



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I667348 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：102132276

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 06 日

(51)Int. Cl. : C12N15/66 (2006.01)

C12N15/82 (2006.01)

(30)優先權：2012/09/07 美國

61/697,886

(71)申請人：美商陶氏農業科學公司 (美國) DOW AGROSCIENCES LLC (US)

美國

美商聖加莫生物科技股份有限公司 (美國) SANGAMO BIOSCIENCES, INC. (US)

美國

(72)發明人：安利 W 麥克 AINLEY, W. MIKE (US)；韋伯 史蒂芬 R WEBB, STEVEN R. (CA)；山繆 龐 SAMUEL, PON (US)；古辛 狄米崔 Y GUSCHIN, DMITRY Y. (US)；米勒 傑佛瑞 C MILLER, JEFFREY C. (US)；張雷 ZHANG, LEI (US)

(74)代理人：憚軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

WO 2011/049627A1

王令等人，鋅指核酸酶在基因組靶向修飾中的應用，中國生物化學與分子生物學報，25

(7)：585-589，2009/07。

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：8 共 147 頁

(54)名稱

FAD2 執行位點及相對應之能誘導標定斷裂的標定位址專一性結合蛋白

FAD2 PERFORMANCE LOCI AND CORRESPONDING TARGET SITE SPECIFIC BINDING
PROTEINS CAPABLE OF INDUCING TARGETED BREAKS

(57)摘要

本發明係揭示一種用於 FAD2 位點內之基因破壞、基因編輯或基因堆疊之方法與組成物，其藉由位址定向方式切割黃豆細胞之 FAD2 基因部位，以於 FAD2 基因中產生斷裂，隨後任擇地將感興趣之核酸分子融入該斷裂處。

Methods and compositions for gene disruption, gene editing or gene stacking within a FAD2 loci by cleaving, in a site directed manner, a location in a FAD2 gene in a soybean cell, to generate a break in the FAD2 gene and then optionally integrating into the break a nucleic acid molecule of interest is disclosed.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

FAD2執行位點及相對應之能誘導標定斷裂的標定位址
專一性結合蛋白

FAD2 PERFORMANCE LOCI AND CORRESPONDING
TARGET SITE SPECIFIC BINDING PROTEINS
CAPABLE OF INDUCING TARGETED BREAKS

【參考相關申請案】

[0001]本申請案係申請補充美國暫時專利申請號
61/697,886，於2012年9月7日提申之內容，其揭示內容在此
併入本案以作為參考資料。

【技術領域】

發明領域

[0002]本發明之揭示係有關用於重組植物技術(例如，用
於生產基因轉殖植物)之組成物與方法。更特別地，本發明
之揭示係有關於其基因體內含有可位址專一性地引入任何
感興趣核酸之位點之植物細胞與植物。

【先前技術】

發明背景

[0003]有許多植物以外源性核酸(例如，轉基因)進行基
因轉殖以引入所希望之性狀，例如，以改進農業價值。利
用基因轉殖而達到農業價值改進之例子包括：改進營養品
質、增加產量、害蟲或疾病抗性、乾旱與壓力耐受性、改
進園藝品質(例如，改進顏色及/或生長)、除草劑抗性、由
植物生產工業上適用之化合物及/或材料，及/或生產藥物。

利用經選殖基因引入植物細胞，及穩定可孕基因轉殖植物之復育，於多個世代後可產生穩定之基因改造植物，從而達成作物植物之基因工程。

[0004]以基因轉殖與基因轉殖植物生產之方法中，外源性DNA典型上為隨機引入真核植物細胞之核或色素體DNA中，接著分離含有經外源性DNA融入之細胞，隨後進行穩定轉型植物之再生。基因轉殖植物一般以農桿菌(*Agrobacterium*)媒介之轉型技術產生。這些技術的成功刺激了其他方法的發展，如原生質體之PEG媒介之DNA攝取、粒子轟擊法(microprojectile bombardment)，以及矽晶鬚(silicon whisker)媒介之轉型作用，以引入感興趣之核酸分子至植物基因體。

[0005]然而，在所有的這些植物轉型方法中，併入植物基因體之外源性核酸，係隨機地融入植物細胞中，且拷貝數無法預測。Terada et al. (2002) *Nat Biotechnol* 20(10):1030；Terada et al. (2007) *Plant Physiol* 144(2):846；D'Halluin et al. (2008) *Plant Biotechnology J.* 6(1):93。舉例而言，轉基因，包括整體轉基因或其部分，常以序列重複子形式融入。此一複雜之融入情況常對於被融入核酸之表現量造成不利影響(例如，經由轉錄後基因靜默機制破壞經轉錄之RNA，或藉由誘導經融入DNA之甲基化)。同時，融入位址之部位常會影響經融入核酸之表現量。此外，外源性DNA之融入對於基因體上融入發生區域可能具有破壞性影響，從而影響或干擾該標定區域之正常功能，並產生不

副作用。綜合包括前述之各項因素，造成不同基因轉殖植物細胞與植物系間之轉基因或外源性DNA(與整體農藝品質)的表現程度變化較大，即使以相同方法產生亦如此。由於基因融入為隨機進行，這些影響無法由人為控制，即使人員試圖產生具有希望特徵之新植物。

[0006] 上述考量之必要性為，每當評估特定外源性核酸引入植物之影響時，必須產生與分析大量的基因轉殖植物系，以取得明顯結果。同樣地，在產生含有特定經融入核酸之基因轉殖植物，以提供該基因轉殖植物所希望之表現型時，必須生產一大族群獨立建立之基因轉殖植物系，以挑選出該核酸表現最佳化，且整體表現型與該基因轉殖植物之執行具有最小或無副作用之植物系。這些實際考量對於以插入多個外源性核酸(亦即，基因堆疊)產生之基因轉殖植物更顯重要。在此類植物中，轉錄後基因靜默(*gene silencing*)現象可能被放大。

[0007] 有幾種用於控制植物轉基因插入之方法已被建立。請見，例如，Kumar and Fladung (2001) *Trends Plant Sci.* 6:155-9。這些方法取決於以同源重組為主之轉基因融入，其已成功應用於原核與低等真核細胞。Paszkowski *et al.* (1988) *EMBO J.* 7:4021-6。然而，直到最近，植物之轉基因融入之主要機制皆以不合規則重組 (*illegitimate recombination*) 為主，其中重組DNA各股之間同源性低。因此，本領域之主要挑戰為，罕見同源重組品系之偵測與世代挑選，其會被不合規則重組、更有效率融入之品系遮蔽。

此外，即使達成經標定同源重組品系之世代挑選與偵測，該品系必須標定至宿主基因體之所希望之部位，以達到此一策略之最大效益。

[0008]舉例而言，經標定基因轉殖之預期效益為，相較於隨機融入之轉型品系，該轉基因表現之品系對品系變異性減少。進一步之預期效益為，挑選經引入核酸所需之品系數、分類轉型構築體，以及生產所得基因轉殖植物所希望整體特徵之情況明顯減少。達到這些效益所需之重要因素為辨別出基因體上轉基因執行一致之專一性部位，並盡可能去除或最小化對於宿主植物之不良影響。

[0009]近來，用於基因體DNA標定切割之方法與組成物已被提出。此類標定切割品系可用於，例如，引入標定突變反應、誘導細胞DNA序列之標定刪除，以及促進預期之染色體位點之標定重組與融入。請見，例如，Urnov *et al.* (2010) *Nature* 435(7042):646-51；美國專利公開號20030232410；20050208489；20050026157；20050064474；20060188987；20090263900；20090117617；20100047805；20110207221；20110301073；2011089775；20110239315；20110145940；以及世界專利公開號WO 2007/014275，其揭示內容在此併入本案以作為參考資料。可藉由使用專一性核酸酶，如經設計之鋅指核酸酶(ZFN)、類轉錄活化因子核酸酶(TALENs)進行切割，或使用CRISPR/Cas系統連同經設計之crRNA/tracr RNA(‘單一導引性RNA’)，以引導專一性切割。美國專利公開號20080182332 揭示了使用非典型的鋅

指核酸酶(ZFNs)以標定修飾植物基因體；美國專利公開號20090205083揭示了ZFN媒介之植物EPSPS位點標定修飾；美國專利公開號20100199389揭示了植物*Zp15*位點之標定修飾，以及美國專利公開號20110167521揭示了涉及脂肪酸合成之植物基因的標定修飾。此外，Moehle *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(9):3055-3060揭示了以經設計之ZFNs於指定位點進行標定基因累加。美國專利公開號20110041195揭示了製造同型性二倍體生物體之方法。

[0010] 然而，目前仍需要一種組成物與方法，以改造及/或調控*FAD2*基因於植物之表達，包括標定插入所希望之轉基因至*FAD2*位點，以生產植物。

【發明內容】

發明概要

[0011] 本發明揭示描述了用於調控*FAD2*基因(例如，於植物、藻類與真菌中)表現之組成物與方法，以及使用這些位點作為一位址，將感興趣核酸序列(例如，外源性核酸序列)標定融入宿主細胞之用途。在一些實施例中，宿主細胞可含有具備一或多個*FAD2*序列(例如，同系物或旁系物)之一或多個基因體，其任一或全部係可選擇性地經修飾及/或破壞。在具體之範例中，本發明揭示描述了黃豆(*Glycine max*)之*FAD2* 2.3與*FAD2* 2.6 基因，與相對應之同系物或旁系物(例如，*G. max* c.v. Jack、Williams 82, X5, Westag與Maverick)，以及以其作為位點，用於將感興趣核酸序列之標定融入。說明於此，雖然*FAD2*基因涉及宿主之脂肪酸生

合成，其未預期之修飾或破壞(例如，藉由融入一外源性核酸至FAD2編碼序列中)，對於所產生之宿主生物體不具有或具有最小之不良影響。

[0012]於此亦描述使用一或多個特定之FAD2位點，後接一可影響該FAD2位點內專一性核酸序列之切割及/或融入之多胜肽。使用一或多個特定之FAD2位點，後接一可影響該FAD2位點內專一性核酸序列之切割及/或融入之多胜肽之範例，包括使用選自於由鋅指蛋白質、巨核酸酶、TAL結構域、TALENs、RNA導引性CRISPR-Cas9、重組酶、白胺酸拉鏈、CRISPr/Cas，以及其他技術上已知者組成族群之多胜肽。特定範例包括嵌合(“融合”)型蛋白質，包含位址專一性DNA-結合結構域多胜肽與切割結構域多胜肽(例如，核酸酶)，如包含鋅指多胜肽與FokI核酸酶多胜肽之ZFN蛋白。舉例而言，於此描述特定ZFNs之體外與體內效用與專一性，該特定ZFNs設計為可結合至FAD2 2.3與FAD2 2.6基因並誘發其雙股斷裂，且互相組合而未切割成相對應之同系物或旁系物。在一些實施例中，特定FAD2位點可與前述任一多胜肽一同使用，以影響感興趣核酸之位址專一性融入，該核酸之後會於宿主中表現，而對於宿主之農藝功能執行僅具有最低程度之負面影響。

[0013]在某些觀點中，係描述一種包含有一DNA結合結構域之多胜肽，其專一性地結合至FAD2基因。在某些實施例中，此一多胜肽亦可包含一核酸酶(切割)結構域，或半-結構域(例如，ZFN、重組酶、轉座酶(transposase)，或歸巢

核酸內切酶，包括具有經修飾DNA結合結構域之歸巢核酸內切酶、TAL結構域、TALENs、RNA導引性CRISPR-Cas9)，及/或接合酶結構域，使得該多胜肽可包括一定向雙股斷裂，及/或加速斷裂位址之感興趣核酸之重組。在特定之實施例中，標的為FAD2位點之DNA結合結構域，可為一DNA-切割功能性結構域。前述之多胜肽可用於某些實施例中，以將外源性核酸引入至宿主生物體(例如，植物或動物物種)之基因體之一或多個FAD2位點上。在某些實施例中，該DNA結合結構域包含具有一或多個鋅指(例如，2、3、4、5、6、7、8、9或更多鋅指)之鋅指蛋白質，並可改造(非天然發生)，以結合至FAD2基因內之任一序列。此述之任一鋅指蛋白質可結合至標的基因之編碼序列內，或鄰近序列內(例如，促進子或其他表現元件)之標定位址上。在某些實施例中，該鋅指蛋白質可結合至FAD2基因內之標定位址上，如表1所示。示範性FAD2-結合鋅指之辨識螺旋區段示於表2。鋅指蛋白質之一或多個組成性鋅指結合結構域可為典型(C2H2)鋅指，或非-典型(例如，C3H)鋅指(例如，N端及/或C端鋅指可為非典型指)。

[0014]於此亦描述破壞或編輯FAD2基因之方法。於此額外描述依據本發明方法產生之經基因修飾之宿主生物體(例如，基因轉殖之植物)。在特定範例中，由本發明實施例產生之基因轉殖生物體可為，但不侷限於，藻類、真菌、單子葉植物、雙子葉植物等。在某些特定實施例中，該雙子葉植物可為黃豆(*Glycine max*)植物。

[0015] 於此揭示之FAD2基因包括任一於具有一或多個FAD2基因之植物、藻類或真菌中發現者。

[0016] 前述與其他特徵將於下列數個實施例之詳細說明，並參考附圖而更臻清楚。

【圖式簡單說明】

[0017] 圖1係顯示來自 Williams 82 (SEQ ID NO:4)、Westag (SEQ ID NO:5)、X5(SEQ ID NO:6)、Jack (SEQ ID NO:7)，以及 Maverick (SEQ ID NO:8)之FAD2 2.3編碼序列之排列比較。

[0018] 圖2係顯示來自 Williams 82 (SEQ ID NO:9)、Westag (SEQ ID NO:10)、X5(SEQ ID NO:11)、Jack (SEQ ID NO:12)，以及Maverick (SEQ ID NO:13)之FAD2 2.6編碼序列之排列比較。

[0019] 圖3說明依據FAD2 2.3與2.6基因設計之ZFNs，於DLSSA試驗中之活性。係評估依據FAD2 2.3與2.6位點設計之ZFNs，對於選殖至哺乳動物細胞中作為報導子之FAD2 2.3與2.6序列之切割活性。

[0020] 圖4係顯示pDAB115620之質體圖譜。

[0021] 圖5係顯示pDAB115622之質體圖譜。

[0022] 圖6係顯示pDAB7221之質體圖譜。

[0023] 圖7為位點破壞試驗所使用之探針/引子示意圖。圖中指出FAD2 2.3與2.6基因之F2 ZFN結合位址，以及破壞試驗中所使用之引子。

[0024] 圖8係顯示使用FAD2 2.3位點中之F2 ZFN2鋅指

核酸酶，而使NHEJ定向至供體序列上，所產生之內-外PCR產物序列。參考序列(圖示上方)代表以逆向方位定向插入至供體載體之組成。經由FokI切割而產生之DNAs單股末端係經填滿，而產生該參考序列。列出Sanger序列。係標示出F2 ZFN2 ZFN結合序列。與專一性序列具有類似序列之質體複製株列於右方。

序列

[0025]以代表核苷酸鹼基之標準字母縮寫顯示核酸序列，如37 C.F.R. § 1.822所定義。各核酸序列僅顯示一股，不過其互補股可被理解為涵蓋於任何參照用之表現股。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

I. 幾個實施例之概述

[0026]本發明實施例建立了宿主基因體標定融入外源性核酸(例如，轉基因)之方法，其對於宿主經融入核酸作用以外之其他表型不會產生明顯不良影響。一些實施例為於單一宿主基因體中“堆疊”多個核酸。此方法需要建立與配置四種相互關聯之技術：以標定技術引入特定基因體DNA部位之雙股斷裂處(請見，例如，Puchta *et al.* (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:5034-40；Siebert and Puchta (2002) *Plant Cell* 14:1121-31；D'Halluin *et al.* (2008) *Plant Biotechnol. J.* 6(1):93-102；Cai *et al.* (2009) *Plant Mol. Biol.* 69(6):699-709；Shukla *et al.* (2009) *Nature* 459 (7245):437-41；Shan *et al.* (2103) *Nature Biotechnol.*

31:686-680 ; Le *et al.* (2013) Nature Biotechnol 31: 688-691 ; Nekrasov *et al.* (2013) Nature Biotechnol. 31:691-693 ; Ainely *et al.* (2013) Plant Biotechnol. J. (19 Aug 上線) ; 以輸送技術運送經最佳化之外源性(供體)核酸 (Bibikova *et al.* (2003) Science 300(5620):764) ; 融入技術涉及宿主基因之修改(位於同源重組或NHEJ路徑)，從而增加 HDR或NHEJ頻率，以進行標定供體DNA之插入；以分析工具富集與確認標定融入情況；以及特定之所希望宿主基因體部位(“執行位點”)，其基因上定義完備並符合跨世代之穩定基因表現，而不會對於經轉型宿主生物體產生明顯不良影響。亦請見，美國專利公開號 20030232410 ; 20050208489 ; 20050026157 ; 20050064474 ; 20060188987 ; 20090263900 ; 20090117617 ; 20100047805 ; 20110207221 ; 20110301073 ; 2011089775 ; 20110239315 ; 20110145940 ; 20080182332 ; 20090205083 ; 20100199389 ; 20110167521 。舉例而言，在植物中，執行位點為，以轉基因插入該位點時，基因轉殖植物之農藝或品質特性之負面影響可忽略或不存在之一位點。

[0027] 本文所述之實施例利用一意外之發現，即植物 *FAD2* 基因為標定插入外源性核酸(例如，基因；非編碼之 DNA 序列，如經改造之 Landing Pads (ELPs) (美國專利申請號 12/011,735) 與經改造轉基因 Insertion Platform (ETIP) (審查中之美國專利申請號 61/697882) ; 以及植物轉型單元)之執行位點。*FAD2* 位點於植物中普遍存在之特性，以及證據

顯示改變或剔除油菜、玉米、向日葵、小麥、棉花、黃豆之FAD2，並不影響其農藝或品質，確認了FAD2位點可作為商業上相關植物品種有利之執行位點。

[0028]一些實施例使用FAD2位點之位址專一性雙股DNA切割，例如，標定位址專一性DNA辨識與切割蛋白質之輸送與表達。在具體之範例中，此一FAD2專一性DNA辨識與切割蛋白質可為，例如且不限於，ZFN；TALEN；RNA導引性CRISPR-Cas9；重組酶(例如，Cre、Hin、RecA、Tre與FLP重組酶)；巨核酸酶，以及源自任何前述或其同等物之經設計蛋白質。亦可使用CRISPR/Cas系統與經設計之crRNA/tracrRNA(‘單一導引性RNA’)以導引專一性切割。在一些實施例中，FAD2執行位點內之雙股斷裂，會經由融入供體核酸於切割位址，例如，藉由同源定向修復(HDR)或非同源末端連接(NHEJ)，而修復。

[0029]本發明之揭示例證了以FAD2位點作為執行位點，例如，藉由描述黃豆之FAD2 2.3與FAD2 2.6位點，以及相對應之FAD2專一性ZFNs，其用於將外源性核酸融入FAD2 2.3及/或FAD2 2.6位點。

[0030]本發明之實施例解決了許多本領域中未決之問題。舉例而言，本文所述之標定融入方法具有選擇性，可降低或減少欲去除不必要之基因轉殖品系所需之重複試驗，由於本領域涉及之資源及繁複之規範要求，這些試驗所費不貲。此外，本文所述之標定DNA插入方法特別有利於轉基因堆疊流程。

[0031]雖然內源性FAD2位點之原始核苷酸序列可用於直接標定感興趣之核酸，但是在一些實施例中，核酸可首先標定至宿主之至少一FAD2位點，其有助於將另外的感興趣核酸分子融入宿主中。在其他範例中，可使用非同源於側接有DNA辨識位址(例如，鋅指辨識位址)之宿主生物體原始序列(例如，基本上隨機產生之核酸序列)之核苷酸序列。

II. 術語

[0032]使用於本說明書，包括申請專利範圍，單數與單數形式之術語，例如，涵蓋了複數之指涉，除非內容另有明確規定。因此，例如，"植物"、"該植物"或"一植物"之引用，亦指複數個植物。此外，依據全文，術語"植物"之使用，亦指基因上相似或相同之子代植物。同樣地，術語"核酸"亦指具有許多拷貝體之核酸分子。同樣地，術語"探針"亦指許多相似或相同之探針分子。

[0033]數字範圍為涵蓋一定義範圍之數字，並於該定義範圍內涵蓋以各整數與非整數分數表示。除非另有定義，本文所用之所有技術上與科學術語，具有本領域技術人員可普遍理解之相同意義。

[0034]為了便於本發明所揭示之各種實施例之審閱，特定術語之解釋提供如下：

[0035]經分離：“經分離”之生物成分(如核酸或蛋白質)為實質上由該成分自然出現之生物體細胞之其他生物成分中，分開、產出，或純化出來(亦即，其他染色體與染色體

外之DNA與RNA，以及蛋白質)，其造成該成分之化學上或功能上改變(例如，藉由切斷染色體內核酸與其他DNA相連之化學鍵以分離該核酸)。“經分離”之核酸分子與蛋白質包括以標準純化方法純化之核酸分子與蛋白質。該術語亦包括於宿主細胞內以重組表現方法製備之核酸與蛋白質，以及經化學合成之核酸分子、蛋白質與胜肽。

[0036]雜交：使用於此，關於植物，術語“雜交”或“經雜交”意指經由授粉使配子融合，以產生子代(例如，細胞、種子與植物)。該術語包括有性雜交(亦即，由一植物授粉另一植物)與自體雜交(亦即，自體授粉，例如，利用同一植物之花粉與胚珠)。

[0037]回交(Backcrossing)：可使用回交方法將核酸序列引入植物中。此方法已廣為使用數十年，以將新性狀引入植物。Jensen, N., Ed. *Plant Breeding Methodology*, John Wiley & Sons, Inc., 1988。在典型之回交方法中，以原有之感興趣品種(回交母代)雜交至攜帶欲轉型之感興趣核酸序列之第二品種(非回交母代)。隨後，以該雜交所得之子代再雜交至回交母代，並重複此步驟直到取得所希望之植物，其中除了非回交母代之經轉移核酸序列以外，基本上該回交植物所有的所希望之形態與生理特徵，皆回復至經轉換之植物中。

[0038]基因移入(Introgression)：使用於此，術語“基因移入”意指將對偶基因(或含有外源性核酸之經改造對偶基因)傳輸至特定位點之基因背景中。在一些實施例中，經由

相同品種兩母代間之有性雜交，將對偶基因傳輸至子代之至少一者，以進行位點之特定對偶基因之基因移入，其中母代之至少一者之基因體內具有特定對偶基因。含有特定對偶基因之子代可重複回交至具有所欲基因背景之品系。回交子代可針對特定之對偶基因形式進行挑選，以產生新品種，其中該特定對偶基因形式之基因背景被修正。在一些實施例中，以兩供體基因體(例如，在一經融合之原生質體中)間之重組進行兩特定對偶基因之基因移入，其中該供體基因體之至少一者於其基因體內具有該特定對偶基因。涉及傳輸特定對偶基因形式之基因移入可為，例如且不限於，經破壞或修改之對偶基因；轉基因；PTU；以及ELP。

[0039]生殖質(Germplasm)：使用於此，術語"生殖質"意指源自一個別植物、一族群植物(例如，植物系、品種與家族)之基因材料，以及源自一植物或一族群植物之殖株。生殖質可為生物體或細胞之一部分，或其可由生物體或細胞分出(例如，經分離)。一般而言，生殖質提供具有特定分子構造之基因材料，其為植物遺傳素質之基礎。使用於此，"生殖質"意指特定植物之細胞；種子；特定植物之組織(例如，新種植物長出之組織)；以及特定植物之非種子部分(例如，葉、莖、花粉與細胞)。使用於此，術語"生殖質"為"基因材料"之代名詞，且其可用於代表由植物繁殖出之種子(或其他植物材料)。
 "生殖質庫"意指不同種子或其他基因材料之一種組織化收集(其中各基因型皆獨特地被確認)，其中可培養習知之品種，以及其中可產生新品種。

[0040] 基因：使用於此，術語“基因”(或“基因片段”)意指具有功能顯著性之遺傳性基因體DNA序列。基因可為原始之核酸，或融入基因體內之核酸。術語“基因”亦可指，例如且不限於，由遺傳性基因體DNA序列所編碼之cDNA及/或mRNA。

[0041] 核酸分子：使用於此，術語“核酸分子”意指核苷酸之聚合形式(亦即，核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸，及/或前者之經修飾形式)。使用於此，“核酸分子”為“核酸”與“多核苷酸”之代名詞。該術語包括RNA、cDNA、基因體DNA之義股與反義股，以及合成形式及其混合之聚合物。該術語包括任何的拓撲構形，包括單股、雙股、部分雙鏈、三鏈、髮夾、圓形與掛鎖構形。核酸分子可包括天然存在與經修飾核苷酸之一或兩者。此核苷酸可藉由天然存在及/或非天然存在之核苷酸聯結方式相連。

[0042] 核酸分子可經化學上或生化學上修飾，或可含有經衍生之核苷酸鹼基，其為本領域技術人員所易於理解。此類修飾包括，例如且不限於，標籤；甲基化；以類似物取代一或多個天然存在之核苷酸；以及核苷酸間之修飾(例如，未帶電聯結，例如，磷酸甲酯類、磷酸三酯類、胺基磷酸酯類與胺甲酸酯類；帶電聯結，例如，硫代磷酸酯類與二硫代磷酸酯類；下垂片段，例如，胍肽；嵌入劑，例如，吡啶(acridine)與補骨脂素(psoralen)；螯合劑；烷化劑；以及經修飾之聯結，例如， α -變旋異構性核酸)。

[0043] 外源性：“外源性”分子為非原生於指定系統(例

如，生殖質、品種、優良品種，及/或植物)之分子，如多核苷酸之核苷酸序列及/或基因體部位(亦即，位點)(以及多胜肽之胺基酸序列及/或細胞定位)。在實施例中，外源性或異源性多核苷酸或多胜肽可爲人爲供應至生物系統(例如，植物細胞、植物基因、特殊植物種或品種，及/或植物染色體)之分子，且其非原生於該特定生物系統。因此，一核酸被指定爲“外源性”，可能意謂著該核酸源自天然存在以外之來源，或其可能意謂著該核酸具有非天然之構造、基因部位，或基因片段排列。

[0044]與此相反，例如，“原始”或“內源性”核酸爲不含染色體內正常存在以外之核酸片段，或其核酸常於自然界中發現之其他基因材料之核酸(例如，基因)。內源性基因轉錄本(transcript)於其天然染色體位點處由核苷酸序列所編碼，且並非人爲供應至細胞。

[0045]可操作地連接：若第一種核酸序列在功能上與第二種核酸序列有相關性，便可將該第一種核酸序列可操作地連接至該第二種核酸序列。舉例而言，若促進子可影響編碼基因之轉錄與表現，可將該促進子可操作地連接至該編碼基因。當進行重組生產時，可操作地連接之核酸序列一般爲相連，其中必須於相同讀碼區內連接兩個蛋白質編碼區段。然而，基因調控片段無需相連以進行可操作地連接。

[0046]促進子：促進子爲一DNA區段，其一般位於核酸上游(至5'區段)並可增進核酸之轉錄。促進子可適當活化或

抑制其可操作連接之核酸。促進子含有可被轉錄因子辨識之特定序列。這些因子結合至促進子DNA序列，並可召集RNA聚合酶，此酵素可由核酸之編碼區段合成RNA。經轉型：載體可“轉型”或“轉導”細胞，若其將核酸分子運送至細胞內。細胞可經由核酸分子“轉型”意指該核酸分子可於細胞內穩定複製，包括經由將核酸分子併入細胞基因體內或經由游離基因體複製(episomal replication)。使用於此，術語“轉型”包括所有以核酸分子引入細胞之技術。範例包括但不侷限於，以病毒載體轉型；以質體載體轉型；電穿孔法(Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3)；脂質體轉染法(Felgner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7)；顯微注射法(Mueller *et al.* (1978) *Cell* 15:579-85)；農桿菌媒介之轉移(Fraley *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7)；直接DNA攝入法；以及粒子轟擊法(Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70)。

[0047]經引入：使用於此，術語“經引入”當描述以外源性核酸轉移至細胞時中，意指使用任一本領域可得之方法學將核酸併入細胞。此術語包含核酸引入方法包括，例如且不限於，轉染法；轉型法；以及轉導法。

[0048]轉基因：使用於此，術語“轉基因”意指感興趣之外源性核酸編碼序列。舉例而言，轉基因可編碼產業上或醫藥上有用之化合物，或有利於所欲農業性狀(例如，除草劑抗性或害蟲抗性)之表現產物。在另外之實施例中，轉基因可為反義核酸(antisense nucleic acid)，其中該反義核酸之

表現可抑制標的核酸序列之表現。轉基因可包含調節序列，其可操作地連接至該轉基因(例如，促進子)。在一些實施例中，轉基因爲以位址專一性標定FAD2位點而引入之感興趣核酸分子。然而，在其他實施例中，感興趣之核酸分子可爲PTU、ELP、ETIP，或內源性核酸序列(例如，其中額外的、內源性核酸序列之外源性基因體拷貝體爲所期望的)。

[0049]基因片段可亦包括編碼有結構性RNA，如shRNA，之DNA。此RNA可修飾外源性或內源性基因，其包括但不侷限於，影響基因分發(postings)或提供除草劑抗性。

[0050]重組型：使用於此，術語“重組型”意指經由人爲介入而改變之材料(例如，核酸、基因、多核苷酸，及/或多胜肽)。舉例而言，重組型分子部分或片段之排列可能非原始之排列，及/或重組型分子之主要序列可能已異於其原始序列，例如，爲了最佳化其表現及/或活性。材料可經改變，以於其天然環境或狀態內產生重組型材料，或自其中移除。如一範例所示，若一開放讀碼區核苷酸序列爲自其天然環境中移出，並選殖至一人爲核酸分子中(例如，載體)，則該核酸開放讀碼區爲重組型。生產重組型分子(例如，重組型核酸)之方法與試劑爲本領域常見，且其用途爲常規。術語“重組型”於此可亦指包含重組型材料(例如，含有重組型核酸之植物及/或植物細胞)之細胞或生物體。在一些範例中，重組型生物體爲基因轉殖生物體。

[0051]載體：使用於此，術語“載體”意指能轉移至少一核酸片段至細胞中之多核苷酸或其他分子。載體可任擇地包含媒介該載體維持及/或啓動其用途之基因成分/片段(例如，複製所需之序列、提供藥物或抗生素抗性之基因、多重選殖位址，及/或可操作地連接之促進子/增進子基因片段，其可啓動經選殖基因之表現)。載體可衍生自，例如，質體、噬菌體，或植物或動物病毒。“選殖載體”、“運輸載體”或“次選殖載體”一般包含可操作地連接之基因片段，以利選殖或次選殖步驟(例如，多重選殖位址含有多個限制核酸內切酶位址)。

[0052]表現載體：術語“表現載體”使用於此，意指包含可操作地連接之多核苷酸序列之載體，其有助於編碼序列於特定宿主生物體內之表現。舉例而言，細菌表現載體有助於編碼序列於細菌內之表現。同樣地，植物表現載體有助於編碼序列於植物細胞內之表現。有助於原核細胞表現之多核苷酸序列包括，例如且不限於，促進子；操作子；以及核糖體結合位址。真核細胞表現載體(例如，植物表現載體)可包含，例如，促進子；增強子；末端訊息序列；以及聚腺苷酸化(polyadenylation)訊息序列(與其他序列)，其一般異於原核細胞之表現載體。

[0053]序列等同度：術語“序列等同度”或“等同度”，用於全文之兩個核酸或多肽序列，意指，在一特定比較窗中，以最大對應度對齊時，該二序列內之相同殘基數。序列等同度之數值，係於一比較窗內，藉由比較二最佳化之比對

序列(例如，核酸序列與胺基酸序列)而定，其中相較於參考序列(其不含加入或刪除)，該比較範圍內之序列部分可能包含加入或刪除(亦即，間隙)，以達到該二序列之最佳化比對。序列等同度以百分比計算，係藉由確定兩序列之相同核苷酸或胺基酸殘基之位置數目，以取得相符合之位置數、以相符合之位置數除以比較範圍內之位置總數，並將所得結果乘上100，以產生序列等同度之百分比。

[0054] 序列比對方法為本領域中所習知。有多種程式與比對演算法描述於，例如：Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482；Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443；Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444；Higgins and Sharp (1988) *Gene* 73:237-44；Higgins and Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3；Corpet *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90；Huang *et al.* (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65；Pearson *et al.* (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31；Tatiana *et al.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50。有關序列比對方法與同源性計算之詳盡討論可見於Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10。

[0055] 美國國家生技資訊中心(NCBI)之 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™；Altschul *et al.* (1990))可用於比對序列，且其可得自數個來源，包括美國國家生技資訊中心(Bethesda, MD)，以及網際網路，用於連結數個序列分析程式。針對如何使用該程式以確認序列等同度之描述，可取自網路版BLAST™的“支援”一節。在核酸序列比對方面，

可以原始參數結合BLAST™ (Blastn)程式 “Blast 2序列”功能進行。以此方法進行評估時，核酸序列與參考序列之相似度愈大，則百分比等同度愈大。

[0056]使用於此，術語“實質上等同”意指核苷酸序列之等同度大於80%。舉例而言，實質上等同之核苷酸序列可為至少85%；至少86%；至少87%；至少88%；至少89%；至少90%；至少91%；至少92%；至少93%；至少94%；至少95%；至少96%；至少97%；至少98%；至少99%；或至少99.5%等同於參考序列。

[0057]位點：使用於此，術語“位點”意指基因體上相對應於可測量特徵(例如，性狀)之位置。在一些實施例中，特別感興趣之位點為FAD2基因於基因體之位置，其中破壞該基因會減少或消除轉錄自野生型基因之mRNA表現。位點可由探針找出，其可由南方雜合法或PCR方法雜合至位點內獨特的核苷酸序列。

[0058]標記物：使用於此，“標記物”意指可用於辨別植物是否具有特定對偶基因，及/或具有特定性狀或表現型之基因或核苷酸序列。標記物可描述為一給定基因體位點之變化型。遺傳標記物可為短DNA序列，如單一鹼基對改變處(單核苷酸多型性，或“SNP”)周圍之序列，或長序列，例如，迷你衛星/簡單序列重複體(“SSR”)。“標記物對偶基因”意指存在於特定植物內之標記物類型。使用於此，術語標記物意指植物染色體DNA之經選殖片段(例如，含有FAD2位點之片段，或經修飾及/或經破壞之FAD2位點)，且亦指

互補於植物染色體DNA經選殖片段之DNA分子。如本領域技術人員所理解的，取得額外的、相連接核苷酸序列以納入標記物之步驟，可幾乎無限定地重複(僅受限於染色體之長度)，從而辨別出沿著染色體之額外標記物。任一與所有上述標記物之變異體可用於本發明之一些實施例。

[0059]在一些實施例中，生殖質內轉基因或標記物(其特徵如“標定”序列所示)之存在可經由核酸探針，如寡核苷酸，偵測出。探針可為DNA分子或RNA分子。寡核苷酸探針可藉由合成或選殖方式製備。適用之選殖載體為本領域技術人員所習知。RNA探針可藉由本領域習知之工具合成，例如，使用DNA分子模板。

[0060]寡核苷酸探針可經標示或未經標示。現有多種核酸分子標示技術包括，例如且不限於，藉由缺口轉移之放射線標籤；隨機引導；以及以末端去氧轉移酶接尾(tailing)，其中核苷酸之標籤為，例如，利用放射性³²P。可使用之其他標籤包括，例如且不限於，螢光團；酵素；酵素受質；酵素輔因子；以及酵素抑制劑。或者，使用可提供可偵測訊號之標籤，其可自行或結合其他反應試劑產生，並以其用於取代配體與受體之結合，其中該受體經標示(例如，藉由前面指出之標籤)以提供可偵測訊號，係自行或結合其他試劑產生。請見，例如，Leary *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4045-9。

[0061]探針為待偵測之轉基因或標記物之準確拷貝體。探針亦可為包含一核苷酸序列，或由其組成之核酸分

子，其中該核苷酸序列實質上等同於經選殖之包含欲偵測轉基因或標記物之染色體DNA片段。探針可進一步包含額外的核酸序列，例如，促進子；轉錄訊息序列；及/或載體序列。

[0062]探針可含有所有的或一部份的標定核苷酸序列，以及額外的、源自基因體之相連接核苷酸序列。其於本文中稱為“相連性探針”。如傳統上所理解的，該額外的、相連接核苷酸序列稱為原標定處之“上游”或“下游”，其取決於源自染色體之該相連接核苷酸序列，係位於原標記處之5'端或是3'端。探針亦可含有未連接至原標定物之核苷酸序列；此探針於本文中稱為“非連接性探針”。非連接性探針序列可足夠接近染色體上原標定處之序列，因此該非連接性探針可連接至原標記物或轉基因。

[0063]在一些實施例中，探針為“可專一性地雜合”或“專一性地互補”至待偵測標定物之準確拷貝體之核酸分子。術語“可專一性地雜合”與“專一性地互補”意指足夠程度之互補性，因此核酸分子與標定物之間產生穩定與專一性結合。核酸分子無需100%互補於其標定序列，以達到專一性雜合。若有足夠程度之互補性，以避免核酸於所希望專一性結合條件下，例如，於嚴苛的雜合條件下，出現非專一性地結合至非標定序列，則該核酸分子為可專一性地雜合。

[0064]產生特定嚴苛度之雜合條件，係依據所選用雜合方法之性質，及雜合用核酸序列之組成與長度而不同。一

般而言，雜合溫度與雜合緩衝液之離子強度(尤其是 Na^+ 及/或 Mg^{++} 的濃度)，將決定雜合作用之嚴苛度，雖然洗滌時間亦影響嚴苛度。關於達到特定嚴苛程度所需之雜合條件的計算，為本領域技術人員所習知，並可見於，例如，Sambrook *et al.* (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11；以及Hames and Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985。關於核酸雜合之進一步詳細指示與指導，可見於，例如，Tijssen, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993；以及Ausubel *et al.*, Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995。

[0065]使用於此，“嚴苛條件”為雜合分子與DNA標定物之間錯誤配對率低於25%之雜合條件。“嚴苛條件”包括更特定之嚴苛度。因此，使用於此，“輕度嚴苛”條件為分子間有大於25%序列未配對而無法雜交；“中度嚴苛”條件為分子間有大於15%序列未配對而無法雜交；以及，“高度嚴苛”條件為序列間有大於10%之未配對而無法雜交。“非常高度嚴苛”條件為序列間有大於6%之未配對而無法雜交。

[0066]在特定之實施例中，嚴苛條件為於65°C之6x檸檬

酸鈉鹽水 (SSC) 緩衝液、5x 鄧哈特溶液 (Denhardt's solution)、0.5% SDS與100 μ g經剪切之鮭魚睪丸DNA中之雜合反應，接著於65°C 之2x SSC緩衝液與0.5% SDS中連續洗滌15-30分鐘，再以1x SSC緩衝液與0.5% SDS洗滌，以及最後以0.2x SSC緩衝液與0.5% SDS洗滌。

[0067] 連接(不)平衡：使用於此，術語“連接平衡”意指標記物與第二種核酸(例如，轉基因、PTU與第二種標記物)獨立分開之情況；亦即，子代之該標記物與該第二種核酸隨機排列。若核酸出現連接平衡，則被視為未連接(無論其是否位於相同染色體上)。使用於此，術語“連接不平衡”意指標記物與第二種核酸以非隨機方式分開之情況；亦即，該核酸具有低於50%之重組頻率(因此依據定義，在同一連接族群上之間隔距離小於 50 cM)。在一些範例中，若核酸出現連接不平衡，則被視為相連接。

[0068] 連接、緊密連接與極緊密連接：使用於此，標記物與第二種核酸(例如，轉基因、PTU與第二種標記物)之間的連接可表達一現象，即染色體上之核酸具有可測得機率並同時傳遞至下一代個體。因此，一標記物連接至第二種核酸之情況，可由重組頻率測量及/或表示。兩核酸彼此之間愈靠近，則機率愈接近“1”。因此，術語“經連接”意指一或多個基因或標記物連同第二種核酸同時傳遞之機率大於0.5 (預期源自獨立之分離體，其中標記物/基因位於不同染色體)。若基因(例如，轉基因)之表達使個體產生表現型，則連接至標記物之基因可稱為連接至表現型。因此，術語

“經連接”意指標記物與基因之間，或標記物與表現型之間的關係。

[0069] 相對基因距離(依跨越頻率而定，並以分摩(cM)測量)一般與物理上距離(以鹼基對測量)成正比，代表兩相連接之標記物或基因於染色體上彼此分開。一分摩定義為兩遺傳標記物之間距具有1%重組頻率(亦即，每100次細胞分裂，該二標記物之間出現一次跨越品系)。一般而言，一標記物愈接近另一標記物或基因(無論其間之距離是否以基因距離或物理距離測量)，則其連接愈緊密。由於性狀間之染色體距離約正比於各表徵間之重組品系頻率，因此概略物理上距離亦相關於重組頻率。此相關性為主要作物植物與許多其他生物體中所習知或易於判定(Helentjaris and Burr (eds.) (1989) *Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY ; Gresshoff (ed.) (1994) *Plant Genome Analysis*. CRC Press, Boca Raton, FL ; Lander *et al.* (1987) *Genomics* 1:174-81 ; Tanksley *et al.* (1988) “Molecular mapping of plant chromosomes”，見於 *Chromosome Structure and Function*. Gustafson and Appels (eds.) Plenum Press, NY, pp. 157-73)。舉例而言，酵母菌之1 cM對應於大約2.5-3.0 kb、阿拉伯芥(*Arabidopsis*)大約140 kb、向日葵大約400 kb，以及桉樹(*Eucalyptus*)大約350 kb。

[0070] 術語“連接”於此意指一或多個重組頻率小於50% (亦即，小於50 cM)之核酸。舉例而言，“連接”核酸為

以約45%或更低、約40%或更低、約35%或更低、約30%或更低、約25%或更低、約20%或更低、約15%或更低，以及約10%或更低之頻率重組。於相同染色體上，對應於前述重組頻率之此類核酸間之物理上距離(不同染色體之核酸預期應為連接平衡)取決於宿主基因體，並可由前述方法算出。

[0071]使用於此，術語“緊密連接”意指一或多個重組頻率約20%或更低(亦即，約20 cM或更低)之核酸。舉例而言，“緊密連接”核酸為以22%或更低、約18%或更低、約16%或更低、約14%或更低、約12%或更低、約10%或更低、約8%或更低、約6%或更低、約4%或更低，以及約2%或更低之頻率重組。

[0072]使用於此，術語“極緊密連接”意指一或多個重組頻率約10%或更低(亦即，約10 cM或更小)之核酸。舉例而言，“極緊密連接”核酸為以11%或更低、約9%或更低、約8%或更低、約7%或更低、約6%或更低、約5%或更低、約4%或更低、約3%或更低、約2%或更低，以及約1%或更低之頻率重組。

[0073]特定核酸與編碼特定表現型之多胜肽的基因愈接近(無論以基因或物理上距離測量)，則該特定核酸與該表現型愈緊密連接。鑑於上述情況，將可理解的是，連接至特定基因或表現型之核酸包括那些緊密連接至與那些極緊密連接至基因或表現型之核酸。在一些實施例中，特定核酸與*FAD2*位點愈接近(例如，經修飾或經破壞之*FAD2*位

點)，無論以基因或物理上距離測量，則該特定核酸與融入該*FAD2*位點之外源性核酸之任何性狀/表現型(或在未修飾位點之情況，為野生型 *FAD2*表現型)愈緊密連接。因此，連接、緊密連接，及/或極緊密連接至經外源性核酸融入之*FAD2*位點的遺傳標記物，可能適用於MAS程序，以辨別包含該經融入核酸之生物體(例如，植物與植物品種)、以辨別包含該經融入核酸所產生表現型之生物體，以及以育種該經融入核酸所產生之此一核酸及/或表現型成為其他相容性生物體。

[0074] 標記物輔助育種：使用於此，術語“標記物輔助育種”意指以植物直接繁殖出一或多個性狀(例如，多基因性狀)之方法。在目前之實踐中，植物育種者試圖找出易察覺性狀，例如，花的顏色、種皮外觀，或連接至農藝上所欲性狀之異構酶變異體。隨後，植物育種者依循該分離、育種族群之農藝性狀，係依循易察覺性狀之分離情況。然而，用於植物育種之感興趣性狀與易察覺性狀之間，僅有極少連接關聯性。在本發明之一些實施例中，標記物輔助育種包含找出連接至*FAD2*位點之一或多個遺傳標記物(例如，SNP、異構酶，及/或SSR標記物)，其中將產生感興趣性狀之外源性核酸融入，並依循分離、育種族群之感興趣性狀，係依循該一或多個遺傳標記物之分離情況。在一些範例中，一或多個遺傳標記物之育種分離係以該一或多個遺傳標記物之探針判定，其藉由分析子代植物基因樣本中該一或多個遺傳標記物之存在。標記物輔助育種提供了具

時間與成本效益之方法，以改進植物品種。

[0075] 性狀或表現型：術語“性狀”與“表現型”於此可交替使用。針對本發明揭示之目的，特別感興趣性狀包括農藝上重要性狀，如表現於，例如，作物植物，以及由經標定融入品系產生之轉基因表現產物。術語“分子表現型”意指表現型可於族群(一或多個)分子層次偵測出。在一些範例中，分子表現型僅能於分子層次偵測出。表現型之可偵測分子可為核酸(例如，基因體DNA或RNA)；蛋白質；及/或代謝物。舉例而言，分子表現型可為一或多個基因產物之表現情形(例如，於植物發育之特定階段，或對於環境條件或壓力之反應)。

[0076] 數量性狀位點：性狀持續地因遺傳(累加、顯性與上位性)與環境影響而改變，通常稱為“數量性狀”。數量性狀不同於“質量”或“不連續”性狀，係依據兩個因素：環境對於基因表現之影響，其產生表現型之連續性分佈，以及由多基因遺傳產生之複雜育種分離。連接至數量性狀表現之基因體上一或多個區段的辨別，該區段即稱為數量性狀位點(“QTL”)。

[0077] 植物：使用於此，術語“植物”意指完整植物、衍生自植物之細胞或組織，及/或任何上述之任何部分。因此，術語“植物”包括，例如且不限於，整體植物；植物成分及/或器官(例如，葉、莖與根)；植物組織；種子；以及植物細胞。植物細胞可為，例如且不限於，植物之細胞、分離自植物之細胞，以及取自植物細胞經分離後之培養細

胞。

[0078] “基因轉殖植物”為植物細胞之至少一者內含外源性多核苷酸。使用於此，術語“基因轉殖”意指基因型因外源性核酸之存在而改變之任何細胞、細胞株、癒傷組織、組織、植物部分，或植物。因此，此術語包括最初經改變而含有外源性多核苷酸之基因轉殖生物體與細胞，以及經由雜交或無性繁殖該最初基因轉殖生物體或細胞而產生之生物體與細胞。使用於此，術語“基因轉殖”不包括以傳統植物育種方法(例如，僅非基因轉殖生物體之雜交)或以天然存在品系(例如，隨機雜交授精、非重組型病毒感染、非重組型細菌轉型、非重組型換位，以及自然突變)引入之基因體(染色體或染色體外)改變。

[0079] 植物“系”、“品種”或“品系”為具有相同母系之一族群之個別植物。植物系一般近交至某種程度，且大多數的基因位點(例如，*FAD2*位點)常具有同型性與同源性。“亞系”意指源自共同祖先之一近交子代，其基因異於相同祖先之其他類似之近交子代。在一些實施例中，“亞系”可由挑選 F_3 至 F_5 世代之個別基因轉殖植物種子而育種產生，直到剩餘之分離位點的大部分或全部皆為同型性位點為止。

[0080] “結合蛋白”為可結合至另一分子之蛋白質。結合蛋白可結合至，例如，DNA分子(DNA結合蛋白)、RNA分子(RNA結合蛋白)及/或蛋白質分子(蛋白質結合蛋白)。在蛋白質結合蛋白之情況，其可結合至自身(以形成同型二聚體、同型三聚體等)，及/或其可結合至不同蛋白質之一或多

個分子。結合蛋白可具有大於一者之結合活性類型。舉例而言，鋅指蛋白質具有DNA結合、RNA結合與蛋白質結合活性。

[0081]“鋅指DNA結合蛋白”(或結合結構域)為經由一或多個鋅指以序列專一性方式結合至DNA的蛋白質或較大蛋白質內部結構域，其中該結合結構域內胺基酸序列區段之結構經由鋅離子之配位而穩定。術語鋅指DNA結合蛋白常縮寫為鋅指蛋白質或ZFP。

[0082]“TALE DNA結合結構域”或“TALE”為包含一或多個TALE重複結構域/單元之多胜肽。該重複結構域涉及TALE與其同源標定DNA序列之結合。單一“重複單元”(亦稱為“重複序列”)之長度一般為33-35個胺基酸，並具有至少一些序列與天然存在之TALE蛋白質之其他TALE重複序列同源。

[0083]鋅指與TALE結合結構域可“經設計”以結合至預定之核苷酸序列，例如，經由天然存在之鋅指或TALE蛋白質之辨識螺旋區段的基因工程(改變一或多個胺基酸)。因此，經設計之DNA結合蛋白(鋅指或TALEs)為非天然存在之蛋白質。設計並挑選出用於改造DNA結合蛋白之方法之非侷限範例。經設計之DNA結合蛋白為不存在於自然界之蛋白質，其設計/組成結果主要來自合理性標準。用於設計之合理性標準包括取代規則與電腦化演算法之應用，以處理現有的ZFP及/或TALE設計與結合數據資訊庫之資料。請見，例如，美國專利號6,140,081；6,453,242；以及6,534,261；

亦請見 WO 98/53058；WO 98/53059；WO 98/53060；WO 02/016536 與 WO 03/016496，以及美國專利公開號 20110301073。

[0084]“經挑選”之鋅指蛋白質或TALE為不存在於自然界之蛋白質，其產生結果主要來自於經驗過程，如噬菌體展示、交互作用捕捉或雜合挑選。請見，例如，US 5,789,538；US 5,925,523；US 6,007,988；US 6,013,453；US 6,200,759；WO 95/19431；WO 96/06166；WO 98/53057；WO 98/54311；WO 00/27878；WO 01/60970；WO 01/88197；WO 02/099084；以及美國專利公開號20110301073。

[0085]“切割”意指DNA分子之共價鍵骨架斷裂。切割可由多種方法進行，包括但不限於，磷酸二酯鍵之酵素性或化學性水解。單股切割與雙股切割皆可能發生，且雙股切割可因兩不同單股之切割事件而發生。DNA切割可產生鈍端或交錯端。在某些實施例中，融合多胜肽係用於經標定之雙股DNA切割。

[0086]“切割半結構域”為一多胜肽序列，其接合第二種多胜肽(可為相同或不同)以形成具有切割活性(較佳為雙股切割活性)之複合物。術語“第一種與第二種切割半結構域”；“+與-切割半結構域”與“右與左切割半結構域”可互換使用，以表示二聚體化之切割半結構域配對體。

[0087]“經設計之切割半結構域”為經修改之切割半結構域，從而與另一切割半結構域(例如，另一經設計之切割半結構域)形成絕對雜二聚體(obligate heterodimers)。亦請

見，美國專利公開號 2005/0064474、20070218528、2008/0131962與2011/0201055，其在此併入本案以作為參考資料。

[0088]雙股DNA斷裂產生工具：使用於此，術語“雙股DNA斷裂產生工具”目的為參照由國會核准之35 U.S.C. § 112之第六段的特殊聲明規定。具體而言，“雙股DNA斷裂產生工具”意指能切割雙股DNA分子兩股的分子結構。此類結構包括許多已知之核酸酶蛋白質所涵蓋之多胜肽結構域，例如，FokI核酸酶結構域，其催化結構域為選自於由蛋白質 Mmel、大腸桿菌素-E7 (CEA7_ECOLX)、大腸桿菌素-E9、APFL、EndA、Endo I (END1_EC0LI)、人類 Endo G (NUCG_HUMAN)、牛Endo G (NUCG_BOVIN)、R.HinP11、I-BasI、I-Bm1、I-Hm1、I-Tev1、I-Tev11、I-Tev111、I-Tw1、R.Msp1、R.Mva1、NucA、NucM、Vvn、Vvn_CLS、金黃色葡萄球菌核酸酶(NUC_STAAU)、金黃色葡萄球菌核酸酶(NUC_STAHY)、微球菌核酸酶(NUC_SHIFL)、核酸內切酶 yncB、去氧核糖核酸內切酶 I(ENRN_BPT7)、轉域酶 (Metnase)、Nb.BsrDI、BsrDI A、Nt.BspD61 (R.BspD61大型次單元)、ss.BspD61 (R.BspD61小型次單元)、R.P1el、M1yl、Alw1、Mva12691、Bsr1、Bsml、Nb.BtsCI、Nt.BtsCI、Rl.Bts1、R2.Bts1、BbvCI次單元1、BbvCI次單元2、BpulOI α 次單元、BpulOI β 次單元、Bmrl、Bfil、I-Crel、hExol (EX01JHUMAN)、酵母菌Exol (EX01_YEAST)、大腸桿菌 Exol、人類TREX2、小鼠TREX1、人類TREX1、牛TREX1、

大鼠TREX1、人類DNA2、酵母菌DNA2 (DNA2_YEAST) 所組成之族群。

[0089] 雙股DNA斷裂修補工具：使用於此，術語“雙股DNA斷裂修補工具”目的亦為參照由國會核准之35 U.S.C. § 112之第六段的特殊聲明規定。具體而言，“雙股DNA斷裂修補工具”意指能促進/催化雙股DNA分子終端連接，例如，連接單股雙股DNA分子經切割產生之終端，或以單一雙股DNA分子經切割產生之一端，連接外源性雙股DNA分子之一端，之分子結構。此類結構包括許多已知之連接酶蛋白質所涵蓋之多胜肽結構域，例如，Cre重組酶。在一些範例中，同一分子結構可同時作為雙股DNA斷裂產生工具與雙股DNA斷裂修補工具，其中該同一結構可同時促進雙股DNA分子(例如，Hin重組酶)之切割與修補。

[0090] 基因體內位址專一性雙股斷裂之誘導作用，會誘導宿主植物細胞之DNA修補路徑，其經由同源定向修復(HDR)或非同源末端連接(NHEJ)，而修補雙股斷裂。在植物中，科學文獻報導了，基因或供體DNA準確插入原始基因體或預先改造之位置，涉及進入之供體DNA構築體，其含有各種含量之定向雙股斷裂側接序列之同源序列。此類供體插入至預先設定之專一性標靶位點，係依賴HDR路徑。在植物中，基因標靶獨佔性地依賴HDR路徑會產生限制，歸因於HDR修復路徑並非主要的DNA修復路徑，當與NHEJ相較時。已發表之植物學科學文獻中，係利用標靶專一性DNA斷裂(ZFN、TALENs，或經改造之巨核酸酶等)，已報

導該NHEJ路徑為將專一性點突變(插入或刪除)引入於基因體中之方法。於此，我們報導位址專一性雙股斷裂(由ZFN、TALENs等誘發)，以各種供體DNA方式呈現，其設計為具有同源區域0至<10 bp，可專一性地插入至標靶斷裂處，經由植物中之NHEJ修復路徑。多種不同的DNA供體，設計為具有零同源性至小段1 – 10 bp範圍，直線或圓形，單股至雙股，可設計為標靶特定位置，使用NHEJ路徑。NHEJ為主之供體DNA植物基因體標靶可以“黏性末端捕捉法”為基礎，其中該基因體中定向雙股斷裂係由*FokI*(或其他Type II 核酸內切酶結構域)切割產生，而相對應之黏性末端則以NHEJ供體DNA設計為基礎。黏性末端供體DNA可以具有預先定義突出端之直線形供體DNA形式，直接傳送至細胞中。另一方法為於體內產生供體DNA黏性末端，藉由與宿主標靶ZFN與一圓形DNA供體分子，其含有至少一ZFN辨識位址，其與標靶辨識位址相同，共傳輸。表現至少一ZFN會切割宿主基因體DNA(原始或預改造)與圓形供體DNA，產生黏性末端，其可使用NHEJ修復路徑解決。

[0091]在供體分子(單一ZFN)切割位置上可具有一或多個ZFN切割位置，以使整個供體分子直線化，有2個相同之ZFN位址可釋放較小之供體DNA片段，或2個不同之ZFN位址可自供體釋放一片段，以及自宿主基因體DNA上釋放一相對應之片段(DNA置換)。

[0092]因此，該供體多核苷酸可為DNA或RNA、單股及/或雙股，且可以直線或圓形形式引入細胞。請見，例如，

美國專利公開號20100047805與20110207221。本發明之某些實施例亦可包括直線形外源性(供體)核酸、包含這些核酸之組成物，以及製備與使用這些直線形供體分子之方法。在某些實施例中，該直線形供體分子可穩定存留在所引入之細胞中。在其他實施例中，該直線形供體分子係經修飾。以抵抗細胞核外之切割，例如置入一或多個硫代磷酸硫雙酯鍵於供體分子末端上之一或多個鹼基對。該直線形外源性核酸亦可包括單股專一性DNA。

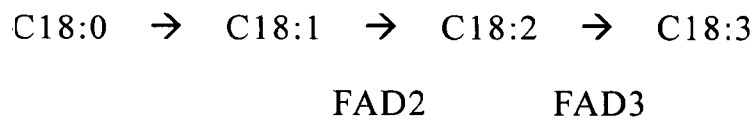
III. *FAD2* 執行位點

[0093]指定於FAD2(脂肪酸去飽和酶 2)之位點係包括於QTLs中，其涉及植物中脂肪酸含量之複雜多重性狀之遺傳。*FAD2*係編碼負責將油酸(18:1)去飽和為亞油酸(C18:2)之酵素。請見 Tanhuanpaa *et al.* (1998) *Mol. Breed.* 4:543-50；Schierholt *et al.* (2001) *Crop Sci.* 41:1444-9。

[0094]在植物油之生合成路徑中，脂肪酸去飽和酶(FADs)在植物脂肪生合成中按演重要角色，且其活性會明顯影響脂肪酸之組成。FADs在植物中含量相當豐沛，且由表現分析顯示FAD之mRNAs會過量製造。此外，FAD基因係於各種組織、細胞種類與亞細胞區室中表現，包括色素體與內質網。

[0095]植物之脂肪酸組成，以及在許多應用中，植物製造油類之執行，係由主要脂肪酸組成：油酸、亞油酸、亞麻酸(C18:3)之相對濃度決定。這些脂肪酸濃度主要係由FAD2與FAD3酵素之功能進行調節。植物中，油酸會轉換為亞油

酸與亞麻酸，依據下列流程：



FAD2 基因已於大部分植物與藻類中發現，包括但不侷限於，玉米、大豆、棉花、阿拉伯芥(*Arabidopsis*)、小麥、牧草、水稻、向日葵和芸苔(*Brassica*)，且 FAD2 表現之修飾會導致此生物體中脂肪酸分佈情況改變。此外，含有經修飾 FAD2 基因之植物已經商品化，且 FAD2 基因之破壞，顯示可增進宿主植物所製造油類之營養與功能特性，而不會使該宿主植物有農藝上的損失。舉例而言，油菜和向日葵已商品化為 Nexera[®] 商標(Dow AgroSciences, LLC)，其特徵為具有較高油酸、較低亞油酸與較低亞麻酸(以及較低之飽和性脂肪酸)組成，與野生型油菜與向日葵之含量相較。

[0096]如 Chi, X., et al., ((2011) Genome-wide analysis of fatty acid desaturases in soybean (*Glycine max*). *Plant Molecular Biology Reports* 29, 769-783)所述，其於此併入參考文獻中：黃豆中已知之FAD2功能性基因拷貝體，依系統發育分類於阿拉伯芥之9個亞科中，分別為FAB2、FAD2、FAD3、FAD5、FAD6、FAD7、FAD8、SLD1與DES1。目前已發現有29個去飽和酶基因分佈於至少20種黃豆染色體中之15種中。其基因結構與模體組成，在各亞科之間具有相當大之保留性。依據微陣列數據分析，大部分去飽和酶基因會顯示出不同組織與發育階段之專一性時空分佈。

[0097]植物中之FAD2位點可經修飾及/或破壞，而不會對植物價值產生不良影響，且用於許多目的中，實際上可增加其價值，包括改變FAD2之表現、改變油類含量/比例，及/或將希望之轉基因融入與表現。此外，根據在植物中FAD2位點之普遍性，在許多物種中，FAD2位點可經修飾及/或破壞，而不會惡化至少某些目的，這些物種包括如，但不侷限於：油菜；大豆；玉米；小麥；牧草；芸苔屬(*brassica* sp.)；水稻；蕃茄；大麥；燕麥；高粱；棉花與向日葵，以及真菌和藻類。本發明範例包括FAD2位點，以及使用其作為將外源性核酸融入之執行位點。在範例中，FAD2位點具有數種特徵之至少一者，其已發現使用其作為執行位點係有助益的，包括但不侷限於：在宿主生物體生命週期中，表現量大約一致；以及令人驚訝地，在FAD2位點插入供體DNA，不會誘發宿主之品質或合格度降低。

[0098]在本發明之一些實施例中，至少一FAD2位點(例如，FAD2 2.3位點與FAD2 2.6位點)係作為用於位址專一性融入外源性核酸(例如，一含有編碼感興趣多肽核之苷酸序列之核酸)之標定位址。在特定之實施例中，外源性核酸之融入造成一經修飾位點。舉例而言，外源性核酸之融入可修飾該位點，因而產生經破壞(亦即，去活化)之FAD2基因。

[0099]在一些實施例中，FAD2位點可包含一核苷酸序列，其可專一性地與一核苷酸序列，選自於由SEQ ID NOs: 14至SEQ ID NO: 20組成之族群，之互補物雜交。舉例而

言，FAD2位點可包含一核苷酸序列，選自於由SEQ ID NOs: 14至SEQ ID NO: 20組成之族群。在一些實施例中，FAD2位點可包含一核苷酸序列，其實質上等同於一核苷酸序列，選自於由SEQ ID NOs: 14至SEQ ID NO: 20組成之族群。舉例而言，在一些實施例中，FAD2位點為FAD2同源物(例如，同系或旁系)，其包含一核苷酸序列至少約85%等同於選自於由SEQ ID NOs: 14至SEQ ID NO: 20組成族群之一核苷酸序列。FAD2同源物可包含一核苷酸序列，例如但不侷限於，其至少80%；至少85%；至少約90%；至少約91%；至少約92%；至少約93%；至少約94%；至少約95%；至少約96%；至少約97%；至少約98%；至少約99%；至少約99.5%；99.6%、99.7%、99.8%及/或至少約99.9%等同於選自於由SEQ ID NOs: 14至SEQ ID NO: 20組成族群之一核苷酸序列。此一FAD2同源物可立即辨識出，且可分離自任一完整或部分之基因體，其為此技術領域者可立即由各種生物體中取得。

IV. 於 FAD2 位點將一核酸標定融入

[0100]於FAD2位點將一外源性核酸以位址專一性方式融入，可以此技術領域者所知之技術達成。在一些實施例中，於FAD2位點將一外源性核酸融入，包含將一細胞(例如，經分離之細胞，或組織或生物體內之細胞)與包含該外源性核酸之核酸分子接觸。例如，此一核酸分子可包含一外源性核酸側接之核苷酸序列，該外源性核酸可幫助核酸分子與至少一FAD2位點進行同源性重組。在特定範例中，

該側接有可幫助同源性重組之外源性核酸之核苷酸序列，可與FAD2位點之內源性核苷酸互補。在特定範例中，該側接有可幫助同源性重組之外源性核酸之核苷酸序列，可與預先融入之外源性核苷酸互補。在一些實施例中，複數個外源性核酸可融入一FAD2位點，如以基因堆疊方式。

[0101]在某些實施例中，於 FAD2位點融入一核酸，可加速(例如，催化)宿主細胞之內源性細胞機器，例如且不限於，內源性DNA與內源性重組酶酵素群。在一些實施例中，於 FAD2位點融入一核酸，可被一或多個宿主提供之因子(例如，多胜肽)加速。舉例而言，核酸酶、重組酶，及/或接合酶多胜肽，可藉由將多胜肽與宿主細胞接觸，或藉由於宿主細胞中表現多胜肽而提供(不論是單獨或作為嵌合多胜肽之一部分)。因此，在一些範例中，包含編碼核酸酶、重組酶，及/或接合酶多胜肽之至少一者之核苷酸序列，可引入宿主細胞中，不論是同時或依序地將核酸以位址專一性方式融入FAD2位點上，其中至少一核酸酶、重組酶，及/或接合酶多胜肽係表現自宿主細胞中之該核苷酸序列。

A. DNA-結合性多胜肽

[0102]在一些實施例中，位址專一性融入可藉由使用可辨識並結合至特定核苷酸序列之因子而達成，例如，融入至宿主生物體之基因體中。舉例而言，許多蛋白質包含多胜肽結構域，其可以位址專一性方式辨識並結合至DNA。可由DNA-結合性多胜肽辨識出之DNA序列，可稱之為“標定”序列。可以位址專一性方式辨識並結合至DNA之多胜肽

結構域，一般係折疊正確，且可獨立地以位址專一性方式結合至DNA，即使是表現一多胜肽，而非原始分離出該結構域之蛋白質。同樣地，辨識並結合至DNA-結合性多胜肽之標定序列，一般可被此類多胜肽辨識出並結合，即使當大型DNA結構(例如，染色體)存在時，尤其是當該標定序列所在之位置為已知可使可溶性細胞性蛋白質進入者(例如，一基因)。

[0103]當由自然界存在之蛋白質辨識出之DNA-結合性多胜肽，結合至離散性核苷酸序列或模體時(例如，一致性辨識序列)，技術上便有已知之方法可修飾許多此類DNA-結合性多胜肽，以便釋出不同之核苷酸序列或模體。DNA-結合性多胜肽包括如但不侷限於：鋅指DNA結合結構域；白胺酸拉鏈；UPA DNA結合結構域；GAL4；TAL；LexA；Tet抑制子；LacR；以及類固醇賀爾蒙接受器。

[0104]在一些範例中，DNA-結合性多胜肽為鋅指。各鋅指模體可設計為標定並專一性結合至大範圍DNA位址之任一者。典型Cys₂His₂(以及非典型Cys₃His)鋅指多胜肽，係藉由將 α -螺旋插入至DNA雙股螺旋之主要手套區，而標定結合至DNA。由鋅指辨識DNA為模組化：每一指主要接觸標的物中三個連續鹼基對，該多胜肽內之一些關鍵殘基會產生辨識。藉由包括多個鋅指DNA結合結構域於一標定核酸內切酶中，該標定核酸內切酶之DNA-結合專一性(且任一基因調節子作用產生之專一性亦因此而增加)，可進一步增加。請見，例如，Urnov *et al.* (2005) Nature 435:646-51。

因此，一或多個鋅指DNA-結合性多胜肽可經改造與利用，使得引入至宿主細胞中之標定核酸內切酶，可與該宿主細胞基因體中獨特之DNA序列產生交互作用。

[0105]較佳為，該鋅指蛋白質為非天然產生，而是經改造結合至所選定之標定位址。請見，例如，請見，例如，Beerli et al. (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141；Pabo et al. (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340；Isalan et al. (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660；Segal et al. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637；Choo et al. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416；美國專利號 6,453,242；6,534,261；6,599,692；6,503,717；6,689,558；7,030,215；6,794,136；7,067,317；7,262,054；7,070,934；7,361,635；7,253,273；以及美國專利公開號 2005/0064474；2007/0218528；2005/0267061，所有皆在此併入本案以作為參考資料。

[0106]經改造之鋅指結合結構域 可具有新穎之結合專一性，與天然存在之鋅指蛋白質相較。改造方法包括但不侷限於，合理性設計與各種形式之挑選。合理性設計包括，例如，使用包含三重(或四重)核苷酸序列與各鋅指胺基酸序列之資料庫，其中三重或四重核苷酸序列 之每一者係與鋅指之一或多個胺基酸序列有關，其中該鋅指係結合至特定之三重或四重序列。請見，例如，專利權共有之美國專利號6,453,242與6,534,261，其完整內容於此併入參考文獻中。

[0107]示範性之挑選方法，包括噬菌體展示法與雙重雜交系統，係揭示於美國專利號 5,789,538；5,925,523；



6,007,988 ; 6,013,453 ; 6,410,248 ; 6,140,466 ; 6,200,759 ; 與 6,242,568 ; 以及 WO 98/37186 ; WO 98/53057 ; WO 00/27878 ; WO 01/88197與GB 2,338,237。此外，鋅指結合結構域結合專一性之強化已描述於，例如，專利權共有之WO 02/077227。

[0108]此外，如同這些與其他參考文獻所述，鋅指結構域及/或多重指化之鋅指蛋白質，可使用任一適當之連接子序列連接在一起，該連接子包括例如，5或更多個胺基酸長度之連接子。亦請見，美國專利號6,479,626 ; 6,903,185 ; 與7,153,949，例如具6個或更多胺基酸長度之示範性連接子序列。於此描述之蛋白質可包括該蛋白質各鋅指間之適當連接子之任一組合。

[0109]標定位址之挑選；用於設計與建構融合蛋白質(與編碼其之多核苷酸)之ZFPs與方法，為此技術領域者所知，並詳細描述於美國專利號6,140,0815 ; 789,538 ; 6,453,242 ; 6,534,261 ; 5,925,523 ; 6,007,988 ; 6,013,453 ; 6,200,759 ; WO 95/19431 ; WO 96/06166 ; WO 98/53057 ; WO 98/54311 ; WO 00/27878 ; WO 01/60970 ; WO 01/88197 ; WO 02/099084 ; WO 98/53058 ; WO 98/53059 ; WO 98/53060 ; WO 02/016536與WO 03/016496。

[0110]此外，在這些與其他參考文獻中亦揭示，鋅指結構域及/或多重指化之鋅指蛋白質，可使用任一適當之連接子序列連接在一起，該連接子包括例如，5個或更多個胺基酸長度之連接子。亦請見，美國專利號6,479,626 ;

6,903,185；與7,153,949，例如具6個或更多胺基酸長度之示範性連接子序列。於此描述之蛋白質可包括該蛋白質各鋅指間之適當連接子之任一組合。

[0111]在一些範例中，DNA-結合性多胜肽為來自GAL4之一DNA結合結構域。GAL4為酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)為模組轉錄活化子，但其亦可於許多其他生物體中以轉錄活化子方式操作。請見，例如，Sadowski *et al.* (1988) *Nature* 335:563-4。在此調節系統中，編碼酵母菌中半乳糖代謝路徑中酵素之基因表現，係嚴格地經可得之碳源調節。Johnston (1987) *Microbiol. Rev.* 51:458-76。這些代謝酵素之轉錄控制，係經由正向調節蛋白質GAL4與一17 bp對稱性DNA序列，其與GAL4特異性結合(UAS)，之交互作用而產生。

[0112]原始GAL4係由881個胺基酸殘基組成，具有分子量99 kDa。GAL4包含功能性自主結構域，其結合活性會於體內產生GAL4活性。Ma and Ptashne (1987) *Cell* 48:847-53)；Brent and Ptashne (1985) *Cell* 43(3 Pt 2):729-36。GAL4之N端65個胺基酸包含GAL4 DNA結合結構域。Keegan *et al.* (1986) *Science* 231:699-704；Johnston (1987) *Nature* 328:353-5。序列專一性結合需要二價陽離子存在，其與DNA結合結構域中6個Cys殘基配位。該含配位陽離子之結構域會與17 bp UAS之每一末端上之保留性CCG三重物產生交互作用並辨識出，經由與DNA螺旋之主要手套區直接接觸而作用。Marmorstein *et al.* (1992) *Nature*

356:408-14。促進子附近之蛋白質位置C端轉錄活化結構域之DNA-結合性功能，使得該活化結構域可主導轉錄作用。

[0113]某些實施例中可利用之額外DNA-結合性多胜肽包括，例如且不限於，AVRBS3可誘發基因之結合序列；AVRBS3-可誘發基因或由其改造而得之合成性結合序列之一致性結合序列(例如，UPA DNA結合結構域)；TAL；LexA (請見，例如，Brent & Ptashne (1985), *supra*)；LacR (請見，例如：Labow *et al.* (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-56；Baim *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(12):5072-6)；類固醇賀爾蒙接受器(Elliston *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:11517-121)；Tet抑制子(U.S. Patent 6,271,341)及一突變之Tet抑制子，其可結合至*tet*操作子序列，在四環黴素(Tc)之存在下；NF- κ B之DNA結合結構域；以及調節系統中之各組成，如Wang *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(17):8180-4中所述，其利用GAL4，一種賀爾蒙接受器，與VP16之融合物。

[0114]在某些實施例中，本文所述方法與組成物所使用之一或多個核酸酶之DNA結合結構域，包含天然存在或經設計(非天然存在)之TAL效應子(effector) DNA結合結構域。請見，例如，美國專利公開號20110301073，在此併入本案以作為參考資料。植物致病性黃單胞菌屬(*Xanthomonas*)已知在重要作物植物造成許多疾病。黃單胞菌屬之致病性取決於一種保留性第III型分泌(T3S)系統，其注入25種以上的不同效應子蛋白質進入植物細胞。在這些

被注入的蛋白質中，類轉錄活化因子(TAL)效應子可模擬植物轉錄活化因子並操縱植物轉錄體(請見，Kay et al (2007) Science 318:648-651)。這些蛋白質含有DNA結合結構域與轉錄活化結構域。其中最被良好確認出的TAL效應子為源自辣椒斑點黃單胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*)之AvrBs3 (請見，Bonas et al (1989) Mol Gen Genet 218: 127-136 and WO2010079430)。TAL效應子含有由串聯重複體組成之集中結構域，各重複體含有約34個胺基酸，其對於這些蛋白質的DNA結合專一性相當重要。此外，其含有核酸定位序列與酸性轉錄活化結構域(欲參照，請見，Schornack S, et al (2006) J Plant Physiol 163(3): 256-272)。此外，在植物病原菌馬鈴薯青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)中，馬鈴薯青枯菌生物群1菌株GMI1000與生物群4菌株RS1000的兩個基因brg11與hpx17，被發現同源於黃單胞菌屬AvrBs3家族(請見，Heuer et al (2007) Appl and Envir Micro 73(13): 4379-4384)。這些基因彼此之間的核苷酸序列有98.9%等同度，但不同之處為hpx17重複體結構域刪除了1,575 bp。然而，兩基因產物與黃單胞菌屬AvrBs3家族蛋白質之序列等同度低於40%。請見，例如，美國專利號 8,420,782 與 8,440,431，以及美國專利公開號 20110301073。

[0115]在其他實施例中，核酸酶包含CRISPR/Cas系統。CRISPR(群聚且有規律間隔之短回文重複體)位點，其編碼該系統之RNA部分，以及cas (CRISPR相關聯)位點，其

編碼可組合該CRISPR/Cas核酸酶系統基因序列之蛋白質 (Jansen *et al.*, 2002. *Mol. Microbiol.* 43: 1565-1575 ; Makarova *et al.*, 2002. *Nucleic Acids Res.* 30: 482-496 ; Makarova *et al.*, 2006. *Biol. Direct* 1: 7 ; Haft *et al.*, 2005. *PLoS Comput. Biol.* 1: e60)。微生物宿主CRISPR位點含有CRISPR相關聯(Cas)基因之結合物，及能編程該CRISPR媒介之核酸切割專一性之非編碼RNA片段。

[0116]第II型CRISPR為其中一種最被良好確認之系統，並以四個連續步驟進行標定DNA雙股斷裂。第一，兩個非編碼RNA、crRNA前體陣列與tracrRNA，皆轉錄自CRISPR位點。第二，tracrRNA雜合至該crRNA前體之重複體區段，並媒介crRNA前體之加工，成為含有個別間隔體序列之成熟crRNAs。第三，該成熟之crRNA:tracrRNA複合體經由 crRNA上的間隔體與原間隔體鄰近模體(PAM)，用於標定辨識之額外需求，旁邊之標定DNA上的原間隔體之間的華生-克立克(Watson-Crick)鹼基配對，將Cas9導引至標定DNA。最後，Cas9媒介標定DNA之切割，並於原間隔體內產生雙股斷裂。CRISPR/Cas系統之活性包含三步驟：(i)以一種稱為‘改編’的方法將外來DNA序列插入CRISPR陣列以防止未來受攻擊，(ii)相關蛋白質之表現，以及該陣列之表現與加工，以及(iii)該外來核酸之RNA媒介干擾作用。因此，在細菌細胞中，幾個所謂的‘Cas’蛋白質皆涉及CRISPR/Cas系統的自然功能，並於例如外來DNA之插入等功能中扮演一些角色。

[0117]在某些實施例中，Cas蛋白質可為天然發生之Cas蛋白質之"功能性衍生物"。原始序列多胜肽之"功能性衍生物"為一化合物，其具有與原始序列多胜肽等效之生物性質。"功能性衍生物"包括但不侷限於，原始序列之片段，與原始序列多胜肽與其片段之衍生物，其中其具有與相對應原始序列多胜肽相同之生物活性。生物活性於此係指該功能性衍生物將DNA受質水解為片段之能力。術語"衍生物"包含多胜肽、共價性修飾物與其融合物之二種胺基酸序列變異物。Cas多胜肽或其片段之適當衍生物包括但不侷限於功能性衍生物之突變物、融合物、共價性修飾物。Cas蛋白質，包括Cas蛋白質或其片段，以及Cas蛋白質或其片段之衍生物，可得自一細胞，或以化學合成方式，或此二方法之結合而得。該細胞可為天然製造Cas蛋白質之細胞，或是天然製造Cas蛋白質並經基因工程改造，而製造具較高表現量之內源性Cas蛋白質，或由外源性引入之核酸製造Cas蛋白質，其中該核酸編碼與內源性Cas相同或不同之Cas之細胞。在某些情況下，該細胞並不會天然製造Cas蛋白質，而是經基因工程改造而製造出Cas蛋白質。

[0118]在特定之實施例中，DNA-結合多胜肽係專一性地辨識並結合至標定核苷酸序列，其包含於宿主生物體之基因體核酸內。在某些範例中發現標定核苷酸序列可具有任何數目之離散情況。該標定核苷酸序列在該生物體之基因體中是相當稀有的(例如，少於約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、約2或 約1個標定序列之拷貝體可存

在於基因體中)。舉例而言，該標定核苷酸序列可位於該生物體之基因體中之一獨特位址。標定核苷酸序列可，例如且不限於，在整個基因體中互相隨機分散；位於基因體中之不同連鎖群中；位於相同連鎖群中；位於不同基因體中；位於相同基因體上；位於可在類似條件下，於該生物體中表現之基因體位址(例如，在相同或實質上功能相等之調節因子控制條件下)；以及位於接近基因體中另一序列處(例如，標定序列可包含於融入之核酸中，作為該基因體位點之多連體)。

B. 標定核酸內切酶

[0119]在特定之實施例中，可專一性辨識並結合至標定核苷酸序列之DNA-結合性多胜肽，可包含於一嵌合多胜肽中，以使該嵌合多胜肽可專一性結合至該標定序列。在範例中，此一嵌合多胜肽可包含例如且不限於，核酸酶、重組酶，及/或接合酶多胜肽，這些多胜肽係如上所述。包含一DNA-結合性多胜肽，以及核酸酶、重組酶，及/或接合酶多胜肽之嵌合多胜肽，亦可包含其他功能性多胜肽模體，及/或結構域，例如但不侷限於：位於嵌合蛋白質中各功能性多胜肽間之間隔子序列；引導胜肽；將融合蛋白質標定至一胞器(例如，細胞核)之胜肽；被一細胞性酵素切割之多胜肽；胜肽標籤(例如，Myc, His, etc.)；以及其他不會干擾該嵌合多胜肽功能之胺基酸序列。

[0120]嵌合多胜肽中之功能性多胜肽(例如，DNA-結合性多胜肽與核酸酶多胜肽)可操作地聯結在一起。在一些實

施例中，嵌合多胜肽之功能性多胜肽可藉由於讀框中表現編碼至少該互相接合之功能性多胜肽，以產生編碼嵌合蛋白質之嵌合基因之單一多核苷酸，而操作地聯結。在另一實施例中，該嵌合多胜肽之功能性多胜肽可以其他方式而操作地聯結，例如藉由將單獨表現之多胜肽進行橋聯。

[0121]在一些實施例中，可專一性辨識並結合至標定核苷酸序列之DNA-結合性多胜肽，可包含於一天然分離出之蛋白質(或其突變物)中，其中該天然分離出之蛋白質或其突變物，亦包含一核酸酶多胜肽(且亦可包含重組酶及/或接合酶多胜肽)。此分離出之蛋白質範例包括TALENs、重組酶(例如，Cre、Hin、Tre與FLP重組酶)、RNA導引性CRISPR-Cas9，以及巨核酸酶。

[0122]使用於此，術語“標定核酸內切酶”係指天然或經改造且分離出之蛋白質與其突變物，其包含一DNA-結合性多胜肽與一核酸酶多胜肽，以及包含DNA-結合性多胜肽與核酸酶之嵌合多胜肽。在某些實施例中，可使用任一種標定方式標定一核酸內切酶，其包含可專一性辨識並結合至*FAD2*位點(例如，不論是由於標定序列包含於該位點之原始序列，或由於該標定序列係引入該位點中，例如，藉由重組方式)內之標定核苷酸序列之DNA-結合性多胜肽。

[0123]可用於本發明特定實施例之某些嵌合多胜肽範例包括，但不侷限於下列多胜肽之組合：鋅指DNA-結合性多胜肽；FokI核酸酶多胜肽；TALE結構域；白胺酸拉鏈；轉錄因子DNA-結合性模體；以及DNA辨識及/或切割結構

域，其分離自，例如且不限於，TALEN、重組酶(例如，Cre、Hin、RecA、Tre與FLP重組酶)、RNA導引性CRISPR-Cas9、巨核酸酶；以及其他技術上已知者。特定範例包括位址專一性DNA結合多胜肽與核酸酶多胜肽之嵌合蛋白質。嵌合多胜肽可以此技術領域者所知之任何方法改造，以改變該嵌合多胜肽所包含之DNA-結合性多胜肽之辨識序列，以標定該嵌合多胜肽至一特別興趣之核苷酸序列上。

[0124]在某些實施例中，該嵌合多胜肽包含一DNA結合結構域(例如，鋅指、TAL-效應子結構域等)，以及核酸酶(切割)結構域。該切割結構域可異源於該DNA結合結構域，例如鋅指DNA結合結構域與一來自於核酸酶之切割結構域，或TALEN之DNA結合結構域與一切割結構域，或巨核酸酶DNA結合結構域與來自不同核酸酶之切割結構域。異源性切割結構域可得自任何核酸內切酶或核酸外切酶。由其衍生切割結構域之核酸內切酶範例包括但不侷限於，限制性核酸內切酶，以及歸巢核酸內切酶。請見，例如，2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Beverly, MA; and Belfort *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388。可切割DNA之其他酵素為已知(例如，S1核酸酶；綠豆核酸酶；胰DNase I；微球菌核酸酶；酵母HO核酸內切酶；亦請參照Linn *et al.* (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993)。這些酵素(或其功能性片段)之一或多者，可使用作為切割結構域與切割半結構域之來源。

[0125]同樣地，切割半結構域可衍生自任一核酸酶或其

一部份，如上所述，其切割活性需要二聚體化。一般而言，若融合蛋白質包含一切割半結構域，則需要二個融合蛋白質。或者，可使用包含二切割半結構域之單一蛋白質。該二切割半結構域可衍生自同一核酸內切酶(或其功能性片段)，或每一切割半結構域可衍生自不同之核酸內切酶(或其功能性片段)。此外，二融合蛋白質之標定位址較佳可經部署，互相定位，使得該二融合蛋白質可結合至其各自之標定位址，便可以使該切割半結構域形成功能性切割結構域之空間定位，例如，二聚體化，放入切割半結構域。因此，在某些實施例中，接近標定位址邊緣處係由5-8個核苷酸或15-18個核苷酸分隔。然而，任一整數之核苷酸或核苷酸對，可介入二標定位址之間(例如，2至50個核苷酸對或更多)。一般而言，切割位址位於各標定位址之間。

[0126]限制性核酸內切酶(限制酵素)存在於許多物種中，並可序列-專一性地結合至DNA(於辨識位址)，並於結合位址或附近切割DNA，例如，一或多個外源性序列(供體/轉基因)係融入該結合(標定)位址或附近。某些限制酶(例如，第IIS型)係於辨識位址移除處切割DNA，並可分離結合與切割結構域。舉例而言，第IIS型酵素*Fok I*會催化DNA雙股切割，於一股上辨識位址起算第9個核苷酸處，以及另一股之辨識位址起算第13個核苷酸處進行切割。請見，例如，美國專利號5,356,802；5,436,150與5,487,994；以及Li *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279；Li *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768；Kim *et al.*

(1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887 ; Kim *et al.* (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31,978-31,982。因此，在一實施例中，該融合蛋白質包含至少一第IIS型限制酶切割結構域(或切割半結構域)，以及一或多個鋅指結合結構域，其可經或未改造。

[0127]第IIS型限制酶，其切割結構域可分離自該結合結構域，範例為*Fok I*。此特定酵素在二聚體形式時具活性。Bitinaite *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10,570-10,575。因此，針對本發明揭示之目的，用於本發明融合蛋白質之*Fok I*酵素之一部分可為一切割半結構域。因此，使用鋅指-*Fok I*融合物進行細胞內序列之標定雙股切割，及/或標定置換，二融合蛋白質，每一者皆包含一*Fok I*切割半結構域，可用於組成一催化性活性切割結構域。或者，可使用含有一DNA結合結構域與二*Fok I*切割半結構域之單一多胜肽分子。

[0128]一切割結構域或切割半結構域可為可保留切割活性，或維持多體化(例如，二聚體化)以形成功能性切割結構域能力之蛋白質之任一部份。

[0129]示範性第IIS型限制酶係描述於美國專利公開號20070134796，在此併入本案以作為參考資料。其他限制酶亦包含可分離之結合與切割結構域，這些皆包含於本發明揭示中。請見，例如，Roberts *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:418-420。

[0130]在某些實施例中，該切割結構域包含一或多個經

改造之切割半結構域(亦稱之為結構域突變物二聚體化),其可預防同質二聚體化或使其最小化,例如,描述於美國專利公開號20050064474;20060188987與20080131962者,在此併入本案以作為參考資料。*Fok* I之位置446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537與538之胺基酸殘基,皆為影響*Fok* I切割半結構域二聚體化之目標。

[0131]示範性經改造*Fok* I切割半結構域,其必須形成異質二聚體,包括一對切割半結構域,其中第一割半結構域包括突變,位於*Fok* I胺基酸殘基位置490與538,而第二切割半結構域包括突變,位於胺基酸殘基位置486與499。

[0132]因此,在一實施例中,位置490之突變係以Lys(K)置換Glu(E);位置538之突變係將Lys(K)置換為Iso (I);位置486之突變係將Glu(E)置換為Gln(Q);以及位置499之突變係將Lys(K)置換為Iso(I)。具體而言,此述之經改造切割半結構域,係藉由將一切割半結構域之位置90(E→K)與538(I→K)進行突變,而產生名為“E490K:I538K”之切割半結構域,而將另一切割半結構域之位置486(Q→E)與499(I→L)進行突變,而產生名為“Q486E:I499L”之切割半結構域。此述之經改造切割半結構域必須形成異質二聚體突變物,其中可降低或消除異常之切割。請見,例如,美國專利公開號2008/0131962,在此併入本案以作為參考資料。

[0133]在某些實施例中,該經改造之切割半結構域包含位置486、499與496(參考野生型 *Fok*I之編號)之突變,例如

將位置486之野生型Gln(Q)殘基置換為Glu(E)殘基，位置499之野生型Iso(I)殘基置換為Leu(L)殘基，以及位置496之野生型Asn(N)殘基置換為Asp(D)或Glu(E)殘基(亦分別稱之為“ELD”與“ELE”結構域)。在其他實施例中，該經改造之切割半結構域包含位置490、538與537(參考野生型FokI之編號)之突變，例如將位置490之野生型Glu(E)殘基置換為Lys(K)殘基，位置538之野生型Iso(I)殘基置換為Lys(K)殘基，以及位置537之野生型His(H)殘基置換為Lys(K)殘基或Arg(R)殘基(亦分別稱之為“KKK”與“KKR”結構域)。在其他實施例中，該經改造之切割半結構域包含位置490與537(參考野生型FokI之編號)之突變，例如將位置490之野生型Glu(E)殘基置換為Lys(K)殘基，位置537之野生型His(H)殘基置換為Lys(K)殘基或Arg(R)殘基(亦分別稱之為“KIK”與“KIR”結構域)。(請見美國專利公開號 20110201055)。此述之經改造切割半結構域可使用任何適當之方法製備，例如，藉由定點突變野生型切割半結構域 (*Fok I*)，如描述於美國專利公開號 20050064474；20080131962；與20110201055者。

[0134]或者，核酸酶可於體內組合，於該核酸標定位址，使用所謂的“裂解酶”技術(請見如美國專利公開號20090068164)。此裂解酶之各組成可表現，不論是於分隔之表現建構物上表現，或是與一開放讀碼區聯結，其中各組成係由，例如，藉由自行切割2A胜肽或IRES序列分隔。組成可為單獨之鋅指結合結構域，或巨核酸酶核酸結構域

之結合結構域。

C. 鋅指核酸酶

[0135]在特定實施例中，嵌合多胜肽為客製化鋅指核酸酶(ZFN)，其可設計為將經標定位址專一性雙股DNA斷裂物，傳送至待融入之外源性核酸，或供體DNA(請見專利權共有之美國專利公開號20100257638，在此併入本案以作為參考資料)。ZFNs為含有含有來自限制性核酸內切酶之非專一性切割結構域(例如，*FokI*)，以及一鋅指DNA結合結構域多胜肽之嵌合多胜肽。請見，例如，Huang *et al.* (1996) *J. Protein Chem.* 15:481-9；Kim *et al.* (1997a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3616-20；Kim *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1156-60；Kim *et al.* (1994) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-7；Kim *et al.* (1997b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12875-9；Kim *et al.* (1997c) *Gene* 203:43-9；Kim *et al.* (1998) *Biol. Chem.* 379:489-95；Nahon and Raveh (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:1233-9；Smith *et al.* (1999) *Nucleic Acids Res.* 27:674-81。在一些實施例中，該ZFNs含有非典型鋅指DNA結合結構域(請見專利權共有之美國專利公開號20080182332，在此併入本案以作為參考資料)。*FokI*限制性核酸內切酶必須經過核酸酶結構域二聚體化，以切割DNA，並引入雙股斷裂。之後，含有此核酸內切酶之核酸酶結構域之ZFNs，亦需要該核酸酶結構域進行二聚體化，以切割目標DNA。Mani *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334:1191-7；Smith *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res.*

28:3361-9。ZFN之二聚體化可由二鄰近、相反方向之DNA-結合位址加速進行。

[0136] ZFN系統之彈性與專一性，係提供先前已知重組酶-媒介之基因編輯策略所無法達到之控制。如一範例所示，ZFNs可輕易地經改造，例如，以辨識專一性核酸序列。Wu *et al.* (2007) Cell. Mol. Life Sci. 64:2933-44 (請見，美國專利公開號20090205083、20110189775、20110167521與20100199389，在此併入本案以作為參考資料)。鋅指辨識殘基密碼子之隨機化，可允許新的指區域之挑選進行，該指區域對於任意選擇之DNA序列具有高度親和力。此外，鋅指為天然DNA-結合性分子，經改造鋅指已顯示出會作用於其設計標定之活細胞。因此，以鋅指為主之核酸酶為可標定至具專一性但任意之辨識位址。

[0137] 在特定範例中，外源性核酸位址專一性地融入宿主之至少一FAD2執行位點，包含將一ZFN引入宿主細胞，其中該ZFN可辨識並結合至一標定核苷酸序列，其中該標定核苷酸序列係包含於該宿主之至少一FAD2位點中。在某些實施例中，該標定核苷酸序列並不包含於該宿主之基因體之任一其他位置中，而是位於至少一FAD2位點中。舉例而言，ZFN之DNA-結合性多胜肽可經改造，以辨識並結合至一標定核苷酸序列上，其經辨識位於至少一FAD2位點中(例如，藉由定序該FAD2位點)。將外源性核酸位址專一性地融入宿主之至少一FAD2執行位點之方法，包含將一ZFN引入宿主細胞，亦可包含將一外源性核酸引入該細胞，其

中該外源性核酸與包含至少一*FAD2*位點之宿主核酸進行重組，係由ZFN位址專一性地辨識並結合至標定序列(以及之後切割包含該*FAD2*位點之核酸)而加速。

V. 於 *FAD2* 位點融入外源性核酸

[0138]本發明實施例可包括一或多個核酸，選自於由：位址專一性融入於*FAD2*位點上之外源性核酸，例如且不限於，PTU、ELP、ETIP 或ORF；包含編碼標定核酸內切酶之核苷酸序列之核酸；以及包含前述二核酸之至少一者或二者之載體。因此，某些實施例中所使用之特定核酸，包括編碼一多胜肽、結構性核苷酸序列，及/或DNA-結合性多胜肽辨識與結合位址之核苷酸序列。

A. 用於位址專一性融入之外源性核酸分子

[0139]如上所述，係提供一種外源性序列(亦稱之為“供體序列”或“供體”或“轉基因”)插入法，以表現一多胜肽、校正突變物基因，或增加野生型基因之表現。顯而易見的是，該供體序列一般與其所置入之基因體序列並不相同。供體序列可含有非-同源序列，其側接同源物之二區域，以使感興趣之位置上有有效之HDR。此外，該供體序列可包含一含有與細胞染色體中，該感興趣區域異源之序列之載體分子。供體分子可含有數個、不連續之細胞染色體同源性區域。舉例而言，用於標定插入感興趣區域中不常出現之序列，該序列可存在於供體核酸分子中，並側接有與該感興趣區域之序列同源之區域。

[0140]該供體多核苷酸可為DNA或RNA、單股或雙

股，且可以直線或圓形形式引入細胞中。請見，例如，美國專利公開號20100047805、20110281361、20110207221與美國專利申請號13/889,162。若以直線形式引入，該供體序列之末端可經保護(例如，不被核酸外切酶降解)，使用技術上已知之方法。舉例而言，一或多個二去氧核苷酸殘基係加至直線形分子上，及/或自我互補之寡核苷酸之3'端，而與一端或二端接合。請見，例如，Chang *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4959-4963；Nehls *et al.* (1996) *Science* 272:886-889。保護外源性多核苷酸不被降解之其他方法包括但不侷限於，加入末端胺基，並使用經修飾之核苷酸間聯結，例如，硫代磷酸酯、磷醯胺酯，以及O-甲基核糖或去氧核糖殘基。

[0141] 多核苷酸可以載體分子之一部分引入細胞，該載體具有額外之序列，例如，複製起始點、促進子，以及編碼具抗生素抗性之基因。此外，供體多核苷酸可以裸體核酸形式、與一試劑如微脂體或帕洛沙姆(poloxamer)複合之核酸形式引入，或可以病毒(例如，腺病毒、AAV、疱疹病毒、逆轉錄病毒、慢病毒，以及整合酶缺乏性慢病毒(IDLV))傳送。

[0142] 供體一般係經融入，使其表現可由位於融入位址之內源性促進子驅動，亦即該促進子可驅動供體融入之內源性基因(例如，*FAD2*)之表現。然而，顯而易見的是，該供體可包含一促進子及/或增強子，例如一組成性促進子，或可誘發或組織專一性促進子。

[0143]此外，雖然並非表現所需要，外源性序列亦可包括轉錄或轉譯調節序列，例如，促進子、增強子、絕緣子 (insulators)、內部核糖進入位址、編碼2A胜肽及/或聚腺苷酸化訊號之序列。

[0144]可以位址專一性融入至少一*FAD2*位點，以修飾*FAD2*位點之外源性核酸，例如且不限於，包含編碼感興趣多胜肽之核苷酸序列之核酸；包含一農藝性狀基因之核酸；包含編碼RNAi分子之核苷酸序列之核酸；或可破壞*FAD2*基因之核酸。

[0145]在一些實施例中，外源性核酸係於*FAD2*位點融入，以修飾*FAD2*位點，其中該核酸包含一農藝性狀基因，或編碼感興趣多胜肽之核苷酸序列，使得該農藝性狀基因或核苷酸序列可於宿主中，自*FAD2*位點開始表現。在一些範例中，該感興趣之多胜肽(例如，外來蛋白質)係表現自一編碼感興趣多胜肽之核苷酸序列，具工業產量。在這些範例中，該感興趣之多胜肽可得自宿主細胞、組織或生物質。在一些實施例中，該宿主為植物，且用於工業上量產該感興趣多胜肽之植物材料，可為植物、植物部分、植物組織或植物細胞。在一些範例中，該植物部分可為植物種子。由植物生物質中萃取出蛋白質，可以技術上已知之方法達成，討論於如Heney and Orr (1981) Anal. Biochem. 114:92-6 中。

[0146]同樣地，農藝性狀基因可表現於經轉型植物細胞、植物，及/或其後代中。舉例而言，一植物可經基因改

造，使用特定實施例中之方法，表現各種來自至少一*FAD2*位點上感興趣農藝性狀之表現型。

[0147] 在一些實施例中，包含一農藝性狀基因，或編碼感興趣多胜肽之核苷酸序列之核酸，可包括如但不侷限於：對於害蟲或疾病可產生抗性之基因(請見，例如，Jones *et al.* (1994) *Science* 266:789 (選殖蕃茄Cf-9基因以抵抗枝孢葉黴菌(*Cladosporium fulvum*))；Martin *et al.* (1993) *Science* 262:1432；Mindrinos *et al.* (1994) *Cell* 78:1089 (*RSP2*基因，抵抗丁香假單胞菌(*Pseudomonas syringae*))；PCT國際專利公開號WO 96/30517(抵抗大豆胞囊線蟲病)；PCT國際專利公開號WO 93/19181)；編碼蘇雲金芽孢桿菌(*Bacillus thuringiensis*)之一蛋白質之基因或其衍生物，或以其為模組之合成性多胜肽(請見，例如，Geiser *et al.* (1986) *Gene* 48:109 (Bt δ -內毒素基因之選殖與核苷酸序列；此外，編碼 δ -內毒素基因之DNA分子可購自American Type Culture Collection (Manassas, VA)，例如，ATCC Accession Nos. 40098；67136；31995；與31998))；編碼凝集素之基因(請見，例如，Van Damme *et al.* (1994) *Plant Molec. Biol.* 24:25 (數個君子蘭(*Clivia miniata*)甘露醣-結合性凝集素基因之核苷酸序列))；編碼維生素-結合蛋白之基因如抗生物素蛋白質(avidin)(請見PCT國際專利公開號US93/06487 (使用抗生物素蛋白質與抗生物素蛋白質同源物，作為殺幼蟲劑對抗昆蟲害蟲))；編碼酵素抑制劑之基因，例如，蛋白酶、蛋白酶抑制劑，或澱粉酶抑制劑(請見，例如，Abe *et al.*

(1987) *J. Biol. Chem.* 262:16793 (稻米半胱胺酸蛋白酶抑制劑之核苷酸序列)；Huub *et al.* (1993) *Plant Molec. Biol.* 21:985 (編碼菸草蛋白酶抑制劑I之cDNA之核苷酸序列)；Sumitani *et al.* (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1243 (硝孢鏈黴菌(*Streptomyces nitrosporeus*) α -澱粉酶抑制劑之核苷酸序列)，以及美國專利號5,494,813)；編碼昆蟲-專一性賀爾蒙或費落蒙之基因，例如，保幼激素或蛻皮激素，或其變異物、以其為基礎之模擬物，或其拮抗劑或協同劑(請見，例如，Hammock *et al.* (1990) *Nature* 344:458 (經複製之保幼激素酯酶，其為一種保幼激素之失活劑，於桿狀病毒中之表現))；編碼昆蟲-專一性胜肽或神經胜肽之基因，在其表現時，會破壞受影響害蟲之生理現象(請見，例如，Regan (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9 (複製物之表現會產生編碼昆蟲利尿激素受體之DNA)；Pratt *et al.* (1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163:1243 (太平洋折翅蠅(*Diploptera punctata*)之異史他汀(allostatin))；以及美國專利號5,266,317 (編碼昆蟲-特異性、麻痺性神經毒素之基因))；編碼由蛇、黃蜂，或其他生物體天然產生之昆蟲-特異性蛇毒之基因(請見，例如，Pang *et al.* (1992) *Gene* 116:165 (於植物中異源性表現編碼蠍子昆蟲毒素胜肽之基因))；編碼負責單萜、倍半萜類、類固醇、異羧脂酸、苯丙烷類衍生物或其他具有殺蟲劑活性之分子過度累積之酵素之基因；編碼涉及生物活性分子之修飾，包括轉譯後修飾之酵素，例如，醣類分解酵素、蛋白質分解酵素、脂肪分解酵素、核酸酶、環化

酶、胺基轉移酶、酯酶、水解酶、去磷酸酶、激酶、磷酸化酶、聚合酶、彈性蛋白酶、幾丁質酶，或葡聚糖酶，不論是天然或合成，之基因(請見，例如，PCT國際專利公開號WO 93/02197 (胼胝質酶(callase)基因之核苷酸序列)；此外，含有幾丁質酶-編碼序列之DNA分子，例如，可獲得自ATCC，Accession Nos. 39637與67152；Kramer *et al.* (1993) *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23:691 (編碼煙草天蛾幾丁質酶之cDNA核苷酸序列)；以及Kawalleck *et al.* (1993) *Plant Molec. Biol.* 21:673 (荷蘭芹ubi4-2聚泛素基因之核苷酸序列))；編碼會刺激訊息傳遞之分子之基因(請見，例如，Botella *et al.* (1994) *Plant Molec. Biol.* 24:757 (綠豆鈣調蛋白cDNA複製物之核苷酸序列)；以及Griess *et al.* (1994) *Plant Physiol.* 104:1467 (玉米鈣調蛋白cDNA複製物之核苷酸序列))；編碼疏水力矩胜肽之基因(請見，例如，PCT國際專利公開案號WO 95/16776 (抗菌肽(Tachyplesin)之胜肽衍生物，其可抑制真菌植物致病原)；以及PCT國際專利公開案號WO 95/18855 (合成之抗微生物胜肽，可提供疾病抗性))；編碼細胞膜穿透酶，一種通道形成物或通道阻斷物，之基因(請見，例如，Jaynes *et al.* (1993) *Plant Sci* 89:43 (異源性表現殺菌肽- β 溶胞肽類似物，以使基因轉形之煙草植物可抵抗青枯假單胞菌(*Pseudomonas solanacearum*))；編碼病毒-侵入蛋白質或由其衍生之複合毒素之基因(請見，例如，Beachy *et al.* (1990) *Ann. rev. Phytopathol.* 28:451)；編碼昆蟲專一性抗體或由其衍生之免疫毒素之基因(請見，例

如，Taylor *et al.*, Abstract #497, Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions (Edinburgh, Scotland) (1994) (在基因轉殖煙草中，經由產生單鏈抗體片段而使酵素失活))；編碼具病毒-專一性之抗體之基因(請見，例如，Tavladoraki *et al.* (1993) Nature 366:469 (表現重組性抗體基因之基因轉殖植物，可經保護避免病毒攻擊))；編碼由病原體或寄生蟲天然製造之發育阻滯蛋白質之基因(請見，例如，Lamb *et al.* (1992) Bio/Technology 10:1436 (真菌內 α -1,4-D-聚半乳糖醛酸酶，會促進真菌定植與植物養分釋放，藉由溶解植物細胞壁之同- α -1,4-D-半乳糖醛酸酶而達成)；Toubart *et al.* (1992) Plant J. 2:367 (選殖與鑑定編碼豆類內聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白之基因))；編碼由植物天然製造之發育阻滯蛋白質之基因(請見，例如，Logemann *et al.* (1992) Bio/Technology 10:305 (表現荷蘭芹核糖體-失活基因之基因轉殖植物，對於真菌疾病之抗性增加))。

[0148]在一些實施例中，包含編碼有感興趣多胜肽之農藝上基因或核苷酸序列之核酸可亦，及/或選擇性地包括，例如且不限於：提供具除草劑抗性之基因，如抑制生長點或分生組織之除草劑，例如，咪唑啉酮(imidazolinone)或磺醯基脲(sulfonylurea)(此類別之示範性基因可編碼突變體ALS與AHAS酵素，分別如Lee *et al.* (1988) EMBO J. 7:1241，以及Miki *et al.* (1990) Theor. Appl. Genet. 80:449所描述)；草甘膦(glyphosate)抗性，如突變體5-烯醇丙酮基莽草酸-3-磷酸鹽合成酶(EPSPs)基因所提供(經由導入重組型



核酸及/或原始EPSPs基因之各種形式體內突變(包括但不限於CP4、DMMG與DGT-28)；個別的*aroA*基因與草甘膦乙醯轉移酶(GAT)基因)；其他膦醯基化合物，如源自鏈黴菌菌種，包括吸水鏈黴菌(*Streptomyces hygroscopicus*)與從鏈黴菌(*Streptomyces viridichromogenes*)，之固殺草(glufosinate)草銨膦乙醯轉移酶(PAT)基因；以及吡啶氧基或苯氧基丙酸與環己酮(ACCase抑制劑編碼基因)。請見，例如，美國專利號4,940,835與6,248,876(可提供植物草甘膦抗性之各種形式EPSPs核苷酸序列)。可由ATCC 登錄號39256取得編碼突變體*aroA*基因之DNA分子。亦請見，美國專利號4,769,061(突變體*aroA*基因之核苷酸序列)。歐洲專利申請號0 333 033與美國專利號4,975,374揭示了麩醯胺酸合成酶基因之核苷酸序列，其可提供除草劑如L-草銨膦之抗性。歐洲專利申請號0 242 246與DeGreef *et al.* (1989) *Bio/Technology* 7:61提供了示範性PAT基因之核苷酸序列(表現嵌合條帶基因與編碼PAT活性之轉基因植物的生產)。提供具苯氧基丙酸與環己酮，如西殺草(sethoxydim)與合氯氟(haloxyfop)，抗性之基因之示範例包括描述於Marshall *et al.* (1992) *Theor. Appl. Genet.* 83:435之Acc1-S1、Acc1-S2與Acc1-S3基因。可提供草甘膦抗性之GAT基因係揭示於，例如，WO 2005012515。可提供2,4-D、苯氧基丙酸與吡啶基氧基生長素(auxin)除草劑抗性之基因係揭示於，例如，WO 2005107437與WO 2007053482。

[0149] 包含農藝基因或編碼感興趣多肽之核苷酸序

列之核酸亦可包括，例如但不侷限於：可抵抗會抑制光合作用之除草劑如三吡類 (psbA與gs+ 基因)，以及苯甲腈(腈合成酶基因)之基因。請見，例如，Przibila *et al.* (1991) *Plant Cell* 3:169 (以編碼突變物 psb基因之質體轉型單胞藻 (*Chlamydomonas*))。腈合成酶基因之核苷酸序列係揭示於美國專利4,810,648,，而含有這些基因之DNA分子可得自 ATCC Accession Nos. 53435; 67441; 與67442。亦請見Hayes *et al.* (1992) *Biochem. J.* 285:173 (選殖與表現編碼穀胱甘肽-S-轉移酶之DNA)。

[0150] 在一些實施例中，包含農藝基因或編碼感興趣多肽之核苷酸序列之核酸亦可及/或額外包括，可提供或貢獻具增加價值之性狀之基因，例如但不侷限於：經修飾脂肪酸之代謝，例如，以硬脂醯基-ACP去飽和酶之反義基因轉殖一植物，以增加植物之硬脂酸含量(請見，例如，Knultzon *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:2624)；降低植酸含量，例如，引入植酸酶-合成基因，可增加植酸之降解，增加更多自由磷酸鹽至轉型植物中(請見，例如，Van Hartingsveldt *et al.* (1993) *Gene* 127:87 (黑黴菌(*Aspergillus nige*)植酸酶基因之核苷酸序列)；基因可引入以降低玉米中之植酸含量，例如，此可藉由選殖，之後再次引入與具低含量植酸特徵之玉米突變物之單一對偶基因相關之DNA而達成(請見Raboy *et al.* (1990) *Maydica* 35:383))；受到經編碼改變澱粉分支狀況之酵素之基因轉殖植物作用，而修飾之碳水化合物組成物(請見，例如，Shiroza

et al. (1988) *J. Bacteriol.* 170:810 (鏈球菌(*Streptococcus*)突變物果糖基轉移酶基因之核苷酸序列); Steinmetz *et al.* (1985) *Mol. Gen. Genet.* 20:220 (果聚糖蔗糖酶(levansucrase)基因); Pen *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10:292 (α -澱粉酶); Elliot *et al.* (1993) *Plant Molec. Biol.* 21:515 (蕃茄轉化酶基因之核苷酸序列); Sogaard *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:22480 (大麥 α -澱粉酶基因); 以及 Fisher *et al.* (1993) *Plant Physiol.* 102:1045 (玉米胚乳澱粉分支酵素II))。

[0151] 在一些實施例中，外源性核酸係於 *FAD2* 位點融入，以修飾 *FAD2* 位點，其中該核酸包含一 PTU 或 ELP，例如，接著於 PTU 或 ELP 位址專一性融入第二外源性核酸是有助益的。亦請見，美國專利申請號 13/889,162。

[0152] 標定核酸內切酶-媒介之感興趣核酸分子融入於植物基因體中，係經由標定融入，需要傳送標定核酸內切酶或標定核酸內切酶-編碼核酸分子，之後於宿主中表現功能性標定核酸內切酶蛋白質。外源性核酸較佳亦同時存在於宿主細胞中，當標定核酸內切酶傳送至該處或表現時，使得功能性標定核酸內切酶蛋白質於至少一 *FAD2* 位點之標定位址上誘發雙股斷裂，之後修復，例如經由外源性核酸之同源性-驅動融入至該位點。此技術領域者可想像的到，表現功能性標定核酸內切酶蛋白質，可藉由數種方法達成：包括但不侷限於，基因轉殖入一種標定核酸內切酶-編碼建構物，並短暫表現標定核酸內切酶-編碼建構物。在此二案例中，功能性標定核酸內切酶蛋白質之表現，以及

外源性核酸傳送至宿主細胞，可同時達成，以驅動經標定融入於*FAD2*位點。

[0153]由利用ZFNs作為標定核酸內切酶之特定範例所獲得之優點為，需要嵌合鋅指核酸酶之切割結構域之雙聚體化，而提供較高之序列專一性，以及切割專一性。由於每一組三指區可結合9個連續鹼基對，該二嵌合核酸酶便可有效地主導18 bp標定，若每一鋅指結構域具有完美的專一性。此長度之任一序列可預測在單一基因體(假設約 10^9 bp)中具獨特性。Bibikova *et al.* (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21(1):289-97；Wu *et al.* (2007), 同上。此外，額外的指區可提供增強之專一性，Beerli *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14628-33；Kim and Pabo (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2812-7；Liu *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5525-30，使得每一DNA結合結構域之鋅指數目可增加，以提供更高之專一性。舉例而言，專一性可藉由使用4-、5-、6-或更多的指區ZFNs對，其辨識24 bp 序列而增進。Urnov *et al.* (2005) *Nature* 435:646-51。因此，可使用ZFNs，使得引入至宿主植物基因體之辨識序列在基因體中是獨特的。

B. 包含編碼標定核酸內切酶之核苷酸序列之核酸分子

[0154]在一些實施例中，編碼標定核酸內切酶之核苷酸序列，可由編碼包含於標定核酸內切酶內之多胜肽之原始核苷酸序列，進行人工改造(例如，接合)而進行。舉例而言，編碼包含一DNA-結合性多胜肽之蛋白質之基因之核苷酸序

列，預期可辨識對應於該DNA-結合性多胜肽之基因之核苷酸序列，且該核苷酸序列可使用作為編碼包含DNA-結合性多胜肽之標定核酸內切酶之核苷酸序列之一元件(element)。或者，標定核酸內切酶之胺基酸序列可用於推衍一編碼標定核酸內切酶之核苷酸序列，例如，依據該編碼密碼子之退化演繹。

[0155]在包含編碼標定核酸內切酶之核苷酸序列之核酸分子範例中，該編碼核酸酶多胜肽之第一多核苷酸序列之最後一個密碼子，與編碼DNA-結合性多胜肽之第二多核苷酸序列之第一個密碼子，可以任何數目之如不具編碼內含子或“停止”訊號之核苷酸三重物分隔。同樣地，編碼核酸酶多胜肽之第一多核苷酸序列之最後一個密碼子，與編碼DNA-結合性多胜肽之第二多核苷酸序列之第一個密碼子，可以任何數目之核苷酸三重物分隔。在這些與其他實施例中，該編碼核酸酶多胜肽之第一多核苷酸序列之最後一個密碼子(亦即，核酸序列3'端之最後一個)，與編碼DNA-結合性多胜肽之第二多核苷酸序列，可於階段-固定子(phase-register)處與緊接之另一多核苷酸編碼序列之第一個密碼子融合，或以一短胜肽序列分隔，如由一合成性核苷酸連接子編碼者(例如，可用於達成融合之核苷酸連接子)。此一其他多核苷酸序列範例包括，例如且不限於，標籤、標定胜肽，以及酵素切割位址。同樣地，該第一與第二多核苷酸序列最5'端(在核酸序列中)之第一個密碼子，可於階段-固定子(phase-register)處與緊接之另一多核苷酸編碼序列之第一個

密碼子融合，或以一短胜肽序列分隔。

[0156]分隔編碼一標定核酸內切酶(例如，一DNA-結合性多胜肽與一核酸酶多胜肽)之功能性多胜肽之多核苷酸序列之序列，舉例而言，係由任一序列組成，使得該編碼之胺基酸序列並不會明顯改變標定核酸內切酶之轉譯情況。由於已知核酸酶多胜肽與已知DNA-結合性多胜肽之自主特性，間隔序列之範例為不會干擾這些結構物之各自功能者。

C. 載體與表現建構物

[0157]在一些實施例中，包含至少一編碼一感興趣多胜肽，及/或標定核酸內切酶之外源性多核苷酸序列之至少一核酸分子，可引入一細胞、組織，或其表現之生物體。舉例而言，包含一多核苷酸序列之核酸分子，其中該多核苷酸序列編碼可專一性辨識至少一FAD2位點內包含之核苷酸序列之標定核酸內切酶，可引入一細胞中，以表現該標定核酸內切酶，且該包含一編碼感興趣多胜肽之多核苷酸序列之核酸分子，可引入該細胞，使得編碼感興趣多胜肽之多核苷酸序列，在引入所表現之標定核酸內切酶位點之雙股斷裂物之後，可藉由同源性重組融入該至少一FAD2位點中，該感興趣之多胜肽係表現自該經融合之多核苷酸序列。

[0158]在一些實施例中，如前述之一核酸分子，例如，可為一載體系統包括，例如且不限於，直線形質體，或封閉之圓形質體。在特定範例中，該載體可為一表現載體。特定實施例中之核酸序列，例如，可融入至一載體中，使得該核酸序列可操作地連接至一或多個調節序列上。就此目的而

言，許多載體可立即取得，而特定載體之挑選可依據，例如，待插入載體之核酸大小、待以該載體轉型之特定宿主細胞，及/或希望表現之任一經編碼多胜肽之量。載體一般含有各種成分，取決於載體之功能(例如，用於倍增DNA或表現DNA)，以及與該載體相容之特定宿主細胞。

[0159] 在一些實施例中，可操作地連接至一或多個編碼序列之調節序列可為促進子序列，其於宿主細胞如細菌細胞、藻類細胞、真菌細胞或植物細胞中執行功能，其中該核酸分子經倍增或表現。某些實施例可包括包含一核苷酸序列之植物轉型載體，該核苷酸序列包含至少一調節序列，其可操作地連接至一或多個編碼感興趣多胜肽或標定核酸內切酶之核苷酸序列，其中該一或多個核苷酸序列可在調節序列控制之下，於植物細胞、組織或生物體中表現，以製造該感興趣之多胜肽或標定核酸內切酶。

[0160] 在某些實施例中，適合使用於核酸分子中之促進子包括可誘發、組織專一性、病毒性、合成性或組成性者，所有皆為技術上已知者。可用於本發明實施例中之促進子非限制性範例係提供於：美國專利號 6,437,217 (玉米RS81促進子)；5,641,876 (稻米肌動蛋白促進子)；6,426,446 (玉米RS324促進子)；6,429,362 (玉米PR-1促進子)；6,232,526 (玉米A3促進子)；6,177,611 (組成性玉米促進子)；5,322,938、5,352,605、5,359,142與5,530,196 (35S促進子)；6,433,252 (玉米L3油體蛋白促進子)；6,429,357 (稻米肌動蛋白2促進子，以及稻米肌動蛋白2內含子)；6,294,714 (光可誘發促進子)；

6,140,078 (鹽類可誘發促進子)；6,252,138 (病原體可誘發促進子)；6,175,060 (磷缺乏誘發促進子)；6,388,170 (雙向促進子)；6,635,806 (γ -萸苡醇溶蛋白促進子)；5,447,858 (黃豆熱休克促進子)；以及美國專利暫時申請系列號09/757,089 (玉米葉綠體醛縮酶促進子)。

[0161]額外之示範性促進子包括胭脂鹼合成酶(NOS)促進子 (Ebert *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(16):5745-9)；章魚鹼合成酶(OCS)促進子(其攜帶於農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)之腫瘤-可誘發質體上)；花椰菜花葉病毒促進子，如花椰菜嵌紋病毒(CaMV) 19S促進子 (Lawton *et al.* (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:315-24)；CaMV 35S促進子 (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-2；玄參嵌合病毒 35S-促進子 (Walker *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(19): 6624-8)；蔗糖合成酶促進子 (Yang and Russell (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4144-8)；R基因複合物促進子 (Chandler *et al.* (1989), *Plant Cell* 1: 1175-83)；葉綠素 a/b結合蛋白質基因促進子；CaMV35S (美國專利號5,322,938、5,352,605、5,359,142與5,530,196)；FMV35S (美國專利號6,051,753與5,378,619)；PC1SV促進子 (美國專利號 5,850,019)；SCP1促進子 (美國專利號 6,677,503)；以及AGRtu.nos促進子 (GenBank Accession No. V00087；Depicker *et al.* (1982), *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 561-73；Bevan *et al.* (1983), *Nature* 304: 184-7)。

[0162]在特定之實施例中，核酸分子可包含組織特異性

促進子。組織-專一性促進子為一核苷酸序列，其可導引組織中可操作地連接之核苷酸序列之高量轉錄，其中該促進子為專一性，相對於生物體中之其他組織。組織-專一性促進子之範例包括但不侷限於：絨氈層-專一性促進子；花藥-專一性促進子；花粉-專一性促進子(請見，例如，美國專利號7,141,424，以及PCT國際專利公開案WO 99/042587)；胚珠-專一性促進子；(請見，例如，美國專利申請號 2001/047525 A1)；果實-特異性促進子 (請見，例如，美國專利號4,943,674與5,753,475)；以及種子-特異性促進子(請見，例如，美國專利號5,420,034與5,608,152)。在一些實施例中，可使用發育階段-專一性促進子(例如，在發育學較晚階段活化之促進子)。

[0163]在某些實施例中，可操作地連接至一核酸分子之額外調節序列，包括位於促進子序列間之5' UTRs，以及功能為一轉譯引導序列之編碼序列。該轉譯引導序列係存在於經加工完全之mRNA，其可影響一級轉錄作用之加工，及/或RNA穩定性。轉譯引導序列之範例包括玉米與矮牽牛(petunia)熱休克蛋白質引導序列(美國專利號5,362,865)、植物病毒外衣蛋白質 引導序列、植物rubisco引導序列與其他。請見，例如，Turner and Foster (1995) Molecular Biotech. 3(3):225-36。5' UTRs之非限制性範例係提供於：GmHsp (U.S. Patent No. 5,659,122)；PhDnaK (U.S. Patent No. 5,362,865)；AtAnt1；TEV (Carrington and Freed (1990) J. Virol. 64:1590-7)；以及 AGRtunos (GenBank Accession No.

V00087；以及Bevan *et al.* (1983), *同上*)。

[0164]在某些實施例中，可操作地連接至一核酸分子之額外調節序列亦包括3'端末轉譯序列、3'端轉錄終止區域，或聚-腺苷酸化區域。這些為位於核苷酸序列下游之基因片段，並包括可提供聚腺苷酸化訊號，及/或其他可影響轉錄作用或mRNA加工之調節訊號之多核苷酸。在植物中，聚腺苷酸化訊號之功能為導致加入聚腺苷酸核苷酸至mRNA前驅物之3'端。聚腺苷酸化序列可衍生自多種植物基因，或來自T-DN基因。3'轉錄作用終止區域為胭脂鹼合成酶3'區域(nos 3'；Fraley *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7)。使用不同3'末轉譯區域之範例係提供於Ingelbrecht *et al.* (1989) Plant Cell 1:671-80。聚腺苷酸化訊號之非限制性範例包括來自豌豆(*Pisum sativum*) RbcS2 基因(Ps.RbcS2-E9；Coruzzi *et al.* (1984) EMBO J. 3:1671-9)，以及AGRtu.nos (GenBank Accession No. E01312)。

[0165]可用於特定實施例之額外資訊相關之調節序列，係描述於，例如，in Goeddel (1990) "Gene Expression Technology," Methods Enzymol. 185, Academic Press, San Diego, CA。

[0166]一重組型核酸分子或載體可包含一可挑選標記物，其提供轉型細胞如植物細胞一可挑選表現型。可挑選標記物亦可用於挑選包含一含有該可挑選標記物可細胞或生物體。標記物可編碼殺菌劑抗性、抗生素抗性(例如，卡那黴素、遺傳黴素(G418)、博來黴素、潮黴素)，或除草劑抗

性 (例如, 草甘膦)。可挑選標記物之範例包括但不侷限於：可提供卡那黴素抗性之*neo*基因, 可用於挑選例如, 卡那黴素與G418；可提供雙丙氨磷抗性之*bar*基因；可提供草甘膦抗性之突變物EPSP合成酶基因；可提供溴苯腈(bromoxynil)抗性之脲水解酶基因；可提供咪唑啉或磺脲類抗性之突變乙醯乳酸合成酶基因(ALS)；以及提供甲氨蝶呤-抗性之DHFR基因。目前可得之可提供化學試劑抗性之多重可挑選標記物包括例如且不限於, 氨苄青黴素；博萊黴素；氯黴素；慶大黴素；潮黴素；卡那黴素；林可黴素；氨甲喋呤；草銨膦；嘌呤黴素；大觀黴素；利福平；鏈黴素和四環黴素。此類可挑選標記物之範例係示範於例如, 美國專利5,550,318；5,633,435；5,780,708與6,118,047。

[0167]核酸分子或載體亦可或可另外包括可篩選(screenable)標記物。可篩選標記物可用於監控表現情況。示範性可篩選標記物包括 β -葡萄糖醛酸酶或*uidA*基因(GUS), 已知其編碼各種顯色物質(Jefferson *et al.* (1987), *Plant Mol. Biol. Rep.* 5 : 387-405)；R-locus基因, 其編碼可調節植物組織中產生花青素染料(紅色)之產物(Dellaporta *et al.* (1988), "Molecular cloning of the Corn *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*." In *18th Stadler Genetics Symposium*, P. Gustafson and R. Appels, eds. (New York : Plenum), pp. 263-82)； β -內醯胺酶基因(Sutcliffe *et al.* (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 : 3737-41)；已知其編碼各顯色受質之酵素(例如, PADAC、顯色頭孢黴素)；螢光素酶

基因(Ow *et al.* (1986), *Science* 234 : 856-9) ; *xylE*基因，其編碼兒茶酚雙加氧酶，其可轉換顯色兒茶酚(Zukowski *et al.* (1983), *Gene* 46(2-3) : 247-55) ; 澱粉酵素基因(Ikatu *et al.* (1990) *Bio/Technol.* 8 : 241-2) ; 酪胺酸酶基因，其編碼可將酪胺酸酶氧化成DOPA與多巴醌，之後可縮合為黑色素之酵素 (Katz *et al.* (1983), *J. Gen. Microbiol.* 129 : 2703-14) ; 以及 α -半乳糖苷酶。

[0168]所有編碼例如，一特定感興趣多胜肽或特定標定核酸內切酶之核苷酸序列，可由此技術領域者立即辨識出。基因密碼子之退化係提供特定胺基酸序列之有限數目編碼序列。用於挑選編碼本發明之一多胜肽特定序列，係由實施者慎重考慮。在不同應用中希望使用不同之編碼序列。

[0169]在一些實施例中，希望可修飾一核酸之核苷酸，例如，增強特定宿主之核酸內多核苷酸序列之表現。基因密碼有64個可能密碼子，但大部分之生物體較喜歡使用這些密碼子之子群組。在某一物種中最常利用之密碼子稱之為最佳密碼子，而不常使用者則稱之為罕用或低使用率密碼子。Zhang *et al.* (1991), *Gene* 105 : 61-72。密碼子可經替代，以反應特定宿主之較佳密碼子使用率，此過程有時稱之為“密碼子最佳化”。可製備含有原核或真核宿主偏好之密碼子之最佳化編碼序列，舉例而言，以增加轉譯速率或產生具希望特性之重組性RNA轉錄物(例如，較長之半生期，與非最佳化序列所產生之轉錄物相較)。

[0170]在本發明實施例中，核酸可藉由下列方法引入宿

主細胞中，例如但不侷限於：藉由原生質體之轉型(請見如美國專利號5,508,184)；藉由乾燥/抑制媒介之DNA吸收(請見，例如，Potrykus *et al.* (1985), *Mol. Gen. Genet.* 199 : 183-8)；藉由電破法(請見，例如，美國專利號5,384,253)；藉由與碳化矽纖維一同攪拌(請見，例如，美國專利號5,302,523與5,464,765)；藉由農桿菌-媒介轉型(請見，例如，美國專利號5,563,055、5,591,616、5,693,512、5,824,877、5,981,840與6,384,301)；以及藉由DNA-塗佈顆粒加速法(請見如美國專利號5,015,580、550,318、538,880、160,208、399,861與6,403,865)等。經由施加這些技術，實質上各物種之細胞皆可被穩定轉型。在某些實施例中，轉型用DNA係融入宿主細胞之基因組中。就多細胞物種而言，基因轉殖細胞可再生為基因轉殖生物體。或者，該基因轉殖細胞無法再生成為一植物。此類技術之任一者可用於產生一基因轉殖植物，舉例而言，該基因轉殖植物之基因組中包含一或更多本發明之核酸序列。

[0171]將表現載體引入植物最廣泛使用之方法，係以農桿菌之天然轉型系統為基礎。根癌農桿菌與發根農桿菌為植物病原土壤細菌，其可基因轉殖植物細胞。根癌農桿菌與發根農桿菌之T_i與R_i質體，分別帶有可使植物基因轉殖之基因。T_i (腫瘤誘發)-質體含有大片段，已知為T-DNA，其可傳送至經轉型之植物中。T_i質體之另一片段，vir區域，功用為T-DNA之傳送。T-DNA區域由末端重複界定邊界。在某些經修飾之雙元載體中，該腫瘤誘發基因經刪除，vir

區域之功能便可用於傳送外來之DNA，其由T-DNA邊界序列界定邊界。該T-區域亦可包含如可挑選標記物，以有效地回收基因轉殖植物與細胞，以及插入序列之多重選殖位置，以傳送如編碼本發明融合蛋白質之核酸。

[0172]因此，在一些實施例中，植物轉型載體可衍生自根癌農桿菌之T_i質體(請見如美國專利號4,536,475、4,693,977、4,886,937與5,501,967；以及歐洲專利EP 0 122 791)，或發根農桿菌之Ri質體。額外之植物轉型載體包括如，但不侷限於，Herrera-Estrella *et al.* (1983), *Nature* 303 : 209-13 ; Bevan *et al.* (1983), *Nature* 304 : 184-7 ; Klee *et al.* (1985), *Bio/Technol.* 3 : 637-42 ; 以及歐洲專利號EP 0 120 516中所描述者，以及衍生自前述任一者。其他細菌如中華根瘤菌、根瘤菌與慢生根瘤菌，其可與植物自然地作用，可經修飾以媒介基因傳送至數種多樣化植物中。這些與植物共生之細菌可由卸甲(disarmed)T_i質體與適當之二元載體合併而傳送基因。

[0173]將外源性DNA提供至受體細胞中後，經轉型之細胞一般經辨識出，而進一步培養與植物再生。爲了增進辨識轉型細胞之能力，希望使用如前所述之可挑選或可篩選標記基因，與用於產生轉型物之載體結合。若使用可挑選標記物，便可藉由將細胞暴露於篩選試劑或試劑群下，於有轉型潛力之細胞族群中辨識出經轉型之細胞。若使用可篩選標記物，便可篩選出具有希望標記基因性狀之細胞。

[0174]可於挑選試劑暴露環境下存活之細胞，或於篩選

試驗中評估為陽性之細胞，可培養於支持植物再生之培養基中。在一些實施例中，任何適當之植物組織培養基(例如，MS與N6培養基)，皆可藉由加入其他物質而修飾，如生長調節劑。組織可維持於具有生長調節劑之基礎培養基中，直到獲得可啟動植物再生效應之足夠組織，或重複數回人工篩選，直到組織型態適合再生(例如至少2週)，之後轉移至可誘發地上部形成之培養基中。培養物可週期性地轉移，直到地上部形成。一旦地上部形成，其便被轉移至可誘發根部形成之培養基中。一旦形成足夠之根部，此植物便可轉移至土壤中，進一步生長與成熟。

[0175]爲了確認感興趣之核酸分子(例如，編碼包含本發明至少一融合蛋白質之多胜肽之核苷酸序列)存在於一再生植物中，可進行各種試驗。此類試驗包括如：分子生物試驗如南方與北方墨漬分析、PCR與核酸定序；生化試驗如偵測蛋白質產物之出現，例如，以免疫方法(ELISA及/或西方墨漬分析法)或酵素功能；植物部分試驗法如葉或根試驗；以及整體再生植物表型之分析。

[0176]舉例而言，融合品系可經PCR倍增法分析，使用如特異於感興趣核苷酸序列之寡核苷酸引子。PCR基因型鑑定法包括，但不侷限於，基因體DNA之聚合酶連鎖反應(PCR)倍增，其衍生自分離出之宿主植物組織，預測該組織含有融入基因組之感興趣核酸分子，之後以標準選殖與定序法分析該PCR倍增產物。PCR基因鑑定之方法已描述(請見如 Rios, G. *et al.* (2002), *Plant J.* 32 : 243-53)，並可應

用於衍生自任一植物物種之基因體DNA(例如，*Z. mays*或*G. max*)或組織類型，包括細胞培養物。

[0177]使用農桿菌-依賴性轉型方法形成之基因轉殖植物，一般會含有重組性DNA序列之單一至多重拷貝體。該單一重組性DNA序列稱之為“基因轉殖品系”或“融入品系”。此基因轉殖植物為插入DNA序列之異型合子。在一些實施例中，與一轉基因呈同型合子之基因轉殖植物，可與獨立分離體基因轉殖植物，其含有單一外源性基因序列，舉例而言， F_0 植物，交配(自交)，以產生 F_1 種子。所產生的 F_1 種子有四分之一，與該轉基因為同型合子。使 F_1 種子發芽，可產生經測試為異型合子之植物，一般使用SNP試驗或熱倍增試驗，其可分辨出異型合子與同型合子(亦即，接合性試驗)。

[0178]除了以某些實施例中之核酸分子直接轉型一植物或植物細胞外，在特定實施例中，基因轉殖植物亦可由具有至少一基因轉殖品系之第一植物，與缺乏此類品系之第二植物交配而得。舉例而言，包含至少一經修飾FAD2位點之核酸，其中外源性核酸以位址專一性方式融入，可引入第一植物株中而轉型，以產生基因轉殖植物，該基因轉殖植物可與第二植物株交配，以使該至少一經修飾FAD2位點基因滲入該第二植物株。

[0179]為了確認感興趣核酸分子存在於再生植物中，可進行各種試驗。此類試驗包括如：分子生物試驗如南方與北方墨漬分析與PCR；生化試驗如偵測蛋白質產物之出

現，例如，以免疫方法(ELISA及/或西方墨漬分析法)或酵素功能；植物部分試驗法如葉或根試驗；以及整株再生植物表型之分析。

[0180]標定融合品系可經PCR倍增法分析，使用如特異於感興趣核苷酸序列之寡核苷酸引子。PCR基因型鑑定法包括，但不侷限於，基因體DNA之聚合酶連鎖反應(PCR)倍增，其衍生自分離出之宿主植物組織，預測該組織含有融入基因組之感興趣核酸分子，之後以標準選殖與定序法分析該PCR倍增產物。PCR基因鑑定之方法已描述（請見如，Rios, G. *et al.* (2002), *Plant J.* 32 : 243-53)，並可應用於衍生自任一植物物種之基因體DNA或組織類型，包括細胞培養物。可結合至二標定序列並引入序列之寡核苷酸引子組合，可依序或重複使用於PCR倍增反應中。寡核苷酸引子係設計為可黏合至標定位址、引入核酸序列，及/或此二者之組合。因此，PCR基因鑑定策略可包括(但不侷限於)在植物基因體中專一性序列之倍增、植物基因體中非專一性序列之倍增，或其組合。此技術領域者應設計額外的引子組合以及倍增反應，以檢驗該基因體。舉例而言，一組正向與逆向寡核苷酸引子可設計為黏合至專一於所引入核酸序列之邊界外之標定核酸序列。

[0181]正向與逆向寡核苷酸引子可設計為專一性地黏合至所引入之感興趣核酸分子，例如，對應於感興趣核酸分子內之編碼區域序列，或感興趣核酸分子之其他部分。這些引子可用於與上述引子連接。寡核苷酸引子可依據希

望序列合成，並可購得（例如，得自 Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA）。倍增反應之後可進行選殖與定序，或直接進行倍增產物之定序分析。此技術領域者應可想像其他PCR基因型鑑定產生之倍增產物分析方法。在一實施例中，專一於基因標定之寡核苷酸引子可使用於PCR倍增反應中。

VI. 於 *FAD2* 執行位點融入之基因轉殖植物與植物材料

[0182] 在一些實施例中，係提供一種基因轉殖植物，其中該植物包含一植物細胞，其包含至少一經修飾(例如，經破壞及/或標定融入一外源性序列)之 *FAD2* 位點(例如，黃豆 *FAD2* 2.3位點，及/或 *FAD2* 2.6位點)。在特定之實施例中，此植物可藉由轉型一植物組織或植物細胞，並使整株植物再生而製造。在其他實施例中，此一植物可經由至少一 *FAD2* 位點，以位址專一方式引入一外源性核酸，或經由經修飾 *FAD2* 位點基因移入至生殖質而達成。係提供包含此一植物細胞之植物材料。此一植物材料可由包含該植物細胞之植物取得。

[0183] 在某些實施例中，包含至少一經修飾 *FAD2* 位點之植物細胞之基因轉殖植物或植物材料，可具有一或多個下列特徵：於植物之一細胞內表現標定核酸內切酶；於植物之一細胞內(或色素體內)表現感興趣多胜肽；於植物之一細胞核內表現標定核酸內切酶；於植物之一細胞內定位一標定核酸內切酶；於 *FAD2* 位點融入至該植物之一細胞之基因體中；於植物細胞之基因體之一 *FAD2* 位點融入編碼感興趣多胜肽

或農藝基因之核苷酸序列；及/或存在有於*FAD2*位點融入之編碼序列之對應RNA轉錄物。此一植物可額外具有一或多個希望之性狀，包括，例如且不限於，由內源性或轉殖核苷酸序列表現而得者、經於植物細胞之基因體之一*FAD2*位點融入編碼感興趣多胜肽或農藝基因之核苷酸序列調節表現者；昆蟲抗性、其他害蟲抗性以及致病試劑抗性；除草劑耐受性；增強之穩定性、產率或儲存期；環境耐受性；藥物製造；工業產物製造；以及營養強化。

[0184]本發明之基因轉殖植物，可為任一可經一核酸轉型之植物，該核酸之後依據本發明方法於至少一*FAD2*位點融入。因此該植物可為雙子葉或單子葉。可用於本發明方法之雙子葉植物之非限制性範例包括阿拉伯芥屬、紫花苜蓿、豆類、花椰菜、捲心菜、油菜、胡蘿蔔、菜花、芹菜、大白菜、棉花、黃瓜、茄子、萵筍、冬瓜、豌豆、辣椒、花生、馬鈴薯、南瓜、蘿蔔、油菜、菠菜、大豆、南瓜、甜菜、向日葵、煙草、蕃茄和西瓜。可用於本發明方法之單子葉植物之非限制性範例包括玉米、大麥、洋蔥、大米、高粱、小麥、黑麥、小米、甘蔗、燕麥、黑麥、柳枝稷，和草坪用草。本發明之基因轉殖植物可用於以任何方式培養。

[0185]某些實施例亦提供由本發明基因轉殖植物製造之商品產物。商品產物包括，例如但不侷限於：食物產物、餐飲產品、油類，或壓碎或全穀物，或包含於至少一*FAD2*位點融入之一或多個核苷酸序列之植物種子。於一或多個商品或商品產物中偵測一或多個此類核苷酸序列，具事實上之證

據，由於該商品或商品產物為依據本發明實施例製造之基因轉殖植物之至少一部分。在一些實施例中，包含至少一經修飾 FAD2位點之植物細胞之基因轉殖植物或種子，其基因組中亦可包含至少一其他轉基因品系，包括，但不侷限於：由RNAi分子轉錄而得之轉基因品系；編碼殺蟲性蛋白質之基因(例如，蘇雲金芽胞桿菌(*Bacillus thuringiensis*)殺蟲性蛋白質)；除草劑耐受性基因(例如，提供可耐受草甘膦之基因)；提供基因轉殖植物希望之表型(例如，產率增加、改變脂肪酸代謝或回復細胞質雄性不育)之基因。

[0186] 包含至少一經修飾FAD2位點之植物細胞之基因轉殖植物，可具有一或多個希望之性狀。此類性狀可包括如：昆蟲抗性、其他害蟲抗性以及致病試劑抗性；除草劑耐受性；增強之穩定性、產率或儲存期；環境耐受性；藥物製造；工業產物製造；以及營養強化。希望之性狀可藉由於FAD2位點標定重組而融入之一或多個核酸分子提供，其可於具有希望性狀之植物中表現出。因此，在一些實施例中，該希望之性狀係由於轉基因存在於植物中而造成的，其於至少一經修飾FAD2位點引入該植物之基因體中。在另一實施例中，希望之性狀可經由傳統之培育法或得，其性狀可藉由於FAD2位點標定重組而融入之一或多個核酸分子提供。

[0187] 本發明之基因轉殖植物可以任何方式使用或培養，其中希望存在有至少一經修飾FAD2位點。因此，植物可經改造以具有一或多個希望之性狀，藉由以之後將以位

址專一性融入至本發明之至少一FAD2位點之核酸分子轉型，並以此技術領域者所知之任一方法種植與培養。

VII. 包含於一 FAD2 執行位點融入之核酸之基因轉殖植物之標記物輔助育種

[0188]係提供聯結(例如，緊密聯結)至大豆(*Glycine max*) *fad2*之分子標記物。舉例而言，辨識出含有與HO性狀(*fad2*)有關之序列之DNA片段。這些片段環繞並位於聯結(例如，緊密聯結)至基因體連鎖群中突變物對偶基因之標記物之間。因此，亦提供包含具有失活突變之突變物FAD2基因之核酸分子。這些經辨識出之片段、其標記物，係包含於本發明主體中，其位置係位於大豆(*Glycine max*)基因體之連鎖群上。

[0189]所有於此引用之參考文獻，包括公開案、專利與專利申請案，皆在此併入本案以作為參考資料，其內容與本揭示之明確細節並無不一致之處，因此每一單獨與特定指出之文獻皆完整併入本案以作為參考資料。於此所討論之參考文獻僅提供本發明申請日之前之揭示。於此揭示之內容不應被解釋為本發明人無權憑藉先前之發明揭示本發明。

範例

範例 Ⅱ：五種黃豆品種 FAD2 標定序列之定序

[0190]定序反應

[0191]自黃豆組織分離基因體DNA。基因體DNA為分離與純化自經凍乾之X5與Westag品種之胚性懸浮細胞，以

及Jack、Williams 82與Maverick品種之嫩葉。利用DNeasy Plant Mini Kit™ (Qiagen ; Carlsbad, CA)萃取基因體DNA並遵循製造商提供之方法進行。

[0192] FAD2 2.3與2.6基因

[0193]以引子 MA49 (SEQ ID NO:1 caagggttccaaacacaaagcc) 與 MA51 (SEQ ID NO:2 catcaatacttgttctgtacc) 或 MA50 (SEQ ID NO:3 gaagaagcctctctcaagggttc)與MA51，進行PCR放大FAD2 2.3與FAD2 2.6基因體DNA序列。針對含有1140 bp的基因，可取得約40至1140個鹼基片段之基因體DNA序列。PCR反應條件為於98°C下之初始變性反應1分鐘，接著為35個循環的98°C下30 s、60°C下15 s、72°C下3分鐘，以及最終於72°C下進行延伸反應5分鐘。

[0194]將所得之PCR擴增子懸浮於TE緩衝液(1 µg溶於TE緩衝液)，並以Covaris E220 System™超音波震盪器(Covaris ; Woburn, MA)剪切成約300 bp之片段，所使用之設定如下：入射功率峰值140、工作因數10%、每次爆發為200個週期，以及處理時間為430秒。利用PrepX DNA library kit™ (IntegenX ; Pleasanton, CA)，於Apollo 324™ Automation System™ (IntegenX) 上製備Illumina™ (San Diego, CA)配對終端定序庫，並以製造商建議之方法進行。簡言之，為將剪切之含有5'或3'突出端DNA片段轉換為5'磷酸化鈍端DNA。將單一腺嘌呤(A)延伸物加至經終端修補DNA片段之3'端，接著連接至經指標之Illumina™

paired-end (PE)轉接子。最後，自機器回收經轉接子連接之序列庫產物，並以Illumina TruSeq PCR™試劑進行PCR擴增，其熱循環條件為於98°C下之初始變性反應30 s，接著為10個循環的98°C下10 s、60°C下30 s、72°C下30 s，以及最終於72°C下進行延伸反應5分鐘。將經擴增之序列庫標準化至2 nM並匯集。隨後，以氫氧化鈉將匯集之序列庫變性，並以雜合緩衝液稀釋至6 pM用於填入Miseq flow cell™ (Illumina; San Diego, CA)。於Miseq™進行6個指數週期的2x150循環運行，並依據Illumina建議之方法進行。

[0195]將源自Illumina Miseq™儀器之所得序列反應之配對終端判讀結果修整為TruSeq adapter sequences™ (Illumina)。於修整後，以Burrows Wheeler Aligner (BWA)將讀值標定至品種Williams 82之黃豆參考架構(Li H.and Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. Bioinformatics, 25:1754-60)。

[0196]各黃豆品種以單獨樣本處理，因此各品種之定序判讀結果為個別標定。以經標定之定序讀值深度大於零之架構區段進行檢測。由於存在源自擴增子之定序讀值，僅架構上之專一性區段被預期具有可標定讀值。在不同樣本中，定序讀值皆標定至黃豆染色體10與20。針對各樣本，以Mpileup電腦程式取得共同序列。這些結果指出，定序讀值可標定至兩個旁系假定FAD基因。以所得序列讀值進行比對，以辨別品種X5、Westag、Jack、Williams 82與Maverick之旁系假定基因序列之間的SNPs/變異。

[0197] 以取自 Vector NTI Advance 11.0 電腦程式 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 之 AlignX[®] 程式進行序列比對，並顯示於圖1與圖2。AlignX[®] 使用經修正的 Clustal W 演算法以進行蛋白質或核酸序列之多重序列比對，用於比較相似度與註解。如圖1與圖2所示，經分離序列之分析指出，FAD2 2.3 與 FAD2 2.6 序列各具有高度序列相似性。

[0198] FAD2 2.3 基因可對應於 Williams 82 參考基因體序列 (SEQ ID NO:4) 之染色體 10 鹼基 49,417,070 至 49,418,219。五個品種 (Williams 82、Jack、Maverick、X5 與 Westag) 的基因序列鹼基 41-1140 相同 (該範圍結果以引子取得)。FAD2 2.6 基因可對應於 Williams 82 參考基因體序列 (SEQ ID NO:9) 之染色體 20 鹼基 34,178,330 至 34,179,475。相對於 Williams 82 參考序列，X5 序列可於位置 233 (C>T)、352 (A>G)、633 (C>T)、645 (T>C)、658 (T>C)、894 (A>G) 辨別出序列差異。在位置 352 與 894，Maverick 與 X5 具有相同的鹼基變化。

範例 2：FAD2 基因專一性鋅指結合結構域之設計

[0199] 如前述，設計針對編碼各種 FAD2 基因位點功能序列之鋅指蛋白質。請見，例如，Urnov *et al.* (2005) Nature 435:646-651。示範性之標定序列與辨識螺旋如表1(標定位址)與表2(辨識螺旋區段設計)所示。設計鋅指核酸酶 (ZFN) 標定位址以結合 FAD2 標定位址。將 FAD2 之鋅指設計併入鋅指表現載體，其編碼之蛋白質具有至少一 CCHC 結構之鋅指。請見，美國專利公開號 2008/0182332。特別的是，各

蛋白質最後一個鋅指具有CCHC骨架以針對辨識螺旋。經由四胺基酸之ZC連接子與源自玉米之*opaque-2*細胞核定位訊息序列，將非典型鋅指編碼序列融合至第IIS型限制酶FokI之核酸酶結構域(如Wah *et al.*, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10564-10569所示序列之胺基酸384-579)，以形成FAD2鋅指核酸酶(ZFNs)。野生型FokI與eHF-FokI結構域(請見，美國專利公開號20110201055)皆用於ZFNs 1至3之構築，而僅eHF-FokI結構域用於ZFNs 4至7。

[0200]以 DLSSA 試驗 (請 見 ， 美 國 專 利 公 開 號 20110301073)檢測由FAD2 2.3與2.6設計之ZFNs活性，以辨別具有最高活性之ZFNs。進行選殖至哺乳動物細胞之相關FAD2 2.3與2.6序列之ZFNs切割評估(圖3)。以其活性與具高度活性之ZFN參考物(8266:8196)相比較；基線值活性如所示。

表 1：FAD2 鋅指之標定位址

質體名稱	標定FAD2基因	SEQ ID NO:	ZFN結合位址之序列	用於結合ZFN結合位址之ZFN單體
pDAB115603	2.3	14	Agccatcgccgccatcactccaac acagggtcccttgac	37354, 37355
pDAB115600	2.3	14	agccatcgccgccatcac tccaac acagggtcccttgac	37354, 37355
pDAB115605	2.3	15	tctaccgtgttgcaaccct gaaagg gttggttggtgctgctatg	37370, 37371
pDAB115601	2.3	15	tctaccgtgttgcaaccct gaaagg gttggttggtgctgctatg	37370, 37371
pDAB115606	2.3	16	gccttgccctcattacgat tcac agaatgggactggctgaa	37374, 37375
pDAB115604	2.3	17	ctgtgacttactctct accgt gttgcaaccctgaaaggg	37366, 37367
pDAB115607	2.6	18	agccatcgccgccaccac tccaac acgggttccttgac	37384, 37385

pDAB115602	2.6	18	agccatcgccgccaccac tccaac acgggttccttgac	37384, 37385
pDAB115609	2.6	19	ctgtgacttacttgcct accgt gttgcaactatgaaaggg	37398, 37399
pDAB115608	2.6	20	ttcaatgtctctggc agaccc tatgatggttttgc	37392, 37393

表 2：用於 ZFN 結合位址之 ZFN 單體 FAD2 鋅指之設計

ZFP#	F1	F2	F3	F4	F5	F6
37354	SEQ ID NO:24 QSSDLR	SEQ ID NO:25 RKDALVA	SEQ ID NO:26 RSADLTR	SEQ ID NO:27 RSDDLTR	SEQ ID NO:28 RSDAMSQ	SEQ ID NO:29 RNASRTR
37355	SEQ ID NO:30 DRSNLSR	SEQ ID NO:31 HKWLRNQ	SEQ ID NO:32 DSSDRKK	SEQ ID NO:33 LRHHLTR	SEQ ID NO:34 QSGTRKT	NA
37370	SEQ ID NO:35 QNAHRK T	SEQ ID NO:33 LRHHLTR	SEQ ID NO:36 QSGDLTR	SEQ ID NO:37 QTSTLSK	SEQ ID NO:38 TSGSLSR	SEQ ID NO:39 RSDHLTQ
37371	SEQ ID NO:40 RSDVLSE	SEQ ID NO:41 RSADLSR	SEQ ID NO:24 QSSDLR	SEQ ID NO:42 RTDALRG	SEQ ID NO:33 LRHHLTR	SEQ ID NO:43 HRSARKR
37374	SEQ ID NO:44 DRSHLTR	SEQ ID NO:45 QSGNLHV	SEQ ID NO:46 RSDHLSA	SEQ ID NO:47 RSNLLVA	SEQ ID NO:48 QSGALAR	SEQ ID NO:49 DRSALAR
37375	SEQ ID NO:50 QSSNLAR	SEQ ID NO:51 QSSDLRR	SEQ ID NO:52 RSDTLSE	SEQ ID NO:53 QSGHLR	SEQ ID NO:54 RSDVLST	SEQ ID NO:55 QNAHRIK
37366	SEQ ID NO:56 RSDNLSQ	SEQ ID NO:57 ASNDRKK	SEQ ID NO:58 RSDNLST	SEQ ID NO:59 MRQHLLN	SEQ ID NO:60 RSDNLAR	SEQ ID NO:61 QKKDRSY
37367	SEQ ID NO:62 RSDHLR	SEQ ID NO:63 DRSNRKT	SEQ ID NO:64 RSDTLA	SEQ ID NO:65 DKSTRTK	SEQ ID NO:36 QSGDLTR	SEQ ID NO:66 TSGSLTR
37384	SEQ ID NO:24 QSSDLR	SEQ ID NO:25 RKDALVA	SEQ ID NO:26 RSADLTR	SEQ ID NO:27 RSDDLTR	SEQ ID NO:67 RSDSLA	SEQ ID NO:68 RSDALAR
37385	SEQ ID NO:30 DRSNLSR	SEQ ID NO:31 HKWLRNQ	SEQ ID NO:32 DSSDRKK	SEQ ID NO:33 LRHHLTR	SEQ ID NO:69 RRDILHQ	NA
37398	SEQ ID NO:56 RSDNLSQ	SEQ ID NO:57 ASNDRKK	SEQ ID NO:58 RSDNLST	SEQ ID NO:59 MRQHLLN	SEQ ID NO:36 QSGDLTR	SEQ ID NO:70 QRTHLKA
37399	SEQ ID NO:62 RSDHLR	SEQ ID NO:63 DRSNRKT	SEQ ID NO:40 RSDVLSE	SEQ ID NO:71 ARSTRTN	SEQ ID NO:36 QSGDLTR	SEQ ID NO:66 TSGSLTR
37392	SEQ ID NO:72 QSGNLAR	SEQ ID NO:73 WRISLAA	SEQ ID NO:30 DRSNLSR	SEQ ID NO:74 WKESLGA	SEQ ID NO:75 HRKSLSR	NA
37393	SEQ ID NO:24 QSSDLR	SEQ ID NO:76 YHWYLKK	SEQ ID NO:77 TSGHLR	SEQ ID NO:78 TSGNLTR	SEQ ID NO:79 WWTSRAL	NA

範例 3：鋅指核酸酶與供體構築體

[0201] ZFN構築體

[0202] 含有示範性鋅指核酸酶之ZFN表現構築體質體載體，於設計後以試驗辨別，如範例2所述。

[0203] 將各鋅指編碼序列融合至opaque-2細胞核定位訊息序列 (Maddaloni *et al.* (1989) *Nuc. Acids Res.* 17(18):7532)，其位於鋅指核酸酶上游。接著，以opaque-2細胞核定位訊息序列::鋅指核酸酶融合序列，配對至互補之opaque-2細胞核定位訊息序列::鋅指核酸酶融合序列。因此，各構築體由單一開放讀碼區組成，其含有兩個opaque-2細胞核定位訊息序列::鋅指核酸酶融合序列，並以刺蛾 (*Thosa asigna*) 病毒2A序列分隔 (Mattion *et al.* (1996) *J. Virol.* 70:8124-8127)。融合蛋白質之表現係以相對較強的組成型促進子，如源自木薯脈花葉病毒 (CsVMV) 之促進子，驅動，並側接有農桿菌 ORF23 3'端未轉譯區段 (AtuORF23 3'UTR)。

[0204] 以 IN-FUSION™ Advantage Technology (Clontech, Mountain View, CA) 組裝載體。限制核酸內切酶皆購自 New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA)，並以 T4 DNA 連接酶 (Invitrogen) 用於 DNA 連接。以 NUCLEOSPIN® Plasmid Kit (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA) 或 Plasmid Midi Kit (Qiagen) 進行質體製備，並遵照供應商之說明進行。於瓊脂 Tris-醋酸鹽凝膠中進行電泳後，以 QIAquick Gel Extraction Kit™ (Qiagen) 分離 DNA 片段。以 miniprep DNA

之限制酶切割進行所有經組裝質體殖株之初步篩選。由商業上定序廠商(Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL)進行經篩選殖株之質體DNA定序。以SEQUENCHER™軟體(Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI)進行定序數據之組裝與分析。

[0205]在送入至黃豆原生質體內之前，以Pure Yield Plasmid Maxiprep System® (Promega Corporation, Madison, WI)或Plasmid Maxi Kit® (Qiagen, Valencia, CA)自大腸桿菌培養基製備質體DNA，並遵照供應商之說明進行。

[0206]以限制酶切割與DNA定序確認所得之十一個質體構築體：pDAB115603 (含有以eHF-FokI構築之ZFN37354與ZFN37355)、pDAB115600 (含有以野生型FokI構築之ZFN37354與ZFN37355)、pDAB115605 (含有以eHF-FokI構築之ZFN37370與ZFN37371)、pDAB115601 (含有以野生型FokI構築之ZFN37370與ZFN37371)、pDAB115606 (含有以eHF-FokI構築之ZFN37374與ZFN37375)、pDAB115604 (含有以eHF-FokI構築之ZFN37366與ZFN37367)、pDAB115607 (含有以eHF-FokI構築之ZFN37384與ZFN37385)、pDAB115602 (含有以野生型FokI構築之ZFN37384與ZFN37385)、pDAB115609 (含有以eHF-FokI構築之ZFN37398與ZFN37399)，以及pDAB115608 (含有以eHF-FokI構築之ZFN37392與ZFN37393)。

[0207]供體構築體

[0208]將從頭合成之直線形片段結合至高拷貝數質體

載體，以構築FAD2供體載體。pDAB115620（圖4）與pDAB115622（圖5）用於將供體融入黃豆基因體之FAD2位點。此二供體載體皆經合成以涵蓋鋅指核酸酶結合結構域。pDAB115620（“供體1”）包含37354:37355 ZFN結合結構域、37366:37367 ZFN結合結構域、37370:37371 ZFN結合結構域，以及37374:37375 ZFN結合結構域。pDAB115622（“供體2”）包含37384:37385 ZFN結合結構域、37392:37393 ZFN結合結構域，以及37398:37399 ZFN結合結構域。ZFN結合結構域可被相對應之經表現之鋅指核酸酶辨識，並可於以供體載體與鋅指核酸酶載體共轉型至植物細胞期間被切割。

範例 4：黃豆原生質體之轉型

[0209] 建立以黃豆(例如，*Glycine max* c.v. Maverick)原生質體為主之轉型方法。原生質體為分離自Maverick懸浮培養基，其源自葉培植體之癒傷組織。下列技術為描述該方法。

[0210] 培養基維持

[0211] 每隔7天繼代培養黃豆細胞懸液一次，係以1:5稀釋於新鮮LS培養液(Linsmaier and Skoog 1965)，內含3% (w/v)蔗糖、0.5 mg/L 2,4-D與7 g細菌用瓊脂，pH 5.7。依據下述方法，所有實驗於繼代培養7天後開始進行。

[0212] 原生質體分離

[0213] 將繼代培養7天後之30毫升Maverick懸液培養基移至50 ml圓錐形離心管，並以200 g離心3分鐘，產生每管

約10 ml之沈降細胞體積(SCV)。將上清液移除而不干擾細胞沉澱物。針對每4 SCV之懸浮細胞，將20毫升酵素溶液(以0.3%果膠酶(320952；MP Biomedicals)、3%纖維素酶(“Onozuka” R10™；Yakult Pharmaceuticals, Japan)溶於MMG溶液(4 mM MES、0.6 M甘露醇、15 mM MgCl₂，pH 6.0)並加入試管內，並以Parafilm™密封。試管於平台搖晃器放置至隔日(約16-18小時)。於隔天早上，部份經溶解細胞可由顯微鏡觀察出，以確保細胞壁順利溶解。

[0214]原生質體純化

[0215]以100 μM細胞濾網緩慢過濾細胞/酵素溶液。以10 ml之W5+培養液(1.82 mM MES、192 mM NaCl、154 mM CaCl₂、4.7 mM KCl，pH 6.0)沖洗細胞濾網。以70 μM篩網重複過濾步驟。經由加入10 ml之W5+培養液，使最終體積達到40 ml。藉由倒轉試管以混合細胞。以8 ml蔗糖緩衝液(500 mM蔗糖、1 mM CaCl₂、5 mM MES-KOH，pH 6.0)加入含有細胞之50 ml圓錐形離心管底部，使原生質體於該緩衝液中緩慢分層。於擺盪吊桶式轉子中，以350 g離心該試管15分鐘。以5 ml滴管尖緩慢移去原生質體層(約7-8 ml)。隨後，將原生質體移至50 ml圓錐形試管並加入25 ml之W5+洗滌液。將試管緩慢倒轉，並於200 g離心10分鐘。將上清液移除、加入10 ml之MMG溶液，並緩慢倒轉試管以再懸浮該原生質體。以血球計或流式細胞儀測定原生質體之密度。典型而言，4 PCV之細胞懸液可產生約2百萬個原生質體。

[0216] 利用PEG進行原生質體轉型

[0217] 以MMG將原生質體濃度調整為1.6百萬個/ml。將300 μ l (約500,000個原生質體)之原生質體分液移至2 ml無菌試管中。在原生質體移至試管期間，規律混合該原生質體懸液。依據實驗設計，將質體DNA加入原生質體分液中。將含有原生質體試管之試管架緩慢倒轉3次、每次1分鐘，以混合DNA與原生質體。於室溫下培養原生質體5分鐘。將300 μ l聚乙二醇(PEG 4000)溶液(40%乙二醇(81240-Sigma Aldrich)、0.3 M甘露醇、0.4 M CaCl_2)加入該原生質體中，並於試管架上混合1分鐘與培養5分鐘，且培養期間和緩翻轉兩次。將1 ml之W5+緩慢加入試管中，並倒轉試管15-20次。隨後，以350 g離心試管5分鐘，並移除上清液而不干擾沈澱物。將1 ml之WI培養液(4 mM MES 0.6 M甘露醇、20 mM KCl, pH 6.0)加入各試管中，並和緩倒轉試管架以再懸浮該沈澱物。以鋁箔覆蓋試管架，並於23°C下靜置培養至隔日。

[0218] 測量轉型效率與收取原生質體

[0219] 以Quanta Flow Cytometer™ (Beckman-Coulter Inc)量化原生質體並測量轉型效率。於轉型後約16-18小時，各重複體取樣100 μ l、置於96孔培養盤並以WI溶液進行1:1稀釋。將重複體再懸浮3次，並取100 μ l進行流式細胞儀量化。進行樣本分析之前，樣本以200 g離心5分鐘、移除上清液，並以液態氮快速冷凍樣本。隨後，將樣本置於-80°C冰箱等待分子分析處理。

範例 5：鋅指核酸酶切割與供體融入

[0220]利用前述之轉型方法，將經設計之ZFNs轉型至黃豆原生質體。以美國暫時專利申請號61/736,856揭示之位點破壞試驗，評估各種ZFNs對於FAD2位點之切割效率。此外，以內-外PCR試驗評估FAD2位點內鋅指核酸酶媒介之供體序列融入，並進行所得PCR擴增子之定序，以確認供體融入黃豆基因體內之情況。

[0221]實驗處理組包含供體載體單獨處理組、ZFN載體單獨處理組，或ZFN與供體載體結合處理組(表3)。此外，實驗組包括未經轉型之細胞，或以對照組載體pDAB7221(圖6)，其為含有以CsVMV促進子驅動之GFP表現基因匣與AtuORF24 3'-UTR作為側翼區之高拷貝數質體，轉型之細胞，之陰性對照處理組。於轉染約18-24小時後，收取經轉型之樣本。實驗數據證實，ZFN質體pDAB115601具有高活性，並以此種ZFN質體作為所有後續實驗之陽性對照組。

[0222]如表3之詳述，轉型實驗含有總共80 µg之DNA，並依據需要加入質體pDAB7221以達到DNA總濃度80 µg。供體載體與ZFN表現質體之比例為約10:1。各實驗組或處理組由六個實驗重複數組成，其單獨處理與分析。以兩組實驗進行ZFNs之評估，其中所有的最終實驗皆以ZFN質體pDAB115601作為陽性對照組。

表 3：實驗設計。以兩組實驗(F2 ZFNs 1-3 與 F2 ZFNs 4-7)進行 ZFN 質體之評估。以適合 ZFN 質體之供體載體進行檢測，並用於標定實驗。各處理組以六重複進行。

樣本IDs	供體質體	供體質體之量 (μg)	ZFN質體 (μg)	ZFN質體之量 (μg)	pDAB7221 (GFP)之量
未處理組	--	--	--	--	--
GFP對照組	--	--	--	--	80
供體1單獨處理組	pDAB115620	36	--	--	44
供體2單獨處理組	pDAB115622	36	--	--	44
F2 ZFN1_WT 單獨處理組	--	--	pDAB115600	4	76
F2 ZFN2_WT 單獨處理組	--	--	pDAB115601	4	76
F2 ZFN3_WT 單獨處理組	--	--	pDAB115602	4	76
F2 ZFN1_HF 單獨處理組	--	--	pDAB115603	4	76
F2 ZFN2_HF 單獨處理組	--	--	pDAB115605	4	76
F2 ZFN3_HF 單獨處理組	--	--	pDAB115607	--	--
供體1+F2 ZFN1_WT	pDAB115620	36	pDAB115600	4	40
供體1+F2 ZFN2_WT	pDAB115620	36	pDAB115601	4	40
供體2+F2 ZFN3_WT	pDAB115622	36	pDAB115602	4	40
供體1+F2 ZFN1_HF	pDAB115620	36	pDAB115603	4	40
供體1+F2 ZFN2_HF	pDAB115620	36	pDAB115605	4	40
供體2+F2 ZFN3_HF	pDAB115622	36	pDAB115607	4	40

樣本IDs	供體質體	供體質體之量 (μg)	ZFN質體 (μg)	ZFN質體之量 (μg)	pDAB7221 (GFP)之量
未處理組	--	--	--	--	--
GFP對照組	--	--	--	--	80
供體1單獨處理組	pDAB115620	36	--	--	44
供體2單獨處理組	pDAB115622	36	--	--	44
F2 ZFN2_WT 單獨處理組	--	--	pDAB115601	4	76
F2 ZFN4_HF 單獨處理組	--	--	pDAB115609	4	76
F2 ZFN5_HF 單獨處理組	--	--	pDAB115608	4	76
F2 ZFN6_HF 單獨處理組	--	--	pDAB115606	4	76
F2 ZFN7_HF 單獨處理組	--	--	pDAB115604	4	76
供體1+F2 ZFN2_WT	pDAB115620	36	pDAB115601	4	40
供體2+F2 ZFN4_HF	pDAB115622	36	pDAB115609	4	40
供體2+F2 ZFN5_HF	pDAB115622	36	pDAB115608	4	40
供體1+F2 ZFN6_HF	pDAB115620	36	pDAB115606	4	40
供體1+F2 ZFN7_HF	pDAB115620	36	pDAB115604	4	40

[0223] 標定之分析

[0224] 利用位點破壞試驗進行標定實驗DNA樣本的分析，以偵測FAD2 ZFN切割位址之改變，或評估由NHEJ產生之標定結果。以經設計之qPCR試驗測量FAD2標定物之完整ZFN結合位址。經由NHEJ修補後，ZFN媒介之供體插入或切割，會造成ZFN結合位址消失，且隨後qPCR可偵測訊號減少。相較於供體單獨處理組，具有明顯切割活性之ZFNs

所產生的擴增子訊號減少。用於位點破壞試驗之引子與探針列於表4，其於FAD2位點上之相對位置顯示於圖7。

[0225]以其結果相較於未經處理黃豆細胞之完整FAD2位點之訊號。於適合之供體載體存在下，以FAD2 2.3 ZFN2_WT ZFN (兩實驗)與FAD2 2.6 ZFNs ZFN4_HF (一實驗)與F2 ZFN5_HF (兩實驗)處理之原生質體，相較於完整序列(供體單獨處理組)取得之訊號，其訊號於統計上明顯較低。

表 4：用於破壞 PCR 之引子與探針

引子名稱	序列	探針 (螢光團/ 淬滅劑)	標定 ZFN
GMS116 SOY F	SEQ ID NO:21 GTAATATGGGCTCAGAGGAATGGT	--	--
GMS116 SOY R	SEQ ID NO:22 ATGGAGAAGAACATTGGAATTGC	--	--
GMS116 SOY	SEQ ID NO:23 CCATGGCCCGGTACCATCTGGTC	HEX	--
MAS723	SEQ ID NO:80 CACGAGTGTGGTCACCATGCCTT	--	ZFN1
MAS724	SEQ ID NO:81 TGAGTGTGACGAGAAGAGAAAC AGCC	--	ZFN1
MAS725_FAM	SEQ ID NO:82 AGCAAGTACCAATGGGTTGATGAT GTTGTG	FAM	ZFN1
MAS727	SEQ ID NO:83 TGCAAGCCACTACCACCCTTATGC	--	ZFN2/ZFN7
MAS728	SEQ ID NO:84 GGCAAAGTGTGTGTGCTGCAAAT ATG	--	ZFN2/ZFN7
MAS729_FAM	SEQ ID NO:85 CTAACCGTGAGAGGCTTCTGATCT ATGTCTCTGA	FAM	ZFN2/ZFN7
MAS731	SEQ ID NO:86 TGAGTGTGATGAGAAGAGAAGCA GCC	--	ZFN3
MAS732_FAM	SEQ ID NO:87 AGCAAGTACCCATGGGTTGATGAT GTTATG	FAM	ZFN3
MAS723	SEQ ID NO:80 CACGAGTGTGGTCACCATGCCTT	--	ZFN3
MAS812	SEQ ID NO:88 TTGGTTTGGCTGCTATGTGTTTAT GG	--	ZFN6

MAS813	SEQ ID NO:89 TGTGGCATTGTAGAGAAGAGATG GTGAG	--	ZFN6
MAS814_FAM	SEQ ID NO:90 AGGGAGCTTTGGCAACTATGGAC AGAGATTAT	FAM	ZFN6
MAS824	SEQ ID NO:91 AGCCTTCAATGTCTCTGGCAGAC CCT	--	ZFN4/ZFN5
MAS818	SEQ ID NO:92 GGCATAGTGTGTGTGCTGCAGATA TG	--	ZFN4/ZFN5
MAS817_FAM	SEQ ID NO:93 CAAATCGTGAGAGGCTTTTGATCT ATGTCTCTGA	FAM	ZFN4/ZFN5

[0226]位點專一性內-外PCR

[0227]欲確認經標定供體之插入情況，以所有處理組之DNA進行位點專一性內-外PCR試驗。各實驗組之供體載體經設計可包含所有的ZFNs結合位址，其用於檢測FAD2位點之標定融入。以ZFN與供體共同傳輸至黃豆細胞，會切割標定處與供體載體上的ZFN結合位址，並隨即經由非同源末端連接機制，將供體融入經切開之FAD2位點。經由ZFN切割所產生之FAD2染色體位址末端，與直線型供體載體，於融入FAD2位點之前會進行加工步驟，並可能產生不完美的末端連接產物。依據“內-外”PCR策略，進行標定處之標定融入確認，其中“外”引子可辨識原始基因體位點上之序列，而“內”引子可結合至供體DNA上之序列。內-外PCR試驗係於基因插入連接處之5’-與3’-端進行。

[0228]所有的受測ZFNs顯示了部分證據，即在至少一實驗中供體片段可標定與融入FAD2黃豆位點，如供體與ZFN樣本之PCR產物測定結果所示。下列ZFNs；F2 ZFN2_WT、F2 ZFN2_HF與F2 ZFN4_HF，之供體融入標定結果具有再現性，係因其6個實驗重複數中至少有2個皆產

生5’與3’端之PCR產物(表5)。

表5：以NHEJ標定黃豆原生質體FAD2位點之摘錄。針對實驗組或處理組，各標定實驗之內-外PCR陽性重複數如所示。

ZFN ID	F2 ZFN1-3A	F2 ZFN1-3B	F2 ZFN4-7A	F2 ZFN4-7B
ZFN 1 WT	1/6	0/6	--	--
ZFN 1 HF	1/6	4/6	--	--
ZFN 2 WT	3/6	5/6	5/6	5/6
ZFN 2 HF	4/6	3/6	--	--
ZFN 3 WT	0/6	0/6	--	--
ZFN 3 HF	0/6	0/6	--	--
ZFN 4 HF	--	--	2/6	2/6
ZFN 5 HF	--	--	0/6	0/6
ZFN 6 HF	--	--	0/6	0/6
ZFN 7 HF	--	--	4/6	0/6

[0229]內-外PCR產物之定序

[0230]將各個內-外PCR標定實驗，其以pDAB1115620與F2 ZFN2_WT，或pDAB1115620與F2 ZFN2_HF進行，其中兩個擴增子(符合預期大小)選殖至質體。利用桑格(Sanger)定序法進行所得質體之定序。將序列比對至參考序列，其中進行單股4 bp末端，其預期由FokI切割產生，之複製，以取得所有可能的末端組合。自取得的23個經選殖序列中找出十個獨特序列樣式(圖8)。所有的序列樣式皆保留部分的FAD2基因體參考序列，並位於ZFN結合位址(GAAATTTC)範圍內，不過該序列樣式亦產生相對於FAD2基因體參考序列的刪除情形。序列4WT1與4WT4含有延伸至ZFN結合位址GAAATTTC序列3’端之刪除形式。兩序

列，1HF4與6HF4，具有單一鹼基插入情形。由觀察到的DNA序列樣式證實，供體DNA可標定至黃豆FAD2位點。

[0231]雖然某些示範性實施例已於本文中提出，本領域技術人員將可認知與理解針對該示範性實施例之眾多增加、刪除與修正之情況，而不背離下列申請專利範圍之範疇。此外，一實施例之特點可與另一實施例之特點相結合。

【符號說明】

(無)

【序列表】

<110> 陶氏農業科學公司 聖加莫生物科技股份有限公司	
<120> FAD2 執行位點及相對應之能誘導標定斷裂的標定位址專一性結合蛋白	
<130> 8326-4012.40	
<140> 102132276	
<141> 2013-09-06	
<150> 61/697,886	
<151> 2012-09-07	
<160> 130	
<170> PatentIn 版本 3.5	
<210> 1	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
• <220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
、 <400> 1	
caagggttcc aaacacaaag cc	22
<210> 2	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 2	
catcaatact tggtcctgta cc	22
<210> 3	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 3	
gaagaagcct ctctcaaggg ttc	23
<210> 4	
<211> 1100	
<212> DNA	

<213> 黄豆

<400> 4

ggaagaagcc tctctcaagg gttccaaaca caaagccacc attcactgtt ggccaactca	60
agaaagcaat tccaccacac tgctttcagc gctccctcct cacttcattc tcctatgttg	120
tttatgacct ttcat ttgcc ttcat tttct acattgccac cacctacttc cacctccttc	180
ctcaaccctt tccctcatt gcatggccaa tctattgggt tctccaaggt tgccttctca	240
ctgggtgtgtg ggtgattgct cagcagtggt gtcacatgc cttcagcaag taccaatggg	300
ttgatgatgt tgtgggtttg acccttact caacactttt agtcccttat ttctcatgga	360
aaataagcca tcgccgccat cactccaaca caggttccct tgaccgtgat gaagtgtttg	420
tcccaaaacc aaaatccaaa gttgcatggt ttccaagta cttaaacaac cctctaggaa	480
gggctgtttc tcttctcgtc acactcaca taggggtggc tatgtattta gccttcaatg	540
tctctggtag accctatgat agttttgcaa gccactacca cccttatgct cccatatatt	600
ctaaccgtga gaggcctctg atctatgtct ctgatgttgc ttgttttct gtgacttact	660
ctctctaccg tgttgcaacc ctgaaagggt tggtttggct gctatgtgtt tatgggggtgc	720
cittgtctcat tgtgaacggt tttcttgtga ctatcacata ttgcagcac acacactttg	780
ccittgcctca ttacgattca tcagaatggg actggctgaa gggagctttg gcaactatgg	840
acagagatta tgggattctg aacaagggtt ttcatcacat aactgatact catgtggctc	900
accatctctt ctctacaatg ccacattacc atgcaatgga ggcaaccaat gcaatcaagc	960
caatatggg tgagtactac caatttgatg acacaccatt ttacaaggca ctgtggagag	1020
aagcgagaga gtgcctctat gtggagccag atgaaggaac atccgagaag ggcgtgtatt	1080
ggtacaggaa caagtattga	1100

<210> 5

<211> 1100

<212> DNA

<213> 黄豆

<400> 5

ggaagaagcc tctctcaagg gttccaaaca caaagccacc attcactgtt ggccaactca	60
agaaagcaat tccaccacac tgctttcagc gctccctcct cacttcattc tcctatgttg	120
tttatgacct ttcat ttgcc ttcat tttct acattgccac cacctacttc cacctccttc	180
ctcaaccctt tccctcatt gcatggccaa tctattgggt tctccaaggt tgccttctca	240
ctgggtgtgtg ggtgattgct cagcagtggt gtcacatgc cttcagcaag taccaatggg	300
ttgatgatgt tgtgggtttg acccttact caacactttt agtcccttat ttctcatgga	360



aaataagcca	tgcgcgccat	cacccaaca	caggttccct	tgaccgtgat	gaagtgtttg	420
tcccaaaacc	aaaatccaaa	gttgcatggg	tttccaagta	cttaaacaac	cctctaggaa	480
gggctgtttc	tcttctcgtc	acactcaca	tagggtaggc	tatgtattta	gccttcaatg	540
tctctggtag	accctatgat	agttttgcaa	gccactacca	cccttatgct	cccatatatt	600
ctaaccgtga	gaggcttctg	atctatgtct	ctgatgttgc	tttgttttct	gtgacttact	660
ctctctaccg	tgttgcaacc	ctgaaagggg	tggtttggct	gctatgtgtt	tatgggggtgc	720
ctttgctcat	tgtgaacggg	tttcttgtga	ctatcacata	tttgagcac	acacactttg	780
ccctgcctca	ttacgattca	tcagaatggg	actggctgaa	gggagctttg	gcaactatgg	840
acagagatta	tgggattctg	aacaagggtg	ttcatcacat	aactgatact	catgtggctc	900
accatctctt	ctctacaatg	ccacattacc	atgcaatgga	ggcaaccaat	gcaatcaagc	960
caatattggg	tgagtactac	caatttgatg	acacaccatt	ttacaaggca	ctgtggagag	1020
aagcgagaga	gtgcctctat	gtggagccag	atgaagggaac	atccgagaag	ggcgtgtatt	1080
ggtacaggaa	caagtattga					1100

<210> 6
<211> 1100
<212> DNA
<213> 黃豆

<400> 6						
ggaagaagcc	tctctcaagg	gttccaaaca	caaagccacc	attcactgtt	ggccaactca	60
agaaagcaat	tccaccacac	tgttttcagc	gtccctctct	cacttcattc	tcttatgttg	120
tttatgacct	ttcatttgcc	ttcattttct	acattgccac	cacctacttc	cacctccttc	180
ctcaaccctt	ttccctcatt	gcatggccaa	tctattgggt	tctccaaggt	tgccttctca	240
ctgggtgtgtg	ggtgattgct	cacgagtgig	gtcaccatgc	cttcagcaag	taccaatggg	300
ttgatgatgt	tgtgggtttg	acccttcact	caacactttt	agtcctttat	ttctcatgga	360
aaataagcca	tgcgcgccat	cactccaaca	caggttccct	tgaccgtgat	gaagtgtttg	420
tcccaaaacc	aaaatccaaa	gttgcatggg	tttccaagta	cttaaacaac	cctctaggaa	480
gggctgtttc	tcttctcgtc	acactcaca	tagggtaggc	tatgtattta	gccttcaatg	540
tctctggtag	accctatgat	agttttgcaa	gccactacca	cccttatgct	cccatatatt	600
ctaaccgtga	gaggcttctg	atctatgtct	ctgatgttgc	tttgttttct	gtgacttact	660
ctctctaccg	tgttgcaacc	ctgaaagggg	tggtttggct	gctatgtgtt	tatgggggtgc	720
ctttgctcat	tgtgaacggg	tttcttgtga	ctatcacata	tttgcagcac	acacactttg	780

ccttgccctca ttacgattca tcagaatggg actggctgaa gggagctttg gcaactatgg	840
acagagatta tgggattctg aacaagggtgt ttcattcacat aactgatact catgtggctc	900
accatctctt cttctacaatg ccacattacc atgcaatgga ggcaaccaat gcaatcaagc	960
caatattggg tgagtactac caatttgatg acacaccatt ttacaaggca ctgtggagag	1020
aagcgagaga gtgcctctat gtggagccag atgaaggaac atccgagaag ggcgtgtatt	1080
ggtacaggaa caagtattga	1100

<210> 7
 <211> 1100
 <212> DNA
 <213> 黄豆

<400> 7	
ggaagaagcc tctctcaagg gttccaaaca caaagccacc attcactgtt ggccaactca	60
agaaagcaat tccaccacac tgctttcagc gctccctcct cacttcattc tcctatgttg	120
tttatgacct ttcatttgcc ttcattttct acattgccac cacttacttc cacctccttc	180
ctcaaccctt tcccctcatt gcatggccaa tctattgggt tctccaaggt tgccttctca	240
ctgggtgtgtg ggtgattgct cagcagtggt gtcaccatgc cttcagcaag taccaatggg	300
ttgatgatgt tgtgggtttg acccttcaact caacactttt agtcccttat ttctcatgga	360
aaataagcca tgcgcgccat cactccaaca caggttccct tgaccgtgat gaagtgtttg	420
tcccaaaaacc aaaatccaaa gttgcatggg ttccaagta cttaaacac cctctaggaa	480
gggctgtttc tcttctcgtc acattcaca taggggtggc tatgtattta gccttcaatg	540
tctctggtag accctatgat agttttgcaa gccactacca ccttatgct cccatatatt	600
ctaaccgtga gaggcttctg atctatgtct ctgatgttgc tttgttttct gtgacttact	660
ctctctaccg tgttgcaacc ctgaaaggtt tggtttggct gctatgtgtt tatgggggtgc	720
ctttgctcat tgtgaacggt ttctttgtga ctatcacata ttgcagcac acacactttg	780
ccttgccctca ttacgattca tcagaatggg actggctgaa gggagctttg gcaactatgg	840
acagagatta tgggattctg aacaagggtgt ttcattcacat aactgatact catgtggctc	900
accatctctt cttctacaatg ccacattacc atgcaatgga ggcaaccaat gcaatcaagc	960
caatattggg tgagtactac caatttgatg acacaccatt ttacaaggca ctgtggagag	1020
aagcgagaga gtgcctctat gtggagccag atgaaggaac atccgagaag ggcgtgtatt	1080
ggtacaggaa caagtattga	1100

<210> 8
<211> 1100
<212> DNA
<213> 黄豆

<400> 8	
ggaagaagcc tctctcaagg gttccaaaca caaagccacc attcactgtt ggccaactca	60
agaaagcaat tccaccacac tgccttcagc gctccctcct cacttcattc tcctatgttg	120
tttatgacct ttcatTTgCc ttcatTTtCt acatTgCcac cacctacttc cacctccttc	180
ctcaaccctt ttccttcatt gcatggccaa tctattgggt tctccaaggt tgccttctca	240
ctggTgtgtg ggtgattgct cacgagtgtg gtcaccatgc cttcagcaag taccaatggg	300
ttgatgatgt tgtgggtttg acccttcact caacactttt agtcccttat ttctcatgga	360
aaataagcca tgcgcgccat cactccaaca caggttccct tgaccgtgat gaagtgtttg	420
tcccaaaacc aaaatccaaa gttgcatggt ttccaagta cttaaacaac cctctaggaa	480
gggctgtttc tcttctcgtc acactcaca tagggTggCc tatgtattta gccttcaatg	540
tctctggtag accctatgat agttttgcaa gccactacca cccttatgct cccatatatt	600
ctaaccgtga gaggcTtctg atctatgtct ctgatgttgc ttgttttct gtgacttact	660
ctctctaccg tgttgcaacc ctgaaagggt tggTttggCt gctatgtgtt tatggggTgc	720
ctttgtctcat tgtgaacggt tttcttgtga ctatcacata ttTgcagcac acacactttg	780
ccttgcctca ttacgattca tcagaatggg actggctgaa gggagctttg gcaactatgg	840
acagagatta tgggattctg aacaaggTgt ttcatcacat aactgatact catgtggctc	900
accatctctt ctctacaatg ccacattacc atgcaatgga ggcaaccaat gcaatcaagc	960
caatatTggg tgagtactac caattTgatg acacaccatt ttacaaggca ctgtggagag	1020
aagcgagaga gtgcctctat gtggagccag atgaaggAAC atccgagaag ggcgtgtatt	1080
ggtacaggaa caagtattga	1100

<210> 9
<211> 1101
<212> DNA
<213> 黄豆

<400> 9	
cagaagaagc ctctctcaag gtttccaaac acaaagccac cattcactgt tggccaactc	60
aagaaagcca ttccaccgca ctgctttcag cgttccctcc tcacttcatt gtcctatgtt	120
gtttatgacc ttTcattggc ttTcattttc tacattgcca ccacctactt ccacctcctc	180
cctcaccctt ttTccctcat tgcatggcca atctattggg ttctccaagg ttgcattctt	240

actggcgtgt ggggtgattgc tcacgagtgt ggtcaccatg ccttcagcaa gtacccatgg	300
gttgatgatg ttatgggttt gaccgttcac tcagcacitt tagtccctta tttctcatgg	360
aaaataagcc atcgccgcca ccactccaac acgggttccc ttgaccgtga tgaagtgttt	420
gtcccaaaac caaaatccaa agttgcatgg tacaccaagt acctgaacaa ccctctagga	480
agggctgctt ctcttctcat cacactcaca atagggtggc ctttgtatit agccttcaat	540
gtctctggca gaccctatga tggttttgct agccactacc acccttatgc tcccatatat	600
tcaaatacgtg agaggctttt gatctatgtc tctgatgttg ctttgttttc tgtgacttac	660
ttgtcttacc gtgttgcaac tatgaaaggg ttggtttggc tgctatgtgt ttatgggggtg	720
ccattgtctca ttgtgaacgg ttttcttgtg accatcacat atctgcagca cacacactat	780
gccttgccctc actatgattc atcagaatgg gattggctga ggggtgcttt ggcaactatg	840
gacagagatt atggaattct gaacaagggtg tttcaccaca taactgatac tcatgtggct	900
caccatcttt tctctacaat gccacattac catgcaacgg aggcaaccaa tgcaatgaag	960
ccaatatatgg gtgagtacta ccgatttgat gacacacat tttacaaggc actgtggaga	1020
gaagcaagag agtgcctcta tgtggagcca gatgaaggaa catccgagaa gggcgtgtat	1080
tggtacagga acaagtattg a	1101

<210> 10
 <211> 1101
 <212> DNA
 <213> 黄豆

<400> 10	
cagaagaagc ctctctcaag ggttccaaac acaaagccac cattcaactgt tggccaactc	60
aagaaagcca ttccaccgca ctgctttcag cgttccctcc tcacttcatt gtcctatgtt	120
gtttatgacc tttcattggc tttcatittc tacattgcca ccacctactt ccacctctc	180
cctcaccctt tttccctcat tgcatggcca atctattggg ttctccaagg ttgcattctt	240
actggcgtgt ggggtgattgc tcacgagtgt ggtcaccatg ccttcagcaa gtacccatgg	300
gttgatgatg ttatgggttt gaccgttcac tcagcacitt tagtccctta tttctcatgg	360
aaaataagcc atcgccgcca ccactccaac acgggttccc ttgaccgtga tgaagtgttt	420
gtcccaaaac caaaatccaa agttgcatgg tacaccaagt acctgaacaa ccctctagga	480
agggctgctt ctcttctcat cacactcaca atagggtggc ctttgtatit agccttcaat	540
gtctctggca gaccctatga tggttttgct agccactacc acccttatgc tcccatatat	600
tcaaatacgtg agaggctttt gatctatgtc tctgatgttg ctttgttttc tgtgacttac	660

ttgctctacc gtgttgcaac tatgaaaggg ttggtttggc tgctatgtgt ttatgggggtg	720
ccattgctca ttgtgaacgg ttttcttgtg accatcacat atctgcagca cacacactat	780
gccttgcctc actatgattc atcagaatgg gattggctga ggggtgcttt ggcaactatg	840
gacagagatt atggaattct gaacaagggtg ttccaccaca taactgatac tcatgtggct	900
caccatcttt tctctacaat gccacattac catgcaacgg aggcaaccaa tgcaatgaag	960
ccaatattgg gtgagtacta ccgatttgat gacacaccat tttaacaaggc actgtggaga	1020
gaagcaagag agtgcctcta tgtggagcca gatgaaggaa catccgagaa gggcgtgtat	1080
tggtacagga acaagtattg a	1101

<210> 11
 <211> 1101
 <212> DNA
 <213> 黄豆

<400> 11	
cagaagaagc ctctctcaag ggttccaaac acaaagccac cattcactgt tggccaactc	60
aagaaagcca ttccaccgca ctgctttcag cgttccctcc tcaattcatt gtcctatgtt	120
gtttatgacc tttcattggc ttccattttc tacattgcca ccacctactt ccacctcctc	180
cctcaccctt ttttctctat tgcattggcca atctattggg ttctccaagg ttgcattctt	240
actggcgtgt gggtgattgc tcacgagtgt ggtcaccatg ccttcagcaa gtacctatgg	300
gttgatgatg ttgtgggttt gaccgttcac tcagcacttt tagtccctta tttctcatgg	360
aaaataagcc atgcccgcga ccactccaac acgggttccc ttgaccgtga tgaagtgttt	420
gtcccaaaac caaaatccaa agttgcatgg tacaccaagt acctgaacaa cctcttagga	480
agggctgctt ctcttctcat cacactcaca atagggtggc ctttgtattt agccttcaat	540
gtctctggca gacctatga tggttttgct agccactacc acccttatgc tcctatatat	600
tcaaaccgtg agaggcttct gatctatgtc tctgatgttg ctttgttttc tgtgacttac	660
ttgctctacc gtgttgcaac tatgaaaggg ttggtttggc tgctatgtgt ttatgggggtg	720
ccattgctca ttgtgaacgg ttttcttgtg accatcacat atctgcagca cacacactat	780
gccttgcctc actatgattc atcagaatgg gattggctga ggggtgcttt ggcaactatg	840
gacagagatt atgggattct gaacaagggtg ttccaccaca taactgatac tcatgtggct	900
caccatcttt tctctacaat gccacattac catgcaacgg aggcaaccaa tgcaatgaag	960
ccaatattgg gtgagtacta ccgatttgat gacacaccat tttaacaaggc actgtggaga	1020
gaagcaagag agtgcctcta tgtggagcca gatgaaggaa catccgagaa gggcgtgtat	1080

tggtacagga acaagtattg a 1101

<210> 12
<211> 1101
<212> DNA
<213> 黄豆

<400> 12
cagaagaagc ctctctcaag ggttccaaac acaaagccac cattcactgt tggccaactc 60
aagaaagcca ttccaccgca ctgctttcag cgttccctcc tcacttcatt gtcctatgtt 120
gtttatgacc tttcattggc tttcattttc tacattgcca ccacctactt ccacctcctc 180
cctcaccctt ttccctcat tgcattggcca atctattggg ttctccaagg ttgcattctt 240
actggcgtgt ggggtgattgc tcacgagtgt ggtcaccatg ccttcagcaa gtacccatgg 300
gttgatgatg ttatggggtt gaccgttcac tcagcacttt tagtccctta ttctctatgg 360
aaaataagcc atcgccgcca ccactccaac acgggttccc ttgaccgtga tgaagtgttt 420
gtcccaaaac caaaatccaa agttgcatgg tacaccaagt acctgaacaa cctcttagga 480
agggcctgtt ctctctcat cacactcaca atagggtggc ctttgtattt agccttcaat 540
gtctctggca gacctatga tggttttgct agccactacc acccttatgc tcccatatat 600
tcaaatcgtg agaggctttt gatctatgtc tctgatgttg ctttgttttc tgtgacttac 660
ttgctctacc gtgttgcaac tatgaaaggg ttggtttggc tgctatgtgt ttatgggggtg 720
ccattgctca ttgtgaacgg tttctttgtg accatcacat atctgcagca cacacactat 780
gccttgccctc actatgattc atcagaatgg gattggctga ggggtgcttt ggcaactatg 840
gacagagatt atggaattct gaacaagggtg ttccaccaca taactgatac tcatgtggct 900
caccatcttt tctctacaat gccacattac catgcaacgg aggcaaccaa tgcaatgaag 960
ccaatattgg gtgagtacta ccgatttgat gacacaccat ttacaaggc actgtggaga 1020
gaagcaagag agtgcctcta tgtggagcca gatgaaggaa catccgagaa gggcgtgtat 1080
tggtacagga acaagtattg a 1101

<210> 13
<211> 1101
<212> DNA
<213> 黄豆

<400> 13
cagaagaagc ctctctcaag ggttccaaac acaaagccac cattcactgt tggccaactc 60
aagaaagcca ttccaccgca ctgctttcag cgttccctcc tcacttcatt gtcctatgtt 120
gtttatgacc tttcattggc tttcattttc tacattgcca ccacctactt ccacctcctc 180



cctcaccctt	tttccctcat	tgcattggcca	atctattggg	ttctccaagg	ttgcattctt	240
actggcggtg	gggtgattgc	tcacgagtgt	ggtcaccatg	ccttcagcaa	gtaccatgg	300
gttgatgatg	ttgtgggttt	gaccgttcac	tcagcacitt	tagtccctta	tttctcatgg	360
aaaataagcc	atcgccgcca	ccactccaac	acgggttccc	ttgaccgtga	tgaagtgttt	420
gtcccaaaac	caaaatccaa	agttgcatgg	tacaccaagt	acctgaacaa	ccctctagga	480
agggctgctt	ctctttctcat	cacactcaca	atagggtggc	ctttgtattt	agccttcaat	540
gtctctggca	gaccctatga	tggttttgct	agccactacc	acccttatgc	tcccatatat	600
tcaaatacgtg	agaggctttt	gatctatgtc	tctgatgttg	ctttgttttc	tgtgacttac	660
ttgctctacc	gtgttgcaac	tatgaaagg	ttggtttggc	tgctatgtgt	ttatgggggtg	720
ccattgctca	ttgtgaacgg	ttttcttggt	accatcacat	atctgcagca	cacacactat	780
gccttgccctc	actatgattc	atcagaatgg	gattggctga	ggggtgcttt	ggcaactatg	840
gacagagatt	atgggattct	gaacaagggt	tttcaccaca	taactgatac	tcatgtggct	900
caccatcttt	tctctacaat	gccacattac	catgcaacgg	aggcaaccaa	tgcaatgaag	960
ccaatattgg	gtgagtacta	ccgatttgat	gacacaccat	tttacaaggc	actgtggaga	1020
gaagcaagag	agtgccctcta	tgtggagcca	gatgaaggaa	catccgagaa	gggcgtgtat	1080
tggtacagga	acaagtattg	a				1101

<210> 14
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸

<400> 14	
agccatcgcc	gccatcactc
caacacaggt	tcccttgac
	39

<210> 15
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸

<400> 15	
tctaccgtgt	tgcaaccctg
aaagggttgg	tttggctgct
atg	
	43

<210> 16

<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 16	
gcccttgccctc attacgattc atcagaatgg gactggctga a	41
<210> 17	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 17	
ctgtgactta ctctctctac cgtgttgcaa ccctgaaagg g	41
<210> 18	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 18	
agccatcgcc gccaccactc caacacgggt tcccttgac	39
<210> 19	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 19	
ctgtgactta ctgtctctac cgtgttgcaa ctatgaaagg g	41
<210> 20	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 20	
ttcaatgtct ctggcagacc ctatgatggt tttgct	36

15

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 26

Arg Ser Ala Asp Leu Thr Arg

15

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 27

Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg

15

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 28

Arg Ser Asp Ala Met Ser Gln

15

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 29

Arg Asn Ala Ser Arg Thr Arg

15

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列



<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 30
Asp Arg Ser Asn Leu Ser Arg
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 31
His Lys Trp Leu Arg Asn Gln
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 32
Asp Ser Ser Asp Arg Lys Lys
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 33
Leu Arg His His Leu Thr Arg
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 34
Gln Ser Gly Thr Arg Lys Thr
1 5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 35
Gln Asn Ala His Arg Lys Thr
1 5

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 36
Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 37
Gln Thr Ser Thr Leu Ser Lys
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 38
Thr Ser Gly Ser Leu Ser Arg
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列



<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 39
Arg Ser Asp His Leu Thr Gln
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 40
Arg Ser Asp Val Leu Ser Glu
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 41
Arg Ser Ala Asp Leu Ser Arg
1 5

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 42
Arg Thr Asp Ala Leu Arg Gly
1 5

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 43
His Arg Ser Ala Arg Lys Arg
1 5

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 44
Asp Arg Ser His Leu Thr Arg
1 5

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 45
Gln Ser Gly Asn Leu His Val
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 46
Arg Ser Asp His Leu Ser Ala
1 5

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 47
Arg Ser Asn Leu Leu Val Ala
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 48
Gln Ser Gly Ala Leu Ala Arg
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 49
Asp Arg Ser Ala Leu Ala Arg
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 50
Gln Ser Ser Asn Leu Ala Arg
1 5

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 51
Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg
1 5

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 52
Arg Ser Asp Thr Leu Ser Glu
1 5

<210> 53
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 53
 Gln Ser Gly His Leu Ser Arg
 1 5

<210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 54
 Arg Ser Asp Val Leu Ser Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 55
 Gln Asn Ala His Arg Ile Lys
 1 5

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 56
 Arg Ser Asp Asn Leu Ser Gln
 1 5

<210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 57
Ala Ser Asn Asp Arg Lys Lys
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 58
Arg Ser Asp Asn Leu Ser Thr
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 59
Met Arg Gln His Leu Leu Asn
1 5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 60
Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1 5

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 61
Gln Lys Lys Asp Arg Ser Tyr
1 5

<210> 62

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 62
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 63
Asp Arg Ser Asn Arg Lys Thr
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 64
Arg Ser Asp Thr Leu Ser Ala
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 65
Asp Lys Ser Thr Arg Thr Lys
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 66
Thr Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 67
Arg Ser Asp Ser Leu Ser Ala
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 68
Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg
1 5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 69
Arg Arg Asp Ile Leu His Gln
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 70
Gln Arg Thr His Leu Lys Ala
1 5

<210> 71
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 71
Ala Arg Ser Thr Arg Thr Asn
1 5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 72
Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 73
Trp Arg Ile Ser Leu Ala Ala
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 74
Trp Lys Glu Ser Leu Gly Ala
1 5

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 75

His Arg Lys Ser Leu Ser Arg
1 5

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 76
Tyr His Trp Tyr Leu Lys Lys
1 5

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 77
Thr Ser Gly His Leu Ser Arg
1 5

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 78
Thr Ser Gly Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之胜肽

<400> 79
Trp Trp Thr Ser Arg Ala Leu
1 5

<210> 80
<211> 23
<212> DNA

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 80	
cacgagtgtg gtcaccatgc ctt	23
<210> 81	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 81	
tgagtgtgac gagaagagaa acagcc	26
<210> 82	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之探針	
<400> 82	
agcaagtacc aatgggttga tgatgttgtg	30
<210> 83	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 83	
tgcaagccac taccaccctt atgc	24
<210> 84	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 84	
ggcaaagtgt gtgtgctgca aatatg	26
<210> 85	
<211> 34	



<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之探针	
<400> 85	
ctaaccgtga gaggccttctg atctatgtct ctga	34
<210> 86	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 86	
tgagtgtgat gagaagagaa gcagcc	26
<210> 87	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之探针	
<400> 87	
agcaagtacc catgggttga tgatgttatg	30
<210> 88	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 88	
ttggtttggc tgctatgtgt ttatgg	26
<210> 89	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 89	
tgtggcattg tagagaagag atggtgag	28
<210> 90	

<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之探針	
<400> 90	
agggagcttt ggcaactatg gacagagatt at	32
<210> 91	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 91	
agccttcaat gtctctggca gaccct	26
<210> 92	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之引子	
<400> 92	
ggcatagtgt gtgtgctgca gatatg	26
<210> 93	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之探針	
<400> 93	
caaatcgiga gaggcttttg atctatgtct ctga	34
<210> 94	
<400> 94	
000	
<210> 95	
<400> 95	
000	



<210> 96

<400> 96
000

<210> 97

<400> 97
000

<210> 98

<400> 98
000

<210> 99

<400> 99
000

<210> 100

<400> 100
000

<210> 101

<400> 101
000

<210> 102

<400> 102
000

<210> 103

<400> 103
000

<210> 104

<400> 104
000

<210> 105

<400> 105
000

<210> 106

<400> 106
000

<210> 107

<400> 107
000

<210> 108

<400> 108
000

<210> 109

<400> 109
000

<210> 110

<400> 110
000

<210> 111

<400> 111
000

<210> 112

<400> 112
000

<210> 113

<400> 113
000

<210> 114

<400> 114
000

<210> 115

<400> 115
000

<210> 116	
<400> 116	
000	
<210> 117	
<400> 117	
000	
<210> 118	
<400> 118	
000	
<210> 119	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 119	
ttactctctc taccgtgttg caaccctgaa atttcagggt tgcaacacgg tagagagagt	60
aa	62
<210> 120	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 120	
ttactctctc taccgtgttg caaccctgat cagggttgca acacggtaga gagagtaa	58
<210> 121	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 121	
ttactctctc taccgtgttg caaccctgaa aggggttgcaa cacggtagag agagtaa	57
<210> 122	

<211> 54	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 122	
ttactctctc taccgtgttg caaccctgag gtigcaacac ggtagagaga gtaa	54
<210> 123	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 123	
ttactctctc taccgtgttg caaccctgaa	30
<210> 124	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 124	
ttactctctc taccgtgttg caaccctgat ttcagggttg caacacggta gagagagtaa	60
<210> 125	
<211> 59	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 125	
ttactctctc taccgtgttg caaccctgat tcagggttgc aacacggtag agagagtaa	59
<210> 126	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸	
<400> 126	
ttactctctc taccgtgttg caaccctatt cagggttgca acacggtaga gagagtaa	58



<210> 127
<211> 59
<212> DNA
<213> 人二序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸

<400> 127
ttactctctc taccgtgttg caaccctgat tcagggttgc aacacggtag agagagtaa 59

<210> 128
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸

<400> 128
ttactctctc taccgtgttg caaccctgaa tcagggttgc aacacggtag agagagtaa 59

1
-
5
<210> 129
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸

<400> 129
ttactctctc taccgtgttg caaccctgaa aggggttgcaa cacggtagag agagtaa 57

<210> 130
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之寡核苷酸

<400> 130
ttactctctc taccgtgttg caaccctctt tcagggttgc aacacggtag agagagtaa 59

I667348

發明摘要

※ 申請案號：102132276

※ 申請日：102/09/06

※IPC 分類：C12N 15/66 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

FAD2執行位點及相對應之能誘導標定斷裂的標定位址專一性結合蛋白
FAD2 PERFORMANCE LOCI AND CORRESPONDING TARGET SITE
SPECIFIC BINDING PROTEINS CAPABLE OF INDUCING TARGETED
BREAKS

【中文】

本發明係揭示一種用於FAD2位點內之基因破壞、基因編輯或基因堆疊之方法與組成物，其藉由位址定向方式切割黃豆細胞之FAD2基因部位，以於FAD2基因中產生斷裂，隨後任擇地將感興趣之核酸分子融入該斷裂處。

【英文】

Methods and compositions for gene disruption, gene editing or gene stacking within a FAD2 loci by cleaving, in a site directed manner, a location in a FAD2 gene in a soybean cell, to generate a break in the FAD2 gene and then optionally integrating into the break a nucleic acid molecule of interest is disclosed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。（無）

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

申請專利範圍

1. 一種修飾黃豆細胞中至少一FAD2基因之方法，該方法包含：

於黃豆細胞中使用一核酸酶以位址專一性方式切割該 FAD2 基因，該核酸酶係結合至至少一 FAD2 基因中由 SEQ ID NO: 14-20 中任一者所示之標定位址，因而使 FAD2 基因產生斷裂；

其中至少一 FAD2 基因係藉由將感興趣之核酸序列融入(integrating)該斷裂處來修飾，其中該 FAD2 基因為 SEQ ID NO: 4 所表示之 FAD2 2.3 基因或其同系物(homeologue)或旁系物(paralog)、SEQ ID NO: 9 所表示之 FAD2 2.6 基因或其同系物或旁系物，或兩者皆是。

2. 如請求項1之方法，其中該核酸酶包含一DNA-結合結構域以及一切割結構域或切割半結構域，其中該DNA-結合結構域專一性地結合至該標定位址及切割該標定位址處或其附近，因此產生該斷裂。
3. 如請求項2之方法，其中該DNA結合結構域係選自於由下列所組成之族群：巨核酸酶DNA-結合結構域、白胺酸拉鏈(leucine zipper)DNA-結合結構域、類轉錄活化因子 (TAL) DNA- 結 合 結 構 域、RNA- 導 引 性 CRISPR-Cas9、重組酶、鋅指蛋白質DNA-結合結構域，以及任何前述之嵌合組合物。
4. 如請求項2之方法，其中該切割結構域或切割半結構

域，係選自於由下列所組成之族群：第IIS型限制核酸內切酶之切割半結構域、FokI核酸內切酶之切割半結構域、StsI核酸內切酶之切割半結構域、Cas蛋白質，以及歸巢核酸內切酶。

5. 如請求項2至4中任一項之方法，其中該核酸酶為鋅指核酸酶，其中該鋅指核酸酶包含自三至六個鋅指結構域，每一鋅指結構域包含辨識螺旋區段，其中該鋅指蛋白質包含依序排列之該辨識螺旋區段，如表2之單一系列所示。
6. 如請求項1之方法，其中該位址專一性切割係以專一於某些而非全部由SEQ ID NO: 4所表示之FAD2 2.3基因與由SEQ ID NO: 9所表示之FAD2 2.6基因的拷貝體之方式進行。
7. 如請求項1之方法，其中該感興趣之核酸序列係選自由下列所組成之群組：包含一DNA結合結構域之結合標定位址的序列、一或多種殺蟲劑抗性基因、一或多種除草劑耐受性基因、一或多種氮素利用效率基因、一或多種水利用效率基因、一或多種營養品質基因、一或多種DNA結合基因、一或多種可挑選標記基因，及其等之組合。
8. 一種經分離之黃豆細胞，其係經如請求項1至7中任一項之方法所修飾，其中該黃豆細胞包含融入至至少一FAD2 2.3及/或FAD2 2.6基因之一或多個拷貝體中的一感興趣之異源核苷酸序列，其中該FAD2 2.3係由SEQ ID NO: 4所表示者或其同系物或旁系物，以及該FAD2 2.6

係由SEQ ID NO: 9所表示者或其同系物或旁系物。

9. 如請求項8之細胞，其中該異源核酸序列係被融入一標定位址，該標定位址係選自於由SEQ ID NO: 14至SEQ ID NO: 20所組成之族群。
10. 一種位址專一性鋅指核酸酶，其係供用於修飾至少一FAD2基因，其中該鋅指核酸酶係於核酸標定位址進行切割，該核酸標定位址係選自於由SEQ ID NO: 14至SEQ ID NO: 20組成之族群，其中該FAD2基因係由SEQ ID NO: 4所表示之FAD2 2.3基因、由SEQ ID NO: 9所表示之FAD2 2.6基因，或兩者皆是，其中該鋅指核酸酶包含自三至六個鋅指結構域，每一鋅指結構域包含一辨識螺旋區段，其中該鋅指蛋白質包含依序排列之該辨識螺旋區段，如表2之單一系列所示。