagccttggg tgctacacct catgaagttc atgggtgtgag 11400
gtggcttcgg catctcaatt aagtgacaaa gagaaagggtg tttcagtgtt tctattgcaa 11460
atggcagaaa ctcgtgatga cgaggggacc atgcatgggt tcatttcttt tcttcctgga 11520
ttctttcttt ccttttatat atgcaggttc ataatttaaa aattagactc gctttcaatt 11580
tcttaatttc tcattttcct cttatattac tgtactaatg ttaaccacgt acacttattt 11640
tttttttagt ttaattttga tagattgtgt tgatttaaac atattaatat tttcaaccaa 11700
ataaaaaatca ttttagtaga tacggctttt taaataatta ttaaaaatat taactattta 11760
tcctaaatgg cacattttta ttaaaaaaaaa tccgggtgtg taagtgtttt attaatttgt 11820
tttggcatta ttaaagcaac ttttttttta tttgttggca ttttgagtac gtacttaggc 11880
tagcctgca 11889

<210> 90
<211> 5661
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Плазмида pKR974

<400> 90
gtacgtctag aggatcccc atggtcaatc aatgagacgc caacttctta atctattgag 60
acctgcagggt ctagaagggc ggatccccgg gtaccgagct cgaattcact ggccgtcgtt 120
ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatcgcct tgcagcacat 180
ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa gagggccgca ccgatcgccc ttcccaacag 240
ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc 300
ggatatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta 360
agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg 420
gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca 480
ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt 540
aatgtcatga taataatgg ttcttagacg tcagggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc 600
ggaaccctta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa 660
taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc 720

cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa	780
acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa	840
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg	900
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa	960
gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc	1020
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	1080
atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	1140
accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag	1200
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccctgtagc aatggcaaca	1260
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata	1320
gactggatgg aggcgggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc	1380
tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca	1440
ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca	1500
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg	1560
taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa	1620
tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacccaaat cccttaacgt	1680
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat	1740
cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg	1800
gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga	1860
gcgcagatac caaataactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac	1920
tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt	1980
ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggtg tcaagacgat agttaccgga taaggcgag	2040
cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc	2100
gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag	2160
gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca	2220
gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt	2280
cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc	2340
tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc	2400
cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc	2460
cgaacgaccg agcgacgca gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa	2520
ccgcctctcc ccgcgcggtg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac	2580

tggaaagcgg	gcagtgagcg	caacgcaatt	aatgtgagtt	agctcactca	ttaggcaccc	2640
caggctttac	actttatgct	tccggctcgt	atgttggtg	gaattgtgag	cggataacaa	2700
tttcacacag	gaaacagcta	tgaccatgat	tacgccaagc	ttgcatgcct	gcaggctagc	2760
ctaagtacgt	actcaaaatg	ccaacaaata	aaaaaaaaag	tgctttaata	atgccaaaac	2820
aaattaataa	aacacttaca	acaccggatt	ttttttaatt	aaaatgtgcc	atntagkata	2880
aatagttaat	atttttaata	attattttaa	aagccgtatc	tactaaaatg	atttttat	2940
ggttgaaaat	attaatatgt	ttaaataaac	acaatctatc	aaaattaaac	taaaaaaaaa	3000
ataagtgtac	gtggttaaca	ttagtacagt	aatataagag	gaaaatgaga	aattaagaaa	3060
ttgaaagcga	gtctaatttt	taaattatga	acctgcatat	ataaaaggaa	agaaagaatc	3120
caggaagaaa	agaaatgaaa	ccatgcatgg	tcccctcgtc	atcacgagtt	tctgccattt	3180
gcaatagaaa	cactgaaaca	cctttctctt	tgctacttaa	ttgagatgcc	gaagccacct	3240
cacaccatga	acttcatgag	gtgtagcacc	caaggcttcc	atagccatgc	atactgaaga	3300
atgtctcaag	ctcagcacc	tacttctgtg	acgtgtccct	cattcacctt	cctctcttcc	3360
ctataaataa	ccacgcctca	ggttctccgc	ttcacaactc	aaacattctc	tccattggtc	3420
cttaaacact	catcagtcac	caccgcggcc	gccaatccat	ggccccgcag	acggagctcc	3480
gccagcgcca	cgccgccgtc	gccgagacgc	cggtggccgg	caagaaggcc	tttcatggc	3540
aggaggtcgc	gcagcacaac	acggcgccct	cgccctggat	cattatccgc	ggcaaggctc	3600
acgacgtgac	cgagtgggcc	aacaagcacc	ccggcgcccg	cgagatggtg	ctgctgcacg	3660
ccggtcgcga	ggccaccgac	acgttcgact	cgtaccaccc	gttcagcgac	aaggccgagt	3720
cgatcttgaa	caagtatgag	attggcacgt	tcacgggccc	gtccgagttt	ccgaccttca	3780
agccggacac	gggcttctac	aaggagtgcc	gcaagcgcg	tggcgagtac	ttcaagaaga	3840
acaacctcca	tccgcaggac	ggcttcccgg	gcctctggcg	catgatggtc	gtgtttgcgg	3900
tcgcccggct	cgccttgtag	ggcatgcact	tttcgactat	ctttgcgctg	cagctcgcgg	3960
ccgcggcgct	ctttggcgtc	tgccaggcgc	tgccgctgct	ccacgtcatg	cacgactcgt	4020
cgcacgcgct	gtacaccaac	atgccgttct	tccattacgt	cgtcggccgc	tttgccatgg	4080
actggtttgc	cggcggtctg	atggtgtcat	ggctcaacca	gcacgtcgtg	ggccaccaca	4140
tctacacgaa	cgtcgcgggc	tcggacccgg	atcttccgg	caacatggac	ggcgacatcc	4200
gccgcacgt	gaaccgccag	gtgttccagc	ccatgtacgc	attccagcac	atctaccttc	4260
cgcgcgtcta	tggcgtgctt	ggcctcaagt	tccgcattcca	ggacttcacc	gacacgttgc	4320
gctcgcacac	gaacggcccc	atccgcgtca	acccgcacgc	gctctcgacg	tggatggcca	4380

```

tgatcagctc caagtcgttc tgggccttct accgcgtgta ccttccgctt gccgtgctcc 4440
agatgccccat caagacgtac cttgcgatct tcttcctcgc cgagtttgtc acgggctggc 4500
acctcgcgtt caacttccaa gtaagccatg tctcgaccga gtgcggctac ccatgcggcg 4560
acgaggccaa gatggcgctc caggacgagt gggcagtctc gcaggtcaag acgtcggctc 4620
actacgcccc tggctcgtgg atgacgacgt tccttgccgg cgcgctcaac taccaggctc 4680
tgcaccactt gttccccagc gtgtcgcagt accactaccc ggcgatcgcg cccatcatcg 4740
tcgacgtctg caaggagtac aacatcaagt acgccatctt gccggacttt acggcggcgt 4800
tcgttgcccc cttgaagcac ctccgcaaca tgggccagca gggcatcgcc gccacgatcc 4860
acatgggcta actcgagctc agctagatcg cggccgcatt tcgcaccaa tcaatgaaag 4920
taataatgaa aagtctgaat aagaatactt aggccttagat gcctttgtta cttgtgtaaa 4980
ataacttgag tcatgtacct ttggcgaaa cagaataaat aaaaggtgaa attccaatgc 5040
tctatgtata agttagtaat acttaatgtg ttctacgggt gtttcaatat catcaaactc 5100
taattgaaac tttagaacca caaatctcaa tcttttctta atgaaatgaa aaatcttaat 5160
tgtaccatgt ttatgttaaa caccttacia ttaattgggt ggagaggagg accaaccgat 5220
gggacaacat tgggagaaa agattcaatg gagatttgga taggagaaca acattctttt 5280
tcacttcaat acaagatgag tgcaacacta aggatatgta tgagactttc agaagctacg 5340
acaacataga tgagtggagt ggtgattcct agcaagaaa acattagagg aagccaaaat 5400
cgaacaagga agacatcaag ggcaagagac aggaccatcc atctcaggaa aaggagcttt 5460
gggatagtcc gagaagttgt acaagaaaatt ttttgagggg tgagtgatgc attgctggtg 5520
actttaactc aatcaaaaatt gagaaaagaa gaaaaggagg ggggctcaca tgtgaataga 5580
agggaaacgg gagaatttta cagttttgat ctaatgggca tcccagctag tggtaacata 5640
ttcaccatgt ttaaccttca c 5661

```

<210> 91

<211> 5578

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плазмида pKR1032

<400> 91

```

ggccgcattt cgcaccaaat caatgaaagt aataatgaaa agtctgaata agaatactta 60
ggcttagatg cctttgttac ttgtgtaaaa taacttgagt catgtacctt tggcggaaac 120
agaataaata aaagggtgaaa ttccaatgct ctatgtataa gttagtaata cttaatgtgt 180
tctacggttg tttcaatatc atcaaactct aattgaaact ttagaaccac aaatctcaat 240

```

cttttcttaa tgaaatgaaa aatcttaatt gtaccatggt tatgttaaac accttacaat	300
taattgggtg gagaggagga ccaaccgatg ggacaacatt gggagaaaga gattcaatgg	360
agatttggtat aggagaacaa cattcttttt cacttcaata caagatgagt gcaacactaa	420
ggatatgtat gagactttca gaagctacga caacatagat gagtgggtg gtgattccta	480
gcaagaaaga cattagagga agccaaaatc gaacaaggaa gacatcaagg gcaagagaca	540
ggaccatcca tctcaggaaa aggagctttg ggatagtccg agaagttgta caagaaattt	600
tttggagggt gagtgatgca ttgctggtga ctttaactca atcaaaattg agaaagaaag	660
aaaagggagg gggctcacat gtgaatagaa gggaaacggg agaattttac agttttgatc	720
taatgggcat cccagctagt ggtaacatat tcaccatggt taaccttcac gtacgtctag	780
aggatcccc atggtcaatc aatgagacgc caacttctta atctattgag acctgcaggt	840
ctagaagggc ggatccccgg gtaccgagct cgaattcact ggccgtcgtt ttacaacgtc	900
gtgactggga aaaccctggc gttaccaaac ttaatcgct tgcagcacat cccctttcg	960
ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgacgccc tcccaacag ttgcgcagcc	1020
tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac	1080
accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc	1140
gacaccgccc aacaccgct gacgcgcct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt	1200
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	1260
cgaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga	1320
taataatggt ttcttagacg tcagggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccctta	1380
tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat	1440
aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc	1500
ttattccctt ttttgcgga ttttgccctc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga	1560
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca	1620
acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt	1680
ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg	1740
gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc	1800
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata	1860
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt	1920
tgcaacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcggtg ggaaccggag ctgaatgaag	1980
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca	2040

aactattaac	tggcgaacta	cttactctag	cttccccggca	acaattaata	gactggatgg	2100
aggcggataa	agttgcagga	ccacttctgc	gctcggccct	tccggctggc	tggtttattg	2160
ctgataaatc	tggagccggg	gagcgtgggt	ctcgcggtat	cattgcagca	ctggggccag	2220
atggtaagcc	ctccccgtatc	gtagttatct	acacgacggg	gagtcaggca	actatggatg	2280
aacgaaatag	acagatcgct	gagatagggt	cctcactgat	taagcattgg	taactgtcag	2340
accaagttta	ctcatatata	ctttagattg	atttaaaact	tcatttttaa	tttaaaagga	2400
tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	tgacccaaat	cccttaacgt	gagttttcgt	2460
tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	ttcttgagat	cctttttttc	2520
tgcgcgtaat	ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	accagcgggt	gtttgtttgc	2580
cggatcaaga	gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	cttcagcaga	gcgcagatac	2640
caaatactgt	ccttctagtg	tagccgtagt	taggccacca	cttcaagaac	tctgtagcac	2700
cgcctacata	cctcgctctg	ctaatacctgt	taccagtggc	tgctgccagt	ggcgataagt	2760
cgtgtcttac	cgggttggtg	tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgag	cggtcgggct	2820
gaacgggggg	ttcgtgcaca	cagcccagct	tggagcgaa	gacctacacc	gaactgagat	2880
acctacagcg	tgagctatga	gaaagcgcca	cgcttcccg	aggagaaaag	gcggacaggt	2940
atccggtaag	cggcagggtc	ggaacaggag	agcgcacgag	ggagcttcca	gggggaaacg	3000
cctggtatct	ttatagtcct	gtcgggtttc	gccacctctg	acttgagcgt	cgatttttgt	3060
gatgctcgtc	agggggggcg	agcctatgga	aaaacgccag	caacgcggcc	tttttacggg	3120
tcttgccctt	ttgctggcct	tttgctcaca	tgttctttcc	tgcgttatcc	cctgattctg	3180
tggataaccg	tattaccgcc	tttgagttag	ctgataccgc	tcgccgcagc	cgaacgaccg	3240
agcgcagcga	gtcagttagc	gaggaagcgg	aagagcgccc	aatacgcaaa	ccgcctctcc	3300
ccgcgcgttg	gccgattcat	taatgcagct	ggcacgacag	gtttcccgac	tggaaagcgg	3360
gcagttagcg	caacgcaatt	aatgtgagtt	agctcactca	ttaggcaccc	caggctttac	3420
actttatgct	tccggctcgt	atgttgtgtg	gaattgtgag	cggataacaa	tttcacacag	3480
gaaacagcta	tgaccatgat	tacgccaagc	ttgcatgcct	gcaggctagc	ctaagtacgt	3540
actcaaatg	ccaacaaata	aaaaaaaaag	tgctttaata	atgccaaaac	aaattaataa	3600
aacacttaca	acaccggatt	ttttttaatt	aaaatgtgcc	atttaggata	aatagttaat	3660
atttttaata	attattttaa	aagccgtatc	tactaaaatg	atttttat	ggttgaaaat	3720
attaatatgt	ttaaatcaac	acaatctatc	aaaattaaac	taaaaaaaaa	ataagtgtac	3780
gtggttaaca	ttagtacagt	aatataagag	gaaaatgaga	aattaagaaa	ttgaaagcga	3840
gtctaatttt	taaattatga	acctgcatat	ataaaaggaa	agaaagaatc	caggaagaaa	3900

agaaatgaaa ccatgcatgg tccccctcgtc atcacgagtt tctgccattt gcaatagaaa 3960
 cactgaaaca cctttctctt tgtcacttaa ttgagatgcc gaagccacct cacaccatga 4020
 acttcatgag gtgtagcacc caaggcttcc atagccatgc atactgaaga atgtctcaag 4080
 ctcagcacc cacttctgtg acgtgtccct cattcacctt cctctcttcc ctataaataa 4140
 ccacgcctca ggttctccgc ttcacaactc aaacattctc tccattgggc cttaaact 4200
 catcagtcac caccgcggcc gcaaaccatg gctctcagtc ttaccacaga acagctgtta 4260
 gaacgccctg atttggttgc gattgatggc atcctctacg accttgaagg gcttgccaaa 4320
 gttcatccag gaggagattt gattctcgct tctggcgct ctgatgcctc cctctcttt 4380
 tattcaatgc atccatacgt caaacccgag aattccaaat tgcttcaaca gtctgtccga 4440
 gggaagcatg accgcacctc gaaggacatt gtctacacgt atgattctcc cttcgacaaa 4500
 gacgttaagc ggacaatgcg cgaggtgatg aaagggagga actggtacgc aaccctggc 4560
 ttctggctgc gcaccgttg gatcatcgcc gtgacggcct tttgcgagtg gactgggct 4620
 accacgggga tgggtgctgtg gggcctgttg actggattca tgcacatgca gatcggtta 4680
 tccatccagc atgatgcgtc ccacggggcc atcagcaaga agccttgggt caacgccctc 4740
 ttgcctacg gcattgacgt catcggatcg tcccggtgga tttggctgca gtcgcacatc 4800
 atgcggcacc acacctacac caaccagcac ggcctcgacc tggatgcgga gtcggcagag 4860
 ccgttcttg tggtccacaa ctaccccgcc gcaaaccacg cccgaaagtg gttccaccgc 4920
 ttccaagctt ggtacatgta ccttgtgctg ggggcatacg gggtatcgct ggtgtacaac 4980
 ccgctctaca ttttccggat gcagcacaat gacaccatcc cagagtctgt cacggccatg 5040
 cgggaaaatg gctttctgcg gcgtaccgc acacttgcat tcgtgatgcg agctttcttc 5100
 atcttccgga ccgcattctt gccctggtag ctcactggga cctcattgct gatcaccatt 5160
 cctctggtgc ccaccgaac tgggtgcctc ttgacgttct tcttcatttt gtcccacaat 5220
 tttgatggct ccgaacggat ccccgacaag aactgcaagg ttaagagatc tgagaaggac 5280
 gttgaggctg accaaattga ctggtatcgg gcgcaggtgg agacgtcctc cacatacggc 5340
 ggccccatcg ccatgttctt cactggcggt ctcaatttcc agatcgagca ccacctctt 5400
 ccccgatgt cgtcttggca ctaccccttc gtccagcagg cggtcgggga gtgttgcaa 5460
 cgccatggag tgcgatatgt tttctaccct accatcgtcg gcaacatcat ctccaccctg 5520
 aagtacatgc ataaggtggg tgtcgtccac tgcgtgaagg acgcacagga ttcctaag 5578

<210> 92
 <211> 11907
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плазмида pKR1037

<220>

<221> разный признак

<222> (7810)..(7810)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<400> 92

```

ggagatccaa gcttttgatc catgcccttc atttgccgct tattaattaa tttggtaaca      60
gtccgtacta atcagttact tacccttccc ccatcataat taatcttggg agtctcgaat      120
gccacaacac tgactagtct cttggatcat aagaaaaagc caaggaacaa aagaagacaa      180
aacacaatga gagtatcctt tgcatagcaa tgtctaagtt cataaaattc aaacaaaaaac      240
gcaatcacac acagtggaca tcacttatcc actagctgat caggatcgcc gcgtcaagaa      300
aaaaaaactg gacccccaaa gccatgcaca acaacacgta ctcaaaagg tgtcaatcga      360
gcagcccaaa acattcacca actcaacca tcatgagccc tcacatttgt tgtttctaac      420
ccaacctcaa actcgtattc tcttcgcgca cctcattttt gtttatttca acaccgtca      480
aactgcatgc caccctgtgg ccaaatgtcc atgcatgtta acaagaccta tgactataaa      540
tagctgcaat ctcgggccag gttttcatca tcaagaacca gttcaatatc ctagtacacc      600
gtattaaaga atttaagata tactgcggcc gcaccatgga ggtgggtgaat gaaatagtct      660
caattgggca ggaagtttta cccaaagttg attatgccc aactctggagt gatgccagtc      720
actgtgaggt gctttacttg tccatcgcat ttgtcatctt gaagttcact cttggccccc      780
ttgggtccaaa aggtcagtct cgtatgaagt ttgttttcac caattacaac cttctcatgt      840
ccattttattc gttgggatca ttccctctca tggcatatgc catgtacacc atcgggtgtta      900
tgtctgacaa ctgcgagaag gcttttgaca acaacgtctt caggatcacc acgcagttgt      960
tctatttgag caagttcctg gagtatattg actccttcta tttgccactg atgggcaagc     1020
ctctgacctg gttgcaattc ttccatcatt tgggggcacc gatggatatg tggctgttct     1080
ataattaccg aaatgaagct gtttggaatt ttgtgctggt gaatgggttc atccactgga     1140
tcatgtacgg ttattattgg accagattga tcaagctgaa gttcccatg ccaaaatccc     1200
tgattacatc aatgcagatc attcaattca atgttggttt ctacattgtc tggaagtaca     1260
ggaacattcc ctgttatcgc caagatggga tgaggatgtt tggctgggtc ttcaattact     1320
tttatgttgg cacagtcttg tgtttgttct tgaatttcta tgtgcaaacg tatatcgtca     1380
ggaagcaciaa gggagccaaa aagattcagt gagcgccgc aagtatgaac taaaatgcat     1440
gtaggtgtaa gagctcatgg agagcatgga atattgtatc cgaccatgta acagtataat     1500

```

aactgagctc catctcactt cttctatgaa taaacaaagg atgttatgat atattaacac	1560
tctatctatg caccttattg ttctatgata aatttcctct tattattata aatcatctga	1620
atcgtgacgg cttatggaat gcttcaaata gtacaaaaac aaatgtgtac tataagactt	1680
tctaaacaat tctaacctta gcattgtgaa cgagacataa gtgttaagaa gacataacaa	1740
ttataatgga agaagtttgt ctccatttat atattatata ttaccactt atgtattata	1800
ttaggatggt aaggagacat aacaattata aagagagaag tttgtatcca tttatatatt	1860
atatactacc catttatata ttatacttat ccacttattt aatgtcttta taaggtttga	1920
tccatgatat ttctaataatt ttagttgata tgtatatgaa agggactat ttgaactctc	1980
ttactctgta taaaggttgg atcatcctta aagtgggtct atttaatttt attgcttctt	2040
acagataaaa aaaaaattat gagttggttt gataaaatat tgaaggattt aaaataataa	2100
taaataacat ataatatatg tatataaatt tattataata taacatttat ctataaaaaa	2160
gtaaataattg tcataaatct atacaatcgt ttagccttgc tggacgaatc tcaattattt	2220
aaacgagagt aaacatattt gacttttttg tttatttaaca aattattatt taacactata	2280
tgaaattttt ttttttatca gcaaagaata aaattaaatt aagaaggaca atgggtgtccc	2340
aatccttata caaccaactt ccacaagaaa gtcaagtcag agacaacaaa aaaacaagca	2400
aaggaaattt ttttaatttga gttgtcttgt ttgctgcata atttatgcag taaaacacta	2460
cacataaccc ttttagcagt agagcaatgg ttgaccgtgt gcttagcttc ttttatttta	2520
tttttttatc agcaaagaat aaataaaaata aaatgagaca cttcagggat gtttcaacaa	2580
gcttggcgcg ccgttctata gtgtcaccta aatcgatatg gtatgataca taaggttatg	2640
tattaattgt agccgcgttc taacgacaat atgtccatat ggtgcactct cagtacaatc	2700
tgctctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc	2760
tgacgggctt gtctgtctcc gccatccgt tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc	2820
tgcatgtgtc agaggttttc accgtcatca ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgtg	2880
atagcctat ttttataggt taatgtcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc	2940
cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg	3000
cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg	3060
gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca	3120
aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg	3180
cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg	3240
tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga	3300

acgggggggtt	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	3360
ctacagcgtg	agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	3420
ccggtaagcg	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	3480
tggtatcttt	atagtctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atTTTTgtga	3540
tgctcgtcag	gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	3600
ctggcctttt	gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	3660
gataaccgta	ttaccgcctt	tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	3720
cgcagcgagt	cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	3780
gcgcgttggc	cgattcatta	atgcaggttg	atcagatctc	gatcccgcga	aattaatacg	3840
actcactata	gggagaccac	aacggtttcc	ctctagaaat	aattttgttt	aactttaaga	3900
aggagatata	cccatggaaa	agcctgaact	caccgcgacg	tctgtcgaga	agtttctgat	3960
cgaaaagttc	gacagcgtct	ccgacctgat	gcagctctcg	gagggcgaag	aatctcgtgc	4020
tttcagcttc	gatgtaggag	ggcgtggata	tgctctgcgg	gtaaatagct	gcgccgatgg	4080
tttctacaaa	gatcgttatg	tttatcggca	ctttgcatcg	gccgcgctcc	cgattccgga	4140
agtgcttgac	attgggggaat	tcagcgagag	cctgacctat	tgcatctccc	gccgtgcaca	4200
gggtgtcacg	ttgcaagacc	tgctgaaac	cgaactgccc	gctgttctgc	agccggtcgc	4260
ggaggctatg	gatgcgatcg	ctgcggccga	tcttagccag	acgagcgggt	tcggcccatt	4320
cggaccgcaa	ggaatcggtc	aatacactac	atggcgtgat	ttcatatgcg	cgattgctga	4380
tccccatgtg	tatcactggc	aaactgtgat	ggacgacacc	gtcagtgcgt	ccgtcgcgca	4440
ggctctcgat	gagctgatgc	tttggggccga	ggactgcccc	gaagtccggc	acctcgtgca	4500
cgcggatthc	ggctccaaca	atgtcctgac	ggacaatggc	cgcataacag	cggtcattga	4560
ctggagcgag	gcgatgttcg	gggattccca	atacgaggtc	gccaacatct	tcttctggag	4620
gccgtggttg	gcttgatatg	agcagcagac	gcgctacttc	gagcggaggc	atccggagct	4680
tgcaggatcg	ccgcggctcc	gggcgtatat	gtcccgcaat	ggtcttgacc	aactctatca	4740
gagcttggtt	gacggcaatt	tcgatgatgc	agcttggggc	cagggtcgat	gcgacgcaat	4800
cgtccgatcc	ggagccggga	ctgtcgggcg	tacacaaatc	gcccgcagaa	gcgcggccgt	4860
ctggaccgat	ggctgtgtag	aagtactcgc	cgatagtgga	aaccgacgcc	ccagcactcg	4920
tccgagggca	aaggaatagt	gaggtacagc	ttggatcgat	ccggctgcta	acaaagcccc	4980
aaaggaagct	gagttggctg	ctgccaccgc	tgagcaataa	ctagcataac	cccttggggc	5040
ctctaaacgg	gtcttgaggg	gttttttgct	gaaaggagga	actatatccg	gatgatcggg	5100
cgcgcgctcg	acggatccgt	acgcaaaggc	aaagatttaa	actcgaaaac	attacaaaag	5160

tctcaaaaca	gaggcaaggc	catgcacaaa	gcacactcta	agtgcttcca	ttgcctacta	5220
agtaggggtac	gtacacgatac	accattcacc	agtgatgatac	tttattaata	tacaacacac	5280
tcagagacag	cttatgttat	agctagctag	cataaactat	cacatcatgt	gttagtacga	5340
caagtgacaa	cattgctttt	aacttcgcyg	ccttggtacc	tctagaccgg	atataatgag	5400
ccgtaaacia	agatgattaa	gtagtaatta	atacgtacta	gtaaaagtgg	caaaagataa	5460
cgagaaagaa	ccaatttctt	tgcattcgyc	cttagcggaa	ggcatatata	agctttgatt	5520
atthttattta	gtgtaatgat	ttcgtacaac	caaagcattt	atttagtact	ctcacacttg	5580
tgtcgcggcc	gcgaattcac	tagtgattcc	ttatagagcc	ttccccgcgg	gttgcttctc	5640
cgccatccgg	gcgaacaccg	ccagatagcy	cagcaggatg	accaaccctt	catggggcag	5700
cgggttccga	tacggcaggt	tgtgcttctg	gcacagctgt	tccacctggg	agctaaccgc	5760
tgtcagggttg	tggcgaggga	gggtcggcca	caaatggtgc	tcaatctggg	aattcaagcc	5820
tccgaaaaac	caatctgtga	taatccctcg	ccgaatgttc	atgggtctcat	ggatctggcc	5880
aaccgagaat	ccatggccat	cccagactga	gtccccgatac	ttctccagtg	ggtagtggtt	5940
catgaacacc	acgatcgcaa	tgccgaagcc	gccaacccagc	tccgaaacga	aaaacaccaa	6000
cagcgatgtg	aggatgctgg	gcataaagaa	taagtggaa	agggcttca	aggtccagtg	6060
cagggcgagg	ccaatggcct	ccttcttata	ctgagagcga	tagaattggg	tatctctgtc	6120
cttcaaactg	cgcacggtca	acacgctctg	gaaacaccaa	atgaaccgca	acaagataca	6180
gatgaccaag	aaatagtact	gctggaactg	aatgagcttg	cgggaaatcg	gtgacgcccg	6240
tgtgacgtca	tcctcagacc	aggctaagag	ggggagggtg	tcaatatcag	ggctgtgccc	6300
ttgaacattg	gttgccgaat	gatgtgcatt	gtgtctgtcc	ttccaccatg	tcacggaaaa	6360
accttgacga	ccattgccc	ataccagctc	cacgaggttg	ttccagttcc	ggttcttgaa	6420
agtctgggtg	tggcaaagt	catgagaaag	ccagcccatc	tgttgatagt	gcaccccaag	6480
caacactgcc	ccaatgaaat	acatctgata	ctgaaccatc	aggaaataac	ccagcactcc	6540
aaggcccagt	gtggtgctga	ttttgtatga	gtaccagagg	ggggaggcat	caaacatgcc	6600
agttgcgatac	aactcttctc	ggagcttccg	gaaatcctct	tgagcttcat	tcactgcagc	6660
ctgggggtggc	aactcagaac	tgggattgat	tttgggcatg	cgcttgagct	tgtcgaaggc	6720
ttcttgagag	tgcataacca	tgaaggcatc	agtggcatcc	cttccttggt	aattctctat	6780
aatttccgca	ccaccagggg	ggaaattgac	ccaggcagac	acatcatatg	ttgttccatc	6840
aattgtaagg	ggaagcgctt	ggcgctttga	cttcatttca	atcgaattcc	cgcgcccgct	6900
tgggggggcta	tggaaagactt	tcttagttag	ttgtgtgaat	aagcaatgtt	gggagaatcg	6960

ggactactta taggatagga ataaaacaga aaagtattaa gtgctaataa aatatttaga	7020
ctgataatta aaatcttcac gtatgtccac ttgatataaa aacgtcagga ataaaggaag	7080
tacagtagaa tttaaaggta ctctttttat atatacccggt gttctctttt tggctagcta	7140
gttgcataaa aaataatcta tttttttatc attattttta atattcttatg agatggtaaa	7200
tatttatcat aatttttttt actattattt attatttgtg tgtgtaatac atatagaagt	7260
taattacaaa ttttatttac tttttcatta ttttgatatg attcaccatt aatttagtgt	7320
tattatttat aatagttcat tttaatcttt ttgtatatat tatgcgtgca gtactttttt	7380
cctacatata actactatta catttttttt atataatatt tttattaatg aattttcgtg	7440
ataatatgta atattgttca ttattatttc agatttttta aaaatatttg tgttattatt	7500
tatgaaatat gtaatttttt tagtatttga ttttatgatg ataaagtgtt ctaaattcaa	7560
aagaaggggg aaagcgtaaa cattaataaa cgatcatcaa caaaaacaaa atcttggtta	7620
taaagataaa actgtttgtt ttgatcactg ttatttcgta atataaaaaac attatttata	7680
tttatattgt tgacaaccaa atttgcctat caaatctaac caatataatg catgcgtggc	7740
aggtaatgta ctaccatgaa ctttaagtcac gacataataa accgtgaatc tgaccaatgc	7800
atgtacctan ctaaattgta tttgtgacac gaagcaaagtg attcaattca caatggagat	7860
gggaaacaaa taatgaagaa ccagaaacta agaaagcttt tctgaaaaat aaaataaagg	7920
caatgtcaaa agtataactgc atcatcagtc cagaaagcac atgatatttt tttatcagta	7980
tcaatgcagc tagttttatt ttacaatata gatatagcta gtttaaatat attgcagcta	8040
gatttataaa tatttgtgtt attattttatc atttgtgtaa tcctgttttt agtatttttag	8100
tttatatatg atgataatgt attccaaatt taaaagaagg gaaataaatt taaacaagaa	8160
aaaaagtcac caaacaacaaa acaaatgaaa ggggtggaaag atgttaccat gtaatgtgaa	8220
tgttacagta tttctttttat tatagagtta acaaatatac taatatgatt ttgttaataa	8280
tgataaaaata tttttttttat tattatttca taatataaaa atagtttact taatataaaa	8340
aaaattctat cgttcacacac aaagttggcc acctaattta accatgcatg taccatgga	8400
ccatattagg taaccatcaa acctgatgaa gagataaaga gatgaagact taagtcataa	8460
cacaaaacca taaaaaaca aaataacaatc aaccgtcaat ctgaccaatg catgaaaaag	8520
ctgcaatagt gagtggcgac acaaagcaca tgattttctt acaacggaga taaaaccaa	8580
aaaatatttc atgaacaacc tagaacaat aaagctttta tataataaat atataaataa	8640
ataaaggcta tggaataata tacttcaata tatttggatt aaataaattg ttggcggggt	8700
tgatatattt atacacacct aaagtcactt caatctcatt ttcacttaac ttttattttt	8760
tttttctttt tatttatcat aaagagaata ttgataatat actttttaac atatttttat	8820

gacattttttt attggtgaaa acttattaaa aatcataaat tttgtaagtt agattttattt	8880
aaagagttcc tcttcttatt ttaaattttt taataaattt ttaaataact aaaatttggtg	8940
ttaaaaatgt taaaaaatgt gttattaacc cttctcttcg aggacgtacg agatccggcc	9000
ggccagatcc tgcaggtctc aatagattaa gaagttggcg tctcattgat tgaccatggg	9060
ggatcctcta gacgtacgtg aaggttaaac atggtgaata tgttaccact agctgggatg	9120
cccattagat caaaactgta aaattctccc gtttcccttc tattcacatg tgagccccct	9180
cccttttctt tctttctcaa ttttgattga gttaaagtca ccagcaatgc atcactcacc	9240
ctccaaaaaa tttcttgtag aacttctcgg actatcccaa agctcctttt cctgagatgg	9300
atggtcctgt ctcttgccct tgatgtcttc cttgttcgat tttggcttcc tctaattgtct	9360
ttcttgctag gaatcaccac ctactcatc tatgttgctg tagcttctga aagtctcata	9420
catatcctta gtgttgact catcttgat tgaagtgaag aagaatggtg ttctcctatc	9480
caaactctca ttgaatctct ttctcccaat gttgtcccat cggttgggtcc tctctccaa	9540
ccaattaatt gtaaggtgtt taacataaac atggtacaat taagattttt catttcatta	9600
agaaaagatt gagatttggtg gttctaaagt ttcaattaga gtttgatgat attgaaacaa	9660
ccgtagaaca cattaagtat tactaactta tacatagagc attggaattt caccttttat	9720
ttattctgtt tccgccaaag gtacatgact caagttattt tacacaagta acaaaggcat	9780
ctaagcctaa gtattcttat tcagactttt cattattact ttcattgatt tgggtgcgaaa	9840
tgcggccgct taggaatcct gtgcgtcctt cacgcagtggt acgacacca ccttatgcat	9900
gtacttcagg gtggagatga tgttgccgac gatggtaggg tagaaaacat atcgactcc	9960
atggcggttcg caacactccc ggaccgcctg ctggacgaag gggtagtgcc aagacgacat	10020
ccggggaaag aggtggtgct cgatctggaa attgagaccg ccagtgaaga acatggcgat	10080
ggggccaccg tatgtggagg acgtctccac ctgcgcccga taccagtcaa tttggtcagc	10140
ctcaacgtcc ttctcagatc tcttaacctt gcagttcttg tcggggatcc gttcggagcc	10200
atcaaaattg tgggacaaaa tgaagaagaa cgtcaagaag gcaccagttg cgggtgggcac	10260
cagaggaatg gtgatcagca atgaggtccc agtgaggtac cagggcaaga atgcggtccg	10320
gaagatgaag aaagctcgca tcacgaatgc aagtgtgcgg tagcgccgca gaaagccatt	10380
ttcccgcatg gccgtgacag actctgggat ggtgtcattg tgctgcatcc ggaaaatgta	10440
gagcggggtg tacaccagcg ataccccgta tgccccagc acaaggtaca tgtaccaagc	10500
ttggaagcgg tggaaaccact ttcgggcggg gtttgcgggc gggtagttgt ggaacaccag	10560
gaacggctct gccgactccg catccaggtc gagggcgtgc tgggttggtgt aggtgtggtg	10620

ccgcatgatg tgcgactgca gccaaatcca ccgggacgat ccgatgacgt caatgccgta 10680
 ggcgaagagg gcgttgaccc aaggcttctt gctgatggcc ccgtgggacg catcatgctg 10740
 gatggataag ccgatctgca tgtgcatgaa tccagtcaac aggccccaca gcaccatccc 10800
 cgtggtagcc cagtgccact cgcaaaaggc cgtcacggcg atgatcccaa cggtgcgag 10860
 ccagaagcca ggggttgcggt accagttcct ccctttcatc acctcgcgca ttgtccgctt 10920
 aacgtcttgt gcgaagggag aatcatatcgt gtagacaatg tccttcgagg tgcggtcatg 10980
 cttccctcgg acgaactgtt gaagcaattht ggaattctcc ggtttgacgt atggatgcat 11040
 tgaataaaaag agaggggagg catcagaggc accagaagcg agaatacaat ctccctcctgg 11100
 atgaactttg gcaagccctt caaggctcgta gaggatgcca tcaatcgcaa ccaaatcagg 11160
 gcgttctaac agctgttctg tggttaagact gagagccatg gtttgcgggc gcggtgatga 11220
 ctgatgagtg tttaaggacc aatggagaga atgtttgagt tgtgaagcgg agaacctgag 11280
 gcgtgggttat ttatagggaa gagaggaagg tgaatgaggg acacgtcaca gaagtagggg 11340
 gctgagcttg agacattctt cagtatgcat ggctatggaa gccttggttg ctacacctca 11400
 tgaagttcat ggtgtgaggt ggcttcggca totcaattaa gtgacaaaga gaaagggtgtt 11460
 tcagtgtttc tattgcaaat ggcagaaact cgtgatgacg aggggaccat gcatggtttc 11520
 atttcttttc ttcttggtt ctttctttcc ttttatatat gcaggttcat aatttaaaaa 11580
 ttagactcgc tttcaatttc ttaattttct attttcctct tatattactg tactaatgtt 11640
 aaccacgtac acttattttt tttttagttt aattttgata gattgtgttg atttaaacat 11700
 attaataatt tcaaccaaatt aaaaatcatt ttagtagata cggcttttta aataattatt 11760
 aaaaatatta actattttat ctaaattggc catttttaatt aaaaaaatc cgggtgttgta 11820
 agtgttttat taattttgtt tggcattatt aaagcaactt tttttttatt tgttggcatt 11880
 ttgagtacgt acttaggcta gcctgca 11907

<210> 93

<211> 8671

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плазмида pKR328

<400> 93

ggatctggcc ggccggatct cgtacggatc cgtcgacggc gcgcccgatc atccggatat 60
 agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa gaccggttta gagggcccaa ggggttatgc 120
 tagttattgc tcagcgggtg cagcagccaa ctcagcttcc tttcgggctt tgttagcagc 180
 cggatcgatc caagctgtac ctactattc ctttgcctc ggacgagtgc tggggcgctc 240

gtttccacta tcggcgagta cttctacaca gccatcggtc cagacggccg cgcttctgcg	300
ggcgatttgt gtacgcccga cagtcccggc tccggatcgg acgattgcgt cgcacgcacc	360
ctgcgcccaa gctgcatcat cgaaattgcc gtcaaccaag ctctgataga gttgggtcaag	420
accaatgcgg agcatatacg cccggagccg cggcgatcct gcaagctccg gatgcctccg	480
ctcgaagtag cgcgtctgct gctccataca agccaaccac ggctccaga agaagatggt	540
ggcgacctcg tattgggaat ccccgaacat cgctcgcctc cagtcaatga ccgctgttat	600
gcgggcattg tccgtcagga cattgttgga gccgaaatcc gcgtgcacga ggtgccggac	660
ttcggggcag tcctcggccc aaagcatcag ctcatcgaga gcctgcgcga cggacgcact	720
gacggtgtcg tccatcacag tttgccagtg atacacatgg ggatcagcaa tcgcgcatat	780
gaaatcacgc catgtagtgt attgaccgat tccttgcggc ccgaatgggc cgaacccgct	840
cgtctggcta agatcggccg cagcgatcgc atccatagcc tccgcgaccg gctgcagaac	900
agcgggcagt tcggtttcag gcaggtcttg caacgtgaca ccctgtgcac ggcgggagat	960
gcaataggtc aggtctctgc tgaattcccc aatgtcaagc acttccggaa tcgggagcgc	1020
ggccgatgca aagtgccgat aaacataacg atctttgtag aaaccatcgg cgcagctatt	1080
taccgcgagg acatatccac gccctcctac atcgaagctg aaagcacgag attcttcgcc	1140
ctccgagagc tgcacaggt cggagacgct gtcgaacttt tcgatcagaa acttctcgac	1200
agacgtcgcg gtgagttcag gcttttccat gggatatct ctttcttaaa gttaaacaaa	1260
attatttcta gagggaaacc gttgtggtct ccctatagt agtcgtatta atttcgcggg	1320
atcgagatcg atccaattcc aatcccacaa aaatctgagc ttaacagcac agttgtcct	1380
ctcagagcag aatcgggtat tcaacaccct catatcaact actacgttgt gtataacggt	1440
ccacatgccg gtatatacga tgactggggc tgtacaaagg cggcaacaaa cggcgttccc	1500
ggagttgcac acaagaaatt tgccactatt acagaggcaa gagcagcagc tgacgcgtac	1560
acaacaagtc agcaaacaga caggttgaac ttcatcccca aaggagaagc tcaactcaag	1620
cccaagagct ttgctaaggc cctaacaagc ccaccaaagc aaaaagccca ctggctcacg	1680
ctaggaacca aaaggcccag cagtgatcca gcccacaaag agatctcctt tgccccggag	1740
attacaatgg acgatttcct ctatctttac gatctaggaa ggaagttcga aggtgaaggt	1800
gacgacacta tgttcaccac tgataatgag aagggttagc tcttcaattt cagaaagaat	1860
gctgaccac agatgggttag agaggcctac gcagcaggtc tcatcaagac gatctacccg	1920
agtaacaatc tccaggagat caaatacctt cccaagaagg ttaaagatgc agtcaaaaga	1980
ttcaggacta attgcatcaa gaacacagag aaagacatat ttctcaagat cagaagtact	2040

attccagtat	ggacgattca	aggcttgctt	cataaaccaa	ggcaagtaat	agagattgga	2100
gtctctaaaa	aggtagttcc	tactgaatct	aaggccatgc	atggagtcta	agattcaaat	2160
cgaggatcta	acagaactcg	ccgtgaagac	tggcgaacag	ttcatacaga	gtctttttacg	2220
actcaatgac	aagaagaaaa	tcttcgtcaa	catgggtggag	cacgacactc	tggcttactc	2280
caaaaatgtc	aaagatacag	tctcagaaga	ccaaagggct	attgagactt	ttcaacaaag	2340
gataatttcg	ggaaacctcc	tccgattcca	ttgcccagct	atctgtcact	tcacgaaag	2400
gacagtagaa	aaggaagggtg	gtcctacaa	atgccatcat	tgcgataaag	gaaaggctat	2460
cattcaagat	gcctctgccg	acagtgggtcc	caaagatgga	ccccaccca	cgaggagcat	2520
cgtggaaaaa	gaagacgttc	caaccacgtc	ttcaaagcaa	gtggattgat	gtgacatctc	2580
cactgacgta	agggatgacg	cacaatccca	ctatccttcg	caagaccctt	cctctatata	2640
aggaagttca	tttcatttgg	agaggacacg	ctcgagctca	tttctctatt	acttcagcca	2700
taacaaaaga	actcttttct	cttcttatta	aaccatgaaa	aagcctgaac	tcaccgcgac	2760
gtctgtcgag	aagtttctga	tcgaaaagtt	cgacagcgtc	tccgacctga	tgacgtcttc	2820
ggagggcgaa	gaatctcgtg	ctttcagctt	cgatgtagga	gggctgggat	atgtcctgcg	2880
ggtaaatagc	tgcgccgatg	gtttctacaa	agatcgttat	gtttatcggc	actttgcatc	2940
ggccgcgctc	ccgattccgg	aagtgcctga	cattggggaa	ttcagcgaga	gcctgaccta	3000
ttgcatctcc	cgccgtgcac	aggggtgtcac	gttgcaagac	ctgcctgaaa	ccgaactgcc	3060
cgctgttctg	cagccgggtcg	cggaggccat	ggatgcgatc	gctgcggccg	atcttagcca	3120
gacgagcggg	ttcggcccat	tccgaccgca	aggaatcggg	caatacacta	catggcgtga	3180
tttcatatgc	gcgattgctg	atccccatgt	gtatcactgg	caaactgtga	tggacgacac	3240
cgtcagtgcg	tccgtcgcgc	aggctctcga	tgagctgatg	ctttgggccc	aggactgccc	3300
cgaagtccgg	cacctcgtgc	acgcggatth	cggctccaac	aatgtcctga	cggacaatgg	3360
ccgcataaca	gcggtcattg	actggagcga	ggcgatgttc	ggggattccc	aatacgaggt	3420
cgccaacatc	ttcttctgga	ggccgtgggt	ggcttgatg	gagcagcaga	cgcgctactt	3480
cgagcggagg	catccggagc	ttgcaggatc	gccgcggctc	cgggcgtata	tgctccgcat	3540
tggctcttgac	caactctatc	agagcttggt	tgacggcaat	ttcgatgatg	cagcttgggc	3600
gcagggtcga	tgcgacgcaa	tccgtccgatc	cggagccggg	actgtcgggc	gtacacaaat	3660
cgcccgcaga	agcgcggccg	tctggaccga	tggctgtgta	gaagtactcg	ccgatagtgg	3720
aaaccgacgc	cccagcactc	gtccgagggc	aaaggaatag	tgaggtaact	aaagaaggag	3780
tgcgtcgaag	cagatcggtc	aaacatttgg	caataaagtt	tcttaagatt	gaatcctggt	3840
gccggctctt	cgatgattat	catataatth	ctgttgtaatt	acgttaagca	tgtaataatt	3900

aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta	3960
tacattttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcg	4020
gcggtgtcat ctatgttact agatcgatgt cgaatcgatc aacctgcatt aatgaatcgg	4080
ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat tgggcgctct tccgcttct cgctcactga	4140
ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat	4200
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca	4260
aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccc	4320
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata	4380
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc	4440
gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc	4500
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	4560
acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	4620
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag	4680
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag	4740
gacagtatth ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag	4800
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttggtt gcaagcagca	4860
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	4920
cgtcagtggt aacgaaaact cacgttaagg gattttggct atgacattaa cctataaaaa	4980
taggcgtatc acgaggccct ttcgtctcgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaaacctctg	5040
acacatgcag ctcccgagga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca	5100
agcccgctcag ggcgcgtcag cgggtgttg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc	5160
atcagagcag attgtactga gaggtcacca tatggacata ttgtcgttag aacgcggcta	5220
caattaatac ataaccttat gtatcataca catacgatth aggtgacact atagaacggc	5280
gcgccaagct tggatctcct gcagcccggg ggatccgccc acgtacggta ccatctgcta	5340
atattttaaa tcacatgcaa gagaggaggc atggttccat tttctacctt cacattatth	5400
gagaaaaacg aacttgttct gtgttttatt tttgcccctt acattagtag aacgtggaag	5460
actcatggtt acacagaatc atacataagt acaatgcttg tccctaagaa aacaagcact	5520
cgttgatttg aacctttacg gctcatgcgg ccgcgaattc actagttagt gaattcgcgg	5580
ccgcttagtc cgacttggcc ttggcgggcg cggccgactc tttgagcgtg aagatctgcg	5640
ccgtctcggg cacagcgccg tagttgacaa agaggtgcgc ggtcttgaag aaggccgtga	5700

tgatgggctc gtcgttcctg cgcacgaggt gcgggtacgc ggccgcaaag tgcttggtgg	5760
cttcgttgag cttgtagtgc ggaatgatcg ggaacaagtg gtggacctgg tgcgtgcaa	5820
tgtgggtggct caggttgctc acgaacgcgc cgtacgagcg gtcgacgctc gagaggttgc	5880
ccttgacgta cgtccactcc gagtcgccgt accacggcgt cgcttcgctg ttgtggtgca	5940
agaaggtcgt aatgacgagg aacgaagcaa agacaaagag cggcgcatag tagtagaggc	6000
ccatgacggc aaagccgagc gagtatgtga ggtacgcgta cgcggcgaag aaggcggccc	6060
agacgccgag cgacacgatg acggccgacg cgcggcgaag gaggagcggg tcccacgggt	6120
caaagtggct catcgtgcgc ggggcatacc cgaccttcaa gtagacaaac cacgcaccgc	6180
cgagcgtgta gaccatttg ggcacgtcct ggaggtcctt gaccgaccgg tgcgggtaaa	6240
agatctcgtc cttatcaatg ttgcccggtg tcttggtggtg gtggcggtgc gtcacgcgcc	6300
agctctcgaa cggcgtcaaa atcgcagagt gcatgatgca gccgatgata aagttgacgc	6360
tgtggtagcg cgagaaggcc gagtggccgc agtcgtggcc gaccgtgaag aagccccaga	6420
agatgacgcc ctgcacgtag atgtagggtg cgcaaacgag cgcgtaggagc agaacgttat	6480
cggcaatgaa cggcgtcgag cgcgccgcgt agagcagcgc cgccgaggcc gacgcgttga	6540
agatcgcgcg ggccgtgtag tagagcgaga ggccgagggt cgactcaaag cacgcgttcg	6600
ggatcgagtg cttgagctcc gtgagcgtcg ggaactcgac cttcgtctta tcctcagtca	6660
tgcggccgct gaagtattgc ttcttagtta acctttcctt tctctctcag ctatgtgaat	6720
tcattttgct ttcgtcaciaa tttatatagt gaaattggat ctttgagatt aacgccttca	6780
caggattatc gtgttagaac aatgcttttt catgttctaa ttagtagtac attacaaatg	6840
tgcactctat tcaataagca tcttttggca cgttaataaa tcatgtgaaa aaaaaatact	6900
actatttcaa agaaagtgtt gtaaaaagaa acggaaagag agctggcttc agttgttgag	6960
acttgtttgc tagtaaaaat ggtgtgaaga gtgattcatg gtgaggtggt ttttcgtccc	7020
tttctgtttg catgaaaaac aaatggcaag agatgacgta ggattccttc ccttaacgat	7080
tatctgtttt taatttcaaa tatacatata ggaatttatg aattactaag gttgtaaaat	7140
atgctggtca tttatttatg gctaaaatat ttttttttct cgtaaatata aaaatattta	7200
aaatttatth ttatcatatt ttttatcctt ataaaattat gtgtacaacc tatataaaaa	7260
aatatcatat ttaatatgga ttatatgttt aatcaatata aaaaatcatt atcatatatt	7320
tagattttatt cgaatataca tctaaacaaa aaataacata ttttaatttt atgaagaaaa	7380
aaaaatattt tctcctttat ttatttaaga ttaattaata gttatgtatt gtggaaagac	7440
ttttacacat gcaatagata tactgaatca attagatgcc aatgctgagt tggaaatcac	7500
ttgaggaggg gaggagactt gccaatgctt ttcagtttca tttaaatgat ttagtgaggg	7560

agatagagta gtgataaagg catgccccaa ttttggagtg tatatatgag tggaaataag 7620
 agagggatag agagaaaaaa taaagagagt aaaaataatt aatgtgaaat gatatgataa 7680
 aaaaataaag aaagagataa agagaaaaat gaaatgagag atagatgaaa tagagagtag 7740
 atacatgttt gtttaggttt tttttaggaa ataacacatt tttttctcat cacttattac 7800
 tcactgtcaa tttcctctct ttcaatcata atgatatgat ttgtttaaca aaaatgtgaa 7860
 aaaacatata aagtaaaata tttttataaa ttgataaata aaaatttaca aaatttattt 7920
 cttattaaat tgaatagaaa atgaaagaaa agaaaagaaa aagtatatat aaaatgatat 7980
 agctttaaaa agaataaatt tttcatatca gtcttttttt aataatttag aaatatttaa 8040
 gtatatagca aaaatataat gtactttaca tatgcataaa taataatttg aaaatagaac 8100
 taatagaata gagaaaaaag taatataata attaactata tgaaaattta gaagggacaa 8160
 tatttttaat taagaatata aacaatattt cttttcatgt aatgagggac ggatgtacgg 8220
 ggccagtgtt ggagtcaaag ccaaaatagt cacggggaaa ttaatgcact gcatgactat 8280
 tcgaaaaaat tcactagcct tacttagatg ttagattaat agctaggggg tgcagataat 8340
 tttgaaaggc atgaaaaaca ttaatttgta cattgcaagc ttttgatgac aagctttgca 8400
 attgttcaca ctaccttatg ccatttataa atagagtgat tggcatatga aggaaatcat 8460
 gagagtcgaa gcgaaaaaca aagcttgaga gtgtaggaaa aatacagttt ttttggtaaa 8520
 aatacagtat ttgaatagga gcgaaaaata tcctttcaaa atgatccttt tctttttttt 8580
 tttttttctt gttgttcttg gtcagttatt caaaggaaaa gggattgaaa taaaaacttg 8640
 catgtgggat cgtacgtcga gtcgacctgc a 8671

<210> 94

<211> 1413

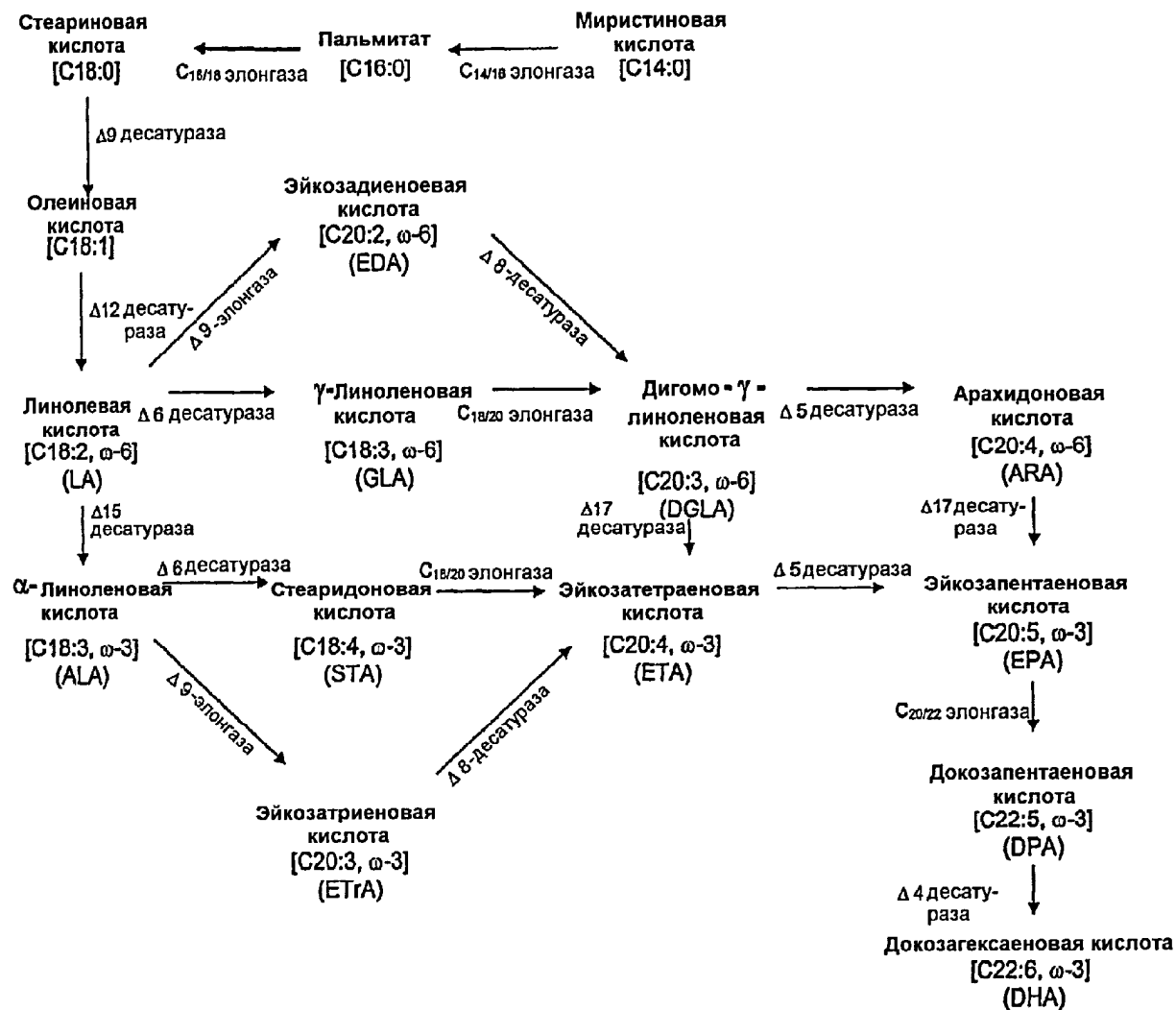
<212> ДНК

<213> Saprolegnia diclina

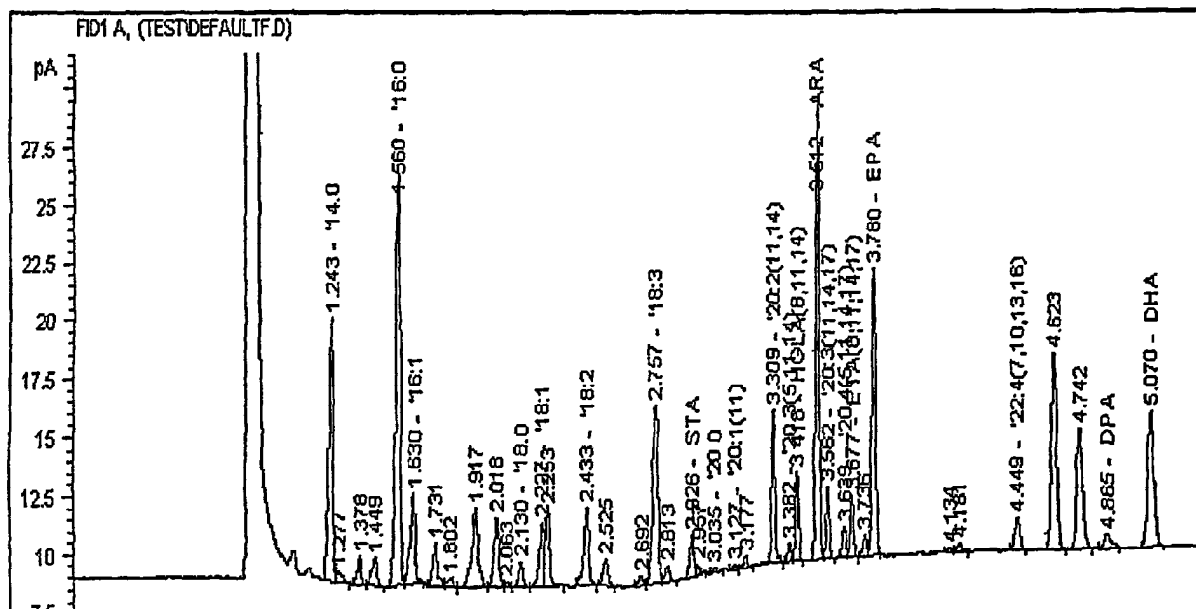
<400> 94

atggccccgc agacggagct ccgccagcgc cacgccgccg tcgccgagac gccggtggcc 60
 ggcaagaagg cctttacatg gcaggaggtc gcgcagcaca acacggcggc ctccggcctgg 120
 atcattatcc gcggcaaggt ctacgacgtg accgagtggg ccaacaagca ccccggcggc 180
 cgcgagatgg tgctgctgca cgccggtcgc gaggccaccg acacgttcga ctcgtagcac 240
 ccgttcagcg acaaggccga gtcgatcttg aacaagtatg agattggcac gttcacgggc 300
 ccgtccgagt ttccgacctt caagccggac acgggcttct acaaggagtg ccgcaagcgc 360
 gttggcgagt acttcaagaa gaacaacctc catccgcagg acggcttccc gggcctctgg 420
 cgcatgatgg tcgtgtttgc ggtcgccggc ctgcgcttgt acggcatgca cttttcgact 480

atctttgcgc tgcagctcgc ggccgcggcg ctctttggcg tctgccaggc gctgccgctg	540
ctccacgtca tgcacgactc gtcgcacgcg tcgtacacca acatgccgtt cttccattac	600
gtcgtcggcc gctttgccat ggactggttt gccggcggct cgatgggtgc atggctcaac	660
cagcacgtcg tgggccacca catctacacg aacgtcgcgg gctcggaccc ggatcttccg	720
gtcaacatgg acggcgacat ccgccgcac gtgaaccgcc aggtgttcca gcccatgtac	780
gcattccagc acatctacct tccgccgctc tatggcgtgc ttggcctcaa gttccgcac	840
caggacttca ccgacacgtt cggctcgcac acgaacggcc cgatccgcgt caaccgcac	900
gcgtctcga cgtggatggc catgatcagc tccaagtcgt tctgggcctt ctaccgcgtg	960
taccttcgcg ttgccgtgct ccagatgcc atcaagacgt accttgcat cttcttcctc	1020
gccgagtttg tcacgggctg gtacctcgcg ttcaacttcc aagtaagcca tgtctcgacc	1080
gagtgcggct acccatgcgg cgacgaggcc aagatggcgc tccaggacga gtgggcagtc	1140
tcgcaggtea agacgtcggc cgactacgcc catggctcgt ggatgacgac gttccttgcc	1200
ggcgcgctca actaccaggt cgtgcaccac ttgttcccca gcgtgtcgca gtaccactac	1260
ccggcgatcg cgcctcatcat cgtcgacgtc tgcaaggagt acaacatcaa gtacgccatc	1320
ttgccggact ttacggcggc gttcgttgcc cacttgaagc acctccgaa catgggccag	1380
cagggcacgc ccgccacgat ccacatgggc taa	1413



Фиг.1



Фиг.2

Консервативный район 1

205 W Q E Q H W T - H H A Y T M H A E M D P D S F G A E P M L L F N D - - Y P L D H
 225 W L N Q H V V G H H I Y T M V A G A D P D - L P V D F K S D V R - - - R I V Y R
 204 W L N Q H V V G H H I Y T M V A G A D P D - L P V D F E S D V R - - - R I V H R
 207 W C H Q H V I G H H L Y T M V R N A D P D - L G Q G - E I D F R - - - V V T P Y
 178 W K D R H N A - H H S A T N V Q G H D P D - I D N L P L L A W S E D D V T R A S
 205 W R A R H N T - H H V C T N E D G S D P D - I K T A P L L I Y V R E N P S I A X

SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

242 P A R T W L H R T Q A F F Y M P V L A G Y W L S A V F N P Q I L D - L Q Q R G A
 261 Q V L L P I Y K Y Q - H L Y L P P L Y G V L G - - - L K F R V O D V F E T F V T
 240 Q V L L P I Y K F O - H I Y L P P L Y G V L G - - - L K F R I Q D V F E T F V S
 242 Q A R S W Y H K Y Q - H I Y A E I L Y G V Y A - - - L K Y R I Q D - H E I F T K
 216 P I S R K L I Q F Q - Q Y Y F L V I C I L L R - - - F I W C F Q S V I T V R S L
 243 R L N - F F Q R W Q - Q Y Y Y V P T M A I L D - - - L Y W R L E S I A Y V A V R

SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

281 L S V G I R L D W A F I H S R R K Y A V F W R A V Y I A V N V I A P F F Y T N S G
 297 L T N G P L R V N P L S V G D W A B M I L S K A F N V F Y R I Y I P L A V L Q V
 276 L T N G P V R V N P H P V S D W V Q M I F A K A F N T F Y R I Y I P L V W L K I
 277 K S N G A I R Y S P I S T I D T A I F I L G K L V F I I S R F I L P L I Y N H S
 252 K D - - - R D N Q F Y R S Q Y K K B A I C L A L H W T L K T L F H L F F M P S
 278 - - - - - - - - - L P K M W N Q A A A L A A H Y A L - - L C W V F A A H L

SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

321 - L E W S W R V F G N I M L M G V A E S L A L A V L F S L S H N F R S A D R D P
 337 D P A R F W G V F - - - F L A E F S T G W Y L A F N F Q V S H V S T A C E Y P G
 316 T P S T F W G V F - - - F L A E F T T G W Y L A F N F Q V S H V S T E C E Y P C
 317 - F S H L I C F F - - - L I S E L V L G W Y L A I S F Q V S H V V E D L Q F M A
 288 I L T S L L V F E - - - V S E L V G G F G I A I V V F M N H Y P L E K I G D S
 304 N L I P L M M V A - - - R - - - - G F A T G I V V F A T H Y G E D I L D R E

SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

360 - - - - - T A P L K K T G E P V D W F K T Q V E T S C T Y G G - - F L S G
 374 - - - - - G D E E V - - T S I D D E W A I S Q V K S S V D Y G H G S F I T T
 353 - - - - - G D A F S - - A E V G D E W A I S Q V K S S V D Y A H G S P L A A
 353 T P E I F D G A D H P L F - T T F N Q D W A I L Q V K I T Q D Y A Q D S V L S T
 324 - - - - - - - - - V W D G H G F S V G Q I H E T M N I R R G - I I T D
 335 - - - - - H V E G M T L V E Q T A K T S R N I T G G - W L V N

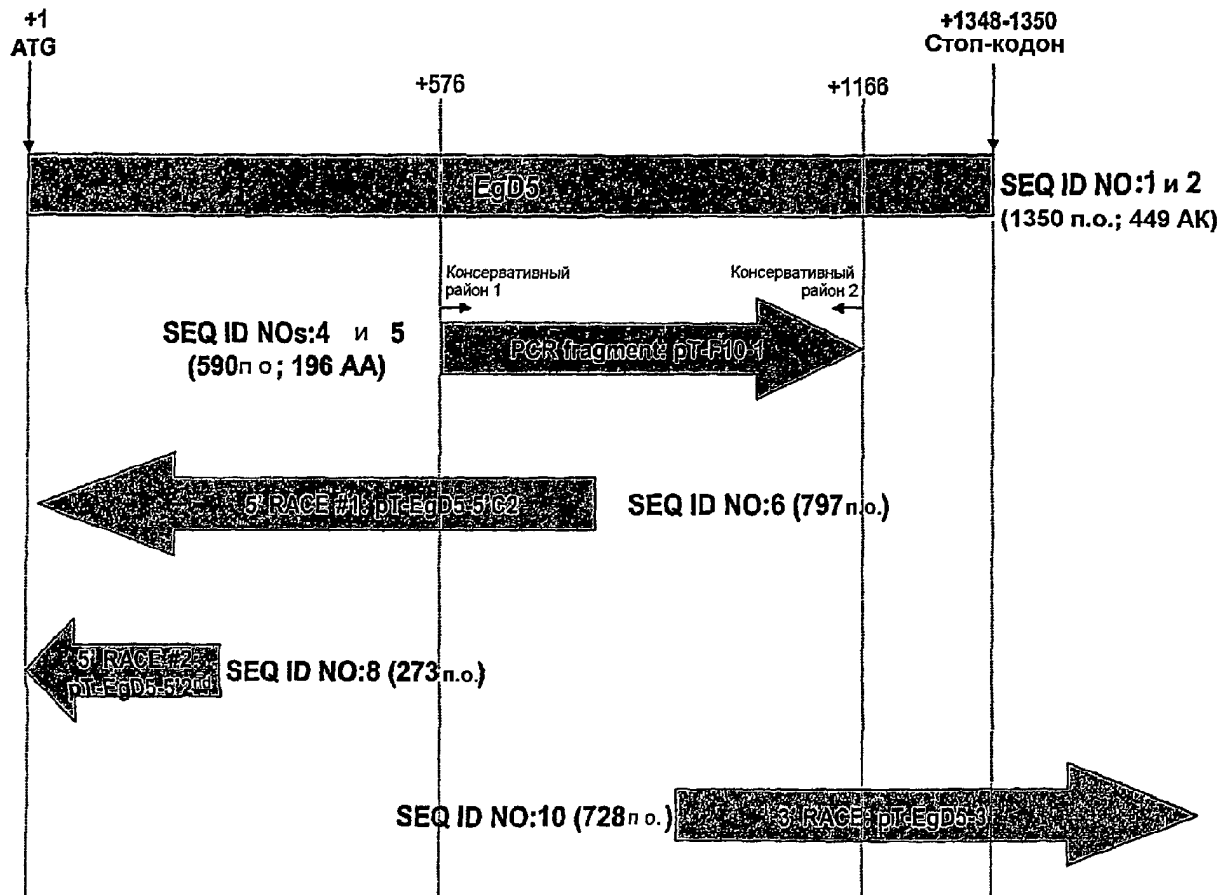
SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

Консервативный район 2

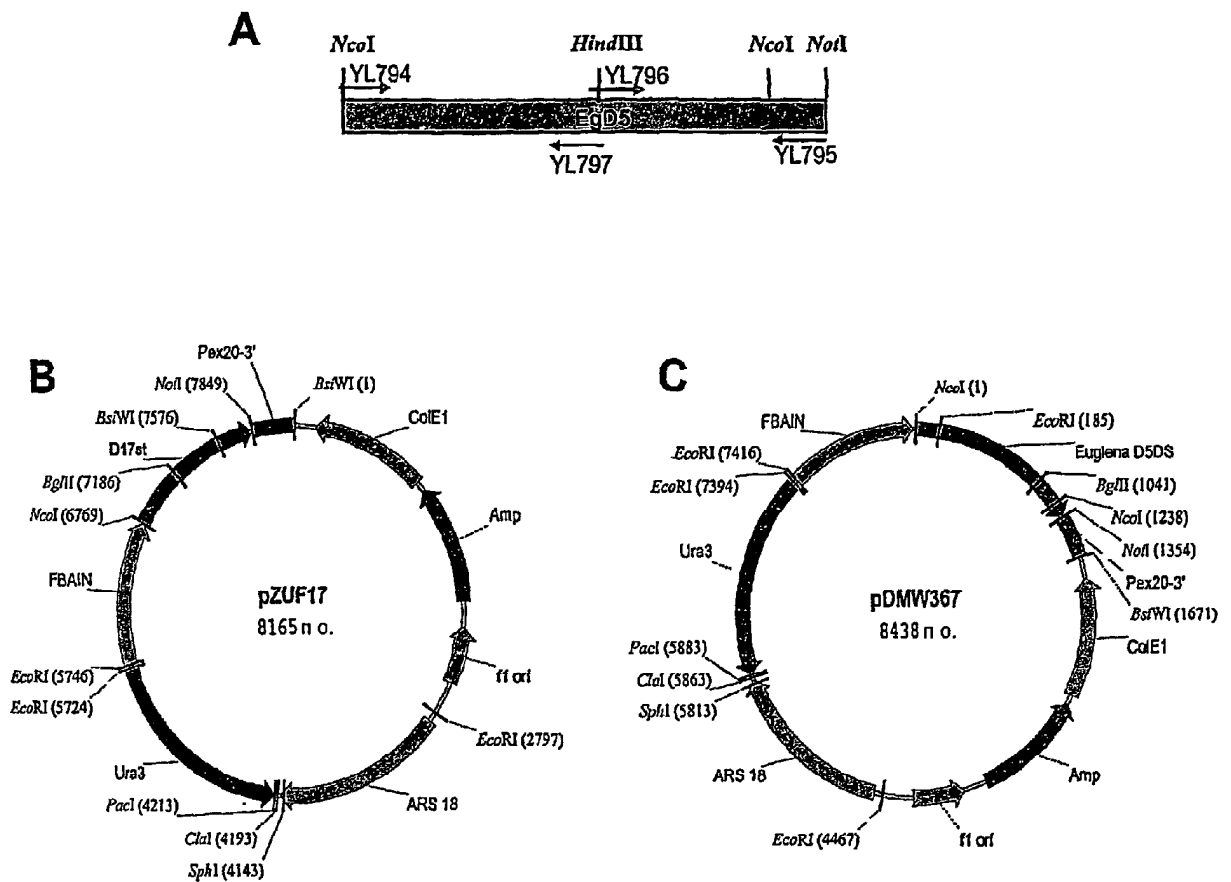
390 C F T G G L N F Q V R H H L F P 405
 405 F L T G A L N Y Q V T H H L F P 420
 384 F L C G A L N Y Q V T H H L F P 399
 392 F F S G C L N L Q V I H H C F P 407
 349 W F F G G L N Y Q I E R H L F P 364
 360 V L T G F I S L O T E E H L F P 375

SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

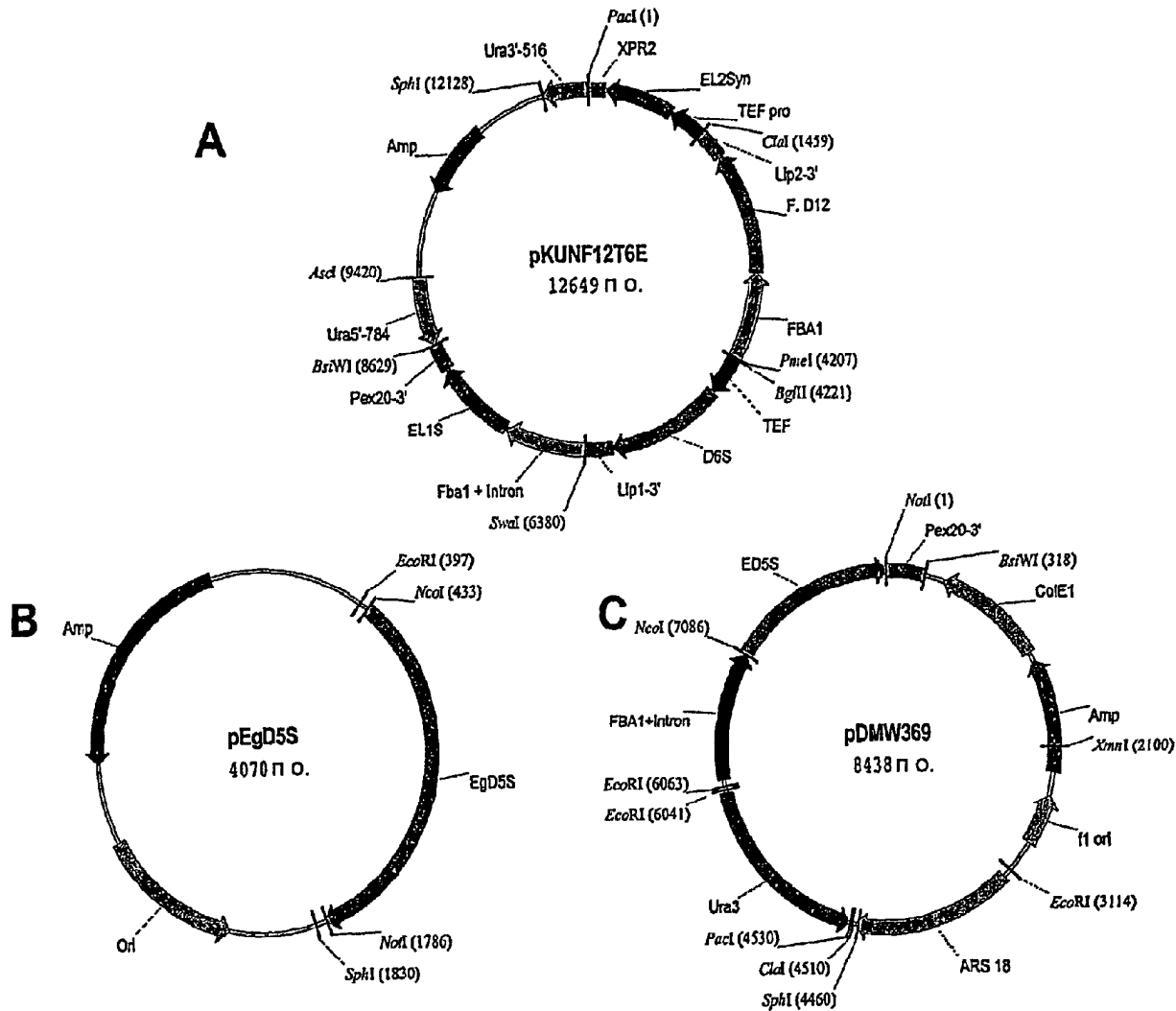
Фиг.3



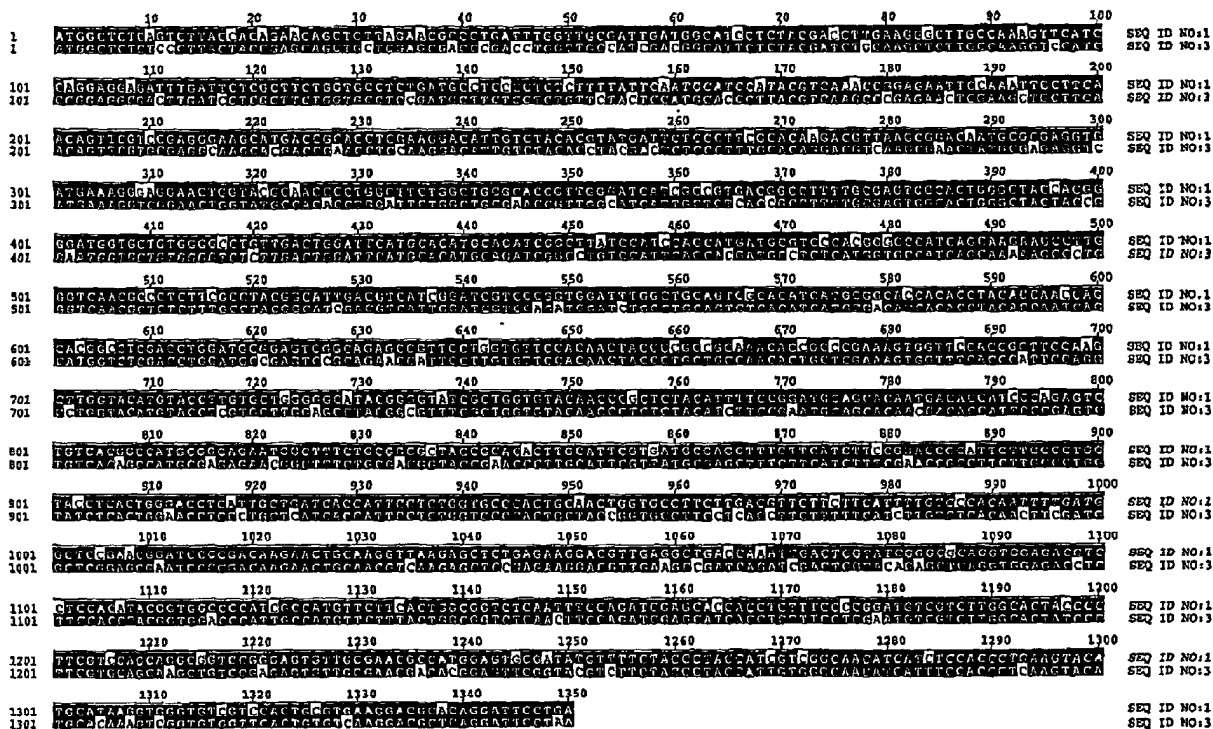
ФИГ.4



ФИГ.5



Фиг.6

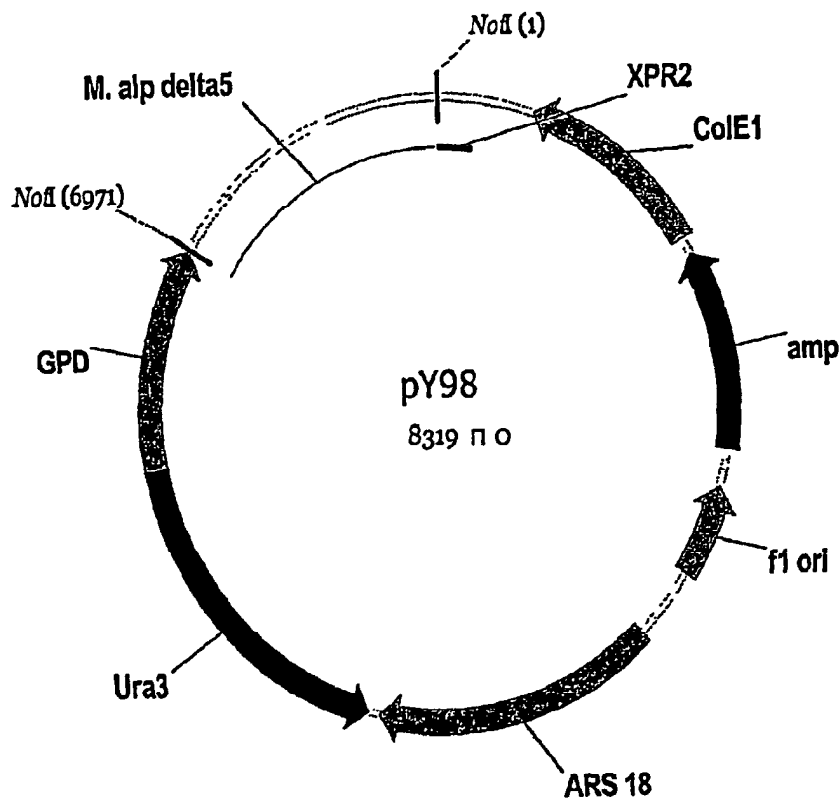


Фиг.7

Стр.: 241

	250	260	270	280	
230	LLIY-----VRENPSIAKRL--NFFQRWQQYY	SEQ ID NO 18 (Pavlova lutheri).pro			
235	LLIY-----VRNKPSIAKRL--NAFQRYQQYY	SEQ ID NO 64 (Pavlova salina).pro			
203	LLAWSE-----DDVTRASPI SRKLI QFQ-----QYYF	SEQ ID NO 16 (Euglena gracilis).pro			
232	VLLWDEYASAAAYYASLDQEP TMVSRFLAEQVLP HQTRYFF	SEQ ID NO 63 (Rhizopus stolonifer).pro			
232	VLLWDEYASAAAYYASLDQEP TMVSRFLAEQVLP HQTRYFF	SEQ ID NO 51 (Rhizopus stolonifer).pro			
	290	300	310	320	
256	VPTMAILDL YWRLESIAYVAVR--LPKMWMQAA-----	SEQ ID NO 18 (Pavlova lutheri).pro			
261	VPVMAILDL YWRLESIAYVAMR--LPKMLPQAL-----	SEQ ID NO 64 (Pavlova salina).pro			
230	LVI CILLRFI WCFQSV--LT YRSL- KDRDNQFYRSQYKK	SEQ ID NO 16 (Euglena gracilis).pro			
272	FIL- AFARLSWALQSLSY SFKKESI NKS RQLNLF-----	SEQ ID NO 63 (Rhizopus stolonifer).pro			
272	FIL- AFARLSWALQSLSY SFKKESI NKS RQLNLF-----	SEQ ID NO 51 (Rhizopus stolonifer).pro			
	330	340	350	360	
287	-----ALAAHYALLCWVFAAHLNLIPLMM--VARGF	SEQ ID NO 18 (Pavlova lutheri).pro			
292	-----ALVAHYAIVAWVFAGNYHLLPLVT--VLRGF	SEQ ID NO 64 (Pavlova salina).pro			
266	EAI GLALHWT LKTLFHLF- FMP S I L T S L L V F F V S E L V G G F	SEQ ID NO 16 (Euglena gracilis).pro			
305	ERVCI VGHWALSA- FCI YSWCSNVYHMLVFFLV SQATTGY	SEQ ID NO 63 (Rhizopus stolonifer).pro			
306	ERVCI VGHWALFA- FCI YSWCSNVYHMLVFFLV SQATTGY	SEQ ID NO 51 (Rhizopus stolonifer).pro			
	370	380	390	400	
316	ATGI VVFATHYGEDIL DREHVEG MTLVEQTAKTSRNI TGG	SEQ ID NO 18 (Pavlova lutheri).pro			
321	GTGI TVFATHYGEDIL DADQVRHMTLVEQTALTSRNI SGG	SEQ ID NO 64 (Pavlova salina).pro			
305	GI AI VVFMNHYPLEKI GDSVWDG HGF SVGQI HETMNI RRG	SEQ ID NO 16 (Euglena gracilis).pro			
344	TLALVFALNHN GMPVITEEKAESMEFFEI QVITGRDVTLS	SEQ ID NO 63 (Rhizopus stolonifer).pro			
344	TLALVFALNHN GMPVITEEKAESMEFFEI QVITGRDVTLS	SEQ ID NO 51 (Rhizopus stolonifer).pro			
	410	420	430	440	
356	WLVNVLTGFI SLQTEHHLFPMMP TGNLMTI QPEVRDFFKK	SEQ ID NO 18 (Pavlova lutheri).pro			
361	WLVNVLTGFI SLQTEHHLFPMMP TGNLMTI QPEVRAFFKK	SEQ ID NO 64 (Pavlova salina).pro			
345	IITDWFFGGLNYQIEHHLWPTLPRHNLTA VSYQVEQLCQK	SEQ ID NO 16 (Euglena gracilis).pro			
364	PLGDWFMGGLNYQIEHHVFPNM PRHNLPTVKPMYKSLCQK	SEQ ID NO 63 (Rhizopus stolonifer).pro			
364	PLGDWFMGGLNYQIEHHVFPNM PRHNLPTVKPMYKSLCQK	SEQ ID NO 51 (Rhizopus stolonifer).pro			
	450	460	470		
396	HGLE YREGNLFQCVHQNI KALAF EHL L H	SEQ ID NO 18 (Pavlova lutheri).pro			
401	HGLE YREGNLI ECVRQNI RALAF EHL L	SEQ ID NO 64 (Pavlova salina).pro			
365	HNL PYRNPL PHEGLVILLRYLAVFARMAEKQPA GKAL	SEQ ID NO 16 (Euglena gracilis).pro			
424	YDIN YHDTGFLKG TLEVLTQTL DITSKLSL-QLSKKSF	SEQ ID NO 63 (Rhizopus stolonifer).pro			
424	YDIN YHDTGFLKG TLEVLTQTL DITSKLSL-QLSKKSF	SEQ ID NO 51 (Rhizopus stolonifer).pro			

Фиг.8В



Фиг.9

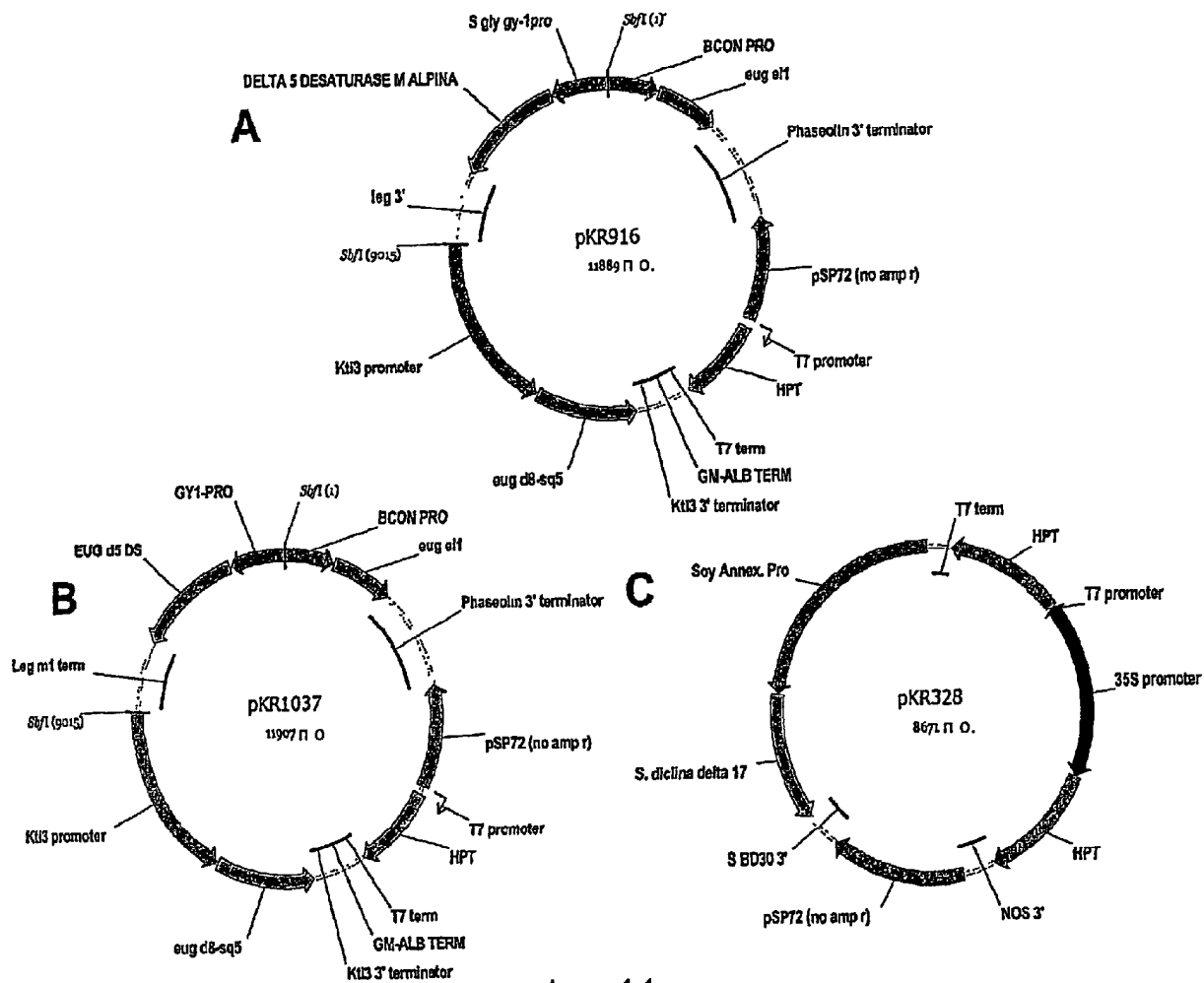
A

Жирная кислота	Клон	Ген	Состав жирных кислот (вес%)															
			16:0	16:1	18:0	18:1	LA	GLA	ALA	STA	EDA	SCI	DGLA	ARA	ETra	JUP	ETA	EPA
Никакая	pY98	MaD5	9.5	9.5	0.7	37.4	42.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	pDMW367	EgD5	9.8	10.0	0.3	24.1	55.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
EDA	pY98	MaD5	9.8	8.2	0.8	39.7	34.1	0.0	0.0	0.0	7.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	pDMW367	EgD5	9.6	7.7	0.9	33.6	39.4	0.0	0.0	0.0	6.1	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
DGLA	pY98	MaD5	12.0	6.8	1.4	38.8	19.3	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	18.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	pDMW367	EgD5	12.4	6.9	0.9	32.8	22.9	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	13.7	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
ETra	pY98	MaD5	8.9	7.2	1.0	41.2	17.2	0.0	12.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.6	0.0	0.0
	pDMW367	EgD5	8.8	7.2	0.6	35.8	18.4	0.0	16.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.7	0.0	0.0
ETA	pY98	MaD5	11.9	6.5	0.8	38.5	12.2	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	pDMW367	EgD5	10.4	7.1	0.6	30.2	16.2	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

B

Жирная кислота	Клон	Ген	% дельта-5-десатурации	отношение десатурации Eg/Ma	Отношение продукт/побочный продукт	Отношение продукт/побочный продукт Eg/Ma	Отношение n-6/n-3
Никакая	pY98	MaD5					
	pDMW367	EgD5					
EDA	pY98	MaD5	3.4	2.7			0.68
	pDMW367	EgD5	8.9				1.76
DGLA	pY98	MaD5	14.0	2.9	4.17	1.08	1.17
	pDMW367	EgD5	40.3		4.52		1.27
ETra	pY98	MaD5	4.9	1.0			
	pDMW367	EgD5	5.1				
ETA	pY98	MaD5	12.0	2.6	2.44	2.56	
	pDMW367	EgD5	31.8		6.25		

Фиг.10



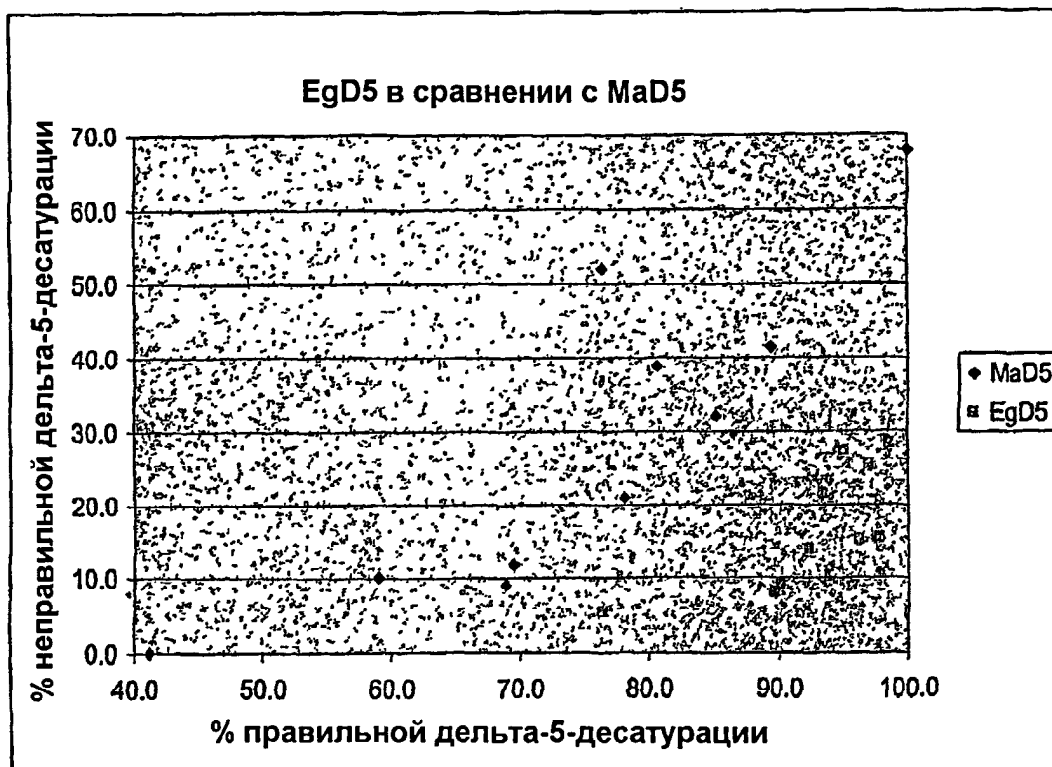
Фиг.11

Случай	Средний состав жирных кислот (вес%)														% правильной дельта-5- десатурации	% непра- вильной дельта-5- десатурации
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	SCI	DGLA	ARA	ERA	JUP	ETA	EPA	Другие		
2010-5-4-1	13.4	2.7	8.1	25.9	13.8	4.9	5.1	0.0	0.8	1.7	8.9	0.0	9.0	5.7	100.0	67.7
2010-5-12-1	17.2	5.0	14.3	28.4	12.5	5.7	0.8	0.3	0.0	2.1	4.8	0.4	6.0	2.6	89.3	41.5
2010-13-2-1	14.6	4.5	17.6	25.0	6.6	9.9	1.7	1.1	0.5	1.7	3.8	0.5	8.8	3.7	85.2	32.0
2010-9-10-1	17.2	4.3	14.7	22.1	7.1	7.1	0.7	0.8	0.1	3.4	5.9	1.7	10.5	4.4	80.6	38.8
2010-13-3-1	15.9	4.5	15.0	28.5	9.2	7.8	0.1	2.1	0.5	1.3	2.2	0.6	9.5	3.0	78.1	20.8
2010-6-2-1	17.9	3.4	10.1	18.8	9.4	8.1	0.6	0.3	0.1	6.6	15.1	1.3	4.9	3.3	76.4	52.0
2010-6-1-1	16.9	3.2	9.8	22.5	7.6	19.2	2.1	3.5	6.5	2.7	0.8	0.5	2.6	2.0	69.5	11.8
2010-12-8-1	16.0	3.9	14.9	17.2	5.2	18.2	0.3	1.9	0.0	7.0	2.2	1.9	8.4	2.9	68.8	9.2
2010-9-13-1	16.6	3.6	8.6	26.3	13.1	7.4	0.8	7.2	7.6	1.6	0.2	1.0	4.2	1.7	59.0	10.2
2010-12-4-1	15.7	4.2	27.6	17.2	4.7	6.7	0.0	3.5	0.0	1.6	0.0	6.8	7.2	4.9	41.2	0.0

Фиг.12А

Случай	Средний состав жирных кислот (вес%)														% правильной дельта-5- десатурации	% непра- вильной дельта-5- десатурации
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	SCI	DGLA	ARA	ERA	JUP	ETA	EPA	Другие		
2036-5-1-1	14.1	3.8	18.8	26.6	8.3	9.8	1.4	0.0	0.3	2.4	3.4	0.1	8.2	2.7	98.6	28.2
2041-5-4-1	16.7	4.4	17.1	32.5	11.1	7.3	0.3	0.0	0.1	2.1	1.4	0.1	5.4	1.5	97.8	15.2
2036-6-1-1	14.2	3.3	19.3	32.1	11.5	6.0	0.3	0.1	0.2	1.7	2.3	0.1	6.7	2.4	97.0	25.3
2036-5-3-1	12.7	2.7	17.2	29.4	7.4	10.2	0.4	0.2	0.3	2.0	1.7	0.3	12.8	2.6	96.3	14.9
2041-6-1-1	16.4	4.2	13.2	24.9	8.4	13.8	4.8	0.4	6.2	2.0	1.1	0.0	2.3	2.3	95.0	27.2
2036-3-2-1	12.9	2.7	14.5	28.8	5.4	13.8	0.9	0.3	0.5	2.9	3.7	0.4	9.4	3.9	93.4	21.4
2041-1-3-1	15.0	4.5	23.7	21.5	9.1	8.3	1.0	0.7	7.4	1.5	0.8	0.3	3.8	2.6	92.3	13.8
2036-7-2-1	18.0	4.5	16.5	25.3	13.2	5.4	0.4	0.9	8.9	1.0	0.2	0.4	3.1	2.2	90.1	9.1
2036-6-5-1	13.3	3.0	18.5	25.3	6.9	10.1	0.6	0.9	3.1	1.2	0.4	0.8	12.4	3.3	89.6	6.1
2036-6-7-1	12.8	3.4	14.9	30.2	6.0	13.3	0.7	2.7	8.8	1.1	0.2	0.7	2.4	2.9	76.5	5.5

Фиг.12В



Фиг.13