РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 98695A

(51) A01H 1/00 A01H 5/00
C12N 15/00 C12N 9/02
C12P 7/64 C12P 1/02
C12P 1/04

(21) Заявителски № 98695

(22) Заявено на 05.04.1994

(24) Начало на действие на патента от:

Приоритетни данни

(31)	774475	(32) 10.10.1991	(33)	US
	817919	08.01.1992		US

(41) Публикувана заявка в бюлетин № 5 | 31.05.1995

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин № на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
BAYER S.A.S. , . , 69009 LYON , 16, RUE JEAN-MARIE LECLAIR (FR) ;

(72) Изобретател(и):
THOMAS , TERRY L . , COLLEGE STATION, (FR) ; REDDY , AVUTU S . , BRYAN,TX (FR) ; NUCCIO , MICHAEL . , BRYAN,TX (FR) ; FREYSSINET , GEORGES L . , SAINT CYR AU (FR) ;

(74) Представител по индустриална собственост:
Юлиян Иванов Върбанов , 1421 София , "Юлиан Върбанов и партньори" ООД

(86) № на PCT заявка:
PCT/ US92/0 / 8746 , 13.10.1992

(87) № и дата на PCT публикация:
93/067 / 12 , 15.04.1993

(54) ПОЛУЧАВАНЕ НА ГАМА-ЛИНОЛЕНОВА КИСЕЛИНА ЧРЕЗ ДЕЛТА 6-ДЕЗАТУРАЗА

(57) Изобретението се отнася до получаване на -линоленова киселина (gla) чрез ензима 6-дезатураза, като нуклеиновите киселини и рекомбинантните конструкции се използват за получаване на gla в трансгенни организми. 6-дезатуразата е ензим от около 359 аминокиселини, има мембранно свързана част и активно място за дезатериране на мастни киселини. С него се осигурява възможност за получаването на големи количества gla, използвана в диетологията за предотвратяване на хиперхолестеролемия, атеросклероза и др. Коронарни заболявания. Осигуряват се също клетки и организми, съдържащи насочващите вектори със ласно изобретението и потомци на такива организми. Насочващите вектори се състоят от 6-дезатуразен промотор, кодираща област и ограничаваща област. Изолираната нуклеинова киселина се съдържа в трансг енен организъм, който може да е бактерия, гъба, растителна клетка или животно. Изобретението се отнася и до метод за получаване на растения с увеличено съдържание на - линоленова киселина, например слъ нчоглед, соя, царевиц а, тютюн, фъстък или маслодайна рапица, който се състои в трансформиране на растителна клетка с

BG 98695A

изолирана нуклеинова киселина съгласно изобретението и регенериране на растения с увеличено съдържание на gla от посочената растителна клетка. Изобретението се отнася и до метод за придаване на студоустойчивост на културните растения.

23 претенции, 7 фигури

BG 98695A

рег № 98695

Получаване на гама линоленова киселина чрез Δ6-дезатураза

Линолова киселина (18:2) (LA) се трансформира в гама линоленова киселина (18:3) (GLA) чрез ензима Δ6-дезатураза. Когато този ензим, или нуклеиновата киселина, която го кодира, се прехвърли в LA-произвеждащи клетки, се получава GLA. Настоящето изобретение осигурява нуклеинова киселина, съдържаща Δ6-дезатуразния ген. По-специално, нуклеиновата киселина се състои от промотор, кодираща област и ограничаващи области на Δ6-дезатуразния ген. Настоящето изобретение е още насочено към рекомбинантни конструкции на Δ6-дезатуразна кодираща област във функционална комбинация с хетероложни регулиращи последователности. Нуклеиновите киселини и рекомбинантните конструкции от настоящето изобретение се използват за получаване на GLA в трансгенни организми.

Ненаситени мастни киселини, такива като линолова ($C_{18}\Delta^{9,12}$) и α-линоленова ($C_{18}\Delta^{9,12,18}$) киселини, са важни диетични съставни части, които не могат да бъдат синтезирани от гръбначни животни, тъй като гръбначните клетки могат да вкарват двойни връзки в Δ^9 позицията на мастни киселини, но не могат да вкарват допълнителни двойни връзки между Δ^9 двойната връзка и метиловия край на мастната киселинна верига. Тъй като те са предшественици на други продукти, линоловата и α-линоленовата киселини са важни мастни киселини и обикновено се получават от растителни източници. Линоловата киселина може да бъде превърната в γ-линоленова (GLA, $C_{18}\Delta^{6,9,12}$) киселина от бозайници, която от своя страна може да бъде превърната в арахидонова киселина (20:4), крайно

важна мастна киселина, тъй като тя е важна основа за повечето простагландини.

Диетичното осигуряване на линолова киселина, благодарение на нейното превръщане в GLA и арахидонова киселина, задоволява диетичната нужда от GLA и арахидонова киселина. Все пак, показано е, че има връзка между консумацията на наситени мазнини и болестни състояния, такива като хиперхолестеролемия, атеросклероза и други химични нарушения, свързани с податливост към коронарни заболявания, докато консумацията на ненаситени мазнини се свързва с намаляване на концентрацията на холестерол в кръвта и намаляване риска от атеросклероза. Терапевтичната полза от диетичната GLA е, че тя е предшественик на арахидоновата киселина и така спомага за простагландиновия синтез. Съответно, консумацията на по-ненаситената GLA, вместо линоловата киселина, има потенциални здравни предимства. Обаче, GLA не присъства в буквално нито едно от търговско отглежданите културни растения.

Линоловата киселина се превръща в GLA, чрез ензима Δ6-дезатураза. Δ6-дезатураза, ензим от около 359 амино киселини, има мембранно-свързана част и активно място за дезатуриране на мастни киселини. Когато този ензим премине в клетки, ендогенно произвеждащи линолова киселина, но не GLA, се получава GLA. Чрез осигуряване на ген-кодираща Δ6-дезатураза, настоящето изобретение позволява получаването на трансгенни организми, които съдържат функционална Δ6-дезатураза и които произвеждат GLA. Освен че позволява получаването на големи количества GLA, настоящето изобретение осигурява нови диетични източници на GLA.

Настоящето изобретение е насочено към изолиран Δ6-дезатуразен ген. По-специално, изолирания ген се състои от Δ6-дезатуразен промотор, кодираща област и ограничаваща област.

Настоящето изобретение още описва насочващи вектори, състоящи се от Δ6-дезатуразен промотор, кодираща област и ограничаваща област.

Настоящето изобретение също описва насочващи вектори, състоящи се от Δ6-дезатуразна кодираща област в функционална комбинация с хетероложни регулиращи области, т.е. елементи не произтичащи от Δ6-дезатуразния ген.

Настоящето изобретение също осигурява клетки и организми, съдържащи векторите от настоящето изобретение и потомци на такива организми.

Настоящето изобретение също осигурява изолирана бактериална Δ6-дезатураза и освен това е насочено към изолирана нуклеинова киселина, кодираща бактериална Δ6-дезатураза.

По-нататък, настоящето изобретение осигурява метод за получаване на растения с увеличено съдържание на гама линоленова киселина (GLA), който се състои в трансформиране на растителна клетка с изолирана нуклеинова киселина от настоящето изобретение и регенериране на растение с увеличено съдържание на GLA от споменатата растителна клетка.

Настоящето изобретение също осигурява метод за получаване на студоустойчиви растения.

Фиг.1 описва хидропатийните профили на извлечените амино-киселинни последователности на Synechocystis Δ6-дезатураза (част А) и Δ12-дезатураза (част В). Предполагаемите мембранно-вършящи се области са обозначени

чрез плътни линии. Хидрофобния индекс е изчислен за отрязък от 19 аминокиселинни утайки [Kyte, и др. (1982) J. Molec. Biol. 157].

Фиг.2 описва газ-течни хроматографски профили на див (част А) и трансгенна (част В) Anabaena.

Фиг.3 е диаграма от карти на космидите cSy75, cSy13 и cSy7 със застъпващи се области и клонинги. Произхидът на клонингите на cSy75, cSy75-3.5 и cSy7 са обозначени чрез наклонени диагонални линии. Дезактивираните ограничителни места са в скоби.

Фиг.4 описва газ-течни хроматографски профили на див (част А) и трансгенен (част В) тютюн.

Настоящето изобретение осигурява изолирана нуклеинова киселина, кодираща Δ6-дезатураза. За да се идентифицира нуклеиновата киселина, кодираща Δ6-дезатураза, се изолира DNA от организъм, който произвежда GLA. Споменатия организъм може да бъде например животинска клетка, някои гъби (например Mortierella), някои бактерии (като Synechocystis) или определени растения (пореч, Oenothera, френско грозде). Изолирането на геномната DNA може да бъде осъществено чрез множество методи, добре известни за средния специалист в областта, описани с примери от Sambrook и др. (1989) в Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY. Изолираната DNA се разделя на части чрез физични методи или ензимно разлагане и се клонира до подходящ вектор, като бактериофага или космиден вектор, чрез който и да е от множество добре известни от литературата методи, например от Sambrook и др. (1989). По-специално разглеждани тук, са насочващи вектори, съдържащи DNA от настоящето изобретение. DNA кодиращата Δ6-дезатураза може да бъде идентифицирана чрез функционален анализ. Векторът, съдържащ разделената на части DNA, се

прехвърля, например посредством инфекция, трансконюгация и трансфекция, в гостоприемен организъм, който произвежда линолова киселина, но не GLA. Използваният тук термин "трансформация" означава най-общо вграждане на чужда DNA в гостоприемна клетка. Методи за вкарване на рекомбинантна DNA в гостоприемен организъм са известни на средния специалист в областта и са изложени, например, в Sambrook и др. (1989). Произвеждането на GLA от тези организми (т.е. придобиване на функция) се изследва, например, чрез газова хроматография или други методи, известни на средния специалист в областта. Организмите накарани да произвеждат GLA, т.е. придобили функция, чрез вкарването на вектора, се идентифицират, като се извлича DNA кодиращата Δ6-дезатураза, а споменатата DNA се възстановява от организмите. Възстановената DNA може отново да се раздели на части, да се клонира с насочващи вектори и да се оцени функционално по горните процедури, за да се определи с по-голяма точност DNA кодиращата Δ6-дезатураза.

Като пример от настоящето изобретение се изолира произволна DNA от цианобактерията Synechocystis Pasteur Culture Collection (PCC) 6803, American Type Culture Collection (ATCC) 27184, клонира се в козмиден вектор и се вкарва чрез трансконюгация в цианобактерийния щам Anabaena PCC 7120, ATCC 27893, който е с недостиг на GLA. Получаването на GLA от съдържаща Anabaena линолова киселина се следи чрез газова хроматография и се изолира съответния DNA фрагмент.

Изолираната DNA се структурира чрез методи добре известни на средния специалист в областта, като например в Sambrook и др. (1989).

В съответствие с настоящето изобретение се изолира DNA съдържаща Δ6-дезатуразен ген. По-специално, от цианобактерията Synechocystis се изолират 3.588 килобаза (kb) DNA, съдържаща Δ6-дезатуразен ген. Определя се нуклеотидната последователност на 3.588 kb DNA, която е показана в SEQ ID NO:1. Отворени отчитащи контури, определящи потенциални кодиращи области, присъстват в нуклеотиди от 317 до 1507 и в нуклеотиди от 2002 до 3081. За да се определят нуклеотидите кодиращи Δ6-дезатураза, 3.588 kb фрагмента, който причинява Δ6-дезатуразна активност се разцепва на два подфрагмента, всеки от които съдържа само един отворен отчитащ контур. Фрагментът ORF1 съдържа нуклеотиди от 1 до 1704, докато фрагмента ORF2 съдържа нуклеотиди от 1705 до 3588. Всеки фрагмент се субклонира в двете права и обратна ориентации до конюгиращ насочващ вектор (AM542, Wolk и др. [1984] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1561), който съдържа цианобактериален карбоксилазен промотор. Получените структури [т.е. ORF1(F), ORF1(R), ORF2(F) и ORF2(R)] се конюгират до див тип Anabaena PCC 7120 посредством стандартни методи (виж, например, Wolk и др. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1561). Конюгираните клетки от Anabaena се идентифицират, като Neo^R зелени колонии върху кафява основа от умиращи неконюгирани клетки, след двуседмичен растеж върху селективна среда (стандартна минерална среда BG11N + съдържаща 30 μгр/мл неомицин, съгласно Rippka и др., (1979) J. Gen Microbiol. 111, 1). Подбират се зелените колонии и израстват в селективна течна среда (BG11N + с 15 μгр/мл неомицин). Чрез стандартни методи се екстрахират липиди (например, Dahmer и др., (1989) Journal of American Oil Chemical Society 66, 543) от получените трансконюгати, съдържащи право и обратно ориентираните ORF1 и ORF2

конструкции. За сравнение, липидите също се екстрахират от диви типове култури Anabaena и Synechocystis. Метиловите естери на мастни киселини се анализират чрез газ-течна хроматография (GLC), например с Tracor-560 газ-течен хроматограф, снабден с йонизиращ детектор с водороден пламък и капилярна колона. Резултатите от GLC анализа са показани в таблица 1.

Таблица 1: Разпространение на C18 мастни киселини във див тип цианобактерия и трансгенна цианобактерия

Източник	18:0	18:1	18:2	γ18:3	α18:3	18:4
Anabaena (див тип)	+	+	+	-	+	-
Anabaena + ORF1(F)	+	+	+	-	+	-
Anabaena + ORF1(R)	+	+	+	-	+	-
Anabaena + ORF2(F)	+	+	+	+	+	+
Anabaena + ORF2(R)	+	+	+	-	+	-
Synechocystis (див тип)	+	+	+	+	-	-

Както показва GLC анализът, Anabaena с недостиг на GLA придобива свойството (функцията) да произвежда GLA, когато се въкарва чрез трансконюгация, конструкцията съдържаща ORF2 в права ориентация. Транконюгати, съдържащи конструкции с ORF2 в обратна ориентация спрямо карбоксилазния промотор или ORF1 в която и да е ориентация, не произвеждат GLA. Този анализ показва, че единичния отворен отчитащ контур (ORF2) в 1884-ия bp фрагмент кодира Δ6-дезатураза. 1884-ия bp фрагмент е SEQ ID NO:3. Това се потвърждава от цялата прилика на хидропатийните профили между Δ6-дезатураза и Δ12-дезатураза [Waga и др. (1990) Nature 347], както е показано на Фиг.1, като (A) и (B), съответно.

Изолираните нуклеинови киселини, кодиращи Δ6-дезатураза, могат да бъдат различени от другите организми, които произвеждат GLA, чрез описания по-горе анализ за придобито свойство или чрез хибридизационни методи с нуклеинова киселина, използващи изолираната нуклеинова киселина, която кодира Anabaena Δ6-дезатураза, като хибридизационна проба. И двата геномен и cDNA клониращ метод са известни на специалистите и са изложени в настоящето изобретение. Хибридизационната проба може да съдържа цялата DNA последователност, описана като SEQ. ID NO:1 или ограничаващ фрагмент или друг съответен DNA фрагмент, включващ олигонуклеотидна проба. Методите за клониране на хомоложни гени чрез кръстосана хибридизация са известни на средния специалист в областта и са описани, например, в Sambrook (1989) и Beltz и др. (1983) Methods in Enzymology 100, 266.

Трансгенните организми, които са придобили функцията да произвеждат GLA, чрез вкарване на DNA кодираща Δ-дезатураза, също така придобиват свойството да произвеждат октадекатетраеонна киселина ($18{:}4_{\Delta}^{6,9,12,15}$). Октадекатетраеонна киселина присъства обикновено в рибни масла и в някои растителни видове от рода Boraginaceae (Craid и др. [1964] J. Amer. Oil Chem. Soc. 41, 209-211; Gross и др. [1976] Can. J. Plant Sci. 56, 659-664). В трансгенните организми от настоящето изобретение октадекатетраеноената киселина се получава от по-нататъшно дезатуриране на α-линоленова киселина чрез Δ6-дезатураза или дезатуриране на GLA посредством Δ15-дезатураза.

359-те аминокиселини кодирани от ORF2, т.е. отворения отчитащ контур кодиращ Δ6-дезатураза, са показани като SEQ. ID NO:2. Настоящето изобретение също описва други

нуклеотидни последователности, които кодират аминокиселините от SEQ ID NO:2. В компетенцията на средния специалист е да идентифицира такива последователности, които се получават, например, от дегенерирането на генетичния код. Освен това, средния специалист в областта може да определи, посредством описания по-горе анализ за придобито свойство, по-малки подфрагменти на 1884-ия bp фрагмент, съдържащ ORF2, който кодира Δ6-дезатураза.

Настоящето изобретение изследва който и да е полипептиден фрагмент на Δ6-дезатураза и съответните нуклеинови киселини, който запазва активност за превръщане на LA в GLA.

В друг аспект на настоящето изобретение, вектор съдържащ 1884-ия bp фрагмент или по-малък фрагмент съдържащ промотор, кодираща последователност и ограничаваща област на Δ6-дезатуразен ген се прехвърля в организъм, например цианобактерия, в която Δ6-дезатуразния промотор и ограничаващите области са функционални. Съответно, това изобретение осигурява организми произвеждащи рекомбинантна Δ6-дезатураза. Още един аспект на настоящето изобретение е осигуряването на изолирана Δ6-дезатураза, която може да бъде пречистена от рекомбинантните организми, чрез стандартни методи за протеиново пречистване. (Виж, например, Ausubel и др. [1987] Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, New York).

Настоящето изобретение също осигурява вектори съдържащи DNA кодираща Δ6-дезатураза. За средния специалист в областта е очевидно, че могат да бъдат конструирани подходящи вектори, които да насочват преминаването на Δ6-дезатуразната кодираща последователност в множество

организми. По-специално се предпочитат възпроизвеждащи се насочващи вектори. Описаните тук възпроизвеждащи се насочващи вектори са DNA или RNA молекули, конструирани за контролирано насочване на желания ген, т.е. Δ6-дезатуразния ген. За предпочитане векторите са плазмиди, бактериофаги, козмиди или вируси. Совалкови вектори, като описаните от Wolk и др. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1561-1565 и Bustos и др. (1991) J. Bacteriol. 174, 7525-7533, се изследват в настоящето изобретение. Sambrook и др. (1989), Goeddel, ed. (1990) Methods in Enzymology 185 Academic Press и Perbal (1988) A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons, Inc., дават подробен преглед на вектори в които може да бъде вкарана и насочена нуклеинова киселина кодираща наличната Δ6-дезатураза. Такива вектори също съдържат нуклеинови киселинни последователности, които могат да влияят на насочването на нуклеиновите киселини, кодиращи Δ6-дезатураза. Последователности, способни да влияят на насочването на генен продукт, са промотори, усилващи елементи, възходящо активиращи последователности, транскрипционни ограничаващи сигнали и полиаденилиращи места. Разглеждат се и двата съставен и тъканно-специфичен промотори. По-специално интересни за трансформиране на растителни клетки са 35S промотора на цветнозелевия мозаечен вирус (CaMV) и промотори, които се регулират по време на узряването на растителните семена. Всички тези промотори и транскрипционни регулаторни елементи, самостоятелно или в комбинация, се разглеждат за използване в настоящите възпроизвеждащи се насочващи вектори и са известни на средния специалист в областта. CaMV 355 промотора е описан, например, от Restrepo и др. (1990) Plant Cell 2, 987. Също се изследват генетично конструирани и мутирали регулаторни

последователности. Средния специалист в областта може да определи подходящите вектори и регулаторни елементи за носител в конкретна гостоприемна клетка. Например, вектор съдържащ промотора от гена, кодиращ карбоксилазата на Anabaena, оперативно свързан с кодиращата област на Δ6-дезатураза и също оперативно свързан с ограничаващ сигнал от Synechocystis, е подходящ за носител на Δ6-дезатураза в цианобактерия. "Оперативно свързан", в този контекст, означава, че промотора и ограничаващите последователности действат ефективно за регулиране на транскрипцията. Примерно, вектор, подходящ за носител на Δ6-дезатураза в трансгенни растения, може да включва семенно-специфична промоторна последователност, получена от хелиантинин, напин или глицин, оперативно свързана с Δ6-дезатуразната кодираща област и също оперативно свързана със семенен ограничаващ сигнал или с нопалиновия синтазен ограничаващ сигнал.

По-специално, хелиантининовите регулаторни елементи, описани в нерешена U.S. заявка No. 682 354, заявена на осми април 1991 и цитирана тук за справка, са описани като промоторни елементи, насочващи пренасянето на Δ6-дезатуразата от настоящето изобретение.

Модификациите на описаните тук нуклеотидни последователности или регулаторни елементи, които притежават дадените тук функции са в обхвата на това изобретение. Такива модификации са прибавки, заместители и заличители и специфични заместители, които отразяват разрушаването на генетичния код.

Стандартните методи за конструиране на такива хибридни вектори са добре известни на средните специалисти в областта и са описани в публикации, такива като Sambrook и др. (1989) или

в който и да е от многобройните, широко разпространени лабораторни наръчници за рекомбинантна DNA технология. Познати са множество подходи за лигазиране на фрагментите на DNA, изборът на които зависи от естеството на края на DNA фрагментите. По-нататък се описва включването в хибридните вектори на други елементи с нуклеотидни последователности, които улесняват клонирането, насочването или обработката, например последователности, кодиращи сигнални пептиди, последователност, кодираща KDEL, която е необходима за задържане на протеините в ендоплазмичния ретикулум или последователности, кодиращи транзитни пептиди, които насочват Δ6-дезатуразата към хлоропласта. Такива последователности са известни на средния специалист в областта. Оптимизиран транзитен пептид е описан, например, в Van den Broeck и др. (1985) Nature 313, 358. Прокариотни и еукариотни сигнални последователности са описани, например, от Michaelis и др. (1982) Ann. Rev. Microbiol. 36, 425.

Друг аспект от настоящето изобретение осигурява организми различни от цианобактерията, които съдържат DNA, кодираща Δ6-дезатуразата от това изобретение. Трансгенните организми, съответно описани в настоящето изобретение, са бактерии, цианобактерии, гъби и растения и животни. Изолираната DNA от настоящето изобретение може да бъде вкарана в гостоприемника по методи известни от нивото на техниката, например, инфекция, трансфекция, трансформиране или трансконюгация. Методите за трансфер на DNA от настоящето изобретение в такива организми са добре известни и са описани в публикациии, такива като Sambrook и др. (1989).

Известни са множество методи за трансформиране на растения. Δ6-дезатуразния ген може да бъде вкаран в растенията

през листото, чрез трансформационно-регенерационна процедура, описана от Horsch и др. (1985) Science 227, 1229. Други методи за трансформация, такива като протопластна култура (Horsch и др. (1984) Science 223, 496; DeBlock и др. (1984) EMBO J. 2, 2143; Barton и др. (1983) Cell 32, 1033), могат също да бъдат използвани и са в обхвата на това изобретение. За предпочитане е растенията да се трансформират с Agrobacterium-получени вектори. Все пак, известни са и други методи за вкарване на Δ6-дезатуразния ген от настоящето изобретение в растителни клетки. Такива алтернативни методи са биолистни подходи (Klein и др. (1987) Nature 327, 70), електропорация, химически-индуцирано DNA поемане или използване на вируси или цветен прашец, като вектори.

Когато е необходимо за метода на трансформация, Δ6-дезатуразния ген от настоящето изобретение може да бъде вкаран в растителен трансформационен вектор, като двойния вектор, описан от Bevan (1984) Nucleic Acids Res. 12, 8111. Растителни трансформационни вектори могат да бъдат получени чрез модифициране на естествената генна система за трансфер на Agrobacterium tumefaciens. Естествената система включва големі Ti (тумор-предизвикващи)-плазмиди, съдържащи голям сегмент, известен като T-DNA, който е прехвърлен на трансформираните растения. Друг сегмент от Ti плазмида, vir областта, е необходим за T-DNA трансфер. T-DNA областта граничи с крайни повтарящи се елементи. В модифицираните двойни вектори тумор-предизвикващите гени са премахнати и функциите на vir областта се използват да прехвърлят чуждата DNA, граничеща с T-DNA граничните последователности. T-областта съдържа, също, селективен маркер за антибиотична устойчивост и многократно клониращо място за вкарване на

последователности за трансфер. Такива конструирани щамове са известни като "обезвредени" A. tumefaciens щамове и позволяват ефикасна трансформация на последователности, граничещи с Т-областта в ядрените геноми на растенията.

Повърхностно-стерилизирани листа се заразяват с "обезвредения" A. tumefaciens, съдържащ чужда DNA, култивират се за два дни и след това се прехвърлят в среда, съдържаща антибиотик. След внедряването в среда, съдържаща подходящ антибиотик се избират трансформирани части от тъкан, прехвърлят се в пръст и регенерират.

Като друг аспект от това изобретение се осигуряват трансгенни растения или прогени на тези растения, съдържащи изолирана DNA от това изобретение. Изследват се както едносемеделни, така и двусемеделни растения. Растителни клетки се трансформират с изолираната DNA кодираща Δ6-дезатураза по който и да е от методите за трансформиране на растения, описани по-горе. Трансформираната растителна клетка, обикновено намираща се в новообразуване на кората или в листото, регенерира до завършено трансгенно растение по методи добре известни на средния специалист от областта (напр. Horsch и др. (1985) Science 227, 1129). За предпочитане, трансгенното растение е слънчоглед, маслодайна рапица, царевица, тютюн, фъстък или соя. Тъй като прогените на трансформираните растения наследяват DNA кодираща Δ6-дезатураза, семена или отрязъци от трансформираните растения се използват, за да поддържат трансгенната растителна линия.

Настоящето изобретение също осигурява метод за получаване на трансгенни растения с увеличено съдържание на GLA. Този метод включва вкарване на DNA кодираща Δ6-

дезатураза в растителни клетки, които нямат GLA или са с ниски нива на GLA, но съдържат LA, и регенериране на растения с увеличено съдържание на GLA от трансгенните клетки. По-специално, като трансгенен организъм се използват търговско отглеждани културни растения, като слънчоглед, соя, маслодайна рапица, царевица, фъстък и тютюн, без те да се считат за ограничаващи.

Настоящето изобретение, също осигурява метод за получаване на трансгенни организми, които съдържат GLA. Този метод включва вкарване на DNA кодираща Δ6-дезатураза в организъм, който няма GLA или е с ниски нива на GLA, но съдържа LA. В друг случай, включва вкарване на един или повече насочващи вектори, които съдържат DNA кодираща Δ12-дезатураза и Δ6-дезатураза в организми, които са с недостатъчно GLA и LA. Съответно, организми с недостатъчно GLA и LA се предизвикват да произвеждат LA чрез вкарването на Δ12-дезатураза, а след това генерират GLA, вследствие на вкарването Δ6-дезатураза. Насочващи вектори, съдържащи DNA кодираща Δ12-дезатураза или Δ12-дезатураза и Δ6-дезатураза, могат да бъдат конструирани по методите на рекомбинантната технология, известни на средния специалист от областта (Sambrook и др., 1989) и публикуваната последователност на Δ12-дезатураза (Wada и др [1990] Nature (London) 347, 200-203). Също така е намерено, в съответствие с настоящето изобретение, че нуклеотиди 2002-3081 от SEQ. ID NO:1 кодират цианобактериалната Δ12-дезатураза. Съответно, тази последователност може да се използва за конструиране на споменатите насочващи вектори. По-специално, като трансгенен организъм се използват търговско отглеждани културни растения, като слънчоглед, соя, маслодайна рапица,

царевица, фъстък и тютюн, без те да се считат за ограничаващи.

Настоящето изобретение също е насочено към метод за предизвикване на студоустойчивост в растения. Чувствителността към студ може да се дължи на фазово преминаване на липиди в клетъчни мембрани. Температурата на фазово преминаване зависи от степента на ненаситеност на мастни киселини в липидните мембрани и по-този начин увеличавайки степента на ненаситеност, например чрез вкарване на Δ6-дезатураза, която да преобразува LA в GLA, може да се предизвика или подобри студоустойчивостта. Съответно, настоящият метод включва вкарването на DNA кодираща Δ6-дезатураза в растителна клетка и регенериране на растение с подобрена студоустойчивост от споменатата трансформирана растителна клетка. За предпочитане растението е слънчоглед, соя, маслодайна рапица, царевица, фъстък или тютюн.

Следващите примери илюстрират настоящето изобретение.

Пример 1

Щамове и условия за култивиране

Synechocystis (PCC 6803, ATCC 27184), Anabaena (PCC 7120, ATCC 27893) и Synechococcus (PCC 7942, ATCC 33912) се отглеждат фотоавтотропно при 30° С в BG11N+ среда (Rippka и др. [1979] J. Gen. Microbiol. 111, 1-61) при осветяване от лампи с нажежаема жичка (60 μE.m^{-2}.S^{-1}). Избират се космиди и плазмиди и се размножават в Escherichia coli щам DH5α върху LB среда с прибавени антибиотици при стандартни концентрации, както е

описано от Maniatis и др. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, New York.

Пример 2

Конструиране на Synechocystis космидна геномна съвкупност

Общата геномна DNA от Synechocystis (PCC 6803) се разрежда частично с Sau3A и се фракционира при захарозен градиент (Ausubel и др. [1987] Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York). Избират се фракциите, съдържащи 30 до 40 kb DNA фрагменти и се лигазират в дефосфорилираното BamHI място на космидния вектор, pDUCA7 (Buikema и др. [1991] J. Bacteriol. 173, 1879-1885). Лигазираната DNA се опакова in vitro както е описано от Ausubel и др. (1987) и опакованата фага се размножава в E. coli DH5α, съдържаща AvaI и Eco4711 метилазен помощен плазмид, pRL528, както е описан от Buikema и др., 1991. Общо 1152 колонии се изолират в произволен ред и се отглеждат индивидуално в дванадесет 96-гнездни микротитърни плочи.

Пример 3

Придобиване на функция след вкарване на GLA в Anabaena

Anabaena (PCC 7120), пръчковидна цианобактерия, е с недостиг на GLA, но съдържа значителни количества линолова киселина, която е предшественик на GLA (фигура 2, таблица 2). Synechocystis космидната съвкупност, описана в пример 2, се конюгира в Anabaena (PCC 7120), за да се идентифицират трансконюгатите, които произвеждат GLA. Клетките Anabaena се отглеждат до средна фаза в BG11N+ течна среда и

се ресуспендират в същата среда до получаване на крайна концентрация от приблизително $2x10^8$ клетки на мл. Културата от средната фаза, E. coli RP4 (Burkardt и др. [1979] J. Gen. Microbiol. 114, 341-348), отгледана в LB, съдържаща ампицилин, се промива и ресуспендира в свежа LB среда. След това Anabaena и RP4 се смесват и се разполагат равномерно върху BG11N+ плочи, съдържащи 5% LB. Космидната геномна съвкупност отново се разполага върху LB плочи, съдържащи 50 μгр/мл канамицин и 17.5 μгр/мл хлорамфеникол и последователно се поставя на BG11N+ плочи, съдържащи Anabaena и RP4. След 24 часов престой в инкубатор при 30° С, се подслоява 30 μгр/мл неомицин и престоя в инкубатор, при 30° С, продължава докато се появят трансконюгати.

След конюгация се изолират индивидуални трансконюгати и се отглеждат в 2 мл. BG11N+ течна среда с 15 μгр/мл неомицин. Получават се метилови естери на мастна киселина от див тип култури и култури съдържащи множества от по десет трансконюгати, както следва. След центрофугиране се получават див тип и трансгенни цианобактериални култури, които се промиват двукратно с дестилирана вода. От тези култури се екстрахират метилови естери на мастна киселина, както е описано от Dahmer и др. (1989) J.Amer. Oil. Chem. Soc. 66, 543-548, и се анализират чрез газ-течна хроматография (GLC), като се използва Tracor-560, снабден с водородно-пламъчен йонизационен детектор и капилярна колона (30 м х 0.25 мм свързана с FSOT Superox II, Alltech Associates Inc., IL). За идентифициране на мастни киселини се използват времената на задържане и кохроматография на стандартни проби (получени от Sigma Chemical Co.). Средната мастно-кисела композиция се

определя като съотношение на пиковата стойност (област) на всяка C18 мастна киселина към нейната стандартна стойност.

Представителни GLC профили са показани на фиг. 2. Показани са метилови естери на C18 мастна киселина. Пиковете се идентифицират, чрез сравняване на времената за елюиране с известните стандартни стойности за метилови естери на мастна киселина и след това се потвърждават чрез газ-хроматографска масс спектрометрия. Част А представлява GLC анализ на мастни киселини от див тип Anabaena. Стрелката показва миграционното време на GLA. Част В представлява GLC профил на мастни киселини на трансконюгати от Anabaena с pAM542+1.8F. За две GLA произвеждащи множества (от 25 множества с общо 250 трансконюгати) се доказва, че произвеждат GLA. Индивидуални трансконюгати от всяко от тези множества се анализира за това дали произвежда GLA; два независими трансконюгата, AS13 и AS75, по един от всяко множество, се идентифицират, че имат значителни нива GLA и че съдържат космиди, съответно, cSy13 и cSy75 (фигура 3). Космидите се застъпват в област с дължина приблизително 7.5 kb. 3.5 kb NheI фрагмент от cSy75 се реклонира във вектор pDUCA7 и се прехвърля в Anabaena, която придобива функция да отделя GLA (таблица 2).

Два NheI/Hind III подфрагмента (1.8 и 1.7 kb) на 3.5 kb Nhe I фрагмента на cSy75-3.5 се субклонират в "pBLUESCRIPT" (Stratagene) (фигура 3) за получаване на последователност. Прилагат се стандартни молекулярни биологични методи, както е описано от Maniatis и др. (1982) и Ausubel и др. (1987). Осъществява се получаване на дидеокси последователност (Sanger и др. [1977] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463, 5467) на pBS1.8 с "SEQUENASE" (United States Biochemical) на двете

вериги, чрез използване на специфични олигонуклеотидни първични слоеве, синтезирани от Advanced DNA Technology Laboratory (Biology Department, Texas A & M University). Осъществява се анализ на DNA последователността с GCG (Madison, WI) софтуер, както е описано от Devereux и др. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 387-395.

Двата подфрагмента NheI/HindIII се прехвърлят в конюгиращ насочващ вектор AM542, както в права, така и в обратна ориентация спрямо цианобактериалния карбоксилазен промотор и се вкарват в Anabaena чрез конюгация. Трансконюгантите, съдържащи 1.8 kb фрагмента в права ориентация (AM542-1.8F) произвеждат значителни количества GLA и октадекатетраеноена киселина (фигура 2; таблица 2). Транконюгати, съдържащи други конструкции, обратно ориентиран 1.8 kb фрагмент или право и обратно ориентиран 1.7 kb фрагмент, не произвеждат видими нива GLA (таблица 2).

Във фигура 2 се сравняват C18 мастно-киселинен профил на екстракт от див тип Anabaena (фигура 2A) с този на трансгенна Anabaena, съдържаща 1.8 kb фрагмента на cSy75-3.5 в правата си ориентация (фигура 2B). GLC анализът на метилови естери на мастна киселина от AM542-1.8F показва пик с време на задържане, идентично с това на автентичната стандартна GLA. Анализът на този пик чрез газ-хроматографска масс спектрометрия (GC-MS) показва, че той има същото масс фрагментиране, като GLA проба. Трансгенни Anabaena с променени нива на полиненаситени мастни киселини са подобни на дивия тип по темп на растеж и морфология.

Таблица 2

Състав на С18 мастни киселини в див тип и в трансгенна цианобактерия

Щам	Мастна киселина (%)					
	18:0	18:1	18:2	18:3 (α)	18:3 (γ)	18:4
Див тип						
Synechocystis (sp.PCC6803)	13.6	4.5	54.5	-	27.3	-
Anabaena (sp.PCC7120)	2.9	24.8	37.1	35.2	-	-
Synechococcus (Sp.PCC7942)	20.6	79.4	-	-	-	-
Anabaena трансконюгати						
cSy75	3.8	24.4	22.3	9.1	27.9	12.5
cSy75-3.5	4.3	27.6	18.1	3.2	40.4	6.4
pAM542-1.8F	4.2	13.9	12.1	19.1	25.4	25.4
pAM542-1.8R	7.7	23.1	38.4	30.8	-	-
pAM542-1.7F	2.8	27.8	36.1	33.3	-	-
pAM542-1.7R	2.8	25.4	42.3	29.6	-	-
Synechococcus трансформанти						
pAM854	27.8	72.2	-	-	-	-
pAM854-Δ^{12}	4.0	43.2	46.0	-	-	-
pAM854-Δ^{6}	18.2	81.8	-	-	-	-
pAM854-Δ^{6} & Δ^{12}	42.7	25.3	19.5	-	16.5	-

18:0, стеаринова киселина; 18:1, олеинова киселина; 18:2, линолова киселина; 18:3(α), α-линоленова киселина; 18:3(γ), γ-линоленова киселина; 18:4, октадекатетраеноена киселина

Пример 4

Трансформиране на Synechococcus с Δ6 и Δ12 дезатуразни гени

Трети космид, cSy7, който съдържа Δ12-дезатуразен ген, се изолира чрез отделяне от Synechocystis геномната съвкупност на олигонуклеотид, синтезиран от публикуваната Synechocystis дезатуразна генна последователност (Wada и др. [1990] Nature (London) 347, 200-203). 1.7 kb AvaI фрагмент от този космид, съдържащ Δ12-дезатуразния ген, се идентифицира и служи като пример, за да демонстрира, че cSy13 съдържа не само Δ6-дезатуразен ген, но също и Δ12-дезатуразен ген (фигура 3). Геномния Southern Blot анализ показва, че и двата Δ6 и Δ12-дезатуразни гена са уникални за Synechocystis геном, така че двата функционални гена, включени в C18 мастно-киселинното дезатуриране, са тясно свързани в Synechocystis генома.

Едноклетъчната цианобактерия Synechocystis (PCC 7942) е с недостатъчно съдържание, както на линолова киселина, така и на GLA(3). Δ12 и Δ6 дезатуразните гени се клонират индивидуално и заедно в pAM854 (Bustos и др. [1991] J. Bacteriol. 174, 7525-7533), совалков вектор, който съдържа последователности, необходими за интегриране на чуждата DNA в генома Synechococcus (Golden и др. [1987] Methods in Enzymol. 153, 215-231). Syncchococcus се трансформира с тези генни конструкции и се избират колонии. Метиловите естери на мастна киселина се екстрахират от трансгенна Synechococcus и се анализират чрез GLC.

Таблица 2 показва, че основните мастни киселини на дивия тип Synechococcus са стеаринова киселина (18:0) и олеинова киселина (18:1). Synechococcus трансформиран с pAM854-Δ12 отделя линолова киселина (18:2), освен основните мастни киселини. Трансформантите с pAM854-Δ6 и Δ12 произвеждат,

както линолеат, така и GLA (таблица 1). Тези резултати показват, че Synechococcus, съдържащ и двата Δ12- и Δ6-дезатуразни гена, придобива способността да вкара втора двойна връзка в Δ12 позиция и трета двойна връзка в Δ6 позиция на C18 мастни киселини. Все пак, не се забелязват промени в мастно-киселинния състав на трансформанта, съдържащ pAM854-Δ6, което показва, че при отсъствието на субстрат синтезиран от Δ12-дезатураза, Δ6-дезатуразата не е активна. Освен това този експеримент показва, че 1.8 kb NheI/HindIII фрагмента (фигура 3) съдържа, както кодираща, така и промоторна област на Synechocystis Δ6-дезатуразния ген. Трансгенните Synechococcus с променени нива на полиненаситени мастни киселини са подобни на дивия тип по темп на растеж и морфология.

Пример 5

Нуклеотидна последователност на Δ6-дезатураза

Определя се нуклеотидната последователност на 1.8 kb фрагмента на cSy75-3.5, включващ функционалния Δ6-дезатуразен ген. Идентифицира се отворен отчитащ контур, кодиращ полипептид от 359 амино киселини (фигура 4). Kyte-Doolittle хидропатиен анализ (Kyte и др. [1982] J. Mol. Biol. 157, 105-132) показва две области на хидрофобни амино киселини, които могат да представляват трансмембранни домени (фигура 1A); освен това, хидропатийния профил на Δ6-дезатуразата е подобен на този на Δ12-дезатуразния ген (фигура 1B; Wada и др.) и на Δ9-дезатуразите (Thiede и др. [1986] J. Biol. Chem. 261, 13230-13235). Подобието на последователностите между Synechocystis Δ6- и Δ12- дезатурази е по-малко от 40% при нуклеотидното ниво и е приблизително 18% при амино-киселинното ниво.

Пример 6

Трансфер на цианобактериална Δ^6-дезатураза в тютюн

Цианобактериалния Δ^6-дезатуразен ген се вкарва в растителен насочващ вектор и се прехвърля в тютюн, като се използва генни методи за трансфер, посредством Agrobacterium среда. За да се осигури, че прехвърлената дезатураза е подходящо внедрена в листа и развиващи се семена и че дезатуразния генен продукт е насочен към ендоплазмения ретикулум или към хлоропласта, се конструират разнообразни насочващи касети с Synechocystis Δ-дезатуразен отворен отчитащ контур (ORF). Компонентите на тези касети са : (i) 35S промотор или семенно-специфичен промотор, извлечен от слънчогледовия хелиантининов ген, за насочване на Δ^6-дезатуразното генно отделяне във всички растителни тъкани или съответно само в развиващите се семена, (ii) предполагаем сигнален пептид от морковен екстензинов ген или от слънчогледов хелиантининов ген, който да насочи ново-синтезираната Δ^6-дезатураза в ER, (iii) ER лумен ограничаваща сигнална последователност (KDEL) в COOH-края на Δ^6-дезатуразния ORF и (iv) оптимизиран транзитен пептид, за насочване на Δ^6-дезатуразата в хлоропласта. 35S промотора е производно на pRTL2, описано от Restrepo и др. (1990). Оптимизираната транзитна пептидна последователност е описана от Van de Broeck и др. (1985). Морковният екстензинов сигнален пептид е описан от Chen и др (1985) EMBO J. 9, 2145.

Получават се трансгенни тютюневи растения, съдържащи химеричен цианобактериален дезатуразен ген, състоящ се от Synechocystis Δ^6-дезатуразния ген свързан с ендоплазмена

ретикулумна ограничаваща последователност (KDEL) и екстенсинов сигнален пептид, движен от CaMV 35S промотор. PCR увеличения на трансгенната тютюнева геномна DNA показват, че Δ^6-дезатуразния ген е вграден в тютюневия геном. Метилови естери на мастна киселина от листата на тези трансгенни тютюневи растения се екстрахират и анализират чрез газ-течна хроматография (GLC). Този трансгенен тютюн акумулира значителни количества GLA (фигура 4). Фигура 4 показва метилови естери на мастна киселина, както са определени, чрез GLC. Пиковете се определят, чрез сравняване на времето за елюиране с известните стандарти за метилов естер на мастна киселина. Съответно, цианобактериални гени, включени в мастно-киселинния метаболизъм, могат да бъдат използвани за да генерират трансгенни растения с променен мастно-кисел състав.

Списък на последователности

(1) Обща информация :

(i) Заявител : Thomas, Terry L.
Reddy, Avutu S.
Nuccio, Michael
Freyssinet, Georges L.

(ii) Заглавие на изобретението : Получаване на гама линоленова киселина чрез делта 6-дезатураза

(iii) Брой последователности : 3

(iv) Адрес за кореспонденция :

(A) Адресант : Scully, Scott, Murphy & Presser
(B) Улица : 400 Garden City Plaza
(C) Град : Garden City
(D) Щат : New York
(E) Държава : САЩ
(F) ZIP код : 11530

(v) Компютърно оборудване

(A) Носител : Флопи диск
(B) Компютър : IBM PC съвместим
(C) Операционна система : PC-DOS/MS-DOS
(D) Софтуер : PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) Данни за описанието

(A) Номер на описанието :
(B) Дата на подаване : 08 януари 1992
(C) Класификация :

(vii) Информация за пълномощника :

(A) Име : McNulty, William E.
(B) Регистрационен номер : 22606
(C) Списъчен номер : 8383Z

(ix) Телекомуникационна информация

(A) Телефон : (516) 742-4343
(B) Телефакс : (516) 742-4366
(C) Телекс : 230 901 SANS UR

(2) Информация за SEQ (последователност) ID NO:1 :

(i) Характеристики на последователността

(A) Дължина : 3588 базови двойки

(B) Тип : нуклеинова киселина

(C) Вид на веригата : и двата вида

(D) Топология : линейна

(ii) Тип молекула : DNA (геномна)

(ix) Особености :

(A) Име/код : CDS

(B) Местонахождение : 2002...3081

(xi) Описание на последователността : SEQ ID NO:1 :

GCTAGCCACC AGTGACGATG CCTTGAATTT GGCCATTCTG ACCCAGGCCC GTATTCTGAA 60

TCCCCGCATT CGCATTGTTA ATCGTTTGTT CAACCATGCC CTGGGTAAAC GTTTAGACAC 120

CACCTTGCCA GACCACGTTA GTTTGAGTGT TTCCGCCCTG GCGGCCCCGA TTTTTTCCTT 180

TGCGGCTTTG GGCAATCAGG CGATCGGGCA ATTGCGTTTG TTTGACCAGA CTTGGCCCAT 240

TCAGGAAATT GTCATTCACC AAGACCATCC CTGGCTCAAT TTACCCCTGG CGGATTTATG 300

GGATGATCCG AGCCGAATGT TGATCTATTA CCTACCGGCC CACAGTGAAA CGGATTTAGT 360

AGGCGCAGTG GTGAATAATT TAACGTTGCA ATCTGGGGAC CATTTAATAG TGGGACAAAA 420

ACCCCAACCC AAGACCAAAC GGCGATCGCC TTGGCGCAAA TTTTCCAAAC TGATTACCAA 480

CCTGCGGGAG TATCAGCGGT ATGTCCAACA GGTGATATGG GTGGTGTTGT TTTTATTGTT 540

GATGATTTTT CTGGCCACCT TCATCTACGT TTCCATTGAT CAACATATTG CCCCAGTGGA 600

CGCGTTGTAT TTTTCCGTGG GCATGATTAC CGGGGCCGGT GGCAAGGAAG AGGTGGCCGA 660

AAAGTCCCCC GATATCATCA AAGTATTCAC AGTGGTGATG ATGATCGCCG GGGCGGGGGT 720

GATTGGTATT TGTTATGCCC TACTGAATGA TTTCATCCTT GGCAGTCGCT TTAGTCAGTT 780

TTTGGATGCG GCCAAGTTAC CCGATCGCCA TCACATCATC ATTTGTGGGC TGGGGGGAGT 840

GAGCATGGCC ATTATTGAAG AGTTAATTCA CCAGGGCCAT GAAATTGTGG TAATCGAAAA 900

GGATACAGAT AATCGTTTCT TGCATACGGC CCGCTCCCTG GGGGTGCCCG TAATTGTGGA 960

GGATGCCCGC CTAGAAAGAA CGTTGGCCTG CGCCAATATC AACCGAGCCG AAGCCATTGT 102

GGTGGCCACC AGCGACGACA CCGTTAACTT GGAAATTGGC CTAACTGCCA AGGCGATCGC 108

CCCTAGCCTG CCAGTGGTGT TGCGTTGCCA GGATGCCCAG TTTAGCCTGT CCCTGCAGGA 114

AGTATTTGAA TTTGAAACGG TGCTTTGTCC GGCGGAATTG GCCACCTATT CCTTTGCGGC 120

GGCGGCCCTG GGGGGCAAAA TTTTGGGCAA CGGCATGACC GATGATTTGC TGTGGGTAGC 126

CCTAGCCACC TTAATCACTC CTAACCATCC CTTTGCCGAC CAATTGGTTA AAATTGCAGC 132

CCAAAAGTCT GATTTCGTTC CCCTCTATCT AGAACGGGGT GGCAAAACCA TCCATAGCTG 138

GGAATTATTG GGTACCCATC TCGACTCTGG AGACGTGTTG TATTTAACCA TGCCCGCCAC 144

TGCCCTAGAG CAACTTTGGC GATCGCCCCG TGCCACTGCT GATCCTCTGG ACTCTTTTTT 150

GGTTTAGCAT GGGGGGATGG AACTCTTGAC TCGGCCCAAT GGTGATCAAG AAAGAACGCT 156

TTGTCTATGT TTAGTATTTT TAAGTTAACC AACAGCAGAG GATAACTTCC AAAAGAAATT 162

AAGCTCAAAA AGTAGCAAAA TAAGTTTAAT TCATAACTGA GTTTTACTGC TAAACAGCGG 168

TGCAAAAAAG TCAGATAAAA TAAAAGCTTC ACTTCGGTTT TATATTGTGA CCATGGTTCC 174

CAGGCATCTG CTCTAGGGAG TTTTTCCGCT GCCTTTAGAG AGTATTTTCT CCAAGTCGGC 180

TAACTCCCCC ATTTTTAGGC AAAATCATAT ACAGACTATC CCAATATTGC CAGAGCTTTG 186

ATGACTCACT GTAGAAGGCA GACTAAAATT CTAGCAATGG ACTCCCAGTT GGAATAAATT 192

TTTAGTCTCC CCCGGCGCTG GAGTTTTTTT GTAGTTAATG GCGGTATAAT GTGAAAGTTT 198

TTTATCTATT TAAATTTATA A ATG CTA ACA GCG GAA AGA ATT AAA TTT ACC 20
Met Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Phe Thr
1 5 10

CAG AAA CGG GGG TTT CGT CGG GTA CTA AAC CAA CGG GTG GAT GCC TAC 207
Gln Lys Arg Gly Phe Arg Arg Val Leu Asn Gln Arg Val Asp Ala Tyr
15 20 25

TTT GCC GAG CAT GGC CTG ACC CAA AGG GAT AAT CCC TCC ATG TAT CTG 212
Phe Ala Glu His Gly Leu Thr Gln Arg Asp Asn Pro Ser Met Tyr Leu
30 35 40

```
AAA ACC CTG ATT ATT GTG CTC TGG TTG TTT TCC GCT TGG GCC TTT GTG  2175
Lys Thr Leu Ile Ile Val Leu Trp Leu Phe Ser Ala Trp Ala Phe Val
        45                  50                  55

CTT TTT GCT CCA GTT ATT TTT CCG GTG CGC CTA CTG GGT TGT ATG GTT  2223
Leu Phe Ala Pro Val Ile Phe Pro Val Arg Leu Leu Gly Cys Met Val
    60                  65                  70

TTG GCG ATC GCC TTG GCG GCC TTT TCC TTC AAT GTC GGC CAC GAT GCC  2271
Leu Ala Ile Ala Leu Ala Ala Phe Ser Phe Asn Val Gly His Asp Ala
 75                  80                  85                  90

AAC CAC AAT GCC TAT TCC TCC AAT CCC CAC ATC AAC CGG GTT CTG GGC  2319
Asn His Asn Ala Tyr Ser Ser Asn Pro His Ile Asn Arg Val Leu Gly
                95                 100                 105

ATG ACC TAC GAT TTT GTC GGG TTA TCT AGT TTT CTT TGG CGC TAT CGC  2367
Met Thr Tyr Asp Phe Val Gly Leu Ser Ser Phe Leu Trp Arg Tyr Arg
            110                 115                 120

CAC AAC TAT TTG CAC CAC ACC TAC ACC AAT ATT CTT GGC CAT GAC GTG  2415
His Asn Tyr Leu His His Thr Tyr Thr Asn Ile Leu Gly His Asp Val
        125                 130                 135

GAA ATC CAT GGA GAT GGC GCA GTA CGT ATG AGT CCT GAA CAA GAA CAT  2463
Glu Ile His Gly Asp Gly Ala Val Arg Met Ser Pro Glu Gln Glu His
    140                 145                 150

GTT GGT ATT TAT CGT TTC CAG CAA TTT TAT ATT TGG GGT TTA TAT CTT  2511
Val Gly Ile Tyr Arg Phe Gln Gln Phe Tyr Ile Trp Gly Leu Tyr Leu
155                 160                 165                 170

TTC ATT CCC TTT TAT TGG TTT CTC TAC GAT GTC TAC CTA GTG CTT AAT  2559
Phe Ile Pro Phe Tyr Trp Phe Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Val Leu Asn
                175                 180                 185

AAA GGC AAA TAT CAC GAC CAT AAA ATT CCT CCT TTC CAG CCC CTA GAA  2607
Lys Gly Lys Tyr His Asp His Lys Ile Pro Pro Phe Gln Pro Leu Glu
            190                 195                 200

TTA GCT AGT TTG CTA GGG ATT AAG CTA TTA TGG CTC GGC TAC GTT TTC  2655
Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ile Lys Leu Leu Trp Leu Gly Tyr Val Phe
        205                 210                 215

GGC TTA CCT CTG GCT CTG GGC TTT TTC ATT CCT GAA GTA TTA ATT GGT  2703
Gly Leu Pro Leu Ala Leu Gly Phe Ser Ile Pro Glu Val Leu Ile Gly
    220                 225                 230
```

GCT TCG GTA ACC TAT ATG ACC TAT GGC ATC GTG GTT TGC ACC ATC TTT 2751
Ala Ser Val Thr Tyr Met Thr Tyr Gly Ile Val Val Cys Thr Ile Phe
235 240 245 250

ATG CTG GCC CAT GTG TTG GAA TCA ACT GAA TTT CTC ACC CCC GAT GGT 2799
Met Leu Ala His Val Leu Glu Ser Thr Glu Phe Leu Thr Pro Asp Gly
255 260 265

GAA TCC GGT GCC ATT GAT GAC GAG TGG GCT ATT TGC CAA ATT CGT ACC 2847
Glu Ser Gly Ala Ile Asp Asp Glu Trp Ala Ile Cys Gln Ile Arg Thr
270 275 280

ACG GCC AAT TTT GCC ACC AAT AAT CCC TTT TGG AAC TGG TTT TGT GGC 2895
Thr Ala Asn Phe Ala Thr Asn Asn Pro Phe Trp Asn Trp Phe Cys Gly
285 290 295

GGT TTA AAT CAC CAA GTT ACC CAC CAT CTT TTC CCC AAT ATT TGT CAT 2943
Gly Leu Asn His Gln Val Thr His His Leu Phe Pro Asn Ile Cys His
300 305 310

ATT CAC TAT CCC CAA TTG GAA AAT ATT ATT AAG GAT GTT TGC CAA GAG 2991
Ile His Tyr Pro Gln Leu Glu Asn Ile Ile Lys Asp Val Cys Gln Glu
315 320 325 330

TTT GGT GTG GAA TAT AAA GTT TAT CCC ACC TTC AAA GCG GCG ATC GCC 3039
Phe Gly Val Glu Tyr Lys Val Tyr Pro Thr Phe Lys Ala Ala Ile Ala
335 340 345

TCT AAC TAT CGC TGG CTA GAG GCC ATG GGC AAA GCA TCG TGACATTGCC 3088
Ser Asn Tyr Arg Trp Leu Glu Ala Met Gly Lys Ala Ser
350 355 360

TTGGGATTGA AGCAAAATGG CAAAATCCCT CGTAAATCTA TGATCGAAGC CTTTCTGTTG 3148

CCCGCCGACC AAATCCCCGA TGCTGACCAA AGGTTGATGT TGGCATTGCT CCAAACCCAC 3208

TTTGAGGGGG TTCATTGGCC GCAGTTTCAA GCTGACCTAG GAGGCAAAGA TTGGGTGATT 3268

TTGCTCAAAT CCGCTGGGAT ATTGAAAGGC TTCACCACCT TTGGTTTCTA CCCTGCTCAA 3328

TGGGAAGGAC AAACCGTCAG AATTGTTTAT TCTGGTGACA CCATCACCGA CCCATCCATG 3388

TGGTCTAACC CAGCCCTGGC CAAGGCTTGG ACCAAGGCCA TGCAAATTCT CCACGAGGCT 3448

AGGCCAGAAA AATTATATTG GCTCCTGATT TCTTCCGGCT ATCGCACCTA CCGATTTTTG 3508

AGCATTTTTG CCAAGGAATT CTATCCCCAC TATCTCCATC CCACTCCCCC GCCTGTACAA 3568

AATTTTATCC ATCAGCTAGC 3588

(2) Информация за SEQ ID NO:2 :

(i) Характеристики на последователността

(A) Дължина : 359 амино киселини

(B) Тип : амино киселина

(D) Топология : линейна

(ii) Тип молекула : протеин

(xi) Описание на последователността : SEQ ID NO:2 :

Met Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Phe Thr Gln Lys Arg Gly Phe Arg
1 5 10 15

Arg Val Leu Asn Gln Arg Val Asp Ala Tyr Phe Ala Glu His Gly Leu
20 25 30

Thr Gln Arg Asp Asn Pro Ser Met Tyr Leu Lys Thr Leu Ile Ile Val
35 40 45

Leu Trp Leu Phe Ser Ala Trp Ala Phe Val Leu Phe Ala Pro Val Ile
50 55 60

Phe Pro Val Arg Leu Leu Gly Cys Met Val Leu Ala Ile Ala Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Ser Phe Asn Val Gly His Asp Ala Asn His Asn Ala Tyr Ser
85 90 95

Ser Asn Pro His Ile Asn Arg Val Leu Gly Met Thr Tyr Asp Phe Val
100 105 110

Gly Leu Ser Ser Phe Leu Trp Arg Tyr Arg His Asn Tyr Leu His His
115 120 125

Thr Tyr Thr Asn Ile Leu GLy His Asp Val Glu Ile His Gly Asp Gly
130 135 140

Ala Val Arg Met Ser Pro Glu Gln Glu His Val Gly Ile Tyr Arg Phe
145 150 155 160

Gln Gln Phe Tyr Ile Trp Gly Leu Tyr Leu Phe Ile Pro Phe Tyr Trp
165 170 175

Phe Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Val Leu Asn Lys Gly Lys Tyr His Asp
180 185 190

His Lys Ile Pro Pro Phe Gln Pro Leu Glu Leu Ala Ser Leu Leu Gly
195 200 205

Ile Lys Leu Leu Trp Leu Gly Tyr Val Phe Gly Leu Pro Leu Ala Leu
210 215 220

Gly Phe Ser Ile Pro Glu Val Leu Ile Gly Ala Ser Val Thr Tyr Met
225 230 235 240

Thr Tyr Gly Ile Val Val Cys Thr Ile Phe Met Leu Ala His Val Leu
245 250 255

Glu Ser Thr Glu Phe Leu Thr Pro Asp Gly Glu Ser Gly Ala Ile Asp
260 265 270

Asp Glu Trp Ala Ile Cys Gln Ile Arg Thr Thr Ala Asn Phe Ala Thr
275 280 285

Asn Asn Pro Phe Trp Asn Trp Phe Cys Gly Gly Leu Asn His Gln Val
290 295 300

Thr His His Leu Phe Pro Asn Ile Cys His Ile His Tyr Pro Gln Leu
305 310 315 320

Glu Asn Ile Ile Lys Asp Val Cys Gln Glu Phe Gly Val Glu Tyr Lys
325 330 335

Val Tyr Pro Thr Phe Lys Ala Ala Ile Ala Ser Asn Tyr Arg Trp Leu
340 345 350

Glu Ala Met Gly Lys Ala Ser
355

(2) Информация за SEQ ID NO:3 :

(i) Характеристики на последователността

(A) Дължина : 1884 базови двойки

(B) Тип : нуклеинова киселина

(C) Вид на веригата : и двата вида

(D) Топология : линейна

(ii) Тип молекула : DNA (геномна)

(xi) Описание на последователността : SEQ ID NO:3 :

AGCTTCACTT CGGTTTTATA TTGTGACCAT GGTTCCCAGG CATCTGCTCT AGGGAGTTTT 60

TCCGCTGCCT TTAGAGAGTA TTTTCTCCAA GTCGGCTAAC TCCCCCATTT TTAGGCAAAA 120

TCATATACAG ACTATCCCAA TATTGCCAGA GCTTTGATGA CTCACTGTAG AAGGCAGACT 180

AAAATTCTAG CAATGGACTC CCAGTTGGAA TAAATTTTTA GTCTCCCCCG GCGCTGGAGT 240

TTTTTTGTAG TTAATGGCGG TATAATGTGA AAGTTTTTTA TCTATTTAAA TTTATAAATG 300

CTAACAGCGG AAAGAATTAA ATTTACCCAG AAACGGGGGT TTCGTCGGGT ACTAAACCAA 360

CGGGTGGATC CCTACTTTGC CGAGCATGGC CTGACCCAAA GGGATAATCC CTCCATGTAT 420

CTGAAAACCC TGATTATTGT GCTCTGGTTG TTTTCCGCTT GGGCCTTTGT GCTTTTTGCT 480

CCAGTTATTT TTCCGGTGCG CCTACTGGGT TGTATGGTTT TGGCGATCGC CTTGGCGGCC 540

TTTTCCTTCA ATGTCGGCCA CGATGCCAAC CACAATGCCT ATTCCTCCAA TCCCCACATC 600

AACCGGCTTC TGGGCATGAC CTACGATTTT GTCGGGTTAT CTAGTTTTCT TTGGCGCTAT 660

CGCCACAACT ATTTGCACCA CACCTACACC AATATTCTTG GCCATGACGT GGAAATCCAT 720

GGAGATGGCG CAGTACGTAT GAGTCCTGAA CAAGAACATG TTGGTATTTA TCGTTTCCAG 780

CAATTTTATA TTTGGGGTTT ATATCTTTTC ATTCCCTTTT ATTGGTTTCT CTACGATGTC 840

TACCTAGTGC TTAATAAAGG CAAATATCAC GACCATAAAA TTCCTCCTTT CCAGCCCCTA 900

GAATTAGCTA GTTTGCTAGG GATTAAGCTA TTATGGCTCG GCTACGTTTT CGGCTTACCT 960

CTGGCTCTGG GCTTTTCCAT TCCTGAAGTA TTAATTGGTG CTTCGGTAAC CTATATGACC 1020

TATGGCATCG TGGTTTGCAC CATCTTTATG CTGGCCCATG TGTTGGAATC AACTGAATTT 1080

CTCACCCCCG ATGGTGAATC CGGTGCCATT GATGACGAGT GGGCTATTTG CCAAATTCGT 1140

ACCACGGCCA ATTTTGCCAC CAATAATCCC TTTTGGAACT GGTTTTGTGG CGGTTTAAAT 1200

CACCAAGTTA CCCACCATCT TTTCCCCAAT ATTTGTCATA TTCACTATCC CCAATTGGAA 1260

AATATTATTA AGCATGTTTG CCAAGAGTTT GGTGTGGAAT ATAAAGTTTA TCCCACCTTC 1320

AAAGCGGCGA TCGCCTCTAA CTATCGCTGG CTAGAGGCCA TGGGCAAAGC ATCGTGACAT 1380

TGCCTTGGGA TTGAAGCAAA ATGGCAAAAT CCCTCGTAAA TCTATGATCG AAGCCTTTCT 1440

GTTGCCCGCC GACCAAATCC CCGATGCTGA CCAAAGGTTG ATGTTGGCAT TGCTCCAAAC 150

CCACTTTGAG GGGGTTCATT GGCCGCAGTT TCAAGCTGAC CTAGGAGGCA AAGATTGGGT 156

GATTTTGCTC AAATCCGCTG GGATATTGAA AGGCTTCACC ACCTTTGGTT TCTACCCTGC 162

TCAATGGGAA GGACAAACCG TCAGAATTGT TTATTCTGGT GACACCATCA CCGACCCATC 168

CATGTGGTCT AACCCAGCCC TGGCCAAGGC TTGGACCAAG GCCATGCAAA TTCTCCACGA 174

GGCTAGGCCA GAAAAATTAT ATTGGCTCCT GATTTCTTCC GGCTATCTCA CCTACCGATT 180

TTTGAGCATT TTTGCCAAGG AATTCTATCC CCACTATCTT CATCCCACTC CCCCGCCTGT 186

ACAAAATTTT ATCCATCAGC TAGC 1354

Патентни претенции :

1. Изолирана нуклеинова киселина, кодираща бактериална Δ6-дезатураза.

2. Нуклеиновата киселина от претенция 1, съдържаща нуклеотидите от SEQ. ID NO:3.

3. Изолирана нуклеинова киселина, която кодира аминокиселинната последователност кодирана от нуклеиновата киселина от претенция 1.

4. Изолираната нуклеинова киселина, съгласно която и да е претенция 1-3, където споменатата нуклеинова киселина се съдържа във вектор.

5. Изолираната нуклеинова киселина от претенция 4, функционално свързана с промотор и/или ограничаващ сигнал, способен да осъществи насочването на генния продукт на споменатата изолирана нуклеинова киселина.

6. Изолираната нуклеинова киселина от претенция 5, където споменатия промотор е Δ6-дезатуразен промотор, Anabaena карбоксилазен промотор, хелиантининов промотор, глицинов промотор, напинов промотор или хелиантининов тъканно-специфичен промотор.

7. Изолираната нуклеинова киселина от претенция 5, където споменатия ограничаващ сигнал е Synechocystis ограничаващ сигнал, нопалинов синтазен ограничаващ сигнал или семенен ограничаващ сигнал.

8. Изолираната нуклеинова киселина, съгласно която и да е от претенции 1-7, където споменатата изолирана нуклеинова киселина се съдържа в трансгенен организъм.

9. Изолиранат нуклеинова киселина, съгласно претенция 8, където споменатия трансгенен организъм е бактерия, гъба, растителна клетка или животно.

10. Растение или потомство на това растение, което е регенерирано от трансгенната растителна клетка от претенция 9.

11. Растението, съгласно претенция 10, което е слънчоглед, соя, царевица, тютюн, фъстък или маслодайна рапица.

12. Метод за получаване на растение с увеличено съдържание на гама линоленова киселина (GLA), който включва:

(а) трансформиране на растителна клетка с изолираната нуклеинова киселина, съгласно която и да е от претенции 1-7; и

(в) регенериране на растение с увеличено съдържание на GLA от споменатата растителна клетка.

13. Метод съгласно претенция 12, където споменатото растение е слънчоглед, соя, царевица, тютюн, фъстък или маслодайна рапица.

14. Метод за предизвикване получаването на гама линоленова киселина (GLA) в организъм с недостатъчна или липсваща GLA, който включва трансформиране на споменатия организъм с изолираната нуклеинова киселина от която и да е от претенции 1-7.

15. Метод за предизвикване получаването на гама линоленова киселина (GLA) в организъм с недостатъчна или липсваща GLA и линолова киселина (LA), който включва трансформиране на споменатия организъм с изолирана нуклеинова киселина, кодираща бактериална Δ6-дезатураза и изолирана нуклеинова киселина, кодираща Δ12-дезатураза.

16. Метод за предизвикване получаването на гама линоленова киселина (GLA) в организъм с недостатъчна или липсваща GLA и линолова киселина (LA), който включва трансформиране на споменатия организъм с най-малко един насочващ вектор, включващ изолирана нуклеинова киселина, кодираща бактериална

Δ6-дезатураза и изолирана нуклеинова киселина, кодираща Δ12-дезатураза.

17. Метод, съгласно което и да е от претенции 15 или 16, където споменатата изолирана нуклеинова киселина, кодираща Δ6-дезатураза, включва нуклеотиди 317 до 1507 от SEQ. ID NO:1.

18. Метод за предизвикване получаването на октадекатетраеонна киселина в организъм с недостатъчна или липсваща гама линоленова киселина, който се състои в трансформиране на споменатия организъм с изолирана нуклеинова киселина, съгласно което и да е от претенции 1 до 7.

19. Метод, съгласно претенция 18, където споменатия организъм е бактерия, гъба, растение или животно.

20. Метод за използване на изолираната нуклеинова киселина, съгласно което и да е от претенции 1 до 7, за получаване на растение с подобрена студоустойчивост, който включва :

а) трансформиране на растителна клетка с изолираната нуклеинова киселина от което и да е от претенции 1 до 7; и

б) регенериране на споменатото растение с подобрена студоустойчивост от споменатата трансформирана растителна клетка.

21. Метод, съгласно претенция 20, където споменатото растение е слънчоглед, соя, царевица, тютюн, фъстък или маслодайна рапица.

22. Изолирана бактериална Δ6-дезатураза.

23. Изолираната бактериална Δ6-дезатураза, съгласно претенция 22, притежаваща амино-киселинна последователност от SEQ ID NO:2.

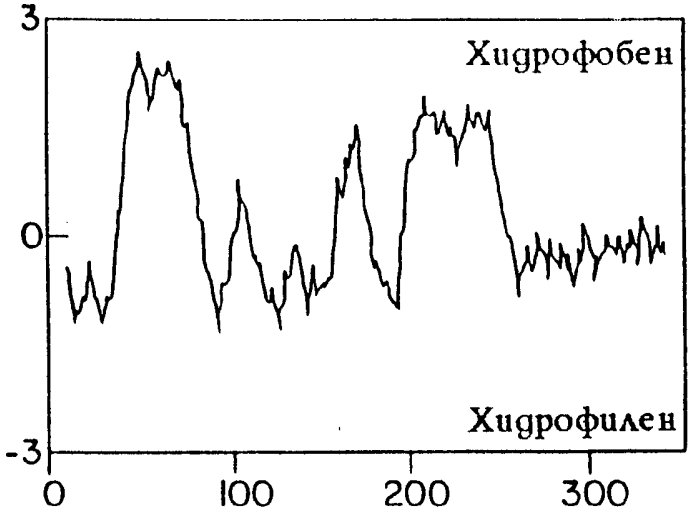

3
0
-3
Хидрофобен
Хидрофилен
0
100
200
300

FIG. IA

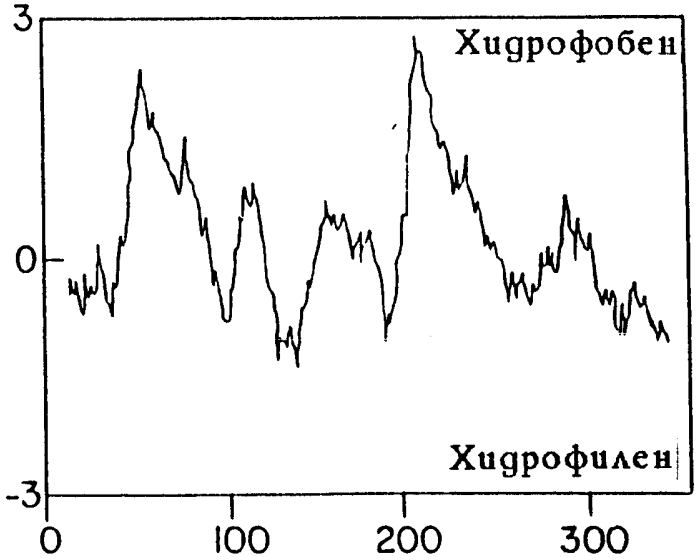

3
0
-3
Хидрофобен
Хидрофилен
0
100
200
300

FIG. IB

FIG. 2A

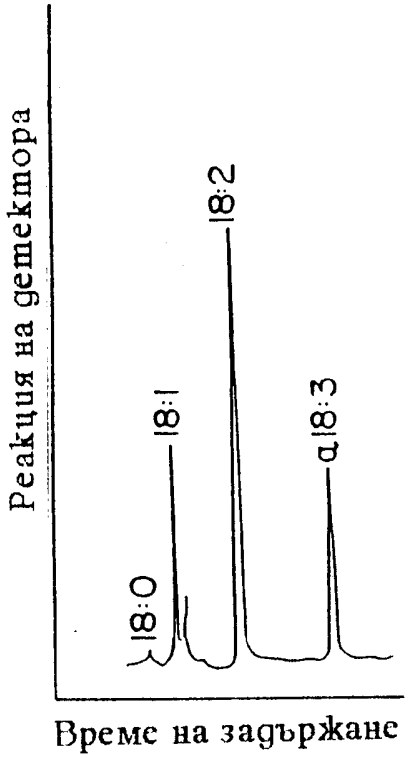
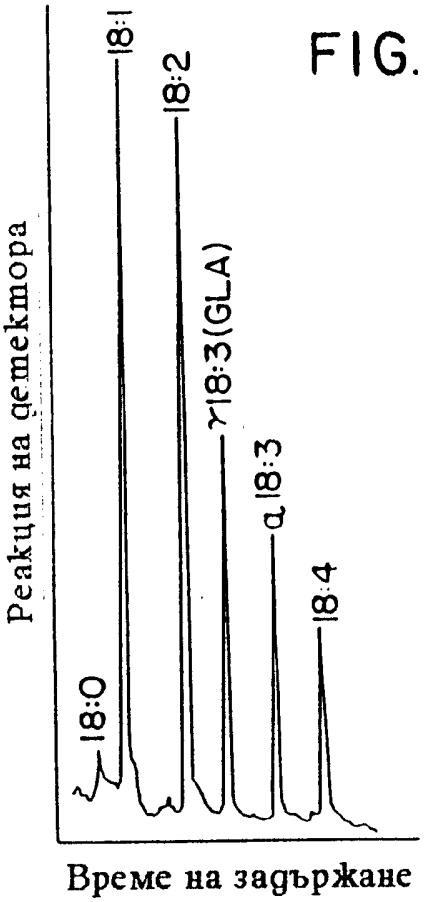


FIG. 2B



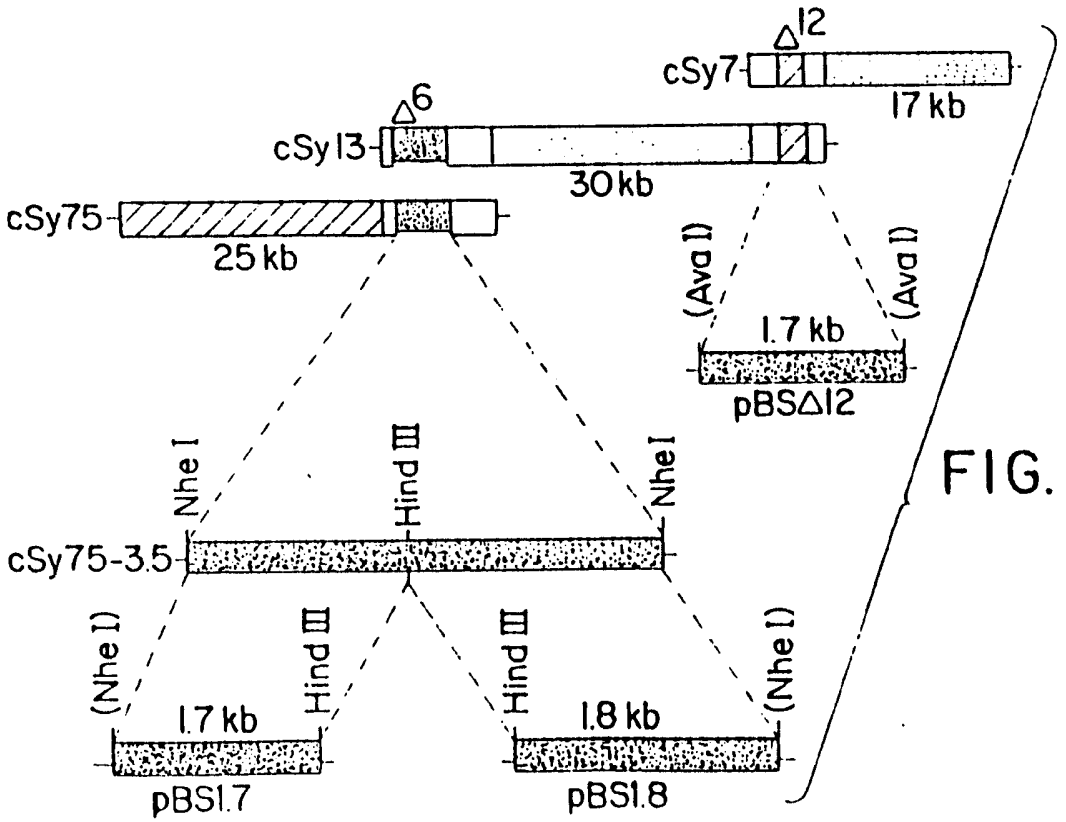


FIG. 3

Метилови естери на мастна киселина от листа на тютюн (див тип)

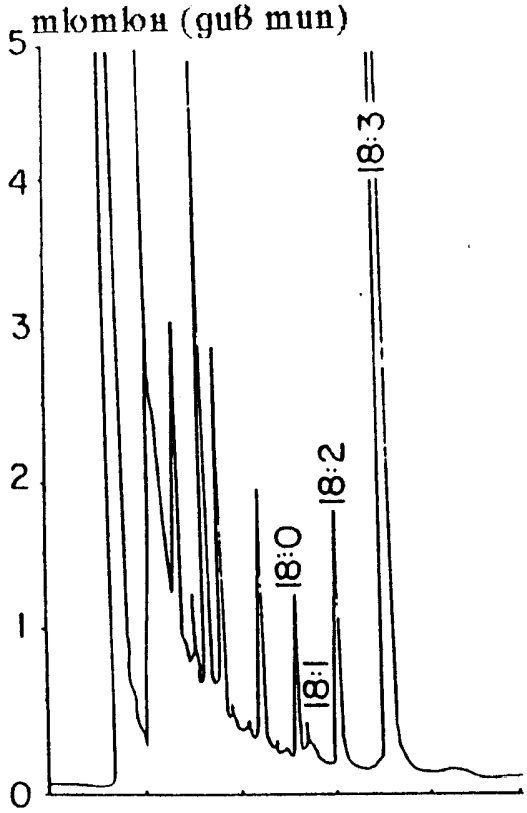


FIG. 4A

Метилови естери на мастна киселина от трансгенна тютюнева (+Δ6)дезатураза

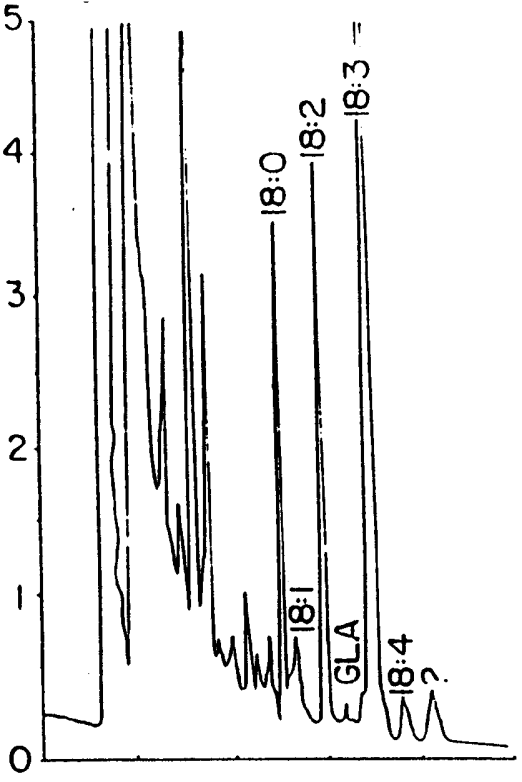


FIG. 4B