УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **127917** (13) **C2**

(51) МПК (2024.01)
A01H 5/00
C11B 1/10 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ "УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2018 03576**

(22) Дата подання заявки: **14.06.2013**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **15.02.2024**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/660,392, 61/663,344, 61/697,676, 61/782,680**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **15.06.2012, 22.06.2012, 06.09.2012, 14.03.2013**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US, US, US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **27.08.2018, Бюл.№ 16**

(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **14.02.2024, Бюл.№ 7**

(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21): **, a201500277, 14.06.2013**

(72) Винахідник(и):
Петрі Джеймс Робертсон (AU),
Сінгх Суріндер Пал (AU),
Де Фейтер Роберт Чарльз (AU)

(73) Володілець (володільці):
КОММОНВЕЛТ САЙНТІФІК ЕНД ІНДАСТРІЕЛ РІСЕРЧ ОРГАНІЗЕЙШН,
Clunies Ross St, Acton, Australian Capital Territory 2601, Australia (AU),
ГРЕЙНЗ РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КОРПОРЕЙШН,
Level 4, 4 National Circuit, Barton, Australian Capital Territory 2600, Australia (AU),
НУСІД НУТРІШИНЕЛ ОСТРЕЛІА ПТІ ЛТД,
103-109 Pipe Road, Laverton North, Victoria 3026, Australia (AU)

(74) Представник:
Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2005/103253 A1, 03.11.2005
WO 2010/057246 A1, 27.05.2010
WO 2004/101757 A2, 25.11.2004
US 2011/0039010 A1, 17.02.2011
WO 2009/017821 A1, 05.02.2009
WO 2013/016546 A2, 31.01.2013
Xue-Rong Zhou, Stanley S. Robert, James R. Petrie et al. Isolation and characterization of genes from the marine microalga Pavlova salina encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis. Phytochemistry. 2007. vol. 68. No. 6. P. 785 - 796 URL: https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.12.016 (дата звернення 03.10.2023)
James R. Petrie, Surinder P. Singh. Expanding the docosahexaenoic acid food web for sustainable production: engineering lower plant pathways into higher plants. AoB PLANTS. 2011. plr011. P. 1-11 URL: https://doi.org/10.1093/aobpla/plr011 (дата звернення 03.10.2023)

UA 127917 C2

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Guohai Wu, Martin Truksa, Nagamani Datla et al. Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. Nat. Biotechnol. 2005. vol. 23. No. 8. P. 1013 – 1017 URL: https://doi.org/10.1038/nbt1107 (дата звернення 03.10.2023)
Robert Stanley S. et al. Isolation and characterisation of a Δ5-fatty acid elongase from the marine microalga Pavlova salina. Marine biotechnology. 2009. No. 11. P. 410-418 URL: https://doi.org/10.1007/s10126-008-9157-y (дата звернення 03.10.2023)
Ryckebosch Eline et al. Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. Lipid Technology. 2012. Vol. 24. No. 6. P. 128-130 URL: https://doi.org/10.1002/lite.201200197 (дата звернення 03.10.2023)
Ruiz-Lopez Noemi et al. Enhancing the accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic Arabidopsis thaliana via iterative metabolic engineering and genetic crossing. Transgenic Res. 2012. Vol. 21. No. 6. P. 1233-1243 URL: https://doi.org/10.1007/s11248-012-9596-0 (дата звернення 03.10.2023)
Petrie J. R. et al. Rapid expression of transgenes driven by seed-specific constructs in leaf tissue: DHA production. Plant Methods. 2010. Vol. 6. No. 8. P. 1-6 URL: https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-8 (дата звернення 03.10.2023)
Lin Li et al. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. Vol. 100. No. 10. P. 5962-6

(54) РЕКОМБІНАНТНА КЛІТИНА BRASSICA NAPUS, ЯКА МІСТИТЬ ДОВГОЛАНЦЮГОВІ ПОЛІНЕНАСИЧЕНІ ЖИРНІ КИСЛОТИ, ТРАНСГЕННА РОСЛИНА ТА НАСІННЯ BRASSICA NAPUS, СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЕКСТРАГОВАНОГО ЛІПІДУ РОСЛИН, ХАРЧОВОГО ПРОДУКТУ ТА ЕТИЛОВОГО ЕФІРУ ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ

(57) Реферат:

Винахід стосується рекомбінантної клітини *Brassica napus*, яка містить екзогенні полінуклеотиди, які кодують Δ12-десатуразу, ω3-десатуразу або Δ15-десатуразу, Δ6-десатуразу, Δ5-десатуразу, Δ4-десатуразу, Δ6-елонгазу і Δ5-елонгазу, трансгенної рослини *Brassica napus*, трансгенного насіння трансгенної рослини *Brassica napus*, способу отримання та очищення екстрагованого ліпіду рослин, макухи отриманої з насіння, способу отримання харчового продукту та етилового ефіру поліненасичених жирних кислот.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Цей винахід належить до способів синтезу довголанцюгових поліненасичених жирних кислот, особливо докозагексаєнової кислоти, в рекомбінантних рослинних клітинах.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Довголанцюгові омега-3 поліненасичені жирні кислоти (ДЛ-ПНЖК) на сьогоднішній день широко визнані як важливі сполуки для здоров'я людини і тварин. Вказані жирні кислоти можуть бути одержані з харчових джерелом або шляхом перетворення лінолевої (ЛК, 18:2ω6) або α-ліноленової (АЛК, 18:3ω3) жирних кислот, обидві з яких розглядаються як незамінні жирні кислоти в раціоні людини. Хоча людина і багато інших хребетних тварин можуть перетворювати ЛК або АЛК, одержані з рослинних джерел, на С22, вони здійснюють таке перетворення з дуже низькою швидкістю. Крім того, більшості сучасних суспільств властиве незбалансоване харчування, в якому щонайменше 90 % поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) складають ω6 жирні кислоти, замість співвідношення 4:1 або менше для ω6:ω3 жирних кислот, яке вважається ідеальним (Trautwein, 2001). Безпосереднім харчовим джерелом ДЛ-ПНЖК, наприклад, ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК, 20:5ω3) і докозагексаєнової кислоти (ДГК, 22:6ω3) для людини, в основному, є риба або риб'ячий жир. Таким чином, медичні працівники рекомендують регулярно включати рибу до раціону людини, що містить значні рівні ДЛ-ПНЖК. Все частіше ДЛ-ПНЖК, одержані з риб'ячого жиру, вводять, наприклад, в харчові продукти і дитяче харчування. Однак за рахунок зменшення глобального і національного вилову риби, необхідні альтернативні джерела вказаних жирів, що проявляють позитивний вплив на здоров'я.

Квіткові рослини, на противагу тваринам, не володіють здатністю синтезувати поліненасичені жирні кислоти з довжиною ланцюга більше 18 атомів вуглецю. Зокрема, культивовані і садові рослини разом з іншими покритонасінними не мають ферментів, необхідних для синтезу ω3 жирних кислот з довшим ланцюгом, наприклад, ЕПК, докозапентаєнової кислоти (ДПК, 22:5ω3) і ДГК, одержаних з АЛК. Важливою метою в біотехнології рослин, таким чином, є створення культивованих рослин, що продукують значні кількості ДЛ-ПНЖК, таким чином забезпечуючи альтернативне джерело цих сполук.

Шляхи біосинтезу ДЛ-ПНЖК

Біосинтез ДЛ-ПНЖК в організмах, таких як мікроводорості, мохи і гриби, звичайно відбувається як серія реакцій кисень-залежної десатурації і елонгації (Фіг. 1). Найпоширеніший шлях одержання ЕПК у вказаних організмах включає Δ6-десатурацію, Δ6-елонгацію і Δ5-десатурацію (має назву шляху Δ6-десатурації), тоді як в менш поширеному шляху використовується Δ9-елонгація, Δ8-десатурація і Δ5-десатурація (має назву шляху Δ9-десатурації). Вказані послідовні реакції десатурації і елонгації можуть починатися із субстрату ω6 жирної кислоти ЛК, схематично проілюстрованого у верхній лівій частині Фіг. 1 (ω6) або субстрату ω3 АЛК до ЕПК, проілюстрованого на нижній правій частині Фіг. 1 (ω3). Якщо початкова Δ6-десатурація здійснюється на субстраті ω6 ЛК, продукт серії із трьох ферментів ДЛ-ПНЖК буде ω6 жирною арахідоновою кислотою (АРК). Організми, які синтезують ДЛ-ПНЖК, можуть перетворювати ω6 жирні кислоти на ω3 жирні кислоти з використанням ω3-десатурази, що проілюстровано як стадія Δ17-десатурази на Фіг. 1, для перетворення арахідонової кислоти (АРК, 20:4ω6) на ЕПК. Деякі члени родини ω3-десатурази можуть впливати на різні субстрати, що варіюють від ЛК до АРК. Рослинні ω3-десатурази часто специфічно каталізують Δ15-десатурацію ЛК до АЛК, тоді як грибкові і дріжджові ω3-десатурази можуть бути специфічними по відношенню до Δ17-десатурації АРК до ЕПК (Pereira et al., 2004a; Zank et al., 2005). Деякі звіти наводять на думку про те, що можуть існувати неспецифічні ω3-десатурази, які можуть перетворювати широкий спектр ω6 субстратів на відповідні ω3 продукти (Zhang et al., 2008).

Перетворення ЕПК на ДГК в таких організмах відбувається шляхом Δ5-елонгації ЕПК з утворенням ДПК, після чого слідує Δ4-десатурація з утворенням ДГК (Фіг. 1). І навпаки, ссавці використовують так званий шлях "Шпрехера", в якому ДПК перетворюється на ДГК в ході трьох окремих реакцій, незалежних від Δ4-десатурази (Sprecher et al., 1995).

Front-end десатурази, загалом знайдені в рослинах, мохах, мікроводоростях і нижчих тваринах, наприклад, Caenorhabditis elegans, в основному приймають субстрати жирних кислот, естерифікованих в положенні sn-2 фосфатидилхолінового (ФХ) субстрату. Вказані десатурази, таким чином, відомі як ацил-ФХ, зв'язані з ліпідом, front-end десатурази (Domergue et al., 2003). І навпаки, front-end десатурази вищих тварин загалом приймають субстрати ацил-КоА, де жирнокислотний субстрат зв'язаний з КоА замість ФХ (Domergue et al., 2005). Відомо, що деякі десатурази мікроводоростей і одна рослинна десатураза використовують жирнокислотні субстрати, естерифіковані до КоА (Табл. 2).

Кожна реакція елонгації ПНЖК складається з чотирьох стадій, що каталізуються багатокомпонентним білковим комплексом: спочатку, реакція конденсації приводить до

додавання модуля 2С з малоніл-КоА до жирної кислоти, результатом чого є утворення β-кетоацильної проміжної сполуки. Далі вона відновлюється НАДФ-Н, з подальшою дегідратацією і утворенням єноїльної проміжної сполуки. Вкінці ця проміжна сполука повторно відновлюється з утворенням подовженої жирної кислоти. Загалом, вважається, що стадія конденсації в числі вказаних чотирьох реакцій є специфічною для субстрату, а інші стадії - ні. На практиці це означає, що природний апарат елонгації рослини здатний до елонгації ПНЖК, за умови, що введений конденсаційний фермент (звичайно під назвою "елонгаза"), специфічний по відношенню до ПНЖК, хоча ефективність природного апарату елонгації рослини з точки зору елонгації неприродних субстратів ПНЖК може бути низькою. У 2007 році була опублікована інформація щодо ідентифікації та опису циклу елонгації дегідратази дріжджів (Denic and Weissman, 2007).

Десатурація ПНЖК в рослинах, мохах і мікроводоростях природним чином відбувається на жирнокислотних субстратах, в основному, в пулі ацил-ФХ, тоді як елонгація відбувається на субстратах в пулі ацил-КоА. Перенесення жирних кислот від молекул ацил-ФХ до носія КоА здійснюється фосфоліпазами (ФЛА), тоді як перенесення жирних кислот ацил-КоА до носія ФХ здійснюється лізофосфатидил-холін ацилтрансферазами (ЛФХАТ) (Фіг. 21) (Singh et al., 2005).

Сконструйоване продукування ДЛ-ПНЖК

Велика частина метаболічного конструювання ДЛ-ПНЖК здійснювалася з використанням аеробного шляху Δ6-десатурація/елонгація. Про біосинтез γ-ліноленової кислоти (ГЛК, 18:3ω6) в тютюні з використанням Δ6-десатурази із ціанобактерії Synechocystis вперше повідомлялося в 1996 році (Reddy and Thomas, 1996). Пізніше ГЛК була одержана в культивованих рослинах, таких як сафлор (73 % ГЛК в олії з насіння; Knauf et al., 2006) і соя (28 % ГЛК; Sato et al., 2004). Продукування ДЛ-ПНЖК, наприклад, ЕПК і ДГК, включає складніше конструювання за рахунок збільшення кількості залучених стадій десатурації та елонгації. Про продукування ЕПК в наземній рослині вперше повідомлялося Qi et al. (2004), які ввели гени, що кодують Δ9-елонгазу з Isochrysis galbana, Δ8-десатуразу з Euglena gracilis і Δ5-десатуразу з Mortierella alpina в Arabidopsis з одержанням до 3 % ЕПК. Ця робота була продовжена Abbadi et al. (2004), які повідомляли про продукування до 0,8 % ЕПК в насінні льону з використанням генів, що кодують Δ6-десатуразу і Δ6-елонгазу з Physcomitrella patens і Δ5-десатуразу з Phaeodactylum tricornutum.

Перший звіт про одержання ДДЛ-ДГК, і на сьогоднішній день найвищих зареєстрованих рівнів ПНЖК з дуже довгим ланцюгом, міститься у WO 04/017467, в якій розкрито продукування 3 % ДГК у зародках сої, але не насінні, шляхом введення генів, що кодують Δ6-десатуразу Saprolegnia diclina, Δ6-десатуразу Mortierella alpina, Δ5-десатуразу Mortierella alpina, Δ4-десатуразу Saprolegnia diclina, Δ17-десатуразу Saprolegnia diclina, Δ6-елонгазу Mortierella alpina та Δ5-елонгазу Pavlova lutheri. Максимальний рівень ЕПК в ембріонах, які також продукують ДГК, становив 19,6 %, вказуючи на низьку ефективність перетворення ЕПК на ДГК (WO 2004/071467). Це відкриття було подобнім до опублікованого Robert et al. (2005), де вихід перетворення ЕПК на ДГК був низьким, з продукуванням 3 % ЕПК і 0,5 % ДГК в Arabidopsis з використанням Δ5/6-десатурази Danio rerio, Δ6-елонгази Caenorhabditis elegans та Δ5-елонгази і Δ4-десатурази Pavlova salina. Крім того, в 2005 році Wu et al. опублікували повідомлення щодо продукування 25 % АРК, 15 % ЕПК і 1,5 % ДГК у Brassica juncea з використанням Δ6-десатурази Pythium irregulare, Δ5-десатурази Thraustochytrid, Δ6-елонгази Physcomitrella patens, Δ12-десатурази Calendula officinalis, Δ5-елонгази Thraustochytrid, Δ17-десатурази Phytophthora infestans, елонгази ДЦ-ПНЖК Oncorhyncus mykiss, Δ4-десатурази Thraustochytrid і ЛФХАТ Thraustochytrid (Wu et al., 2005). Короткий опис зусиль з одержання врожаю насіння олійних культур, яке синтезує ω3 ДЛ-ПНЖК, наведений у Venegas-Caleron et al. (2010) і Ruiz-Lopez et al. (2012). Як вказано Ruiz-Lopez et al. (2012), на дату публікації результати з одержання ДГК у трансгенних рослинах навіть віддалено не нагадують рівнів, що спостерігаються в риб'ячому жирі.

Таким чином, залишається потреба в ефективнішому продукуванні ДЛ-ПНЖК в рекомбінантних клітинах, зокрема ДГК в насінні рослин олійних культур.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Авторами цього винаходу ідентифіковані способи і рослини для одержання ліпіду з високими рівнями ДГК.

У першому аспекті цього винаходу розкривається екстрагований рослинний ліпід, що містить жирні кислоти в естерифікованій формі, причому жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), та необов'язково одну або більше із стеаридонової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) та ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), при тому, що

рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить приблизно 7–20 %.

У варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід має одну або більше, або всі наступні ознаки:

i) рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 2 % до 18 %, від приблизно 2 % до 16 % або від приблизно 2 % до 15 %,

ii) рівень міристинової кислоти (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 6 %, менше, ніж приблизно 3 %, менше, ніж приблизно 2 % або менше, ніж приблизно 1 %,

iii) рівень олеїнової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 1 % до приблизно 30 %, від приблизно 3 % до приблизно 30 %, від приблизно 6 % до приблизно 30 %, від 1 % до приблизно 20 %, від приблизно 30 % до приблизно 60 %, від приблизно 45 % до приблизно 60 % або становить приблизно 30 %,

iv) рівень лінолевої кислоти (ЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 35 %, від приблизно 4 % до приблизно 20 % або від приблизно 4 % до 17 %,

v) рівень α-ліноленової кислоти (АЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 40 %, від приблизно 7 % до приблизно 40 %, від приблизно 10 % до приблизно 35 %, від приблизно 20 % до приблизно 35 %, від приблизно 4 % до приблизно 16 % або від приблизно 2 % до приблизно 16 %,

vi) рівень γ-ліноленової кислоти (ГЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, менше, ніж приблизно 2 %, менше, ніж приблизно 1 %, менше, ніж приблизно 0,5 %, від 0,05 % до приблизно 7 %, від 0,05 % до приблизно 4 %, від 0,05 % до приблизно 3 % або від 0,05 % до приблизно 2 %,

vii) рівень стеаридонової кислоти (СДК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 7 %, менше, ніж приблизно 6 %, менше, ніж приблизно 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 7 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 6 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 4 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 3 %, або від 0,05 % до приблизно 2 %,

viii) рівень ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 6 %, менше, ніж приблизно 5 %, менше, ніж приблизно 4 %, менше, ніж приблизно 1 %, менше, ніж приблизно 0,5 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 6 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 5 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 4 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 3 % або від приблизно 0,05 % до приблизно 2 %,

ix) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕТрК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 4 %, менше, ніж приблизно 2 %, менше, ніж приблизно 1 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 4 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 3 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 2 % або від приблизно 0,05 % до приблизно 1 %,

x) рівень ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, менше, ніж приблизно 2 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 10 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 5 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 3 % або від приблизно 0,05 % до приблизно 2 %,

xi) рівень докозапентаєнової кислоти (ДПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, менше, ніж приблизно 2 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 8 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 5 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 3 % або від приблизно 0,05 % до приблизно 2 %,

xii) рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить приблизно 8 %, приблизно 9 %, приблизно 10 %, приблизно 11 %, приблизно 12 %, приблизно 13 %, приблизно 14 %, приблизно 15 %, приблизно 16 %, приблизно 17 %, приблизно 18 %, від приблизно 8 % до 20 %, від приблизно 10 % до 20 %, від приблизно 11 % до 20 %, від приблизно 10 % до приблизно 16 % або від приблизно 14 % до 20 %,

xiii) ліпід містить ω6-докозапентаєнову кислоту ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xiv) ліпід по суті не містить ω6-докозапентаєновой кислоти ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xv) ліпід по суті не містить СДК, ЕПК і ЕТК серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xvi) рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 25 %, від приблизно 4 % до приблизно 20 %, від приблизно 6 % до приблизно 20 %, від приблизно 4 % до приблизно 60 %, від приблизно 30 % до приблизно 60 % або від приблизно 45 % до приблизно 60 %,

xvii) рівень загальних мононенасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 35 %, від приблизно 8 % до приблизно 25 % або від 8 % до приблизно 22 %,

xviii) рівень загальних поліненасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 20 % до приблизно 75 %, від приблизно 50 % до приблизно 75 % або від приблизно 60 % до приблизно 75 %,

xix) рівень загальних ω6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 35 % до приблизно 50 %, від приблизно 20 % до приблизно 35 %, від приблизно 6 % до 20 %, менше, ніж приблизно 20 %, менше, ніж приблизно 16 %, менше, ніж приблизно 10 %, від приблизно 1 % до приблизно 16 %, від приблизно 2 % до приблизно 10 % або від приблизно 4 % до приблизно 10 %,

xx) рівень нових ω6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 10 %, менше, ніж приблизно 8 %, менше, ніж приблизно 6 %, менше, ніж 4 %, від приблизно 1 % до приблизно 20 %, від приблизно 1 % до приблизно 10 %, від приблизно 0,5 % до приблизно 8 % або від приблизно 0,5 до 4 %,

xxi) рівень загальних ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 36 % до приблизно 65 %, від приблизно 40 % до приблизно 60 %, від приблизно 20 % до приблизно 35 %, від приблизно 10 % до приблизно 20 %, приблизно 25 %, приблизно 30 %, приблизно 35 % або приблизно 40 %,

xxii) рівень нових ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 9 % до приблизно 33 %, від приблизно 10 % до приблизно 20 %, від приблизно 20 % до приблизно 30 %, від приблизно 12 % до приблизно 25 %, приблизно 13 %, приблизно 15 %, приблизно 17 % або приблизно 20 %,

xxiii) співвідношення загальних ω6 жирних кислот : загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 1,0 до приблизно 3,0, від приблизно 0,1 до приблизно 1, від приблизно 0,1 до приблизно 0,5, менше, ніж приблизно 0,50, менше, ніж приблизно 0,40, менше, ніж приблизно 0,30, менше, ніж приблизно 0,20, менше, ніж приблизно 0,15, приблизно 1,0, приблизно 0,1 або приблизно 0,2,

xxiv) співвідношення нових ω6 жирних кислот : нових ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 1,0 до приблизно 3,0, від приблизно 0,1 до приблизно 1, від приблизно 0,1 до приблизно 0,5, менше, ніж приблизно 0,50, менше, ніж приблизно 0,40, менше, ніж приблизно 0,30, менше, ніж приблизно 0,20, менше, ніж приблизно 0,15, приблизно 0,1, приблизно 0,2 або приблизно 1,0,

xxv) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією Δ12-десатурази щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 %, від приблизно 60 % до приблизно 98 %, від приблизно 70 % до приблизно 95 % або від приблизно 75 % до приблизно 90 %,

xxvi) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення АЛК на СДК під дією Δ6-десатурази щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, від приблизно 30 % до приблизно 70 %, від приблизно 35 % до приблизно 60 % або від приблизно 50 % до приблизно 70 %,

xxvii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення СДК на кислоту ЕТК під дією Δ6-елонгази щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 75 %, від приблизно 60 % до приблизно 95 %, від приблизно 70 % до приблизно 88 % або від приблизно 75 % до приблизно 85 %,

xxviii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення ЕТК на ЕПК під дією Δ5-десатурази щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 75 %, від приблизно 60 % до приблизно 99 %, від приблизно 70 % до приблизно 99 % або від приблизно 75 % до приблизно 98 %,

xxix) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення ЕПК на ДПК під дією Δ5-елонгази щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, від приблизно 50 % до приблизно 95 % або від приблизно 85 % до приблизно 95 %,

xxx) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення ДПК на ДГК під дією Δ4-десатурази щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше

приблизно 93 %, від приблизно 50 % до приблизно 95 %, від приблизно 80 % до приблизно 95 % або від приблизно 85 % до приблизно 95 %,

xxxi) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДГК щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, від приблизно 10 % до приблизно 50 %, від приблизно 10 % до приблизно 30 % або від приблизно 10 % до приблизно 25 %,

xxxii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення ЛК на ДГК щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 22 %, щонайменше приблизно 25 %, від приблизно 15 % до приблизно 50 %, від приблизно 20 % до приблизно 40 % або від приблизно 20 % до приблизно 30 %,

xxxiii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення АЛК на ДГК щонайменше приблизно 17 %, щонайменше приблизно 22 %, щонайменше приблизно 24 %, від приблизно 17 % до приблизно 55 %, від приблизно 22 % до приблизно 35 % або від приблизно 24 % до приблизно 35 %,

xxxiv) загальні жирні кислоти в екстрагованому ліпіді містять менше, ніж 1 % C20:1,

xxxv) вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше 95 %, від приблизно 70 % до приблизно 99 % або від приблизно 90 % до приблизно 99 %,

xxxvi) ліпід містить діацилгліцерол (ДАГ),

xxxvii) ліпід містить менше, ніж приблизно 10 %, менш ніж приблизно 5 %, менше, ніж приблизно 1 % або від приблизно 0,001 % до приблизно 5 % вільних (неестерифікованих) жирних кислот та/або фосфоліпіду, або по суті не містить їх,

xxxviii) щонайменше 70 % або щонайменше 80 % естерифікованої ДГК у формі ТАГ знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ,

xxxix) в ліпіді найпоширенішими видами ТАГ, що містять ДГК, є ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12), і

xl) ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18).

В іншому варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід знаходиться у формі олії, причому ліпід становить щонайменше приблизно 90 %, або щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 98 % або від приблизно 95 % до приблизно 98 мас. % олії.

У переважному варіанті реалізації винаходу ліпід або олія, переважно олія з насіння, має наступні ознаки: у загальному вмісті жирних кислот ліпіду або олії рівень ДГК становить від приблизно 7 % до 20 %, рівень пальмітинової кислоти становить від приблизно 2 % до приблизно 16 %, рівень міристинової кислоти становить менше, ніж приблизно 6 %, рівень олеїнової кислоти становить від приблизно 1 % до приблизно 30 %, рівень ЛК становить від приблизно 4 % до приблизно 35 %, АЛК присутня, ГЛК присутня, рівень СДК становить від приблизно 0,05 % до приблизно 7 %, рівень ЕТК становить менше, ніж приблизно 4 %, рівень ЕПК становить від приблизно 0,05 % до приблизно 10 %, рівень ДПК становить від приблизно 0,05 % до приблизно 8 %, рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 25 %, рівень загальних мононенасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 35 %, рівень загальних поліненасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 20 % до приблизно 75 %, співвідношення загальних ω6 жирних кислот : загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,05 до приблизно 3,0, співвідношення нових ω6 жирних кислот: нових ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,03 до приблизно 3,0, переважно менше, ніж приблизно 0,50, склад жирних кислот ліпіду базується на: ефективності перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією Δ12-десатурази щонайменше приблизно 60 %, ефективності перетворення СДК на кислоту ЕТК під дією Δ6-елонгази щонайменше приблизно 60 %, ефективності перетворення ЕПК на ДПК під дією Δ5-елонгази від приблизно 50 % до приблизно 95 %, ефективності перетворення ДПК на ДГК під дією Δ4-десатурази від приблизно 50 % до приблизно 95 %, ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДГК щонайменше приблизно 10 %, і вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше приблизно 70 %, і необов'язково ліпід по суті не містить холестерину та/або ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18).

У більш переважному варіанті реалізації винаходу ліпід або олія, переважно олія з насіння, має наступні ознаки: у загальному вмісті жирних кислот ліпіду рівень ДГК становить від приблизно 7 до 20 %, рівень пальмітинової кислоти становить від приблизно 2 % до приблизно 16 %, рівень міристинової кислоти становить менше, ніж приблизно 2 %, рівень олеїнової кислоти становить від приблизно 1 % до приблизно 30 %, рівень ЛК становить від приблизно 4

% до приблизно 35 %, рівень АЛК становить від приблизно 7 % до приблизно 40 %, рівень ГЛК становить менше, ніж приблизно 4 %, рівень СДК становить від приблизно 0,05 % до приблизно 7 %, рівень ЕТК становить менше, ніж приблизно 4 %, рівень ЕТрК становить від приблизно 0,05 % до приблизно 4 %, рівень ЕПК становить від приблизно 0,05 % до приблизно 10 %, рівень ДПК становить від приблизно 0,05 % до приблизно 8 %, рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 25 %, рівень загальних мононенасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 35 %, рівень загальних поліненасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 20 % до приблизно 75 %, рівень нових ω6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,5 % до приблизно 10 %, рівень загальних ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 36 % до приблизно 75 %, рівень нових ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 9 % до приблизно 33 %, співвідношення загальних ω6 жирних кислот: загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,05 до приблизно 3,0, співвідношення нових ω6 жирних кислот: нових ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,03 до приблизно 3,0, склад жирних кислот ліпіду базується на: ефективності перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією Δ12-десатурази щонайменше приблизно 60 %, ефективності перетворення СДК на кислоту ЕТК під дією Δ6-елонгази щонайменше приблизно 60 %, ефективності перетворення ЕТК на ЕПК під дією Δ5-десатурази щонайменше приблизно 60 %, ефективності перетворення ЕПК на ДПК під дією Δ5-елонгази від приблизно 50 % до приблизно 95 %, ефективності перетворення ДПК на ДГК під дією Δ4-десатурази від приблизно 50 % до приблизно 95 %, ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДГК щонайменше приблизно 10 %, ефективності перетворення ЛК на ДГК щонайменше приблизно 15 %, ефективності перетворення АЛК на ДГК щонайменше приблизно 17 %, і у вмісті загальних жирних кислот в екстрагованому ліпіді С20:І становить менше, ніж 1 %, вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше приблизно 70 %, ліпід по суті не містить холестерину, і ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18). Переважно ліпід або олія є канолаолією каноли та/або не оброблений за методом переестерифікації після екстракції з рослини або частини рослини. У конкретному варіанті реалізації винаходу ліпід або олія каноли в подальшому можуть бути оброблені, з метою перетворення жирних кислот в олії на алкілові ефіри, наприклад, метилові або етилові ефіри. Додаткова обробка може застосовуватися для збагачення ліпіду або олії ДГК.

У варіанті реалізації винаходу ліпід або олія, переважно олія з насіння, має наступні ознаки: у загальному вмісті жирних кислот ліпіду рівень ДГК становить від приблизно 7 до 20 %, рівень пальмітинової кислоти становить від приблизно 2 % до приблизно 16 %, рівень міристинової кислоти становить менше, ніж приблизно 2 %, рівень олеїнової кислоти становить від приблизно 30 % до приблизно 60 %, переважно від приблизно 45 % до приблизно 60 %, рівень ЛК становить від приблизно 4 % до приблизно 20 %, рівень АЛК становить від приблизно 2 % до приблизно 16 %, рівень ГЛК становить менше, ніж приблизно 3 %, рівень СДК становить менше, ніж приблизно 3 %, рівень ЕТК становить менше, ніж приблизно 4 %, рівень ЕТрК менше, ніж приблизно 2 %, рівень ЕПК становить менше, ніж приблизно 4 %, рівень ДПК становить менше, ніж приблизно 4 %, рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 25 %, рівень загальних мононенасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 30 % до приблизно 60 % або від приблизно 40 % до приблизно 60 %, рівень загальних поліненасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 20 % до приблизно 75 %, рівень нових ω6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,5 % до приблизно 10 %, рівень загальних ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 10 % до приблизно 20 %, рівень нових ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 9 % до приблизно 20 %, співвідношення загальних ω6 жирних кислот: загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,05 до приблизно 3,0, переважно менше, ніж приблизно 0,50, співвідношення нових ω6 жирних кислот : нових ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,03 до приблизно 3,0, вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше приблизно 70 %, ліпід по суті не містить холестерину, і ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18). Переважно ліпід або олія по суті не містить СДК, ЕПК і ЕТК та/або є олією каноли та/або не оброблений за

методом переестерифікації після виділення з рослини або частини рослини. У конкретному варіанті реалізації винаходу ліпід або олія каноли в подальшому можуть бути оброблені, з метою перетворення жирних кислот в олії на алкілові ефіри, наприклад, метилові або етилові ефіри. Додаткова обробка може застосовуватися для збагачення ліпіду або олії ДГК.

У ще одному переважному варіанті реалізації винаходу ліпід або олія, переважно олія з насіння, має наступні ознаки: у загальному вмісті жирних кислот ліпіду або олії рівень ДГК становить від приблизно 7 % до 20 %, рівень пальмітинової кислоти становить від приблизно 2 % до приблизно 16 %, рівень міристинової кислоти становить менше, ніж приблизно 6 %, рівень олеїнової кислоти становить від приблизно 1 % до приблизно 30 %, рівень ЛК становить від приблизно 4 % до приблизно 35 %, АЛК присутня, ГЛК присутня, рівень СДК становить від приблизно 0,05 % до приблизно 7 %, рівень ЕТК становить менше, ніж приблизно 6 %, рівень ЕПК становить від приблизно 0,05 % до приблизно 10 %, рівень ДПК становить від приблизно 0,05 % до приблизно 8 %.

У подальшому варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід додатково містить один або більш стеролів, переважно рослинних стеролів.

В іншому варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід знаходиться у формі олії і містить менше, ніж приблизно 10 мг стеролів/г олії, менше, ніж приблизно 7 мг стеролів/г олії, від приблизно 1,5 мг до приблизно 10 мг стеролів/г олії, або від приблизно 1,5 мг до приблизно 7 мг стеролів/г олії.

Приклади стеролів, які можуть бути присутніми в екстрагованому ліпіді, включають, не обов'язково обмежуючись ними, один або більш або все з наступного: кампестрол/24-метилхолестерин, Δ5-стигмастерол, ебурикол, β-ситостерол/24-етилхолестерин, Δ5-авенастерол/ізофукостерол, Δ7-стигмастерол/стигмаст-7-ен-3β-ол і Δ7-авенастерол.

У варіанті реалізації винаходу вид рослини є одним з наведених в Табл. 26, наприклад, канола, і рівень стеролів є приблизно таким же, як наведений в Табл. 26 для цього конкретного виду рослини.

У варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід містить менше, ніж приблизно 0,5 мг холестерину/г олії, менше, ніж приблизно 0,25 мг холестерину/г олії, від приблизно 0 мг до приблизно 0,5 мг холестерину/г олії, або від приблизно 0 мг до приблизно 0,25 мг холестерину/г олії, або по суті не містить холестерину.

У подальшому варіанті реалізації винаходу ліпід є олією, переважно олією з олійної культури. Приклади таких олій включають, без обмеження, олію Brassica sp., наприклад, олію каноли, олію Gossypium hirsutum, олію Linum usitatissimum, олію Helianthus sp., олію Carthamus tinctorius, олію Glycine max, олію Zea mays, олію Arabidopsis thaliana, олію Sorghum bicolor, олію Sorghum vulgare, олію Avena sativa, олію Trifolium sp., олію Elaesis guineenis, олію Nicotiana benthamiana, олію Hordeum vulgare, олію Lupinus angustifolius, олію Oryza sativa, олію Oryza glaberrima, олію Camelina sativa, олію Crambe abyssinica, олію Miscanthus x giganteus або олію Miscanthus sinensis.

Також розкритий екстрагований рослинний ліпід, переважно екстрагована олія з насіння каноли, що містить жирні кислоти в естерифікованій формі, причому жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і необов'язково одну або більше із стеаридонової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), притому, що ліпід має наступні ознаки по відношенню до загального вмісту жирних кислот в ліпіді:

i) рівень ДГК становить приблизно 3 %, приблизно 4 %, приблизно 5 %, приблизно 6 % або приблизно 7 %,

ii) рівень пальмітинової кислоти становить від приблизно 2 % до приблизно 16 %,

iii) рівень міристинової кислоти становить менше, ніж приблизно 2 %,

iv) рівень олеїнової кислоти становить від приблизно 30 % до приблизно 60 %, переважно від приблизно 45 % до приблизно 60 %,

v) рівень ЛК становить від приблизно 4 % до приблизно 20 %,

vi) рівень АЛК становить від приблизно 2 % до приблизно 16 %,

vii) рівень ГЛК становить менше, ніж приблизно 4 %,

viii) рівень СДК становить менше, ніж приблизно 6 % або менше, ніж приблизно 4 %,

ix) рівень ЕТК становить менше, ніж приблизно 6 % або менше, ніж приблизно 4 %,

x) рівень ЕТрК становить менше, ніж приблизно 1 %,

xi) рівень ЕПК становить менше, ніж приблизно 10 % та/або рівень ЕПК становить 0,5-2,0 x рівень ДГК,

xii) рівень ДПК становить менше, ніж приблизно 4 %,

xiii) рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 25 %,

xiv) рівень загальних мононенасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 30 % до приблизно 70 %,

xv) рівень загальних поліненасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 15 % до приблизно 75 %, переважно від приблизно 15 % до приблизно 30 %,

xvi) рівень нових ω6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,5 % до приблизно 10 %,

xvii) рівень загальних ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 10 % до приблизно 20 %,

xviii) рівень нових ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 3 % до приблизно 20 %,

xix) співвідношення загальних ω6 жирних кислот : загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,05 до приблизно 3,0, переважно менше, ніж приблизно 0,50,

xx) співвідношення нових ω6 жирних кислот : нових ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,03 до приблизно 3,0,

xxi) вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше приблизно 70 %, і

xxii) ліпід по суті не містить холестерину. У варіанті реалізації винаходу ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18). Більш переважно, ліпід по суті не містить СДК і ЕТК, та/або не оброблений за методом переестерифікації після виділення з рослини або частини рослини.

В іншому аспекті розкритий екстрагований рослинний ліпід, що містить жирні кислоти в естерифікованій формі, причому жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і одну або більше із стеаридонової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) та ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), притому, що (i) рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 7 % до 20 %, (ii) рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 2 % до 16 %, (iii) рівень міристинової кислоти (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж 6 %, (iv) рівень олеїнової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 1 % до 30 % або від 30 % до 60 %, (v) рівень лінолевої кислоти (ЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 4 % до 35 %, (vi) рівень α-ліноленової кислоти (АЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 4 % до 40 %, (vii) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕТрК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж 4 %, (viii) рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 4 % до 25 %, (ix) співвідношення загальних ω6 жирних кислот : загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 1,0 до 3,0 або від 0,1 до 1, (x) вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше 70 %, і (xi) щонайменше 70 % естерифікованої ДГК у формі ТАГ знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ. У варіанті реалізації винаходу присутні одна або більше, або всі з наступних ознак:

i) рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 2 % до 15 %,

ii) рівень міристинової кислоти (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж 1 %,

iii) рівень олеїнової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 3 % до приблизно 30 %, від приблизно 6 % до приблизно 30 %, від 1 % до приблизно 20 %, від приблизно 45 % до приблизно 60 %, або становить приблизно 30 %,

iv) рівень лінолевої кислоти (ЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 20 % або від приблизно 4 % до 17 %,

v) рівень α-ліноленової кислоти (АЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 7 % до приблизно 40 %, від приблизно 10 % до приблизно 35 %, від приблизно 20 % до приблизно 35 % або від приблизно 4 до 16 %,

vi) рівень γ-ліноленової кислоти (ГЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, менше, ніж приблизно 2 %, менше, ніж приблизно 1 %, менше, ніж приблизно 0,5 %, від 0,05 % до 7 %, від 0,05 % до 4 % або від 0,05 % до приблизно 3 %, або від 0,05 % до приблизно 2 %,

vii) рівень стеаридонової кислоти (СДК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 7 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 4 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 3 %, або від 0,05 % до приблизно 2 %,

viii) рівень ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 4 %, менше, ніж приблизно 1 %, менше, ніж приблизно 0,5 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 5 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 4 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 3 % або від приблизно 0,05 % до приблизно 2 %,

ix) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕТрК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 2 %, менше, ніж приблизно 1 %, від 0,05 % до 4 %, від 0,05 % до 3 %, або від 0,05 % до приблизно 2 %, або від 0,05 % до приблизно 1 %,

x) рівень ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, менше, ніж приблизно 2 %, від 0,05 % до 10 %, від 0,05 % до 5 %, або від 0,05 % до приблизно 3 %, або від 0,05 % до приблизно 2 %,

xi) рівень докозапентаєнової кислоти (ДПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, менше, ніж приблизно 2 %, від 0,05 % до 8 %, від 0,05 % до 5 %, або від 0,05 % до приблизно 3 %, або від 0,05 % до приблизно 2 %,

xii) рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить приблизно 8 %, приблизно 9 %, приблизно 10 %, приблизно 11 %, приблизно 12 %, приблизно 13 %, приблизно 14 %, приблизно 15 %, приблизно 16 %, приблизно 17 %, приблизно 18 %, від приблизно 8 % до 20 %, від приблизно 10 % до 20 %, від приблизно 11 % до 20 %, від приблизно 10 % до приблизно 16 % або від приблизно 14 % до 20 %,

xiii) ліпід містить ω6-докозапентаєнову кислоту ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xiv) ліпід в істотній мірі не містить ω6-докозапентаєнової кислоти ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xv) ліпід по суті не містить СДК, ЕПК і ЕТК серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xvi) рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 20 % або від приблизно 6 % до приблизно 20 %,

xvii) рівень загальних мононенасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 35 %, від приблизно 8 % до приблизно 25 %, або від 8 % до приблизно 22 %,

xviii) рівень загальних поліненасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 20 % до приблизно 75 %, від приблизно 50 % до приблизно 75 %, або від приблизно 60 % до приблизно 75 %,

xix) рівень загальних ω6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 35 % до приблизно 50 %, від приблизно 20 % до приблизно 35 %, від приблизно 6 % до 20 %, менше 20 %, менше, ніж приблизно 16 %, менше, ніж приблизно 10 %, від приблизно 1 % до приблизно 16 %, від приблизно 2 % до приблизно 10 % або від приблизно 4 % до приблизно 10 %,

xx) рівень нових ω6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 10 %, менше, ніж приблизно 8 %, менше, ніж приблизно 6 %, менше 4 %, від приблизно 1 % до приблизно 20 %, від приблизно 1 % до приблизно 10 %, від приблизно 0,5 % до приблизно 8 % або від приблизно 0,5 % до 4 %,

xxi) рівень загальних ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 36 % до приблизно 65 %, від 40 % до приблизно 60 %, від приблизно 20 % до приблизно 35 %, від приблизно 10 % до приблизно 20 %, приблизно 25 %, приблизно 30 %, приблизно 35 % або приблизно 40 %,

xxii) рівень нових ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 9 % до приблизно 33 %, від приблизно 10 % до приблизно 20 %, від приблизно 20 % до приблизно 30 %, від приблизно 12 % до приблизно 25 %, приблизно 13 %, приблизно 15 %, приблизно 17 % або приблизно 20 %,

xxiii) співвідношення загальних ω6 жирних кислот : загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,1 до приблизно 0,5, менше, ніж приблизно 0,50, менше, ніж приблизно 0,40, менше, ніж приблизно 0,30, менше, ніж приблизно 0,20, менше, ніж приблизно 0,15, приблизно 1,0, приблизно 0,1 або приблизно 0,2,

xxiv) співвідношення нових ω6 жирних кислот : нових ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 1,0 до приблизно 3,0, від приблизно 0,1 до приблизно 1, від приблизно 0,1 до приблизно 0,5, менше, ніж приблизно 0,50, менше, ніж приблизно 0,40, менше, ніж приблизно 0,30, менше, ніж приблизно 0,20, менше, ніж приблизно 0,15, приблизно 0,1, приблизно 0,2 або приблизно 1,0,

xxv) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДГК щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, від приблизно 10 % до приблизно 50 %, від приблизно 10 % до приблизно 30 % або від приблизно 10 % до приблизно 25 %,

xxvi) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення ЛК на ДГК щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 22 %, щонайменше приблизно 25 %, від приблизно 15 % до приблизно 50 %, від приблизно 20 % до приблизно 40 % або від приблизно 20 % до приблизно 30 %,

xxvii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення АЛК на ДГК щонайменше приблизно 17 %, щонайменше приблизно 22 %, щонайменше приблизно 24 %, від приблизно 17 % до приблизно 55 %, від приблизно 22 % до приблизно 35 % або від приблизно 24 % до приблизно 35 %,

xxviii) загальні жирні кислоти в екстрагованому ліпіді містять менше 1 % C20:1,

xxix) вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше 95 %, від приблизно 70 % до приблизно 99 % або від приблизно 90 % до приблизно 99 %,

xxx) ліпід містить діацилгліцерол (ДАГ),

xxxi) ліпід містить менше, ніж приблизно 10 %, менше, ніж приблизно 5 %, менше, ніж приблизно 1 % або від приблизно 0,001 % до приблизно 5 % вільних (неестерифікованих) жирних кислот та/або фосфоліпіду, або по суті не містить їх,

xxxii) щонайменше 80 % естерифікованої ДГК у формі ТАГ знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ,

xxxiii) в ліпіді найпоширенішими видами ТАГ, що містять ДГК, є ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12), і

xxxiv) ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18).

З особливою увагою до згаданого вище аспекту, у варіанті реалізації винаходу:

i) ліпід знаходиться у формі олії, причому олія містить один або більше стеролів, наприклад, один або більше або всі з кампестеролу, Δ5-стигмастеролу, ебуриколу, β-ситостеролу, Δ5-авенастеролу, Δ7-стигмастеролу і Δ7-авенастеролу, і олія необов'язково містить менше 10 мг стеролів/г олії та/або олія істотною мірою не містить холестерину, та/або

ii) ліпід знаходиться у формі олії з насіння олійної культури, такого як насіння олійної культури, що є насінням Brassica sp. або насінням каноли.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпіду, який включає стадії:

i) одержання частини рослини, що містить ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти в естерифікованій формі, при тому, що жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і необов'язково одну або більше з ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), стеаридонової кислоти (СДК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) та ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), і, при цьому, рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот ліпіду, що екстрагується, в частині рослини становить приблизно 7–20 %, і

ii) екстракція ліпіду з частини рослини,

причому рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить приблизно 7-20 %.

У переважному варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід має одну або більше ознак, визначених вище.

У варіанті реалізації винаходу, в якому частина рослини є насінням, переважним є насіння олійної культури. Приклади такого насіння включають, без обмеження, насіння Brassica sp., Gossypium hirsutum, Linum usitatissimum, Helianthus sp., Carthamus tinctorius, Glycine max, Zea mays, Arabidopsis thaliana, Sorghum bicolor, Sorghum vulgare, Avena sativa, Trifolium sp., Elaesis guineenis, Nicotiana benthamiana, Hordeum vulgare, Lupinus angustifolius, Oryza sativa, Oryza glaberrima, Camelina sativa або Crambe abyssinica, переважно Brassica napus, B. juncea або C. sativa.

В іншому варіанті реалізації винаходу насіння містить щонайменше приблизно 18 мг, щонайменше приблизно 22 мг, щонайменше приблизно 26 мг, від приблизно 18 мг до

приблизно 100 мг, від приблизно 22 мг до приблизно 70 мг, або від приблизно 24 мг до приблизно 50 мг ДГК на грам насіння.

У подальшому варіанті реалізації винаходу частина рослини містить екзогенні полінуклеотиди, що кодують один з наступних наборів ферментів:

i) ω3-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза,

ii) Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза,

iii) Δ12-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза,

iv) Δ12-десатураза, ω3-десатураза або Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза,

v) ω3-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза,

vi) Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза,

vii) Δ12-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза, або

viii) Δ12-десатураза, ω3-десатураза або Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза,

причому кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше промоторами, здатними спрямовувати експресію вказаних полінуклеотидів в клітині частини рослини.

Ще в одному варіанті реалізації винаходу частина рослини має одну або більше, або всі з наступних ознак:

i) Δ12-десатураза перетворює олеїнову кислоту на лінолеву кислоту в одній або більше клітинах рослини з ефективністю щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 %, від приблизно 60 % до приблизно 98 %, від приблизно 70 % до приблизно 95 % або від приблизно 75 % до приблизно 90 %,

ii) ω3-десатураза перетворює ω6 жирні кислоти на ω3 жирні кислоти в одній або більше клітинах рослини з ефективністю щонайменше приблизно 65 %, щонайменше приблизно 75 %, щонайменше приблизно 85 %, від приблизно 65 % до приблизно 95 %, від приблизно 75 % до приблизно 95 % або від приблизно 80 % до приблизно 95 %,

iii) Δ6-десатураза перетворює АЛК на СДК в одній або більше клітинах рослини з ефективністю щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, від приблизно 30 % до приблизно 70 %, від приблизно 35 % до приблизно 60 % або від приблизно 50 % до приблизно 70 %,

iv) Δ6-десатураза перетворює лінолеву кислоту на γ-ліноленову кислоту в одній або більше клітинах рослини з ефективністю менше, ніж приблизно 5 %, менше, ніж приблизно 2,5 %, менше, ніж приблизно 1 %, від приблизно 0,1 % до приблизно 5 %, від приблизно 0,5 % до приблизно 2,5 %, або від приблизно 0,5 % до приблизно 1 %,

v) Δ6-елонгаза перетворює СДК на ЕТК в одній або більше клітинах рослини з ефективністю щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 75 %, від приблизно 60 % до приблизно 95 %, від приблизно 70 % до приблизно 88 % або від приблизно 75 % до приблизно 85 %,

vi) Δ5-десатураза перетворює ЕТК на ЕПК в одній або більше клітинах рослини з ефективністю щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 75 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, від приблизно 60 % до приблизно 99 %, від приблизно 70 % до приблизно 99 % або від приблизно 75 % до приблизно 98 %,

vii) Δ5-елонгаза перетворює ЕПК на ДПК в одній або більше клітинах рослини з ефективністю щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, від приблизно 50 % до приблизно 95 % або від приблизно 85 % до приблизно 95 %,

viii) Δ4-десатураза перетворює ДПК на ДГК в одній або більше клітинах рослини з ефективністю щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 93 %, від приблизно 50 % до приблизно 95 %, від приблизно 80 % до приблизно 95 % або від приблизне 85 %о до приблизно 95 %,

ix) ефективність перетворення олеїнової кислоти на ДГК в одній або більше клітинах частини рослини становить щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, від приблизно 10 % до приблизно 50 %, від приблизно 10 % до приблизно 30 % або від приблизно 10 % до приблизно 25 %,

x) ефективність перетворення ЛК на ДГК в одній або більше клітинах частини рослини становить щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 22 %, щонайменше приблизно 25 %, від приблизно 15 % до приблизно 50 %, від приблизно 20 % до приблизно 40 % або від приблизно 20 % до приблизно 30 %,

xi) ефективність перетворення АЛК на ДГК в одній або більше клітинах частини рослини становить щонайменше приблизно 17 %, щонайменше приблизно 22 %, щонайменше приблизно 24 %, від приблизно 17 % до приблизно 55 %, від приблизно 22 % до приблизно 35 % або від приблизно 24 % до приблизно 35 %,

xii) одна або більше клітин частини рослини містять щонайменше приблизно на 15 %, щонайменше приблизно на 20 %, від приблизно 15 % до приблизно 30 % або від приблизно 22,5 % до приблизно 27,5 %, більше жирних кислот ω3, ніж відповідні клітини без екзогенних полінуклеотидів,

xiii) Δ6-десатураза переважно зменшує насиченість α-ліноленової кислоти (АЛК) щодо лінолевої кислоти (ЛК),

xiv) Δ6-елонгаза додатково має активність Δ9-елонгази,

xv) Δ12-десатураза додатково має активність Δ15-десатурази,

xvi) Δ6-десатураза додатково має активність Δ8-десатурази,

xvii) Δ8-десатураза додатково має активність Δ6-десатурази або не має активність Δ6-десатурази,

xviii) Δ15-десатураза додатково має активність ω3-десатурази по відношенню до ГЛК,

xix) ω3-десатураза додатково має активність Δ15-десатурази по відношенню до ЛК,

xx) ω3-десатураза зменшує насиченість ЛК та/або ГЛК,

xxi) ω3-десатураза переважно зменшує насиченість ГЛК щодо ЛК,

xxii) рівень ДГК в частині рослини базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДГК в частині рослини щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, від приблизно 10 % до приблизно 50 %, від приблизно 15 % до приблизно 30 % або від приблизно 20 % до приблизно 25 %,

xxiii) рівень ДГК в частині рослини базується на ефективності перетворення ЛК на ДГК в частині рослини щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 22 %, від приблизно 15 % до приблизно 60 %, від приблизно 20 % до приблизно 40 % або від приблизно 22 % до приблизно 30 %,

xxiv) рівень ДГК в частині рослини базується на ефективності перетворення АЛК на ДГК в частині рослини щонайменше приблизно 17 %, щонайменше приблизно 22 %, щонайменше приблизно 24 %, від приблизно 17 % до приблизно 65 %, від приблизно 22 % до приблизно 35 % або від приблизно 24 % до приблизно 35 %,

xxx) одна або більше або всі десатурази володіють вищою активністю на субстраті ацил-КоА, ніж на відповідному субстраті ацил-фосфатидилхоліну (ацил-ФХ),

xxxi) Δ6-десатураза має вищу активність Δ6-десатурази по відношенню до АЛК, ніж ЛК як жирнокислотного субстрату,

xxxii) Δ6-десатураза має вищу активність Δ6-десатурази по відношенню до АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж по відношенню до АЛК, приєднаної до положення sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,

xxxiii) Δ6-десатураза має щонайменше в 2 рази вищу активність Δ6-десатурази, щонайменше в 3 рази вищу активність, щонайменше в 4 рази вищу активність або щонайменше в 5 разів вищу активність по відношенню до АЛК як субстрату, в порівнянні з ЛК,

xxxiv) Δ6-десатураза має вищу активність по відношенню до АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж по відношенню до АЛК, приєднаної до положення sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,

xxxv) Δ6-десатураза має щонайменше в 5 разів вищу активність Δ6-десатурази або щонайменше в 10 разів вищу активність по відношенню до АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж по відношенню до АЛК, приєднаної до положення sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,

xxxvi) десатураза являє собою front-end десатуразу,

xxxvii) Δ6-десатураза не має активність Δ5-десатурази по відношенню до ЕТК, яку можна було б виявити.

Ще в одному варіанті реалізації винаходу частина рослини має одну або більше, або всі з наступних ознак:

i) Δ12-десатураза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 10, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 10,

ii) ω3-десатураза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 12, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 12,

iii) Δ6-десатураза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 16, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 16,

iv) Δ6-елонгаза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 25, її біологічно активний фрагмент, такий як SEQ ID NO: 26, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 25 та/або SEQ ID NO: 26,

v) Δ5-десатураза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 30, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 30,

vi) Δ5-елонгаза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 37, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 37,

vii) Δ4-десатураза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 41, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 41.

У варіанті реалізації винаходу частина рослини додатково містить екзогенний полінуклеотид, що кодує діацилгліцерол ацилтрансферазу (ДГАТ), моноацилгліцерол ацилтрансферазу (МГАТ), гліцерол-3-фосфат ацилтрансферазу (ГФАТ), 1-ацил-гліцерол-3-фосфат ацилтрансферазу (ЛФКАТ) переважно ЛФКАТ, яка може використовувати поліненасичений жирний ацил-КоА субстрат С22, ацил-КоА:лізофосфатидилхолін ацилтрансферазу (ЛФХАТ), фосфоліпазу A_2 (PLA_2), фосфоліпазу С (PLC), фосфоліпазу D (PLD), СДП-холін діацилгліцероллхолін фосфотрансферазу (ХФТ), фосфатидилхолін діацилгліцерол ацилтрансферазу (ФДАТ), фосфатидилхолін:діацилгліцерол холін фосфотрансферазу (ФДХТ), ацил-КоА синтазу (АКС) або комбінацію двох або більше із вказаних ферментів.

В іншому варіанті реалізації винаходу частина рослини додатково містить введену мутацію або екзогенний полінуклеотид, який в клітині частини рослини негативно регулює продукування та/або активність ендогенного ферменту, вибраного серед FAE1, ДГАТ, МГАТ, ГФАТ, ЛФКАТ, ЛФХАТ, PLA_2, PLC, PLD, ХФТ, ФДАТ, тіоестерази, наприклад, FATB або Δ12-десатурази, або комбінації двох або більше із вказаних ферментів.

У подальшому варіанті реалізації винаходу щонайменше один або всі промотори є специфічними для насіння промоторами. У варіанті реалізації винаходу щонайменше один або всі промотори одержані з генів біосинтезу або акумуляції олії, таких як олеозин, або із генів зберігання білка в насінні, таких як конлінін.

В іншому варіанті реалізації винаходу промотор(и), що спрямовує(ють) експресію екзогенних полінуклеотидів, які кодують Δ4-десатуразу і Δ5-елонгазу, ініціює експресію полінуклеотидів в насінні частини рослини, що розвивається, перед або досягає піку експресії перед промотором(ами), що спрямовує(ють) експресію екзогенних полінуклеотидів, що кодують Δ12-десатуразу і ω3-десатуразу.

У подальшому варіанті реалізації винаходу екзогенні полінуклеотиди ковалентно з'єднані в молекулу ДНК, переважно молекулу Т-ДНК, інтегровану в геном клітин частини рослини, причому кількість таких молекул ДНК, інтегрованих в геном клітин частини рослини переважно становить не більше однією, двох або трьох, або становить дві або три.

Ще в одному варіанті реалізації винаходу рослина містить щонайменше два різні екзогенні полінуклеотиди, кожний з яких кодує Δ6-десатуразу з такою ж або іншою послідовністю амінокислот.

У подальшому варіанті реалізації винаходу загальний вміст олії в частині рослини, що містить екзогенні полінуклеотиди, становить щонайменше приблизно 40 %, або щонайменше приблизно 50 %, або щонайменше приблизно 60 %, або щонайменше приблизно 70 % або від приблизно 50 % до приблизно 80 % від загального вмісту олії у відповідній частині рослини, в якій відсутні екзогенні полінуклеотиди. У цих варіантах реалізації винаходу максимальний вміст олії може становити приблизно 100 % від вмісту олії у відповідній частині рослини дикого типу.

В іншому варіанті реалізації винаходу ліпід знаходиться у формі олії, переважно олії з насіння олійної культури, причому щонайменше приблизно 90 %, або щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 98 % або від приблизно 95 % до приблизно 98 мас. % ліпіду складають тріацилгліцероли.

У подальшому варіанті реалізації винаходу спосіб додатково включає обробку ліпіду, з метою підвищення рівня ДГК як відсотка від загального вмісту жирних кислот. Наприклад, обробка може бути переестерифікацією. Наприклад, ліпід, такий як олія каноли, може бути підданий обробці з метою перетворення жирних кислот в олії на алкілові ефіри, наприклад, метилові або етилові ефіри, які далі можуть бути фракційовані із збагаченням ліпіду або олії ДГК.

Додатково розкритий спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпіду, який включає стадії:

i) одержання частини рослини, переважно насіння каноли, що містить ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти в естерифікованій формі, притому, що жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і необов'язково одну або більше із ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), стеаридонової кислоти (СДК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), і, при цьому, рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот ліпіду, що екстрагується, в частині рослини становить приблизно 3 %, приблизно 4 %, приблизно 5 %, приблизно 6 % або від приблизно 7 %, і

ii) екстракція ліпіду з частини рослини,

причому екстрагований ліпід має наступні ознаки загального вмісту жирних кислот в ліпіді;

i) рівень ДГК становить приблизно 3 %, приблизно 4 %, приблизно 5 %, приблизно 6 % або приблизно 7 %,

ii) рівень пальмітинової кислоти становить від приблизно 2 % до приблизно 16 %,

iii) рівень міристинової кислоти становить менше, ніж приблизно 2 %,

iv) рівень олеїнової кислоти становить від приблизно 30 % до приблизно 60 %, переважно від приблизно 45 % до приблизно 60 %,

v) рівень ЛК становить від приблизно 4 % до приблизно 20 %,

vi) рівень АЛК становить від приблизно 2 % до приблизно 16 %,

vii) рівень ГЛК становить менше, ніж приблизно 4 %,

viii) рівень СДК становить менше, ніж приблизно 6 % або менше, ніж приблизно 4 %,

ix) рівень ЕТК становить менше, ніж приблизно 6 % або менше, ніж приблизно 4 %,

x) рівень ЕТрК становить менше, ніж приблизно 1 %,

xi) рівень ЕПК становить менше, ніж приблизно 10 % та/або рівень ЕПК становить 0,5–2,0 х рівень ДГК,

xii) рівень ДПК становить менше, ніж приблизно 4 %,

xiii) рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 25 %,

xiv) рівень загальних мононенасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 30 % до приблизно 70 %,

xv) рівень загальних поліненасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 15 % до приблизно 75 %, переважно від приблизно 15 % до приблизно 30 %,

xvi) рівень нових ω6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,5 % до приблизно 10 %,

xvii) рівень загальних ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 10 % до приблизно 20 %,

xviii) рівень нових ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 3 % до приблизно 20 %,

xix) співвідношення загальних ω6 жирних кислот : загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,05 до приблизно 3,0, переважно менше, ніж приблизно 0,50,

xx) співвідношення нових ω6 жирних кислот : нових ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,03 до приблизно 3,0,

xxi) вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше приблизно 70 %, і

xxii) ліпід по суті не містить холестерину.У варіанті реалізації винаходу ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18). Більш переважно, ліпід по суті не містить СДК і ЕТК, та/або не оброблений за методом переестерифікації після виділення з рослини або частини рослини.

Також розкритий спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпіду, який включає стадії:

i) одержання частини рослини, що містить ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти в естерифікованій формі, притому, що жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і одну або більше із

стеаридонової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), і, при цьому: (i) рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 7 % до 20 %, (ii) рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 2 % до 16 %, (iii) рівень міристинової кислоти (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше 6 %, (iv) рівень олеїнової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 1 % до 30 % або від 30 % до 60 %, (v) рівень лінолевої кислоти (ЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 4 % до 35 %, (vi) рівень α-ліноленової кислоти (АЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 4 % до 40 %, (vii) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕТрК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше 4 %, (viii) рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 4 % до 25 %, (ix) співвідношення загальних ω6 жирних кислот : загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 1,0 до 3,0 або від 0,1 до 1, (x) вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше 70 %, і (xi) щонайменше 70 % естерифікованих ДГК у формі ТАГ знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ.

%, і

ii) екстракція ліпіду з частини рослини,

при цьому, рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить приблизно 7-20 %.

Крім того, розкритий ліпід, або олія, що містить ліпід, одержані із застосуванням способу за винаходом.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання етилових ефірів поліненасичених жирних кислот, який включає переестерифікацію триацилгліцеролів в екстрагованому рослинному ліпіді, причому екстрагований рослинний ліпід містить жирні кислоти в естерифікованій формі, притому, що жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і необов'язково одне або більше із стеаридонової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), притому, що рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить приблизно 7–20 %, з одержанням в такий спосіб етилових ефірів.

У переважному варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід має один або більше з ознак, визначених вище.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання етилових ефірів поліненасичених жирних кислот, який включає переестерифікацію триацилгліцеролів в екстрагованому рослинному ліпіді, причому екстрагований рослинний ліпід містить естерифіковані жирні кислоти у формі триацилгліцеролів, причому жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і одну або більш із стеаридонової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), притому, що (i) рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить приблизно 3 %, приблизно 4 %, приблизно 5 %, приблизно 6 % або від 7 % до 20 %, (ii) рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 2 % до 16 %, (iii) рівень міристинової кислоти (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше 6 %, (iv) рівень олеїнової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 1 % до 30 % або від 30 % до 60 %, (v) рівень лінолевої кислоти (ЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 4 % до 35 %, (vi) рівень α-ліноленової кислоти (АЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 4 % до 40 %, (vii) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕТрК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше 4 %, (viii) рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 4 % до 25 %, (ix) співвідношення загальних ω6 жирних кислот : загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 1,0 до 3,0 або від 0,1 до 1, (x) вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше 70 %, і (xi) щонайменше 70 % естерифікованої ДГК у формі ТАГ знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ, з одержанням в такий спосіб етилових ефірів. У варіанті реалізації винаходу екстрагований рослинний ліпід має одну або більше, або всі з наступних ознак:

i) рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 2 % до 15 %,

ii) рівень міристинової кислоти (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше 1 %,

xxxv) рівень олеїнової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 3 % до приблизно 30 %, від приблизно 6 % до приблизно 30 %, від 1 % до приблизно 20 %, від приблизно 45 % до приблизно 60 % або становить приблизно 30 %,

xxxvi) рівень лінолевої кислоти (ЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 20 % або від приблизно 4 % до 17 %,

xxxvii) рівень α-ліноленової кислоти (АЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 7 % до приблизно 40 %, від приблизно 10 % до приблизно 35 %, від приблизно 20 % до приблизно 35 % або від приблизно 4 % до 16 %,

xxxviii) рівень γ-ліноленової кислоти (ГЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, менше, ніж приблизно 2 %, менше, ніж приблизно 1 %, менше, ніж приблизно 0,5 %, від 0,05 % до 7 %, від 0,05 % до 4 %, або від 0,05 % до приблизно 3 %, або від 0,05 % до приблизно 2 %,

xxxix) рівень стеаридонової кислоти (СДК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 7 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 4 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 3 %, або від 0,05 % до приблизно 2 %,

xl) рівень ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 4 %, менше, ніж приблизно 1 %, менше, ніж приблизно 0,5 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 5 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 4 %, від приблизно 0,05 % до приблизно 3 % або від приблизно 0,05 % до приблизно 2 %,

xli) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕТрК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 2 %, менше, ніж приблизно 1 %, від 0,05 % до 4 %, від 0,05 % до 3 % або від 0,05 % до приблизно 2 % або від 0,05 % до приблизно 1 %,

xlii) рівень ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, менше, ніж приблизно 2 %, від 0,05 % до 10 %, від 0,05 % до 5 % або від 0,05 % до приблизно 3 % або від 0,05 % до приблизно 2 %,

xliii) рівень докозапентаєнової кислоти (ДПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше 4 %, менше, ніж приблизно 3 %, менше, ніж приблизно 2 %, від 0,05 % до 8 %, від 0,05 % до 5 % або від 0,05 % до приблизно 3 % або від 0,05 % до приблизно 2 %,

xliv) рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить приблизно 8 %, приблизно 9 %, приблизно 10 %, приблизно 11 %, приблизно 12 %, приблизно 13 %, приблизно 14 %, приблизно 15 %, приблизно 16 %, приблизно 17 %, приблизно 18 %, від приблизно 8 % до 20 %, від приблизно 10 % до 20 %, від приблизно 11 % до 20 %, від приблизно 10 % до приблизно 16 % або від приблизно 14 % до 20 %,

xlv) ліпід містить ω6-докозапентаєнову кислоту ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xlvi) ліпід по суті не містить ω6-докозапентаєновой кислоти ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xlvii) ліпід по суті не містить СДК, ЕПК і ЕТК серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xlviii) рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 20 % або від приблизно 6 % до приблизно 20 %,

xlix) рівень загальних мононенасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 4 % до приблизно 35 %, від приблизно 8 % до приблизно 25 % або від 8 % до приблизно 22 %,

l) рівень загальних поліненасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 20 % до приблизно 75 %, від приблизно 50 % до приблизно 75 %, або від приблизно 60 % до приблизно 75 %,

li) рівень загальних ω6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 35 % до приблизно 50 %, від приблизно 20 % до приблизно 35 %, від приблизно 6 % до 20 %, менше, ніж 20 %, менше, ніж приблизно 16 %, менше, ніж приблизно 10 %, від приблизно 1 % до приблизно 16 %, від приблизно 2 % до приблизно 10 % або від приблизно 4 % до приблизно 10 %,

liii) рівень нових ω6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить менше, ніж приблизно 10 %, менше, ніж приблизно 8 %, менше, ніж приблизно 6 %, менше 4 %, від приблизно 1 % до приблизно 20 %, від приблизно 1 % до приблизно 10 %, від приблизно 0,5 % до приблизно 8 % або від приблизно 0,5 % до 4 %,

liiii) рівень загальних ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 36 % до приблизно 65 %, від 40 % до приблизно 60 %, від приблизно 20 % до приблизно 35 %, від приблизно 10 % до приблизно 20 %, приблизно 25 %, приблизно 30 %, приблизно 35 % або приблизно 40 %,

liv) рівень нових ω3 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від 9 % до приблизно 33 %, від приблизно 10 % до приблизно 20 %, від приблизно 20 % до приблизно 30 %, від приблизно 12 % до приблизно 25 %, приблизно 13 %, приблизно 15 %, приблизно 17 % або приблизно 20 %,

lv) співвідношення загальних ω6 жирних кислот : загальних ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 0,1 до приблизно 0,5, менше, ніж приблизно 0,50, менше, ніж приблизно 0,40, менше, ніж приблизно 0,30, менше, ніж приблизно 0,20, менше, ніж приблизно 0,15, приблизно 1,0, приблизно 0,1 або приблизно 0,2,

lvi) співвідношення нових ω6 жирних кислот : нових ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпіду становить від приблизно 1,0 до приблизно 3,0, від приблизно 0,1 до приблизно 1, від приблизно 0,1 до приблизно 0,5, менше, ніж приблизно 0,50, менше, ніж приблизно 0,40, менше, ніж приблизно 0,30, менше, ніж приблизно 0,20, менше, ніж приблизно 0,15, приблизно 0,1, приблизно 0,2 або приблизно 1,0,

lvii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДГК щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, від приблизно 10 % до приблизно 50 %, від приблизно 10 % до приблизно 30 % або від приблизно 10 % до приблизно 25 %,

lviii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення ЛК на ДГК щонайменше приблизно 15 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 22 %, щонайменше приблизно 25 %, від приблизно 15 % до приблизно 50 %, від приблизно 20 % до приблизно 40 % або від приблизно 20 % до приблизно 30 %,

lix) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення АЛК на ДГК щонайменше приблизно 17 %, щонайменше приблизно 22 %, щонайменше приблизно 24 %, від приблизно 17 % до приблизно 55 %, від приблизно 22 % до приблизно 35 % або від приблизно 24 % до приблизно 35 %,

lx) загальні жирні кислоти в екстрагованому ліпіді містять менше 1 % C20:1,

lxi) вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше 95 %, від приблизно 70 % до приблизно 99 % або від приблизно 90 % до приблизно 99 %,

lxii) ліпід містить діацилгліцерол (ДАГ),

lxiii) ліпід містить менше, ніж приблизно 10 %, менше, ніж приблизно 5 %, менше, ніж приблизно 1 % або від приблизно 0,001 % до приблизно 5 %, вільних (неестерифікованих) жирних кислот та/або фосфоліпіду або по суті не містить їх,

lxiv) щонайменше 80 % естерифікованої ДГК у формі ТАГ знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ,

lxv) в ліпіді найпоширенішими видами ТАГ, що містять ДГК, є ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12), і

lxvi) ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18).

З особливою увагою до згаданого вище аспекту, у варіанті реалізації винаходу застосовують одне або більше або все з наступного:

i) ліпід знаходиться у формі олії, причому олія містить один або більше стеролів, наприклад, один або більше або всі з кампестеролу, Δ5-стигмастеролу, ебуриколу, β-ситостеролу, Δ5-авенастеролу, Δ7-стигмастеролу і Δ7-авенастеролу, і олія необов'язково містить менше 10 мг стеролів/г олії та/або олія істотною мірою не містить холестерину,

ii) ліпід знаходиться у формі олії з насіння олійної культури, такого як насіння олійної культури, що є насінням Brassica sp. або насінням каноли,

iii) рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпіду становить приблизно 3 %, приблизно 4 %, приблизно 5 %, приблизно 6 %, або становить від 7 % до 20 %.

У подальшому аспекті цього винаходу розкривається химерна генетична конструкція, що містить у вказаному порядку: перший ген, другий ген, третій ген, четвертий ген, п'ятий ген і шостий ген, всі з яких ковалентно з'єднані в єдиній молекулі ДНК, причому перший, другий і третій гени об'єднані як перший кластер генів, і четвертий, п'ятий і шостий гени об'єднані як

другий кластер генів, притому, що кожен ген містить промотор, кодуючу ділянку і термінатор транскрипції та/або ділянку поліаденілювання таким чином, що кожен промотор функціонально пов'язаний з кодуючою ділянкою і термінатором транскрипції та/або ділянкою поліаденілювання,

при цьому, кожен промотор незалежно є ідентичним або відрізняється від інших промоторів таким чином, що молекула ДНК містить три, чотири, п'ять або шість різних промоторів, причому один або більш або всі промотори є гетерологічними відносно кодуючої ділянки, з якою вони функціонально пов'язані,

притому, що напрямок транскрипції першого гена йде від третього гена і протилежний напрямку транскрипції третього гена,

при цьому, напрямок транскрипції четвертого гена йде від шостого гена і протилежний напрямку транскрипції шостого гена,

причому напрямок транскрипції другого гена такий же, як для першого гена або третього гена,

притому, що напрямок транскрипції п'ятого гена такий же, як для четвертого гена або шостого гена,

при цьому, термінатор транскрипції та/або ділянка поліаденілювання другого гена відокремлені від промотору першого або третього гена, в залежності від того, який із них є ближчим, першою ділянкою розпірки розміром від приблизно 0,2 до приблизно 3,0 тисяч основ,

причому перший кластер генів відокремлений від другого кластера генів другою ділянкою розпірки розміром від приблизно 1,0 до приблизно 10,0 тисяч основ, і

при цьому, термінатор транскрипції та/або ділянка поліаденілювання п'ятого гена відокремлені від промотору четвертого або шостого гена, в залежності від того, який із них є ближчим, третьою ділянкою розпірки розміром від приблизно 0,2 до приблизно 3,0 тисяч основ.

У варіанті реалізації винаходу молекула ДНК містить сьомий ген, що відокремлений від першого кластера генів або другого кластера генів, в залежності від того, який із них є ближчим, ділянкою розпірки розміром від приблизно 1,0 до приблизно 10,0 тисяч основ.

В іншому варіанті реалізації винаходу молекула ДНК містить два або більше різних термінаторів транскрипції та/або ділянок поліаденілювання.

Ще в одному варіанті реалізації винаходу щонайменше одна з ділянок розпірки містить ділянку прикріплення до матриксу (ДПМ).

У подальшому варіанті реалізації винаходу молекула ДНК містить праві і ліві ділянки межі, що фланкують гени, і являє собою молекулу Т-ДНК.

В іншому варіанті реалізації винаходу генетична конструкція знаходиться в клітині Agrobacterium або інтегрована в геном рослинної клітини.

У переважному варіанті реалізації винаходу щонайменше один з генів кодує десатуразу жирних кислот або елонгазу жирних кислот.

В іншому варіанті реалізації винаходу генетична конструкція містить гени, що кодують набір ферментів, як визначається в цьому документі, та/або один або більше генів кодують фермент, як визначається в цьому документі.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається виділений та/або екзогенний полінуклеотид, що містить:

i) послідовність нуклеотидів, вибрану як будь-яка із SEQ ID NO: 1–9, 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 або 45, та/або

ii) послідовність нуклеотидів, щонайменше на 95 % ідентичну або на 99 % ідентичну одній або більше послідовностям, представленим у SEQ ID NO: 1–9, 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 або 45.

В особливо переважному варіанті реалізації винаходу виділений та/або екзогенний полінуклеотид містить:

i) послідовність нуклеотидів SEQ ID NO: 2 та/або

ii) послідовність нуклеотидів, щонайменше на 95 % ідентичну або на 99 % ідентичну послідовності, представленій в SEQ ID NO: 2.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається вектор або генетична конструкція, що містить полінуклеотид за винаходом та/або генетичну конструкцію за винаходом.

У варіанті реалізації винаходу послідовність нуклеотидів, вибрана як будь-яка із SEQ ID NO: 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 або 45, або послідовність нуклеотидів, щонайменше на 95 % ідентична або на 99 % ідентична одній або більше послідовностям, представленим у SEQ ID NO: 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 або 45, функціонально пов'язана з промотором.

У ще одному аспекті цього винаходу розкривається клітина-хазяїн, що містить екзогенні полінуклеотиди, які кодують один з наступних наборів ферментів:

i) ω3-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза,

ii) Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза,

iii) Δ12-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза,

iv) Δ12-десатураза, ω3-десатураза або Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза,

v) ω3-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза,

vi) Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза,

vii) Δ12-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза, або

viii) Δ12-десатураза, ω3-десатураза або Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза,

і, при цьому, кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше промоторами, що здатні спрямовувати експресію вказаних полінуклеотидів в клітині.

У варіанті реалізації винаходу клітина містить ліпід, як визначається вище, або в ній одна або більше або всі десатурази або елонгази володіють однією або більше ознак, як визначається вище.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається клітина-хазяїн, яка містить:

i) перший екзогенний полінуклеотид, що кодує Δ12-десатуразу, яка містить амінокислоти з послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 10, її біологічно активний фрагмент або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 10, і

ii) другий екзогенний полінуклеотид, що кодує ω3-десатуразу, яка містить амінокислоти з послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 12, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 12,

причому кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше промоторами, здатними спрямовувати експресію вказаних полінуклеотидів в клітині.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається клітина-хазяїн, що містить один або більше полінуклеотидів за винаходом, генетичну конструкцію за винаходом, або вектор або генетичну конструкцію за винаходом.

У варіанті реалізації винаходу клітина знаходиться в рослині, в частині рослини та/або є клітиною насіння зрілої рослини.

У варіанті реалізації винаходу рослина або насіння рослини є рослиною олійної культури або насінням олійної культури, відповідно.

Також розкритий трансгенний організм, що не належить до людського роду, який містить клітину за винаходом. Переважно трансгенний організм, що не належить до людського роду, є трансгенною рослиною, переважно рослиною олійної культури або Arabidopsis thaliana. У варіанті реалізації винаходу рослина є рослиною Brassica, переважно B. napus або B. juncea, або іншою рослиною, окрім Arabidopsis thaliana.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається рослина олійної культури, що містить:

а) ліпід в її насінні, причому ліпід містить жирні кислоти в естерифікованій формі, і

б) екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів:

i) Δ12-десатураза, грибкова ω3-десатураза та/або грибкова Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза, або

ii) Δ12-десатураза, грибкова ω3-десатураза та/або грибкова A15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза,

притому, що кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше специфічними для насіння промоторами, які здатні спрямовувати експресію вказаних полінуклеотидів в насінні рослини, що розвивається, і, при цьому, жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, що включають лінолеву кислоту (ЛК) і γ-ліноленову кислоту (ГЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК), стеаридонову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і необов'язково ейкозапентаєнову кислоту (ЕПК) та/або ейкозатетраєнову кислоту (ЕТК), причому рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот ліпіду становить приблизно 7–20 %.

Приклади рослин олійної культури включають, без обмеження, Brassica sp., Gossypium hirsutum, Linum usitatissimum, Helianthus sp., Carthamus tinctorius, Glycine max, Zea mays, Arabidopsis thaliana, Sorghum bicolor, Sorghum vulgare, Avena sativa, Trifolium sp., Elaesis guineenis, Nicotiana benthamiana, Hordeum vulgare, Lupinus angustifolius, Oryza sativa, Oryza glaberrima, Camelina sativa або Crambe abyssinica. У варіанті реалізації винаходу рослина

олійної культури являє собою канола, Glycine max, рослину Camelina sativa або Arabidopsis thaliana. В альтернативному варіанті реалізації винаходу рослина олійної культури являє собою рослину, окрім A. thaliana.

У варіанті реалізації винаходу одна або більш десатураз здатні використовувати субстрат ацил-КоА. У переважному варіанті реалізації винаходу одна або більш з Δ6-десатурази, Δ5-десатурази, Δ4-десатурази і Δ8-десатурази, якщо вони присутні, здатні використовувати субстрат ацил-КоА, переважно кожна з i) Δ6-десатурази, Δ5-десатурази і Δ4-десатурази або ii) Δ5-десатурази, Δ4-десатурази і Δ8-десатурази здатна використовувати субстрат ацил-КоА. У варіанті реалізації винаходу Δ12-десатураза та/або ω3-десатураза здатні використовувати субстрат ацил-КоА. Субстрат ацил-КоА переважно являє собою АЛК-КоА, ЕТК-КоА, ДПК-КоА, ЕТрК-КоА, ЛК-КоА, ГЛК-КоА або АРК-КОА.

У варіанті реалізації винаходу зріле, зібране в процесі збору урожаю насіння рослини містить ДГК в кількості щонайменше близько 28 мг на грам насіння, переважно щонайменше близько 32 мг на грам насіння, щонайменше близько 36 мг на грам насіння, щонайменше близько 40 мг на грам насіння, більш переважно щонайменше близько 44 мг на грам насіння або щонайменше близько 48 мг на грам насіння. Максимальний вміст ДГК може становити від приблизно 80 до приблизно 100 мг на грам насіння, або приблизно 80 мг або приблизно 100 мг на грам насіння.

У подальшому аспекті цього винаходу розкривається рослина Brassica napus, B. juncea або Camelina sativa, яка здатна давати насіння, що містить ДГК, причому зібране в процесі збору урожаю, зріле насіння рослини містить ДГК в кількості щонайменше близько 28 мг на грам насіння, переважно щонайменше близько 32 мг на грам насіння, щонайменше близько 36 мг на грам насіння, щонайменше близько 40 мг на грам насіння, більш переважно щонайменше близько 44 мг на грам насіння або щонайменше близько 48 мг на грам насіння. Максимальний вміст ДГК може становити від приблизно 80 до приблизно 100 мг на грам насіння, або приблизно 80 мг або приблизно 100 мг на грам насіння.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається клітина рослини за винаходом, що містить екзогенні полінуклеотиди.

Також розкрита частина рослини, переважно насіння, яка має одну або більше з наступних ознак:

i) одержана з рослини за винаходом,

ii) містить ліпід, розкритий в цьому документі,

iii) може використовуватися в способі за винаходом,

iv) містить генетичну конструкцію за винаходом, або

v) містить набір екзогенних полінуклеотидів, як визначено в цьому документі.

Ще в одному аспекті цього винаходу розкривається зріле, зібране в процесі збору урожаю насіння Brassica napus, B. juncea або Camelina sativa, що містить ДГК, із вмістом вологи від приблизно 4 % до приблизно 15 мас. %, причому вміст ДГК в насінні становить щонайменше близько 28 мг на грам насіння, переважно щонайменше близько 32 мг на грам насіння, щонайменше близько 36 мг на грам насіння, щонайменше близько 40 мг на грам насіння, більш переважно щонайменше близько 44 мг на грам насіння або щонайменше близько 48 мг на грам насіння. Максимальний вміст ДГК може становити від приблизно 80 до приблизно 100 мг на грам насіння або приблизно 80 мг або приблизно 100 мг на грам насіння.

У варіанті реалізації винаходу розкрита клітина за винаходом, трансгенний організм за винаходом, рослина олійної культури за винаходом, рослина Brassica napus, B. juncea або Camelina sativa за винаходом, частина рослини за винаходом або насіння за винаходом, які можуть застосовуватися для одержання екстрагованого ліпіду, що має одну або більше, або всі ознаки, визначені в цьому документі.

Ще в одному аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання клітини за винаходом, який включає:

а) введення в клітину, переважно клітину, яка не здатна до синтезу ДЛ-ПНЖК, генної конструкції за винаходом, виділеного та/або екзогенного полінуклеотиду за винаходом, вектора або генетичної конструкції за винаходом, однієї або більш комбінацій екзогенних полінуклеотидів, визначених в цьому документі,

б) необов'язково експресію генів або полінуклеотиду(ів) у клітині;

в) необов'язково аналіз складу жирних кислот у клітині, і

г) необов'язково селекцію клітини, яка експресує гени або полінуклеотид(и).

У варіанті реалізації винаходу ліпід в клітині має одну або більше ознак, визначених у цьому документі.

В іншому варіанті реалізації винаходу генетична конструкція, виділений та/або екзогенний полінуклеотид, вектор, генетична конструкція або комбінація екзогенних полінуклеотидів стають стабільно інтегрованими до геному клітини.

В іншому варіанті реалізації винаходу клітина є клітиною рослини, і спосіб додатково включає стадію регенерації трансформованої рослини з клітини із стадії а).

В іншому варіанті реалізації винаходу гени та/або екзогенний(і) полінуклеотид(и) тимчасово експресуються в клітині.

Також розкрита клітина, одержана із застосуванням способу за винаходом.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання насіння, який включає:

а) вирощування рослини за винаходом або рослини, яка утворює частину, розкриту в цьому документі, переважно в полі як частини популяції розміром щонайменше 1000 таких рослин або на площі щонайменше 1 гектар, насаджених із стандартною щільністю насадження,

б) збір урожаю насіння з рослини або рослин, і

в) необов'язково, екстракцію ліпіду з насіння, Переважно з одержанням олії із загальним виходом ДГК щонайменше 60 кг ДГК/гектар.

У варіанті реалізації винаходу рослина, клітина рослини, частина рослини або насіння за винаходом має одну або більше з наступних ознак:

і) олія є такою, як розкрито в цьому документі,

іі) частина рослини або насіння можуть застосовуватися в способі за винаходом,

ііі) екзогенні полінуклеотиди введені в генетичну конструкцію за винаходом,

іv) екзогенні полінуклеотиди включають екзогенний полінуклеотид за винаходом,

v) клітина рослини є клітиною за винаходом, і

vі) насіння одержане у відповідності до способу за винаходом.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання однієї або більше десатураз жирних кислот та/або елонгаз жирних кислот, або однієї або більше десатураз жирних кислот і однієї або більше елонгаз жирних кислот, причому вказаний спосіб включає експресію в клітині або неклітинній системі експресії генетичної конструкції за винаходом, виділеного та/або екзогенного полінуклеотиду за винаходом, вектору або генетичної конструкції за винаходом, однієї або більше комбінацій екзогенних полінуклеотидів, розкритих в цьому документі, переважно в насінні олійної культури, що розвивається, на рослині олійної культури в полі.

У подальшому аспекті цього винаходу розкривається ліпід або олія, продуковані або одержані із застосуванням способу за винаходом, із клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини Brassica napus, B. juncea або Camelina sativa за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом або рослини, клітини рослини, частини рослини або насіння за винаходом.

У варіанті реалізації винаходу ліпід або олія одержані екстракцією олії з олійної культури. Приклади олії з олійних культур включають, без обмеження, олію каноли (Brassica napus, підвид Brassica rapa), олію гірчиці (Brassica juncea), іншу олію Brassica sp., соняшникову олію (Helianthus annus), льняну олію (Linum usitatissimum), соєву олію (Glycine max), сафлорову олію (Carthamus tinctorius), кукурудзяну олію (Zea mays), олію тютюну (Nicotiana tabacum), арахісове масло (Arachis hypogaea), пальмову олію, бавовняну олію (Gossypium hirsutum), кокосове масло (Cocos nucifera), олію авокадо (Persea americana), оливкову олію (Olea europaea), олію кеш'ю (Anacardium occidentale), олію макадамії (Macadamia intergrifolia), мигдальну олію (Prunus amygdalus) або олію насіння Arabidopsis (Arabidopsis thaliana).

У подальшому аспекті цього винаходу розкривається жирна кислота, продукована або одержана із застосуванням способу за винаходом, з клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини Brassica napus, B. juncea або Camelina sativa за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, або рослини, клітини рослини, частини рослини або насіння за винаходом. Переважно жирна кислота являє собою ДГК. Жирна кислота може знаходитися в суміші жирних кислот, склад жирних кислот у якій є таким, як розкрито в цьому документі. У варіанті реалізації винаходу жирна кислота є неестерифікованою.

Також розглядається шрот, отриманий з насіння за винаходом. Переважно шрот включає, не обов'язково обмежуючись ними, шрот Brassica napus, B. juncea, Camelina sativa або Glycine max. У варіанті реалізації винаходу шрот містить екзогенний(і) полінуклеотид(и) та/або генетичні конструкції, як розкрито в цьому документі.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається композиція, що містить один або більше з ліпіду або олії за винаходом, жирної кислоти за винаходом, генетичної конструкції за винаходом, виділеного та/або екзогенного полінуклеотиду за винаходом, вектора або

генетичної конструкції за винаходом, клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини Brassica napus, B. juncea або Camelina sativa за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, рослини, рослинної клітини, частини рослини або насіння за винаходом або макухи за винаходом. У варіантах реалізації винаходу композиція містить носій, придатний для фармацевтичного, харчового або сільськогосподарського застосування, сполуки для обробки насіння, добриво, інший харчовий продукт або поживний інгрідієнт, або додатковий білок або вітаміни.

Також розкриті харчові продукти (корми), косметика або хімічні речовини, що містять одне або більше з ліпіду або олії за винаходом, жирної кислоти за винаходом, генетичної конструкції за винаходом, виділеного та/або екзогенного полінуклеотиду за винаходом, вектора або генетичної конструкції за винаходом, клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини Brassica napus, B. juncea або Camelina sativa за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, рослини рослинної клітини, частини рослини або насіння за винаходом, макухи за винаходом або композиції за винаходом.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання харчових продуктів (корму), який включає змішування одного або більше ліпідів, або олії за винаходом, жирної кислоти за винаходом, генетичної конструкції за винаходом, виділеного та/або екзогенного полінуклеотиду за винаходом, вектора або генетичної конструкції за винаходом, клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини Brassica napus, B. juncea або Camelina sativa за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, рослини, рослинної клітини, частини рослини або насіння за винаходом, макухи за винаходом або композиції за винаходом, щонайменше із ще одним поживним інгредієнтом.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб лікування або попередження стану, при якому ПНЖК здійснюють сприятливу дію, причому вказаний спосіб включає введення суб'єкту одного або більше з ліпіду або олії за винаходом, жирної кислоти за винаходом, генетичної конструкції за винаходом, виділеного та/або екзогенного полінуклеотиду за винаходом, вектора або генетичної конструкції за винаходом, клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини Brassica napus, B. juncea або Camelina sativa за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, рослини, рослинної клітини, частини рослини або насіння за винаходом, шроту за винаходом, композиції за винаходом або харчових продуктів (корму) за винаходом.

Приклади станів, при яких ПНЖК здійснюють сприятливу дію, включають, без обмеження, серцеву аритмію, ангіопластику, запалення, астму, псоріаз, остеопороз, камені в нирках, СНІД, множинний склероз, ревматоїдний артрит, хворобу Крона, шизофренію, рак, плодовий алкогольний синдром, синдром гіперактивності і дефіциту уваги, муковісцидоз, фенілкетонурію, уніполярну депресію, агресивну ворожість, адренолейкодістрофію, захворювання коронарних судин серця, гіпертензію, діабет, ожиріння, хворобу Альцгеймера, хронічне обструктивне захворювання легенів, виразковий коліт, рестеноз після ангіопластики, екзему, гіпертонію, агрегацію тромбоцитів, шлунково-кишкову кровотечу, ендометріоз, передменструальний синдром, міалгічний енцефаломієліт, хронічну втомленість після вірусних інфекцій або захворювання очей.

Також розкрите застосування одного або більше з ліпіду або олії за винаходом, жирної кислоти за винаходом, генетичної конструкції за винаходом, виділеного та/або екзогенного полінуклеотиду за винаходом, вектора або генетичної конструкції за винаходом, клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини Brassica napus, B. juncea або Camelina sativa за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, рослини, рослинної клітини, частини рослини або насіння за винаходом, шроту за винаходом, композиції за винаходом або харчових продуктів (корму) за винаходом для виробництва лікарського засобу для лікування або попередження стану, при якому ПНЖК здійснюють сприятливу дію. Одержання лікарського засобу може включати змішування олії за винаходом з фармацевтично прийнятним носієм, з метою лікування стану, розкритого в цьому документі. Спосіб може включати, по-перше, очищення та/або переестерифікацію олії та/або фракціонування олії, з метою підвищення рівня ДГК. У конкретному варіанті реалізації винаходу спосіб включає обробку ліпіду або олії, наприклад, олії каноли, з метою перетворення жирних кислот в олії на алкілові ефіри, наприклад, метилові або етилові ефіри. Подальша обробка, наприклад, фракціонування або дистиляція, може застосовуватися для збагачення ліпіду або олії ДГК. У переважному варіанті реалізації винаходу лікарський засіб містить етилові ефіри ДГК. У ще більш переважному варіанті

реалізації винаходу рівень етилових ефірів ДГК в лікарському засобі становить від 30 % до 50 %. Лікарський засіб може додатково містити етилові ефіри ЕПК, наприклад, від 30 % до 50 % від загального вмісту жирних кислот в лікарському засобі. Такі лікарські засоби придатні для введення суб'єктам-людям або тваринам при лікуванні медичних станів, як розкрито в цьому документі.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб торгівлі насінням, який включає одержання насіння за винаходом і торгівлі одержаним насінням з одержанням грошової вигоди.

У варіанті реалізації винаходу одержання насіння включає культивацію рослин за винаходом та/або збір урожаю насіння з рослин.

В іншому варіанті реалізації винаходу одержання насіння додатково включає вміщення насіння до ємності та/або зберігання насіння.

У подальшому варіанті реалізації винаходу одержання насіння додатково включає перевезення насіння в інше місце.

Ще в одному варіанті реалізації винаходу спосіб додатково включає перевезення насіння в інше місце після продажу насіння.

У подальшому варіанті реалізації винаходу торгівля здійснюється з використанням електронних засобів, наприклад, комп'ютера.

Ще в одному аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання бункерів з насінням, який включає:

а) валкування, рядкове компостування та/або жнива наземних частин рослин, що містять насіння за винаходом,

б) молотьбу та/або віяння частин рослин, з відокремленням насіння від залишку частин рослини, і

в) просівання та/або сортування насіння, відокремленого на стадії б), і завантаження просіяного та/або сортованого насіння в бункери, з одержанням в такий спосіб бункерів із насінням.

У варіанті реалізації винаходу, якщо це доречно, ліпід або олія, переважно олія з насіння, за винаходом або придатні у відповідності до винаходу, містять приблизно такі рівні жиру, як розкрито в Таблиці в розділі Прикладів, наприклад, насіння 14 з Табл. 16.

Будь-який варіант реалізації в цьому документі слід інтерпретувати як застосовний, з відповідними поправками, до будь-якого іншого варіанту, якщо конкретно не вказано інше.

Контекст цього винаходу не повинен обмежуватись конкретними варіантами, розкритими в цьому документі, які наведені тільки з метою ілюстрації. Функціонально еквівалентні продукти, композиції і способи очевидно знаходяться в межах обсягу винаходу, розкритого в цьому документі.

В цьому документі, якщо конкретно не вказано інше або з контексту очевидно не слідує інше, посилання на єдину стадію, композицію речовини, групу стадій або групу композицій речовини повинно бути інтерпретоване як включаюче однину і множину (тобто, одну або більше) таких стадій, композицій речовини, груп стадій або груп композицій речовини.

Винахід додатково розкритий за допомогою наступних необмежуючих Прикладів, з посиланням на додані графічні матеріали.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фігура 1. Аеробні шляхи біосинтезу ДГК.

Фігура 2. Карта ділянки вставки Т-ДНК від лівої до правої меж pJP3416-GA7. RB позначає праву межу; LB, ліва межа; TER, ділянка термінатора транскрипції/поліаденілювання; PRO, промотор; кодуючі ділянки показані над стрілками, промотори і термінатори - під стрілками. Micpu-Δ6D, Δ6-десатураза Micromonas pusilla; Pyrco-Δ6E, Δ6-елонгаза Pyramimonas cordata; Pavsa-Δ5D, Δ5-десатураза Pavlova salina; Picpa-ω3D, ω3-десатураза Pichia pastoris; Pavsa-Δ4D, Δ4-десатураза P. salina; LackI-Δ12D, Δ12-десатураза Lachancea kluyveri; Pyrco-Δ5E, Δ5-елонгаза Pyramimonas cordata. NOS позначає ділянку термінатора транскрипції/поліаденілювання нопалінсинтази Agrobacterium tumefaciens; FP1, укорочений промотор напіну Brassica napus; FAE1, промотор Arabidopsis thaliana FAE1; Lectin, ділянка термінатора транскрипції/поліаденілювання лектину Glycine max; CnI1 і CnI2 позначає промотор або термінатор конлініну 1 або конлініну 2 Linum usitatissimum. ДПМ позначає ділянку прикріплення до матриксу Rb7 з Nicotiana tabacum.

Фігура 3. Карта ділянки вставки Т-ДНК від лівої до правої межі pJP3404. Позначення такі ж, як на Фіг. 2.

Фігура 4. Карта ділянки вставки від лівої до правої межі pJP3367. Позначення такі ж, як на Фіг. 2.

Фігура 5. Рівні ДГК як відсоток загальних жирних кислот в ліпіді насіння декількох незалежних трансгенних зерен Arabidopsis thaliana в поколіннях T_2 і T_3. Взяті в дужки події T_2 були відібрані для T_3. Проілюстровані події з генетичного оточення мутанта A. thaliana Columbia і fad2.

Фігура 6. Вміст олії (мас/мас) проти вмісту ДГК, як відсоток від загального вмісту жирних кислот ліпіду з трансгенних зерен Arabidopsis thaliana.

Фігура 7. Характерний ЗТ-ПЛР гель, що ілюструє низьку експресію гена Δ6-десатурази щодо інших трансгенів в Т-ДНК зародків B. napus, трансформованих з використанням pJP3416-GA7. Доріжки зліва ілюструють продукти ЗТ-ПЛР: 1, ДНК маркери розміру; доріжка 2, Δ12-десатураза; доріжка 3, ω3-десатураза; доріжка 4, Δ6-десатураза (низька експресія); доріжка 5, Δ6-елонгаза; доріжка 6, Δ5-десатураза; доріжка 7, Δ5-елонгаза; доріжка 8, Δ4-десатураза.

Фігура 8. Відсоток АЛК, нанесений на графік проти відсотка олеїнової кислоти, кожен у вигляді відсотку загальних жирних кислот в ліпіді, одержаному з трансгенних 35S:LEC2 соматичних ембріонів Brassica napus.

Фігура 9. Позиційний аналіз розподілу ЯМР на A) жирі тунця і, B) олії трансгенних зерен ДГК Arabidopsis. Піки, позначені "ДГК-альфа" представляють кількість ДГК, присутньої в положеннях sn-1 і sn-3 ТАГ (без позиційної переваги це дорівнювало б 66 % від загальної ДГК), тоді як піки, позначені "ДГК-бета" представляють кількість ДГК, присутньої в положенні sn-2 ТАГ (без переваги це дорівнювало би 33 % ДГК).

Фігура 10. Аналіз методом РХ-МС основних різновидів триацилгліцеролів, що містять ДГК, в трансгенному насінні, що розвивається (сірі), і зрілих (чорні), A. thaliana. Число, наступне за ДГК, позначає загальну кількість атомів вуглецю і загальну кількість подвійних зв'язків у двох інших жирних кислотах. Таким чином, ДГК/34:1 може також бути позначений як ТАГ 56:7, тощо.

Фігура 11. Карта ділянки вставки Т-ДНК від лівої до правої межі pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert. Позначення такі ж, як на Фіг. 2. SSU, промотор маленької субодиниці рубіско Arabidopsis thaliana.

Фігура 12. Карта бінарного вектора pJP3364, що ілюструє рестрикційний сайт NotI, в який були клоновані Δ12-десатурази-кандидати.

Фігура 13. Коробчаста діаграма, що згенерована з використанням SigmaPlot та ілюструє відсоток жирної кислоти 20:4ω6 (АРК) в ліпіді насіння з популяцій насіння T2 Arabidopsis, трансформованого pFN045-pFN050. Межа кожного прямокутника, найближча до нуля, вказує на 25-й процентиль, лінія в межах кожного прямокутника позначає медіану, і межа кожного прямокутника, найвіддаленіша від нуля, вказує на 75-й процентиль. Стовпчики помилки, наведені вище і нижче кожного прямокутника, вказують на 90-й і 10-й процентилі.

Фігура 14. Середній рівень АРК як відсоток від загального вмісту жирних кислот в ліпіді насіння з насіння T2 Arabidopsis, трансформованого pFN045-pFN050.

Фігура 15. Коробчата діаграма, що ілюструє відсоток жирної кислоти 20:2ω6 (ЕДК) в ліпіді насіння з популяцій насіння T2 Arabidopsis, трансформованих pFN045-pFN050. Коробчаста діаграма представляє значення, як визначено на Фіг. 13.

Фігура 16. Коробчаста діаграма, що ілюструє відсоток АРК в ліпіді насіння з популяцій насіння T4 Arabidopsis, трансформованих pFN045-pFN050. Коробчата діаграма представляє значення, як визначено на Фіг. 13.

Фігура 17. Середній рівень АРК як відсоток від загального вмісту жирних кислот в ліпіді насіння з популяцій насіння T_4 Arabidopsis, трансформованого pFN045-pFN050.

Фігура 18. Коробчаста діаграма, що ілюструє відсоток ЕДК в ліпіді насіння з популяцій насіння Arabidopsis T4, трансформованих pFN045-pFN050. Коробчата діаграма представляє значення, як визначено на Фіг. 13.

Фігура 19. (A) Основна структура фітостерину з кільцем і нумерацією бічного ланцюга. (B) Хімічні структури деяких фітостеринів.

Фігура 20. Філогенетичне дерево відомих ЛФКАТ (LPAAT).

Фігура 21. Різноманітні ферменти обміну ацилу, які переносять жирні кислоти між ФХ, пулами КоА і пулами ТАГ. Адаптовано із Singh et al. (2005).

КЛЮЧ ДО ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 - послідовність нуклеотидів pJP3416-GA7.

SEQ ID NO: 2 - послідовність нуклеотидів pGA7-mod_B.

SEQ ID NO: 3 - послідовність нуклеотидів pGA7-mod_C.

SEQ ID NO: 4 - послідовність нуклеотидів pGA7-mod_D.

SEQ ID NO: 5 - послідовність нуклеотидів pGA7-mod_E.

SEQ ID NO: 6 - послідовність нуклеотидів pGA7-mod_F.

SEQ ID NO: 7 - послідовність нуклеотидів pGA7-mod_G.

SEQ ID NO: 8 - послідовність нуклеотидів pORE04+ 11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert.

SEQ ID NO: 9 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ12-десатурази Lachancea kluyveri в рослинах.

SEQ ID NO: 10 - Δ12-десатураза Lachancea kluyveri.

SEQ ID NO: 11 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії ω3-десатурази Pichia pastoris в рослинах.

SEQ ID NO: 12 - ω3-десатураза Pichia pastoris.

SEQ ID NO: 13 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ6-десатуразу Micromonas pusilla.

SEQ ID NO: 14 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ6-десатурази Micromonas pusilla в рослинах (версія 1).

SEQ ID NO: 15 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ6-десатурази Micromonas pusilla в рослинах (версія 2).

SEQ ID NO: 16 - Δ6-десатураза Micromonas pusilla.

SEQ ID NO: 17-відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ6-десатуразу Ostreococcus lucimarinus.

SEQ ID NO: 18 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ6-десатурази Ostreococcus lucimarinus в рослинах.

SEQ ID NO: 19 - Δ6-десатураза Ostreococcus lucimarinus.

SEQ ID NO: 20 - Δ6-десатураза Ostreococcus tauri.

SEQ ID NO: 21 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ6-елонгазу Pyramimonas cordata.

SEQ ID NO: 22 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ6-елонгази Pyramimonas cordata в рослинах (вкорочена на 3' кінці і кодуюча функціональну елонгазу) (версія 1).

SEQ ID NO: 23 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ6-елонгази Pyramimonas cordata в рослинах (укорочена на 3' кінці і кодуюча функціональну елонгазу) (версія 2).

SEQ ID NO: 24 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ6-елонгази Pyramimonas cordata в рослинах (вкорочена на 3' кінці і кодуюча функціональну елонгазу) (версія 3).

SEQ ID NO: 25 - Δ6-елонгаза Pyramimonas cordata.

SEQ ID NO: 26 – вкорочена Δ6-елонгаза Pyramimonas cordata.

SEQ ID NO: 27 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ5-десатуразу Pavlova salina.

SEQ ID NO: 28 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ5-десатурази Pavlova salina в рослинах (версія 1).

SEQ ID NO: 29 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ5-десатурази Pavlova salina в рослинах (версія 2).

SEQ ID NO: 30 - Δ5-десатураза Pavlova salina.

SEQ ID NO: 31 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ5-десатуразу Pyramimonas cordata.

SEQ ID NO: 32 - Δ5-десатураза Pyramimonas cordata.

SEQ ID NO: 33 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ5-елонгазу Pyramimonas cordata.

SEQ ID NO: 34 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ5-елонгази Pyramimonas cordata в рослинах (версія 1).

SEQ ID NO: 35 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ5-елонгази Pyramimonas cordata в рослинах (версія 2).

SEQ ID NO: 36 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ5-елонгази Pyramimonas cordata в рослинах (версія 3).

SEQ ID NO: 37 - Δ5-елонгаза Pyramimonas cordata.

SEQ ID NO: 38 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ4-десатуразу Pavlova salina.

SEQ ID NO: 39 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ4-десатурази Pavlova salina в рослинах (версія 1).

SEQ ID NO: 40 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ4-десатурази Pavlova salina в рослинах (версія 2).

SEQ ID NO: 41 - Δ4-десатураза Pavlova salina.

SEQ ID NO: 42 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ9-елонгазу Isochrysis galbana.

SEQ ID NO: 43 - Δ9-елонгаза Isochrysis galbana.

SEQ ID NO: 44 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ9-елонгазу Emiliania huxleyi CCMP1516.

SEQ ID NO: 45 - кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ9-елонгази Emiliania huxleyi в рослинах.

SEQ ID NO 46 - Δ9-елонгаза Emiliania huxleyi CCMP1516.

SEQ ID NO 47 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ9-елонгазу Pavlova pinguis.

SEQ ID NO 48 - Δ9-елонгаза Pavlova pinguis.
SEQ ID NO 49 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ9-елонгазу Pavlova salina.
SEQ ID NO 50 - Δ9-елонгаза Pavlova salina.
SEQ ID NO 51 - відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ8-десатуразу Pavlova salina.
SEQ ID NO 52 - Δ8-десатураза Pavlova salina.
SEQ ID NO 53 - вірусний супресор P19.
SEQ ID NO 54 - вірусний супресор V2.
SEQ ID NO 55 - вірусний супресор P38.
SEQ ID NO 56 - вірусний супресор Pe-P0.
SEQ ID NO 57 - вірусний супресор RPV-P0.
SEQ ID NO 58 - відкрита рамка зчитування, кодуюча вірусний супресор P19.
SEQ ID NO 59 - відкрита рамка зчитування, кодуюча вірусний супресор V2.
SEQ ID NO 60 - відкрита рамка зчитування, кодуюча вірусний супресор P38.
SEQ ID NO 61 - відкрита рамка зчитування, кодуюча вірусний супресор Pe-P0.
SEQ ID NO 62 - відкрита рамка зчитування, кодуюча вірусний супресор RPV-P0.
SEQ ID NO 63 - ЛФКАТ2 Arabidopsis thaliana.
SEQ ID NO 64 - ЛФКАТ Limnanthes alba.
SEQ ID NO 65 - ЛФКАТ Saccharomyces cerevisiae.
SEQ ID NO 66 - ЛФКАТ Micromonas pusilla.
SEQ ID NO 67 - ЛФКАТ Mortierella alpina.
SEQ ID NO 68 - ЛФКАТ Braccisa napus.
SEQ ID NO 69 - ЛФКАТ Brassica napus.
SEQ ID NO 70 - ω3 десатураза Phytophthora infestans.
SEQ ID NO 71 - ω3 десатураза Thalassiosira pseudonana.
SEQ ID NO 72 - ω3 десатураза Pythium irregulare.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Загальні способи і визначення

Якщо конкретно не визначено інше, всі технічні і наукові терміни, використані в цьому документі, слід розуміти, як маючі таке ж значення, якого завжди надає їм середній фахівець в даній галузі техніки (наприклад, в культивуванні клітин, молекулярній генетиці, синтезі жирних кислот, трансгенних рослинах, хімії білка і біохімії).

Якщо не вказано інше, рекомбінантний білок, культура клітин та імунологічні методи, що використовуються в цьому винаході, являють собою стандартні способи, добре відомі фахівцям з рівня техніки. Такі методики описані і пояснені в літературних джерелах, наприклад, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (редактор), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (редактори), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 і 1996), F.M. Ausubel et al. (редактори), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, включаючи всі видання до сьогоднішнього дня), Ed Harlow and David Lane (редактори), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988) і J.E. Coligan et al. (редактори), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (включаючи всі видання до сьогоднішнього дня).

Термін "та/або", наприклад, "X та/або Y" слід розуміти, як такий, що позначає будь-яке з "X і Y" або "X або Y", і його слід інтерпретувати як явно підтримуючий обидва значення або будь-яке із значень.

В цьому документі термін "близько", якщо не вказано протилежне, позначає +/- 10 %, більш переважно +/- 5 %, більш переважно +/- 1 % від наведеного значення.

В цьому документі слово "включають" або його варіації, наприклад, "включає" або "який включає" слід розуміти, як таке, що позначає включення заявленого елементу, цілого числа або стадії, або групи елементів, цілих чисел або стадій, але не виключення будь-якого іншого елементу, цілого числа або стадії, або групи елементів, цілих чисел або стадій.

Деякі визначення

В цьому документі терміни "екстрагований рослинний ліпід" і "виділений рослинний ліпід" позначають ліпідну композицію, що виділена, наприклад, шляхом подрібнення, з рослини або її частини, такої як насіння. Екстрагований ліпід може являти собою відносно неочищену композицію, одержану, наприклад, шляхом подрібнення насіння рослини, або більш очищену композицію, з якої більшість, якщо не всі з одного або більше або кожного із води, нуклеїнових кислот, білків і вуглеводів, що походять з рослинного матеріалу, видалені. Нижче розкриті приклади способів очищення. У варіанті реалізації винаходу екстрагований або виділений

рослинний ліпід містить щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, або щонайменше приблизно 95 мас./мас. % ліпіду в композиції. Ліпід може бути твердим або рідким за кімнатної температури, якщо він є рідиною, то має назву олії. У варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід за винаходом не змішується з іншим ліпідом, наприклад, ДГК, що не продукованою іншим джерелом (наприклад, ДГК з риб'ячого жиру). У варіанті реалізації винаходу після екстракції одне або більше або всі із співвідношень олеїнова кислота : ДГК, пальмітинова кислота : ДГК, лінолева кислота : ДГК, і загальні ω6 жирні кислоти : загальні ω3 жирні кислоти, істотною мірою не змінюються (наприклад, не більш, ніж 10 % або 5 % змін), в порівнянні із співвідношенням в інтактному насінні або клітині. В іншому варіанті реалізації винаходу екстрагований рослинний ліпід не обробляється процедурою, такою як гідрогенізація або фракціонування, яка може змінити одне або більше або всі із співвідношень олеїнова кислота : ДГК, пальмітинова кислота : ДГК, лінолева кислота : ДГК і загальні ω6 жирні кислоти : загальні ω3 жирні кислоти, в порівнянні із співвідношенням в інтактному насінні або клітині. Якщо екстрагований рослинний ліпід за винаходом міститься в олії, олія може додатково містити молекули, що не є жирними кислотами, наприклад, стероли.

В цьому документі терміни "екстрагована рослинна олія (масло)" і "виділена рослинна олія (масло)" позначають речовину або композицію, що містить екстрагований рослинний ліпід або виділений рослинний ліпід, що є рідким за кімнатної температури. Олію одержують з рослини або її частини, наприклад, насіння. Екстрагована або виділена олія може являти собою відносно неочищену композицію, одержану, наприклад, шляхом подрібнення насіння рослини, або більш очищену композицію, з якої більшість, якщо не всі, з одного або більше або кожного із води, нуклеїнових кислот, білків і вуглеводів, що походять з рослинного матеріалу, видалені. Композиція може містити інші компоненти, що можуть бути ліпідними або неліпідними. У варіанті реалізації винаходу олійна композиція містить щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, або щонайменше приблизно 95 мас./мас. % екстрагованого рослинного ліпіду. У варіанті реалізації винаходу екстрагована олія за винаходом не змішується з іншим маслом, таким як ДГК, не продукована іншим джерелом (наприклад, ДГК з риб'ячого жиру). У варіанті реалізації винаходу, після екстракції одне або більше або всі із співвідношень олеїнова кислота : ДГК, пальмітинова кислота: ДГК, лінолева кислота: ДГК і загальні ω6 жирні кислоти : загальні ω3 жирні кислоти істотно не змінюються (наприклад, не більше, ніж 10 % або 5 % змін), в порівнянні із співвідношенням в інтактному насінні або клітині. В іншому варіанті реалізації винаходу екстраговану олію рослини не обробляють процедурою, такою як гідрогенізація або фракціонування, яка може змінювати одне або більше або всі із співвідношень олеїнова кислота : ДГК, пальмітинова кислота: ДГК, лінолева кислота: ДГК і загальні ω6 жирні кислоти : загальні ω3 жирні кислоти, в порівнянні із співвідношенням в інтактному насінні або клітині. Екстрагована рослинна олія за винаходом може містити молекули, що не є жирними кислотами, наприклад, стероли.

В цьому документі "олія (масло)" являє собою композицію, що містить в основному ліпід і є рідкою за кімнатної температури. Наприклад, олія за винаходом переважно містить щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 % або щонайменше 90 мас. % ліпіду. Як правило, очищена олія містить щонайменше 90 мас. % триацилгліцеролів (ТАГ) від вмісту ліпіду в олії. Мінорні компоненти олії, такі як діацилгліцероли (ДАГ), вільні жирні кислоти (ВЖК), фосфоліпід і стероли, можуть бути присутніми, як розкрито в цьому документі.

В цьому документі термін "жирна кислота" позначає карбонову кислоту (або органічну кислоту), часто з довгим аліфатичним хвостом, насиченим або ненасиченим. Зазвичай жирні кислоти містять ланцюг вуглець-вуглецевих зв'язків завдовжки щонайменше 8 атомів вуглецю, більш переважно завдовжки щонайменше 12 атомів вуглецю. Більшість жирних кислот, що зустрічаються в природі, містить парну кількість атомів вуглецю, оскільки в їх біосинтезі приймає участь ацетат, що містить два атоми вуглецю. Жирні кислоти можуть бути у вільному стані (неестерифіковані) або в естерифікованій формі, наприклад, як частина тригліцеролу, діацилгліцеролу, моноацилгліцеролу, зв'язки з ацил-КоА (тіоефір) або іншої форми зв'язку. Жирна кислота може бути естерифікованою як фосфоліпід, наприклад, форми фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну, фосфатидилсерину, фосфатидилгліцеролу, фосфатидилінозитолу або дифосфатидилгліцеролу.

"Насичені жирні кислоти" не містять подвійних зв'язків або інших функціональних груп уздовж ланцюга. Термін "насичений" позначає водень, з тим, що всі атоми вуглецю (окрім групи карбонової кислоти [-COOH]) містять максимально можливу кількість водню. Іншими словами,

омега (ω) кінець містить 3 атоми водню (CH3-), і кожен атом вуглецю в межах ланцюга містить 2 атоми водню (-CH2-).

"Ненасичені жирні кислоти" за формою подібні до насичених жирних кислот, за винятком того, що одна або більше алкенових функціональних груп присутні вздовж ланцюга, причому кожен алкен замінює одинарний зв'язок "-CH2-CH2-" частини ланцюга подвійним зв'язком "-CH=CH-" (тобто, вуглець приєднаний подвійним зв'язком до іншого атома вуглецю). Два наступні атоми вуглецю в ланцюгу, які приєднані до кожної із сторін подвійного зв'язку, можуть бути присутніми в цис- або транс-конфігурації.

В цьому документі термін "мононенасичена жирна кислота" позначає жирну кислоту, що містить щонайменше 12 атомів вуглецю у вуглецевому ланцюгу, і лише одну алкенову групу (подвійний вуглець-вуглецевий зв'язок) в ланцюгу. В цьому документі терміни "поліненасичена жирна кислота" або "ПНЖК" позначають жирну кислоту, яка містить щонайменше 12 атомів вуглецю у вуглецевому ланцюгу і щонайменше дві алкенові групи (подвійні вуглець-вуглецеві зв'язки).

В цьому документі терміни "довголанцюгова поліненасичена жирна кислота" і "ДЛ-ПНЖК" позначають жирну кислоту, яка містить щонайменше 20 атомів вуглецю у вуглецевому ланцюгу і щонайменше два подвійні вуглець-вуглецевих зв'язки, і таким чином включають ДДЛ-ПНЖК. В цьому документі терміни "поліненасичена жирна кислота з дуже довгим ланцюгом" і "ДДЛ-ПНЖК" позначають жирну кислоту, яка містить щонайменше 22 атоми вуглецю у вуглецевому ланцюгу і щонайменше три подвійні вуглець-вуглецевих зв'язки. Звичайно, кількість атомів вуглецю у вуглецевому ланцюгу жирних кислот відноситься до нерозгалуженого вуглецевого ланцюга. Якщо вуглецевий ланцюг розгалужений, кількість атомів вуглецю виключає атоми вуглецю бічних груп. В одному варіанті реалізації винаходу довголанцюгова поліненасичена жирна кислота являє собою ω3 жирну кислоту, тобто, містить десатурацію (подвійний вуглець-вуглецевий зв'язок) в положенні третього вуглець-вуглецевого зв'язку від метильного кінця жирної кислоти. В іншому варіанті реалізації винаходу довголанцюгова поліненасичена жирна кислота є ω6 жирною кислотою, тобто, містить десатурацію (подвійний вуглець-вуглецевий зв'язок) в положенні шостого вуглець-вуглецевого зв'язку від метильного кінця жирної кислоти. В іншому варіанті реалізації винаходу довголанцюгова поліненасичена жирна кислота вибрана з групи, що складається з: арахідонової кислоти (АРК, 20:4Δ5,8,11,14; ω6), ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК, 20:4Δ8,11,14,17, ω3), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК, 20:5Δ5,8,11,14,17; ω3), докозапентаєнової кислоти (ДПК, 22:5Δ7,10,13,16,19, ω3) або докозагексаєнової кислоти (ДГК, 22:6Δ4,7,10,13,16,19, ω3). Крім того, ДЛ-ПНЖК можуть являти собою дигомо-γ-лінолеву кислоту (ДГЛК) або ейкозатриєнову кислоту (ЕТрК, 20:3Δ11,14,17, ω3). Буде очевидно, що ДЛ-ПНЖК, одержана у відповідності до винаходу, може бути сумішшю будь-яких або всіх згаданих вище сполук, і може містити іншу ДЛ-ПНЖК або похідні будь-якої з наведених ДЛ-ПНЖК. В переважному варіанті реалізації винаходу ω3 жирні кислоти являють собою щонайменше ДГК, переважно ДПК і ДГК або ЕПК, ДПК і ДГК.

Додатково, в цьому документі терміни "довголанцюгова поліненасичена жирна кислота" і "поліненасичена жирна кислота з дуже довгим ланцюгом" позначають жирну кислоту, що знаходиться у вільному стані (неестерифіковану) або в естерифікованій формі, наприклад, як частина тригліцеролу, діацилгліцеролу, моноацилгліцеролу, зв'язки з ацил-КоА (тіоефір) або іншої форми зв'язку. Жирна кислота може бути естерифікованою як фосфоліпід, наприклад, форми фосфатидилхоліну (ФХ), фосфатидилетаноламіну, фосфатидилсерину, фосфатидилгліцеролу, фосфатидилінозитолу або дифосфатидилгліцеролу. Тому, ДЛ-ПНЖК може бути присутньою як суміш форм в ліпіді клітини або очищеній олії або ліпіді, екстрагованих з клітин, тканин або організмів. У переважних варіантах реалізації винаходу розкривається олія, що містить щонайменше 75 % або щонайменше 85 % триацилгліцеролів, причому решта представлена іншими формами ліпіду, такими як згадані вище, у яких присутні щонайменше вказані триацилгліцероли, що містять ДЛ-ПНЖК. В подальшому олія може бути додатково очищена або оброблена, наприклад гідролізом із сильною основою, з метою вивільнення вільних жирних кислот, або дистиляцією, тощо.

В цьому документі вираз "загальні ω6 жирні кислоти" або "загальний вміст ω6 жирних кислот" або подібний позначає суму всіх ω6 жирних кислот, естерифікованих і неестерифікованих, в екстрагованому ліпіді, олії, рекомбінантній клітині, частині рослини або насінні, як визначається контекстом, виражену як відсоток від загального вмісту жирних кислот. Вказані ω6 жирні кислоти включають (за наявності) ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК і ω6-ДПК, але виключають будь-які ω3 жирні кислоти і мононенасичені жирні кислоти.

В цьому документі вираз "нові ω6 жирні кислоти" або "вміст нових ω6 жирних кислот" або подібний позначає суму всіх ω6 жирних кислот, за винятком ЛК, естерифікованих і

неестерифікованих, в екстрагованому ліпіді, олії, рекомбінантній клітині, частині рослини або насінні, як визначається контекстом, виражену, як відсоток від загального вмісту жирних кислот. Такі нові ω6 жирні кислоти є жирними кислотами, продукованими в клітинах, рослинах, частинах рослини і насінні за винаходом шляхом експресії генетичних конструкцій (екзогенні полінуклеотиди), введених в клітини, і включають (за наявності) ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК і ω6-ДПК, але виключають ЛК і будь-які ω3 жирні кислоти і мононенасичені жирні кислоти. Характерний загальний вміст ω6 жирних кислот і вміст нових ω6 жирних кислот визначається за перетворенням жирних кислот у зразку на МЕЖК і результатами аналізу ГХ, як розкрито в Прикладі 1.

В цьому документі вираз "загальні ω3 жирні кислоти" або "загальний вміст ω3 жирних кислот" або подібний позначає суму всіх ω3 жирних кислот, естерифікованих і неестерифікованих, в екстрагованому ліпіді, олії, рекомбінантній клітині, частині рослини або насінні, як визначається контекстом, виражену, як відсоток від загального вмісту жирних кислот. Такі ω3 жирні кислоти включають (якщо вони присутні) АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК, і виключають будь-які ω6 жирні кислоти і мононенасичені жирні кислоти.

В цьому документі вираз "нові ω3 жирні кислоти" або "вміст нових ω3 жирних кислот" або подібний позначає суму всіх ω3 жирних кислот, за винятком АЛК, естерифікованих і неестерифікованих, в екстрагованому ліпіді, олії, рекомбінантній клітині, частині рослини або насінні, як визначається контекстом, виражену, як відсоток від загального вмісту жирних кислот. Такі нові ω3 жирні кислоти є жирними кислотами, продукованими в клітинах, рослинах, частинах рослин і насінні за винаходом шляхом експресії генетичних конструкцій (екзогенні полінуклеотиди), введених в клітини, і включають (якщо вони присутні) СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК, але виключають АЛК і будь-які ω6 жирні кислоти і мононенасичені жирні кислоти. Характерний загальний вміст ω3 жирних кислот і вміст нових ω3 жирних кислот визначається за перетворенням жирних кислот у зразку на МЕЖК і результатами аналізу ГХ, як розкрито в Прикладі 1.

Білки десатураза, елонгаза і ацилтрансфераза та гени, що кодують їх, які можуть застосовуватися у відповідності до винаходу, є будь-якими з відомих в рівні техніки або їх гомологами або похідними. Приклади таких генів і розмір кодованих білків наведені в Табл. 1. Ферменти десатурази, для яких продемонстровано участь в біосинтезі ДЛ-ПНЖК, всі належать до групи так званих "front-end" десатураз.

В цьому документі термін "front-end десатураза" позначає члена класу ферментів, які вводять подвійний зв'язок між карбоксильною групою і вже існуючою ненасиченою частиною ацильного ланцюга ліпідів, які структурно характеризуються присутністю домену N-кінцевого цитохром b5, разом з типовим доменом десатурази жирних кислот, що містить три високою мірою консервативних гістидинових бокси (Napier et al., 1997).

Активність будь-якої з елонгаз або десатураз для застосування у відповідності до винаходу може бути протестована шляхом експресії гена, що кодує фермент, в клітині, такій як, наприклад, дріжджова клітина, рослинна клітина, або переважно в соматичних ембріонах або трансгенних рослинах, і визначення того, чи має клітина, ембріон або рослина підвищеною здатністю до продукування ДЛ-ПНЖК, в порівнянні з аналогічною клітиною, ембріоном або рослиною, у яких фермент не експресується.

В одному варіанті реалізації винаходу одна або більше десатураз та/або елонгаз для застосування у відповідності до винаходу можуть бути одержані з мікроводорості і очищені, тобто мати послідовність амінокислот, ідентичну поліпептиду, який може бути одержаний з мікроводорості і очищений.

Хоча деякі ферменти конкретно розкриваються в цьому документі як "біфункціональні", відсутність такого терміну не обов'язково означає, що конкретний фермент не має іншу активність, окрім конкретно розкритої.

Десатурази

В цьому документі термін "десатураза" позначає фермент, що здатний вводити подвійний вуглець-вуглецевий зв'язок до ацильної групи жирнокислотного субстрату, який звичайно знаходиться в естерифікованій формі, наприклад, ефіри ацил-КоА. Ацильна група може бути естерифікована до фосфоліпіду, наприклад, фосфатидилхолін (ФХ), або до білка-носія ацилу (БНА), або, в переважному варіанті реалізації винаходу, до КоА. Десатурази загалом можуть бути розділені на три групи, відповідно. В одному варіанті реалізації винаходу десатураза являє собою front-end десатуразу.

В цьому документі "Δ4-десатураза" позначає білок, який здійснює реакцію десатурації із введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 4-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. Щонайменше "Δ4-десатураза" здатна

перетворювати ДПК на ДГК. Стадія десатурації з утворенням ДГК з ДПК каталізується Δ4-десатуразою в організмах, що не відносяться до ссавців, і ген, що кодує даний фермент, виділений із виду прісноводних найпростіших Euglena gracilis і морських видів Thraustochytrium (Qiu et al., 2001; Meyer et al., 2003). В одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ4-десатурази відповідає представленій в SEQ ID NO: 41, або Δ4-десатуразі виду Thraustochytrium, її біологічно активному фрагменту або послідовності амінокислот, щонайменше на 80 % ідентичній SEQ ID NO: 41.

Таблиця 1

Клоновані гени, що беруть участь в біосинтезі ДЛ-ПНЖК

Фермент	Тип організму	Вид	Номери доступу	Розмір білка (ак)	Посилання
Δ4-десатураза	Найпростіші	Euglena gracilis	AY278558	541	Meyer et al., 2003
	Водорості	Pavlova lutherii	AY332747	445	Tonon et al., 2003
		Isochrysis galbana	AAV33631	433	Pereira et al., 2004b
		Pavlova salina	AAY15136	447	Zhou et al., 2007
	Траустохітри-дієві	Thraustochytrium aureum	AAN75707 AAN75708 AAN75709 AAN75710	515	Отсутствуют
		Thraustochytrium sp. ATCC21685	AAM09688	519	Qiu et al., 2001
Δ5-десатураза	Ссавці	Homo sapiens	AF199596	444	Cho et al., 1999b Leonard et al., 2000b
	Нематода	Caenorhabditis elegans	AF11440, NM_069350	447	Michaelson et al., 1998b; Watts and Browse, 1999b
	Гриби	Mortierella alpina	AF067654	446	Michaelson et al., 1998a; Knutzon et al., 1998
		Pythium irregulare	AF419297	456	Hong et al., 2002a
		Dictyostelium discoideum	AB022097	467	Saito et al., 2000
		Saprolegnia diclina		470	WO02081668
	Діатомові	Phaeodactylum tricornutum	AY082392	469	Domergue et al., 2002
	Водорості	Thraustochytrium sp.	AF489588	439	Qiu et al., 2001
		Thraustochytrium aureum		439	WO02081668
		Isochrysis galbana		442	WO02081668
	Мох	Marchantia polymorpha	AY583465	484	Kajikawa et al., 2004
Δ6-десатураза	Ссавці	Homo sapiens	NM_013402	444	Cho et al., 1999a; Leonard et al., 2000
		Mus musculus	NM_019699	444	Cho et al., 1999a
	Нематода	Caenorhabditis elegans	Z70271	443	Napier et al., 1998
	Рослини	Borago officinales	U79010	448	Sayanova et al., 1997
		Echium	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto et al., 2002
		Primula vialii	AY234127	453	Sayanova et al., 2003
		Anemone leveillei	AF536525	446	Whitney et al., 2003
	Мохи	Ceratodon purpureus	AJ250735	520	Sperling et al., 2000
		Marchantia polymorpha	AY583463	481	Kajikawa et al., 2004
		Physcomitrella patens	CAA11033	525	Girke et al., 1998

Таблиця 1

Клоновані гени, що беруть участь в біосинтезі ДЛ-ПНЖК

Фермент	Тип організму	Вид	Номери доступу	Розмір білка (ак)	Посилання
	Гриби	Mortierella alpina	AF110510 AB020032	457	Huang et al., 1999; Sakuradani et al., 1999
		Pythium irregulare	AF419296	459	Hong et al., 2002a
		Mucor circinelloides	AB052086	467	NCBI*
		вид Rhizopus	AY320288	458	Zhang et al., 2004
		Saprolegnia diclina		453	WO02081668
	Діатомові	Phaedactylum tricornutum	AY082393	477	Domergue et al., 2002
	Бактерії	Synechocystis	L11421	359	Reddy et al., 1993
	Водорості	Thraustochytrium aureum		456	WO02081668
Біфункціональна Δ5/Δ6-десатураза	Риба	Danio rerio	AF309556	444	Hastings et al., 2001
C20 Δ8-десатураза	Водорості	Euglena gracilis	AF139720	419	Wallis and Browse, 1999
	Рослини	Borago officinales	AAG43277	446	Sperling et al., 2001
Δ6-елонгаза	Нематода	Caenorhabditis elegans	NM_069288	288	Beaudoin et al., 2000
	Мохи	Physcomitrella patens	AF428243	290	Zank et al., 2002
		Marchantia polymorpha	AY583464	290	Kajikawa et al., 2004
	Гриби	Mortierella alpina	AF206662	318	Parker-Barnes et al., 2000
	Водорості	Pavlova lutheri**		501	WO 03078639
		Thraustochytrium	AX951565	271	WO 03093482
		вид Thraustochytrium**	AX214454	271	WO 0159128
ПНЖК-елонгаза	Ссавці	Homo sapiens	AF231981	299	Leonard et al., 2000b; Leonard et al., 2002
		Rattus norvegicus	AB071985	299	Inagaki et al., 2002
		Rattus norvegicus**	AB071986	267	Inagaki et al., 2002
		Mus musculus	AF170907	279	Tvrdik et al., 2000
		Mus musculus	AF170908	292	Tvrdik et al., 2000
	Риба	Danio rerio	AF532782	291 (282)	Agaba et al., 2004
		Danio rerio**	NM_199532	266	Lo et al., 2003
	Черв'як	Caenorhabditis elegans	Z68749	309	Abbott et al., 1998 Beaudoin et al., 2000
	Водорості	Thraustochytrium aureum**	AX464802	272	WO 0208401-A2
		Pavlova lutheri**		320	WO 03078639
Δ9-елонгаза	Водорості	Isochrysis galbana	AF390174	263	Qi et al., 2002
		Euglena gracilis		258	WO 08/128241
Δ5-елонгаза	Водорості	Ostreococcus tauri	AAV67798	300	Meyer et al., 2004
		Pyramimonas cordata		268	WO 2010/057246
		вид Pavlova CCMP459	AAV33630	277	Pereira et al., 2004b
		Pavlova salina	AAY15135	302	Robert et al., 2009
	Діатомові	Thalassiosira pseudonana	AAV67800	358	Meyer et al., 2004
	Риба	Oncorhynchus mykiss	CAM55862	295	WO 06/008099
	Мох	Marchantia polymorpha	BAE71129	348	Kajikawa et al., 2006

* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ** Функція не доведена/не продемонстрована

В цьому документі "Δ5-десатураза" позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 5-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. Приклади "Δ5-десатураз" наведені в Ruiz-Lopez et al. (2012) і Petrie et al. (2010a), а також у Табл. 1 цього документу. В одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ5-десатурази відповідає представленій в SEQ ID NO: 30, її біологічно активному фрагменту або послідовності амінокислот, щонайменше на 80 % ідентичній SEQ ID NO: 30. В іншому варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ5-десатурази відповідає представленій SEQ ID NO: 32, її біологічно активному фрагменту, або послідовності амінокислот, щонайменше на 53 % ідентичній SEQ ID NO: 32. В іншому варіанті реалізації винаходу Δ5-десатураза одержана з виду Thraustochytrium або Emiliania huxleyi.

В цьому документі "Δ6-десатураза" позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 6-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. Приклади Δ6-десатураз наведені в Ruiz-Lopez et al. (2012) і Petrie et al. (2010a), а також в Табл. 1 цього документу. Переважні Δ6-десатурази одержані з Micromonas pusilla, Pythium irregulare або Ostreococcus taurii.

У варіанті реалізації винаходу Δ6-десатураза додатково характеризується наявністю щонайменше двох, переважно всіх трьох і переважно в рослинній клітині, з наступного: i) вища активність Δ6-десатурази по відношенню до α-ліноленової кислоти (АЛК, 18:3Δ9,12,15, ω3), ніж по відношенню до лінолевої кислоти (ЛК, 18:2Δ9,12, ω6) як жирнокислотного субстрату; ii) вища активність Δ6-десатурази по відношенню до АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж по відношенню до АЛК, приєднаної в положенні sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату; iiii) активність Δ8-десатурази по відношенню до ЕТрК. Приклади таких Δ6-десатураз наведені в Табл. 2.

У варіанті реалізації винаходу Δ6-десатураза має вищу активність по відношенню до ω3 субстрату, ніж по відношенню до відповідного ω6 субстрату, і має активність по відношенню до АЛК з утворенням октадекатетраєнової кислоти (стеаридонова кислота, СДК, 18:4Δ6,9,12,15, ω3), з ефективністю щонайменше 30 %, більш переважно щонайменше 40 %, або найбільш переважно щонайменше 50 %, при експресії з екзогенного полінуклеотиду в рекомбінантній клітині, такій як рослинна клітина, або щонайменше 35 % при експресії в дріжджовій клітині. В одному варіанті реалізації винаходу Δ6-десатураза має вищу активністю, наприклад, щонайменше приблизно в 2 рази вищу активність Δ6-десатурази по відношенню до АЛК, ніж по відношенню до ЛК як жирнокислотного субстрату. В іншому варіанті реалізації винаходу Δ6-десатураза має вищу активність, наприклад, щонайменше приблизно в 5 разів вищу активність Δ6-десатурази або щонайменше в 10 разів вищу активність по відношенню до АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж по відношенню до АЛК, приєднаної в положенні sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату. В іншому варіанті реалізації винаходу, Δ6-десатураза має активність по відношенню до обох жирнокислотних субстратів - АЛК-КоА і АЛК, приєднаних в положенні sn-2 ФХ.

Таблиця 2

Десатурази, які продемонстрували активність на субстраті ацил-КоА

Фермент	Тип організму	Вид	Номери доступу	Розмір білка (ак)	Посилання
Δ6-десатураза	Водорості	Mantoniella squamata	CAQ30479	449	Hoffmann et al., 2008
		Ostreococcus tauri	AAW70159	456	Domergue et al., 2005
		Micromonas pusilla	EEH58637		Petrie et al., 2010a (SEQ ID NO: 13)
Δ5-десатураза	Водорості	Mantoniella squamata	CAQ30478	482	Hoffmann et al., 2008
	Рослина	Anemone leveillei	Отсутствует		Sayanova et al., 2007

Таблиця 2

Десатурази, які продемонстрували активність на субстраті ацил-КоА

Фермент	Тип організму	Вид	Номери доступу	Розмір білка (ак)	Посилання
ω3-десатураза	Гриби	Pythium aphanidermatum	FW362186.1	359	Xue et al., 2012; WO2008/054565
	Гриби (ооміцет)	Phytophthora sojae	FW362214.1	363	Xue et al., 2012; WO2008/054565
	Гриби (ооміцет)	Phytophthora rumorum	FW362213.1	361	Xue et al., 2012; WO2008/054565

В одному варіанті реалізації винаходу Δ6-десатураза не має активність Δ5-десатурази по відношенню до ЕТК, яка могла би бути виявлена. В іншому варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ6-десатурази представлена SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 або SEQ ID NO: 20, їх біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 77 % ідентичною SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 або SEQ ID NO: 20. В іншому варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ6-десатурази представлена SEQ ID NO: 19 або SEQ ID NO: 20, їх біологічно активним фрагментом або послідовністю амінокислот, щонайменше на 67 % ідентичною одній або обом з SEQ ID NO:19 або SEQ ID NO: 20. Крім того, Δ6-десатураза може володіти активністю Δ8-десатурази.

В цьому документі "Δ8-десатураза" позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 8-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. Щонайменше Δ8-десатураза здатна перетворювати ЕТрК на ЕТК. Приклади Δ8-десатураз наведені в Табл. 1. В одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ8-десатурази відповідає представленій SEQ ID NO: 52, її біологічно активним фрагментом або послідовності амінокислот, щонайменше на 80 % ідентичній SEQ ID NO: 52.

В цьому документі "ω3-десатураза" позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 3-ого вуглець-вуглецевого зв'язку від метилового кінця жирнокислотного субстрату. Таким чином, ω3-десатураза може перетворювати ЛК на АЛК і ГЛК на СДК (всі С18 жирні кислоти), або ДГЛК на ЕТК та/або АРК на ЭПК (С20 жирні кислоти). Деякі ω3-десатурази (група I) володіють активністю тільки на С18 субстратах, таких як рослинні і ціанобактеріальні ω3-десатурази. Такі ω3-десатурази також є Δ15-десатуразами. Інші ω3-десатурази виявляють активність на субстратах С20 без активності (група II) або з деякою активністю (група III) на субстратах С18. Такі ω3-десатурази також є Δ17-десатуразами. Переважними ω3-десатуразами є група III типу, яка перетворює ЛК на АЛК, ГЛК на СДК, ДГЛК на ЭТК і АРК на ЭПК, наприклад, Pichia pastoris ω3-десатураза (SEQ ID NO: 12). Приклади ω3-десатураз включають описані Pereira et al. (2004a) (ω3-десатураза Saprolegnia diclina, група II), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) і Spychalla et al. (1997) (ω3-десатураза C. elegans, група III). В переважному варіанті реалізації винаходу ω3-десатураза являє собою грибкову ω3-десатуразу. В цьому документі "грибкова ω3-десатураза" позначає ω3-десатуразу, одержану з грибкового джерела, в тому числі, ооміцетного джерела, або її варіант з послідовністю амінокислот, щонайменше на 95 % ідентичною їй. Гени, що кодують численні ω3-десатурази, виділені з грибкових джерел, таких як, наприклад, Phytophthora infestans (номер доступу CAJ30870, WO2005083053; SEQ ID NO: 70), Saprolegnia diclina (номер доступу AAR20444, Pereira et al., 2004a і патент США № 7211656), Pythium irregulare (WO2008022963, Група II; SEQ ID NO: 72), Mortierella alpina (Sakuradani et al., 2005; номер доступу BAD91495; WO2006019192), Thalassiosira pseudonana (Armbrust et al., 2004; номер доступу XP_002291057; WO2005012316, SEQ ID NO: 71), Lachancea kluyveri (також відомий як Saccharomyces kluyveri; Oura et al., 2004; номер доступу AB118663). Xue et al. (2012) описує ω3-десатурази з ооміцетів Pythium aphanidermatum, Phytophthora sojae і Phytophthora ramorum, здатні ефективно перетворювати жирнокислотні субстрати ω6 на відповідні ω3 жирні кислоти, з перевагою у відношенні субстратів С20, тобто ті, що володіють вираженішою активністю Δ17-десатурази порівняно з активністю Δ15-десатурази. Такі ферменти не володіють активністю Δ12-десатурази, але здатні використовувати жирні кислоти в ацил-КоА і фосфоліпідній фракції як субстрати.

У більш переважному варіанті реалізації винаходу грибкова ω3-десатураза являє собою ω3-десатуразу/Δ15-десатуразу Pichia pastoris (також відома як Komagataella pastoris) (Zhang et al.,

2008; номер доступу EF116884; SEQ ID NO: 12) або поліпептид, який щонайменше на 95 % ідентичний їй.

У варіанті реалізації винаходу ω3-десатураза здатна здійснювати щонайменше одне з наступних перетворень: АРК на ЕПК, ДГЛК на ЕТК, ГЛК на СДК, АРК на ЕПК і ДГЛК на ЕТК, АРК на ЕПК і ГЛК на СДК, або всі три з них.

В одному варіанті реалізації винаходу ω3-десатураза має активність Δ17-десатурази по відношенню до жирної кислоти С20, яка містить щонайменше три подвійних вуглець-вуглецевих зв'язки, переважно АРК. В іншому варіанті реалізації винаходу ω3-десатураза має активністю Δ15-десатурази по відношенню до жирної кислоти С18, яка містить три подвійних вуглець-вуглецевих зв'язки, переважно ГЛК. Переважно обидва види активності присутні.

В цьому документі "Δ12-десатураза" позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 12-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. Звичайно Δ12-десатурази перетворюють олеоїл-фосфатидилхолін або олеоїл-КоА на лінолеоїл-фосфатидилхолін (18:1-ФХ) або лінолеоїл-КоА (18:1-КоА), відповідно. Підклас, що використовує пов'язаний з ФХ субстрат, називають фосфоліпід-залежними Δ12-десатуразами, другий підклас — ацил-КоА-залежними Δ12-десатуразами. Рослинні і грибкові Δ12-десатурази звичайно відносяться до першого підкласу, тоді як тваринні Δ12-десатурази відносяться до другого підкласу, наприклад, Δ12-десатурази, кодовані генами, які клоновані з комах Zhou et al. (2008). Численні інші послідовності Δ12-десатурази можуть бути легко ідентифіковані шляхом пошуку в базах даних послідовностей.

В цьому документі "Δ15-десатураза" позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 15-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. Численні гени, що кодують Δ15-десатурази, клоновані з рослинних і грибкових видів. Наприклад, в US5952544 розкриті нуклеїнові кислоти, що кодують рослинні Δ15-десатурази (FAD3). Ці ферменти містить мотиви амінокислот, які були характерними для рослинних Δ15-десатураз. У WO200114538 розкритий ген, що кодує FAD3 сої. Численні інші послідовності Δ15-десатурази можуть бути легко ідентифіковані шляхом пошуку в базах даних послідовностей.

В цьому документі "Δ17-десатураза" позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 17-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. Крім того, Δ17-десатураза розцінюється як ω3-десатураза, якщо вона діє на субстрат С20, з введенням десатурації в положенні зв'язку ω3.

У переважному варіанті реалізації винаходу Δ12-десатураза та/або Δ15-десатураза являє собою грибкову Δ12-десатуразу або грибкову Δ15-десатуразу. В цьому документі "грибкова Δ12-десатураза" або "грибкова Δ15-десатураза" позначає Δ12-десатуразу або Δ15-десатуразу, одержану з грибкового джерела, зокрема, ооміцетного джерела, або її варіант, послідовність амінокислот якого є щонайменше на 95 % ідентичною їй. Гени, що кодують численні десатурази, виділені з грибкових джерел. У US 7211656 розкрита Δ12-десатураза із Saprolegnia diclina. У WO2009016202 розкриті грибкові десатурази з Helobdella robusta, Laccaria bicolor, Lottia gigantea, Microcoleus chthonoplastes, Monosiga brevicollis, Mycosphaerella fijiensis, Mycospaerella graminicola, Naegleria gruben, Nectria haematococca, Nematostella vectensis, Phycomyces blakesleeanus, Trichoderma resii, Physcomitrella patens, Postia placenta, Selaginella moellendorffii і Microdochium nivale. У WO2005/012316 розкрита Δ12-десатураза з Thalassiosira pseudonana та інших грибів. У WO2003/099216 розкриті гени, кодуючі грибкові Δ12-десатурази і Δ15-десатурази, виділені з Neurospora crassa, Aspergillus nidulans, Botrytis cinerea і Mortierella alpina. У WO2007133425 розкриті грибкові Δ15 десатурази, виділені з: Saccharomyces kluyveri, Mortierella alpina, Aspergillus nidulans, Neurospora crassa, Fusarium graminearum, Fusarium moniliforme і Magnaporthe grisea. Переважна Δ12 десатураза виділена з Phytophthora sojae (Ruiz-Lopez et al., 2012).

Іншим підкласом грибкових Δ12-десатураз і грибкових Δ15-десатураз є біфункціональні грибкові Δ12/Δ15-десатурази. Гени, що кодують їх, клоновані з Fusarium monoliforme (номер доступу DQ272516, Damude et al., 2006), Acanthamoeba castellanii (номер доступу EF017656, Sayanova et al., 2006), Perkinsus marinus (WO2007042510), Claviceps purpurea (номер доступу EF536898, Meesapyodsuk et al., 2007) і Coprinus cinereus (номер доступу AF269266, Zhang et al., 2007).

В іншому варіанті реалізації винаходу ω3-десатураза має щонайменше деяку активність, переважно більшу активність, по відношенню до субстрату ацил-КоА, ніж до субстрату відповідного ацил-ФХ. В цьому документі "відповідний субстрат ацил-ФХ" позначає

естерифікований жирною кислотою в положенні sn-2 фосфатидилхолін (ФХ), в якому жирна кислота є такою ж жирною кислотою, як в субстраті ацил-КоА. Наприклад, субстрат ацил-КоА може бути АРК-КОА, і тоді відповідний субстрат ацил-ФХ являє собою sn-2 АРК-ФХ. У варіанті реалізації винаходу активність щонайменше вдвічі вища. Переважно ω3-десатураза має щонайменше деяку активність по відношенню до субстрату ацил-КоА і відповідного субстрату ацил-ФХ, і має активність по відношенню до субстратів С18 і С20. Приклади таких ω3-десатураз відомі серед клонованих грибкових десатураз, наведених вище.

В іншому варіанті реалізації винаходу ω3-десатураза містить послідовність амінокислот, представлену SEQ ID NO: 12, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, яка є щонайменше на 60 % ідентичною SEQ ID NO: 12, переважно є щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичною SEQ ID NO: 12.

Ще в одному варіанті реалізації винаходу десатураза для використання в цьому винаході має вищу активність по відношенню до субстрату ацил-КоА, ніж відповідного субстрату ацил-ФХ. В іншому варіанті реалізації винаходу десатураза для використання в цьому винаході має вищу активність по відношенню до субстрату ацил-ФХ, ніж відповідного субстрату ацил-КоА, але має деяку активність по відношенню до обох субстратів. Як окреслено вище, "відповідний субстрат ацил-ФХ" позначає естерифікований жирною кислотою в положенні sn-2 фосфатидилхолін (ФХ), в якому жирна кислота є такою ж, як жирна кислота в субстраті ацил-КоА. У варіанті реалізації винаходу вища активність означає щонайменше вдвічі вищу активність. У варіанті реалізації винаходу десатураза являє собою Δ5- або Δ6-десатуразу, або ω3-десатуразу, приклади яких розкриті, без обмеження, в Табл. 2. З метою тестування того, на який субстрат діє десатураза, а саме, на субстрат ацил-КоА або ацил-ФХ, можуть бути проведені аналізи на дріжджових клітинах, як описано в Domergue et al. (2003) і (2005). Крім того, здатність десатурази діяти на субстрат ацил-КоА може передбачатися, якщо елонгаза, яка експресується разом з десатуразою, демонструє ефективність ферментного перетворення в рослинних клітинах щонайменше близько 90 %, якщо елонгаза каталізує елонгацію продукту десатурази. Базуючись на цьому, Δ5-десатураза і Δ4-десатурази, що експресуються із конструкта GA7 (Приклади 2 і 3) та їх варіанти (Приклад 5) здатні до десатурації відповідних ацил-КоА субстратів, ЕТК-КоА і ДПК-КоА.

Елонгази

Біохімічні докази наводять на думку про те, що елонгація жирної кислоти складається з 4-х стадій: конденсація, відновлення, дегідратація і друге відновлення. В контексті цього винаходу, "елонгаза" позначає поліпептид, що каталізує стадію конденсації в присутності інших членів комплексу елонгації, у відповідних фізіологічних умовах. Показано, що гетерологічна або гомологічна експресія в клітині тільки конденсуючого компоненту ("елонгаза") комплексу елонгації білка потрібна для елонгації відповідного ацильного ланцюга. Тому, введена елонгаза може успішно рекрутувати відновлювальну і дегідратувальну активність з трансгенного хазяїна, з метою здійснення успішної елонгації ацилу. Вважається, що за специфічність реакції елонгації щодо довжини ланцюга і ступеня десатурації жирнокислотних субстратів відповідає компонент конденсації. Крім того, вважається, що цей компонент є обмежуючим швидкість в реакції елонгації.

В цьому документі "Δ5-елонгаза" щонайменше здатна перетворювати ЕПК на ДПК. Приклади Δ5-елонгаз включають розкриті у WO2005/103253. В одному варіанті реалізації винаходу Δ5-елонгаза має активність по відношенню до ЕПК з утворенням ДПК із ефективністю щонайменше 60 %, більш переважно щонайменше 65 %, більш переважно щонайменше 70 % або найбільш переважно щонайменше 80 % або 90 %. В додатковому варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ5-елонгази представлена SEQ ID NO: 37, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 47 % ідентичною SEQ ID NO: 37. У подальшому варіанті реалізації винаходу Δ6-елонгаза походить з Ostreococcus taurii або Ostreococcus lucimarinus (US2010/088776).

В цьому документі "Δ6-елонгаза" щонайменше здатна перетворювати СДК на ЕТК. Приклади Δ6-елонгаз включають наведені в Табл. 1. В одному варіанті реалізації винаходу елонгаза містить послідовність амінокислот, представлену SEQ ID NO: 25, її біологічно активний фрагмент (наприклад, фрагмент, розкритий як SEQ ID NO: 26), або послідовність амінокислот, щонайменше на 55 % ідентичну одній або обом з SEQ ID NO: 25 або SEQ ID NO: 26. У варіанті реалізації винаходу Δ6-елонгаза одержана з Physcomitrella patens (Zank et al., 2002; номер доступу AF428243) або Thalassiosira pseudonana (Ruiz-Lopez et al., 2012).

В цьому документі "Δ9-елонгаза" щонайменше здатна перетворювати АЛК на ЕТрК. Приклади Δ9-елонгаз включають наведені в Табл. 1. В одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ9-елонгази представлена SEQ ID NO: 43, її біологічно активним

фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 80 % ідентичною SEQ ID NO: 43. В іншому варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ9-елонгази представлена SEQ ID NO: 46, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 81 % ідентичною SEQ ID NO: 46. У ще одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ9-елонгази представлена SEQ ID NO: 48, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичною SEQ ID NO: 48. В іншому варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ9-елонгази представлена SEQ ID NO: 50, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичною SEQ ID NO: 50. У подальшому варіанті реалізації винаходу Δ9-елонгаза має вищу активність по відношенню до ω6 субстрату, ніж відповідного ω3 субстрату, або навпаки.

В цьому документі термін "має вищу активність по відношенню до субстрату ω6, ніж відповідного субстрату ω3" позначає відносну активність ферменту по відношенню до субстратів, яка відрізняється за активністю ω3 десатурази. Переважно субстрат ω6 являє собою ЛК, і субстрат ω3 являє собою АЛК.

Елонгаза з активністю Δ6-елонгази і Δ9-елонгази щонайменше здатна (i) перетворювати СДК на ЕТК і (ii) перетворювати АЛК на ЕТрК, а також має вищу активність Δ6-елонгази, ніж активністю Δ9-елонгази. В одному варіанті реалізації винаходу елонгаза має ефективність перетворення СДК з утворенням ЕТК, яка становить щонайменше 50 %, більш переважно щонайменше 60 %, та/або ефективністю перетворення АЛК з утворенням ЕТрК, яка становить щонайменше 6 % або більш переважно щонайменше 9 %. В іншому варіанті реалізації винаходу елонгаза має активність Δ6-елонгази, щонайменше приблизно в 6,5 раз перевищуючою активність Δ9-елонгази. У подальшому варіанті реалізації винаходу елонгаза не має активність Δ5-елонгази, яка могла би бути виявлена.

Інші ферменти

В цьому документі термін "l-ацил-гліцерол-3-фосфат ацилтрансфераза" (ЛФКАТ), що також має назву ацилтрансферази лізофосфатидинової кислоти або ацил-КоА-лізофосфатидат-ацилтрансферази, позначає білок, який ацилює sn-1-ацил-гліцерол-3-фосфат (sn-1 G-3-P) в положенні sn-2, з утворенням фосфатидної кислоти (ФК). Таким чином, термін "активність l-ацил-гліцерол-3-фосфат ацилтрансферази" позначає ацилування (sn-1 G-3-P) в положенні sn-2, з утворенням ФК (ЄС 2.3.1.51). Переважними ЛФКАТ є такі, що можуть використовувати поліненасичений С22 ацил-КоА як субстрат, для перенесення поліненасиченої групи ацилу С22 в положення sn-2 ЛФК, з утворенням ФК. Приклади таких ЛФКАТ наведені в Прикладі 13 і можуть бути протестовані, як розкрито в цьому документі. У варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот ЛФКАТ, придатна у відповідності до винаходу, представлена будь-якою з SEQ ID NO: 63–69, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 40 % ідентичною будь-якій одній або більше із SEQ ID NO: 63–69. У переважному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот ЛФКАТ, придатна у відповідності до винаходу, представлена будь-якою з SEQ ID NO: 64, 65 і 67, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 40 % ідентичною будь-який однієї або більш з SEQ ID NO: 64, 65 і 67.

В цьому документі термін "діацилгліцерол ацилтрансфераза" (ЄС 2.3.1.20; ДГАТ), позначає білок, який переносить жирну групу ацилу з ацил-КоА до діацилгліцерольного субстрату, з утворенням триацилгліцеролу. Тому, термін "активність діацилгліцерол ацилтрансферази" позначає перенесення ацил-КоА до діацилгліцеролу, з утворенням триацилгліцеролу. Існує три відомих види ДГАТ, позначені як ДГАТ1, ДГАТ2 і ДГАТ3, відповідно. Поліпептиди ДГАТ1 звичайно містять 10 трансмембранних доменів, ДГАТ2 звичайно містять 2 трансмембранних домени, тоді як ДГАТ3 звичайно є розчинним. Приклади поліпептидів ДГАТ1 включають поліпептиди, кодовані генами ДГАТ1 з Aspergillus fumigatus (номер доступу XP_755172), Arabidopsis thaliana (CAB44774), Ricinus communis (AAR11479), Vernicia fordii (ABC94472), Vernonia galamensis (ABV21945, ABV21946), Euonymus alatus (AAV31083), Caenorhabditis elegans (AAF82410), Rattus norvegicus (NP_445889), Homo sapiens (NP_036211), а також їх варіанти та/або мутанти. Приклади поліпептидів ДГАТ2 включають поліпептиди, кодовані генами ДГАТ2 з Arabidopsis thaliana (номер доступу NP_566952), Ricinus communis (AAY16324), Vernicia fordii (ABC94474), Mortierella ramanniana (AAK84179), Homo sapiens (Q96PD7, Q58HT5), Bos taurus (Q70VD8), Mus musculus (AAK84175), Micromonas CCMP1545, а також їх варіанти та/або мутанти. Приклади поліпептидів ДГАТ3 включають поліпептиди, кодовані генами ДГАТ3 з арахісу (Arachis hypogaea, Saha, et al., 2006), а також їх варіанти та/або мутанти.

Поліпептиди/пептиди

Термін "рекомбінантний" в контексті поліпептиду позначає поліпептид, який продукується клітиною або неклітинною системою експресії у модифікованій кількості або з модифікованою швидкістю, в порівнянні з його природним станом, коли він продується природним шляхом. В одному варіанті реалізації винаходу клітина є клітиною, яка в природі не продукує поліпептиду. Однак, клітина може бути клітиною, яка містить не ендогенний ген, що приводить до продукування модифікованої кількості поліпептиду. Рекомбінантний поліпептид за винаходом включає поліпептиди в клітині, тканині, органі або організмі, або неклітинній системі експресії, у якій він продукується, тобто поліпептид, який не був очищений або відокремлений від інших компонентів трансгенної (рекомбінантної) клітини, в якій він був продукований, і поліпептидів, продукованих в таких клітинах або неклітинних системах, які в подальшому очищають щонайменше від деяких інших компонентів.

Терміни "поліпептид" і "білок" загалом використовуються рівнозначно.

Поліпептид або клас поліпептидів може бути визначений за ступенем ідентичності (% ідентичності) його послідовності амінокислот референтній послідовності амінокислот, або за більшим % ідентичності одній референтній послідовності амінокислот, ніж іншій. % ідентичності поліпептиду референтній послідовність амінокислот звичайно визначається за аналізом GAP (Needleman and Wunsch, 1970; програма GCG) з параметрами штрафу на відкриття проміжку = 5 і штрафу на подовження проміжку = 0,3. Довжина послідовності запиту становить щонайменше 15 амінокислот, і аналіз GAP вирівнює дві послідовності протягом ділянки завдовжки щонайменше 15 амінокислот. Переважніше довжина послідовності запиту становить щонайменше 50 амінокислот, і аналіз GAP вирівнює дві послідовності протягом ділянки завдовжки щонайменше 50 амінокислот. Переважніше довжина послідовності запиту становить щонайменше 100 амінокислот, і аналіз GAP вирівнює дві послідовності протягом ділянки завдовжки щонайменше 100 амінокислот. Навіть переважніше довжина послідовності запиту становить щонайменше 250 амінокислот, і аналіз GAP вирівнює дві послідовності протягом ділянки завдовжки щонайменше 250 амінокислот. Навіть більш Переважно аналіз GAP вирівнює дві послідовності протягом їх повної довжини. Поліпептид або клас поліпептидів може володіти такою ж ферментною активністю або іншою активністю або не володіти активністю референтного поліпептиду. Переважно поліпептид має ферментну активність на рівні щонайменше 10 %, щонайменше 50 %, щонайменше 75 % або щонайменше 90 % від активності референтного поліпептиду.

"Біологічно активний фрагмент" є частиною поліпептиду, визначеного в цьому документі, яка зберігає певну активність повнорозмірного референтного поліпептиду, наприклад, має активність десатурази та/або елонгази або іншу ферментну активність. Біологічно активні фрагменти в цьому документі виключають повнорозмірний поліпептид. Біологічно активні фрагменти можуть бути частиною будь-якого розміру, до тих пір, поки вони зберігають певну активність. Переважно біологічно активний фрагмент зберігає щонайменше 10 %, щонайменше 50 %, щонайменше 75 % або щонайменше 90 % активності повнорозмірного білка.

Щодо певного поліпептиду або ферменту, необхідно розуміти, що % ідентичності, перевищуючий розкриті в цьому документі, включає переважні варіанти. Таким чином, якщо це доречно, у світлі мінімального % ідентичності, Переважно щоб поліпептид/фермент містив послідовність амінокислот, яка є щонайменше на 60 %, більш переважно щонайменше на 65 %, більш переважно щонайменше на 70 %, більш переважно щонайменше на 75 %, більш переважно щонайменше на 76 %, більш переважно щонайменше на 80 %, більш переважно щонайменше на 85 %, більш переважно щонайменше на 90 %, більш переважно щонайменше на 91 %, більш переважно щонайменше на 92 %, більш переважно щонайменше на 93 %, більш переважно щонайменше на 94 %, більш переважно щонайменше на 95 %, більш переважно щонайменше на 96 %, більш переважно щонайменше на 97 %, більш переважно щонайменше на 98 %, більш переважно щонайменше на 99 %, більш переважно щонайменше на 99,1 %, більш переважно щонайменше на 99,2 %, більш переважно щонайменше на 99,3 %, більш переважно щонайменше на 99,4 %, більш переважно щонайменше на 99,5 %, більш переважно щонайменше на 99,6 %, більш переважно щонайменше на 99,7 %, більш переважно щонайменше на 99,8 %, і навіть більш переважно щонайменше на 99,9 % ідентична вказаній у зв'язку з нею SEQ ID NO.

Варіанти/мутанти амінокислотної послідовності поліпептидів, розкритих в цьому документі, можуть бути одержані шляхом введення відповідних модифікацій нуклеотидів до нуклеїнової кислоти, розкритої в цьому документі, або синтезу цільового поліпептиду in vitro. Такі варіанти/мутанти включають, наприклад, делеції, вставки або заміни залишків в межах послідовності амінокислот. Комбінація делеції, вставки і заміни може бути здійснена таким

чином, щоб одержати кінцеву конструкцію, за умови, що кінцевий пептидний продукт має бажану ферментну активність.

Мутантні (модифіковані) пептиди можуть бути одержані із застосуванням будь-якої методології, відомої з рівня техніки. Наприклад, полінуклеотид, розкритий в цьому документі, може бути оброблений методами мутагенезу in vitro або тасування ДНК, як детально описано Harayama (1998). Скринінг продуктів, які одержують з видозміненої/модифікованої ДНК, може бути з легкістю здійснений із застосуванням способів, розкритих в цьому документі, для визначення того, чи володіють вони, наприклад, десатуразною або елонгазною активністю.

При конструюванні мутантів послідовності амінокислот, місцеположення сайту мутації і природа мутації залежатимуть від характеристики(ик), яку модифікують. Сайти для мутації можуть бути модифіковані індивідуально або посерійно, наприклад, шляхом: (1) заміни спочатку вибраних консервативних амінокислот, а потім більш радикальних замін, в залежності від досягнутих результатів, (2) видалення залишку-мішені, або (3) вставки інших залишків, суміжних з розміщеним сайтом.

Делеції в амінокислотній послідовності загалом варіюють від приблизно 1 до 15 залишків, переважніше від приблизно 1 до 10 залишків і звичайно приблизно від 1 до 5 суміжних залишків.

У мутантах заміни видалений щонайменше один залишок амінокислоти в молекулі поліпептиду, та інший залишок вставлений на його місце. Найцікавіші положення для мутагенезу шляхом заміни включають сайти, що не є консервативними в природних десатуразах або елонгазах. Заміни в таких сайти переважно здійснюються відносно консервативним чином, з метою збереження активності ферменту. Такі консервативні заміни проілюстровані в Табл. 3 під заголовком "приклади замін".

У переважному варіанті реалізації винаходу мутантний/варіантний поліпептид містить тільки або не більше ніж одну або дві або три або чотири консервативні модифікації амінокислот, в порівнянні з природним поліпептидом. Подробиці консервативних модифікацій амінокислот наведені в Табл. 3. Як буде зрозуміле кваліфікованому фахівцю, такі незначні модифікації можуть в розумних межах бути спрогнозовані як не впливаючі на активність поліпептиду при експресії в рекомбінантній клітині.

Поліпептиди можуть бути одержані різноманітними шляхами, зокрема, продукування і виділення природних поліпептидів або рекомбінантних поліпептидів у відповідності до методів, відомих з рівня техніки. В одному варіанті реалізації винаходу рекомбінантний поліпептид продукується культивованою клітиною, здатною експресувати поліпептид в умовах, ефективних для продукування поліпептиду, наприклад, клітиною-хазяїном, розкритою в цьому документі. Більш переважною клітиною для продукування поліпептиду є клітина в рослині, особливо в насінні на рослині.

Полінуклеотиди

Крім того, у винаході розкриваються та/або застосовуються полінуклеотиди, які можуть бути, наприклад, геном, виділеним полінуклеотидом, химерною генетичною конструкцією, такою як молекула Т-ДНК або химерна ДНК. Це може бути ДНК або РНК геномного або синтетичного походження, двохланцюгова або одноланцюгова, а також комбінована з вуглеводом, ліпідами, білком або іншими матеріалами з метою здійснення конкретної активності, розкритої в цьому документі. Термін "полінуклеотид" використовується в цьому документі рівнозначно з терміном "молекула нуклеїнової кислоти". Під "виділеним полінуклеотидом" ми маємо на увазі полінуклеотид, який, при одержанні з природного джерела, був відокремлений від полінуклеотидних послідовностей, з якими він асоційований або зв'язаний в природному стані, або полінуклеотид, що не зустрічається в природі. Переважно виділений полінуклеотид є щонайменше на 60 % вільним, переважніше щонайменше на 75 % вільним, і переважніше щонайменше на 90 % вільним від інших компонентів, з якими він зв'язаний в природі.

Таблиця 3

Приклади замін

Початковий залишок	Приклади замін
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser

Таблиця 3

Приклади замін

Початковий залишок	Приклади замін
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pto, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

У варіанті реалізації винаходу полінуклеотид за винаходом не зустрічається в природі. Приклади полінуклеотидів, що не зустрічаються в природі, включають, без обмеження, такі, що мутували (наприклад, в результаті застосування способів, розкритих в цьому документі), і полінуклеотиди, у яких відкрита рамка зчитування, кодуюча білок, функціонально пов'язана з промотором, із яким вона не пов'язана в природі (наприклад, у конструкціях, розкритих в цьому документі).

В цьому документі термін "ген" використовується в найширшому контексті і включає дезоксирибонуклеотидні послідовності, що містять транскрибовану ділянку і, у випадку трансляції, ділянка кодування білка структурного гена, включаючи послідовності, розміщені суміжно з кодуючою ділянкою на 5' і 3' кінцях, на відстані щонайменше приблизно 2 тисячі пар основ на будь-якому кінці, що беруть участь в експресії гена. В цьому відношенні, ген містить контрольні сигнали, наприклад, промотори, енхансери, сигнали термінації та/або поліаденілювання, які в природі асоційовані з даним геном, або гетерологічні контрольні сигнали, і в цьому випадку ген носить назву "Химерного гена". Послідовності, що розміщені на 5' кінці кодуючої білок ділянки, і які присутні на мРНК, позначаються як 5' нетрансльовані послідовності. Послідовності, що розміщені на 3' кінці або нижче по відношенню до кодуючої білок ділянки, і які присутні на мРНК, позначаються як 3' нетрансльовані послідовності. Термін "ген" включає кДНК і геномні форми гена. Геномна форма або клон гена містить кодуючу ділянку, що може перериватися некодуючими послідовностями під назвою "інтрони" або "проміжні ділянки" або "проміжні послідовності". Інтрони являє собою сегменти гена, транскрибовані в ядерну РНК (гетерогенну ядерну РНК, гяРНК). Інтрони можуть містити регуляторні елементи, наприклад, енхансери. Інтрони видаляють або "зрощують" з ядерним або первинним транскриптом; таким чином, інтрони відсутні в транскрипті матричної РНК (мРНК). Функція мРНК в ході трансляції полягає в конкретизації послідовності або порядку амінокислот у виникаючому поліпептиді. Термін "ген" включає синтетичну або злиту молекулу, що кодує повнорозмірні білки або їх частини за винаходом, розкриті в цьому документі, і нуклеотидну послідовність, комплементарну до будь-якої із згаданих вище.

В цьому документі "химерна ДНК" або "химерна генетична конструкція" позначає будь-яку молекулу ДНК, що не є природною молекулою ДНК в її природному місцеположенні, яка також позначається в цьому документі як "конструкція ДНК". Як правила, химерна ДНК або химерний ген містить регуляторну і транскрибовану або кодуючу білок послідовності, які не знайдені функціонально пов'язаними одна з однією в природі, тобто які є гетерологічними по відношенню одна до одної. Відповідно, химерна ДНК або химерний ген можуть містити регуляторні послідовності і кодуючі послідовності, що походять з різних джерел, або регуляторні послідовності і кодуючі послідовності, що походять з одного джерела, але організовані в інший спосіб, ніж знайдені в природі.

Термін "ендогенний" використовується в цьому документі для позначення субстанції, що звичайно присутня або продукується, наприклад, в немодифікованій рослині на такій же стадії

розвитку, що і досліджувана рослина. "Ендогенний ген" позначає природний ген в його природному положенні в геномі організму. В цьому документі "молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти", "рекомбінантний полінуклеотид" або їх варіації позначають молекулу нуклеїнової кислоти, що конструюється або модифікується за допомогою технології рекомбінантної ДНК. Терміни "чужорідний полінуклеотид" або "екзогенний полінуклеотид" або "гетерологічний полінуклеотид" і подібні позначають будь-яку нуклеїнову кислоту, що введена в геном клітини за допомогою експериментальних маніпуляцій. Чужорідні або екзогенні гени можуть являти собою гени, вставлені в неприродний організм, природні гени, що введені в нове місцеположення в межах природного хазяїна, або химерні гени. "Трансген" є геном, що введений в геном процедурою трансформації. Терміни "генетично модифікований", "трансгенний" та їх варіації включають введення генів в клітини шляхом трансформації або трансдукції, мутацію генів в клітинах і модифікацію або модуляцію регуляції гена в клітині або організмах, над якими здійснювалися вказані дії, або їх потомстві. "Геномна ділянка" в цьому документі позначає положення в межах геному, в якому трансген або група трансгенів (також позначена в цьому документі як кластер) вставлені в клітину або її предка. Такі ділянки включають тільки нуклеотиди, що введені в результаті втручання людини, наприклад, за способами, розкритими в цьому документі.

Термін "екзогенний" в контексті полінуклеотиду позначає полінуклеотид, присутній в клітині в модифікованій кількості, в порівнянні з його природним станом. В одному варіанті реалізації винаходу клітина є клітиною, що в природі не містять полінуклеотиду. Однак, клітина може бути клітиною, яка містить не ендогенний полінуклеотид, що приводить до зміни рівня продукування кодованого поліпептиду. Екзогенний полінуклеотид за винаходом включає полінуклеотиди, що не відокремлені від інших компонентів трансгенної (рекомбінантної) клітини або неклітинної системи експресії, в якій вони присутні, і полінуклеотиди, продуковані в таких клітинах або неклітинних системах, які в подальшому були очищені щонайменше від деяких інших компонентів. Екзогенний полінуклеотид (нуклеїнова кислота) може бути безперервним ланцюгом нуклеотидів, існуючим в природі, або містити дві або більше суміжних нуклеотидних ділянок з різних джерел (природних та/або синтетичних), сполучені таким чином, щоб утворити єдиний полінуклеотид. Звичайно такі химерні полінуклеотиди містять щонайменше відкриту рамку зчитування, що кодує поліпептид за винаходом, функціонально пов'язаний з промотором, придатним для управління транскрипцією відкритої рамки зчитування в цільовій клітині.

В цьому документі термін "різноманітні екзогенні полінуклеотиди" або його варіації означають, що нуклеотидна послідовність кожного полінуклеотиду відрізняється щонайменше одним, переважно більше нуклеотидами. Полінуклеотиди кодують РНК, що можуть транслюватися або не транслюватися в білок у межах клітини. В прикладі, кожен полінуклеотид переважно кодує білок з іншою активністю. В іншому прикладі, кожен екзогенний полінуклеотид є менше, ніж на 95 %, менше, ніж на 90 % або менше, ніж на 80 % ідентичним іншим екзогенним полінуклеотидам. Переважно екзогенні полінуклеотиди кодують функціональні білки/ферменти. Крім того, різні екзогенні полінуклеотиди переважно є такими, що частково не перекриваються, в тому значенні, що кожен полінуклеотид являє собою чітко визначену ділянку, наприклад, позахромосомно переносиму нуклеїнову кислоту, що частково не перекривається з іншим екзогенним полінуклеотидом. Щонайменше, кожен екзогенний полінуклеотид містить сайт ініціації і термінації транскрипції, а також позначений промотор. Окремий екзогенний полінуклеотид може містити або не містити інтронів.

Щодо розкритих полінуклеотидів, необхідно розуміти, що вищий % ідентичності, ніж розкриті вище, включатиме переважні варіанти. Таким чином, якщо це доречно, у світлі мінімального % ідентичності, полінуклеотид переважно містить полінуклеотидну послідовність, яка є щонайменше на 60 %, більш переважно щонайменше на 65 %, більш переважно щонайменше на 70 %, більш переважно щонайменше на 75 %, більш переважно щонайменше на 80 %, більш переважно щонайменше на 85 %, більш переважно щонайменше на 90 %, більш переважно щонайменше на 91 %, більш переважно щонайменше на 92 %, більш переважно щонайменше на 93 %, більш переважно щонайменше на 94 %, більш переважно щонайменше на 95 %, більш переважно щонайменше на 96 %, більш переважно щонайменше на 97 %, більш переважно щонайменше на 98 %, більш переважно щонайменше на 99 %, більш переважно щонайменше на 99,1 %, більш переважно щонайменше на 99,2 %, більш переважно щонайменше на 99,3 %, більш переважно щонайменше на 99,4 %, більш переважно щонайменше на 99,5 %, більш переважно щонайменше на 99,6 %, більш переважно щонайменше на 99,7 %, більш переважно щонайменше на 99,8 %, і навіть більш переважно щонайменше на 99,9 % ідентичною відповідній вказаній SEQ ID NO.

Полінуклеотид за даним винаходом може селективно гібридизуватися, в суворих умовах, з полінуклеотидом, який кодує поліпептид за даним винаходом. В цьому документі суворі умови є наступними: (1) застосування в ході гібридизації денатуруючого агента, такого як формамід, наприклад, 50 об/об % формаміду, 0,1 мас/об % альбуміну телячої сироватки, що містить, 0,1 % Фіколу, 0,1 % полівінілпіролідону, 50 мМ натрій-фосфатний буфер, pH 6,5, що містить 750 мМ NaCl, 75 мМ натрію цитрату при 42°C; або (2) застосування 50 % формаміду, 5 х натрію хлорид + натрію цитрат (ХЦН, 0,75 М NaCl, 0,075 М натрій цитрату), 50 мМ натрію фосфату (pH 6,8), 0,1 % натрію пірофосфату, 5 х розчин Денхардта, оброблена ультразвуком ДНК сперми лосося (50 г/мл), 0,1 % натрію додецилсульфату і 10 % декстрану сульфату при 42°C в 0,2 х натрій хлорид + натрію цитрат і 0,1 % натрію додецилсульфату та/або (3) застосування низької іонної сили і високотемпературного промивання, наприклад, 0,015 М NaCl/0,0015 М натрію цитрату/0,1 % натрію додецилсульфату при 50°C.

Полінуклеотиди за винаходом можуть містити, в порівнянні з молекулами, що зустрічаються в природі, одну або більше мутацій, що являють собою делеції, вставки або заміни нуклеотидних залишків. Полінуклеотиди, що містять мутації відносно референтної послідовності, можуть бути природними (тобто, виділеними з природного джерела) або синтетичними (наприклад, одержаними в результаті сайт-спрямованого мутагенезу або тасування ДНК з нуклеїнової кислоти, як розкрито вище). Таким чином, очевидно, що полінуклеотиди за винаходом можуть бути одержані з природного джерела або можуть бути рекомбінантними. Переважними полінуклеотидами є такі, що містять кодуючі ділянки, кодон-оптимізовані для трансляції в клітинах рослини, як відомо з рівня техніки.

Рекомбінантні вектори

Один варіант реалізації цього винаходу включає рекомбінантний вектор, який містить щонайменше одну молекулу полінуклеотиду, розкриту в цьому документі, вставлену в будь-який вектор, здатний доставити молекулу полінуклеотиду в клітину-хазяїна. Рекомбінантні вектори включають вектори експресії. Рекомбінантні вектори містять гетерологічні полінуклеотидні послідовності, тобто, полінуклеотидні послідовності, що в природі не знайдені суміжними з молекулами полінуклеотиду, розкритими в цьому документі, які переважно одержані з інших видів, ніж ті, з яких одержана(и) молекула(и) полінуклеотиду. Вектор може являти собою РНК або ДНК, і звичайно є плазмідою. Плазмідні вектори звичайно містять додаткові послідовності нуклеїнових кислот, які забезпечують простоту селекції, ампліфікації і трансформації касети експресії в прокаріотних клітинах, наприклад, одержані з pUC вектори, одержані з pSK вектори, одержані з pGEM вектори, одержані з pSP вектори, одержані з pBS вектори, або переважно бінарні вектори, що містять одну або більш ділянок Т-ДНК. Додаткові послідовності нуклеїнових кислот включають джерела реплікації для забезпечення автономної реплікації вектора, гени селекційних маркерів, переважно кодуючі резистентність до антибіотика або гербіциду, унікальні множинні сайти клонування, які забезпечують множинні сайти вставки послідовностей нуклеїнових кислот або генів, кодованих в конструкції нуклеїнової кислоти, і послідовності, які підвищують активність трансформації прокаріотних і еукаріотних (особливо рослинних) клітин. Рекомбінантний вектор може містити більш ніж один полінуклеотид, розкритий в цьому документі, наприклад, три, чотири, п'ять або шість полінуклеотидів, розкритих в цьому документі, в комбінації, переважно химерну генетичну конструкцію за винаходом, в якій кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з послідовностями контролю експресії, активними в цільовій клітині. Більш ніж один полінуклеотид, розкритий в цьому документі, наприклад, 3, 4, 5 або 6 полінуклеотидів, переважно ковалентно сполучені в єдиному рекомбінантному векторі, переважно в межах єдиної молекули Т-ДНК, яка в подальшому може бути введена як єдина молекула в клітину, з одержанням рекомбінантній клітини за винаходом, і переважно інтегрована в геном рекомбінантної клітини, наприклад, в трансгенній рослині. Таким чином, полінуклеотиди, сполучені у такий спосіб, будуть успадковуватися разом як єдиний генетичний локус у нащадка рекомбінантної клітини або рослини. Рекомбінантний вектор або рослина може містити два або більше таких рекомбінантних векторів, кожен з яких містить декілька полінуклеотидів, наприклад, кожен рекомбінантний вектор містить 3, 4, 5 або 6 полінуклеотидів.

"Функціонально пов'язаний" в цьому документі позначає функціональне взаємовідношення між двома або більш сегментами нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК). Як правило, це позначає функціональне взаємовідношення транскрипційного регуляторного елементу (промотору) і транскрибованої послідовності. Наприклад, промотор функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, такою як полінуклеотид, розкритий в цьому документі, якщо він стимулює або модулює транскрипцію кодуючої послідовності у відповідній клітині. Загалом, транскрипційні регуляторні елементи промотору, які функціонально пов'язані з

транскрибованою послідовністю, є фізично суміжними з транскрибованою послідовністю, тобто, вони є cis-діючими. Однак, для деяких транскрипційних регуляторних елементів, таких як енхансери, немає необхідності бути фізично суміжними або розташованими в безпосередній близькості від кодуючих послідовностей, транскрипцію яких вони збільшують.

Якщо присутні декілька промоторів, кожен промотор може незалежно бути таким же або іншим.

Крім того, рекомбінантні молекули, наприклад, химерні ДНК або генетичні конструкції, можуть містити: (а) один або більш секреторних сигналів, що кодують сигнальні пептидні послідовності, щоб дозволити експресованому поліпептиду, розкритому в цьому документі, секретуватися з клітини, яка продукує поліпептид, або яка забезпечує локалізацію експресованого поліпептиду, наприклад, для утримання поліпептиду в ендоплазматичному ретикулумі (ЕР) клітини або перенесення в пластиду, та/або (б) химерні послідовності, які приводять до експресії молекул нуклеїнових кислот у вигляді химерних білків. Приклади відповідних сигнальних сегментів включають будь-який сигнальний сегмент, здатний спрямовувати секрецію або локалізацію поліпептиду, розкритого в цьому документі. Додатково, рекомбінантні молекули можуть містити проміжні та/або нетрансльовані послідовності, навколо та/або в межах послідовностей нуклеїнових кислот молекул нуклеїнових кислот, розкритих в цьому документі.

Для спрощення ідентифікації трансформантів, бажано, щоб конструкція нуклеїнової кислоти містила ген селекційного або скринінгового маркера у вигляді або на додаток до чужорідного або екзогенного полінуклеотиду. "Ген маркера" позначає ген, який надає відмінного фенотипу клітинам, що експресують ген маркера, таким чином, що трансформовані клітини відрізняються від клітин, які не містять маркера. Ген селекційного маркера забезпечує ознаку, за якою можна "здійснювати селекцію" на базі резистентності до селекційного агента (наприклад, гербіцид, антибіотик, випромінювання, нагрівання або інший вид обробки, ушкоджуючий нетрансформовані клітини). Ген придатного для скринінгу маркера (або репортерний ген) забезпечує ознаку, за якою можна ідентифікувати, шляхом спостереження або тестування, наприклад, за допомогою "скринінгу" (наприклад, активність β-глюкуронідази, люциферази, зеленого флуоресцентного білка (ЗФБ) або іншого ферменту, відсутню в нетрансформованих клітинах). Ген маркера і цільова нуклеотидна послідовність не обов'язково повинні бути пов'язаними. Фактично, вибір маркера не є критичним, до тих пір, поки він є функціональним (тобто, селективним) в поєднанні з клітинами вибору, такими як рослинна клітина.

Прикладами бактеріальних селекційних маркерів є маркери, що забезпечують резистентність до антибіотиків, наприклад, резистентність до ампіциліну, еритроміцину, хлорамфеніколу або тетрацикліну, переважно резистентність до канаміцину. Приклади селекційних маркерів для селекції рослин включають, без обмеження, ген hyg, який кодує резистентність до гігроміцину В; ген неоміцин фосфотрансферази (nptII), що забезпечує резистентність до канаміцину, паромоміцину, G418; ген глутатіон-S-трансферази з печінки щурів, що забезпечує резистентність до гербіцидів-похідних глутатіону, наприклад, таких як, розкриті у ЕР 256223; ген глутамінсинтетази, що при надмірній експресії забезпечує резистентність до інгібіторів глутамінсинтетази, таких як фосфінотрицин, наприклад, розкритий у WO 87/05327, ген ацетилтрансферази із Streptomyces viridochromogenes, що забезпечує резистентність до селекційного агента фосфінотрицину, наприклад, розкритий у ЕР 275957, ген, що кодує 5-єнолшикімат-3-фосфат синтазу (ЄШФС), що забезпечує переносимість N-фосфонометилгліцину, наприклад, розкритий Hinchee et al. (1988), ген bar, що забезпечує резистентність до біалафосу, наприклад, розкритий у WO91/02071; ген нітрилази, наприклад, bxn із Klebsiella ozaenae, що забезпечує резистентність до бромоксинілу (Stalker et al., 1988); ген дигідрофолатредуктази (ДГФР), що забезпечує резистентність до метотрексату (Thillet et al., 1988); ген мутанта ацетолактатсинтази (АЛС), який забезпечує резистентність до імідазолінону, сульфонілсечовини або інших хімічних речовин, що інгібують АЛС (ЕР 154204); мутантний ген антранілат синтази, який забезпечує резистентність до 5-метилтриптофану; або ген далапон дегалогенази, який забезпечує резистентність до гербіциду.

Переважні скринінгові маркери включають, без обмеження, ген uidA, що кодує β-глюкуронідазу (GUS), фермент, для якого відомі різноманітні хромогенні субстрати, ген зеленого флуоресцентного білка (Niedz et al., 1995) або його похідні; ген люциферази (luc) (Ow et al., 1986), який дозволяє виявити біолюмінесценцію, та інші, відомі з рівня техніки. "Репортерною молекулою" в цьому документі називається молекула, яка, за своєю хімічною природою, забезпечує придатний для аналітичної ідентифікації сигнал, що спрощує визначення активності промотору на базі білкового продукту.

Переважно конструкція нуклеїнової кислоти стабільно інкорпорована в геном клітини, наприклад, рослинної клітини. Відповідно, нуклеїнова кислота може містити відповідні елементи, які дозволяють молекулі інкорпоруватися в геном, переважно послідовності правої і лівої меж молекули Т-ДНК, або конструкція розміщена у відповідному векторі, який може бути інкорпорований в хромосому клітини.

Експресія

В цьому документі вектор експресії являє собою вектор ДНК, що здатний трансформувати клітину-хазяїна і здійснювати експресію однієї або більше вказаних молекул полінуклеотиду. Переважні вектори експресії за даним винаходом можуть спрямовувати експресію гена в дріжджових та/або рослинних клітинах. Вектори експресії, придатні у відповідності до винаходу, містять регуляторні послідовності, наприклад, послідовності для контролю транскрипції, послідовності для контролю трансляції, джерела реплікації та інші регуляторні послідовності, сумісні з рекомбінантною клітиною, які контролюють експресію молекул полінуклеотиду за даним винаходом. Зокрема, полінуклеотиди або вектори, придатні у відповідності до цього винаходу, містять послідовності для контролю транскрипції. Послідовності для контролю транскрипції є послідовностями, які контролюють ініціацію, елонгацію і термінацію транскрипції. Особливо важливими послідовностями для контролю транскрипції є такі, які контролюють ініціацію транскрипції, наприклад, послідовності промотору та енхансера. Відповідні послідовності для контролю транскрипції включають будь-яку послідовність для контролю транскрипції, яка може функціонувати щонайменше в одній з рекомбінантних клітин за даним винаходом. Вибір використовуваних регуляторних послідовностей залежить від організму-мішені, такого як рослина, та/або органу-мішені або цільової тканини. Такі регуляторні послідовності можуть бути одержані з будь-якого еукаріотного організму, такого як рослини, або віруси рослин, або можуть бути хімічно синтезовані. Численні такі послідовності для контролю транскрипції відомі фахівцям з рівня техніки. Особливо переважними послідовностями для контролю транскрипції є промотори, що активно спрямовують транскрипцію в рослинах, конститутивно або специфічним для стадії та/або тканини чином, в залежності від використання рослини або її частин.

Ряд векторів, придатних для стабільної трансфекції рослинних клітин або одержання трансгенних рослин, описаний, наприклад, у Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987; Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; і Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990. Як правила, вектори експресії в рослинах містять, наприклад, один або більше клонованих генів рослини під транскрипційним контролем 5' і 3' регуляторних послідовностей і домінантний селекційний маркер. Додатково, такі вектори експресії в рослинах можуть містити регуляторну ділянку промотору (наприклад, регуляторна ділянка, що контролює індуцибельну або конститутивну, регульовану умовами навколишнього середовища або стадією розвитку, або клітинно- або тканиноспецифічну експресію), старт-сайт ініціації транскрипції, сайт зв'язування з рибосомою, сигнал процесингу РНК, сайт термінації транскрипції та/або сигнал поліаденілювання.

Описаний цілий ряд конститутивних промоторів, які активні в клітинах рослини. Придатні промотори для конститутивної експресії в рослинах включають, без обмеження, промотор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), 35S мозаїчного вірусу ранника шишкуватого (FMV), промотор паличкоподібного вірусу цукрової тростини, промотор вірусу жовтої крапки комеліни, індуцибельний світлом промотор з маленької субодиниці рибулозо-1,5-біс-фосфат карбоксилази, промотор цитозольної триосефосфат ізомерази рису, промотор аденін фосфорибозилтрансферази Arabidopsis, промотор гена рисового актину 1, промотори манопінсинтази та октопінсинтази, промотор Adh, промотор синтази сахарози, промотор комплексу R гена і промотор гена хлорофіл-зв'язувального білка α/β.

З метою експресії у вихідних тканинах рослини, таких як листя, насіння, коріння або стебло, промоторам, використовуваним у відповідності до цього винаходу, переважно властива відносно висока експресія в цих конкретних тканинах. Для даної мети можна здійснювати вибір із цілого ряду промоторів для генів з тканино- або клітиноспецифічною або -підсиленою експресією. Відомі з літератури приклади таких промоторів включають промотор глутамін синтази GS2 з хлоропласту гороху, промотор фруктозо-1,6-біфосфатази хлоропласту з пшениці, промотор ядерного фотосинтетичного ST-LS 1 з картоплі, промотор серин кінази і промотор глюкоамілази (CHS) з Arabidopsis thaliana. Також повідомлялося про активність у фотосинтетично активних тканинах промоторів рибулозо-1,5-бісфосфат карбоксилази і промоторів Cab.

Різноманітні промотори рослинних генів, які регулюються у відповідь на екологічні, гормональні, хімічні та/або пов'язані з розвитком сигнали, також можуть використовуватися для експресії генів в клітинах рослини, зокрема, промотори, регульовані (1) нагріванням, (2) освітленням (наприклад, промотор RbcS-3A гороху, промотор RbcS маїсу); (3) гормонами, наприклад, абсцизиновою кислотою, (4) пошкодженнями (наприклад, WunI); або (5) хімічними речовинами, наприклад, метилжасмонатом, саліциловою кислотою, стероїдними гормонами, спиртом, сафенерами (WO97/06269), або може бути переважним використання (6) орган-специфічних промоторів.

В цьому документі термін "промотор, специфічний для насіння рослини" або його варіації позначає промотор, який переважно в порівнянні з іншими тканинами рослини, спрямовує транскрипцію гена в насінні рослини, що розвивається. У варіанті реалізації винаходу промотор, специфічний для насіння, експресується щонайменше в 5 разів активніше у насінні рослини, що розвивається, відносно листя та/або стебел рослини, і переважно експресується активніше в ембріоні насіння, що розвивається, в порівнянні з іншими тканинами рослини. Переважно промотор тільки спрямовує експресію цільового гена в насінні, що розвивається, та/або експресія цільового гена у інших частинах рослини, таких як листя, не може бути виявлена нозерн-блотингом та/або ЗТ-ПЛР. Звичайно, промотор контролює експресією генів в процесі росту і розвитку насіння, зокрема, в ході фази синтезу і акумуляції запасних речовин в насінні. Такі промотори можуть контролювати експресією гена в суцільному запасному органі рослини або тільки в його частині, наприклад, оболонці насіння або сім'ядолі(ях), переважно в ембріонах, у насінні дводольних рослин або ендоспермі або алейроновому шарі насіння однодольних рослин.

Переважні промотори специфічної для насіння експресії включають: i) промотори з генів, що кодують ферменти, які беруть участь в біосинтезі жирних кислот та їх акумуляції в насінні, наприклад, десатурази і елонгази, ii) промотори з генів, що кодують запасні білки для зберігання в насінні, і iii) промотори з генів, що кодують ферменти, які беруть участь в біосинтезі вуглеводів та їх акумуляції в насінні. Придатними специфічними для насіння промоторами є промотор гена напіну олійної каноли (US 5608152), промотор USP Vicia faba (Baumlein et al., 1991), промотор олеозину Arabidopsis (WO98/45461), промотор фазеоліну Phaseolus vulgaris (US 5504200), промотор Bce4 Brassica (WO91/13980) або промотор легуміну LeB4 з Vicia faba (Baumlein et al., 1992), і промотори, які забезпечують специфічну для насіння експресію в однодольних, таких як маїс, ячмінь, пшениця, жито, рис, тощо. Як придатні слід зазначити такі промотори: промотор гена lpt2 або lpt1 ячменю (WO95/15389 і WO95/23230) або промотори, розкриті у WO99/16890 (промотори з гена гордеїну ячменю, гена глютеліну рису, гена оризину рису, гена проламіну рису, гена гліадину пшениці, гена глютеліну пшениці, гена зеїну маїсу, гена глютеліну вівса, гена казирину сорго, гена секаліну жита). Інші промотори включають розкриті Broun et al. (1998), Potenza et al. (2004), US20070192902 і US20030159173. У варіанті реалізації винаходу специфічний для насіння промотор переважно експресується в певних частинах насіння, таких як ембріон, сім'ядоля(і) або ендосперм. Приклади таких специфічних промоторів включають, без обмеження, промотор FP1 (Ellerstrom et al., 1996), промотор легуміну гороху (Perrin et al., 2000), промотор фітогемаглютиніну боба (Perrin et al., 2000), промотори конлінін 1 і конлінін 2 для генів, що кодують запасні білки 2S льону (Cheng et al., 2010), промотор гена FAE1 з Arabidopsis thaliana, промотор BnGLP гена глобулін-подібного білка Brassica napus, промотор LPXR гена пероксиредоксину з Linum usitatissimum.

5' нетрансльована лідерна послідовність може бути одержана з промотору, вибраного для експресії гетерологічної послідовності гена полінуклеотиду за даним винаходом, або переважно є гетерологічною щодо ділянки, яка кодує фермент, що виробляється, і може бути специфічно модифікована, при бажанні, таким чином, щоб збільшити трансляцію мРНК. Огляд оптимізації експресії трансгенів див. у Koziel et al. (1996). Додатково, 5' нетрансльовані ділянки можуть бути одержані з РНК вірусів рослин (серед іншого, вірус мозаїки тютюну, вірус гравіювання тютюну, вірус карликової мозаїчності маїсу, вірус мозаїки люцерни), з відповідних еукаріотних генів, рослинних генів (лідер гена білка a/b хлорофілу пшениці і маїсу, що зв'язується), або із синтетичної послідовності гена. Даний винахід не обмежується конструкціями, в яких нетрансльована ділянка одержана з 5' нетрансльованої послідовності, супроводжуючої послідовність промотору. Додатково, лідерна послідовність може бути одержана із неспорідненого промотору або кодуючої послідовності. Лідерні послідовності, придатні в контексті цього винаходу, включають лідер Hsp70 маїсу (US 5362865 і US 5859347) і омега-елемент вірусу мозаїки тютюну (TMV).

Термінація транскрипції забезпечується 3' нетрансльованою послідовністю ДНК, функціонально пов'язаною в химерному векторі з цільовим полінуклеотидом. 3' нетрансльована

ділянка рекомбінантної молекули ДНК містить сигнал поліаденілювання, функція якого в рослинах полягає у забезпеченні додавання аденілатних нуклеотидів до 3' кінця РНК. 3' нетрансльовані ділянки можуть бути одержані з різноманітних генів, які експресуються в клітинах рослин. У такому випадку звичайно використовуються 3' нетрансльована ділянка нопалінсинтази, 3' нетрансльована ділянка з маленької субодиниці гена Rubisco гороху, 3' нетрансльована ділянка з гена запасного білка 7S насіння сої або гена конлініну льону. Крім того, придатними є 3' транскрибовані, нетрансльовані ділянки, що містять поліаденілатний сигнал індукуючих пухлину (Ti) Agrobacterium плазмідних генів.

Технології рекомбінантної ДНК можуть застосовуватися для покращення експресії трансформованої молекули полінуклеотиду, шляхом маніпуляції, наприклад, кількістю копій молекули полінуклеотиду в межах клітини-хазяїна, ефективністю, з якою такі молекули полінуклеотиду транскрибуються, ефективністю, з якою транслюються копії, що утворюються в результаті, та ефективністю посттрансляційних модифікацій. Рекомбінантні методи, придатні для збільшення експресії молекул полінуклеотиду, розкритих в цьому документі, включають, без обмеження, інтеграцію молекули полінуклеотиду в одну або більше хромосом клітини-хазяїна, введення стабілізуючих послідовностей в мРНК, заміни або модифікації сигналів контролю транскрипції (наприклад, промотори, оператори, енхансери), заміни або модифікації сигналів контролю трансляції (наприклад, сайти зв'язування з рибосомою, послідовності Шайна-Дальгарно), модифікацію молекул полінуклеотиду для відповідності використанню кодонів в клітині-хазяїні і делецію послідовностей, що дестабілізують транскрипти.

Рекомбінантні клітини

У винаході також розкривається рекомбінантна клітина, переважно рекомбінантна клітина рослини, що є клітиною-хазяїном, трансформованою однією або більше рекомбінантними молекулами, такими як полінуклеотиди, химерні генетичні конструкції або рекомбінантні вектори, розкриті в цьому документі. Рекомбінантна клітина може містити будь-яку їх комбінацію, наприклад, два або три рекомбінантних вектори, або рекомбінантний вектор і один або більше додаткових полінуклеотидів або химерних ДНК. Придатні клітини за винаходом включають будь-яку клітину, яка може бути трансформована полінуклеотидом, химерною ДНК або рекомбінантним вектором за винаходом, таку як молекула, що кодує поліпептид або фермент, розкритий в цьому документі. Переважно клітина є клітиною, яка, таким чином, придатна для використання з метою одержання ДЛ-ПНЖК. Рекомбінантна клітина може бути клітиною в культурі, клітиною in vitro, або в організмі, такому як, наприклад, рослина, або в органі, такому як, наприклад, насіння або лист. Переважно клітина знаходиться в рослині або частині рослини, переважніше в насінні рослини.

Клітини-хазяї, до яких введений(і) полінуклеотид(и), можуть бути нетрансформованими клітинами або клітинами, які вже трансформовані щонайменше однією молекулою нуклеїнової кислоти. Такі молекули нуклеїнової кислоти можуть бути пов'язані з синтезом ДЛ-ПНЖК або не пов'язані з ним. Клітини-хазяї за даним винаходом можуть бути ендогенно (тобто, природним чином) здатні до продукування білків, розкритих в цьому документі, і в цьому випадку рекомбінантна клітина, одержана з них, має підвищену здатність до продукування поліпептидів, або вони можуть бути здатні до продукування таких білків тільки після трансформації щонайменше одним полінуклеотидом за винаходом. У варіанті реалізації винаходу рекомбінантна клітина за винаходом має підвищену здатність до синтезу довголанцюгової поліненасиченої жирної кислоти. В цьому документі термін "клітина з підвищеною здатністю до синтезу довголанцюгової поліненасиченої жирної кислоти" є відносним терміном, за допомогою якого рекомбінантна клітина за винаходом порівнюється з клітиною-хазяїном, в якій відсутній(і) полінуклеотид(и) за винаходом, з рекомбінантною клітиною, яка продукує поліненасичені жирні кислоти з довшим ланцюгом, або з більшою концентрацією ДЛ-ПНЖК, наприклад, ДГК (щодо інших жирних кислот), ніж у природній клітині. Клітина з підвищеною здатністю до синтезу іншого продукту, наприклад, іншої жирної кислоти, ліпіду, вуглеводу, такого як крохмаль, молекули РНК, поліпептиду, фармацевтичного або іншого продукту, має відповідне значення.

Клітини-хазяї за даним винаходом можуть являти собою будь-яку клітину, здатну до продукування щонайменше одного білка, розкритого в цьому документі, і включають клітини бактерій, грибів (зокрема, дріжджів), паразитів, членистоногих, тварин і рослин. Клітини можуть бути прокаріотними або еукаріотними. Переважні клітини-хазяї являють собою клітини дріжджів і рослин. У переважному варіанті реалізації винаходу клітина рослини являє собою клітину насіння, зокрема, клітину в сім'ядолі або ендоспермі насіння. В одному варіанті реалізації винаходу клітина являє собою тваринну клітину або водоростеву клітину. Тваринна клітина може належати до будь-якого виду тварин, наприклад, клітина тварини, що не належить до людського роду, клітина хребетного, що не належить до людського роду, клітина ссавця, що не

належить до людського роду, або клітини водних тварин, таких як риба або ракоподібні, безхребетних, комах, тощо. Клітини можуть належати організму, придатному для процесу ферментації. В цьому документі термін "процес ферментації" позначає будь-який процес ферментації або будь-який процес, що включає стадію ферментації. Приклади ферментувальних мікроорганізмів включають грибкові організми, наприклад, дріжджі. В цьому документі "дріжджі" включають вид Saccharomyces, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces carlbergensis, вид Candida, види Kluveromyces, види Pichia, вид Hansenula, вид Trichoderma, Lipomyces starkey і Yarrowia lipolytica. Переважні дріжджі включають штами видів Saccharomyces і, зокрема, Saccharomyces cerevisiae.

Трансгенні рослини

Додатково, у винаході розкривається рослина, що містить клітину за винаходом, наприклад, трансгенна рослина, що містить один або більше полінуклеотидів за винаходом. Термін "рослина" в цьому документі як іменник позначає суцільні рослини, але при використанні в ролі прикметника ("рослинний") позначає будь-яку субстанцію, в якій присутній, одержану з, що походить із або пов'язану з рослиною, наприклад, органи рослини (такі як листя, стебла, коріння, квіти), одиничні клітини (такі як пилок), насіння, рослинні клітини, тощо. Термін "частина рослини" позначає всі частини рослини, які містять ДНК рослини, зокрема, вегетативні структури, наприклад, листя або стебла, коріння, квіткові органи або структури, пилок, насіння, частини насіння, такі як ембріон, ендосперм, щиток зародка або оболонка насіння, тканину рослини, таку як судинна тканина, клітини і їх потомство, до тих пір, поки частина рослини синтезує ліпід за винаходом.

"Трансгенна рослина", "генетично модифікована рослина" або їх варіації позначають рослину, яка містить генетичну конструкцію ("трансген"), не знайдену в рослині дикого типу такого ж виду, різновиди або сорти. Трансгенні рослини в контексті цього винаходу включають рослини та їх потомство, генетично модифіковані із застосуванням рекомбінантних методів, що приводить до продукування ліпіду або щонайменше одного поліпептиду, розкритого в цьому документі, у цільовій рослині або органі рослини. Трансгенні клітини рослини і трансгенні частини рослини мають відповідне значення. "Трансген" в цьому документі має звичайне значення для даної галузі біотехнології і містить генетичну послідовність, яка одержана або модифікована технологією рекомбінації ДНК або РНК, і яка введена до клітини за винаходом, переважно клітини рослини. Трансген може містити генетичні послідовності, одержані з клітини рослини, яка може належати до того ж виду, різновиду або сорту, що і клітина рослини, до якої введений трансген, або до іншого виду, різновиду або сорту, або з клітини, що не є рослинною. Звичайно, трансген вводять до клітини, наприклад, рослинної, шляхом маніпуляції людиною, наприклад, трансформації, причому може застосовуватися будь-який спосіб за рішенням фахівця в цій галузі техніки.

Терміни "насіння" і "зерно" в цьому документі використовуються рівнозначно. "Зерно" позначає зріле зерно, наприклад, зібране в процесі збору врожаю зерно, або зерно, яке ще знаходиться на рослині, але готове для збору врожаю, а також може позначати насіння після набухання або проростання, згідно контексту. Зріле зерно або насіння звичайно містить вологу в кількості менше, ніж приблизно 18–20 %. "Насіння, що розвивається" в цьому документі позначає насіння до настання зрілості, звичайно знайдене в репродуктивних структурах рослини після запліднення або цвітіння, але може також позначати таке насіння до настання зрілості, яке виділено з рослини.

В цьому документі термін "одержання частини рослини" або "одержання насіння" позначає будь-які засоби для одержання частини рослини або насіння, відповідно, зокрема, збір урожаю частин рослини або насіння з рослин у полі або в закритому просторі, такому як теплиця або камера для росту, або придбання або одержання від постачальника частин рослини або насіння. Насіння може бути придатним для насадження, тобто здатним до проростання і утворення рослини-нащадка, або альтернативно, оброблено таким чином, що більше не може прорости, наприклад розколене, шліфоване або змолочене насіння, придатне для застосування при одержанні харчових продуктів або в харчуванні або для екстракції ліпіду за винаходом.

В цьому документі термін "запасаючий орган рослини" позначає частину рослини, що спеціалізується на зберіганні енергії у формі, наприклад, білків, вуглеводів, жирних кислот та/або олій. Прикладами запасаючих органів рослини є насіння, плід, бульбоподібне коріння і бульби. Переважним запасаючим органом рослини за винаходом є насіння.

В цьому документі термін "фенотипово нормальний" позначає генетично модифіковану рослину або орган рослини, особливо запасаючий орган, такий як насіння, бульбу або плід за винаходом, не володіючий істотною мірою зниженою здатністю до росту і відтворення, в порівнянні з немодифікованою рослиною або органом рослини. У варіанті реалізації винаходу

генетично модифікована рослина або орган рослини, які є фенотипово нормальними, містять екзогенний полінуклеотид, що кодує супресор сайленсингу, функціонально пов'язаний з промотором, специфічним для запасаючого органу рослини, і має здатність до росту або відтворення, по суті такою ж, як ізогенна рослина або орган, що не містить вказаного полінуклеотиду. Переважно біомаса, темпи росту, швидкість проростання, розмір запасаючого органу, розмір насіння та/або кількість утворених життєздатних зерен становить не менше 90 % від показників рослини, яка не містить вказаного екзогенного полінуклеотиду, при вирощуванні в ідентичних умовах. Даний термін не охоплює ознак рослини, що можуть відрізнятися від рослини дикого типу, але при цьому не впливають на повноцінність рослини з точки зору комерційних цілей, наприклад, фенотип балерини листя саджанця.

Рослини, розкриті або включені для використання у практиці цього винаходу, включають однодольні рослини і дводольні рослини. В переважних варіантах реалізації рослини за даним винаходом являють собою урожайні рослини (наприклад, злакові і зернобобові, маїс, пшеницю, картоплю, тапіоку, рис, сорго, просо., маніоку, ячмінь або горох) або інші бобові. Рослини можеть бути вирощені для одержання їстівних коренів, клубенів, листя, стебел, квітів або плоду. Рослини можуть бути овочевими або декоративними рослинами. Рослини за винаходом можуть являти собою: кукурудзу (Zea mays), канола (Brassica napus, підвид Brassica rapa), гірчицю (Brassica juncea), льон (Linum usitatissimum), люцерну (Medicago sativa), рис (Oryza sativa), жито (Secale cerale), сорго (Sorghum bicolour, Sorghum vulgare), соняшник (Helianthus annus), пшеницю (Tritium aestivum), сою (Glycine max), тютюн (Nicotiana tabacum), картоплю (Solanum tuberosum), арахіс (Arachis hypogaea), бавовник (Gossypium hirsutum), солодку картоплю (Lopmoea batatus), маніоку (Manihot esculenta), каву (вид Cofea), кокосовий горіх (Cocos nucifera), ананас (Anana comosus), цитрусове дерево (вид Citrus), какао (Theobroma cacao), чай (Camellia senensis), банан (вид Musa), авокадо (Persea americana), інжир (Ficus casica), гуаву (Psidium guajava), манго (Mangifer indica), оливу (Olea europaea), папайю (Carica papaya), кеш'ю (Anacardium occidentale), макадамію (Macadamia intergrifolia), мигдаль (Prunus amygdalus), цукровий буряк (Beta vulgaris), овес або ячмінь.

У переважному варіанті реалізації винаходу рослина є покритонасінною рослиною.

У варіанті реалізації винаходу рослина є рослиною олійної культури, переважно урожайною рослиною олійної культури. В цьому документі "рослина олійної культури" є видом рослини, використовуваним для комерційного одержання олій з насіння рослини. Рослина олійної культури може бути олійним канолаом (наприклад, канола), маїсом, соняшником, соєю, сорго, льоном (насіння льону) або цукровим буряком. Крім того, рослина олійної культури може бути іншими представниками Brassicas, бавовником, арахісом, маком, гірчицею, рициною звичайною, кунжутом, сафлором або рослиною, що дає горіхи. Рослина може продукувати високі рівні олії в плоді, наприклад, олива, олійна пальма або кокосовий горіх. Садовими рослинами, до яких може бути застосований даний винахід, є салат, ендивій або хрестоцвітні овочі, включаючи капусту, броколі або цвітну капусту. Цей винахід може бути застосований до тютюну, гарбузових, моркви, суниці, помідора або перцю.

У ще одному переважному варіанті реалізації винаходу нетрансгенна рослина, використовувана для одержання трансгенної рослини за винаходом, продукує олію, особливо у насінні, яке містить: i) менше 20 %, менше 10 % або менше 5 % жирних кислот 18:2 та/або ii) менше 10 % або менше 5 % жирних кислот 18:3.

У переважному варіанті реалізації винаходу трансгенна рослина є гомозиготною по всіх і кожному введеному гену (трансгену), таким чином, що її потомство не розділяється для бажаного фенотипу. Крім того, трансгенна рослина може бути гетерозиготною по введеному(им) трансгену(ам), переважно однорідно гетерозиготною по трансгену, наприклад, в потомстві F1, яке вирощене з гібридного насіння. Такі рослини можуть забезпечувати переваги, наприклад, гібридну силу, добре відому з рівня техніки.

Якщо це доречно, трансгенні рослини можуть містити додаткові трансгени, що кодують ферменти, які беруть участь у продукуванні ДЛ-ПНЖК, такі як, без обмеження, Δ6-десатураза, Δ9-елонгаза, Δ8-десатураза, Δ6-елонгаза, Δ5-десатураза, ω3-десатураза, Δ4-десатураза, Δ5-елонгаза, діацилгліцерол ацилтрансфераза, ЛФКАТ, Δ17-десатураза, Δ15-десатураза та/або Δ12-десатураза. Приклади таких ферментів з одним або більше вказаних видів активності відомі з рівня техніки і включають розкриті в цьому документі. У конкретних прикладах, трансгенна рослина щонайменше містить екзогенні полінуклеотиди, які кодують:

а) Δ4-десатуразу, Δ5-десатуразу, Δ6-десатуразу, Δ5-елонгазу і Δ6-елонгазу,

б) Δ4-десатуразу, Δ5-десатуразу, Δ8-десатуразу, Δ5-елонгазу і Δ9-елонгазу,

в) Δ4-десатуразу, Δ5-десатуразу, Δ6-десатуразу, Δ5-елонгазу, Δ6-елонгазу і Δ15-десатуразу,

г) Δ4-десатуразу, Δ5-десатуразу, Δ8-десатуразу, Δ5-елонгазу, Δ9-елонгазу і Δ15-десатуразу,

д) Δ4-десатуразу, Δ5-десатуразу, Δ6-десатуразу, Δ5-елонгазу, Δ6-елонгазу і Δ17-десатуразу, або

е) Δ4-десатуразу, Δ5-десатуразу, Δ8-десатуразу, Δ5-елонгазу, Δ9-елонгазу і Δ17-десатуразу.

У варіанті реалізації винаходу екзогенні полінуклеотиди кодують набір поліпептидів, що являють собою Δ6-десатуразу Pythium irregulare, Δ5-дезатуразу Thraustochytrid або Δ5-дезатуразу Emiliana huxleyi, Δ6-елонгазу Physcomitrella patens, Δ5-елонгазу Thraustochytrid або Δ5-елонгазу Ostreocccus taurii, ω3-десатуразу Phytophthora infestans або ω3-десатуразу Pythium irregulare і Δ4-десатуразу Thraustochytrid.

У варіанті реалізації винаходу рослини за винаходом вирощені в полі, переважно як популяція розміром щонайменше 1000 або 1000000 рослин, які по суті є однаковими, або на площі щонайменше 1 гектар. Щільність насадження варіює у відповідності до виду рослини, різновиду рослини, клімату, умов грунту, норм застосування добрив та інших факторів, як відомо з рівня техніки. Наприклад, канолу звичайно вирощують із щільністю насадження 1,2–1,5 млн. рослин на гектар. Урожай рослин збирають, як відомо з рівня техніки, що може включати валкування, рядне компостування та/або жнива плодів рослин, з подальшою молотьбою та/або віянням рослинного матеріалу для відокремлення насіння від решти частин рослини, часто у формі полови. Альтернативно, урожай насіння може бути зібраний з рослин у полі в ході єдиного процесу, а саме, комбайнування.

Трансформація рослин

Трансгенні рослини можуть бути одержані із застосуванням методів, відомих з рівня техніки, таких як загалом описані в A. Slater et al., Plant Biotechnology — The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003), і P. Christou and H. Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004).

В цьому документі терміни "стабільно трансформуючий", "стабільно трансформований" і їх варіації позначають інтеграцію екзогенних молекул нуклеїнових кислот в геном клітини таким чином, що вони передаються клітинам потомства в процесі поділу клітини, без необхідності в проведенні позитивної селекції щодо їх присутності. Стабільні трансформанти або їх потомство можуть бути відібрані будь-якими засобами, відомими з рівня техніки, такими як саузерн-блоти на хромосомній ДНК або гібридизація геномної ДНК in situ.

Опосередковане Agrobacterium перенесення є широко використовуваною системою для введення генів в рослинні клітини, оскільки ДНК може бути введена в клітини в суцільних тканинах рослини або органах рослини або експлантах в культурі тканини, з метою тимчасової експресії або стабільної інтеграції ДНК в геном клітини рослини. Використання опосередкованих Agrobacterium векторів, що інтегруються, для рослин з метою введення ДНК в клітини рослини добре відоме з рівня техніки (див., наприклад, US 5177010, US 5104310, US 5004863 або US 5159135), включаючи методи занурення квіток з використанням Agrobacterium або інших бактерій, які можуть переносити ДНК в клітини рослини. Ділянка ДНК для перенесення визначається послідовностями межі, причому проміжна ДНК (Т-ДНК) звичайно вставляється до геному рослини. В подальшому, інтеграція Т-ДНК є відносно точним процесом, що приводить до декількох реорганізацій. У тих різновидах рослин, в яких опосередкована Agrobacterium трансформація є ефективною, вона є способом вибору завдяки легкій і визначеній природі перенесення гена. Переважні вектори трансформації Agrobacterium здатні до реплікації в E. coli, так само, як і Agrobacterium, дозволяючи здійснити необхідні маніпуляції, як було описано (Klee et al., в: Plant DNA Infectious Agents, Hohn and Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 179-203 (1985)).

Способи прискорення, які можуть застосовуватися, включають, наприклад, балістичну трансфекцію, тощо. Одним із прикладів способу доставки трансформуючих молекул нуклеїнових кислот в клітини рослини є балістична трансфекція. Даний спосіб розглянутий Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994). Небіологічні частинки (мікрочастинки) в ньому можуть бути вкриті нуклеїновими кислотами і доставлені в клітини рушійною силою. Приклади частинок включають виготовлені з вольфраму, золота, платини, тощо. Конкретна перевага балістичної трансфекції, на додаток до того, що вона є ефективним засобом відтворюваної трансформації однодольних, є те, що вона не вимагає ані виділення протопластів, ні сприйнятливості до інфекції Agrobacterium.

В іншому альтернативному варіанті реалізації винаходу пластиди можуть бути стабільно трансформовані. Способи, розкриті для трансформації пластиди у вищих рослинах, включають доставку за допомогою генної гармати частинки ДНК, що містить селекційний маркер, і націлювання ДНК на геном пластиди за допомогою гомологічної рекомбінації (US 5451513, US 5545818, US 5877402, US 5932479 і WO 99/05265).

Інші способи трансформації клітини можуть також застосовуватися і включають, без обмеження, введення ДНК в рослини прямим перенесенням ДНК в пилок, прямою ін'єкцією ДНК в репродуктивні органи рослини або прямою ін'єкцією ДНК у клітини незрілих ембріонів, з подальшою регідратацією висушених ембріонів.

Регенерація, розвиток і культивування рослин з одинарних трансформантів протопласта рослини або з різноманітних трансформованих експлантів добре відомі з рівня техніки (Weissbach et al. У: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988)). Така регенерація і процес росту звичайно включають стадії селекції трансформованих клітин, культивування таких індивідуальних клітин через звичайні стадії ембріонального розвитку, зокрема, стадію вкорінення саджанця. Трансгенні ембріони і насіння регенерують в такий же спосіб. Одержані трансгенні укорінені пагони в подальшому висаджують у відповідне середовище для росту рослини, таке як грунт.

Розвиток або регенерація рослин, що містять чужорідний, екзогенний ген, добре відомі з рівня техніки. Переважно регенеровані рослини є такими, що самозапилюються, щоб забезпечити гомозиготні трансгенні рослини. В іншому випадку, пилок, одержаний від регенерованих рослин, схрещують з вирощеними із насіння рослинами важливих з агрономічної точки зору ліній. З другого боку, пилок рослин таких важливих ліній використовується для запилення регенерованих рослин. Трансгенну рослину за даним винаходом, що містить бажану екзогенну нуклеїнову кислоту, культивують із застосуванням способів, добре відомих фахівцю в даній галузі техніки.

Щоб підтвердити присутність трансгенів в трансгенних клітинах і рослинах, може бути здійснена ампліфікація шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або аналіз методом саузерн-блота, із застосуванням способів, відомих фахівцям в дані галузі техніки. Продукти експресії трансгенів можуть бути виявлені будь-яким з численних шляхів, в залежності від природи продукту, що включають вестерн-блот і ферментний аналіз. Як тільки трансгенні рослини одержані, їх можна вирощувати для одержання тканин або частин рослини з бажаним фенотипом. Тканина рослини або частини рослини можуть бути зібрані як урожай, та/або зібране насіння. Насіння може служити джерелом вирощування додаткових рослин з тканинами або частинами, що володіють бажаними характеристиками.

Трансгенна рослина, одержана із застосуванням Agrobacterium або інших способів трансформації, звичайно містить єдиний генетичний локус на одній хромосомі. Такі трансгенні рослини можуть носити назву гемізиготних по введеному(им) гену(ам). Більш переважною є трансгенна рослина, гомозиготна по введеному(им) гену(ам); тобто, трансгенна рослина, яка містить два додаткових гени, по одному гену в однакових локусах на кожній хромосомі з пари хромосом. Гомозиготна трансгенна рослина може бути одержана шляхом самозапліднення гемізиготної трансгенної рослини, пророщування частини одержаного насіння та аналізу одержаних рослин щодо присутності цільового гена.

Крім того, необхідно розуміти, що дві різні трансгенні рослини, що містять два незалежно сегрегуючих екзогенних гени або локуси, можуть бути схрещеними (спареними), з метою одержання потомства, яке містить обидва набори генів або локусів. Самозапліднення відповідного нащадка F1 може давати рослини, гомозиготні по обох екзогенних генах або локусах. Зворотне схрещування з материнською рослиною і знищення нетрансгенної рослини також розглядаються, як вегетативне розведення. Опис інших способів розведення, які звичайно використовуються для різноманітних ознак і врожаю, можна знайти в Fehr, в: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Підвищення рівнів екзогенної РНК і стабілізована експресія

Супрессори сайленсингу

У варіанті реалізації винаходу клітина, рослина або частина рослини за винаходом містить екзогенний полінуклеотид, що кодує білок супресора сайленсингу.

Посттранскрипційний сайленсинг гена (ПТСГ) є специфічним для послідовності нуклеотидів механізмом захисту, що може бути націлений як на клітинні, так і на вірусні мРНК з метою їх розкладу. ПТСГ виникає в рослинах або грибах, стабільно або тимчасово трансформованих чужорідною (гетерологічною) або ендогенною ДНК, і приводить до зменшення акумуляції молекул РНК, послідовність яких подібна до введеної нуклеїнової кислоти.

Широко досліджений той факт, що співекспресія супресора сайленсинга з цільовим трансгеном підвищує рівні присутньої в клітині РНК, що транскрибована із трансгена. Хоча це є доведеним фактом для клітин in vitro, значущі побічні ефекти спостерігаються в багатьох дослідженнях співекспресії у суцільних рослинах. Більш конкретно, як описано в Mallory et al. (2002), Chapman et al. (2004), Chen et al. (2004), Dunoyer et al. (2004), Zhang et al. (2006), Lewsey

et al. (2007) і Meng et al. (2008) рослини, що експресують супресори сайленсинга, загалом під контролем конститутивних промоторів, часто є фенотипово аномальними до такої міри, що вони непридатні для комерційного виробництва.

Нещодавно було виявлено, що рівні молекул РНК можуть бути збільшені та/або рівні молекул РНК можуть бути стабілізовані протягом численних поколінь шляхом допомогою обмеження експресії супресора сайленсинга насінням рослини або його частиною (WO2010/057246). В цьому документі "білок-супресор сайленсинга" або БСС являє собою будь-який поліпептид, який може експресуватися в клітині рослини, що підвищує рівень продукту експресії іншого трансгена в клітині рослини, особливо в подальших поколіннях, одержаних від початково трансформованої рослини. У варіанті реалізації винаходу БСС являє собою вірусний супресор сайленсинга або його мутант. Велика кількість вірусних супресорів сайленсинга відома з рівня техніки і включає, без обмеження, P19, V2, P38, Pe-Po і RPV-P0. У варіанті реалізації винаходу вірусний супресор сайленсинга містить послідовність амінокислот, представлену будь-якою з SEQ ID NO: 53–57, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот щонайменше на 50 % ідентичною будь-якій одній або більше із SEQ ID NO: 53-57, яка додатково має активність супресора сайленсинга.

В цьому документі терміни "стабілізуючий експресію" "стабільно експресований", "стабілізована експресія" та їх варіації позначають рівень молекули РНК, по суті такий ж або перевищуючий рівень у рослинах-нащадках протягом наступних поколінь, наприклад, щонайменше 3, щонайменше 5 або щонайменше 10 поколінь, в порівнянні з ізогенними рослинами, які не містять екзогенного полінуклеотиду, що кодує супресор сайленсинга. Однак, даний(і) термін(и) не виключає(ють) можливості деякого зниження рівнів молекули РНК в наступних поколіннях, в порівнянні з попереднім поколінням, наприклад, зниження не менше 10 % на покоління.

Супресор може бути вибраний з будь-якого джерела, наприклад, рослини, вірусу, ссавця, тощо. Див. WO2010/057246 щодо переліку вірусів, з яких може бути одержаний супресор і позначення білка (наприклад, B2, P14, тощо.) або кодуючої ділянки для супресора з кожного конкретного вірусу. Множинні копії супресора можуть бути використані. Різні супресори можуть використовуватися спільно (наприклад, в тандемі).

Молекули РНК

По суті будь-яка молекула РНК, яку бажано екпресувати в насінні рослини, може бути співекспресована із супресором сайленсинга. Кодовані поліпептиди можуть приймати участь в метаболізмі олії, крохмалю, вуглеводів, поживних речовин, тощо, або можуть бути відповідальними за синтез білків, пептидів, жирних кислот, ліпідів, воску, масел, крохмалів, цукру, вуглеводів, смакоароматичних речовин, ароматичних речовин, токсинів, каротиноїдів, гормонів, полімерів, флавоноїдів, запасних білків, фенолових кислот, алкалоїдів, лігніну, танінів, целюлози, глікопротеїнів, гліколіпідів, тощо, переважно біосинтез або збирання ТАГ.

У конкретному прикладі, рослини продукують підвищені рівні ферментів для продукування олії в рослинах, наприклад, видів Brassica, таких як канола або соняшника, сафлору, льону, бавовнику, соєвому бобі, Camelina або маїсі.

Рівні продукування ДЛ-ПНЖК

Рівні ДЛ-ПНЖК або комбінацій ДЛ-ПНЖК, що продукуються в рекомбінантній клітині або частині рослини, наприклад, насінні, мають велике значення. Рівні можуть бути виражені, як склад (у відсотках) загальних жирних кислот, які є конкретними ДЛ-ПНЖК або групою споріднених ДЛ-ПНЖК, наприклад, ω3 ДЛ-ПНЖК або ω6 ДЛ-ПНЖК, або ДДЛ-ПНЖК, або інші, що може бути визначене за способами, відомими з рівня техніки. Крім того, рівень може бути виражений, як вміст ДЛ-ПНЖК, наприклад як відсоток ДЛ-ПНЖК в сухій масі матеріалу, що містить рекомбінантні клітини, наприклад, відсоток від маси насіння, який представляє ДЛ-ПНЖК. Необхідно розуміти, що рівень ДЛ-ПНЖК, що продукується в олійній культурі, може бути значно вищим за показниками вмісту ДЛ-ПНЖК, ніж в овочі або насінні, яке не вирощувалося для цілей одержання олії, хоча обидва можуть мати подібний склад ДЛ-ПНЖК і обидва можуть використовуватися як джерела ДЛ-ПНЖК для споживання людиною або твариною.

Рівні ДЛ-ПНЖК можуть бути визначені за будь-яким із способів, відомих у даній галузі техніки. У переважному способі загальний ліпід добувають з клітин, тканин або організмів, і жирну кислоту перетворюють на метилові ефіри перед аналізом газовою хроматографією (ГХ). Такі методи розкриті у Прикладі 1. Розташування піку на хроматограмі може використовуватися для ідентифікації кожної конкретної жирної кислоти, і площу кожного піку інтегрують для визначення кількості. В цьому документі, якщо не вказано інше, відсоток конкретної жирної кислоти у зразку визначають, виражаючи площу піку вказаної жирної кислоти як відсоток від загальної площі піків жирних кислот на хроматограмі. По суті, це відповідає масовому відсотку

(мас/мас). Ідентичність жирних кислот може бути підтверджена ГХ-МС. Загальні ліпіди можуть бути виділені методами, відомими з рівня техніки, з метою очищення фракцій, наприклад, фракції ТАГ. Наприклад, тонкошарова хроматографія (ТШХ) може бути здійснена в аналітичному масштабі, щоб відокремити ТАГ від інших фракцій ліпіду, таких як ДАГ, ацил-КоА або фосфоліпід, з метою визначення складу жирних кислот конкретно для ТАГ.

В одному варіанті реалізації винаходу загальна сума АРК, ЕПК, ДПК і ДГК в жирних кислотах екстрагованого ліпіду становить від приблизно 7 % до приблизно 25 % загальних жирних кислот в клітині. У подальшому варіанті реалізації винаходу загальні жирні кислоти в клітині містять менше 1 % С20:1. У переважних варіантах реалізації екстрагований ТАГ в клітині містить жирні кислоти в кількостях, вказаних у цьому документі. Кожна з можливих комбінацій ознак, що визначають ліпід, розкритий в цьому документі, також включена.

Додатково рівень продукування ДЛ-ПНЖК в рекомбінантній клітині, рослині або частині рослини, наприклад, насінні, може бути виражений, як відсоток перетворення конкретного жирнокислотного субстрату на один або більше жирнокислотних продуктів, що в цьому документі додатково носить назву "ефективності перетворення" або "ефективності ферменту". Цей параметр базується на жирнокислотному складі ліпіду, екстрагованого з клітини, рослини, частини рослини або насіння, тобто, кількості утвореної ДЛ-ПНЖК (зокрема іншої ДЛ-ПНЖК, одержаної з неї), вираженому як відсоток від одного або більше жирнокислотних субстратів (зокрема, всіх інших жирних кислот, одержаних із нього). Загальна формула для відсотка перетворення: 100 × (сума відсотків продукту ДЛ-ПНЖК і всіх продуктів, одержаних із нього)/(сума відсотків жирнокислотного субстрату і всіх продуктів, одержаних із нього). Стосовно ДГК, наприклад, це може бути виражено, як співвідношення рівня ДГК (у вигляді відсотка від загального вмісту жирних кислот в ліпіді) до рівня жирнокислотного субстрату (наприклад ОК, ЛК, АЛК, СДК, ЕТК або ЕПК) і всіх продуктів, окрім ДГК, одержаних з субстрату. Відсоток перетворення або ефективність перетворення можуть бути виражені для єдиної ферментної стадії біохімічного шляху, а також для частини або всього шляху.

Специфічна ефективність перетворення обчислена в цьому документі за наступними формулами:

1. ОК на ДГК = 100 × (%ДГК)/(сума % для ОК, ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК).

2. ЛК на ДГК = 100 × (%ДГК)/(сума % для ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК).

3. АЛК на ДГК = 100 × (%ДГК)/(сума % для АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК).

4. ЕПК на ДГК = 100 × (%ДГК)/(сума % для ЕПК, ДПК і ДГК).

5. ДПК на ДГК (ефективність Δ4-десатурази) = 100 × (%ДГК)/(сума % для ДПК і ДГК).

6. Ефективність Δ12-десатурази = 100 × (сума % для ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК)/(сума % для ОК, ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК).

7. Ефективність ω3-десатурази = 100 × (сума % для АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК)/(сума % ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК).

8. ОК на АЛК = 100 × (сума % для АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК)/(сума % для ОК, ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК).

9. Ефективність Δ6-десатурази (на ω3 субстраті АЛК) = 100 × (сума % для СДК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК)/(% АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК).

10. Ефективність Δ6-елонгази (на ω3 субстраті СДК) = 100 × (сума % для ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК)/(сума % для СДК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК).

11. Ефективність Δ5-десатурази (на ω3 субстраті ЕТК) = 100 × (сума % для ЕПК, ДПК і ДГК)/(сума % для ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК).

12. Ефективність Δ5-елонгази (на ω3 субстраті ЕПК) = 100 × (сума % для ДПК і ДГК)/(сума % для ЕПК, ДПК і ДГК).

Жирнокислотний склад ліпіду, переважно олії з насіння, за винаходом також відрізняється за співвідношенням ω6 жирних кислот : ω3 жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот, для будь-яких загальних ω6 жирних кислот : загальних ω3 жирних кислот або для нових ω6 жирних кислот : ω3 нових жирних кислот. Терміни загальні ω6 жирні кислоти, загальні ω3 жирні кислоти, нові ω6 жирні кислоти і нові ω3 жирні кислоти мають значення, визначені в цьому документі. Співвідношення обчислюють на базі складу жирних кислот у ліпіді, екстрагованому з клітини, рослини, частини рослини або насіння ліпіду, за способом, приклад якого наведений у цьому документі. Більш бажаною є присутність в ліпіді вищого рівня ω3 жирних кислот, ніж ω6 жирних кислот, і таким чином співвідношення ω6:ω3 менше 1,0 є переважним. Співвідношення 0,0 вказує на повну відсутність певних ω6 жирних кислот; співвідношення 0,03 було досягнуте, як

розкрито у Прикладі 6. Такі низькі значення співвідношення можуть бути досягнуті шляхом сполученого використання Δ6-десатурази з перевагою по відношенню до субстрату ω3, разом з ω3-десатуразою, особливо грибковою ω3-десатуразою, такою як ω3-десатураза Pichia pastoris, приклад якої наведений в цьому документі.

Додатково вихід ДЛ-ПНЖК на масу насіння може бути обчислений на базі загального вмісту олії в насінні і % ДГК в олії. Наприклад, якщо вміст олії в насінні канолау становить приблизно 40 % (мас./масс.), і приблизно 12 % від загального вмісту жирних кислот в олії становить ДГК, вміст ДГК в насінні становить приблизно 4,8 % або близько 48 мг на грам насіння. Як розкрито в Прикладі 2, вміст ДГК в насінні Arabidopsis, що містить приблизно 9 % ДГК, в якому вміст олії нижчий, ніж в канолаі, становив 25 мг/г насіння. При вмісті ДГК приблизно 7 %, насіння канолау або насіння Camelina sativa містить рівень ДГК приблизно 28 мг на грам насіння. У цьому винаході таким чином розкриваються рослини Brassica napus, B. juncea і Camelina sativa та одержане з них насіння, яке містить щонайменше близько 28 мг ДГК на грам насіння. Вміст вологи в насінні є стандартним для зібраного в процесі збору урожаю зрілого насіння після сушіння (4–15 % вологи). У винаході також розкривається спосіб одержання олії, який включає одержання насіння і виділення олії з насіння, застосування олії і способи одержання насіння, включаючі збір урожаю насіння з рослин за винаходом.

Крім того, може бути обчислена кількість ДГК, що продукується на гектар, якщо вихід насіння з гектара відомий або може бути оцінений. Наприклад, урожайність каноли в Австралії зазвичай приблизно 2,5 тони насіння на гектар, що при вмісті олії 40 % дає близько 1000 кг олії. При вмісті ДГК 12 % в кінцевій олії, це забезпечує близько 120 кг ДГК на гектар. Якщо вміст олії знижується на 50 %, це все ще забезпечує близько 60 кг ДГК/га.

Одержані на сьогоднішній день докази свідчать про те, що деякі десатурази, що гетерологічно експресуються в дріжджах або рослинах, володіють відносно низькою активністю в комбінації з деякими елонгазами. Дану ситуацію можна покращити, надаючи десатуразі здатність використовувати форму ацил-КоА жирної кислоти як субстрат у синтезі ДЛ-ПНЖК, і це вважається переважним в рекомбінантних клітинах, особливо у клітинах рослини. Особливо переважна комбінація для ефективного синтезу ДГК являє собою грибкову ω3-десатуразу, наприклад, таку як ω3-десатураза Pichia pastoris (SEQ ID NO: 12), що є Δ6-десатуразою з перевагою по відношенню до ω3 ацильних субстратів, наприклад, таку як Δ6-десатураза Micromonas pusilla (SEQ ID NO: 13) або її варіанти з ідентичністю послідовності амінокислот щонайменше 95 %.

В цьому документі термін "що по суті не містить" означає, що композиція (наприклад, ліпід або олія) містить невелику кількість (наприклад, менше, ніж приблизно 0,5 %, менше, ніж приблизно 0,25 %, менше, ніж приблизно 0,1 %, або менше, ніж приблизно 0,01 %) або не містить певного компоненту. У варіанті реалізації винаходу "такий, що по суті не містить" означає, що компонент неможливо знайти за допомогою шаблонної методики аналізу, наприклад, конкретна жирна кислота (наприклад, ω6-докозапентаєнова кислота) не може бути знайдена за допомогою газової хроматографії, як у загальних рисах розкрито в Прикладі 1

Отримання олій

Методи, які шаблонно практикуються в цій галузі техніки, можуть застосовуватися для виділення, обробки і аналізу олій, продукованих клітинами, рослинами, насінням, тощо за даним винаходом. Зазвичай насіння рослини термічно обробляють, пресують і екстрагують, щоб продукувати неочищену олію, яку далі гідратують, рафінують, відбілюють і дезодорують. Загалом методи подрібнення насіння відомі з рівня техніки. Наприклад, насіння олійних культур може бути пом'якшено шляхом орошування його водою для підвищення вмісту вологи, наприклад, до 8,5 %, і провальцьоване за допомогою гладкого валу із щілинами розміром 0,23–0,27 мм. В залежності від виду насіння, перед подрібненням можна не додавати воду. Застосування нагрівання інактивує ферменти, полегшує подальший розрив клітини, об'єднання олійних крапель, і забезпечує агломерацію частинок білка, причому все це спрощує процес екстракції.

У варіанті реалізації винаходу більшість олії з насіння вивільняється при пропусканні крізь гвинтовий прес. Макуху, що виходить з гвинтового пресу, далі екстрагують, наприклад, гексаном, з використанням колонки із супровідним теплоконтролем. Як альтернатива, неочищена олія, одержана в ході операції пресування, може бути пропущена крізь резервуар для осадження з дротяним дренажним верхом із прорізами, щоб видалити тверді речовини, які потрапляють в олію в ході операції пресування. Освітлена олія може бути пропущена крізь рамний і фільтр-прес для видалення будь-яких тонких механічних включень, що залишилися. За необхідності олія після процесу екстракції може бути об'єднана з освітленою олією, з одержанням змішаної неочищеної олії.

Як тільки розчинник відділений з неочищеної олії, пресовані та екстраговані порції об'єднують і обробляють звичайними процедурами обробки олії. В цьому документі термін "очищений", використовуваний у зв'язку з ліпідом або олією за винаходом, звичайно означає, що екстрагований ліпід або олія пройшли одну або більше стадій обробки, які підвищують ступінь чистоти ліпідного/олійного компоненту. Наприклад, стадія очищення може включати одне або більше або все із групи, що складається з: гідратації, дезодорування, відбілювання, сушіння та/або фракціонування екстрагованого олії. Однак в цьому документі термін "очищений" не включає процесу переестерифікації або іншого процесу, що модифікує склад жирних кислот ліпіду або олії за винаходом для збільшення вмісту ДГК як відсотка від загального вмісту жирних кислот. Іншими словами, склад жирних кислот очищеного ліпіду або олії по суті є таким же, як склад неочищеного ліпіду або олії.

Гідратація

Гідратація є початковою стадією рафінацій олій, і його основна мета полягає у видаленні з олії більшості фосфоліпідів, які можуть бути присутніми в кількості приблизно 1–2 % від загального екстрагованого ліпіду. Додавання до неочищеного олії ~2 % води, що звичайно містить фосфорну кислоту, при 70-80°C приводить до відокремлення більшості фосфоліпідів, за наявності залишкових кількостей металів і пігментів. Нерозчинний матеріал, який відокремлюється, в основному є сумішшю фосфоліпідів і триацилгліцеролів, і також відомий як лецитин. Гідратація може здійснюватись шляхом додавання концентрованої фосфорної кислоти до неочищеної олії з насіння, з метою переведення нездатних до гідратації фосфатидів у здатну до гідратації форму та утворення хелатів металів, які присутні в незначних кількостях. Смолу відокремлюють від олії з насіння центрифугуванням.

Лужна рафінація

Лужна рафінація є одним із способів очищення для обробки неочищеного олії, який іноді також називають нейтралізацією. Вона зазвичай слідує за гідратацією і передує відбілюванню. Після гідратації олія з насіння може бути оброблена додаванням достатньої кількості розчину лугу, щоб відтитрувати всі жирні кислоти і фосфорні кислоти, з подальшим видаленням утвореного мила. Придатні лужні матеріали включають натрію гідроксид, калію гідроксид, натрію карбонат, літію гідроксид, кальцію гідроксид, кальцію карбонат і амонію гідроксид. Цей спосіб, як правило, здійснюють за кімнатної температури, з видаленням фракції вільних жирних кислот. Мило видаляють центрифугуванням або екстракцією мила розчинником , і нейтралізовану олію промивають водою. За необхідності, надлишок лугу в олії може бути нейтралізований відповідною кислотою, такою як хлористоводнева кислота або сірчана кислота.

Відбілювання

Відбілювання є способом очищення, за якого олію нагрівають до 90–120°C, витримуючи за цієї температури протягом 10–30 хвилин у присутності відбілюючої глини (0,2–2,0 %) і за відсутності кисню, в атмосфері азоту або пари або під вакуумом. Ця стадія обробки олії розроблена таким чином, щоб видаляти небажані пігменти (каротиноїди, хлорофіл, госипол, тощо), причому спосіб додатково видаляє продукти окиснення, залишкові метали, сполуки сірки і залишок мила.

Дезодорування

Дезодорування є обробкою олій і жирів за високої температури (200–260°C) і низького тиску (0,1–1 мм рт. ст). Зазвичай, це досягається шляхом введення пари в олію з насіння із швидкістю приблизно 0,1 мл/хвилину/100 мл олії з насіння. Приблизно через 30 хвилин зрошування олії з насіння охолоджують під вакуумом. Олію з насіння зазвичай подають до скляного контейнеру і пропускають аргон, після чого зберігають за низької температури. Така обробка покращує колір олії з насіння і видаляє більшість летючих субстанцій або пахучих сполук, включаючи вільні жирні кислоти, що залишилися, моноацилгліцероли і продукти окиснення.

Вінтеризація

Вінтеризація є способом, що іноді застосовується в комерційному виробництві олій з метою розділення олій і жирів на тверді (стеарин) і рідкі (олеїн) фракції шляхом кристалізації за температур, нижчих за температуру навколишнього середовища. Спочатку його застосовували до бавовняної олії, з метою одержання продукту, що не містить твердих речовин. Зазвичай, цей спосіб застосовують для зменшення вмісту насичених жирних кислот в олії.

Переестерифікація

Переестерифікація є способом обміну жирних кислот в межах і між ТАГ або перенесення жирних кислот на інший спирт, з утворенням ефіру, спочатку шляхом вивільнення жирних кислот з ТАГ у формі вільних жирних кислот або у формі ефірів жирних кислот, звичайно метилових ефірів або етилових ефірів жирних кислот. За умови поєднання із способом

фракціонування, переестерифікація може застосовуватися для модифікації жирнокислотного складу ліпідів (Marangoni et al., 1995). Для переестерифікації можуть використовуватися хімічні (наприклад, каталізовані сильною кислотою або основою) або ферментні препарати, причому останні включають ліпази, що можуть бути специфічними до положення (sn-1/3 або sn-2 специфічними) жирної кислоти в ТАГ, або з перевагою по відношенню до деяких жирних кислот в порівнянні з іншими (Speranza et al., 2012). Фракціонування жирних кислот, з метою підвищення концентрації ДЛ-ПНЖК в олії може бути здійснено будь-яким із способів, відомих з рівня техніки, таких як, наприклад, кристалізація виморожуванням, утворення комплексів з використанням сечовини, молекулярна дистиляція, екстракція надкритичною рідиною і утворення комплексів з іоном срібла. Утворення комплексів із сечовиною є переважним способом унаслідок його простоти та ефективності з точки зору зниження рівня насичених і мононенасичених жирних кислот в олії (Gamez et al., 2003). Спочатку, ТАГ в олії розщеплюють на складові жирні кислоти, часто у формі ефірів жирних кислот, шляхом гідролізу в умовах каталізу кислотою або основою, внаслідок чого один моль ТАГ реагує щонайменше з 3 моль спирту (наприклад, етанолу у випадку етилових ефірів або метанолу у випадку метилових ефірів), причому використовують надлишок спирту, щоб забезпечує розділення алкілових ефірів, які утворилися, і гліцерину, який також утворюється, або за допомогою ліпаз. Такі вільні жирні кислоти або ефіри жирних кислот, що звичайно залишаються в незміненому виді у складі жирних кислот після обробки, в подальшому можуть бути змішані з етанольним розчином сечовини для утворення комплексів. Насичені і мононенасичені жирні кислоти легко утворюють комплекси із сечовиною, кристалізуються при охолодженні і далі можуть бути видалені фільтрацією. Фракція, що не утворила комплекси із сечовиною, таким чином, збагачується ДЛ-ПНЖК.

Продукти харчування (корми)

Цей винахід включає композиції, які можуть використовуватися як продукти харчування (корми). Для цілей цього винаходу "продукти харчування (корми)" включають будь-який продукт харчування або препарат для споживання людиною або твариною, який при надходженні в організм: (а) служить цілям живлення або утворення тканин або постачання енергією; та/або (б) підтримує, відновлює або сприяє належному харчовому статусу або метаболічній функції. Продукти харчування (корми) за винаходом включають харчові суміші для немовлят та/або дітей молодшого віку, такі як, наприклад, молочна суміш для дитячого харчування, і шрот за винаходом.

Продукти харчування (корми) за винаходом включають, наприклад, клітину за винаходом, рослину за винаходом, частину рослини за винаходом, насіння за винаходом, екстракт за винаходом, продукт способу за винаходом, продукт процесу ферментації за винаходом, або композицію разом з відповідним(и) носієм(ями). Термін "носій" використовується в найширшому значенні і включає будь-який компонент, який може мати харчове значення або не мати його. Як буде зрозуміло кваліфікованому фахівцю, носій повинен бути придатним для використання (або використовуваним в достатньо низькій концентрації) в продукті харчування (кормі), таким чином, що він не здійснює шкідливого впливу на організм, якій споживає продукт харчування (корм).

Продукт харчування (корм) за цим винаходом включає олію, ефір жирної кислоти або жирну кислоту, одержану прямо або непрямо із застосуванням способів, клітин або рослин, розкритих у цьому документі. Додатково композиція може знаходитися в твердій або рідкій формі. Крім того, композиція може містити їстівні мікронутрієнти, білок, вуглеводи, вітаміни та/або мінерали в кількостях, бажаних для конкретного застосування. Кількості цих інгредієнтів варіюватимуть залежно від того, чи призначається композиція для застосування у здорових індивідуумів або для застосування у індивідуумів з особливими потребами, наприклад, індивідуумів, які страждають на метаболічні розлади, тощо.

Приклади придатних носіїв, що мають харчове значення, включають, без обмеження, макронутрієнти, наприклад, їстівні жири, вуглеводи і білки. Приклади таких їстівних жирів включають, без обмеження, кокосове масло, олію бурячника, олію грибів, олію чорної смородини, соєву олію, а також моно- і дигліцероли. Приклади таких вуглеводів включають (без обмеження): глюкозу, їстівну лактозу і гідролізований крохмаль. Додатково, приклади білків, які можуть використовуватися в харчовій композиції за винаходом, включають (без обмеження) білки сої, оброблену електродіалізом сироватку, оброблене електродіалізомзбиране молоко, молочну сироватку або гідролізати вказаних білків.

Стосовно вітамінів і мінералів, наступне може бути додане до композицій харчових продуктів (кормів) за цим винаходом: кальцій, фосфор, калій, натрій, хлорид, магній, марганець, залізо, мідь, цинк, селен, йод, вітаміни А, Е, D, С і вітаміни групи В. Крім того, інші такі вітаміни і мінерали можуть бути додані.

Компоненти, що використовуються в композиціях продукту харчування (корма) за цим винаходом, можуть бути напівочищеними або очищеними. Під напівочищеним або очищеним мається на увазі матеріал, який одержаний шляхом очищення природного матеріалу або синтезу de novo.

Додатково композиція харчового продукту (корми) за даним винаходом може бути додана до їжі навіть в тому випадку, якщо немає необхідності в добавках до раціону. Наприклад, композиція може бути додана до їжі будь-якого типу, зокрема (без обмеження): маргарин, модифіковане масло, сири, молоко, йогурт, шоколад, цукерки, легкі закуски, олії для салатів, олії для приготування їжі, кулінарні жири, м'ясо, риба і напої.

Рід Saccharomyces spp. використовується як при виготовленні пива, так і у виноробстві, а також як агент у випічці, особливо хліба. Крім того, інші види дріжджів, такі як дріжджі-продуценти ліпідів, включаючи, наприклад, вид Yarrowia, є придатними для одержання ДЛ-ПНЖК. Дріжджі можуть використовуватися як добавка до харчування тварин, наприклад, в аквакультурі. Необхідно розуміти, що можуть бути запропоновані генетично сконструйовані штами дріжджів, адаптовані до синтезу ДЛ-ПНЖК, як розкрито в цьому документі. Такі штами дріжджів або продукуючі ДЛ-ПНЖК можуть в подальшому використовуватися в продовольчих продуктах, а також виробництві вина і пива, з метою забезпечення продуктів із підвищеним вмістом жирних кислот.

Додатково жирні кислоти, що отримують відповідно за цим винаходом, або клітини-хазяї, трансформовані таким чином, що в них містяться та експресуються цільові гени, можуть використовуватися як харчові добавки для тварин, з метою модифікації складу жирних кислот в тканині, яйці або молоці тварини до необхідного для споживання людиною або твариною. Приклади таких тварин включають овець, велику рогату худобу, коней, домашніх птахів, наприклад, курей, тощо.

До того ж, продукти харчування (корми) за винаходом можуть використовуватися в аквакультурі, з метою підвищення рівнів жирних кислот в організмі риби або ракоподібних, таких як, наприклад, креветки, для споживання людиною або твариною. Переважно риба є лососем.

Переважні продукти харчування (корми) за винаходом є рослинами, насінням та іншими частинами рослини, такими як листя і стебла, що безпосередньо можуть використовуватися як їжа або корм для людини або тварин. Наприклад, тварини можуть безпосередньо пастися на таких рослинах, вирощуваних в полі, або їм можуть згодовуватися точніше визначені кількості в ході контрольованого годування. Винахід включає застосування таких рослин і частин рослини як їжі для підвищення рівнів ДЛ-ПНЖК в організмі людини і тварин.

Композиції

Цей винахід також включає композиції, особливо фармацевтичні композиції, що містять одну або більше жирних кислот та/або олій, одержаних із застосуванням способів за винаходом.

Фармацевтична композиція може містити одну або більше жирних кислот та/або олій, в комбінації із стандартним, відомим, нетоксичним фармацевтично прийнятним носієм, ад'ювантом або розчинником, таким як фосфатно-сольовий буфер, вода, етанол, поліоли, рослинні олії, зволожуючий агент або емульсія, наприклад, емульсія вода/олія. Композиція може знаходитися в рідкій або твердій формі. Наприклад, композиція може бути у формі пігулки, капсули, рідини для ковтання або порошку, в ін'єкційній формі або у формі мазі або крему для місцевого застосування. Необхідна текучість може підтримуватись, наприклад, шляхом підтримки необхідного розміру частинок у разі дисперсій і використовування поверхнево-активних речовин. Крім того, може бути бажаним введення ізотонічних агентів, наприклад, цукру, натрію хлориду, тощо. Окрім таких інертних розбавлювачів, композиція може містити ад'юванти, такі як зволожувачі, емульгатори і суспендувальні агенти, підсолоджувачі, смакові добавки та ароматизатори.

Суспензії разом з активними сполуками можуть містити суспендувальні агенти, такі як етоксильовані ізостеарилові спирти, складні ефіри сорбіту і поліоксиетилен сорбітану, мікрокристалічну целюлозу, мета-гідроксид алюмінію, бентоніт, агар-агар і трагакант або суміші цих субстанцій.

Тверді лікарські форми, такі як таблетки і капсули, можуть бути одержані із застосуванням способів, добре відомих з рівня техніки. Наприклад, жирні кислоти, одержані у відповідності до цього винаходу, можуть бути таблетовані із звичайними основами таблеток, такими як лактоза, сахароза і кукурудзяний крохмаль, у комбінації із зв'язувальними речовинами, такими як акація, кукурудзяний крохмаль або желатин, дезінтегрантами, такими як картопляний крохмаль або альгінова кислота, і змащувальними речовинами, такими як стеаринова кислота або магнію стеарат. Капсули можуть бути одержані шляхом об'єднання вказаних допоміжних речовин в желатиновій капсулі з антиоксидантами і відповідною жирною(ими) кислотою(ами).

Для внутрішньовенного введення, жирні кислоти, одержані у відповідності до цього винаходу, або їх похідні, можуть бути введені в комерційні препарати.

Типові дози конкретної жирної кислоти становлять від 0,1 мг до 20 г, при введенні від 1 до 5 разів на день (до 100 г щоденно), і переважно знаходяться в інтервалі від приблизно 10 мг до приблизно 1, 2, 5 або 10 г щодня (у вигляді однієї або декількох доз). Як відомо з рівня техніки, бажано вводити щонайменше приблизно 300 мг/день жирної кислоти, особливо ДЛ-ПНЖК. Проте необхідно розуміти, що будь-яка кількість жирної кислоти буде корисною для суб'єкта.

Можливі способи введення фармацевтичних композицій за цим винаходом включають, наприклад, ентеральний (наприклад, пероральний і ректальний) і парентеральний. Наприклад, рідкий препарат може бути введений перорально або ректально. Додатково гомогенна суміш може бути повністю диспергована у воді, попередньо змішаній в стерильних умовах з фізіологічно прийнятними розбавлювачами, консервантами, буферами або пропелентами для одержання спрею або засобу для інгаляцій.

Дози композиції для введення пацієнту можуть бути визначені звичайним фахівцем в цій галузі техніки і залежать від різних факторів, таких як маса тіла пацієнта, вік пацієнта, загальний стан здоров'я пацієнта, анамнез пацієнта, імунний статус пацієнта, тощо.

Додатково композиції за цим винаходом можуть застосовуватися для косметичних цілей. Вони можуть додаватися до існуючих косметичних композицій таким чином, що утворюється суміш, або жирна кислота, одержана у відповідності до цього винаходу, може використовуватися як єдиний "активний" інгредієнт в косметичній композиції.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Матеріали і способи

Експресія генів в клітинах рослини в системі тимчасової експресії

Екзогенні генетичні конструкції експресують в клітинах рослини в системі тимчасової експресії, як суттєво описано Voinnet et al. (2003) і Wood et al. (2009). Плазміди, що містять кодуючу ділянку, яка експресується з високоактивного конститутивного промотору, наприклад, промотору CaMV 35S, вводять в Agrobacterium tumefaciens, штам AGL1. Химерний ген 35S:p19 для експресії вірусного супресора сайленсинга p19 окремо вводять в AGL1, як розкрито у WO 2010/057246. Рекомбінантні клітини Agrobacterium вирощують за 28°C в лізогенному бульйоні (ЛБ), що містить 50 мг/л канаміцину і 50 мг/л рифампіцину, до стаціонарної фази. Далі бактерії гранулюють центрифугуванням при 5000 g протягом 15 хвилин при кімнатній температурі, після чого ресуспендують до OD600 = 1,0 в інфільтраційному буфері, що містить 10 мМ морфоліноетансульфонової кислоти (МЕС), pH 5,7, 10 мМ $MgCl_2$ і 100 мкМ ацетосирингону. Далі клітини інкубують за 28°C із струшуванням протягом 3 годин, після чого рівні об'єми культур Agrobacterium, що містять 35S:p19 і досліджувану цільову химерну конструкцію(ї), змішують перед інфільтрацією листової тканини. Рослини звичайно вирощують ще протягом 5 днів після інфільтрації, після чого листові диски витягують і сушать виморожуванням для аналізу жирних кислот методом ГХ.

Складні метилові ефіри жирних кислот (МЕЖК) загальних листових ліпідів у ліофілізованих зразках одержують, інкубуючи зразки протягом 2 годин при 80°C в розчині метанол/HCl/дихлорметан (10/1/1, об/об), що містить відому кількість гексадеканової кислоти як внутрішній стандарт. МЕЖК екстрагують в гексан/ДХМ, концентрують до невеликого об'єму в гексані і вводять в прилад для ГХ. Кількість присутніх індивідуальних і загальних жирних кислот в ліпідних фракціях визначають на базі відомої кількості внутрішнього стандарту.

Аналіз жирних кислот методом газової хроматографії (ГХ)

МЕЖК аналізують методом газової хроматографії за допомогою газового хроматографа Agilent Technologies 7890A GC (Пало-Альто, Каліфорнія, США), обладнаного колонкою SGE-BPX70 (70 % ціанопропіл полісилфенілен-силоксану, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина плівки 0,25 мм) завдовжки 30 м, ПІД (плазмово-іонізаційним детектором), інжектором з розділенням/без розділення, а також серійним аутосамплером та інжектором Agilent Technologies 7693. Гелій використовують як газ-носій. Зразки вводять інжекцією в методі з розділенням (співвідношення 50:1) при температурі печі 150°C. Після інжекції температуру печі підтримують на рівні 150°C протягом 1 хвилини, далі підвищують до 210°C із швидкістю 3°C/хвилину, знову підвищують до 240°C із швидкістю 50°C/хвилину і остаточно підтримують протягом 1,4 хвилин на рівні 240°C. Площу піків визначають за допомогою програмного забезпечення Agilent Technologies ChemStation (версія Rev B.04.03 (16), Пало-Альто, Каліфорнія, США), на базі відповіді відомої кількості зовнішнього стандарту GLC-411 (Nucheck) і внутрішнього стандарту C17:0-ME.

Аналіз ліпідів методом рідинної хроматографії-мас-спектрометрії (РХ-МС)

Загальні ліпіди екстрагують з ліофілізованого насіння, що розвивається, через 12 днів після цвітіння (дпц) і зрілого насіння після додавання відомої кількості три-C17:0-ТАГ як внутрішнього стандарту для кількісної оцінки. Екстраговані ліпіди розчиняють в 1 мл 10 мМ бутильованого гідрокситолуолу в суміші бутанол/метанол (1:1, об/об) на 5 мг сухого матеріалу і аналізують за допомогою рідинного хроматографа серії Agilent 1200 з РХ та іонізацією електророзпиленням за допомогою РХ-МС 6410b з трьома квадрупольними лінзами. Ліпіди хроматографічно розділяють з використанням колонки Ascentis Express RP-Amide (50 мм x 2,1 мм, 2,7 мкм, Supelco) в режимі бінарного градієнта із швидкістю потоку 0,2 мл/хвилину. Рухомі фази: А. 10 мМ амонію форміату в суміші H_2O/метанол/тетрагідрофуран (50:20:30 об/об/об); В. 10 мМ амонію форміату в суміші H_2O/метанол/тетрагідрофуран (5:20:75, об/об/об). Переліки для моніторингу множинних реакцій (ММР) базуються на наступних основних жирних кислотах: 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4, 20:1, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5, 22:6, з використанням енергії зіткнення 30 В і фрагментора 60 В. Індивідуальні ТАГ згідно ММР ідентифікують на базі іона амонізованого прекурсору та іона продукту, утвореного в результаті втрати нейтральних частинок 22:6. Кількість ТАГ визначають з використанням 10 мкМ зовнішнього стандарту тристеарину.

Визначення профілю жирних кислот і вмісту олії в насінні

За необхідності визначення вмісту олії в насінні, насіння сушать в ексикаторі протягом 24 годин, і приблизно 4 мг насіння переносять до скляного флакону місткістю 2 мл, із вкритою Тефлоном нагвинчувальною кришкою. 0,05 мг тригептадеканоїну, розчиненого в 0,1 мл толуолу, додають у флакон як внутрішній стандарт.

МЕЖК насіння одержують, додаючи 0,7 мл 1 н метанольного HCl (Supelco) у флакон, що містить матеріал насіння, короткочасно обробляють вихровим перемішуванням та інкубують при 80° С протягом 2 годин. Після охолодження до кімнатної температури, 0,3 мл 0,9 % (мас/об) розчину NaCl і 0,1 мл гексану додають у флакон і ретельно перемішують протягом 10 хвилин в Heidolph Vibramax 110. МЕЖК збирають у скляну вставку місткістю 0,3 мл і аналізують методом ГХ з плазмово-іонізаційним детектором (ПІД), як було згадано раніше.

Площу піку окремого МЕЖК спочатку коректують на базі відповіді у вигляді площі піку відомої кількості таких же МЕЖК, присутніх в комерційному стандарті GLC-411 (NU-CHEK PREP, INC., США). GLC-411 містить рівні кількості 31 жирної кислоти (мас. %), в інтервалі від C8:0 до C22:6. У випадку жирних кислот, які відсутні в стандарті, винахідники використовували відповіді у вигляді площі піку найбільш подібного МЕЖК. Наприклад, відповідь у вигляді площі піку МЕЖК 16:1d9 використовували для 16:1d7, і відповідь МЕЖК C22:6 використовували для C22:5. Скоректовані значення площі піку використовують для обчислення маси кожного МЕЖК в зразку, в порівнянні з масою внутрішнього стандарту. Олія зберігається в основному у формі ТАГ, і її масу обчислюють на базі маси МЕЖК. Загальну кількість моль гліцерину визначають шляхом обчислення кількості моль кожного МЕЖК і поділу загальної кількості моль МЕЖК на три. Вміст ТАГ обчислюють як суму гліцерину і жирних ацильних фрагментів, з використанням співвідношення: мас. % олії = 100 x ((41 x загальна кількість моль МЕЖК/3) + (загальна кількість грам МЕЖК – (15 x загальна кількість моль МЕЖК)))/грам насіння, де 41 і 15 — молекулярна маса залишку гліцеролу і метильної групи, відповідно.

Аналіз вмісту стеролів у зразках олії

Зразки приблизно по 10 мг олії, разом з доданою аліквотою C24:0 монолу як внутрішнього стандарту, омилюють за допомогою 4 мл 5 % розчину KOH у 80 % MeOH і нагрівання до 80°C, витримуючи протягом 2 годин при цій температурі, у вкритій Тефлоном скляній пробірці з нагвинчувальною кришкою. Після охолодження реакційної суміші додають 2 мл води Milli-Q, і стероли екстрагують 2 мл суміші гексан/дихлорметан (4:1, об./об.) при струшуванні і вихровому перемішуванні. Суміш центрифугують, екстракт стеролів витягають і промивають 2 мл води Milli-Q. Далі екстракт стеролів відокремлюють після струшування і центрифугування. Екстракт упарюють в потоку газоподібного азоту, і стероли силілюють з використанням 200 мл N,O-бис(триметилсиліл)трифторацетаміду (БСТФА) при нагріванні до 80°C, витримуючи протягом 2 годин при цій температурі.

Для аналізу стеролів методом ГХ/ГХ-МС, похідні стерол-О-триметилсилілу (стерол-OTMSi) сушать в потоку газоподібного азоту на термоблоці при 40°C, і далі повторно розчиняють у хлороформі або гексані безпосередньо перед аналізом методом ГХ/ГХ-МС. Похідні стерол-OTMS аналізують газовою хроматографією (ГХ) за допомогою газового хроматографа Agilent Technologies 6890A GC (Пало-Альто, Каліфорнія, США), обладнаного капілярною колонкою з кварцевого скла Supelco Equity™-1 (15 м x 0,1 мм внутрішній діаметр, товщина плівки 0,1 мкм), ПІД та інжектором з розщепленням/без розщеплення, а також серійним аутосемплером Agilent Technologies 7683B та інжектором. Як газ-носій використовують гелій. Інжекцію зразків здійснюють в режимі без розщеплення при температурі печі 120°C. Після інжекції температуру

печі підвищують до 270°С із швидкістю 10°С/хвилину, і в кінці до 300°С із швидкістю 5°С/хвилину. Площу піків визначають за допомогою програмного забезпечення Agilent Technologies ChemStation (Пало-Альто, Каліфорнія, США). Результати ГХ містять помилку ± 5 %, від значень площі піку окремих компонентів.

Аналізи методом ГХ-мас-спектрометрії (ГХ-МС) здійснюють за допомогою приладів для ГХ-МС Finnigan Thermoquest GCQ і Finnigan Thermo Electron Corporation GC-MS, притому, що обидві системи обладнані інжектором для введення проб безпосередньо на колонку, і програмного забезпечення Thermoquest Xcalibur (Остін, Техас, США). Кожний з приладів для ГХ обладнаний капілярною колонкою, полярність якої подібна до розкритої вище. Індивідуальні компоненти ідентифікують, використовуючи дані мас-спектрометрії і порівнюючи дані часу утримування з одержаними для автентичних і лабораторних стандартів. Повну методику холостого аналізу виконують паралельно із серією зразків.

Умови ЗТ-ПЛР

Ампліфікацію методом ПЛР із зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР) звичайно здійснюють з використанням системи ЗТ-ПЛР Superscript III One-Step (Invitrogen) в об'ємі 25 мкл, з використанням 10 пмоль прямого праймера і 30 пмоль зворотного праймера, $MgSO_4$ до кінцевої концентрації 2,5 мМ, 400 нг загальної РНК з буфером і нуклеотидними компонентами згідно інструкцій виробника. Типові температурні режими були наступними: 1 цикл при температурі 45°С протягом 30 хвилин для виникнення зворотної транскрипції; потім 1 цикл при температурі 94°С протягом 2 хвилин, і далі 40 циклів з температурою 94°С протягом 30 секунд, 52°С протягом 30 секунд, 70°С протягом 1 хвилини; потім 1 цикл при температурі 72°С протягом 2 хвилин перед охолодженням реакційних сумішей до 5°С.

Одержання соматичних ембріонів B. napus за допомогою індукції за допомогою 35S-LEC2

Насіння B. napus (сорт Oscar) стерилізують газоподібним хлором, як описано (Attila Kereszt et al., 2007). Стерилізоване насіння пророщують на середовищах MS (Murashige and Skoog, 1962) з 1/2 активності, що містять 0,8 % агару, з корекцією pH до 5,8, і вирощують при 24°С при освітленні флуоресцентним світлом (50 мкЕ/$м^2$с) з фотоперіодом 18/6 годин (освітлення/темрява) протягом 6–7 днів. Сім'ядольні черешки з довжиною ніжки 2–4 мм виділяють в асептичних умовах з одержаних пагонів і використовують як експланти. Культури трансформованого A. tumefaciens, штам AGL1, одна з яких несе специфічний для насіння бінарний вектор і друга — конструкцію 35S-LEC2, інокулюють з одиничних колоній із свіжих планшетів та вирощують в 10 мл середовища Лурія-Бертані з відповідними антибіотиками протягом ночі при 28° С і збовтуванні із швидкістю 150 об/хв. Бактеріальні клітини збирають центрифугуванням із швидкістю 4000 об/хв протягом 5 хвилин, промивають середовищами MS, що містять 2 % сахарози, ресуспендують в 10 мл такого ж середовища і вирощують з антибіотиками для селекції у відповідних умовах протягом 4 годин після додавання ацетосирингону до концентрації 100 мкМ. За 2 години до додавання рослинних тканин, додають спермідин до кінцевої концентрації 1,5 мМ, і кінцеву щільність бактерій доводять до OD 600 нм = 0,4 за допомогою свіжого середовища. Дві культури бактерій, одна з яких несе специфічну для насіння конструкцію, а інша несе 35S-AtLEC2, змішують у співвідношеннях від 1:1 до 1:1,5.

Свіжовиділені сім'ядольні черешки B. napus інфікують 20 мл культур A. tumefaciens протягом 6 хвилин. Сім'ядольні черешки промокають стерильним фільтрувальним папером для видалення надлишку A. tumefaciens, і далі переносять в середовища для співкультивування (середовища MS, що містять 1 мг/л тідіазурону (ТДЗ), 0,1 мг/л α-нафталіноцтової кислоти (НОК), 100 мкМ ацетосирингону з додаванням L-цистеїну (50 мг/л), аскорбінової кислоти (15 мг/л) і морфоліноетанолсульфонової кислоти (МЕС, 250 мг/л)). Планшети герметизують мікропористою стрічкою та інкубують в темряві при 24°С протягом 48 годин. Співкультивовані експланти переносять у передселекційні середовища (MS, що містять 1 мг/л ТДЗ, 0,1 мг/л НОК, 3 мг/л $AgNO_3$, 250 мг/л цефотаксиму і 50 мг/л тиментину) і культивують протягом 4–5 днів при температурі 24° С з фотоперіодом 16 годин/8 годин. В подальшому експланти переносять на селекційні середовища (MS, що містять 1 мг/л ТДЗ, 0,1 мг/л НОК, 3 мг/л $AgNO_3$, 250 мг/л цефотаксиму і 50 мг/л тиментину), що відповідають гену селекційного маркера на специфічному для насіння векторі, і культивують протягом 2–3 тижнів при 24°С з фотоперіодом 16 годин/8 годин. Експланти із зеленим ембріогенним калюсом переносять в середовища MS, що не містять гормонів (MS, що містять 3 мг/л $AgNO_3$, 250 мг/л цефотаксиму, 50 мг/л тиментину і селекційний агент), і культивують ще протягом 2–3 тижнів. Торпедоподібні ембріони або ембріони сім'ядольної стадії, виділені з експлантів, що вижили на селекційному середовищі, аналізують щодо складу жирних кислот в загальному ліпіді методом ГХ.

Приклад 2. Стабільна експресія трансгенних біохімічних шляхів ДГК в насінні Arabidopsis thaliana

Конструкція бінарного вектора

Бінарні вектори pJP3416-GA7 і pJP3404, кожен з яких містить 7 гетерологічних генів біосинтезу жирних кислот, кодуючих 5 десатураз і 2 елонгази, та селекційний маркер для рослин між повторами лівої і правої меж Т-ДНК, присутніми в кожному векторі (Фіг. 2 і 3). У SEQ ID NO: 1 розкрита нуклеотидна послідовність ділянки Т-ДНК pJP3416-GA7 від правої до лівої граничних послідовностей. Обидві генетичні конструкції містять рослинні кодон-оптимізовані гени, що кодують Δ12-десатуразу Lachancea kluyveri (містить нуклеотиди 14143–16648 із SEQ ID NO: 1), ω3-десатуразу Pichia pastoris (містить нуклеотиди 7654–10156 із SEQ ID NO: 1), Δ6-десатуразу Micromonas pusilla (містить нуклеотиди 226–2309 із SEQ ID NO: 1), Δ5- і Δ4-десатурази Pavlova salina (містять нуклеотиди 4524–6485 і 10157–14142 із SEQ ID NO: 1, відповідно) і Δ6- і Δ5-елонгази Pyramimonas cordata (містить нуклеотиди 2310–4523 і 17825–19967 із SEQ ID NO: 1, відповідно). Конкретні ділянки Т-ДНК (орієнтація: від правої до лівої граничної послідовності) бінарного вектора pJP3416-GA7 щодо SEQ ID NO: 1 є наступними:

нуклеотиди 1–163: права межа; 480–226, термінатор нопалінсинтази Agrobacterium tumefaciens (TER_NOS); 1883–489, Δ6-десатураза Micromonas pusilla; 2309–1952, вкорочений промотор напіну Brassica napus (PRO_FP1); 2310–3243, промотор FAE1 Arabidopsis thaliana (PRO_FAE1); 3312–4181, Δ6-елонгаза Pyramimonas cordata; 4190–4523, термінатор лектину Glycine max (TER_Lectin); 4524–4881, PRO_FP1; 4950–6230: Δ5-десатураза Pavlova salina; 6231–6485: TER_NOS; 7653–6486, ділянка прикріплення до матриксу Rb7 Nicotiana tabacum (ДПМ); 8387–7654, термінатор конлініну 1 Linum usitatissimum (TER_Cnl1); 9638-8388, ω3-десатураза Pichia pastoris; 10156–9707, промотор конлініну 1 Linum usitatissimum (PRO_Cnl1); 10157–12189, промотор конлініну 1 Linum usitatissimum; 12258–13604, Δ4-десатураза Pavlova salina; 13605–14142, термінатор конлініну 2 Linum usitatissimum; 14143–14592, PRO_Cnl1; 14661–15914, Δ12-десатураза Lachancea kluyveri; 15915–16648, TER_Cnl1; 17816–16649, ДПМ; 17825–18758, PRO_FAE1; 18827–19633, Δ5-елонгаза Pyramimonas cordata; 19634–19967, TER_Lectin; 19990–20527, промотор вірусу мозаїки цвітної капусти 35S з подвоєною ділянкою енхансера; 20537–21088, гени фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази Streptomyces viridochromo; 21097-21349, TER_NOS; 21367-21527, ліва межа.

Кожна із 7 кодуючих ділянок в конструкціях знаходиться під контролем специфічного для насіння промотору, причому використовуються три різних промотори, а саме вкорочений промотор напіну Brassica napus (pBnFP1), промотор Arabidopsis thaliana FAE1 (pAtFAE1) і промотор конлініну 1 Linum usitatissimum (pLuCnl1). Сім генів біосинтезу жирних кислот спільно кодують повний біохімічний шлях синтезу ДГК, сконструйований з метою перетворення $18{:}1^{\Delta 9}$ (олеїнова кислота) на $22{:}6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (ДГК). Обидва бінарні вектори містять селекційний маркер для рослин BAR, кодуючий ділянку, функціонально пов'язану з промотором вірусу мозаїки цвітної капусти 35S (CaMV), що містить подвоєну ділянку енхансера, а також з термінатором транскрипції-ділянкою поліаденілювання nos3' A. tumefaciens. Селекційний маркер для рослин розташований суміжно з лівою межею Т-ДНК, тобто, дистально на Т-ДНК відносно орієнтації перенесення Т-ДНК в клітини рослини. Це підвищує вірогідність того, що часткове перенесення Т-ДНК, яке, ймовірно, не включає ген селекційного маркера, не пройде селекцію. Кожний з pJP3416-GA7 і pJP3404 містить джерело реплікації RiA4 з Agrobacterium rhizogenes (Hamilton, 1997).

pJP3416-GA7 генерують шляхом синтезу ділянки ДНК, що відповідає нуклеотидам 226–19975 SEQ ID NO: 1 (ділянка GA7) і вставки даної ділянки в бінарний вектор-реципієнт pJP3416 на сайті PspOMI. Кожен ген біосинтезу жирних кислот на GA7 містить послідовність 5' нетрансльованої ділянки (5'UTR) вірусу мозаїки тютюну, функціонально пов'язану з кожною кодуючою ділянкою, між промотором і кодоном ініціації трансляції ATG, з метою максимізації ефективності трансляції мРНК, одержаних з генів. Конструкція GA7 також містить дві послідовності ділянки прикріплення до матриксу Rb7 (ДПМ) Nicotiana tabacum, як описано Hall et al. (1991). Послідовності ДПМ, які іноді називають ядерними ділянками прикріплення, відомі як такі, що специфічно зв'язуються з ядерним матриксом in vitro і можуть опосередкувати зв'язування хроматину з ядерним матриксом in vivo. Вважається, що ДПМ зменшують сайленсинг трансгена. У pJP3416-GA7 ДПМ також вставлені і розташовані в межах ділянки Т-ДНК для того, щоб вони виконували функцію розпірок ДНК, з метою ізоляції трансгенних касет експресії. Вектор pJP3416 перед вставкою ділянки GA7 містить тільки касету селекційного маркера для рослин між межами.

Генетичну конструкцію pJP3404 одержують послідовною вставкою, що базується на рестрикційних ферментах, в ході якої касети генів додають до бінарного вектора, pJP3367, який містить гени для продукування СДК у насінні. Дана конструкція містить гени, що кодують Δ12-десатуразу L. kluyveri і ω3-десатуразу P. pastoris, причому обидва експресуються вкороченим

промотором напіну B. napus (FP1), і Δ6-десатуразу M. pusilla, експресовану промотором FAE1 A. thaliana (Фіг. 4). Спочатку, інтрон FAD2 A. thaliana фланкують сайтами EcoRI і клонують в сайт MfeI pJP3367 з одержанням pJP3395. Фрагмент, що містить касети Δ6- і Δ5-елонгази P. cordata під контролем промоторів FAE1 і FP1, відповідно, клонують в сайт KasI pJP3395 з одержанням pJP3398. Далі одержують pJP3399 шляхом заміни джерела реплікації RK2 в pJP3398 джерелом реплікації RiA4. Кінцевий бінарний вектор pJP3404 одержують шляхом клонування SbfI-фланкованого фрагмента, що містить касети Δ5- і Δ4-десатурази P. salina під контролем промоторів FP1 і FAE1, відповідно, у сайт SbfI pJP3399.

Трансформація A. thaliana і аналіз складу жирних кислот

Химерні вектори вводять в A. tumefaciens, штам AGL1, і клітини з культур трансформованої Agrobacterium використовують для обробки. рослин A. thaliana (екотипи Columbia і мутант fad2), застосовуючи для трансформації спосіб занурення квіток (Clough and Bent, 1998). Після дозрівання врожай зерен T_1 з оброблених рослин збирають і наносять на планшети MS, що містять фосфінотрицин (ФФТ), з метою селекції рослин, що містять ген селекційного маркера BAR. Саджанці T_1, що вижили і є здоровими, переносять в грунт. Після вирощування рослин до стану зрілості і надання їм можливості для самозапліднення, збирають урожай зерен T_2 з одержаних рослин, і склад жирних кислот у ліпіді їх насіння аналізують за методом ГХ, як розкрито у Прикладі 1.

Дані щодо рівня ДГК в ліпідах насіння проілюстровані на Фіг. 5 (вузькі доріжки з відміткою T_2) для 13 трансформантів з pJP3416-GA7, введеним в генетичний фон Columbia, і для 6 трансформантів з використанням мутанта fad2. Конструкція pJP3416-GA7 приводить до продукування дещо вищих рівнів ДГК, виражених як відсоток від загального вмісту жирних кислот, в середньому щодо конструкції pJP3404. У Табл. 4 наведений склад жирних кислот в загальному ліпіді насіння ліній T_2 з найвищими рівнями ДГК. Обчислена ефективність перетворення для кожної стадії ферментації в продукуванні ДГК з олеїнової кислоти в тому ж насінні наведена в Табл. 5. Ефективність перетворення обчислена як (% продуктів x 100)/(% субстрату, що залишився + % продуктів), і таким чином виражена у відсотках.

Найвищий спостережуваний рівень продукування ДГК в трансформованих pJP3416-GA7 лініях T_2 становить 6,2 %, додатково з 0,5 % ЕПК і 0,2 % ДПК (лінія #14). Вказане насіння T_2 все ще було сегрегованим по трансгену, тобто ще не було однорідно гомозиготним. Компільовані дані з профілів загального ліпіду насіння для незалежного трансгенного насіння (Табл. 4) наведені в Табл. 6. Рівень ω3 жирних кислот, продукованих в результаті наявності трансгенів в цьому насінні (нові загальні ω3 жирні кислоти, за винятком рівня АЛК, яка виробляється ендогенно в екотипі Columbia), становить 10,7 %, тоді як рівень ω6 жирних кислот (нові загальні ω6 жирні кислоти, за винятком $18{:}2^{\Delta 9,12}$) становить 1,5 %. Це представляє надзвичайно сприятливе співвідношення нових ω3 жирних кислот : нових ω6 жирних кислот, а саме 7,3:1.

Насіння T_2 відібраних ліній, трансформованих pJP3416-GA7, а саме ліній, позначених 7, 10, 14, 22 і 34 в екотипі Columbia, і ліній, позначених 18, 21 і 25 в мутанті екотипі fad2, наносять на планшети із середовищами MS, що містять ФФТ, для селекції трансгенних саджанців in vitro. По 20 ФФТ-резистентних саджанців з кожної лінії переносять в грунт і вирощують до стану зрілості після самозапліднення. Було високою мірою вірогідним, що ці рослини будуть гомозиготними по гену селекційного маркера, і таким чином, містити щонайменше по одній вставці Т-ДНК в геномі рослин. Урожай зерен T_3 з цих рослин збирають і аналізують склад жирних кислот в олії з насіння за методом ГХ. Дані наведені в Табл. 7. Даний аналіз виявив, що конструкції pJP3416-GA7 генерують вищі рівні ω3 ДЛ-ПНЖК ДГК в насінні T_3 гомозиготних рослин, ніж в сегрегованому насінні T_2. До приблизно 13,9 % ДГК спостерігається в трансформованій pJP3416-GA7 лінії T_3, позначеній 22.2 в екотипі Columbia, що означає збільшення з рівня приблизно 5,5 % в гемізиготному насінні T_2, причому сумарний рівень нових ω3 жирних кислот становить приблизно 24,3 % від вмісту загальних жирних кислот в ліпіді насіння. Рівень нових ω6 жирних кислот становить 1,1 % від загальних жирних кислот, представляючи високою мірою сприятливе співвідношення нових ω3 жирних кислот : нових ω6 жирних кислот, а саме, приблизно 22:1. Так само, трансформанти в екотипі fad2 дають сумарну кількість нових ω3 жирних кислот 20,6 %, включаючи 11,5 % ДГК, як відсоток від загального вмісту жирних кислот в ліпіді насіння.

Таблиця 4

Склад жирних кислот загальних ліпідів насіння незалежного трансгенного насіння T_2 Arabidopsis з рівнями ДГК на верхній межі спостережуваного інтервалу. "Col" позначає екотип Columbia, і "FAD2" позначає мутантний екотип fad2. "GA7" позначає трансформацію за допомогою Т-ДНК з вектора pJP3416-GA7, pJP3404 - за допомогою Т-ДНК з вектора pJP3404. Жирні кислоти 20:1n-9 і 20:1n-11 не розділяли в ході аналізу ГХ. "Інші незначні" жирні кислоти включають 14:0, 16:1n7, 16:1n9, 16:1n13t, 16:2n6, 16:3n3, i18:0, 18:1n5, 20:1n5, 22:0, 22:1n7, 22:1n11/n13, 24:0, 24:1n9.

	pJP3404_Col_#1	pJP3404_FAD2_#31	GA7_Col_#7	GA7_Col_#34	GA7_Col_#2	GA7_Col_#10	GA7_Col_#22	GA7_Col_#14	GA7_FAD2_#25	GA7_FAD2_#21	GA7_FAD2_#18
16:0	9,6	7,8	8,7	8,2	8,7	8,6	8,3	9,7	7,2	8,5	7,5
18:0	2,9	3,9	3,7	3,9	3,6	3,3	3,4	3,6	3,2	3,9	3,0
18:1d11	2,2	1,8	2,0	1,9	2,0	2,3	2,3	2,7	1,9	2,0	1,8
20:0	1,6	2,3	2,0	2,0	2,1	1,6	1,6	1,8	1,6	2,2	1,5
20:1d13	2,2	1,8	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5	1,7	1,5	1,7	1,4
20:1d9/d11	13,0	15,9	16,1	16,1	16,3	15,0	13,9	13,5	18,3	15,9	17,0
22:1d13	1,1	1,2	1,1	1,1	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,3	1,2
Інші незначні	1,9	1,5	1,5	1,4	1,5	1,3	1,6	1,7	1,6	1,4	1,6
18:1d9	10,8	14,0	10,6	10,6	10,1	11,1	10,0	7,7	26,0	8,2	20,9
18:2ω6	28,9	28,3	16,4	16,1	18,2	13,7	13,7	11,4	6,6	16,6	4,3
18:3ω3	16,6	14,9	29,6	29,6	27,5	32,4	30,4	32,8	21,9	27,7	30,1
18:3ω6	0,7	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
20:2ω6	1,6	1,5	1,1	1,2	1,3	1,0	1,0	1,0	0,4	1,4	0,4
20:3ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:4ω6	1,6	0,6	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4
22:5ω6	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:4ω3	1,0	0,5	1,2	1,1	1,1	1,5	2,7	2,7	1,9	1,8	1,7
20:3ω3	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,6	0,7	0,0	0,8	0,6
20:4ω3	0,4	0,6	0,6	0,7	0,5	0,8	0,8	0,4	1,0	0,8	0,8
20:5ω3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,7	0,5	0,6	0,4	0,5
22:5ω3	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
22:6ω3	3,6	2,4	3,0	3,1	3,3	3,9	5,5	6,2	4,3	4,4	4,8

Таблиця 5

Ефективність перетворення для окремих ферментних стадій в процесі одержання ДГК з олеїнової кислоти, що спостерігалася в загальних ліпідах насіння незалежного трансгенного насіння, наведеного в Табл. 4.

		pJP3404_Col_#1	pJP3404_FAD2_#31	GA7_Col_#7	GA7_Col_#34	GA7_Col_#2	GA7_Col_#10	GA7_Col_#22	GA7_Col_#14	GA7_FAD2_#25	GA7_FAD2_#21	GA7_FAD2_#18
	d12-дес	69,6 %	62,5 %	66,4 %	66,6 %	66,7 %	67,5 %	70,2 %	72,7 %	45,9 %	69,5 %	53,7 %
	d15-дес	39,8 %	37,8 %	66,1 %	66,8 %	62,3 %	72,1 %	72,7 %	77,2 %	79,7 %	66,0 %	88,1 %
Омега-6	d6-дес	4,5 %	2,5 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,9 %	1,3 %	1,0 %	1,6 %	1,1 %	1,1 %
	(d9-ело)	3,1 %	3,1 %	2,2 %	2,3 %	2,4 %	1,8 %	1,8 %	1,7 %	1,2 %	2,7 %	0,9 %
	d6-ело	71,4 %	56,9 %	83,3 %	83,4 %	83,0 %	84,7 %	70,3 %	74,5 %	85,5 %	66,1 %	88,0 %
	d5-дес	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	d5-ело	100,0 %	97,8 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	d4-дес	6,2 %	13,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Омега 3	d6-дес	23,9 %	21,0 %	15,2 %	15,4 %	16,4 %	17,1 %	24,7 %	23,6 %	27,1 %	21,9 %	21,0 %
	(d9-эло)	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,8 %	0,0 %	0,0 %	2,0 %	2,2 %	0,0 %	2,6 %	2,1 %

Таблиця 5

Ефективність перетворення для окремих ферментних стадій в процесі одержання ДГК з олеїнової кислоти, що спостерігалася в загальних ліпідах насіння незалежного трансгенного насіння, наведеного в Табл. 4.

		pJP3404_Col_#1	pJP3404_FAD2_#31	GA7_Col_#7	GA7_Col_#34	GA7_Col_#2	GA7_Col_#10	GA7_Col_#22	GA7_Col_#14	GA7_FAD2_#25	GA7_FAD2_#21	GA7_FAD2_#18
	d6-ело	80,6 %	86,6 %	77,7 %	79,6 %	79,4 %	77,5 %	72,7 %	73,0 %	76,7 %	77,4 %	79,2 %
	d5-дес	93,7 %	92,1 %	91,7 %	91,4 %	91,5 %	92,6 %	89,6 %	92,4 %	88,0 %	91,8 %	91,0 %
	d5-ело	93,7 %	92,1 %	91,7 %	91,4 %	91,5 %	92,6 %	89,6 %	92,4 %	88,0 %	91,8 %	91,0 %
	d4-дес	100,0 %	90,6 %	94,8 %	94,0 %	95,3 %	94,4 %	95,8 %	96,9 %	93,1 %	92,9 %	94,2 %

Таблиця 6

Компільовані дані з профілів загального ліпіду насіння для незалежного трансгенного насіння, наведеного в Табл. 2. Обчислення не включають "незначні жирні кислоти" в Табл. 4.

Параметр	pJP3404_Col_#1	pJP3404_FAD2_#31	GA7_Col_#7	GA7_Col_#34	GA7_Col_#2	GA7_Col_#10	GA7_Col_#22	GA7_Col_#14	GA7_FAD2_#25	GA7_FAD2_#21	GA7_FAD2_#18
Загальні w3 (% від загальних ЖК)	21,8	18,8	34,9	35,6	32,9	39,1	40,9	43,5	30,0	36,2	38,8
Загальні w6 (% від загальних ЖК)	32,9	31,0	17,9	17,7	19,9	1,52	15,4	12,9	7,6	18,6	5,2
Співвідношеня w3/w6	0,66	0,61	1,95	2,01	1,65	2,57	2,66	3,37	3,95	1,95	7,46
Співвідношеня w6/w3	1,51	1,65	0,51	0,50	0,60	0,39	0,38	0,30	0,25	0,51	0,13
Загальні нові w3 (% від загальних ЖК)	5,2	3,9	5,3	6,0	5,4	6,7	10,5	10,7	8,1	8,5	8,7
Загальні нові w6 (% від загальних ЖК)	4,0	2,7	1,5	1,6	1,7	1,5	1,7	1,5	1,0	2,0	0,9
Співвідношеня нових w3/w6	1,30	1,44	3,53	3,75	3,18	4,47	6,18	7,13	8,10	4,25	9,67
Співвідношеня нових w6/w3	0,77	0,69	0,28	0,27	0,31	0,22	0,16	0,14	0,12	0,24	0,10
Ефективність перетворення ОК на ЕПК	4,8 %	3,5 %	4,3 %	4,4 %	4,7 %	5,4 %	7,9 %	8,8 %	6,3 %	6,4 %	6,7 %
Ефективність перетворення ОК на ДГК	4,5 %	3,0 %	3,7 %	3,8 %	4,1 %	4,8 %	6,8 %	7,9 %	5,2 %	5,5 %	5,8 %
Ефективність перетворення ЛК на ЕПК	6,9 %	5,6 %	6,6 %	6,8 %	7,2 %	8,1 %	11,4 %	12,2 %	13,8 %	9,3 %	12,7 %
Ефективність перетворення ЛК на ДГК	6,6 %	4,8 %	5,7 %	5,8 %	6,3 %	7,2 %	9,8 %	11,0 %	11,4 %	8,0 %	10,9 %
Ефективність перетворення АЛК на ЕПК	17,4 %	14,9 %	10,0 %	10,1 %	11,6 %	11,3 %	15,6 %	15,9 %	17,3 %	14,1 %	14,4 %
Ефективність перетворення АЛК на ДГК	16,5 %	12,8 %	8,6 %	8,7 %	10,0 %	10,0 %	13,4 %	14,3 %	14,3 %	12,2 %	12,4 %
Загальні насичені жирні кислоти	14,1	14,0	14,4	14,1	14,4	13,5	13,3	15,1	12,0	14,6	12,0
Загальні мононенасичені жирні кислоти	29,3	34,7	31,4	31,2	31,4	31,0	28,7	26,6	48,7	29,1	42,3
Загальні поліненасичені жирні кислоти	54,7	49,8	52,8	53,3	52,8	54,3	56,3	56,4	37,6	54,8	44,0
Загальні C20	17,4	20	19,7	20,4	20,1	18,7	18,5	17,8	21,8	21	20,7
Загальні C22	6,4	4,5	4,6	4,7	5,1	5,5	7,2	7,8	6,1	6,4	6,7
Співвідношення загальні C20/C22	2,72	4,44	4,28	4,34	3,94	3,40	2,57	2,28	3,57	3,28	3,09

Таблиця 7

Склад жирних кислот загального ліпіду насіння для незалежного трансгенного насіння нащадків T_3 і T_4 Arabidopsis, одержаних з ліній рослин, наведених в Табл. 3. Помилка, вказана в поколінні T_4, позначає стандартне відхилення (SD) для n=10.

	GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2_25.10	GA7_FAD2_21.2	GA7_FAD2_18.14	T_4 Col_22.2 (середнє значення ± стандартне відхилення)	T_4 Col_22.2 (краща лінія)
16:0	9,8	9,0	9,5	11,2	10,4	8,1	10,7	7,7	10,6 ± 0,9	12,2
18:0	4,0	3,8	4,2	3,4	3,5	3,5	3,8	3,3	3,5 ± 0,4	3,6
18:1n7	2,0	1,9	2,2	2,9	2,5	1,7	2,2	1,6	2,3 ± 0,2	2,6
20:0	2,2	1,9	1,7	1,4	2,3	1,8	2,0	1,9	1,9 ± 0,3	2,0
20:1d13	1,4	1,3	1,2	1,6	2,5	1,2	1,4	1,3	1,6 ± 0,2	1,9
20:1d9/11	13,6	14,7	12,4	9,5	13,0	15,7	12,4	18,4	11,7 ± 1,7	9,5
22:1d13	1,2	1,2	0,8	0,6	1,6	1,0	1,1	1,5	0,9 ± 0,1	0,8
Інші незначні	1,8	1,5	1,5	2,1	2,6	1,7	1,9	1,6	1,9 ± 0,1	2,3
18:1d9	5,5	6,7	6,8	4,6	6,9	11,3	4,2	11,5	4,6 ± 1,0	3,3
18:2ω6	7,5	7,9	7,4	5,6	14,8	5,8	8,9	5,6	5,3 ± 0,9	4,3
18:3ω3	33,7	33,7	36,1	31,5	26,1	28,3	28,9	30,8	31,0 ± 1,1	29,5
18:3ω6	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,3	0,6	0,1	0,4 ± 0,1	0,4
20:2ω6	1,0	1,0	0,7	0,7	1,4	0,6	1,2	0,6	0,9 ± 0,1	0,9
20:3ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
20:4ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
22:4ω6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1 ± 0,0	0,1
22:5ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
18:4ω3	3,1	2,6	3,0	5,3	3,3	3,7	5,2	2,6	4,8 ± 0,9	5,5
20:3ω3	1,4	1,3	1,2	1,3	1,2	1,1	1,3	1,3	1,5 ± 0,2	1,7
20:4ω3	0,7	0,6	0,6	0,9	0,2	1,7	0,9	0,9	0,8 ± 0,2	0,8
20:5ω3	0,9	0,9	0,7	1,9	0,8	1,2	1,0	0,8	1,5 ± 0,3	1,8
22:5ω3	0,7	0,6	0,6	1,0	0,4	0,8	0,6	0,5	1,1 ± 0,2	1,5
22:6ω3	9,5	9,2	9,4	13,9	6,6	10,3	11,5	7,9	13,3 ± 1,6	15,1

Ефективність ферментного перетворення для кожної ферментної стадії в біохімічному шляху одержання ДГК з олеїнової кислоти наведена в Табл. 8 для насіння T_3 з вищими рівнями ДГК. Ефективність перетворення під дією Δ12-десатурази в насінні лінії 22.2 становила 81,6 %, і ефективність ω3-десатурази становила 89,1 %, причому обидва значення є досить високими і вказують на те, що дані грибкові (дріжджові) ферменти можуть добре функціонувати в насінні, що розвивається. Активність інших екзогенних ферментів в дорозі ДГК була подібним чином високою по відношенню до субстратів ω3, причому ефективність Δ6-десатурази становить 42,2 %, Δ6-елонгази - 76,8 %, Δ5-десатурази - 95,0 %, Δ5-елонгази - 88,7 % і Δ4-десатурази - 93,3 %. Активність Δ6-десатурази по відношенню до субстрату ω6 ЛК є набагато нижчою, і ефективність перетворення ЛК під дією Δ6-десатурази становить тільки 0,7 %. ГЛК присутній на рівні всього 0,4 % і являє собою єдиний новий продукт ω6, за винятком 20:2ω6, знайденої в насінні T_3 з найвищим вмістом ДГК. Компільовані дані з профілів загального ліпіду насіння для незалежного трансгенного насіння (Табл. 7) наведені в Табл. 9. Такі дані для лінії з найвищим рівнем ДГК включають співвідношення загального вмісту ω6 ФК (зокрема, ЛК) до загального вмісту ω3 ФК (зокрема, АЛК), що дорівнює 0,10. Співвідношення нових ω6 ФК (за винятком ЛК) і нових ω3 ФК (за винятком АЛК) в ліпіді даної лінії становило 0,05. Рівні загальних поліненасичених жирних кислот становлять більше 50 % в даних лініях, і перевищують 60 % щонайменше в 4 лініях. Загальна ефективність перетворення обчислена як: ОК на ЕПК = 21,8 %, ОК на ДГК = 18,0 %, ЛК на ЕПК = 26,9 %, ЛК на ДГК = 22,2 %, АЛК на ЕПК = 30,1 %, АЛК на ДГК = 24,9 %.

Таблиця 8

Ефективність перетворення для окремих ферментних стадій одержання ДГК з олеїнової кислоти, що спостерігалася в загальних ліпідах насіння для трансгенного насіння T_3 Arabidopsis, наведеного в Табл. 7.

		GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2_25.10	GA7_FAD2_21.2	GA7_FAD2_18.14	T_4 Col_22.2 (середнє значення +/- стандартне відхилення)	T_4 Col_22.2 (найкраща лінія)
	d12-дес	75,4 %	73,1 %	75,7 %	81,6 %	73,4 %	66,6 %	78,5 %	63,1 %	67,6 %	82,7 %
	d15-дес	85,3 %	84,4 %	86,2 %	89,1 %	70,2 %	87,5 %	82,2 %	87,6 %	81,0 %	90,9 %
Омега-6	d6-дес	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,7 %	0,3 %	0,6 %	1,0 %	0,2 %	1,3 %	0,7 %
	(d9-ело)	1,7 %	1,7 %	1,2 %	1,2 %	2,6 %	1,1 %	2,0 %	1,3 %	1,6 %	1,5 %
	d6-ело										
	d5-дес										
	d5-ело										
	d4-дес										
Омега 3	d6-дес	30,7 %	29,3 %	28,2 %	42,2 %	30,2 %	38,5 %	40,0 %	29,2 %	41,0 %	45,7 %
	(d9-ело)	2,7 %	2,7 %	2,3 %	2,4 %	3,0 %	2,3 %	2,7 %	2,9 %	2,8 %	3,1 %
	d6-ело	79,0 %	81,1 %	79,0 %	76,8 %	70,9 %	79,2 %	73,2 %	79,1 %	77,5 %	77,7 %
	d5-дес	94,0 %	94,6 %	94,5 %	95,0 %	97,9 %	87,8 %	93,3 %	91,1 %	95,0 %	95,8 %
	d5-ело	91,9 %	91,7 %	93,6 %	88,7 %	89,5 %	89,9 %	92,2 %	91,6 %	90,8 %	90,2 %
	d4-дес	93,2 %	93,7 %	94,4 %	93,3 %	93,7 %	92,5 %	95,0 %	93,9 %	92,2 %	90,9 %

Таблиця 9

Компільовані дані з профілів загальних ліпідів насіння для незалежного трансгенного насіння, наведеного в Табл. 5. Обчислення не включають "незначні жирні кислоти", як в Табл. 7.

Параметр	GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2_25.10	GA7_FAD2_21.2	GA7_FAD2_18.14	T_4 Col_22.2 (середнє значення ± стандартне відхилення)	T_4 Col_22.2 (найкраща лінія)
Загальні w3 (% від загальних ЖК)	50,0	48,9	51,6	55,8	38,6	47,1	49,4	44,8	54,0	55,9
Загальні w6 (% від загальних ЖК)	8,7	9,1	8,3	6,7	16,3	6,7	10,7	6,3	6,7	5,7
Співвідношення w3/w6	5,75	5,37	6,22	8,33	2,37	7,03	4,62	7,11	806	9,81
Співвідношення w6/w3	0,17	0,19	0,16	0,12	0,42	0,14	0,22	0,14	0,12	0,10
Загальні нові w3 (% від загальних ЖК)	16,3	15,2	15,5	24,3	12,5	18,8	20,5	14,0	23,0	26,4

Таблиця 9

Компільовані дані з профілів загальних ліпідів насіння для незалежного трансгенного насіння, наведеного в Табл. 5. Обчислення не включають "незначні жирні кислоти", як в Табл. 7.

Параметр	GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2_25.10	GA7_FAD2_21.2	GA7_FAD2_18.14	T_4 Col_22.2 (середнє значення ± стандартне відхилення)	T_4 Col_22.2 (найкраща лінія)
Загальні нові w6 (% від загальних ЖК)	1,2	1,2	0,9	1,1	1,5	0,9	1,8	0,7	1,4	1,4
Співвідношення нових w3/w6	13,58	12,67	17.22	22,09	8,33	20,89	11,39	20,00	16,43	18,86
Співвідношення нових w6/w3	0,07	0,08	0,06	0,05	0,12	0,05	0,09	0,05	0,06	0,05
Ефективність перетворення ОК на ЕПК	14,1 %	13,3 %	13,4 %	21,8 %	10,2 %	15,0 %	16,8 %	11,2 %	20,4 %	24,5 %
Ефективність перетворення ОК на ДГК	12,0 %	11,4 %	11,8 %	18,0 %	8,6 %	12,6 %	14,8 %	9,6 %	17,1 %	20,1 %
Ефективність перетворення ЛК на ЕПК	18,9 %	18,4 %	17,9 %	26,9 %	14,2 %	22,9 %	21,8 %	18,0 %	26,2 %	29,9 %
Ефективність перетворення ЛК на ДГК	16,2 %	15,9 %	15,7 %	22,2 %	12,0 %	19,1 %	19,1 %	15,5 %	21,9 %	24,5 %
Ефективність перетворення АЛК на ЕПК	22,2 %	21,9 %	20,7 %	30,1 %	20,2 %	26,1 %	26,5 %	20,5 %	29,4 %	32,9 %
Ефективність перетворення АЛК на ДГК	19,0 %	18,8 %	18,2 %	24,9 %	17,1 %	21,9 %	23,3 %	17,6 %	24,6 %	27,0 %
Загальні насичені жирні кислоти	16,0	14,7	15,4	16,0	16,2	13,4	16,5	12,9	16,0	17,8
Загальні мононенасичені жирні кислоти	23,7	25,8	23,4	19,2	26,5	30,9	21,3	34,3	21,1	18,1
Загальні поліненасичені жирні кислоти	58,7	58,0	59,9	62,5	54,9	53,8	60,1	51,1	60,7	61,6
Загальні C20	19	19,8	16,8	15,9	19,1	21,5	18,2	23,3	18	16,6
Загальні C22	11,4	11	10,8	15,5	8,6	12,1	13,2	9,9	15,4	17,5
Співвідношення C20/C22	1,67	1,80	1,56	1,03	2,22	1,78	1,38	2,35	1,17	0,95

Насіння T_3 лінії pJP3416-GA7 22.2 в екотипі Columbia, що є нащадками лінії T_2 22, висівають безпосередньо в грунт, і склад жирних кислот в зрілому насінні одержаних в результаті рослин T_3 аналізують за методом ГХ. Середній рівень ДГК в цьому насінні становить 13,3 % ± 1,6 (n = 10) як відсоток від загальних жирних кислот в ліпіді насіння. Як проілюстровано в Табл. 6 (права колонка), лінія з найвищим рівнем ДГК містить 15,1 % ДГК від загального вмісту жирних кислот в ліпіді насіння. Ферментна ефективність перетворення наведена в Табл. 8 для кожної стадії одержання ДГК з олеїнової кислоти.

Співвідношення загального вмісту ω6 ФК (зокрема, ЛК) до загального вмісту ω3 ФК (зокрема, АЛК) в лінії з найвищим рівнем ДГК становило 0,102. Співвідношення нових ω6 ФК (за винятком ЛК) і нових ω3 ФК (за винятком АЛК) в лінії з найвищим рівнем ДГК становило 0,053. Рівень загальних насичених жирних кислот становив приблизно 17,8 %, і рівень загальних мононенасичених жирних кислот становив близько 18,1 %. Рівень загальних ω6-жирних кислот становив близько 5,7 %, і рівень ω3-жирних кислот становив близько 55,9 %. Обчислена загальна ефективність перетворення становила: ОК на ЕПК = 24,5 %, ОК на ДГК = 20,1 %, ЛК на ЕПК = 29,9 %, ЛК на ДГК = 24,5 %, АЛК на ЕПК = 32,9 %, АЛК на ДГК = 27,0 %. Знайдено, що загальні омега-3 жирні кислоти акумулюються на рівні 55,9 % від загальних жирних кислот, тоді як омега-6 жирні кислоти складають 5,7 % від загального профілю.

Здійснюють аналіз гібридизації методом саузерн-блоту. Результати показують, що лінії з високим рівнем акумуляція ДГК містять одинарну або подвійну копію Т-ДНК з конструкції pJP3416-GA7, за винятком трансгенної лінії Columbia #22, що містить три вставки Т-ДНК в геномі рослини Arabidopsis. Насіння покоління Т5 також проаналізоване, і знайдено вміст до 13,6 % ДГК в загальних ліпідах насіння. Конструкція GA7 продемонструвала стабільність протягом декількох поколінь з точки зору здатності до утворення ДГК.

Визначення вмісту олії в трансгенних лініях A. thaliana ДГК

Вміст олії в трансгенному насінні A. thaliana з різними рівнями ДГК визначають за методом ГХ, як розкрито в Прикладі 1. Дані проілюстровані на Фіг. 6, на якій наведений графік вмісту олії (% олії від маси насіння) проти вмісту ДГК (як відсотка від загальних жирних кислот). Знайдено до 26,5 мг ДГК на грам насіння (Табл. 10). Знайдено, що вміст олії в трансгенному насінні Arabidopsis негативно корелює з вмістом ДГК. Кількість ДГК на масу насіння була великою в трансформованому насінні, з рівнем ДГК приблизно 9 % відносно насіння із вмістом ДГК приблизно 14 %. Чи буде це справедливо для іншого насіння, окрім Arabidopsis, встановлено не було.

Таблиця 10

Частка і кількість ДГК в насінні трансформованого GA7 Arabidopsis.

	Вміст ДГК (% від ОЖК)	Вміст олії (% олії на грам насіння)	Вміст ДГК за масою (мг/г насіння)
GA7/col 22.2-1	14,2	14,89	20,2
GA7/col 22.2-2	14,3	15,02	20,5
GA7/col 22.2-3	14,0	15,92	21,2
GA7/col 10.15-1	8,7	30,23	25,06
GA7/col 10.15-2	8,6	31,25	25,77
GA7/col 10.15-3	8,8	31,70	26,49

Приклад 3. Стабільна експресія трансгенного шляху ДГК в насінні Camelina sativa

Бінарний вектор pJP3416-GA7, розкритий вище, вводять в штам A. tumefaciens AGL1, і клітини з культури трансформованої Agrobacterium використовують для обробки квітучої рослини C. sativa, із застосуванням способу занурення квіток для трансформації (Lu and Kang, 2008). Після вирощування і дозрівання рослин, урожай насіння T_1 з оброблених рослин збирають, висівають в грунт, і одержані в результаті рослини обробляють шляхом обприскування гербіцидом BASTA для селекції трансгенних рослин, що експресують ген селекційного маркера bar на Т-ДНК pJP3416-GA7. Рослини T_1, що вижили і є толерантними до гербіциду, вирощують до стану зрілості після того, як їм дають можливість самозапліднення, і збирають урожай насіння T_2, що утворилося. П'ять трансгенних рослин були одержані, тільки три з них містили повну Т-ДНК.

Ліпід екстрагують з пулу приблизно 20 насінин кожної з трьох рослин, що містили повну Т-ДНК. Два з об'єднаних в пул зразків містили дуже низькі, ледве знайдені рівні ДГК, але третій пул зразків містив приблизно 4,7 % ДГК (Табл. 12). Таким чином, ліпід був витягнутий із 10 індивідуальних насінин T_2 даної рослини, і склад жирних кислот проаналізований методом ГХ. Дані щодо складу жирних кислот індивідуального насіння для даної трансформованої лінії також наведені в Табл. 11. Компільовані дані з профілів (Табл. 11) загального ліпіду насіння наведені в Табл. 12.

Таблиця 11

Склад жирних кислот загальних ліпідів насіння з трансгенного насіння T_2 Camelina sativa, трансформованих Т-ДНК з pJP3416-GA7. Склад жирних кислот наведений для об'єднаної в пул серії (FD5.46) насіння і для 10 окремих насінин, ранжируваних (зліва направо) від найвищого до найнижчого рівня ДГК.

Жирна кислота	Пул FD5.46	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
14:0	0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
16:0	11,6	12,1	12,3	12,1	13,2	12,3	12,8	11,9	11,4	11,5	11,7
16:1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2
16:3	0,3	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	3,7	3,3	3,2	3,2	3,0	3,1	3,2	3,3	3,1	3,2	3,2
18:1	10,8	8,0	8,0	8,6	8,5	9,4	11,0	10,2	8,3	9,4	8,6
18:1d11	1,7	1,3	1,4	1,4	1,7	1,4	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3
18:2	24,7	18,2	19,5	19,2	18,5	20,1	23,8	32,2	30,3	29,8	31,6
18:3ω3	27,4	26,7	26,6	27,3	28,9	28,2	27,4	28,3	29,2	29,5	28,2
18:3ω6	0,2	1,4	0,3	0,3	0,4	0,2	0,5	0,0	0,5	0,4	0,6
20:0	1,6	1,4	1,3	1,4	1,2	1,4	1,4	1,8	2,1	1,9	2,0
18:4ω3	2,2	6,8	6,4	5,7	7,2	5,7	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:1d11	5,3	4,4	4,6	4,8	3,3	4,1	3,5	4,4	6,1	5,8	5,5
20:1iso	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
20:2ω6	0,8	0,8	0,9	0,8	0,6	0,8	0,7	1,3	1,5	1,4	1,4
20:3ω3	0,6	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6
22:0	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6
20:4ω3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1	1,1	1,1	1,2	1,1	0,5	0,9	0,8	1,6	2,2	1,9	2,0
20:5ω3	0,7	1,3	1,6	1,5	1,6	1,1	1,7	0,0	0,0	0,0	0,1
22:2ω6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,2	0,2
22:4ω6+22:3ω3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,6	0,5	0,5
24:0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,4	0,4	0,4
24:1	0,3	0,4	0,4	0,3	0,0	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
22:5ω3	0,3	1,1	1,2	1,1	1,1	0,9	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
22:6ω3	4,7	9,0	8,5	8,3	8,3	7,1	4,9	0,0	0,0	0,0	0,0

Таблиця 12

Компільовані дані з профілів загального ліпіду насіння для трансгенного насіння, наведеного в Табл. 11. Обчислення не включають "незначних жирних кислот", включених в Табл. 11.

Параметр	Пул FD5.46	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
Загальні w3 (% від загальних ЖК)	36,1	46	45,4	45	48,2	44,2	40,1	28,9	29,9	30,2	28,9
Загальні w6 (% від загальних ЖК)	25,8	20,4	20,7	20,3	19,5	21,1	25	33,7	32,6	31,8	33,8
Співвідношення w3/w6	1,40	2,25	2,19	2,22	2,47	2,09	1,60	0,86	0,92	0,95	0,86
Співвідношення w6/w3	0,71	0,44	0,46	0,45	0,40	0,48	0,62	1,17	1,09	1,05	1,17
Загальні нові w3 (% від загальних ЖК)	8,1	18,5	18	16,9	18,6	15,2	12	0	0	0	0,1

Таблиця 12

Компільовані дані з профілів загального ліпіду насіння для трансгенного насіння, наведеного в Табл. 11. Обчислення не включають "незначних жирних кислот", включених в Табл. 11.

Параметр	Пул FD5.46	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
Загальні нові w6 (% від загальних ЖК)	1,1	2,2	1,2	1,1	1	1	1,2	1,5	2,3	2	2,2
Співвідношення нових w3/w6	7,36	8,41	15,00	15,36	18,60	15,20	10,00				0,05
Співвідношення нових w6/w3	0,14	0,12	0,07	0,07	0,05	0,07	0,10				22,00
Ефективність перетворення ОК на ЕПК	8,2 %	15,6 %	15,5 %	15,1 %	15,1 %	12,8 %	10,5 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,1 %
Ефективність перетворення ОК на ДГК	6,7 %	12,3 %	11,6 %	11,5 %	11,4 %	10,0 %	7,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Ефективність перетворення ЛК на ЕПК	9,2 %	17,2 %	17,1 %	16,7 %	16,2 %	13,9 %	11,4 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,2 %
Ефективність перетворення ЛК на ДГК	7,6 %	13,6 %	12,9 %	12,7 %	12,3 %	10,9 %	7,5 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Ефективність перетворення АЛК на ЕПК	15,8 %	24,8 %	24,9 %	24,2 %	22,8 %	20,6 %	18,5 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,3 %
Ефективність перетворення АЛК на ДГК	13,0 %	19,6 %	18,7 %	18,4 %	17,2 %	16,1 %	12,2 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Загальні насичені жирні кислоти	17,6	17,8	17,8	17,6	18	17,8	18,1	18,2	17,7	17,8	18,1
Загальні мононенасичені жирні кислоти	19,8	15,5	16	16,6	14,3	16,6	16,8	18,7	19,3	19,6	18,6
Загальні поліненасичені жирні кислоти	62,5	66,6	66,4	65,6	67,7	65,6	65,1	63	63,1	62,5	63,2
Загальні C20	9,6	9,3	9,8	9,9	8,1	8,9	8,5	8,6	11	10,3	10,1
Загальні C22	5,4	10,3	10	9,7	9,4	8,3	5,7	0,6	0,9	0,7	0,7
Співвідношення загальні C20/C22	1,78	0,90	0,98	1,02	0,86	1,07	14,9	14,33	12,22	14,71	14,43

ДГК присутня в 6 з 10 індивідуальних насінин. Чотири інші насіння не містили ДГК, і, ймовірно, були нульовими сегрегантами, що не містять Т-ДНК, на базі гемізиготності вставки Т-ДНК в материнській рослині. Екстрагований ліпід з єдиної насінини з найвищим рівнем ДГК містив 9,0 % ДГК, тоді як сумарний відсоток для ЕПК, ДПК і ДГК становив 11,4 %. Сумарний відсоток для нових ω3 жирних кислот, продукованих в цьому насінні в результаті перетворення (СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК, ДГК) становив 19,3 %, тоді як відповідний сумарний відсоток для нових ω6 жирних кислот (ГЛК, ЕДК, ДГЛК, АРК і будь-яких продуктів ω6 елонгації) становив 2,2 %; тільки ГЛК і ЕДК були знайдені як нові ω6 жирні кислоти. Співвідношення загальних ω6 ЖК (включаючи ЛК) до ω3 ЖК (включаючи АЛК) становило 0,44. Співвідношення нових ω6 ЖК (за винятком ЛК) до нових ω3 ЖК (за винятком АЛК) у насінині з найвищим рівнем ДГК становило 0,12. Рівень загальних насичених жирних кислот становив приблизно 17,8 %, і рівень мононенасичених жирних кислот становив приблизно 15,5 %. Рівень загальних ω6 жирних

кислот становив приблизно 20,4 %, і рівень ω3 жирних кислот становив приблизно 46 %. Обчислена загальна ефективність перетворення становила: ОК на ЕПК = 15,6 %, ОК на ДГК = 12,3 %, ЛК на ЕПК = 17,2 %, ЛК на ДГК = 13,6 %, АЛК на ЕПК = 24,8 %, АЛК на ДГК = 19,6 %.

Гомозиготне насіння цієї лінії одержують в поколінні Т4. До 10,3 % ДГК продукується в події FD5-46-18-110, із середньою величиною 7,3 % ДГК, спостережуваною для всього покоління Т4.

Гомозиготне насіння висаджують в декілька теплиць, з метою одержання сумарно понад 600 індивідуальні рослини. Олію екстрагують з насіння із застосуванням різноманітних способів, зокрема, апарату Сокслета, екстракції ацетоном і гексаном.

Оскільки кількість одержаних незалежно трансформованих ліній C. sativa, як розкрито вище, було низьким, виконуються подальші експерименти з трансформації C. sativa за допомогою pJP3416-GA7. Винахідники прогнозують, що в подальших трансформованих лініях будуть досягнуті рівні ДГК, що перевищують 10 %, як відсоток від загального вмісту жирних кислот в олії з насіння, і в рослинах, гомозиготних по Т-ДНК — до 20 % ДГК. Одержані 20 подій C. sativa GA7_modH, і насіння проаналізоване щодо вмісту ДГК. Одержані 3 події GA7_modB, і аналіз насіння Т1 від події CMD17.1 виявив вміст ДГК в пулі насіння 9,8 %. Найвищий вміст ДГК, знайдений в окремому насінні, становить 13,5 %.

Приклад 4. Стабільна експресія трансгенних шляхів ДГК в насінні Brassica napus

Трансформація B. napus і аналіз складу жирних кислот з використанням єдиного вектора

Бінарний вектор pJP3416-GA7 використовують для одержання трансформованих рослин Brassica napus і насіння з рослин. Вектор pJP3416-GA7, розкритий вище, вводять в Agrobacterium tumefaciens, штам AGL1, за допомогою стандартних процедур електропорації. Культури трансгенних клітин Agrobacterium вирощують протягом ночі при 28°C в середовищі Лурія-Бертані при збовтуванні із швидкістю 150 об/хв. Бактеріальні клітини збирають центрифугуванням із швидкістю 4000 об/хв протягом 5 хвилин, промивають середовищем Winans AB (Winans, 1988), ресуспендують в 10 мл середовища Winans AB (pH 5,2) і продовжують культивування протягом ночі в присутності канаміцину (50 мг/л), рифампіцину (25 мг/л) і 100 мкМ ацетосирингону. За 2 години до інфікування клітин Brassica додають спермідин (120 мг/л), і кінцеву щільність бактерій доводять до OD 600 нм 0,3–0,4 за допомогою свіжого середовища AB. Свіжовиділені сім'ядольні черешки 8-денних саджанців Brassica napus, вирощених на середовищі MS (Murashige and Skoog, 1962) з 1/2 активності або сегменти підсім'ядольного коліна, попередньо кондиційовані протягом 3–4 днів на середовищах MS, що містять 1 мг/л тіадіазурону (ТДЗ) і 0,1 мг/л α-нафталіноцтової кислоти (НОК), інфікують 10 мл культури Agrobacterium протягом 5 хвилин. Експланти, інфіковані Agrobacterium, в подальшому промокають стерильним фільтрувальним папером для видалення надлишку Agrobacterium і переносять в середовища спів-культивування (середовища MS, що містять 1 мг/л ТДЗ, 0,1 мг/л НОК і 100 мкМ ацетосирингону), з додаванням або без додавання різних антиоксидантів (L-цистеїн, 50 мг/л і аскорбінова кислота 15 мг/л). Всі планшети герметизують парафіном та інкубують в темряві при температурі 23–24°C протягом 48 годин.

Оброблені експланти далі промивають стерильною дистильованою водою, що містить 500 мг/л цефотаксиму і 50 мг/л тиментину, протягом 10 хвилин, споліскують стерильною дистильованою водою протягом 10 хвилин, промокають стерильним фільтрувальним папером, переносять в передселекційні середовища (MS, що містять 1 мг/л ТДЗ, 0,1 мг/л НОК, 20 мг/л аденіну сульфату (АДС), 1,5 мг/л $AgNO_3$, 250 мг/л цефотаксиму і 50 мг/л тиментину) і культивують протягом 5 днів при температурі 24°C з фотоперіодом 16 годин/8 годин. Після цього їх переносять в селекційні середовища (MS, що містять 1 мг/л ТДЗ, 0,1 мг/л НОК, 20 мг/л АДС, 1,5 мг/л $AgNO_3$, 250 мг/л цефотаксиму і 50 мг/л тиментину) з додаванням 1,5 мг/л амонію глюфозинату як агента для селекції трансформованих клітин, і культивують протягом 4 тижнів при температурі 24°C з фотоперіодом 16 годин/8 годин, кожні два тижні перевиваючи в такі ж середовища. Експланти із зеленим калюсом переносять в середовища ініціації пагонів (MS, що містять 1 мг/л кінетину, 20 мг/л АДС, 1,5 мг/л $AgNO_3$, 250 мг/л цефотаксиму, 50 мг/л тиментину і 1,5 мг/л амонію глюфозинату) і культивують ще протягом 2–3 тижнів. Пагони, що з'являються від резистентних експлантів, переносять в середовища для подовження пагонів (середовища MS, що містять 0,1 мг/л гіберелової кислоти, 20 мг/л АДС, 1,5 мг/л $AgNO_3$, 250 мг/л цефотаксиму і 1,5 мг/л амонію глюфозинату) та культивують ще протягом двох тижнів. Здорові пагони довжиною 2–3 см відбирають і переносять в середовища для коренеутворення (1/2 MS, 1 мг/л НОК, що містять, 20 мг/л АДС, 1,5 мг/л $AgNO_3$ і 250 мг/л цефотаксиму) і культивують протягом 2–3 тижнів. Добре розвинені пагони з корінням переносять в горщики, що містять суміш для росту саджанців, вирощують в кімнаті для росту протягом двох тижнів, і далі переносять в

теплицю. Приблизно 40 (T_0) рослин, трансформованих конструкцією GA7, були одержані в такий спосіб.

Рослини вирощують до стану зрілості після надання їм можливості самозапліднення. Насіння, одержане від трансформованих рослин, аналізують щодо складу жирних кислот в олії з насіння, як розкрито у Прикладі 1. Дані для трансформованої лінії з найвищим рівнем ДГК наведені в Табл. 13. Значно нижчі рівні ДГК в середньому присутні в олії з насіння B. napus, трансформованих Т-ДНК з pJP3416-GA7, ніж у насінні A. thaliana (Приклад 2) або насінні Camelina (Приклад 3), трансформованому такою ж конструкцією. Найвищий рівень ДГК приблизно в 40 лініях був визначений як 1,52 %, причому більшість трансгенних ліній містила знайденні рівні ДГК. Слід зазначити, що значущою була акумуляція АЛК, приблизно 35 % від загальних жирних кислот, в тому насінні, яке не здійснювало ефективного перетворення на СДК або наступні продукти в біохімічному шляху.

Проаналізовані профілі жирних кислот в окремих насінинах B. napus від події T_1, CT125-2, з метою більш точного визначення кількості ДГК, продукованої в трансгенному насінні. Знайдено вміст в насінні від 0 % (нульове насіння) до 8,5 % ДГК (Табл. 13).

Деякі з насінин від лінії рослин CT116, а також інших трансгенних ліній, що демонструють продукування ДГК, висівають з метою одержання рослин-нащадків. ЗТ-ПЛР виконують на загальній РНК, виділеній з ембріонів, що розвиваються, від таких рослин, для визначення того, чому конструкція GA7 здійснює слабкий вплив з точки зору одержання ДГК відносно трансгенних A. thaliana і C. sativa, що містять таку ж конструкцію, і слабкий ефект відносно комбінації генів на pJP3115 і pJP3116 (нижче). ЗТ-ПЛР проводять на загальній РНК з використанням набору для одностадійної ЗТ-ПЛР (Invitrogen) і специфічних для гена праймерів, націлених на кожен трансген. Це підтвердило, що кожний з генів в конструкції GA7 належним чином експресується в трансформантах B. napus, за винятком Δ6-десатурази, яка слабко експресувалася в більшості трансформованого насіння. Інші гени із вказаного конструкта функціонують належним чином в насінні B. napus і A. thaliana, наприклад, Δ12- і Δ15-десатурази, функція яких полягає у продукуванні підвищених рівнів ЛК і АЛК в насінні, при зниженні рівнів олеїнової кислоти. Характерний гель ЗТ-ПЛР проілюстрований на Фіг. 7 і чітко демонструє низьку експресію Δ6-десатурази відносно інших трансгенів з pJP3416-GA7.

Трансгенні рослини і насіння, гомозиготні по трансгенах, одержують вирощуванням потомства ліній із найвищим вмістом ДГК.

Таблиця 13

Склад жирних кислот як відсоток від загальних жирних кислот в олії з насіння для незалежного насіння T_1 Brassica napus, трансформованого pJP3416-GA7, лінії CT116-11 і CT-125-2, в порівнянні з контролем дикого типу (нетрансформований). 22:6ω3 представляє ДГК. Дані одиничних насінин CT125-2 B. napus позначені "SS".

	Контроль	CT116-11	CT125-2	CT125-2 #2 SS	CT125-2 #3 SS	CT125-2 #10 SS
14:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
16:0	4,3	7,2	5,2	6,5	4,7	7,7
16:1	0,2	0,5	0,4	0,3	0,3	0,8
16:3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
18:0	2,1	2,2	2,4	2,3	2,3	2,8
18:1d9	59,1	27,0	38,1	34,0	19,3	14,8
18:1d11	3,7	6,6	4,2	4,4	4,3	9,6
18:2	19,7	14,1	16,6	13,9	10,2	10,2
18:3ω3	8,3	35,2	27,7	34,1	49,5	37,9
20:0	0,6	0,5	0,6	0,4	0,3	0,7
18:4ω3	0,0	0,9	0,3	0,5	0,6	2,6
20:1d11	1,2	1,1	1,0	1,0	0,8	0,6
20:1is0		0,2		0,1		0,2
20:2ω6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20:3ω3		1,3	0,7	0,8	1,6	0,9
22:0	0,3	0,4	0,3	0,1	0,1	0,4
20:4ω3		0,1	0,3	0,4	0,6	0,5
22:1						

Таблиця 13

Склад жирних кислот як відсоток від загальних жирних кислот в олії з насіння для незалежного насіння T_1 Brassica napus, трансформованого pJP3416-GA7, лінії CT116-11 і CT-125-2, в порівнянні з контролем дикого типу (нетрансформований). 22:6ω3 представляє ДГК. Дані одиничних насінин CT125-2 B. napus позначені "SS".

	Контроль	CT116-11	CT125-2	CT125-2 #2 SS	CT125-2 #3 SS	CT125-2 #10 SS
20:5ω3					0,1	0,3
22:3ω3					0,1	
24:0	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3
24:1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1
22:5ω3		0,1	0,1	0,1	0,1	0,5
22:6ω3		1,52	1,2	1,3	2,7	8,5

Трансформація B. napus і аналіз складу жирних кислот з використанням двох векторів

В іншому експерименті з B. napus, і як альтернативний формат для введення трансгенів, бінарні вектори pJP3115 і pJP3116, розкриті у WO 2010/057246, використовують для окремого одержання трансформованих рослин B. napus, і одержують трансформоване насіння від рослин. Т-ДНК на pJP3115 містить химерні гени, що кодують Δ12-десатуразу Crepis palestina, Δ6-десатуразу Micromonas pusilla, Δ6-елонгазу Pyramimonas cordata і Δ5-десатуразу Pavlova salina, і Т-ДНК на pJP3116 містить химерні гени, що кодують Δ15-десатуразу Perilla frutescens, Δ5-елонгазу Pyramimonas cordata і Δ4-десатуразу Pavlova salina. Дві Т-ДНК, якщо вони присутні спільно і експресуються в насінні, що розвивається, утворюють 7-генний шлях для одержання ДГК з олеїнової кислоти, що продукується ендогенно. Вказані вектори вводять в Agrobacterium tumefaciens, штам AGL1, за допомогою стандартних процедур електропорації, і трансформовані клітини використовують незалежно для трансформації B. napus із застосуванням розкритого вище способу для одержання стабільно трансформованих рослин T_0. Були одержані 29 трансформантів pJP3115 і 19 трансформантів pJP3116, вказані рослини були вирощені до стану зрілості, і одержане насіння після самозапліднення було проаналізоване щодо складу жирних кислот в олії з насіння. У випадку Т-ДНК з pJP3115 очікувалося, що перетворення буде приводити до утворення ЕПК з ендогенно продукованої АЛК, тоді як у випадку Т-ДНК з pJP3116 очікувався результат у вигляді підвищеного продукування АЛК з ЛК. Ідентифіковані деякі рослини, що демонстрували вказані фенотипи. Більшість подій демонструвала фенотип зниження ОК/підвищення ЛК в результаті Δ12 десатурації, з низьким рівнем продукування ЕПК. До 2,6 % ЕПК спостерігалося в пулі трансгенного насіння pJP31115. Подібним чином знайдено, що більшість подій pJP3116 має фенотип підвищення АЛК в результаті активності Δ15-десатурази. До 18,5 % АЛК знайдено в пулі насіння, трансформованого Т-ДНК з pJP3116.

Рослини T_1 з ліній із найвищими рівнями ЕПК і АЛК схрещують, і насіння нащадків (F1) від 24 виділених подій аналізують щодо вмісту ДГК. У 17 з цих подій знайдена ДГК, причому до 1,9 % ДГК знайдено в пулі насіння від цих подій. Аналіз одиничних насінин виконують з метою визначення інтервалу продукування ДГК — дані наведені у Табл. 14. Великий інтервал рівнів ДГК спостерігається у нащадків схрещування, ймовірно за рахунок гемізиготної природи Т-ДНК в материнських рослинах, таким чином, що деяке насіння не одержало обох Т-ДНК. До 6,7 % ДГК спостерігається в загальному ліпіді насіння.

Таблиця 14

Склад жирних кислот як відсоток від загальних жирних кислот в олії з насіння для одиничних насінин B. napus F1, одержаних в результаті схрещування рослин, трансгенних по Т-ДНК із pJP3115, з рослинами, трансгенними по Т-ДНК із pJP3116. B1, B2 і B4 позначають події. 0,0 = неможливо виявити методом ГХ.

	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4-g	B1.5-g	B2.1	B2.2	B2.3g	B2.4g	B2.5g	B3.1	B3.2
14:0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
16:0	6,6	6,4	4,5	12,3	7,9	5,1	5,0	10,1	8,5	6,8	5,3	7,2
16:1	0,4	0,5	0,2	1,0	0,6	0,4	0,4	0,6	1,1	0,5	0,5	0,6
16:3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2
18:0	2,3	2,6	2,2	1,6	2,9	2,9	3,4	2,2	1,8	2,9	3,4	2,4

Таблиця 14

Склад жирних кислот як відсоток від загальних жирних кислот в олії з насіння для одиничних насінин B. napus F1, одержаних в результаті схрещування рослин, трансгенних по Т-ДНК із pJP3115, з рослинами, трансгенними по Т-ДНК із pJP3116. B1, B2 і B4 позначають події. 0,0 = неможливо виявити методом ГХ.

	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4-g	B1.5-g	B2.1	B2.2	B2.3g	B2.4g	B2.5g	B3.1	B3.2
18:1	34,1	39,3	46,9	14,9	20,7	41,6	46,3	14,4	23,4	38,3	43,6	32,0
18:1d11	4,6	5,8	2,7	6,8	6,2	3,8	4,9	5,9	8,7	4,5	5,5	5,1
18:2	33,6	30,7	30,4	29,2	34,4	31,7	27,7	33,2	23,9	33,3	27,9	33,4
18:3ω6	0,2	0,3	0,1	0,4	0,4	0,2	0,2	0,7	0,1	0,2	0,2	0,3
18:3ω3	10,3	7,1	7,7	18,7	14,9	8,2	5,9	14,8	28,1	6,3	7,3	10,0
20:0	0,6	0,7	0,6	0,5	0,7	0,8	0,9	0,6	0,4	0,7	0,9	0,7
18:4ω3	0,2	0,1	0,1	0,8	0,5	0,2	0,2	0,8	0,0	0,2	0,2	0,2
20:1d11	1,0	1,1	1,1	0,7	0,8	1,1	1,1	0,5	0,9	1,1	1,1	0,9
20:1iso	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
20:2ω6	0,4	0,3	0,2	0,5	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5	0,5	0,3	0,5
20:3ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:3ω3	1,8	1,6	1,1	2,8	2,1	1,1	1,0	2,7	0,7	1,4	0,9	1,6
22:0	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4
20:4ω3	0,3	0,2	0,2	0,4	0,4	0,1	0,1	0,5	0,0	0,2	0,1	0,2
22:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5ω3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
22:2ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:4ω6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2
24:0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3
22:5ω6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,5	0,0	0,2	0,1	0,2
24:1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
22:5ω3	0,7	0,7	0,3	2,1	1,6	0,3	0,4	3,2	0,0	0,5	0,4	1,2
22:6ω3	1,4	1,0	0,5	5,5	3,9	0,8	0,7	6,7	0,0	1,1	0,8	2,0

Таблиця 15

Компільовані дані з профілів загального ліпіду насіння для трансгенного насіння, наведеного в Табл. 14. Обчислення не включають "незначних жирних кислот", включених в Табл. 14.

Параметр	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4-g	B1.5-g	B2.1	B2.2	B2.3g	B2.4g	B2.5g	B3.1
Загальні w3 (% від загальних ЖК)	4,6	3,9	2,3	12,1	9	2,7	2,6	14,8	0,8	3,6	2,6
Загальні w6 (% від загальних ЖК)	44,5	38,5	38,5	48,8	50,3	40,5	34,1	49,4	52,7	40,5	35,7
Співвідношення w3/w6	0,10	0,10	0,06	0,25	0,18	0,07	0,08	0,30	0,02	0,09	0,07
Співвідношення w6/w3	9,67	9,87	16,74	4,03	5,59	15,00	13,12	3,34	65,88	11,25	13,73
Загальні нові w3 (% від загальних ЖК)	2,6	2	1,1	8,9	6,5	1,4	1,4	11,4	0	2	1,5
Загальні нові w6 (% від загальних ЖК)	10,5	7,5	7,9	19,1	15,4	8,4	6,1	15,8	28,3	6,7	7,5
Співвідношення нових w3/w6	0,25	0,27	0,14	0,47	0,42	0,17	0,23	0,72	0,00	0,30	0,20
Співвідношення нових w6/w3	4,04	3,75	7,18	2,15	2,37	6,00	4,36	1,39		3,35	5,00

Таблиця 15

Компільовані дані з профілів загального ліпіду насіння для трансгенного насіння, наведеного в Табл. 14. Обчислення не включають "незначних жирних кислот", включених в Табл. 14.

Параметр	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4-g	B1.5-g	B2.1	B2.2	B2.3g	B2.4g	B2.5g	B3.1
Ефективність перетворення ОК на ЕПК	2,5 %	2,1 %	0,9 %	10,1 %	6,9 %	1,3 %	1,3 %	12,8 %		1,9 %	1,4 %
Ефективність перетворення ОК на ДГК	1,7 %	1,2 %	0,6 %	7,2 %	4,8 %	0,9 %	0,8 %	8,5 %		1,3 %	1,0 %
Ефективність перетворення ЛК на ЕПК	4,3 %	4,0 %	2,0 %	12,6 %	9,4 %	2,5 %	3,0 %	15,7 %		3,6 %	3,1 %
Ефективність перетворення ЛК на ДГК	2,9 %	2,4 %	1,2 %	9,0 %	6,6 %	1,9 %	1,9 %	10,4 %		2,5 %	2,1 %
Ефективність перетворення АЛК на ЕПК	47,7 %	44,7 %	36,4 %	68,1 %	65,9 %	44,0 %	45,8 %	72,1 %		47,1 %	50,0 %
Ефективність перетворення АЛК на ДГК	31,8 %	26,3 %	22,7 %	48,7 %	45,9 %	32,0 %	29,2 %	47,9 %		32,4 %	33,3 %
Загальні насичені жирні кислоти	10,2	10,6	7,9	15,1	12,4	9,6	10,2	13,7	11,6	11,3	10,6
Загальні мононенасичені жирні кислоти	40,4	47	51,1	23,8	28,7	47,2	53	21,8	34,7	44,7	51
Загальні поліненасичені жирні кислоти	49,2	42,5	40,9	61	59,4	43,3	36,8	64,3	53,7	44,2	38,4
Загальні C20	4,2	4	3,2	5,1	4,7	3,6	3,5	5,1	2,8	4	3,4
Загальні C22	2,6	2,5	1,3	8,3	6,4	1,7	1,8	11,1	0,5	2,4	1,9
Співвідношення загальні C20/C22	1,62	1,60	2,46	0,61	0,73	2,12	1,94	0,46	5,60	1,67	1,79

Компільовані дані профілів загального ліпіду (Табл. 14) наведені в Табл. 15. На базі даних Табл. 15, співвідношення загальних ω6 ЖК (включаючи ЛК) і ω3 ЖК (включаючи АЛК) в насінні з найвищим рівнем ДГК становило 3,34. Співвідношення нових ω6 ЖК (за винятком ЛК) і нових ω3 ЖК (за винятком АЛК) становило 1,39. Рівень загальних насичених жирних кислот становив приблизно 13,7 %, і рівень мононенасичених жирних кислот становив приблизно 21,8 %. Рівень загальних ω6 жирних кислот становив приблизно 46,4 %, і рівень ω3 жирних кислот становив приблизно 14,8 %. Обчислена загальна ефективність перетворення становила: ОК на ЕПК = 12,8 %, ОК на ДГК = 8,5 %, ЛК на ЕПК = 15,7 %, ЛК на ДГК = 10,4 %, АЛК на ЕПК = 72,1 %, АЛК на ДГК = 47,9 %. Знижена ефективність перетворення ω6 жирних кислот на ω3 жирні кислоти, яка спостерігалася в цьому експерименті при використанні комбінації pJP3115 і pJP3116, була віднесена на рахунок нижчої ефективності рослинної Δ15-десатурази, в порівнянні з грибковою Δ15/ω3 десатуразою (Приклади 2 і 3) при комбінації з генами для перетворення АЛК на ДГК.

Потомство ліній, що містять ДГК, гомозиготних по всіх введених трансгенах, було одержане для аналізу.

Приклад 5. Модифікації Т-ДНК, що кодують шляхи ДГК в насінні рослин

Для покращення рівня продукування ДГК у B. napus, в порівнянні з рівнями, розкритими у Прикладі 4, бінарні вектори pJP3416-GA7-modA, pJP3416-GA7-modB, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416-GA7-modE і pJP3416-GA7-modF були сконструйовані, як розкрито нижче. Ці бінарні вектори є варіантами конструкції pJP3416-GA7, розкритої у Прикладі 2, і були сконструйовані з метою подальшого підвищення синтезу ДГК в насінні рослин, особливо шляхом покращення функцій Δ6-десатурази і Δ6-елонгази. Спостерігалася акумуляція СДК в

деякому насінні, трансформованому конструкцією GA7, внаслідок відносно низької ефективності елонгації, в порівнянні з Δ5-елонгазою, тому, серед інших модифікацій, положення двох генів елонгази було змінене в Т-ДНК.

Дві послідовності, що кодують елонгази у pJP3416-GA7, були поміняні місцями на Т-ДНК, з одержанням pJP3416-GA7-modA першим клонуванням нової касети Δ6-елонгази P. cordata між сайтами SbfI pJP3416-GA7, для заміни касети Δ5-елонгази P. cordata. Ця конструкція була додатково модифікована шляхом обміну промотору FP1, який контролює Δ6-десатуразу M. pusilla, з промотором конлініну Cnl2 (pLuCnl2), щоб одержати pJP3416-GA7-modB. Дана модифікація була здійснена з метою збільшення експресії Δ6-десатурази, і таким чином ефективності фермента. Вважається, що промотор Cnl2 може давати більш вісоку експресію трансгену у B. napus, ніж вкороченій промотор напінк. pJP3416-GA7-modC було одержано шляхом додавання другої касети Δ6-десатурази M. pusilla з дещо іншим використанням кодонів (SEQ ID NO: 15), контрольованої промотором FP1, який було вставлено у сайт PmeI тільки всередині правої межі pJP3416-GA7-modB. Друга касета Δ6-десатурази додана до pJP3416-GA7-modB і pJP3416-GA7-modF з метою підвищення рівня експресії Δ6-десатурази і збільшення періоду часу в процесі розвитку насіння для експресії Δ6-десатурази шляхом використання декілької промоторів. Різноманітні способи використання кодонів застосовувались у двох нуклеотидних послідовностях, щоб здійснити трансляцію однієї і тієї ж послідовності білка без ризику ко-супресії з боку подобніх кодуючих ділянок в межах одніє і тієї ж Т-ДНК. pJP3416-GA7-modD і pJP3416-GA7-modE являють собою подібні варіанти, у яких третя послідовність ДПМ, що відповідає нуклеотидам 16649–17816 SEQ ID NO: 1, додана до pJP3416-GA7 і pJP3416-GA7-modB, відповідно, на сайті PmeI. pJP3416-GA7-modF одержаний шляхом додавання другої касети Δ6-десатурази M. pusilla, що містить нуклеотидну послідовність природної Δ6-десатурази і контрольованої промотором FP1 на сайте PmeI у правій границі pJP3416-GA7-modB. pJP3416-GA7-modG одержаний спочатку заміною касети Δ6-десатурази M. pusilla касетою Cnl2:Δ5-елонгази P. cordata рестрикційним клонуванням на сайтах AscI-PacI. Далі pJP3416-GA7-modG був одержаний шляхом заміни оригінальної касети FAE1:Δ5-елонгаза P. cordata касетою FAE1:Δ6-десатураза M. pusilla рестрикційним клонуванням на сайтах SbfI. Нуклеотидні послідовності Т-ДНК з кожної із вказаних генетичних конструкцій наведені як: pJP3416-GA7-modB (SEQ ID NO: 2), pJP3416-GA7-modC (SEQ ID NO: 3), pJP3416-GA7-modD (SEQ ID NO: 4), pJP3416-GA7-modE (SEQ ID NO: 5), pJP3416-GA7-modF (SEQ ID NO: 6) и pJP3416-GA7-modG (SEQ ID NO: 7).

Бінарні вектори pJP3416-GA7-modB, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416-GA7-modE, pJP3416-GA7-modF і pJP3416-GA7-modG використовуються для одержання трансформованих соматичних ембріонів Brassica і рослин Brassica napus, Camelina sativa і Arabidopsis thaliana, а також насіння потомства. Дані для pJP3416-GA7-modB наведені в наступному Прикладі.

Одержані 8 трансгенних подій pJP3416-GA7-modB A. thaliana і 15 трансгенних подій pJP3416-GA7-modG A. thaliana. Спостерігається від 3,4 % до 7,2 % ДГК в пулі насіння pJP3416-GA7-modB, і від 0,6 до 4,1 % ДГК в пулі насіння Т2 pJP3416-GA7-modG. Деякі з подій pJP3416-GA7-modB з найвищим рівнем висівають на селекційні середовища, і саджанці, що вижили, відбирають для наступного покоління. Насіння аналізують щодо вмісту ДГК. Оскільки об'єднане в пул насіння Т1 представляє популяції, сегреговані по трансгенах, і включають будь-які нульові сегреганти, очікується, що в гомозиготному насінні рослин-нащадків рівні ДГК будуть вищими, до 20 % від загального вмісту жирних кислот в олії насіння. Інші модифіковані конструкції використовувалися для трансформації A. thaliana. Хоча одержана тільки невелика кількість трансформованих ліній, жодна з них не давала вищих рівнів ДГК, ніж конструкція modB.

Конструкція pJP3416-GA7-modB також використовувалася для одержання трансформованих рослин B. napus сорту Oscar і в лінії розведення, позначеній NX005. Таким чином були одержані 10 незалежних трансформованих рослин (Т0) для трансформації Oscar, і 20 незалежних ліній – для NX005. Урожай насіння (насіння Т1) одержаний від вказаних трансгенних ліній. Пули насіння були проаналізовані щодо рівнів ДГК в олії з насіння, і дві лінії, які продемонстрували найвищі рівні, були вибрані і позначені як лінії CT132.5 (у сорті Oscar) і CT133.15 (у NX005). Набухають 20 насінин з CT132.5 і 11 насінин з CT133.15, і через два дні олію витягають з половини сім'ядолі кожної з індивідуальних насінин. Другу половину сім'ядоль з ембріональними осями утримують і культивують на середовищах, щоб зберегти конкретні лінії нащадків. Склад жирних кислот в олії визначають; дані для CT132.5 наведені в Табл. 16. Рівень ДГК в 10 із проаналізованих 20 насінин, за даними аналізу методом ГХ, знаходиться в інтервалі 7–20 % від загального вмісту жирних кислот. Інші насінини містили менше 7 % ДГК і могли містити часткову (неповну) копію Т-ДНК із pJP3416-GA7-modB. Схоже, що трансгенна лінія

містить множинні вставки трансгена, які були генетично роз'єднані. Насіння трансгенної лінії CT133.15 продемонструвало рівні ДГК в інтервалі 0–5 %. Насінини без ДГК, ймовірно, були нульовими сегрегантами. Ці дані підтверджують, що конструкція modB функціонує належним чином для одержання ДГК в насінні каноли.

Конструкції pJP3416-GA7-modB і pJP3416-GA7-modF також використовувалися для одержання трансформованих рослин Camelina sativa. Щонайменше 24 незалежні трансформовані рослини (T0) були одержані і детальніше вивчені шляхом аналізу нащадків. Урожай насіння (насіння T1) був зібраний із вказаних трансгенних ліній. Пули насіння були проаналізовані щодо рівнів ДГК в олії з насіння, і 6 ліній, які продемонстрували найвищі рівні ДГК (від 6 % до 9 %), були відібрані. Рівні ДГК в 20 насінні T1 з кожної лінії були проаналізовані, і більшість насіння продемонструвала рівні ДГК в інтервалі 6–14 % від загального вмісту жирних кислот, за даними аналізу методом ГХ. Склад жирних кислот в олії був визначений; дані для декількох трансгенних насінин наведені в Табл. 17. Ці дані підтверджують, що конструкції modB і modF обидві належним чином функціонують для продукування ДГК в зерні Camelina.

Таблиця 16

Профілі жирних кислот в половинках сім'ядоль пророщеного трансгенного насіння T1 B. napus, що містять конструкт modB. До 18,1 % ДГК спостерігалося в численних зразках, що містять більше 10 % ДГК.

Насіння	14:0	16:0	16:1 d3?	16:1	16:3	18:0	18:1	18:1 d11	18:2	18:3 n6	18:3 n3	20:0	18:4 n3	C20:1d11	20:1 d13	C20:2n6	C20:3n3	C22:0	20:4 n3	20:5 n3	22:3 n3	C24:0	C24:1	22:5 n3	C22:6n3
1	0,1	4,2	0,1	0,1	0,2	1,8	29,9	2,5	9,9	0,1	38,4	0,5	0,8	1,0	0,0	0,1	2,1	0,3	2,8	0,3	0,1	0,2	0,2	0,5	3,9
2	0,1	4,7	0,1	0,1	0,2	4,0	23,0	2,3	7,4	0,3	29,3	1,0	4,3	1,1	0,0	0,1	1,9	0,4	6,9	1,0	0,0	0,3	0,1	1,7	9,5
3	0,1	3,7	0,2	0,1	0,2	1,8	55,1	1,9	4,7	0,2	15,2	0,8	1,8	1,4	0,0	0,1	0,3	0,5	11,3	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	0,0
4	0,1	4,6	0,2	0,2	0,2	2,9	22,1	1,8	6,6	0,4	26,5	1,0	7,2	1,0	0,0	0,1	0,8	0,5	11,2	1,9	0,0	0,2	0,2	1,7	8,7
5	0,1	4,0	0,1	0,1	0,2	1,7	27,4	2,1	8,1	0,3	26,4	0,6	2,8	1,0	0,0	0,1	1,5	0,3	7,6	1,5	0,0	0,1	0,1	1,8	12,2
6	0,1	3,5	0,1	0,1	0,2	1,6	59,8	2,0	4,3	0,1	18,5	0,6	0,5	1,3	0,0	0,0	0,7	0,3	6,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0
7	0,1	6,0	0,3	0,3	0,3	1,7	16,6	2,6	23,9	1,0	23,2	0,6	5,4	0,8	0,0	0,2	0,6	0,4	2,6	1,1	0,0	0,3	0,3	1,7	9,9
8	0,1	4,9	0,1	0,1	0,2	2,7	12,9	1,4	11,7	0,3	34,3	0,9	5,0	0,9	0,0	0,2	2,4	0,5	4,1	1,3	0,0	0,2	0,2	1,8	13,8
9	0,1	3,9	0,1	0,1	0,1	2,4	41,6	1,7	21,5	0,0	23,4	0,7	0,0	1,2	0,0	0,1	2,2	0,4	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2	0,0	0,0
10	0,1	3,7	0,2	0,1	0,1	2,1	30,9	1,7	19,2	0,4	23,6	0,7	2,1	1,1	0,0	0,1	1,5	0,4	3,6	0,6	0,0	0,2	0,1	0,7	6,9
11	0,1	5,7	0,4	0,3	0,2	3,8	41,2	2,4	26,7	2,1	7,2	1,3	0,3	1,2	0,0	0,2	0,3	0,8	4,8	0,0	0,0	0,6	0,3	0,0	0,0
12	0,1	4,6	0,0	0,1	0,2	2,4	25,5	1,7	16,1	0,3	28,9	0,8	3,9	1,1	0,0	0,1	1,9	0,4	3,9	0,6	0,0	0,2	0,0	1,1	6,2
13	0,1	4,3	0,1	0,1	0,1	4,2	19,4	1,6	9,2	0,1	45,5	1,0	0,2	1,1	0,0	0,1	5,2	0,4	2,6	0,3	0,2	0,2	0,1	0,4	3,4
14	0,1	6,3	0,2	0,2	0,2	4,0	10,5	2,3	8,4	1,3	31,1	1,3	3,9	0,8	0,0	0,1	2,3	0,6	4,6	1,8	0,1	0,3	0,2	2,5	18,1
15	0,1	5,1	0,1	0,2	0,2	3,3	16,8	2,4	11,2	0,3	28,8	1,0	4,5	0,9	0,0	0,1	2,1	0,6	3,2	1,5	0,1	0,3	0,1	1,8	15,1
16	0,1	4,4	0,1	0,1	0,2	4,0	16,2	1,5	11,6	0,2	33,5	0,9	2,8	1,1	0,0	0,2	3,7	0,4	4,6	0,7	0,1	0,3	0,1	1,3	12,1
17	0,2	7,2	0,2	0,2	0,2	4,9	15,0	2,1	8,9	0,3	25,9	1,4	5,1	0,9	0,0	0,0	1,6	0,8	4,9	2,1	0,0	0,6	0,3	2,2	15,0
18	0,1	4,0	0,1	0,1	0,2	2,3	64,8	1,2	7,2	0,1	12,5	1,0	3,5	1,5	0,0	0,1	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,0
19	0,1	3,9	0,1	0,1	0,2	4,6	36,9	1,7	7,1	0,2	28,6	1,2	1,8	1,2	0,0	0,1	1,4	0,5	4,3	0,4	0,0	0,4	0,1	0,8	4,3
20	0,1	4,8	0,1	0,1	0,2	6,0	18,5	1,2	12,8	0,2	34,8	1,4	2,4	1,1	0,0	0,1	3,4	0,6	3,2	0,4	0,1	0,3	0,1	0,7	7,6

Таблиця 17

Профілі жирних кислот трансгенного насіння T1 C. sativa, що містять конструкції modB або modF.

	C14:0	1C6:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4 n3	C20:1d11	20:1 d13	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4 n3	C22:1	20:5 n3	C22:2n6	22:3 n3	C24:0	C24:1	22:5 n3	C22:6n3
123-8	0,1	7,3	0,0	5,2	7,9	1,0	7,7	0,7	29,9	2,3	6,0	7,1	0,4	0,7	0,0	0,0	0,9	0,4	1,3	1,0	4,6	0,0	0,1	0,2	0,3	1,5	13,3
123-12	0,1	8,3	0,0	5,3	7,2	1,2	8,7	0,9	27,2	2,5	5,7	6,9	0,5	0,7	0,0	0,1	0,9	0,5	1,5	1,2	5,0	0,0	0,1	0,2	0,4	1,5	13,2
5-8	0,1	8,3	0,1	3,5	9,4	1,3	8,1	1,1	29,0	1,0	9,3	7,9	0,4	0,6	0,0	0,0	0,8	0,2	0,4	0,8	3,4	0,0	0,1	0,2	0,4	0,9	12,6
5-9	0,1	8,1	0,0	3,5	9,4	1,2	8,4	1,2	29,2	1,0	9,0	8,1	0,3	0,6	0,0	0,0	0,8	0,2	0,5	0,8	3,5	0,0	0,1	0,1	0,3	0,9	12,6
17-10	0,1	8,7	0,1	4,1	8,4	1,3	5,5	1,2	26,1	1,6	11,8	7,2	0,3	0,0	0,4	0,03	0,8	0,3	0,4	0,7	5,5	0,0	0,0	0,2	0,3	1,3	13,5
17-26	0,1	8,8	0,1	5,5	5,0	1,3	7,6	0,9	27,8	2,7	10,1	6,2	0,3	0,0	0,7	0,03	1,1	0,6	0,5	1,0	4,7	0,1	0,1	0,3	0,4	1,0	13,1

Винахідники вважають, що, загалом, ефективність обмежуючої швидкість ферментної активності в біохімічному шляху ДГК може бути вищою у трансформантах, що містять декілька

копій Т-ДНК, в порівнянні з трансформантами, що містять єдину копію Т-ДНК, або може бути збільшена за допомогою вставки в Т-ДНК декількох генів, що кодують фермент, який може бути обмежуючим в біохімічному шляху. Докази можливої значущості трансформантів, що містять декілька копій, спостерігалися в насінні Arabidopsis, трансформованому конструкцією GA7 (Приклад 2), в яких подія з найвищим вмістом ДГК включала три Т-ДНК, вставлені в геном хазяїна. Декілька генів можуть бути ідентичними, або переважно є різними варіантами, що кодують один і той же поліпептид, або що знаходяться під контролем різних промоторів, яким властивий характер експресії, що частково перекривається. Наприклад, збільшена експресія могла б бути досягнута шляхом експресії декількох ділянок, що кодують Δ6-десатуразу, навіть, якщо продукується один і той же білок. Наприклад, в pJP3416-GA7-modF і pJP3416-GA7-modC присутні дві версії Δ6-десатурази M. pusilla, які експресуються різними промоторами. Кодуючі послідовності включають різне використання кодонів, і таким чином різні нуклеотидні послідовності, з метою зменшення потенційного сайленсинга або ефектів ко-супресії, але що приводять до продукування одного і того ж білка.

Приклад 6. Активність специфічних для насіння конструкцій в соматичних ембріонах

Для одержання системи швидкого аналізу, яка буде прогностичною для експресії генетичних конструкцій в насінні під контролем специфічних для насіння промоторів, система соматичних ембріонів була одержана для Brassica napus. Це здійснюється з використанням вектора для експресії фактора транскрипції LEC2, який приймає участь в ініціації соматичного ембріогенезу. Як демонстрація, бінарні вектори 35S:LEC2 і pJP107 (Petrie et al., 2010a і b) вводять в Agrobacterium tumefaciens, штам AGL1, шляхом стандартної електропорації, і трансформантів Agrobacterium використовують для співтрансформації Brassica napus шляхом співкультивування. Ділянка Т-ДНК pJP107 містить гени, що кодують Δ9-елонгазу Isochrysis galbana, Δ8-десатуразу P. salina і Δ5-десатуразу P. salina, причому кожен ген експресується специфічним для насіння промотором. Для контрольної трансформації використовують тільки вектори 35S:LEC2. Експресія 35S:LEC2 приводить до генерації соматичних ембріонів в культурі тканини безпосередньо із тканини калюсу, трансформованої B. napus, як розкрито у Прикладі 1.

Аналіз жирних кислот продемонстрував, що специфічні для насіння гени на Т-ДНК конструкції pJP107 експресуються в трансгенних соматичних ембріонах в присутності співтрансформуючого гена LEC2 і функціонують для продукування АРК ($20:4^{\Delta5,8,11,14}$) з ЛК і ЕПК ($20:5^{\Delta5,8,11,14,17}$) з АЛК. Дані для трьох співтрансформованих соматичних ембріонів наведені у Табл. 18, і склад жирних кислот кожного з них порівнюється зі складом жирних кислот олії з насіння для насіння Brassica napus, яке було трансгенним та експресуючим Т-ДНК pJP107 (Petrie et al., 2010a і b). Подібний загальний відсоток АРК і проміжних жирних кислот ЕДК (20:2ω6) і ДГЛК (20:3ω6), а також ефективність перетворення, спостерігалися для соматичної ембріональної тканини, при порівнянні з профілями стабільно трансформованого насіння. Подібні результати спостерігалися для складу жирних кислот стабільного трансгенного насіння T_2 і соматичних ембріонів: вміст ω6 жирних кислот знаходився на рівні 26,6 % і 25,6 % (середня величина), відповідно, тоді як рівні АРК становили 9,7 % і 10,6 % (середня величина), відповідно.

При введенні тільки 35S:LEC2 і аналізі соматичних ембріонів в часі було знайдено, що профіль жирних кислот змінюється на більш подібний до ембріонів профіль, причому вміст $18:3^{\Delta9,12,15}$ знижується, і вміст $18:1^{\Delta9}$ підвищується зворотно корелюючим чином (Фіг. 8). Одержані результати вказують на те, що соматичні ембріони дійсно ставали подібними насінню за характером, і експресувалися гени на Т-ДНК із pJP107. Це є демонстрацією того, що система соматичних ембріонів дозволяє швидку характеристику специфічних для насіння трансгенних конструкцій в B. napus, без необхідності у проведенні повного способу одержання трансгенної рослини та її зрілого насіння.

Таблиця 18

Склад жирних кислот ліпіду, одержаного із соматичних ембріонів Brassica napus, що генеруються за допомогою співтрансформації pJP107 і 35S:LEC2, в порівнянні з контрольним нетрансформованим насінням (ДТ) і насінням T_2, трансформованим pJP107. Ефективність перетворення для окремих ферментів наведена в дужках після відповідних ферментних стадій. D9-Ело позначає Δ9-елонгазу, D8-Дес позначає Δ8-десатуразу, і D5-Дес позначає Δ5-десатуразу

	ДТ	Трансгенне насіння T2 pJP107	LEC2:#45	LEC2:#57	LEC2:#58
$18:1^{\Delta 9}$	57,2	45,7	3,8	2,5	1,9
$18:2^{\Delta 9,12}$	19,1	8,7	10	10,6	10
$18:3^{\Delta 9,12,15}$	10,2	4,1	22,5	27,5	24,2
$20:2^{\Delta 11,14}$		7,1 ± 1,9 (67 % D9-ело)	5,2 (61,8 % D9-ело)	3,7 (56,7 % D9-ело)	4,6 (61,8 % D9-ело)
$20:3^{\Delta 8,11,14}$		1,1 ± 0,2 (60 % D8-дес)	0,4 (67 % D8-дес)	0,2 (73 % D8-дес)	0,4 (73 % D8-дес)
$20:4^{\Delta 5,8,11,14}$		9,7 ± 0,9 (90 % D5-дес)	10,6 (98 % D5-дес)	10 (96 % D5-дес)	11,2 (97 % D5-дес)
$20:3^{\Delta 11,14,17}$		4,0 ± 0,8	9,9	5,5	7,3
$20:4^{\Delta 8,11,14,17}$		0,3 ± 0,1	0,4	0,3	0,4
$20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$		2,4 ± 0,2	7,6	6,4	7,9
Всього нових		24,6	34,1	26,1	31,8

З використанням такої ж системи для генерації соматичних ембріонів, клітини Brassica napus окремо трансформують pJP3416-GA7-modB і pJP3416-GA7-modD. Були одержані 42 ембріони, 18 для modB і 24 для modD. Загальний ліпід екстрагують з ембріонів і аналізують склад жирних кислот. Ембріони містять від 0 % до 16,9 % ДГК (Табл. 19). Результати з 0 % ДГК, ймовірно, були одержані унаслідок тільки часткової інтеграції Т-ДНК або вставки в транскрипціонально "мовчазну" ділянку геному. Співвідношення загальних ω3 ЖК (зокрема, АЛК) до загальних ω6 ЖК (зокрема, ЛК) становить 2,3 для ембріона #270 і 11,96 для ембріона #284. Співвідношення загальних ω6 ЖК (зокрема, ЛК) до загальних ω3 ЖК (зокрема, АЛК) становить 0,08 для #284. Співвідношення нових ω6 ЖК (за винятком ЛК) до нових ω3 ЖК (за винятком АЛК) становить 0,03 для #284. Обчислена загальна ефективність перетворення становить: (для ембріонів #270, #284) ОК на ЕПК = 14,0 %, 29,8 %; ОК на ДГК = 9,7 %, 24,2 %; ЛК на ЕПК = 15,4 %, 30,7 %; ЛК на ДГК = 10,7 %, 25,0 %; АЛК на ЕПК = 22,1 %, 33,3 %; АЛК на ДГК = 15,3 %, 27,0 %. Ці значення ефективності подібні або перевищують, у випадку #284, спостережувані для ліній T_3 pJP3416-GA7 Arabidopsis, що вказує на здатність вектора pJP3416-GA7-modB до належного функціонування в клітинах B. napus. Рівень СДК становить менше 3,0 %, вказуючи на те, що Δ6-елонгаза функціонує навіть краще, ніж конструкція GA7. Індивідуальна ефективність ферментів, досягнута в #284, становила: 97,4 % для Δ12-десатурази; 92,3 % для ω3-десатурази; 38,2 % для Δ6-десатурази; 88,2 % для Δ6-елонгази; 98,8 % для Δ5-десатурази; 94,1 % для Δ5-елонгази; і 86,3 % для Δ4-десатурази. Загальний вміст насичених жирних кислот становить 21,2 %, загальний вміст мононенасичених жирних кислот становить 10,2 %, загальний вміст поліненасичених жирних кислот становить 68,6 %.

Винахідники вважають, що це був найвищий рівень ДГК, досягнутий в клітинах B. napus на даний момент, за винятком подальших даних, розкритих нижче. Це також продемонструвало, що модифікація pJP3416-GA7-modB відносно pJP3416-GA7 є ефективною з точки зору з погляду підвищення рівня експресії гена Δ6-десатурази. Бінарні вектори pJP3416-GA7, pJP3416-GA7-modA, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416-GA7-modE, і pJP3416-GA7-modF, розкриті вище, використовуються для співтрансформації з 35S:LEC2, з метою одержання трансформованих соматичних ембріонів B. napus. До 7,0 % ДГК спостерігається в ембріонах modD, 9,9 % - в ембріонах modE, 8,3 % - в ембріонах modF і 3,6 % - в невеликій кількості ембріонів modG.

Таблиця 19

Склад жирних кислот олії із соматичних ембріонів Brassica napus #270 і #284, одержаних співтрансформацією специфічною для насіння конструкцією кислоти ДГК pJP3416-GA7-modB і 35S:LEC2, а також #286 і #289 (pJP3416-GA7-modD)

	#270	#284	#286	#289
14:0	0,3	0,2	0,2	0,2
16:0	14,0	15,7	17,2	16,6
16:1d9	0,7	0,4	0,8	0,8
16:3	0,5	0,6	1,1	1,3
18:0	2,6	2,4	2,5	2,5
18:1d9	6,6	1,8	1,5	1,1
18:1d11	6,3	6,8	6,5	6,7
18:2	18,9	4,5	10,0	9,8
18:3ω6	0,7	0,8	0,3	0,3
18:3ω3	33,0	37,2	42,0	41,5
20:0	0,9	0,9	0,8	0,8
18:4ω3	1,9	2,8	3,6	4,5
20:1d11	0,2	0,1	0,1	0,1
20:2ω6	0,1	0,1	0,1	0,2
20:3ω3	0,5	0,0	0,5	0,6
22:0	0,8	1,5	0,6	0,7
20:4ω3	0,2	0,9	0,7	0,7
20:5ω3	0,7	0,2	0,3	0,3
22:2ω6	0,0	1,2	0,0	0,0
22:3ω3	0,0	0,1	0,0	0,1
24:0	0,8	1,0	1,0	1,0
24:1	0,8	1,0	0,7	0,9
22:5ω3	2,4	2,7	3,2	3,0
22:6ω3	7,0	16,9	6,1	6,4

Приклад 7. Аналіз ТАГ з трансгенного насіння A. thaliana, що продукує ДГК

Позиційний розподіл ДГК в ТАГ із трансформованого насіння A. thaliana визначали за методом ЯМР. Загальний ліпід екстрагують приблизно з 200 мг насіння, спочатку роздавлюючи його під шаром гексану, з подальшим перенесенням роздавленого насіння до скляної пробірки, що містить 10 мл гексану. Пробірку нагрівають приблизно до 55°C на водяній бані, після чого обробляють вихровим перемішуванням і центрифугують. Гексановий розчин екстрагують, і процедуру повторюють з додатковими порціями 4 х 10 мл. Екстракти об'єднують, упарюють за допомогою роторного випарника, і ТАГ в екстрагованому ліпіді очищують від полярних ліпідів шляхом пропускання крізь коротку колонку з кремнію діоксидом, з використанням 20 мл 7 % діетилового ефіру в гексані. Позиційний розподіл ацильної групи на очищеному ТАГ визначають кількісно, як було описано раніше (Petrie et al., 2010a і b).

Аналіз продемонстрував, що велика частина ДГК в загальній олії з насіння розташована в положеннях sn-1/3 ТАГ, і невелика кількість знайдена в положенні sn-2 (Фіг. 9). На протилежність цьому, ТАГ з продукуючого АРК насіння продемонстрували, що 50 % АРК ($20:4^{\Delta 5,8,11,14}$) розташовано в положенні sn-2 олії трансгенної каноли, тоді як очікувана величина для випадкового розподілу становить тільки 33 % (Petrie et al., 2012).

Позиційний розподіл ДГК в ТАГ з насіння B. napus, трансформованого pJP3416-GA7 або комбінацією pJP3115 і pJP3116, визначали по суті в такий же спосіб.

Додатково, загальний ліпід з трансгенного. насіння A. thaliana був проаналізований РХ-МС з потрійною квадрупольною лінзою, щоб визначити основні різновиди триацилгліцеролу, які містять ДГК (ТАГ) (Фіг. 10). Знайдено, що різновидами ТАГ з найвищим вмістом ДГК є ДГК-18:3-18:3 (ТАГ 58:12; номенклатура не описує позиційного розподілу), і на другому місці знаходиться ДГК-18:3-18:2 (ТАГ 58:11). Три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18) спостерігається в загальній олії з насіння, хоча і з низькими, але знайденими рівнями. Інші основні різновиди ТАГ, що містять ДГК, включали ДГК-34:3 (ТАГ 56:9), ДГК-36:3 (ТАГ 58:9), ДГК-36:4 (ТАГ 58:10), ДГК-36:7 (ТАГ 58:13) і

ДГК-38:4 (ТАГ 60:10). Ідентичність двох основних ТАГ, що містять ДГК, була додатково підтверджена квадрупольною часопролітною (Q-TOF) МС/МС

Приклад 8. Прогнозування продукування ДГК в насінні B. napus

Ефективне продукування ДГК в насінні Arabidopsis з рівнем 15 % при використанні генетичної конструкції GA7 було продемонстроване у Прикладі 2. Така ж конструкція в насінні Brassica napus приводила до продукування тільки приблизно 1,5 % ДГК у багатьох (але не всіх) із трансформантів, перш за все за рахунок слабкої експресії гена Δ6-десатурази GA7 в цьому виді (Приклад 4). На базі припущення про те, що модифікації конструкції GA7 можуть подолати проблему (див. Приклад 5, як продемонстровано у Прикладі 6) експресії гена Δ6-десатурази, були здійснені обчислення для визначення вірогідного профілю жирних кислот для трансгенного насіння B. napus, що експресує гени з варіанту pJP3416-GA7, в якому кожен кодований трансгеном фермент функціонує так само ефективно, як спостерігається для A. thaliana, що містить конструкцію GA7. Передбачений склад жирних кислот для трьох обчислень (#1, #2, #3) наведений в Табл. 20. Дані базуються на складі жирних кислот дикого типу (нетрансформований) для B. napus, що містить 59 % олеїнової кислоти, 20 % ЛК і 8 % АЛК. Три передбачені часткові профілі жирних кислот, наведені у нижній половині таблиці, базуються на ефективності перетворення для кожної ферментної стадії, наведеної у верхній половині таблиці. У прогнозі #2, комбінація Δ12-десатурації з ефективністю 75 %, Δ15-десатурації з ефективністю 75 %, Δ6-десатурації з ефективністю 35 %, Δ6-елонгації з ефективністю 80 %, Δ5-десатурації з ефективністю 90 %, Δ5-елонгації з ефективністю 90 % і Δ4-десатурації з ефективністю 90 % приводила б до продукування приблизно 10 % ДГК в типовому трансгенному насінні каноли. Всі наведені значення ефективності є нижчими або дорівнюють індивідуальній ефективності, спостережуваній в Arabidopsis, тому прогноз #2 представляє консервативну оцінку. Ефективність трансформації, наведена в #3, представляє наближення, що базуються на ефективних перетвореннях, які спостерігалися в A. thaliana, трансформованій pJP3416-GA7. Згідно прогнозу, ДГК буде продукуватися на рівні приблизно 15 % від загального вмісту жирних кислот в олії з насіння, що продукується в насінні B. napus, причому даний результат відображує найефективніші рівні продукування, спостережувані в A. thaliana. Очікується, що вставка декількох Т-ДНК в гомозиготному стані підвищуватиме рівень ДГК до 20 % у B. napus.

Таблиця 20

Прогнозований склад жирних кислот для відібраних жирних кислот як відсоток від загального вмісту жирних кислот в олії з насіння Brassica napus, трансформованого конструкцією біохімічного шляху ДГК, що базується на ефективності ферментів, що спостерігалася у трансгенному Arabidopsis. Ферменти наведені у порядку біохімічного шляху для одержання ДГК з олеїнової кислоти, дес = десатураза, ело = елонгаза. Передбачений склад жирних кислот #1, #2 і #3 базується на значеннях ефективності, наведених у верхній половині таблиці.

Фермент		#1	#2	#3
d12-дес		70 %	75 %	80 %
d15-дес		70 %	75 %	80 %
d6-дес (ω3)		30 %	35 %	40 %
d6-ело		80 %	80 %	90 %
d5-дес		80 %	90 %	90 %
d5-ело		80 %	90 %	90 %
d4-дес		80 %	90 %	90 %
Жирна кислота	ДТ	#1	#2	#3
18:1d9	59 %	26 %	22 %	18 %
18:2ω6	20 %	19 %	17 %	14 %
18:3ω6		1 %	2 %	3 %
18:3ω3	8 %	30 %	32 %	34 %
18:4ω3		3 %	3 %	2 %
20:4ω3		2 %	1 %	2 %
20:5ω3		2 %	1 %	2 %
22:5ω3		1 %	1 %	2 %
22:6ω3		5 %	10 %	15 %

Приклад 9. Стабільна експресія трансгенного біохімічного шляху ЕПК в листі рослини

Конструкція бінарного вектора

Бінарний вектор, pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert (SEQ ID NO: 8) сконструйований для введення Т-ДНК в рослини з метою синтезу ЕПК в тканинах листя. Він містить химерні гени, що кодують ферменти: Δ6-десатуразу M. pusilla (SEQ ID NO: 16), Δ6-елонгазу P. cordata (SEQ ID NO: 25) і Δ5-десатуразу P. salina (SEQ ID NO: 30), кожну під контролем CaMV 35S і промоторів маленької субодиниці (ПМС) рубіско A. thaliana (Фіг. 9). Бінарний вектор конструюють шляхом синтезу ділянки 199–10878 SEQ ID NO: 2 і клонування його в бінарний вектор-реципієнта pORE04 (Coutu et al., 1997) на сайтах BsiWI і KasI. Три гени біосинтезу жирних кислот, кодуючі ферменти, необхідні для перетворення АЛК, $18:3^{\Delta 9,12,15}$ на ЕПК, $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$.

Тимчасова експресія конструкції ЕПК в клітинах листя N. benthamiana

Для перевірки правильності конструкції та її здатності ефективно експресувати гени в тканинах листа, химерний вектор pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert вводять в A. tumefaciens, штам AGL1. Химерний вектор 35S:p19 також вводять в A. tumefaciens, штам AGL1, як розкрито у Прикладі 1. Клітинами з одержаних культур інфільтрують тканину листя рослин Nicotiana benthamiana в кімнаті для росту з температурою 24°C. Декілька зразків для прямого порівняння інфільтрують зразками для порівняння, розміщеними з обох боків одного і того ж листа. Експерименти виконують в трьох повтореннях. Після інфільтрації рослини вирощують ще протягом 5 днів, після чого листові диски витягають для аналізу профілю жирних кислот за методом ГХ, як розкрито у Прикладі 1. Аналіз за методом ГХ виявив, що вектор ЕПК здійснює свою функцію у вигляді продукування ЕПК в листі Nicotiana benthamiana (Табл. 21) з найвищим рівнем ЕПК, який становить 10,7 % від загальних ліпідів листа.

Стабільна трансформація Nicotiana tabacum

Химерний вектор pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert використовують для стабільної трансформації Nicotiana tabacum. Вектор вводять в A. tumefaciens, штам AGL1, шляхом стандартної процедури електропорації. Трансформовані клітини вирощують на твердих середовищах Лурія-Бертані з додаванням канаміцину (50 мг/л) і рифампіцину (25 мг/л) та інкубують при температурі 28°C протягом двох днів. Одиничну колонію використовують для ініціації свіжої культури. Через 48 годин інтенсивного культивування, клітини збирають центрифугуванням при 2000 x g, і супернатант видаляють. Клітини ресуспендують у свіжому розчині, що містить 50 % середовища Лурія-Бертані і 50 % середовища MS, з оптичною густиною OD_{600} = 0,5.

Таблиця 21

Склад жирних кислот загального ліпіду листя трансгенних подій Nicotiana benthamiana (тимчасова експресія) і Nicotiana tabacum (стабільний первинний трансформант) з найвищими рівнями ЕПК із кожного експерименту

		N. benthamiana	N. tabacum
	14:0	0,1	0,1
	16:0	18,5	17,8
	16:1w13t	2,2	3,8
	16:1d9	0,1	0
	16:3	6,2	5,7
	18:0	3,4	3,2
	18:1d11	0,3	0,3
	20:0	0,5	0,5
	22:0	0,2	0,3
	24:0	0,1	0,4
	18:1	2,9	1,6
	18:2ω6	12,6	14,5
Омега-6	18:3ω6	2,3	2,9
	20:2ω6	0,0	0,0
	20:3ω6	0,1	0,0
	20:4ω6	0,3	0,7

Таблиця 21

Склад жирних кислот загального ліпіду листя трансгенних подій Nicotiana benthamiana (тимчасова експресія) і Nicotiana tabacum (стабільний первинний трансформант) з найвищими рівнями ЕПК із кожного експерименту

		N. benthamiana	N. tabacum
Омега-3	18:3ω3	37,1	32,4
	18:4ω3	1,6	1,9
	20:3ω3	0,1	0,3
	20:4ω3	0,3	1,1
	20:5ω3	10,7	12,1
	22:5ω3	0,3	0,4

Зразки листя N. tabacum, сорт W38, вирощеного in vitro, зрізають і розрізають на квадратні секції розміром приблизно 0,5–1 $см^2$ за допомогою гострого скальпеля в зануреному у розчин A. tumefaciens стані. Пораненим фрагментам листя N. tabacum, зануреним в A. tumefaciens, витримували за кімнатної температури протягом 10 хвилин, після чого промокали стерильним фільтрувальним папером і переносили на планшети MS без добавок. Після періоду співкультивування протягом двох днів при 24°C, експланти тричі промивають стерильним рідким середовищем MS, і далі промокають насухо стерильним фільтрувальним папером та вміщують на селекційний агар MS, 1,0 мг/л бензиламінопурину (БАП), що містять 0,25 мг/л індолоцтової кислоти (ІОК), 50 мг/л канаміцину і 250 мг/л цефотаксиму. Планшети інкубують при температурі 24°C протягом двох тижнів, щоб дати можливість розвинутися пагонам із трансформованих фрагментів листя N. tabacum.

Для одержання вкорінених трансгенних рослин in vitro, здорові зелені пагони зрізають і переносять в горщики для культури тканини місткістю 200 мл, що містять агарове середовище MS з додаванням 25 мкг/л ІУК, 50 мг/л канаміцину і 250 мг/л цефотаксиму. Після утворення коріння трансгенні пагони переносять в грунт і вирощують до стану зрілості в теплиці. Листові диски досить великого розміру одержані від 21 зрілої трансгенної рослини, і профіль жирних кислот аналізують, як розкрито у Прикладі 1. Виявлено, що всі трансгенні зразки містять ЕПК (Табл. 21), причому найвищий рівень ЕПК знайдений в первинному гемізиготному трансформанті і становить 12,1 % від загальних ліпідів листя, причому зразки листя також містять невелику кількість (< 0,5 %) ДПК в ліпіді, що є результатом елонгації ЕПК з низьким рівнем Δ5-елонгазної активності у Δ6-елонгази. Співвідношення загальних ω3 ЖК (зокрема, АЛК) до ω6 ЖК (зокрема, ЛК) становить 2,7. Обчислена загальна ефективність перетворення становить: ОК на ЕПК = 18,4 %, ЛК на ЕПК = 18,9 %, АЛК на ЕПК = 25,9 %. Продукування 12,1 % ЕПК є особливо значущим, оскільки події були первинними гемізиготними трансформантами. Зокрема, ефективність перетворення АЛК на ЕПК є близькою до спостережуваної в стабільних трансформантах насіння. Також слід зазначити, що конструкція не містить Δ12- або Δ15-десатурази, щоб збільшити перетворення ОК і ЛК на АЛК. Очікується підвищення ефективності при додаванні такої активності.

Урожай насіння гемізиготних трансформантів збирають і висівають для одержання гомозиготних рослин.

Набір насіння ліній з найвищими рівнями ЕПК виглядає нормальним, і насіння ліній #10 і #17 проростає достатньо добре, щоб одержати покоління T_2. Співвідношення ЕПК до вказаних нульових (відсутність ЕПК) ліній показує, що подія #28 була однолокусною, і покоління T_3 було таким же. Аналіз профілю жирних кислот вказаної популяції T_3 продемонстрував, що трансгени були гомозиготними без нульових подій та із стабільною кількістю ЕПК. Середня кількість ЕПК в загальних ліпідах листя загальної популяції T_3 становить 9,4 ± 0,3 % (Табл. 22).

Таблиця 22

Характерні профілі жирних кислот загальних ліпідів листя дикого типа (ДТ) і незалежних трансгенних або тимчасово трансформованих ліній (ЕПК). Представлені види Nicotiana benthamiana (тимчасова трансформація), N. tabacum (стабільно трансформована популяція T_3), Vigna unguiculata (стабільно трансформована подія T_1). Помилка позначає стандартне відхилення для декількох зразків. Очевидна ефективність перетворення, наведена внизу, описує шлях ω3 та обчислена як сума продуктів у вигляді ЖК/суму субстрату + продуктів у вигляді ЖК.

		N. benthamiana		N. tabacum		V. unguiculata	
		ДТ	ЕПК	ДТ	ЕПК	ДТ	ЕПК
	16:0	17,1 ± 0,1	18,7 ± 0,2	15,0 ± 0,6	16,5 ± 0,5	18,0	18,2 ± 0,2
	16:1ω13t	3,2 ± 0,1	2,2 ± 0	3,5 ± 0,1	3,0 ± 0,3	3,8	2,0 ± 0,9
	16:3	6,8 ± 0,1	6,2 ± 0,1	5,2 ± 0,5	5,4 ± 0,3	-	-
	18:0	3,1 ± 0	3,5 ± 0,3	2,2 ± 0,2	2,6 ± 0,1	1,8	4,5 ± 0,4
	Незначні	1,4 ± 0	1,4 ± 0,1	3,1 ± 0,4	2,5 ± 0,3	2,3	2,5 ± 0,4
	ОК	1,7 ± 0,1	2,7 ± 0,2	1,6 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,0	4,3 ± 1,3
	ЛК	12,5 ± 0,4	12,7 ± 0,2	17,0 ± 1,1	18,0 ± 0,9	13,4	18,2 ± 3,0
	АЛК	53,3 ± 0,2	37,2 ± 0,2	52,2 ± 1,9	34,0 ± 0,6	58,6	38,2 ± 0
Омега-6	ГЛК	-	2,3 ± 0,1	-	2,3 ± 0,3	-	0,6 ± 0,2
	20:2ω6	0,1 ± 0	-	0,1 ± 0	0,1 ± 0	-	0,1 ± 0
	ДГЛК	0,1 ± 0	0,1 ± 0	-	-	-	-
	АРК	-	0,3 ± 0	-	0,7 ± 0,1	-	0,2 ± 0
Омега-3	СДК	-	1,5 ± 0,1	-	1,6 ± 0,1	-	1,5 ± 0
	20:3ω3	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,3 ± 0	0,1 ± 0	1,5 ± 0,1
	ЭТК	-	0,4 ± 0	-	1,1 ± 0,1	-	0,3 ± 0,2
	ЕПК	-	10,2 ± 0,5	-	9,4 ± 0,3	-	7,1 ± 0,2
	ДПК	-	0,3 ± 0,1	-	0,4 ± 0	-	0,8 ± 0,1
Перетворення омега-3	Δ6-дес		25 %		27 %		20 %
	Δ6-ело		88 %		87 %		85 %
	Δ5-дес		97 %		90 %		96 %
	Δ5-ело		3 %		4 %		10 %

Зразки листя гомозиготних рослин T_3 N. tabacum піддають подальшому біохімічному аналізу. Загальні ліпіди екстрагують з ліофілізованого листового матеріалу і фракціонують тонкошаровою хроматографією (ТШХ). Виявлено, що ЕПК присутня в ТАГ N. tabacum в кількості до 30,1 %, а також у полярних ліпідах в кількості 6,3 % (Табл. 23). Було цікаво відзначити, що ЕПК, продукована трансгенним шляхом, присутня у всіх оцінених ліпідних фракціях зокрема, ТАГ, моногалактозилдигліцероли (МГДГ), дигалактозилдигліцероли (ДГДГ), сульфохіновазилдіацилгліцероли (СХДГ), фосфатидилгліцерол (ФГ), ФХ, фосфатидилетаноламін (ФЕ), фосфатидилінозитол (ФЕ) і фосфатидилсерин (ФС). Всі пули ліпідів містили низькі рівні нової проміжної сполуки або ω6 жирних кислот ДЛ-ПНЖК, із співвідношенням ТАГ нових ω3 і ω6 жирних кислот, що становить 10:1.

Стабільна трансформація вігни китайської (коров'ячий горох, Cowpea)

Химерний вектор pORE04+11ABGBEC-Cowpea-EPA-insert трансформують у вігну китайську (Vigna unguiculata), як розкрито нижче. Зріле сухе насіння є переважним початковим матеріалом, хоча насіння, зібране із незрілих стручків з максимальною масою свіжого насіння, також може використовуватися. Сухе насіння молотять уручну, щоб уникнути розколювання оболонки насіння, і таким чином зменшити інфікування мікроорганізмами.

Сухе насіння або незрілі стручки занурюють в 70 % етанол на 2 хвилини, і далі обробляють протягом 30 хвилин в 20 % комерційному відбілювачі (кінцева концентрація натрію гіпохлориту

8,4 г/л). Далі насіння кілька разів промивають стерильною водою. Незріле насіння витягують із стручків в асептичних умовах, тоді як зріле насіння замочують для набухання протягом ночі. Два різних експланти можуть використовуватися для одержання множинних пагонів, а саме, ембріональна вісь і сім'ядоля безпосередньо, переважно сім'ядоля з приєднаною, розрізаною навпіл ембріональною віссю. Пагони і кореневі бруньки видаляють з осі перед утворенням пошкодження в сім'ядольному вузлі, тобто точці прикріплення осі до сім'ядолі. На основі початкового порівняння 19 сортів і ліній стало зрозумілим, що більшість ліній вігни китайської може бути трансформована, і єдине застереження полягає у тому, що різні умови культивування тканин слід оптимізувати для кожної лінії.

Таблиця 23

Аналіз триацилгліцеролу (ТАГ) ліпідних фракцій молодого і зрілого листя (молодих | зрілих), загального полярного ліпіду (ПЛ), моногалактозилдіацилгліцеролу (МГДГ), дигалактозилдіацилгліцеролу (ДГДГ), сульфохіновазилдіацилгліцеролу (СХДГ), фосфатидилгліцеролу (ФГ), фосфатидилхоліну (ФХ), фосфатидилетаноламіну (ФЕ), фосфатидилінозитолу (ФЕ) і фосфатидилсерину (ФС) із зразків трансгенного листя Nicotiana tabacum. Помилка означає стандартне відхилення для декількох зразків. До 30 % ЕПК спостерігається в ТАГ листя, причому ЕПК також поширена в полярних ліпідах. Крім того, для декількох жирних кислот спостерігалися відмінності в профілях між молодим і зрілим листям.

				Хлоропластидні			Позахлоропластидні				
		ТАГ	ФЛ	МГДГ	ДГДГ	СХДГ	ФГ	ФХ	ФЭ	ФИ	ФС
	16:0	9,8 | 18,3	17,8 | 23,8	3,1 | 3,2	18,0 | 16,8	48,3 | 50,0	21,0 | 26,4	22,9 | 30,0	24,0 | 30,5	38,7 | 43,3	31,9 | 36,2
	16:1ω13t	0 | 0	3,4 | 3,1	0 | 0	0 | 0	0 | 0	34,0 | 32,0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	1,0 | 1,4
	16:3	0,2 | 0,9	5,6 | 6,4	14,8 | 19,4	1,2 | 1,8	0,4 | 1,2	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0
	18:0	7,3 | 3,7	2,9 | 3,9	1,1 | 1,2	3,5 | 3,5	5,4 | 7,1	4,7 | 6,9	6,6 | 9,1	11,0 | 11,4	9,4 | 9,3	20,2 | 19,4
	Незначні	2,5 | 2,9	1,4 | 2,4	1,0 | 0,4	0,8 | 1,0	1,9 | 2,1	1,0 | 1,5	1,4 | 1,6	4,9 | 4,1	6,5 | 7,7	2,5 | 3,7
	ОК	5,5 | 0,8	2,8 | 1,1	0,8 | 0,3	1,8 | 1,0	2,7 | 1,3	5,3 | 4,9	8,1 | 2,9	2,5 | 1,1	2,5 | 0,8	4,9 | 2,3
	ЛК	27,7 | 13,7	17,3 | 12,3	8,0 | 6,8	9,2 | 10,5	11,7 | 8,9	17,1 | 13,2	39,2 | 25,2	37,9 | 28,5	22,0 | 13,4	24,4 | 17,1
	АЛК	9,6 | 17,2	39,0 | 34,4	60,3 | 51,9	61,2 | 58,6	23,7 | 21,5	15,7 | 14,1	7,3 | 18,2	5,5 | 10,5	7,6 | 10,0	4,8 | 10,5
Омега-6	ГЛК	2,5 | 3,0	1,5 | 2,1	2,1 | 3,0	1,1 | 1,8	1,4 | 1,9	0,2 | 0	1,8 | 2,5	1,7 | 2,7	0,8 | 0,9	1,1 | 1,3
	20:2ω6	0 | 0	0,1 | 1,1	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0,5 | 0	0 | 0	0 | 0
	ДГЛК	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0
	АРК	0,6 | 0,9	0,1 | 0,2	0,2 | 0,4	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0,3 | 0,3	0,4 | 0,4	0,4 | 0,6	0 | 0,2
Омега-3	СДК	4,0 | 7,6	1,6 | 2,0	1,7 | 2,0	0,6 | 0,7	1,2 | 1,2	0 | 0	2,1 | 3,6	1,3 | 2,0	0,8 | 0,8	0,9 | 1,6
	20:3ω3	0,2 | 0,3	0,1 | 0,2	0 | 0	0,2 | 0,3	0 | 0	0 | 0,1	0,2 | 0	0,3 | 0,4	0 | 0	0 | 0
	ЭТК	0,9 | 0,2	0,2 | 0,3	0 | 0,2	0 | 0,3	0 | 0	0 | 0	0,2 | 0	0,4 | 0,2	0,1 | 0,2	0 | 0
	ЕПК	28,8 | 30,1	6,1 | 6,3	6,9 | 11,2	2,3 | 3,6	3,4 | 4,6	1,0 | 0,8	9,7 | 6,4	9,1 | 7,8	11,2 | 12,8	8,4 | 6,2
	ДПК	0,4 | 0,5	0 | 0	0 | 0,1	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0,3 | 0,4	0,5 | 0,4	0 | 0,2	0 | 0,1

Гени селекційних маркерів bar або NptII можуть використовуватися для трансформації. Agrobacterium tumefaciens, штам AGL1, є переважним штамом для трансформації вігни китайською. Agrobacterium, що несе вектор pORE04+11ABGBEC-Cowpea-EPA-insert

культивують протягом ночі при 28°С на шейкері із швидкістю обертання 180 об/хв, суспензію центрифугують при 8000 g протягом 10 хвилин і ресуспендують в Середовищі 1 (середовище на базі MS, розбавлене 1/10, що містить 30 г/л сахарози, 20 мМ 2-МЕС, pH доводять до 5,6 перед обробкою в автоклаві, з додаванням оброблених стерилізуючою фільтрацією вітамінів MS, 100 мг/л міоінозитолу, 1,7 мг/л БАП, 0,25 мг/л гіберелової кислоти (GA_3), 0,2 мМ ацетосирингону, 250 мг/л Na тіосульфату, 150 мг/л дитіотрейтолу і 0,4 г/л L-цистеїну). Експланти занурюють без струшування до бактеріальної суспензії на 1 годину після утворення пошкоджень в меристематичних ділянках з використанням скальпелю. Далі оброблені експланти промокають стерильним фільтрувальним папером і переносять до затверділого Середовища 2 (Середовище 1, що містить 0,8 % агару), накрите фільтрувальним папером. Через 4 дні співкультивування, експланти переносять в Середовище 3 (середовище MS з повною активністю, що містить 100 мг/л міоінозитолу, 150 мг/л тиментину, 30 г/л сахарози, 3 мМ МЕС, 1,7 мг/л БАП, 5 мг/л ФФТ або 25–50 мг/л генетицину або 150 мг/л канаміцину, 0,8 г/л агару, pH доведено до 5,6) для ініціації пагонів і селекції трансформованих пагонів. За два тижні з'являються перші пагони. Сім'ядолі видаляють з ділянки сім'ядольного вузла, і культури переносять у свіже Середовище 3. Культури переносять у свіже Середовище 3 кожні два тижні після видалення мертвої і вмираючої тканини. Перші чотири субкультури вирощують із селекцією канаміцином, і далі чергують генетицин і канаміцин. Після шести субкультур зелені пагони, що вижили, переносять в Середовище 4 (Середовище 3 без БАП, але з додаванням 0,5 мг/л GA3, 50 мг/л аспарагіну, 0,1 мг/л 3-індолоцтової кислоти (ІОК), 150 мг/л тиментину або ФФТ (10 мг/л), генетицин (50 мг/л) або канаміцин (150 мг/л)) для подовження пагонів. Пагони перевивають кожні два тижні, до тих пір, поки довжина одиничних пагонів не буде становити більше 1 см. Такі великі пагони переносять із чашок Петрі в банки для культури (заввишки 80 мм) для подальшого росту в умовах селекції.

Більшість регенерованих пагонів може вкорінятися in vitro, причому рослини з утвореним корінням переносять в грунт і дозволяють укорінятися в камері з високою вологістю протягом 14–21 дня перед перенесенням в теплицю з умовами навколишнього середовища.

Для підвищення частоти перенесення гена у вігну китайську, до середовищ для співкультивування додають тіольні сполуки. Додавання L-цистеїну, дитіотрейтолу і натрію тіосульфату зменшує появу бурого забарвлення пораненої тканини.

Великі кількості експлантів вігни китайської можуть оброблятися за спрощеним протоколом. Коротко, протокол складається з наступних стадій: набухання стерилізованого зрілого насіння протягом ночі у воді; одержання експлантів шляхом подовжнього розрізання насіння навпіл, внаслідок чого розщеплена ембріональна вісь (з видаленими верхівками пагонів і коріння) все ще залишається приєднаною до сім'ядолі; інфікування Agrobacterium, штам AGL1, якому сприяє утворення місцевих пошкоджень на меристематичних ділянках, співкультивування на середовищах, що містять тіольні сполуки, протягом 4 днів при 25°С в освітленому місці, ініціація пагонів і елонгації на середовищі, що містить селективні агенти, вкорінення пагонів in vitro і перенесення їх в умови теплиці для цвітіння і утворення насіння, ПЛР або ферментний аналіз передбачуваних трансгенних рослин, і скринінг наступного покоління нащадків за методом ПЛР або визначення ферментної активності.

Потомство трансгенних рослин T_0 є фенотипово нормальним. Трансгени передаються потомству, і гомозиготні рослини T_2 ідентифікують за допомогою скринінгу їх нащадків T_3 щодо ферментної активності або ПЛР.

Із застосуванням даної системи трансформації одержані приблизно 10 трансгенних рослин на 1000 експлантів, що є подібним до частоти трансформації для інших бобів. В залежності від сорту або лінії, яку трансформують, даний протокол вимагає 5–8 місяців з моменту одержання експланту до збирання урожаю насіння T_1.

Система трансформації використовується для введення бінарного вектора pORE04+11ABGBEC-Cowpea-EPA-insert в регенеровані, трансформовані рослини вігни китайської.

Були здійснені модифікації бінарного вектора pORE04+11ABGBEC-Cowpea-EPA-insert, в ході яких додані гени, що кодують Δ5-елонгазу і Δ4-десатуразу, щоб забезпечити генетичну конструкцію, яка має додаткову здатність перетворення продукованої ЕПК на ДГК. Конструкцію трансформують в рослини для одержання ДГК у вегетативних тканинах.

Присутність ЕПК була знайдена в невеликій кількості подій, що вижили в результаті хімічної селекції. Лінія з найвищим вмістом містила 7,1 ± 0,2 % ЕПК в загальних ліпідах листя. Швидкість перетворення була нижчою, ніж звичайно спостерігається для вігни китайською, причому тільки 6 ліній були підтверджені як трансгенні. Це означає, що на даний момент невідоме, що саме спричиняло вказаний ефект, хоча цікаво відзначити, що більша, ніж звичайно частка

трансгенних подій містила неповні ділянки Т-ДНК. Можливо, великий розмір конструкції сприяв зниженню ефективності. Крім того, була обчислена очевидна ефективність перетворення для кожного із трьох трансгенних ферментів (Табл. 22). Результати були високою мірою подібними для всіх трьох видів, з високим рівнем перетворення на ЕПК після початкової Δ6-десатурації природної АЛК. Деяка міра Δ5-елонгації ЕПК до ДПК була відзначена, незважаючи на відсутність специфічної Δ5-елонгази. Попередньо Δ6-елонгаза P. cordata продемонструвала низький рівень Δ9-елонгазної активності (тобто, перетворення $18:3^{\Delta 9,12,15}$ на $20:3^{\Delta 11,14,17}$), хоча в дріжджовому аналізі Δ5-елонгазної активності виявлено не було.

Приклад 10. Тестування варіацій генів Δ12-десатурази

Конструкція бінарного вектора

У спробі протестувати і порівняти серії химерних генів Δ12-десатурази, було сконструйовано декілька бінарних векторів, які використовуються для трансформації A. thaliana і B. napus. Кожний з бінарних векторів pJP3365, pJP3366, pJP3367, pJP3368 і pJP3369 містить гени, що кодують ферменти ω3-десатуразу P. pastoris (SEQ ID NO: 12) і Δ6-десатуразу M. pusilla (SEQ ID NO: 16), і одну з серії Δ12-десатураз. Δ12-десатурази одержані з Cryptococcus neoformans (номер доступу XP_570226 у pJP3365), версії Δ12-десатурази Cryptococcus neoformans, що містить мутацію L151M, мета якої полягає у збільшенні активності гена (у pJP3366), Lachancea kluyveri (SEQ ID NO: 10 в pJP3367), Synechocystis PCC6803 (номер доступу BAA18169 в pJP3368) і Crepis palaestina (номер доступу CAA76157, Lee et al., 1998, в pJP3369). Десатураза Crepis є єдиною рослинною десатуразою в серії; інші є грибковими ферментами. Вектори одержані за допомогою вставки рослинної кодон-оптимізованої ділянки кодування білка, за винятком Δ12-десатурази Crepis palestina, яка була ділянкою дикого типу, для кожної Δ12-десатурази в сайт NotI вектора pJP3364 (див. Фіг. 12), в орієнтації, функціонально пов'язаній з промотором FP1, щоб забезпечити специфічну для насіння експресію кожної десатурази. Вектор pJP3364 вже містить химерні гени, що кодують омга3-десатуразу P. pastoris і Δ6-десатуразу M. pusilla, кожна під контролем специфічних для насіння промоторів (Фіг. 12). Комбінація трьох ферментів біосинтезу жирних кислот, а саме Δ12-десатурази, ω3-десатурази і Δ6-десатурази, була розроблена таким чином, щоб здійснити збирання біохімічного шляху перетворення олеїнової кислоти ($18:1^{\Delta 9}$) на СДК ($18:4^{\Delta 6,9,12,15}$). Далі проводять аналізи для вимірювання рівня утворення СДК в трансформованому насінні.

Трансформація і аналіз A. thaliana і B. napus

Химерні бінарні вектори вводять в A. tumefaciens, штам AGL1, і клітини з культур трансформованої Agrobacterium використовують для трансформації рослин мутантів fad2 A. thaliana, застосовуючи для трансформації спосіб занурення квіток (Clough and Bent, 1998). Після дозрівання, урожай насіння T_1 оброблених рослин збирають і здійснюють скринінг на планшетах MS, що містять канаміцин для селекції саджанців, які несуть ген селекційного маркера NptII, присутній на Т-ДНК кожного химерного вектора. Саджанці T_1, що вижили, переносять в грунт. Після того, як рослинам дозволяють самозапліднитися і вирощують їх до стану зрілості, врожай насіння T_2 вказаних рослин збирають, і склад жирних кислот ліпідів насіння аналізують методом ГХ.

Химерний вектор pJP3367 також використовували для трансформації B. napus за способом, розкритим у Прикладі 4, з одержанням 12 трансгенних подій. Вміст СДК був знайдений в інтервалі від 0,6 % до 2,2 % в пулі насіння рослин, і 9 індивідуальних насінин трансгенної рослини з найвищим рівнем СДК були проаналізовані щодо складу жирних кислот. Одержані в результаті такого аналізу дані щодо складу жирних кислот наведені в Табл. 24.

Дані продемонстрували, що активність Δ12-десатурази, експресованої з кожної із Т-ДНК в A. thaliana і B. napus була несподівано низкою, забезпечуючи ефективність ферментного перетворення приблизно 20 % замість 70-80 %, спостережуваних для такої ж касети експресії в конструкції GA7 (Приклади 2 і 3). Причина такої відносно слабкої експресії генів Δ12-десатурази із вказаних векторів є не до кінця зрозумілою, але може бути пов'язана з положенням генів у конструкції в цілому.

І навпаки, аналіз експресії методом ЗТ-ПЛР продемонстрував, що гени ω3-десатурази P. pastoris і Δ6-десатурази M. pusilla на Т-ДНК відносно добре експресувалися у трансформованому насінні. Табл. 24 включає ефективність перетворення під дією Δ6-десатурази в трансформованому насінні, яка варіює від приблизно 11 % до приблизно 25 % в одній трансформованій лінії B. napus. Це значно вище, ніж ефективність перетворення під дією Δ6-десатурази приблизно 7 %, яка спостерігалася в насінні B. napus, трансформованому конструкцією GA7 (Приклад 4).

Таблиця 24

Склад жирних кислот як відсоток від загальних жирних кислот в олії з насіння, одержаному з одиничного насіння рослини T_1 Brassica napus, трансформованої Т-ДНК з pJP3367. СДК (18:4ω3) позначена напівжирним зображенням шрифту.

Зразок	CT110-3#1	CT110-3#2	CT110-3#3	CT110-3#4	CT110-3#5	CT110-3#6	CT110-3#7	CT110-3#8	CT110-3#9
C14:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C16:0	4,3	4,2	4,1	4,5	3,8	4,3	4,0	5,0	4,7
16:1d7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
C16:1d9	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
16:3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C18:0	1,9	1,9	1,3	1,8	2,1	1,8	2,4	3,1	2,2
C18:1	58,1	59,4	55,5	59,1	62,1	56,0	57,2	52,0	53,2
C18:1d11	3,5	3,6	3,0	3,2	2,9	3,6	3,2	4,4	3,5
C18:2	18,4	17,1	19,2	17,3	17,4	18,7	19,0	20,3	20,2
C18:3ω6	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
C18:3ω3	8,2	9,0	11,1	8,6	7,5	10,2	9,8	9,3	9,8
C20:0	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6	0,7	0,6
18:4ω3	2,4	2,0	2,8	2,5	1,4	2,6	1,3	2,4	3,2
C20:1d11	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1
20:1iso	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,03	0,02	0,03	0,02
C20:2ω6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C22:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
C24:0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2
C24:1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Δ6-дес %	22,9	17,9	20,3	22,8	15,8	20,2	11,7	20,9	24,9

Таким чином, для одержання переваги вищої ефективності перетворення під дією Δ6-десатурази, що надається Т-ДНК із pJP3367, рослини B. napus, трансформовані даною Т-ДНК, схрещують з рослинами, трансформованими Т-ДНК із pJP3416-GA7 (Приклад 4), з метою одержання рослин-нащадків і насіння, що несе обидві Т-ДНК. Склад жирних кислот олії, екстрагованої з насіння F1, аналізують методом ГХ щодо вмісту ДГК та вмісту інших жирних кислот. Спостерігаються підвищені рівні ДГК, як наслідок збільшеної експресії Δ6-десатурази. Рослини, що є гомозиготними по обом Т-ДНК, одержані і повинні продукувати вищі рівні ДГК.

Приклад 11. Збільшення акумуляції жирних кислот з використанням білків-супресорів сайленсинга

Конструкція бінарного вектора

У WO 2010/057246 розкрито використання білків-супресорів сайленсинга (БСС) для збільшення експресії трансгена в насінні рослин. Для демонстрації того, що використання таких білків може збільшити і стабілізувати продукування ДЛ-ПНЖК в олійних культурах протягом декількох поколінь, декілька БСС були вибрані з метою тестування, а саме V2 (номер доступу GU178820.1), p19 (номер доступу AJ288943.1), p38 (номер доступу DQ286869.1) і $P0^{PE}$ (номер доступу L04573.1). p19 являє собою білок-супресор з вірусу кущистої карликовості томатів (ВККТ), який зв'язується з міРНК завдовжки 21 нуклеотид перед тим, як вони будуть контролювати спрямоване Argonaute розщеплення гомологічної РНК (Voinnet et al., 2003). V2, білок-супресор з вірусу жовтої кучерявості листя томату (ВЖКЛТ), зв'язується з рослинним білком SGS3 (Glick et al., 2008), тобто білком, який вважається необхідним для одержання проміжних сполук двохланцюгових РНК із субстрату олРНК (Beclin et al., 2002), або зв'язується із структурами длРНК, що містять 5' виступ (Fukunaga et al., 2009). p38 являє собою білок-супресор з вірусу складчастості ріпи (ВСР), який створює перешкоди в механізмі сайленсинга рослини шляхом зв'язуванні з білками Dicer і Argonaute (Azevedo et al., 2010). Білки P0, наприклад, $P0^{PE}$ і RPV-P0, із полеровірусів, націлюють на білки Argonaute, щоб підсилити розкладання (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007, Fusaro et al., 2012). Генетичні конструкції були? таким чином? підготовлені для експресії даних БСС в зерні рослини, в

комбінації з набором генів біосинтезу жирних кислот для одержання АРК (20:4$^{\Delta 5,8,11,14}$) з ЛК (18:1$^{\Delta 9,12}$), як вказано нижче.

Гени біосинтезу жирних кислот, кодуючі Δ9-елонгазу Isochrysis galbana та Δ8- і Δ5-десатурази Pavlova salina і бактеріальний селекційний маркер, одержані на єдиному фрагменті ДНК з pJP3010 шляхом розщеплення PmeI і AvrII, що дає фрагмент розміром 9560 пар основ. Ділянку, що кодує Δ9-елонгазу, на цьому фрагменті сполучають з промотором FAE1 A. thaliana (pAtFAE1) і ділянкою термінації транскрипції/поліаденілювання конлініну (LuCnl2-3'). Кожну з ділянок, що кодують десатуразу, приєднують до вкороченого промотору напіну FP1 (pBnFP1) і ділянки термінації транскрипції/поліаденілювання nos3'. Три гени біосинтезу жирних кислот на цьому фрагменті орієнтовані і розміщені таким же чином, як у pJP107 (Petrie et al., 2012) і кодують такі ж білки, як pJP107. Фрагмент ДНК також містить ген pFP1:GFiP:nos3' з pCW141 (див. WO 2010/057246), який кодує зелений флуоресцентний білок (ЗФБ). Даний ген скринінгового маркера використовується як специфічний для насіння візуальний маркер, що дає можливість простої і неруйнівної ідентифікації, і таким чином селекції трансгенного насіння, що несе та експресує ген.

Фрагмент PmeI-AvrII вставляють у сайт PmeI-AvrII кожної із серій по 5 векторів, кожен з яких містить інший ген БСС (WO 2010/057246), з одержанням генетичних конструкцій, позначених pFN045, pFN046, pFN047, pFN048 і pFN049. Вони містять гени, які кодують БСС P0^{PE}, p38, p19, 35S:V2 і V2, відповідно. Кожен з генів БСС знаходиться під контролем промотору FP1 і ділянки термінації транскрипції/поліаденілювання ocs3', за винятком конструкції pFN048, в якій ділянка, що кодує V2, знаходиться під контролем конститутивного промотору CaMV 35S. Ген БСС у кожному випадку знаходиться в межах ділянки Т-ДНК конструкцій, суміжної з правою межею (ПГ) Т-ДНК. Шоста конструкція, pFN050, в якій відсутні послідовності, що кодують БСС, одержана за допомогою розщеплення pFN045 AhdI і NheI, з подальшою рециркуляризації ДНК для видалення гену FP1:P0^{PE}. Кожна з 6 конструкцій містить ген селекційного маркера NptII в межах Т-ДНК, суміжно з лівою межею Т-ДНК. Всі конструкції містять джерела реплікації RK2 для підтримки плазмід в Agrobacterium.

Трансформація A. thaliana векторами експресії АРК в комбінації з БСС

Для трансформації генотипу MC49 Arabidopsis, що являє собою подвійний мутант fad2/fae1 з високими рівнями лінолевої кислоти в ліпіді насіння, рослини, обробляють за способом занурення квіток (Clough and Bent, 1998) з використанням A. tumefaciens, штам GV3101, окремо трансформованої кожною із шести конструкцій pFN045-pFN050. Оброблені рослини вирощують до стану зрілості, і зібраний з них урожай насіння T_1 вміщують на планшети із середовищем MS, що містить канаміцин, для селекції трансформованих рослин T_1. Скринінг щодо експресії ЗФБ в насінні також застосовують як візуальний маркер для трансформованого насіння T_1. Саджанці, які вижили на планшетах MS/Kan, або які були одержані із ЗФБ-позитивного насіння, переносять в грунт і вирощують до стану зрілості для одержання насіння T_2. Кількість одержаних трансформованих рослин становила 5, 14, 32, 8, 23 і 24 для трансформації pFN045, pFN046, pFN047, pFN048, pFN049 і pFN050, відповідно. На даній стадії було виявлено, що ген, який кодує p38 в pFN046, був нефункціональним і, таким чином, рослини, трансформовані вектором pFN046 розглядалися як додатковий контроль, тобто по суті такий же, як і pFN050.

Пул чисельністю близько 100 насінин T_2 одержаний від кожної трансформованої рослини для визначення складу жирних кислот в ліпіді насіння шляхом одержання МЕЖК і аналізу методом ГХ. Крім того, 6 саджанців T_2 з кожної трансгенної лінії були вирощені для одержання насіння T_3.

Склад жирних кислот в загальному ліпіді, екстрагованому з насіння T_2, визначають за допомогою ГХ. Аналіз продемонстрував інтервал рівнів АРК і проміжних сполук ЕДК (20:2ω6) і ДГЛК (20:3ω6) в популяціях T_2. Дані для АРК проілюстровані на Фіг. 13 і 14.

Фіг. 13 ілюструє аналіз методом коробчатої діаграми рівня АРК в ліпіді популяцій насіння T_2. Очевидно, що медіанний рівень (50-й процентиль) АРК в популяціях насіння, які містили гени FP1:p19 і 35S:V2, на додаток до генів біосинтезу АРК, є значно вищим, ніж у насінні, що містить дефектний ген FP1:p38 або контрольну Т-ДНК із pFP050, що не містить гена БСС. Середні рівні АРК для насіння, трансформованого генами, які кодують p19 і V2, є вищими, ніж для насіння, що трансформоване геном p38 або не містить БСС (Фіг. 14). Одна лінія FP1:p19 і дві лінії FP1:V2 продемонстрували близько 19 %, 20 % і 23 % АРК, відповідно. Вони представляють значення, що різко відхиляються, і таким чином не входили до обчислення для аналізу методом коробчатої діаграми. Вижила менша кількість рослин, трансформованих Т-ДНК, що містять гени FP1:P0^{PE} і 35S:V2, в порівнянні з іншими конструкціями; вважається, що ці гени можуть шкодити здоров'ю рослини на фоні MC49.

Не тільки рівні АРК значно відрізнялися для різних конструкцій, але і спостережувані рівні в ліпіді насіння першої проміжної сполуки біохімічного шляху від ЛК до АРК, а саме ЕДК (20:2ω6) були нижчими в лініях, що експресують V2 або p19, ніж у насінні, що не містить БСС або що містить конструкцію p38 (Фіг. 15). Серед насіння T_3, одна популяція, що містить конструкцію, яка експресує p19, продемонструвала рівень АРК 38 %, як відсоток від загальних жирних кислот в ліпіді насіння.

Ряд трансгенних ліній T_3 прогресував до покоління T_4. Рівні АРК в насінні T_4, що експресує V_2, є такими ж, як і в попередньому поколінні, або дійсно демонструють підвищені рівні, в порівнянні з їх батьками T_3 (Фіг. 16). Лінії, що експресують p19, продемонстрували більш різноманітні рівні АРК. Рівень АРК був зниженим у деяких лініях, тоді як в інших він був таким же або вищим, в порівнянні з батьками Т3. І навпаки, лінії, що містять дефектний ген p38 або не містять БСС, загалом продемонстрували зниження рівня АРК і підвищення рівнів проміжних сполук (Фіг. 18). У деяких із цих ліній, вміст АРК був зменшений приблизно до 1 %, і рівні ЕДК зросли приблизно до 20 %. Середній рівень АРК в насінні T_4 був вищим для ліній, що експресують p19 і V2, в порівнянні з лініями, що експресують p38 або що не містять БСС (Фіг. 17).

Даний експеримент проілюстрував, що експресія БСС у насінні трансгенної рослини, разом з додатковими генами для біосинтетичного шляху ДЛ-ПНЖК, не тільки підвищує рівень продукування бажаної жирної кислоти в першому поколінні нащадків, але і стабілізує рівень продукування жирної кислоти в більш пізніх поколіннях, наприклад, третьому або четвертому поколінні нащадків. Збільшене продукування жирних кислот супроводжується зниженням рівнів проміжних жирних кислот в біосинтетичному шляху. БСС p19 і V2, що експресуються із специфічних для насіння промоторів, є переважними. Конструкція, розроблена для експресії БСС p38, виявилася дефектною, і придатні дані не були одержані при використанні даної конструкції. БСС V2 і його гомологи з інших вірусів вважаються особливо переважними, оскільки вони дозволяють максимальну експресію генів біосинтетичного шляху і одночасний сайленсинг інших генів в тих же клітинах насіння, що розвивається.

Приклад 12. Аналіз вмісту і складу стеролів в оліях

Фітостерини з 12 зразків рослинної олії, придбаних із комерційних джерел в Австралії, охарактеризовані за методами ГХ і ГХ-МС. як похідні О-триметилсилілового ефіру (OTMSi-ефір), як розкрито у Прикладі 1. Стероли ідентифікували за даними утримання, інтерпретацією мас-спектрів і порівнянням з літературними даними та даними мас-спектроскопії лабораторних стандартів. Кількість стеролів визначають з використанням внутрішнього стандарту 5|(H)-холан-24-олу. Базова структура фітостерину і хімічна структура деяких з ідентифікованих стеролів проілюстровані на Фіг. 19 і в Табл. 25.

Аналізували рослинні олії: кунжуту (Sesamum indicum), оливи (Olea europaea), соняшнику (Helianthus annus), рицини (Ricinus communis), каноли (Brassica napus), сафлору (Carthamus tinctorius), арахісу (Arachis hypogaea), льону (Linum usitatissimum) і сої (Glycine max). У порядку зниження по відношенню відносного вмісту, у всіх зразках олії основними фітостеринами були: β-ситостерол (інтервал 28-55 % від загального вмісту стеролів), Δ5-авенастерол (ізофукостерол) (3–24 %), кампестерол (2–33 %), Δ5-стигмастерол (0,7–18 %), Δ7-стигмастерол (1–18 %) і Δ7-авенастерол (0,1–5 %). Були ідентифіковані декілька інших мінорних стеролів: холестерин, брасікастерол, чалінастерол, кампестанол та ебурикол. Додатково, були знайдені чотири C29:2 і два C30:2 стероли, але необхідне подальше дослідження для остаточної ідентифікації цих мінорних компонентів. Крім того, в деяких з олій присутні декілька інших неідентифікованих стеролів, але через дуже низький їх вміст, мас-спектри не були достатньо інтенсивними, щоб дозволити ідентифікацію їх структури.

Вміст стеролів, виражений як мг/г олії, у порядку зниження: олія каноли (6,8 мг/г), кунжутна олія (5,8 мг/г), льняна олія (4,8–5,2 мг/г), олія соняшнику (3,7–4,1 мг/г), арахісова олія (3,2 мг/г), сафлорова олія (3,0 мг/г), соєва олія (3,0 мг/г), оливкова олія (2,4 мг/г), рицинова олія (1,9 мг/г). % стеролів в складі і загальний вміст стеролів наведені у Табл. 26.

Таблиця 25

Назви за ІЮПАК / систематичні назви ідентифікованих стеролів

Стерол №	Загальна назва(и)	ІЮПАК/систематична назва
1	холестерин	холест-5-ен-3β-ол
2	брасікастерол	24-метилхолеста-5,22E-дієн-3β-ол
3	чалінастерол / 24-	24-метилхолеста-5,24(28)E-дієн-3β-ол

Таблиця 25

Назви за ІЮПАК / систематичні назви ідентифікованих стеролів

Стерол №	Загальна назва(и)	ІЮПАК/систематична назва
	метиленхолестерин	
4	кампестерол / 24-метилхолестерин	24-метилхолест-5-ен-3β-ол
5	кампестанол / 24-метилхолестанол	24-метилхолестан-3β-ол
7	Δ5-стигмастерол	24-етилхолеста-5,22E-дієн-3β-ол
9	ергост-7-ен-3β-ол	24-метилхолест-7-ен-3β-ол
11	ебурикол	4,4,14-триметилергоста-8,24(28)-дієн-3β-ол
12	β-ситостерол / 24-етилхолестерин	24-етилхолест-5-ен-3β-ол
13	D5-авенастерол / ізофукостерол	24-етилхолеста-5,24(28)Z-дієн-3β-ол
19	D7-стигмастерол / стигмаст-7-ен-3b-ол	24-етилхолест-7-ен-3β-ол
20	D7-авенастерол	24-етилхолеста-7,24(28)-дієн-3β-ол

Загалом, серед усіх зразків олії з насіння основним фітостерином був β-ситостерол (інтервал 30–57 % від загального вмісту стеролів). Для олій спостерігався широкий інтервал частки інших основних стеролів: кампестерол (2–17 %), Δ5-стигмастерол (0,7–18 %), Δ5-авенастерол (4–23 %), Δ7-стигмастерол (1–18 %). Олії різних видів містили інший профіль стеролів, причому деякі профілі були досить відмінними. У випадку олії каноли, вона містило найвищу частку кампестеролу (33,6 %), тоді як зразки інших видів загалом містили нижчі рівні, наприклад, до 17 % в арахісовій олії. Сафлорова олія містила відносно високу частку Δ7-стигмастеролу (18 %), тоді як вміст цього стеролу звичайно був низьким в оліях інших видів, до 9 % в олії соняшнику. Оскільки вони є характерними для кожного виду, профілі стеролів можуть, таким чином, використовуватися як допоміжні для ідентифікації конкретних овочевих або рослинних олій та перевірки їх непідробленості або підробки іншими оліями.

Таблиця 26

Вміст і склад стеролів у проаналізованих рослинних оліях

Номер стеролу*	Загальна назва стеролу	Кунжут	Олива	Соняшник	Соняшник	Рицина	Канола	Сафлор	Сафлор	Арахіс	Льон (насіння льону)	Льон (насіння льону)	Соя
					холодне пресування				холодне пресування				
1	холестерин	0,2	0,8	0,2	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4	0,2
2	брасікастерол	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
3	чалінастерол / 24-метилен-холестерин	1,5	0,1	0,3	0,1	1,1	2,4	0,2	0,1	0,9	1,5	1,4	0,8
4	кампестерол / 24-метилхолестерин	16,2	2,4	7,4	7,9	8,4	33,6	12,1	8,5	17,4	15,7	14,4	16,9
5	кампестанол / 24-метилхолестанол	0,7	0,3	0,3	0,1	0,9	0,2	0,8	0,8	0,3	0,2	0,2	0,7
6	C29:2*	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,5	0,5	0,0	1,2	1,3	0,1
7	Δ5-стигмастерол	6,4	1,2	7,4	7,2	18,6	0,7	7,0	4,6	6,9	5,1	5,8	17,6

Таблиця 26

Вміст і склад стеролів у проаналізованих рослинних оліях

Номер стеролу*	Загальна назва стеролу	Кунжут	Олива	Соняшник	Соняшник	Рицина	Канола	Сафлор	Сафлор	Арахіс	Льон (насіння льону)	Льон (насіння льону)	Соя
8	невідомий	0,5	1,3	0,7	0,6	0,8	0,7	0,7	1,3	0,4	0,7	0,6	1,3
9	ергост-7-ен-3β-ол	0,1	0,1	1,9	1,8	0,2	0,4	2,7	4,0	1,4	1,4	1,4	1,0
10	невідомий	0,0	1,3	0,9	0,8	1,2	0,9	1,8	0,7	1,2	0,7	0,5	0,7
11	ебурикол	1,6	1,8	4,1	4,4	1,5	1,0	1,9	2,9	1,2	3,5	3,3	0,9
12	β-ситостерол / 24-етилхолестерин	55,3	45,6	43,9	43,6	37,7	50,8	40,2	35,1	57,2	29,9	28,4	40,2
13	Δ5-авенастерол / ізофукостерол	8,6	16,9	7,2	4,1	19,3	4,4	7,3	6,3	5,3	23,0	24,2	3,3
14	Тритерпеновий спирт	0,0	2,4	0,9	1,1	0,0	0,0	1,6	1,9	0,0	0,0	0,0	0,9
15	Тритерпеновий спирт	0,0	0,0	0,7	0,6	0,0	0,0	2,8	1,8	0,0	0,0	0,3	0,0
16	C29:2*	0,0	0,5	0,7	0,7	1,5	1,2	2,8	1,9	2,0	1,0	0,7	0,5
17	C29:2*	1,0	0,9	2,3	2,4	0,6	0,4	1,3	1,9	0,9	1,0	1,0	1,0
18	C30:2*	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19	Δ7-стигмастерол / стигмаст-7-ен-3β-ол	2,2	7,1	9,3	10,9	2,3	0,9	10,5	18,3	1,1	7,9	8,7	5,6
20	Δ7-авенастерол	1,3	0,1	4,0	3,6	0,6	0,2	2,0	4,7	0,7	0,4	0,4	0,6
21	невідомий	0,7	7,1	0,9	0,8	0,0	0,4	0,3	0,4	0,0	3,0	3,6	0,0
22	невідомий	0,3	0,0	0,3	0,9	0,0	0,0	1,2	1,3	0,2	0,1	0,0	0,3
23	невідомий	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5
24	невідомий	0,0	3,1	0,9	1,3	0,6	0,4	0,2	0,4	0,7	1,7	1,9	0,8
25	невідомий	0,9	0,4	0,3	0,5	0,3	0,1	0,5	0,7	0,3	0,1	0,1	0,6
26	C30:2	2,2	6,0	4,6	5,7	1,4	0,6	1,0	1,2	1,2	1,2	1,1	5,2
27	невідомий	0,0	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,0	0,3
	Сума	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Загальний стерол (мг/г олії)	5,8	2,4	4,1	3,7	1,9	6,8	3,2	3,0	3,2	4,8	5,2	3,0

C29:2* і C30:2* позначають стерол C29 з двома подвійними зв'язками і стерол C30 з двома подвійними зв'язками, відповідно

Порівнювали по два зразки соняшнику і сафлору, у кожному випадку один був одержаний холодним пресуванням насіння і був нерафінованим, тоді як інший не був одержаний холодним пресуванням і був рафінованим. Хоча спостерігалися деякі відмінності, два джерела олії містили подібний склад стеролів і загальний вміст стеролів, наводячи на думку про те, що обробка і рафінування здійснюють незначний вплив на два вказаних параметри. Вміст стеролів серед зразків відрізнявся в 3 рази і варіював від 1,9 мг/г до 6,8 мг/г. В олії каноли він був найвищий, а в рициновій олії — найнижчий вміст стеролів.

Приклад 13. Збільшення акумуляції ДГК в положенні sn-2 ТАГ

Автори цього винаходу припускали, що акумуляція ДГК в положенні sn-2 ТАГ може бути збільшена шляхом співекспресії l-ацил-гліцерол-3-фосфат ацилтрансферази (ЛФКАТ) із шляхом

біосинтезу ДГК, наприклад, наданим конструкцією GA7 або її варіантами. Переважними ЛФКАТ є такі, які можуть впливати на поліненасичений С22 жирний ацил-КоА як субстрат, що приводить до збільшення вставки поліненасиченого ланцюга С22 в положенні sn-2 ЛФК з утворенням ФК, відносно ендогенного ЛФКАТ. Цитоплазматичні ферменти ЛФКАТ часто демонструють варіюючі переваги по відношенню до субстрату, особливо, якщо вид синтезує і акумулює в ТАГ незвичайні жирні кислоти. Продемонстровано, що ЛФКАТ2 з Limnanthes douglasii може використовувати ерукоїл-КоА (С22:1-КоА) як субстрат для синтезу ФК, на протилежність ЛФКАТ1 з того ж виду, яка не може утилізувати субстрат С22 (Brown et al., 2002).

Розглядалися відомі ЛФКАТ, і багато з них були вибрані для тестування, зокрема, ті, від яких не очікувалося збільшення інкорпорації ДГК в положенні sn-2, як контроль. Відомі ЛФКАТ включали: ЛФКАТ2: Arabidopsis thaliana (SEQ ID NO: 63, номер доступу ABG48392, Kim et al., 2005), ЛФКАТ Limnanthes alba (SEQ ID NO: 64, номер доступу AAC49185, Lassner et al., 1995), Slc1p Saccharomyces cerevisiae (SEQ ID NO: 65, номер доступу NP_010231, Zou et al., 1997), ЛФКАТ 1 Mortierella alpina (SEQ ID NO: 67, номер доступу AED33305; патент США № 7879591) і ЛФКАТ Brassica napus (SEQ ID NO: 68 і SEQ ID NO: 69, номери доступу ADC97479 і ADC97478, відповідно). Вони були вибрані таким чином, щоб охопити три групи ферментів ЛФКАТ: 1) контрольні рослинні ЛФКАТ насіння, звичайно з низькою активністю по відношенню до незвичайних довголанцюгових поліненасичених жирних кислот (зокрема, ЛФКАТ Arabidopsis і Brassica); 2. ЛФКАТ, які раніше продемонстрували дію на жирні кислоти С22 і використовування С22 ацил-КоА як субстрат, в цьому випадку, ерукової кислоти С22:1 (зокрема, ЛФКАТ Limnanthes і Saccharomyces); 3. ЛФКАТ, які винахідники вважали найбільш ймовірна здатними утилізувати довголанцюгові поліненасичені жирні кислоти, такі як ЕПК і ДГК, як субстрати (зокрема, ЛФКАТ Mortierella).

ЛФКАТ2 Arabidopsis (також позначена як ЛФАТ2) являє собою локалізований в ендоплазматичному ретикулумі фермент, що продемонстрував активність по відношенню до субстратів С16 і С18, однак активність по відношенню до субстратів С20 або С22 не тестувалася (Kim et al., 2005). ЛФКАТ2 Limnanthes alba продемонструвала вставку ацильного ланцюга С22:1 в положення sn-2 ФК, хоча здатність використовувати ДГК як субстрат не тестувалася (Lassner et al., 1995). Вибрана ЛФКАТ S. cerevisiae Slc1p продемонструвала активність у вигляді використання 22:1-КоА на додаток до 18:1-КоА як субстратів, указуючи на широку специфічність по відношенню до субстратів з урахуванням довжини ланцюга (Zou et al., 1997). Знову, ДГК-КоА та інші ДЛ-ПНЖК не тестувалися як субстрати. Раніше було продемонстровано, що ЛФКАТ Mortierella має активність по відношенню до жирнокислотних субстратів ЕПК і ДГК в трансгенному Yarrowia lipolytica (US 7879591).

Додаткові ЛФКАТ були ідентифіковані винахідниками. Micromonas pusilla являє собою мікроводорость, що продукує та акумулює ДГК в олії, хоча позиційний розподіл ДГК на ТАГ у цьому виді не було підтверджено. ЛФКАТ Micromonas pusilla (SEQ ID NO: 66, номер доступу XP_002501997) була ідентифікована шляхом пошуку серед геномних послідовностей Micromonas pusilla з використанням ЛФКАТ2 Arabidopsis як послідовності запиту BLAST. З'явилися декілька послідовностей-кандидатів, і послідовність XP_002501997 була синтезована для тестування як вірогідний фермент ЛФКАТ з активністю по відношенню до С22 ДЛ-ПНЖК. ЛФКАТ Ricinus communis була анотована як передбачувана ЛФКАТ в послідовності геному рицини (Chan et al., 2010). Чотири кандидати на ЛФКАТ з геному рицини були синтезовані і протестовані на неочищених лізатах листя інфільтрованої тканини листа N. benthamiana. Розкрита в цьому документі послідовність-кандидат продемонструвала активність ЛФКАТ.

Ряд кандидатів на ЛФКАТ був вирівняний з відомим ЛФКАТ на філогенетичному дереві (Фіг. 20). Слід зазначити, що передбачувана ЛФКАТ Micromonas не групується з передбачуваними С22 ЛФКАТ, але має дивергуючу послідовність.

Як первинний аналіз різних ЛФКАТ щодо їх здатності використовувати ДГК-КоА як субстрат, одержують химерні генетичні конструкції для конститутивної експресії екзогенних ЛФКАТ в листі N. benthamiana, кожна під контролем промотору 35S, як розкрито нижче: 35S:Arath-ЛФАТ2 (Arabidopsis ER ЛФКАТ); 35S:Ricco-ЛФКАТ2; 35S:Limal-ЛФКАТ (ЛФКАТ Limnanthes alba); 35S:Sacce-Slc1p (ЛФКАТ S. cerevisiae); 35S:Micpu-ЛФКАТ (ЛФКАТ Micromonas pusilla); 35S:Moral-ЛФКАТ1 (ЛФКАТ Mortierella alpina). Конструкції 35S:p19, що не містять екзогенної ЛФКАТ, використовуються в експерименті як контроль. Кожну із вказаних конструкцій вводять за допомогою Agrobacterium в листя N. benthamiana, як розкрито у Прикладі 1, і через 5 днів після інфільтрації оброблені зони листя вирізують і подрібнюють для одержання лізату листя. Кожен лізат містить екзогенну ЛФКАТ, а також ендогенні ферменти для синтезу ЛФК. Реакційні суміші одержують in vitro, окремо додаючи до лізатів мічені ^{14}C ОК, ЛК або АЛК (субстрати С18), АРК (субстрат С20) і ДГК (С22), в трьох повтореннях. Реакційні суміші інкубують при 25°С, і рівень

інкорпорації мічених ^{14}C жирних кислот у ФК визначають за методом ТСХ. Обчислюють здатність кожної ЛФКАТ використовувати ДГК відносно АРК і жирних кислот С18. Знайдено, що ЛФКАТ пінника лугового, Mortierella і Saccharomyces володіють активністю по відношенню до субстрату ДГК, причому радіомічена ФК виникає у випадку цих, але не інших ЛФКАТ. Активність всіх ЛФКАТ була підтверджена подібним споживанням олеїнової кислоти.

Для тестування активності ЛФКАТ в насінні, деяку кількість кодуючих білок послідовностей або ЛФКАТ вставляють в бінарний вектор під контролем промотору конлініну (pLuCnl1). Одержані в результаті генетичні конструкції, що містять химерні гени Cnl1Arath-ЛФКАТ (негативний контроль), Cnl1:Limal-ЛФКАТ, Cn1:Sacce-Slc1p, і Cnl1Moral-ЛФКАТ, відповідно, далі використовують для трансформації рослин B. napus і A. thaliana, щоб одержати стабільні трансформанти, які експресують ЛФКАТ в специфічній для насіння формі. Трансформовані рослини, що містять конструкції Cnl1-ЛФКАТ, схрещують з рослинами, які експресують конструкцію GA7 або її варіанти (Приклад 5), які продукують ДГК в насінні, щоб досягти збільшення інкорпорації ДГК у положенні sn-2 ТАГ. Крім того, конструкції використовуються для трансформації рослин B. napus, C. sativa і A. thaliana, які вже містять конструкцію GA7 та її варіанти (Приклади 2–5), з метою одержання потомства, що несе материнські і ЛФКАТ генетичні конструкції. Очікується збільшення інкорпорації ДГК в положенні sn-2 ТАГ відносно інкорпорації в рослинах без кодуючих ЛФКАТ трансгенів. Вміст олії також підвищується в насінні, особливо у випадку насіння, що продукує вищі рівні ДГК, нейтралізуючи тенденцію, спостережувану в насінні Arabidopsis, як розкрито у Прикладі 2.

Кваліфікованим фахівцям в цій галузі техніки буде зрозуміло, що численні варіації та/або модифікації винаходу можуть бути здійснені, як розкрито в конкретних варіантах, без відходу від духу або контексту винаходу в його широкому значенні. Представлені варіанти, таким чином, слід розглядати в усіх відношеннях як ілюстративні, але не обмежуючі.

У цій заявці заявлений пріоритет по US 61/660392, поданій 15 червня 2012 року, US 61/663344, поданій 22 червня 2012 року, US 61/697676, поданій 6 вересня 2012 року, і US 61/782680, поданій 14 березня 2013 року, кожна з яких включена до цього документу шляхом посилання в повному обсязі.

Всі публікації, що обговорювалися, та/або на які присутнє посилання в цьому документі, включені до цього документу в повному обсязі.

Ця заявка включає до цього документу шляхом посилання US 61/660392, подану 15 червня 2012 року, US 61/663344, подану 22 червня 2012 року, US 61/697676, подану 6 вересня 2012 року.

Будь-яке обговорення документів, дій, матеріалів, пристроїв, виробів, тощо, яке включено до цього документу, призначене виключно для цілей забезпечення контексту цього винаходу. Не слід робити припущення, що будь-які або всі ці питання утворюють частину відомого рівня техніки або являли собою загальнодоступне знання в галузі техніки, до якої відноситься це винахід, в тому вигляді, в якому воно існувало до дати пріоритету кожного з пунктів формули цієї заявки.

Джерела інформації:

Abbadi et al. (2004) Plant Cell 16: 2734-2748.
Abbott et al. (1998) Science 282:2012-2018.
Abdullah et al. (1986) Biotech. 4:1087.
Agaba et al. (2004) Marine Biotechnol. (NY) 6:251-261.
Alvarez et al. (2000) Theor Appl Genet 100:319-327.
Armbrust et al. (2004) Science 306:79-86.
Attila Kereszt et al. (2007) Nature Protocols 2:948 - 952.
Baumberger et al. (2007) Curr. Biol. 17:1609-1614.
Baumlein et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 225:459-467.
Baumlein et al. (1992) Plant J. 2:233-239.
Beaudoin et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6421-6426.
Beclin et al. (2002) Curr. Biol. 12:684-688.
Berberich. et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:297-306.
Bortolamiol et al. (2007) Curr. Biol. 17:1615-1621.
Broun et al. (1998) Plant J. 13:201-210.
Brown et al. (2002) Biochem J. 364:795-805.
Chapman et al. (2004) Gen. Dev. 18:1179-1186.
Chen et al. (2004) The Plant Cell 16:1302-1313.
Cheng et al. (1996) Plant Cell Rep. 15:653-657.
Cheng et al. (2010) Transgenic Res 19: 221-229.

Chikwamba et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:11127-11132.
Cho et al. (1999a) J. Biol. Chem. 274:471-477.
Cho et al. (1999b) J. Biol. Chem. 274:37335-37339.
Clough and Bent (1998) Plant J. 16:735-43.
Coutu et al. (2007) Transgenic Res. 16: 771-781.
Damude et al. (2006). Proc Natl Acad Sci USA 103: 9446-9451.
Denic and Weissman (2007) Cell 130:663-677.
Domergue et al (2002) Eur. J. Biochem. 269:4105-4113.
Domergue et al. (2002) Eur. J. Biochem. 269:4105-4113.
Domergue et al. (2003) J. Biol. Chem. 278: 35115-35126.
Domergue et al. (2005) Biochem. J. 1 389: 483-490.
Dunoyer et al. (2004) The Plant Cell 16:1235-1250.
Ellerstrom et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:1019-1027.
Fujimura et al. (1985) Plant Tissue Culture Lett. 2:74.
Fukunaga (2009) EMBO J. 28:545-55.
Gamez et al. (2003) Food Res International 36: 721-727.
Garcia-Maroto et al. (2002) Lipids 37:417-426.
Girke et al. (1998) Plant J. 15:39-48.
Glick et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 105-157-161.
Grant et al. (1995) Plant Cell Rep. 15:254-258.
Hall et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9320-9324
Hamilton and Baulcombe (1999) Science 286:950-952.
Hamilton et al. (1997) Gene 200:107-16.
Harayama (1998). Trends Biotechnol. 16: 76-82.
Hastings et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14304-14309.
Hinchee et al. (1988) Biotechnology 6:915-922.
Hoffmann et al. (2008) J Biol. Chem. 283:22352-22362.
Hong et al. (2002a) Lipids 37:863-868.
Horiguchi et al. (1998) Plant Cell Physiol. 39:540-544.
Horvath et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:1914-1919.
Huang et al. (1999) Lipids 34:649-659.
Inagaki et al. (2002) Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:613-621.
Johansen and Carrington (2001) Plant Physiol. 126-930-938.
Kajikawa et al. (2004) Plant Mol. Biol. 54:335-52.
Kajikawa et al. (2006) FEBS Lett 580:149-154.
Kim et al. (2005) Plant Cell. 2005 1073-89.
Knutzon et al. (1998) J. Biol Chem. 273:29360-6.
Koziel et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:393-405.
Lassner (1995) Plant Physiol. 109:1389-94.
Leonard et al. (2000) Biochem. J. 347:719-724.
Leonard et al. (2000b) Biochem. J. 350:765-770.
Leonard et al. (2002) Lipids 37:733-740.
Lewsey et al. (2007) Plant J. 50:240-252.
Lo et al. (2003) Genome Res. 13:455-466.
Lu and Kang (2008) Plant Cell Rep. 27:273-8.
Mallory et al. (2002) Nat. Biotech. 20:622-625.
Marangoni et al. (1995) Trends in Food Sci. Technol. 6: 329-335.
Meesapyodsuk et al. (2007) J Biol Chem 282: 20191-20199.
Meng et al. (2008) J. Gen. Virol. 89:2349-2358.
Meyer et al. (2003) Biochem. 42:9779-9788.
Meyer et al. (2004) Lipid Res 45:1899-1909.
Michaelson et al. (1998a) J. Biol. Chem. 273:19055-19059.
Michaelson et al. (1998b) FEBS Lett. 439:215-218.
Murashige and Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15:473-497.
Napier et al. (1998) Biochem. J. 330:611-614.
Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453.
Niedz et al. (1995) Plant Cell Reports 14:403.
Ow et al. (1986) Science 234:856-859.
Parker-Barnes et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8284-8289.
Pereira et al. (2004a) Biochem. J. 378:665-671.

Pereira et al. (2004b) Biochem. J. 384:357-366.
Perrin et al. (2000) Mol Breed 6:345-352.
Petrie et al. (2010a) Metab. Eng. 12:233-240.
Petrie et al. (2010b) Plant Methods 11:6:8.
Petrie et al. (2012) Transgenic Res. 21:139-147.
Potenza et al. (2004) In Vitro Cell Dev Biol - Plant 40:1-22.
Prasher et al (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 127:31-36.
Qi et al. (2002) FEBS Lett. 510:159-165.
Qi et al. (2004) Nat. Biotech. 22: 739-745.
Qiu et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:31561-31566.
Reddy and Thomas (1996) Nat. Biotech. 14:639-642.
Reddy et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:293-300.
Robert et al. (2005) Func. Plant Biol. 32:473-479.
Robert et al. (2009) Marine Biotech 11:410-418.
Ruiz-Lopez et al. (2012) Transgenic Res. 21:139-147.
Saha et al. (2006) Plant Physiol. 141:1533-1543.
Saito et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267:1813-1818.
Sakuradani et al. (1999) Gene 238:445-453.
Sato et al. (2004) Crop Sci. 44: 646-652.
Sakuradani et al. (2005) Appl. Microbiol. Biotechnol. 66:648-654.
Sayanova et al. (2006) J Biol Chem 281: 36533-36541.
Sayanova et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:4211-4216.
Sayanova et al. (2003) FEBS Lett. 542:100-104.
Sayanova et al. (2006) Planta 224:1269-1277.
Sayanova et al. (2007) Plant Physiol 144:455-467.
Singh et al. (2005) Curr. Opin. in Plant Biol. 8:197-203.
Speranza et al. (2012) Process Biochemistry (In Press).
Sperling et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267:3801-3811.
Sperling et al. (2001) Arch. Biochm. Biophys. 388:293-8.
Sprecher et al. (1995) J. Lipid Res. 36:2471-2477.
Spychalla et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:1142-1147.
Stalker et al. (1998) J. Biol. Chem. 263:6310-6314.
Thillet et al. (1988) J. Biol. Chem 263:12500-12508.
Tonon et al. (2003) FEBS Lett. 553:440-444.
Toriyama et al. (1986) Theor. Appl. Genet. 205:34.
Trautwein (2001) European J. Lipid Sci. and Tech. 103:45-55.
Tvrdik (2000) J. Cell Biol. 149:707-718.
Venegas-Caleron et al. (2010) Prog. Lipid Res. 49:108-119.
Voinnet et al. (2003) Plant J. 33:949-956.
Wallis and Browse (1999) Arch. Biochem. Biophys. 365:307-316.
Watts and Browse (1999b) Arch. Biochem. Biophys. 362:175-182.
Weiss et al. (2003) Int. J. Med. Microbiol. 293:95:106.
Whitney et al. (2003) Planta 217:983-992.
Winans (1988) J. Bacteriol. 170:4047-54.
Wood (2009) Plant Biotechnol J. 7:914-24.
Wu et al. (2005) Nat. Biotech. 23:1013-1017.
Yang et al. (2003) Planta 216:597-603.
Zank et al. (2002) Plant J. 31:255-268.
Zank et al. (2005) WO 2005/012316
Zhang et al. (2004) FEBS Lett. 556:81-85.
Zhang et al. (2006) 20:3255-3268.
Zhang et al. (2007a) FEBS Letters 581: 315-319.
Zhang et al. (2008) Yeast 25: 21-27.
Zhou et al. (2007) Phytochem. 68:785-796.
Zhou et al. (2008) Insect Mol Biol 17: 667-676.
Zou et al. (1997) Plant Cell. 9:909-23.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Nuseed Pty Ltd

Grain Research and Development Corporation Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> ПРОДУКУВАННЯ ДОВГОЛАНЦЮГОВИХ ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ У РОСЛИННИХ КЛІТИНАХ

<130> 513594

<150> US 61/660,392 <151> 2012-06-15

<150> US 61/663,344 <151> 2012-06-22

<150> US 61/697,676 <151> 2012-09-06

<150> US 61/782,680 <151> 2013-03-14

<160> 72

<170> Patentln версія 3.5

<210> 1

<211> 21527

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> p3P3416-GA7 нуклеотидна послідовність.

<400> 1

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttttca cgccctttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgcccccgcgg aaagcttgcg gccgcccgat ctagtaacat 240

agatgacacc gcgcgcgata atttatccta gtttgcgcgc tatattttgt tttctatcgc 300

gtattaaatg tataattgcg ggactctaat cataaaaacc catctcataa ataacgtcat 360

gcattacatg ttaattatta cgtgcttaac gtaattcaac agaaattata tgataatcat 420

cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt ttgaacgatc 480

ggcgcgcctc attagtgagc cttctcagcc tttccgttaa cgtagtagtg ctgtcccacc 540

ttatcaaggt tagagaaagt agccttccaa gcaccgtagt aagagagcac cttgtagttg 600

agtccccact tcttagcgaa aggaacgaat cttctgctaa cctcaggctg tctgaattga 660

ggcatatcag ggaagaggtg gtggataacc tgacagttaa ggtatcccat aagccagttc 720

acgtatcctc tagaaggatc gatatcaacg gtgtgatcaa cagcgtagtt aacccaagaa 780

aggtgcttat cagatggaac aacagggagg tgagtatgag aagtagagaa gtgagcgaaa 840

aggtacatgt aagcgatcca gtttccgaaa gtgaaccacc agtaagcaac aggccaagag 900

tatccagtag caagcttgat aacagcggtt ctaacaacat gagaaacgag catccaagaa 960

gcctcttcgt agttcttctt acggagaact tgtctagggt ggagaacgta gatccagaaa 1020

gcttgaacaa gaagtccaga ggtaacagga acgaaagtcc aagcttgaag tctagcccaa 1080

gctctagaga atcctctagg tctgttatcc tcaacagcag tgttgaagaa agccacagca 1140

ggagtggtat caagatccat atcgtgtcta acctttttgag gggtagcatg gtgcttgtta 1200

tgcatctggt tccacatctc accagaagta gaaagtccga atccacaagt catagcctga 1260

agtctcttgt ccacgtaaac agatccggta agagagttat gtccaccctc atgttgaacc 1320

catccacatc tagctccgaa gaaagcaccg taaacaacag aagcaatgat agggtatcca 1380

gcgtacataa gagcagttcc aagagcgaat gtagcaagaa gctcgagaag tctgtaagcc 1440

acatgggtga tagaaggctt gaagaatcca tctctctcaa gctcagcacg ccatctagcg 1500

aaatcctcaa gcataggagc atcctcagac tcagatctct tgatctcagc aggtctagaa 1560

ggcaaagctc taagcatctt ccaagccttg agagaacgca tgtggaattc tttgaaagcc 1620

tcagtagcat cagcaccagt gttagcaagc atgtagaaga tcacagatcc accagggtgc 1680

ttgaagttag tcacatcgta ctcaacgtcc tcaactctaa cccatctagt ctcgaaagta 1740

gcagcaagct catgaggctc aagagtctta agatcaacag gagcagtaga agcatcctta 1800

gcatcaagag cctcagcaga agatttagac ctggtaagtg gagatctagg agaagatctt 1860

ccatcagtct taggagggca catggtatgg taattgtaaa tgtaattgta atgttgtttg 1920

ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa agatcctcgt gtatgttttt aatcttgttt 1980

gtatcgatga gttttggttt gagtaaagag tgaagcggat gagttaattt ataggctata 2040

aaggagattt gcatggcgat cacgtgtaat aatgcatgca cgcatgtgat tgtatgtgtg 2100

tgctgtgaga gagaagctct taggtgtttg aaggggagtga caagtggcga agaaaaacaa 2160

ttctccgcgg ctgcatgcta tgtgtaacgt gtagctaatg ttctggcatg gcatcttatg 2220

aacgattctt tttaaaaaca aggtaaaaac ttaacttcat aaaattaaaa aaaaaaacgt 2280

ttactaagtt ggtttaaaag gggatgagac tagtagattg gttggttggt ttccatgtac 2340

cagaaggctt accctattag ttgaaagttg aaactttgtt ccctactcaa ttcctagttg 2400

tgtaaatgta tgtatatgta atgtgtataa aacgtagtac ttaaatgact aggagtggtt 2460

cttgagaccg atgagagatg ggagcagaac taaagatgat gacataatta agaacgaatt 2520

tgaaaggctc ttaggtttga atcctattcg agaatgtttt tgtcaaagat agtggcgatt 2580

ttgaaccaaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccggtta cgttcatgca aatagaaagt 2640

ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca atcctggctg 2700

tgtacaaaac tacaaataat atattttaga ctatttggcc ttaactaaac ttccactcat 2760

tatttactga ggttagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccgagaa atactcatga 2820

tcccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc cctcaaattt 2880

taatgcacat gtaatcatag tttagcacaa ttcaaaaata atgtagtatt aaagacagaa 2940

atttgtagac ttttttttgg cgttaaaaga agactaagtt tatacgtaca ttttatttta 3000

agtggaaaac cgaaattttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat ttctgcaatg 3060

tactatttta ctattttggc aactttcagt ggactactac tttattacaa tgtgtatgga 3120

tgcatgagtt tgagtataca catgtctaaa tgcatgcttt gtaaaacgta acggaccaca 3180

aaagaggatc catacaaata catctcatag cttcctccat tattttccga cacaaacaga 3240

gcattttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca acattacaat tacatttaca 3300

attaccatac catggaattc gcccagcctc ttgttgctat ggctcaagag caatacgctg 3360

ctatcgatgc tgttgttgct cctgctatct tctctgctac tgattctatc ggatggggac 3420

ttaagcctat ctcttctgct actaaggact tgcctcttgt tgagtctcct acacctctca 3480

tcctttcttt gcttgcttac ttcgctatcg ttggatctgg actcgtttac agaaaggttt 3540

tcccctagaac cgtgaaggga caagatccat tcctttttgaa ggctcttatg cttgctcaca 3600

acgtgttcct tatcggactt tctctttaca tgtgcctcaa gcttgtgtac gaggcttacg 3660

ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaaccctgc tcaaactgag atggctaagg 3720

ttatctggat cttctacgtg agcaagatct acgagttcat ggataccttc atcatgctcc 3780

tcaagggaaa tgttaaccag gttagcttcc ttcacgttta ccatcacgga tctatctctg 3840

gaatctggtg gatgattact tacgctgctc ctggtggtga tgcttacttc tctgctgctc 3900

ttaactcttg ggttcacgtg tgtatgtaca cctactattt tatggctgcc gtgcttccta 3960

aggacgagaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact caaatgcaga 4020

tgttccagtt cttcatgaac cttctccagg ctgtttacct tctctactct tcatctcctt 4080

accctaagtt tatcgctcag ctcctcgtgg tgtacatggt tactcttctc atgcttttcg 4140

gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgccg ggccgccgcc 4200

atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg atcgctagtg 4260

attgtcattg ttatatataa taatgttatc tttcacaact tatcgtaatg catgtgaaac 4320

tataacacat taatcctact tgtcatatga taacactctc cccatttaaa actcttgtca 4380

atttaaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaaata tattataaat tcaatcactc 4440

ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac taatttagtc 4500

tgaatagaat aattagattc tagtctcatc ccctttttaaa ccaacttagt aaacgttttt 4560

ttttttaatt ttatgaagtt aagtttttac cttgtttttta aaaagaatcg ttcataagat 4620

gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag aattgttttt 4680

cttcgccact tgtcactccc ttcaaacacc taagagcttc tctctcacag cacacacata 4740

caatcacatg cgtgcatgca ttattacacg tgatcgccat gcaaatctcc tttatagcct 4800

ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat acaaacaaga 4860

ttaaaaacat acacgaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac 4920

attacaatta catttacaat taccatacca tgcctccaag ggactcttac tcttatgctg 4980

ctcctccttc tgctcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac aagaaagagc 5040

ttgttatcgg agatagggct tacgatgtta ccaacttcgt taagagacac cctggtggaa 5100

agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag ttccatgtta 5160

gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctcttccttc tcgtcctgtt cacaagggat 5220

actctccaag aagggctgat cttatcgctg atttccaaga gttcaccaag caacttgagg 5280

ctgagggaat gttcgagcct tctcttcctc atgttgctta cagacttgct gaggttatcg 5340

ctatgcatgt tgctggtgct gctcttatct ggcatggata cactttcgct ggaatcgcta 5400

tgcttggagt tgttcaggga agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga cattactctc 5460

tcactggaaa cattgctttc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga cttggatgtg 5520

gaatgtctgg tgcttggtgg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact cctcaaaagc 5580

ttcagcacga tgttgatctt gatacccttc ctctcgttgc tttccatgag agaatcgctg 5640

ctaaggttaa gtctcctgct atgaaggctt ggctttctat gcaagctaag cttttcgctc 5700

ctgttaccac tcttcttgtt gctcttggat ggcagcttta ccttcatcct agacacatgc 5760

tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgctcggaat cagatacgga cttgttggat 5820

accttgctgc taactacggt gctggatacg ttctcgcttg ttaccttctt tacgttcagc 5880

ttggagctat gtacatcttc tgcaacttcg ctgtttctca tactcacctc cctgttgttg 5940

agcctaacga gcatgctact tgggttgagt acgctgctaa ccacactact aactgttctc 6000

catcttggtg gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag caccaccttt 6060

acccttctat gcctcaattc agacacccta agatcgctcc tagagttaag cagcttttcg 6120

agaagcacgg acttcactac gatgttagag gatacttcga ggctatggct gatactttcg 6180

ctaaccttga taacgttgcc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga gatcgttcaa 6240

acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggtcttgcg atgattatca 6300

tataatttct gttgaattac gttaagcacg taataattaa catgtaatgc atgacgttat 6360

ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa 6420

acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag 6480

atcggtcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat tgagtaaaac 6540

aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct ttaagacttt 6600

ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat 6660

ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattggttg tacgatcact 6720

ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt catatgtcaa 6780

aatctatcaa aattcttata tatcttttte gaatttgaag tgaaatttcg ataatttaaa 6840

attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta attactaaat 6900

ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa 6960

tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta 7020

aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat 7080

taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc ggcaaaaccg 7140

aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccg aaccaactcg 7200

gtccatttgc acccctaatc ataatagctt taatatttca agatattatt aagttaacgt 7260

tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt 7320

aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa atatcccaag 7380

tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa 7440

agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaaata 7500

cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tatttttgt tcttaaacaa gcatcccctc 7560

taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatttt 7620

ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtgatagaa cccacacgag catgtgcttt 7680

ccatttaatt ttaaaaacca agaaacatac atacataaca ttccatcagc ctctctctct 7740

ttttattacg gttaatgact taaaacacat cttattatcc catccttaac acctagcagt 7800

gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg ctgcccctgg 7860

agctggcatc ggctaggctg ggtgccgcac tgtcccggaa ggtccctagc gacttgttta 7920

gattgatggg accacctctc aacttcctgc tgctgtccct gctgctggat gtcctgcctc 7980

atctggccga ttgcacgctc cagtcccctg catgtgcact cgctcctcaa ttgcttaaga 8040

tcatcgcagc agctatcgaa gtgctggctc tgttgccctc ctccacggcc ttggttgtag 8100

tagtagctgc cgccgccctt ctggacttttt tcccacagga accgccgaat aattcgatag 8160

aaccacacga gcatgtgctt tcatttattt taaaaaccaa gaaacataca taacatttca 8220

tcagcctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctttta 8280

ttacagctgt tacactaact taaaacacat tcatctcatt attattatta ttatccatcc 8340

ttaacaccta gcagtgtctt tgtacgatct cataatcgat caccccttca tcaggtatcc 8400

ttaggcttca ctccaacgtt gttgcagtta cggaacatgt acacaccatc atggttctca 8460

acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaaccc acatgttctc atcggtgtgt 8520

ctgtagtgct ctcccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc atggtagaat 8580

gggatccttg aaacgtagtg atggagcaca tgagtctcga tgatgtcatg gaagatgatt 8640

ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa agtccactct 8700

tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac gaaaacaagc 8760

cagtggttaa caaggatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca gaatccgaaa 8820

accttgtaag cggtgtaaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc agaaagaacg 8880

atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg agacttgaag 8940

aacttagaaa caccagggta aggttgtcca gtagcgttag tagcaaggta aagagaaagt 9000

cctccaagct gttggaacaa gagagcgaaa acagagtaga taggagtttc ctcagcgata 9060

tcgtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcggtgta aggaacgaaa 9120

accatatctc tggtcatgtg tccagtagcc ttatggtgct tagcatgaga gaacttccag 9180

ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaacccatc caacggtatc gttaacccat 9240

ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat tccgaatccg 9300

aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa ttcgttaggg 9360

agaagaggga tgtaggtaag tccaacgtaa gcgatagcag agatagccac gatatctctc 9420

accacgtaag acatagactt cacgagagat ctctcgtaac agtgcttagg gatagcgtca 9480

aggatatcct tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt ttccgaaggt atcgatagcg 9540

gtcttttgct gcttgaaaga tgcaacgttt ccagaacgcc taacggtctt agtagatccc 9600

tcaaggatct cagatccaga cacggtaacc ttagacatgg tatggtaatt gtaaatgtaa 9660

ttgtaatgtt gtttgttgtt tgttgttgtt ggtaattgtt gtaaaatttt tggtggtgat 9720

tggttcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggtttggt gagattgggg 9780

atggtgggtt tatatagtgg agactgagga atggggtcgt gagtgttaac tttgcatggg 9840

ctacacgtgg gttcttttgg gcttacacgt agtattattc atgcaaatgc agccaataca 9900

tatacggtat tttaataatg tgtgggaata caatatgccg agtattttac taattttggc 9960

aatgacaagt gtacatttgg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat ttggattatt 10020

tttattctct taccttggcc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca gaattgaatg 10080

gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat taacgtcgaa 10140

ggaaaatact gattctctca agcatacgga caagggtaaa taacatagtc accagaacat 10200

aataaacaaa aagtgcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt caggttcata 10260

ttggaaacat cattatccta gtcttgtgac catccttcct cctgctctag ttgagaggcc 10320

ttgggactaa cgagaggtca gttgggatag cagatcctta tcctggacta gcctttctgg 10380

tgtttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga agatgactct 10440

tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc tggcttgcaa 10500

tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgttt gctgatttag 10560

agctcccggt tgggtgattt gacttcgatt tcagtttagg cttgttgaaa tttttcaggt 10620

tccattgtga agcctttaga gcttgagctt ccttccatgt taatgccttg atcgaatact 10680

cctagagaaa agggaagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat tttttttcaa 10740

cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatac ttatactgac 10800

aagtaatagt cttaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg ggttttccga 10860

catccataac gacccgaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg ttcttcttgt 10920

catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc tccgcaaaat 10980

attcgaacgg caagttatgg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc aggacctatt 11040

gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtggttgtca gcaaaccaat gaccgaaatc 11100

catcacatga cggacgtcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc tatctttcag 11160

agtcgtgagc tccacaccgg attccggcaa ctacgtgttg ggcaggcttc gccgtattag 11220

agatatgttg aggcagaccc atctgtgcca ctcgtacaat tacgagagtt gttttttttg 11280

tgattttcct agtttctcgt tgatggtgag ctcatattct acatcgtatg gtctctcaac 11340

gtcgtttcct gtcatctgat atcccgtcat ttgcatccac gtgcgccgcc tcccgtgcca 11400

agtcgctagg tgtcatgcac gccaaattgg tggtggtgcg ggctgccctg tgcttcttac 11460

cgatgggtgg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt gacggtttgg 11520

tgtgggttga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attctttggc agaaaacaat 11580

tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat tccaacagag 11640

ttacatctct taagaaataa tgtaaccccc ttagacttta tatatttgca attaaaaaaa 11700

taatttaact tttagacttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca ctctattatt 11760

tatatcgaaa ctatttgtat gtctcccctc taaataaact tggtattgtg tttacagaac 11820

ctataatcaa ataatcaata ctcaactgaa gtttgtgcag ttaattgaag ggattaacgg 11880

ccaaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat ttccatcaat 11940

atcatcgccg ttcttcttct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga cacctgcact 12000

tcattgtcct tattacgtgt tacaaaatga aacccatgca tccatgcaaa ctgaagaatg 12060

gcgcaagaac ccttcccctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac catctcccgc 12120

tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat ccatccaaaa 12180

gatacccact tttacaacaa ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat tacaattaca 12240

tttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct tctactggtg 12300

ttcatgctgg tgttactgac tcttctgctt tcaccagaaa ggatgttgct gatagacctg 12360

atctcaccat cgttggagat tctgtttacg atgctaaggc tttcagatct gagcatcctg 12420

gtggtgctca tttcgtttct ttgttcggag gaagagatgc tactgaggct ttcatggaat 12480

accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttgga tctcttgctt 12540

ctactgagga acctgttgct gctgatgagg gtaccttca actttgtgct aggatcgcta 12600

agatggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctcctgcttc ttactgggtt aaggctggac 12660

ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgctgga aagagacttc 12720

tcccttctat cgttcttgga tggcttttcg ctcttatcgg tcttaacatc cagcatgatg 12780

ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgctt ctgttaacct tgctcttgga ctttgtcagg 12840

attggatcgg aggatctatg atcctttggc ttcaagagca tgttgttatg caccacctcc 12900

acactaacga tgttgataag gatcctgatc aaaaggctca cggtgctctt agactcaagc 12960

ctactgatgc ttggtcacct atgcattggc ttcagcatct ttacctttg cctggtgaga 13020

ctatgtacgc tttcaagctt ttgttcctcg acatctctga gcttgttatg tggcgttggg 13080

agggtgagcc tatctctaag cttgctggat acctctttat gccttctttg cttctcaagc 13140

ttaccttctg ggctagattc gttgctttgc ctctttacct tgctccttct gttcatactg 13200

ctgtgtgtat cgctgctact gttatgactg gatctttcta cctcgctttc ttcttcttca 13260

tctcccacaa cttcgagggt gttgcttctg ttggacctga tggatctatc acttctatga 13320

ctagaggtgc tagcttcctt aagagacaag ctgagacttc ttctaacgtt ggaggacctc 13380

ttcttgctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcacttg ttccctagag 13440

ttcaccatgg attctaccct agacttgctc ctcttgttaa ggctgagctt gaggctagag 13500

gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtctaacct tgcttctacc ctcagacata 13560

tgtacgctct tggaagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct tatgtgacgt 13620

gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa agtgagaatg 13680

aggggaaggg gaaatgtgta atgagccagt agccggtggt gctaattttg tatcgtattg 13740

tcaataaatc atgaattttg tggtttttat gtgtttttttt aaatcatgaa ttttaaattt 13800

tataaaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatatc catgcatgga tgtttcttta 13860

cccaaatcta gttcttgaga ggatgaagca tcaccgaaca gttctgcaac tatccctcaa 13920

aagctttaaa atgaacaaca aggaacagag caacgttcca aagatcccaa acgaaacata 13980

ttatctatac taatactata ttattaatta ctactgcccg gaatcacaat ccctgaatga 14040

ttcctattaa ctacaagcct tgttggcggc ggagaagtga tcggcgcggc gagaagcagc 14100

ggactcggag acgaggcctt ggaagatctg agtcgaacgg gcagaatcag tattttcctt 14160

cgacgttaat tgatcctaca ctatgtaggt catatccatc gttttaattt ttggccacca 14220

ttcaattctg tcttgccttt agggatgtga atatgaacgg ccaaggtaag agaataaaaa 14280

taatccaaat taaagcaaga gaggccaagt aagataatcc aaatgtacac ttgtcattgc 14340

caaaattagt aaaatactcg gcatattgta ttcccacaca ttattaaaat accgtatatg 14400

tattggctgc atttgcatga ataatactac gtgtaagccc aaaagaaccc acgtgtagcc 14460

catgcaaagt taacactcac gaccccattc ctcagtctcc actatataaa cccaccatcc 14520

ccaatctcac caaacccacc acacaactca caactcactc tcacacctta aagaaccaat 14580

caccaccaaa aatttttacaa caattaccaa caacaacaaa caacaaacaa cattacaatt 14640

acatttacaa ttaccatacc atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca 14700

gaggatcttc tagcaacacc gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa 14760

acgtgttctc tgttcctgat ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt 14820

gttacgagag aagattggct acctctctct actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc 14880

ttaccaccgg ataccttacc cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacacctcta 14940

acagcatcat caagttcact ttctgggccc tttacactta cgttcaagga cttttcggaa 15000

ccggaatctg ggttctcgct catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg 15060

tgaacgattt cgttggatgg acccttcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga 15120

agtactctca tggaaagcac cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg 15180

ttcctgccac caaagaggaa ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctcgctgagt 15240

actctgagga ttctccactt agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat 15300

ggatcgctta cctcttcgtt aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt ccttcttgga 15360

aatggaacca cttctggctt acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct 15420

tcctttctga tcttggaatc ctcacccagg gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat 15480

tcggaggatg gtccctttcc atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aaccactggc 15540

tcgttttcat cacattcctt cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg 15600

aatggacttt cgctaagggt gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcatcggac 15660

ctcacatctt ccatgatatc atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc 15720

cattctacaa cgctagacct gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca 15780

ggtctagcga cgagaacatg tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg 15840

ttgacggtga taacggtgtt ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg 15900

ctgagaagta atgaaggggt gatcgattat gagatcgtac aaagacactg ctaggtgtta 15960

aggatggata ataataataa taatgagatg aatgtgtttt aagttagtgt aacagctgta 16020

ataaagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagaggctg 16080

atgaaatgtt atgtatgttt cttggttttt aaaataaatg aaagcacatg ctcgtgtggt 16140

tctatcgaat tattcggcgg ttcctgtggg aaaaagtcca gaagggccgc cgcagctact 16200

actacaacca aggccgtgga ggagggcaac agagccagca cttcgatagc tgctgcgatg 16260

atcttaagca attgaggagc gagtgcacat gcaggggact ggagcgtgca atcggccaga 16320

tgaggcagga catccagcag cagggacagc agcaggaagt tgagaggtgg tcccatcaat 16380

ctaaacaagt cgctagggac cttccgggac agtgcggcac ccagcctagc cgatgccagc 16440

tccaggggca gcagcagtct gcatggtttt gaagtggtga tcgatgagat cgtataaaga 16500

cactgctagg tgttaaggat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa ccgtaataaa 16560

aagagagaga ggctgatgga atgttatgta tgtatgtttc ttggttttta aaattaaatg 16620

gaaagcacat gctcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata tttggtctaa 16680

tttagtttgg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aaatataaat atatagtttt 16740

tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct agaaatattt 16800

gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt tattaacttt 16860

aaataattgg ttgtacgatc actttcttat caagtgttac taaaatgcgt caatctcttt 16920

gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt ttcgaatttg 16980

aagtgaaatt tcgataattt aaaattaaat agaacatatc attatttagg tatcatattg 17040

atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa cgaaaaatta 17100

gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc tataagaata 17160

ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaa ttaattttta ctaacacata tatttactta 17220

tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaa aaaccagaaa 17280

atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt tggtttgatt 17340

ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcaccccta atcataatag ctttaatatt 17400

tcaagatatt attaagttaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa tgaatcaagc 17460

ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat gtaatttact 17520

tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg ttagctacga 17580

tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa atatacgaag 17640

gaacaaatat ttttaaaaaa atacgcaatg acttggaaca aaagaaagtg atatattttt 17700

tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg taactattat 17760

gctcccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa aatagtcctg 17820

caggctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct attagttgaa 17880

agttgaaact ttgttcccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat atgtaatgtg 17940

tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc 18000

agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg tttgaatcct 18060

attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa 18120

atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggtct aggatctgat tgtaatttta 18180

gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt 18240

ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcattattt actgaggtta gagaatagac 18300

ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca gagggtatgc 18360

caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag 18420

cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt tttggcgtta 18480

aaagaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa ttttccatcg 18540

aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt 18600

tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt 18660

ctaaatgcat gctttgtaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct 18720

catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcatt ttacaacaat taccaacaac 18780

aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcgc 18840

tatccctgct gctcttgctg gaactcttgg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga 18900

tatcccagct tctgagaaag ttcctgctta cttcatgcag gttgagtact ggggacctac 18960

tatcggaact attggatacc tcctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag 19020

atctcaacct ttcggactca agaacgctat gctcgtttac aacttctacc agaccttctt 19080

caacagctac tgcatctacc ttttcgttac ttctcatagg gctcagggac ttaaggtttg 19140

gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggtta tctggcttca 19200

ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga caccttcttc atggtgatga ggaagaagtt 19260

cgaccagctt tctttccttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catggttcgt 19320

tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgtta acaccttcgt 19380

gcacgtgatc atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagttaact gtttctggaa 19440

gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta 19500

caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttccttac cttcaactct gggttatggt 19560

gaacatgttc gttctcttcg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta agggtgctaa 19620

gaagcagtga taagggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagtg taataagacg 19680

actctcacta ctcgatcgct agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac 19740

aacttatcgt aatgcatgtg aaactataac acattaatcc tacttgtcat atgataacac 19800

tctccccatt taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttctttaaat gattaaaaaa 19860

aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa 19920

aaaaatactt atactaattt agtctgaata gaataattag attctagcct gcagggcggc 19980

cgcggatccc atggagtcaa agattcaaat agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac 20040

tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa 20100

catggtggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatatc aaagatacag tctcagaaga 20160

ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca 20220

ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaggtg gctcctacaa 20280

atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtggtcc 20340

caaagatgga cccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc 20400

ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca 20460

ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg agagaacacg 20520

ggggactgaa ttaaatatga gccctgagag gcgtcctgtt gaaatcagac ctgctactgc 20580

tgctgatatg gctgctgttt gtgatatcgt gaaccactac atcgagactt ctaccgttaa 20640

cttcagaact gagcctcaaa ctcctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga 20700

tagataccct tggcttgttg ctgaggttga gggtgttgtt gctggaatcg cttacgctgg 20760

accttggaag gctagaaacg cttacgattg gactgttgag tctaccgttt acgtttcaca 20820

cagacatcag agacttggac ttggatctac cctttacact caccttctca agtctatgga 20880

agctcaggga ttcaagtctg ttgttgctgt tatcggactc cctaacgatc cttctgttag 20940

acttcatgag gctcttggat acactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca 21000

cggtggatgg catgatgttg gattctggca aagagatttc gagcttcctg ctcctcctag 21060

acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgatc gttcaaacat ttggcaataa 21120

agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 21180

aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 21240

tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 21300

gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatca ctagtgatgt 21360

acggttaaaa ccacccccagt acattaaaaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 21420

cgtcaatttg tttacaccac aatatatcct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 21480

gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagtcc 21527

<210> 2
<211> 23512
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> pGA7-mod_B нуклеотидна послідовність
<400> 2

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttttca cgcccttttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgcccccgcgg aaagcttgcg gccgcggtac cgcccgttcg 240

actcagatct tccaaggcct cgtctccgag tccgctgctt ctcgccgcgc cgatcacttc 300

tccgccgcca acaaggcttg tagttaatag gaatcattca gggattgtga ttccgggcag 360

tagtaattaa taatatagta ttagtataga taatatgttt cgtttgggat ctttggaacg 420

ttgctctgtt ccttgttgtt cattttaaag cttttgaggg atagttgcag aactgttcgg 480

tgatgcttca tcctctcaag aactagattt gggtaaagaa acatccatgc atggatatgg 540

aatgttgttc ttccgattgg agattatttt ataaaattta aaattcatga tttaaaaaaa 600

cacataaaaa ccacaaaatt catgatttat tgacaatacg atacaaaatt agcaccaccg 660

gctactggct cattacacat ttccccttcc cctcattctc actttgtggc tttattatta 720

ttattattac atatatttta ccgttattat ttcacgtcac ataagcttgt taattaatca 780

ttagtgagcc ttctcagcct ttccgttaac gtagtagtgc tgtcccacct tatcaaggtt 840

agagaaagta gccttccaag caccgtagta agagagcacc ttgtagttga gtccccactt 900

cttagcgaaa ggaacgaatc ttctgctaac ctcaggctgt ctgaattgag gcatatcagg 960

gaagaggtgg tggataacct gacagttaag gtatcccata agccagttca cgtatcctct 1020

agaaggatcg atatcaacgg tgtgatcaac agcgtagtta acccaagaaa ggtgcttatc 1080

agatggaaca acagggaggt gagtatgaga agtagagaag tgagcgaaaa ggtacatgta 1140

agcgatccag tttccgaaag tgaaccacca gtaagcaaca ggccaagagt atccagtagc 1200

aagcttgata acagcggttc taacaacatg agaaacgagc atccaagaag cctcttcgta 1260

gttcttctta cggagaactt gtctagggtg gagaacgtag atccagaaag cttgaacaag 1320

aagtccagag gtaacaggaa cgaaagtcca agcttgaagt ctagcccaag ctctagagaa 1380

tcctctaggt ctgttatcct caacagcagt gttgaagaaa gccacagcag gagtggtatc 1440

aagatccata tcgtgtctaa ccttttgagg ggtagcatgg tgcttgttat gcatctggtt 1500

ccacatctca ccagaagtag aaagtccgaa tccacaagtc atagcctgaa gtctcttgtc 1560

cacgtaaaca gatccggtaa gagagttatg tccaccctca tgttgaaccc atccacatct 1620

agctccgaag aaagcaccgt aaacaacaga agcaatgata gggtatccag cgtacataag 1680

agcagttcca agagcgaatg tagcaagaag ctcgagaagt ctgtaagcca catgggtgat 1740

agaaggcttg aagaatccat ctctctcaag ctcagcacgc catctagcga aatcctcaag 1800

cataggagca tcctcagact cagatctctt gatctcagca ggtctagaag gcaaagctct 1860

aagcatcttc caagccttga gagaacgcat gtggaattct ttgaaagcct cagtagcatc 1920

agcaccagtg ttagcaagca tgtagaagat cacagatcca ccagggtgct tgaagttagt 1980

cacatcgtac tcaacgtcct caactctaac ccatctagtc tcgaaagtag cagcaagctc 2040

atgaggctca agagtcttaa gatcaacagg agcagtagaa gcatccttag catcaagagc 2100

ctcagcagaa gatttagacc tggtaagtgg agatctagga gaagatcttc catcagtctt 2160

aggagggcac atggtatggt aattgtaaat gtaattgtaa tgttgtttgt tgtttgttgt 2220

tgttggtaat tgttgtaaaa ttaattaagt gggtatcttt tggatggata agcaagtagt 2280

gatgatgttc taggtgaagt gatgggggtg ttttatagcg ggagatggtg aaatggatgg 2340

tcgccacata agaaatggag gggaagggtt cttgcgccat tcttcagttt gcatggatgc 2400

atgggtttca ttttgtaaca cgtaataagg acaatgaagt gcaggtgtct ctcaagtttc 2460

agaggggata tgtggacaga agaagaacgg cgatgatatt gatggaaatg gccatctagt 2520

gtgaatctat tcggttgata atactagtgc attttggccg ttaatccctt caattaactg 2580

cacaaacttc agttgagtat tgattatttg attataggtt ctgtaaacac aataccaagt 2640

ttatttagag gggagacata caaatagttt cgatataaat aatagagtgg ttaaacttag 2700

ttattaaaac tatatataaa gtctaaaagt taaattattt ttttaattgc aaatatataa 2760

agtctaaagg ggttacatta tttcttaaga gatgtaactc tgttggaatc tgacttaatc 2820

cgtctcatca ctctggtttc cagttctaat ctaatgaatt gttttctgcc aaagaatttg 2880

aagcaagaag taaattgatc aatgccgtca acccacacca aaccgtcaac ccactaccat 2940

cgccgcggag acccccaaac tcaacctcca cccatcggta agaagcacag ggcagcccgc 3000

accaccacca atttggcgtg catgacacct aggggacttgg cacgggaggc ggcgcacgtg 3060

gatgcaaatg acgggatatc agatgacagg aaacgacgtt gagagaccat acgatgtaga 3120

atatgagctc accatcaacg agaaactagg aaaatcacaa aaaaaacaac tctcgtaatt 3180

gtacgagtgg cacagatggg tctgcctcaa catatctcta atacggcgaa gcctgcccaa 3240

cacgtagttg ccggaatccg gtgtggagct cacgactctg aaagataggc gcttcctgtt 3300

tcgtttcgct cacccactgg acgtccgtca tgtgatggat ttcggtcatt ggtttgctga 3360

caaccacatt ctgaagctcc atgagatgag tcttcacaat aggtcctgct caataccgtg 3420

gagttatggt tgcaagtcca taacttgccg ttcgaatatt ttgcggagcc agtcggacgg 3480

gaattggcga gctcggctga cacctataaa ggccatgaca agaagaacca aaagttcttc 3540

cctaatgctt tcatgaggct tcgggtcgtt atggatgtcg gaaaacccct cttgaaggaa 3600

cgagacgtta ttatgcatga cggtaagact attacttgtc agtataagta tgaaagatta 3660

cctgtcttct gctttgtttg tggattgatt ggacacgttg aaaaaaaatg tgcacttcga 3720

tttcaatact cagagatcga cttccctttt ctctaggagt attcgatcaa ggcattaaca 3780

tggaaggaag ctcaagctct aaaggcttca caatggaacc tgaaaaattt caacaagcct 3840

aaactgaaat cgaagtcaaa tcacccaacc gggagctcta aatcagcaaa cactcctcct 3900

ccacagtatc caatcatcgt gcacgatgct ccaggtattg caagccaggt attgcaagct 3960

aggagtagga tagagacctt aaacgtcgtt ggtgtgaaga gtcatcttca gacctaatgg 4020

agatagatgt agacggcggc acgaagactc tgaaacacca gaaaggctag tccaggataa 4080

ggatctgcta tcccaactga cctctcgtta gtcccaaggc ctctcaacta gagcaggagg 4140

aaggatggtc acaagactag gataatgatg tttccaatat gaacctgaat gtccatagct 4200

aatttttta gtcttgcttc tgcacttttt gtttattatg ttctggtgac tatgttattt 4260

acccttgtcc gtatgcttga gggtacccta gtagattggt tggttggttt ccatgtacca 4320

gaaggcttac cctattagtt gaaagttgaa actttgttcc ctactcaatt cctagttgtg 4380

taaatgtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aaatgactag gagtggttct 4440

tgagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag aacgaatttg 4500

aaaggctctt aggtttgaat cctattcgag aatgtttttg tcaaagatag tggcgatttt 4560

gaaccaaaga aaacatttaa aaaatcagta tccggttacg ttcatgcaaa tagaaagtgg 4620

tctaggatct gattgtaatt ttagacttaa agagtctctt aagattcaat cctggctgtg 4680

tacaaaacta caaataatat attttagact atttggcctt aactaaactt ccactcatta 4740

tttactgagg ttagagaata gacttgcgaa taaacacatt cccgagaaat actcatgatc 4800

ccataattag tcagagggta tgccaatcag atctaagaac acacattccc tcaaatttta 4860

atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa agacagaaat 4920

ttgtagactt ttttttggcg ttaaaagaag actaagttta tacgtacatt ttatttaag 4980

tggaaaaccg aaattttcca tcgaaatata tgaatttagt atatatattt ctgcaatgta 5040

ctattttgct attttggcaa ctttcagtgg actactactt tattacaatg tgtatggatg 5100

catgagtttg agtatacaca tgtctaaatg catgctttgt aaaacgtaac ggaccacaaa 5160

agaggatcca tacaaataca tctcatagct tcctccatta ttttccgaca caaacagagc 5220

attttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta catttacaat 5280

taccatacca tggcctctat cgctatccct gctgctcttg ctggaactct tggatacgtt 5340

acctacaatg tggctaaccc tgatatccca gcttctgaga aagttcctgc ttacttcatg 5400

caggttgagt actggggacc tactatcgga actattggat acctcctctt catctacttc 5460

ggaaagcgta tcatgcagaa cagatctcaa cctttcggac tcaagaacgc tatgctcgtt 5520

tacaacttct accagacctt cttcaacagc tactgcatct acctttttcgt tacttctcat 5580

agggctcagg gacttaaggt ttggggaaac atccctgata tgactgctaa ctcttgggga 5640

atctctcagg ttatctggct tcactacaac aacaagtacg ttgagcttct cgacaccttc 5700

ttcatggtga tgaggaagaa gttcgaccag ctttctttcc ttcacatcta ccaccacact 5760

cttctcatct ggtcatggtt cgttgttatg aagcttgagc ctgttggaga ttgctacttc 5820

ggatcttctg ttaacacctt cgtgcacgtg atcatgtact cttactacgg acttgctgct 5880

cttggagtta actgtttctg gaagaagtac atcacccaga tccagatgct tcagttctgt 5940

atctgtgctt ctcactctat ctacaccgct tacgttcaga ataccgcttt ctggcttcct 6000

taccttcaac tctgggttat ggtgaacatg ttcgttctct tcgccaactt ctaccgtaag 6060

aggtacaagt ctaagggtgc taagaagcag tgataaggcg cgcggcgcgc cgggccgccg 6120

ccatgtgaca gatcgaagga agaaagtgta ataagacgac tctcactact cgatcgctag 6180

tgattgtcat tgttatatat aataatgtta tctttcacaa cttatcgtaa tgcatgtgaa 6240

actataacac attaatccta cttgtcatat gataacactc tccccattta aaactcttgt 6300

caatttaaag atataagatt ctttaaatga ttaaaaaaaa tatattataa attcaatcac 6360

tcctactaat aaattattaa ttattattta ttgattaaaa aaatacttat actaatttag 6420

tctgaataga ataattagat tctagtctca tccccttta aaccaactta gtaaacgttt 6480

ttttttttaa ttttatgaag ttaagttttt accttgtttt taaaaagaat cgttcataag 6540

atgccatgcc agaacattag ctacacgtta cacatagcat gcagccgcgg agaattgttt 6600

ttcttcgcca cttgtcactc ccttcaaaca cctaagagct tctctctcac agcacacaca 6660

tacaatcaca tgcgtgcatg cattattaca cgtgatcgcc atgcaaatct cctttatagc 6720

ctataaatta actcatccgc ttcactcttt actcaaacca aaactcatcg atacaaacaa 6780

gattaaaaac atacacgagg atcttttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca 6840

acattacaat tacatttaca attaccatac catgcctcca agggactctt actcttatgc 6900

tgctcctcct tctgctcaac ttcacgaagt tgatactcct caagagcacg acaagaaaga 6960

gcttgttatc ggagataggg cttacgatgt taccaacttc gttaagagac accctggtgg 7020

aaagatcatt gcttaccaag ttggaactga tgctaccgat gcttacaagc agttccatgt 7080

tagatctgct aaggctgaca agatgcttaa gtctcttcct tctcgtcctg ttcacaaggg 7140

atactctcca agaagggctg atcttatcgc tgatttccaa gagttcacca agcaacttga 7200

ggctgaggga atgttcgagc cttctcttcc tcatgttgct tacagacttg ctgaggttat 7260

cgctatgcat gttgctggtg ctgctcttat ctggcatgga tacactttcg ctggaatcgc 7320

tatgcttgga gttgttcagg gaagatgtgg atggcttatg catgagggtg gacattactc 7380

tctcactgga aacattgctt tcgacagagc tatccaagtt gcttgttacg gacttggatg 7440

tggaatgtct ggtgcttggt ggcgtaacca gcataacaag caccatgcta ctcctcaaaa 7500

gcttcagcac gatgttgatc ttgataccct tcctctcgtt gctttccatg agagaatcgc 7560

tgctaaggtt aagtctcctg ctatgaaggc ttggctttct atgcaagcta agcttttcgc 7620

tcctgttacc actcttcttg ttgctcttgg atggcagctt taccttcatc ctagacacat 7680

gctcaggact aagcactacg atgagcttgc tatgctcgga atcagatacg gacttgttgg 7740

ataccttgct gctaactacg gtgctggata cgttctcgct tgttaccttc tttacgttca 7800

gcttggagct atgtacatct tctgcaactt cgctgtttct catactcacc tccctgttgt 7860

tgagcctaac gagcatgcta cttgggttga gtacgctgct aaccacacta ctaactgttc 7920

tccatcttgg tggtgtgatt ggtggatgtc ttaccttaac taccagatcg agcaccacct 7980

ttacccttct atgcctcaat tcagacaccc taagatcgct cctagagtta agcagctttt 8040

cgagaagcac ggacttcact acgatgttag aggatacttc gaggctatgg ctgatacttt 8100

cgctaacctt gataacgttg cccatgctcc tgagaagaaa atgcagtaat gagatcgttc 8160

aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggtcttg cgatgattat 8220

catataattt ctgttgaatt acgttaagca cgtaataatt aacatgtaat gcatgacgtt 8280

atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcgataga 8340

aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gcggtgtcat ctatgttact 8400

agatcggtcg attaaaaatc ccaattatat ttggtctaat ttagtttggt attgagtaaa 8460

acaaattcga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact 8520

tttatagaa ttttctttaa aaaatatcta gaaatatttg cgactcttct ggcatgtaat 8580

atttcgttaa atatgaagtg ctccatttt attaacttta aataattggt tgtacgatca 8640

ctttcttatc aagtgttact aaaatgcgtc aatctctttg ttcttccata ttcatatgtc 8700

aaaatctatc aaaattctta tatatctttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta 8760

aaattaaata gaacatatca ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa 8820

atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata 8880

aatatcatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg 8940

taaaaaaaat taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag 9000

attaaaataa tattcatcta acaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaac ccggcaaaac 9060

cgaaccaatc caaaccgata tagttggttt ggtttgattt tgatataaac cgaaccaact 9120

cggtccattt gcacccctaa tcataatagc tttaatattt caagatatta ttaagttaac 9180

gttgtcaata tcctggaaat tttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat 9240

ttaaaagcag ctcgatgtgg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca 9300

agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac 9360

aaagaaccat aaagtgattg aagctcgaaa tatacgaagg aacaaatatt tttaaaaaaa 9420

tacgcaatga cttggaacaa aagaaagtga tatatttttt gttcttaaac aagcatcccc 9480

tctaaagaat ggcagttttc ctttgcatgt aactattatg ctcccttcgt tacaaaaatt 9540

ttggactact attgggaact tcttctgaaa atagtgatag aacccacacg agcatgtgct 9600

ttccatttaa ttttaaaaac caagaaacat acatacataa cattccatca gcctctctct 9660

ctttttatta cggttaatga cttaaaacac atcttattat cccatcctta acacctagca 9720

gtgtctttat acgatctcat cgatcaccac ttcaaaacca tgcagactgc tgctgccctt 9780

ggagctggca tcggctaggc tgggtgccgc actgtcccgg aaggtcccta gcgacttgtt 9840

tagattgatg ggaccacctc tcaacttcct gctgctgtcc ctgctgctgg atgtcctgcc 9900

tcatctggcc gattgcacgc tccagtcccc tgcatgtgca ctcgctcctc aattgcttaa 9960

gatcatcgca gcagctatcg aagtgctggc tctgttgccc tcctccacgg ccttggttgt 10020

agtagtagct gccgccgccc ttctggactt tttcccacag gaaccgccga ataattcgat 10080

agaaccacac gagcatgtgc tttcatttat tttaaaaacc aagaaacata cataacattt 10140

catcagcctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctt 10200

tattacagct gttacactaa cttaaaacac attcatctca ttattattat tattatccat 10260

ccttaacacc tagcagtgtc tttgtacgat ctcataatcg atcacccctt catcaggtat 10320

ccttaggctt cactccaacg ttgttgcagt tacggaacat gtacacacca tcatggttct 10380

caacgaactg gcaagatctc caagttttcc aaaggctaac ccacatgttc tcatcggtgt 10440

gtctgtagtg ctctcccata actttcttga tgcactcggt agcttctcta gcatggtaga 10500

atgggatcct tgaaacgtag tgatggagca catgagtctc gatgatgtca tggaagatga 10560

ttccgaggat tccgaactct ctatcgatag tagcagcagc acccttagcg aaagtccact 10620

cttgagcatc gtaatgaggc atagaagaat cggtgtgctg aaggaaggta acgaaaacaa 10680

gccagtggtt aacaaggatc caaggacaga accatgtgat gaaagtaggc cagaatccga 10740

gaaccttgta agcggtgtaa acagaagtga gggtagcaag gattccaaga tcagaaagaa 10800

cgatgtacca gtagtccttc ttatcgaaaa cagggctaga aggccagtag tgagacttga 10860

agaacttaga aacaccaggg taaggttgtc cagtagcgtt agtagcaagg taaagagaaa 10920

gtcctccaag ctgttggaac aagagagcga aaacagagta gataggagtt tcctcagcga 10980

tatcgtgaag gctggtaact tggtgcttct ctttgaattc ctcggcggtg taaggaacga 11040

aaaccatatc tctggtcatg tgtccagtag ccttatggtg cttagcatga gagaacttcc 11100

agctgaagta aggaaccata acaagagagt ggagaaccca tccaacggta tcgttaaccc 11160

atccgtagtt agagaaagca gaatgtccac actcatgtcc aaggatccag attccgaatc 11220

cgaaacaaga gatagagaac acgtaagcag accaagcagc gaatctaagg aattcgttag 11280

cgagaagagg gatgtaggta agtccaacgt aagcgatagc agagatagcc acgatatctc 11340

tcaccacgta agacatagac ttcacgagag atctctcgta acagtgctta gggatagcgt 11400

caaggatatc cttgatggtg taatctggca ccttgaaaac gtttccgaag gtatcgatag 11460

cggtcttttg ctgcttgaaa gatgcaacgt ttccagaacg cctaacggtc ttagtagatc 11520

cctcaaggat ctcagatcca gacacggtaa ccttagacat ggtatggtaa ttgtaaatgt 11580

aattgtaatg ttgtttgttg tttgttgttg ttggtaattg ttgtaaaatt tttggtggtg 11640

attggttctt taaggtgtga gagtgagttg tgagttgtgt ggtgggtttg gtgagattgg 11700

ggatggtggg tttatatagt ggagactgag gaatggggtc gtgagtgtta actttgcatg 11760

ggctacacgt gggttctttt gggcttacac gtagtattat tcatgcaaat gcagccaata 11820

catatacggt attttaataa tgtgtgggaa tacaatatgc cgagtatttt actaattttg 11880

gcaatgacaa gtgtacattt ggattatctt acttggcctc tcttgcttta atttggatta 11940

ttttttattct cttaccttgg ccgttcatat tcacatccct aaaggcaaga cagaattgaa 12000

tggtggccaa aaattaaaac gatggatatg acctacatag tgtaggatca attaacgtcg 12060

aaggaaaata ctgattctct caagcatacg gacaagggta aataacatag tcaccagaac 12120

ataataaaca aaaagtgcag aagcaagact aaaaaaatta gctatggaca ttcaggttca 12180

tattggaaac atcattatcc tagtcttgtg accatccttc ctcctgctct agttgagagg 12240

ccttgggact aacgagaggt cagttgggat agcagatcct tatcctggac tagcctttct 12300

ggtgtttcag agtcttcgtg ccgccgtcta catctatctc cattaggtct gaagatgact 12360

cttcacacca acgacgttta aggtctctat cctactccta gcttgcaata cctggcttgc 12420

aatacctgga gcatcgtgca cgatgattgg atactgtgga ggaggagtgt ttgctgattt 12480

agagctcccg gttgggtgat ttgacttcga tttcagttta ggcttgttga aatttttcag 12540

gttccattgt gaagccttta gagcttgagc ttccttccat gttaatgcct tgatcgaata 12600

ctcctagaga aaagggaagt cgatctctga gtattgaaat cgaagtgcac attttttttc 12660

aacgtgtcca atcaatccac aaacaaagca gaagacaggt aatctttcat acttatactg 12720

acaagtaata gtcttaccgt catgcataat aacgtctcgt tccttcaaga ggggttttcc 12780

gacatccata acgacccgaa gcctcatgaa agcattaggg aagaactttt ggttcttctt 12840

gtcatggcct ttataggtgt cagccgagct cgccaattcc cgtccgactg gctccgcaaa 12900

atattcgaac ggcaagttat ggacttgcaa ccataactcc acggtattga gcaggaccta 12960

ttgtgaagac tcatctcatg gagcttcaga atgtggttgt cagcaaacca atgaccgaaa 13020

tccatcacat gacggacgtc cagtgggtga gcgaaacgaa acaggaagcg cctatctttc 13080

agagtcgtga gctccacacc ggattccggc aactacgtgt tgggcaggct tcgccgtatt 13140

agagatatgt tgaggcagac ccatctgtgc cactcgtaca attacgagag ttgttttttt 13200

tgtgattttc ctagtttctc gttgatggtg agctcatatt ctacatcgta tggtctctca 13260

acgtcgtttc ctgtcatctg atatcccgtc atttgcatcc acgtgcgccg cctcccgtgc 13320

caagtcccta ggtgtcatgc acgccaaatt ggtggtggtg cgggctgccc tgtgcttctt 13380

accgatgggt ggaggttgag tttgggggtc tccgcggcga tggtagtggg ttgacggttt 13440

ggtgtgggtt gacggcattg atcaatttac ttcttgcttc aaattctttg gcagaaaaca 13500

attcattaga ttagaactgg aaaccagagt gatgagacgg attaagtcag attccaacag 13560

agttacatct cttaagaaat aatgtaaccc ctttagactt tatatatttg caattaaaaa 13620

aataatttaa cttttagact ttatatatag ttttaataac taagtttaac cactctatta 13680

tttatatcga aactatttgt atgtctcccc tctaaataaa cttggtattg tgtttacaga 13740

acctataatc aaataatcaa tactcaactg aagtttgtgc agttaattga agggattaac 13800

ggccaaaatg cactagtatt atcaaccgaa tagattcaca ctagatggcc atttccatca 13860

atatcatcgc cgttcttctt ctgtccacat atcccctctg aaacttgaga gacacctgca 13920

cttcattgtc cttattacgt gttacaaaat gaaacccatg catccatgca aactgaagaa 13980

tggcgcaaga acccttcccc tccatttctt atgtggcgac catccatttc accatctccc 14040

gctataaaac acccccatca cttcacctag aacatcatca ctacttgctt atccatccaa 14100

aagataccca cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta 14160

catttacaat taccatacca tgccacctag cgctgctaag caaatgggag cttctactgg 14220

tgttcatgct ggtgttactg actcttctgc tttcaccaga aaggatgttg ctgatagacc 14280

tgatctcacc atcgttggag attctgttta cgatgctaag gctttcagat ctgagcatcc 14340

tggtggtgct catttcgttt ctttgttcgg aggaagagat gctactgagg ctttcatgga 14400

ataccataga agggcttggc ctaagtctag aatgtctaga ttccacgttg gatctcttgc 14460

ttctactgag gaacctgttg ctgctgatga gggatacctt caactttgtg ctaggatcgc 14520

taagatggtg ccttctgttt cttctggatt cgctcctgct tcttactggg ttaaggctgg 14580

acttatcctt ggatctgcta tcgctcttga ggcttacatg ctttacgctg gaaagagact 14640

tctcccttct atcgttcttg gatggctttt cgctcttatc ggtcttaaca tccagcatga 14700

tgctaaccat ggtgctttgt ctaagtctgc ttctgttaac cttgctcttg gactttgtca 14760

ggattggatc ggaggatcta tgatcctttg gcttcaagag catgttgtta tgcaccacct 14820

ccacactaac gatgttgata aggatcctga tcaaaaggct cacggtgctc ttagactcaa 14880

gcctactgat gcttggtcac ctatgcattg gcttcagcat ctttaccttt tgcctggtga 14940

gactatgtac gctttcaagc ttttgttcct cgacatctct gagcttgtta tgtggcgttg 15000

ggagggtgag cctatctcta agcttgctgg atacctcttt atgccttctt tgcttctcaa 15060

gcttaccttc tgggctagat tcgttgcttt gcctctttac cttgctcctt ctgttcatac 15120

tgctgtgtgt atcgctgcta ctgttatgac tggatctttc tacctcgctt tcttcttctt 15180

catctcccac aacttcgagg gtgttgcttc tgttggacct gatggatcta tcacttctat 15240

gactagaggt gctagcttcc ttaagagaca agctgagact tcttctaacg ttggaggacc 15300

tcttcttgct actcttaacg gtggactcaa ctaccaaatt gagcatcact tgttccctag 15360

agttcaccat ggattctacc ctagacttgc tcctcttgtt aaggctgagc ttgaggctag 15420

aggaatcgag tacaagcact accctactat ctggtctaac cttgcttcta ccctcagaca 15480

tatgtacgct cttggaagaa ggcctagatc taaggctgag taatgacaag cttatgtgac 15540

gtgaaataat aacggtaaaa tatatgtaat aataataata ataaagccac aaagtgagaa 15600

tgaggggaag gggaaatgtg taatgagcca gtagccggtg gtgctaattt tgtatcgtat 15660

tgtcaataaa tcatgaattt tgtggttttt atgtgttttt ttaaatcatg aattttaaat 15720

tttataaaat aatctccaat cggaagaaca acattccata tccatgcatg gatgtttctt 15780

tacccaaatc tagttcttga gaggatgaag catcaccgaa cagttctgca actatccctc 15840

aaaagcttta aaatgaacaa caaggaacag agcaacgttc caaagatccc aaacgaaaca 15900

tattatctat actaatacta tattattaat tactactgcc cggaatcaca atccctgaat 15960

gattcctatt aactacaagc cttgttggcg gcggagaagt gatcggcgcg gcgagaagca 16020

gcggactcgg agacgaggcc ttggaagatc tgagtcgaac gggcagaatc agtattttcc 16080

ttcgacgtta attgatccta cactatgtag gtcatatcca tcgttttaat ttttggccac 16140

cattcaattc tgtcttgcct ttagggatgt gaatatgaac ggccaaggta agagaataaa 16200

aataatccaa attaaagcaa gagaggccaa gtaagataat ccaaatgtac acttgtcatt 16260

gccaaaatta gtaaaatact cggcatattg tattcccaca cattattaaa ataccgtata 16320

tgtattggct gcatttgcat gaataatact acgtgtaagc ccaaaagaac ccacgtgtag 16380

cccatgcaaa gttaacactc acgacccccat tcctcagtct ccactatata aacccaccat 16440

ccccaatctc accaaaccca ccacacaact cacaactcac tctcacacct taaagaacca 16500

atcaccacca aaaatttttac aacaattacc aacaacaaca aacaacaaac aacattacaa 16560

ttacatttac aattaccata ccatgagcgc tgttaccgtt actggatctg atcctaagaa 16620

cagaggatct tctagcaaca ccgagcaaga ggttccaaaa gttgctatcg ataccaacgg 16680

aaacgtgttc tctgttcctg atttcaccat caaggacatc cttggagcta tccctcatga 16740

gtgttacgag agaagattgg ctacctctct ctactacgtg ttcagagata tcttctgcat 16800

gcttaccacc ggatacctta cccataagat cctttaccct ctcctcatct cttacacctc 16860

taacagcatc atcaagttca ctttctgggc cctttacact tacgttcaag gacttttcgg 16920

aaccggaatc tgggttctcg ctcatgagtg tggacatcaa gctttctctg attacggaat 16980

cgtgaacgat ttcgttggat ggacccttca ctcttacctt atggttcctt acttcagctg 17040

gaagtactct catggaaagc accataaggc tactggacac atgaccagag atatggtttt 17100

cgttcctgcc accaaagagg aattcaagaa gtctaggaac ttcttcggta acctcgctga 17160

gtactctgag gattctccac ttagaaccct ttacgagctt cttgttcaac aacttggagg 17220

atggatcgct tacctcttcg ttaacgttac aggacaacct taccctgatg ttccttcttg 17280

gaaatggaac cacttctggc ttacctctcc acttttcgag caaagagatg ctctctacat 17340

cttcctttct gatcttggaa tcctcaccca gggaatcgtt cttactcttt ggtacaagaa 17400

attcggagga tggtcccttt tcatcaactg gttcgttcct tacatctggg ttaaccactg 17460

gctcgttttc atcacattcc ttcagcacac tgatcctact atgcctcatt acaacgctga 17520

ggaatggact ttcgctaagg gtgctgctgc tactatcgat agaaagttcg gattcatcgg 17580

acctcacatc ttccatgata tcatcgagac tcatgtgctt caccactact gttctaggat 17640

cccattctac aacgctagac ctgcttctga ggctatcaag aaagttatgg gaaagcacta 17700

caggtctagc gacgagaaca tgtggaagtc actttggaag tctttcaggt cttgccaata 17760

cgttgacggt gataacggtg ttctcatgtt ccgtaacatc aacaactgcg gagttggagc 17820

tgctgagaag taatgaaggg gtgatcgatt atgagatcgt acaaagacac tgctaggtgt 17880

taaggatgga taataataat aataatgaga tgaatgtgtt ttaagttagt gtaacagctg 17940

taataaagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagaggc 18000

tgatgaaatg ttatgtatgt ttcttggttt ttaaaataaa tgaaagcaca tgctcgtgtg 18060

gttctatcga attattcggc ggttcctgtg ggaaaaagtc cagaagggcc gccgcagcta 18120

ctactacaac caaggccgtg gaggagggca acagagccag cacttcgata gctgctgcga 18180

tgatcttaag caattgagga gcgagtgcac atgcagggga ctggagcgtg caatcggcca 18240

gatgaggcag gacatccagc agcagggaca gcagcaggaa gttgagaggt ggtcccatca 18300

atctaaacaa gtcgctaggg accttccggg acagtgcggc acccagccta gccgatgcca 18360

gctccagggg cagcagcagt ctgcatggtt ttgaagtggt gatcgatgag atcgtataaa 18420

gacactgcta ggtgttaagg atgggataat aagatgtgtt ttaagtcatt aaccgtaata 18480

aaaagagaga gaggctgatg gaatgttatg tatgtatgtt tcttggtttt taaaattaaa 18540

tggaaagcac atgctcgtgt gggttctatc tcgattaaaa atcccaatta tatttggtct 18600

aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt cgaaccaaac caaaatataa atatatagtt 18660

tttatatata tgcctttaag acttttttata gaattttctt taaaaaatat ctagaaatat 18720

ttgcgactct tctggcatgt aatatttcgt taaatatgaa gtgctccatt tttattaact 18780

ttaaataatt ggttgtacga tcactttctt atcaagtgtt actaaaatgc gtcaatctct 18840

ttgttctttcc atattcatat gtcaaaatct atcaaaattc ttatatatct ttttcgaatt 18900

tgaagtgaaa tttcgataat ttaaaattaa atagaacata tcattattta ggtatcatat 18960

tgatttttat acttaattac taaatttggt taactttgaa agtgtacatc aacgaaaaat 19020

tagtcaaacg actaaaataa ataaatatca tgtgttatta agaaaattct cctataagaa 19080

tattttaata gatcatatgt ttgtaaaaaa aattaatttt tactaacaca tatatttact 19140

tatcaaaaat ttgacaaagt aagattaaaa taatattcat ctaacaaaaa aaaaaccaga 19200

aaatgctgaa aacccggcaa aaccgaacca atccaaaccg atatagttgg tttggtttga 19260

ttttgatata aaccgaacca actcggtcca tttgcacccc taatcataat agctttaata 19320

tttcaagata ttattaagtt aacgttgtca atatcctgga aattttgcaa aatgaatcaa 19380

gcctatatgg ctgtaatatg aatttaaaag cagctcgatg tggtggtaat atgtaattta 19440

cttgattcta aaaaaatatc ccaagtatta ataatttctg ctaggaagaa ggttagctac 19500

gatttacagc aaagccagaa tacaaagaac cataaagtga ttgaagctcg aaatatacga 19560

aggaacaaat atttttaaaa aaatacgcaa tgacttggaa caaaagaaag tgatatattt 19620

tttgttctta aacaagcatc ccctctaaag aatggcagtt ttcctttgca tgtaactatt 19680

atgctcccct cgttacaaaa attttggact actattggga acttcttctg aaaatagtcc 19740

tgcaggctag tagattggtt ggttggtttc catgtaccag aaggcttacc ctattagttg 19800
aaagttgaaa ctttgttccc tactcaattc ctagttgtgt aaatgtatgt atatgtaatg 19860
tgtataaaac gtagtactta aatgactagg agtggttctt gagaccgatg agagatggga 19920
gcagaactaa agatgatgac ataattaaga acgaatttga aaggctctta ggtttgaatc 19980
ctattcgaga atgtttttgt caaagatagt ggcgattttg aaccaaagaa aacatttaaa 20040
aaatcagtat ccggttacgt tcatgcaaat agaaagtggt ctaggatctg attgtaattt 20100
tagacttaaa gagtctctta agattcaatc ctggctgtgt acaaaactac aaataatata 20160
ttttagacta tttggcctta actaaacttc cactcattat ttactgaggt tagagaatag 20220
acttgcgaat aaacacattc ccgagaaata ctcatgatcc cataattagt cagagggtat 20280
gccaatcaga tctaagaaca cacattccct caaattttaa tgcacatgta atcatagttt 20340
agcacaattc aaaaataatg tagtattaaa gacagaaatt tgtagacttt tttttggcgt 20400
taaaagaaga ctaagtttat acgtacattt tattttaagt ggaaaaccga aattttccat 20460
cgaaatatat gaatttagta tatatatttc tgcaatgtac tattttgcta ttttggcaac 20520
tttcagtgga ctactacttt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtatacacat 20580
gtctaaatgc atgctttgta aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaaatacat 20640
ctcatagctt cctccattat tttccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca 20700
acaacaaaca acaaacaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaatttgct 20760

caacctctcg ttgctatggc tcaagagcag tacgctgcta tcgatgctgt tgttgctcct 20820
gctatcttct ctgctaccga ctctattgga tggggactca agcctatctc ttctgctact 20880
aaggatctcc ctctcgttga atctcctacc cctcttatcc tttctctcct cgcttacttc 20940
gctatcgttg gttctggact cgtttaccgt aaagtgttcc ctagaaccgt taagggacag 21000
gatcctttcc ttctcaaggc tcttatgctc gctcacaacg ttttccttat cggactcagc 21060
ctttacatgt gcctcaagct cgtttacgag gcttacgtga acaagtactc cttctgggga 21120
aacgcttaca accctgctca aaccgagatg gctaaggtga tctggatctt ctacgtgtcc 21180
aagatctacg agttcatgga caccttcatc atgcttctca agggaaacgt taaccaggtt 21240
tccttcctcc atgtttacca ccacggatct atctctggaa tctggtggat gatcacttat 21300
gctgctccag gtggagatgc ttacttctct gctgctctca actcttgggt tcatgtgtgc 21360

atgtacacct actacttcat ggctgctgtt cttcctaagg acgaaaagac caagagaaag 21420

tacctttggt ggggaagata ccttacccag atgcaaatgt tccagttctt catgaacctt 21480

ctccaggctg tttacctcct ctactcttct tctccttacc ctaagttcat tgctcaactc 21540

ctcgttgttt acatggttac cctcctcatg cttttcggaa acttctacta catgaagcac 21600

cacgcttcta agtgataagg gccgccgcca tgtgacagat cgaaggaaga aagtgtaata 21660

agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tatatataat aatgttatct 21720

ttcacaactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt gtcatatgat 21780

aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtcaa tttaaagata taagattctt taaatgatta 21840

aaaaaaatat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta ttatttattg 21900

attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct agcctgcagg 21960

gcggccgcgg atcccatgga gtcaaagatt caaatagagg acctaacaga actcgccgta 22020

gagactggcg aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc 22080

gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 22140

gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 22200

ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 22260

tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 22320

ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 22380

acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa 22440

tcccactatc cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca tttggagaga 22500

acacgggggа ctgaattaaa tatgagccct gagaggcgtc ctgttgaaat cagacctgct 22560

actgctgctg atatggctgc tgtttgtgat atcgtgaacc actacatcga gacttctacc 22620

gttaacttca gaactgagcc tcaaactcct caagagtgga tcgatgatct tgagagactc 22680

caagatagat acccttggct tgttgctgag gttgagggtg ttgttgctgg aatcgcttac 22740

gctggacctt ggaaggctag aaacgcttac gattggactg ttgagtctac cgtttacgtt 22800

tcacacagac atcagagact tggacttgga tctacccttt acactcacct tctcaagtct 22860

atggaagctc agggattcaa gtctgttgtt gctgttatcg gactccctaa cgatccttct 22920

gttagacttc atgaggctct tggatacact gctagaggaa ctcttagagc tgctggatac 22980

aagcacggtg gatggcatga tgttggattc tggcaaagag atttcgagct tcctgctcct 23040

cctagacctg ttagaccagt tactcagatc tgaatttgcg tgatcgttca aacatttggc 23100

aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc 23160

tgttgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat 23220

gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat 23280

agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cggtgtcatc tatgttacta gatcactagt 23340

gatgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt 23400

ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca acagctcccc 23460

gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccatcagt cc 23512

<210> 3
<211> 25787
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> pGA7-mod_C нуклеотидна послідовність
<400> 3

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttttca cgccctttta 60

aatatccgat tatttctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgccccgatc tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa 240

tttatcctag tttgcgcgct atattttgtt ttctatcgcg tattaaatgt ataattgcgg 300

gactctaatc ataaaaaccc atctcataaa taacgtcatg cattacatgt taattattac 360

gtgcttaacg taattcaaca gaaattatat gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt 420

caatcttaag aaactttatt gccaaatgtt tgaacgatct gcccggaagc ggccaactcg 480

aaaatttaat taatcatcag tgagccttct cagcctttcc gttaacgtag tagtgctgtc 540

caactttgtc gaggttgctg aaagtagcct tccaagcacc gtagtaagag agcaccttgt 600

agttgagtcc ccacttctta gcgaaaggga cgaatcttct tgacacctca ggctgtctga 660

attgaggcat atcagggaag agatggtgga taacctggca gttaaggtat cccataagcc 720

agttaacgta tccacgagaa ggatcgatgt caacggtgtg atcaacagcg tagttaaccc 780

agctaaggtg cttgtcagat ggaacaacag ggaggtgagt gtgagaagta gagaagtgag 840

cgaagaggta catgtaagcg atccagtttc cgaaagtgaa ccaccagtaa gcaacaggcc 900

aagagtatcc ggtagcaagc ttgataacag cggttctaac aacgtgagaa acgagcatcc 960

aagaagcttc ctcgtagttc ttcttcctga gcacctgtct aggatggaga acgtagatcc 1020

agaaagcctg aacgagaagt ccagaagtaa caggaacgaa ggtccaagct tgaagtctag 1080

cccaagctct agagaatccc ctaggtctat tatcctccac agcggtgttg aagaaagcca 1140

cagcaggagt ggtatcaaga tccatgtcgt gtctaacttt ctgaggggta gcatggtgct 1200

tgttatgcat ctggttccac atctctccgc tggtagaaag tccgaatccg caagtcatag 1260

cctgaagtct cttatccacg tacacagatc cggtaagaga gttgtgtcca ccctcatgtt 1320

gaacccatcc acatctagct ccgaagaaag caccgtacac aacgctagca atgatagggt 1380

atccagcgta cataagagcg gttccaagag cgaaagtagc aagaagctcc aaaagacggt 1440

aagcaacatg ggtgatagaa ggcttgaaga atccgtccct ctcaagttca gctctccacc 1500

tagcgaaatc ctcaagcata ggagcatcct cagactcaga tctcttgatc tcagcaggtc 1560

tagaaggcaa agctctaagc atcttccaag ccttgaggct acgcatgtga aattctttga 1620

aagcctcagt agcatcagca ccagtgttag caagcatgta gaagatcacg cttccaccag 1680

gatgtttgaa gttggtcacg tcgtactcaa catcctcaac cctaacccat ctagtctcga 1740

aggtagcagc aagttcatga ggctcaaggg tcttaagatc aacaggagcg gtagaagcat 1800

ccttagcatc aagagcctca gcagatgact tagacctggt gagaggagat ctaggagaag 1860

atcttccatc ggtcttagga ggacacatgg cgcgccgatt ttcgagatgg taattgtaaa 1920

tgtaattgta atgttgtttg ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa attcgagttg 1980

gccgcttccg gggatcctcg tgtatgtttt taatcttgtt tgtatcgatg agttttggtt 2040

tgagtaaaga gtgaagcgga tgagttaatt tataggctat aaaggagatt tgcatggcga 2100

tcacgtgtaa taatgcatgc acgcatgtga ttgtatgtgt gtgctgtgag agagaagctc 2160

ttaggtgttt gaagggagtg acaagtggcg aagaaaaaca attctccgcg gctgcatgct 2220

atgtgtaacg tgtagctaat gttctggcat ggcatcttat gaacgattct ttttaaaaac 2280

aaggtaaaaa cttaacttca taaaattaaa aaaaaaaacg tttactaagt tggtttaaaa 2340

ggggatgaga ggcgccccgc ggaaagcttg ctagccaatt ggggcccaac gttctcgagt 2400

ttttctagaa ggaaactgaa ggcgggaaac gacaatctgc tagtggatct cccagtcacg 2460

acgttgtaaa acgggcgccc cgcggaaagc ttgcggccgc ggtaccgccc gttcgactca 2520

gatcttccaa ggcctcgtct ccgagtccgc tgcttctcgc cgcgccgatc acttctccgc 2580

cgccaacaag gcttgtagtt aataggaatc attcagggat tgtgattccg ggcagtagta 2640

attaataata tagtattagt atagataata tgtttcgttt gggatctttg gaacgttgct 2700

ctgttccttg ttgttcattt taaagctttt gagggatagt tgcagaactg ttcggtgatg 2760

cttcatcctc tcaagaacta gatttgggta aagaaacatc catgcatgga tatggaatgt 2820

tgttcttccg attggagatt attttataaa atttaaaatt catgatttaa aaaaacacat 2880

aaaaaccaca aaattcatga tttattgaca atacgataca aaattagcac caccggctac 2940

tggctcatta cacatttccc cttcccctca ttctcacttt gtggctttat tattattatt 3000

attacatata ttttaccgtt attatttcac gtcacataag cttgttaatt aatcattagt 3060

gagccttctc agcctttccg ttaacgtagt agtgctgtcc caccttatca aggttagaga 3120

aagtagcctt ccaagcaccg tagtaagaga gcaccttgta gttgagtccc cacttcttag 3180

cgaaaggaac gaatcttctg ctaacctcag gctgtctgaa ttgaggcata tcagggaaga 3240

ggtggtggat aacctgacag ttaaggtatc ccataagcca gttcacgtat cctctagaag 3300

gatcgatatc aacggtgtga tcaacagcgt agttaaccca agaaaggtgc ttatcagatg 3360

gaacaacagg gaggtgagta tgagaagtag agaagtgagc gaaaaggtac atgtaagcga 3420

tccagtttcc gaaagtgaac caccagtaag caacaggcca agagtatcca gtagcaagct 3480

tgataacagc ggttctaaca acatgagaaa cgagcatcca agaagcctct tcgtagttct 3540

tcttacggag aacttgtcta gggtggagaa cgtagatcca gaaagcttga acaagaagtc 3600

cagaggtaac aggaacgaaa gtccaagctt gaagtctagc ccaagctcta gagaatcctc 3660

taggtctgtt atcctcaaca gcagtgttga agaaagccac agcaggagtg gtatcaagat 3720

ccatatcgtg tctaaccttt tgaggggtag catggtgctt gttatgcatc tggttccaca 3780

tctcaccaga agtagaaagt ccgaatccac aagtcatagc ctgaagtctc ttgtccacgt 3840

aaacagatcc ggtaagagag ttatgtccac cctcatgttg aacccatcca catctagctc 3900

cgaagaaagc accgtaaaca acagaagcaa tgatagggta tccagcgtac ataagagcag 3960

ttccaagagc gaatgtagca agaagctcga gaagtctgta agccacatgg gtgatagaag 4020

gcttgaagaa tccatctctc tcaagctcag cacgccatct agcgaaatcc tcaagcatag 4080

gagcatcctc agactcagat ctcttgatct cagcaggtct agaaggcaaa gctctaagca 4140

tctttccaagc cttgagagaa cgcatgtgga attctttgaa agcctcagta gcatcagcac 4200

cagtgttagc aagcatgtag aagatcacag atccaccagg gtgcttgaag ttagtcacat 4260

cgtactcaac gtcctcaact ctaacccatc tagtctcgaa agtagcagca agctcatgag 4320

gctcaagagt cttaagatca acaggagcag tagaagcatc cttagcatca agagcctcag 4380

cagaagattt agacctggta agtggagatc taggagaaga tcttccatca gtcttaggag 4440

ggcacatggt atggtaattg taaatgtaat tgtaatgttg tttgttgttt gttgttgttg 4500

gtaattgttg taaaattaat taagtgggta tcttttggat ggataagcaa gtagtgatga 4560

tgttctaggt gaagtgatgg gggtgtttta tagcgggaga tggtgaaatg gatggtcgcc 4620

acataagaaa tggaggggaa gggttcttgc gccattcttc agtttgcatg gatgcatggg 4680

tttcatttttg taacacgtaa taaggacaat gaagtgcagg tgtctctcaa gtttcagagg 4740

ggatatgtgg acagaagaag aacggcgatg atattgatgg aaatggccat ctagtgtgaa 4800

tctattcggt tgataatact agtgcatttt ggccgttaat cccttcaatt aactgcacaa 4860

acttcagttg agtattgatt atttgattat aggttctgta aacacaatac caagtttatt 4920

tagaggggag acatacaaat agtttcgata taaataatag agtggttaaa cttagttatt 4980

aaaactatat ataaagtcta aaagttaaat tatttttta attgcaaata tataaagtct 5040

aaaggggtta cattatttct taagagatgt aactctgttg gaatctgact taatccgtct 5100

catcactctg gtttccagtt ctaatctaat gaattgtttt ctgccaaaga atttgaagca 5160

agaagtaaat tgatcaatgc cgtcaaccca caccaaaccg tcaacccact accatcgccg 5220

cggagacccc caaactcaac ctccacccat cggtaagaag cacagggcag cccgcaccac 5280

caccaatttg gcgtgcatga cacctaggga cttggcacgg gaggcggcgc acgtggatgc 5340

aaatgacggg atatcagatg acaggaaaacg acgttgagag accatacgat gtagaatatg 5400

agctcaccat caacgagaaa ctaggaaaat cacaaaaaaa acaactctcg taattgtacg 5460

agtggcacag atgggtctgc ctcaacatat ctctaatacg gcgaagcctg cccaacacgt 5520

agttgccgga atccggtgtg gagctcacga ctctgaaaga taggcgcttc ctgtttcgtt 5580

tcgctcaccc actggacgtc cgtcatgtga tggatttcgg tcattggttt gctgacaacc 5640

acattctgaa gctccatgag atgagtcttc acaataggtc ctgctcaata ccgtggagtt 5700

atggttgcaa gtccataact tgccgttcga atattttgcg gagccagtcg gacgggaatt 5760

ggcgagctcg gctgacacct ataaaggcca tgacaagaag aaccaaaagt tcttccctaa 5820

tgctttcatg aggcttcggg tcgttatgga tgtcggaaaa cccctcttga aggaacgaga 5880

cgttattatg catgacggta agactattac ttgtcagtat aagtatgaaa gattacctgt 5940

cttctgcttt gtttgtggat tgattggaca cgttgaaaaa aaatgtgcac ttcgatttca 6000

atactcagag atcgacttcc cttttctcta ggagtattcg atcaaggcat taacatggaa 6060

ggaagctcaa gctctaaagg cttcacaatg gaacctgaaa aatttcaaca agcctaaact 6120

gaaatcgaag tcaaatcacc caaccgggag ctctaaatca gcaaacactc ctcctccaca 6180

gtatccaatc atcgtgcacg atgctccagg tattgcaagc caggtattgc aagctaggag 6240

taggatagag accttaaacg tcgttggtgt gaagagtcat cttcagacct aatggagata 6300

gatgtagacg gcggcacgaa gactctgaaa caccagaaag gctagtccag gataaggatc 6360

tgctatccca actgacctct cgttagtccc aaggcctctc aactagagca ggaggaagga 6420

tggtcacaag actaggataa tgatgtttcc aatatgaacc tgaatgtcca tagctaattt 6480

ttttagtctt gcttctgcac tttttgttta ttatgttctg gtgactatgt tatttaccct 6540

tgtccgtatg cttgagggta ccctagtaga ttggttggtt ggtttccatg taccagaagg 6600

cttaccctat tagttgaaag ttgaaacttt gttccctact caattcctag ttgtgtaaat 6660

gtatgtatat gtaatgtgta taaaacgtag tacttaaatg actaggagtg gttcttgaga 6720

ccgatgagag atgggagcag aactaaagat gatgacataa ttaagaacga atttgaaagg 6780

ctcttaggtt tgaatcctat tcgagaatgt ttttgtcaaa gatagtggcg attttgaacc 6840

aaagaaaaca tttaaaaaat cagtatccgg ttacgttcat gcaaatagaa agtggtctag 6900

gatctgattg taattttaga cttaaagagt ctcttaagat tcaatcctgg ctgtgtacaa 6960

aactacaaat aatatatttt agactatttg gccttaacta aacttccact cattatttac 7020

tgaggttaga gaatagactt gcgaataaac acattcccga gaaatactca tgatcccata 7080

attagtcaga gggtatgcca atcagatcta agaacacaca ttccctcaaa ttttaatgca 7140

catgtaatca tagtttagca caattcaaaa ataatgtagt attaaagaca gaaatttgta 7200

gacttttttt tggcgttaaa agaagactaa gtttatacgt acattttatt ttaagtggaa 7260

aaccgaaatt ttccatcgaa atatatgaat ttagtatata tatttctgca atgtactatt 7320

ttgctatttt ggcaactttc agtggactac tactttatta caatgtgtat ggatgcatga 7380

gtttgagtat acacatgtct aaatgcatgc tttgtaaaac gtaacggacc acaaaagagg 7440

atccatacaa atacatctca tagcttcctc cattattttc cgacacaaac agagcatttt 7500

acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattacattt acaattacca 7560

taccatggcc tctatcgcta tccctgctgc tcttgctgga actcttggat acgttaccta 7620

caatgtggct aaccctgata tcccagcttc tgagaaagtt cctgcttact tcatgcaggt 7680

tgagtactgg ggacctacta tcggaactat tggatacctc ctcttcatct acttcggaaa 7740

gcgtatcatg cagaacagat ctcaaccttt cggactcaag aacgctatgc tcgtttacaa 7800

cttctaccag accttcttca acagctactg catctacctt ttcgttactt ctcatagggc 7860

tcagggactt aaggtttggg gaaacatccc tgatatgact gctaactctt ggggaatctc 7920

tcaggttatc tggcttcact acaacaacaa gtacgttgag cttctcgaca ccttcttcat 7980

ggtgatgagg aagaagttcg accagctttc tttccttcac atctaccacc acactcttct 8040

catctggtca tggttcgttg ttatgaagct tgagcctgtt ggagattgct acttcggatc 8100

ttctgttaac accttcgtgc acgtgatcat gtactcttac tacggacttg ctgctcttgg 8160

agttaactgt ttctggaaga agtacatcac ccagatccag atgcttcagt tctgtatctg 8220

tgcttctcac tctatctaca ccgcttacgt tcagaatacc gctttctggc ttccttacct 8280

tcaactctgg gttatggtga acatgttcgt tctcttcgcc aacttctacc gtaagaggta 8340

caagtctaag ggtgctaaga agcagtgata aggcgcgcgg cgcgccgggc cgccgccatg 8400

tgacagatcg aaggaagaaa gtgtaataag acgactctca ctactcgatc gctagtgatt 8460

gtcattgtta tatataataa tgttatcttt cacaacttat cgtaatgcat gtgaaactat 8520

aacacattaa tcctacttgt catatgataa cactctcccc atttaaaact cttgtcaatt 8580

taaagatata agattcttta aatgattaaa aaaaatatat tataaattca atcactccta 8640

ctaataaatt attaattatt atttattgat taaaaaaata cttatactaa tttagtctga 8700

atagaataat tagattctag tctcatcccc ttttaaacca acttagtaaa cgttttttt 8760

tttaatttta tgaagttaag ttttacctt gtttttaaaa agaatcgttc ataagatgcc 8820

atgccagaac attagctaca cgttacacat agcatgcagc cgcggagaat tgttttctt 8880

cgccacttgt cactcccttc aaacacctaa gagcttctct ctcacagcac acacatacaa 8940

tcacatgcgt gcatgcatta ttacacgtga tcgccatgca aatctccttt atagcctata 9000

aattaactca tccgcttcac tctttactca aaccaaaact catcgataca aacaagatta 9060

aaaacataca cgaggatctt ttacaacaat taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt 9120

acaattacat ttacaattac cataccatgc ctccaaggga ctcttactct tatgctgctc 9180

ctccttctgc tcaacttcac gaagttgata ctcctcaaga gcacgacaag aaagagcttg 9240

ttatcggaga tagggcttac gatgttacca acttcgttaa gagacaccct ggtggaaaga 9300

tcattgctta ccaagttgga actgatgcta ccgatgctta caagcagttc catgttagat 9360

ctgctaaggc tgacaagatg cttaagtctc ttccttctcg tcctgttcac aagggatact 9420

ctccaagaag ggctgatctt atcgctgatt tccaagagtt caccaagcaa cttgaggctg 9480

agggaatgtt cgagccttct cttcctcatg ttgcttacag acttgctgag gttatcgcta 9540

tgcatgttgc tggtgctgct cttatctggc atggatacac tttcgctgga atcgctatgc 9600

ttggagttgt tcagggaaga tgtggatggc ttatgcatga gggtggacat tactctctca 9660

ctggaaacat tgctttcgac agagctatcc aagttgcttg ttacggactt ggatgtggaa 9720

tgtctggtgc ttggtggcgt aaccagcata acaagcacca tgctactcct caaaagcttc 9780

agcacgatgt tgatcttgat acccttcctc tcgttgcttt ccatgagaga atcgctgcta 9840

aggttaagtc tcctgctatg aaggcttggc tttctatgca agctaagctt ttcgctcctg 9900

ttaccactct tcttgttgct cttggatggc agctttacct tcatcctaga cacatgctca 9960

ggactaagca ctacgatgag cttgctatgc tcggaatcag atacggactt gttggatacc 10020

ttgctgctaa ctacggtgct ggatacgttc tcgcttgtta ccttctttac gttcagcttg 10080

gagctatgta catcttctgc aacttcgctg tttctcatac tcacctccct gttgttgagc 10140

ctaacgagca tgctacttgg gttgagtacg ctgctaacca cactactaac tgttctccat 10200

cttggtggtg tgattggtgg atgtcttacc ttaactacca gatcgagcac caccttttacc 10260

cttctatgcc tcaattcaga caccctaaga tcgctcctag agttaagcag cttttcgaga 10320

agcacggact tcactacgat gttagaggat acttcgaggc tatggctgat actttcgcta 10380

accttgataa cgttgcccat gctcctgaga agaaaatgca gtaatgagat cgttcaaaca 10440

tttggcaata aagtttctta agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat 10500

aatttctgtt gaattacgtt aagcacgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta 10560

tgagatgggt ttttatgatt agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca 10620

aaatatagcg cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcatctatg ttactagatc 10680

ggtcgattaa aaatcccaat tatatttggt ctaatttagt ttggtattga gtaaaacaaa 10740

ttcgaaccaa accaaaatat aaatatatag tttttatata tatgccttta agacttttta 10800

tagaattttc tttaaaaaat atctagaaat atttgcgact cttctggcat gtaatatttc 10860

gttaaatatg aagtgctcca tttttattaa ctttaaataa ttggttgtac gatcactttc 10920

ttatcaagtg ttactaaaat gcgtcaatct ctttgttctt ccatattcat atgtcaaaat 10980

ctatcaaaat tcttatatat ctttttcgaa tttgaagtga aatttcgata atttaaaatt 11040

aaatagaaca tatcattatt taggtatcat attgattttt atacttaatt actaaatttg 11100

gttaactttg aaagtgtaca tcaacgaaaa attagtcaaa cgactaaaat aaataaatat 11160

catgtgttat taagaaaatt ctcctataag aatattttaa tagatcatat gtttgtaaaa 11220

aaaattaatt tttactaaca catatattta cttatcaaaa atttgacaaa gtaagattaa 11280

aataatattc atctaacaaa aaaaaaacca gaaaatgctg aaaacccggc aaaaccgaac 11340

caatccaaac cgatatagtt ggtttggttt gattttgata taaaccgaac caactcggtc 11400

catttgcacc cctaatcata atagctttaa tatttcaaga tattattaag ttaacgttgt 11460

caatatcctg gaaattttgc aaaatgaatc aagcctatat ggctgtaata tgaatttaaa 11520

agcagctcga tgtggtggta atatgtaatt tacttgattc taaaaaaata tcccaagtat 11580

taataatttc tgctaggaag aaggttagct acgatttaca gcaaagccag aatacaaaga 11640

accataaagt gattgaagct cgaaatatac gaaggaacaa atatttttaa aaaaatacgc 11700

aatgacttgg aacaaaagaa agtgatatat tttttgttct taaacaagca tcccctctaa 11760

agaatggcag ttttcctttg catgtaacta ttatgctccc ttcgttacaa aaattttgga 11820

ctactattgg gaacttcttc tgaaaatagt gatagaaccc acacgagcat gtgctttcca 11880

tttaatttta aaaaccaaga aacatacata cataacattc catcagcctc tctctctttt 11940

tattacggtt aatgacttaa aacacatctt attatcccat ccttaacacc tagcagtgtc 12000

tttatacgat ctcatcgatc accacttcaa aaccatgcag actgctgctg cccctggagc 12060

tggcatcggc taggctgggt gccgcactgt cccggaaggt ccctagcgac ttgtttagat 12120

tgatgggacc acctctcaac ttcctgctgc tgtccctgct gctggatgtc ctgcctcatc 12180

tggccgattg cacgctccag tcccctgcat gtgcactcgc tcctcaattg cttaagatca 12240

tcgcagcagc tatcgaagtg ctggctctgt tgccctcctc cacggccttg gttgtagtag 12300

tagctgccgc cgcccttctg gacttttttc cacaggaacc gccgaataat tcgatagaac 12360

cacacgagca tgtgctttca tttattttaa aaaccaagaa acatacataa catttcatca 12420

gcctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctttatta 12480

cagctgttac actaacttaa aacacattca tctcattatt attattatta tccatcctta 12540

acacctagca gtgtctttgt acgatctcat aatcgatcac cccttcatca ggtatcctta 12600

ggcttcactc caacgttgtt gcagttacgg aacatgtaca caccatcatg gttctcaacg 12660

aactggcaag atctccaagt tttccaaagg ctaacccaca tgttctcatc ggtgtgtctg 12720

tagtgctctc ccataacttt cttgatgcac tcggtagctt ctctagcatg gtagaatggg 12780

atccttgaaa cgtagtgatg gagcacatga gtctcgatga tgtcatggaa gatgattccg 12840

aggattccga actctctatc gatagtagca gcagcaccct tagcgaaagt ccactcttga 12900

gcatcgtaat gaggcataga agaatcggtg tgctgaagga aggtaacgaa aacaagccag 12960

tggttaacaa ggatccaagg acagaaccat gtgatgaaag taggccagaa tccgaaaacc 13020

ttgtaagcgg tgtaaacaga agtgagggta gcaaggattc caagatcaga aagaacgatg 13080

taccagtagt ccttcttatc gaaaacaggg ctagaaggcc agtagtgaga cttgaagaac 13140

ttagaaacac cagggtaagg ttgtccagta gcgttagtag caaggtaaag agaaagtcct 13200

ccaagctgtt ggaacaagag agcgaaaaca gagtagatag gagtttcctc agcgatatcg 13260

tgaaggctgg taacttggtg cttctctttg aattcctcgg cggtgtaagg aacgaaaacc 13320

atatctctgg tcatgtgtcc agtagcctta tggtgcttag catgagagaa cttccagctg 13380

aagtaaggaa ccataacaag agagtggaga acccatccaa cggtatcgtt aacccatccg 13440

tagttagaga aagcagaatg tccacactca tgtccaagga tccagattcc gaatccgaaa 13500

caagagatag agaacacgta agcagaccaa gcagcgaatc taaggaattc gttagggaga 13560

agagggatgt aggtaagtcc aacgtaagcg atagcagaga tagccacgat atctctcacc 13620

acgtaagaca tagacttcac gagagatctc tcgtaacagt gcttagggat agcgtcaagg 13680

atatccttga tggtgtaatc tggcaccttg aaaacgtttc cgaaggtatc gatagcggtc 13740

ttttgctgct tgaaagatgc aacgtttcca gaacgcctaa cggtcttagt agatccctca 13800

aggatctcag atccagacac ggtaacctta gacatggtat ggtaattgta aatgtaattg 13860

taatgttgtt tgttgtttgt tgttgttggt aattgttgta aaatttttgg tggtgattgg 13920

ttctttaagg tgtgagagtg agttgtgagt tgtgtggtgg gtttggtgag attggggatg 13980

gtgggtttat atagtggaga ctgaggaatg gggtcgtgag tgttaacttt gcatgggcta 14040

cacgtgggct ctttttgggct tacacgtagt attattcatg caaatgcagc caatacatat 14100

acggtatttt aataatgtgt gggaatacaa tatgccgagt attttactaa ttttggcaat 14160

gacaagtgta catttggatt atcttacttg gcctctcttg ctttaatttg gattattttt 14220

attctcttac cttggccgtt catattcaca tccctaaagg caagacagaa ttgaatggtg 14280

gccaaaaatt aaaacgatgg atatgaccta catagtgtag gatcaattaa cgtcgaagga 14340

aaatactgat tctctcaagc atacggacaa gggtaaataa catagtcacc agaacataat 14400

aaacaaaaag tgcagaagca agactaaaaa aattagctat ggacattcag gttcatattg 14460

gaaacatcat tatcctagtc ttgtgaccat ccttcctcct gctctagttg agaggccttg 14520

ggactaacga gaggtcagtt gggatagcag atccttatcc tggactagcc tttctggtgt 14580

ttcagagtct tcgtgccgcc gtctacatct atctccatta ggtctgaaga tgactcttca 14640

caccaacgac gtttaaggtc tctatcctac tcctagcttg caatacctgg cttgcaatac 14700

ctggagcatc gtgcacgatg attggatact gtggaggagg agtgtttgct gatttagagc 14760

tcccggttgg gtgatttgac ttcgatttca gtttaggctt gttgaaattt ttcaggttcc 14820

attgtgaagc ctttagagct tgagcttcct tccatgttaa tgccttgatc gaatactcct 14880

agagaaaagg gaagtcgatc tctgagtatt gaaatcgaag tgcacatttt ttttcaacgt 14940

gtccaatcaa tccacaaaca aagcagaaga caggtaatct ttcatactta tactgacaag 15000

taatagtctt accgtcatgc ataataacgt ctcgttcctt caagaggggt tttccgacat 15060

ccataacgac ccgaagcctc atgaaagcat tagggaagaa cttttggttc ttcttgtcat 15120

ggcctttata ggtgtcagcc gagctcgcca attcccgtcc gactggctcc gcaaaatatt 15180

cgaacggcaa gttatggact tgcaaccata actccacggt attgagcagg acctattgtg 15240

aagactcatc tcatggagct tcagaatgtg gttgtcagca aaccaatgac cgaaatccat 15300

cacatgacgg acgtccagtg ggtgagcgaa acgaaacagg aagcgcctat ctttcagagt 15360

cgtgagctcc acaccggatt ccggcaacta cgtgttgggc aggcttcgcc gtattagaga 15420

tatgttgagg cagacccatc tgtgccactc gtacaattac gagagttgtt ttttttgtga 15480

ttttcctagt ttctcgttga tggtgagctc atattctaca tcgtatggtc tctcaacgtc 15540

gtttcctgtc atctgatatc ccgtcatttg catccacgtg cgccgcctcc cgtgccaagt 15600

ccctaggtgt catgcacgcc aaattggtgg tggtgcgggc tgccctgtgc ttcttaccga 15660

tgggtggagg ttgagtttgg gggtctccgc ggcgatggta gtgggttgac ggtttggtgt 15720

gggttgacgg cattgatcaa tttacttctt gcttcaaatt ctttggcaga aaacaattca 15780

ttagattaga actggaaacc agagtgatga gacggattaa gtcagattcc aacagagtta 15840

catctcttaa gaaataatgt aacccctttа gactttatat atttgcaatt aaaaaaataa 15900

tttaactttt agactttata tatagtttta ataactaagt ttaaccactc tattatttat 15960

atcgaaacta tttgtatgtc tccctctaa ataaacttgg tattgtgttt acagaacrta 16020

taatcaaata atcaatactc aactgaagtt tgtgcagtta attgaaggga ttaacggcca 16080

aaatgcacta gtattatcaa ccgaatagat tcacactaga tggccatttc catcaatatc 16140

atcgccgttc ttcttctgtc cacatatccc ctctgaaact tgagagacac ctgcacttca 16200

ttgtccttat tacgtgttac aaaatgaaac ccatgcatcc atgcaaactg aagaatggcg 16260

caagaacccc tcccctccat ttcttatgtg gcgaccatcc atttcaccat ctcccgctat 16320

aaaacacccc catcacttca cctagaacat catcactact tgcttatcca tccaaaagat 16380

acccactttt acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattacattt 16440

acaattacca taccatgcca cctagcgctg ctaagcaaat gggagcttct actggtgttc 16500

atgctggtgt tactgactct tctgctttca ccagaaagga tgttgctgat agacctgatc 16560

tcaccatcgt tggagattct gtttacgatg ctaaggcttt cagatctgag catcctggtg 16620

gtgctcattt cgtttctttg ttcggaggaa gagatgctac tgaggctttc atggaatacc 16680

atagaagggc ttggcctaag tctagaatgt ctagattcca cgttggatct cttgcttcta 16740

ctgaggaacc tgttgctgct gatgagggat accttcaact ttgtgctagg atcgctaaga 16800

tggtgccttc tgtttcttct ggattcgctc ctgcttctta ctgggttaag gctggactta 16860

tccttggatc tgctatcgct cttgaggctt acatgcttta cgctggaaag agacttctcc 16920

cttctatcgt tcttggatgg cttttcgctc ttatcggtct taacatccag catgatgcta 16980

accatggtgc tttgtctaag tctgcttctg ttaaccttgc tcttggactt tgtcaggatt 17040

ggatcggagg atctatgatc ctttggcttc aagagcatgt tgttatgcac cacctccaca 17100

ctaacgatgt tgataaggat cctgatcaaa aggctcacgg tgctcttaga ctcaagccta 17160

ctgatgcttg gtcacctatg cattggcttc agcatcttta ccttttgcct ggtgagacta 17220

tgtacgcttt caagcttttg ttcctcgaca tctctgagct tgttatgtgg cgttgggagg 17280

gtgagcctat ctctaagctt gctggatacc tctttatgcc ttctttgctt ctcaagctta 17340

ccttctgggc tagattcgtt gctttgcctc tttaccttgc tccttctgtt catactgctg 17400

tgtgtatcgc tgctactgtt atgactggat ctttctacct cgctttcttc ttcttcatct 17460

cccacaactt cgagggtgtt gcttctgttg gacctgatgg atctatcact tctatgacta 17520

gaggtgctag cttccttaag agacaagctg agacttcttc taacgttgga ggacctcttc 17580

ttgctactct taacggtgga ctcaactacc aaattgagca tcacttgttc cctagagttc 17640

accatggatt ctaccctaga cttgctcctc ttgttaaggc tgagcttgag gctagaggaa 17700

tcgagtacaa gcactaccct actatctggt ctaaccttgc ttctaccctc agacatatgt 17760

acgctcttgg aagaaggcct agatctaagg ctgagtaatg acaagcttat gtgacgtgaa 17820

ataataacgg taaaatatat gtaataataa taataataaa gccacaaagt gagaatgagg 17880

ggaaggggaa atgtgtaatg agccagtagc cggtggtgct aattttgtat cgtattgtca 17940

ataaatcatg aattttgtgg tttttatgtg ttttttttaaa tcatgaattt taaattttat 18000

aaaataatct ccaatcggaa gaacaacatt ccatatccat gcatggatgt ttctttaccc 18060

aaatctagtt cttgagagga tgaagcatca ccgaacagtt ctgcaactat ccctcaaaag 18120

ctttaaaatg aacaacaagg aacagagcaa cgttccaaag atcccaaacg aaacatatta 18180

tctatactaa tactatatta ttaattacta ctgcccggaa tcacaatccc tgaatgattc 18240

ctattaacta caagccttgt tggcggcgga gaagtgatcg gcgcggcgag aagcagcgga 18300

ctcggagacg aggccttgga agatctgagt cgaacgggca gaatcagtat tttccttcga 18360

cgttaattga tcctacacta tgtaggtcat atccatcgtt ttaatttttg gccaccattc 18420

aatttctgtct tgcctttagg gatgtgaata tgaacggcca aggtaagaga ataaaaataa 18480

tccaaattaa agcaagagag gccaagtaag ataatccaaa tgtacacttg tcattgccaa 18540

aattagtaaa atactcggca tattgtattc ccacacatta ttaaaatacc gtatatgtat 18600

tggctgcatt tgcatgaata atactacgtg taagcccaaa agaacccacg tgtagcccat 18660

gcaaagttaa cactcacgac cccattcctc agtctccact atataaaccc accatcccca 18720

atctcaccaa acccaccaca caactcacaa ctcactctca caccttaaag aaccaatcac 18780

caccaaaaat tttacaacaa ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat tacaattaca 18840

tttacaatta ccataccatg agcgctgtta ccgttactgg atctgatcct aagaacagag 18900

gatcttctag caacaccgag caagaggttc caaaagttgc tatcgatacc aacggaaacg 18960

tgttctctgt tcctgatttc accatcaagg acatccttgg agctatccct catgagtgtt 19020

acgagagaag attggctacc tctctctact acgtgttcag agatatcttc tgcatgctta 19080

ccaccggata ccttacccat aagatccttt accctctcct catctcttac acctctaaca 19140

gcatcatcaa gttcactttc tgggcccttt acacttacgt tcaaggactt ttcggaaccg 19200

gaatctgggt tctcgctcat gagtgtggac atcaagcttt ctctgattac ggaatcgtga 19260

acgatttcgt tggatggacc cttcactctt accttatggt tccttacttc agctggaagt 19320

actctcatgg aaagcaccat aaggctactg gacacatgac cagagatatg gttttcgttc 19380

ctgccaccaa agaggaattc aagaagtcta ggaacttctt cggtaacctc gctgagtact 19440

ctgaggattc tccacttaga acccttacg agcttcttgt tcaacaactt ggaggatgga 19500

tcgcttacct cttcgttaac gttacaggac aaccttaccc tgatgttcct tcttggaaat 19560

ggaaccactt ctggcttacc tctccacttt tcgagcaaag agatgctctc tacatcttcc 19620

tttctgatct tggaatcctc acccagggaa tcgttcttac tctttggtac aagaaattcg 19680

gaggatggtc ccttttcatc aactggttcg ttccttacat ctgggttaac cactggctcg 19740

ttttcatcac attccttcag cacactgatc ctactatgcc tcattacaac gctgaggaat 19800

ggactttcgc taagggtgct gctgctacta tcgatagaaa gttcggattc atcggacctc 19860

acatcttcca tgatatcatc gagactcatg tgcttcacca ctactgttct aggatcccat 19920

tctacaacgc tagacctgct tctgaggcta tcaagaaagt tatgggaaag cactacaggt 19980

ctagcgacga gaacatgtgg aagtcacttt ggaagtcttt caggtcttgc caatacgttg 20040

acggtgataa cggtgttctc atgttccgta acatcaacaa ctgcggagtt ggagctgctg 20100

agaagtaatg aaggggtgat cgattatgag atcgtacaaa gacactgcta ggtgttaagg 20160

atggataata ataataataa tgagatgaat gtgttttaag ttagtgtaac agctgtaata 20220

aagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gaggctgatg 20280

aaatgttatg tatgtttctt ggtttttaaa ataaatgaaa gcacatgctc gtgtggttct 20340

atcgaattat tcggcggttc ctgtgggaaa aagtccagaa gggccgccgc agctactact 20400

acaaccaagg ccgtggagga gggcaacaga gccagcactt cgatagctgc tgcgatgatc 20460

ttaagcaatt gaggagcgag tgcacatgca ggggactgga gcgtgcaatc ggccagatga 20520

ggcaggacat ccagcagcag ggacagcagc aggaagttga gaggtggtcc catcaatcta 20580

aacaagtcgc tagggacctt ccgggacagt gcggcaccca gcctagccga tgccagctcc 20640

aggggcagca gcagtctgca tggttttgaa gtggtgatcg atgagatcgt ataaagacac 20700

tgctaggtgt taaggatggg ataataagat gtgttttaag tcattaaccg taataaaaag 20760

agagagaggc tgatggaatg ttatgtatgt atgtttcttg gtttttaaaa ttaaatggaa 20820

agcacatgct cgtgtgggtt ctatctcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt 20880

agtttggtat tgagtaaaac aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat 20940

atatatgcct ttaagacttt ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg 21000

actcttctgg catgtaatat ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa 21060

taattggttg tacgatcact ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt 21120

cttccatatt catatgtcaa aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag 21180

tgaaatttcg ataatttaaa attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt 21240

tttatactta attactaaat ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc 21300

aaacgactaa aataaataaa tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt 21360

taatagatca tatgtttgta aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca 21420

aaaatttgac aaagtaagat taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg 21480

ctgaaaaccc ggcaaaaccg aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg 21540

atataaaccg aaccaactcg gtccatttgc acccctaatc ataatagctt taatatttca 21600

agatattatt aagttaacgt tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta 21660

tatggctgta atatgaattt aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga 21720

ttctaaaaaa atatcccaag tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt 21780

acagcaaagc cagaatacaa agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa 21840

caaatatttt taaaaaaata cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tatttttgt 21900

tcttaaacaa gcatccccte taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct 21960

cccttcgtta caaaaatttt ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtcctgcag 22020

gctagtagat tggttggttg gtttccatgt accagaaggc ttaccctatt agttgaaagt 22080

tgaaactttg ttccctactc aattcctagt tgtgtaaatg tatgtatatg taatgtgtat 22140

aaaacgtagt acttaaatga ctaggagtgg ttcttgagac cgatgagaga tgggagcaga 22200

actaaagatg atgacataat taagaacgaa tttgaaaggc tcttaggttt gaatcctatt 22260

cgagaatgtt tttgtcaaag atagtggcga ttttgaacca aagaaaacat ttaaaaaatc 22320

agtatccggt tacgttcatg caaatagaaa gtggtctagg atctgattgt aattttagac 22380

ttaaagagtc tcttaagatt caatcctggc tgtgtacaaa actacaaata atatatttta 22440

gactatttgg ccttaactaa acttccactc attatttact gaggttagag aatagacttg 22500

cgaataaaca cattcccgag aaatactcat gatcccataa ttagtcagag ggtatgccaa 22560

tcagatctaa gaacacacat tccctcaaat tttaatgcac atgtaatcat agtttagcac 22620

aattcaaaaa taatgtagta ttaaagacag aaatttgtag actttttttt ggcgttaaaa 22680

gaagactaag tttatacgta cattttattt taagtggaaa accgaaattt tccatcgaaa 22740

tatatgaatt tagtatatat atttctgcaa tgtactattt tgctattttg gcaactttca 22800

gtggactact actttattac aatgtgtatg gatgcatgag tttgagtata cacatgtcta 22860

aatgcatgct ttgtaaaacg taacggacca caaaagagga tccatacaaa tacatctcat 22920

agcttcctcc attatttttcc gacacaaaca gagcatttta caacaattac caacaacaac 22980

aaacaacaaa caacattaca attacattta caattaccat accatggaat ttgctcaacc 23040

tctcgttgct atggctcaag agcagtacgc tgctatcgat gctgttgttg ctcctgctat 23100

cttctctgct accgactcta ttggatgggg actcaagcct atctcttctg ctactaagga 23160

tctccctctc gttgaatctc ctacccctct tatcctttct ctcctcgctt acttcgctat 23220

cgttggttct ggactcgttt accgtaaagt gttccctaga accgttaagg gacaggatcc 23280

tttccttctc aaggctctta tgctcgctca caacgtttte cttatcggac tcagcctta 23340

catgtgcctc aagctcgttt acgaggctta cgtgaacaag tactccttct ggggaaacgc 23400

ttacaaccct gctcaaaccg agatggctaa ggtgatctgg atcttctacg tgtccaagat 23460

ctacgagttc atggacacct tcatcatgct tctcaaggga aacgttaacc aggtttcctt 23520

cctccatgtt taccaccacg gatctatctc tggaatctgg tggatgatca cttatgctgc 23580

tccaggtgga gatgcttact tctctgctgc tctcaactct tgggttcatg tgtgcatgta 23640

cacctactac ttcatggctg ctgttcttcc taaggacgaa aagaccaaga gaaagtacct 23700

ttggtgggga agatacctta cccagatgca aatgttccag ttcttcatga accttctcca 23760

ggctgtttac ctcctctact cttcttctcc ttaccctaag ttcattgctc aactcctcgt 23820

tgttacatg gttaccctcc tcatgctttt cggaaacttc tactacatga agcaccacgc 23880

ttctaagtga taagggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagtg taataagacg 23940

actctcacta ctcgatcgct agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac 24000

aacttatcgt aatgcatgtg aaactataac acattaatcc tacttgtcat atgataacac 24060

tctccccatt taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttctttaaat gattaaaaaa 24120

aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa 24180

aaaaatactt atactaattt agtctgaata gaataattag attctagcct gcagggcggc 24240

cgcggatccc atggagtcaa agattcaaat agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac 24300

tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa 24360

catggtggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatatc aaagatacag tctcagaaga 24420

ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca 24480

ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaggtg gctcctacaa 24540

atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtggtcc 24600

caaagatgga cccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc 24660

ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca 24720

ctatccttcg caagacccct cctctatata aggaagttca tttcatttgg agagaacacg 24780

ggggactgaa ttaaatatga gccctgagag gcgtcctgtt gaaatcagac ctgctactgc 24840

tgctgatatg gctgctgttt gtgatatcgt gaaccactac atcgagactt ctaccgttaa 24900

cttcagaact gagcctcaaa ctcctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga 24960

tagataccct tggcttgttg ctgaggttga gggtgttgtt gctggaatcg cttacgctgg 25020

acttggaaag gctagaaacg cttacgattg gactgttgag tctaccgttt acgtttcaca 25080

cagacatcag agacttggac ttggatctac cctttacact caccttctca agtctatgga 25140

agctcaggga ttcaagtctg ttgttgctgt tatcggactc cctaacgatc cttctgttag 25200

acttcatgag gctcttggat acactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca 25260

cggtggatgg catgatgttg gattctggca aagagatttc gagcttcctg ctcctcctag 25320

acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgatc gttcaaacat ttggcaataa 25380

agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 25440

aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 25500

tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 25560

gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatca ctagtgatgt 25620

acggttaaaa ccaccccagt acattaaaaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 25680

cgtcaatttg tttacaccac aatatatcct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 25740

gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagtcc 25787

<210> 4
<211> 22824
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> pGA7-mod_D нуклеотидна послідовність
<400> 4

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttttca cgcccttttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgcctcgatt aaaaatccca attatatttg gtctaattta 240

gtttggtatt gagtaaaaca aattcgaacc aaaccaaaat ataaatatat agtttttata 300

tatatgcctt taagactttt tatagaattt tctttaaaaa atatctagaa atatttgcga 360

ctcttctggc atgtaatatt tcgttaaata tgaagtgctc catttttatt aactttaaat 420

aattggttgt acgatcactt tcttatcaag tgttactaaa atgcgtcaat ctctttgttc 480

ttccatattc atatgtcaaa atctatcaaa attcttatat atctttttcg aatttgaagt 540

gaaatttcga taatttaaaa ttaaatagaa catatcatta tttaggtatc atattgattt 600

ttatacttaa ttactaaatt tggttaactt tgaaagtgta catcaacgaa aaattagtca 660

aacgactaaa ataaataaat atcatgtgtt attaagaaaa ttctcctata agaatatttt 720

aatagatcat atgtttgtaa aaaaaattaa tttttactaa cacatatatt tacttatcaa 780

aaatttgaca aagtaagatt aaaataatat tcatctaaca aaaaaaaaac cagaaaatgc 840

tgaaaacccg gcaaaaccga accaatccaa accgatatag ttggtttggt ttgattttga 900

tataaaccga accaactcgg tccatttgca cccctaatca taatagcttt aatatttcaa 960

gatattatta agttaacgtt gtcaatatcc tggaaatttt gcaaaatgaa tcaagcctat 1020

atggctgtaa tatgaatttа aaagcagctc gatgtggtgg taatatgtaa tttacttgat 1080

tctaaaaaaa tatcccaagt attaataatt tctgctagga agaaggttag ctacgattta 1140

cagcaaagcc agaatacaaa gaaccataaa gtgattgaag ctcgaaatat acgaaggaac 1200

aaatattttt aaaaaaatac gcaatgactt ggaacaaaag aaagtgatat atttttttgtt 1260

cttaaacaag catccccctct aaagaatggc agttttcctt tgcatgtaac tattatgctc 1320

ccttcgttac aaaaattttg gactactatt gggaacttct tctgaaaata gtggcgcccc 1380

gcggaaagct tgctagccaa ttggggcccа acgttctcga gtttttctag aaggaaactg 1440

aaggcgggaa acgacaatct gctagtggat ctcccagtca cgacgttgta aaacgggcgc 1500

cccgcggaaa gcttgcggcc gcccgatcta gtaacataga tgacaccgcg cgcgataatt 1560

tatcctagtt tgcgcgctat attttgtttt ctatcgcgta ttaaatgtat aattgcggga 1620

ctctaatcat aaaaacccat ctcataaata acgtcatgca ttacatgtta attattacgt 1680

gcttaacgta attcaacaga aattatatga taatcatcgc aagaccggca acaggattca 1740

atcttaagaa actttattgc caaatgtttg aacgatcggc gcgcctcatt agtgagcctt 1800

ctcagccttt ccgttaacgt agtagtgctg tcccaccttа tcaaggttag agaaagtagc 1860

cttccaagca ccgtagtaag agagcacctt gtagttgagt ccccacttct tagcgaaagg 1920

aacgaatctt ctgctaacct caggctgtct gaattgaggc atatcaggga agaggtggtg 1980

gataacctga cagttaaggt atcccataag ccagttcacg tatcctctag aaggatcgat 2040

atcaacggtg tgatcaacag cgtagttaac ccaagaaagg tgcttatcag atggaacaac 2100

agggaggtga gtatgagaag tagagaagtg agcgaaaagg tacatgtaag cgatccagtt 2160

tccgaaagtg aaccaccagt aagcaacagg ccaagagtat ccagtagcaa gcttgataac 2220

agcggttcta acaacatgag aaacgagcat ccaagaagcc tcttcgtagt tcttcttacg 2280

gagaacttgt ctagggtgga gaacgtagat ccagaaagct tgaacaagaa gtccagaggt 2340

aacaggaacg aaagtccaag cttgaagtct agcccaagct ctagagaatc ctctaggtct 2400

gttatcctca acagcagtgt tgaagaaagc cacagcagga gtggtatcaa gatccatatc 2460

gtgtctaacc ttttgagggg tagcatggtg cttgttatgc atctggttcc acatctcacc 2520

agaagtagaa agtccgaatc cacaagtcat agcctgaagt ctcttgtcca cgtaaacaga 2580

tccggtaaga gagttatgtc cacctcatg ttgaacccat ccacatctag ctccgaagaa 2640

agcaccgtaa acaacagaag caatgatagg gtatccagcg tacataagag cagttccaag 2700

agcgaatgta gcaagaagct cgagaagtct gtaagccaca tgggtgatag aaggcttgaa 2760

gaatccatct ctctcaagct cagcacgcca tctagcgaaa tcctcaagca taggagcatc 2820

ctcagactca gatctcttga tctcagcagg tctagaaggc aaagctctaa gcatcttcca 2880

agccttgaga gaacgcatgt ggaattcttt gaaagcctca gtagcatcag caccagtgtt 2940

agcaagcatg tagaagatca cagatccacc agggtgcttg aagttagtca catcgtactc 3000

aacgtcctca actctaaccc atctagtctc gaaagtagca gcaagctcat gaggctcaag 3060

agtcttaaga tcaacaggag cagtagaagc atccttagca tcaagagcct cagcagaaga 3120

tttagacctg gtaagtggag atctaggaga agatcttcca tcagtcttag gagggcacat 3180

ggtatggtaa ttgtaaatgt aattgtaatg ttgtttgttg tttgttgttg ttggtaattg 3240

ttgtaaaaga tcctcgtgta tgtttttaat cttgtttgta tcgatgagtt ttggtttgag 3300

taaagagtga agcggatgag ttaatttata ggctataaag gagatttgca tggcgatcac 3360

gtgtaataat gcatgcacgc atgtgattgt atgtgtgtgc tgtgagagag aagctcttag 3420

gtgtttgaag ggagtgacaa gtggcgaaga aaaacaattc tccgcggctg catgctatgt 3480

gtaacgtgta gctaatgttc tggcatggca tcttatgaac gattcttttt aaaaacaagg 3540

taaaaactta acttcataaa attaaaaaaa aaaacgttta ctaagttggt ttaaaagggg 3600

atgagactag tagattggtt ggttggtttc catgtaccag aaggcttacc ctattagttg 3660

aaagttgaaa ctttgttccc tactcaattc ctagttgtgt aaatgtatgt atatgtaatg 3720

tgtataaaac gtagtactta aatgactagg agtggttctt gagaccgatg agagatggga 3780

gcagaactaa agatgatgac ataattaaga acgaatttga aaggctctta ggtttgaatc 3840

ctattcgaga atgtttttgt caaagatagt ggcgattttg aaccaaagaa aacatttaaa 3900

aaatcagtat ccggttacgt tcatgcaaat agaaagtggt ctaggatctg attgtaattt 3960

tagacttaaa gagtctctta agattcaatc ctggctgtgt acaaaactac aaataatata 4020

ttttagacta tttggcctta actaaacttc cactcattat ttactgaggt tagagaatag 4080

acttgcgaat aaacacattc ccgagaaata ctcatgatcc cataattagt cagagggtat 4140

gccaatcaga tctaagaaca cacattccct caaattttaa tgcacatgta atcatagttt 4200

agcacaattc aaaaataatg tagtattaaa gacagaaatt tgtagacttt tttttggcgt 4260

taaaagaaga ctaagtttat acgtacattt tattttaagt ggaaaaccga aattttccat 4320

cgaaatatat gaatttagta tatatatttc tgcaatgtac tattttgcta ttttggcaac 4380

tttcagtgga ctactacttt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtatacacat 4440

gtctaaatgc atgctttgta aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaaatacat 4500

ctcatagctt cctccattat tttccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca 4560

acaacaaaca acaaacaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaattcgcc 4620

cagcctcttg ttgctatggc tcaagagcaa tacgctgcta tcgatgctgt tgttgctcct 4680

gctatcttct ctgctactga ttctatcgga tggggacttа agcctatctc ttctgctact 4740

aaggacttgc ctcttgttga gtctcctaca cctctcatcc tttctttgct tgcttacttc 4800

gctatcgttg gatctggact cgtttacaga aaggttttcc ctagaaccgt gaagggacaa 4860

gatccattcc ttttgaaggc tcttatgctt gctcacaacg tgttccttat cggactttct 4920

ctttacatgt gcctcaagct tgtgtacgag gcttacgtta acaagtactc tttctgggga 4980

aacgcttaca accctgctca aactgagatg gctaaggtta tctggatctt ctacgtgagc 5040

aagatctacg agttcatgga taccttcatc atgctcctca agggaaatgt taaccaggtt 5100

agcttccttc acgtttacca tcacggatct atctctggaa tctggtggat gattacttac 5160

gctgctcctg gtggtgatgc ttacttctct gctgctctta actcttgggt tcacgtgtgt 5220

atgtacacct actattttat ggctgccgtg cttcctaagg acgagaaaac taagagaaag 5280

tacctctggt ggggaagata ccttactcaa atgcagatgt tccagttctt catgaacctt 5340

ctccaggctg tttaccttct ctactcttca tctccttacc ctaagtttat cgctcagctc 5400

ctcgtggtgt acatggttac tcttctcatg cttttcggaa acttctacta catgaagcac 5460

cacgctagca agtgatgagg cgcgccgggc cgccgccatg tgacagatcg aaggaagaaa 5520

gtgtaataag acgactctca ctactcgatc gctagtgatt gtcattgtta tatataataa 5580

tgttatcttt cacaacttat cgtaatgcat gtgaaactat aacacattaa tcctacttgt 5640

catatgataa cactctcccc atttaaaact cttgtcaatt taaagatata agattcttta 5700

aatgattaaa aaaaatatat tataaattca atcactccta ctaataaatt attaattatt 5760

atttattgat taaaaaaata cttatactaa tttagtctga atagaataat tagattctag 5820

tctcatcccc ttttaaacca acttagtaaa cgtttttttt tttaatttta tgaagttaag 5880

tttttacctt gtttttaaaa agaatcgttc ataagatgcc atgccagaac attagctaca 5940

cgttacacat agcatgcagc cgcggagaat tgtttttctt cgccacttgt cactcccttc 6000

aaacacctaa gagcttctct ctcacagcac acacatacaa tcacatgcgt gcatgcatta 6060

ttacacgtga tcgccatgca aatctccttt atagcctata aattaactca tccgcttcac 6120

tctttactca aaccaaaact catcgataca aacaagatta aaaacataca cgaggatctt 6180

ttacaacaat taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac 6240

cataccatgc ctccaaggga ctcttactct tatgctgctc ctccttctgc tcaacttcac 6300

gaagttgata ctcctcaaga gcacgacaag aaagagcttg ttatcggaga tagggcttac 6360

gatgttacca acttcgttaa gagacaccct ggtggaaaga tcattgctta ccaagttgga 6420

actgatgcta ccgatgctta caagcagttc catgttagat ctgctaaggc tgacaagatg 6480

cttaagtctc ttccttctcg tcctgttcac aagggatact ctccaagaag ggctgatctt 6540

atcgctgatt tccaagagtt caccaagcaa cttgaggctg agggaatgtt cgagccttct 6600

cttcctcatg ttgcttacag acttgctgag gttatcgcta tgcatgttgc tggtgctgct 6660

cttatctggc atggatacac tttcgctgga atcgctatgc ttggagttgt tcagggaaga 6720

tgtggatggc ttatgcatga gggtggacat tactctctca ctggaaacat tgctttcgac 6780

agagctatcc aagttgcttg ttacggactt ggatgtggaa tgtctggtgc ttggtggcgt 6840

aaccagcata acaagcacca tgctactcct caaaagcttc agcacgatgt tgatcttgat 6900

acccttcctc tcgttgcttt ccatgagaga atcgctgcta aggttaagtc tcctgctatg 6960

aaggcttggc tttctatgca agctaagctt ttcgctcctg ttaccactct tcttgttgct 7020

cttggatggc agctttacct tcatcctaga cacatgctca ggactaagca ctacgatgag 7080

cttgctatgc tcggaatcag atacggactt gttggatacc ttgctgctaa ctacggtgct 7140

ggatacgttc tcgcttgtta ccttctttac gttcagcttg gagctatgta catcttctgc 7200

aacttcgctg tttctcatac tcacctcccc gttgttgagc ctaacgagca tgctacttgg 7260

gttgagtacg ctgctaacca cactactaac tgttctccat cttggtggtg tgattggtgg 7320
atgtcttacc ttaactacca gatcgagcac caccttttacc cttctatgcc tcaattcaga 7380
caccctaaga tcgctcctag agttaagcag cttttcgaga agcacggact tcactacgat 7440
gttagaggat acttcgaggc tatggctgat actttcgcta accttgataa cgttgcccat 7500
gctcctgaga agaaaatgca gtaatgagat cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta 7560
agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat aatttctgtt gaattacgtt 7620
aagcacgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt ttttatgatt 7680
agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg cgcaaactag 7740
gataaattat cgcgcgcggt gtcatctatg ttactagatc ggtcgattaa aaatcccaat 7800
tatatttggt ctaatttagt ttggtattga gtaaaacaaa ttcgaaccaa accaaaatat 7860
aaatatatag tttttatata tatgccttta agacttttta tagaattttc tttaaaaaat 7920
atctagaaat atttgcgact cttctggcat gtaatatttc gttaaatatg aagtgctcca 7980
tttttattaa ctttaaataa ttggttgtac gatcactttc ttatcaagtg ttactaaaat 8040
gcgtcaatct ctttgttctt ccatattcat atgtcaaaat ctatcaaaat tcttatatat 8100
cittttcgaa tttgaagtga aatttcgata atttaaaatt aaatagaaca tatcattatt 8160
taggtatcat attgattttt atacttaatt actaaatttg gttaactttg aaagtgtaca 8220
tcaacgaaaa attagtcaaa cgactaaaat aaataaatat catgtgttat taagaaaatt 8280

ctcctataag aatattttaa tagatcatat gtttgtaaaa aaaattaatt tttactaaca 8340
catatattta cttatcaaaa atttgacaaa gtaagattaa aataatattc atctaacaaa 8400
aaaaaaacca gaaaatgctg aaaacccggc aaaaccgaac caatccaaac cgatatagtt 8460
ggtttggttt gattttgata taaaccgaac caactcggtc catttgcacc cctaatcata 8520
atagctttaa tatttcaaga tattattaag ttaacgttgt caatatcctg gaaattttgc 8580
aaaatgaatc aagcctatat ggctgtaata tgaatttaaa agcagctcga tgtggtggta 8640
atatgtaatt tacttgattc taaaaaaata tcccaagtat taataatttc tgctaggaag 8700
aaggttagct acgatttaca gcaaagccag aatacaaaga accataaagt gattgaagct 8760
cgaaatatac gaaggaacaa atatttttaa aaaaatacgc aatgacttgg aacaaaagaa 8820
agtgatatat tttttgttct taaacaagca tcccctctaa agaatggcag ttttcctttg 8880

catgtaacta ttatgctccc ttcgttacaa aaattttgga ctactattgg gaacttcttc 8940

tgaaaatagt gatagaaccc acacgagcat gtgctttcca tttaatttta aaaaccaaga 9000

aacatacata cataacattc catcagcctc tctctctttt tattacggtt aatgacttaa 9060

aacacatctt attatcccat ccttaacacc tagcagtgtc tttatacgat ctcatcgatc 9120

accacttcaa aaccatgcag actgctgctg cccctggagc tggcatcggc taggctgggt 9180

gccgcactgt cccggaaggt ccctagcgac ttgtttagat tgatgggacc acctctcaac 9240

ttcctgctgc tgtcccctgct gctggatgtc ctgcctcatc tggccgattg cacgctccag 9300

tcccctgcat gtgcactcgc tcctcaattg cttaagatca tcgcagcagc tatcgaagtg 9360

ctggctctgt tgccctcctc cacggccttg gttgtagtag tagctgccgc cgcccttctg 9420

gacttttttcc cacaggaacc gccgaataat tcgatagaac cacacgagca tgtgctttca 9480

tttattttaa aaaccaagaa acatacataa catttcatca gcctctctct ctctctctct 9540

ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctttatta cagctgttac actaacttaa 9600

aacacattca tctcattatt attattatta tccatcctta acacctagca gtgtctttgt 9660

acgatctcat aatcgatcac cccttcatca ggtatcctta ggcttcactc caacgttgtt 9720

gcagttacgg aacatgtaca caccatcatg gttctcaacg aactggcaag atctccaagt 9780

tttccaaagg ctaacccaca tgttctcatc ggtgtgtctg tagtgctctc ccataacttt 9840

cttgatgcac tcggtagctt ctctagcatg gtagaatggg atccttgaaa cgtagtgatg 9900

gagcacatga gtctcgatga tgtcatggaa gatgattccg aggattccga actctctatc 9960

gatagtagca gcagcaccct tagcgaaagt ccactcttga gcatcgtaat gaggcataga 10020

agaatcggtg tgctgaagga aggtaacgaa aacaagccag tggttaacaa ggatccaagg 10080

acagaaccat gtgatgaaag taggccagaa tccgaaaacc ttgtaagcgg tgtaaacaga 10140

agtgagggta gcaaggattc caagatcaga aagaacgatg taccagtagt ccttcttatc 10200

gaaaacaggg ctagaaggcc agtagtgaga cttgaagaac ttagaaacac cagggtaagg 10260

ttgtccagta gcgttagtag caaggtaaag agaaagtcct ccaagctgtt ggaacaagag 10320

agcgaaaaca gagtagatag gagtttcctc agcgatatcg tgaaggctgg taacttggtg 10380

cttctctttg aattcctcgg cggtgtaagg aacgaaaacc atatctctgg tcatgtgtcc 10440

agtagcctta tggtgcttag catgagagaa cttccagctg aagtaaggaa ccataacaag 10500

agagtggaga acccatccaa cggtatcgtt aacccatccg tagttagaga aagcagaatg 10560

tccacactca tgtccaagga tccagattcc gaatccgaaa caagagatag agaacacgta 10620

agcagaccaa gcagcgaatc taaggaattc gttagggaga agagggatgt aggtaagtcc 10680

aacgtaagcg atagcagaga tagccacgat atctctcacc acgtaagaca tagacttcac 10740

gagagatctc tcgtaacagt gcttagggat agcgtcaagg atatccttga tggtgtaatc 10800

tggcaccttg aaaacgtttc cgaaggtatc gatagcggtc ttttgctgct tgaaagatgc 10860

aacgtttcca gaacgcctaa cggtcttagt agatccctca aggatctcag atccagacac 10920

ggtaacctta gacatggtat ggtaattgta aatgtaattg taatgttgtt tgttgtttgt 10980

tgttgttggt aattgttgta aaatttttgg tggtgattgg ttctttaagg tgtgagagtg 11040

agttgtgagt tgtgtggtgg gtttggtgag attggggatg gtgggtttat atagtggaga 11100

ctgaggaatg gggtcgtgag tgttaacttt gcatgggcta cacgtgggtt cttttgggct 11160

tacacgtagt attattcatg caaatgcagc caatacatat acggtatttt aataatgtgt 11220

gggaatacaa tatgccgagt attttactaa ttttggcaat gacaagtgta catttggatt 11280

atcttacttg gcctctcttg ctttaatttg gattatttct attctcttac cttggccgtt 11340

catattcaca tccctaaagg caagacagaa ttgaatggtg gccaaaaatt aaaacgatgg 11400

atatgaccta catagtgtag gatcaattaa cgtcgaagga aaatactgat tctctcaagc 11460

atacggacaa gggtaaataa catagtcacc agaacataat aaacaaaaag tgcagaagca 11520

agactaaaaa aattagctat ggacattcag gttcatattg gaaacatcat tatcctagtc 11580

ttgtgaccat ccttcctcct gctctagttg agaggccttg ggactaacga gaggtcagtt 11640

gggatagcag atccttatcc tggactagcc tttctggtgt ttcagagtct tcgtgccgcc 11700

gtctacatct atctccatta ggtctgaaga tgactcttca caccaacgac gtttaaggtc 11760

tctatcctac tcctagcttg caatacctgg cttgcaatac ctggagcatc gtgcacgatg 11820

attggatact gtggaggagg agtgtttgct gatttagagc tcccggttgg gtgatttgac 11880

ttcgatttca gttttaggctt gttgaaattt ttcaggttcc attgtgaagc ctttagagct 11940

tgagcttcct tccatgttaa tgccttgatc gaatactcct agagaaaagg gaagtcgatc 12000

tctgagtatt gaaatcgaag tgcacatttt ttttcaacgt gtccaatcaa tccacaaaca 12060

aagcagaaga caggtaatct ttcatactta tactgacaag taatagtctt accgtcatgc 12120

ataataacgt ctcgttcctt caagaggggt tttccgacat ccataacgac ccgaagcctc 12180

atgaaagcat tagggaagaa cttttggttc ttcttgtcat ggcctttata ggtgtcagcc 12240

gagctcgcca attcccgtcc gactggctcc gcaaaatatt cgaacggcaa gttatggact 12300

tgcaaccata actccacggt attgagcagg acctattgtg aagactcatc tcatggagct 12360

tcagaatgtg gttgtcagca aaccaatgac cgaaatccat cacatgacgg acgtccagtg 12420

ggtgagcgaa acgaaacagg aagcgcctat ctttcagagt cgtgagctcc acaccggatt 12480

ccggcaacta cgtgttgggc aggcttcgcc gtattagaga tatgttgagg cagacccatc 12540

tgtgccactc gtacaattac gagagttgtt ttttttgtga ttttcctagt ttctcgttga 12600

tggtgagctc atattctaca tcgtatggtc tctcaacgtc gtttcctgtc atctgatatc 12660

ccgtcatttg catccacgtg cgccgcctcc cgtgccaagt ccctaggtgt catgcacgcc 12720

aaattggtgg tggtgcgggc tgccctgtgc ttcttaccga tgggtggagg ttgagtttgg 12780

gggtctccgc ggcgatggta gtgggttgac ggtttggtgt gggttgacgg cattgatcaa 12840

tttacttctt gcttcaaatt ctttggcaga aaacaattca ttagattaga actggaaacc 12900

agagtgatga gacggattaa gtcagattcc aacagagtta catctcttaa gaaataatgt 12960

aacccctttа gactttatat atttgcaatt aaaaaaataa tttaactttt agactttata 13020

tatagtttta ataactaagt ttaaccactc tattatttat atcgaaacta tttgtatgtc 13080

tcccctctaa ataaacttgg tattgtgttt acagaaccta taatcaaata atcaatactc 13140

aactgaagtt tgtgcagtta attgaaggga ttaacggcca aaatgcacta gtattatcaa 13200

ccgaatagat tcacactaga tggccatttc catcaatatc atcgccgttc ttcttctgtc 13260

cacatatccc ctctgaaact tgagagacac ctgcacttca ttgtccttat tacgtgttac 13320

aaaatgaaac ccatgcatcc atgcaaactg aagaatggcg caagaacccc tcccctccat 13380

ttcttatgtg gcgaccatcc atttcaccat ctcccgctat aaaacacccc catcacttca 13440

cctagaacat catcactact tgcttatcca tccaaaagat acccactttt acaacaatta 13500

ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattacattt acaattacca taccatgcca 13560

cctagrgctg ctaagcaaat gggagcttct actggtgttc atgctggtgt tactgactct 13620

tctgctttca ccagaaagga tgttgctgat agacctgatc tcaccatcgt tggagattct 13680

gtttacgatg ctaaggcttt cagatctgag catcctggtg gtgctcattt cgtttctttg 13740

ttcggaggaa gagatgctac tgaggctttc atggaatacc atagaagggc ttggcctaag 13800

tctagaatgt ctagattcca cgttggatct cttgcttcta ctgaggaacc tgttgctgct 13860

gatgagggat accttcaact ttgtgctagg atcgctaaga tggtgccttc tgtttcttct 13920

ggattcgctc ctgcttctta ctgggttaag gctggactta tccttggatc tgctatcgct 13980

cttgaggctt acatgcttta cgctggaaag agacttctcc cttctatcgt tcttggatgg 14040

cttttcgctc ttatcggtct taacatccag catgatgcta accatggtgc tttgtctaag 14100

tctgcttctg ttaaccttgc tcttggactt tgtcaggatt ggatcggagg atctatgatc 14160

ctttggcttc aagagcatgt tgttatgcac cacctccaca ctaacgatgt tgataaggat 14220

cctgatcaaa aggctcacgg tgctcttaga ctcaagccta ctgatgcttg gtcacctatg 14280

cattggcttc agcatctttа ccttttgcct ggtgagacta tgtacgcttt caagcttttg 14340

ttcctcgaca tctctgagct tgttatgtgg cgttgggagg gtgagcctat ctctaagctt 14400

gctggatacc tctttatgcc ttctttgctt ctcaagctta cctttctgggc tagattcgtt 14460

gctttgcctc tttaccttgc tccttctgtt catactgctg tgtgtatcgc tgctactgtt 14520

atgactggat ctttctacct cgctttcttc ttcttcatct cccacaactt cgagggtgtt 14580

gcttctgttg gacctgatgg atctatcact tctatgacta gaggtgctag cttccttaag 14640

agacaagctg agacttcttc taacgttgga ggacctcttc ttgctactct taacggtgga 14700

ctcaactacc aaattgagca tcacttgttc cctagagttc accatggatt ctaccctaga 14760

cttgctcctc ttgttaaggc tgagcttgag gctagaggaa tcgagtacaa gcactaccct 14820

actatctggt ctaaccttgc ttctaccctc agacatatgt acgctcttgg aagaaggcct 14880

agatctaagg ctgagtaatg acaagcttat gtgacgtgaa ataataacgg taaaatatat 14940

gtaataataa taataataaa gccacaaagt gagaatgagg ggaaggggaa atgtgtaatg 15000

agccagtagc cggtggtgct aattttgtat cgtattgtca ataaatcatg aattttgtgg 15060

tttttatgtg ttttttttaaa tcatgaattt taaattttat aaaataatct ccaatcggaa 15120

gaacaacatt ccatatccat gcatggatgt ttctttaccc aaatctagtt cttgagagga 15180

tgaagcatca ccgaacagtt ctgcaactat ccctcaaaag ctttaaaatg aacaacaagg 15240

aacagagcaa cgttccaaag atcccaaacg aaacatatta tctatactaa tactatatta 15300

ttaattacta ctgcccggaa tcacaatccc tgaatgattc ctattaacta caagccttgt 15360

tggcggcgga gaagtgatcg gcgcggcgag aagcagcgga ctcggagacg aggccttgga 15420

agatctgagt cgaacgggca gaatcagtat tttccttcga cgttaattga tcctacacta 15480

tgtaggtcat atccatcgtt ttaatttttg gccaccattc aattctgtct tgcctttagg 15540

gatgtgaata tgaacggcca aggtaagaga ataaaaataa tccaaattaa agcaagagag 15600

gccaagtaag ataatccaaa tgtacacttg tcattgccaa aattagtaaa atactcggca 15660

tattgtattc ccacacatta ttaaaatacc gtatatgtat tggctgcatt tgcatgaata 15720

atactacgtg taagcccaaa agaacccacg tgtagcccat gcaaagttaa cactcacgac 15780

cccattcctc agtctccact atataaaccc accatcccca atctcaccaa acccaccaca 15840

caactcacaa ctcactctca caccttaaag aaccaatcac caccaaaaat tttacaacaa 15900

ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat tacaattaca tttacaatta ccataccatg 15960

agcgctgtta ccgttactgg atctgatcct aagaacagag gatcttctag caacaccgag 16020

caagaggttc caaaagttgc tatcgatacc aacggaaacg tgttctctgt tcctgatttc 16080

accatcaagg acatccttgg agctatccct catgagtgtt acgagagaag attggctacc 16140

tctctctact acgtgttcag agatatcttc tgcatgctta ccaccggata ccttacccat 16200

aagatccttt accctctcct catctcttac acctctaaca gcatcatcaa gttcactttc 16260

tgggcccttt acacttacgt tcaaggactt ttcggaaccg gaatctgggt tctcgctcat 16320

gagtgtggac atcaagcttt ctctgattac ggaatcgtga acgatttcgt tggatggacc 16380

cttcactctt accttatggt tccttacttc agctggaagt actctcatgg aaagcaccat 16440

aaggctactg gacacatgac cagagatatg gttttcgttc ctgccaccaa agaggaattc 16500

aagaagtcta ggaacttctt cggtaacctc gctgagtact ctgaggattc tccacttaga 16560

acccctttacg agcttcttgt tcaacaactt ggaggatgga tcgcttacct cttcgttaac 16620

gttacaggac aaccttaccc tgatgttcct tcttggaaat ggaaccactt ctggcttacc 16680

tctccacttt tcgagcaaag agatgctctc tacatcttcc tttctgatct tggaatcctc 16740

acccagggaa tcgttcttac tctttggtac aagaaattcg gaggatggtc ccttttcatc 16800

aactggttcg ttccttacat ctgggttaac cactggctcg ttttcatcac attccttcag 16860

cacactgatc ctactatgcc tcattacaac gctgaggaat ggactttcgc taagggtgct 16920

gctgctacta tcgatagaaa gttcggattc atcggacctc acatcttcca tgatatcatc 16980

gagactcatg tgcttcacca ctactgttct aggatcccat tctacaacgc tagacctgct 17040

tctgaggcta tcaagaaagt tatgggaaag cactacaggt ctagcgacga gaacatgtgg 17100

aagtcacttt ggaagtcttt caggtcttgc caatacgttg acggtgataa cggtgttctc 17160

atgttccgta acatcaacaa ctgcggagtt ggagctgctg agaagtaatg aaggggtgat 17220

cgattatgag atcgtacaaa gacactgcta ggtgttaagg atggataata ataataataa 17280

tgagatgaat gtgttttaag ttagtgtaac agctgtaata aagagagaga gagagagaga 17340

gagagagaga gagagagaga gagagagaga gaggctgatg aaatgttatg tatgtttctt 17400

ggtttttaaa ataaatgaaa gcacatgctc gtgtggttct atcgaattat tcggcggttc 17460

ctgtgggaaa aagtccagaa gggccgccgc agctactact acaaccaagg ccgtggagga 17520

gggcaacaga gccagcactt cgatagctgc tgcgatgatc ttaagcaatt gaggagcgag 17580

tgcacatgca ggggactgga gcgtgcaatc ggccagatga ggcaggacat ccagcagcag 17640

ggacagcagc aggaagttga gaggtggtcc catcaatcta aacaagtcgc tagggacctt 17700

ccgggacagt gcggcaccca gcctagccga tgccagctcc aggggcagca gcagtctgca 17760

tggttttgaa gtggtgatcg atgagatcgt ataaagacac tgctaggtgt taaggatggg 17820

ataataagat gtgttttaag tcattaaccg taataaaaag agagagaggc tgatggaatg 17880

ttatgtatgt atgtttcttg gtttttaaaa ttaaatggaa agcacatgct cgtgtgggtt 17940

ctatctcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat tgagtaaaac 18000

aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct ttaagacttt 18060

ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat 18120

ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattggttg tacgatcact 18180

ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt catatgtcaa 18240

aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaaatttcg ataatttaaa 18300

attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta attactaaat 18360

ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa 18420

tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta 18480

aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat 18540

taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc ggcaaaaccg 18600

aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccg aaccaactcg 18660

gtccatttgc acccctaatc ataatagctt taatatttca agatattatt aagttaacgt 18720

tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt 18780

aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa atatcccaag 18840

tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa 18900

agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaaata 18960

cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tatttttttgt tcttaaacaa gcatcccctc 19020

taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatttt 19080

ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtcctgcag gctagtagat tggttggttg 19140

gtttccatgt accagaaggc ttaccctatt agttgaaagt tgaaactttg ttccctactc 19200

aattcctagt tgtgtaaatg tatgtatatg taatgtgtat aaaacgtagt acttaaatga 19260

ctaggagtgg ttcttgagac cgatgagaga tgggagcaga actaaagatg atgacataat 19320

taagaacgaa tttgaaaggc tcttaggttt gaatcctatt cgagaatgtt tttgtcaaag 19380

atagtggcga ttttgaacca aagaaaacat ttaaaaaatc agtatccggt tacgttcatg 19440

caaatagaaa gtggtctagg atctgattgt aattttagac ttaaagagtc tcttaagatt 19500

caatcctggc tgtgtacaaa actacaaata atatatttta gactatttgg ccttaactaa 19560

acttccactc attatttact gaggttagag aatagacttg cgaataaaca cattcccgag 19620

aaatactcat gatcccataa ttagtcagag ggtatgccaa tcagatctaa gaacacacat 19680

tccctcaaat tttaatgcac atgtaatcat agtttagcac aattcaaaaa taatgtagta 19740

ttaaagacag aaatttgtag actttttttt ggcgttaaaa gaagactaag tttatacgta 19800

cattttattt taagtggaaa accgaaattt tccatcgaaa tatatgaatt tagtatatat 19860

atttctgcaa tgtactattt tgctattttg gcaactttca gtggactact actttattac 19920

aatgtgtatg gatgcatgag tttgagtata cacatgtcta aatgcatgct ttgtaaaacg 19980

taacggacca caaaagagga tccatacaaa tacatctcat agcttcctcc attatttccc 20040

gacacaaaca gagcatttta caacaattac caacaacaac aaacaacaaa caacattaca 20100

attacattta caattaccat accatggcct ctatcgctat ccctgctgct cttgctggaa 20160

ctcttggata cgttacctac aatgtggcta accctgatat cccagcttct gagaaagttc 20220

ctgcttactt catgcaggtt gagtactggg gacctactat cggaactatt ggatacctcc 20280

tcttcatcta cttcggaaag cgtatcatgc agaacagatc tcaacctttc ggactcaaga 20340

acgctatgct cgtttacaac ttctaccaga ccttcttcaa cagctactgc atctaccttt 20400

tcgttacttc tcatagggct cagggactta aggtttgggg aaacatccct gatatgactg 20460

ctaactcttg gggaatctct caggttatct ggcttcacta caacaacaag tacgttgagc 20520

ttctcgacac cttcttcatg gtgatgagga agaagttcga ccagctttct ttccttcaca 20580

tctaccacca cactcttctc atctggtcat ggttcgttgt tatgaagctt gagcctgttg 20640

gagattgcta cttcggatct tctgttaaca ccttcgtgca cgtgatcatg tactcttact 20700

acggacttgc tgctcttgga gttaactgtt tctggaagaa gtacatcacc cagatccaga 20760

tgcttcagtt ctgtatctgt gcttctcact ctatctacac cgcttacgtt cagaataccg 20820

ctttctggct tccttacctt caactctggg ttatggtgaa catgttcgtt ctcttcgcca 20880

acttctaccg taagaggtac aagtctaagg gtgctaagaa gcagtgataa gggccgccgc 20940

catgtgacag atcgaaggaa gaaagtgtaa taagacgact ctcactactc gatcgctagt 21000

gattgtcatt gttatatata ataatgttat ctttcacaac ttatcgtaat gcatgtgaaa 21060

ctataacaca ttaatcctac ttgtcatatg ataacactct ccccatttaa aactcttgtc 21120

aatttaaaga tataagattc tttaaatgat taaaaaaaat atattataaa ttcaatcact 21180

cctactaata aattattaat tattatttat tgattaaaaa aatacttata ctaatttagt 21240

ctgaatagaa taattagatt ctagcctgca gggcggccgc ggatcccatg gagtcaaaga 21300

ttcaaataga ggacctaaca gaactcgccg taaagactgg cgaacagttc atacagagtc 21360

tcttacgact caatgacaag aagaaaatct tcgtcaacat ggtggagcac gacacacttg 21420

tctactccaa aaatatcaaa gatacagtct cagaagacca aagggcaatt gagacttttc 21480

aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta 21540

ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa 21600

aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccacccacga 21660

ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg 21720

atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct 21780

ctatataagg aagttcattt catttggaga gaacacgggg gactgaatta aatatgagcc 21840

ctgagaggcg tcctgttgaa atcagaccctg ctactgctgc tgatatggct gctgtttgtg 21900

atatcgtgaa ccactacatc gagacttcta ccgttaactt cagaactgag cctcaaactc 21960

ctcaagagtg gatcgatgat cttgagagac tccaagatag ataccccttgg cttgttgctg 22020

aggttgaggg tgttgttgct ggaatcgctt acgctggacc ttggaaggct agaaacgctt 22080

acgattggac tgttgagtct accgtttacg tttcacacag acatcagaga cttggacttg 22140

gatctaccct ttacactcac cttctcaagt ctatggaagc tcagggattc aagtctgttg 22200

ttgctgttat cggactccct aacgatcctt ctgttagact tcatgaggct cttggataca 22260

ctgctagagg aactcttaga gctgctggat acaagcacgg tggatggcat gatgttggat 22320

tctggcaaag agatttcgag cttcctgctc ctcctagacc tgttagacca gttactcaga 22380

tctgaatttg cgtgatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 22440

tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 22500

taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcaatt 22560

atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 22620

cgcggtgtca tctatgttac tagatcacta gtgatgtacg gttaaaacca ccccagtaca 22680

ttaaaaacgt ccgcaatgtg ttattaagtt gtctaagcgt caatttgttt acaccacaat 22740

atatcctgcc accagccagc caacagctcc ccgaccggca gctcggcaca aaatcaccac 22800

tcgatacagg cagcccatca gtcc 22824

<210> 5
<211> 24809
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> pga7-mod_e нуклеотидна послідовність

<400> 5

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttttca cgccctttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgcctcgatt aaaaatccca attatatttg gtctaattta 240

gtttggtatt gagtaaaaca aattcgaacc aaaccaaaat ataaatatat agtttttata 300

tatatgcctt taagactttt tatagaattt tctttaaaaa atatctagaa atatttgcga 360

ctcttctggc atgtaatatt tcgttaaata tgaagtgctc catttttatt aactttaaat 420

aattggttgt acgatcactt tcttatcaag tgttactaaa atgcgtcaat ctctttgttc 480

ttccatattc atatgtcaaa atctatcaaa attcttatat atctttttcg aatttgaagt 540

gaaatttcga taatttaaaa ttaaatagaa catatcatta tttaggtatc atattgattt 600

ttatacttaa ttactaaatt tggttaactt tgaaagtgta catcaacgaa aaattagtca 660

aacgactaaa ataaataaat atcatgtgtt attaagaaaa ttctcctata agaatatttt 720

aatagatcat atgtttgtaa aaaaaattaa ttttttactaa cacatatatt tacttatcaa 780

aaatttgaca aagtaagatt aaaataatat tcatctaaca aaaaaaaaac cagaaaatgc 840

tgaaaacccg gcaaaaccga accaatccaa accgatatag ttggtttggt ttgattttga 900

tataaaccga accaactcgg tccatttgca cccctaatca taatagcttt aatatttcaa 960

gatattatta agttaacgtt gtcaatatcc tggaaatttt gcaaaatgaa tcaagcctat 1020

atggctgtaa tatgaattta aaagcagctc gatgtggtgg taatatgtaa tttacttgat 1080

tctaaaaaaa tatcccaagt attaataatt tctgctagga agaaggttag ctacgattta 1140

cagcaaagcc agaatacaaa gaaccataaa gtgattgaag ctcgaaatat acgaaggaac 1200

5

aaatattttt aaaaaaatac gcaatgactt ggaacaaaag aaagtgatat atttttttgtt 1260

cttaaacaag catccccctct aaagaatggc agttttcctt tgcatgtaac tattatgctc 1320

ccttcgttac aaaaattttg gactactatt gggaacttct tctgaaaata gtggcgcccc 1380

gcggaaagct tgctagccaa ttggggccca acgttctcga gtttttctag aaggaaactg 1440

aaggcgggaa acgacaatct gctagtggat ctcccagtca cgacgttgta aaacgggcgc 1500

cccgcggaaa gcttgcggcc gcggtaccgc ccgttcgact cagatcttcc aaggcctcgt 1560

ctccgagtcc gctgcttctc gccgcgccga tcacttctcc gccgccaaca aggcttgtag 1620

ttaataggaa tcattcaggg attgtgattc cgggcagtag taattaataa tatagtatta 1680

gtatagataa tatgtttcgt ttgggatctt tggaacgttg ctctgttcct tgttgttcat 1740

tttaaagctt ttgagggata gttgcagaac tgttcggtga tgcttcatcc tctcaagaac 1800

tagatttggg taaagaaaca tccatgcatg gatatggaat gttgttcttc cgattggaga 1860

ttattttata aaatttaaaa ttcatgattt aaaaaaaacac ataaaaacca caaaattcat 1920

gatttattga caatacgata caaaattagc accaccggct actggctcat tacacatttc 1980

cccttcccct cattctcact ttgtggcttt attattatta ttattacata tattttaccg 2040

ttattatttc acgtcacata agcttgttaa ttaatcatta gtgagccttc tcagcctttc 2100

cgttaacgta gtagtgctgt cccaccttat caaggttaga gaaagtagcc ttccaagcac 2160

cgtagtaaga gagcaccttg tagttgagtc cccacttctt agcgaaagga acgaatcttc 2220

tgctaacctc aggctgtctg aattgaggca tatcagggaa gaggtggtgg ataacctgac 2280

agttaaggta tcccataagc cagttcacgt atcctctaga aggatcgata tcaacggtgt 2340

gatcaacagc gtagttaacc caagaaaggt gcttatcaga tggaacaaca gggaggtgag 2400

tatgagaagt agagaagtga gcgaaaaggt acatgtaagc gatccagttt ccgaaagtga 2460

accaccagta agcaacaggc caagagtatc cagtagcaag cttgataaca gcggttctaa 2520

caacatgaga aacgagcatc caagaagcct cttcgtagtt cttcttacgg agaacttgtc 2580

tagggtggag aacgtagatc cagaaagctt gaacaagaag tccagaggta acaggaacga 2640

aagtccaagc ttgaagtcta gcccaagctc tagagaatcc tctaggtctg ttatcctcaa 2700

cagcagtgtt gaagaaagcc acagcaggag tggtatcaag atccatatcg tgtctaacct 2760

tttgaggggt agcatggtgc ttgttatgca tctggttcca catctcacca gaagtagaaa 2820

gtccgaatcc acaagtcata gcctgaagtc tcttgtccac gtaaacagat ccggtaagag 2880

agttatgtcc accctcatgt tgaacccatc cacatctagc tccgaagaaa gcaccgtaaa 2940

caacagaagc aatgataggg tatccagcgt acataagagc agttccaaga gcgaatgtag 3000

caagaagctc gagaagtctg taagccacat gggtgataga aggcttgaag aatccatctc 3060

tctcaagctc agcacgccat ctagcgaaat cctcaagcat aggagcatcc tcagactcag 3120

atctcttgat ctcagcaggt ctagaaggca aagctctaag catcttccaa gccttgagag 3180

aacgcatgtg gaattctttg aaagcctcag tagcatcagc accagtgtta gcaagcatgt 3240

agaagatcac agatccacca gggtgcttga agttagtcac atcgtactca acgtcctcaa 3300

ctctaaccca tctagtctcg aaagtagcag caagctcatg aggctcaaga gtcttaagat 3360

caacaggagc agtagaagca tccttagcat caagagcctc agcagaagat ttagacctgg 3420

taagtggaga tctaggagaa gatcttccat cagtcttagg agggcacatg gtatggtaat 3480

tgtaaatgta attgtaatgt tgtttgttgt ttgttgttgt tggtaattgt tgtaaaatta 3540

attaagtggg tatcttttgg atggataagc aagtagtgat gatgttctag gtgaagtgat 3600

gggggtgttt tatagcggga gatggtgaaa tggatggtcg ccacataaga aatggagggg 3660

aagggttctt gcgccattct tcagtttgca tggatgcatg ggtttcattt tgtaacacgt 3720

aataaggaca atgaagtgca ggtgtctctc aagtttcaga ggggatatgt ggacagaaga 3780

agaacggcga tgatattgat ggaaatggcc atctagtgtg aatctattcg gttgataata 3840

ctagtgcatt ttggccgtta atcccttcaa ttaactgcac aaacttcagt tgagtattga 3900

ttatttgatt ataggttctg taaacacaat accaagttta tttagagggg agacatacaa 3960

atagtttcga tataaataat agagtggtta aacttagtta ttaaaactat atataaagtc 4020

taaaagttaa attatttttt taattgcaaa tatataaagt ctaaaggggt tacattattt 4080

cttaagagat gtaactctgt tggaatctga cttaatccgt ctcatcactc tggtttccag 4140

ttctaatcta atgaattgtt ttctgccaaa gaatttgaag caagaagtaa attgatcaat 4200

gccgtcaacc cacaccaaac cgtcaaccca ctaccatcgc cgcggagacc cccaaactca 4260

acctccaccc atcggtaaga agcacagggc agcccgcacc accaccaatt tggcgtgcat 4320

gacacctagg gacttggcac gggaggcggc gcacgtggat gcaaatgacg ggatatcaga 4380

tgacaggaaa cgacgttgag agaccatacg atgtagaata tgagctcacc atcaacgaga 4440

aactaggaaa atcacaaaaa aaacaactct cgtaattgta cgagtggcac agatgggtct 4500

gcctcaacat atctctaata cggcgaagcc tgcccaacac gtagttgccg gaatccggtg 4560

tggagctcac gactctgaaa gataggcgct tcctgtttcg tttcgctcac ccactggacg 4620

tccgtcatgt gatggatttc ggtcattggt ttgctgacaa ccacattctg aagctccatg 4680

agatgagtct tcacaatagg tcctgctcaa taccgtggag ttatggttgc aagtccataa 4740

cttgccgttc gaatattttg cggagccagt cggacgggaa ttggcgagct cggctgacac 4800

ctataaaggc catgacaaga agaaccaaaa gttcttccct aatgctttca tgaggcttcg 4860

ggtcgttatg gatgtcggaa aacccctctt gaaggaacga gacgttatta tgcatgacgg 4920

taagactatt acttgtcagt ataagtatga aagattacct gtcttctgct ttgtttgtgg 4980

attgattgga cacgttgaaa aaaaatgtgc acttcgattt caatactcag agatcgactt 5040

ccctttttct taggagtatt cgatcaaggc attaacatgg aaggaagctc aagctctaaa 5100

ggcttcacaa tggaacctga aaaatttcaa caagcctaaa ctgaaatcga agtcaaatca 5160

cccaaccggg agctctaaat cagcaaacac tcctcctcca cagtatccaa tcatcgtgca 5220

cgatgctcca ggtattgcaa gccaggtatt gcaagctagg agtaggatag agaccttaaa 5280

cgtcgttggt gtgaagagtc atcttcagac ctaatggaga tagatgtaga cggcggcacg 5340

aagactctga aacaccagaa aggctagtcc aggataagga tctgctatcc caactgacct 5400

ctcgttagtc ccaaggcctc tcaactagag caggaggaag gatggtcaca agactaggat 5460

aatgatgttt ccaatatgaa cctgaatgtc catagctaat ttttttagtc ttgcttctgc 5520

acttttgtt tattatgttc tggtgactat gttatttacc cttgtccgta tgcttgaggg 5580

taccctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct attagttgaa 5640

agttgaaact ttgttcccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat atgtaatgtg 5700

tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc 5760

agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg tttgaatcct 5820

attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa 5880

atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggtct aggatctgat tgtaatttta 5940

gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt 6000

ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcattattt actgaggtta gagaatagac 6060

ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca gagggtatgc 6120

caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag 6180

cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt tttggcgtta 6240

aaagaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa ttttccatcg 6300

aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt 6360

tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt 6420

ctaaatgcat gctttgtaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct 6480

catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcatt ttacaacaat taccaacaac 6540

aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcgc 6600

tatccctgct gctcttgctg gaactcttgg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga 6660

tatcccagct tctgagaaag ttcctgctta cttcatgcag gttgagtact ggggacctac 6720

tatcggaact attggatacc tcctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag 6780

atctcaacct ttcggactca agaacgctat gctcgtttac aacttctacc agaccttctt 6840

caacagctac tgcatctacc ttttcgttac ttctcatagg gctcagggac ttaaggtttg 6900

gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggtta tctggcttca 6960

ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga caccttcttc atggtgatga ggaagaagtt 7020

cgaccagctt tctttccttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catggttcgt 7080

tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgtta acaccttcgt 7140

gcacgtgatc atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagttaact gtttctggaa 7200

gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta 7260

caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttccttac cttcaactct gggttatggt 7320

gaacatgttc gttctcttcg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta agggtgctaa 7380

gaagcagtga taaggcgcgc ggcgcgccgg gccgccgcca tgtgacagat cgaaggaaga 7440

aagtgtaata agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tatatataat 7500

aatgttatct ttcacaactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt 7560

gtcatatgat aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtcaa tttaaagata taagattctt 7620

taaatgatta aaaaaaatat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta 7680

ttatttattg attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct 7740

agtctcatcc ccttttaaac caacttagta aacgtttttt tttttaattt tatgaagtta 7800

agtttttacc ttgtttttaa aaagaatcgt tcataagatg ccatgccaga acattagcta 7860

cacgttacac atagcatgca gccgcggaga attgtttttc ttcgccactt gtcactccct 7920

tcaaacacct aagagcttct ctctcacagc acacacatac aatcacatgc gtgcatgcat 7980

tattacacgt gatcgccatg caaatctcct ttatagccta taaattaact catccgcttc 8040

actctttact caaaccaaaa ctcatcgata caaacaagat taaaaacata cacgaggatc 8100

ttttacaaca attaccaaca acaacaaaca acaaacaaca ttacaattac atttacaatt 8160

accataccat gcctccaagg gactcttact cttatgctgc tcctccttct gctcaacttc 8220

acgaagttga tactcctcaa gagcacgaca agaaagagct tgttatcgga gatagggctt 8280

acgatgttac caacttcgtt aagagacacc ctggtggaaa gatcattgct taccaagttg 8340

gaactgatgc taccgatgct tacaagcagt tccatgttag atctgctaag gctgacaaga 8400

tgcttaagtc tcttccttct cgtcctgttc acaagggata ctctccaaga agggctgatc 8460

ttatcgctga tttccaagag ttcaccaagc aacttgaggc tgagggaatg ttcgagcctt 8520

ctcttcctca tgttgcttac agacttgctg aggttatcgc tatgcatgtt gctggtgctg 8580

ctcttatctg gcatggatac actttcgctg gaatcgctat gcttggagtt gttcagggaa 8640

gatgtggatg gcttatgcat gagggtggac attactctct cactggaaac attgctttcg 8700

acagagctat ccaagttgct tgttacggac ttggatgtgg aatgtctggt gcttggtggc 8760

gtaaccagca taacaagcac catgctactc ctcaaaagct tcagcacgat gttgatcttg 8820

atacccttcc tctcgttgct ttccatgaga gaatcgctgc taaggttaag tctcctgcta 8880

tgaaggcttg gctttctatg caagctaagc ttttcgctcc tgttaccact cttcttgttg 8940

ctcttggatg gcagctttac cttcatccta gacacatgct caggactaag cactacgatg 9000

agcttgctat gctcggaatc agatacggac ttgttggata ccttgctgct aactacggtg 9060

ctggatacgt tctcgcttgt taccttcttt acgttcagct tggagctatg tacatcttct 9120

gcaacttcgc tgtttctcat actcacctcc ctgttgttga gcctaacgag catgctactt 9180

gggttgagta cgctgctaac cacactacta actgttctcc atcttggtgg tgtgattggt 9240

ggatgtctta ccttaactac cagatcgagc accaccttta ccctttctatg cctcaattca 9300

gacaccctaa gatcgctcct agagttaagc agcttttcga gaagcacgga cttcactacg 9360

atgttagagg atacttcgag gctatggctg atactttcgc taaccttgat aacgttgccc 9420

atgctcctga gaagaaaatg cagtaatgag atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct 9480

taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg 9540

ttaagcacgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga 9600

ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact 9660

aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcggtcgatt aaaaatccca 9720

attatatttg gtctaattta gtttggtatt gagtaaaaca aattcgaacc aaaccaaaat 9780

ataaatatat agtttttata tatatgcctt taagactttt tatagaattt tctttaaaaa 9840

atatctagaa atatttgcga ctcttctggc atgtaatatt tcgttaaata tgaagtgctc 9900

catttttatt aactttaaat aattggttgt acgatcactt tcttatcaag tgttactaaa 9960

atgcgtcaat ctctttgttc ttccatattc atatgtcaaa atctatcaaa attcttatat 10020

atctttttcg aatttgaagt gaaatttcga taatttaaaa ttaaatagaa catatcatta 10080

tttaggtatc atattgattt ttatacttaa ttactaaatt tggttaactt tgaaagtgta 10140

catcaacgaa aaattagtca aacgactaaa ataaataaat atcatgtgtt attaagaaaa 10200

ttctcctata agaatatttt aatagatcat atgtttgtaa aaaaaattaa tttttactaa 10260

cacatatatt tacttatcaa aaatttgaca aagtaagatt aaaataatat tcatctaaca 10320

aaaaaaaaac cagaaaatgc tgaaaacccg gcaaaaccga accaatccaa accgatatag 10380

ttggtttggt ttgattttga tataaaccga accaactcgg tccatttgca cccctaatca 10440

taatagcttt aatatttcaa gatattatta agttaacgtt gtcaatatcc tggaaatttt 10500

gcaaaatgaa tcaagcctat atggctgtaa tatgaattta aaagcagctc gatgtggtgg 10560

taatatgtaa tttacttgat tctaaaaaaa tatcccaagt attaataatt tctgctagga 10620

agaaggttag ctacgattta cagcaaagcc agaatacaaa gaaccataaa gtgattgaag 10680

ctcgaaatat acgaaggaac aaatatttttt aaaaaaatac gcaatgactt ggaacaaaag 10740

aaagtgatat atttttttgtt cttaaacaag catcccctct aaagaatggc agttttcctt 10800

tgcatgtaac tattatgctc ccttcgttac aaaaattttg gactactatt gggaacttct 10860

tctgaaaata gtgatagaac ccacacgagc atgtgctttc catttaattt taaaaaccaa 10920

gaaacataca tacataacat tccatcagcc tctctctctt tttattacgg ttaatgactt 10980

aaaacacatc ttattatccc atccttaaca cctagcagtg tctttatacg atctcatcga 11040

tcaccacttc aaaaccatgc agactgctgc tgcccctgga gctggcatcg gctaggctgg 11100

gtgccgcact gtcccggaag gtccctagcg acttgtttag attgatggga ccacctctca 11160

acttcctgct gctgtccctg ctgctggatg tcctgcctca tctggccgat tgcacgctcc 11220

agtcccctgc atgtgcactc gctcctcaat tgcttaagat catcgcagca gctatcgaag 11280

tgctggctct gttgccctcc tccacggcct tggttgtagt agtagctgcc gccgcccttc 11340

tggacttttt cccacaggaa ccgccgaata attcgataga accacacgag catgtgcttt 11400

catttatttt aaaaaccaag aaacatacat aacatttcat cagcctctct ctctctctct 11460

ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctttat tacagctgtt acactaactt 11520

aaaacacatt catctcatta ttattattat tatccatcct taacacctag cagtgtcttt 11580

gtacgatctc ataatcgatc acccccttcat caggtatcct taggcttcac tccaacgttg 11640

ttgcagttac ggaacatgta cacaccatca tggttctcaa cgaactggca agatctccaa 11700

gttttccaaa ggctaaccca catgttctca tcggtgtgtc tgtagtgctc tcccataact 11760

ttcttgatgc actcggtagc ttctctagca tggtagaatg ggatccttga aacgtagtga 11820

tggagcacat gagtctcgat gatgtcatgg aagatgattc cgaggattcc gaactctcta 11880

tcgatagtag cagcagcacc cttagcgaaa gtccactctt gagcatcgta atgaggcata 11940

gaagaatcgg tgtgctgaag gaaggtaacg aaaacaagcc agtggttaac aaggatccaa 12000

ggacagaacc atgtgatgaa agtaggccag aatccgaaaa ccttgtaagc ggtgtaaaca 12060

gaagtgaggg tagcaaggat tccaagatca gaaagaacga tgtaccagta gtccttctta 12120

tcgaaaacag ggctagaagg ccagtagtga gacttgaaga acttagaaac accagggtaa 12180

ggttgtccag tagcgttagt agcaaggtaa agagaaagtc ctccaagctg ttggaacaag 12240

agagcgaaaa cagagtagat aggagtttcc tcagcgatat cgtgaaggct ggtaacttgg 12300

tgcttctctt tgaattcctc ggcggtgtaa ggaacgaaaa ccatatctct ggtcatgtgt 12360

ccagtagcct tatggtgctt agcatgagag aacttccagc tgaagtaagg aaccataaca 12420

agagagtgga gaacccatcc aacggtatcg ttaacccatc cgtagttaga gaaagcagaa 12480

tgtccacact catgtccaag gatccagatt ccgaatccga aacaagagat agagaacacg 12540

taagcagacc aagcagcgaa tctaaggaat tcgttaggga gaagagggat gtaggtaagt 12600

ccaacgtaag cgatagcaga gatagccacg atatctctca ccacgtaaga catagacttc 12660

acgagagatc tctcgtaaca gtgcttaggg atagcgtcaa ggatatcctt gatggtgtaa 12720

tctggcacct tgaaaacgtt tccgaaggta tcgatagcgg tcttttgctg cttgaaagat 12780

gcaacgtttc cagaacgcct aacggtctta gtagatccct caaggatctc agatccagac 12840

acggtaacct tagacatggt atggtaattg taaatgtaat tgtaatgttg tttgttgttt 12900

gttgttgttg gtaattgttg taaaatttttt ggtggtgatt ggttctttaa ggtgtgagag 12960

tgagttgtga gttgtgtggt gggtttggtg agattgggga tggtgggttt atatagtgga 13020

gactgaggaa tggggtcgtg agtgttaact ttgcatgggc tacacgtggg ttcttttggg 13080

cttacacgta gtattattca tgcaaatgca gccaatacat atacggtatt ttaataatgt 13140

gtgggaatac aatatgccga gtattttact aattttggca atgacaagtg tacatttgga 13200

ttatcttact tggcctctct tgctttaatt tggattattt ttattctctt accttggccg 13260

ttcatattca catccctaaa ggcaagacag aattgaatgg tggccaaaaa ttaaaacgat 13320

ggatatgacc tacatagtgt aggatcaatt aacgtcgaag gaaaatactg attctctcaa 13380

gcatacggac aagggtaaat aacatagtca ccagaacata ataaacaaaa agtgcagaag 13440

caagactaaa aaaattagct atggacattc aggttcatat tggaaacatc attatcctag 13500

tcttgtgacc atccttcctc ctgctctagt tgagaggcct tgggactaac gagaggtcag 13560

ttgggatagc agatccttat cctggactag cctttctggt gttttcagagt cttcgtgccg 13620

ccgtctacat ctatctccat taggtctgaa gatgactctt cacaccaacg acgtttaagg 13680

tctctatcct actcctagct tgcaatacct ggcttgcaat acctggagca tcgtgcacga 13740

tgattggata ctgtggagga ggagtgtttg ctgatttaga gctcccggtt gggtgatttg 13800

acttcgattt cagtttaggc ttgttgaaat ttttcaggtt ccattgtgaa gcctttagag 13860

cttgagcttc cttccatgtt aatgccttga tcgaatactc ctagagaaaa gggaagtcga 13920

tctctgagta ttgaaatcga agtgcacatt ttttttcaac gtgtccaatc aatccacaaa 13980

caaagcagaa gacaggtaat ctttcatact tatactgaca agtaatagtc ttaccgtcat 14040

gcataataac gtctcgttcc ttcaagaggg gttttccgac atccataacg acccgaagcc 14100

tcatgaaagc attagggaag aacttttggt tcttcttgtc atggccttta taggtgtcag 14160

ccgagctcgc caattcccgt ccgactggct ccgcaaaata ttcgaacggc aagttatgga 14220

cttgcaacca taactccacg gtattgagca ggacctattg tgaagactca tctcatggag 14280

cttcagaatg tggttgtcag caaaccaatg accgaaatcc atcacatgac ggacgtccag 14340

tgggtgagcg aaacgaaaca ggaagcgcct atctttcaga gtcgtgagct ccacaccgga 14400

ttccggcaac tacgtgttgg gcaggcttcg ccgtattaga gatatgttga ggcagaccca 14460

tctgtgccac tcgtacaatt acgagagttg ttttttttgt gattttccta gtttctcgtt 14520

gatggtgagc tcatattcta catcgtatgg tctctcaacg tcgtttcctg tcatctgata 14580

tcccgtcatt tgcatccacg tgcgccgcct cccgtgccaa gtccctaggt gtcatgcacg 14640

ccaaattggt ggtggtgcgg gctgccctgt gcttcttacc gatgggtgga ggttgagttt 14700

gggggtctcc gcggcgatgg tagtgggttg acggtttggt gtgggttgac ggcattgatc 14760

aatttacttc ttgcttcaaa ttctttggca gaaaacaatt cattagatta gaactggaaa 14820

ccagagtgat gagacggatt aagtcagatt ccaacagagt tacatctctt aagaaataat 14880

gtaacccctt tagactttat atatttgcaa ttaaaaaaat aatttaactt ttagactttta 14940

tatatagttt taataactaa gtttaaccac tctattattt atatcgaaac tatttgtatg 15000

tctcccctct aaataaactt ggtattgtgt ttacagaacc tataatcaaa taatcaatac 15060

tcaactgaag tttgtgcagt taattgaagg gattaacggc caaaatgcac tagtattatc 15120

aaccgaatag attcacacta gatggccatt tccatcaata tcatcgccgt tcttcttctg 15180

tccacatatc ccctctgaaa cttgagagac acctgcactt cattgtcctt attacgtgtt 15240

acaaaatgaa acccatgcat ccatgcaaac tgaagaatgg cgcaagaacc cttcccctcc 15300

atttcttatg tggcgaccat ccatttcacc atctcccgct ataaaacacc cccatcactt 15360

cacctagaac atcatcacta cttgcttatc catccaaaag atacccactt ttacaacaat 15420

taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgc 15480

cacctagcgc tgctaagcaa atgggagctt ctactggtgt tcatgctggt gttactgact 15540

cttctgcttt caccagaaag gatgttgctg atagacctga tctcaccatc gttggagatt 15600

ctgtttacga tgctaaggct ttcagatctg agcatcctgg tggtgctcat ttcgtttctt 15660

tgttcggagg aagagatgct actgaggctt tcatggaata ccatagaagg gcttggccta 15720

agtctagaat gtctagattc cacgttggat ctcttgcttc tactgaggaa cctgttgctg 15780

ctgatgaggg ataccttcaa ctttgtgcta ggatcgctaa gatggtgcct tctgtttctt 15840

ctggattcgc tcctgcttct tactgggtta aggctggact tatccttgga tctgctatcg 15900

ctcttgaggc ttacatgctt tacgctggaa agagacttct cccttctatc gttcttggat 15960

ggcttttcgc tcttatcggt cttaacatcc agcatgatgc taaccatggt gctttgtcta 16020

agtctgcttc tgttaacctt gctcttggac tttgtcagga ttggatcgga ggatctatga 16080

tcctttggct tcaagagcat gttgttatgc accacctcca cactaacgat gttgataagg 16140

atcctgatca aaaggctcac ggtgctctta gactcaagcc tactgatgct tggtcaccta 16200

tgcattggct tcagcatctt taccttttgc ctggtgagac tatgtacgct ttcaagcttt 16260

tgttcctcga catctctgag cttgttatgt ggcgttggga gggtgagcct atctctaagc 16320

ttgctggata cctctttatg ccttctttgc ttctcaagct taccttctgg gctagattcg 16380

ttgctttgcc tctttacctt gctccttctg ttcatactgc tgtgtgtatc gctgctactg 16440

ttatgactgg atctttctac ctcgctttct tcttcttcat ctcccacaac ttcgagggtg 16500

ttgcttctgt tggacctgat ggatctatca cttctatgac tagaggtgct agcttcctta 16560

agagacaagc tgagacttct tctaacgttg gaggacctct tcttgctact cttaacggtg 16620

gactcaacta ccaaattgag catcacttgt tcrctagagt tcaccatgga ttctacccta 16680

gacttgctcc tcttgttaag gctgagcttg aggctagagg aatcgagtac aagcactacc 16740

ctactatctg gtctaacctt gcttctaccc tcagacatat gtacgctctt ggaagaaggc 16800

ctagatctaa ggctgagtaa tgacaagctt atgtgacgtg aaataataac ggtaaaatat 16860

atgtaataat aataataata aagccacaaa gtgagaatga ggggaagggg aaatgtgtaa 16920

tgagccagta gccggtggtg ctaattttgt atcgtattgt caataaatca tgaatttttgt 16980

ggtttttatg tgtttttttta aatcatgaat tttaaatttt ataaaataat ctccaatcgg 17040

aagaacaaca ttccatatcc atgcatggat gtttctttac ccaaatctag ttcttgagag 17100

gatgaagcat caccgaacag ttctgcaact atcgctcaaa agctttaaaa tgaacaacaa 17160

ggaacagagc aacgttccaa agatcccaaa cgaaacatat tatctatact aatactatat 17220

tattaattac tactgcccgg aatcacaatc cctgaatgat tcctattaac tacaagcctt 17280

gttggcggcg gagaagtgat cggcgcggcg agaagcagcg gactcggaga cgaggccttg 17340

gaagatctga gtcgaacggg cagaatcagt attttccttc gacgttaatt gatcctacac 17400

tatgtaggtc atatccatcg ttttaatttt tggccaccat tcaattctgt cttgcctttа 17460

gggatgtgaa tatgaacggc caaggtaaga gaataaaaat aatccaaatt aaagcaagag 17520

aggccaagta agataatcca aatgtacact tgtcattgcc aaaattagta aaatactcgg 17580

catattgtat tcccacacat tattaaaata ccgtatatgt attggctgca tttgcatgaa 17640

taatactacg tgtaagccca aaagaaccca cgtgtagccc atgcaaagtt aacactcacg 17700

acccccattcc tcagtctcca ctatataaac ccaccatccc caatctcacc aaacccacca 17760

cacaactcac aactcactct cacaccttaa agaaccaatc accaccaaaa attttacaac 17820

aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta catttacaat taccatacca 17880

tgagcgctgt taccgttact ggatctgatc ctaagaacag aggatcttct agcaacaccg 17940

agcaagaggt tccaaaagtt gctatcgata ccaacggaaa cgtgttctct gttcctgatt 18000

tcaccatcaa ggacatcctt ggagctatcc ctcatgagtg ttacgagaga agattggcta 18060

cctctctcta ctacgtgttc agagatatct tctgcatgct taccaccgga taccttaccc 18120

ataagatcct ttaccctctc ctcatctctt acacctctaa cagcatcatc aagttcactt 18180

tctgggccct ttacacttac gttcaaggac ttttcggaac cggaatctgg gttctcgctc 18240

atgagtgtgg acatcaagct ttctctgatt acggaatcgt gaacgatttc gttggatgga 18300

ccattcactc ttaccttatg gttccttact tcagctggaa gtactctcat ggaaagcacc 18360

ataaggctac tggacacatg accagagata tggttttcgt tcctgccacc aaagaggaat 18420

tcaagaagtc taggaacttc ttcggtaacc tcgctgagta ctctgaggat tctccactta 18480

gaacccttta cgagcttctt gttcaacaac ttggaggatg gatcgcttac ctcttcgtta 18540

acgttacagg acaaccttac cctgatgttc cttcttggaa atggaaccac ttctggctta 18600

cctctccact tttcgagcaa agagatgctc tctacatctt cctttctgat cttggaatcc 18660

tcacccaggg aatcgttctt actctttggt acaagaaatt cggaggatgg tccctttca 18720

tcaactggtt cgttccttac atctgggtta accactggct cgttttcatc acattccttc 18780

agcacactga tcctactatg cctcattaca acgctgagga atggactttc gctaagggtg 18840

ctgctgctac tatcgataga aagttcggat tcatcggacc tcacatcttc catgatatca 18900

tcgagactca tgtgcttcac cactactgtt ctaggatccc attctacaac gctagacctg 18960

cttctgaggc tatcaagaaa gttatgggaa agcactacag gtctagcgac gagaacatgt 19020

ggaagtcact ttggaagtct ttcaggtctt gccaatacgt tgacggtgat aacggtgttc 19080

tcatgttccg taacatcaac aactgcggag ttggagctgc tgagaagtaa tgaaggggtg 19140

atcgattatg agatcgtaca aagacactgc taggtgttaa ggatggataa taataataat 19200

aatgagatga atgtgtttta agttagtgta acagctgtaa taaagagaga gagagagaga 19260

gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagaggctga tgaaatgtta tgtatgtttc 19320

ttggtttta aaataaatga aagcacatgc tcgtgtggtt ctatcgaatt attcggcggt 19380

tcctgtggga aaaagtccag aagggccgcc gcagctacta ctacaaccaa ggccgtggag 19440

gagggcaaca gagccagcac ttcgatagct gctgcgatga tcttaagcaa ttgaggagcg 19500

agtgcacatg caggggactg gagcgtgcaa tcggccagat gaggcaggac atccagcagc 19560

aggggacagca gcaggaagtt gagaggtggt cccatcaatc taaacaagtc gctagggacc 19620

ttccgggaca gtgcggcacc cagcctagcc gatgccagct ccaggggcag cagcagtctg 19680

catggttttg aagtggtgat cgatgagatc gtataaagac actgctaggt gttaaggatg 19740

ggataataag atgtgtttta agtcattaac cgtaataaaa agagagagag gctgatggaa 19800

tgttatgtat gtatgtttct tggtttttaa aattaaatgg aaagcacatg ctcgtgtggg 19860

ttctatctcg attaaaaatc ccaattatat ttggtctaat ttagtttggt attgagtaaa 19920

acaaattcga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact 19980

ttttatagaa ttttctttaa aaaatatcta gaaatatttg cgactcttct ggcatgtaat 20040

atttcgttaa atatgaagtg ctccattttt attaacttta aataattggt tgtacgatca 20100

ctttcttatc aagtgttact aaaatgcgtc aatctctttg ttcttccata ttcatatgtc 20160

aaaatctatc aaaattctta tatatctttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta 20220

aaattaaata gaacatatca ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa 20280

atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata 20340

aatatcatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg 20400

taaaaaaaat taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag 20460

attaaaataa tattcatcta acaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaac ccggcaaaac 20520

cgaaccaatc caaaccgata tagttggttt ggtttgattt tgatataaac cgaaccaact 20580

cggtccattt gcacccctaa tcataatagc tttaatattt caagatatta ttaagttaac 20640

gttgtcaata tcctggaaat tttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat 20700

ttaaaagcag ctcgatgtgg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca 20760

agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac 20820

aaagaaccat aaagtgattg aagctcgaaa tatacgaagg aacaaatatt tttaaaaaaa 20880

tacgcaatga cttggaacaa aagaaagtga tatatttttt gttcttaaac aagcatcccc 20940

tctaaagaat ggcagttttc ctttgcatgt aactattatg ctccccttcgt tacaaaaatt 21000

ttggactact attgggaact tcttctgaaa atagtcctgc aggctagtag attggttggt 21060

tggtttccat gtaccagaag gcttacccta ttagttgaaa gttgaaactt tgttccctac 21120

tcaattccta gttgtgtaaa tgtatgtata tgtaatgtgt ataaaacgta gtacttaaat 21180

gactaggagt ggttcttgag accgatgaga gatgggagca gaactaaaga tgatgacata 21240

attaagaacg aatttgaaag gctcttaggt ttgaatccta ttcgagaatg tttttgtcaa 21300

agatagtggc gattttgaac caaagaaaac atttaaaaaa tcagtatccg gttacgttca 21360

tgcaaataga aagtggtcta ggatctgatt gtaattttag acttaaagag tctcttaaga 21420

ttcaatcctg gctgtgtaca aaactacaaa taatatattt tagactattt ggccttaact 21480

gaacttccac tcattattta ctgaggttag agaatagact tgcgaataaa cacattcccg 21540

agaaatactc atgatcccat aattagtcag agggtatgcc aatcagatct aagaacacac 21600

attcgctcaa attttaatgc acatgtaatc atagtttagc acaattcaaa aataatgtag 21660

tattaaagac agaaatttgt agacttttt ttggcgttaa aagaagacta agtttatacg 21720

tacattttat tttaagtgga aaaccgaaat tttccatcga aatatatgaa tttagtatat 21780

atatttctgc aatgtactat tttgctattt tggcaacttt cagtggacta ctactttatt 21840

acaatgtgta tggatgcatg agtttgagta tacacatgtc taaatgcatg ctttgtaaaa 21900

cgtaacggac cacaaaagag gatccataca aatacatctc atagcttcct ccattatttt 21960

ccgacacaaa cagagcattt tacaacaatt accaacaaca acaaacaaca aacaacatta 22020

caattacatt tacaattacc ataccatgga atttgctcaa cctctcgttg ctatggctca 22080

agagcagtac gctgctatcg atgctgttgt tgctcctgct atcttctctg ctaccgactc 22140

tattggatgg ggactcaagc ctatctcttc tgctactaag gatctcgctc tcgttgaatc 22200

tcctaccgct cttatccttt ctctcctcgc ttacttcgct atcgttggtt ctggactcgt 22260

ttaccgtaaa gtgttcgcta gaaccgttaa gggacaggat cctttccttc tcaaggctct 22320

tatgctcgct cacaacgttt tccttatcgg actcagcctt tacatgtgcc tcaagctcgt 22380

ttacgaggct tacgtgaaca agtactcctt ctggggaaac gcttacaacc ctgctcaaac 22440

cgagatggct aaggtgatct ggatcttcta cgtgtccaag atctacgagt tcatggacac 22500

cttcatcatg cttctcaagg gaaacgttaa ccaggtttcc ttcctccatg tttaccacca 22560

cggatctatc tctggaatct ggtggatgat cacttatgct gctccaggtg gagatgctta 22620

cttctctgct gctctcaact cttgggttca tgtgtgcatg tacacctact acttcatggc 22680

tgctgttctt cctaaggacg aaaagaccaa gagaaagtac ctttggtggg gaagatacct 22740

tacccagatg caaatgttcc agttcttcat gaaccttctc caggctgttt acctcctcta 22800

ctcttcttct ccttacccta agttcattgc tcaactcctc gttgtttaca tggttaccct 22860

cctcatgctt ttcggaaact tctactacat gaagcaccac gcttctaagt gataagggcc 22920

gccgccatgt gacagatcga aggaagaaag tgtaataaga cgactctcac tactcgatcg 22980

ctagtgattg tcattgttat atataataat gttatctttc acaacttatc gtaatgcatg 23040

tgaaactata acacattaat cctacttgtc atatgataac actctcccca tttaaaactc 23100

ttgtcaattt aaagatataa gattctttaa atgattaaaa aaaatatatt ataaattcaa 23160

tcactcctac taataaatta ttaattatta tttattgatt aaaaaaatac ttatactaat 23220

ttagtctgaa tagaataatt agattctagc ctgcagggcg gccgcggatc ccatggagtc 23280

aaagattcaa atagaggacc taacagaact cgccgtaaag actggcgaac agttcatata 23340

gagtctctta cgactcaatg acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac 23400

acttgtctac tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac 23460

ttttcaacaa agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca 23520

ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa 23580

aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggt cccaaagatg gacccccacc 23640

cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg 23700

atgtgatatc tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc 23760

ttcctctata taaggaagtt catttcattt ggagagaaca cgggggactg aattaaatat 23820

gagccctgag aggcgtcctg ttgaaatcag acctgctact gctgctgata tggctgctgt 23880

ttgtgatatc gtgaaccact acatcgagac ttctaccgtt aacttcagaa ctgagcctca 23940

aactcctcaa gagtggatcg atgatcttga gagactccaa gatagatacc cttggcttgt 24000

tgctgaggtt gagggtgttg ttgctggaat cgcttacgct ggaccttgga aggctagaaa 24060

cgcttacgat tggactgttg agtctaccgt ttacgtttca cacagacatc agagacttgg 24120

acttggatct acccttttaca ctcaccttct caagtctatg gaagctcagg gattcaagtc 24180

tgttgttgct gttatcggac tccctaacga tccttctgtt agacttcatg aggctcttgg 24240

atacactgct agaggaactc ttagagctgc tggatacaag cacggtggat ggcatgatgt 24300

tggattctgg caaagagatt tcgagcttcc tgctcctcct agacctgtta gaccagttac 24360

tcagatctga atttgcgtga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat 24420

cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta 24480

ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg 24540

caattataca tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta 24600

tcgcgcgcgg tgtcatctat gttactagat cactagtgat gtacggttaa aaccacccca 24660

gtacattaaa aacgtccgca atgtgttatt aagttgtcta agcgtcaatt tgtttacacc 24720

acaatatatc ctgccaccag ccagccaaca gctccccgac cggcagctcg gcacaaaatc 24780

accactcgat acaggcagcc catcagtcc 24809

<210> 6

<211> 26543
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> pGA7-mod_F нуклеотидна послідовність
<400> 6

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttttca cgccctttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgggcggccg cctagaatct aattattcta ttcagactaa 240

attagtataa gtatttttt aatcaataaa tattaattaa taatttatta gtaggagtga 300

ttgaatttat aatatatttt ttttaatcat ttaaagaatc ttatatcttt aaattgacaa 360

gagttttaaa tggggagagt gttatcatat gacaagtagg attaatgtgt tatagtttca 420

catgcattac gataagttgt gaaagataac attattatat ataacaatga caatcactag 480

cgatcgagta gtgagagtcg tcttattaca ctttcttcct tcgatctgtc acatggcggc 540

ggcccgcgat cgcgataatt ctcagtgcgc cttctccgcc ttgccgttga cgtagtagtg 600

ctgcccgacc ttatccaagt tcgagaacgt cgccttccag gcgccgtaat aggacagcac 660

cttgtagttc agccccctact tcttcgcgaa cgggacgaac cgccggctca cctccggctg 720

gcgaaactgc ggcatgtccg ggaacaggtg atgaatgacc tggcagttca gatatcccat 780

caaccagttc acgtacccgc gcgacgggtc gatgtccacg gtgtgatcga ccgcgtagtt 840

cacccagctc aggtgcttat ccgagggcac gaccgggagg tgcgtgtggc tcgtggagaa 900

gtgcgcgaag aggtacatgt acgcgatcca gttgccgaag gtgaaccacc agtacgcgac 960

gggccacgag taccccgtcg cgagtttaat caccgcggtc ctgacgacgt gagagacgag 1020

catccacgac gcctcctcgt agttcttctt tcgcaacacc tgccgcgggt gcaggacgta 1080

gatccagaac gcctggacga gcagcccgga ggtcaccggg acgaacgtcc acgcctgaag 1140

ccgagcccac gcgcgggaga acccccctcgg ccggttgtcc tccacggcgg tgttaaaaaa 1200

cgccaccgcg ggggtcgtgt ccaggtccat gtcgtgcctc actttctgcg gcgtcgcgtg 1260

gtgcttattg tgcatctggt tccacatctc cccgctcgtg gacagcccga acccgcacgt 1320

catcgcttgg aggcgcttgt cgacgtagac ggaccccgtg agcgagttgt gcccgccctc 1380

gtgctggacc caaccgcacc gagcgccgaa gaacgcgccg tacacgacgg acgcgatgat 1440

cgggtacccg gcgtacatga gggcggtgcc gaggggcgaag gtcgcgagga gctcgagtaa 1500

ccgatacgcg acgtgcgtta tcgagggctt aaagaacccg tcgcgttcga gctccgcgcg 1560

ccaccgcgcg aaatcctcca acatcggcgc gtcctcgctc tcgctgcgtt tgatctccgc 1620

ggggcgcgac ggcagcgctc tgagcatctt ccacgccttа agcgatcgca tgtggaactc 1680

cttgaacgcc tccgtggcgt ccgcgcccgt gttcgcgagc atgtagaata tcacgctgcc 1740

tcccgggtgt ttgaagtttg tgacgtcgta ctcgacgtcc tccacgcgca cccatcgcgt 1800

ctcgaacgtc gccgcgagct cgtgcggctc gagcgttttg agatcgacgg gcgcggtcga 1860

cgcgtccttg gcgtcgagcg cctccgcgga ggatttgctg cgcgtcagcg gcgatcgcgg 1920

ggacgatcgg ccgtccgtct tcggcgggca catcgtcgcg cgcgcgactt aaaccgacga 1980

cggacggacg aacctgcaac ggcgaattat caattgacgc gttgctctgt ttgtgtcgga 2040

aaataatgga ggaagctatg agatgtattt gcatggatcc tcttttgtgg tccgttacgt 2100

tttgcaaagc atgcatttag acatgtgtat actcaaactc atgcatccat acacattgta 2160

ataaagtagt agtccactga aagttgccaa aatagcaaaa tagtacattg cagaaatata 2220

tatactaaat tcatatattt cgatggaaaa tttcggtttt ccacttaaaa taaaatgtac 2280

gtataaactt agtcttcctt taacgccaaa aaaaagtcta caaatttctg tctttaatac 2340

tacattattt ttgaattgtg ctaaactatg attacatgtg cattaaaatt tgagggaatg 2400

tgtgttctta gatctgattg gcataccctc tgactaatta tgggatcatg agtatttctc 2460

gggaatgtgt ttattcgcaa gtctattctc taacctcagt aaataatgag tggaagttta 2520

gttaaggcca aatagtctaa aatatattat ttgtagtttt gtacacagcc aggattgaat 2580

cttaagagac tctttaagtc taaaattaca atcagatcct agaccacttt ctatttgcat 2640

gaacgtaacc ggatactgat tttttaaatg ttttctttgg ttcaaaatcg ccactatctt 2700

tgacaaaaac attctcgaat aggattcaaa cctaagagcc tttcaaattc gttcttaatt 2760

atgtcatcat ctttagttct gctcccatct ctcatcggtc tcaagaacca ctcctagtca 2820

tttaagtact acgttttata cgcattacat atacatacat ttacacaact aggaattgag 2880

tagggaacaa agtttcaact ttcaactaat agggtaagcc ttctggtaca tggaaaccaa 2940

ccaaccaatc tactaggcgg ccgcccgtcg ggatcttctg caagcatctc tatttcctga 3000

aggtctaacc tcgaagattt aagatttaat tacgtttata attacaaaat tgattctagt 3060

atctttaatt taatgcttat acattattaa ttaatttagt actttcaatt tgttttcaga 3120

aattatttta ctatttttta taaaataaaa gggagaaaat ggctatttaa actgaaggcg 3180

ggaaacgaca atctgctagt ggatctccca gtcacgacgt tgtaaaacgg gcgccccgcg 3240

gaaagcttgc ggccgcggta ccgcccgttc gactcagatc ttccaaggcc tcgtctccga 3300

gtccgctgct tctcgccgcg ccgatcactt ctccgccgcc aacaaggctt gtagttaata 3360

ggaatcattc agggattgtg attccgggca gtagtaatta ataatatagt attagtatag 3420

ataatatgtt tcgtttggga tctttggaac gttgctctgt tccttgttgt tcattttaaa 3480

gcttttgagg gatagttgca gaactgttcg gtgatgcttc atcctctcaa gaactagatt 3540

tgggtaaaga aacatccatg catggatatg gaatgttgtt cttccgattg gagattattt 3600

tataaaattt aaaattcatg atttaaaaaa acacataaaa accacaaaat tcatgattta 3660

ttgacaatac gatacaaaat tagcaccacc ggctactggc tcattacaca tttccccttc 3720

ccctcattct cactttgtgg ctttattatt attattatta catatatttt accgttatta 3780

tttcacgtca cataagcttg ttaattaatc attagtgagc cttctcagcc tttccgttaa 3840

cgtagtagtg ctgtcccacc ttatcaaggt tagagaaagt agccttccaa gcaccgtagt 3900

aagagagcac cttgtagttg agtccccact tcttagcgaa aggaacgaat cttctgctaa 3960

cctcaggctg tctgaattga ggcatatcag ggaagaggtg gtggataacc tgacagttaa 4020

ggtatcccat aagccagttc acgtatcctc tagaaggatc gatatcaacg gtgtgatcaa 4080

cagcgtagtt aacccaagaa aggtgcttat cagatggaac aacagggagg tgagtatgag 4140

aagtagagaa gtgagcgaaa aggtacatgt aagcgatcca gtttccgaaa gtgaaccacc 4200

agtaagcaac aggccaagag tatccagtag caagcttgat aacagcggtt ctaacaacat 4260

gagaaacgag catccaagaa gcctcttcgt agttcttctt acggagaact tgtctagggt 4320

ggagaacgta gatccagaaa gcttgaacaa gaagtccaga ggtaacagga acgaaagtcc 4380

aagcttgaag tctagcccaa gctctagaga atcctctagg tctgttatcc tcaacagcag 4440

tgttgaagaa agccacagca ggagtggtat caagatccat atcgtgtcta acctttgag 4500

gggtagcatg gtgcttgtta tgcatctggt tccacatctc accagaagta gaaagtccga 4560

atccacaagt catagcctga agtctcttgt ccacgtaaac agatccggta agagagttat 4620

gtccaccctc atgttgaacc catccacatc tagctccgaa gaaagcaccg taaacaacag 4680

aagcaatgat agggtatcca gcgtacataa gagcagttcc aagagcgaat gtagcaagaa 4740

gctcgagaag tctgtaagcc acatgggtga tagaaggctt gaagaatcca tctctctcaa 4800

gctcagcacg ccatctagcg aaatcctcaa gcataggagc atcctcagac tcagatctct 4860

tgatctcagc aggtctagaa ggcaaagctc taagcatctt ccaagccttg agagaacgca 4920

tgtggaattc tttgaaagcc tcagtagcat cagcaccagt gttagcaagc atgtagaaga 4980

tcacagatcc accagggtgc ttgaagttag tcacatcgta ctcaacgtcc tcaactctaa 5040

cccatctagt ctcgaaagta gcagcaagct catgaggctc aagagtctta agatcaacag 5100

gagcagtaga agcatcctta gcatcaagag cctcagcaga agatttagac ctggtaagtg 5160

gagatctagg agaagatctt ccatcagtct taggagggca catggtatgg taattgtaaa 5220

tgtaattgta atgttgtttg ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa attaattaag 5280

tgggtatctt ttggatggat aagcaagtag tgatgatgtt ctaggtgaag tgatgggggt 5340

gttttatagc gggagatggt gaaatggatg gtcgccacat aagaaatgga ggggaagggt 5400

tcttgcgcca ttcttcagtt tgcatggatg catgggtttc attttgtaac acgtaataag 5460

gacaatgaag tgcaggtgtc tctcaagttt cagaggggat atgtggacag aagaagaacg 5520

gcgatgatat tgatggaaat ggccatctag tgtgaatcta ttcggttgat aatactagtg 5580

catttggcc gttaatccct tcaattaact gcacaaactt cagttgagta ttgattattt 5640

gattataggt tctgtaaaca caataccaag tttatttaga ggggagacat acaaatagtt 5700

tcgatataaa taatagagtg gttaaactta gttattaaaa ctatatataa agtctaaaag 5760

ttaaattatt tttttaattg caaatatata aagtctaaag gggttacatt atttcttaag 5820

agatgtaact ctgttggaat ctgacttaat ccgtctcatc actctggttt ccagttctaa 5880

tctaatgaat tgttttctgc caaagaattt gaagcaagaa gtaaattgat caatgccgtc 5940

aacccacacc aaaccgtcaa cccactacca tcgccgcgga gacccccaaa ctcaacctcc 6000

acccatcggt aagaagcaca gggcagcccg caccaccacc aatttggcgt gcatgacacc 6060

tagggacttg gcacgggagg cggcgcacgt ggatgcaaat gacgggatat cagatgacag 6120

gaaacgacgt tgagagacca tacgatgtag aatatgagct caccatcaac gagaaactag 6180

gaaaatcaca aaaaaaacaa ctctcgtaat tgtacgagtg gcacagatgg gtctgcctca 6240

acatatctct aatacggcga agcctgccca acacgtagtt gccggaatcc ggtgtggagc 6300

tcacgactct gaaagatagg cgcttcctgt ttcgtttcgc tcacccactg gacgtccgtc 6360

atgtgatgga tttcggtcat tggtttgctg acaaccacat tctgaagctc catgagatga 6420

gtcttcacaa taggtcctgc tcaataccgt ggagttatgg ttgcaagtcc ataacttgcc 6480

gttcgaatat tttgcggagc cagtcggacg ggaattggcg agctcggctg acacctataa 6540

aggccatgac aagaagaacc aaaagttctt ccctaatgct ttcatgaggc ttcgggtcgt 6600

tatggatgtc ggaaaacccc tcttgaagga acgagacgtt attatgcatg acggtaagac 6660

tattacttgt cagtataagt atgaaagatt acctgtcttc tgctttgttt gtggattgat 6720

tggacacgtt gaaaaaaaat gtgcacttcg atttcaatac tcagagatcg acttcccttt 6780

tctctaggag tattcgatca aggcattaac atggaaggaa gctcaagctc taaaggcttc 6840

acaatggaac ctgaaaaatt tcaacaagcc taaactgaaa tcgaagtcaa atcacccaac 6900

cgggagctct aaatcagcaa acactcctcc tccacagtat ccaatcatcg tgcacgatgc 6960

tccaggtatt gcaagccagg tattgcaagc taggagtagg atagagacct taaacgtcgt 7020

tggtgtgaag agtcatcttc agacctaatg gagatagatg tagacggcgg cacgaagact 7080

ctgaaacacc agaaaggcta gtccaggata aggatctgct atcccaactg acctctcgtt 7140

agtcccaagg cctctcaact agagcaggag gaaggatggt cacaagacta ggataatgat 7200

gtttccaata tgaacctgaa tgtccatagc taatttttttt agtcttgctt ctgcactttt 7260

tgtttattat gttctggtga ctatgttatt taccccttgtc cgtatgcttg agggtaccct 7320

agtagattgg ttggttggtt tccatgtacc agaaggctta ccctattagt tgaaagttga 7380

aactttgttc cctactcaat tcctagttgt gtaaatgtat gtatatgtaa tgtgtataaa 7440

acgtagtact taaatgacta ggagtggttc ttgagaccga tgagagatgg gagcagaact 7500

aaagatgatg acataattaa gaacgaattt gaaaggctct taggtttgaa tcctattcga 7560

gaatgttttt gtcaaagata gtggcgattt tgaaccaaag aaaacattta aaaaatcagt 7620

atccggttac gttcatgcaa atagaaagtg gtctaggatc tgattgtaat tttagactta 7680

aagagtctct taagattcaa tcctggctgt gtacaaaact acaaataata tattttagac 7740

tatttggcct taactaaact tccactcatt atttactgag gttagagaat agacttgcga 7800

ataaacacat tcccgagaaa tactcatgat cccataatta gtcagagggt atgccaatca 7860

gatctaagaa cacacattcc ctcaaatttt aatgcacatg taatcatagt ttagcacaat 7920

tcaaaaataa tgtagtatta aagacagaaa tttgtagact ttttttggc gttaaaagaa 7980

gactaagttt atacgtacat tttatttttaa gtggaaaacc gaaattttcc atcgaaatat 8040

atgaatttag tatatatatt tctgcaatgt actattttgc tattttggca actttcagtg 8100

gactactact ttattacaat gtgtatggat gcatgagttt gagtatacac atgtctaaat 8160

gcatgctttg taaaacgtaa cggaccacaa aagaggatcc atacaaatac atctcatagc 8220

ttcctccatt attttccgac acaaacagag cattttacaa caattaccaa caacaacaaa 8280

caacaaacaa cattacaatt acatttacaa ttaccatacc atggcctcta tcgctatccc 8340

tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat gtggctaacc ctgatatccc 8400

agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcaggttgag tactggggac ctactatcgg 8460

aactattgga tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt atcatgcaga acagatctca 8520

acctttcgga ctcaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc taccagacct tcttcaacag 8580

ctactgcatc tacctttttcg ttacttctca tagggctcag ggacttaagg tttggggaaa 8640

catcccctgat atgactgcta actcttgggg aatctctcag gttatctggc ttcactacaa 8700

caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatggtg atgaggaaga agttcgacca 8760

gctttctttc cttcacatct accaccacac tcttctcatc tggtcatggt tcgttgttat 8820

gaagcttgag cctgttggag attgctactt cggatcttct gttaacacct tcgtgcacgt 8880

gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt aactgtttct ggaagaagta 8940

catcacccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct tctcactcta tctacaccgc 9000

ttacgttcag aataccgctt tctggcttcc ttaccttcaa ctctgggtta tggtgaacat 9060

gttcgttctc ttcgccaact tctaccgtaa gaggtacaag tctaagggtg ctaagaagca 9120

gtgataaggc gcgcggcgcg ccgggccgcc gccatgtgac agatcgaagg aagaaagtgt 9180

aataagacga ctctcactac tcgatcgcta gtgattgtca ttgttatata taataatgtt 9240

atctttcaca acttatcgta atgcatgtga aactataaca cattaatcct acttgtcata 9300

tgataacact ctccccattt aaaactcttg tcaatttaaa gatataagat tctttaaatg 9360

attaaaaaaa atatattata aattcaatca ctcctactaa taaattatta attattattt 9420

attgattaaa aaaatactta tactaattta gtctgaatag aataattaga ttctagtctc 9480

atccccttt aaaccaactt agtaaacgtt tttttttta attttatgaa gttaagtttt 9540

taccttgttt ttaaaaagaa tcgttcataa gatgccatgc cagaacatta gctacacgtt 9600

acacatagca tgcagccgcg gagaattgtt tttcttcgcc acttgtcact cccttcaaac 9660

acctaagagc ttctctctca cagcacacac atacaatcac atgcgtgcat gcattattac 9720

acgtgatcgc catgcaaatc tcctttatag cctataaatt aactcatccg cttcactctt 9780

tactcaaacc aaaactcatc gatacaaaca agattaaaaa catacacgag gatcttttac 9840

aacaattacc aacaacaaca aacaacaaac aacattacaa ttacatttac aattaccata 9900

ccatgcctcc aagggactct tactcttatg ctgctcctcc ttctgctcaa cttcacgaag 9960

ttgatactcc tcaagagcac gacaagaaag agcttgttat cggagatagg gcttacgatg 10020

ttaccaactt cgttaagaga caccctggtg gaaagatcat tgcttaccaa gttggaactg 10080

atgctaccga tgcttacaag cagttccatg ttagatctgc taaggctgac aagatgctta 10140

agtctcttcc ttctcgtcct gttcacaagg gatactctcc aagaagggct gatcttatcg 10200

ctgatttcca agagttcacc aagcaacttg aggctgaggg aatgttcgag ccttctcttc 10260

ctcatgttgc ttacagactt gctgaggtta tcgctatgca tgttgctggt gctgctctta 10320

tctggcatgg atacactttc gctggaatcg ctatgcttgg agttgttcag ggaagatgtg 10380

gatggcttat gcatgagggt ggacattact ctctcactgg aaacattgct ttcgacagag 10440

ctatccaagt tgcttgttac ggacttggat gtggaatgtc tggtgcttgg tggcgtaacc 10500

agcataacaa gcaccatgct actcctcaaa agcttcagca cgatgttgat cttgataccc 10560

ctcctctcgt tgctttccat gagagaatcg ctgctaaggt taagtctcct gctatgaagg 10620

cttggctttc tatgcaagct aagcttttcg ctcctgttac cactcttctt gttgctcttg 10680

gatggcagct ttaccttcat cctagacaca tgctcaggac taagcactac gatgagcttg 10740

ctatgctcgg aatcagatac ggacttgttg gataccttgc tgctaactac ggtgctggat 10800

acgttctcgc ttgttacctt ctttacgttc agcttggagc tatgtacatc ttctgcaact 10860

tcgctgtttc tcatactcac ctccctgttg ttgagcctaa cgagcatgct acttgggttg 10920

agtacgctgc taaccacact actaactgtt ctccatcttg gtggtgtgat tggtggatgt 10980

cttaccttaa ctaccagatc gagcaccacc tttacccttc tatgcctcaa ttcagacacc 11040

ctaagatcgc tcctagagtt aagcagcttt tcgagaagca cggacttcac tacgatgtta 11100

gaggatactt cgaggctatg gctgatactt tcgctaacct tgataacgtt gcccatgctc 11160

ctgagaagaa aatgcagtaa tgagatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat 11220

tgaatcctgt tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc 11280

acgtaataat taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag 11340

tcccgcaatt atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata 11400

aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac tagatcggtc gattaaaaat cccaattata 11460

tttggtctaa tttagtttgg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aaatataaat 11520

atatagtttt tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct 11580

agaaatattt gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt 11640

tattaacttt aaataattgg ttgtacgatc actttcttat caagtgttac taaaatgcgt 11700

caatctcttt gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt 11760

ttcgaatttg aagtgaaatt tcgataattt aaaattaaat agaacatatc attatttagg 11820

tatcatattg atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa 11880

cgaaaaatta gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc 11940

tataagaata ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaa ttaattttta ctaacacata 12000

tatttactta tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaa 12060

aaaccagaaa atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt 12120

tggtttgatt ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcaccccta atcataatag 12180

ctttaatatt tcaagatatt attaagttaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa 12240

tgaatcaagc ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat 12300

gtaatttact tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg 12360

ttagctacga tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa 12420

atatacgaag gaacaaatat ttttaaaaaa atacgcaatg acttggaaca aaagaaagtg 12480

atatatttttt tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg 12540

taactattat gctccccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa 12600

aatagtgata gaacccacac gagcatgtgc tttccattta attttaaaaa ccaagaaaca 12660

tacatacata acattccatc agcctctctc tctttttatt acggttaatg acttaaaaca 12720

catcttatta tcccatcctt aacacctagc agtgtctttа tacgatctca tcgatcacca 12780

cttcaaaacc atgcagactg ctgctgcccc tggagctggc atcggctagg ctgggtgccg 12840

cactgtcccg gaaggtccct agcgacttgt ttagattgat gggaccacct ctcaacttcc 12900

tgctgctgtc cctgctgctg gatgtcctgc ctcatctggc cgattgcacg ctccagtccc 12960

ctgcatgtgc actcgctcct caattgctta agatcatcgc agcagctatc gaagtgctgg 13020

ctctgttgcc ctcctccacg gccttggttg tagtagtagc tgccgccgcc cttctggact 13080

ttttcccaca ggaaccgccg aataattcga tagaaccaca cgagcatgtg ctttcattta 13140

ttttaaaaac caagaaacat acataacatt tcatcagcct ctctctctct ctctctctct 13200

ctctctctct ctctctctct ctctctctct ttattacagc tgttacacta acttaaaaca 13260

cattcatctc attattatta ttattatcca tccttaacac ctagcagtgt ctttgtacga 13320

tctcataatc gatcaccccct tcatcaggta tccttaggct tcactccaac gttgttgcag 13380

ttacggaaca tgtacacacc atcatggttc tcaacgaact ggcaagatct ccaagttttc 13440

caaaggctaa cccacatgtt ctcatcggtg tgtctgtagt gctctcccat aactttcttg 13500

atgcactcgg tagcttctct agcatggtag aatgggatcc ttgaaacgta gtgatggagc 13560

acatgagtct cgatgatgtc atggaagatg attccgagga ttccgaactc tctatcgata 13620

gtagcagcag cacccttagc gaaagtccac tcttgagcat cgtaatgagg catagaagaa 13680

tcggtgtgct gaaggaaggt aacgaaaaca agccagtggt taacaaggat ccaaggacag 13740

aaccatgtga tgaaagtagg ccagaatccg aaaaccttgt aagcggtgta aacagaagtg 13800

agggtagcaa ggattccaag atcagaaaga acgatgtacc agtagtcctt cttatcgaaa 13860

acagggctag aaggccagta gtgagacttg aagaacttag aaacaccagg gtaaggttgt 13920

ccagtagcgt tagtagcaag gtaaagagaa agtcctccaa gctgttggaa caagagagcg 13980

aaaacagagt agataggagt ttcctcagcg atatcgtgaa ggctggtaac ttggtgcttc 14040

tctttgaatt cctcggcggt gtaaggaacg aaaaccatat ctctggtcat gtgtccagta 14100

gccttatggt gcttagcatg agagaacttc cagctgaagt aaggaaccat aacaagagag 14160

tggagaaccc atccaacggt atcgttaacc catccgtagt tagagaaagc agaatgtcca 14220

cactcatgtc caaggatcca gattccgaat ccgaaacaag agatagagaa cacgtaagca 14280

gaccaagcag cgaatctaag gaattcgtta gggagaagag ggatgtaggt aagtccaacg 14340

taagcgatag cagagatagc cacgatatct ctcaccacgt aagacataga cttcacgaga 14400

gatctctcgt aacagtgctt agggatagcg tcaaggatat ccttgatggt gtaatctggc 14460

accttgaaaa cgtttccgaa ggtatcgata gcggtctttt gctgcttgaa agatgcaacg 14520

tttccagaac gcctaacggt cttagtagat ccctcaagga tctcagatcc agacacggta 14580

accttagaca tggtatggta attgtaaatg taattgtaat gttgtttgtt gtttgttgtt 14640

gttggtaatt gttgtaaaat ttttggtggt gattggttct ttaaggtgtg agagtgagtt 14700

gtgagttgtg tggtgggttt ggtgagattg gggatggtgg gtttatatag tggagactga 14760

ggaatggggt cgtgagtgtt aactttgcat gggctacacg tgggttcttt tgggcttaca 14820

cgtagtatta ttcatgcaaa tgcagccaat acatatacgg tattttaata atgtgtggga 14880

atacaatatg ccgagtattt tactaatttt ggcaatgaca agtgtacatt tggattatct 14940

tacttggcct ctcttgcttt aatttggatt atttttattc tcttaccttg gccgttcata 15000

ttcacatccc taaaggcaag acagaattga atggtggcca aaaattaaaa cgatggatat 15060

gacctacata gtgtaggatc aattaacgtc gaaggaaaat actgattctc tcaagcatac 15120

ggacaagggt aaataacata gtcaccagaa cataataaac aaaaagtgca gaagcaagac 15180

taaaaaaatt agctatggac attcaggttc atattggaaa catcattatc ctagtcttgt 15240

gaccatcctt cctcctgctc tagttgagag gccttgggac taacgagagg tcagttggga 15300

tagcagatcc ttatcctgga ctagcctttc tggtgtttca gagtcttcgt gccgccgtct 15360

acatctatct ccattaggtc tgaagatgac tcttcacacc aacgacgttt aaggtctcta 15420

tcctactcct agcttgcaat acctggcttg caatacctgg agcatcgtgc acgatgattg 15480

gatactgtgg aggaggagtg tttgctgatt tagagctccc ggttgggtga tttgacttcg 15540

atttcagttt aggcttgttg aaatttttca ggttccattg tgaagccttt agagcttgag 15600

cttccttcca tgttaatgcc ttgatcgaat actcctagag aaaagggaag tcgatctctg 15660

agtattgaaa tcgaagtgca catttttttt caacgtgtcc aatcaatcca caaacaaagc 15720

agaagacagg taatctttca tacttatact gacaagtaat agtcttaccg tcatgcataa 15780

taacgtctcg ttccttcaag aggggttttc cgacatccat aacgacccga agcctcatga 15840

aagcattagg gaagaacttt tggttcttct tgtcatggcc tttataggtg tcagccgagc 15900

tcgccaattc ccgtccgact ggctccgcaa aatattcgaa cggcaagtta tggacttgca 15960

accataactc cacggtattg agcaggacct attgtgaaga ctcatctcat ggagcttcag 16020

aatgtggttg tcagcaaacc aatgaccgaa atccatcaca tgacggacgt ccagtgggtg 16080

agcgaaacga aacaggaagc gcctatcttt cagagtcgtg agctccacac cggattccgg 16140

caactacgtg ttgggcaggc ttcgccgtat tagagatatg ttgaggcaga cccatctgtg 16200

ccactcgtac aattacgaga gttgtttttt ttgtgatttt cctagtttct cgttgatggt 16260

gagctcatat tctacatcgt atggtctctc aacgtcgttt cctgtcatct gatatcccgt 16320

catttgcatc cacgtgcgcc gcctcccgtg ccaagtccct aggtgtcatg cacgccaaat 16380

tggtggtggt gcgggctgcc ctgtgcttct taccgatggg tggaggttga gtttgggggt 16440

ctccgcggcg atggtagtgg gttgacggtt tggtgtgggt tgacggcatt gatcaatttа 16500

cttcttgctt caaattcttt ggcagaaaac aattcattag attagaactg gaaaccagag 16560

tgatgagacg gattaagtca gattccaaca gagttacatc tcttaagaaa taatgtaacc 16620

cctttagact ttatatattt gcaattaaaa aaataattta acttttagac tttatatata 16680

gttttaataa ctaagtttaa ccactctatt atttatatcg aaactatttg tatgtctccc 16740

ctctaaataa acttggtatt gtgtttacag aacctataat caaataatca atactcaact 16800

gaagtttgtg cagttaattg aagggattaa cggccaaaat gcactagtat tatcaaccga 16860

atagaticac actagatggc catttccatc aatatcatcg ccgttcttct tctgtccaca 16920

tatccccict gaaacttgag agacacctgc acttcattgt ccttattacg tgttacaaaa 16980

tgaaaacccat gcatccatgc aaactgaaga atggcgcaag aacccttccc ctccatttct 17040

tatgtggcga ccatccattt caccatctcc cgctataaaa cacccccatc acttcaccta 17100

gaacatcatc actacttgct tatccatcca aaagataccc acttttacaa caattaccaa 17160

caacaacaaa caacaaacaa cattacaatt acatttacaa ttaccatacc atgccaccta 17220

gcgctgctaa gcaaatggga gcttctactg gtgttcatgc tggtgttact gactcttctg 17280

ctttcaccag aaaggatgtt gctgatagac ctgatctcac catcgttgga gattctgttt 17340

acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctggtggtgc tcatttcgtt tctttgttcg 17400

gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccatag aaggggcttgg cctaagtcta 17460

gaatgtctag attccacgtt ggatctcttg cttctactga ggaacctgtt gctgctgatg 17520

agggatacct tcaactttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtt tcttctggat 17580

tcgctcctgc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct tggatctgct atcgctcttg 17640

aggcttacat gctttacgct ggaaagagac ttctcccttc tatcgttctt ggatggcttt 17700

tcgctcttat cggtcttaac atccagcatg atgctaacca tggtgctttg tctaagtctg 17760

cttctgttaa ccttgctctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct atgatccttt 17820

ggcttcaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacactaa cgatgttgat aaggatcctg 17880

atcaaaaggc tcacggtgct cttagactca agcctactga tgcttggtca cctatgcatt 17940

ggcttcagca tctttacctt ttgcctggtg agactatgta cgctttcaag cttttgttcc 18000

tcgacatctc tgagcttgtt atgtggcgtt gggagggtga gcctatctct aagcttgctg 18060

gatacctctt tatgccttct ttgcttctca agcttacctt ctgggctaga ttcgttgctt 18120

tgcctctita ccttgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgctgct actgttatga 18180

ctggatcttt ctacctcgct ttcttcttct tcatctccca caacttcgag ggtgttgctt 18240

ctgttggacc tgatggatct atcacttcta tgactagagg tgctagcttc cttaagagac 18300

aagctgagac ttcttctaac gttggaggac ctcttcttgc tactcttaac ggtggactca 18360

actaccaaat tgagcatcac ttgttcccta gagttcacca tggattctac cctagacttg 18420

ctcctcttgt taaggctgag cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac taccctacta 18480

tctggtctaa ccttgcttct accctcagac atatgtacgc tcttggaaga aggcctagat 18540

ctaaggctga gtaatgacaa gcttatgtga cgtgaaataa taacggtaaa atatatgtaa 18600

taataataat aataaagcca caaagtgaga atgaggggaa ggggaaatgt gtaatgagcc 18660

agtagccggt ggtgctaatt ttgtatcgta ttgtcaataa atcatgaatt ttgtggtttt 18720

tatgtgtttt tttaaatcat gaattttaaa ttttataaaa taatctccaa tcggaagaac 18780

aacattccat atccatgcat ggatgtttct ttacccaaat ctagttcttg agaggatgaa 18840

gcatcaccga acagttctgc aactatccct caaaagcttt aaaatgaaca acaaggaaca 18900

gagcaacgtt ccaaagatcc caaacgaaac atattatcta tactaatact atattattaa 18960

ttactactgc ccggaatcac aatccctgaa tgattcctat taactacaag ccttgttggc 19020

ggcggagaag tgatcggcgc ggcgagaagc agcggactcg gagacgaggc cttggaagat 19080

ctgagtcgaa cgggcagaat cagtattttc cttcgacgtt aattgatcct acactatgta 19140

ggtcatatcc atcgttttaa tttttggcca ccattcaatt ctgtcttgcc tttagggatg 19200

tgaatatgaa cggccaaggt aagagaataa aaataatcca aattaaagca agagaggcca 19260

agtaagataa tccaaatgta cacttgtcat tgccaaaatt agtaaaatac tcggcatatt 19320

gtattcccac acattattaa aataccgtat atgtattggc tgcatttgca tgaataatac 19380

tacgtgtaag cccaaaagaa cccacgtgta gcccatgcaa agttaacact cacgacccca 19440

ttcctcagtc tccactatat aaacccacca tccccaatct caccaaaccc accacacaac 19500

tcacaactca ctctcacacc ttaaagaacc aatcaccacc aaaaatttta caacaattac 19560

caacaacaac aaacaacaaa caacattaca attacattta caattaccat accatgagcg 19620

ctgttaccgt tactggatct gatcctaaga acagaggatc ttctagcaac accgagcaag 19680

aggttccaaa agttgctatc gataccaacg gaaacgtgtt ctctgttcct gatttcacca 19740

tcaaggacat ccttggagct atccctcatg agtgttacga gagaagattg gctacctctc 19800

tctactacgt gttcagagat atcttctgca tgcttaccac cggatacctt acccataaga 19860

tcctttaccc tctcctcatc tcttacacct ctaacagcat catcaagttc actttctggg 19920

ccctttacac ttacgttcaa ggacttttcg gaaccggaat ctgggttctc gctcatgagt 19980

gtggacatca agctttctct gattacggaa tcgtgaacga tttcgttgga tggacccttc 20040

actcttacct tatggttcct tacttcagct ggaagtactc tcatggaaag caccataagg 20100

ctactggaca catgaccaga gatatggttt tcgttcctgc caccaaagag gaattcaaga 20160

agtctaggaa cttcttcggt aacctcgctg agtactctga ggattctcca cttagaaccc 20220

tttacgagct tcttgttcaa caacttggag gatggatcgc ttacctcttc gttaacgtta 20280

caggacaacc ttaccctgat gttccttctt ggaaatggaa ccacttctgg cttacctctc 20340

cacttttcga gcaaagagat gctctctaca tcttcctttc tgatcttgga atcctcaccc 20400

agggaatcgt tcttactctt tggtacaaga aattcggagg atggtccctt ttcatcaact 20460

ggttcgttcc ttacatctgg gttaaccact ggctcgtttt catcacattc cttcagcaca 20520

ctgatcctac tatgcctcat tacaacgctg aggaatggac tttcgctaag ggtgctgctg 20580

ctactatcga tagaaagttc ggattcatcg gacctcacat cttccatgat atcatcgaga 20640

ctcatgtgct tcaccactac tgttctagga tcccattcta caacgctaga cctgcttctg 20700

aggctatcaa gaaagttatg ggaaagcact acaggtctag cgacgagaac atgtggaagt 20760

cactttggaa gtctttcagg tcttgccaat acgttgacgg tgataacggt gttctcatgt 20820

tccgtaacat caacaactgc ggagttggag ctgctgagaa gtaatgaagg ggtgatcgat 20880

tatgagatcg tacaaagaca ctgctaggtg ttaaggatgg ataataataa taataatgag 20940

atgaatgtgt tttaagttag tgtaacagct gtaataaaga gagagagaga gagagagaga 21000

gagagagaga gagagagaga gagagagagg ctgatgaaat gttatgtatg tttcttggtt 21060

tttaaaataa atgaaagcac atgctcgtgt ggttctatcg aattattcgg cggttcctgt 21120

gggaaaaagt ccagaagggc cgccgcagct actactacaa ccaaggccgt ggaggagggc 21180

aacagagcca gcacttcgat agctgctgcg atgatcttaa gcaattgagg agcgagtgca 21240

catgcagggg actggagcgt gcaatcggcc agatgaggca ggacatccag cagcagggac 21300

agcagcagga agttgagagg tggtcccatc aatctaaaca agtcgctagg gaccttccgg 21360

gacagtgcgg cacccagcct agccgatgcc agctccaggg gcagcagcag tctgcatggt 21420

tttgaagtgg tgatcgatga gatcgtataa agacactgct aggtgttaag gatgggataa 21480

taagatgtgt tttaagtcat taaccgtaat aaaaagagag agaggctgat ggaatgttat 21540

gtatgtatgt ttcttggttt ttaaaattaa atggaaagca catgctcgtg tgggttctat 21600

ctcgattaaa aatcccaatt atatttggtc taatttagtt tggtattgag taaaacaaat 21660

tcgaaccaaa ccaaaatata aatatatagt ttttatatat atgcctttaa gacttttttat 21720

agaatttttct ttaaaaaata tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg 21780

ttaaatatga agtgctccat ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct 21840

tatcaagtgt tactaaaatg cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaatc 21900

tatcaaaatt cttatatatc ttttttcgaat ttgaagtgaa atttcgataa tttaaaatta 21960

aatagaacat atcattattt aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg 22020

ttaactttga aagtgtacat caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc 22080

atgtgttatt aagaaaattc tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa 22140

aaattaattt ttactaacac atatatttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa 22200

ataatattca tctaacaaaa aaaaaaccag aaaatgctga aaacccggca aaaccgaacc 22260

aatccaaacc gatatagttg gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcggtcc 22320

atttgcaccc ctaatcataa tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc 22380

aatatcctgg aaattttgca aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa 22440

gcagctcgat gtggtggtaa tatgtaattt acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt 22500

aataatttct gctaggaaga aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaaagaa 22560

ccataaagtg attgaagctc gaaatatacg aaggaacaaa tatttttaaa aaaatacgca 22620

atgacttgga acaaaagaaa gtgatatatt ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa 22680

gaatggcagt tttcctttgc atgtaactat tatgctccct tcgttacaaa aattttggac 22740

tactattggg aacttcttct gaaaatagtc ctgcaggcta gtagattggt tggttggttt 22800

ccatgtacca gaaggcttac cctattagtt gaaagttgaa actttgttcc ctactcaatt 22860

cctagttgtg taaatgtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aaatgactag 22920

gagtggttct tgagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag 22980

aacgaatttg aaaggctctt aggtttgaat cctattcgag aatgtttttg tcaaagatag 23040

tggcgatttt gaaccaaaga aaacatttaa aaaatcagta tccggttacg ttcatgcaaa 23100

tagaaagtgg tctaggatct gattgtaatt ttagacttaa agagtctctt aagattcaat 23160

cctggctgtg tacaaaacta caaataatat attttagact atttggcctt aactaaactt 23220

ccactcatta tttactgagg ttagagaata gacttgcgaa taaacacatt cccgagaaat 23280

actcatgatc ccataattag tcagagggta tgccaatcag atctaagaac acacattccc 23340

tcaaatttta atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa 23400

agacagaaat ttgtagactt ttttttggcg ttaaaagaag actaagttta tacgtacatt 23460

ttatttttaag tggaaaaccg aaattttcca tcgaaatata tgaatttagt atatatattt 23520

ctgcaatgta ctattttgct attttggcaa ctttcagtgg actactactt tattacaatg 23580

tgtatggatg catgagtttg agtatacaca tgtctaaatg catgctttgt aaaacgtaac 23640

ggaccacaaa agaggatcca tacaaataca tctcatagct tcctccatta ttttccgaca 23700

caaacagagc attttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta 23760

catttacaat taccatacca tggaatttgc tcaacctctc gttgctatgg ctcaagagca 23820

gtacgctgct atcgatgctg ttgttgctcc tgctatcttc tctgctaccg actctattgg 23880

atggggactc aagcctatct cttctgctac taaggatctc cctctcgttg aatctcctac 23940

ccctcttatc ctttctctcc tcgcttactt cgctatcgtt ggttctggac tcgtttaccg 24000

taaagtgttc cctagaaccg ttaagggaca ggatcctttc cttctcaagg ctcttatgct 24060

cgctcacaac gttttccttа tcggactcag cctttacatg tgcctcaagc tcgtttacga 24120

ggcttacgtg aacaagtact ccttctgggg aaacgcttac aaccctgctc aaaccgagat 24180

ggctaaggtg atctggatct tctacgtgtc caagatctac gagttcatgg acaccttcat 24240

catgcttctc aagggaaacg ttaaccaggt ttccttcctc catgtttacc accacggatc 24300

tatctctgga atctggtgga tgatcactta tgctgctcca ggtggagatg cttacttctc 24360

tgctgctctc aactcttggg ttcatgtgtg catgtacacc tactacttca tggctgctgt 24420

tcttcctaag gacgaaaaga ccaagagaaa gtacctttgg tggggaagat accttaccca 24480

gatgcaaatg ttccagttct tcatgaacct tctccaggct gtttacctcc tctactcttc 24540

ttctccttac cctaagttca ttgctcaact cctcgttgtt tacatggtta ccctcctcat 24600

gcttttcgga aacttctact acatgaagca ccacgcttct aagtgataag ggccgccgcc 24660

atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg atcgctagtg 24720

attgtcattg ttatatataa taatgttatc tttcacaact tatcgtaatg catgtgaaac 24780

tataacacat taatcctact tgtcatatga taacactctc cccatttaaa actcttgtca 24840

atttaaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaaata tattataaat tcaatcactc 24900

ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac taatttagtc 24960

tgaatagaat aattagattc tagcctgcag ggcggccgcg gatccratgg agtcaaagat 25020

tcaaatagag gacctaacag aactcgccgt aaagactggc gaacagttca tacagagtct 25080

cttacgactc aatgacaaga agaaaatctt cgtcaacatg gtggagcacg acacacttgt 25140

ctactccaaa aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agacttttca 25200

acaaagggta atatccggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcactttat 25260

tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa 25320

ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tggtcccaaa gatggacccc cacccacgag 25380

gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga 25440

tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc 25500

tatataagga agttcatttc atttggagag aacacggggg actgaattaa atatgagccc 25560

tgagaggcgt cctgttgaaa tcagacctgc tactgctgct gatatggctg ctgtttgtga 25620

tatcgtgaac cactacatcg agacttctac cgttaacttc agaactgagc ctcaaactcc 25680

tcaagagtgg atcgatgatc ttgagagact ccaagataga taccccttggc ttgttgctga 25740

ggttgagggt gttgttgctg gaatcgctta cgctggacct tggaaggcta gaaacgctta 25800

cgattggact gttgagtcta ccgtttacgt ttcacacaga catcagagac ttggacttgg 25860

atctaccctt tacactcacc ttctcaagtc tatggaagct cagggattca agtctgttgt 25920

tgctgttatc ggactcccta acgatccttc tgttagactt catgaggctc ttggatacac 25980

tgctagagga actcttagag ctgctggata caagcacggt ggatggcatg atgttggatt 26040

ctggcaaaga gatttcgagc ttcctgctcc tcctagacct gttagaccag ttactcagat 26100

ctgaatttgc gtgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt 26160

gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt 26220

aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggtttta tgattagagt cccgcaatta 26280

tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc 26340

gcggtgtcat ctatgttact agatcactag tgatgtacgg ttaaaaccac cccagtacat 26400

taaaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgttta caccacaata 26460

tatcctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag ctcggcacaa aatcaccact 26520

cgatacaggc agcccatcag tcc 26543

<210> 7
<211> 23760
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> pGA7-mod_G нуклеотидна послідовність
<400> 7

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttta cgcccttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcggtac cgcccgttcg 240

actcagatct tccaaggcct cgtctccgag tccgctgctt ctcgccgcgc cgatcacttc 300

tccgccgcca acaaggcttg tagttaatag gaatcattca gggattgtga ttccgggcag 360

tagtaattaa taatatagta ttagtataga taatatgttt cgtttgggat ctttggaacg 420

ttgctctgtt ccttgttgtt cattttaaag cttttgaggg atagttgcag aactgttcgg 480

tgatgcttca tcctctcaag aactagattt gggtaaagaa acatccatgc atggatatgg 540

aatgttgttc ttccgattgg agattatttt ataaaattta aaattcatga tttaaaaaaa 600

cacataaaaa ccacaaaatt catgatttat tgacaatacg atacaaaatt agcaccaccg 660

gctactggct cattacacat ttccccttcc cctcattctc actttgtggc tttattatta 720

ttattattac atatatttta ccgttattat ttcacgtcac ataagcttgt taattaatta 780

tcactgcttc ttagcaccct tagacttgta cctcttacgg tagaagttgg cgaagagaac 840

gaacatgttc accataaccc agagttgaag gtaaggaagc cagaaagcgg tattctgaac 900

gtaagcggtg tagatagagt gagaagcaca gatacagaac tgaagcatct ggatctgggt 960

gatgtacttc ttccagaaac agttaactcc aagagcagca agtccgtagt aagagtacat 1020

gatcacgtgc acgaaggtgt taacagaaga tccgaagtag caatctccaa caggctcaag 1080

cttcataaca acgaaccatg accagatgag aagagtgtgg tggtagatgt gaaggaaaga 1140

aagctggtcg aacttcttcc tcatcaccat gaagaaggtg tcgagaagct caacgtactt 1200

gttgttgtag tgaagccaga taacctgaga gattccccaa gagttagcag tcatatcagg 1260

gatgtttccc caaaccttaa gtccctgagc cctatgagaa gtaacgaaaa ggtagatgca 1320

gtagctgttg aagaaggtct ggtagaagtt gtaaacgagc atagcgttct tgagtccgaa 1380

aggttgagat ctgttctgca tgatacgctt tccgaagtag atgaagagga ggtatccaat 1440

agttccgata gtaggtcccc agtactcaac ctgcatgaag taagcaggaa ctttctcaga 1500

agctgggata tcagggttag ccacattgta ggtaacgtat ccaagagttc cagcaagagc 1560

agcagggata gcgatagagg ccatggtatg gtaattgtaa atgtaattgt aatgttgttt 1620

gttgtttgtt gttgttggta attgttgtaa aattaattaa gtgggtatct tttggatgga 1680

taagcaagta gtgatgatgt tctaggtgaa gtgatggggg tgttttatag cgggagatgg 1740

tgaaatggat ggtcgccaca taagaaatgg aggggaaggg ttcttgcgcc attcttcagt 1800

ttgcatggat gcatgggttt cattttgtaa cacgtaataa ggacaatgaa gtgcaggtgt 1860

ctctcaagtt tcagaggggа tatgtggaca gaagaagaac ggcgatgata ttgatggaaa 1920

tggccatcta gtgtgaatct attcggttga taatactagt gcattttggc cgttaatccc 1980

ttcaattaac tgcacaaact tcagttgagt attgattatt tgattatagg ttctgtaaac 2040

acaataccaa gtttatttag aggggagaca tacaaatagt ttcgatataa ataatagagt 2100

ggttaaactt agttattaaa actatatata aagtctaaaa gttaaattat ttttttaatt 2160

gcaaatatat aaagtctaaa ggggttacat tatttcttaa gagatgtaac tctgttggaa 2220

tctgacttaa tccgtctcat cactctggtt tccagttcta atctaatgaa ttgttttctg 2280

ccaaagaatt tgaagcaaga agtaaattga tcaatgccgt caacccacac caaaccgtca 2340

acccactacc atcgccgcgg agacccccaa actcaacctc cacccatcgg taagaagcac 2400

agggcagccc gcaccaccac caatttggcg tgcatgacac ctagggactt ggcacgggag 2460

gcggcgcacg tggatgcaaa tgacgggata tcagatgaca ggaaacgacg ttgagagacc 2520

atacgatgta gaatatgagc tcaccatcaa cgagaaacta ggaaaatcac aaaaaaaaca 2580

actctcgtaa ttgtacgagt ggcacagatg ggtctgcctc aacatatctc taatacggcg 2640

aagcctgccc aacacgtagt tgccggaatc cggtgtggag ctcacgactc tgaaagatag 2700

gcgcttcctg tttcgtttcg ctcacccact ggacgtccgt catgtgatgg atttcggtca 2760

ttggtttgct gacaaccaca ttctgaagct ccatgagatg agtcttcaca ataggtcctg 2820

ctcaataccg tggagttatg gttgcaagtc cataacttgc cgttcgaata ttttgcggag 2880

ccagtcggac gggaattggc gagctcggct gacacctata aaggccatga caagaagaac 2940

caaaagttct tccctaatgc tttcatgagg cttcgggtcg ttatggatgt cggaaaaccc 3000

ctcttgaagg aacgagacgt tattatgcat gacggtaaga ctattacttg tcagtataag 3060

tatgaaagat tacctgtctt ctgctttgtt tgtggattga ttggacacgt tgaaaaaaaa 3120

tgtgcacttc gatttcaata ctcagagatc gacttccctt ttctctagga gtattcgatc 3180

aaggcattaa catggaagga agctcaagct ctaaaggctt cacaatggaa cctgaaaaat 3240

ttcaacaagc ctaaactgaa atcgaagtca aatcacccaa ccgggagctc taaatcagca 3300

aacactcctc ctccacagta tccaatcatc gtgcacgatg ctccaggtat tgcaagccag 3360

gtattgcaag ctaggagtag gatagagacc ttaaacgtcg ttggtgtgaa gagtcatctt 3420

cagacctaat ggagatagat gtagacggcg gcacgaagac tctgaaacac cagaaaggct 3480

agtccaggat aaggatctgc tatcccaact gacctctcgt tagtcccaag gcctctcaac 3540

tagagcagga ggaaggatgg tcacaagact aggataatga tgtttccaat atgaacctga 3600

atgtccatag ctaatttttt tagtcttgct tctgcacttt ttgtttatta tgttctggtg 3660

actatgttat ttacccttgt ccgtatgctt gagggtaccc tagtagattg gttggttggt 3720

ttccatgtac cagaaggctt accctattag ttgaaagttg aaactttgtt ccctactcaa 3780

ttcctagttg tgtaaatgta tgtatatgta atgtgtataa aacgtagtac ttaaatgact 3840

aggagtggtt cttgagaccg atgagagatg ggagcagaac taaagatgat gacataatta 3900

agaacgaatt tgaaaggctc ttaggtttga atcctattcg agaatgtttt tgtcaaagat 3960

agtggcgatt ttgaaccaaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccggtta cgttcatgca 4020

aatagaaagt ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca 4080

atcctggctg tgtacaaaac tacaaataat atattttaga ctatttggcc ttaactaaac 4140

ttccactcat tatttactga ggttagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccgagaa 4200

atactcatga tcccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc 4260

cctcaaattt taatgcacat gtaatcatag tttagcacaa ttcaaaaata atgtagtatt 4320

aaagacagaa atttgtagac tttttttttgg cgttaaaaga agactaagtt tatacgtaca 4380

ctttatttta agtggaaaac cgaaattttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat 4440

ttctgcaatg tactattttg ctattttggc aactttcagt ggactactac tttattacaa 4500

tgtgtatgga tgcatgagtt tgagtataca catgtctaaa tgcatgcttt gtaaaacgta 4560

acggaccaca aaagaggatc catacaaata catctcatag cttcctccat tattttccga 4620

cacaaacaga gcatttttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca acattacaat 4680

tacatttaca attaccatac catggaattc gcccagcctc ttgttgctat ggctcaagag 4740

caatacgctg ctatcgatgc tgttgttgct cctgctatct tctctgctac tgattctatc 4800

ggatggggac ttaagcctat ctcttctgct actaaggact tgcctcttgt tgagtctcct 4860

acacctctca tcctttcttt gcttgcttac ttcgctatcg ttggatctgg actcgtttac 4920

agaaaggttt tccctagaac cgtgaaggga caagatccat tccttttgaa ggctcttatg 4980

cttgctcaca acgtgttcct tatcggactt tctctttaca tgtgcctcaa gcttgtgtac 5040

gaggcttacg ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaaccctgc tcaaactgag 5100

atggctaagg ttatctggat cttctacgtg agcaagatct acgagttcat ggataccttc 5160

atcatgctcc tcaagggaaa tgttaaccag gttagcttcc ttcacgttta ccatcacgga 5220

tctatctctg gaatctggtg gatgattact tacgctgctc ctggtggtga tgcttacttc 5280

tctgctgctc ttaactcttg ggttcacgtg tgtatgtaca cctactattt tatggctgcc 5340

gtgcttccta aggacgagaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact 5400

caaatgcaga tgttccagtt cttcatgaac cttctccagg ctgtttacct tctctactct 5460

tcatctcctt accctaagtt tatcgctcag ctcctcgtgg tgtacatggt tactcttctc 5520

atgcttttcg gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgccg 5580

ggccgccgcc atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg 5640

atcgctagtg attgtcattg ttatatataa taatgttatc tttcacaact tatcgtaatg 5700

catgtgaaac tataacacat taatcctact tgtcatatga taacactctc cccatttaaa 5760

actcttgtca atttaaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaaata tattataaat 5820

tcaatcactc ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac 5880

taatttagtc tgaatagaat aattagattc tagtctcatc ccctttaaa ccaacttagt 5940

aaacgttttt ttttttaatt ttatgaagtt aagtttttac cttgtttta aaaagaatcg 6000

ttcataagat gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag 6060

aattgttttt cttcgccact tgtcactccc ttcaaacacc taagagcttc tctctcacag 6120

cacacacata caatcacatg cgtgcatgca ttattacacg tgatcgccat gcaaatctcc 6180

tttatagcct ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat 6240

acaaacaaga ttaaaaacat acacgaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaaac 6300

aacaaacaac attacaatta catttacaat taccatacca tgcctccaag ggactcttac 6360

tcttatgctg ctcctccttc tgctcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac 6420

aagaaagagc ttgttatcgg agatagggct tacgatgtta ccaacttcgt taagagacac 6480

cctggtggaa agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag 6540

ttccatgtta gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctcttccttc tcgtcctgtt 6600

cacaagggat actctccaag aagggctgat cttatcgctg atttccaaga gttcaccaag 6660

caacttgagg ctgagggaat gttcgagcct tctcttcctc atgttgctta cagacttgct 6720

gaggttatcg ctatgcatgt tgctggtgct gctcttatct ggcatggata cactttcgct 6780

ggaatcgcta tgcttggagt tgttcaggga agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga 6840

cattactctc tcactggaaa cattgctttc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga 6900

cttggatgtg gaatgtctgg tgcttggtgg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact 6960

cctcaaaagc ttcagcacga tgttgatctt gatacccttc ctctcgttgc tttccatgag 7020

agaatcgctg ctaaggttaa gtctcctgct atgaaggctt ggctttctat gcaagctaag 7080

cttttcgctc ctgttaccac tcttcttgtt gctcttggat ggcagcttta ccttcatcct 7140

agacacatgc tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgctcggaat cagatacgga 7200

cttgttggat accttgctgc taactacggt gctggatacg ttctcgcttg ttaccttctt 7260

tacgttcagc ttggagctat gtacatcttc tgcaacttcg ctgtttctca tactcacctc 7320

cctgttgttg agcctaacga gcatgctact tgggttgagt acgctgctaa ccacactact 7380

aactgttctc catcttggtg gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag 7440

caccaccttt acccttctat gcctcaattc agacacccta agatcgctcc tagagttaag 7500

cagcttttcg agaagcacgg acttcactac gatgttagag gatacttcga ggctatggct 7560

gatactttcg ctaaccttga taacgttgcc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga 7620

gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggtcttgcg 7680

atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcacg taataattaa catgtaatgc 7740

atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 7800

gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 7860

atgttactag atcggtcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat 7920

tgagtaaaac aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct 7980

ttaagacttt ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg 8040

catgtaatat ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattggttg 8100

tacgatcact ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt 8160

catatgtcaa aatctatcaa aattcttata tatcttttte gaatttgaag tgaaatttcg 8220

ataatttaaa attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta 8280

attactaaat ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa 8340

aataaataaa tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca 8400

tatgtttgta aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac 8460

aaagtaagat taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc 8520

ggcaaaaccg aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccg 8580

aaccaactcg gtccatttgc acccctaatc ataatagctt taatatttca agatattatt 8640

aagttaacgt tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta 8700

atatgaattt aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa 8760

atatcccaag tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc 8820

cagaatacaa agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt 8880

taaaaaaata cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tatttttgt tcttaaacaa 8940

gcatcccctc taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta 9000

caaaaatttt ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtgatagaa cccacacgag 9060

catgtgcttt ccatttaatt ttaaaaacca agaaacatac atacataaca ttccatcagc 9120

ctctctctct ttttattacg gttaatgact taaaacacat cttattatcc catccttaac 9180

acctagcagt gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg 9240

ctgccccctgg agctggcatc ggctaggctg ggtgccgcac tgtcccggaa ggtccctagc 9300

gacttgttta gattgatggg accacctctc aacttcctgc tgctgtccct gctgctggat 9360

gtcctgcctc atctggccga ttgcacgctc cagtcccctg catgtgcact cgctcctcaa 9420

ttgcttaaga tcatcgcagc agctatcgaa gtgctggctc tgttgccctc ctccacggcc 9480

ttggttgtag tagtagctgc cgccgccctt ctggactttt tcccacagga accgccgaat 9540

aattcgatag aaccacacga gcatgtgctt tcatttattt taaaaaccaa gaaacataca 9600

taacatttca tcagcctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc 9660

tctctcttta ttacagctgt tacactaact taaaacacat tcatctcatt attattatta 9720

ttatccatcc ttaacaccta gcagtgtctt tgtacgatct cataatcgat caccccttca 9780

tcaggtatcc ttaggcttca ctccaacgtt gttgcagtta cggaacatgt acacaccatc 9840

atggttctca acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaaccc acatgttctc 9900

atcggtgtgt ctgtagtgct ctcccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc 9960

atggtagaat gggatccttg aaacgtagtg atggagcaca tgagtctcga tgatgtcatg 10020

gaagatgatt ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa 10080

agtccactct tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac 10140

gaaaacaagc cagtggttaa caaggatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca 10200

gaatccgaaa accttgtaag cggtgtaaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc 10260

agaaagaacg atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg 10320

agacttgaag aacttagaaa caccagggta aggttgtcca gtagcgttag tagcaaggta 10380

aagagaaagt cctccaagct gttggaacaa gagagcgaaa acagagtaga taggagtttc 10440

ctcagcgata tcgtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcggtgta 10500

aggaacgaaa accatatctc tggtcatgtg tccagtagcc ttatggtgct tagcatgaga 10560

gaacttccag ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaacccatc caacggtatc 10620

gttaacccat ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat 10680

tccgaatccg aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa 10740

ttcgttaggg agaagaggga tgtaggtaag tccaacgtaa gcgatagcag agatagccac 10800

gatatctctc accacgtaag acatagactt cacgagagat ctctcgtaac agtgcttagg 10860

gatagcgtca aggatatcct tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt ttccgaaggt 10920

atcgatagcg gtcttttgct gcttgaaaga tgcaacgttt ccagaacgcc taacggtctt 10980

agtagatccc tcaaggatct cagatccaga cacggtaacc ttagacatgg tatggtaatt 11040

gtaaatgtaa ttgtaatgtt gtttgttgtt tgttgttgtt ggtaattgtt gtaaaatttt 11100

tggtggtgat tggttcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggtttggt 11160

gagattgggg atggtgggtt tatatagtgg agactgagga atggggtcgt gagtgttaac 11220

tttgcatggg ctacacgtgg gttcttttgg gcttacacgt agtattattc atgcaaatgc 11280

agccaataca tatacggtat tttaataatg tgtgggaata caatatgccg agtattttac 11340

taattttggc aatgacaagt gtacatttgg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat 11400

ttggattatt tttattctct taccttggcc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca 11460

gaattgaatg gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat 11520

taacgtcgaa ggaaaatact gattctctca agcatacgga caagggtaaa taacatagtc 11580

accagaacat aataaacaaa aagtgcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt 11640

caggttcata ttggaaacat cattatccta gtcttgtgac catccttcct cctgctctag 11700

ttgagaggcc ttgggactaa cgagaggtca gttgggatag cagatcctta tcctggacta 11760

gcctttctgg tgtttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga 11820

agatgactct tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc 11880

tggcttgcaa tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgttt 11940

gctgatttag agctcccggt tgggtgattt gacttcgatt tcagtttagg cttgttgaaa 12000

tttttcaggt tccattgtga agcctttaga gcttgagctt ccttccatgt taatgccttg 12060

atcgaatact cctagagaaa agggaagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat 12120

ttttttcaa cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatac 12180

ttatactgac aagtaatagt cttaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg 12240

ggttttccga catccataac gacccgaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg 12300

ttcttcttgt catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc 12360

tccgcaaaat attcgaacgg caagttatgg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc 12420

aggacctatt gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtggttgtca gcaaaccaat 12480

gaccgaaatc catcacatga cggacgtcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc 12540

tatctttcag agtcgtgagc tccacaccgg attccggcaa ctacgtgttg ggcaggcttc 12600

gccgtattag agatatgttg aggcagaccc atctgtgcca ctcgtacaat tacgagagtt 12660

gtttttttg tgattttcct agtttctcgt tgatggtgag ctcatattct acatcgtatg 12720

gtctctcaac gtcgtttcct gtcatctgat atcccgtcat ttgcatccac gtgcgccgcc 12780

tcccgtgcca agtccctagg tgtcatgcac gccaaattgg tggtggtgcg ggctgccctg 12840

tgcttcttac cgatgggtgg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt 12900

gacggtttgg tgtgggttga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attctttggc 12960

agaaaacaat tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat 13020

tccaacagag ttacatctct taagaaataa tgtaacccct ttagacttta tatatttgca 13080

attaaaaaaa taatttaact tttagacttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca 13140

ctctattatt tatatcgaaa ctatttgtat gtctcccctc taaataaact tggtattgtg 13200

tttacagaac ctataatcaa ataatcaata ctcaactgaa gtttgtgcag ttaattgaag 13260

ggattaacgg ccaaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat 13320

ttccatcaat atcatcgccg ttcttcttct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga 13380

cacctgcact tcattgtcct tattacgtgt tacaaaatga aacccatgca tccatgcaaa 13440

ctgaagaatg gcgcaagaac ccttcccctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac 13500

catctcccgc tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat 13560

ccatccaaaa gatacccact tttacaacaa ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat 13620

tacaattaca tttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct 13680

tctactggtg ttcatgctgg tgttactgac tcttctgctt tcaccagaaa ggatgttgct 13740

gatagacctg atctcaccat cgttggagat tctgtttacg atgctaaggc tttcagatct 13800

gagcatcctg gtggtgctca tttcgtttct ttgttcggag gaagagatgc tactgaggct 13860

ttcatggaat accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttgga 13920

tctcttgctt ctactgagga acctgttgct gctgatgagg gataccttca actttgtgct 13980

aggatcgcta agatggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctcctgcttc ttactgggtt 14040

aaggctggac ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgctgga 14100

aagagacttc tcccttctat cgttcttgga tggcttttcg ctcttatcgg tcttaacatc 14160

cagcatgatg ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgctt ctgttaacct tgctcttgga 14220

ctttgtcagg attggatcgg aggatctatg atcctttggc ttcaagagca tgttgttatg 14280

caccacctcc acactaacga tgttgataag gatcctgatc aaaaggctca cggtgctctt 14340

agactcaagc ctactgatgc ttggtcacct atgcattggc ttcagcatct ttacctttg 14400

cctggtgaga ctatgtacgc tttcaaggtt ttgttcctcg acatctctga gcttgttatg 14460

tggcgttggg agggtgagcc tatctctaag cttgctggat acctctttat gccttctttg 14520

cttctcaagc ttaccttctg ggctagattc gttgctttgc ctctttacct tgctccttct 14580

gttcatactg ctgtgtgtat cgctgctact gttatgactg gatctttcta cctcgctttc 14640

ttcttcttca tctcccacaa cttcgagggt gttgcttctg ttggacctga tggatctatc 14700

acttctatga ctagaggtgc tagcttcctt aagagacaag ctgagacttc ttctaacgtt 14760

ggaggacctc ttcttgctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcacttg 14820

ttcgctagag ttcaccatgg attctaccct agacttgctc ctcttgttaa ggctgagctt 14880

gaggctagag gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtctaacct tgcttctacc 14940

ctcagacata tgtacgctct tggaagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct 15000

tatgtgacgt gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa 15060

agtgagaatg aggggaaggg gaaatgtgta atgagccagt agccggtggt gctaattttg 15120

tatcgtattg tcaataaatc atgaattttg tggtttttat gtgttttttt aaatcatgaa 15180

ttttaaattt tataaaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatatc catgcatgga 15240

tgtttcttta cccaaatcta gttcttgaga ggatgaagca tcaccgaaca gttctgcaac 15300

tatcgctcaa aagctttaaa atgaacaaca aggaacagag caacgttcca aagatcccaa 15360

acgaaaacata ttatctatac taatactata ttattaatta ctactgcccg gaatcacaat 15420

ccctgaatga ttcctattaa ctacaagcct tgttggcggc ggagaagtga tcggcgcggc 15480

gagaagcagc ggactcggag acgaggcctt ggaagatctg agtcgaacgg gcagaatcag 15540

tatttttctt cgacgttaat tgatcctaca ctatgtaggt catatccatc gttttaattt 15600

ttggccacca ttcaattctg tcttgccttt agggatgtga atatgaacgg ccaaggtaag 15660

agaataaaaa taatccaaat taaagcaaga gaggccaagt aagataatcc aaatgtacac 15720

ttgtcattgc caaaattagt aaaatactcg gcatattgta ttcccacaca ttattaaaat 15780

accgtatatg tattggctgc atttgcatga ataatactac gtgtaagccc aaaagaaccc 15840

acgtgtagcc catgcaaagt taacactcac gaccccattc ctcagtctcc actatataaa 15900

cccaccatcc ccaatctcac caaacccacc acacaactca caactcactc tcacacctta 15960

aagaaccaat caccaccaaa aattttacaa caattaccaa caacaacaaa caacaaacaa 16020

cattacaatt acatttacaa ttaccatacc atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat 16080

cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat 16140

accaacggaa acgtgttctc tgttcctgat ttcaccatca aggacatcct tggagctatc 16200

cctcatgagt gttacgagag aagattggct acctctctct actacgtgtt cagagatatc 16260

ttctgcatgc ttaccaccgg ataccttacc cataagatcc tttaccctct cctcatctct 16320

tacacctcta acagcatcat caagttcact ttctgggccc tttacactta cgttcaagga 16380

cttttcggaa ccggaatctg ggttctcgct catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat 16440
tacggaatcg tgaacgattt cgttggatgg acccttcact cttaccttat ggttccttac 16500
ttcagctgga agtactctca tggaaagcac cataaggcta ctggacacat gaccagagat 16560
atggttttcg ttcctgccac caaagaggaa ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac 16620
ctcgctgagt actctgagga ttctccactt agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa 16680
cttggaggat ggatcgctta cctcttcgtt aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt 16740
ccttcttgga aatggaacca cttctggctt acctctccac ttttcgagca aagagatgct 16800
ctctacatct tcctttctga tcttggaatc ctcacccagg gaatcgttct tactctttgg 16860
tacaagaaat tcggaggatg gtccctttтc atcaactggt tcgttcctta catctgggtt 16920
aaccactggc tcgttttcat cacattcctt cagcacactg atcctactat gcctcattac 16980
aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga 17040
ttcatcggac ctcacatctt ccatgatatc atcgagactc atgtgcttca ccactactgt 17100
tctaggatcc cattctacaa cgctagacct gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga 17160
aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct 17220
tgccaatacg ttgacggtga taacggtgtt ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga 17280
gttggagctg ctgagaagta atgaaggggt gatcgattat gagatcgtac aaagacactg 17340

ctaggtgtta aggatggata ataataataa taatgagatg aatgtgtttt aagttagtgt 17400
aacagctgta ataaagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 17460
agagaggctg atgaaatgtt atgtatgttt cttggttttt aaaataaatg aaagcacatg 17520
ctcgtgtggt tctatcgaat tattcggcgg ttcctgtggg aaaaagtcca gaagggccgc 17580
cgcagctact actacaacca aggccgtgga ggagggcaac agagccagca cttcgatagc 17640
tgctgcgatg atcttaagca attgaggagc gagtgcacat gcaggggact ggagcgtgca 17700
atcggccaga tgaggcagga catccagcag cagggacagc agcaggaagt tgagaggtgg 17760
tcccatcaat ctaaacaagt cgctagggac cttccgggac agtgcggcac ccagcctagc 17820
cgatgccagc tccaggggca gcagcagtct gcatggtttt gaagtggtga tcgatgagat 17880

cgtataaaga cactgctagg tgttaaggat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa 17940

ccgtaataaa aagagagaga ggctgatgga atgttatgta tgtatgtttc ttggtttttа 18000

aaattaaatg gaaagcacat gctcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata 18060

ttggtctaa tttagtttgg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aaatataaat 18120

atatagtttt tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct 18180

agaaatattt gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt 18240

tattaacttt aaataattgg ttgtacgatc actttcttat caagtgttac taaaatgcgt 18300

caatctcttt gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt 18360

ttcgaatttg aagtgaaatt tcgataattt aaaattaaat agaacatatc attatttagg 18420

tatcatattg atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa 18480

cgaaaaatta gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc 18540

tataagaata ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaa ttaatttttа ctaacacata 18600

tatttactta tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaa 18660

aaaccagaaa atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt 18720

tggtttgatt ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcacccctа atcataatag 18780

ctttaatatt tcaagatatt attaagttaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa 18840

tgaatcaagc ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat 18900

gtaatttact tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg 18960

ttagctacga tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa 19020

atatacgaag gaacaaatat ttttaaaaaa atacgcaatg acttggaaca aaagaaagtg 19080

atatattttt tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg 19140

taactattat gctcccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa 19200

aatagtcctg caggctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct 19260

attagttgaa agttgaaact ttgttcccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat 19320

atgtaatgcg tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag 19380

agatgggagc agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg 19440

tttgaatcct attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa 19500
catttaaaaa atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggtct aggatctgat 19560
tgtaatttta gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa 19620
ataatatatt ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcattattt actgaggtta 19680
gagaatagac ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca 19740
gagggtatgc caatcagatc taagaacaca cattcctca aattttaatg cacatgtaat 19800
catagtttag cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt 19860
tttggcgtta aaggaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa 19920
ttttccatcg aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt 19980
ttggcaactt tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt 20040
atacacatgt ctaaatgcat gctttgcaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatgc 20100
aaatacatct catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcaga ctctagagga 20160
tccccccgtt ttacaacaat taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt acaattacat 20220
ttacaattac catcccaaat cggcgcgcca tgtgtcctcc taagaccgat ggaagatctt 20280
ctcctagatc tcctctcacc aggtctaagt catctgctga ggctcttgat gctaaggatg 20340
cttctaccgc tcctgttgat cttaagaccc ttgagcctca tgaacttgct gctaccttcg 20400
agactagatg ggttagggtt gaggatgttg agtacgacgt gaccaacttc aaacatcctg 20460

gtggaagcgt gatcttctac atgcttgcta acactggtgc tgatgctact gaggctttca 20520
aagaatttca catgcgtagc ctcaaggctt ggaagatgct tagagctttg ccttctagac 20580
ctgctgagat caagagatct gagtctgagg atgctcctat gcttgaggat ttcgctaggt 20640
ggagagctga acttgagagg gacggattct tcaagccttc tatcacccat gttgcttacc 20700
gtcttttgga gcttcttgct actttcgctc ttggaaccgc tcttatgtac gctggatacc 20760
ctatcattgc tagcgttgtg tacggtgctt tctttcggagc tagatgtgga tgggttcaac 20820
atgagggtgg acacaactct cttaccggat ctgtgtacgt ggataagaga cttcaggcta 20880
tgacttgcgg attcggactt tctaccagcg gagagatgtg gaaccagatg cataacaagc 20940
accatgctac ccctcagaaa gttagacacg acatggatct tgataccact cctgctgtgg 21000
ctttcttcaa caccgctgtg gaggataata gacctagggg attctctaga gcttgggcta 21060

gacttcaagc ttggaccttc gttcctgtta cttctggact tctcgttcag gctttctgga 21120

tctacgttct ccatcctaga caggtgctca ggaagaagaa ctacgaggaa gcttcttgga 21180

tgctcgtttc tcacgttgtt agaaccgctg ttatcaagct tgctaccgga tactcttggc 21240

ctgttgctta ctggtggttc actttcggaa actggatcgc ttacatgtac ctcttcgctc 21300

acttctctac ttctcacact cacctccctg ttgttccatc tgacaagcac cttagctggg 21360

ttaactacgc tgttgatcac accgttgaca tcgatccttc tcgtggatac gttaactggc 21420

ttatgggata ccttaactgc caggttatcc accatctctt ccctgatatg cctcaattca 21480

gacagcctga ggtgtcaaga agattcgtcc ctttcgctaa gaagtgggga ctcaactaca 21540

aggtgctctc ttactacggt gcttggaagg ctactttcag caacctcgac aaagttggac 21600

agcactacta cgttaacgga aaggctgaga aggctcactg atgattaatt aaatttgggc 21660

tcgaaccggt tcgagcaagc ttatgtgacg tgaaataata acggtaaaat atatgtaata 21720

ataataataa taaagccaca aagtgagaat gaggggaagg ggaaatgtgt aatgagccag 21780

tagccggtgg tgctaatttt gtatcgtatt gtcaataaat catgaatttt gtggttttta 21840

tgtgtttttt taaatcatga attttaaatt ttataaaata atctccaatc ggaagaacaa 21900

cattccatat ccatgcatgg atgtttcttt acccaaatct agttcttgag aggatgaagc 21960

atcaccgaac agttctgcaa ctatccctca aaagctttaa aatgaacaac aaggaacaga 22020

gcaacgttcc aaagatccca aacgaaacat attatctata ctaatactat attattaatt 22080

actactgccc ggaatcacaa tccctgaatg attcctatta actacaagcc ttgttggcgg 22140

cggagaagtg atcggcgcgg cgagaagcag cggactcgga gacgaggcct tggaagatct 22200

cctgcagggc ggccgcggat cccatggagt caaagattca aatagaggac ctaacagaac 22260

tcgccgtaaa gactggcgaa cagttcatac agagtctctt acgactcaat gacaagaaga 22320

aaatcttcgt caacatggtg gagcacgaca cacttgtcta ctccaaaaat atcaaagata 22380

cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga cttttcaaca aagggtaata tccggaaacc 22440

tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag 22500

gtggctccta caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg 22560

ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg 22620

ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg 22680

acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt 22740

tggagagaac acgggggact gaattaaata tgagccctga gaggcgtcct gttgaaatca 22800

gacctgctac tgctgctgat atggctgctg tttgtgatat cgtgaaccac tacatcgaga 22860

cttctaccgt taacttcaga actgagcctc aaactcctca agagtggatc gatgatcttg 22920

agagactcca agatagatac ccttggcttg ttgctgaggt tgagggtgtt gttgctggaa 22980

tcgcttacgc tggaccttgg aaggctagaa acgcttacga ttggactgtt gagtctaccg 23040

tttacgtttc acacagacat cagagacttg gacttggatc taccctttac actcaccttc 23100

tcaagtctat ggaagctcag ggattcaagt ctgttgttgc tgttatcgga ctccctaacg 23160

atccttctgt tagacttcat gaggctcttg gatacactgc tagaggaact cttagagctg 23220

ctggatacaa gcacggtgga tggcatgatg ttggattctg gcaaagagat ttcgagcttc 23280

ctgctcctcc tagacctgtt agaccagtta ctcagatctg aatttgcgtg atcgttcaaa 23340

catttggcaa taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcga tgattatcat 23400

ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt 23460

tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa 23520

caaaatatag cgcgcaaact aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga 23580

tcactagtga tgtacggtta aaaccacccc agtacattaa aaacgtccgc aatgtgttat 23640

taagttgtct aagcgtcaat ttgtttacac cacaatatat cctgccacca gccagccaac 23700

agctcccccga ccggcagctc ggcacaaaat caccactcga tacaggcagc ccatcagtcc 23760

<210> 8
<211> 11042
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert нуклеотидна послідовність
<400> 8

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttttca cgccctttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgccctagaa tctaattatt ctattcagac taaattagta 240

taagtatttt tttaatcaat aaataataat taataattta ttagtaggag tgattgaatt 300

tataatatat ttttttttaat catttaaaga atcttatatc tttaaattga caagagtttt 360

aaatggggag agtgttatca tatcacaagt aggattaatg tgttatagtt tcacatgcat 420

tacgataagt tgtgaaagat aacattatta tatataacaa tgacaatcac tagcgatcga 480

gtagtgagag tcgtcttatt acactttctt ccttcgatct gtcacatggc ggcggcccga 540

attctcatca cttagaagcg tggtgcttca tgtagtagaa gtttccgaaa agcatgagaa 600

gagtcaccat gtacaccacg aggagctgag cgataaactt agggtaaggt gaagaagagt 660

agaggaggta cacagcctgg agaaggttca tgaagaactg gaacatttgc atctgggtga 720

ggtatcttcc ccaccagagg tacttttctct tagttttctc atccttaggg agcacagcag 780

ccataaagta gtaggtgtac atgcacacgt gcacccaaga gttgagagca gcagagaaat 840

aagcatcacc acctggagca gcgtaggtga tcatccacca gattccagag atagatccgt 900

gatggtacac gtggaggaat gacacctggt tcacatttcc cttgaggagc atgatgaagg 960

tatccatgaa ctcgtagatc tttgacacgt agaaaatcca gatcaccttа gccatctcgg 1020

cctgagcagg gttgtaagcg tttccccaga aagagtactt gttcacgtaa gcctcgtaca 1080

cgagcttgag gcacatgtag agtgagagtc cgatgaggaa cacgttatga gcgagcatga 1140

gagccttgag caagaatgga tcctgtccct tcacagttct agggaacacc tttctgtaca 1200

cgagtccaga tcccacgata gcgaagtaag cgaggagaga caagataaga ggggtaggag 1260

attccacgag agggagatcc ttagtagcag aagagatagg cttgagtccc catccgatag 1320

aatcggtagc agagaagata gcaggagcca caacagcatc gatagcagcg tattgttctt 1380

gagccatagc cacgagaggc tgagcaaatt ccatgaattc tgttcttctt tactctttgt 1440

gtgactgagg tttggtctag tgctttggtc atctatatat aatgataaca acaatgagaa 1500

caagctttgg agtgatcgga gggtctagga tacatgagat tcaagtggac taggatctac 1560

accgttggat tttgagtgtg gatatgtgtg aggttaattt tacttggtaa cggccacaaa 1620

ggcctaagga gaggtgttga gacccttatc ggcttgaacc gctggaataa tgccacgtgg 1680

aagataattc catgaatctt atcgttatct atgagtgaaa ttgtgtgatg gtggagtggt 1740

gcttgctcat tttacttgcc tggtggactt ggccctttcc ttatggggaa tttatatttt 1800

acttactata gagctttcat accttttttt taccttggat ttagttaata tataatggta 1860

tgattcatga ataaaaatgg gaaatttttg aatttgtact gctaaatgca taagattagg 1920

tgaaactgtg gaatatatat ttttttcatt taaaagcaaa atttgccttt tactagaatt 1980

ataaatatag aaaaatatat aacattcaaa taaaaatgaa aataagaact ttcaaaaaac 2040

agaactatgt ttaatgtgta aagattagtc gcacatcaag tcatctgtta caatatgtta 2100

caacaagtca taagcccaac aaagttagca cgtctaaata aactaaagag tccacgaaaa 2160

tattacaaat cataagccca acaaagttat tgatcaaaaa aaaaaaacgc ccaacaaagc 2220

taaacaaagt ccaaaaaaaa cttctcaagt ctccatcttc ctttatgaac attgaaaact 2280

atacacaaaa caagtcagat aaatctcttt ctgggcctgt cttcccaacc tcctacatca 2340

cttccctatc ggattgaatg ttttacttgt acctttccg ttgcaatgat attgatagta 2400

tgtttgtgaa aactaatagg gttaacaatc gaagtcatgg aatatggatt tggtccaaga 2460

ttttccgaga gctttctagt agaaagccca tcaccagaaa tttactagta aaataaatca 2520

ccaattaggt ttcttattat gtgccaaatt caatataatt atagaggata tttcaaatga 2580

aaacgtatga atgttattag taaatggtca ggtaagacat taaaaaaatc ctacgtcaga 2640

tattcaactt taaaaattcg atcagtgtgg aattgtacaa aaatttggga tctactatat 2700

atatataatg ctttacaaca cttggatttt tttttggagg ctggaatttt taatctacat 2760

atttgttttg gccatgcacc aactcattgt ttagtgtaat actttgattt tgtcaaatat 2820

atgtgttcgt gtatatttgt ataagaattt ctttgaccat atacacacac acatatatat 2880

atatatatat atattatata tcatgcactt ttaattgaaa aaataatata tatatatata 2940

gtgcattttt tctaacaacc atatatgttg cgattgatct gcaaaaatac tgctagagta 3000

atgaaaaata taatctattg ctgaaattat ctcagatgtt aagattttct taaagtaaat 3060

tctttcaaat tttagctaaa agtcttgtaa taactaaaga ataatacaca atctcgacca 3120

cggaaaaaaa acacataata aatttggggc ccctagaatc taattattct attcagacta 3180

aattagtata agtatttttt taatcaataa ataataatta ataatttatt agtaggagtg 3240

attgaattta taatatattt ttttttaatca tttaaagaat cttatatctt taaattgaca 3300

agagttttaa atggggagag tgttatcata tcacaagtag gattaatgtg ttatagtttc 3360

acatgcatta cgataagttg tgaaagataa cattattata tataacaatg acaatcacta 3420

gcgatcgagt agtgagagtc gtcttattac actttcttcc ttcgatctgt cacatggcgg 3480

cggcccgcgg ccgctcatca gtgagccttc tcagcctttc cgttcacgta gtagtgctgt 3540

cccaccttat cgaggtttga gaaggtagcc ttccaagcac cgtagtaaga gagcaccttg 3600

tagttgagtc cccacttctt agcgaaagga acgaatcttc ttgacacctc aggctgtctg 3660

aactgtggca tatctgggaa gaggtgatgg atcacctggc agttgaggta tcccatgagc 3720

cagttcacgt aacccctaga aggatcgata tccacggtgt gatccacagc gtagttcacc 3780

caagaaaggt gcttatcaga tggcaccact gggagatggg tatgagaggt agagaagtga 3840

gcgaagaggt acatgtaagc gatccagttt ccgaaggtga accaccaata agcaacaggc 3900

caagagtatc cggtagcgag cttgataaca gcggttctca caacgtgaga cacgagcatc 3960

caagaagcct cttcgtagtt cttctttctg agcacctgtc taggatggag aacgtagatc 4020

cagaaagcct gcacgagaag tccagaagtc acaggaacga aagtccaagc ctgaagtcta 4080

gcccaagctc tagaaaatcc cctaggcctg ttatcctcaa cagcggtgtt gaagaaagcc 4140

acagcaggag tggtatcgag atccatatca tgcctcacct tttgtggggt tgcgtggtgc 4200

ttgttgtgca tctggttcca catctcacca gaggtagaaa gtccgaatcc gcaagtcata 4260

gcctggagcc tcttatccac atacacagat ccggtgagag agttatgacc accctcgtgt 4320

tgaacccatc cacatctagc tccgaagaaa gcaccgtaca ccacagaagc gataataggg 4380

tatccagcat acatgagagc agttccgaga gcgaaagtag caagaagctc gagaagtctg 4440

tatgccacgt gggtgataga aggcttgaag aatccatccc tctcaagctc agctctccac 4500

ctagcgaaat cttcgagcat aggagcatcc tcagactcag acctcttgat ctcagctggt 4560

ctagaaggca aagccctaag catcttccaa gccttgagag atctcatgtg aaattctttg 4620

aaagcctcag tagcatcagc accggtgtta gcgagcatgt agaagatcac agaaccacca 4680

gggtgcttga agttagtaac atcgtactca acatcctcaa ctctcaccca tctagtctcg 4740

aaggtagcag ccaactcatg aggctcaaga gtcttgagat ccacaggagc agtagaagca 4800

tccttagcat cgagagcctc agcagatgac ttagacctgg taagaggtga cctaggagaa 4860

gatcttccat cagtctttgg agggcacatg cggccgctgt tcttctttac tctttgtgtg 4920

actgaggttt ggtctagtgc tttggtcatc tatatataat gataacaaca atgagaacaa 4980

gctttggagt gatcggaggg tctaggatac atgagattca agtggactag gatctacacc 5040

gttggatttt gagtgtggat atgtgtgagg ttaattttac ttggtaacgg ccacaaaggc 5100

ctaaggagag gtgttgagac ccttatcggc ttgaaccgct ggaataatgc cacgtggaag 5160

ataattccat gaatcttatc gttatctatg agtgaaattg tgtgatggtg gagtggtgct 5220

tgctcatttt acttgcctgg tggacttggc cctttcctta tggggaattt atattttact 5280

tactatagag ctttcatacc ttttttttac cttggattta gttaatatat aatggtatga 5340

ttcatgaata aaaatgggaa atttttgaat ttgtactgct aaatgcataa gattaggtga 5400

aactgtggaa tatatatttt tttcatttaa aagcaaaatt tgccttttac tagaattata 5460

aatatagaaa aatatataac attcaaataa aaatgaaaat aagaactttc aaaaaacaga 5520

actatgttta atgtgtaaag attagtcgca catcaagtca tctgttacaa tatgttacaa 5580

caagtcataa gcccaacaaa gttagcacgt ctaaataaac taaagagtcc acgaaaatat 5640

tacaaatcat aagcccaaca aagttattga tcaaaaaaaa aaaacgccca acaaagctaa 5700

acaaagtcca aaaaaaactt ctcaagtctc catcttcctt tatgaacatt gaaaactata 5760

cacaaaacaa gtcagataaa tctctttctg ggcctgtctt cccaacctcc tacatcactt 5820

ccctatcgga ttgaatgttt tacttgtacc ttttccgttg caatgatatt gatagtatgt 5880

ttgtgaaaac taatagggtt aacaatcgaa gtcatggaat atggatttgg tccaagattt 5940

tccgagagct ttctagtaga aagcccatca ccagaaattt actagtaaaa taaatcacca 6000

attaggtttc ttattatgtg ccaaattcaa tataattata gaggatattt caaatgaaaa 6060

cgtatgaatg ttattagtaa atggtcaggt aagacattaa aaaaatccta cgtcagatat 6120

tcaacttttaa aaattcgatc agtgtggaat tgtacaaaaa tttgggatct actatatata 6180

tataatgctt tacaacactt ggatttttttt ttggaggctg gaatttttaa tctacatatt 6240

tgttttggcc atgcaccaac tcattgttta gtgtaatact ttgatttttgt caaatatatg 6300

tgttcgtgta tatttgtata agaatttctt tgaccatata cacacacaca tatatatata 6360

tatatatata ttatatatca tgcacttttа attgaaaaaa taatatatat atatatagtg 6420

cattttttct aacaaccata tatgttgcga ttgatctgca aaaatactgc tagagtaatg 6480

aaaaatataa tctattgctg aaattatctc agatgttaag attttcttaa agtaaattct 6540

ttcaaatttt agctaaaagt cttgtaataa ctaaagaata atacacaatc tcgaccacgg 6600

aaaaaaaaca cataataaat ttgggcgcgc cgcgtattgg ctagagcagc ttgccaacat 6660

ggtggagcac gacactctcg tctactccaa gaatatcaaa gatacagtct cagaagacca 6720

aagggctatt gagacttttc aacaaagggt aatatcggga aacctcctcg gattccattg 6780

cccagctatc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaaggtggca cctacaaatg 6840

ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 6900

agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 6960

aaagcaagtg gattgatgtg ataacatggt ggagcacgac actctcgtct actccaagaa 7020

tatcaaagat acagtctcag aagaccaaag ggctattgag acttttcaac aaagggtaat 7080

atcgggaaac ctcctcggat tccattgccc agctatctgt cacttcatca aaaggacagt 7140

agaaaaggaa ggtggcacct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg ctatcgttca 7200

agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggacccccа cccacgagga gcatcgtgga 7260

aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata tctccactga 7320

cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta taaggaagt 7380

tcatttcatt tggagaggac acgctgaaat caccagtctc tctctacaaa tctatctctg 7440

cgatcgcatg cctcctaggg attcttactc ttacgctgct cctccatctg ctcagctcca 7500

tgaagttgat actcctcaag agcacgataa gaaagaactc gtgatcggag atagggctta 7560

cgatgtgacc aacttcgtga agagacaccc tggtggaaag attatcgctt accaggttgg 7620

aactgatgct accgatgctt acaagcagtt ccacgtgaga tctgctaagg ctgataagat 7680

gctcaagtct ctcccatcta ggcctgtgca caagggatat tctccaagaa gggctgatct 7740

tatcgctgat ttccaagagt tcaccaagca gcttgaggct gagggaatgt tcgaaccttc 7800

tctcgctcat gtggcttaca gactcgctga ggttatcgct atgcatgttg ctggtgctgc 7860

tctcatctgg cacggatata ctttcgctgg aatcgctatg ctcggagtgg ttcagggaag 7920

atgtggatgg cttatgcatg agggtggaca ctactctctc accggaaaca ttgctttcga 7980

tagggctatc caggtggcat gctatggact tggatgtgga atgtctggtg cttggtggag 8040

aaaccagcat aacaagcacc atgctacccc tcaaaagctc cagcatgatg tggatctcga 8100

tactctccct ctcgtggctt tccatgagag aatcgctgct aaggtgaagt ctcctgctat 8160

gaaggcttgg ctctctatgc aggctaagct tttcgctcct gtgactactc ttctcgttgc 8220

tcttggatgg cagctctacc tccatcctag acacatgctc aggaccaagc actacgatga 8280

gcttgctatg ctcggtatca gatacggact cgttggatac ctcgctgcta attacggtgc 8340

tggatacgtt ctcgcttgct accttcttta cgttcagctc ggagctatgt acatcttctg 8400

caacttcgct gtgtctcaca ctcatctccc tgtggttgaa cctaacgagc atgctacttg 8460

ggttgagtac gctgctaacc acactaccaa ctgctctcca tcttggtggt gtgattggtg 8520

gatgtcttac ctcaactacc agatcgagca ccacctctac ccttctatgc ctcagttcag 8580

acaccctaag atcgctccta gagtgaagca gcttttcgag aagcacggac tccactacga 8640

tgtgagagga tactttgagg ctatggctga taccttcgct aacctcgata atgtggctca 8700

cgctcctgag aagaaaatgc agtgatgagc gatcgcgatc gttcaaacat ttggcaataa 8760

agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 8820

aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 8880

tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 8940

gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatcc ctgcagggcg 9000

tattggctag agcagcttgc caacatggtg gagcacgaca ctctcgtcta ctccaagaat 9060

atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aagggtaata 9120

tcgggaaacc tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc acttcatcaa aaggacagta 9180

gaaaaggaag gtggcaccta caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcgttcaa 9240

gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa 9300

aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgataa catggtggag 9360

cacgacactc tcgtctactc caagaatatc aaagatacag tctcagaaga ccaaagggct 9420

attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcg ggaaacctcc tcggattcca ttgcccagct 9480

atctgtcact tcatcaaaag gacagtagaa aaggaaggtg gcacctacaa atgccatcat 9540

tgcgataaag gaaaggctat cgttcaagat gcctctgccg acagtggtcc caaagatgga 9600

cccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa 9660

gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg 9720

caagaccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttgga gaggacacgc tgaaatcacc 9780

agtctctctc tacaaatcta tctctctcga gatgattgaa caagatggat tgcacgcagg 9840

ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg 9900

ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg aggccggttc tttttgtcaa 9960

gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact tcaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct 10020

ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga 10080

ctggctgcta ttgggcgaag tgccgggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc 10140

cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg atccggctac 10200

ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc 10260

cggtcttgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact 10320

gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga ctcatggcga 10380

tgcctgcttg ccgaatatca tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg 10440

ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctacccgtg atattgctga 10500

agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga 10560

ttcgcagcgc atcgccttct atcgccttct tgacgagttc ttctgaaacg cgtgatcgtt 10620

caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccggtctt gcgatgatta 10680

tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcatgacgt 10740

tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcaatt atacatttaa tacgcgatag 10800

aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac 10860

tagatcgacg tccgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt 10920

attaagttgt ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca 10980

acagctcccc gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccatcagt 11040

cc 11042

<210> 9

<211> 1254
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Lachancea kluyveri 12 десатурази в рослинах
<400> 9

atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc 60

gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa acgtgttctc tgttcctgat 120

ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt gttacgagag aagattggct 180

acctctctct actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc ttaccaccgg ataccttacc 240

cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacacctcta acagcatcat caagttcact 300

ttctgggccc tttacactta cgttcaagga cttttcggaa ccggaatctg ggttctcgct 360

catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg tgaacgattt cgttggatgg 420

accottcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga agtactctca tggaaagcac 480

cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg ttcctgccac caaagaggaa 540

ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctcgctgagt actctgagga ttctccactt 600

agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat ggatcgctta cctcttcgtt 660

aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt ccttcttgga aatggaacca cttctggctt 720

acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct tcctttctga tcttggaatc 780

ctcacccagg gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat tcggaggatg gtccctttic 840

atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aaccactggc tcgttttcat cacattcctt 900

cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt 960

gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcatcggac ctcacatctt ccatgatatc 1020

atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc cattctacaa cgctagacct 1080

gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg 1140

tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg ttgacggtga taacggtgtt 1200

ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg ctgagaagta atga 1254

<210> 10
<211> 416
<212> Білок
<213> Lachancea kluyveri
<400> 10

```
Met Ser Ala Val Thr Val Thr Gly Ser Asp Pro Lys Asn Arg Gly Ser
1               5                  10                  15

Ser Ser Asn Thr Glu Gln Glu Val Pro Lys Val Ala Ile Asp Thr Asn
            20                  25                  30

Gly Asn Val Phe Ser Val Pro Asp Phe Thr Ile Lys Asp Ile Leu Gly
        35                  40                  45

Ala Ile Pro His Glu Cys Tyr Glu Arg Arg Leu Ala Thr Ser Leu Tyr
    50                  55                  60

Tyr Val Phe Arg Asp Ile Phe Cys Met Leu Thr Thr Gly Tyr Leu Thr
65                  70                  75                  80

His Lys Ile Leu Tyr Pro Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Ser Ile
                85                  90                  95

Ile Lys Phe Thr Phe Trp Ala Leu Tyr Thr Tyr Val Gln Gly Leu Phe
            100                 105                 110

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

Ser Asp Tyr Gly Ile Val Asn Asp Phe Val Gly Trp Thr Leu His Ser
    130                 135                 140
```

Tyr Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Gly Lys His
145 150 155 160

His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro Ala
165 170 175

Thr Lys Glu Glu Phe Lys Lys Ser Arg Asn Phe Phe Gly Asn Leu Ala
180 185 190

Glu Tyr Ser Glu Asp Ser Pro Leu Arg Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Val
195 200 205

Gln Gln Leu Gly Gly Trp Ile Ala Tyr Leu Phe Val Asn Val Thr Gly
210 215 220

Gln Pro Tyr Pro Asp Val Pro Ser Trp Lys Trp Asn His Phe Trp Leu
225 230 235 240

Thr Ser Pro Leu Phe Glu Gln Arg Asp Ala Leu Tyr Ile Phe Leu Ser
245 250 255

Asp Leu Gly Ile Leu Thr Gln Gly Ile Val Leu Thr Leu Trp Tyr Lys
260 265 270

Lys Phe Gly Gly Trp Ser Leu Phe Ile Asn Trp Phe Val Pro Tyr Ile
275 280 285

Trp Val Asn His Trp Leu Val Phe Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
290 295 300

Pro Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Glu Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
305 310 315 320

Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Lys Phe Gly Phe Ile Gly Pro His Ile
325 330 335

Phe His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Cys Ser Arg
340 345 350

Ile Pro Phe Tyr Asn Ala Arg Pro Ala Ser Glu Ala Ile Lys Lys Val
355 360 365

Met Gly Lys His Tyr Arg Ser Ser Asp Glu Asn Met Trp Lys Ser Leu
370 375 380

Trp Lys Ser Phe Arg Ser Cys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Asn Gly Val
385 390 395 400

Leu Met Phe Arg Asn Ile Asn Asn Cys Gly Val Gly Ala Ala Glu Lys
405 410 415

<210> 11
<211> 1251
<212> ДНК
<213> Pichia pastoris
<400> 11

atgtctaagg ttaccgtgtc tggatctgag atccttgagg gatctactaa gaccgttagg 60

cgttctggaa acgttgcatc tttcaagcag caaaagaccg ctatcgatac cttcggaaac 120

gttttcaagg tgccagatta caccatcaag gatatccttg acgctatccc taagcactgt 180

tacgagagat ctctcgtgaa gtctatgtct tacgtggtga gagatatcgt ggctatctct 240

gctatcgctt acgttggact tacctacatc cctcttctcc ctaacgaatt ccttagattc 300

gctgcttggt ctgcttacgt gttctctatc tcttgtttcg gattcggaat ctggatcctt 360

ggacatgagt gtggacattc tgctttctct aactacggat gggttaacga taccgttgga 420

tgggttctcc actctcttgt tatggttcct tacttcagct ggaagttctc tcatgctaag 480

caccataagg ctactggaca catgaccaga gatatggttt tcgttcctta caccgccgag 540

gaattcaaag agaagcacca agttaccagc cttcacgata tcgctgagga aactcctatc 600

tactctgttt tcgctctctt gttccaacag cttggaggac tttctcttta ccttgctact 660

aacgctactg gacaacctta ccctggtgtt tctaagttct tcaagtctca ctactggcct 720

tctagccctg ttttcgataa gaaggactac tggtacatcg ttctttctga tcttggaatc 780

ctigctaccc tcacttctgt ttacaccgct tacaaggttt tcggattctg gcctactttc 840

atcacatggt tctgtccttg gatccttgtt aaccactggc ttgttttcgt taccttcctt 900

cagcacaccg attcttctat gcctcattac gatgctcaag agtggacttt cgctaagggt 960

gctgctgcta ctatcgatag agagttcgga atcctcggaa tcatcttcca tgacatcatc 1020

gagactcatg tgctccatca ctacgtttca aggatcccat tctaccatgc tagagaagct 1080

accgagtgca tcaagaaagt tatgggagag cactacagac acaccgatga gaacatgtgg 1140

gttagccttt ggaaaacttg gagatcttgc cagttcgttg agaaccatga tggtgtgtac 1200

atgttccgta actgcaacaa cgttggagtg aagcctaagg atacctgatg a 1251

<210> 12
<211> 415
<212> Білок
<213> Pichia pastoris
<400> 12

Met Ser Lys Val Thr Val Ser Gly Ser Glu Ile Leu Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Thr Val Arg Arg Ser Gly Asn Val Ala Ser Phe Lys Gln Gln Lys
20 25 30

Thr Ala Ile Asp Thr Phe Gly Asn Val Phe Lys Val Pro Asp Tyr Thr
35 40 45

Ile Lys Asp Ile Leu Asp Ala Ile Pro Lys His Cys Tyr Glu Arg Ser
50 55 60

Leu Val Lys Ser Met Ser Tyr Val Val Arg Asp Ile Val Ala Ile Ser
65 70 75 80

Ala Ile Ala Tyr Val Gly Leu Thr Tyr Ile Pro Leu Leu Pro Asn Glu
85 90 95

Phe Leu Arg Phe Ala Ala Trp Ser Ala Tyr Val Phe Ser Ile Ser Cys
100 105 110

Phe Gly Phe Gly Ile Trp Ile Leu Gly His Glu Cys Gly His Ser Ala
115 120 125

Phe Ser Asn Tyr Gly Trp Val Asn Asp Thr Val Gly Trp Val Leu His
130 135 140

Ser Leu Val Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His Ala Lys
145 150 155 160

His His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro
165 170 175

Tyr Thr Ala Glu Glu Phe Lys Glu Lys His Gln Val Thr Ser Leu His
180 185 190

Asp Ile Ala Glu Glu Thr Pro Ile Tyr Ser Val Phe Ala Leu Leu Phe
195 200 205

Gln Gln Leu Gly Gly Leu Ser Leu Tyr Leu Ala Thr Asn Ala Thr Gly
210 215 220

Gln Pro Tyr Pro Gly Val Ser Lys Phe Phe Lys Ser His Tyr Trp Pro
225 230 235 240

Ser Ser Pro Val Phe Asp Lys Lys Asp Tyr Trp Tyr Ile Val Leu Ser
245 250 255

Asp Leu Gly Ile Leu Ala Thr Leu Thr Ser Val Tyr Thr Ala Tyr Lys
260 265 270

Val Phe Gly Phe Trp Pro Thr Phe Ile Thr Trp Phe Cys Pro Trp Ile
275 280 285

Leu Val Asn His Trp Leu Val Phe Val Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
290 295 300

Ser Ser Met Pro His Tyr Asp Ala Gln Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
305 310 315 320

Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Glu Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ile Phe
325 330 335

His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Val Ser Arg Ile
340 345 350

Pro Phe Tyr His Ala Arg Glu Ala Thr Glu Cys Ile Lys Lys Val Met
355 360 365

Gly Glu His Tyr Arg His Thr Asp Glu Asn Met Trp Val Ser Leu Trp
370 375 380

Lys Thr Trp Arg Ser Cys Gln Phe Val Glu Asn His Asp Gly Val Tyr
385 390 395 400

Met Phe Arg Asn Cys Asn Asn Val Gly Val Lys Pro Lys Asp Thr
405 410 415

<210> 13
<211> 1392
<212> ДНК
<213> Micromonas pusilla
<400> 13

atgtgcccgc cgaagacgga cggccgatcg tccccgcgat cgccgctgac gcgcagcaaa 60

tcctccgcgg aggcgctcga cgccaaggac gcgtcgaccg cgcccgtcga tctcaaaacg 120

ctcgagccgc acgagctcgc ggcgacgttc gagacgcgat gggtgcgcgt ggaggacgtc 180

gagtacgacg tcacaaactt caaacacccg ggaggcagcg tgatattcta catgctcgcg 240

aacacgggcg cggacgccac ggaggcgttc aaggagttcc acatgcgatc gcttaaggcg 300

tggaagatgc tcagagcgct gccgtcgcgc cccgcggaga tcaaacgcag cgagagcgag 360

gacgcgccga tgttggagga tttcgcgcgg tggcgcgcgg agctcgaacg cgacgggttc 420

tttaagccct cgataacgca cgtcgcgtat cggttactcg agctcctcgc gaccttcgcc 480

ctcggcaccg ccctcatgta cgccgggtac ccgatcatcg cgtccgtcgt gtacggcgcg 540

ttcttcggcg ctcggtgcgg ttgggtccag cacgagggcg ggcacaactc gctcacgggg 600

tccgtctacg tcgacaagcg cctccaagcg atgacgtgcg ggttcgggct gtccacgagc 660

ggggagatgt ggaaccagat gcacaataag caccacgcga cgccgcagaa agtgaggcac 720

gacatggacc tggacacgac ccccgcggtg gcgtttttta acaccgccgt ggaggacaac 780

cggccgaggg ggttctcccg cgcgtgggct cggcttcagg cgtggacgtt cgtcccggtg 840

acctccgggc tgctcgtcca ggcgttctgg atctacgtcc tgcacccgcg gcaggtgttg 900

cgaaagaaga actacgagga ggcgtcgtgg atgctcgtct ctcacgtcgt caggaccgcg 960

gtgattaaac tcgcgacggg gtactcgtgg cccgtcgcgt actggtggtt caccttcggc 1020

aactggatcg cgtacatgta cctcttcgcg cacttctcca cgagccacac gcacctcccg 1080

gtcgtgccct cggataagca cctgagctgg gtgaactacg cggtcgatca caccgtggac 1140

atcgacccgt cgcgcgggta cgtgaactgg ttgatgggat atctgaactg ccaggtcatt 1200

catcacctgt tcccggacat gccgcagttt cgccagccgg aggtgagccg gcggttcgtc 1260

ccgttcgcga agaagtgggg gctgaactac aaggtgctgt cctattacgg cgcctggaag 1320

gcgacgttct cgaacttgga taaggtcggg cagcactact acgtcaacgg caaggcggag 1380

aaggcgcact ga 1392

<210> 14
<211> 1395
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Micromonas pusilla б десатурази в рослинах (версія 1)
<400> 14

atgtgccctc ctaagactga tggaagatct tctcctagat ctccacttac caggtctaaa 60

tcttctgctg aggctcttga tgctaaggat gcttctactg ctcctgttga tcttaagact 120

cttgagcctc atgagcttgc tgctactttc gagactagat gggttagagt tgaggacgtt 180

gagtacgatg tgactaactt caagcaccct ggtggatctg tgatcttcta catgcttgct 240

aacactggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaattcc acatgcgttc tctcaaggct 300

tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360

gatgctccta tgcttgagga tttcgctaga tggcgtgctg agcttgagag agatggattc 420

ttcaagcctt ctatcaccca tgtggcttac agacttctcg agcttcttgc tacattcgct 480

cttggaactg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg cttctgttgt ttacggtgct 540

ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacataactc tcttaccgga 600

tctgtttacg tggacaagag acttcaggct atgacttgtg gattcggact ttctacttct 660

ggtgagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcaaaa ggttagacac 720

gatatggatc ttgataccac tcctgctgtg gctttcttca acactgctgt tgaggataac 780

agacctagag gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacttt cgttcctgtt 840

acctctggac ttcttgttca agctttctgg atctacgttc tccaccctag acaagttctc 900

cgtaagaaga actacgaaga ggcttcttgg atgctcgttt ctcatgttgt tagaaccgct 960

gttatcaagc ttgctactgg atactcttgg cctgttgctt actggtggtt cactttcgga 1020

aactggatcg cttacatgta ccttttcgct cacttctcta cttctcatac tcacctccct 1080

gttgttccat ctgataagca cctttcttgg gttaactacg ctgttgatca caccgttgat 1140

atcgatcctt ctagaggata cgtgaactgg cttatgggat accttaactg tcaggttatc 1200

caccacctct tccctgatat gcctcaattc agacagcctg aggttagcag aagattcgtt 1260

cctttcgcta agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttggaag 1320

gctactttct ctaaccttga taaggtggga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag 1380

aaggctcact aatga 1395

<>210> 15
<211> 1395
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Micromonas pusilla б десатурази в рослинах (версія 2)
<400> 15

atgtgtcctc ctaagaccga tggaagatct tctcctagat ctcctctcac caggtctaag 60

tcatctgctg aggctcttga tgctaaggat gcttctaccg ctcctgttga tcttaagacc 120

cttgagcctc atgaacttgc tgctaccttc gagactagat gggttagggt tgaggatgtt 180

gagtacgacg tgaccaactt caaacatcct ggtggaagcg tgatcttcta catgcttgct 240

aacactggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaatttc acatgcgtag cctcaaggct 300

tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360

gatgctccta tgcttgagga tttcgctagg tggagagctg aacttgagag ggacggattc 420

ttcaagcctt ctatcaccca tgttgcttac cgtcttttgg agcttcttgc tactttcgct 480

cttggaaccg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg ctagcgttgt gtacggtgct 540

ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacacaactc tcttaccgga 600

tctgtgtacg tggataagag acttcaggct atgacttgcg gattcggact ttctaccagc 660

ggagagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcagaa agttagacac 720

gacatggatc ttgataccac tcctgctgtg gctttcttca acaccgctgt ggaggataat 780

agacctaggg gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacctt cgttcctgtt 840

acttctggac ttctcgttca ggcttttctgg atctacgttc tccatcctag acaggtgctc 900

aggaagaaga actacgagga agcttcttgg atgctcgttt ctcacgttgt tagaaccgct 960

gttatcaagc ttgctaccgg atactcttgg cctgttgctt actggtggtt cactttcgga 1020

aactggatcg cttacatgta cctcttcgct cacttctcta cttctcacac tcacctccct 1080

gttgttccat ctgacaagca ccttagctgg gttaactacg ctgttgatca caccgttgac 1140

atcgatcctt ctcgtggata cgttaactgg cttatgggat accttaactg ccaggttatc 1200

caccatctct tccctgatat gcctcaattc agacagcctg aggtgtcaag aagattcgtc 1260

cctttcgcta agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttggaag 1320

gctactttca gcaacctcga caaagttgga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag 1380

aaggctcact gatga 1395

<210> 16
<211> 463
<212> Білок
<213> Micromonas pusilla
<400> 16

Met Cys Pro Pro Lys Thr Asp Gly Arg Ser Ser Pro Arg Ser Pro Leu
1 5 10 15

Thr Arg Ser Lys Ser Ser Ala Glu Ala Leu Asp Ala Lys Asp Ala Ser
20 25 30

Thr Ala Pro Val Asp Leu Lys Thr Leu Glu Pro His Glu Leu Ala Ala
35 40 45

Thr Phe Glu Thr Arg Trp Val Arg Val Glu Asp Val Glu Tyr Asp Val
50 55 60

Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Phe Tyr Met Leu Ala
65 70 75 80

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Met Arg
85 90 95

Ser Leu Lys Ala Trp Lys Met Leu Arg Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala
100 105 110

Glu Ile Lys Arg Ser Glu Ser Glu Asp Ala Pro Met Leu Glu Asp Phe
115 120 125

Ala Arg Trp Arg Ala Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser
130 135 140

Ile Thr His Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Leu Ala Thr Phe Ala
145 150 155 160

Leu Gly Thr Ala Leu Met Tyr Ala Gly Tyr Pro Ile Ile Ala Ser Val
165 170 175

Val Tyr Gly Ala Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu
180 185 190

Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Ser Val Tyr Val Asp Lys Arg Leu
195 200 205

Gln Ala Met Thr Cys Gly Phe Gly Leu Ser Thr Ser Gly Glu Met Trp
210 215 220

Asn Gln Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His
225 230 235 240

```
Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala
                245                 250                 255

Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Arg Ala Trp Ala Arg Leu
            260                 265                 270

Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Leu Leu Val Gln Ala
        275                 280                 285

Phe Trp Ile Tyr Val Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Lys Lys Asn
    290                 295                 300

Tyr Glu Glu Ala Ser Trp Met Leu Val Ser His Val Val Arg Thr Ala
305                 310                 315                 320

Val Ile Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Trp Pro Val Ala Tyr Trp Trp
                325                 330                 335

Phe Thr Phe Gly Asn Trp Ile Ala Tyr Met Tyr Leu Phe Ala His Phe
            340                 345                 350

Ser Thr Ser His Thr His Leu Pro Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
        355                 360                 365

Ser Trp Val Asn Tyr Ala Val Asp His Thr Val Asp Ile Asp Pro Ser
    370                 375                 380
```

Arg Gly Tyr Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
405 410 415

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Gly Leu Asn Tyr Lys Val
420 425 430

Leu Ser Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Ser Asn Leu Asp Lys
435 440 445

Val Gly Gln His Tyr Tyr Val Asn Gly Lys Ala Glu Lys Ala His
450 455 460

<210> 17
<211> 1449
<212> ДНК
<213> Ostreococcus lucimarinus
<400> 17

atgtgcgtcg aaacgaccga aggcacatcg cgaacgatgg cgaacgaacg cacgagctcg 60

tcgtcgtcgc tgagcgaagg cggaacgccg acggtgacgg tcgggatggg aagcgaagac 120

gcggggaaga agactcgaaa cgcgagcgtc acggcgtgga cgaaagagtt ggagccgcac 180

gcgatcgcga agacgttcga acggcggtac gtgacgatcg aaggcgtgga atacgatgtg 240

acggatttta agcatcccgg aggatcggtt atttattaca tgctgtcgaa cacgggagcg 300

gacgcgacgg aggcttttaa agagtttcat tatcggtcga aaaaggcgcg caaggcgttg 360

gcggcgttgc cgcataagcc agtggacgcg gcgacgcggg aaccgatcga agatgaggcg 420

atgctgaagg atttcgcgca gtggcgcaag gaattggagc gtgagggatt ttttaagccc 480

tcgccggcgc acgtggcgta tcgattcgcc gagctcgcgg cgatgttcgc gctcggcacg 540

gcgttgatgc acgcgcgttg gcacgtcgct tccgtgatcg tgtactcgtg tttcttcggc 600

gcgcgatgcg gttgggtgca gcacgagggt gggcacaatt cgttgactgg aaacatttgg 660

tgggacaagc gaatccaagc cttcgccgcg gggttcggct tggcgtcgag tggcgacatg 720

tggaacaaca tgcacaacaa gcatcacgcg acgccccaaa aggtgcgaca cgatatggat 780

ctcgacacca ctcccacggt ggcgttcttc aactccgcgg ttgaagaaaa tcgcccgcgg 840

ggattcagta agttgtggtt gcgccttcaa gcgtggacct tcgtgccgct gacgtccggt 900

atggttttgt tcttctggat gttcgtcttg cacccgcgta acgcgctgcg acgcaaaagc 960

ttcgaagaag cggcttggat gttttccgcg cacgtcattc gcacggcggt tatcaaagcc 1020

gtcaccggct actcctggat cgcctcgtac ggcttgttcg cggcgacgat gtgggcgagc 1080

ggatgttact tgttcgcgca cttttccacg tctcacacgc acttggatgt cgtgccgagc 1140

gataaacacc tctcgtgggt gcgatacgcc gtcgatcaca cgatcgacat caatccgaac 1200

aacagcgtcg tcaactggtt gatgggctac ttgaactgcc aagtcatcca tcacctgttc 1260

ccggatatgc ctcagttccg ccaacccgaa gtctcccgcc gattcgtccc gtttgcgaag 1320

aagtggaact taaactacaa ggtcttgacg tattatgggg cctggaaggc gacgttcggc 1380

aacttgaacg acgtcgggaa gcactattac gtgcacggat ctcagcgcgt caaatcaaag 1440

tcggcgtga 1449

<210> 18
<211> 1449
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Ostreococcus lucimarinus 6-десатурази в рослинах
<400> 18

atgtgtgttg agactactga gggaacctct agaactatgg ctaacgagag gacctcttct 60

tcttcttcac tctctgaggg tggaactcct actgttactg tgggaatggg atctgaggat 120

gctggaaaga aaaccagaaa cgcttctgtt actgcttgga ccaaagagct tgagcctcac 180

gctatcgcta agaccttcga gagaagatac gttaccatcg agggtgttga gtacgatgtg 240

accgatttca aacaccctgg tggatctgtg atctactaca tgctctctaa cactggtgct 300

gatgctactg aggctttcaa agagttccac taccgttcta agaaggctag aaaggctctt 360

gctgctcttc ctcacaagcc tgttgatgct gctactagag agcctattga ggacgaggct 420

atgcttaagg atttcgctca gtggagaaaa gagttggaga gagagggatt cttcaagcct 480

tctcctgctc atgttgctta ccgtttcgct gaactcgctg ctatgttcgc tcttggaacc 540

gctcttatgc atgctagatg gcacgttgct agcgttatcg tgtactcctg tttcttcgga 600

gctagatgtg gatgggttca acatgagggt ggacacaact ctcttaccgg aaacatctgg 660

tgggataaga gaatccaagc tttcgctgct ggattcggac ttgcttcttc tggtgacatg 720

tggaacaaca tgcacaacaa gcaccatgct actcctcaga aagtgagaca cgatatggat 780

cttgatacca cccctaccgt tgctttcttc aactctgctg tggaggaaaa cagacctagg 840

ggattctcta agctttggct cagacttcaa gcttggacct tcgttcctgt tacctctgga 900

atggtgctct tcttctggat gttcgttctc catcctagaa acgctctccg tcgtaagtct 960

ttcgaagagg ctgcttggat gttctctgct cacgttatca gaaccgctgt tatcaaggct 1020

gttaccggat actcttggat cgctagctac ggacttttcg ctgctactat gtgggcttct 1080

ggatgctacc ttttcgctca cttctctact tctcacaccc acctcgatgt tgttccatct 1140

gataagcacc ttagctgggt taggtacgct gttgatcaca ccatcgacat caaccctaac 1200

aactctgttg tgaactggct atgggatac cttaactgcc aggttatcca ccatctcttc 1260

cctgatatgc ctcaattcag acagcctgag gtgtcaagaa gattcgtccc tttcgctaag 1320

aagtggaacc tcaactacaa ggtgctcact tactacggtg cttggaaggc tactttcgga 1380

aacctcaacg atgttggaaa gcactactac gttcacggat ctcagagagt gaagagcaag 1440

agcgcttga 1449

<210> 19
<211> 482
<212> Білок
<213> Ostreococcus lucimarinus
<400> 19

Met Cys Val Glu Thr Thr Glu Gly Thr Ser Arg Thr Met Ala Asn Glu
1 5 10 15

Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Glu Gly Gly Thr Pro Thr Val
20 25 30

Thr Val Gly Met Gly Ser Glu Asp Ala Gly Lys Lys Thr Arg Asn Ala
35 40 45

Ser Val Thr Ala Trp Thr Lys Glu Leu Glu Pro His Ala Ile Ala Lys
50 55 60

Thr Phe Glu Arg Arg Tyr Val Thr Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val
65 70 75 80

Thr Asp Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Tyr Tyr Met Leu Ser
85 90 95

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Tyr Arg
100 105 110

Ser Lys Lys Ala Arg Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro His Lys Pro Val
115 120 125

Asp Ala Ala Thr Arg Glu Pro Ile Glu Asp Glu Ala Met Leu Lys Asp
130 135 140

Phe Ala Gln Trp Arg Lys Glu Leu Glu Arg Glu Gly Phe Phe Lys Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Phe
165 170 175

Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met His Ala Arg Trp His Val Ala Ser Val
180 185 190

Ile Val Tyr Ser Cys Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His
195 200 205

Glu Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg
210 215 220

Ile Gln Ala Phe Ala Ala Gly Phe Gly Leu Ala Ser Ser Gly Asp Met
225 230 235 240

Trp Asn Asn Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg
245 250 255

```
His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Thr Val Ala Phe Phe Asn Ser
            260                 265                 270

Ala Val Glu Glu Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Lys Leu Trp Leu Arg
        275                 280                 285

Leu Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Met Val Leu Phe
    290                 295                 300

Phe Trp Met Phe Val Leu His Pro Arg Asn Ala Leu Arg Arg Lys Ser
305                 310                 315                 320

Phe Glu Glu Ala Ala Trp Met Phe Ser Ala His Val Ile Arg Thr Ala
                325                 330                 335

Val Ile Lys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Trp Ile Ala Ser Tyr Gly Leu
            340                 345                 350

Phe Ala Ala Thr Met Trp Ala Ser Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe
        355                 360                 365

Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
    370                 375                 380

Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp His Thr Ile Asp Ile Asn Pro Asn
385                 390                 395                 400

Asn Ser Val Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
                405                 410                 415

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
            420                 425                 430

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val
        435                 440                 445

Leu Thr Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Gly Asn Leu Asn Asp
    450                 455                 460
```

Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His Gly Ser Gln Arg Val Lys Ser Lys
465 470 475 480

Ser Ala

<210> 20
<211> 456
<212> Білок
<213> Ostreococcus lucimarinus
<400> 20

Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile
1 5 10 15

Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser
20 25 30

Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
35 40 45

Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His
50 55 60

Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp
65 70 75 80

Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg
85 90 95

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val
100 105 110

Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu
115 120 125

Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg
130 135 140

```
Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr
145                 150                 155                 160

Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly
                165                 170                 175

Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr
            180                 185                 190

Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe
        195                 200                 205

Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His
    210                 215                 220

His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr
225                 230                 235                 240

Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg
                245                 250                 255

Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro
            260                 265                 270

Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro
        275                 280                 285

Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu
    290                 295                 300

Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe
305                 310                 315                 320

Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser
                325                 330                 335

Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp
            340                 345                 350
```

Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp
355 360 365

His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met
370 375 380

Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro
385 390 395 400

Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys
405 410 415

Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys
420 425 430

Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His
435 440 445

Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala
450 455

<210> 21
<211> 894
<212> ДНК
<213> Pyramimonas cordata
<400> 21
atggagttcg ctcagcctct tgtggctatg gcacaggagc agtatgccgc aattgacgcg 60

gtggtagccc ctgcaatttt ctcagctacc gacagcatcg gttggggtct taagcccatt 120

agcagcgcga caaaggatct tcctctcgtt gagagtccga cgccgctcat actgagcctg 180

ttggcctatt ttgcgatcgt cggctctggg ctggtgtacc gcaaagtatt ccctcgcaca 240

gtaaaggggc aagacccctt cctgctgaag gcgctcatgc ttgcgcacaa cgtgttcctc 300

attggcctca gtctatacat gtgcttgaag cttgtctacg aggcttacgt caacaagtac 360

tccttctggg gaaacgccta caaccccgca cagaccgaga tggcgaaggt catctggatt 420

ttctacgtct ccaagatcta tgagttcatg gacacgttca tcatgctctt gaagggcaac 480

gtcaaccagg tctctttcct gcatgtgtac catcatggct ccatctctgg tatctggtgg 540

atgatcacct acgctgcccc tggcggtgac gcgtactttct cggcggcgct caactcgtgg 600

gtgcacgtgt gcatgtacac gtactacttc atggcggcgg tgctgcccaa ggacgagaag 660

accaagcgca agtacctctg gtggggccgc tacctgaccc agatgcagat gttccagttc 720

ttcatgaacc tgctccaggc ggtctacctc ctctactcct ctagccccta ccccaagttc 780

atcgcccagc tgctggtggt gtacatggtc acgctgctga tgctcttcgg caacttctac 840

tacatgaagc accacgcgag caagaagcag aagctggcca gcaagaagca gtag 894

<210> 22
<211> 870
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pyramimonas cordata б елонгази в рослинах (вкорочена на 3' кінці і кодуюча функціональну елонгазу) (версія 1)
<400> 22

atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgctgc tatcgatgct 60

gttgttgctc ctgctatctt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc 120

tcttctgcta ctaaggactt gcctcttgtt gagtctccta cacctctcat cctttctttg 180

cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctcgtttaca gaaaggtttt ccctagaacc 240

gtgaagggac aagatccatt ccttttgaag gctcttatgc ttgctcacaa cgtgttcctt 300

atcggacttt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggcttacgt taacaagtac 360

tctttctggg gaaacgctta caaccctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc 420

ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaaat 480

gttaaccagg ttagcttcct tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctggtgg 540

atgattactt acgctgctcc tggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg 600

gttcacgtgt gtatgtacac ctactatttt atggctgccg tgcttcctaa ggacgagaaa 660

actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aaatgcagat gttccagttc 720

ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctt ctctactctt catctcctta ccctaagttt 780

atcgctcagc tcctcgtggt gtacatggtt actcttctca tgcttttcgg aaacttctac 840

tacatgaagc accacgctag caagtgatga 870

<210> 23
<211> 870
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>

<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pyramimonas cordata 6 елонгази в рослинах (вкорочена на 3' кінці і кодуюча функціональну елонгазу) (версія 2)

<400> 23

atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgctgc tatcgatgct 60

gttgttgctc ctgctatctt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc 120

tctttctgcta ctaaggactt gcctcttgtt gagtctccta cacctctcat cctttctttg 180

cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctcgtttaca gaaaggtttt ccctagaacc 240

gtgaagggac aagatccatt ccttttgaag gctcttatgc ttgctcacaa cgtgttcctt 300

atcggacttt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggcttacgt taacaagtac 360

tctttctggg gaaacgctta caaccctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc 420

ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaaat 480

gttaaccagg ttagcttcct tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctggtgg 540

atgattactt acgctgctcc tggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg 600

gttcacgtgt gtatgtacac ctactatttt atggctgccg tgcttcctaa ggacgagaaa 660

actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aaatgcagat gttccagttc 720

ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctt ctctactctt catctcctta ccctaagttt 780

atcgctcagc tcctcgtggt gtacatggtt actcttctca tgcttttcgg aaacttctac 840

tacatgaagc accacgctag caagtgatga 870

<210> 24

<211> 870

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pyramimonas cordata 6 елонгази в рослинах (вкорочена на 3' кінці і кодуюча функціональну елонгазу) (версія 3)

<400> 24

atggaatttg ctcaacctct cgttgctatg gctcaagagc agtacgctgc tatcgatgct 60

gttgttgctc ctgctatctt ctctgctacc gactctattg gatggggact caagcctatc 120

tctttctgcta ctaaggatct ccctctcgtt gaatctccta cccctcttat cctttctctc 180

ctcgcttact tcgctatcgt tggttctgga ctcgtttacc gtaaagtgtt ccctagaacc 240

gttaagggac aggatccttt ccttctcaag gctcttatgc tcgctcacaa cgttttcctt 300

atcggactca gcctttacat gtgcctcaag ctcgtttacg aggcttacgt gaacaagtac 360

tccttctggg gaaacgctta caaccctgct caaaccgaga tggctaaggt gatctggatc 420

ttctacgtgt ccaagatcta cgagttcatg gacaccttca tcatgcttct caagggaaac 480

gttaaccagg tttccttcct ccatgtttac caccacggat ctatctctgg aatctggtgg 540

atgatcactt atgctgctcc aggtggagat gcttacttct ctgctgctct caactcttgg 600

gttcatgtgt gcatgtacac ctactacttc atggctgctg ttcttcctaa ggacgaaaag 660

accaagagaa agtacctttg gtggggaaga taccttaccc agatgcaaat gttccagttc 720

ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctc ctctactctt cttctcctta ccctaagttc 780

attgctcaac tcctcgttgt ttacatggtt accctcctca tgcttttcgg aaacttctac 840

tacatgaagc accacgcttc taagtgataa 870

<210> 25
<211> 297
<212> Білок
<213> Pyramimonas cordata
<400> 25

Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
1 5 10 15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
20 25 30

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

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
50 55 60

Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
85 90 95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
100 105 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
115 120 125

```
Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
    130                 135                 140

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145                 150                 155                 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
                165                 170                 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
            180                 185                 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
        195                 200                 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
    210                 215                 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225                 230                 235                 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
                245                 250                 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
            260                 265                 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
        275                 280                 285

Lys Gln Lys Leu Ala Ser Lys Lys Gln
    290                 295
```

<210> 26
<211> 288
<212> Білок
<213> Pyramimonas cordata
<400> 26

```
Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
1               5                  10                  15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
            20                  25                  30

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

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
    50                  55                  60

Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65                  70                  75                  80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
                85                  90                  95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
            100                 105                 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
        115                 120                 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
    130                 135                 140

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145                 150                 155                 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
                165                 170                 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
            180                 185                 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
        195                 200                 205
```

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
210 215 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225 230 235 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
245 250 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
260 265 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
275 280 285

<210> 27
<211> 1278
<212> ДНК
<213> Pavlova salina
<400> 27

atgccgccgc gcgatagcta ctcgtacgcc gccccgccgt cggcccagct gcacgaggtc 60

gataccccgc aggagcatga taagaaggag ctcgtcatcg gtgaccgcgc gtacgacgtg 120

accaactttg tgaagcgcca cccgggtggc aagatcatcg ataccaggt tggcacagat 180

gcgacggacg cgtacaagca gttccatgtg cggtctgcca aggcggacaa gatgctcaag 240

tcgctgcctt cgcgcccggt gcacaagggc tactcgcccc gccgcgctga cctcattgcc 300

gacttccagg agttcaccaa gcagctggag gcggagggca tgtttgagcc gtcgctgccg 360

cacgtggcat accgcctggc ggaggtgatc gcgatgcacg tggccggcgc cgcgctcatc 420

tggcacgggt acaccttcgc gggcattgcc atgctcggcg ttgtgcaggg ccgctgcggc 480

tggctcatgc acgagggcgg ccactactcg ctcacgggca acattgcttt tgaccgtgcc 540

atccaagtcg cgtgctacgg ccttggctgc ggcatgtcgg gcgcgtggtg gcgcaaccag 600

cacaacaagc accacgcgac gccgcagaag ttgcagcacg acgtcgacct cgacaccctc 660

ccgctcgtcg ccttccacga gcggatagcc gccaaggtga agagccccgc gatgaaggcg 720

tggcttagta tgcaggcgaa gctcttcgcg ccagtgacca cgctgctggt cgcgctgggc 780

tggcagctgt acctgcaccc gcgccatatg ctgcgcacca agcactacga cgagctcgcg 840

atgctcggca ttcgctacgg ccttgtcggc tacctcgcgg cgaactacgg cgcggggtac 900

gtgctcgcgt gctacctgct gtacgtgcag ctcggcgcca tgtacatctt ctgcaacttt 960

gccgtgtcgc acacacacct gccggttgtc gagcctaacg agcacgcaac gtgggtggag 1020

tacgccgcga accacacgac caactgctcg ccctcgtggt ggtgcgactg gtggatgtcg 1080

tacctcaact accagatcga gcaccacctc tacccgtcca tgccgcagtt ccgccacccg 1140

aagattgcgc cgcgggtgaa gcagctcttc gagaagcacg gcctgcacta cgacgtgcgt 1200

ggctacttcg aggccatggc ggacacgttt gccaaccttg acaacgtcgc gcacgcgccg 1260

gagaagaaga tgcagtga 1278

<210> 28
<211> 1281
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pavlova salina 5 десатурази в рослинах (версія 1)
<400> 28

atgcctccaa gggactctta ctcttatgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaagtt 60

gatactcctc aagagcacga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtt 120

accaacttcg ttaagagaca ccctggtgga aagatcattg cttaccaagt tggaactgat 180

gctaccgatg cttacaagca gttccatgtt agatctgcta aggctgacaa gatgcttaag 240

tctcttcctt ctcgtcctgt tcacaaggga tactctccaa gaagggctga tcttatcgct 300

gatttccaag agttcaccaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgagcc ttctcttcct 360

catgttgctt acagacttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctggtgc tgctcttatc 420

tggcatggat acactttcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgtgga 480

tggcttatgc atgagggtgg acattactct ctcactggaa acattgcttt cgacagagct 540

atccaagttg cttgttacgg acttggatgt ggaatgtctg gtgcttggtg gcgtaaccag 600

cataacaagc accatgctac tcctcaaaag cttcagcacg atgttgatct tgataccctt 660

cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaaggtta agtctcctgc tatgaaggct 720

tggctttcta tgcaagctaa gcttttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttgga 780

tggcagcttt accttcatcc tagacacatg ctcaggacta agcactacga tgagcttgct 840

atgctcggaa tcagatacgg acttgttgga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac 900

gttctcgctt gttaccttct ttacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc 960

gctgtttctc atactcacct ccctgttgtt gagcctaacg agcatgctac ttgggttgag 1020

tacgctgcta accacactac taactgttct ccatcttggt ggtgtgattg gtggatgtct 1080

taccttaact accagatcga gcaccacctt tacccttcta tgcctcaatt cagacaccct 1140

aagatcgctc ctagagttaa gcagcttttc gagaagcacg gacttcacta cgatgttaga 1200

ggatacttcg aggctatggc tgatactttc gctaaccttg ataacgttgc ccatgctcct 1260

gagaagaaaa tgcagtaatg a 1281

<21Э> 29
<211> 1281
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pavlova salina 5 десатурази в рослинах (версія 2)

<400> 29
atgcctccta gggactctta ctcttacgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaggtt 60

gacactcctc aagagcacga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtg 120

accaacttcg ttaagagaca ccctggtgga aagatcattg cttaccaagt gggaactgat 180

gctaccgatg cttacaagca gttccatgtg agatctgcta aggctgacaa gatgctcaag 240

tctctccctt ctagacctgt tcacaaggga tactctccta gaagagctga tcttatcgct 300

gacttccaag agttcactaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgaacc ttctctccct 360

catgttgctt accgtcttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctggtgc tgctcttatc 420

tggcacggat acactttcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgcgga 480

tggcttatgc atgagggtgg acactactct cttaccggaa acattgcttt cgatagggct 540

atccaagttg cttgttacgg acttggatgc ggaatgtctg gtgcttggtg gagaaaccag 600

cataacaagc accatgctac tcctcaaaag ctccagcacg atgttgatct tgataccctc 660

cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaaggtta agtctcctgc tatgaaggct 720

tggctctcca tgcaagctaa actcttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttgga 780

tggcagcttt accttcaccc tagacacatg ctcagaacta agcactacga cgagcttgct 840

atgcttggta tcagatacgg acttgtggga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac 900

gttcttgctt gctaccttct ctacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc 960

gctgtttctc acactcatct ccctgttgtt gagcctaacg agcatgctac ttgggttgag 1020

tacgctgcta accacactac taactgctct ccatcttggt ggtgtgattg gtggatgagc 1080

tacctcaact accagatcga gcatcacctt tacccttcta tgcctcagtt caggcatcct 1140

aagatcgctc ctagagtgaa gcaactcttc gagaagcacg gacttcacta cgatgtgcgt 1200

ggatacttcg aggctatggc tgatactttc gctaacctcg ataacgttgc tcatgctcct 1260

gagaagaaaa tgcaatgatg a 1281

<210> 30
<211> 425
<212> Білок
<213> Pavlova salina
<400> 30

Met Pro Pro Arg Asp Ser Tyr Ser Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gln
1 5 10 15

Leu His Glu Val Asp Thr Pro Gln Glu His Asp Lys Lys Glu Leu Val
20 25 30

Ile Gly Asp Arg Ala Tyr Asp Val Thr Asn Phe Val Lys Arg His Pro
35 40 45

Gly Gly Lys Ile Ile Ala Tyr Gln Val Gly Thr Asp Ala Thr Asp Ala
50 55 60

Tyr Lys Gln Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Met Leu Lys
65 70 75 80

```
Ser Leu Pro Ser Arg Pro Val His Lys Gly Tyr Ser Pro Arg Arg Ala
                85                  90                  95

Asp Leu Ile Ala Asp Phe Gln Glu Phe Thr Lys Gln Leu Glu Ala Glu
            100                 105                 110

Gly Met Phe Glu Pro Ser Leu Pro His Val Ala Tyr Arg Leu Ala Glu
        115                 120                 125

Val Ile Ala Met His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Trp His Gly Tyr
    130                 135                 140

Thr Phe Ala Gly Ile Ala Met Leu Gly Val Val Gln Gly Arg Cys Gly
145                 150                 155                 160

Trp Leu Met His Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Asn Ile Ala
                165                 170                 175

Phe Asp Arg Ala Ile Gln Val Ala Cys Tyr Gly Leu Gly Cys Gly Met
            180                 185                 190

Ser Gly Ala Trp Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro
        195                 200                 205

Gln Lys Leu Gln His Asp Val Asp Leu Asp Thr Leu Pro Leu Val Ala
    210                 215                 220

Phe His Glu Arg Ile Ala Ala Lys Val Lys Ser Pro Ala Met Lys Ala
225                 230                 235                 240

Trp Leu Ser Met Gln Ala Lys Leu Phe Ala Pro Val Thr Thr Leu Leu
                245                 250                 255

Val Ala Leu Gly Trp Gln Leu Tyr Leu His Pro Arg His Met Leu Arg
            260                 265                 270

Thr Lys His Tyr Asp Glu Leu Ala Met Leu Gly Ile Arg Tyr Gly Leu
        275                 280                 285
```

Val Gly Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Val Leu Ala Cys
290 295 300

Tyr Leu Leu Tyr Val Gln Leu Gly Ala Met Tyr Ile Phe Cys Asn Phe
305 310 315 320

Ala Val Ser His Thr His Leu Pro Val Val Glu Pro Asn Glu His Ala
325 330 335

Thr Trp Val Glu Tyr Ala Ala Asn His Thr Thr Asn Cys Ser Pro Ser
340 345 350

Trp Trp Cys Asp Trp Trp Met Ser Tyr Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His
355 360 365

His Leu Tyr Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Pro Lys Ile Ala Pro
370 375 380

Arg Val Lys Gln Leu Phe Glu Lys His Gly Leu His Tyr Asp Val Arg
385 390 395 400

Gly Tyr Phe Glu Ala Met Ala Asp Thr Phe Ala Asn Leu Asp Asn Val
405 410 415

Ala His Ala Pro Glu Lys Lys Met Gln
420 425

<210> 31
<211> 1329
<212> ДНК
<213> Pyramimonas cordata
<400> 31

atgggaaagg gaggcaatgc tagcgctcct actgcgaaga aggaggtgtt gatcgagggg 60

aagttttacg atgtcaccga cttcaggcac cccggtggtt cgatcatcaa gtttctctcg 120

ggttctggtg ctgacgccac cgcttcctac cgcgagttcc acgttaggtc agcgaaggca 180

gacaagttct tgaagacgct gccctcccgc gaagccactc cccaggagct gaagcaggcg 240

gttgagtttt ccaagctcaa cccgccctcc gcggagagtg cctctgctcc cctgaccgac 300

cttgccaagg tggaagcgct gaacaaggac ttcgaggctt tccgtgagca gctcattcag 360

gagggcttct ttaagcccaa tatcccgcat gtggtcaagc gcatcacgga agtcgtggcg 420

atgatggccg tagcctcctg gatgatggtg cagaccaacg ctcttgttgt gaccctcgga 480

gttctgatcc gcggcattgc acagggccgg tgcggttggc ttatgcacga gggcggccac 540

tatagtctta ctgggaagat ctccattgat aggcgtctgc aggagtcaat ttacggattc 600

ggctgtggaa tgtccggcgc ctggtggcgc aaccagcaca acaagcacca cgcaacccca 660

cagaagctgc agcatgacgt cgacctggag acccttcctc tgatggcttt caacaacgct 720

gttaccgata gacgcaaggt gaagcctggt agtctccagg ctctgtggct caagtaccag 780

gccttcctct tctttccccgt gacctccctt ctggtcggcc tcggttggac caccgtcctc 840

caccccaggc acagcttgcg caccaagcac tatttcgagc tgctctgcat ggctgctcgt 900

tacgcgagtt tcgctgctct tttcgctccc aagtacggac ttgcaggagc tgccgggctc 960

tacctcgcca ccttcgctgt cgggtgcaac tatattttca tcaacttctc ggtctctcac 1020

actcacctgc ccgtgagcgg tgcgagcgag tacctgcatt gggtcgtgta ttcggccatc 1080

cacaccacta acatcaaatc cagcatgctg tgcgattggt ggatgtcatt cctcaacttc 1140

cagatcgagc atcacctgtt cccttcaatg ccccagttcc gccacaagat tatctccccg 1200

cgtgtaaagg ccttgtttga gaagcacggt cttgtgtatg atgtgcgccc ctattggggg 1260

gccatggctg acaccttcaa gaacttgaat gacgttggca ctcacgcatc tcactccaag 1320

gcgcactag 1329

<210> 32
<211> 442
<212> Білок
<213> Pyramimonas cordata
<400> 32

```
Met Gly Lys Gly Gly Asn Ala Ser Ala Pro Thr Ala Lys Lys Glu Val
1               5                  10                  15

Leu Ile Glu Gly Lys Phe Tyr Asp Val Thr Asp Phe Arg His Pro Gly
            20                  25                  30

Gly Ser Ile Ile Lys Phe Leu Ser Gly Ser Gly Ala Asp Ala Thr Ala
        35                  40                  45

Ser Tyr Arg Glu Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Phe Leu
    50                  55                  60

Lys Thr Leu Pro Ser Arg Glu Ala Thr Pro Gln Glu Leu Lys Gln Ala
65                  70                  75                  80

Val Glu Phe Ser Lys Leu Asn Pro Pro Ser Ala Glu Ser Ala Ser Ala
                85                  90                  95

Pro Leu Thr Asp Leu Ala Lys Val Glu Ala Leu Asn Lys Asp Phe Glu
            100                 105                 110

Ala Phe Arg Glu Gln Leu Ile Gln Glu Gly Phe Phe Lys Pro Asn Ile
        115                 120                 125

Pro His Val Val Lys Arg Ile Thr Glu Val Val Ala Met Met Ala Val
    130                 135                 140

Ala Ser Trp Met Met Val Gln Thr Asn Ala Leu Val Val Thr Leu Gly
145                 150                 155                 160
```

Val Leu Ile Arg Gly Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Leu Met His
165 170 175

Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Lys Ile Ser Ile Asp Arg Arg
180 185 190

Leu Gln Glu Ser Ile Tyr Gly Phe Gly Cys Gly Met Ser Gly Ala Trp
195 200 205

Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Leu Gln
210 215 220

His Asp Val Asp Leu Glu Thr Leu Pro Leu Met Ala Phe Asn Asn Ala
225 230 235 240

Val Thr Asp Arg Arg Lys Val Lys Pro Gly Ser Leu Gln Ala Leu Trp
245 250 255

Leu Lys Tyr Gln Ala Phe Leu Phe Phe Pro Val Thr Ser Leu Leu Val
260 265 270

Gly Leu Gly Trp Thr Thr Val Leu His Pro Arg His Ser Leu Arg Thr
275 280 285

Lys His Tyr Phe Glu Leu Leu Cys Met Ala Ala Arg Tyr Ala Ser Phe
290 295 300

Ala Ala Leu Phe Ala Pro Lys Tyr Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu
305 310 315 320

Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Val Gly Cys Asn Tyr Ile Phe Ile Asn Phe
325 330 335

Ser Val Ser His Thr His Leu Pro Val Ser Gly Ala Ser Glu Tyr Leu
340 345 350

His Trp Val Val Tyr Ser Ala Ile His Thr Thr Asn Ile Lys Ser Ser
355 360 365

Met Leu Cys Asp Trp Trp Met Ser Phe Leu Asn Phe Gln Ile Glu His
370 375 380

His Leu Phe Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Lys Ile Ile Ser Pro
385 390 395 400

Arg Val Lys Ala Leu Phe Glu Lys His Gly Leu Val Tyr Asp Val Arg
405 410 415

Pro Tyr Trp Gly Ala Met Ala Asp Thr Phe Lys Asn Leu Asn Asp Val
420 425 430

Gly Thr His Ala Ser His Ser Lys Ala His
435 440

<210> 33
<211> 804
<212> ДНК
<213> Pyramimonas cordata
<400> 33
atggcgtcta ttgcgattcc ggctgcgctg gcagggactc ttggttatgt gacgtacaat 60

gtcgcaaacc cagatattcc tgcatccgag aaggtgcctg cttactttat gcaggtcgag 120

tattgggggc caacgattgg gaccatcggt tatcttctgt tcatctactt tggtaaacgg 180

attatgcaaa acaggagcca gccgtttggc ctgaagaacg ctatgctggt gtacaacttc 240

tatcagactt tcttcaactc gtactgcata tacctttttg tcacgtcgca ccgcgctcag 300

gggctgaaag tttggggaaa catccccgat atgactgcca acagctgggg gatctcacag 360

gtgatctggc tgcactacaa caacaagtac gttgagctgc tggacacgtt cttcatggtc 420

atgcgcaaga agtttgacca gctttcgttc ctgcacattt accatcatac cctgttgatc 480

tggtcttggt tcgtggtgat gaaattggag cccgttgggg actgctactt tggctctagc 540

gtcaacacgt ttgtgcacgt cattatgtac tcgtactatg gccttgccgc gctcggggtg 600

aattgcttct ggaagaagta cattacgcag attcagatgc tgcagttctg tatctgcgct 660

tcgcactcga tttataccgc ctatgtgcag aacaccgcgt tctggttgcc ttacttgcag 720

ctgtgggtga tggtgaacat gttcgtgttg ttcgccaact tctatcgcaa gcgctacaag 780

agcaagggtg ccaagaagca gtaa 804

<210> 34
<211> 807
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pyramimonas cordata 5 елонгази в рослинах (версія 1)
<400> 34

atggcctcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat 60

gtggctaacc ctgatatccc agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcaggttgag 120

tactggggac ctactatcgg aactattgga tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt 180

atcatgcaga acagatctca acctttcgga cttaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc 240

taccagacct tcttcaacag ctactgcatc taccttttcg ttacttctca tagggctcag 300

ggacttaagg tttggggaaa catcgctgat atgactgcta actcttgggg aatctctcag 360

gttatctggc ttcactacaa caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatggtg 420

atgaggaaga agttcgacca gctttctttc cttcacatct accaccacac tcttctcatc 480

tggtcatggt tcgttgttat gaagcttgag cctgttggag attgctactt cggatcttct 540

gttaacacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt 600

aactgtttct ggaagaagta catcacccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct 660

tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aataccgctt tctggcttcc ttaccttcaa 720

ctctgggtta tggtgaacat gttcgttctc ttcgccaact tctaccgtaa gaggtacaag 780

tctaagggtg ctaagaagca gtgataa 807

<210> 35
<211> 867
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pyramimonas cordata 5 елонгази в рослинах (версія 2)

<400> 35

atggaatttg ctcaacctct cgttgctatg gctcaagagc agtacgctgc tatcgatgct 60

gttgttgctc ctgctatctt ctctgctacc gactctattg gatggggact caagcctatc 120

tcttctgcta ctaaggatct ccctctcgtt gaatctccta cccctcttat cctttctctc 180

ctcgcttact tcgctatcgt tggttctgga ctcgtttacc gtaaagtgtt ccctagaacc 240

gttaagggac aggatccttt ccttctcaag gctcttatgc tcgctcacaa cgttttcctt 300

atcggactca gcctttacat gtgcctcaag ctcgtttacg aggcttacgt gaacaagtac 360

tccttctggg gaaacgctta caaccctgct caaaccgaga tggctaaggt gatctggatc 420

ttctacgtgt ccaagatcta cgagttcatg gacaccttca tcatgcttct caagggaaac 480

gttaaccagg tttccttcct ccatgtttac caccacggat ctatctctgg aatctggtgg 540

atgatcactt atgctgctcc aggtggagat gcttacttct ctgctgctct caactcttgg 600

gttcatgtgt gcatgtacac ctactacttc atggctgctg ttcttcctaa ggacgaaaag 660

accaagagaa agtacctttg gtggggaaga taccttaccc agatgcaaat gttccagttc 720

ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctc ctctactctt cttctcctta ccctaagttc 780

attgctcaac tcctcgttgt ttacatggtt accctcctca tgcttttcgg aaacttctac 840

tacatgaagc accacgcttc taagtga 867

<210> 36
<211> 807
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pyramimonas cordata 5 елонгази в рослинах (версія 3)
<400> 36

atggcttcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt gacctacaac 60

gtggctaacc ctgatattcc tgcttctgag aaggttccag cttacttcat gcaagtggag 120

tactggggac ctactatcgg aactatcggt tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt 180

atcatgcaaa acagaagcca gcctttcgga cttaagaacg ctatgctcgt gtacaacttc 240

taccagacct tcttcaacag ctactgcatc tacctcttcg ttacctctca tagggctcag 300

ggacttaaag tttggggaaa catccctgat atgaccgcta actcttgggg aatctctcag 360

gttatctggc tccactacaa caacaagtac gtggagcttc tcgatacctt cttcatggtg 420

atgaggaaga agttcgacca gctttctttc cttcacatct accaccacac tcttctcatc 480

tggtcatggt tcgtggttat gaagctcgag cctgttggag attgctactt cggatctagc 540

gttaacacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt 600

aactgcttct ggaagaagta catcacccag atccagatgc ttcagttctg tatctgcgct 660

tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aacactgctt tctggcttcc ttaccttcag 720

ctctgggtga tggttaacat gttcgtgctc ttcgctaact tctaccgtaa aaggtacaag 780

agcaagggtg ctaagaagca gtgataa 807

<210> 37
<211> 267
<212> Білок
<213> Pyramimonas cordata
<400> 37

```
Met Ala Ser Ile Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu Gly Tyr
1               5                  10                  15

Val Thr Tyr Asn Val Ala Asn Pro Asp Ile Pro Ala Ser Glu Lys Val
            20                  25                  30

Pro Ala Tyr Phe Met Gln Val Glu Tyr Trp Gly Pro Thr Ile Gly Thr
        35                  40                  45

Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Ile Tyr Phe Gly Lys Arg Ile Met Gln Asn
    50                  55                  60

Arg Ser Gln Pro Phe Gly Leu Lys Asn Ala Met Leu Val Tyr Asn Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Ser Tyr Cys Ile Tyr Leu Phe Val Thr Ser
                85                  90                  95

His Arg Ala Gln Gly Leu Lys Val Trp Gly Asn Ile Pro Asp Met Thr
            100                 105                 110

Ala Asn Ser Trp Gly Ile Ser Gln Val Ile Trp Leu His Tyr Asn Asn
        115                 120                 125

Lys Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Phe Phe Met Val Met Arg Lys Lys
    130                 135                 140

Phe Asp Gln Leu Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Leu Leu Ile
145                 150                 155                 160

Trp Ser Trp Phe Val Val Met Lys Leu Glu Pro Val Gly Asp Cys Tyr
                165                 170                 175
```

Phe Gly Ser Ser Val Asn Thr Phe Val His Val Ile Met Tyr Ser Tyr
180 185 190

Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val Asn Cys Phe Trp Lys Lys Tyr Ile
195 200 205

Thr Gln Ile Gln Met Leu Gln Phe Cys Ile Cys Ala Ser His Ser Ile
210 215 220

Tyr Thr Ala Tyr Val Gln Asn Thr Ala Phe Trp Leu Pro Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Leu Trp Val Met Val Asn Met Phe Val Leu Phe Ala Asn Phe Tyr Arg
245 250 255

Lys Arg Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Lys Lys Gln
260 265

<210> 38
<211> 1344
<212> ДНК
<213> Pavlova salina
<400> 38
atgcctccga gcgcggcgaa gcagatgggc gcgagcacgg gcgtgcatgc gggcgtcaca 60

gattcgtcgg ccttcacgcg caaggatgtc gccgacaggc cggacctcac gatcgtgggt 120

gacagcgtgt acgatgcgaa ggcgttccgc tccgagcatc cgggtggcgc gcactttgtg 180

tcgctgttcg gcgggcgcga tgccacggag gcgttcatgg agtaccaccg gcgcgcctgg 240

cccaagtcgc gcatgtcgcg cttccacgtc ggctctctgg catcgaccga ggagcccgtc 300

gccgccgatg agggctacct ccagctgtgc gctcgcatcg ccaagatggt gccgtcggtc 360

agcagcgggt tcgcgccggc gtcgtactgg gtgaaggccg ggctgatcct cggctccgcg 420

atcgcgctcg aggcgtacat gctgtacgcg ggcaagcgcc tgctcccgtc gatcgtgctc 480

gggtggctgt ttgcgctgat tggcctgaac atccagcacg atgccaacca cggcgcgctc 540

tccaagtcgg cctcggtcaa cctggcgctc gggttgtgcc aggactggat cggcgggagc 600

atgatcctct ggctgcagga gcacgttgtc atgcaccact tgcacaccaa cgacgttgac 660

aaggaccccgg accagaaggc gcacggcgcc ctgcggctca agccgaccga cgcgtggagc 720

ccgatgcact ggctgcagca cctctacctg ctgcctgggg agacgatgta cgccttcaag 780

ctgctgtttc tcgacatcag cgagctggtg atgtggcggt gggagggcga gcccatcagc 840

aagctggccg ggtacctctt catgccctcg ctgctcctca agctcacctt ctgggcgcgc 900

tttgtcgcgc tgccgctgta cctcgcgccc agcgtgcaca cggcggtgtg catcgcggcg 960

acggtaatga cggggagctt ctacctcgcc ttcttcttct tcatctcgca caacttcgag 1020

ggcgtggcga gcgtcggacc ggacggcagc atcaccagca tgacgcgcgg cgcatccttc 1080

ctcaagcggc aggccgagac ctcgtccaac gtgggcggcc cgctgctcgc cacgctcaac 1140

ggcggcctca actaccaaat cgagcaccac ctcttcccca gggtgcacca cggcttctac 1200

cctcgcctcg cgccgttggt caaggcggag ctcgaggcgc gcggcattga gtacaagcac 1260

taccccacca tatggagcaa cctggcatcc acgctgaggc acatgtacgc gctcggccgc 1320

aggccgcgca gcaaggcgga gtga 1344

<210> 39
<211> 1347
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pavlova salina 4 десатурази в рослинах (версія 1)

<400> 39
atgccaccta gcgctgctaa gcaaatggga gcttctactg gtgttcatgc tggtgttact 60

gactcttctg ctttcaccag aaaggatgtt gctgatagac ctgatctcac catcgttgga 120

gattctgttt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctggtggtgc tcatttcgtt 180

tctttgttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccatag aagggcttgg 240

cctaagtcta gaatgtctag attccacgtt ggatctcttg cttctactga ggaacctgtt 300

gctgctgatg agggatacct tcaactttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtt 360

tcttctggat tcgctcctgc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct tggatctgct 420

atcgctcttg aggcttacat gctttacgct ggaaagagac ttctcccttc tatcgttctt 480

ggatggcttt tcgctcttat cggtcttaac atccagcatg atgctaacca tggtgctttg 540

tctaagtctg cttctgttaa ccttgctctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct 600

atgatccttt ggcttcaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacactaa cgatgttgat 660

aaggatcctg atcaaaaggc tcacggtgct cttagactca agcctactga tgcttggtca 720

cctatgcatt ggcttcagca tctttacctt ttgcctggtg agactatgta cgctttcaag 780

cttttgttcc tcgacatctc tgagcttgtt atgtggcgtt gggaggggtga gcctatctct 840

aagcttgctg gatacctctt tatgccttct ttgcttctca agcttacctt ctgggctaga 900

ttcgttgctt tgcctctttа ccttgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgctgct 960

actgttatga ctggatcttt ctacctcgct ttcttcttct tcatctccca caacttcgag 1020

ggtgttgctt ctgttggacc tgatggatct atcacttcta tgactagagg tgctagcttc 1080

cttaagagac aagctgagac ttcttctaac gttggaggac ctcttcttgc tactcttaac 1140

ggtggactca actaccaaat tgagcatcac ttgttcccta gagttcacca tggattctac 1200

cctagacttg ctcctcttgt taaggctgag cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac 1260

taccctacta tctggtctaa ccttgcttct acccтcagac atatgtacgc tcttggaaga 1320

aggcctagat ctaaggctga gtaatga 1347

<210> 40
<211> 1347
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pavlova salina 4 десатурази в рослинах (версія 2)
<400> 40

atgcctccat ctgctgctaa acagatggga gcttctactg gtgttcacgc tggtgttacc 60

gattcttctg ctttcaccag aaaggatgtg gctgatagac ctgatcttac catcgttggt 120

gactctgtgt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctggtggtgc tcatttcgtt 180

tcactcttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccacag aagagcttgg 240

cctaagtcta ggatgtctag gttccatgtt ggatctcttg cttctaccga ggaacctgtt 300

gctgctgatg agggatacgt tcagctttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtg 360

tcatctggat tcgctccagc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct cggatctgct 420

atcgctcttg aggcttacat gctctacgct ggaaagagac ttctcccttc tatcgttctt 480

ggatggctct tcgctcttat cggacttaac atccagcatg acgctaacca tggtgctttg 540

tctaagtctg ctagcgttaa ccttgctctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct 600

atgatcctt ggctccaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacaccaa cgatgttgat 660

aaggaccctg atcaaaaggc tcatggtgct cttagactca agcctaccga tgcttggtca 720

cctatgcatt ggcttcagca cctttacctt ctccctggtg aaactatgta cgctttcaag 780

ctcctcttcc tcgatatctc tgagcttgtg atgtggagat gggagggtga acctatctct 840

aagctcgctg gatacctctt catgccttct cttctcctca agcttacctt ctgggctaga 900

ttcgttgctc ttcctctta cctcgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgctgct 960

actgttatga ccggaagctt ctaccttgct ttcttcttct tcatcagcca caacttcgag 1020

ggtgttgctt ctgttggacc tgatggatct atcacctcta tgaccagggg agcttctttc 1080

cttaagaggc aggctgagac ttcttctaat gtgggaggac ctcttcttgc tactcttaac 1140

ggtggactca actaccaaat cgagcaccac cttttccctа gagttcacca cggattctac 1200

cctagacttg ctcctcttgt gaaggctgaa cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac 1260

taccctacca tctggtctaa cctcgcttct accctcagac atatgtacgc tcttggaaga 1320

aggcctagat ctaaggctga gtgatga 1347

<210> 41
<211> 447
<212> БІЛОК
<213> Pavlova salina

<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pavlova salina 4 десатурази в рослинах (версія 2)
<400> 40

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

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

Arg Pro Asp Leu Thr Ile Val Gly Asp Ser Val Tyr Asp Ala Lys Ala
35 40 45

Phe Arg Ser Glu His Pro Gly Gly Ala His Phe Val Ser Leu Phe Gly
50 55 60

Gly Arg Asp Ala Thr Glu Ala Phe Met Glu Tyr His Arg Arg Ala Trp
65 70 75 80

Pro Lys Ser Arg Met Ser Arg Phe His Val Gly Ser Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Glu Glu Pro Val Ala Ala Asp Glu Gly Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Arg
100 105 110

Ile Ala Lys Met Val Pro Ser Val Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala Ser
115 120 125

Tyr Trp Val Lys Ala Gly Leu Ile Leu Gly Ser Ala Ile Ala Leu Glu
130 135 140

Ala Tyr Met Leu Tyr Ala Gly Lys Arg Leu Leu Pro Ser Ile Val Leu
145 150 155 160

Gly Trp Leu Phe Ala Leu Ile Gly Leu Asn Ile Gln His Asp Ala Asn
165 170 175

His Gly Ala Leu Ser Lys Ser Ala Ser Val Asn Leu Ala Leu Gly Leu
180 185 190

Cys Gln Asp Trp Ile Gly Gly Ser Met Ile Leu Trp Leu Gln Glu His
195 200 205

Val Val Met His His Leu His Thr Asn Asp Val Asp Lys Asp Pro Asp
210 215 220

Gln Lys Ala His Gly Ala Leu Arg Leu Lys Pro Thr Asp Ala Trp Ser
225 230 235 240

Pro Met His Trp Leu Gln His Leu Tyr Leu Leu Pro Gly Glu Thr Met
245 250 255

Tyr Ala Phe Lys Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ser Glu Leu Val Met Trp
260 265 270

Arg Trp Glu Gly Glu Pro Ile Ser Lys Leu Ala Gly Tyr Leu Phe Met
275 280 285

Pro Ser Leu Leu Leu Lys Leu Thr Phe Trp Ala Arg Phe Val Ala Leu
290 295 300

Pro Leu Tyr Leu Ala Pro Ser Val His Thr Ala Val Cys Ile Ala Ala
305 310 315 320

Thr Val Met Thr Gly Ser Phe Tyr Leu Ala Phe Phe Phe Phe Ile Ser
325 330 335

His Asn Phe Glu Gly Val Ala Ser Val Gly Pro Asp Gly Ser Ile Thr
340 345 350

Ser Met Thr Arg Gly Ala Ser Phe Leu Lys Arg Gln Ala Glu Thr Ser
355 360 365

Ser Asn Val Gly Gly Pro Leu Leu Ala Thr Leu Asn Gly Gly Leu Asn
370 375 380

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

Pro Arg Leu Ala Pro Leu Val Lys Ala Glu Leu Glu Ala Arg Gly Ile
405 410 415

Glu Tyr Lys His Tyr Pro Thr Ile Trp Ser Asn Leu Ala Ser Thr Leu
420 425 430

Arg His Met Tyr Ala Leu Gly Arg Arg Pro Arg Ser Lys Ala Glu
435 440 445

<210> 42
<211> 792
<212> ДНК

<213> Isochrysis galbana
<400> 42

atggccctcg caaacgacgc gggagagcgc atctgggcgg ctgtgaccga cccggaaatc 60

ctcattggca ccttctcgta cttgctactc aaaccgctgc tccgcaattc cgggctggtg 120

gatgagaaga agggcgcata caggacgtcc atgatctggt acaacgttct gctggcgctc 180

ttctctgcgc tgagcttcta cgtgacggcg accgccctcg gctggggacta tggtacgggc 240

gcgtggctgc gcaggcaaac cggcgacaca ccgcagccgc tcttccagtg cccgtccccg 300

gtttggggact cgaagctctt cacatggacc gccaaggcat tctattactc caagtacgtg 360

gagtacctcg acacggcctg gctggtgctc aagggcaaga gggtctcctt tctccaggcc 420

ttccaccact ttggcgcgcc gtgggatgtg tacctcggca ttcggctgca caacgagggc 480

gtatggatct tcatgttttt caactcgttc attcacacca tcatgtacac ctactacggc 540

ctcaccgccg ccgggtataa gttcaaggcc aagccgctca tcaccgcgat gcagatctgc 600

cagttcgtgg gcggcttcct gttggtctgg gactacatca acgtcccctg cttcaactcg 660

gacaaaggga agttgttcag ctgggctttc aactatgcat acgtcggctc ggtcttcttg 720

ctcttctgcc actttttcta ccaggacaac ttggcaacga agaaatcggc caaggcgggc 780

aagcagctct ag 792

<210> 43

<211> 263
<212> Білок
<213> Isochrysis galbana
<400> 43

Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
65 70 75 80

Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe
130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly
145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr
165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro
180 185 190

Leu Ile Thr Ala Met Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu
195 200 205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys
210 215 220

Leu Phe Ser Trp Ala Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser
245 250 255

Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
260

<210> 44

<211> 801
<212> ДНК
<213> Emiliania huxleyi
<400> 44

atgctcgatc gcgcctcgtc cgacgcggcc atctggtctg cggtgtccga tccggaaatc 60

ctgatcggca ctttctccta cctgctgctc aagccgctgc tacgcaactc aggggtcgtg 120

gacgagcgga aaggcgccta ccggacctcg atgatctggt acaacgtggt gctcgcgctc 180

ttctccgcga cgagcttcta cgtgactgcg accgcgctcg ggtgggacaa gggcaccggc 240

gagtggctcc gcagtctcac gggcgacagc ccgcagcagc tgtggcaatg cccgtcgagg 300

gtatgggact ccaagctgtt cctgtggacg gccaaggcct tctactactc aaagtacgtg 360

gagtacctcg acacggcgtg gctcgtcctc aaggggaaga aggtctcctt cctgcagggc 420

ttccaccact ttggcgcgcc gtgggacgtg tacctgggca ttcggctgaa gaacgagggc 480

gtgtggatct tcatgttctt caactcgttc atccacacgg tcatgtacac gtactacggc 540

ctcaccgccg cgggctacaa gatccgcggc aagccgatca tcaccgcgat gcaaataagc 600

cagttcgtcg gcggctttgt cctagtgtgg gactacatca acgtgccgtg cttccacgcc 660

gacgccgggc aggtcttcag ctgggtcttt aactatgctt acgtcggctc cgtctttctg 720

ctgttctgcc acttcttcta catggacaac atcgcgaagg ccaaggccaa gaaggccgtc 780

gctacccgca aggcgctgtg a 801

<210> 45
<211> 801
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Emiliania huxleyi 9 елонгази в рослинах
<400> 45

atgcttgata gagcttcatc tgatgctgct atttggagcg ctgtttctga tcctgagatc 60

cttatcggaa ccttctctta ccttttgctt aagcctctcc tcagaaactc tggacttgtg 120

gatgagagaa agggagctta ccgtacttct atgatctggt acaacgttgt tcttgctctt 180

ttctctgcta cctctttcta cgttactgct actgctcttg gatgggataa gggaactggt 240

gagtggctta gatctcttac tggtgattct cctcaacaac tttggcagtg cccttctaga 300

gtttgggaca gcaaactctt cttgtggact gctaaagcct tctactactc caagtacgtt 360

gagtaccttg atactgcttg gcttgttctc aagggaaaga aggtttcatt cctccaggga 420

ttccatcatt tcggtgctcc atgggatgtt taccttggaa tcaggcttaa gaacgaggga 480

gtttggatct tcatgttctt caacagcttc atccacactg ttatgtacac ttactacgga 540

cttactgctg ctggatacaa gatcagagga aagcctatca tcaccgctat gcaaatctct 600

caattcgttg gtggattcgt tcttgtgtgg gactacatca acgttccttg tttccatgct 660

gatgctggac aagttttctc ttgggtgttc aactacgctt atgtgggatc tgttttcctt 720

cttttctgcc acttcttcta catggacaac attgctaagg ctaaggctaa aaaggctgtt 780

gctaccagaa aggctctttg a 801

<210> 46
<211> 266
<212> Білок
<213> Emiliania huxleyi
<400> 46

Met Leu Asp Arg Ala Ser Ser Asp Ala Ala Ile Trp Ser Ala Val Ser
1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Arg Lys Gly Ala Tyr Arg
35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Val Leu Ala Leu Phe Ser Ala Thr
50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Lys Gly Thr Gly
65 70 75 80

Glu Trp Leu Arg Ser Leu Thr Gly Asp Ser Pro Gln Gln Leu Trp Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Arg Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Leu Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Lys Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe
130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu Lys Asn Glu Gly
145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Val Met Tyr
165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Lys Pro
180 185 190

Ile Ile Thr Ala Met Gln Ile Ser Gln Phe Val Gly Gly Phe Val Leu
195 200 205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe His Ala Asp Ala Gly Gln

210 215 220

Val Phe Ser Trp Val Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Met Asp Asn Ile Ala Lys Ala Lys Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Val Ala Thr Arg Lys Ala Leu
260 265

<210> 47
<211> 819
<212> ДНК
<213> Pavlova pinguis
<400> 47

atggttgcgc cacccatcac gctcgagtgg ctgctttcgc cgaagctcaa ggatgcagtg 60

ttcggtgggg aggtgctcta cttctccatt gcctacctgt ttcttgcgcc cattttgaag 120

cgcacccccgt tggtggacac gcggaagggc gcgtataaga gtggtatgat cgcgtacaac 180

gtgatcatgt gcgtgttctc gctggtgtgc ttcatctgcc agctcgcagc cctgggctat 240

gacatgggct acttgcagtg ggtgcgtgac ctcacagggg acgagattgt ccccctctac 300

caggacgtgt ccccgtcccc cgccttctcc aacaagctct tcaagtattc gtctattgcc 360

ttccactact ccaagtatgt tgagtacatg gacaccgcat ggctggtgat gaagggcaag 420

cccgtgtcct tgctccaggg cttccaccac tttggcgccg cctgggacac ctactttggc 480

atcaccttcc agaacgaggg catctacgtg ttcgtggtgc tcaacgcctt catccacacg 540

atcatgtacg catactacgc ggccactgcg gcgggtctca agttctcact gaagttcgtc 600

atcacgctca tgcagatcac ccaattcaac gtgggcttcg taatggtgta tcactacatc 660

accctggagt acttccgcaa ctcaccggag ctcgtcttct cctacctttt caactatgcg 720

tacgtctgca cggttctcct cctcttcatg cagttcttct acatggacaa ctttggcaag 780

aagaaggccg ctgccgccgc gggcaagaag aagaagtag 819

<210> 48
<211> 272

<212> Білок
<213> Pavlova pinguis
<400> 48

Met Val Ala Pro Pro Ile Thr Leu Glu Trp Leu Leu Ser Pro Lys Leu
1 5 10 15

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

Leu Phe Leu Ala Pro Ile Leu Lys Arg Thr Pro Leu Val Asp Thr Arg
35 40 45

Lys Gly Ala Tyr Lys Ser Gly Met Ile Ala Tyr Asn Val Ile Met Cys
50 55 60

Val Phe Ser Leu Val Cys Phe Ile Cys Gln Leu Ala Ala Leu Gly Tyr
65 70 75 80

Asp Met Gly Tyr Leu Gln Trp Val Arg Asp Leu Thr Gly Asp Glu Ile
85 90 95

Val Pro Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe Ser Asn Lys
100 105 110

Leu Phe Lys Tyr Ser Ser Ile Ala Phe His Tyr Ser Lys Tyr Val Glu
115 120 125

Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Met Lys Gly Lys Pro Val Ser Leu
130 135 140

Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr Tyr Phe Gly
145 150 155 160

Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Ile Tyr Val Phe Val Val Leu Asn Ala
165 170 175

Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Gly
180 185 190

Leu Lys Phe Ser Leu Lys Phe Val Ile Thr Leu Met Gln Ile Thr Gln
195 200 205

Phe Asn Val Gly Phe Val Met Val Tyr His Tyr Ile Thr Leu Glu Tyr
210 215 220

Phe Arg Asn Ser Pro Glu Leu Val Phe Ser Tyr Leu Phe Asn Tyr Ala
225 230 235 240

Tyr Val Cys Thr Val Leu Leu Leu Phe Met Gln Phe Phe Tyr Met Asp
245 250 255

Asn Phe Gly Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Lys Lys Lys Lys
260 265 270

<210> 49
<211> 840
<212> ДНК
<213> Pavlova salina
<400> 49
atggcgactg aagggatgcc ggcgataacg ctggactggc tgctctcgcc cggggctgaag 60

gatgccgtaa ttggcgggga ggtgctctac ttttcgcttg ggtatctgct gctcgagccc 120

atcctcaagc gctcaccgtt tgtggacaag cgcaagggcg cataccgcaa cggcatgatc 180

gcgtacaaca tcctcatgtg cggtttctcg ctggtatgct tcgtgtgcca gatggcggcg 240

ctcggccttg atcgcggcca cctgcagttt gtccgcgacc tcacgggcga cagcgtggtg 300

cagctctacc aggacgtgag cccatccccc gcattcgcga acaagctctt ccggtactca 360

gcggtggcgt tccactactc aaagtacgtg gagtacatgg acacagcgtg gcttgtgctg 420

aagggcaagc ccgtctcgtt cctgcagggc ttccaccact tcggcgccgc gtgggacacc 480

tactttggca tcacgtttca gaacgagggc acctacgtct ttgtgctgct caacgcattc 540

atccacacaa tcatgtacac ctactacggc gcgacggcag cgggcatcaa aatctcgatg 600

aagccgctga tcaccctcat gcagatcacg cagttcctgc tgggcttcgc gctcgtctac 660

ccgtacattg acctcggcta cttccgtgcg tcgcccgagc tcgtgtggag ctacctgttc 720

aactatgcgt acgtactcat ggtgctcttc ctcttcatgc gcttcttcta ccacgacaac 780

tttagcaagc acaagccaat ctcgcgcatc gactccagca accgcatgaa aaccgagtag 840

<210> 50
<211> 279
<212> Білок
<213> Pavlova salina
<400> 50

Met Ala Thr Glu Gly Met Pro Ala Ile Thr Leu Asp Trp Leu Leu Ser
1 5 10 15

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

Leu Gly Tyr Leu Leu Leu Glu Pro Ile Leu Lys Arg Ser Pro Phe Val
35 40 45

Asp Lys Arg Lys Gly Ala Tyr Arg Asn Gly Met Ile Ala Tyr Asn Ile
50 55 60

Leu Met Cys Gly Phe Ser Leu Val Cys Phe Val Cys Gln Met Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gly Leu Asp Arg Gly His Leu Gln Phe Val Arg Asp Leu Thr Gly
85 90 95

Asp Ser Val Val Gln Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe
100 105 110

Ala Asn Lys Leu Phe Arg Tyr Ser Ala Val Ala Phe His Tyr Ser Lys
115 120 125

Tyr Val Glu Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Leu Lys Gly Lys Pro
130 135 140

Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr
145 150 155 160

Tyr Phe Gly Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Thr Tyr Val Phe Val Leu
165 170 175

Leu Asn Ala Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Ala Thr
180 185 190

Ala Ala Gly Ile Lys Ile Ser Met Lys Pro Leu Ile Thr Leu Met Gln
195 200 205

Ile Thr Gln Phe Leu Leu Gly Phe Ala Leu Val Tyr Pro Tyr Ile Asp
210 215 220

Leu Gly Tyr Phe Arg Ala Ser Pro Glu Leu Val Trp Ser Tyr Leu Phe
225 230 235 240

Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Met Val Leu Phe Leu Phe Met Arg Phe Phe
245 250 255

Tyr His Asp Asn Phe Ser Lys His Lys Pro Ile Ser Arg Ile Asp Ser
260 265 270

Ser Asn Arg Met Lys Thr Glu
275

<210> 51
<211> 1284
<212> ДНК
<213> Pavlova salina
<400> 51

atgggacgcg gcggagacag cagtgggcag gcgcatccgg cggcggagct ggcggtcccg 60

agcgaccgcg cggaggtgag caacgctgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc 120

aagcgcgtgg atgtgaccaa gttccaacgc acgcacccgg gtggtagcaa ggtcttccgg 180

atcttccagg accgcgatgc gacggagcag ttcgagtcct accactcgaa gcgcgcgatc 240

aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgctc ccgccgacac gcccttgccc 300

tcccagtcac cgatggggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt 360

tactacgatc catgcccgct cgatgagctg ttcaagctca gcctcgtgct cctcccgacc 420

tttgcgggca tgtacatgct caaggcgggc gtcggctccc cgctctgcgg cgccctcatg 480

gtgagctttg gctggtacct cgatggctgg ctcgcgcacg actatctgca ccactccgtc 540

ttcaaggggt ccgtcgcacg caccgtcggg tggaacaacg cggcgggcta cttcctcggc 600

ttcgtgcagg ggtatgcggt cgagtggtgg cgcgcgcggc ataacacgca ccacgtgtgc 660

accaatgagg acggctcgga ccccgacatc aaaacggcgc cgctgctcat atacgtgcgc 720

aacaagccga gcatcgccaa gcgcctgaac gccttccagc gctaccagca gtactactat 780

gtgccggtga tggcaatcct cgacctgtac tggcggctcg agtcgatcgc ctacgtcgcg 840

atgcgcctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctcgcactcg tcgcgcacta cgccatcgtc 900

gcgtgggtct ttgcgggcaa ctaccacctg ctcccgctcg tgacggttct gcgcgggttt 960

ggcactggga tcaccgtttt cgcgacgcac tacggtgagg acattctcga cgcggaccag 1020

gtgcgtcaca tgacgctcgt cgagcagacg gcactcacct cgcgcaacat ctcgggcggc 1080

tggctcgtga acgtgctcac cggcttcatc tcactgcaga cggagcacca cctgttcccg 1140

atgatgccaa ccggcaacct catgactatc cagcccgagg tgcgcgcctt cttcaagaag 1200

cacggacttg agtaccgcga gggcaacctc attgagtgcg tgcggcagaa catccgtgcg 1260

cttgcattcg agcacctgct ttga 1284

<210> 52
<211> 427
<212> Білок
<213> Pavlova salina
<400> 52

```
Met Gly Arg Gly Gly Asp Ser Ser Gly Gln Ala His Pro Ala Ala Glu
1               5                  10                  15

Leu Ala Val Pro Ser Asp Arg Ala Glu Val Ser Asn Ala Asp Ser Lys
            20                  25                  30

Ala Leu His Ile Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe
        35                  40                  45

Gln Arg Thr His Pro Gly Gly Ser Lys Val Phe Arg Ile Phe Gln Asp
    50                  55                  60

Arg Asp Ala Thr Glu Gln Phe Glu Ser Tyr His Ser Lys Arg Ala Ile
65                  70                  75                  80

Lys Met Met Glu Gly Met Leu Lys Lys Ser Glu Asp Ala Pro Ala Asp
                85                  90                  95

Thr Pro Leu Pro Ser Gln Ser Pro Met Gly Lys Asp Phe Lys Ala Met
            100                 105                 110

Ile Glu Arg His Val Ala Ala Gly Tyr Tyr Asp Pro Cys Pro Leu Asp
        115                 120                 125

Glu Leu Phe Lys Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Thr Phe Ala Gly Met
    130                 135                 140

Tyr Met Leu Lys Ala Gly Val Gly Ser Pro Leu Cys Gly Ala Leu Met
145                 150                 155                 160

Val Ser Phe Gly Trp Tyr Leu Asp Gly Trp Leu Ala His Asp Tyr Leu
                165                 170                 175

His His Ser Val Phe Lys Gly Ser Val Ala Arg Thr Val Gly Trp Asn
            180                 185                 190

Asn Ala Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Phe Val Gln Gly Tyr Ala Val Glu
        195                 200                 205
```

```
Trp Trp Arg Ala Arg His Asn Thr His His Val Cys Thr Asn Glu Asp
    210                 215                 220

Gly Ser Asp Pro Asp Ile Lys Thr Ala Pro Leu Leu Ile Tyr Val Arg
225                 230                 235                 240

Asn Lys Pro Ser Ile Ala Lys Arg Leu Asn Ala Phe Gln Arg Tyr Gln
                245                 250                 255

Gln Tyr Tyr Tyr Val Pro Val Met Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Trp Arg
            260                 265                 270

Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Val Ala Met Arg Leu Pro Lys Met Leu Pro
        275                 280                 285

Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Val Ala Trp Val Phe
    290                 295                 300

Ala Gly Asn Tyr His Leu Leu Pro Leu Val Thr Val Leu Arg Gly Phe
305                 310                 315                 320

Gly Thr Gly Ile Thr Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu Asp Ile Leu
                325                 330                 335

Asp Ala Asp Gln Val Arg His Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Leu
            340                 345                 350
```

Thr Ser Arg Asn Ile Ser Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly
355 360 365

Phe Ile Ser Leu Gln Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr
370 375 380

Gly Asn Leu Met Thr Ile Gln Pro Glu Val Arg Ala Phe Phe Lys Lys
385 390 395 400

His Gly Leu Glu Tyr Arg Glu Gly Asn Leu Ile Glu Cys Val Arg Gln
405 410 415

Asn Ile Arg Ala Leu Ala Phe Glu His Leu Leu
420 425

<210> 53
<211> 172
<212> Білок
<213> Вірус кущистої карликовості томату
<400> 53

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Asn Asp Ala Arg Glu Gln Ala Asn Ser
1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Thr Ser Pro Phe Lys Leu
20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Trp Thr Glu Trp Arg Leu His Asn Asp Glu
35 40 45

Thr Asn Ser Asn Gln Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Gly
50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Arg Thr Glu
65 70 75 80

Ala Ser Leu His Arg Val Leu Gly Ser Trp Thr Gly Asp Ser Val Asn
85 90 95

Tyr Ala Ala Ser Arg Phe Phe Gly Phe Asp Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Val Ser Ile Thr Val Ser Gly Gly Ser Arg
115 120 125

Thr Leu Gln His Leu Cys Glu Met Ala Ile Arg Ser Lys Gln Glu Leu
130 135 140

Leu Gln Leu Ala Pro Ile Glu Val Glu Ser Asn Val Ser Arg Gly Cys
145 150 155 160

Pro Glu Gly Thr Glu Thr Phe Glu Lys Glu Ser Glu
165 170

<210> 54
<211> 116
<212> Білок
<213> Вірус жовтої кучерявості листя томату
<400> 54

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ser Val Glu Glu Thr Tyr
20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
35 40 45

Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
65 70 75 80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr
85 90 95

Ile Met Asp Val Gln Ala His Val Pro Glu Ala Gln Asn Ile Gln Asn
100 105 110

Val Ser Lys Pro
115

<210> 55
<211> 351
<212> Білок
<213> Вірус складчастості ріпи
<400> 55

Met Glu Asn Asp Pro Arg Val Arg Lys Phe Ala Ser Glu Gly Ala Gln
1 5 10 15

Trp Ala Ile Lys Trp Gln Lys Lys Gly Trp Ser Ser Leu Thr Ser Arg
20 25 30

Gln Lys Gln Thr Ala Arg Ala Ala Met Gly Ile Lys Leu Ser Pro Val
35 40 45

Ala Gln Pro Val Gln Lys Val Thr Arg Leu Ser Ala Pro Val Ala Leu
50 55 60

Ala Tyr Arg Glu Val Ser Thr Gln Pro Arg Val Ser Thr Ala Arg Asp
65 70 75 80

Gly Ile Thr Arg Ser Gly Ser Glu Leu Ile Thr Thr Leu Lys Lys Asn
85 90 95

Thr Asp Thr Glu Pro Lys Tyr Thr Thr Ala Val Leu Asn Pro Ser Glu
100 105 110

Pro Gly Thr Phe Asn Gln Leu Ile Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Glu Lys
115 120 125

Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Arg Phe Arg Tyr Ser Pro Met Ser Pro Ser
130 135 140

```
Thr Thr Gly Gly Lys Val Ala Leu Ala Phe Asp Arg Asp Ala Ala Lys
145                 150                 155                 160

Pro Pro Pro Asn Asp Leu Ala Ser Leu Tyr Asn Ile Glu Gly Cys Val
                165                 170                 175

Ser Ser Val Pro Trp Thr Gly Phe Ile Leu Thr Val Pro Thr Asp Ser
            180                 185                 190

Thr Asp Arg Phe Val Ala Asp Gly Ile Ser Asp Pro Lys Leu Val Asn
        195                 200                 205

Phe Gly Lys Leu Ile Met Ala Thr Tyr Gly Gln Gly Ala Asn Asp Ala
    210                 215                 220

Ala Gln Leu Gly Glu Val Arg Val Glu Tyr Thr Val Gln Leu Lys Asn
225                 230                 235                 240

Arg Thr Gly Ser Thr Ser Asp Ala Gln Ile Gly Asp Phe Ala Gly Val
                245                 250                 255

Lys Asp Gly Pro Arg Leu Val Ser Trp Ser Lys Thr Lys Gly Thr Ala
            260                 265                 270

Gly Trp Glu His Asp Cys His Phe Leu Gly Thr Gly Asn Phe Ser Leu
        275                 280                 285

Thr Leu Phe Tyr Glu Lys Ala Pro Val Ser Gly Leu Glu Asn Ala Asp
    290                 295                 300

Ala Ser Asp Phe Ser Val Leu Gly Glu Ala Ala Ala Gly Ser Val Gln
305                 310                 315                 320

Trp Ala Gly Val Lys Val Ala Glu Arg Gly Gln Ser Val Lys Met Val
                325                 330                 335

Thr Thr Glu Glu Gln Pro Arg Gly Lys Trp Gln Ala Leu Arg Ile
            340                 345                 350
```

<210> 56
<211> 303
<212> Білок

<213> Вірус мозаїки гороху
<400> 56

Met His Gly Ile Glu Gln Pro Gln Leu Pro Leu Asp Tyr Val His Arg
1 5 10 15

Cys Ala Ser Thr Ser Phe Leu Leu Ala Ser Leu Asp Gly Leu Leu Ser
20 25 30

Glu Ala Arg Glu Leu Ser Gly Pro Leu Ala Leu Ile Thr Ser Ser Tyr
35 40 45

Tyr Leu Leu Val Ser Ile Ala Leu Cys Trp Ala Ile Pro Gly Ser Phe
50 55 60

Trp Tyr Arg Pro Gly Cys Trp Leu Gln Pro Val Ser Gly Arg Asn Leu
65 70 75 80

Ile Phe Cys Gly Pro Thr Glu Ala Leu Gln Arg Phe Arg Leu Tyr Ala
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Leu Val Leu Ser Glu Asn Cys Pro Arg His Gly Gln
100 105 110

Ser Ala Ala Ile Thr Leu Gln Ser Tyr Trp Ala Leu Pro Asn Asn Ile
115 120 125

Trp Met Asp Met Ala Gln Leu Asp Leu Leu Thr Phe Ser Met Pro Ile
130 135 140

Ala Asn Thr Phe Ala Tyr Leu Ala Asp Cys Glu Ala Arg Phe Pro Pro
145 150 155 160

Ile Val Glu Gly Val Gly Ser Ala Tyr Tyr Val Pro Thr Leu Leu Gly
165 170 175

Leu Thr His Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Leu Ala Leu Arg Arg Arg Asn
180 185 190

Leu Asp Leu Ser Gly Glu Pro His Arg Val Arg Pro Gly Val Leu Glu
195 200 205

Ser Met Ala Leu Leu Cys Ser Ser Val Arg Ser Thr Ser Arg Ser Arg
210 215 220

Gln Ile Pro Pro Leu Tyr Gly Ser Val Leu His His Val Leu Gly Leu
225 230 235 240

Ala Glu Arg Asp Cys Ile Leu Phe Asp Thr Asp Ser Asn Tyr Ser Ser
245 250 255

Tyr Thr His Arg Val Leu Glu Gln Asp Arg Asn Arg Ala Asp Gln Ser
260 265 270

Leu Phe Ser Ile Asp Leu Glu Tyr Val His Asp Leu Glu Leu Ile Ala
275 280 285

Leu Gly Tyr Ser Asp Glu Asp Asp Glu Asp Leu Asp Asn Phe Phe
290 295 300

<210> 57
<211> 256
<212> Білок

<213> Вірус жовтої карликовості злакових <400> 57

Met Phe Ile Ala Gln Pro Cys Gly Arg Val Leu Val Phe Asp Val Ala
1 5 10 15

Ser Arg Thr Pro Ser Phe Phe Thr Arg Tyr Ser Val Glu Leu Ser Leu
20 25 30

Arg Val Leu Asp Pro Phe Phe Thr Arg Ala Val Thr Asp Phe Arg Tyr
35 40 45

Thr Gln Asn Glu Ile Asp Leu Phe Cys Val Ser Leu Gly Phe Leu Leu
50 55 60

Pro Ile Leu Leu Thr Gly Glu Ser Tyr Ser Trp Arg Gly His Leu Asn
65 70 75 80

Leu Pro Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Leu Val Arg Trp Gly Leu Ala Val
85 90 95

Gly Tyr Phe Pro Thr Phe Ser Thr Asp Gly Asp Ile Arg Gln Asn Pro
100 105 110

Glu Leu Arg Ile Asp Leu Ser Thr Met Ser Thr Arg Ser Phe Tyr Glu
115 120 125

Gln Phe Leu Leu Arg Tyr Asn Thr Ser Gly Leu Ala Lys Ala Ile Val
130 135 140

Gly Gln Gln Glu Cys Phe Gln Ser Gly Met Glu Ser Phe Lys Arg Phe
145 150 155 160

Leu His Tyr Arg Leu Thr Cys Phe Glu Ser Cys Leu Pro Arg Pro Arg
165 170 175

Trp Glu Ser Pro Leu Ala Pro Gly Pro Tyr Leu Asp Arg Ala Phe Glu
180 185 190

Ala Thr Leu Leu Gly Arg Met Val Gly His Asn Gln Leu Leu Phe Thr
195 200 205

Gly Leu Ser Ser Asp Ile Thr Arg Tyr Tyr Asn Glu Leu Val Val Glu
210 215 220

Gly Val Pro Val Ala Phe Trp Asp Ala Ala Gly Ile Thr Leu His His
225 230 235 240

Ala Gly Glu Glu Tyr Phe Ser Asn Ser Tyr Ile Gln Lys Ile Leu Gln
245 250 255

<210> 58
<211> 519
<212> ДНК
<213> Вірус кущистої карликовості томату
<400> 58

atggaacgag ctatacaagg aaacgacgct agggaacaag ctaacagtga acgttgggat 60

ggaggatcag gaggtaccac ttctcccttc aaacttcctg acgaaagtcc gagttggact 120

gagtggcggc tacataacga tgagacgaat tcgaatcaag ataatcccct tggtttcaag 180

gaaagctggg gtttcgggaa agttgtattt aagagatatc tcagatacga caggacggaa 240

gcttcactgc acagagtcct tggatcttgg acgggagatt cggttaacta tgcagcatct 300

cgatttttcg gtttcgacca gatcggatgt acctatagta ttcggtttcg aggagttagt 360

atcaccgttt ctggagggtc gcgaactctt cagcatctct gtgagatggc aattcggtct 420

aagcaagaac tgctacagct tgccccaatc gaagtggaaa gtaatgtatc aagaggatgc 480

cctgaaggta ctgagacctt cgaaaaagaa agcgagtaa 519

<210> 59
<211> 351
<212> ДНК
<213> Вірус жовтої кучерявості листя томату
<400> 59
atgtgggatc cacttctaaa tgaatttcct gaatctgttc acggatttcg ttgtatgtta 60

gctattaaat atttgcagtc cgttgaggaa acttacgagc ccaatacatt gggccacgat 120

ttaattaggg atcttatatc tgttgtaagg gcccgtgact atgtcgaagc gaccaggcga 180

tataatcatt tccacgcccg cctcgaaggt tcgccgaagg ctgaacttcg acagcccata 240

cagcagccgt gctgctgtcc ccattgtcca aggcacaaac aagcgacgat catggacgta 300

caggcccatg taccggaagc ccagaatata cagaatgtat cgaagccctg a 351

<210> 60
<211> 1056
<212> ДНК
<213> Вірус складчастості ріпи
<400> 60
atggaaaatg atcctagagt ccgaaagttc gcatccgagg gcgcccaatg ggcgataaag 60

tggcagaaga agggctggtc atccctaacc agcagacaga aacagaccgc ccgcgcagcg 120

atggggatca agctctcccc tgtggcgcaa cctgtgcaga aagtgactcg actgagtgct 180

ccggtggctc tcgcctaccg cgaggtttcc acccagcctc gggtttctac tgccagggac 240

ggcataacca gaagcggttc tgaactgatc acaaccctga agaagaacac tgacactgaa 300

cctaagtaca ccacagctgt gcttaaccca agcgaacccg gaacattcaa ccaactcatc 360

aaggaggcgg cccagtatga aaaataccga ttcacgtcac tcagatttag gtactctccc 420

atgagccctt caaccaccgg gggcaaggtg gctctggcat tcgaccgaga cgctgccaaa 480

cctccgccca acgacctcgc ttcccctctac aacatagagg gttgtgtatc tagcgtgccc 540

tggacagggt ttattttgac cgtcccaaca gattctactg accgctttgt ggcggatggt 600

atcagcgatc caaagcttgt caatttcggc aagctcatca tggccaccta tggccaagga 660

gccaatgatg ccgcccaact cggtgaagtg cgagtcgagt acaccgtgca gctcaagaac 720

agaactggct caaccagcga cgcccagatt ggggacttcg cgggtgttaa ggacggaccc 780

aggttggtct cgtggtccaa gaccaaggga acagctgggt gggagcacga ttgtcatttt 840

ctcggaaccg gaaacttctc gttgacactg ttctacgaga aggcgcccgt ttcggggcta 900

gaaaacgcag acgcctctga cttctcggtc ctgggagaag ccgcagcagg tagtgtccaa 960

tgggctggag tgaaggtagc agaaagggga caaagcgtga aaatggtcac aactgaggag 1020

cagccaaggg gaaaatggca agcactcagg atttag 1056

<210> 61

<211> 912
<212> ДНК
<213> Вірус мозаїки гороху
<400> 61

atgcacggaa ttgagcagcc tcaactaccg ctagattacg ttcaccgttg cgcatcaacc 60

tccttcttgc tcgcatcact agatggcctc ctttctgaag cccgtgaact ctcagggcct 120

ctggctctca ttacttctag ctattactta cttgtttcta ttgccctctg ctgggcaatc 180

cctggatcct tctggtatag gcctggctgc tggttgcagc cagtctcagg gcggaatctc 240

atcttttgcg gccctaccga ggccttgcaa cgattccgtc tgtacgctgc cagacttggg 300

ttggtcctgt cagagaactg cccaagacac ggccaatcag cagcaatcac ccttcaatca 360

tactgggcac ttcctaacaa catctggatg gacatggccc aattggactt gctcaccttc 420

tcaatgccaa ttgctaatac atttgcctac ttggcagatt gtgaagcaag atttcctcct 480

attgttgaag gagtgggatc tgcttactat gtgccaacgc tgctcggact tactcaccaa 540

gaccccaggc tttatcttgc gcttcgcagg agaaaccttg atcttagtgg cgaacctcat 600

agagttcgtc ctggtgtcct ggagtctatg gctttgctct gttctagtgt acgtagcaca 660

agccgttcca ggcaaattcc tcctttatat ggcagcgttt tgcaccacgt tttgggcctg 720

gccgagagag actgcatcct ctttgatacg gatagtaact actcctctta cactcatcgg 780

gttcttgaac aagaccggaa tcgggctgat cagtcattgt ttagcattga cttggaatat 840

gttcatgacc tggagcttat tgccctgggt tactctgatg aagatgatga agatcttgat 900

aacttcttct ag 912

<210> 62
<211> 771
<212> ДНК
<213> Вірус жовтої карликовості злакових
<400> 62
atgttcatcg cccaaccttg cgggcgagtt cttgtgttcg acgtcgcctc ccgcacgcca 60

tcgttcttca ctcgttatag tgttgaactc tcgctccgtg ttctagaccc attcttcacg 120

cgagcagtaa cagatttccg atacacccaa aatgaaatcg atttatttttg tgtgtctctt 180

ggctttctgt tgccaattct cctcacagga gaatcttact cttggcgcgg tcacctcaac 240

ctccccctit cttacaccga attacttgtt cgatgggggc tcgcagtggg gtacttccct 300

accttctcca ctgatggtga cattcgacag aacccagaac tccgcatcga cctgtccacc 360

atgtcaaccc gctctttcta cgagcagttc ctactcagat ataacacgag tgggttggca 420

aaagctatcg tcggacagca agagtgcttt caaagcggca tggagtcttt taaaagattc 480

ctacactacc gcctcacgtg ctttgaaagc tgccttccac gacctcgttg ggaaagtcct 540

ttggctcctg gtccttatct ggacagggct tttgaggcaa ctcttctcgg ccgtatggtc 600

ggtcataacc aactactctt taccggtttg tcttctgata tcactaggta ttataacgag 660

ttggttgtgg aaggcgtgcc ggtggctttt tgggacgctg ccggcattac tttgcatcac 720

gctggtgaag aatatttttc gaattcttac attcaaaaga ttcttcaatg a 771

<210> 63
<211> 389
<212> Білок
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 63

```
Met Val Ile Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Leu Leu Phe Phe
1               5                  10                  15

Ile Ser Gly Leu Ala Val Asn Leu Phe Gln Ala Val Cys Tyr Val Leu
            20                  25                  30

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

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
    50                  55                  60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
65                  70                  75                  80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
                85                  90                  95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
            100                 105                 110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
        115                 120                 125

Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
    130                 135                 140

Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Ser Asp Phe
145                 150                 155                 160

Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
                165                 170                 175
```

```
Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
            180                 185                 190

Pro Ile Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
        195                 200                 205

Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
    210                 215                 220

Val Thr Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
225                 230                 235                 240

Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
                245                 250                 255

Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
            260                 265                 270

Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
        275                 280                 285

Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
    290                 295                 300

Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ala Cys Val Leu Thr Leu Gly Ala Ile
305                 310                 315                 320
```

Lys Phe Leu His Trp Ala Gln Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Thr
325 330 335

Ile Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
340 345 350

Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
355 360 365

Ala Lys Pro Lys Asp Asn His His Pro Glu Ser Ser Ser Gln Thr Glu
370 375 380

Thr Glu Lys Glu Lys
385

<210> 64
<211> 281
<212> Білок
<213> Limnanthes alba
<400> 64

Met Ala Lys Thr Arg Thr Ser Ser Leu Arg Asn Arg Arg Gln Leu Lys
1 5 10 15

Thr Ala Val Ala Ala Thr Ala Asp Asp Asp Lys Asp Gly Ile Phe Met
20 25 30

Val Leu Leu Ser Cys Phe Lys Ile Phe Val Cys Phe Ala Ile Val Leu
35 40 45

Ile Thr Ala Val Ala Trp Gly Leu Ile Met Val Leu Leu Leu Pro Trp
50 55 60

Pro Tyr Met Arg Ile Arg Leu Gly Asn Leu Tyr Gly His Ile Ile Gly
65 70 75 80

Gly Leu Val Ile Trp Leu Tyr Gly Ile Pro Ile Glu Ile Gln Gly Ser
85 90 95

Glu His Thr Lys Lys Arg Ala Ile Tyr Ile Ser Asn His Ala Ser Pro
100 105 110

Ile Asp Ala Phe Phe Val Met Trp Leu Ala Pro Ile Gly Thr Val Gly
115 120 125

Val Ala Lys Lys Glu Val Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Leu Tyr
130 135 140

Thr Leu Ala His His Ile Arg Ile Asp Arg Ser Asn Pro Ala Ala Ala
145 150 155 160

Ile Gln Ser Met Lys Glu Ala Val Arg Val Ile Thr Glu Lys Asn Leu
165 170 175

Ser Leu Ile Met Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Gly Asp Gly Arg Leu
180 185 190

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

Pro Ile Val Pro Met Ile Leu Thr Gly Thr His Leu Ala Trp Arg Lys
210 215 220

Gly Thr Phe Arg Val Arg Pro Val Pro Ile Thr Val Lys Tyr Leu Pro
225 230 235 240

Pro Ile Asn Thr Asp Asp Trp Thr Val Asp Lys Ile Asp Asp Tyr Val
245 250 255

Lys Met Ile His Asp Ile Tyr Val Arg Asn Leu Pro Ala Ser Gln Lys
260 265 270

Pro Leu Gly Ser Thr Asn Arg Ser Lys
275 280

<210> 65
<211> 303
<212> Білок

<213> Saccharomyces cerevisiae
<400> 65

```
Met Ser Val Ile Gly Arg Phe Leu Tyr Tyr Leu Arg Ser Val Leu Val
1               5                  10                  15

Val Leu Ala Leu Ala Gly Cys Gly Phe Tyr Gly Val Ile Ala Ser Ile
            20                  25                  30

Leu Cys Thr Leu Ile Gly Lys Gln His Leu Ala Gln Trp Ile Thr Ala
        35                  40                  45

Arg Cys Phe Tyr His Val Met Lys Leu Met Leu Gly Leu Asp Val Lys
    50                  55                  60

Val Val Gly Glu Glu Asn Leu Ala Lys Lys Pro Tyr Ile Met Ile Ala
65                  70                  75                  80

Asn His Gln Ser Thr Leu Asp Ile Phe Met Leu Gly Arg Ile Phe Pro
                85                  90                  95

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

Leu Gly Trp Phe Met Ala Leu Ser Gly Thr Tyr Phe Leu Asp Arg Ser
        115                 120                 125

Lys Arg Gln Glu Ala Ile Asp Thr Leu Asn Lys Gly Leu Glu Asn Val
    130                 135                 140

Lys Lys Asn Lys Arg Ala Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser
145                 150                 155                 160

Tyr Thr Ser Glu Leu Thr Met Leu Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe His
                165                 170                 175

Leu Ala Gln Gln Gly Lys Ile Pro Ile Val Pro Val Val Val Ser Asn
            180                 185                 190
```

Thr Ser Thr Leu Val Ser Pro Lys Tyr Gly Val Phe Asn Arg Gly Cys
195 200 205

Met Ile Val Arg Ile Leu Lys Pro Ile Ser Thr Glu Asn Leu Thr Lys
210 215 220

Asp Lys Ile Gly Glu Phe Ala Glu Lys Val Arg Asp Gln Met Val Asp
225 230 235 240

Thr Leu Lys Glu Ile Gly Tyr Ser Pro Ala Ile Asn Asp Thr Thr Leu
245 250 255

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

Asn Lys Lys Ile Lys Asn Glu Pro Val Pro Ser Val Ser Ile Ser Asn
275 280 285

Asp Val Asn Thr His Asn Glu Gly Ser Ser Val Lys Lys Met His
290 295 300

<210> 66
<211> 373
<212> Білок
<213> Micromonas pusilla
<400> 66

Met Thr Pro Tyr Gln Trp Phe Asn Val Val Ser Ser Leu Gly Tyr Val
1 5 10 15

Leu Phe Thr Ala Thr Thr Ser Thr Val Thr Met Leu Val Pro Ala Ile
20 25 30

Ile Leu Leu Arg Pro Val Ser Ala Asn Leu Tyr Ala Arg Cys Thr Ser
35 40 45

Trp Ile Phe Ala Cys Trp Trp Thr Ser Cys Leu Phe Ile Thr Glu Arg
50 55 60

Leu Asn Gly Val Lys Val Arg Val Thr Gly Asp Ala Leu Pro Leu Asn

65 70 75 80

Ala Pro Leu Leu Ile Met Ser Asn His Lys Cys Asn Leu Asp Trp Met
85 90 95

Phe Leu Trp Ser Ser Ala Ile Arg Thr Gly Ser Met Phe His Val Gly
100 105 110

Val Phe Lys Ala Val Ala Lys Ser Glu Ile Arg Val Ile Pro Ile Phe
115 120 125

Gly Trp Gly Cys Lys Leu Asn Gly Phe Ala Tyr Val Arg Arg Arg Trp
130 135 140

Ser Ser Asp Ala Ser His Leu Thr Ser Trp Ile Gln Ser Gln Ile Arg
145 150 155 160

Arg Arg Leu Asn Ala Asn Trp Thr Leu Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg
165 170 175

Tyr Thr Asp Arg Asn Lys Glu Arg Ser Asp Leu Ser Cys Ala Lys Asp
180 185 190

Gly Leu Glu Pro Met Ala Gly Glu Ile Leu Arg Pro Arg Thr Lys Gly
195 200 205

Leu Ala Leu Leu Leu Arg Glu Ser Ala Lys Gly Gly Gly Tyr Tyr Arg
210 215 220

Lys Ile Val Asp Met Thr Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Asp Gly Lys Pro
225 230 235 240

Leu Lys Gly Ala Ala Leu Gly Thr Arg Cys Phe Gly Gln Leu Ala Lys
245 250 255

Gly Gln Leu Pro Val Ala Thr Cys His Val His Phe Asp Val Phe Ser
260 265 270

His Lys Asp Val Pro Ala Gly Glu Asp Glu Asp Glu Val Glu Ala Trp

275 280 285

Val Trp Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ala Asn Met Leu Glu Ala Cys Ala
290 295 300

Ser Ala Gly Gln Phe Glu Gly Val Arg Glu Trp Ser Thr Ser Gly Thr
305 310 315 320

Ala Val Pro Leu Lys Thr Gln Thr Ala Leu Arg Cys Phe Phe Val Leu
325 330 335

Gln Gly Leu Val Cys Val Gly Val Ala Cys Ser Ser Thr Ala Phe Leu
340 345 350

Ala Tyr Val Ala Cys Ala Ala Val Gly Ala Ala Val Ile Ala Gln Thr
355 360 365

Asp Pro Ala Trp Trp
370

<210> 67
<211> 314
<212> Білок
<213> Mortierella alpina
<400> 67

Met Ser Ile Gly Ser Ser Asn Pro Val Leu Leu Ala Ala Ile Pro Phe
1 5 10 15

Val Tyr Leu Phe Val Leu Pro Arg Val Leu Ala Phe Leu Pro Gln Lys
20 25 30

Ala Gln Phe Leu Ala Lys Cys Ile Val Val Leu Ile Ala Thr Leu Ile
35 40 45

Met Ser Val Ala Gly Cys Phe Ile Ser Ile Val Cys Ala Leu Leu Asp
50 55 60

Lys Arg Tyr Val Ile Asn Tyr Val Val Ser Arg Leu Phe Ser Phe Leu
65 70 75 80

```
Ala Ala Arg Pro Cys Gly Val Thr Tyr Lys Ile Val Gly Glu Glu His
                85                  90                  95

Leu Asp Lys Tyr Pro Ala Ile Val Val Cys Asn His Gln Ser Ser Met
            100                 105                 110

Asp Met Met Val Leu Gly Arg Val Phe Pro Lys His Cys Val Val Met
        115                 120                 125

Ala Lys Lys Glu Leu Leu Tyr Phe Pro Phe Leu Gly Met Phe Met Lys
    130                 135                 140

Leu Ser Asn Ala Ile Phe Ile Asp Arg Lys Asn His Lys Lys Ala Ile
145                 150                 155                 160

Glu Ser Thr Thr Gln Ala Val Ala Asp Met Lys Lys His Asn Ser Gly
                165                 170                 175

Ile Trp Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Leu Asp Lys Ala Asp
            180                 185                 190

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

Leu Pro Ile Leu Pro Ile Ile Ser Gln Gly Tyr Ser His Ile Tyr Asp
    210                 215                 220

Ser Ser Lys Arg Tyr Phe Pro Gly Gly Glu Leu Glu Ile Arg Val Leu
225                 230                 235                 240

Glu Pro Ile Pro Thr Thr Gly Leu Thr Thr Asp Asp Val Asn Asp Leu
                245                 250                 255

Met Asp Lys Thr Arg Asn Leu Met Leu Lys His Leu Lys Glu Met Asp
            260                 265                 270

Ser Gln Tyr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Asn Gly Ser Thr His Ile Asp
        275                 280                 285
```

Ala Asp Ile Ala Lys Ser Thr Ala Thr Ser Ile Gly Asn Thr Asp Asp
290 295 300

Ala Ile Thr Lys Arg Arg Thr Pro Lys Glu
305 310

<210> 68
<211> 391
<212> Білок
<213> Braccisa napus
<400> 68

Met Ala Met Ala Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe
1 5 10 15

Phe Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Cys Tyr Val
20 25 30

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

Val Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp
50 55 60

Ala Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asp Glu Thr Phe Asn Arg
65 70 75 80

Met Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile
85 90 95

Asp Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly
100 105 110

Ser Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile
115 120 125

Gly Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp
130 135 140

```
Ala Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp
145                 150                 155                 160

Phe Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe
                165                 170                 175

Thr Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Gln
            180                 185                 190

Leu Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val
        195                 200                 205

Ser Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met
    210                 215                 220

Thr Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu
225                 230                 235                 240

Phe Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser
                245                 250                 255

Met Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg
            260                 265                 270

Asp Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala
        275                 280                 285

Asp Thr Phe Pro Gly Gln Lys Glu His Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys
    290                 295                 300

Ser Leu Ala Val Val Val Ser Trp Ala Cys Leu Leu Thr Leu Gly Ala
305                 310                 315                 320

Met Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Leu Lys Gly Ile
                325                 330                 335

Ala Leu Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile
            340                 345                 350
```

Leu Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Ala
355 360 365

Pro Ala Lys Pro Lys Asp Lys His Gln Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
370 375 380

Glu Val Glu Glu Lys Gln Lys
385 390

<210> 69
<211> 390
<212> Білок
<213> Braccisa napus
<400> 69

Met Ala Met Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe Phe
1 5 10 15

Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Ile Cys Tyr Val Leu
20 25 30

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

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
50 55 60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
65 70 75 80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
85 90 95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
100 105 110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
115 120 125

```
Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
    130                 135                 140

Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp Phe
145                 150                 155                 160

Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
                165                 170                 175

Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
            180                 185                 190

Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
        195                 200                 205

Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
    210                 215                 220

Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
225                 230                 235                 240

Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
                245                 250                 255

Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
            260                 265                 270

Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
        275                 280                 285

Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
    290                 295                 300

Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ser Cys Leu Leu Ile Leu Gly Ala Met
305                 310                 315                 320

Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Ala
                325                 330                 335
```

Phe Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
340 345 350

Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
355 360 365

Ala Lys Pro Lys Asp Asn His Asn Asp Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
370 375 380

Glu Val Glu Lys Gln Lys
385 390

<210> 70
<211> 361
<212> Білок
<213> Phytophthora infestans
<400> 70

Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Lys Asp Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Phe Gly
35 40 45

Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu
50 55 60

Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gln Gly Ile Val Phe
65 70 75 80

Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser
85 90 95

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

Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His

115 120 125

Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg
130 135 140

Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly
145 150 155 160

Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val
165 170 175

Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala
180 185 190

Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile
195 200 205

Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr
210 215 220

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

His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr
245 250 255

Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu
260 265 270

Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu
275 280 285

Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe
290 295 300

His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile
305 310 315 320

Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val

325 330 335

Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr
340 345 350

Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr
355 360

<210> 71
<211> 418
<212> Білок
<213> Thalassiosira pseudonana
<480> 71

Met Tyr Arg Leu Thr Ser Thr Phe Leu Ile Ala Leu Ala Phe Ser Ser
1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Phe Ser Pro Gln Arg Pro Pro Arg Thr Ile Thr Lys
20 25 30

Ser Lys Val Gln Ser Thr Val Leu Pro Ile Pro Thr Lys Asp Asp Leu
35 40 45

Asn Phe Leu Gln Pro Gln Leu Asp Glu Asn Asp Leu Tyr Leu Asp Asp
50 55 60

Val Asn Thr Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ile Met Lys Met Leu Pro Lys
65 70 75 80

Glu Thr Phe Asn Ile Asp Thr Ala Thr Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Met
85 90 95

Asp Met Ala Ala Val Val Ser Ser Met Thr Leu Leu Asn Ala Ile Val
100 105 110

Thr Ser Asp Gln Tyr His Ala Leu Pro Leu Pro Leu Gln Ala Ala Thr
115 120 125

Val Ile Pro Phe Gln Leu Leu Ala Gly Phe Ala Met Trp Cys Met Trp
130 135 140

```
Cys Ile Gly His Asp Ala Gly His Ser Thr Val Ser Lys Thr Lys Trp
145                 150                 155                 160

Ile Asn Arg Val Val Gly Glu Val Ala His Ser Val Val Cys Leu Thr
                165                 170                 175

Pro Phe Val Pro Trp Gln Met Ser His Arg Lys His His Leu Asn His
            180                 185                 190

Asn His Ile Glu Lys Asp Tyr Ser His Lys Trp Tyr Ser Arg Asp Glu
        195                 200                 205

Phe Asp Asp Ile Pro Gln Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Tyr Asn Pro Arg
    210                 215                 220

Met Met Gln Leu Pro Phe Leu Tyr Phe Met Tyr Leu Ala Leu Gly Ile
225                 230                 235                 240

Pro Asp Gly Gly His Val Val Phe Tyr Gly Arg Met Trp Glu Gly Val
                245                 250                 255

Ser Leu Gln Lys Lys Phe Asp Ala Ala Ile Ser Val Ala Val Ser Cys
            260                 265                 270

Ala Thr Ala Gly Ser Leu Trp Met Asn Met Gly Thr Ala Asp Phe Thr
        275                 280                 285

Val Val Cys Met Val Pro Trp Leu Val Leu Ser Trp Trp Leu Phe Met
    290                 295                 300

Val Thr Tyr Leu Gln His His Ser Glu Asp Gly Lys Leu Tyr Thr Asp
305                 310                 315                 320

Glu Thr Phe Thr Phe Glu Lys Gly Ala Phe Glu Thr Val Asp Arg Ser
                325                 330                 335

Tyr Gly Lys Leu Ile Asn Arg Met Ser His His Met Met Asp Gly His
            340                 345                 350
```

Val Val His His Leu Phe Phe Glu Arg Val Pro His Tyr Arg Leu Glu
355 360 365

Ala Ala Thr Glu Ala Leu Val Lys Gly Met Asp Glu Thr Gly Gln Lys
370 375 380

His Leu Tyr Lys Tyr Ile Asp Thr Pro Asp Phe Asn Ala Glu Ile Val
385 390 395 400

Asn Gly Phe Arg Asp Asn Trp Phe Leu Val Glu Glu Glu Asn Ile Lys
405 410 415

Arg Glu

<210> 72
<211> 363
<212> Білок
<213> Pythium irregulare
<400> 72

Met Ala Ser Thr Ser Ala Ala Gln Asp Ala Ala Pro Tyr Glu Phe Pro
1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Ile Lys Arg Ala Leu Pro Ser Glu Cys Phe Glu Ala
20 25 30

Ser Val Pro Leu Ser Leu Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser Leu Ala Leu Ala
35 40 45

Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Ser Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Leu Val
50 55 60

Gln Ala Asn Ala Leu Leu Asp Ala Thr Leu Cys Thr Gly Tyr Val Leu
65 70 75 80

Leu Gln Gly Ile Val Phe Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Cys
85 90 95

```
Gly His Gly Ala Phe Ser Arg Ser His Val Leu Asn Phe Ser Val Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Met His Ser Ile Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu
        115                 120                 125

Ser His Arg His His His Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Lys Asp Glu
    130                 135                 140

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

Leu Val Met Ser Leu Gly Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Leu Phe Ala Gly
                165                 170                 175

Phe Pro Pro Arg Thr Met Asn His Phe Asn Pro Trp Glu Ala Met Tyr
            180                 185                 190

Val Arg Arg Val Ala Ala Val Ile Ile Ser Leu Gly Val Leu Phe Ala
        195                 200                 205

Phe Ala Gly Leu Tyr Ser Tyr Leu Thr Phe Val Leu Gly Phe Thr Thr
    210                 215                 220

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

Val Val Thr Thr Phe Leu His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr
                245                 250                 255

Ala Asp Ser Glu Trp Thr Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp
            260                 265                 270

Arg Ser Tyr Gly Ala Leu Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr
        275                 280                 285

His Gln Ile His His Leu Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Asn
    290                 295                 300
```

```
Asp Ala Thr Ala Ala Phe Ala Lys Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys
305                 310                 315                 320

Asn Ala Ala Pro Ile Ile Pro Thr Phe Phe Arg Met Ala Ala Met Tyr
                325                 330                 335

Ala Lys Tyr Gly Val Val Asp Thr Asp Ala Lys Thr Phe Thr Leu Lys
            340                 345                 350

Glu Ala Lys Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Ser
        355                 360
```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Рекомбінантна клітина Brassica napus, яка містить екзогенні полінуклеотиди, які кодують Δ12-десатуразу, ω3-десатуразу або Δ15-десатуразу, Δ6-десатуразу, Δ5-десатуразу, Δ4-десатуразу, Δ6-елонгазу і Δ5-елонгазу, де кожний полінуклеотид функціонально зв'язаний з одним або декількома промоторами, які здатні спрямовувати експресію вказаних полінуклеотидів в клітині, і де клітина містить ліпід, який містить жирні кислоти в естерифікованій формі, жирні кислоти, які містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6-жирні кислоти, які містять лінолеву кислоту (ЛК), ω3-жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК), докозагексаєнову кислоту (ДГК), стеаридонову кислоту (СДК), ейкозапентаєнову кислоту (ЕПК), докозапентаєнову кислоту (ДПК) і ейкозатетраєнову кислоту (ЕТК), і де щонайменше 70 % ДГК, естерифікованої в формі триацилгліцерину (ТАГ), знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ.

2. Клітина за п. 1, в якій ω3-десатураза і/або Δ15-десатураза є грибковою десатуразою.

3. Клітина за п. 1 або 2, яка має одну або більше з наступних ознак:

i) загальна сума арахідонової кислоти (АРК), ЕПК, ДПК і ДГК становить від 7 до 25 % від загального вмісту жирних кислот в ліпідах;

ii) рівень нових ω3-жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 9 до 33 %;

iii) щонайменше 80 % ДГК, естерифікованої в формі ТАГ, знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ.

4. Клітина за будь-яким із пп. 1-3, яка має одну або більше, або всі з наступних ознак:

i) рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 2 до 16 % або від 2 до 15 %,

ii) рівень олеїнової кислоти в загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 1 до 30 %, від 3 до 30 % або від 6 до 30 %, або від 1 до 20 %, або від 30 до 60 %,

iii) рівень ЛК в загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 4 до 35 % або від 4 до 20 %, або від 4 до 17 %,

iv) рівень АЛК в загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 4 до 40 %, від 7 до 40 % або від 10 до 35 %, або від 20 до 35 %, або від 4 до 16 %, або від 2 до 16 %,

v) рівень γ-ліноленової кислоти (ГЛК) в загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить менше 4 %, менше 3 %, менше 2 %, менше 1 %, менше 0,5 %, від 0,05 до 7 %, від 0,05 до 4 % або від 0,05 до 3 %, або від 0,05 до 2 %,

vi) рівень СДК в загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить менше 7 %, менше 6 %, менше 4 %, менше 3 %, від 0,05 до 7 %, від 0,05 до 6 %, від 0,05 до 4 %, від 0,05 до 3 % або від 0,05 до 2 %,

vii) рівень ЕТК в загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить менше 6 %, менше 5 %, менше 4 %, менше 1 %, менше 0,5 %, від 0,05 % до 6 %, від 0,05 до 5 %, від 0,05 до 4 %, від 0,05 до 3 % або від 0,05 до 2 %,

viii) рівень ейкозатриєнової кислоти (ETrA) в загальному вмісті жирних кислот в ліпідах

становить менше 4 %, менше 2 %, менше 1 %, від 0,05 до 4 %, від 0,05 до 3 % або від 0,05 до 2 % або від 0,05 до 1 %,

ix) рівень ЕПК в загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить менше 4 %, менше 3 %, менше 2 %, від 0,05 до 10 %, від 0,05 до 5 % або від 0,05 до 3 %, або від 0,05 до 2 %,

x) рівень ДПК в загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить менше 4 %, менше 3 %, менше 2 %, від 0,05 до 8 %, від 0,05 до 5 % або від 0,05 до 3 %, або від 0,05 до 2 %,

xi) рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 8 до 20 %, від 10 до 20 %, від 11 до 20 %, від 10 до 16 % або від 14 до 20 %,

xii) ліпід містить ω6-докозапентаєнову кислоту ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) у вмісті жирних кислот або ліпід не містить ω6-докозапентаєнової кислоти ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) у вмісті жирних кислот,

xiii) рівень загального вмісту насичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 4 до 25 % або від 4 до 20 %, від 6 до 20 %, від 4 до 60 %, від 30 до 60 % або від 45 до 60 %,

xiv) рівень загального вмісту мононенасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот у ліпідах становить від 4 до 35 % або від 8 до 25 %, або від 8 до 22 %,

xv) рівень загального вмісту поліненасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 20 до 75 % або від 50 до 75 %, або від 60 до 75 %,

xvi) рівень загального вмісту ω6-жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 35 до 50 %, від 20 до 35 %, від 6 до 20 %, менше 20 %, менше 16 %, менше 10 %, від 1 % до 16 %, від 2 до 10 % або від 4 до 10 %,

xvii) рівень вмісту нових ω6-жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить менше 10 %, менше 8 %, менше 6 %, менше 4 %, від 1 до 20 %, від 1 до 10 %, від 0,5 до 8 % або від 0,5 до 4 %,

xviii) рівень загального вмісту ω3-жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 36 до 65 %, від 40 до 60 %, від 20 до 35 %, від 10 до 20 %,

xix) рівень вмісту нових ω3-жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот у ліпідах становить від 9 до 33 %, від 10 до 20 %, від 20 до 30 %, від 12 до 25 %,

xx) співвідношення загальний вміст ω6-жирних кислот:загальний вміст ω3-жирних кислот у вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 1,0 до 3,0, від 0,1 до 1, від 0,1 до 0,5, менше 0,50, менше 0,40, менше 0,30, менше 0,20, менше 0,15,

xxi) співвідношення вміст нових ω6-жирних кислот:вміст нових ω3-жирних кислот у вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 1,0 до 3,0, від 0,1 до 1, від 0,1 до 0,5, менше 0,50, менше 0,40, менше 0,30, менше 0,20, менше 0,15,

xxii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти в ЛК Δ12-десатуразою щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, від 60 до 98 %, від 70 до 95 % або від 75 до 90 %,

xxiii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення АЛК в СДК Δ6-десатуразою щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, від 30 до 70 %, від 35 до 60 % або від 50 до 70 %,

xxiv) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення СДК в ЕТК-кислоту Δ6-елонгазою щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, від 60 до 95 %, від 70 до 88 % або від 75 до 85 %,

xxv) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення ЕТК в ЕПК Δ5-десатуразою щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, від 60 до 99 %, від 70 до 99 % або від 75 до 98 %,

xxvi) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення ЕПК в ДПК Δ5-елонгазою щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, від 50 до 95 % або від 85 до 95 %,

xxvii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення ДПК в ДГК Δ4-десатуразою щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, щонайменше 93 %, від 50 до 95 %, від 80 до 95 % або від 85 до 95 %,

xxviii) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти в ДГК щонайменше 10 %, щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, від 10 до 50 %, від 10 до 30 % або від 10 до 25 %,

xxix) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення ЛК в ДГК щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, щонайменше 22 %, щонайменше 25 %, від 15 до 50 %, від 20 до 40 % або від 20 до 30 %,

xxx) склад жирних кислот ліпіду базується на ефективності перетворення АЛК в ДГК щонайменше 17 %, щонайменше 22 %, щонайменше 24 %, від 17 до 55 %, від 22 до 35 % або від 24 до 35 %,

xxxi) загальний вміст жирних кислот в ліпідах має менше 1 % C20:1,
xxxii) вміст ТАГ в ліпіді становить щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, від 70 до 99 % або від 90 до 99 %,
xxxiii) ліпід включає ДАГ,
xxxiv) ліпід містить менше 10 %, менше 5 %, менше 1 % або від 0,001 до 5 % вільних (неестерифікованих) жирних кислот і/або фосфоліпіду або по суті не містить їх,
xxxv) найбільш поширеними видами ДГК-вмісних ТАГ в ліпіді є ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12),
xxxvi) ліпід включає три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18),
xxxvii) рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот в екстрагованих ліпідах становить менше 1 %, і
xxxviii) рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот в ліпідах становить від 7 до 20 %.

5. Клітина за будь-яким із пп. 1-4, яка має одну або більше або всі з наступних ознак:
i) Δ12-десатураза перетворює олеїнову кислоту в лінолеву кислоту в клітині з ефективністю щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, від 60 до 95 %, від 70 до 90 % або від 75 до 85 %,
ii) ω3-десатураза перетворює ω6-жирні кислоти в ω3-жирні кислоти в клітині з ефективністю щонайменше 65 %, щонайменше 75 %, щонайменше 85 %, від 65 до 95 %, від 75 до 91 % або від 80 до 91 %,
iii) Δ6-десатураза перетворює АЛК в СДК в клітині з ефективністю щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, від 30 до 70 %, від 35 до 60 % або від 50 до 70 %,
iv) Δ6-десатураза перетворює лінолеву кислоту в γ-ліноленову кислоту в клітині з ефективністю менше 5 %, менше 2,5 %, менше 1 %, від 0,1 до 5 %, від 0,5 до 2,5 % або від 0,5 до 1 %,
v) Δ6-елонгаза перетворює СДК в ЕТК в клітині з ефективністю щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, від 60 до 95 %, від 70 до 80 % або від 75 до 80 %,
vi) Δ5-десатураза перетворює ЕТК в ЕПК в клітині з ефективністю щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, від 60 до 95 %, від 70 до 95 % або від 75 до 95 %,
vii) Δ5-елонгаза перетворює ЕПК в ДПК в клітині з ефективністю щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, від 50 до 90 % або від 85 до 95 %,
viii) Δ4-десатураза перетворює ДПК в ДГК в клітині з ефективністю щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, щонайменше 93 %, від 50 до 95 %, від 80 до 95 % або від 85 до 95 %,
ix) ефективність перетворення олеїнової кислоти в ДГК в клітині становить щонайменше 10 %, щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, від 10 до 50 %, від 10 до 30 % або від 10 до 25 %,
x) ефективність перетворення ЛК в ДГК в клітині становить щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, щонайменше 22 %, щонайменше 25 %, від 15 до 50 %, від 20 до 40 % або від 20 до 30 %,
xi) ефективність перетворення АЛК в ДГК в клітині становить щонайменше 17 %, щонайменше 22 %, щонайменше 24 %, від 17 до 55 %, від 22 до 35 % або від 24 до 35 %,
xii) клітина містить на щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, від 15 до 30 % або від 22,5 до 27,5 % більше ω3-жирних кислот, ніж відповідні клітини, позбавлені екзогенних полінуклеотидів,
xiii) Δ6-десатураза переважно десатурує α-ліноленову кислоту (АЛК) відносно лінолевої кислоти (ЛК),
xiv) Δ6-елонгаза також має активність Δ9-елонгази,
xv) Δ12-десатураза також має активність Δ15-десатурази,
xvi) Δ6-десатураза також має активність Δ8-десатурази,
xvii) Δ8-десатураза також має активність Δ6-десатурази або не має активності Δ6-десатурази,
xviii) Δ15-десатураза також має активність ω3-десатурази щодо ГЛК,
xix) ω3-десатураза також має активність Δ15-десатурази щодо ЛК,
xx) ω3-десатураза десатурує як ЛК так і/або ГЛК,
xxi) ω3-десатураза переважно десатурує ГЛК порівняно з ЛК,
xxii) рівень ДГК у клітині базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти в ДГК в клітині щонайменше 10 %, щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, від 10 до 50 %, від 15 до 30 % або від 20 до 25 %,
xxiii) рівень ДГК у клітині базується на ефективності перетворення ЛК в ДГК в клітині щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, щонайменше 22 %, від 15 до 60 %, від 20 до 40 % або від 22 до 30 %,
xxiv) рівень ДГК у клітині базується на ефективності перетворення АЛК в ДГК в клітині щонайменше 17 %, щонайменше 22 %, щонайменше 24 %, від 17 до 65 %, від 22 до 35 % або від 24 до 35 %,
xxx) одна або більше або всі десатурази мають більш високу активність щодо субстрату ацил-

КоА, ніж щодо відповідного субстрату ацил-фосфатидилхоліну (ацил-ФХ),
xxxi) Δ6-десатураза має більш високу активність Δ6-десатурази щодо АЛК, ніж щодо ЛК як жирнокислотного субстрату,
xxxii) Δ6-десатураза має більш високу активність Δ6-десатурази щодо АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж щодо АЛК, приєднаної до положення sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,
xxxiii) Δ6-десатураза має щонайменше в 2 рази більш високу активність Δ6-десатурази, щонайменше в 3 рази більш високу активність, щонайменше в 4 рази більш високу активність або щонайменше в 5 разів більш високу активність щодо АЛК як субстрату, порівняно з ЛК,
xxxiv) Δ6-десатураза має більш високу активність щодо АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж щодо АЛК, приєднаної до положення sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,
xxxv) Δ6-десатураза має щонайменше в 5 разів більш високу активність Δ6-десатурази або щонайменше в 10 разів більш високу активність щодо АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж щодо АЛК, приєднаної до положення sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,
xxxvi) десатураза являє собою фронтенд-десатуразу,
xxxvii) Δ6-десатураза не має активності Δ5-десатурази щодо ЕТК, що виявляється.

6. Клітина за будь-яким із пп. 1-5, в якій екзогенні полінуклеотиди ковалентно зв'язані в молекулі ДНК, такій як молекула Т-ДНК, інтегрованій в геном клітини.

7. Клітина за будь-яким із пп. 1-6, яка містить щонайменше два різні екзогенні полінуклеотиди, кожний з яких кодує Δ6-десатурази, які мають однакові або різні амінокислотні послідовності.

8. Трансгенна рослина Brassica napus, яка містить одну або більше клітин за будь-яким із пп. 1-7.

9. Трансгенне насіння трансгенної рослини Brassica napus, що містить одну або більше клітин за будь-яким із пп. 1-7.

10. Спосіб отримання екстрагованого ліпіду рослин, що включає стадії:
i) отримання насіння за п. 9,
ii) витягування ліпіду з насіння.

11. Спосіб за п. 10, який додатково включає очищення ліпіду.

12. Ліпід, отриманий способом за п. 10 або 11.

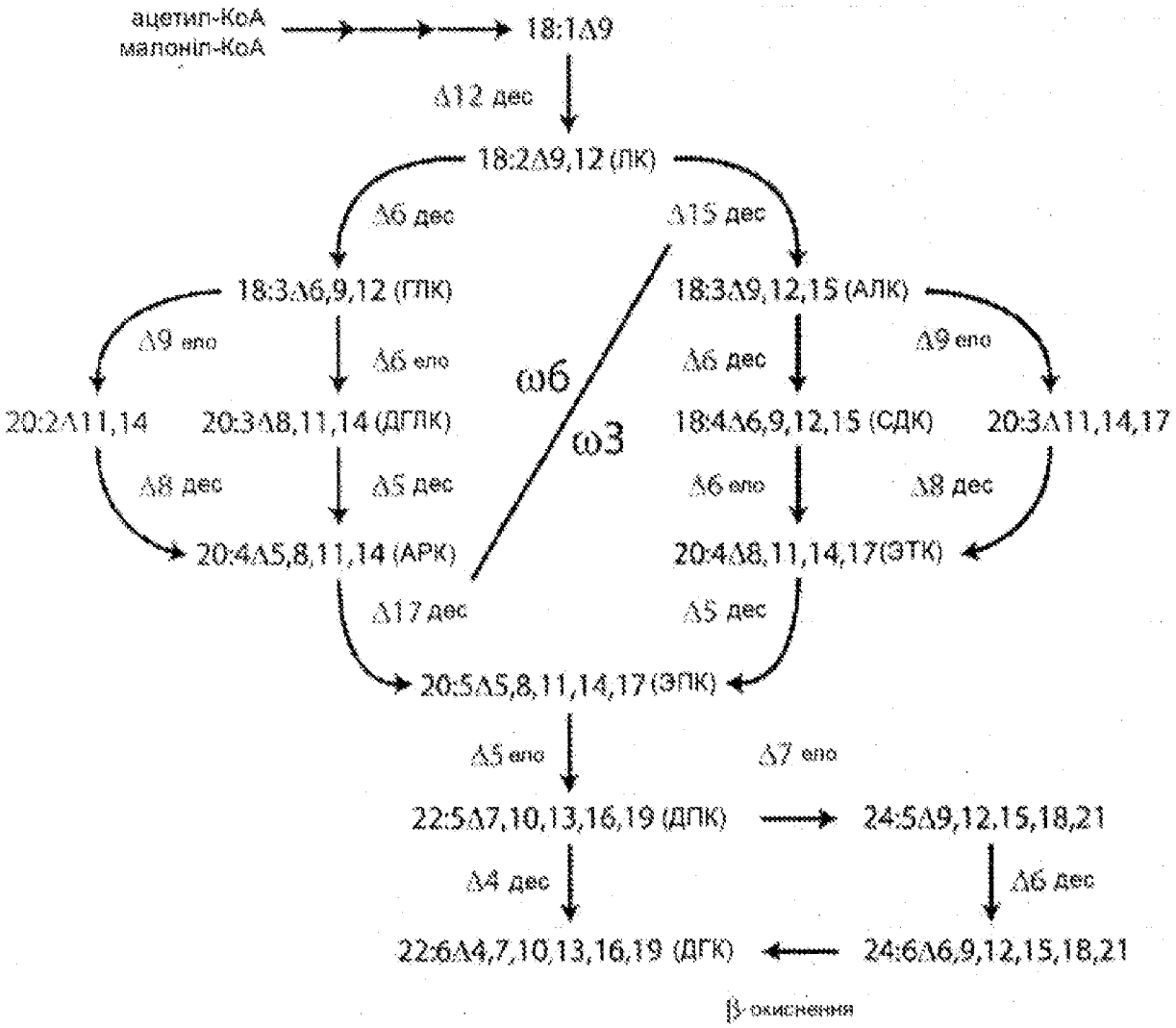
13. Макуха, отримана з насіння за п. 9.

14. Спосіб отримання харчового продукту для споживання людиною або твариною, що включає змішування одного або декількох з клітини за будь-яким із пп. 1-7, трансгенної рослини за п. 8, насіння за п. 9, ліпіду за п. 12 або макухи за п. 13 щонайменше з одним іншим харчовим інгредієнтом.

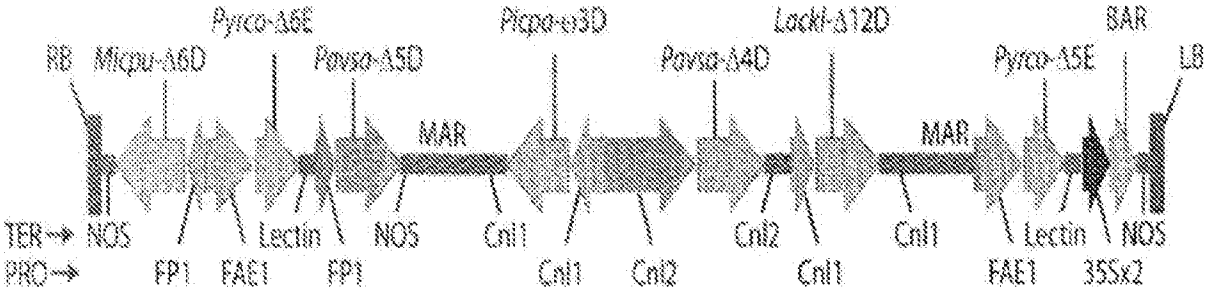
15. Харчовий продукт для споживання людиною або твариною, що містить один або більше з клітини за будь-яким із пп. 1-7, трансгенної рослини за п. 8, насіння за п. 9, ліпіду за п. 12 або макухи за п. 13.

16. Клітина за будь-яким із пп. 1-7, трансгенна рослина за п. 8, насіння за п. 9, ліпід за п. 12, макуха за п. 13 або харчовий продукт, отриманий способом за п. 14, для застосування при лікуванні або попередженні стану, при якому ПНЖК надають сприятливий вплив.

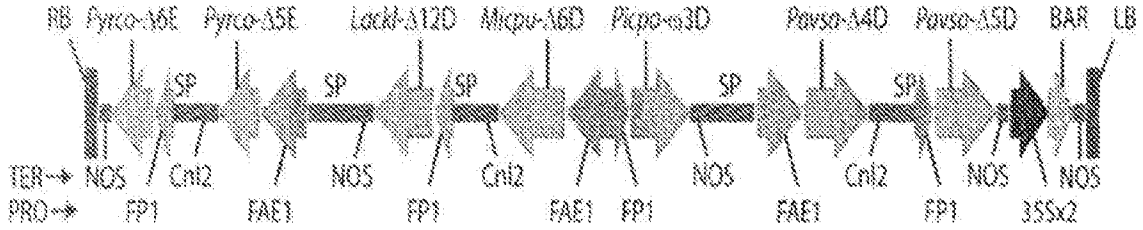
17. Спосіб отримання етилового ефіру поліненасичених жирних кислот, що включає переестерифікацію ТАГ в ліпідах, екстрагованих з насіння за п. 9, з отриманням етилового ефіру.


ацетил-КоА
малоніл-КоА
18:1Δ9
Δ12 дес
18:2Δ9,12 (ЛК)
Δ6 дес
Δ15 дес
18:3Δ6,9,12 (ГЛК)
18:3Δ9,12,15 (АЛК)
Δ9 ело
Δ6 ело
Δ6 дес
Δ9 ело
ω6
ω3
20:2Δ11,14
20:3Δ8,11,14 (ДГЛК)
18:4Δ6,9,12,15 (СДК)
20:3Δ11,14,17
Δ8 дес
Δ5 дес
Δ6 ело
Δ8 дес
20:4Δ5,8,11,14 (АРК)
20:4Δ8,11,14,17(ЭТК)
Δ17 дес
Δ5 дес
20:5Δ5,8,11,14,17 (ЭПК)
Δ5 ело
Δ7 ело
22:5Δ7,10,13,16,19 (ДПК)
24:5Δ9,12,15,18,21
Δ4 дес
Δ6 дес
22:6Δ4,7,10,13,16,19 (ДГК)
24:6Δ6,9,12,15,18,21
β-окислення

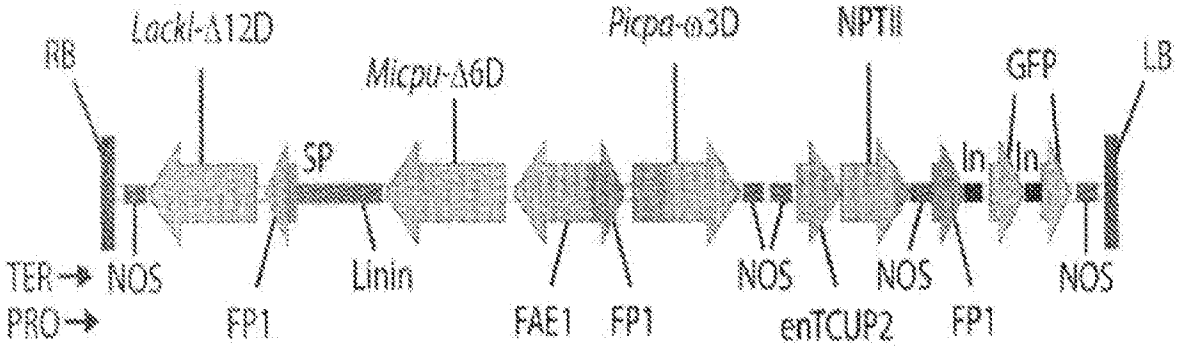
Фіг. 1



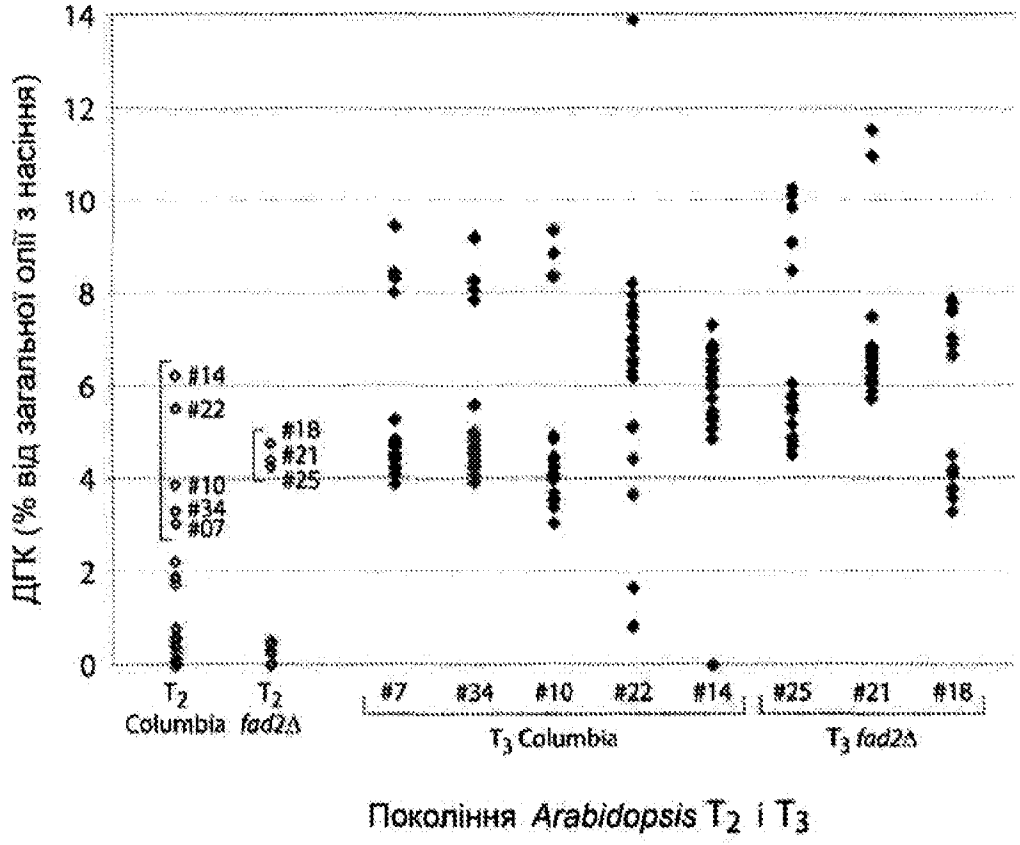
Фіг. 2



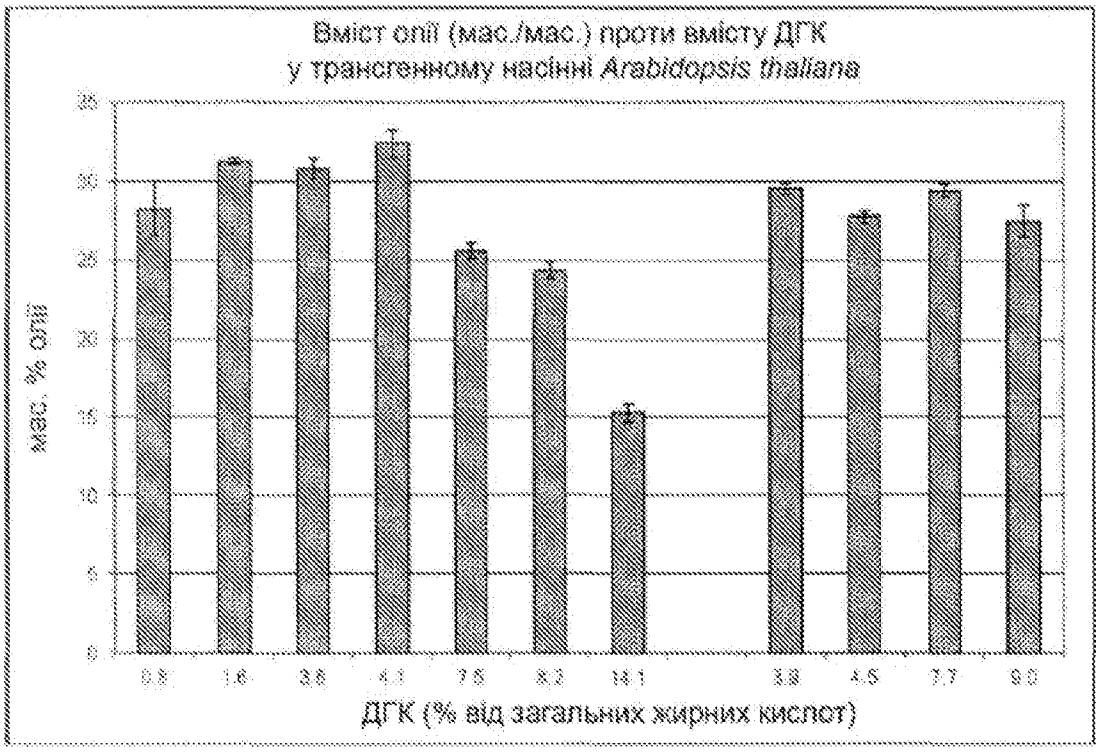
Фіг. 3



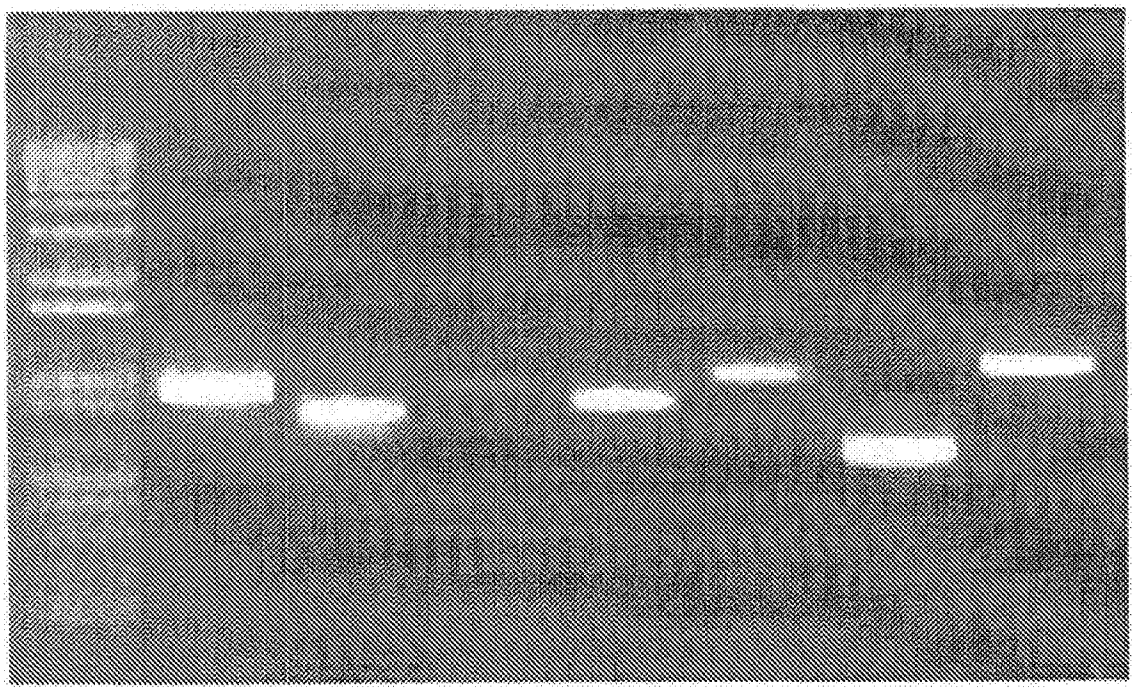
Фіг. 4


ДГК (% від загальної олії з насіння)
14
12
10
8
6
4
2
0
#14
#22
#10
#34
#07
#18
#21
#25
T2 Columbia
T2 fad2Δ
#7
#34
#10
#22
#14
#25
#21
#18
T3 Columbia
T3 fad2Δ
Покоління Arabidopsis T2 і T3

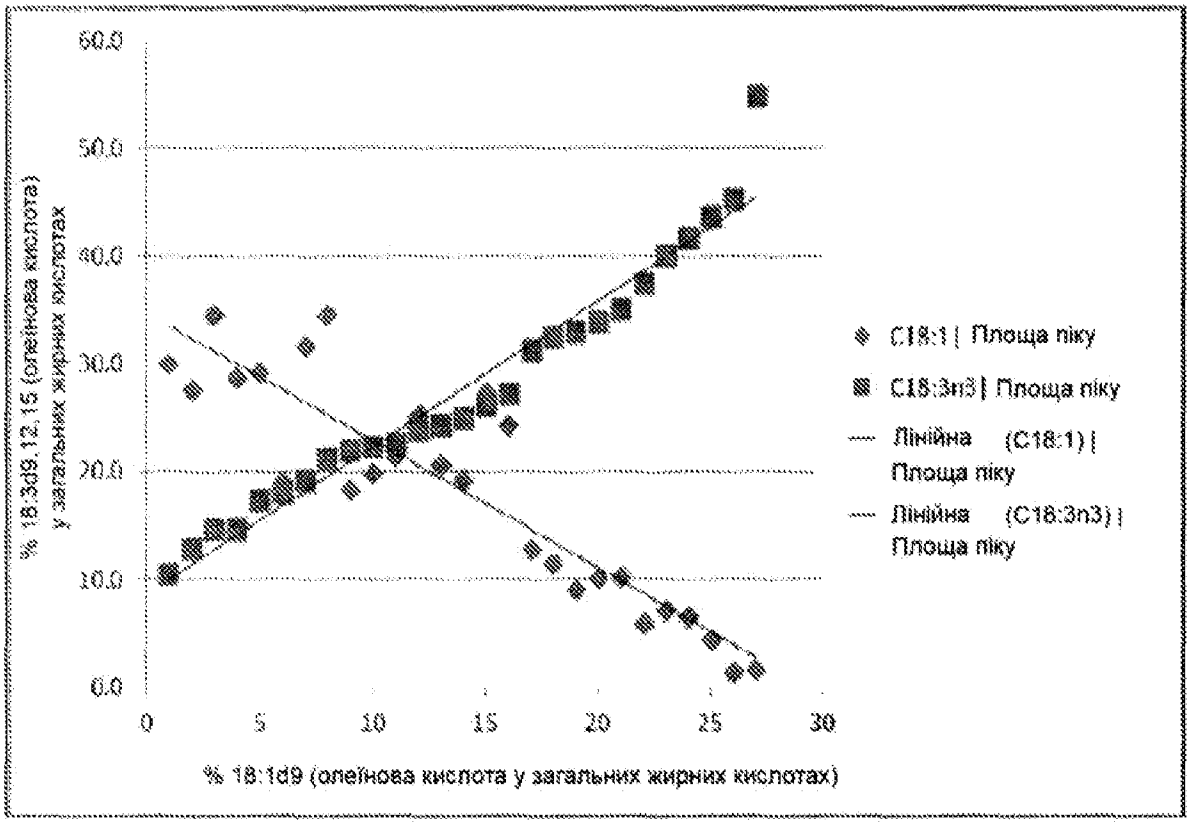
Фіг. 5


Вміст олії (мас./мас.) проти вмісту ДГК
у трансгенному насінні Arabidopsis thaliana
мас. % олії
0.8
1.6
3.8
4.1
7.5
8.3
14.1
3.8
4.5
7.7
9.0
ДГК (% від загальних жирних кислот)

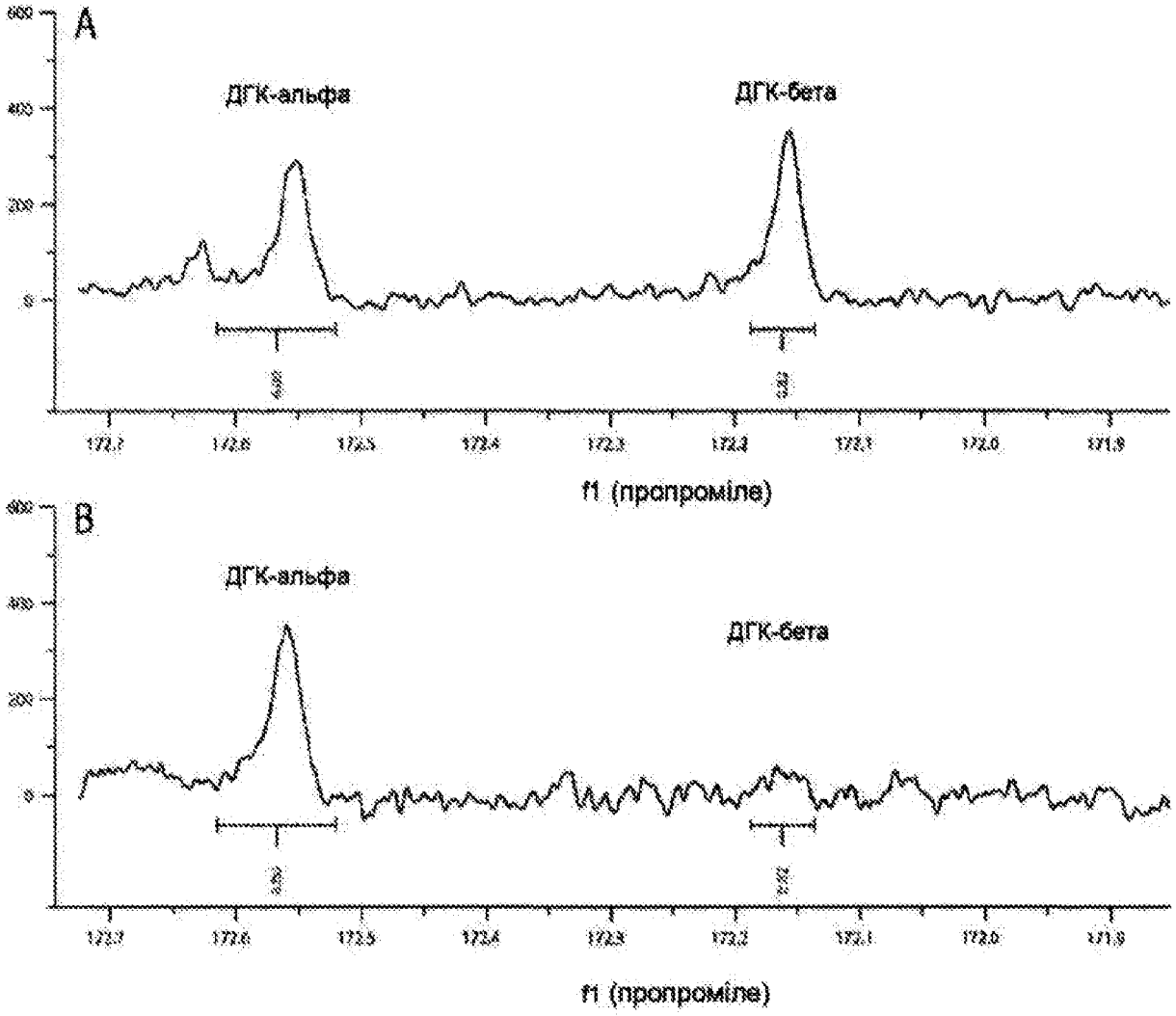
Фіг. 6



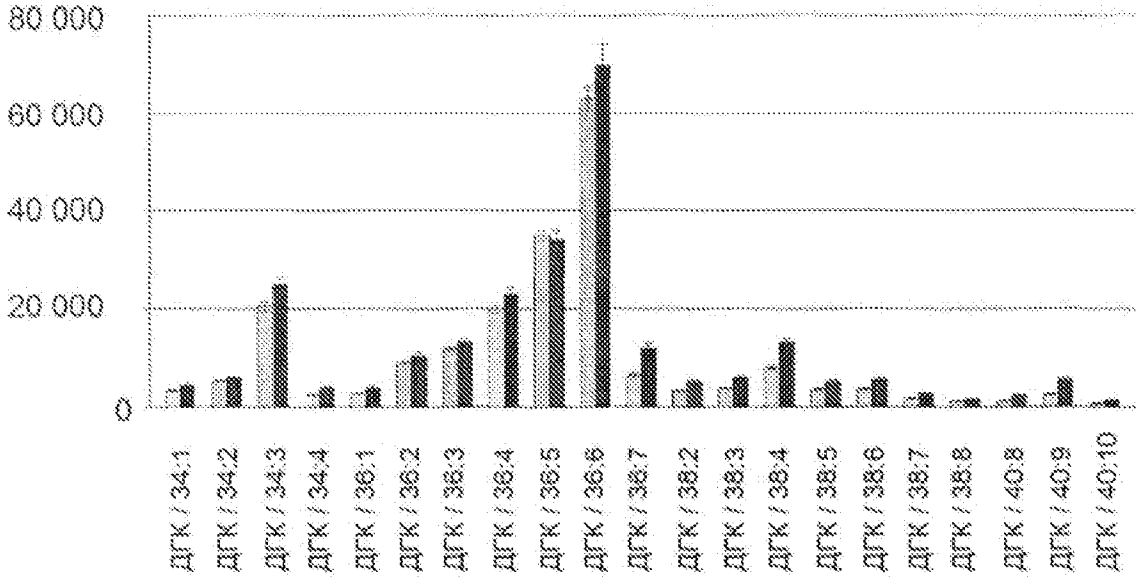
Фіг. 7


60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
0
5
10
15
20
25
30
% 18:3d9,12,15 (олеїнова кислота) у загальних жирних кислотах
% 18:1d9 (олеїнова кислота у загальних жирних кислотах)
C18:1 | Площа піку
C18:3n3 | Площа піку
Лінійна (C18:1) | Площа піку
Лінійна (C18:3n3) | Площа піку

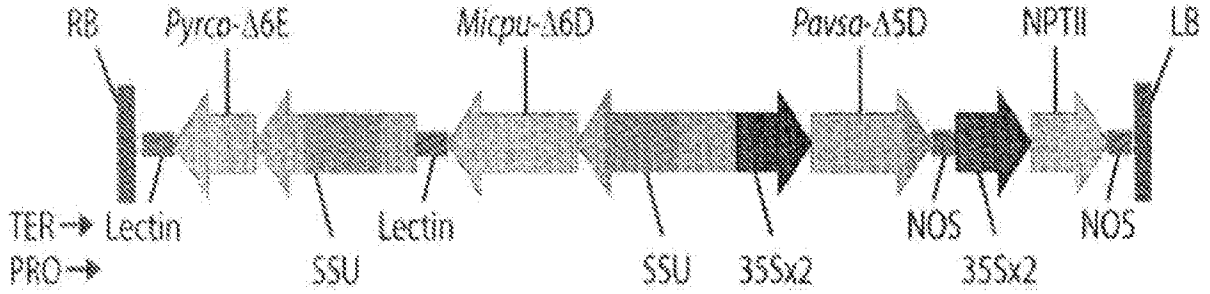
Фіг. 8


A
ДГК-альфа
ДГК-бета
f1 (пропроміле)
B
ДГК-альфа
ДГК-бета
f1 (пропроміле)

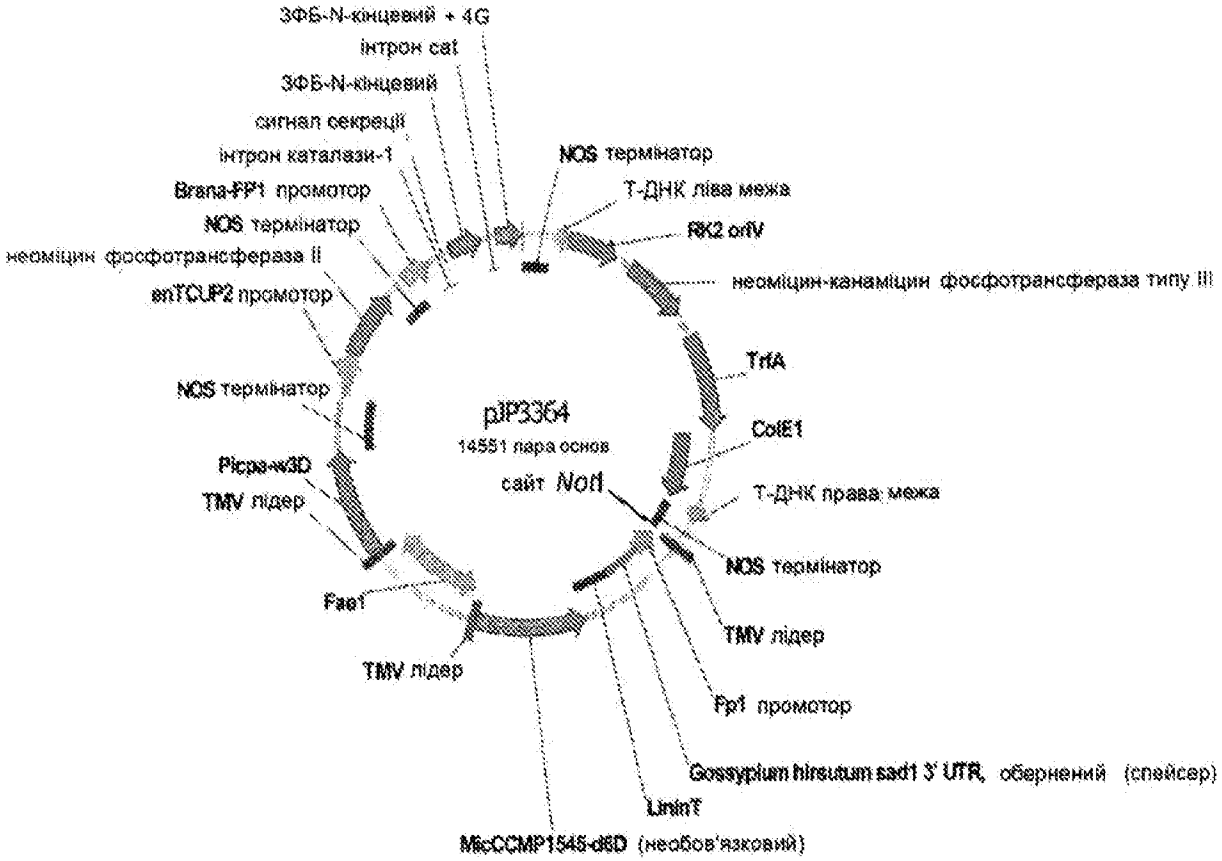
Фіг. 9


80 000
60 000
40 000
20 000
0
ДГК / 34:1
ДГК / 34:2
ДГК / 34:3
ДГК / 34:4
ДГК / 36:1
ДГК / 36:2
ДГК / 36:3
ДГК / 36:4
ДГК / 36:5
ДГК / 36:6
ДГК / 38:7
ДГК / 38:2
ДГК / 38:3
ДГК / 38:4
ДГК / 38:5
ДГК / 38:6
ДГК / 38:7
ДГК / 38:8
ДГК / 40:8
ДГК / 40:9
ДГК / 40:10

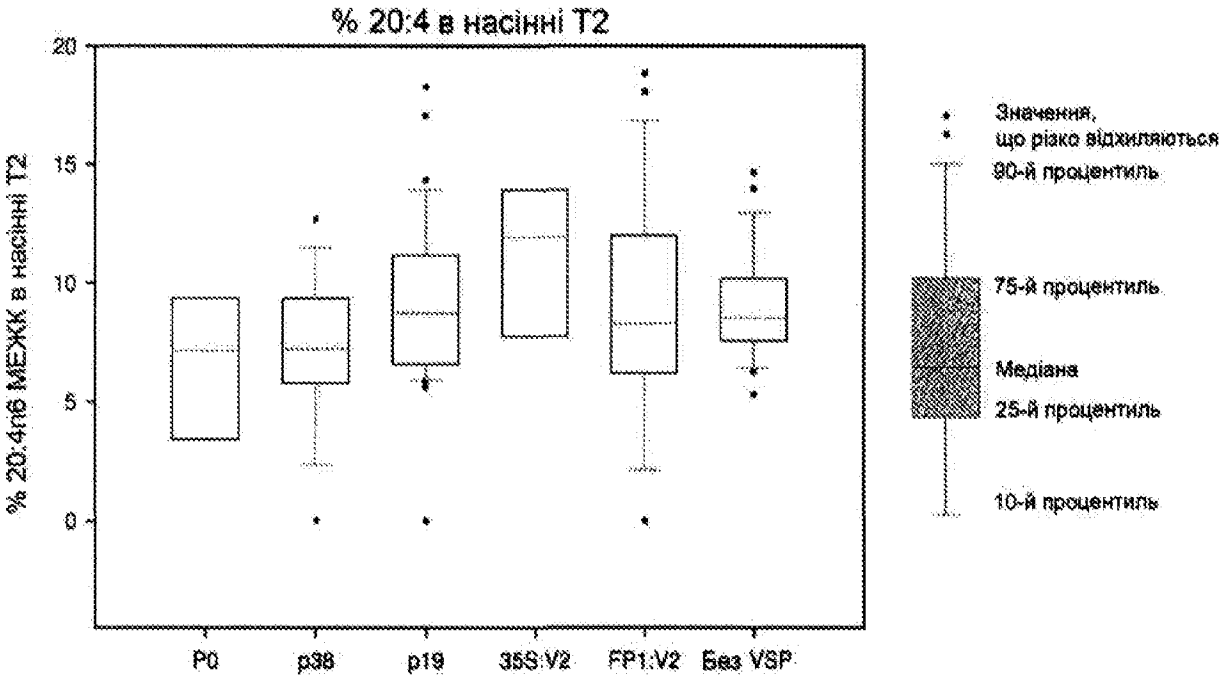
Фіг. 10


RB
Pyrco-Δ6E
Micpu-Δ6D
Pavsa-Δ5D
NPTII
LB
TER→ Lectin
PRO→
SSU
Lectin
SSU
35Sx2
NOS
35Sx2
NOS

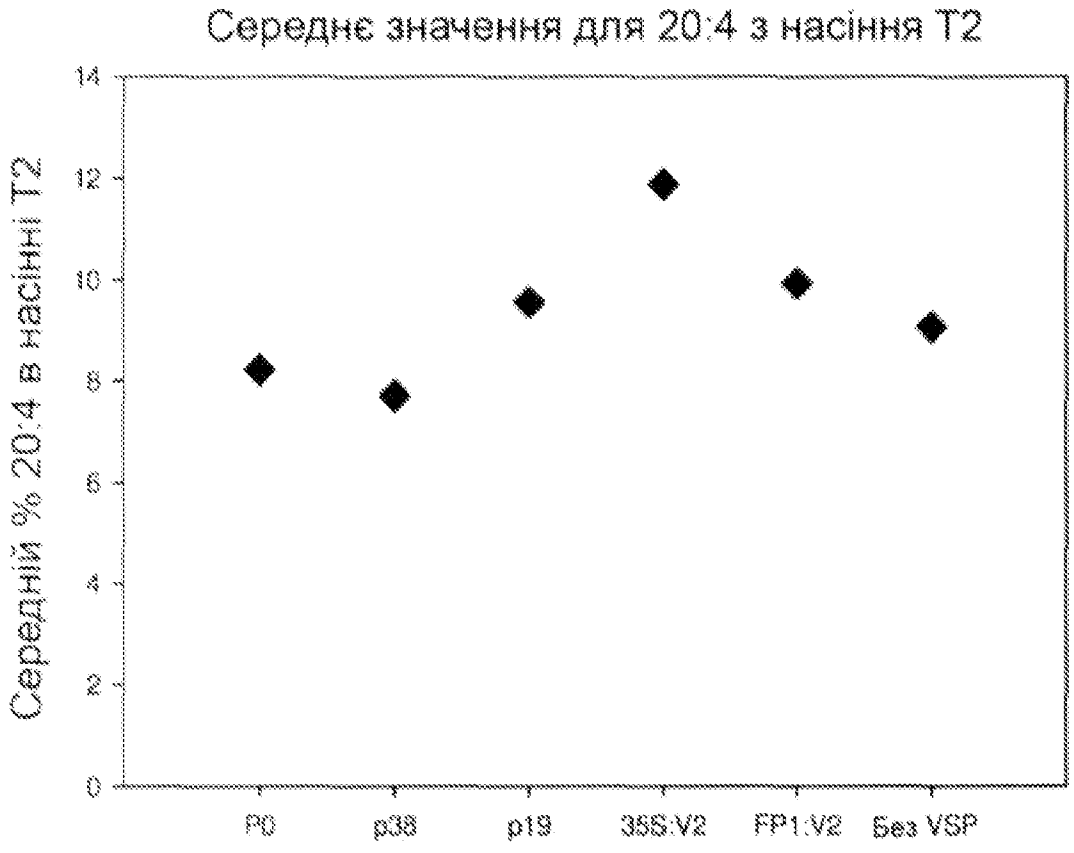
Фіг. 11


ЗФБ-N-кінцевий + 4G
інтрон cat
ЗФБ-N-кінцевий
сигнал секреції
інтрон каталази-1
Brana-FP1 промотор
NOS термінатор
неоміцин фосфотрансфераза II
enTCUP2 промотор
NOS термінатор
Picpa-ω3D
TMV лідер
Fae1
TMV лідер
NOS термінатор
Т-ДНК ліва межа
RK2 oriV
неоміцин-канаміцин фосфотрансфераза типу III
TrfA
ColE1
Т-ДНК права межа
NOS термінатор
TMV лідер
Fp1 промотор
Gossypium hirsutum sad1 3' UTR, обернений (спейсер)
UminT
MicCCMP1545-d6D (необов'язковий)
pJP3364
14551 пара основ
сайт Not1

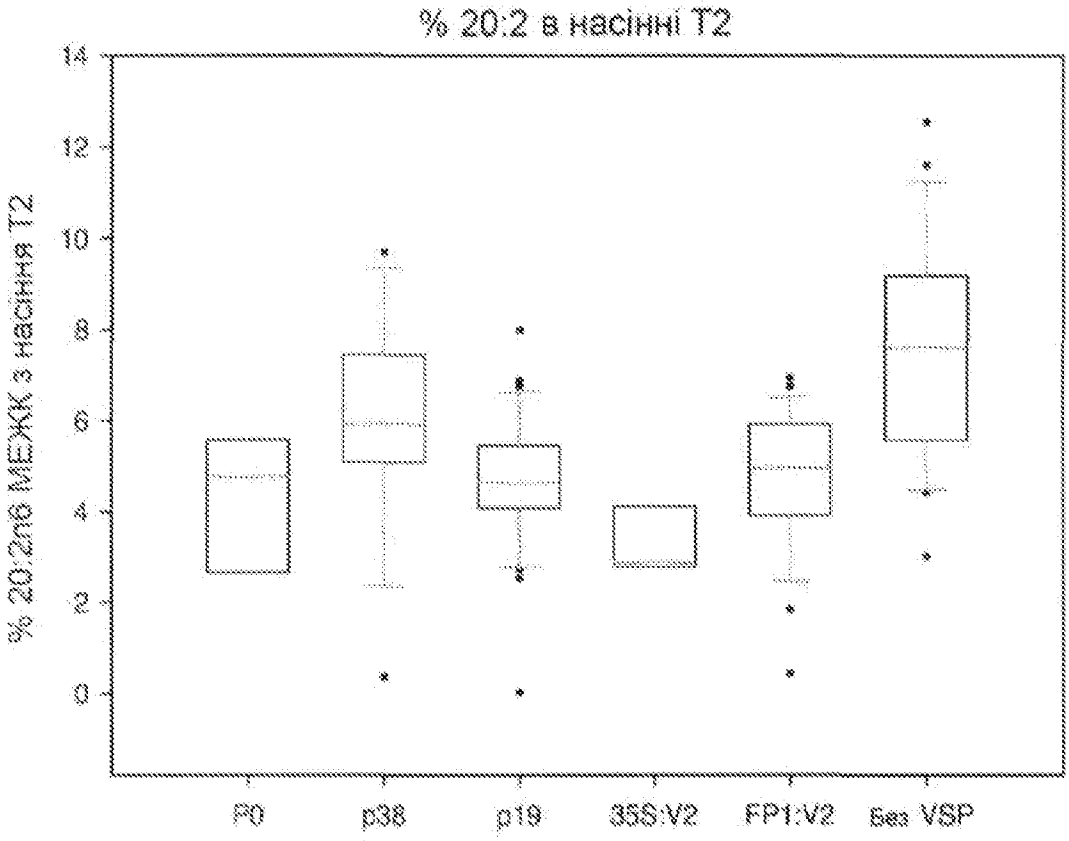
Фіг. 12


% 20:4 в насінні T2
% 20:4n6 МЕЖК в насінні T2
20
15
10
5
0
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Без VSP
Значення, що різко відхиляються
90-й процентиль
75-й процентиль
Медіана
25-й процентиль
10-й процентиль

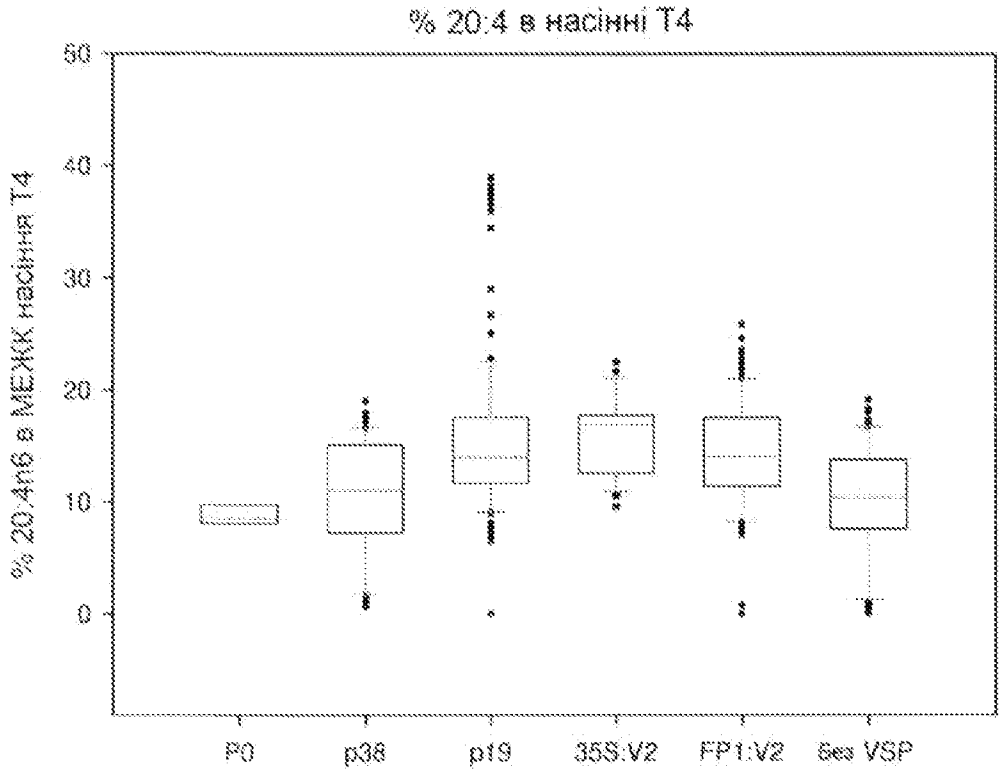
Фіг. 13


Середнє значення для 20:4 з насіння T2
Середній % 20:4 в насінні T2
14
12
10
8
6
4
2
0
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Без VSP

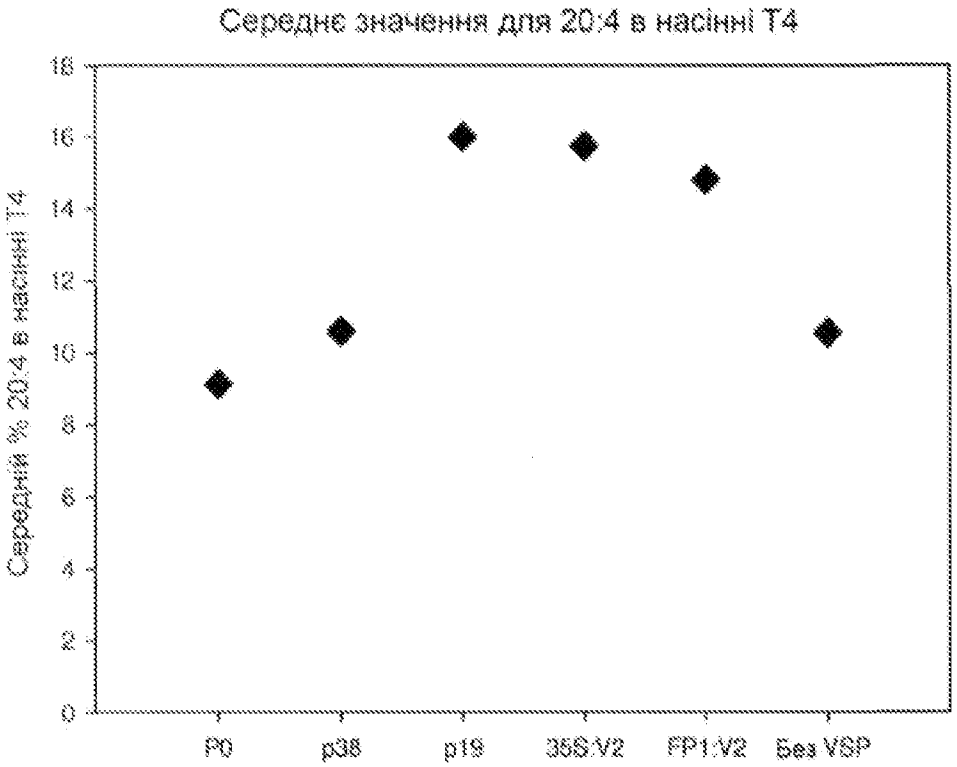
Фіг. 14


% 20:2 в насінні T2
% 20:2n6 МЕЖК з насіння T2
0
2
4
6
8
10
12
14
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Без VSP

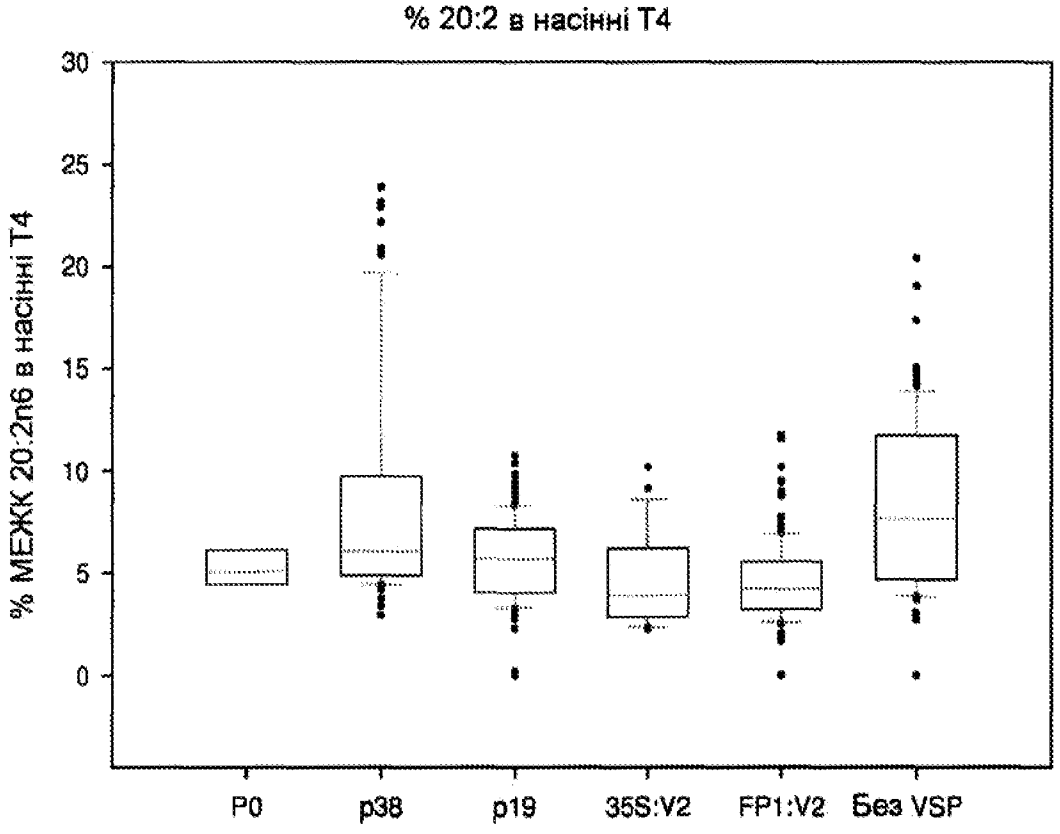
Фіг. 15


% 20:4 в насінні T4
% 20:4n6 в МЕЖК насіння T4
0
10
20
30
40
50
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Без VSP

Фіг. 16

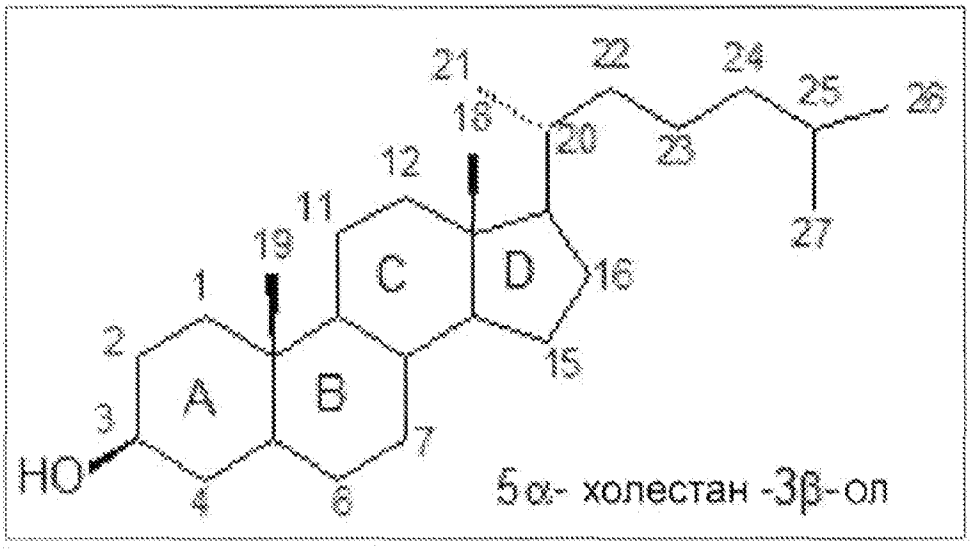

Середнє значення для 20:4 в насінні T4
Середній % 20:4 в насінні T4
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Без VSP

Фіг. 17

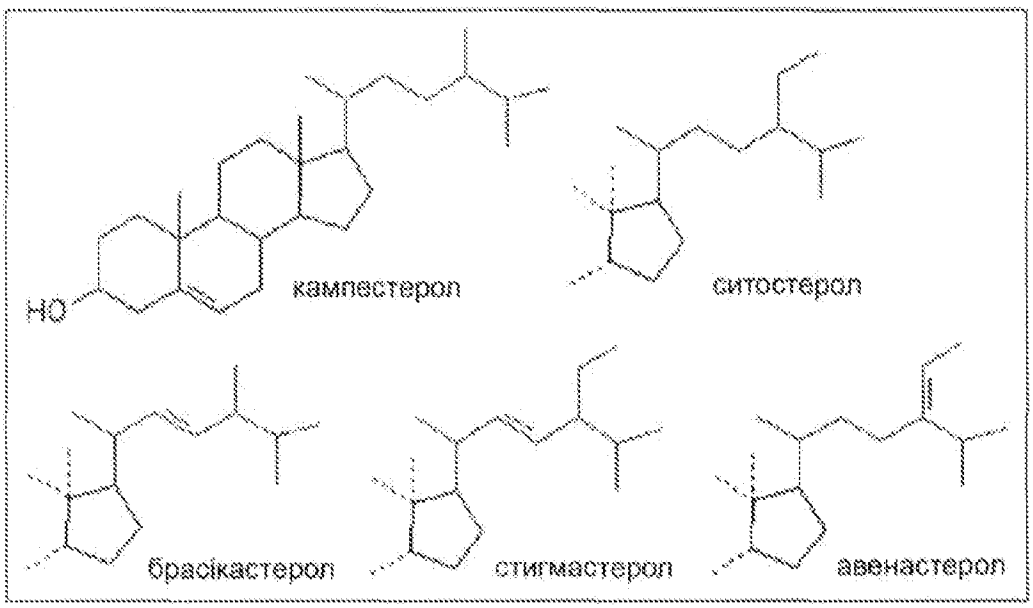

% 20:2 в насінні T4
% МЕЖК 20:2n6 в насінні T4
0
5
10
15
20
25
30
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Без VSP

Фіг. 18

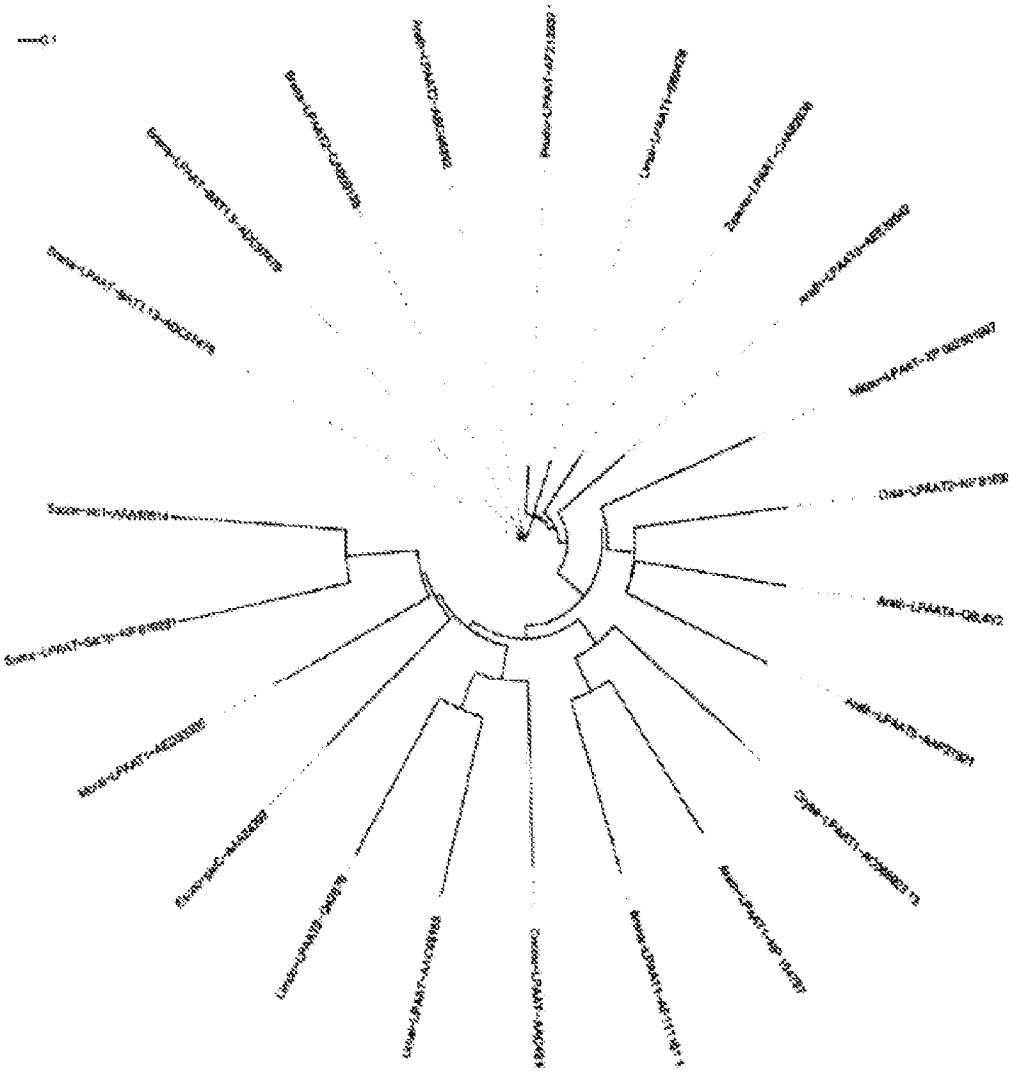
A)


21
22
24
25
26
18
20
23
27
12
11
19
C
D
16
1
2
15
A
B
3
7
HO
4
6
5α- холестан -3β-ол

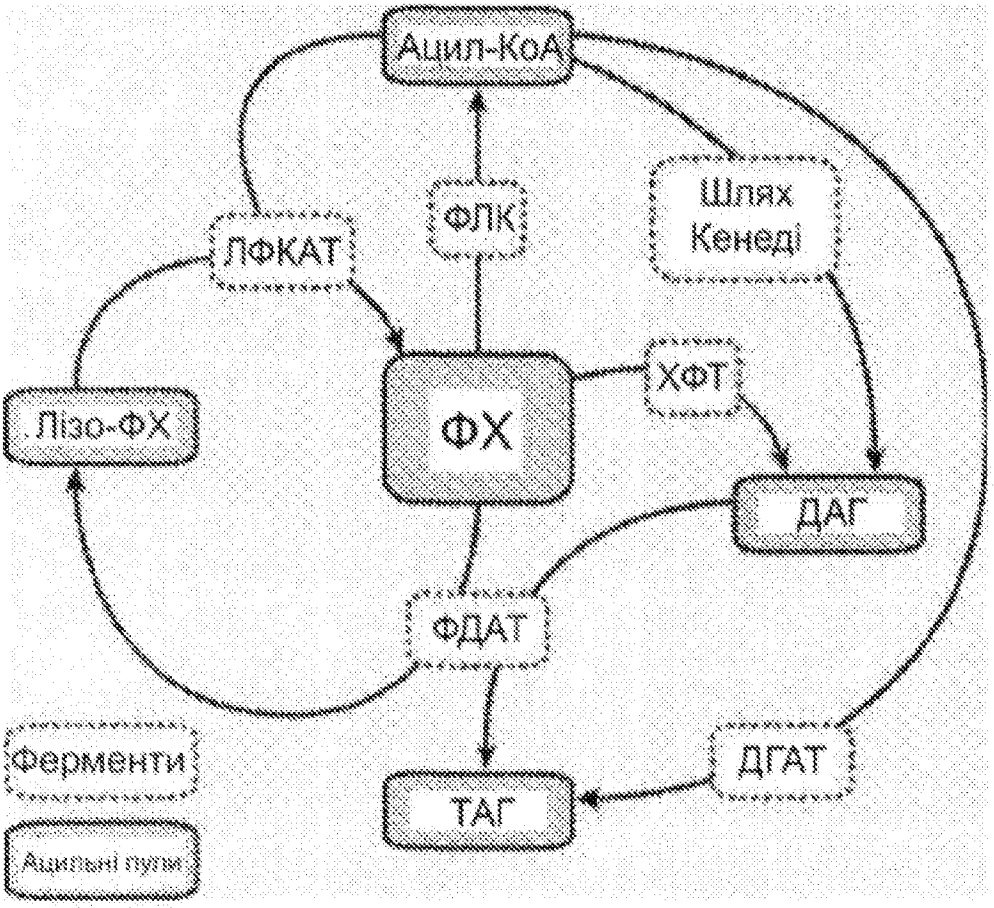
B)


HO
кампестерол
ситостерол
брасікастерол
стигмастерол
авенастерол

Фіг. 19



Фіг. 20



Фіг. 21

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Дмитра Годзенка, 1, м. Київ – 42, 01601