

Винахід стосується нового гена елонгази з наведеними в послідовностях SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 або їх гомологів, похідних або аналогів, генного конструкта, який містить ці гени або їх гомологи, похідні або аналоги, а також їх застосування.

Винахід стосується також і вектора або трансгенних організмів, які містять ген елонгази з послідовністю SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 або його гомологів, похідних або аналогів. Далі винахід стосується застосування послідовностей генів елонгази одних або в комбінації з іншими елонгазами і/або іншими генами біосинтезу кислот жирного ряду. Винахід стосується також і нового гена елонгази з послідовністю SEQ ID NO:1 або його гомологів, похідних або аналогів.

Далі винахід стосується способу одержання поліненасичених кислот жирного ряду, а також способу внесення ДНК в організми, які виробляють велику кількість олій і, зокрема, олій з високим вмістом поліненасичених кислот жирного ряду. Крім того, винахід стосується композиції олій і/або кислот жирного ряду з високим вмістом поліненасичених кислот жирного ряду із щонайменше двома подвійними зв'язками і/або композицій триацилгліцерину з високим вмістом поліненасичених кислот жирного ряду із щонайменше двома подвійними зв'язками.

Певні продукти і побічні продукти наявних у природі процесів обміну речовин у клітинах корисні для широкого спектра промисловості, включаючи промисловість кормів, харчових, косметичних і фармацевтичних засобів. До цих, що позначаються спільно як "тонкі хімікати", молекул відносяться ліпіди і кислоти жирного ряду, серед яких поліненасичені кислоти жирного ряду представляють особливий клас.

Поліненасичені кислоти жирного ряду (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) додають, наприклад, у композиції дитячого харчування, щоб одержати більш високу поживну цінність цих препаративних форм. Поліненасичені кислоти жирного ряду здійснюють, наприклад, позитивний вплив на рівень холестерину в крові людини і тому придатні для захисту від серцевих захворювань. Тонкі хімікати і поліненасичені кислоти жирного ряду можуть виділятися з тваринних джерел, як наприклад, в риби, або з мікроорганізмів. Вирощуванням цих організмів можна одержувати і виділяти велику кількість однієї або декількох бажаних молекул.

Особливо придатними мікроорганізмами для одержання поліненасичених кислот жирного ряду є такі мікроорганізми, як штами *Thraustochytrium* або *Schizochytrium*, такі водорості, як *Phaeodactylum tricornutum* або види *Cryptocodinium*, такі інфузорії, як *Stylonichia* або *Colpidium*, такі гриби, як *Mortierella*, *Entomophthora* або *Mucor*. За допомогою селекції штамів було розвинуто багато штамів-мутантів або відповідних мікроорганізмів, які виробляють ряд корисних сполук, що включають поліненасичені кислоти жирного ряду. Селекція штамів з підвищеним виробництвом певних молекул представляє собою, однак, складний процес, що займає багато часу. Крім того, недоліком є те, що за допомогою одного певного мікроорганізму можна одержувати тільки певні ненасичені кислоти жирного ряду, відповідно, тільки певний спектр кислот жирного ряду.

Альтернативно до цього виробництво тонких хімікатів може здійснюватися виробництвом у великих масштабах рослин, які розвинуті таким чином, що вони виробляють вищенаведені поліненасичені кислоти жирного ряду. Особливо добре придатними для цієї мети рослинами є рослини з олійними плодами, які містять велику кількість ліпідних сполук, такі, як рапс, канола, льон, соя, соняшник, огірочник і енотера. Однак, придатні також і інші корисні рослини, які містять олії або ліпіди і кислоти жирного ряду, такі, як наведені в описі до даного винаходу. За допомогою звичайних методів розведення був розроблений ряд рослин-мутантів, які виробляють спектр бажаних ліпідів і кислот жирного ряду, співфакторів і ферментів. Селекція нових сортів рослин з підвищеним виробництвом певної молекули є складним процесом, який потребує багато часу, і навіть іноді неможлива, якщо сполуки у відповідних рослин немає в природі, як у випадку поліненасичених кислот жирного ряду з 20 і 22 атомами вуглецю і таких з більш довгими вуглецевими ланцюгами.

Даний винахід пропонує нові молекули нуклеїнових кислот, які придатні для ідентифікації і виділення генів елонгази біосинтезу поліненасичених кислот жирного ряду і які можуть застосовуватися для модифікації олій, кислот жирного ряду, ліпідів, сполук, що походять від ліпідів, і особливо переважно для одержання поліненасичених кислот жирного ряду, тому що дотепер є потреба в нових генах, які кодують ферменти, що беруть участь у біосинтезі ненасичених кислот жирного ряду і забезпечують їх одержання в технічних масштабах. Зокрема, є потреба у ферментах біосинтезу кислот жирного ряду, які дозволяють елонгацію поліненасичених кислот жирного ряду з двома і більш подвійними зв'язками в молекулі. Нуклеїнові кислоти, що заявляються, кодуєть ферменти, які мають такі властивості.

Такі мікроорганізми, як *Phaeodactylum*, *Colpidium*, *Mortierella*, *Entomophthora*, *Mucor*, *Cryptocodinium*, також інші водорості, гриби, інфузорії і рослини, зокрема, олійні рослини, застосовуються в промисловості для одержання великої кількості тонких хімікатів у великих масштабах.

За умови наявності векторів клонування і генетичної маніпуляції вищенаведених мікроорганізмів і інфузорій, описуваних у WO 98/01572 і WO 00/23604, або водоростей або споріднених організмів, таких, як *Phaeodactylum tricornutum*, описуваних авторами Falcatore і ін. [1999, *Marine Biotechnology* 1(3):239-251]; а також авторами Dunahay і ін. [1995, *Genetic transformation of diatoms*, *J. Phycol.* 31:10004-1012] і в джерелах, що цитуються в них, молекули нуклеїнових кислот, що заявляються, можуть застосовуватися для генетичних змін цих організмів, так що вони стають кращими виробниками одного або декількох тонких хімікатів, особливо ненасичених кислот жирного ряду. Ця підвищена продуктивність або ефективність виробництва одного тонкого хімікату може викликатися шляхом здійснення прямої маніпуляції над геном, що заявляється, або непрямой маніпуляції над геном.

Мох і водорості є єдиними відомими рослинними системами, які виробляють значні кількості поліненасичених кислот жирного ряду, таких, як арахідонова кислота (ARA) і/або ейкозапентаєнова кислота (EPA) і/або докозугексаєнова кислота (DHA). Мош містить поліненасичені кислоти жирного ряду в мембранових ліпідах, у той час як водорості, споріднені з водоростями організми й окремі гриби акумулюють кількість поліненасичених кислот жирного ряду в триацилгліцерольній фракції, які варті того, щоб згадати тут. Внаслідок цього молекули нуклеїнової кислоти, які виділяються з таких штамів, що акумулюють поліненасичені кислоти жирного ряду також і в триацилгліцерольній фракції, особливо придатні для модифікації систем

виробництва ліпідів і поліненасичених кислот жирного ряду в одному хазяїні, зокрема в мікроорганізмах, приведених вище, і в рослинах, таких, як олійні рослини, наприклад, рапс, канولا, льон, соя, соняшник, огірочник, рицина, олійна пальма, *Carthamus tinctorius*, кокосовий горіх або какао. Далі нуклеїнові кислоти з мікроорганізмів, що акумулюють триацилгліцерол, можуть застосовуватися для ідентифікації таких послідовностей ДНК і ферментів в інших видах, які придатні для модифікації біосинтезу молекул-попередників поліненасичених кислот жирного ряду у відповідних організмах. Зокрема, такі мікроорганізми, як *Cryptocodium cohni* і *Thraustochytrium species* є мікроорганізмами, що акумулюють такі поліненасичені кислоти жирного ряду, як ARA, EPA або DHA у триацилгліцерилах. *Thraustochytrium* є фітогенетично спорідненими зі штамми *Schizochytrium*. Хоча ці організми не мають тісної спорідненості з таким мохом, як *Physcomitrella*, на рівні послідовності ДНК і, зокрема, на рівні поліпептидів можна установити схожість послідовностей у такій мірі, що молекули ДНК у гетерологічних експериментах по гібридизації, порівнянню послідовностей і експериментах із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) також ідентифіковані, виділені і функціонально охарактеризовані з еволюційно дуже віддалених організмів. Зокрема, можна одержувати консенсусні послідовності, які придатні для гетерологічного скринінга або для функціонального комплементування і передбачення функцій гена в третіх видах. Здатність ідентифікувати ці функції, наприклад, передбачення специфічності субстрату, може мати істотне значення. Далі, ці молекули нуклеїнової кислоти можуть служити як опорні послідовності для картування споріднених геномів або для одержання ПЛР-затравок.

Нові молекули нуклеїнових кислот кодують білки, які позначаються тут як специфічних елонгаз поліненасичених кислот жирного ряду (PSE). Ці специфічні елонгази поліненасичені кислоти жирного ряду (PSE) можуть виконувати, наприклад, функцію, яка бере участь в обміні речовин (наприклад, у біосинтезі або розщепленні) сполук, що необхідні для синтезу ліпідів або кислот жирного ряду, таких, як поліненасичені кислоти жирного ряду або ж у трансмембранному транспортуванні одного або декількох композицій ліпідів і/або кислот жирного ряду або в клітину або з клітини.

У даному винаході докладно представлене виділення таких генів елонгази. У перший раз заявником були виділені гени елонгази, що придатні для виробництва довго ланцюгових поліненасичених кислот жирного ряду, переважно, з більш ніж вісімнадцятьма або двадцятьма атомами вуглецю у вуглецевому ланцюзі кислоти жирного ряду і/або щонайменше з двома подвійними зв'язками у вуглецевому ланцюзі і при цьому походять з типових організмів, які містять велику кількість поліненасичених кислот жирного ряду в триацилгліцериловій фракції. Внаслідок цього мова йде тут про ген специфічної елонгази полізаміщеної кислоти жирного ряду (PSE), відповідно про гени або білки (PSE). Інші відомі патентні заявки і публікації не розкривають і не показують функціонально активний PSE-ген, незважаючи на те, що є різні відомі патентні заявки, які показують елонгацію насичених кислот жирного ряду з короткими або середніми ланцюгами (WO 98/46776 і US 5,475,099) або елонгацію або одержання довголанцюгових кислот жирного ряду, які мають не більше одного подвійного зв'язку або приводять до довголанцюгової кислоти жирного ряду (див.: WO 98/54954, WO 96/13582, WO 95/15387). Даний винахід описує виділення нових елонгаз з новими властивостями. Виходячи з приведеної в SEQ ID NO:1 послідовності можна було виявити інші нуклеїнові кислоти, які кодують елонгази, що елонгують ненасичені кислоти жирного ряду.

Такі публікації, як WO 99/64616, WO 98/46763, WO 98/46764, WO 98/46765, описують одержання поліненасичених кислот жирного ряду в трансгенних рослинах і показують клонування і функціональну експресію відповідних активностей десатурази, зокрема, із грибів, однак не кодуючи PSE ген або функціональну PSE-активність (при цьому PSE означає специфічну поліненасиченим кислотам жирного ряду елонгазу). Експресія активності десатурази приводить до зміщення вмісту кислот жирного ряду в трансгенних рослинах, однак, підвищення вмісту ненасичених кислот жирного ряду тут не спостерігається. У цих публікаціях описується одержання триєнової кислоти з 18 атомами вуглецю у вуглецевому ланцюзі на основі гама-ліноленової кислоти, однак, не показується одержання особливо довголанцюгових поліненасичених кислот жирного ряду (з 20 і більше атомами вуглецю у вуглецевому ланцюзі, а також триєнових кислот більш ненасичених типів).

Для одержання довголанцюгових поліненасичених кислот жирного ряду поліненасичені кислоти жирного ряду з 18 або 20 атомами вуглецю повинні подовжуватися за рахунок ферментативної активності елонгази щонайменше на два атоми вуглецю. Послідовність нуклеїнових кислот за винаходом SEQ ID NO:1 кодує першу елонгазу рослин, яка може елонгувати жирні кислоти з 18 або 20 атомами вуглецю з щонайменше двома подвійними зв'язками в кислоті жирного ряду щонайменше на два атоми вуглецю. Після одного циклу подовження ця ферментативна активність приводить до C<sub>20</sub>-кислоти жирного ряду і після двох, трьох і чотирьох циклів подовження до кислот жирного ряду з 22, 24 або 26 атомами вуглецю. За допомогою інших описуваних елонгаз (SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11) можуть бути синтезовані також і інші довголанцюгові поліненасичені кислоти жирного ряду. Вони можуть застосовуватися окремо, декілька або в сумі з елонгазою поліненасиченої жирної кислоти з моху *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:1) для підвищення вмісту поліненасиченої кислоти жирного ряду в новому способі одержання поліненасичених кислот жирного ряду. Активність елонгази згідно з винаходом приводить переважно до кислот жирного ряду з 20 атомами вуглецю з щонайменше двома подвійними зв'язками в молекулі кислоти жирного ряду, переважно з трьома або чотирма подвійними зв'язками в молекулі кислоти жирного ряду і/або до кислоти жирного ряду з 22 атомами вуглецю із щонайменше двома подвійними зв'язками в молекулі, переважно, з п'ятьма або шістьма подвійними зв'язками в молекулі. Після того, як відбулося подовження за допомогою ферменту згідно з винаходом, можуть здійснюватися інші стадії дезатурації, щоб одержати високо ненасичені кислоти жирного ряду. Тому продукти активності елонгази і можливих інших дезатурацій приводять до кращих поліненасичених кислот жирного ряду з високим ступенем дезатурації, до таких, як докозудієнова кислота, арахідінова кислота, ω6-ейкозатриєнодіомо-γ-ліноленова кислота, ейкозапентаєнова кислота, ω3-ейкозатриєнова кислота, ω3-ейкозатетраєнова кислота, докозупентаєнова кислота або докозугексаєнова кислота. Субстратами ферментативної активності згідно з винаходом є, наприклад, таксола кислота;

7,10,13-гексадекатрієнова кислота, 6,9-октадекадієнова кислота, ліолева кислота, піноленова кислота,  $\alpha$ - або  $\gamma$ -ліноленова кислота або стеаридонова кислота, а також арахідонова кислота, ейкозатетраєнова кислота, докозупентаєнова кислота, ейкозапентаєнова кислота. Кращими субстратами є ліолева кислота,  $\gamma$ -ліноленова кислота і/або  $\alpha$ -ліноленова кислота, а також арахідонова кислота, ейкозатетраєнова кислота, докозупентаєнова кислота, ейкозапентаєнова кислота. Особливо кращими є арахідонова кислота, докозупентаєнова кислота, ейкозапентаєнова кислота. Кислоти жирного ряду, що містять 16 або 18 атомів вуглецю, з щонайменше двома подвійними зв'язками в кислоті жирного ряду можуть подовжуватися ферментативною активністю згідно з винаходом у формі вільної кислоти жирного ряду або у формі естеру, такого як фосфоліпіди, гліколіпіди, сфінголіпіди, фосфогліцериди, моноацилгліцерин, діацилгліцерин або триацилгліцерин.

Для харчування людини особливе значення має кон'югована ліолева кислота "CLA". Під CLA розуміють, зокрема, такі кислоти жирного ряду, як C18:2<sup>9cis 11trans</sup> або ізомер C18:2<sup>10trans, 12cis</sup>, які внаслідок ферментативних систем людини після попадання в організм можуть насичуватися, відповідно елонгуватися і сприяти зміцнювальним здоров'я ефектам. Елонгазами згідно з винаходом можуть елонгуватися також і такі кон'юговані кислоти жирного ряду із щонайменше двома подвійними зв'язками в молекулі і разом з цим такі сприятливі здоров'ю кислоти жирного ряду можуть вводитись в харчування людини. Іншими прикладами для кон'югованих кислот жирного ряду є альфа-паринарна кислота, елеостеаринова кислота і календульну кислота.

За умов векторів клонування для застосування в рослинах і при трансформації рослин, яка описується в публікаціях: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Розділ 6/7, Стр.71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, : Transgenic Plants, том 1, Engineering and Utilization, Видавн.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes та інш., Techniques for Gene Transfer, Transgenic Plants, том 1, Engineering and Utilization, Видавн.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225)), нуклеїнові кислоти згідно з винаходом можуть застосовуватися для змін методом генної інженерії широкого спектра рослин, так що ці рослини стають кращими, більш ефективними виробниками продуктів, що одержують від одного або декількох ліпідів, таких, як поліненасичені кислоти жирного ряду. Це підвищене виробництво або більш висока ефективність виробництва продукту, що одержується від одного з ліпідів, наприклад, поліненасичених кислот жирного ряду, може викликатися прямим впливом маніпуляції або непрямим впливом цієї маніпуляції.

Є ряд механізмів, за допомогою яких можна впливати на зміну PSE-білка згідно з винаходом, на вихід, виробництво і/або ефективність виробництва-тонкого хімікату з олійної рослини або мікроорганізму на основі зміненого білка. Число або активність PSE-білка або PSE-гена можуть бути підвищені, так що може бути одержана більш велика кількість цих сполук, тому що організм не вистачало цієї активності і здатності до біосинтезу перед введенням відповідного гена. Також може давати при цьому переваги і застосування різних дивергентних, тобто різних на рівні ДНК, послідовностей.

Внесення PSE-гена або декількох PSE-генів у організм або клітину може підвищити не тільки процес біосинтезу до кінцевого продукту, але і також підвищити відповідний вміст триацилгліцерину або створити його заново. Число або активність інших генів, що сприяють імпорту поживних речовин, необхідних для біосинтезу одного або декількох тонких хімікатів (наприклад, кислот жирного ряду, полярних і нейтральних ліпідів), може бути також підвищена, так що підвищується концентрація цих попередників, співфакторів або проміжних сполук всередині клітин або всередині накопичувального блоку, внаслідок чого здатність клітини продукувати поліненасичені кислоти жирного ряду підвищується, як викладається нижче. Кислоти жирного ряду і ліпіди самі бажані як тонкі хімікати; оптимізацією активності або підвищенням числа одного або декількох PSE, що беруть участь у біосинтезі цих сполук, або руйнуванням активності одного або декількох PSE, що беруть участь у розкладанні цих сполук, можна підвищити вихід, виробництво і/або ефективність виробництва молекул кислот жирного ряду або ліпідів з рослин або мікроорганізмів.

Мутагенез PSE-гена, що заявляється, може також приводити до PSE-білка зі зміненою активністю, що безпосередньо впливає на виробництво одного або декількох бажаних тонких хімікатів. Наприклад, можна підвищити число або активність PSE-гена, що заявляється, так що нормальні відходи або побічні продукти обміну речовин в клітині (кількість яких можливо внаслідок надвиробництва бажаних тонких хімікатів підвищується) можуть ефективно експортуватися з молекули, перш ніж вони зруйнують інші молекули або процеси всередині клітини (які б знижували життєздатність клітин), або можуть заважати біосинтезу тонких хімікатів (внаслідок чого знижується вихід, виробництво й ефективність виробництва бажаних тонких хімікатів). Далі, відносно великі внутрішньоклітинні кількості бажаних тонких хімікатів можуть бути токсичними щодо клітин або ж можуть заважати механізмам зворотного зв'язку ферментів, таким, як алостерична регуляція, наприклад, якби вона (регуляція) шляхом підвищення активності або кількості інших, наступних по ходу реакції, ферментів або інгібувальних ферментів шляху поліненасичених кислот жирного ряду могла збільшувати алокацію поліненасичених кислот жирного ряду в триацилгліцеридній фракції, то можна було б підвищити життєздатність вихідних клітин, що у свою чергу приводить до кращого розвитку клітин у культурах або до посівного зерна, що виробляє бажані тонкі хімікати. Ген PSE, що заявляється, може бути також таким, що маніпулюється таким чином, що одержується відповідна кількість різних молекул ліпідів і кислот жирного ряду. Це може здійснювати вирішальний вплив на композицію ліпідів мембрани клітини і виробляти нові олії додатково до одержання синтезованих поліненасичених кислот жирного ряду. У зв'язку з тим, що кожний тип ліпиду має різні фізичні властивості, зміна композиції ліпідів мембрани може значно змінювати рухомість мембрани. Зміни рухомості мембрани можуть впливати на транспортування молекул через мембрану, а також на зберігання клітини, причому обидва приведені фактори мають вирішальний вплив на виробництво тонких хімікатів. У рослинах ці зміни можуть впливати також і на інші ознаки, такі, як толерантність щодо абіотичних або біотичних стресових ситуацій.

Біотична й абіотична толерантність до стресу є загальною ознакою, яку бажано передавати як спадковому ознаку на широкий спектр рослин, таких, як кукурудза, пшениця, жито, овес, рис, ячмінь, соєві боби, земляний

горіх, бавовник, рапс і канола, маніок, перець, соняшник і тагетес, такі пасльонові рослини, як картопля, тютюн, баклажани і томати, види горошку, горох, люцерна, чагарникові рослини (кава, какао, чай), види *Salix*, дерева (олійна пальма, кокосова пальма) і витривалі злакові і кормові продукти рільництва. Ці кормові продукти рільництва як інші форми виконання винаходу є кращими цільовими рослинами для генної інженерії. Особливо кращими рослинами згідно з винаходом є олійні рослини, такі, як соєві боби, земляний горіх, рапс, канола, соняшник, сафлор, дерева (олійні пальми, кокосові пальми) або продукти рільництва, такі, як кукурудза, пшениця, жито, овес, пшениця, рис, ячмінь, люцерна або такі рослини, як кави, какао, чай.

Винахід стосується таким чином виділених молекул нуклеїнових кислот (наприклад, кДНК), які включають нуклеотидні послідовності, що кодують специфічну елонгазу поліненасичених кислот жирного ряду PSE або декілька елонгаз PSE або їх біологічно активні частини, або фрагменти нуклеїнових кислот, які як затравки або зонди гібридизації придатні для виявлення або ампліфікації нуклеїнових кислот, що кодують елонгазу PSE, (наприклад, ДНК або мРНК). При особливо кращій формі виконання винаходу молекула нуклеїнової кислоти включає одну з наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 нуклеотидних послідовностей або кодуючу ділянку або комплемент однієї з цих послідовностей. При іншій кращій формі виконання винаходу виділена молекула нуклеїнової кислоти включає нуклеотидну послідовність, яка гібридизована з нуклеотидною послідовністю, представленою в послідовності SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11, або з її частиною або є щонайменше на приблизно 50%, переважно приблизно на 60%, більш переважно щонайменше на 70%, 80% або 90% або ще більш переважно щонайменше приблизно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більше гомологічною до неї. При інших кращих формах виконання винаходу виділена молекула нуклеїнової кислоти кодує одну з наведених у SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотних послідовностей. Кращий ген елонгази PSE має переважно також щонайменше одну з описуваних тут активностей елонгази PSE.

При ще одній формі виконання винаходу виділена молекула нуклеїнової кислоти кодує білок або частину його, причому білок або його частина містить амінокислотну послідовність, яка має настільки достатню гомологію до представленої в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотної послідовності, що білок або його частина зберігають активність елонгази PSE. Переважно білок або його частина, що кодується молекулою нуклеїнової кислоти, зберігає здатність брати участь в обміні речовин необхідних для побудови клітинної мембрани рослин сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани. При ще одній формі виконання білок, що кодується молекулою нуклеїнової кислоти, має гомологію щонайменше на приблизно 50%, переважно щонайменше на приблизно 60% і більш переважно щонайменше на приблизно 70%, 80% або 90% і особливо переважно щонайменше приблизно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більше до представленої в послідовності SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотної послідовності. При ще одній кращій формі виконання білок є білком повної довжини, який в основному частково має гомологію до загальної амінокислотної послідовності SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 (яка походить від представленої в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 однієї відкритої рамки зчитування) і в повній довжині може бути виділена відомими фахівцями методами й експериментами.

При ще одній кращій формі виконання виділена молекула нуклеїнової кислоти походить від *Phytophthora infestans*, *Physcomitrella patens*, *Cryptocodinium cohnii* або *Thraustochytrium* і кодує білок (наприклад, гібридний білок елонгази PSE), що містить біологічно активні домени, що принаймні приблизно на 50% або більше мають гомологію до представленої в послідовності SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотної послідовності і зберігає здатність брати участь в обміні речовин сполук, необхідних для побудови клітинної мембрани рослин або брати участь у транспортуванні молекул через ці мембрани, або набуває щонайменше одну з активностей елонгації в поліненасичених кислотах жирного ряду, таких, як ARA, EPA або DHA, або їх молекул-попередників, або ж має одну з наведених у таблиці 1 активностей, і містить гетерологічні послідовності нуклеїнових кислот, що кодують гетерологічний поліпептид або регуляторні білки.

Таблиця 1

Зразок кислоти жирного ряду від шести трансгенних дріжджових штамів у мл.%. Долі введеної та спожитої  $\gamma$ -ліноленової кислоти виділені числами, написаними жирним шрифтом, долі елонгованих продуктів підкреслені і долі елонгованої  $\gamma$ -ліноленової кислоти виділені числами, написаними жирним шрифтом (останній рядок)

Кислоти жирного ряду [мол.-%]	pYES2	pY2PSE1a	pY2PSE1b	pY2PSE1c	pY2PSE1d
16:0	17,0	17,6	16,4	16,3	17,6
16:1 $\Delta^9$	28,0	26,8	28,0	27,9	25,1
18:0	6,5	6,0	6,4	5,6	6,1
18:1 $\Delta^9$	25,9	23,5	27,0	25,2	21,4
18:3 $\Delta^{6,9,12}$	22,6	15,7	13,2	16,4	22,8
20:3 $\Delta^{8,11,14}$	-	10,3	9,0	8,6	7,1
18:3 $\Delta^{6,9,12}$ елонгація	-	39,6	40,5	34,4	23,7

При іншій формі виконання виділена молекула нуклеїнової кислоти має довжину щонайменше в 15

нуклеотидів і гібридується у жорстких умовах з молекулою нуклеїнової кислоти, що містить представлену в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 нуклеотидну послідовність. Переважно виділена молекула нуклеїнової кислоти відповідає наявній в природі молекулі нуклеїнової кислоти. Особливо бажана виділена молекула нуклеїнової кислоти кодує наявну в природі елонгазу PSE з *Cryptocodium*, *Phytophthora* або *Thraustochytrium* або її біологічно активну частину.

Винахід також стосується векторів, наприклад, рекомбінантних векторів експресії, які містять щонайменше одну молекулу нуклеїнової кислоти згідно з винаходом, і клітини-хазяїни, в які введені ці вектори, зокрема, мікроорганізми, клітини рослин, рослинні тканини, органи і цілі рослини. При одній з форм виконання винаходу така клітина-хазяїн може накопичувати сполуки тонких хімікатів, зокрема, поліненасичені кислоти жирного ряду збираються для виділення бажаних сполук клітини. Композиції (олії, ліпіди, триацилгліцериди, кислоти жирного ряду) або PSE можуть потім виділятися із середовища або клітини-хазяїна, якими для рослин є клітини, які містять і накопичують тонкі хімікати, особливо переважно клітини накопичувальних тканин, таких, як оболонки насіння, бульби, клітини епідермісу і насіння.

Далі винахід стосується генетично змінених рослин, переважно, вищезгаданих рослин, що мають олійні плоди, особливо переважно рослин рапсу, льону або *Physcomitrella patens*, в які введений ген елонгази PSE. При одній із форм виконання винаходу геном рапсу, льону або *Physcomitrella patens* змінений як трансген шляхом введення молекули нуклеїнової кислоти згідно з винаходом, яка кодує дику форму і мутовану послідовність елонгази PSE. При іншій формі виконання винаходу є зміненим ендегенний ген елонгази PSE у геномі організмів *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium*, наприклад, шляхом гомологічної рекомбінації зі зміненим геном PSE або мутагенезу і детекції за допомогою ДНК-послідовності, тобто функціонально зруйнований.

При іншій формі виконання рослинний організм належить до сімейства з *Physcomitrella*, *Ceratodon*, *Funaria*, рапсу або льону, причому *Physcomitrella*, рапс або льон бажані. При ще одній формі виконання винаходу *Physcomitrella*, рапс або льон застосовується для одержання бажаної сполуки, такої, як ліпіди і кислоти жирного ряду, причому поліненасичені кислоти жирного ряду особливо бажані.

При ще одній формі виконання винаходу мох *Physcomitrella patens* може застосовуватися для демонстрації функції гена елонгази при застосуванні гомологічної рекомбінації на базі описуваних у винаході нуклеїнових кислот.

Винахід далі стосується виділеного гена специфічної елонгази поліненасичених кислот жирного ряду (PSE) або його частини, наприклад, його біологічно активної частини. При кращій формі виконання винаходу виділена елонгаза PSE або її частина може брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови мембранної клітини в організмі або клітині рослини сполук або у транспортуванні молекул через мембрани. При ще одній кращій формі виконання винаходу виділена PSE або її частина має достатню гомологію до амінокислотної послідовності, представленій в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12, щоб цей протеїн або його частина зберегла свою здатність брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови мембранної оболонки в мікроорганізмах або клітинах рослин сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани.

Винахід також стосується виділеного препарату однієї елонгази PSE. При кращій формі виконання ген елонгази PSE включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 та SEQ ID NO:12. Далі винахід стосується виділеного білка повної довжини, який має гомологію в основному до загальної амінокислотної послідовності, представленій в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 (які кодуються показаними в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 відкритими рамками зчитування). При іншій формі виконання білок щонайменше на приблизно 50%, переважно щонайменше на приблизно 60% і особливо переважно щонайменше на приблизно 70%, 80% або 90% і більш переважно щонайменше на приблизно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологічний амінокислотній послідовності, представлений в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12. При інших формах виконання винаходу виділена елонгаза PSE має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на приблизно 50% гомологічна до однієї з амінокислотних послідовностей, наведених у SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 і може брати участь в обміні речовин, необхідних для одержання кислот жирного ряду в мікроорганізмі або клітині рослини або у транспортуванні молекул через ці мембрани або ж має одну або декілька елонгуючих поліненасичені кислоти жирного ряду активностей, причому здійснюють елонгацію переважно ненасичених вуглеводневих ланцюгів з 16 або 18 або 20 атомами вуглецю з подвійними зв'язками щонайменше в двох місцях.

Альтернативно до цього виділена PSE може мати амінокислотну послідовність, що кодується нуклеотидною послідовністю, яка гібридується з нуклеотидною послідовністю, представленою в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11, наприклад, гібридується при жорстких умовах, або гомологічна до неї щонайменше на приблизно 50%, переважно щонайменше на приблизно 60%, більш переважно щонайменше на приблизно 70%, 80% або 90% і ще більш переважно щонайменше на приблизно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більше. Також є кращим таке виконання, при якому кращі форми PSE мають також описану тут активність PSE.

Поліпептид специфічної до поліненасичених кислот жирного ряду елонгази PSE або його біологічно активна частина може бути функціонально зв'язаний з неспецифічним поліненасиченим кислотам жирного ряду PSE-поліпептидом, так що утворюється гібридний білок. При кращій формі виконання винаходу цей гібридний білок має активність, яка відрізняється від активності тільки елонгази PSE. При іншій формі виконання винаходу цей гібридний білок бере участь в обміні речовин сполук, які необхідні для синтезу ліпідів або кислот жирного ряду, співфакторів і ферментів у мікроорганізмах і рослинах, або беруть участь у транспортуванні молекул через мембрани клітин. При особливо кращій формі виконання винаходу введення цього гібридного білка в клітину-хазяїн модулює виробництво бажаної сполуки клітинами. При кращому варіанті виконання винаходу ці гібридні білки одержують також активність Δ4-, Δ5- або Δ6-, Δ8-, Δ15-, Δ17- або

Δ19-десатурази одні або в комбінації.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб одержання тонких хімікатів. Цей спосіб полягає або у вирощуванні придатного мікроорганізму або ж у вирощуванні рослинних клітин, тканини, органів або цілої рослини, і включає заявлені нуклеотидні послідовності, представлені в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 або їх гомологи, похідні або аналоги або конструкт гена, що включає послідовності SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 або їх гомологи, похідні або аналоги, або вектор, що містить ці послідовності або конструкт гена, який сприяє експресії молекули нуклеїнової кислоти елонгази PSE, так що має місце виробництво тонких хімікатів. При одній із кращих форм виконання способу, що заявляється, він включає стадію одержання клітини, яка містить послідовність нуклеїнових кислот елонгази згідно з винаходом, причому трансформується клітина з послідовністю нуклеїнових кислот елонгази, з конструктом гена або вектором, який сприяє експресії нуклеїнової кислоти елонгази PSE. При іншій формі виконання винаходу цей спосіб включає стадію одержання тонких хімікатів з культури. При особливо кращій формі виконання способу клітина відноситься до ряду інфузорій, мікроорганізмів, таких, як гриби, або до рослин, зокрема, до рослин з олійними плодами, особливо переважно до мікроорганізмів або олійних рослин.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб модуляції виробництва молекули мікроорганізмом. Цей спосіб містить об'єднання клітини з речовиною, яка модулює активність елонгази PSE або експресію нуклеїнової кислоти PSE, так що виробляється зміна асоційованою клітиною активності щодо такої ж активності речовини. При кращій формі виконання модулюється/модулюються один шлях або два шляхи обміну речовин клітини для ліпідів і кислот жирного ряду, співфакторів і ферментів або ж транспортування сполук через ці мембрани, так що підвищується вихід або виробництво бажаного тонкого хімікату цим мікроорганізмом. Речовина, що модулює активність PSE, може бути такою речовиною, яка стимулює активність PSE або експресію нуклеїнової кислоти PSE або яка може застосовуватися як проміжний продукт при біосинтезі кислоти жирного ряду. Прикладами речовини, яка стимулює активність PSE або експресію нуклеїнової кислоти PSE, є, серед інших, малі молекули, активні елонгази PSE, а також кодуєчі елонгази PSE нуклеїнові кислоти, які введені в клітину. Прикладами речовин, які інгібують активність або експресію елонгази PSE, є, серед інших, малі молекули і/або антисмислові молекули нуклеїнових кислот елонгази PSE.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб модуляції виходу бажаної сполуки з клітини, що містить введення в клітину дикого типу або мутантного гена елонгази PSE, який утримується в окремій плазміді або ж інтегрований у геном клітини-хазяїна. При інтегруванні в геном інтеграція може бути випадковою або здійснюватися такою рекомбінацією, що нативний ген замінюється введеною копією, внаслідок чого модулюється виробництво клітиною бажаної сполуки, або застосуванням гена у формі *trans*, так що ген функціонально зв'язаний з функціональним вузлом експресії, який містить щонайменше одну послідовність, що забезпечує експресію гена, і щонайменше одну послідовність, що забезпечує поліаденілювання функціонально транскрибованого гена.

При кращій формі виконання виходу продукту модифіковані. При ще одній кращій формі кількість бажаного хімікату збільшується, причому кількість небажаних сполук, що заважають, може знижуватися. При особливо кращій формі виконання бажаним тонким хімікатом є ліпід або кислота жирного ряду, співфактор або фермент. При ще більш бажаній формі виконання цими тонкими хімікатами є поліненасичені кислоти жирного ряду. Переважно вони вибираються з групи, яка включає арахідонову кислоту (ARA), ейкозапентаєнову кислоту (EPA) або докозугексаєнову кислоту (DHA).

Опис сутності винаходу.

Згідно із даним винаходом розроблені PSE-нуклеїнові кислоти і молекули білка елонгази PSE, які беруть участь в обміні речовин ліпідів і кислот жирного ряду, співфакторів поліненасичених кислот жирного ряду (PUFA) і ферментів у моху *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Cryptocodinium* або *Traustochytrium* або в транспортуванні ліпофільних сполук через мембрани. Сполуки згідно з винаходом можуть застосовуватися для модуляції виробництва тонких хімікатів з організму, наприклад, з таких мікроорганізмів, як інфузорії, гриби, дріжджі, бактерії, водорості і/або з таких рослин, як кукурудза, пшениця, жито, овес, пшениця, рис, ячмінь, соєві боби, земляний горіх бавовник, таких видів, як рапс, канولا і суперка олійна, перець, соняшник, огірочник, енотера або тагетес, таких пасльонових, як картопля, тютюн, баклажани і томати, видів в'юна, гороху, маніоку, люцерни, чагарникових рослин (кава, какао, чай), видів *Salix*, дерев (олійна пальма, кокосовий горіх) і витривалих злакових і кормових польових культур, або безпосередньо (наприклад, якщо надекспресія або оптимізація білка біосинтезу кислоти жирного ряду має прямий вплив на вихід, виробництво і/або ефективність виробництва кислоти жирного ряду з модифікованих організмів) можуть мати непрямий вплив, який приводить до підвищення виходу, виробництва і/або ефективності виробництва бажаної сполуки або до зниження небажаних сполук (наприклад, якщо модуляція обміну речовин ліпідів і кислот жирного ряду, співфакторів і ферментів приводить до зміни виходу, виробництва і/або ефективності виробництва або вмісту бажаних сполук всередині клітин, що у свою чергу може вплинути на виробництво одного або декількох тонких хімікатів).

Винахід пояснюється нижче більш докладно.

I. Тонкі хімікати і поліненасичені кислоти жирного ряду PUFA

Термін "тонкі хімікати" відомий фахівцю в даній галузі й означає молекули, які виробляються організмами і знаходять застосування в різних галузях промисловості, як, наприклад, фармацевтична, сільсько-господарська і косметична, однак не обмежуються ними. Ці сполуки включають ліпіди, кислоти жирного ряду, співфактори, ферменти і т.п. (такі, наприклад, що описуються в публікації Kuninaka, A. (1996) *Nucleotides and related compounds*, стор.561-612, у публікації *Biotechnology* том. 6, авторів Rehm і ін., Видавн. VCH: Вайнхайм і в наведеній там літературі), ліпіди, насичені і ненасичені кислоти жирного ряду (наприклад, арахідонова кислота), вітаміни і співфактори (такі, що описані у джерелі Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, том. A27, *Vitamins*, стор.443-613 (1996) Видавн. VCH: Вайнхайм і в приведених там літературних джерелах, і в публікації Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) *Nutrition, Lipids, Health and Disease Proceedings of the*

UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, що відбулася 1.-3. вересня 1994 у Пенангі, у Малазії, AOCS Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086, і в наведених у ньому літературних джерелах. Обмін речовин і застосування визначених тонких хімікатів пояснюються нижче більш докладно.

Комбінація різних молекул-попередників і ферментів біосинтезу приводить до одержання різних молекул кислот жирного ряду, що впливає на сполуку мембрани. Можна припустити, що поліненасичені кислоти жирного ряду (PUFAs) не тільки вбудовані в триацилгліцерин, але і також у ліпіди мембран.

Синтез мембран є процесом, який добре характеризується і в якому беруть участь багато компонентів, включаючи ліпіди як частину мембрани Білайра. Виробництво нових кислот жирного ряду, наприклад, поліненасичених кислот жирного ряду (PUFAs), може приводити до нових властивостей функцій мембран всередині клітини або організму.

Клітинні мембрани виконують багато функцій у клітині. Насамперед і в першу чергу мембрана обмежує вміст клітини від оточення, внаслідок чого надає клітині цілісності. Мембрани можуть служити як поріг щодо входу небезпечних або небажаних сполук і також виходу бажаних сполук.

Докладний опис і функції мембран і механізмів, які беруть участь, представлені в публікаціях Bamberg, E., і ін. (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, Q. Rev. Biophys. 26:1-25; Gennis, R.B. (1989) Pores, Channels and Transporters, in: Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, стор.270-322; та Nikaido, H., і Saier, H. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design, Science 258:936-942, і в літературних джерелах, що цитуються в них.

Синтез ліпідів підрозділяється на два етапи: синтез кислот жирного ряду і їх зв'язування з sn-гліцерин-3-фосфатом, а також приєднання або модифікація полярної головної групи. Звичайні ліпіди, що застосовуються в мембрані, містять фосфоліпіди, гліколіпіди, сфінголіпіди і кислоти жирного ряду. Синтез кислот жирного ряду починається з перетворення ацетил-CoA або в малоніл-CoA за допомогою ацетил-CoA-карбоксилази або в ацетил-ACP за допомогою ацетилтрансферази. Після реакції конденсації ці обидві молекули продукту зв'язують разом за допомогою ацетоацетил-ACP, який перетворюється за допомогою ряду реакцій конденсації, відновлення і дегідратації, так що одержується насичена молекула кислоти жирного ряду з бажаною довжиною ланцюга. Виробництво кислот жирного ряду з цих молекул каталізується специфічними десатуразами, а саме або аеробно за допомогою молекулярного кисню або анаеробно (щодо синтезу кислот жирного ряду в мікроорганізмах див. джерело F.C. Neidhardt і ін. (1996) E. coli und Salmonella. ASM Press: Вашингтон, D.C., стор.612-636 і літературні джерела, що містяться там; Lengeler і ін. (Видавн.) (1999) Biology of Procarotes. Thieme: Stuttgart, Нью Йорк, і літературні джерела, що містяться там, а також Magnuson, K., і ін. (1993) Microbiological Reviews 57:522-542 і літературні джерела, що там наведені).

Попередниками для біосинтезу поліненасичених кислот жирного ряду є, наприклад, лінолева і ліноленова кислота. Ці кислоти жирного ряду, що містять 18 атомів вуглецю, повинні подовжуватися до 20 або 22 атомів вуглецю, щоб одержати кислоти жирного ряду типу ланцюга ейкозу і докозу. За допомогою різних десатураз, таких як ферменти, що мають активність  $\Delta 6$ -десатурази,  $\Delta 5$ - і  $\Delta 4$ -десатурази, можуть одержуватися, екстрагуватися і застосовуватися для різних цілей, наприклад, для виробництва кормів, косметичних, фармацевтичних цілей, арахідонова кислота, ейкозапентаєнова кислота і докозупентаєнова кислота, а також різні інші довголанцюгові поліненасичені кислоти жирного ряду.

Для одержання довголанцюгових поліненасичених кислот жирного ряду, згаданих вище, поліненасичені кислоти жирного ряду, що містять 16, 18 або 20 атомів вуглецю, повинні подовжуватися на два атоми вуглецю за допомогою ферментативної активності елонгази. Послідовності нуклеїнових кислот згідно з винаходом кодують першу мікробну елонгазу з типових поліненасичених кислот жирного ряду в продуцентах, які містять триацилгліцерольну фракцію і які можуть подовжувати кислоти жирного ряду, що містять 16 або 18 або 20 атомів вуглецю, з щонайменше двома подвійними зв'язками в кислоті жирного ряду на щонайменше два атоми вуглецю або шляхом послідовного перетворення кислоти жирного ряду з 16 або 18 атомами вуглецю в кислоту жирного ряду з 20 атомами вуглецю і потім кислоту жирного ряду з 20 атомами вуглецю в кислоту жирного ряду, що містить 22 або більшу парну кількість атомів вуглецю з щонайменше одним подвійним зв'язком. Після однієї стадії елонгації ця ферментативна активність приводить до кислоти жирного ряду з 20 атомами вуглецю, і після другої, третьої і четвертої стадії елонгації до кислот жирного ряду з 22, 24 або 26 атомами вуглецю. За допомогою елонгази згідно з винаходом можуть бути синтезовані і більш довгі поліненасичені кислоти жирного ряду. Активність елонгаз згідно з винаходом приводить переважно до кислот жирного ряду з 20 і/або 22 атомами вуглецю з щонайменше двома подвійними зв'язками в молекулі кислоти жирного ряду, до кислот жирного ряду з 20 атомами вуглецю з щонайменше трьома, чотирма або п'ятьма подвійними зв'язками, особливо переважно, трьома подвійними зв'язками в молекулі кислоти жирного ряду, до кислот жирного ряду з 22 атомами вуглецю переважно з трьома, чотирма, п'ятьма або шістьма подвійними зв'язками, особливо переважно з п'ятьма або шістьма подвійними зв'язками в молекулі кислоти жирного ряду. Після елонгації за допомогою ферменту згідно з винаходом можуть здійснюватися інші стадії дезатурації. Тому продукти активності елонгази і можливих інших стадій дезатурації приводять до кращих поліненасичених кислот жирного ряду з більш високим ступенем дезатурації, до таких, як докозудієнова кислота, арахідонова кислота,  $\omega 6$ -ейкозутриєндогеном- $\gamma$ -лінолева кислота, ейкозапентаєнова кислота,  $\omega 3$ -ейкозутриєнова кислота,  $\omega 3$ -ейкозатетраєнова кислота, докозупентадієнова кислота або докозугексадієнова кислота. Субстратами цієї ферментативної активності згідно з винаходом є, наприклад, таксолова кислота, 7,10,13-гексадекатриєнова кислота, 6,9-октадекадієнова кислота, лінолева кислота,  $\gamma$ -ліноленова кислота, ліноленова кислота,  $\alpha$ -ліноленова кислота, арахідонова кислота, ейкозапентадієнова кислота або стеаридонова кислота. Кращими субстратами є лінолева кислота,  $\gamma$ -ліноленова кислота і/або  $\alpha$ -ліноленова кислота, відповідно, арахідонова кислота, ейкозатетраєнова кислота або ейкозапентаєнова кислота. Кислоти жирного ряду, що містять 16 або 18 або 20 атомів вуглецю, з щонайменше двома подвійними зв'язками в молекулі можуть елонгуватися за допомогою ферментативної активності згідно з винаходом у формі вільної кислоти жирного ряду або у формі

естеру, як фосфоліпіди, гліколіпіди, сфінголіпіди, фосфогліцериди, моноацилгліцерин, діацилгліцерин або триацилгліцерин.

Далі кислоти жирного ряду повинні транспортуватися в різних модифікаціях і вбудовуватися в триацилгліцеридний накопичувальний ліпід. Іншою важливою стадією синтезу ліпідів є перенос кислот жирного ряду в полярні головні групи, наприклад, за допомогою ацилтрансферази гліцерину і кислоти жирного ряду (див. публікацію Frentzen, 1998, *Lipid*, 100(4-5):161-166).

Публікації стосовно біосинтезу кислот жирного ряду в рослинах, дезатурації, обміну речовин ліпідів і транспортування через мембрану сполук, що містять жири, бета-окислювання, модифікації кислот жирного ряду і співфакторів, накопичення і побудови триацилгліцерину, включаючи наявні в них літературні джерела, наведені нижче: Kinney, 1997, *Genetic Engineering*, Видавн.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge і Browse, 1995, *Plant Cell* 7:957-970; Shanklin і Cahoon, 1998, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:611-641; Voelker, 1996, *Genetic Engineering*, Видавн.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, *Prog. Lipid R.* 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, *Biochim. Biophys. Acta* 1256:181-186; Kunau і ін., 1995, *Prog. Lipid Res.* 34:267-342; Stymne і ін., 1993, у: *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, Видавн.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, *Plant Journal*. 13(1):1-16.

Вітаміни, співфактори і такі "тонкі хімікати", як поліненасичені кислоти жирного ряду охоплюють групу молекул, які більш високо розвинуті тварини вже не можуть синтезувати і разом з цим сприймати або ж більш високо розвинуті тварини самі можуть у недостатньому ступені продукувати і тому повинні додатково їх одержувати, хоча вони можуть бути легко синтезовані іншими організмами, такими, як бактерії. Біосинтез цих молекул в організмах, які їх можуть продукувати, у таких, як бактерії, загалом вже описувався (див. публікації Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, "Vitamins", том A27, стор.443-613, Видавн. VCH: Вайнхайм, 1996; Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" *Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research Asia*, проведеної 1.-3. верес. 1994 у Пенангі, Малазія, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 стор.

Вищенаведені молекули є або самі біологічно активними молекулами або попередніми стадіями біологічно активних речовин, які служать елементами, що передають електрони, або проміжними продуктами при великій кількості шляхів обміну речовин. Ці сполуки мають поряд зі своєю поживною цінністю, також і промислове значення як барвники, антиокислювачі і каталізатори або інші допоміжні речовини (огляд структури, активності і промислової застосовності цих сполук див., наприклад, в енциклопедії Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, "Vitamins", том A27, стор.443-613, Видавн. VCH: Вайнхайм, 1996). Поліненасичені кислоти жирного ряду мають різні функції і сприятливі здоров'ю ефекти, наприклад, при коронарних серцевих захворюваннях, затравочних механізмах, у дитячому харчуванні і т.п. Публікації і літературні джерела, включаючи джерела, що в них цитуються, див. у: Simopoulos, 1999, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (3. Suppl.):560-569, Takahata і ін., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62(11):2079-2085, Willich und Winther, 1995, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 120(7): стор.229 і далі.

Даний винахід заснований щонайменше частково на відкритті нових молекул, які позначаються тут молекулами нуклеїнової кислоти специфічної елонгази поліненасичених кислот жирного ряду PSE і білка, які впливають на побудову клітинної мембрани в *Physcomitrella patens*, *Cryptocodium cohnii*, *Phytophthora infestans*, *Thraustochytrium* і/або *Ceratodon purpureus* і, наприклад, впливають на рух молекул через цю мембрану. При одній з форм виконання винаходу молекули PSE беруть участь в обміні речовин, необхідних для побудови мембрани клітини в організмі, такому, як мікроорганізми і рослини, або які впливають на непряме транспортування молекул через цю мембрану. При кращій формі виконання винаходу активність молекул PSE згідно з винаходом сприяє регуляції виробництва компонентів мембрани і транспорту через мембрану і впливає на виробництво бажаних тонких хімікатів цим організмом. При особливо кращій формі виконання винаходу модульована активність молекул PSE згідно з винаходом, так що вихід, виробництво і/або ефективність процесів обміну речовин мікроорганізмів або рослин, які регулюють елонгази PSE згідно з винаходом, модульовані і змінена ефективність транспортування сполук через мембрани, що прямо або побічно модулює вихід, виробництво й ефективність виробництва бажаних тонких хімікатів мікроорганізмами або рослинами.

Термін PSE або PSE-поліпептид охоплює білки, які беруть участь у процесі обміну речовин, необхідних для побудови клітинних мембран в організмі, наприклад, у мікроорганізмах або рослинах, сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани. Прикладами для PSE є наведені в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовності, їх гомологи, похідні або аналоги. Поняття "елонгази PSE" або "послідовності PSE нуклеїнових кислот" включають такі послідовності нуклеїнових кислот, які кодують PSE і при яких частина може бути кодуючою ділянкою, і відповідними 5'- і 3'-ділянками послідовності, що не транскрибуються. Прикладами для PSE-генів є представлені в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовності. Поняття "виробництво" або "продуктивність" відомі фахівцю в даній галузі і позначають концентрацію продукту ферментації (наприклад, бажаного тонкого хімікату), який утворюється у певний проміжок часу й у певному об'ємі ферментації (наприклад, кг продукту за годину на літр). Поняття "ефективність виробництва" охоплює час, який необхідно для одержання певної кількості продукту (наприклад, скільки часу необхідно клітині для забезпечення певної пропускну здатності тонкого хімікату). Термін "вихід" або "вихід продукту" щодо вуглецю також відомий фахівцю в даній галузі й охоплює ефективність перетворення джерела вуглецю в продукт (тобто тонкий хімікат). Це звичайно виражається в кг продукту на кг джерела вуглецю. Підвищенням виходу або виробництва сполуки підвищується кількість одержаних молекул або придатних одержаних молекул цієї сполуки у певній кількості культури протягом певного проміжку часу. Терміни "біосинтез" або "шлях біосинтезу" відомі фахівцю в даній галузі й означають синтез сполуки, переважно органічної сполуки клітиною з проміжної сполуки, наприклад, у багатостадійному і сильно регульованому процесі. Терміни "розщеплення" або "шлях



розщеплення" відомі фахівцю в даній галузі й означають розщеплення сполуки, переважно, органічної сполуки клітиною в продукти розщеплення (говорячи загалом, малі або менш комплексні молекули), наприклад, у багатостадійному і сильно регульованому процесі. Термін "обмін речовин" відомий фахівцю й охоплює сукупність біохімічних реакцій, які мають місце в організмі. Обмін речовин певної сполуки (наприклад, обмін речовин кислоти жирного ряду) охоплює сукупність шляхів біосинтезу, модифікації і розщеплення цієї сполуки в клітині, в яку входить ця сполука.

При іншій формі виконання винаходу молекули PSE можуть модулювати виробництво бажаної молекули, наприклад, тонкого хімікату, у мікроорганізмі або рослині. Є цілий ряд механізмів, якими можна безпосередньо впливати на зміну PSR, на вихід, виробництво і/або ефективність виробництва тонкого хімікату зі штаму мікроорганізму або рослини, які містять цей змінений білок. Число або активність PSE, які беруть участь у транспортуванні молекул тонкого хімікату всередині клітини або з клітини, може бути підвищено, так що більш великі кількості цих сполук транспортуються через мембрани, з яких вони можуть бути легко одержані і перетворені одна в одну. Далі кислоти жирного ряду, триацилгліцерини і/або ліпіди є самі бажаними тонкими хімікатами. Оптимізацією активності або підвищенням числа однієї або декількох PSE згідно з винаходом, які беруть участь у біосинтезі цих сполук, або перешкодами активності однієї або декількох PSE, які беруть участь у розщепленні цих сполук, є можливість підвищення виходу, виробництва і/або ефективності виробництва молекул кислот жирного ряду і ліпідів з організмів, наприклад, мікроорганізмів або рослин.

Мутагенез гена PSE згідно з винаходом може викликати утворення PSE зі зміненою активністю, які безпосередньо впливають на виробництво одного або декількох бажаних тонких хімікатів з мікроорганізмів або рослин. Наприклад, елонгази PSE згідно з винаходом, які беруть участь в експорті продуктів розщеплення, можуть мати велику чисельність або активність, так що вони можуть більш ефективно експортувати нормальні відходи процесу обміну речовин клітини (кількість яких, можливо, підвищена внаслідок надвиробництва бажаних тонких хімікатів), перш ніж вони можуть ушкоджувати молекули в клітинах (що знижувало б життєстійкість клітини) або заважати біосинтезу тонких хімікатів (що знижувало б вихід, виробництво або ефективність виробництва бажаних тонких хімікатів). Відносно великі внутрішньоклітинні кількості бажаних тонких хімікатів можуть також бути токсичними для клітини, так що підвищенням активності або числа транспортерів, які можуть експортувати ці сполуки з клітини, можна підвищити життєздатність клітини в культурі, що знову ж приводить до більш великої кількості клітин, які виробляють бажані тонкі хімікати. Енголази PSE згідно з винаходом можуть також бути змінені таким чином, що виробляються відповідні кількості різних молекул ліпідів і кислот жирного ряду. Це може значно впливати на сполуку ліпиду клітинної мембрани.

У зв'язку з тим, що кожний тип ліпиду має різні фізичні властивості, зміною композиції ліпідів мембрани можна чітко змінити рухомість мембрани. Зміни рухомості мембрани можуть впливати на транспортування молекул через мембрану, а також цілісність клітини, що має значний вплив на виробництво тонких хімікатів з мікроорганізмів і рослин у ферментативній культурі у великих масштабах. Мембрани рослин додають специфічні властивості, такі, як толерантність до тепла, холоду, солі, сухості, а також толерантність проти патогенів, таких, як бактерії і гриби. Тому модуляція компонентів мембрани впливає на здатність рослин до виживання при вищенаведених стресових параметрах. Це може здійснюватися за допомогою зміни сигнальних каскадів або безпосередньо через змінену сполуку мембрани (див., наприклад, публікацію: Chapman, 1998, Trends in Plant Science, 3(11):419-426) і впливати на сигнальні каскади (див. публікацію Вінга 1999, Plant Physiology, 120:645-651) або толерантність до холоду, як описано в WO 95/18222.

Виділені згідно з винаходом послідовності нуклеїнових кислот містяться, наприклад, у геномі штаму *Thraustochytrium*, який можна придбати в банку "American Type Culture Collection" (ATCC-колекцію) з номером штаму ATCC26185 (*Thraustochytrium*), відповідно, у випадку *Cryptocodium* - наприклад, з Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton ((CCMP) West Boothbay Harbour, ME, США) з номером штаму CCMP316. У випадку *Phytophthora infestans* наведені молекули нуклеїнових кислот, виділені зі штаму ATCC 48886.

Нуклеотидна послідовність ізольованих кДНК із *Physcomitrella*, *Cryptocodium*, *Phytophthora infestans* або *Thraustochytrium* і одержані амінокислотні послідовності *Physcomitrella patens*-PSEs представлені в SEQ ID NO:1 до SEQ ID NO:12. Були проведені комп'ютерні аналізи, які класифікують і/або ідентифікують ці нуклеотидні послідовності як послідовності, що кодують білки, які беруть участь в обміні речовин компонентів мембрани, або білки, що беруть участь у транспортуванні сполук через клітинні мембрани, відповідно, біосинтезу поліненасичених кислот жирного ряду PUFA. EST's з номерами в банку даних PP001019019F, CC001042041R, PI001002014R, а також TC002034029R, TC002034029R-11 і TC002014093R у банку даних винахідника представляють послідовності згідно з винаходом, наведені в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11. Аналогічним чином позначаються парціальні поліпептиди як PP001019019F, CC001042041R, PI001002014R, а також TC002034029R, TC002034029R-11 і TC002014093R і представляють послідовності згідно з винаходом в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 згідно з таблицею 2. Повний інсерт фрагмента ESTs TC002034029R був секвенований і була одержана SEQ ID NO:3, яка є повною послідовністю з TC002034029R. TC002034029R-11 описує послідовність повної довжини елонгази з *Thraustochytrium*. Назва інших клонів аналогічна. До того ж різним клонам були надані відповідні найменування гена. Скорочення: Tc означає *Thraustochytrium*, Cc означає *Cryptocodium*, Pp означає *Physcomitrella patens*, Pi означає *Phytophthora infestans*.

Таблиця 2

Позначення est-найменування	Найменування гена	Поліпептид SEQ ID NO	Нуклеїнова кислота SEQ ID NO
PP001019019F	Pp_PSE1	2	1
TC002034029R	Tc_PSE1	4	3

TC002014093R	Tc_PSE2	6	5
CC001042041R	Cc_PSE1	8	7
TC002034029R-11	Tc_PSE1_1	10	9
PI001002014R	Pi_PSE1	12	11

Даний винахід стосується також і білків з амінокислотною послідовністю, яка в основному гомологічна амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12. Тут застосовується білок з амінокислотною послідовністю, яка в основному гомологічна вибраній амінокислотній послідовності, щонайменше, на приблизно 50% гомологічна вибраній амінокислотній послідовності, наприклад, загальній вибраній амінокислотній послідовності. Білок з амінокислотною послідовністю, яка в основному гомологічна вибраній амінокислотній послідовності, може також бути гомологічною щонайменш на приблизно від 50 до 60%, переважно щонайменш на приблизно від 60 до 70% і особливо переважно щонайменш на приблизно від 70 до 80%, від 80 до 90% або від 90 до 95% і найбільш переважно, щонайменш на приблизно 96%, 97%, 98%, 99% або більше до вибраної амінокислотної послідовності.

Елонгаза PSE згідно з винаходом або її біологічно активна частина або її фрагмент може брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови клітинних мембран у мікроорганізмах або рослинах, сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани або ж мати одну або декілька необхідних для елонгації поліненасичених кислот жирного ряду з 16 або 18, відповідно, 20 атомами вуглецю, а також споріднених поліненасичених кислот жирного ряду.

Різні аспекти винаходу описуються нижче.

#### A. Виділені молекули нуклеїнової кислоти

Однією формою виконання винаходу є виділені нуклеїнові кислоти, які походять з мікроорганізмів, що виробляють поліненасичені кислоти жирного ряду і кодують поліпептиди, які елонгують кислоти жирного ряду з 16 або 18 атомами вуглецю з щонайменше двома подвійними зв'язками в кислоті жирного ряду щонайменше на два атоми вуглецю або елонгують кислоту жирного ряду з 20 атомами вуглецю з щонайменше двома подвійними зв'язками в кислоті жирного ряду на щонайменше два атоми вуглецю.

Інша форма виконання винаходу полягає у виділених нуклеїнових кислотах, які включають нуклеотидні послідовності, що кодують поліпептиди, які елонгують кислоти жирного ряду з 16, 18 або 20 атомами вуглецю з щонайменше двома подвійними зв'язками в кислоті жирного ряду й вибрані з групи, що включає

а) представлені в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовності нуклеїнових кислот,

б) послідовність нуклеїнових кислот, які згідно з виродженістю генетичного коду походять від наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностей, або

в) похідні наведеної в 7SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовності, які кодують поліпептиди наведеної в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотної послідовності і мають щонайменше 50% гомологію на амінокислотному рівні, без значного зниження ферментативної дії поліпептидів.

Вищенаведені нуклеїнові кислоти згідно з винаходом, які діють як елонгази з 16, 18 або 20 атомами вуглецю, походять від таких організмів, як інфузорії, гриби, водорості, рослини або динофлагелати, які можуть синтезувати поліненасичені кислоти жирного ряду, переважно з грибів або водоростей, особливо переважно з таких, як *Phytophthora*, *Physcomitrella*, *Cryptocodinium*, *Thraustochytrium* або *Schizochytrium* і надзвичайно переважно з *Phytophthora infestans*, *Physcomitrella patens*, *Cryptocodinium cohnii* або *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp. або близьких, споріднених організмів.

Винахід стосується виділених молекул нуклеїнової кислоти, які кодують PSE-поліпептиди або їх біологічно активні частини, а також фрагментів нуклеїнових кислот, які є достатніми для застосування як зондів гібридизації або затравки для ідентифікації або ампліфікації кодованої за допомогою PSE нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК специфічної поліненасиченим кислотам жирного ряду елонгази). Поняття "молекула нуклеїнової кислоти", застосовуване в даному описі, означає молекули ДНК (наприклад, кДНК або геномну ДНК) або молекули РНК (наприклад, мРНК), а також аналоги ДНК або РНК, які одержують за допомогою нуклеотидного аналога. Це поняття охоплює до того ж нетрансльовані послідовності на 3'- і на 5'-кінцях кодуєної ділянки гена: щонайменше приблизно 100 нуклеотидів послідовності 5'-кінця кодуєної ділянки і щонайменше приблизно 20 нуклеотидів послідовності 3'-кінця кодуєної ділянки гена. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою або дволанцюговою, однак є переважно дволанцюговою ДНК. "Виділена" молекула нуклеїнової кислоти відокремлюється від інших молекул нуклеїнової кислоти, які є в природному джерелі нуклеїнової кислоти. "Виділена" нуклеїнова кислота переважно не має послідовностей, які природним чином фланкують нуклеїнову кислоту в геномній ДНК організму, з якого походить нуклеїнова кислота (наприклад, послідовності, що знаходяться на 5'- або 3'-кінцях нуклеїнової кислоти). При різних формах виконання винаходу виділена молекула нуклеїнової кислоти елонгази PSE може, наприклад, містити трохи менше, ніж приблизно 5тис. п.о., 4тис. п.о., 3тис. п.о., 2тис. п.о., 1тис. п.о., 0,5тис. п.о. або 0,1тис. п.о. нуклеотидних послідовностей, що природним образом фланкують молекулу нуклеїнової кислоти у геномній ДНК клітини, від якої походить нуклеїнова кислота (наприклад, клітина *Physcomitrella patens*). "Виділена" молекула нуклеїнової кислоти, така, як молекула кДНК, може, крім того, бути в основному вільною від іншого клітинного матеріалу або культурального середовища, якщо вона одержана рекомбінантною технікою або вільна від хімічних попередніх стадій або інших хімікатів, якщо вони хімічно синтезуються.

Молекула нуклеїнової кислоти згідно з винаходом, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти з наведеною в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 нуклеотидною послідовністю або її частини, може виділятися при застосуванні молекулярнобіологічної стандартної техніки і той, що є в розпорядженні, інформації про послідовність. Також і за допомогою порівняльних алгоритмів може бути ідентифікована, наприклад, гомологічна послідовність або гомологічні, консервативні ділянки

послідовності на рівні ДНК або амінокислоти. Наприклад, може бути виділена з *Phytophthora*, *Physcomitrella*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium*-кДНК із *Phytophthora*, *Physcomitrella*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium*- банку даних, при цьому застосовуються повні послідовності SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і/або SEQ ID NO:11 або частина їх як зонди гібридизації, а також стандартна техніка гібридизації (як наприклад, описано в публікації Sambrook і ін., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Крім того, молекула нуклеїнової кислоти, що складає повну послідовність SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 або їх частина, може бути виділена полімеразною ланцюговою реакцією, при цьому застосовуються олігонуклеотидні затравки, які утворюються на базі цієї послідовності або її частини, зокрема, ділянок навколо His-Box-мотивів послідовності з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 або модифікацій таких визначених окремо амінокислот (наприклад, молекула нуклеїнової кислоти, що охоплює повну, наведену в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовність, або її частину, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції при застосуванні олігонуклеотидних затравок, які утворені на базі такої ж послідовності SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11). Далі особливо придатні для цього часткові послідовності, представлені на Фіг.10. Наприклад, можна виділяти мРНК із клітин (наприклад, способом екстракції гуанідину тіоціанату авторів Chirgwin і ін. (1979) *Biochemistry* 18:5294-5299) і кДНК можна одержувати за допомогою зворотної транскриптази (наприклад, зворотної транскриптази Moloney-MLV, одержуваної на фірмі Gibco/BRL, Bethesda, MD, або реверсивної транскриптази AMV, одержуваної на фірмі Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Синтетичні олігонуклеотидні затравки для ампліфікації за допомогою полімеразної ланцюгової реакції можуть бути одержані на базі наведеної в SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9 або 11 нуклеотидної послідовності або за допомогою представлених на Фіг.10 послідовностей амінокислот. Нуклеїнова кислота згідно з винаходом може бути ампліфікована при застосуванні кДНК або альтернативно геномної ДНК як матриці або придатної олігонуклеотидної затравки згідно із стандартною технікою полімеразної ланцюгової реакції. Ампліфікована в такий спосіб нуклеїнова кислота може бути клонована в придатний вектор і може бути охарактеризована за допомогою аналізу послідовності ДНК. Олігонуклеотиди, що відповідають нуклеотидній послідовності PSE, можуть бути одержані стандартним способом синтезу, наприклад, за допомогою автоматичного приладу синтезу ДНК.

Представлена в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 кДНК включає послідовності, які кодують елонгази PSE (тобто "кодуюча ділянка"), а також 5'-нетрансатовані послідовності і 3'-нетрансатовані послідовності. Альтернативно до цього молекула нуклеїнової кислоти може включати тільки кодуючу ділянку однієї з послідовностей у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 або може містити цілі геномні фрагменти, виділені з геномної ДНК.

Послідовність SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 ідентифікується такою ж нумерацією EST, що і SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11, так що вони можуть бути легко відкориговані.

При ще одній кращій формі виконання винаходу виділена молекула нуклеїнової кислоти згідно з винаходом включає таку молекулу нуклеїнової кислоти, що є комплементом однієї з наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 нуклеотидних послідовностей або її частини. Молекула нуклеїнової кислоти, яка є комплементарною до наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 нуклеотидних послідовностей, є тоді досить комплементарною, коли вона може бути гібридизована з однією з наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностей, внаслідок чого виникає більш стабільний дуплекс.

Гомолог нових послідовностей нуклеїнової кислоти елонгази з послідовністю SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 означає, наприклад, алельні варіанти з щонайменше приблизно від 50 до 60%, переважно щонайменше приблизно від 60 до 70%, ще більш переважно щонайменше приблизно від 70 до 80%, від 80 до 90% або від 90 до 95% і ще більш переважно щонайменше приблизно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більшою гомологією до наведених в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 нуклеотидних послідовностей або їх гомологів, похідних або аналогів або до їх частини. При ще одній кращій формі виконання винаходу виділена молекула нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнових кислот, які гібридизують з однієї з наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностей нуклеїнових кислот або їх частиною, наприклад, гібридизується при стрингентних умовах. Алельні варіанти охоплюють, зокрема, функціональні варіанти, які одержуються делецією, інсерцією або заміщенням нуклеотидів із наведеної в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовності, причому метою є краще збереження ферментативної активності синтезованих білків, що походять від цього, для інсерції одного або декількох генів. Білки, які ще мають ферментативну активність елонгази, означають такі білки, із щонайменше 10%, переважно 20%, особливо переважно 30%, ще більш переважно 40% первинної ферментативної активності, у порівнянні з кодованими SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 білками. Елонгази, які мають ще вищенаведену активність, є елонгазами, ферментативна активність яких не значно знижена.

Гомологи до наведених в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностей представляють собою, наприклад, бактеріальні гомологи, гомологи грибів і рослин, вкорочені послідовності, одноланцюгові ДНК або РНК кодуєючої і некодуєючої послідовності ДНК.

Гомологи наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностей означають також і похідні, такі, як, наприклад, варіанти промоторів. Промотори проти ходу приведених нуклеотидних послідовностей можуть бути модифіковані за допомогою одного або декількох заміщень нуклеотидів, за допомогою інсерції (інсерцій) і/або делеції (делецій), без втрати функціональності

активності промоторів. Далі є можливість підвищення активності промоторів за допомогою модифікації їх послідовності або їх повної заміни більш активними промоторами, навіть з гетерологічних організмів.

Крім того, молекула нуклеїнової кислоти згідно з винаходом може включати тільки частину кодуючої ділянки однієї з наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностей, наприклад, фрагмент, який може застосовуватися як зонд або затравка, або фрагмент, який кодує біологічно активну ділянку елонгази PSE. Визначені з клонування гена елонгази PSE з *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Thraustochytrium* і *Cryptocodium* послідовності нуклеїнових кислот дозволяють одержання зондів і затравок, які виконані для ідентифікування і/або клонування гомологів елонгази PSE в інших типах клітин і організмів, а також гомологів елонгази PSE з інших мохів або споріднених видів. Зонд/затравка охоплює звичайно в основному очищений олігонуклеотид. Нуклеотид охоплює в основному ділянку нуклеотидної послідовності, яка при жорстких умовах гібридизується із щонайменше 12, переважно приблизно 16, більш переважно приблизно 25, 40, 50 або 75 нуклеотидами, що ідуть один за одним, смислової ділянки однієї з наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностей, антисмислової ділянки однієї з наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностей або її гомологів, похідних або аналогів або наявних у природі мутантів. Затравки на базі нуклеотидної послідовності з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 можуть застосовуватися в реакції ПЛР для клонування гомологів елонгази PSE. Зонди на базі нуклеотидних послідовностей елонгази PSE можуть застосовуватися для визначення транскриптів або геномних послідовностей, які кодують той же самий або гомологічний білок. При кращій формі виконання винаходу зонд охоплює до того ж зв'язану з ним групу маркерів, наприклад, радіоізоотоп, флуоресцентну сполуку, фермент або співфактор ферменту. Ці зонди можуть застосовуватися як частина пробного набору геномних маркерів для ідентифікації клітин, які помилково експресують елонгазу PSE, наприклад, вимірювання кількості PSE кодуючої нуклеїнової кислоти зразку клітин, наприклад, вимірювання рівня PSE-mPHK або для визначення того, чи мутує або делетує геномний PSE-ген.

При іншій формі виконання винаходу молекула нуклеїнової кислоти згідно з винаходом кодує білок або його частину, який/яка включає послідовність амінокислот, яка досить гомологічна до послідовності амінокислот у SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12, щоб білок або його частина зберігав здатність брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови клітинної мембрани в мікроорганізмах або рослинах сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани. Застосовуване тут поняття "достатньо гомологічні" стосується білків або їх частин, амінокислотні послідовності яких мають мінімальне число ідентичних або еквівалентних залишків амінокислоти (наприклад, залишок амінокислоти з таким же бічним ланцюгом, що і залишок амінокислоти в одній із наведених у SEQ ID NO:2 до 12 послідовностей) із представленої в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотної послідовності так, що білок або його частина може брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови клітинної мембрани в мікроорганізмах або рослинах сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани. Складові частини білка цього шляху обміну речовин для компонентів мембрани або системи транспортування через мембрану можуть грати важливу роль при виробництві і секреції одного або декількох тонких хімікатів. Приклади цієї активності тут також описуються. У такий спосіб "функція елонгази PSE" сприяє або прямо або побічно виходу, виробництву і/або ефективності виробництва одного або декількох тонких хімікатів. Приклади субстратспецифічності PSE каталітичної активності наведені в таблиці 1.

При ще одній формі виконання винаходу похідні молекули нуклеїнової кислоти згідно з винаходом кодують білки з гомологією щонайменше приблизно від 50 до 60%, переважно, щонайменше приблизно від 60 до 70% і ще більш переважно щонайменше приблизно від 70 до 80%, від 80 до 90%, від 90 до 95% і найбільш переважно щонайменше приблизно 96%, 97%, 98%, 99% або більше до представленої в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовності амінокислот. Гомологи послідовності амінокислот по всій ділянці визначені за допомогою програми PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins і ін., CABIOS, 5, 1989:151-153) або BESTFIT або GAP (див. публікацію Henikoff, S. and Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919).

Частини білків, що кодуються молекулами нуклеїнової кислоти PSE згідно з винаходом, є переважно вірогідно активними частинами однієї з елонгаз PSE. Застосовуване тут поняття "біологічно активна частина елонгази PSE", включає ділянку, наприклад, домен/мотив елонгази PSE, який може брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови клітинної мембрани в мікроорганізмах або рослинах сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани або має зазначену в таблиці 1 активність. Для визначення того, чи може елонгаза PSE або її біологічно активна частина брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови клітинної мембрани в мікроорганізмах або рослинах сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани, може проводитися тест ферментативної активності. Цей тест, описуваний у нижченаведеному прикладі 8, відомий фахівцю в даній галузі.

Додаткові фрагменти нуклеїнових кислот, що кодують біологічно активні ділянки елонгази PSE, можуть бути одержані шляхом виділення частини однієї з наведених у SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:42 послідовностей, експресії кодованої ділянки елонгази PSE або пептиду (наприклад, за допомогою рекомбінантної експресії *In vitro*) і визначення активності кодованої частини елонгази PSE або пептиду.

Винахід стосується також і молекули нуклеїнової кислоти, яка відрізняється від однієї з наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 нуклеотидних послідовностей (або її частин) внаслідок виродженості генетичного коду і, разом з цим, кодують ту ж елонгазу PSE, що і та, яка кодується представленою в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 нуклеотидною послідовністю. При іншій формі виконання винаходу виділена молекула нуклеїнової

кислоти згідно з винаходом кодує нуклеотидну послідовність, яка кодує білок з представленою в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовністю амінокислот. При ще одній формі виконання винаходу молекула нуклеїнової кислоти згідно з винаходом кодує білок елонгази PSE повної довжини, який загалом є гомологічним послідовності амінокислот у SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 або SEQ ID NO:12 (яка кодується представленим у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 відкритою рамкою зчитування) і може ідентифікуватися і виділятися відомими методами.

Додатково до представлених в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 нуклеотидних послідовностей елонгази PSE фахівець у даній галузі може бачити, що поліморфізми послідовності ДНК, які приводять до зміни в амінокислотних послідовностях елонгаз PSE, можуть існувати всередині однієї популяції (наприклад, популяції *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodinium* або *Thraustochytrium*). Ці генетичні поліморфізми існують у гені PSE між особинами всередині популяції внаслідок природної варіації. Застосовувані при цьому терміни "ген" і "рекомбінантний ген" означають молекули нуклеїнової кислоти з однією відкритою рамкою зчитування, яка кодує елонгазу PSE, переважно елонгазу PSE з *Phytophthora*, *Physcomitrella*, *Cryptocodinium* або *Thraustochytrium*. Ці природні варіанти звичайно сприяють варіації від 1 до 5% у нуклеотидній послідовності гена елонгази PSE. Усі ці варіації нуклеотиду і отримані в результаті поліморфізми амінокислот в елонгазі PSE, які є результатом природної варіації і які не змінюють функціональну активність елонгаз PSE, входять у рамки даного винаходу.

Молекули нуклеїнової кислоти, що відповідають природним варіантам, а не *Physcomitrella*-, *Phytophthora*-, *Cryptocodinium*- або *Thraustochytrium* -гомологам, -похідним і аналогам *Phytophthora*-, *Physcomitrella*-, *Cryptocodinium*- або *Thraustochytrium* -кДНК, можуть виділятися на основі їх гомології до описуваної тут нуклеїнової кислоти *Phytophthora*-, *Physcomitrella*-, *Cryptocodinium*- або *Thraustochytrium* -PSE при застосуванні *Physcomitrella*-, *Phytophthora*-, *Cryptocodinium*- або *Thraustochytrium*-кДНК або її частини в якості зонда гібридизації згідно із стандартною технікою гібридизації з кДНК. При іншій формі виконання винаходу ізолювана молекула нуклеїнової кислоти згідно з винаходом має довжину щонайменше в 15 нуклеотидів гібридує при жорстких умовах з молекулою нуклеїнової кислоти, яка має представлену в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 нуклеотидну послідовність. При іншій формі виконання винаходу нуклеїнова кислота має довжину щонайменше в 25, 50, 100, 250 або більше нуклеотидів. Застосовуване тут поняття "гібридує при жорстких умовах" описує умови гібридизації і промивання, при яких нуклеотидні послідовності, які щонайменше на 60% гомологічні одна до одної, залишаються гібридизованими одна з одною. Такі умови полягають переважно в тому, що послідовності, які гомологічні одна до одної щонайменше приблизно на 65%, особливо переважно щонайменше приблизно на 70% і ще більш переважно щонайменше приблизно на 75% або більше, звичайно залишаються гібридизованими одна з одною. Ці умови відомі фахівцю в даній галузі й описуються в публікації *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Кращим, однак не обмежуючим прикладом для таких умов гібридизації є гібридизації в  $6 \times \text{SSC}$  (хлорид натрію/цитрат натрію) при приблизно  $45^{\circ}\text{C}$ , з подальшою однією або декількома стадіями промивання в  $0,2 \times \text{SSC}$ , 0,1% додецилсульфат натрію (SDS) при 50 до  $65^{\circ}\text{C}$ . Фахівцю в даній галузі відомо, що ці умови гібридизації розрізняються в залежності від типу нуклеїнової кислоти і, якщо наприклад, застосовується органічний розчинник, в залежності від температури і концентрації буфера. Температура, наприклад, при стандартних умовах гібридизації може мати значення в залежності від типу нуклеїнової кислоти між  $42^{\circ}\text{C}$  і  $58^{\circ}\text{C}$  у водному буфері з концентрацією від 0,1 до  $5 \times \text{SSC}$  (pH 7,2). У випадку органічного розчинника у вищевказаному буфері, наприклад 50% формаміду, температура при умовах гібридизації дорівнює приблизно  $42^{\circ}\text{C}$ . Кращими умовами гібридизації для ДНК : ДНК - гібрида є, наприклад,  $0,1 \times \text{SSC}$  і від  $20^{\circ}\text{C}$  до  $45^{\circ}\text{C}$ , переважно, між  $30^{\circ}\text{C}$  і  $45^{\circ}\text{C}$ . Кращими умовами гібридизації для ДНК : ДНК-гібрида, наприклад,  $0,1 \times \text{SSC}$  і від  $30^{\circ}\text{C}$  до  $55^{\circ}\text{C}$ , переважно від  $45^{\circ}\text{C}$  до  $55^{\circ}\text{C}$ . Вищевказані температури гібридизації призначені, наприклад, для нуклеїнової кислоти з довжиною приблизно 100п.о. і вмістом G + C у 50% у присутності формаміду. Фахівець у даній галузі знає, як можна визначити умови гібридизації за допомогою вищевказаного навчального матеріалу, а також таких джерел: Sambrook і ін., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames and Higgins (Видавн.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Видавн.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Виділена молекула нуклеїнової кислоти згідно з винаходом, яка при жорстких умовах гібридується з послідовністю з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11, відповідає наявній в природі молекулі нуклеїнової кислоти. Застосовуваний тут термін "наявна в природі" нуклеїнова кислота означає молекулу РНК або ДНК із нуклеотидною послідовністю, яка зустрічається в природі (наприклад кодує природний білок). При одній формі виконання винаходу нуклеїнова кислота кодує елонгазу, що зустрічається в природі *Physcomitrella patens*-PSE, *Phytophthora infestans*-PSE, *Cryptocodinium cohnii*-PSE або *Thraustochytrium*-PSE.

Додатково до варіантів, що зустрічаються в природі, PSE-послідовності, які можуть існувати в популяції, фахівець може розпізнати, що також і зміни за допомогою мутації можуть бути внесені в нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11, що приводить до змін послідовності амінокислот кодованої елонгази PSE без того, що ушкоджується функціональність білка PSE. Наприклад, заміщення нуклеотидів, які на "несуттєвих" залишках амінокислот приводять до амінокислотних заміщень, можуть бути одержані в представлений у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовності. "Несуттєвим" залишком амінокислоти є залишок, що може змінюватися в послідовності дикого типу елонгаз PSE (SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12). Без зміни активності PSE, на противагу цьому "істотний" залишок амінокислоти потрібний для активності PSE. Інші залишки амінокислоти (наприклад такі, які не консервативними в домені з активністю PSE або є тільки напівконсервативними) можуть бути несуттєвими для активності і можуть змінюватися без зміни активності PSE.

Внаслідок цього винахід стосується молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує елонгази PSE, що містять змінені залишки амінокислоти, які не є істотними для PSE - активності. Ці елонгази PSE відрізняються за послідовністю амінокислот від представленої в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовностей і зберігають щонайменше одну з описуваних тут PSE-активностей. Виділена молекула нуклеїнової кислоти при одній формі виконання включає нуклеотидну послідовність, яка кодує білок, причому білок має послідовність амінокислот із щонайменше приблизно 50%-ю гомологією до представленої в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовностей амінокислот і може брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови мембрани клітини в *Phytophthora*, *Physcomitrella*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium* сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани. Кодований молекулою нуклеїнової кислоти білок є гомологічним переважно щонайменше приблизно на 50 до 60% до представлених в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовностей, особливо переважно щонайменше приблизно на 60 до 70% є гомологічним до представлених в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовностей і ще більш переважно щонайменше приблизно на 70 до 80%, 80 до 90%, 90 до 95% до представлених в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовностей і найбільше переважно щонайменше приблизно на 96%, 97%, 98% або 99% є гомологічним до представлених в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовностей.

Для визначення процентної гомології двох амінокислотних послідовностей (наприклад, однієї представленої в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовності і її однієї мutowаної форми) або двох нуклеїнових кислот послідовності для їх оптимального порівняння одна з одною пишуться одна під одною (наприклад, пробіли можуть вводитися в послідовність білка або нуклеїнової кислоти, щоб досягти оптимального вирівнювання з іншим білком або з іншою нуклеїновою кислотою). Залишки амінокислот або нуклеотидів у відповідному положенні амінокислоти або положенні нуклеотиду потім порівнюються. Якщо одне положення в послідовності (наприклад, в одній з послідовностей з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12) зайнято тим же амінокислотним залишком або тим же нуклеотидом, що і відповідне місце в іншій послідовності (наприклад, мutowаній формі, вибраній з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовностей), тоді молекули в цьому положенні гомологічні (тобто "гомологія" амінокислоти або нуклеїнової кислоти, застосовуваних тут, відповідає "ідентичності" амінокислоти або нуклеїнової кислоти). Процентна гомологія між обома послідовностями є функцією числа ідентичних положень, які є загальними для обох послідовностей (тобто % гомологія дорівнює числу ідентичних положень/значення числа положень, помноженому на 100).

Подібна молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує елонгазу PSE, яка гомологічна послідовності білка з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12, може бути одержана за допомогою здійснення одного або декількох заміщень, приєднанням або селекцією нуклеотидів у наведених в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностях, так що одне або кілька заміщень, приєднань або селекції амінокислоти може бути введена в кодований білок. Мутації можуть бути внесені в одну з наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностей шляхом стандартних методів, таких, як сайтспецифічний мутагенез або викликаний ПЛР мутагенез. Переважно, консервативне заміщення амінокислот здійснюється на одному або декількох вищенаведених несуттєвих амінокислотних залишках. При "консервативному заміщенні амінокислот" залишок амінокислоти замінюється залишком амінокислоти зі схожим бічним ланцюгом. Сімейства амінокислот з однаковими бічними ланцюгами охоплюють амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими, полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними бічними ланцюгами, (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) і ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Вищенаведений несуттєвий залишок амінокислоти в елонгазі PSE замінюється переважно іншим залишком амінокислоти з того ж сімейства бічних ланцюгів. Альтернативно при іншій формі виконання винаходу мутації можуть вноситися за принципом випадковості по всій або по частині кодуєчої елонгазу PSE послідовності, наприклад, за допомогою насичувального мутагенезу насичення і одержані в результаті мутанти можуть перевірятися на описану тут PSE-активність, щоб ідентифікувати мутанти, які зберігають PSE-активність. Після мутагенезу однієї з наведених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовностей кодований білок може бути рекомбінантно експресований, і активність білка може бути визначена при застосуванні нижчеописуваних тестів (див. приклади).

Додатково до молекул нуклеїнових кислот, що кодуєть вищеописані елонгази PSE, даний винахід стосується виділених молекул нуклеїнової кислоти, які є "антисмисловими". "Антисмислова" нуклеїнова кислота включає нуклеотидну послідовність, яка комплементарна до "смислової" нуклеїнової кислоти, що кодує білок, наприклад, комплементарна до кодуєчого ланцюга дволанцюгової кДНК-молекули або комплементарна до послідовності мРНК. Отже, антисмислова нуклеїнова кислота може зв'язуватися з утворенням вуглеводневого містка зі смисловою нуклеїновою кислотою. Антисмислова нуклеїнова кислота може бути комплементарна до загального, кодуєчого PSE ланцюга або тільки до його частини. При одній формі виконання винаходу молекула антисмислової нуклеїнової кислоти є "антисмисловою" до "кодуєчої ділянки" кодуєчого ланцюга нуклеотидної послідовності, яка кодує PSE. Поняття "кодуєча ділянка" означає ділянку нуклеотидної послідовності, яка містить кодони, які транслюються в залишки нуклеїнової кислоти (наприклад, вся кодуєча ділянка, яка починається і закінчується термінальним кодоном, тобто останнім кодоном перед термінальним кодоном). При іншій формі виконання винаходу молекула антисмислової

нуклеїнової кислоти є "антисмисловою" до "некодуючої ділянки" кодуючого ланцюга послідовності нуклеїнових кислот, яка кодує PSE. Поняття "некодуюча ділянка" стосується 5'- і 3'-послідовностей, які фланкують кодуючу ділянку і не транслювані в амінокислоти (тобто які позначають 5'- і 3'-нетранслатованими ділянками).

З урахуванням описуваних, кодуючих PSE послідовностей кодуючого ланцюга (наприклад, наведені в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовності) антисмислові нуклеїнові кислоти згідно з винаходом можуть бути виконані згідно з методом спарювання основ Уотсона-Кріка. Молекула антисмислової нуклеїнової кислоти може бути комплементарна до загальної кодуючої ділянки PSE-мПНК, однак найбільш переважно може бути олігонуклеотидом, який є "антисмисловим" тільки на частині кодуючої або некодуючої ділянки PSE-мПНК. Антисмисловий олігонуклеотид може, наприклад, бути комплементарним до ділянки, яка оточує місце трансляції PSE-мПНК. Антисмисловий олігонуклеотид може мати довжину, наприклад, приблизно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 і більше нуклеотидів. Переважно антисмисловий олігонуклеотид має довжину від 15 до 25 нуклеотидів. Антисмислова нуклеїнова кислота згідно з винаходом може при застосуванні хімічного синтезу і ферментативної реакції елонгації бути зконструйована відомим фахівцю в даній галузі способом. Антисмислова нуклеїнова кислота (наприклад, антисмисловий олігонуклеотид) може бути, наприклад, хімічно синтезована, причому застосовуються наявні в природі нуклеотиди або будь-яким чином модифіковані нуклеотиди, які створені так, що вони підвищують біологічну стабільність молекул або підвищують фізичну стабільність утвореного між антисмисловою і смисловою нуклеїновими кислотами дуплекса, наприклад, застосовуються похідні фосфоріату і архідинамізовані нуклеотиди. Прикладами для модифікованих нуклеотидів, які можуть застосовуватися для одержання антисмислової нуклеїнової кислоти, є, серед інших, 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гіпоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигідроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламінометил-2-тіоуридин, 5-карбокси-метиламінометилурацил, дигідроурацил, бета-D-галактозилквеозин, інозин, N6-ізопентеніладенін, 1-метилгуанін, 1-метилінозин, 2,2-диметилгуанін, 2-метиладенін, 2-метилгуанін, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденін, 7-метилгуанін, 5-метиламінометилурацил, 5-метоксиамінометил-2-тіоурацил, бета-D-манозилквеозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтіо-N6-ізопентеніладенін, урацил-5-оксиоцтова кислота (v), вібутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тіоцитозин, 5-метил-2-тіоурацил, 2-тіоурацил, 4-тіоурацил, 5-метилурацил, метиловий естер урацил-5-оксиоцтової кислоти, урацил-5-оксиоцтова кислота (v), 5-метил-2-тіоурацил, 3-(3-аміно-3-N-2-карбоксипропіл)урацил, (аср3)w і 2,6-діамінопурин. Антисмислова нуклеїнова кислота альтернативно може бути одержана біологічно при застосуванні вектора експресії, в який субклонується нуклеїнова кислота з антисмисловою орієнтацією (тобто РНК, яка транскрибується введеною нуклеїною кислотою, орієнтована до цільової нуклеїнової кислоти в антисмисловому напрямку, що нижче описується більш докладно).

Молекули антисмислової нуклеїнової кислоти згідно з винаходом звичайно вводяться в клітину або виходять *in situ*, так що вони гібридизуються із клітинною мПНК і/або геномною ДНК, що кодує елонгазу PSE, або зв'язуються з нею, щоб інгібувати експресію білка, наприклад, за допомогою інгібування транскрипції і/або трансляції. Гібридизація може здійснюватися за допомогою звичайної комплементарності нуклеотиду з утворенням стабільного дуплекса або, наприклад, у випадку молекули антисмислової нуклеїнової кислоти, яка зв'язує ДНК-дуплекс, за допомогою специфічної взаємодії у великих витках подвійної спіралі. Антисмислова молекула може бути модифікована таким чином, що вона специфічно зв'язується з рецептором або експресованим на вибраній поверхні клітини антигеном, наприклад, за допомогою зв'язування молекули антисмислової нуклеїнової кислоти з пептидом або антитілом, який/яке зв'язується з рецептором поверхні клітини або антигеном. Молекула антисмислової нуклеїнової кислоти може також при застосуванні описуваних векторів вводиться в клітини. Для одержання достатньої внутрішньоклітинної концентрації антисмислової молекули кращими є конструкції векторів, в яких антисмислова молекула нуклеїнової кислоти знаходиться під контролем прокаріотичного, вірусного або еукаріотичного, включаючи рослинний, промотора.

При ще одній формі виконання винаходу антисмислова молекула нуклеїнової кислоти згідно з винаходом є  $\alpha$ -аномерною молекулою нуклеїнової кислоти.  $\alpha$ -аномерна молекула нуклеїнової кислоти утворює специфічні дволанцюгові гібриди з комплементарною РНК, причому ланцюги на противагу звичайним  $\beta$ -одинацям розміщуються паралельно один до одного, [див. публікацію Gaultier і ін. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641]. Антисмислова молекула нуклеїнової кислоти може до того ж містити 2'-о-метилрибонуклеотид [див. публікацію Inoue і ін. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148] або химерний РНК-ДНК-аналог [див. публікацію Inoue і ін. (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330].

При ще одній формі виконання винаходу антисмислова нуклеїнова кислота згідно з винаходом є рибозимом. Рибозими представляють каталітичні РНК-молекули з рибонуклеазною активністю, які можуть розщеплювати одноланцюгову нуклеїнову кислоту, таку, як мПНК, в якій вони мають комплементарну ділянку. У зв'язку з цим рибозими, наприклад, рибозими Хаммерхідар [описані в публікації Haselhoff und Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591] можуть застосовуватися для каталітичного розщеплення транскриптів PSE-мПНК, щоб цим інгібувати трансляцію PSE-мПНК. Рибозим зі специфічністю до кодуючої елонгазу PSE нуклеїнової кислоти може бути побудований на базі нуклеотидної послідовності описуваної в даній заявці PSE-кДНК (тобто 38\_ck21\_g07fwd у послідовності SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11) або на базі описуваного в даній заявці способу одержання гетерологічної послідовності. Наприклад, може бути побудована похідна тетрагімену-L-19-IVS-ПНК, причому нуклеотидна послідовність активного місця комплементарна до нуклеотидної послідовності, яка повинна розщеплюватися в кодуючій елонгазі PSE мПНК. Див., наприклад, публікації Cech і ін., US 4,987,071 і Cech і ін., US 5,116,742. Альтернативно PSE-мПНК може застосовуватися для селекції каталітичної РНК зі специфічною рибонуклеазною активністю з колекції молекул РНК [див., наприклад, Bartel, D., und Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418].

Альтернативно генна експресія елонгази PSE може бути інгібована таким чином, що нуклеотидні послідовності, комплементарні до регуляторної ділянки PSE-нуклеотидної послідовності (наприклад, PSE-промотору і/або енхансеру), керуються таким чином, що утворюються структури потрібної спіралі, які інгібують

транскрипцію PSE-гена в цільовій клітині [див. загалом публікацію Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Res.* 6(6) 569-84; Helene, C. і ін. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; і Maher. L.J. (1992) *Bioassays* 14(12):807-815].

#### Б. Генний конструкт

Інший об'єкт винаходу стосується нового генного конструкта, який містить виділену нуклеїнову кислоту, що походить з *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium* і кодує поліпептид, який елонгує кислоти жирного ряду з 16, 18 або 20 вуглецевими атомами з щонайменше двома подвійними зв'язками в кислоті жирного ряду на щонайменше два атоми вуглецю, або містить генну послідовність, наведену в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11, її гомологи, похідні або аналоги, які функціонально зв'язані з одним або декількома регуляторними сигналами, переважно для підвищення генної експресії. Прикладами для таких регуляторних послідовностей є послідовності, що зв'язуються з індукторами і репресорами, таким чином регулюють експресію нуклеїнової кислоти. Додатково до цих нових регуляторних послідовностей може ще бути також і природна регуляція цих послідовностей перед власне структурними генами, кращим чином генетично модифікована, так що природна регуляція виключається і підвищується експресія генів. Генний конструкт, однак, може мати більш просту структуру, це означає, що не були вставлені додаткові регуляторні сигнали перед послідовністю SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 або її гомологами і природний промотор зі своєю регуляцією не був делетований. Замість цього природна регулятивна послідовність була мutowана таким чином, що далі регуляція відсутня, а експресія посилена. Генний конструкт може переважно включати одну або декілька так званих енансер-послідовностей, які функціонально зв'язані з промотором і дозволяють проводити підвищену експресію послідовності нуклеїнових кислот. Також є можливість інсерції на 3'-кінці ДНК-послідовності додаткової послідовності, наприклад, ще одного регуляторного елемента або термінаторів. Гени елонгази в генному конструкті можуть бути в одній або декількох копіях. Кращою є наявність інших генів у генному конструкті для інсерції інших генів в організмі.

Кращі регуляторні послідовності для нового способу є, наприклад, у промоторах, таких, як *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacI<sup>q</sup>*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*,  $\lambda$ -*P<sub>R</sub>*- або  $\lambda$ -*P<sub>L</sub>*-промоторі і застосовуються переважно у грам-негативних бактеріях. Інші кращі регуляторні послідовності є, наприклад, у грам-позитивних промоторах *amy* і *SPO2*, у дріжджових або грибних промоторах *ADC1*, *MFa*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *gry28*, *ADH* або в рослинних промоторах *CaMV/35S* [див. публікацію Franck і ін., *Cell* 21 (1980) 285-294], *PRP1* [Ward і ін., *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993)], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B333*, *pos* або в убіквітин- або фезеолін-промоторі. У цьому зв'язку кращими є також індуковані промотори, такі, як описані в EP-A-0 388 186 (індуковані бензилсульфонамідом), *Plant J.* 2, 1992:397-404 (Gatz і ін., індуковані тетрацикліном), EP-A-0 335 528 (індуковані абсцизовою кислотою) або в WO 93/21334 (індуковані етанолом або циклогексанолом) промотори. Іншими придатними рослинними промоторами є промотори *FBP*-азидитозола або *ST-LSI*-промотор картоплі (див. публікацію Stockhaus і ін., *EMBO J.* 8, 1989, 2445), промотор фосфорибозилпірофосфатамідотрансферази з гліцину макс (номер банку генів U87999) або описаний у EP-A-0 249 676 нодієн-специфічний промотор. Особливо кращими промоторами є такі промотори, які дозволяють проводити експресію в тканинах, що беруть участь у синтезі кислот жирного ряду. Особливо кращими є специфічні для насіння промотори, такі, як *usp-*, *LEB4-*, фазеолін- або напіновий промотор. Іншими особливо кращими промоторами є специфічні для насіння промотори, які можуть застосовуватися для однодольних або дводольних рослин і описуються в US 5,608,152 (напіновий промотор з *rancu*), WO 98/45461 (фазеоліновий промотор з *Arobidopsis*), US 5,504,200 (фазеоліновий промотор з *Phaseolus vulgaris*), WO 91/13980 (*Bce4*-промотор з *Brassica*), у публікації Baeumlein і ін., *Plant J.*, 2, 2, 1992:233-239 (*LEB4*-промотор з легумінози), причому ці промотори придатні для дводольних. Приведені далі промотори придатні, наприклад, для однодольних: *lpt-2-* або *lpt-1*-промотор з ячменю (WO 95/15389 і WO 95/23230), хордеїн-промотор з ячменю й інші, описані в WO 99/16890 промотори.

В принципі є можливість застосовувати всі природні промотори зі своїми регуляторними послідовностями, наведеними вище, для нового способу, також можна застосовувати додатково синтезовані промотори.

Генний конструкт, як описано вище, може включати інші гени, які варто вводити в організм. Є можливість, що дає переваги, вводити в організми-хазяїни регуляторні гени, такі, як гени для індукторів, рецепторів або ферментів, які внаслідок їх ферментативної активності беруть участь у регуляції одного або декількох генів біосинтезу, і експресувати у них. Ці гени можуть бути гетерологічного або гомологічного походження. Вбудовані гени можуть мати свій власний промотор або знаходитися під контролем промотору послідовності SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 або їх гомологів, похідних або аналогів.

Переважно генний конструкт для експресії інших наявних генів включає ще 3'- і/або 5'-кінцеві регуляторні послідовності для підвищення експресії, які вибираються в залежності від вибраного організму-хазяїна і гена або генів для оптимальної експресії.

Ці регуляторні послідовності повинні, як наведено вище, забезпечувати специфічну експресію генів і білків. В залежності від організму-хазяїна це означає, наприклад, те, що ген експресується або надекспресується тільки після індукції або що він відразу експресується і/або надекспресується.

Крім того, регуляторні послідовності або фактори можуть впливати на експресію введеного гена і таким чином підвищувати її. Таким чином є можливість посилення регуляторних елементів на рівні транскрипції при застосуванні сильних сигналів транскрипції, таких, як промотори і/або енансери. Однак, є також і можливість посилення трансляції наприклад шляхом поліпшення стабільності мРНК. Переважно послідовності нуклеїнових кислот згідно з винаходом клонуються разом із щонайменше одним геном-репортером у генний конструкт (означає експресійну касету, конструкт нуклеїнової кислоти), який вводиться в організм через вектор або безпосередньо в геном. Цей ген-репортер повинен забезпечувати легке виявлення методами аналізу, флуоресценції, хемотомодом, біоломінесценції, або опору, або фотометричного виміру. Як приклад для гена-репортера варто привести резистентні до антибіотика або гербіциду гени, гени гідролази, гени флуорисцентного білка, гени біоломінесценції, гени обміну речовин цукру або нуклеотиду або гени біосинтезу,



такі, як Ura3-ген, Ilv2-ген, ген люциферази, ген б-галактозидази, gfp-ген, ген 2-дезоксиглюкоза-6-фосфатфосфатази, ген б-глюкуронідази, ген б-лактамази, ген неоміцинофосфотрансферази, ген гігроміцинофосфотрансферази або ген BASTA (резистентності глюфозинату ген). Ці гени дозволяють легку вимірюваність і визначення кількості активності до транскрипції і разом з цим експресії генів. Цим можна визначати місця геномів, які виявляють різну продуктивність.

Послідовності нуклеїнових кислот згідно з винаходом з наведеною в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовністю, які можуть кодувати елонгазу, можуть міститися в одній або декількох копіях в експресійній касеті (у генному конструкті).

Експресійна касета (тобто генний конструкт, конструкт нуклеїнової кислоти) може містити щонайменше ще одну нуклеїнову кислоту, яка кодує ген переважно з біосинтезу кислоти жирного ряду, і яка повинна бути внесена в організми-хазяїни. Ці гени можуть знаходитися під роздільною регуляцією або під тим же регіоном регуляції, що і гени елонгаз згідно з винаходом. При цих генах мова йде, наприклад, про інші гени біосинтезу, переважно синтезу кислот жирного ряду, які дозволяють підвищений синтез. Як приклади можна привести гени для  $\Delta 19$ -,  $\Delta 17$ -,  $\Delta 15$ -,  $\Delta 12$ -,  $\Delta 9$ -,  $\Delta 8$ -,  $\Delta 6$ -,  $\Delta 5$ -,  $\Delta 4$ -десатурази, різні гідролази,  $\Delta 12$ -ацетиленаз, ацил-АСР-тіоестерази,  $\beta$ -кетואцил-АСР-синтази або  $\beta$ -кетואцил-АСР-редуктази. Переважно в конструкті нуклеїнової кислоти застосовуються гени десатурази. Також і ці гени можуть бути в одній або декількох копіях у генному конструкті.

#### В. Рекомбінантні вектори експресії і клітини-хазяїни

Іншим об'єктом винаходу є вектори, переважно, експресійні вектори, що містять нуклеїнову кислоту згідно з винаходом або генний конструкт згідно з винаходом, які кодують елонгазу PSE (або її частину). Термін "вектор" стосується молекули нуклеїнової кислоти, яка може транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона зв'язана. Типом вектора є "плазмід", що відноситься до кільцевої дволанцюгової ДНК-петлі, в яку можуть бути лігвані додаткові ДНК-сегменти. Іншим типом вектора є вірусний вектор, причому у вірусний геном можуть бути лігвані додаткові ДНК-сегменти. Певні вектори можуть автономно реплікуватися в одній клітині-хазяїні, в яку вони вбудовані (наприклад, бактеріальний вектор з бактеріальним стрибком реплікації і епісомальні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомальні вектори ссавців) при вбудуванні в клітину-хазяїна інтегрують у геном клітини-хазяїна і внаслідок цього реплікують разом з геномом-хазяїном. До того ж певні вектори можуть керувати експресією генів, з якими вони функціонально зв'язані. Ці вектори позначаються "експресійними векторами". Звичайно експресійні вектори, які придатні для ДНК-рекомбінації, мають форму плазмід. У даному описі терміни "плазмід" і "вектор" можуть замінятися один одним, тому що плазмід є найбільш часто застосовуваною формою вектора. Винахід, однак, включає також і інші форми експресійних векторів, такі, як вірусні вектори (наприклад, ретровіруси, аденовіруси і споріднені аденовіруси), які виконують такі ж функції. Далі термін "вектор" включає й інші вектори, відомі фахівцю в даній галузі, наприклад, фаги, віруси, такі, як SV40, CMV, бакуловірус, аденовірус, транспозони, IS-елементи, фасміди, фагеміди, косміди, лінійні або кругові ДНК, а також РНК.

Рекомбінантні експресійні вектори згідно з винаходом включають нуклеїнову кислоту згідно з винаходом або генний конструкт згідно з винаходом у формі, яка придатна для експресії нуклеїнової кислоти в клітині-хазяїні, що означає те, що рекомбінантні експресійні вектори включають одну або декілька регуляторних послідовностей, вибраних на базі застосовуваних для експресії клітин-хазяїнів, які функціонально зв'язані з підлягаючою експресії послідовністю нуклеїнової кислоти. У рекомбінантному експресійному векторі поняття "функціонально зв'язані" означає те, що послідовність нуклеїнової кислоти в такий спосіб зв'язана з регуляторною послідовністю, що можлива експресія послідовності нуклеїнових кислот і вони зв'язані одна з одною, що обидві послідовності виконують передбачену, призначену для послідовності функцію (наприклад, у системі *in-vitro*-транскрипції/трансляції або в клітині-хазяїні, якщо вектор вбудований у клітину-хазяїна). Термін "регуляторна послідовність" включає інші елементи контролю експресії (наприклад, сигнали поліаденілювання). Регуляторні послідовності описані в публікації Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), або див.: Gruber and Crosby, у публікації: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Видавн.: Glick und Thompson, глава 7, 89-108, включаючи наведені в них літературні джерела. Регуляторні послідовності включають такі послідовності, які управляють конститутивною експресією послідовності нуклеїнової кислоти в багатьох типах клітини-хазяїна і такі, що управляють безпосередньо експресією послідовності нуклеїнової кислоти тільки у певних клітинах-хазяїнах за певних умов. Фахівець у даній галузі знає, що побудова експресійних векторів може залежати від таких факторів, як вибір клітин-хазяїв, що підлягають трансформації, величина експресії бажаного білка і т.п. Експресійні вектори згідно з винаходом можуть вбудовуватися в клітину-хазяїна, щоб завдяки цьому одержувати білки або пептиди, включаючи гібридні білки або пептиди, які кодуються нуклеїновими кислотами, описуваними тут (наприклад, елонгази PSE, мутантні форми елонгаз PSE, гібридні білки і т.п.).

Рекомбінантні експресійні вектори згідно з винаходом можуть бути побудовані для експресії елонгаз PSE у прокаріотичних і еукаріотичних клітинах. Наприклад, гени елонгаз PSE можуть бути експресовані в бактеріальних клітинах, таких, як *S. glutamicum*, клітини комах (при застосуванні експресійних векторів Baculovirus), клітини дріжджів і грибів [див. публікацію Romanos, M.A., і ін. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., і ін. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", у: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Видавн., Стр.396-428: Academic Press: San Diego; і van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", у: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F., і ін., Видавн., Стр.1-28, Cambridge University Press: Cambridge], Algen [Falcatore і ін., 1999, Marine Biotechnology. 1, 3:239-251], інфузорії типів: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Pseudocohnilembus, Euplates, Engelmanniella і Stylonychia, зокрема Stylonychia lemnae, з векторами за способом трансформації, описаному в WO 98/01572, у такі клітини багатоклітинних рослин [див. Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of

*Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.:583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, Розділ 6/7, S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jenéс і ін., Techniques for Gene Transfer, у: Transgenic Plants, том 1, Engineering and Utilization, Видавн.: Kung and R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 (і в цитованих там літературних джерелах)], або клітини ссавців. Придатні клітини-хазяїни наведені також у публікації Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Реконбінантний експресійний вектор може бути альтернативно, наприклад, при застосуванні T7-промотор-регуляторної послідовності і T7-полімерази, транскрибований і трансльований *in vitro*.

Експресія білків у прокаріотах здійснюється в більшості випадків за допомогою векторів, які містять конститутивні або індуквані промотори, які управляють експресією гібридних або негібридних білків. Вектори злиття вбудовують ряд амінокислот у кодований білок, звичайно на амінокінці реконбінантного білка, однак, також і на карбоксильному кінці або ж зливаються всередині придатних ділянок із білком. Вектори злиття звичайно мають три задачі: 1) посилення експресії реконбінантного білка; 2) підвищення розчинності реконбінантного білка і 3) підтримка очищення реконбінантного білка впливом в якості ліганда при афінному очищенні, наприклад, за допомогою так званих His-Tag. При експресійних векторах злиття протеолітичне місце розщеплення часто вбудовується в місце з'єднання вузла злиття і реконбінантного білка, так що відділення реконбінантного білка від вузла злиття можливе після очищення гібридного білка. Ці ферменти і їх відповідні послідовності розпізнавання включають фактор Ха, тромбін і ентерокиназу.

Типовими експресійними векторами злиття є серед інших pGEX [див. Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40], pMAL [див. New England Biolabs, Beverly, MA] und pRIT5 [Pharmacia, Piscataway, NJ], при яких глутатіон-S-трансферазу (GST), малтозу, Е-зв'язуючий білок, відповідно, білок А піддають злиттю з цільовим білком. При одній з форм виконання винаходу кодуєча PSE послідовність клонована в експресійний вектор pGEX, так що одержують вектор, який кодує гібридний білок, який включає від N-кінця до С-кінця GST-тромбіновий сайт розщеплення-Х-білка. Гібридний білок може піддаватися очищенню за допомогою афінної хроматографії при застосуванні смоли глутатіонарагози. Реконбінантна елонгаза PSE, яка не може зливатися з GST, може бути одержана розщепленням гібридного білка тромбіном.

Прикладами придатних *E. coli*-експресійних векторів, що індукуються та не зливаються, є серед іншого pTrc (див. публікацію Amann і ін. (1988) Gene 69:301-315) і pET 11d (див. Studier і ін., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Експресія цільового гена з pTrc-вектора заснована на транскрипції за допомогою РНК-полімерази-хазяїна гібридного *trp-lac*-промотору. Цільова експресія гена з pET 11d-вектора заснована на транскрипції T7-gn10-lac-промотору злиття, що передається співекспресованою вірусною РНК-полімеразою (T7 gn1). Ця вірусна полімераза готується штамми-хазяїнами BL21 (DE3) або HMS174 (DE3)  $\lambda$ -профага, який переводить T7 gn1-ген під транскрипційний контроль *lacUV 5*-промотора.

Інші, придатні для прокаріотичних організмів вектори відомі спеціалісту в даній галузі. Цими векторами є, наприклад, вектори в *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR-серія, а саме pBR322, pUC-серія, а саме pUC18 або pUC19, M113mp-серія, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1, pgt11 або pBdCl, у *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 або pIJ361, у *Bacillus* pUB110, pC194 або pBD214, у *Corynebacterium* pSA77 або pAJ667.

Стратегією максимізації експресії реконбінантного білка є експресія білка в бактерії-хазяїні, здатність якої до протеолітичного розщеплення реконбінантного білка порушена [див. Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119-128]. Іншою стратегією є зміна послідовності нуклеїнової кислоти, що вбудовується у експресійний вектор, так що окремими кодонами для кожної амінокислоти є такі, що переважно застосовуються у вибраній для експресії бактерії, такий, як *C. glutamicum* [див. Wada і ін. (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118]. Зміна послідовності нуклеїнової кислоти згідно з винаходом здійснюється за допомогою стандартної техніки синтезу ДНК.

При ще одній формі виконання винаходу вектор експресії елонгази PSE є експресійним вектором дріжджів, наприклад, вектор експресії в дріжджах *S. cerevisiae* включає pYepSed [див. Baldari і ін. (1987) Embo J. 6:229-234], pMFa [див. Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943], pJRY88 [див. Schultz (Шульц) і ін. (1987) Gene 54:113-123], також pYES2 [див. Invitrogen Corporation, San Diego, CA]. Вектори і способи конструкції векторів, які придатні для застосування в інших грибах, таких, як філаментні гриби, включає вектори, що описуються в публікаціях: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, у: Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdy і ін., Видавн., Стр.1-28, Cambridge University Press: Cambridge, або в: More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennett & L.L. Lasure, Видавн., Стр.396-428: Academic Press: San Diego]. Іншими придатними векторами дріжджів є, наприклад, pAG-1, YEp6, YEp13 або pEMBLYe23.

Альтернативно до цього елонгази PSE згідно з винаходом можуть бути експресовані при застосуванні векторів бакуловірусу. Вектори бакуловірусу, які є для експресії білків у вирощених клітинах комах (наприклад, у клітинах Sf9) включають pAc-серію [див. Smith і ін. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165] і pVL-серію [див. Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39].

Вищенаведені вектори представляють тільки невеликий огляд можливих придатних векторів. Інші плазмідні відомі фахівцю і наведені, наприклад, у публікації: Cloning Vectors (див. Видавн. Pouwels, P.H., та інш., Elsevier, Amsterdam-Нью Йорк-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

При ще одній формі виконання винаходу нуклеїнова кислота згідно з винаходом експресується в клітинах ссавців при застосуванні експресійного вектора ссавців. Приклади таких векторів включають pCDM8 [див. Seed, B. (1987) Nature 329:840] і pMT2PC [див. Kaufman і ін. (1987) EMBO J. 6:187-195]. При застосуванні в клітинах ссавців контрольні функції експресійного вектора часто забезпечуються вірусними регуляторними елементами. Застосовувані звичайно промотори походять, наприклад, від поліоми, аденовірусу2, цитомегалівірусу і мав'ячого вірусу (Simian Virus) 40. Інші придатні системи експресії для прокаріотичних і еукаріотичних клітин наведені в главах 16 і 17 публікації Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

При іншій формі виконання рекомбінантний вектор експресії у ссавців може управляти експресією нуклеїнової кислоти переважно у певному типі (наприклад, застосовуються тканиноспецифічні регуляторні елементи для експресії нуклеїнової кислоти). Тканиноспецифічні регуляторні елементи відомі фахівцю. Необмежувальними прикладами для придатних тканиноспецифічних регуляторних елементів є серед інших промотор альбуміну [специфічний печінці; див. Pinkert і ін. (1987) *Genes Dev.* 1:268-277], лімфоспецифічні промотори [див. Calame und Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275], зокрема, промотори Т-рецепторів клітин [див. Winoto und Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733] і імуноглобуліни [див. Banerji і ін. (1983) *Cell* 33:729-740; Queen und Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748], нейроноспецифічні промотори [наприклад, нейрофіламентпромотор; Byrne und Ruddle (1989) *PNAS* 86:5473-5477], специфічні для підшлункової залози промотори [Edlund та інш., (1985) *Science* 230:912-916] і специфічні для молочної залози промотори [наприклад, промотор молочної сироватки; див. US 4,873,316 і EP-A-0 264 166]. Також вони включають регулюючі розвиток промотори, наприклад, hox-промотори миші [див. Kessel und Gruss (1990) *Science* 249:374-379] і промотор фетобілка [див. Campes und Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546].

При ще одній формі виконання винаходу елонгази PSE згідно з винаходом можуть бути експресовані в одноклітинних рослинних клітинах (наприклад, водоростях), див. Falcatore і ін., 1999, *Marine Biotechnology* 1 (3):239-251 і наведені там літературні джерела, і в рослинних клітинах з високорозвинених рослин (наприклад, таких *Spermatophyten*, як продукти рільництва). Приклади експресійних векторів рослин включають такі вектори, як описані в публікаціях: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; і Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: *Transgenic Plants*, том 1, Engineering and Utilization, Видавн.: Kung і R. Wu, Academic Press, 1993, Стр.15-38. Іншими придатними рослинними векторами є, наприклад, наведені серед іншого в "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Розділ 6/7, Стр.71-119. Переважними векторами є так звані біфункціональні вектори або бінарні вектори, що реплікуються в *E. coli* і в агробактеріях.

Експресійна касета рослини містить переважно регуляторні послідовності, які можуть управляти експресією генів у клітинах рослин і функціонально зв'язані, так що кожна послідовність може виконувати свою функцію, наприклад функцію термінації транскрипції, наприклад, сигнали поліаденілювання. Кращими сигналами поліаденілювання є такі, що походять від t-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*, як відомий під назвою ген 3 октопінсинтази Ti-плазміді pTiACH5 [див. Gielen і ін., *EMBO J.* 3 (1984) 835ff.] або його функціональні еквіваленти, однак також придатні і всі інші функціонально активні в рослинах термінатори.

У зв'язку з тим, що експресія генів у рослинах дуже часто не обмежується рівнями транскрипції, рослинна експресійна касета містить переважно інші, функціонально зв'язані послідовності, такі, як енхансери трансляції, наприклад, надпослідовність, що містить 5'-нетрансльовану лідерну послідовність з вірусу тютюнової мозаїки, що підвищує співвідношення білка до РНК [див. Gallie і ін., 1987, *Nucl. Acids Research* 15:8693-8711].

Експресія гена в рослинах повинна бути функціонально зв'язана з придатним промотором, що проводить експресію у визначений період часу і специфічно тканині або клітинам. Переважно промоторами, які сприяють конститутивній експресії [див. Benfey і ін., *EMBO J.* 8 (1989) 2195-2202], такими ж як похідні від рослинних вірусів, є 35S CAMV [див. Franck і ін., *Cell* 21 (1980) 285-294], 19S CaMV (див. також US 5,352,605 і WO 84/02913) або рослинні промотори, описані в US 4,962,028, малої підгрупи рибулозо-1,5-біфосфаткарбоксилази.

Іншими кращими послідовностями для функціонального зв'язування в експресійних касетах є послідовності-мішені, які необхідні для подачі генного продукту у свою відповідну частину клітини [див. огляд у публікації Kermode, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 4 (1996) 285-423 і в наведених там літературних джерелах], наприклад, у вакуоль, ядро клітини, усі види пластидів, такі, як амілопласти, хлоропласти, хромопласти, позаклітинний простір, мітохондрії, ендоплазматична ретикулум, пероксисоми й інші частини клітин рослин.

Експресія генів рослин може бути полегшена за допомогою хімічно індукованого промотору [див. огляд у публікації Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89-108]. Хімічно індуковані промотори придатні особливо тоді, коли бажане здійснення експресії генів специфічне для певного періоду часу. Прикладами таких промоторів є індукований саліциловою кислотою промотор (WO 95/19443), індукований тетрацикліном промотор [див. Gatz і ін. (1992) *Plant J.* 2, 397-404] і індукований етанолом промотор.

Придатними промоторами можуть бути також і промотори, які реагують на біотичні й абіотичні стресові умови, наприклад, індукований патогеном промотор PRP1-гена [див. Ward і ін., *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993) 361-366], індукований теплом hsp80-промотор з помідора (US 5,187,267), індукований холодом промотор альфаамілази з картоплі (див. WO 96/12814), або індукований пораненнями rinII-промотор (EP-A-0 375 091).

Кращі зокрема такі промотори, які викликають генну експресію в тканині й органах, в яких має місце біосинтез олій, у клітинах насіння, наприклад, клітинах ендоспермса розвиненого ембріона. Придатними промоторами є промотор напінного гена з рапсу (US 5,608,152), USP-промотор з *Vicia faba* [див. Baumelein та інш., *Mol Gen Genet*, 1991, 225 (3):459-67], олеозинний промотор з *Arabidopsis* (WO 98/45461), фазеолін-промотор з *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), Все4-промотор з *Brassica* (WO 91/13980) або легіум-B4-промотор [див. LeB4; Baumelein і ін., 1992, *Plant Journal*, 2 (2):233-9], також промотори, які викликають специфічну для насіння експресію в таких однодольних рослинах, як кукурудза, ячмінь, пшениця, жито, рис і т.д. Придатними промоторами є промотор lpt2-або lpt1-гена з ячменю (WO 95/15389 і WO 95/23230) або описані в WO 99/16890 промотори (з гена гордеїну ячменя, гена глутеліну рису, гена орицину рису, гена проламіну рису, гена гліадину пшениці, гена глутеліну пшениці, гена зеїну кукурудзи, гена глутеліну вівса, гена казерину сорго, гена секаліну жита).

Також особливо придатними є промотори, які викликають специфічну для пластид експресію, тому що

пластиди є тією частиною, в якій синтезуються попередники, а також окремі кінцеві продукти біосинтезу ліпідів. Придатні промотори, такі, як вірусні промотори ДНК-полімерази, описані WO 95/16783 і WO 97/06250, *clpP*-промотори з *Arabidopsis*, описані в WO 99/46394.

Винахід стосується також і рекомбінантного експресійного вектора, який включає молекулу ДНК згідно з винаходом, клоновану в антисмислового напрямку в експресійний вектор, тобто молекула ДНК функціонально зв'язана з регуляторною послідовністю таким чином, що забезпечується можливість експресії (за допомогою транскрипції молекули ДНК) молекули РНК, яка є "антисмисловою" до РСЕ-мРНК. Можуть бути вибрані регуляторні послідовності, які функціонально зв'язані з клонованою в антисмислового напрямку нуклеїновою кислотою і управляють безперервною експресією молекули антисмислової РНК у великій кількості типів клітин, наприклад, можуть бути вибрані вірусні промотори і/або енхансери або регуляторні послідовності, які управляють безперервною, специфічною тканині або клітині експресією антисмислової РНК. Антисмисловий вектор експресії може бути у формі рекомбінантної плазмиди, фagemіду або атенуйованого вірусу, в якому антисмислова нуклеїнова кислота виробляється під контролем високоефективної регуляторної ділянки, активність якої може визначатися типом клітини, в яку введений вектор. Пояснення регуляції генної експресії за допомогою антисмислового гена див. В публікації Weintraub, H., і ін., *Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis*, Reviews - Trends in Genetics, том 1(1) 1986.

Іншим об'єктом винаходу є клітини-хазяїни, в які введений рекомбінантний експресійний вектор. Терміни "клітина-хазяїн" і "рекомбінантна клітина-хазяїн" можуть взаємно замінятися. Само собою зрозуміло, ці терміни стосуються не тільки визначених цільових клітин, але і потомків або потенційних потомків цієї клітини. У зв'язку з тим, що в поколіннях, які ідуть один за одним, внаслідок мутації або впливів навколишнього середовища можуть виникати різні модифікації, ці потомки не обов'язково ідентичні батьківській клітині, однак їх усе ще позначають цим терміном.

Клітина-хазяїн може бути прокаріотичною або еукаріотичною клітиною. Наприклад, елонгаза РСЕ може бути експресована в клітинах бактерій, таких як *C. glutamicum*, в клітинах комах, клітинах грибів або ссавців (наприклад, в клітинах китайського хом'ячка (*CHO*) або *COS*-клітинах), водоростей, інфузорій, клітин рослин, грибів або інших мікроорганізмів, таких, як *C. glutamicum*. Інші придатні клітини-хазяїни відомі фахівцю в даній галузі.

Вектор ДНК може вводиться в прокаріотичні або еукаріотичні клітини за допомогою звичайних методів трансформації або трансфекції. Терміни "трансформація" і "трансфекція", "кон'югація" і "трансдукція", застосовувані в описі, включають багато відомих з рівня техніки способів вбудовування чужої нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК) у клітину-хазяїна, включаючи співпреципітацію фосфату кальцію або хлориду кальцію, викликану DEAE-декстраном трансфекцію, ліпофекцію, природну комплементацию, хімічно індукований перенос, електропорацію або бомбардування зарядженими частинками. Придатні способи трансформації або трансфекції клітин-хазяїнів можна знайти в публікації авторів Sambrook і ін. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) і інших довідниках, таких, як *Methods in Molecular Biology*, 1995, том 44, *Agrobacterium protocols*, Видавн.: Garland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Щодо стабільної трансфекції клітин ссавців відомо, що в залежності від застосованого вектора експресії і застосованого метода трансфекції тільки мала частина клітин інтегрує чужу ДНК у свій геном. Для ідентифікації і селекції інтегрованих клітин у клітину-хазяїна вбудовується звичайно один ген, який кодує маркер, що селектується (наприклад, стійкість до антибіотика, разом з цільовим геном). Переважні маркери, що селектуються, включають такі маркери, які забезпечують стійкість до таких медикаментів, як G418, гігromіцин і метотрексат, або в рослинах такі, які забезпечують стійкість до гербіцидів, таких, як гліфосфат або гліфозінат. Іншими придатними маркерами є маркери, що кодують гени, які беруть участь у біосинтезі наприклад, цукру або амінокислот, таких, як галактозидаза, *uga3* або *ilv2*. Маркери, які кодують такі гени, як люцифераза, *gfp* або інші гени флуоресценції, також придатні. Ці маркери можуть застосовуватися в мутантах, в яких ці гени не є функціональними, тому що вони делетовані за допомогою звичайних способів. Далі маркери, що кодують нуклеїнову кислоту, яка кодує маркер, що селектується, можуть вбудовуватися в клітину-хазяїна на тому ж векторі, що і вектор, який кодує елонгазу РСЕ, або можуть вбудовуватися в особливий вектор. Клітини, що стабільно трансфіковані вбудованою нуклеїновою кислотою, можуть бути ідентифіковані, наприклад, за допомогою медикаментозної селекції (наприклад, виживають клітини, які інтегрували маркер, що селектується, а інші клітини гинуть).

Для одержання гомологічного рекомбінантного мікроорганізму створюють вектор, який містить щонайменше одну ділянку гена РСЕ, по якому проведена селекція, приєднання або заміщення, щоб цим змінювати ген РСЕ, наприклад, піддавати функціональній дизрупції. Цей ген РСЕ є переважно геном з *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodinium* або *Thraustochytrium*, може, однак, застосовуватися гомолог або аналог з інших організмів, навіть із грибів, комах або ссавців. При одній кращій формі виконання винаходу вектор виконаний таким чином, що ендегенний ген РСЕ при гомологічній рекомбінації піддається функціональній дизрупції (тобто не кодує функціональний білок; він називається також Knock-out-вектором). Альтернативно вектор може бути виконаний таким чином, що ендегенний ген РСЕ мутує при гомологічній рекомбінації або змінюється іншим чином, однак усе ще кодує функціональний білок (наприклад, ділянка, що лежить у протилежній орієнтації, може бути змінена таким чином, що експресію змінюється ендегенна РСЕ). Для одержання точкової мутації гомологічної рекомбінації можуть застосовуватися гібриди ДНК-РНК, які відомі з джерел Cole-Strauss і ін., 1999, *Nucleic Acids Research* 27(5): стор.1323-1330 і Kmiec, *Gene therapy*, 1999, *American Scientist*, 87(3): стор.240-247.

У векторі для гомологічної рекомбінації змінена ділянка гена елонгази РСЕ на своєму 5'- і 3'-кінці фланкована додатковою нуклеїновою кислотою гена РСЕ, так що можлива гомологічна рекомбінація між екзогенним геном РСЕ, на якому є вектор, і ендегенним геном РСЕ у мікроорганізмі або в рослині. Додаткова фланкуюча РСЕ-нуклеїнова кислота має достатню довжину для успішної гомологічної рекомбінації ендегенним геном. Звичайно у векторі міститься від кілька сотень до тисячі пар основ фланкуючої ДНК (як на

5'-, так і на 3'-кінці) [опис векторів для гомологічної рекомбінації див., наприклад, публікацію Thomas, K.R., і Careschi, M.R. (1987) Cell 51:503 або рекомбінації в *Physcomitrella patens* на базі кДНК у публікації Strepp і ін., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (8):4368-4373]. Вектор вводиться в мікроорганізм або клітину рослини, наприклад, за допомогою ДНК із використанням поліетиленгліколю як медіатор, і клітини, в яких уведений ген елонгази PSE гомологічно рекомбінований з ендегенним геном PSE, селектуються відомими фахівцями в даній галузі методами.

При іншій формі виконання винаходу можуть бути одержані рекомбінантні організми, такі, як мікроорганізми і рослини, які містять вибрані системи, що дозволяють проводити регульовану експресію вбудованого гена. Включення гена PSE у вектор, який введений під контролем оперона *lac*, дозволяє, наприклад, експресію гена PSE тільки в присутності ізопропіл- $\beta$ -тіоґалактозиду. Ці системи регуляції відомі фахівцям.

Клітина-хазяїн згідно з винаходом, така, як прокаріотична або еукаріотична клітина-хазяїн, що росте в культурі або в полі, може застосовуватися для одержання (тобто експресії) елонгази PSE. В рослинах може використовуватися додатково альтернативний спосіб прямого переносу ДНК у квітки, що розвиваються, за допомогою електропорації або переносу гена за допомогою агробактерій. Отже винахід стосується способу виробництва елонгаз PSE при застосуванні клітин-хазяїнів згідно з винаходом. При одній з форм виконання спосіб включає вирощування клітини-хазяїна згідно з винаходом (в яку вбудований рекомбінантний ген експресії, що кодує елонгазу PSE, або в геном якої введений ген, що кодує дикий тип елонгази PSE або змінену елонгазу PSE) у придатному середовищі доти, поки не буде одержана елонгаза PSE. Спосіб включає при іншій формі виконання винаходу виділення елонгаз PSE із середовища або клітини-хазяїна. Клітини-хазяїни, що в принципі придатні для прийому нуклеїнової кислоти згідно з винаходом, нового генного продукту згідно з винаходом або вектора згідно з винаходом, є прокаріотичними або еукаріотичними організмами. Переважно застосовуваними організмами є такі організми, як бактерії, гриби, дріжджі, тваринні або рослинні клітини.

Іншими кращими організмами є тварини або рослини або їх частини. Під поняттям "тварина" варто розуміти таке, що не включає людину. Переважно застосовуються гриби, дріжджі або рослини, особливо переважно гриби і рослини, зокрема, такі рослини, як рослини з олійними плодами, що містять велику кількість ліпідних сполук, такі, як рапс, ріцина, енотера, канола, льон, соя, сафлор, земляний горіх, соняшник, огірочник, олійна пальма, кокосовий горіх, або такі рослини, як кукурудза, пшениця, жито, овес, рис, ячмінь, пшениця, бавовна, маніок, перець, тегетес, картопля, тютюн, баклажани, томати, горошок, люцерна, чагарникові рослини (кава, какао, чай), види *Salix*, дерева (олійна пальма, кокосовий горіх), а також злакові і кормові рослини. Особливо кращі рослини з олійними плодами, такі, як соя, земляний горіх, рапс, люцерна, ріцина, льон, енотера, соняшник, сафлор, дерева (олійна пальма, кокосовий горіх).

Згідно із кращою формою виконання винахід стосується також клітини рослини, яка включає полінуклеотид або вектор згідно з винаходом. Далі кращі трансгенні рослини або тканини рослин, що включають клітини згідно з винаходом. При іншій кращій формі виконання даний винахід стосується тих частин рослин, які придатні для збору врожаю і до такого матеріалу, який придатний до розмноження трансгенних рослин згідно з винаходом і які або містять клітини рослин згідно з винаходом, які експресують нуклеїнову кислоту згідно з винаходом, або містять клітини, які мають підвищений рівень білка згідно з винаходом. Придатними для збору врожаю є в принципі всі частини рослин, зокрема, квіти, пилок, плоди, сіянці, корені, листя, насіння, бульби, стебла і т.п.. Матеріал для розмноження охоплює, наприклад, насіння, фрукти, сіянці, бульби, кореневища і черенки.

Г. Виділена, специфічна поліненасиченим кислотам жирного ряду елонгаза (PSE)

Інший об'єкт винаходу стосується виділених елонгаз PSE і їх біологічно активних частин. "Виділений" або "очищений" білок або його біологічно активна частина в основному вільні від клітинного матеріалу, якщо вони виробляються ДНК-рекомбінантною технікою, або хімічними попередніми стадіями або іншими хімікатами, якщо вони хімічно синтезовані.

Поняття "в основному вільний від клітинного матеріалу" включає композиції елонгаз PSE, в яких білок відділений від клітинних компонентів клітин, в яких він природно або рекомбінантно виробляється. При одній формі виконання винаходу поняття "в основному вільний від клітинного матеріалу" охоплює композиції PSE з менше, ніж 30% (у перерахуванні на суху вагу) вмістом не елонгаз PSE (позначених тут як "забруднюючий білок"), особливо переважно менше, ніж 20% вмістом неелонгаз PSE, і ще більш переважно менше, ніж 10% вмістом неелонгаз PSE, і найкраще переважно менше, ніж 5%. Якщо PSE або її біологічно активна частина одержана рекомбінантно, то вона в основному вільна від живильного середовища, тобто живильне середовище дорівнює менше, ніж 20%, переважно менше, ніж 10% і особливо переважно менше, ніж 5% об'єму композиції білка. Поняття "в основному вільний від хімічних сполук попередніх стадій або інших хімікатів" включає композиції PSE, в яких білок відділений від хімічних попередніх стадій або інших хімікатів, що беруть участь у синтезі білка. При ще одній формі виконання винаходу поняття "в основному вільний від хімічних сполук попередніх стадій або інших хімікатів" включає композиції PSE з менш, ніж 30% (у перерахуванні на суху вагу) хімічних сполук попередніх стадій або не-PSE-хімікатів, переважно, менше, ніж 20% хімічних сполук попередніх стадій або не-PSE-хімікатів, особливо переважно менш, ніж приблизно 10% хімічних сполук попередніх стадій або не-PSE-хімікатів і найбільш переважно менше, ніж 5% сполук хімічних попередніх стадій або не-PSE-хімікатів. При кращих формах виконання винаходу виділені білки або їх біологічно активні частини не мають забруднюючих білків з того ж організму, з якого походить елонгаза PSE. У випадку білка згідно з винаходом, що включає наведену в SEQ ID NO:10 послідовність, або кодується геном, що включає послідовність SEQ ID NO 9, варто враховувати те, що послідовність починається з двох Met. Це може привести до того, що при трансляції відповідної кодуючої послідовності нуклеїнової кислоти експресуються дві похідні білка згідно з винаходом, починаючи з першого або другого Met. Експресійне співвідношення двох похідних може, в залежності від виду експресії або організму-хазяїна, коливатися між 0 і 1. У такий спосіб охоплюється елонгаза PSE, яка містить обидві наведені похідні або тільки одну похідну.

Обидві похідні можуть мати різну активність, локалізацію, термін напівобміну, механізми регуляції і т.п. Ці білки одержують звичайно рекомбінантною експресією, наприклад, з *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodinium* або *Thraustochytrium*-PSE у таких рослинах, як *Physcomitrella patens* відповідно, вищенаведені або мікроорганізми, наприклад, бактеріях, таких, як *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *C. glutamicum*, грибах, таких, як *Mortierella*, дріжджах, таких, як *Saccharomyces*, або інфузоріях, таких, як *Colpidium* або водоростях, таких, як *Phaeodactylum*.

Виділена елонгаза PSE або її частина може брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови клітинної мембрани в *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodinium* або *Thraustochytrium* сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани. При кращих формах виконання винаходу білок або його частина охоплює амінокислотну послідовність, яка є настільки достатньо гомологічною до амінокислотної послідовності з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12, що білок або його частина зберігають здатність брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови клітинної мембрани в *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodinium* або *Thraustochytrium* сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани. Частина білка є біологічно активною частиною, як тут описується. При ще одній кращій формі виконання винаходу елонгаза PSE згідно з винаходом має одну з наведених у SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотних послідовностей. При ще одному кращому варіанті виконання PSE має амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, що гібридується з нуклеотидною послідовністю з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11. При ще одній формі виконання PSE має амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка є гомологічною щонайменше приблизно від 50 до 60%, переважно, щонайменше приблизно від 60 до 70%, особливо переважно щонайменше приблизно від 70 до 80%, від 80 до 90%, від 90 до 95% і ще більш переважно щонайменше приблизно 96%, 97%, 98%, 99% або ще більш гомологічна одній з представлених SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотних послідовностей. Краща PSE згідно з винаходом має також щонайменше одну з описуваних тут активностей. Наприклад, краща елонгаза PSE згідно з винаходом включає амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, наприклад, при жорстких умовах гібридується з нуклеотидною послідовністю з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 і може брати участь в обміні речовин, необхідних для побудови клітинної мембрани в *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodinium* або *Thraustochytrium* сполук або у транспортуванні молекул через ці мембрани або може продовжувати одну або кілька поліненасичених кислот жирного ряду з щонайменше двома подвійними зв'язками і довжиною ланцюга в 16 або 18 атомів вуглецю.

При іншій формі виконання PSE є гомологічною до наведеної в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотної послідовності і зберігає функціональну активність білка однієї з наведених у SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 послідовностей, однак її амінокислотна послідовність відрізняється внаслідок природних варіацій або мутагенезу, як докладно описано вище. При ще одній кращій формі виконання винаходу PSE є білком, що включає амінокислотну послідовність, яка щонайменше на приблизно від 50 до 60%, переважно щонайменше приблизно від 60 до 70% і особливо переважно, щонайменше приблизно від 70 до 80%, від 80 до 90%, від 90 до 95% і найбільш переважно щонайменше приблизно 96%, 97%, 98%, 99% або більш гомологічна до однієї повної послідовності з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 і має щонайменше одну, описану тут активність. При іншій формі виконання винахід стосується повного білка з *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodinium* або *Thraustochytrium*, який в основному є гомологічним до повної, представленої в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотної послідовності.

Біологічно активні частини елонгази PSE включають пептиди, які включають амінокислотні послідовності, що походять від амінокислотної послідовності елонгази PSE, наприклад, наведену в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:12 амінокислотну послідовність або амінокислотну послідовність білка, який є гомологічним до елонгази PSE, яка має менше амінокислот, ніж елонгаза PSE повної довжини або білок повної довжини, який є гомологічним до елонгази PSE і має щонайменше одну активність PSE. Звичайно біологічно активні частини (пептиди, наприклад, пептиди, що мають довжину в 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 або більше амінокислот), включають домен або мотив із щонайменше однією активністю елонгази PSE. Крім того, інші біологічно активні частини, в яких делетовані інші ділянки білка, можуть бути одержані рекомбінантною технікою і можуть перевірятися на одну або декілька описуваних активностей. Біологічно активні частини елонгази PSE включають переважно один або декілька вибраних доменів/мотивів або їх частини з біологічною активністю.

Такі домени або мотиви можуть бути ідентифіковані частково за допомогою послідовного аналізу, наприклад, за допомогою підтримуваних технікою обробки даних методів.

У послідовностях згідно з винаходом є так звані KK-мотиви.

Автор Kermode у публікації 1996, *Critical Reviews in Plant Sciences* 15 (4):285-423 описує KK-мотиви, подвійний лізин, який був знайдений в основному як KKXX або K X K XXX -мотив і впливає на метаболічний цикл ER в апараті Гольджі і разом з цим термін перебування білка і його ферментативної активності у певному місці, зокрема, на ендоплазматичному ретикуліумі.

Мотиви подвійного лізину були знайдені, наприклад, у  $\Delta 12$ -десатуразах (див. Arondel і ін. 1992, *Science* 258:1353) є в елонгазах згідно з винаходом, зокрема такі мотиви описані як локалізовані на карбоксильному кінці.

Елонгаза з моху  
PSE1:C-кінець

KQKGAKTE

KTKKA

SEQ ID NO 2:

SEQ ID NO 4

KNLK

SEQ ID NO 6:

При цьому може йти мова про можливу варіацію гена.

Є залишки Lys, які впливають на утворення мішені, і локалізацію на поверхні або в середині ендоплазматичного ретикулу. Маскування цієї послідовності модифікування, або просторова модифікація близькості до карбоксильного кінця, наприклад, за допомогою злиття з зеленим флуоресцентним білком можуть використовуватися для здійснення впливу на розподіл.

Елонгази PSE одержують переважно технікою рекомбінантної ДНК. Наприклад, кодуєча білок-молекула нуклеїнової кислоти клонується у вектор експресії (як описано вище), вектор експресії вводиться у клітині-хазяїні (як описано вище) і елонгаза PSE експресується у клітину-хазяїна. Елонгаза PSE може бути виділена з клітини за допомогою придатного методу очищення, наприклад, за допомогою стандартного методу очищення білків. Альтернативно до рекомбінантної експресії елонгаза PSE, поліпептид або пептид можуть бути хімічно синтезовані за допомогою стандартної техніки синтезу пептидів. Крім того, нативна елонгаза PSE може виділятися з клітин (наприклад, із клітин ендотелію) наприклад, при застосуванні анти-PSE-антитіла, яке може бути одержане стандартною технікою, причому застосовується PSE згідно з винаходом або її фрагмент.

Винахід пропонує також химерні PSE-білки або гібридні PSE-білки. Застосовуване тут поняття "химерний PSE-білок" або "гібридний PSE-білок" включає PSE-поліпептид, який функціонально зв'язаний з не-PSE-поліпептидом. Поняття "PSE-поліпептид" стосується поліпептиду з амінокислотною послідовністю, яка відповідає елонгазі PSE, у той час як "не-PSE-поліпептид" стосується поліпептиду з амінокислотною послідовністю, яка відповідає білку, що в основному не є гомологічним до елонгази PSE, наприклад, білку, який відрізняється від PSE і походить з того ж організму або з іншого організму. Щодо гібридного білка поняття "функціонально зв'язаний" означає те, що PSE-поліпептид, не-PSE-поліпептид, злиті один з одним таким чином, що обидві послідовності виконують передбачену, додану застосовуваній послідовності функцію. Не-PSE-поліпептид може зливатися на N-кінці або на C-кінці PSE-поліпептиду. При одній формі виконання винаходу гібридний білок (білок злиття) є GST-PSE-білком злиття, при якому PSE-послідовності об'єднані на C-кінці GST-послідовностей. Ці білки злиття можуть полегшувати очищення рекомбінантних елонгаз PSE. При ще одній формі виконання білок злиття є елонгазою PSE, що має гетерологічну сигнальну послідовність на її N-кінці. У певних клітинах-хазяях (наприклад, клітинах-хазяях ссавців) експресія і/або секреція елонгази може бути підвищена застосуванням гетерологічної сигнальної послідовності.

Химерний PSE-білок або PSE-гібридний білок (білок злиття) одержують стандартною технікою рекомбінантної ДНК. Наприклад, ДНК-фрагменти, які кодують різні поліпептидні послідовності, можуть лігуватися один до одного за допомогою звичайної техніки в рамці зчитування, причому наприклад, гладкі або виступаючі кінці можуть застосовуватися для лігування, рестрикційного розщеплення ферментів для одержання власних кінців, заповнення кінців, обробки лужними фосфатами, щоб запобігати небажаним сполукам, і ферментативного лігування. При ще одній формі виконання ген злиття може бути синтезований звичайними методами, включаючи автоматичний синтез ДНК. Альтернативно може проводитися ПЛР-ампліфікування генних фрагментів із застосуванням анкерної затравки, створення комплементарних переходів між генними фрагментами, що йдуть один за одним, які потім можуть гібридизуватися один з одним і реампліфікуватися, так що одержують химерну послідовність (див. наприклад, Current Protocols in Molecular Biology, Видавн. Ausubel і ін., John Wiley & Sons: 1992). Крім того, на ринку можна придбати багато з експресованих векторів, які вже кодують одиницю злиття (наприклад, GST-поліпептид). Кодуюча елонгаза PSE-нуклеїнова кислота може клонуватися в такий експресійний вектор, так що одиниця злиття в рамці зчитування зв'язана з PSE-білком.

Гомології до елонгази PSE можуть бути одержані мутагенезом, наприклад, специфічним точковим мутагенезом або вкороченими PSE. Поняття "гомологія" стосується при цьому варіантної форми елонгази PSE, яка діє як агоніст або антагоніст до активності PSE. Агоніст елонгази PSE може в основному зберігати ту ж активність, що і активність або частина біологічної активності PSE. Антагоніст PSE може інгібувати одну або декілька активностей наявної в природі форми PSE за допомогою, наприклад, конкурентного зв'язку з розміщеним по ходу транскрипції або проти ходу транскрипції елементом каскаду обміну речовин для компонента клітинної мембрани, який включає елонгазу PSE, або за допомогою зв'язку з PSE, що сприяє транспортуванню сполук через клітинні мембрани, внаслідок чого інгібується транслокація.

При альтернативній формі виконання винаходу гомології елонгази PSE можуть бути ідентифіковані за допомогою скринінга комбінаторних банків мутантів, наприклад, вкорочених мутантів PSE у відношенні активності агоністів або антагоністів PSE. При ще одній формі виконання мозаїчний банк PSE-варіантів може бути одержаний комбінаторним мутагенезом на рівні нуклеїнової кислоти і кодований мозаїчним банком генів. Мозаїчний банк PSE-варіантів може бути одержаний, наприклад, за допомогою ферментативного лігування суміші синтетичних олігонуклеотидів у генних послідовностях, так що можна експресувати дегенерований набір потенційних PSE-послідовностей як індивідуальні поліпептиди або альтернативно як набір більш великих білків злиття (наприклад, для виявлення фагів), які містять цей набір PSE-послідовностей. Є цілий ряд способів, які можуть застосовуватися для одержання банків потенційних PSE-гомолів з виродженої олігонуклеотидної послідовності. Хімічний синтез дегенерованої генної послідовності може проводитися в автоматичному пристрої для синтезу ДНК і синтезований ген може бути потім легований у придатний експресійний вектор. Застосування виродженого набору генів забезпечує наявність у суміші всіх послідовностей, що кодують бажаний набір потенційних PSE-послідовностей. Способи синтезу вироджених олігонуклеотидів відомі фахівцю в даній галузі [див., наприклад, Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura і ін. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura і ін., (1984) Science 198:1056; Ike та інш. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477].

Додатково банки PSE-фрагментів можуть використовуватися для одержання мозаїчної популяції PSE-фрагментів для скринінга і для подальшої селекції гомолів елонгази PSE. При одній формі виконання

винаходу банк фрагментів кодувальної послідовності може бути одержаний за допомогою обробки дволанцюгового PCR-фрагмента кодувальної PSE-послідовності нуклеазою за умов, при яких відбуваються розриви подвійних ланцюгів тільки один раз на молекулу, за допомогою денатурації дволанцюгової ДНК, ренатуравання ДНК при утворенні дволанцюгової ДНК, яка може охоплювати смислову/антисмислову пару різних продуктів з розривом подвійного ланцюга, видалення одностанцюгових ділянок із заново утвореного дуплекса обробкою S1-нуклеазою і лігування одержаного в результаті банку фрагментів у експресійний вектор. Цим способом може бути одержаний експресійний банк, який кодує N-кінцеві, C-кінцеві і внутрішні фрагменти елонгази PSE різної величини.

Фахівцям відомо кілька методів скринінга генних продуктів у комбінаторних банках, які одержані точковою мутацією або вкоченням, і відомі для скринінга кДНК-банків для одержання генних продуктів з вибраними властивостями. Ці методи можна підганяти під швидкісний скринінг банків генів, які одержані комбінаторним мутагенезом PSE-гомолігів. Найбільш часто застосовувані методи скринінга великих банків генів, які можна піддавати аналізу з високою пропускною здатністю, включають звичайно клонування банку генів у експресійні вектори, що реплікуються, трансформацію придатних клітин з одержаним в результаті банком векторів і експресію комбінаторних генів за умов, при яких полегшується виявлення бажаної активності виділення вектора, що кодує ген, продукт якого був виявлений. Повторюваний мутагенез (REM), новий метод, який підвищує частоту функціональних мутантів у банках, може в комбінації з тестом скринінга застосовуватися для ідентифікації PSE-гомолігів [див. публікації Arkin und Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave і ін. (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331]. Можуть також застосовуватися комбінації вищенаведених методів.

Іншим відомим методом зміни каталітичних властивостей ферментів, відповідно, кодувальних їх генів є так називаний "Gen-Shuffling" (див., наприклад. WO 97/20078 або WO 98/13487), який представляє комбінацію генних фрагментів, причому ця нова комбінація додатково може варіюватися помилковими полімеразними ланцюговими реакціями, і разом з цим створює високу підлягаючу тесту різноманітність послідовностей. Передумовою для застосування такого методу є придатна система скринінга, щоб перевіряти створену різноманітність генів на її функціональність.

Зокрема, для скринінга активності елонгаз передумовою є спосіб скринінга, який визначає ферментативну активність у залежності від поліненасичених кислот жирного ряду. Відносно активностей елонгази зі специфічністю до поліненасичених кислот жирного ряду у видах *Miscog*, які можуть бути відомими способами трансформації бажаними генними конструктами, можна використовувати токсичність арахідонової кислоти в присутності метаболіту (саліцилової кислоти або похідних саліцилової кислоти) (див. Eroshin і ін., *Mikrobiologiia*, том 65, No.1, 1996, Стор.31-36), щоб проводити перший скринінг, що базується на рості. Одержані в результаті клони можуть тоді піддаватися аналізу на вміст ліпідів за допомогою газової хроматографії, щоб визначати вихідні речовини і продукти за їх видом і кількістю.

При ще одній формі виконання винаходу тести на базі клітин можуть використовуватися для аналізу химерного PSE-банку при застосуванні інших відомих фахівцю в даній галузі способів.

При ще одній формі виконання даний винахід стосується антитіла, яке специфічно зв'язується з поліпептидом згідно з даним винаходом або з частинами, наприклад, епітопами, такого білка. Антитіло згідно з винаходом може застосовуватися для того, щоб ідентифікувати і виділяти інші елонгази, зокрема, елонгази PSE. Ці антитіла можуть бути моноклональними антитілами, поліклональними антитілами або синтетичними антитілами, а також фрагментами цих антитіл, такими, як наприклад, Fab-, Fv- або scFV-фрагменти. Моноклональні антитіла можуть бути одержані, наприклад, способом, описаним спочатку авторами Kohler und Milstein, у публікації *Nature* 256 (1975), 485, і Galfro, *Meth. Enzymol.* 73 (1981). Антитіла і їх фрагменти можуть також бути одержані, наприклад, способом, описаним у Harlow & Lane, "Antibodies, a Laboratory Manual", CSH, Press, Cold Spring Harbor, 1988. Ці антитіла можуть застосовуватися для того, щоб преципітувати і локалізувати білки згідно з винаходом або щоб перевіряти синтез цих білків, наприклад, у рекомбінантному організмі, а також для ідентифікації сполук, які взаємодіють із білками згідно з винаходом. У багатьох випадках зв'язок антитіл з антигенами еквівалентний із зв'язком інших лігандів і антилігандів.

Далі винахід стосується способу ідентифікації агоністів або антагоністів елонгаз, зокрема елонгаз PSE, який включає

а) приведення клітин, які експресують поліпептид згідно з даним винаходом, у контакт із речовиною-кандидатом,

б) тестування активності PSE;

с) порівняння активності PSE зі стандартною активністю в присутності речовини-кандидата, причому підвищення активності PSE вище стандарту показує, що речовина-кандидат є агоністом, і зниження активності PSE показує, що речовина-кандидат є антагоністом.

Речовина-кандидат може бути синтезованою або одержаною мікробіологічно речовиною і є присутньою, наприклад, у клітинних екстрактах, наприклад, рослин, тварин або мікроорганізмів. Далі ця речовина може бути відомою з рівня техніки, однак дотепер вона не відома як така, що підвищує або знижує активність елонгаз PSE. Реакційна суміш може бути вільним від клітин екстрактом або ж може включати клітину або клітинну культуру. Придатні методи відомі фахівцю й описуються, наприклад, у Alberts, *Molecular Biology the cell*, 3<sup>rd</sup> Edition (1994), як приклад Розділ 17. Приведені речовини можуть, наприклад, додаватися до реакційної суміші або живильного середовища або ж ін'єктуватися в клітини або набризкуватися на рослину.

Якщо ідентифікований зразок, який містить активну згідно з винаходом речовину, то є можливість або виділити речовину безпосередньо від первісного зразка або можна розділити зразок на різні групи, наприклад, якщо вона складається з великої кількості різних компонентів, щоб знизити число різних речовин на зразок і потім повторювати спосіб згідно з винаходом з таким "субзразком" первісного зразка. В залежності від складності проби вищеописані стадії можуть повторюватися кілька разів, переважно доти, поки ідентифікований згідно з винаходом зразок не включає тільки мале число речовин або тільки одну речовину. Переважно ідентифікована способом згідно з винаходом речовина або її похідні приводяться в препаративну



форму, так що вони придатні для застосування в сфері розведення рослин, або клітинних, або тканинних культур.

Речовинами, що проатестовані й ідентифіковані способом згідно з винаходом, можуть бути такі: експресійні бібліотеки, наприклад, кДНК-бібліотеки, пептиди, білки, нуклеїнові кислоти, антитіла, малі органічні речовини, гормони, PNA або їм подібні (див. Milner, Nature Medicin 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell. 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193-198 і наведені там джерела). Ці речовини можуть також бути функціональними похідними або аналогами відомих інгібіторів або активаторів. Способи одержання хімічних похідних або аналогів відомі фахівцю в даній галузі. Наведені похідні й аналоги можуть бути перевірені згідно з відомими з рівня техніки способами. Клітина або тканина, яка може застосовуватися для способу згідно з винаходом, є переважно клітиною-хазяїном, рослинною клітиною або рослинною тканиною, згідно з винаходом, як описано вище.

У відповідності з цим винахід стосується речовини, яка ідентифікована способом згідно з винаходом. Речовина є, наприклад, гомологом елонгази PSE згідно з винаходом. Гомологи елонгаз PSE можуть бути одержані мутагенезом, наприклад, точковою мутацією або делецією елонгази PSE. Застосовуване тут поняття "гомолог" є формою елонгаз PSE, яка діє як агоніст або антагоніст для активності елонгаз PSE. Агоніст може мати в основному однакову або частину біологічної активності елонгаз PSE. Антагоніст елонгаз PSE може інгібувати одну або декілька активностей природної форми елонгаз PSE, наприклад, зв'язуватися з членом обміну речовини, що знаходиться по ходу транскрипції або проти ходу транскрипції, при синтезі кислот жирного ряду, який включає елонгази PSE, або зв'язується з PSE і при цьому знижувати або інгібувати активність.

Отже, винахід стосується також і антитіла або його фрагменту, який інгібує активність елонгаз PSE згідно з винаходом.

Далі винахід стосується антитіла, яке специфічно розпізнає, відповідно, зв'язує вищеописані агоністи або антагоністи згідно з винаходом.

Винахід стосується також і композиції, яка включає антитіло, ідентифікований способом згідно з винаходом стоп- або антисмисловою молекулу.

#### Д. Застосування і способи згідно з винаходом

Приведені в описі молекули нуклеїнової кислоти, білки, гомологи білків, гібридні білки, антитіла, затравки, вектори і клітини-хазяїни можуть застосовуватися для одного або декількох наведених нижче способів, а саме ідентифікації організмів *Physcomitrella patens*, *Cryptocodium*, *Phytophthora infestans* або *Thraustochytrium* і споріднених організмів, картування геномів організмів, які є спорідненими організмам *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium*, ідентифікації послідовностей *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium*, вивчення еволюції, визначення білків PSE, необхідних для функції, модуляції активності елонгази PSE, модуляції обміну речовин одного або декількох компонентів клітинної мембрани, модуляції транспортування через мембрану одного або декількох сполук, а також модуляції виробництва клітинами бажаної сполуки, такої, як тонкий хімікат. Молекули нуклеїнової кислоти елонгази PSE мають велику кількість можливостей застосування. Вони можуть застосовуватися для ідентифікації такого організму, як *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium* або найближчих споріднених організмів. Вони можуть також застосовуватися для ідентифікації наявності організмів *Physcomitrella*, *Cryptocodium*, *Phytophthora* або *Thraustochytrium* або їх родичів у змішаній популяції мікроорганізмів. Даний винахід пропонує послідовності нуклеїнових кислот ряду генів *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium*, за допомогою зондування екстрагованих геномних ДНК культури суцільної або змішаної популяції мікроорганізмів зондом, який перекриває зони гена з *Physcomitrella*, *Cryptocodium*, *Phytophthora* або *Thraustochytrium* або його частини, що властиво тільки одному організму, можна визначити, чи є цей організм у наявності. Організми *Physcomitrella*, *Cryptocodium*, *Phytophthora* або *Thraustochytrium* самі застосовуються для комерційного виробництва поліненасичених кислот. Нуклеїнові кислоти згідно з винаходом придатні, крім того, для виробництва поліненасичених кислот жирного ряду також і в інших організмах, зокрема, якщо необхідно досягати того, що кислоти жирного ряду, одержані в результаті, повинні також вбудовуватися у фракції триацилгліцеролу.

Далі молекули нуклеїнової кислоти і білка можуть застосовуватися як маркери для специфічних областей генома. Вони придатні не тільки для картування генома, але і для функціонального вивчення білків з організмів *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium*. Для ідентифікації ділянки генома, з яким зв'язується певна ДНК сполучного білка з *Physcomitrella*, *Cryptocodium*, *Phytophthora* або *Thraustochytrium*, геном організмів *Physcomitrella*, *Cryptocodium*, *Phytophthora* або *Thraustochytrium* може, наприклад, розщеплюватися і фрагменти ДНК сполучного білка можуть інкубуватися з ним. Ті фрагменти, що зв'язують білок, можуть додатково зондуватися молекулами нуклеїнової кислоти згідно з винаходом, переважно, що легко визначається; зв'язування однієї такої молекули з геномним фрагментом дозволяє локалізацію на геномній карті організмів *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodium* або *Thraustochytrium* і полегшує, якщо це проводиться кілька разів з різними ферментами, швидке визначення послідовності нуклеїнових кислот, з якими зв'язується білок. Молекули нуклеїнової кислоти згідно з винаходом можуть до того ж бути досить гомологічними до послідовностей споріднених видів, щоб ці молекули нуклеїнової кислоти могли служити як маркери для конструкції геномної карти споріднених грибів або водоростей.

Молекули нуклеїнової кислоти елонгази PSE придатні також для досліджень еволюції і структури білків. Процеси обміну речовин і транспортування через мембрани, в яких беруть участь молекули згідно з винаходом, використовуються багатьма прокаріотичними і еукаріотичними клітинами, порівнянням послідовностей молекул нуклеїнової кислоти згідно з винаходом з такими послідовностями, які кодують такі ж ферменти з інших організмів, може бути визначена ступінь еволюції і спорідненості організмів. Відповідним чином таке порівняння дозволяє визначення того, які ділянки послідовностей є консервативними і які ні, що може допомогти при визначенні ділянок білка, які необхідні для ферментативної функції. Цей тип визначення є дуже цінним для досліджень інженерії білків і може вказувати на те, в якій мірі мутагенез надає толерантності

білку без втрати функціональності.

Маніпуляція молекул нуклеїнової кислоти елонгази PSE згідно з винаходом може привести до одержання елонгаз PSE з функціональними розходженнями по відношенню до дикого типу елонгаз PSE. Ефективність і активність цих білків можуть бути поліпшені, вони можуть бути в клітині в більшій кількості, ніж звичайно, або їх ефективність або активність може бути знижена. Поліпшена ефективність або активність означає, наприклад, те, що фермент має більш високу селективність і/або активність, переважно щонайменше на 10% більш високу активність, зокрема, щонайменше на 20% більш високу активність, особливо переважно щонайменше на 30% більш високу активність, ніж первинний фермент.

Є ряд механізмів, за допомогою яких можна безпосередньо впливати на зміну виходу елонгази PSE згідно з винаходом, на виробництво і/або ефективність виробництва тонкого хімікату, який містить такий змінений білок. Виробництво сполук тонких хімікатів з таких культур, як інфузорії, водорості або гриби, у великих масштабах чітко збільшується, якщо клітина виділяє бажані сполуки, тому що ці сполуки можуть бути легко виділені з живильного середовища (на противагу до екстракції з маси культивованих клітин). В іншому випадку очищення можна поліпшити за рахунок того, що клітина накопичує *in vivo* сполуки в спеціалізованому розділі з механізмом концентрації. Для рослин, що експресують елонгази PSE, підвищене транспортування може привести до кращого розподілу всередині рослинної тканини й органів рослин. Підвищенням числа або активності молекул-транспортів, які експортують тонкі хімікати з клітини, можливо підвищувати кількість вироблених тонких хімікатів, які є в позаклітинних середовищах, внаслідок чого полегшується збирання і очищення або для підвищення рослин ефективності розподілу. Для ефективного надвиробництва одного або декількох хімікатів потрібно на відміну від цього підвищити кількість співфакторів, молекул попередників і проміжних сполук для придатного біосинтезу. Підвищенням числа і/або активності транспортних білків, що беруть участь в імпорті поживних речовин, таких, як джерела вуглеводнів (тобто цукру), джерела азоту (тобто амінокислота, амонієва сіль), фосфат і сірка, можна поліпшити виробництво тонкого хімікату внаслідок усунення всіх обмежень поживних речовин при біосинтезі. Такі кислоти жирного ряду, як поліненасичені кислоти жирного ряду, і ліпіди, що містять поліненасичені кислоти жирного ряду, є найбільш бажаними тонкими хімікатами, за допомогою оптимізації активності або підвищення числа однієї або декількох елонгаз PSE згідно з винаходом, що беруть участь у біосинтезі цих сполук, або порушення активності однієї або декількох елонгаз PSE, що беруть участь у розпаді цих сполук, можна підвищувати вихід, виробництво і/або ефективність виробництва молекул кислот жирного ряду або ліпідів в інфузоріях, водоростях, рослинах, грибах, дріжджах або інших мікроорганізмах.

Маніпуляція над одним або декількома генами елонгази PSE згідно з винаходом може також привести до одержання елонгаз PSE зі зміненою активністю, які побічно впливають на виробництво одного або декількох бажаних тонких хімікатів з водоростей, рослин, інфузорій або грибів. Нормальні біохімічні процеси обміну речовин приводять, наприклад, до виробництва великої кількості відходів (наприклад, пероксидів водню й інших реакційноздатних кисневих сполук), які можуть активно заважати цим процесам обміну речовин [наприклад, пероксинітрит, як відомо, нітрує бічні ланцюги тирозину, внаслідок чого деякі ферменти з тирозином в активному центрі дезактивуються, див. публікацію Groves, J.T. (1999) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3(2); 226-235]. Ці відходи правда звичайно відокремлюються, однак застосовані для ферментативного виробництва у великих масштабах клітини оптимізуються для надвиробництва одного або декількох хімікатів і можуть виробляти ще більше відходів, ніж це звичайно має місце для клітин дикого типу. Внаслідок оптимізації активності однієї або декількох елонгаз PSE, що беруть участь в експорті відхідних молекул, можна поліпшити життєздатність клітини і зберігати активність обміну речовин. Також і наявність більш високих позаклітинних кількостей бажаних тонких хімікатів може бути для клітини токсичною, так що підвищенням здатності до селекції цих сполук можна підвищити життєздатність клітини.

Далі елонгази PSE згідно з винаходом можуть бути піддані маніпуляціям таким чином, що змінюються відносні кількості різних молекул ліпідів і кислот жирного ряду. Це може рішуче впливати на композицію ліпідів клітинної мембрани. У зв'язку з тим, що кожний вид ліпідів має різні фізичні властивості, зміна композиції ліпідів мембрани значно змінює рухомість мембрани. Зміни рухомості мембрани можуть вплинути на транспортування молекул через мембрану, що, як було описано вище, може модифікувати експорт продуктів відходу або вироблених тонких хімікатів або імпорт необхідних поживних речовин. Ці зміни рухомості мембрани можуть також рішуче впливати на цілісність клітини; клітини з порівняно більш слабкими мембранами піддаються абіотичним і біотичним умовам стресу, які можуть привести до ушкодження або загибелі клітини. За допомогою маніпуляції елонгаз PSE, які беруть участь в одержанні кислот жирного ряду і ліпідів для побудови мембрани, завдяки чому одержана в результаті мембрана має такий склад, що є більш прийнятним до переважної більшості культур, що застосовуються для виробництва тонких хімікатів, умов навколишнього середовища, для цього повинна зберігатися і розмножуватися більш велика кількість клітин. Більші кількості продукуючих клітин повинні проявлятися у більш високому виході, більш високій продуктивності або ефективності виробництва тонких хімікатів з культури.

Вищенаведені методи мутагенезу елонгаз PSE, які повинні приводити до підвищеного виходу тонкого хімікату, не обмежуються ними, варіанти цих методів фахівцеві у даній галузі може легко розпізнати. При застосуванні цих механізмів і за допомогою розкритих в описі механізмів молекули нуклеїнової кислоти і білки згідно з винаходом можуть застосовуватися для одержання водоростей, інфузорій, рослин, тварин, грибів або інших мікроорганізмів, таких, як *C. glutamicum*, які експресують мутації молекули нуклеїнової кислоти і білка, що поліпшує вихід, виробництво і/або ефективність виробництва бажаної сполуки. Цією бажаною сполукою може бути будь-який природний продукт із водоростей, інфузорій, рослин, тварин, грибів або бактерій, який включає кінцеві продукти біосинтезу і проміжні продукти наявних у природі процесів обміну речовин, а також молекули, які є в процесі обміну речовин цих клітин у неприродній формі, які, однак, виробляються клітинами згідно з винаходом.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб виробництва поліненасичених кислот жирного ряду, який включає культивування організму, який містить нуклеїнову кислоту згідно з винаходом, генний конструкт або вектор

згідно з винаходом, які кодують поліпептид, що елонгує кислоти жирного ряду, що містять 16, 18 або 20 атомів вуглецю, із щонайменше двома подвійними зв'язками в молекулі щонайменше на два атоми вуглецю за умов, при яких поліненасичені кислоти жирного ряду виробляються в організмі. Одержані цим способом поліненасичені кислоти жирного ряду можна виділяти за допомогою збирання з культури, в якій вони ростуть, або з поля, подрібнення і/або екстракції зібраного матеріалу органічним розчинником. З цього органічного розчинника можна виділяти олію, яка містить ліпіди, фосфоліпіди, сфінголіпіди, гліколіпіди, триацилгліцерини і/або вільні кислоти жирного ряду з високим вмістом поліненасичених кислот жирного ряду. За допомогою основного або кислотного гідролізу ліпідів, фосфоліпідів, сфінголіпідів, гліколіпідів, триацилгліцеринів можуть виділятися вільні кислоти жирного ряду з високим вмістом поліненасичених кислот жирного ряду. Високий вміст поліненасичених кислот жирного ряду означає щонайменше 5%, переважно 10%, особливо переважно 20%, і дуже переважно 40% більше поліненасичених кислот жирного ряду, ніж первинний організм, який не має додаткової нуклеїнової кислоти, що кодує елонгазу згідно з винаходом.

Переважно одержані даним способом поліненасичені кислоти жирного ряду є молекулами кислоти жирного ряду з 18, 20 або 22 атомами вуглецю із щонайменше двома зв'язками в молекулі кислоти жирного ряду, переважно, із трьома, чотирма, п'ятьма або шістьма подвійними зв'язками, особливо переважно з трьома або чотирма подвійними зв'язками. Ці молекули кислоти жирного ряду з 18, 20 або 22 атомами вуглецю можуть бути виділені з організму у формі олії, ліпиду або вільної кислоти жирного ряду. Придатними організмами є наприклад, вищенаведені організми. Кращими організмами є мікроорганізми, тварини або рослини, особливо переважно рослини або водорості, найбільш бажано трансгенні рослини.

Іншим об'єктом винаходу є олії, ліпіди або кислоти жирного ряду або їх фракції, які одержані вищенаведеним способом, зокрема, олія, ліпід або композиція кислоти жирного ряду, яка включає поліненасичені кислоти жирного ряду і походить від трансгенних рослин.

Одним з інших об'єктів винаходу є олії, ліпіди і кислоти жирного ряду, які одержані способом згідно з винаходом. Інші форми виконання винаходу стосуються композицій олії, ліпиду або кислоти жирного ряду, які містять одержані згідно з винаходом поліненасичені кислоти жирного ряду і походять від трансгенних рослин, що містять нуклеїнову кислоту, генний конструкт або вектор згідно з винаходом.

Інший об'єкт винаходу полягає в застосуванні олії, ліпиду або композиції кислоти жирного ряду в кормових засобах, засобах харчування, косметичних і фармацевтичних засобах.

При іншій формі виконання винахід стосується набору, що включає нуклеїнову кислоту, генний конструкт, амінокислотну послідовність, молекул антисмислої нуклеїнової кислоти, антитіла і/або композиції згідно з винаходом, антагоніст або агоніст, одержаний способом згідно з винаходом, і/або олії, ліпідів і/або кислот жирного ряду або їх фракцій. Також набір згідно з винаходом може включати клітини-хазяї, організми, рослини або їх частини, придатні до збору врожаю частини рослин згідно з винаходом або матеріал розмноження або ж антагоніст або агоніст згідно з винаходом. Компоненти набору згідно з винаходом можуть бути упаковані в придатні контейнери, наприклад, з буфером або у буфері з іншими розчинами. Один або кілька компонентів можуть бути упаковані в той самий контейнер. Додатково або альтернативно один або декілька наведених компонентів можуть бути адсорбовані, наприклад, на твердій поверхні, наприклад, на нітроцелюлозному фільтрі, скляних пластинах, гіпсі, нейлонових мембранах або мікротитрувальних планшетах. Набір може застосовуватися для кожного описаного методу і прикладу виконання, наприклад, для одержання клітин-хазяїв, трансгенних рослин, для детекції гомологічних послідовностей, для ідентифікації антагоністів або агоністів і т.п. Далі набір може містити вказівки по застосуванню набору для наведених цілей.

Нижче винахід пояснюється на прикладах виконання, які не обмежують винахід. Зміст усіх літературних джерел, патентних заяв, патентів і опублікованих патентних заяв, що цитуються, наведений за допомогою відповідного посилання.

#### Приклади

##### Приклад 1: Загальні способи

##### а) Загальні способи клонування

Способи клонування, наприклад, рестрикційне розщеплення, гель-електрофорез на агарозі, очищення фрагментів ДНК, перенос нуклеїнових кислот на нітроцелюлозні і нейлонові фільтри, поєднання фрагментів ДНК, трансформація клітин *Escherichia coli* і дріжджів, вирощування бактерій і аналіз послідовностей рекомбінатних ДНК проводять як описано в публікації авторів Sambrook і ін. [(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6] або авторів Kaiser, Michaelis і Mitchell [(1994), "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3]. Трансформація і вирощування таких водоростей, як *Chlorella* або *Phaeodactylum* проводять як описано автором El-Sheekh [(1999), у публікації *Biologia Plantarum* 42:209-216] або авторами Apt і ін. [(1996) *Molecular and General Genetics* 252 (5):872-9].

##### б) Хімікати

Застосовувані хімікати, якщо не зазначено по-іншому, одержують на фірмах Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) і Sigma (Deisenhofen). Розчини одержують із застосуванням чистої, вільної від пірогену води, яка позначається далі як  $H_2O$ , з очисної установки мілі-Q-системи (фірми Millipore, Eschborn). Ендонуклеази рестрикції, модифіковані ДНК ферменти і молекулярнобіологічні набори одержують на фірмах AGS (Heidelberg), Amersham (Брауншвейг), Biometra (Göttingen), Boehringer (Майнхайм), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) і Stratagene (Amsterdam, Нідерланди). Якщо не зазначено по-іншому, застосовують вказівки виготовлювача.

##### в) Клітинний матеріал

Для досліджень застосовують штам *Thraustochytrium*, доступний з American Type Culture Collection (ATCC-колекція) з номером штаму ATCC26185 (*Thraustochytrium*), відповідно, у випадку *Cryptocodium* з Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton ((CCMP) WestBoothbay Harbour, ME, USA) з номером культури Nr. CCMP316. Водорості культивують при 25°C у темряві в скляній трубці, яку продувають знизу повітрям. Вирощування *Thraustochytrium* виробляють альтернативно як описано авторами Singh & Ward (1997,

Advances in Microbiology, 45, стор.271-311).

Як живильне середовище для *Cryptocodinium* застосовують f/2 живильне середовище з 10% органічного середовища за Guillard, R.R.L. [1975; Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. and Chanley, M.H. (Eds.) Culture of marine invertebrate animals, NY Plenum Press, стор.29-60.]: Вона містить 995,5мл морської води (штучн.)

1мл  $\text{NaNO}_3$  (75г/л), 1мл  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (5г/л), 1мл Trace metal solution, 1мл Трис/Cl pH 8.0, 0.5мл f/2 vitamin solution

Trace metal solution означає  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (4,36г/л),  $\text{FeCl}_3$  (3,15г/л),

Primary Trace metals означає  $\text{CuSO}_4$  (10г/л),  $\text{ZnSO}_4$  (22г/л),  $\text{CoCl}_2$  (10г/л),  $\text{MnCl}_2$  (18г/л),

$\text{NaMoO}_4$  (6,3г/л)

f/2 vitamin solution означає біотин 10мг/л, тіамін 200мг/л, вітамін B12 0,1мг/л

органіч. середовище: ацетат натрію (1г/л), глюкоза (6г/л), сукцинат натрію (3г/л),

бактотриптон (4г/л), екстракт дріжджів (2г/л)

г) Матеріал моху (відповідає рослинному матеріалу)

Для аналізу застосовують рослини виду *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. з колекції відділу генетичних досліджень університету Гамбургу. Вони походять від штаму 16/14, зібраного H.L.K. Whitehouse у Gransden Wood, Huntingdonshire (Англія) і субкультивованого автором Engel (1968, Am J Bot 55, 438-446) зі спори. Поліферацію рослин здійснюють за допомогою спор і за допомогою регенерації Gametophyten. Протонема розвивається з гапліодних спор в багату хлоропластами хлоронему і бідну хлоропластами гаулонеми, з якої приблизно через 12 днів утворюються бутони. Вони виростають у гаметофори з антегридіями й архегоніями. Після запліднення виникає диплоїдний спорофіт з капсулою спори, в якій визрівають мейоспори.

е) Вирощування рослин

Вирощування здійснюють у кліматичній камері при температурі повітря 25°C і інтенсивністю світла 55мкмоль-1м-2 (біле світло; Phillips TL 65W/25 флуорисцентна трубка) і з чергуванням темряви і світла в 16/8 годин. Мох модифікують або у рідкій культурі із застосуванням середовища Кнопа згідно з авторами Reski і Abel (1985, Planta 165, 354-358) або вирощують на твердому середовищі Кнопа при застосуванні 1% оксоїдагару (фірми Unipath, Basingstoke, Англія).

Застосовувані для виділення РНК і ДНК протонеми вирощують у рідкій культурі, яку провітрюють. Протонеми роздіблюють через кожні 9 днів і переводять у свіже живильне середовище.

д) Культивування *Phytophthora infestans*

Спочатку створюють ДНК-банк *Phytophthora infestans*. Для цього можна одержувати штам ATCC 48886 з American Type Culture Collection Rockville, США. З відхиленням від протоколу вирощування для штаму ATCC 48886, спори *Phytophthora* промивають холодною бідистильованою водою і поміщають на 6 годин у холодильник для утворення спор. Після цього матеріал переводять у горохове середовище. Для цього 150г замороженого горошку (фірми Iglu, що є в продажі) у 1 літрі води стерильно автоклавує протягом 20 хвилин. Матеріал вирощують у колбі з об'ємом 100мл при кімнатній температурі на круговій вібраційній качалці (200об. за хв). Через два дні відфільтровують по дві колби і через наступні 4 дні ще на дві колби і рідку речовину розтирають у ступці.

Приклад 2: Виділення загальної ДНК із рослин і мікроорганізмів, таких, як *Thraustochytrium* і *Cryptocodinium* для експериментів з гібридизації

Подробиці по виділенню загальної ДНК із рослинного матеріалу зі свіжою вагою у 1 грам.

СТАВ-буфер: 2% (ваг./об.) бромід N-ацетил-N,N,N-триметиламонію (СТАВ); 100мМ Трис-HCl, pH 8,0; 1,4М NaCl; 20мМ етилендіамінотетраоцтової кислоти.

N-лаурилсаркозиновий буфер: 10% (ваг./об.) N-лаурилсаркозину; 100мМ трис-HCl, pH 8,0; 20мМ етилендіамінотетраоцтової кислоти.

Рослинний матеріал або клітинний матеріал з *Cryptocodinium* або *Thraustochytrium* розтирають у ступці під рідким азотом, так що одержують тонкий порошок, і переводять у колбу Еппендорфера з об'ємом 2мл. Заморожений рослинний матеріал покривають зверху шаром у 1мл буфера розкладання (1мл СТАВ-буфера, 100мл N-лаурилсаркозинового буфера, 20мл  $\beta$ -меркаптометанолу і 10мл розчину протеїнази К, 10мг/мл) і інкубують протягом 1 години при безперервному струшуванні при 60°C. Одержаний гомогенат розділяють на дві колби Еппендорфера (2мл) і два рази екстрагують при струшуванні однаковими об'ємами хлороформу/ізоамілового спирту (24:1). Для розділу фаз проводять центрифугування при 8000об./хв. і кімнатній температурі ( $\approx 23^\circ\text{C}$ ) кожного разу по 15 хвилин. ДНК піддають потім осадженню протягом 30 хвилин при застосуванні холодного як лід ізопропанолу при  $-70^\circ\text{C}$ . Осаджену ДНК седиментують при 10000об./хв. протягом 30 хвилин при  $4^\circ\text{C}$  і ресуспендують у 180мл ТЕ-буфера (див. публікацію Sambrook і ін., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). Для подальшого очищення ДНК обробляють за допомогою NaCl (1,2М кінцевої концентрації) і знову осаджують протягом 30 хвилин при застосуванні подвійного об'єму абсолютного етанолу при  $-70^\circ\text{C}$ . Після стадії промивання за допомогою 70% етанолу ДНК сушать і після цього завантажують у 50мл  $\text{H}_2\text{O}$  + рибонуклеаза (50мг/мл кінцевої концентрації). ДНК екстрагують протягом ночі при  $4^\circ\text{C}$  і потім проводять розщеплення рибонуклеаз протягом 1 години при  $37^\circ\text{C}$ . ДНК зберігають при  $4^\circ\text{C}$ .

Приклад 3: Виділення загальної РНК і полі(A)<sup>+</sup>-РНК із рослин і мікроорганізмів (*Cryptocodinium* і *Thraustochytrium*)

Виділення загальної РНК із таких рослин, як льон і рапс і т.п. проводять згідно з описаним в публікації авторів Logemann і ін. методом (1987, Anal. Biochem. 163, 21). З моху може бути одержана загальна РНК тканини протонеми згідно із способом GTC (див. Reski і ін., 1994, Mol. Gen. Genet., 244:352-359).

Виділення РНК з організмів *Cryptocodinium* і *Thraustochytrium*:

Заморожені зразки водоростей ( $-70^\circ\text{C}$ ) розтирають як лід ступці під рідким азотом у тонкий порошок. 2 об'єми середовища гомогенізації (12,024г сорбітолу, 40,0мл трис-HCl, pH 9 (0,2М); 12,0мл 5М NaCl (0,3М), 8,0мл 250ммоль етилендіамінотетраоцтової кислоти, 761,0мг,

етиленглікольбіс(оксиетилєнїтїїло)тетраоцтової кислоти, 40,0мл 10%-го додецилсульфату натрію доливають водою до 200мл і значення рН встановлюють на 8,5. 4 об'єми фенолу з 0,2% меркаптоетанолом додають при 40-50°C при інтенсивному перемішуванні до замороженого клітинного порошку, після цього додають 2 об'єми хлороформу і інтенсивно перемішують протягом 5 хвилин. Реакційну суміш центрифугують 10 хвилин при 10000об./хв. і водну фазу екстрагують фенолом/хлороформом (2об./2об.) і після цього екстрагують хлороформом.

Одержаний об'єм водної фази змішують з 1/20 об'єму 4М ацетат натрію (рН 6) і 1 об'ємом ізопропанолу (холодного як лід) і нуклеїнову кислоту осаджують при -20°C. Реакційну суміш центрифугують протягом 30 хвилин при швидкості 10000об./хв. і надосадову рідину відбирають. Потім виконують стадію промивання за допомогою 70% EtOH і знову центрифугують. Осад подають у трисборатний буфер (80мМ трисборатний буфер, 10мМ етилендіамінотетраоцтової кислоти, рН 7,0). Потім надосадову рідину змішують з 1/3 об'єму 8М LiCl, перемішують 30 хвилин і інкубують при 4°C. Після ще одного центрифугування осад промивають за допомогою 70% етанолу, центрифугують і осад розчиняють у вільній від рибонуклеїнази воді.

Виділення полі(А)<sup>+</sup>-РНК здійснюють при застосуванні Dyna Beads® (Dyna, Oslo, Finland) за вказівками, наведеними у протоколі виробника.

Після визначення концентрації РНК або полі(А)<sup>+</sup>-РНК її осаджують за допомогою добавки 1/10 об'єму 3М ацетат натрію, рН 4,6, і 2 об'ємів етанолу і збирають при -70°C.

Для аналізу по 20мкг РНК подають в 1,5%-ий гель агарози, що містить формальдегід, і переводять на нейлонові мембрани (фірми Hybond, Амстердам). Визначення специфічної транскрипції здійснюють за описаним автором Amasino методом ((1986) Anal. Biochem. 152, 304)).

Виділення загальної РНК і полі-(А)<sup>+</sup> РНК із *Phytophthora infestans*:

Загальну РНК одержують набором РНК RNeasy Plant Total RNA (фірми Qiagen, Хільден) і буфером RLT, що там міститься, за даними виробника. З одержаної загальної РНК виділяють полі-(А)<sup>+</sup> РНК за допомогою системи виділення мРНК "Attract mRNA Isolation System III" фірми Promega (Гейдельберг) за даними виробника.

Приклад 4: Конструкція банку кДНК

Для конструкції банку кДНК із *Physcomitrella*, *Cryptocodium*, відповідно, *Thraustochytrium* виконують синтез першого ланцюга при застосуванні зворотної транскриптази з вірусу лейкемії миші (фірми Roche, Маннгейм, Німеччина) і оліго-д(Т)-затравки, синтез другого ланцюга за допомогою інкубації ДНК-полімеразою I, ферменту Кленова і Н-розщеплення рибонуклеази при 12°C (2 години), 16°C (1 година) і 22°C (1 година). Реакцію зупиняють шляхом інкубації при 65°C (10 хвилин) і після цього переносять на лід. Дволанцюгові ДНК-молекули забезпечуються тупими кінцями за допомогою Т4-ДНК-полімерази (фірми Roche, Маннгейм) при 37°C (30 хвилин). Нуклеотиди видаляють екстракцією фенолом/хлороформом і центрифужних колонок Sephadex-G50. Адаптер EcoRI/XhoI (фірми Pharmacia, Фрейбург, Німеччина) лігують за допомогою Т4-ДНК-лігази (фірми Roche, 12°C, протягом ночі) до кДНК-кінців, ріжуть за допомогою XhoI і фосфорилують інкубацією з полінуклеотидкінази (фірми Roche, 37°C, 30 хвилин) Цю суміш піддають розділу на гелі агарози з низькою точкою плавлення. Молекули ДНК із більш, ніж 300 парами основ виділяють з гелю, екстрагують фенолом, концентрують на колонах Elutip-D (фірми Schleicher und Schüll, г. Дассель, Німеччина), лігують до вектора й спаковують у фаги лямбда-ZAPII або лямбда-ZAP-експрес при застосуванні набору Gigapack Gold (фірми Stratagene, Амстердам, Нідерланди), причому застосовують матеріал виробника і виконують його вказівки.

Конструкцію банку кДНК для *Phytophthora infestans* здійснюють як описано вище.

Приклад 5: Секвенування ДНК і комп'ютерний аналіз

Банки кДНК, описані в прикладі 4, застосовують для секвенування ДНК згідно із стандартним способом, зокрема, за допомогою способу ланцюгової термінації при застосуванні набору секвенуючих реакцій ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit (фірми Perkin-Elmer, Вейтерштадт, Німеччина). Секвенування випадкових, окремих клонів проводять після препаративного одержання плазмиди з кДНК-банків за допомогою масової експресії *in vivo* і ретрансформації DH10B на агрових пластинах (про подробиці - до матеріалу і протоколу фірми Stratagene, Амстердам, Нідерланди). ДНК-плазмиду виділяють з вирощених протягом ночі культур *E. coli*, які були вирощені у відварі Luria з ампіциліном (див. Sambrook і ін. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)), на роботі препаратії ДНК фірми Qiagen (Qiagen, Хільден) згідно з протоколом виробника. Застосовують затравки секвенування з такими нуклеотидними послідовностями:

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'  
5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'  
5'-TGTAACACGACGCCAGT-3'

Послідовності процесують і анотують із застосуванням стандартного пакета програм EST-MAX, який комерційно поставляється фірмою Bio-Max (Мюнхен, Німеччина), із використанням порівняльних алгоритмів і із застосуванням пошукової послідовності за допомогою програми BLAST здійснюють пошук гомологічних генів (див. Altschul і ін. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.). Докладно охарактеризовують послідовність з *Cryptocodium* і *Thraustochytrium* з гомологією до пошукової послідовності елонгази моху з *Physcomitrella patens*.

Приклад 6а: Ідентифікування гена Tc\_PSE1 і Tc\_PSE2 (Tc є *Thraustochytrium*), а також гена Cc\_PSE1 і Cc\_PSE2 (Cc є *Cryptocodium cochii*) порівнянням з геном Pp\_PSE1 з *Physcomitrella patens*.

Послідовність повної довжини елонгази моху згідно з винаходом Pp\_PSE1 (позначення див. таблицю 2) застосовують для порівняння послідовностей у пошуковому алгоритмі TBLASTN:

MEVVERFYGE LDGKVSQGVN ALLGSFGVEL TDTPTTKGLP LVDSPTPIVL GLLWIKARD  
LKPRASEPFL LQALVLVHNL FCFALSLYMC VGIAYQAITW RYSLWGNAYN PKHKEMAILV YLFYMSKYVE  
FMDTVIMILK RSTRQISFLH VYHHSSISLI WWAIAHHAPG GEAYWSAALN SGVHVLMYAY YFLAACLRSS  
PKLKNKYLFW GRYLTQFQMF QFMLNLVQAY YDMKTNAPYP QWLIKILFYY MISLLFLFGN FYVQKYIKPS

DGKQKGAKTE.

Повна нуклеотидна послідовність елонгази Pp\_PSE1 кДНК складається з приблизно 1200 пар основ. Вона містить відкрити рамку зчитування в 873 п.о., яка кодує 290 амінокислот з розрахованою молекулярною масою в 33,4 Дальтона. Білкова послідовність містить тільки 38,5% ідентичності і 48,3% схожості з SE1-, генним продуктом з *Saccharomyces cerevisiae*, яка потрібна для елонгації кислот жирного ряду із середньою довжиною ланцюга в дріжджах (див. Toke & Martin, 1996, Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 271, 18413-18422).

EST-послідовність CC001042041R, а також TC002034029R і TC002014093R були спочатку взяті через слабку гомологічність до елонгази з *Physcomitrella patens* (див. таблицю 2), гену PSE1 серед інших генів-кандидатів як цільовий ген. На Фіг.5 представлений результат порівняння пептидної послідовності Pp\_PSE1 зі знайденою послідовністю. Вона є частиною нуклеїнової кислоти згідно з винаходом з послідовності ID NO:3. (назва гена: Tc\_PSE1, власний банк винахідника TC002034029R). Букви показують ідентичні амінокислоти, у той час як знак плюс показує хімічно схожу амінокислоту. Ідентичність, відповідно, гомологія всіх знайдених послідовностей згідно з винаходом показані в таблиці 3.

Секвенування повного кДНК-фрагмента з клону TC002034029R дає послідовність довжиною в 693 пар основ, починаючи з першої основи з відкритою рамкою зчитування. Послідовність, що кодує поліпептид у 195 амінокислот, представлена в послідовності ID NO:4 з одним термінальним кодоном у положенні пар основ з SEQ ID NO:3 у положенні пар основ 586-588. Клон TC002014093R містить майже повний поліпептид елонгази, як видно з порівняння послідовностей по Фіг.7. Штрихи означають ідентичні амінокислоти, у той час, як двокрапки й окремі крапки означають хімічно замінні, тобто хімічно еквівалентні амінокислоти. Порівняння здійснювали за допомогою матриці BLOSUM62 заміни амінокислот за Henikoff & Henikoff ((1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919). Застосовувані параметри: Gap Weight: 8; Average Match: 2.912, Length Weight: 2, Average Mismatch: -2.003.

Далі порівнянням послідовностей був ідентифікований другий est. На Фіг.6 представлено порівняння пептидної послідовності Pp\_PSE1 зі знайденою послідовністю. Якщо гомологія при вибраних параметрах обмежується невеликою кількістю амінокислот, то це має відношення до сильно консервативної ділянки специфічної до елонгаз поліненасичених кислот жирного ряду. Тому була визначена послідовність повного клонованого фрагмента.

Секвенування повного фрагмента кДНК із клону TC002014093R дало послідовність довжиною в 955 пар основ, починаючи з першої основи у відкритій рамці зчитування. Це дано згідно з винаходом за допомогою SEQ ID NO: 5. Послідовність, що кодує поліпептид з 297 амінокислот з термінальним кодоном у положенні пар основ 892-894 згідно з винаходом, представлена в SEQ ID NO: 6.

За допомогою послідовності PpPSE1 був ідентифікований ген est CC001042041R з *Cryptocodium cochii*, що кодує ген Cc\_PSE1. Виділений ген est CC001042041R, представлений згідно з винаходом як SEQ ID NO: 7, має довжину в 708 пар основ з відкритою рамкою зчитування, починаючи з першої основи з 642 пар основ, що кодують 214 амінокислот і з термінальним кодоном у положенні 643-645. Послідовність амінокислот термінального кодона представлена згідно з винаходом в SEQ ID NO:8.

Поряд зі схожістю з генним продуктом PSE1 може бути залучена і схожість з елонгазою з *Saccharomyces cerevisiae* (sce elo 1P), яка потрібна для елонгації кислот жирного ряду із середньою довжиною ланцюга в дріжджах (див. Toke & Martin, 1996, Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 271, 18413-18422). У таблиці 3 представлена ідентичність і гомологія елонгаз згідно з винаходом одна до одної і до елонгаз з *Physcomitrella patens* і з дріжджів. Дані були одержані за допомогою програми GAP як часткової програми такого програмного забезпечення: Wisconsin Package Version 10.0 (Genetics Computer Group (GCG), Медісон, Віскон., США).

Таблиця 3

Ідентичність/гомологія	Tc_PSE1	TC_PSE2	Pp_PSE1	Sce elo 1P
Cc_PSE1	47,1%/40,2%	50,6%/43,5%	38,5%/29,4%	45,1%/33,5%
Tc_PSE1	100/100	n.d.	43,2%/32,7%	41,9%/29,9%
Tc_PSE2	41,7%/29,5%	100/100	39,2%/30,0	35,4%/27,8%

Зокрема, з Фіг.5 до 10 можна одержати подальші мотиви послідовностей як ділянки високої гомології і відповідні консенсні послідовності, які відводяться від них і які за допомогою зворотного переведення амінокислот у кодон із трьома парами основ приводять до олігонуклеотидів, які можуть бути використані для виділення нових елонгаз за допомогою полімеразних ланцюгових реакцій. Такими є, зокрема, представлені на Фіг.10 мотиви послідовностей. З цих мотивів можна одержувати олігонуклеотиди й у комбінації з двома олігонуклеотидами можна застосовувати в ПЛР-експериментах для виділення інших фрагментів елонгаз. При цьому конструюється і синтезується один олігонуклеотид, що підходить для визначеного звичайним чином 5'-3'-ланцюга і другий, що підходить для 3'-5'-ланцюга вниз по ходу ланцюга олігонуклеотиду. При цьому одержується певна кількість комбінацій затравок, яка обмежена пермутацією можливих варіантів.

При цьому можуть використовуватися також і праймери (затравки) оліго-dT і їх варіанти, наприклад, таким чином, що остання основа допускає специфічність транскриптів, як наприклад, оліго-dT (12-20) X, при цьому X може бути G, C або T. Друга основа оліго-dT (12-20) XY може також використовуватися, у той час як X може бути G, C або A, у той час як Y може бути A, G, C, або T.

Від вищеписуваних послідовностей можна одержувати 17- до 20 -мірні олігонуклеотиди, які при варіаціях комбінацій праймерів і таких параметрів, як температура, концентрація іонів Mg і т.п., можуть бути використані для виділення генних фрагментів. Одержані в такий спосіб генні фрагменти можуть клонуватися в придатні вектори і послідовність одержаних клонів може бути визначена для ідентифікації нових елонгаз згідно з відомими способами.

Приклад 66: Виділення кДНК клону з *Pythophtora infestans*

Клон кДНК із позначенням P1001002014R з *Phytophthora infestans* ідентифікований з випадково секвенованих кДНК на основі гомології до специфічних елонгас поліненасичених кислот жирного ряду з моху *Physcomitrella patens* (ATCCC 48886). Клон містить представлений на Фіг.8 консенсусний мотив MYxYF, причому на відміну від ідентифікованих дотепер елонгас поліненасичених кислот жирного ряду був знайдений залишок треоніну як амінокислота x, що варіюється. Ці інші варіації можуть бути використані для одержання праймерів ПЛР.

Приклад 7: Ідентифікація генів за допомогою гібридизації (TC002034029R-11 iGenTc-PCE1)

Генні послідовності можуть застосовуватися для ідентифікації гомологічних або гетерогенних генів з банків кДНК або геномних банків.

Гомологічні гени (тобто кДНК-клони повної довжини, які гомологічні або є гомологами) можуть виділятися гібридизацією нуклеїнової кислоти при застосуванні, наприклад, банків кДНК. Зокрема, для виділення функціональних генів повної довжини наведеної в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:11 послідовності може застосовуватися цей метод. В залежності від частоти гена від 100000 до 1000000 рекомбінантних бектеріофаг бляшок і переводять на нейлонові мембрани. Після денатурування лугом ДНК іммобілізують на мембрані, наприклад, за допомогою ультрафіолетового зшивання. Гібридизація здійснюється при дуже жорстких умовах. У водному розчині здійснюють гібридизацію і промивання при іонній силі в 1M NaCl і температурі в 68°C. Зонди гібридизації одержують, наприклад, маркуванням за допомогою радіоактивної (<sup>32</sup>P-) нік-транскрипції (див. High Prime, Roche, Майнхайм, Німеччина). Сигнали визначають за допомогою авторадіографії.

Частково гомологічні або гетерологічні гени, які споріднені, однак не ідентичні, можуть бути ідентифіковані аналогічно вищеописаним способам при застосуванні не жорстких умов гібридизації і промивання. Для водної гібридизації іонну силу підтримують звичайно при 1M NaCl, причому температуру поступово знижують від 68 до 42°C.

Виділення послідовностей гена, що мають гомологію тільки до одного єдиного домена, наприклад, від 10 до 20 амінокислот, можна здійснювати при застосуванні синтетичних, радіоактивно маркірованих олігонуклеотидних зондів. Радіоактивно марковані олігонуклеотидні зонди одержують за допомогою фосфорилування 5'-кінця двох комплементарних нуклеотидів за допомогою T4-полінуклеотидкінази. Комплементарні олігонуклеотиди гібридизують один з одним і лігують, так що виникають конкатемери. Дволанцюгові конкатемери радіоактивно маркуються наприклад, за допомогою нік-транскрипції. Гібридизація здійснюється при не жорстких умовах із застосуванням високої концентрації олігонуклеотидів.

Розчин гібридизації олігонуклеотидів:

6xSSC

0,01M фосфату натрію

1 mM етилендіамонотетраоцтової кислоти (pH 8)

0,5% додецилсульфату натрію

100мкг/мл денатурованої ДНК - сперми лососі

0,1% знежирене молоко.

Під час гібридизації температуру знижують ступінчасто від 5 до 10°C нижче розрахованої температури олігонуклеотиду або до кімнатної температури (кімнатна температура дорівнює при цьому приблизно 23°C у всіх експериментах, якщо це не зазначено інакше), потім проводять промивання й авторадіографію. Промивання проводять при дуже низькій жорсткості при застосуванні 4 x хлориду натрію/цитрату натрію. Подальші подробиці див. публікацію Sambrook, J., і ін. (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, або Ausubel, F.M., та інш. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons.

Клон TC002034029R-11 з генним найменуванням Tc\_PCE1\_1 є послідовністю повної довжини елонгази з *Thraustochytrium* і цим більш довгий, ніж клон TC002034029R з Seq. ID No. 3 і Seq. ID No.4. Виділення клону здійснюють гібридизацією, як описано вище (приклад 7). Мова йде при цьому про ДНК довжину в 1054 пар основ, що кодує 271 амінокислоту зі стартовим кодоном у положенні пар основ 43-45 і з термінальним кодоном у положенні пар основ 856-858.

Приклад 8: Ідентифікація цільового гена за допомогою скринінга експресійних банків антитілами

Для одержання рекомбінантного білка, наприклад, у *E. coli*, застосовують кДНК-послідовності (наприклад, систему Qiagen QIAexpress pQE). Рекомбінантні білки афінно очищують звичайною Ni-NTA-афінною хроматографією (фірми Qiagen). Рекомбінантні білки застосовують тоді для одержання специфічних антитіл, наприклад, при застосуванні стандартних методів для імунізації кроликів. Антитіла при застосуванні колонки Ni-NTA, попередньо насиченої рекомбінантними антитілами, афінно очищуються, як описано в публікації авторів Gu і ін., (1994) *BioTechniques* 17:257-262. Антитіло може тоді застосовуватися для перевірки експресійних кДНК-банків за допомогою імунологічного скринінга. (див. Sambrook, J., і ін. (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, або Ausubel, F.M., і ін. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

Приклад 9: Плазмідні для трансформації рослин

Для трансформації рослин можуть застосовуватися бінарні вектори, такі, як pBinAR (див. Höfgen und Willmitzer, *Plant Science* 66 (1990) 221-230). Конструкція бінарного вектора може здійснюватися лігування кДНК зі смисловою або антисмисловою орієнтацією в Т-ДНК. На 5'-кінці кДНК знаходиться рослинний промотор, який активізує транскрипцію кДНК. Послідовність поліаденілування знаходиться на 3' кінці кДНК.

Тканиноспецифічна експресія може бути проведена при застосуванні тканиноспецифічного промотора. Наприклад, специфічна для насіння експресія може досягатися таким чином, що клонується Napin- або LeB4- або USP-промотор 5' кДНК. Може застосовуватися також будь-який інший специфічний для насіння промоторний елемент. Для конститутивної експресії всієї рослини можна застосовувати CaMV-35S-промотор.

Експресований білок при застосуванні сигнального пептиду може бути зкерований, наприклад, на

пластиди, мітохондрії або ендоплазматичний ретикулум, у клітинну ділянку (див. Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423). Сигнальний пептид клонується на 5' у рамці зчитування з кДНК, щоб досягти субклітинної локалізації гібридного білка.

#### Приклад 10: Трансформація агробактерій

Опосередкована агробактеріями трансформація рослини може бути проведена при застосуванні, наприклад, штаму GV3101 (pMP90-) (див. Koncz und Schell, Mol. Gen. Genet. 204 (1986) 383-396) або LBA4404 (Clontech) *Agrobacterium tumefaciens*. Трансформація може здійснюватися стандартними методами трансформації (див. Deblaere і ін., Nucl. Acids. Res. 13 (1984), 4777-4788).

#### Приклад 11: Трансформація рослин

Опосередкована агробактеріями трансформація рослин може здійснюватися при застосуванні стандартних методів трансформації і регенерації (див. Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., Plant Molecular Biology Manual, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 стор., ISBN 0-8493-5164-2).

Наприклад, рапс може бути трансформований за допомогою трансформації сім'ядолі або гіпокотилу (див. Moloney і ін., Plant Cell Report 8 (1989) 238-242; De Block та ін., Plant Physiol. 91 (1989) 694-701). Застосування антибіотика для селекції агробактерій і рослин залежить від застосовуваного для трансформації бінарного вектора і штаму агробактерій. Селекція рапсу здійснюється звичайно при застосуванні канаміцину в якості маркера рослин, що селекується.

Опосередкований агробактеріями перенос гена в льоні (*Linum usitatissimum*) можна проводити із застосуванням, наприклад, описаної авторами Mlynarova і ін. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 техніки. Трансформація сої може проводитися при застосуванні, наприклад, описаної в EP-A-0 0424 047 (Pioneer Hi-Bred International) або в EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (Університет Толедо) техніки.

Трансформація рослин може проводитися при застосуванні бомбардування частинками приєднання ДНК, опосередковане поліетилеогліколем, або техніки кремнійкарбонатного волокна, що описані, наприклад, авторами Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag Нью Йорк).

#### Приклад 12: Плазмиди для трансформації рослин

Для трансформації рослин можуть застосовуватися бінарні вектори, такі, як pBinAR (див. Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230). Конструкція бінарних векторів може здійснюватися лігуванням кДНК із смислової або антисмислової орієнтацією в Т-ДНК. 5' кДНК промотор рослини активує транскрипцію кДНК. Послідовність поліаденілювання знаходиться на 3'-кінці кДНК.

Тканиноспецифічна експресія може здійснюватися при застосуванні тканиноспецифічного промотору. Наприклад, специфічна для насіння експресія може бути досягнута тоді, коли Napin- або LeB4- або USP-промотор клонується на 5' кінець кДНК. Також може застосовуватися будь-який інший специфічний для насіння промоторний елемент. Для конститутивної експресії у всій рослині застосовується CaMV-35S-проМОТОр.

Зокрема гени, що кодують елонгази і десатурази можуть бути клоновані конструкцією послідовно декількох експресійних касет у бінарний вектор, щоб моделювати процес обміну речовин у рослині.

Всередині експресійної касети підлягаючий експресії білок може направлятися в клітинну ділянку при застосуванні сигнального пептиду, наприклад, для пластидів, мітохондрій або ендоплазматичного ретикула. Див. (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423). Сигнальний пептид клонується на 5'-кінці в рамці зчитування кДНК, щоб досягти субклітинної локалізації гібридного білка.

#### Приклад 13: Мутагенез in vivo

In vivo-мутагенез мікроорганізмів може проводити за допомогою пасажу плазмиди (або іншого вектора) ДНК через *E. coli* або інші мікроорганізми (наприклад, *Bacillus* spp. або дріжджі, такі, як *Saccharomyces cerevisiae*), при яких порушена здатність збереження цілісності генетичної інформації. Звичайні мутатор-штами мають мутації в генах для системи виправлення ДНК (наприклад, *mutHLS*, *mutD*, *mutT* і т.п.; (як літературне джерело див. Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanisms, in: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Стор.2277-2294, ASM: Вашингтон). Ці штами відомі фахівцю в даній галузі. Застосування цих штамів описано, наприклад, у публікації Greener, A., і Callahan, M. (1994) *Strategies* 7:32-34. Перенос мутуючих молекул ДНК в рослини здійснюється переважно після селекції і тестування мікроорганізмів. Трансгенні рослини одержують згідно з різними прикладами, наведеними у даній частині опису.

#### Приклад 14: Дослідження експресії рекомбінантного генного продукту в трансформованому організмі

Активність рекомбінантного генного продукту в трансформованому організмі-хазяїні вимірюють на рівні транскрипції і/або трансляції.

Придатним способом для визначення кількості транскрипції гена (вказівка на кількість РНК, що є в розпорядженні для трансляції генного продукту) є проведення нижчеописаного Нозерн-блоттінг аналізу (як літературне джерело див. Ausubel і ін. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: Нью Йорк, або вищенаведену частину опису прикладів), причому праймер, який створений так, що він зв'язується з геном, маркується міткою, що визначається (звичайно радіоактивно або хімічно люмінесцентно), так що якщо загальна РНК культури організму екстрагується, розділяється на гелі, трансформується на стабільну матрицю і інкубується в ній, зв'язок і розмір зв'язку зонда показує наявність і кількість мРНК для цього гена. Ця інформація показує ступінь транскрипції трансформованого гена. Клітинна загальна РНК може бути приготовлена з клітин, тканини або організмів різними способами, відомими фахівцю в даній галузі, як наприклад, способом, описаним у публікації Bormann, E.R., і ін. (1992) *Mol. Microbiol.* 6:317-326.

#### Нозерн-гібридизація:

Для гібридизації РНК 20мкг загальної РНК або 1мкг полі(А)<sup>+</sup>-РНК розділяють за допомогою гелелектрофорезу на агарозі з інтенсивністю в 1,25% при застосуванні формальдегіду, як це описано в публікації Amasino (1986, *Anal. Biochem.* 152, 304). За допомогою капілярних трубочок при застосуванні 10 × хлориду натрію/цитрату натрію переносять на позитивно заряджені нейлонові мембрани (див. Hybond N+, Amersham,



Брауншвейг), іммобілізують ультрафіолетовим світлом і протягом 3 годин при 68°C попередньо гібридизують при застосуванні буфера гібридизації (10% декстрасульфату ваг./об., 1M NaCl, 1% додецилсульфату натрію, 100мг ДНК сперми лосося). Маркування зонда ДНК набором Highprime DNA labeling-Kit (фірми Roche, Майнхайм, Німеччина) здійснюють під час попередньої гібридизації при застосуванні  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP (фірми Amersham, Брауншвейг, Німеччина). Гібридизацію проводять після введення маркованого ДНК-зонда в такий же буфер при 68°C протягом ночі. Промивання проводять два рази протягом 15 хвилин при застосуванні 2 × хлориду натрію/цитрату натрію і два рази протягом 30 хвилин при застосуванні 1 × хлориду натрію/цитрату натрію, 1% додецилсульфату натрію при 68°C. Експозицію закритого фільтра здійснюють при -70°C протягом проміжку часу від 1 до 14 годин.

Дослідження наявності або відносної кількості транслатованого цією мРНК білка можуть проводитися стандартними методами, такими, як Вестерн-блоттінг аналізом (див., наприклад, Ausubel і ін. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: Нью Йорк). При цьому способі екстрагують клітинні загальні білки, розділяють за допомогою гел-електрофорезу, наносять на матрицю, таку, як нітроцелюлоза, і інкубують з зондом, таким, як антитіло, яке специфічно зв'язується з бажаним білком. Цей зонд звичайно має бути таким, що легко детектується, хімічно люмінесцентним або калориметрично міченим. Наявність і кількість маркування, що спостерігається, показує наявність і кількість бажаного, наявного в клітині, мутованого білка.

Приклад 15: Аналіз дії рекомбінантних білків на виробництво бажаного продукту

Вплив генетичної модифікації в рослинах, грибах, водоростях, або інфузоріях на виробництво бажаної сполуки (такої, як кислота жирного ряду) може бути визначений таким чином, що модифіковані мікроорганізми або модифіковані рослини вирощують за придатних умов (як описано вище) і середовище і/або клітинні компоненти перевіряють на підвищене виробництво бажаного продукту (тобто ліпідів або кислот жирного ряду). Методи аналізу відомі фахівцю в даній галузі і включають спектроскопію, тонкошарову хроматографію, способи забарвлення різного виду, ферментативні або мікробіологічні способи, а також аналітичну хроматографію, таку, як високоефективна рідинна хроматографія (див. наприклад, Ullman, *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, том A2, Стр.89-90 та Стр.443-613, Видавн. VCH: Вайнхайм (1985); Fallon, A., та інш., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, том 17; Rehm та інш. (1993) *Biotechnology*, том 3, Розділ III: "Product recovery and purification", Стр.469-714, Видавн. VCH: Вайнхайм; Belter, P.A., та інш. (1988) *Bioseparations: downstream processing for Biotechnology*, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., і Cabral, J.M.S. (1992) *Recovery processes for biological Materials*, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., і Henry, J.D. (1988) *Biochemical Separations*, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, том B3; Розділ 11, Стр.1-27, Видавн. VCH: Вайнхайм; і Dechow, F.J. (1989) *Separation and purification techniques in biotechnology*, Noyes Publications).

Поряд з вищенаведеними способами ліпідні рослин екстрагують з рослинного матеріалу як описано в публікації авторів Cahoon і ін. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (22):12935-12940, і Browse та інш. (1986) *Analytic Biochemistry* 152:141-145. Кількісний і якісний аналіз ліпідів і кислот жирного ряду описаний у публікаціях Christie, William W., *Advances Lipid Methodology*, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., *Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide* - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 стор. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) -16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Додатково до вимірювання кінцевого продукту ферментації можливо також аналізувати інші компоненти процесу обміну речовин, які застосовуються для виробництва бажаних сполук, наприклад, проміжних і побічних продуктів, щоб визначати загальну ефективність виробництва сполуки. Способи аналізу включають вимірювання кількості поживних речовин у середовищі (наприклад, цукру, вуглеводів, джерела азоту, фосфатів і інших іонів), вимірювання вмісту біомаси і росту, аналіз виробництва звичайних метаболітів процесу обміну речовин і вимірювання газів, що виникають під час ферментації. Стандартні способи таких вимірів описані в публікації *Applied Microbial Physiology; A Practical Approach*, P.M. Rhodes і P.F. Stanbury, Видавн.: IRL Press, Стр.131-163 і 165-192 (ISBN: 0199635773) і в цій публікації літературних джерелах.

Одним прикладом є аналіз кислот жирного ряду (застосовувані при цьому скорочення: FAME означає метиловий естер кислоти жирного ряду; GC-MS означає газо-рідинну хроматографію - мас-спектроскопію; TAG означає триацилгліцерин; TLC означає тонкошарову хроматографію).

Чіткий доказ наявності продуктів кислоти жирного ряду може бути одержаний за допомогою аналізу рекомбінантних організмів за стандартними способами аналізу: GC, GC-MS або TLC, як це описано, наприклад, у публікації Christie у літературних джерелах, що цитуються в ній (1997, in: *Advances on Lipid Methodology*, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, *Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren*, Lipide 33:343-353).

Матеріал, що підлягає аналізу, може роздрібнюватись обробкою ультразвуком, здрібнюванням у скляному млині, обробкою рідким азотом і здрібнюванням або іншими способами. Матеріал повинний після роздрібнювання центрифугуватися. Осад ресуспендують у дистильованій воді, нагрівають протягом 10 хвилин при 100°C, охолоджують на льоді і знову центрифугують. Потім здійснюють екстракцію в 0,5M сірчаної кислоти в метанолі з 2% диметоксипропаном протягом 1 години при 90°C, що приводить до гідролізованих композицій олій і ліпідів, які дають трансметильовані ліпіди. Ці метилові естери кислоти жирного ряду екстрагують у петролейному етері і потім піддають газорідинній хроматографії при застосуванні капілярної колонки (фірми Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 мікрон, 0,32мм) при температурах між 170°C і 240°C протягом 20 хвилин і протягом 5 хвилин при 240°C. Ідентичність одержаних метилових етерів кислоти жирного ряду повинна бути визначена застосуванням стандартних методів, одержуваних комерційно (фірми Sigma).

При кислотах жирного ряду, для яких нема стандартів, ідентичність повинна визначатися за допомогою дериватизації і подальшого аналізу GC-MS. Наприклад, локалізація кислот жирного ряду з потрійними зв'язками повинна детектуватися за допомогою GC-MS після дериватизації похідними 4,4-диметоксиксазоліну (див. Christie, 1998, а також див. вище).

Приклад 16: Конструкти експресії в гетерологічних мікробних системах Штами, умови росту і плазміди

Штам *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' kan (фірми Stratagene) застосовується для субклонування нових елонгаз, таких, як PpPSE1 з *Physcomitrella patens*. Для функціональної експресії цього гена ми застосовуємо штам *Saccharomyces cerevisiae* INVSc 1 (фірми Invitrogen Co.). *E. coli* культивують у відварі Лурія-Бертіні (LB, Duchefa, Haarlem, Нідерланди) при 37°C. Якщо необхідно, додають ампіцилін (100мг/літр) і 1,5%-ий агар (ваг./об.) додають для твердих середовищ Лурія-Бертіні. *Saccharomyces cerevisiae* культивують при 30°C або в YPG-середовищі або в повному мінімальному середовищі без урацилу (Cmdu; див. публікації: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Coen, D.M., i Varki, A. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Нью Йорк) за допомогою або 2% (ваг./об.) рафінози або глюкози. До твердого середовища додають 2% (ваг./об.) Bacto™-агар (фірми Difco). Використаними для клонування й експресії плазмідами є pUC18 (фірми Pharmacia) pYES2 (фірми Invitrogen Co.).

Приклад 17: Клонування й експресія специфічних елонгаз поліненасичених кислот жирного ряду з *Physcomitrella*, *Cryptocodinium* і *Thraustochytrium*.

Гени повної довжини послідовностей згідно з винаходом можуть бути виділені як описано в прикладі 7 і оброблені далі як приведено нижче, де наводяться конкретні приклади експресії.

А) Елонгація кислот жирного ряду за допомогою елонгази моху Pp\_PSE1:

Для експресії в дріжджах *P. patens*-мДНК-клон PpPSE1 (колишня назва банку даних 08\_ck19\_b07, нова назва: pp001019019f), що кодує ген специфічної елонгази поліненасичених кислот жирного ряду (PSE1-), модифікують спочатку таким чином, що одержують місце рестрикції BamHI і консенсус послідовності дріжджів для високоєфективної трансляції (див. Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, *Cell* 44, 283-292) поруч зі стартовим кодоном і місце рестрикції BamHI, яке фланкує термінальний кодон. Для ампліфікації відкритої рамки зчитування синтезують пару праймерів, яка була комплементарна до її 5'- і 3'-кінців.

Ген послідовності згідно з винаходом, наведеної в SEQ ID NO:1, клонують за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в рYES і одержують плазмиду pYPr\_PSE1:

Для полімеразної ланцюгової реакції застосовують наведені нижче олігонуклеотиди:

Ppex6: ggatccacataatggaggtcgtggagagattc

Ppex6r: ggatcctcactcagtttagctcctttgc

Полімеразну ланцюгову реакцію проводять із плазмідною ДНК клону PP001019019F як матрицю в термоциклері (фірми Biometra) з полімеразою Pfu-ДНК (фірми Stratagene) і з таким температурним режимом: 3 хвилини при 96°C, далі 25 циклів у 30 секунд при 96°C, 30 секунд при 55°C і 1 хвилину при 72°C, 1 цикл в 10 хвилин при 72°C.

Конкретна величина ампліфікованого ДНК-фрагмента підтверджується за допомогою TBE-гель-електрофорезу на агарозі. Ампліфіковану ДНК екстрагують з гелю за допомогою набору гель-екстракції QIAquick (фірми QIAGEN) і при застосуванні Sure Clone Ligation Kit (фірми Pharmacia) спочатку клонують у pUC18. Клонований таким чином фрагмент ріжуть за допомогою BamHI, лігують у рYES. Причому одержують pYPr\_PSE1. Орієнтування фрагмента перевіряють за допомогою HindIII. Після трансформації *E. coli* XL1 Blue MRF' kan проводять мініпрепарацію ДНК (див. Riggs, M.G., & McLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. *BioTechniques* 4, 310-313) від трансформантів і ідентифікують позитивні клони за допомогою BamHI-рестрикційного аналізу. Послідовність клонованого ПЛР-продукту підтверджують за допомогою повторного секвентування при застосуванні набору ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (фірми Perkin-Elmer, Weiterstadt).

Одержують клон для максипрепарації ДНК за допомогою Nucleobond® AX 500 плазмідно-ДНК-екстракційного набору (фірми Macherey-Nagel, Дюрінген).

*Saccharomyces* INVSc1 трансформують з pYPr\_PSE1, відповідно з рYES2 як контроль згідно з модифікованим PEG/літійацетат-протоколом (див. Ausubel і ін., 1995). Після селекції на Cmdu-агаровій пластині за допомогою 2%-ої глюкози вибирають інші трансформанти і рYES2-трансформанти для подальшого вирощування і функціональної експресії, як уже згадано, і живлять різними кислотами жирного ряду в середовищі.

i) Зразки ліпідів у дріжджах, які трансформовані рYES-плазмідною без інсерції фрагмента або експресують ген Pp-PSE1 (дані в мол.%) після живлення 250 мікрон гексадектриєнової кислоти (16:3<sup>D7c,10c,13c</sup>).

Таблиця 4

PYES2	PYES2	pYPr_PSE1	PYPp_PSE1
16:0	11,8%	16:0	11,1%
16:1	28,7%	16:1	23,9%
16:3 <sup>D7c,10c,13c</sup>	9,2%	16:3 <sup>D7c,10c,13c</sup>	12,0%
18:0	10,6%	18:0	8,6%
18:1 <sup>D9c</sup>	34,9%	18:1 <sup>D9c</sup>	20,6%
18:1 <sup>D11c</sup>	1,1%	18:1 <sup>D11c</sup>	1,4%
18:3 <sup>D9c,12c,15c</sup>	3,7%	18:3 <sup>D9c,12c,15c</sup>	21,4%

ii) зразки ліпідів у дріжджах, що трансформовані плазмідною рYES без інсерції фрагментів, або які експресують ген Pp-PSE1 (дані в мол.%) після введення 500 мікрон ліноленової кислоти (18:3<sup>D6c,9c,12c</sup>).

Таблиця 5

PYES2	PYES2	pYPr_PSE1	PYPp_PSE1
-------	-------	-----------	-----------

16:0	18,3%	16:0	16,9%
16:1 <sup>D9c</sup>	16,0%	16:1 <sup>D9c</sup>	15,3%
18:0	8,6%	18:0	8,4%
18:1 <sup>D9c</sup>	16,7%	18:1 <sup>D9c</sup>	17,5%
18:1 <sup>D11c</sup>	0,7%	18:1 <sup>D11c</sup>	2,0%
18:3 <sup>D6c,9c,12c</sup>	39,8%	18:3 <sup>D6c,9c,12c</sup>	32,6%
20:3 <sup>D7c,11c,14c</sup>	0%	20:3 <sup>D7c,11c,14c</sup>	5,1%

iii) зразки ліпідів у дріжджах, що трансформовані pYES-плазмідом без інсерції фрагментів, або які експресують ген Pp-PSE1 (дані в мол.%) після введення 500 мікрон стеаринової кислоти (18:4<sup>D6c,9c,12c,15c</sup>).

Таблиця 6

PYES2		pYPp_PSE1	PYPp_PSE1
16:0	15,2%	16:0	15,6%
16:1 <sup>D9c</sup>	13,1%	16:1 <sup>D9c</sup>	14,9%
18:0	12,3%	18:0	10,7%
18:1 <sup>D9c</sup>	12,9%	18:1 <sup>D9c</sup>	14,0%
18:1 <sup>D11c</sup>	0,7%	18:1 <sup>D11c</sup>	1,2%
18:3 <sup>D6c,9c,12c,15c</sup>	45,4%	18:3 <sup>D6c,9c,12c,15c</sup>	23,8%
20:4 <sup>D8c,11c,14c,17c</sup>	0,4%	20:4 <sup>D8c,11c,14c,17c</sup>	19,8%

iv) зразки ліпідів у дріжджах, що трансформовані pYES-плазмідом без інсерції фрагментів, або які експресують ген Pp-PSE1 (дані в мол.%) після введення 500 мікрон лінолевої кислоти (18:2<sup>D9c,12c</sup>).

Таблиця 7

pYES2	pYES2	pYPp_PSE1	PYPp_PSE1
16:0	7,9%	16:0	8,7%
16:1 <sup>D9c</sup>	1,2%	16:1 <sup>D9c</sup>	1,3%
18:0	5,3%	18:0	5,1%
18:1 <sup>D9c</sup>	1,3%	18:1 <sup>D9c</sup>	1,3%
18:2 <sup>D9c,12c</sup>	83,9%	18:2 <sup>D9c,12c</sup>	80,4%
20:2 <sup>D11c,14c</sup>	0,5%	20:2 <sup>D11c,14c</sup>	3,2%

#### Б) Елонгація кислоти жирного ряду за допомогою елонгази з *Thraustochytrium*

Для експресії в дріжджах *Thraustochytrium*-кДНК-клон з SEQ ID NR: 3 (Tc\_PSE2), що кодує специфічний ген елонгази (PSE) поліненасичених кислот жирного ряду, модифікують спочатку таким чином, що він являє собою функціонально активний поліпептид. Для цієї мети N-термінальний кінець білка на рівні ДНК продовжують основами елонгази з *Physcomitrella patens*, яких не вистачає, на 42 пари основ. Однак до послідовності може бути доданий тільки один стартовий кодон у придатній рамці читування.

Наведені нижче олігонуклеотиди застосовуються для експерименту полімеразної ланцюгової реакції:

pTCPSE2-5':aaaggatccacataatggaggtctggagagattctacggtgagttggatggga

agGTCATTTCTGGGCTCGACC

pTCPSE2-3':aaggatccctgagtttagctccctttgtcttcc

Додатково в обох олігонуклеотидах є місце для рестрикції BamHI і консенсусна послідовність дріжджів для вискофективної трансляції (див. публікацію Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell 44, 283-292).

Полімеразна ланцюгова реакція проводиться з плазмідною ДНК в якості матриці в термоциклері (фірми Biometra) полімеразою Pfu-ДНК (фірми Stratagene) і при такому температурному режимі: 3 хвилини при 96°C, далі ідуть 25 циклів по 30 секунд при 96°C, 30 сек при 55°C і 3 хвилини при 72°C, 1 цикл за 10 хвилин при 72°C і Stop при 4°C.

Конкретна величина ампліфікованого фрагмента ДНК підтверджується ТВЕ-гель-електрофорезом на агарозі. Ампліфіковану ДНК екстрагують з гелю за допомогою набору QIAquick (фірми QIAGEN) і лігують у місце рестрикції SmaI дефосфорилизованого вектора pUC 18 при застосуванні Sure Clone Ligation-набору (фірми Pharmacia) і при цьому одержують pUC-hybrid-Tc\_PSE2. Після трансформації *E. coli* XL1 Blue MRF<sup>+</sup> kan проводять мініпрепарацію ДНК (див. Riggs, M.G., & McLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. BioTechniques 4, 310-313) на 24 стійких до ампіциліну трансформантах і ідентифікують позитивні клони за допомогою рестрикційного аналізу BamHI. Послідовність клонованого продукту полімеразної ланцюгової реакції підтверджується за допомогою ресеквенування при застосуванні набору ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (фірми Perkin-Elmer, Weiterstadt).

Плазмідну ДНК із pUC-PSE1, а також pUC- hybrid-Tc\_PSE2 до того ж розщеплюють за допомогою BamHI і одержані фрагменти лігують у місце рестрикції BamHI дефосфорилизованого дріжджового *E. coli*-вектора pYES2, при цьому одержують pY2 гібрид-Tc\_PSE2. Після трансформації *E. coli* і мініпрепарації ДНК із трансформантів перевіряють орієнтацію фрагмента ДНК у векторі за допомогою розщеплення HindIII. Клон одержують для макси-препарації ДНК за допомогою екстракційного набору Nucleobond® AX 500 плазмиди ДНК

(Macherey-Nagel, Дюрінген). Далі *Saccharomyces INVSc1* трансформують з pY2PSE1, pYES2, pY2-hybrid-Tc\_PSE2 і pYES2 згідно з модифікованим PEG/літійацетат-протоколом (див. Ausubel і ін., 1995). Після селекції на Cm<sup>dum</sup>-агара-пластинах з 2% глюкозою вибирають для подальшого культивування і функціональної експресії по чотирьох pY2PSE1-трансформанти (pY2PSE1a-d), pY2-hybrid-Tc\_PSE2-трансформанти (pY2-hybrid-Tc\_PSE2 1a-d) і один pYES2-трансформант.

Функціональна експресія активності елонгази в дріжджах

Попередня культура:

20мл рідкого середовища Cm<sup>dum</sup>- з 2% (ваг./об.) рафінози засівають трансгенними дріжджовими клонами (pY2- hybrid-Tc\_PSE2 1a-d, pYES2) і вирощують 3 дні при 30°C до досягнення оптичної густини при 600nm (OD<sub>600</sub>) у 1,5-2.

Головна культура:

Для експресії рідке середовище Cm<sup>dum</sup> з 2% рафінози і 1% (об./об.) тергітолу NP-40 доводять субстратом кислоти жирного ряду до кінцевої концентрації в 0,003% (ваг./об.). Середовище засівають попередніми культурами до OD<sub>600</sub> у 0,05. Експресію індукують при OD<sub>600</sub> у 0,2 за допомогою 2% (ваг./об.) галактози протягом 16 годин, після чого культуру OD<sub>600</sub> у 0,8-1,2 збирають.

Аналіз кислот жирного ряду:

Загальні кислоти жирного ряду екстрагують із дріжджових культур і аналізують за допомогою газової хроматографії. Клітинні з 5мл культури збирають за допомогою центрифугування (1000об./хв., 10хв, 4°C) і промивають один раз за допомогою 100ммол NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0, щоб видалити залишкове середовище і кислоти жирного ряду. Для одержання метилового естеру кислоти жирного ряду осади клітин обробляють 1М метанольною H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> і 2% (об./об.) диметоксипропану протягом 1 години при 80°C. Метильовий естер кислоти жирного ряду за допомогою 2мл петролейного етеру, промивають один раз 100ммол NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0, і один раз дистильованою водою і сушать за допомогою H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Органічний розчинник випаровують під потоком аргону і метильовий естер кислоти жирного ряду розчиняють у 50мл петролейного етеру. Проби на капілярній колонії ZEBRON-ZB-Wax (30м, 0,32мм, 0,25ммк; фірми Phenomenex) розділяють у газохроматографі Hewlett Packard-6850 за допомогою детектора іонізації полум'я. Температуру печі програмують від 70°C (витримуючи 1 хвилину) до 200°C і зі швидкістю 20°C/хв, потім до 250°C (витримуючи 5 хвилин) зі швидкістю 5°C/хв і на закінчення до 260°C зі швидкістю 5°C/хв. Азот застосовують як газ-носіє (4,5мл/хв при 70°C). Кислоти жирного ряду ідентифікують порівнянням з часом утримання стандарту FAME (фірми SIGMA).

Зразки кислоти жирного ряду від п'яти різних штамів дріжджів у мол.-% представлені в таблиці 1.

Співвідношення поданої і поглинутої g-ліноленової кислоти виділені жирним шрифтом, співвідношення елонгованих продуктів показані червоним кольором і елонгованої g-ліноленової кислоти жирними цифрами (останній рядок).

GC-аналіз метилових естерів кислоти жирного ряду (FAMES), які походять з загальних ліпідів, трансформованих за допомогою pYES2 (i/контроль) і pY2PSE1 (ii-iv с+d/ кожний трансформований за допомогою pY2PSE1A, pY2PSE1B, pY2PSE1C, pY2PSE1D) дріжджів, представлений на Фіг.2а-е. Для аналізу вирощують трансгенні дріжджі в присутності g-18:3. Таблиця 1 показує їх кислоти жирного ряду в мол.%. Поглинання g-18:3 виділено жирними цифрами, продукт елонгації дигомо-g-ліноленової кислоти (20:3D8,11,14) підкреслюють і співвідношення g-18:3 до продукту елонгування (також у мол.%) показано жирними цифрами (останній рядок). Структура і мас-спектри DMOX-похідної цис-06,9,12 C18:3 впливають з Фіг.3а+b. Структура і мас-спектри DMOX-похідної D8,11,14 C20:3 впливають з Фіг.4а+b.

Результати показують, що g-18:3 вбудований у великих кількостях у трансгенні дріжджі. Усі чотири трансгенні дріжджові клони, які трансформовані з pY2PSE1, показують додатковий пік газохроматограми, який був ідентифікований за допомогою порівняння терміну утримання як 20:3 D8,11,14. Газохроматографія, мас-спектроскопія може давати додаткову підтримку для підтвердження цієї ідентичності. Частина елонгованих g-18:3 дорівнює, як показано в таблиці 1, 23,7 до 40,5%. Далі не спостерігалось ніякої істотної елонгації пальмітинової кислоти (16:0), пальмітолеїнової кислоти (16:1), стеаринової кислоти (18:0) або масляної кислоти (18:1 D9).

Ідентифіковані продукти показують, що нуклеотидна послідовність від PpPSE1 кодує D6-селективну елонгазу кислоти жирного ряду з моху *Physcomitrella patens*, що приводить до утворення нових кислот жирного ряду в трансгенних дріжджах.

Співвідношення поданих і поглинутих субстратів кислоти жирного ряду могли бути визначені за вищеописаним принципом й у такий спосіб встановлені якості і кількість реакції елонгування.

Структура і мас-спектри DMOX-похідних дають також положення подвійних зв'язків.

Інші експерименти живлення різними іншими кислотами жирного ряду (наприклад, арахідонової кислоти, ейкозупентаєнової кислоти і т.п.) можуть бути проведені для більш докладного підтвердження селективності цієї елонгази.

Приклад 18: Очищення бажаного продукту з трансформованих організмів загалом

Одержання бажаного продукту з рослинного матеріалу або грибів, водоростей, інфузорій, тваринних клітин або з надосадової рідини вищеописуваних культур може здійснюватися різними, відомими фахівцю в даній галузі способами. Якщо бажаний продукт виділяється не з клітин, клітини можуть збиратися з культур за допомогою повільного центрифугування, клітини можуть бути лізовані стандартними методами, такими, як механічна сила або обробка ультразвуком. Органи рослин можуть механічно відокремлюватися від іншої тканини або інших органів. Після гомогенізації уламки клітин відокремлюються центрифугуванням і надосадова фракція, що містить розчинні білки, зберігається для подальшого очищення бажаних рослин. Якщо продукт виділяється з бажаних клітин, клітини відокремлюються з культури повільним центрифугуванням і надосадова фракція зберігається для подальшого очищення.

Надосадова фракція з кожного способу очищення піддається хроматографії з придатною смолою, причому бажана молекула утримується на хроматографічній смолі, однак багато забруднень у пробі немає, або ж забруднення залишаються в смолі, а не в пробі. Ці хроматографічні стадії можуть, якщо необхідно,

повторюватися, причому застосовуються ті ж або інші хроматографічні смоли, що відомі фахівцю в даній галузі і він може вибрати відповідні хроматографічні смоли і застосувати їх ефективно для певної молекули, що підлягає очищенню. Очищений продукт може концентруватися фільтрацією або ультрафільтрацією і зберігатися при температурі, при якій стабільність продукту максимальна.

Фахівцям у даній галузі відомий широкий спектр способів очищення і вищенаведений спосіб очищення не призначений для обмеження їх вибору. Ці способи очищення наведені, наприклад, у публікації Bailey, J.E., & Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill: Нью Йорк (1986).

Ідентичність і чистота виділеного продукту може визначатися стандартними методами. До них відносяться високошвидкісна рідинна хроматографія (HPLC), спектроскопічні способи, способи забарвлення, тонкошарова хроматографія, NIRS, ферментативні тести або мікробіологічні способи. Огляд методів аналізу можна знайти в таких публікаціях: Patek і інш. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60:133-140; Malakhova та інш. (1996) *Biotechnologiya* 11:27-32; і Schmidt і ін. (1998) *Bioprocess Engineer.* 19:67-70. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (1996) том A27, Видавн. VCH: Вайнхайм, Стр.89-90, Стр.521-540, Стр.540-547, Стр.559-566, 575-581 і Стр.581-587; Michal, G (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley та Sons; Fallon, A., і ін. (1987) *Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, том. 17.

Еквіваленти

Фахівець у даній галузі розпізнає або може встановити багато еквівалентів описуваних специфічних форм виконання винаходу, якщо він проведе ряд звичайних, відомих експериментів. Ці еквіваленти підлягають також захисту в рамках даного винаходу.

**Фіг. 1** Порівняння пептиду із дріжджів elo1 (верхній ряд) з елонгазою *Physcomitrella patens* PpPSE1

```

49 dfefvtvgkqplseprpvllfiamyvvi fggrslvk.....sckplkl 91
   |  |  |  .  | :. | :. |  :: | |  : |  .  |  |
32 DTPPTKGLPLVDSPTPIVLGVS VYLTIVIGGLLWIKARDLKPRASEPFL 81

92 rfisqvhnlmltsvsflwlilmveqmlpivyrhglyfavcnveswtqpme 141
   . :  ||||  .. |  : .  |  | : : | :  | .  .  |
82 QALVLVHNLFCFALS LMCVGIAYQ..AITWRYSLWGNAYNPKH..KEMA 127

142 tlyylnymtkfvefadtvlmvlkh..rkltflhtyhhgatal lcy...nq 186
   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
128 ILVYLFYMSKYVEFMDTVIMILKRSTRQISFLHVYHHSSISLIWWAIAHH 177

187 lvgytavtwvpvtlnlavhvlmywyflsa.....sgirvwwkawvt 228
   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
178 APGGEAY.W.SAALNSGVHVL MYAYYFLAACLRSSPKLKNKYLFWGRYLT 225

229 rlqivqfmlldlivvyvlyqkivaayfknactpqc edclgsmtaiaagaa 278
   .  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
226 QFQMFOFMLNLVQAYYDM..KTNAPY.....PQ.....WLIKILFY 259

279 ilt sylflfifisyievykrgsasgkkk 305
   :  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
260 YMISLLFLFGNFYVQKYIKPS.DGKQK

```

| ідентичні амінокислоти

./: хімічний еквівалент

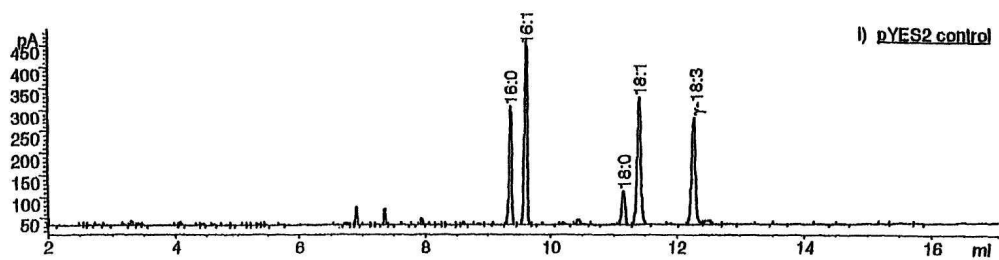


Fig. 2a

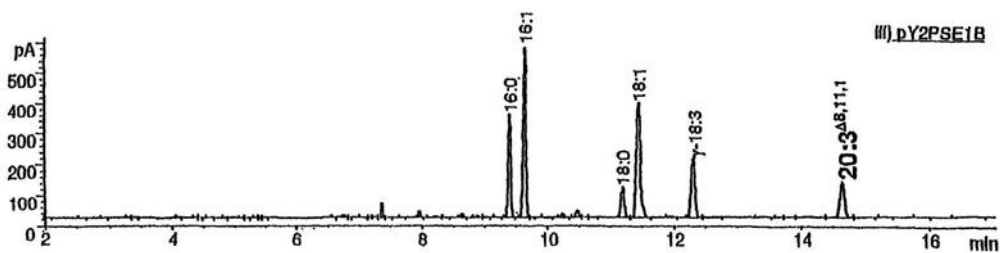
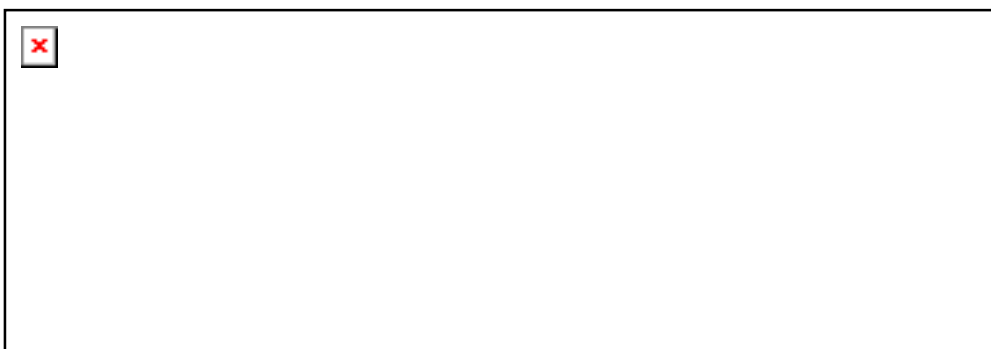


Fig. 2b

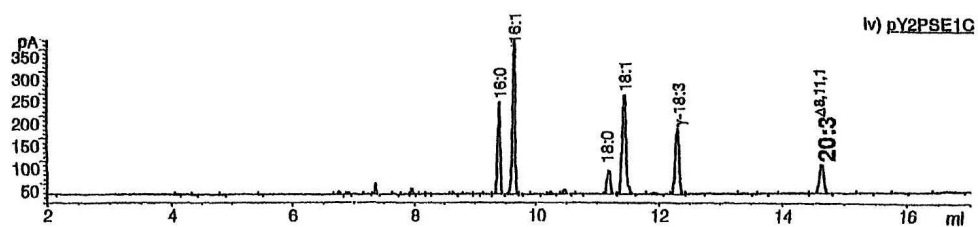


Fig. 2c

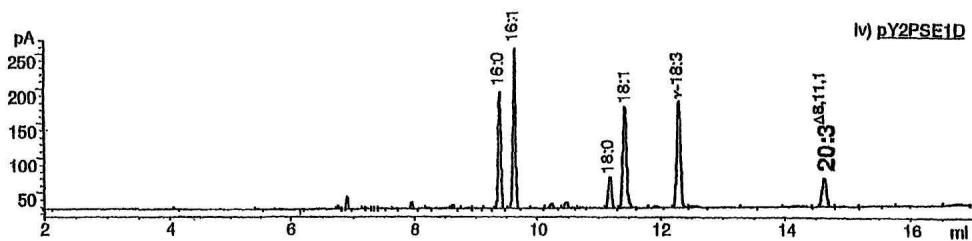
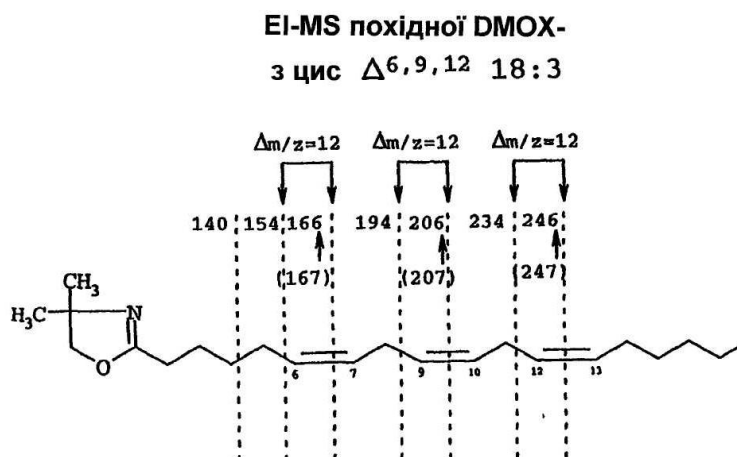
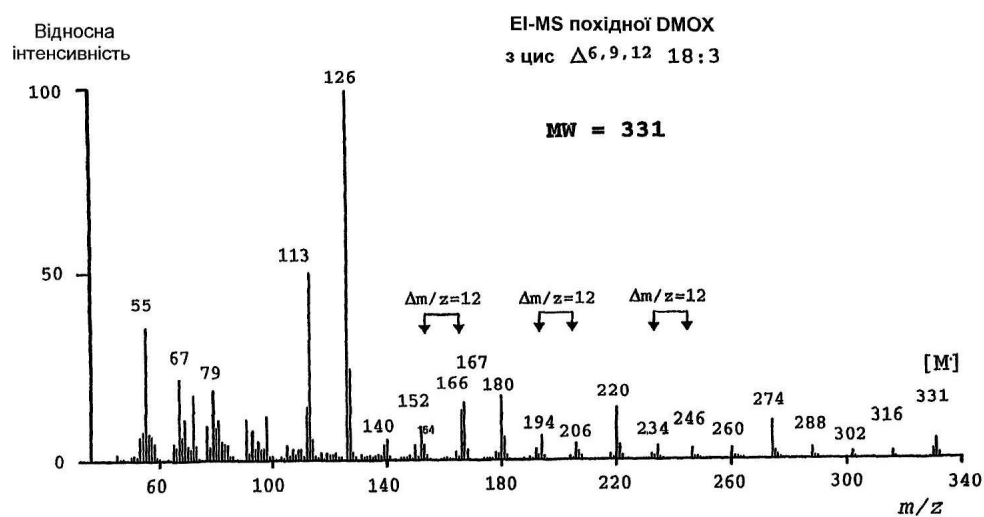


Fig. 2d

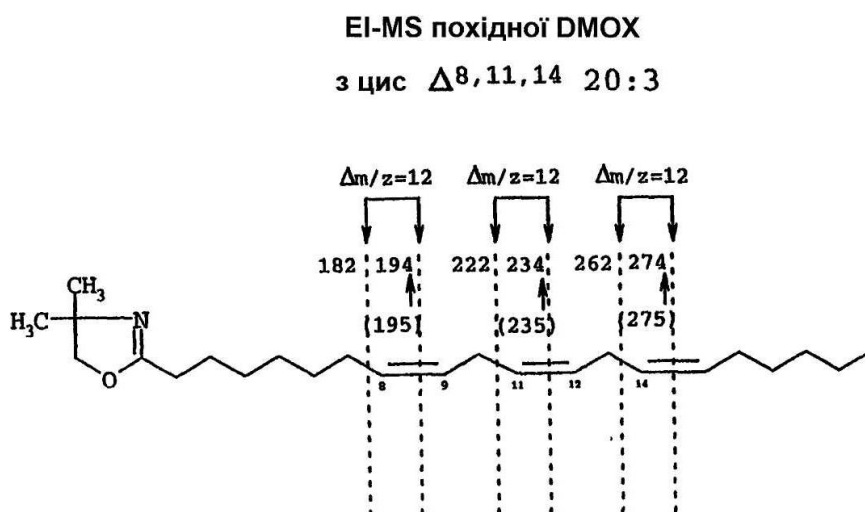
Фіг. 3а Похідна DMOX з цис  $\Delta^{6,9,12}$  18:3



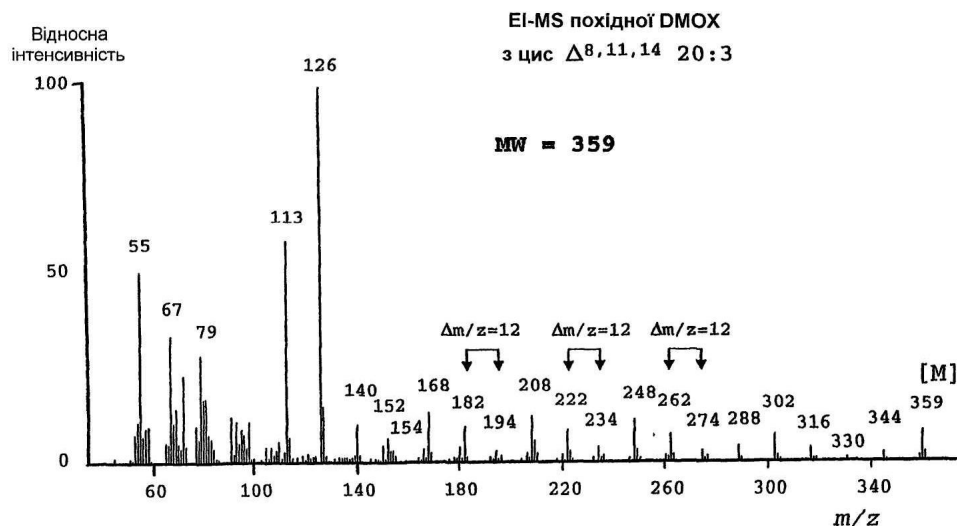
Фіг. 3б Мас-спектрограма похідної DMOX з цис  $\Delta^{6,9,12}$  18:3



Фіг. 4а Похідна DMOX з цис  $\Delta^{8,11,14}$  20:3



Фіг. 46

Мас-спектрограма похідної DMOX з цис  $\Delta^{8,11,14}$  20:3

Фіг. 5

Pp\_PSE1: KHKEMAILVYLFYMSKYVEFMDTVIMILKRSTRQISFLHVYHHSSISLIWWAIAHHAPGG

KH ++ LF +SK E+ DTV++I+K + ++ FLHV HH++ W H

Tc\_PSE1: KHPHFQLISLLFALSКИEWFDTVLLIVKGN--KLRFLHVLHHATT--FWLYAIDHIFLS

Pp\_PSE1: EAYWSAALNSGVHVLMYAYYFLAACLRSSPKLKNKYLFWGRYLTQFQMFQFMLNL-----

+ A+N+ +H +MYA+YF R PK + TQ Q+ QF+ ++

Tc\_PSE1: SIKYGVAVNAFIHTVMYAHYF-----RPFPKGLRPLI-----TQLQIVQFIFSIGIHTA

Pp\_PSE1: VQAYYDMKTNPYPQWLKILFYFMISLLFLFGNFYVQKYI

+ +YD + W + +++ L LF NFY+Q+Y+

Tc\_PSE1: IYWHYDCEPLVHTHFWEYVTPYLFVVPFLILFLNFYLOQYV

Фіг. 6

Pp\_PSE1: LNSGVHVLMYAYYFLAA

+N+VH +MYAYY A

Tc\_PSE2: INASVHAIMYAYYAFTA

Фіг. 7

Pp\_PSE1: AILVYLFYMSKYVEFMDTVIMILKRSTRQISFLHVYHHSSISLIWW-AIA-HHAPGGEAY

A+ + LF SK E MDTV +ILK +++ FL YHH+++ L W A+A + PG

Cc\_PSE1: ALALCLFCFSKIPELMDTVFLILKG--KKVRFLQWYHHATVMLFCWLALATEYTPG---L

Pp\_PSE1: WSAALNSGVHVLMYAYYFL 203

W AA N VH +MY Y+FL

Cc\_PSE1: WFAATNYFVHSIMYMYFPL 339



Фіг. 8 Порівняння послідовності поліпептидів PpPSE1 з Tc\_PSE2

```

Pp_PSE1: 1 MEVVERFYGELDGKVSQGVNAL.LGSFGVELTDTPTTKGLPLVDSPTPIV 49
          | |.. | . |. || . |
Tc_PSE2: 1 .....VISGLDLLPVLWETMKFDTAEVVS VWLRTEMWVPF 36

          . . . . .
50 LGVSVYLTIVIGGLWIKAR...DL.KPRASEPFLQALVLVHNLFCFAL 95
   | :|| :: | :.. | || || |. | . : .:
37 LMCFIYLVVIFGIQYVMEDRKEFDLRKPLAA....WSAFLAIFSIGASTR 82

          . . . . .
96 SLYMCVGIAYQAITWRYS LWGNAYNP..KHKEMAILVYLFYMSKYVEFMD 143
   .. . . :| : | |. | : | || |. |
83 TVPVLLKMLYEKGT.HHVLCGDTRNDWVIDNPAGVWTMAFIFSKIPELID 131

          . . . . .
144 TVIMILKRSTRQISFLHVYHSSISLI.WWAIAHNAPGGEAYWSAALNSG 192
   |. .:|:: |.: || ||| .: | | | | | : ||:|.
132 TLFIVLRK..RKLITLHWYHHVTVLLFCWHAWATFALTGIVF..AAINAS 177

          . . . . .
193 VHVLMYAYYFLAACLRSSPKLNKYLFWGRYLTQFQMFQFMLNLVQAY.. 240
   || :|||| | | | | :| |. | .. :
178 VHAIMYAYYAFTA.LGYRP...TSYAI...YITLIQIMQMVVGTAFTFYI 220

          . . . . .
241 .YDMKTNAFYYP.....QW..LIK.....ILFYMI..S 263
   ||| | | | | | :| .. |
221 GYDMAFVTPQPFRLDMKLNWDPLSKGENTEPTCKGANSSNAIFGVIMYAS 270

          . . . . .
264 LLFLFGNFYVQKYIKPSDGKQKGAKTE. 290
   |:| | : |:| | |
271 YLYLFCLEFFYMAYL RPKKSTPAAKKTN. 297

```

| ідентична амінокислота  
./: хімічно еквівалентна

Фіг. 9 Порівняння поліпептидної послідовності CC\_PSE1 з Tc\_PSE2

```

      .       .       .       .       .
6  MTEKRGLOFTICGSTGELVQNLQDGPALALCLFCFSKIPELMDTVFLIL 55
   |  .:|   :|| |   . | | .   | |||||.|||.::|
90 MLYEKGTHHVLCGDTRN..DWVIDNPAGVWTMAFIFSKIPELIDTLFIVL 137
      .       .       .       .       .
56 KGKKVRFLQWYHHATVMLFCWLALATEYTPGLWFAATNYFVHSIMYMYFF 105
   : :|. | ||| ||:|||| | |   |: ||| | ||.||| |:
138 RKRKLITLHWYHHVTVLLFCWHAWATFALTGIVFAAINASVHAIMYAYY. 186
      .       .       .       .       .
106 LMTFKTAAKVVKPIAPLITIIQIAQMVGGLIVN.....GIAITT...F.. 145
    |           | ||:|||| || | |   .| | |
187 ..AFTALGYRPTSYAIYITLIQIMQMVVGTAFTFYIGYDMAFVTPQPFRL 234
      .       .       .       .       .
146 .....FTTGACQ.IQSVTVYSAIVMYASYFYLFSQLFLEAY 180
    | |. |   :||||| || | |
235 DMKLNWDPLSKGENTEPTCKGANSSNAIFGVIMYASYLYLFCLFFYMAY 283

```

| ідентична амінокислота

./: хімічно еквівалентна

Фіг. 10

	Motiv 1	Motiv 2	Motiv 3	Motiv 4
Pp_PSE1		FLHVVYHH	LMYAYYF	FGNIFYVQ
Tc_PSE1		FLHVLHH	LMYAHYF	FLNIFYLQ
Tc_PSE2	FSKIPEL	TLHWYHH	IMYAYFF	
Cc_PSE1	FSKIPEL	FLQWYHH	IMYMYFF	

---

Consensus:	FSKIPEL	FLEWYHH	LMYAYYF	FGNIFYVQ
Variation:		T QVL	I MHP	L L

# ПРОТОКОЛ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> БАСФ Акціонерне товариство

<120> Нові гени елонгази і спосіб одержання полінезаміщених кислот жирного ряду

<130> 0050/51159

<140> 20000081

<141> 2000-02-09

<160> 12

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1192

<212> ДНК

<213> Physcomitrella patens

<220>

<221> CDS

<222> (58)..(930)

<400> 1

```

ctgcttcgtc tcattcttggg ggtgtgattc gggagtgggt tgagttggtg gagcgca      57
.
atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg      105
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
  1          5          10          15

cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt ggg gtg gag ttg acg gat      153
Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
      20          25          30

acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt gac agt ccc aca ccc atc      201
Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
      35          40          45

gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att gtc att gga ggg ctt ttg      249
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
      50          55          60

tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc gcc tcg gag cca ttt ttg      297
Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
      65          70          75          80

ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg ttc tgt ttt gcg ctc agt      345
Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
      85          90          95

ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag gct att acc tgg cgg tac      393
Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
      100          105          110

tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa cat aaa gag atg gcg att      441
Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
      115          120          125

```

```

ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac gtg gaa ttc atg gat acc 489
Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
130 135 140

gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg caa ata agc ttc ctc cac 537
Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
145 150 155 160

gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att tgg tgg gct att gct cat 585
Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
165 170 175

cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct gcg gct ctg aac tca gga 633
His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
180 185 190

gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc ttg gct gcc tgc ctt cga 681
Val His Val Leu Met Tyr Asn Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
195 200 205

agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt ttt tgg ggc agg tac ttg 729
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
210 215 220

aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg aac tta gtg cag gct tac 777
Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
225 230 235 240

tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca caa tgg ctg atc aag att 825
Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
245 250 255

ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt ctt ttc ggc aat ttt tac 873
Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
260 265 270

gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct aaa 921
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
275 280 285

act gag tga gctgtatcaa gccatagaaa ctctattatg ttagaacctg 970
Thr Glu
290

aagttggtgc tttcttatct ccacttatct ttttaagcagc atcagttttg aaatgatgtg 1030

tgggcgtggt ctgcaagtag tcatcaatat aatcggcctg agcacttcag atggattgtt 1090

agaacatgag taaaagcggg tattacggtg tttattttgt accaaatcac cgcacgggtg 1150

aattgaaata tttcagattt gatcaatttc atctgaaaaa aa 1192

```

<210> 2

<211> 290

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens

<400> 2

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser  
1 5 10 15  
Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp  
20 25 30  
Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile  
35 40 45  
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu  
50 55 60  
Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu  
65 70 75 80  
Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser  
85 90 95  
Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr  
100 105 110  
Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile  
115 120 125  
Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr  
130 135 140  
Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His  
145 150 155 160  
Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His  
165 170 175  
His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly  
180 185 190  
Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg  
195 200 205  
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu  
210 215 220  
Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr  
225 230 235 240  
Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile  
245 250 255  
Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr  
260 265 270  
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys  
275 280 285  
Thr Glu  
290

<210> 3  
 <211> 687  
 <212> ДНК  
 <213> Thraustochytrium

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(588)

```

<400> 3
cgc agc gtg cat aac ctc ggg ctc tgc ctc ttc tcg ggc gcc gtg tgg 48
Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp
1 5 10 15

atc tac acg agc tac ctc atg atc cag gat ggg cac ttt cgc agc ctc 96
Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu
20 25 30

gag gcg gca acg tgc gag ccg ctc aag cat ccg cac ttc cag ctc atc 144
Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile
35 40 45

agc ttg ctc ttt gcg ctg tcc aag atc tgg gag tgg ttc gac acg gtg 192
Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val
50 55 60

ctc ctc atc gtc aag ggc aac aag ctc cgc ttc ctg cac gtc ttg cac 240
Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His
65 70 75 80

cac gcc acg acc ttt tgg ctc tac gcc atc gac cac atc ttt ctc tcg 288
His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser
85 90 95

tcc atc aag tac ggc gtc gcg gtc aat gct ttc atc cac acc gtc atg 336
Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met
100 105 110

tac gcg cac tac ttc cgc cca ttc ccg aag ggc ttg cgc ccg ctt att 384
Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile
115 120 125

acg cag ttg cag atc gtc cag ttc atc ttc agc atc ggc atc cat acc 432
Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr
130 135 140

gcc atc tac tgg cac tac gac tgc gag ccg ctc gtg cat acc cac ttt 480
Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe
145 150 155 160

tgg gaa tac gtc acg ccc tac ctc ttc gtc gtg ccc ttc ctc atc ctc 528
Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu
165 170 175

ttt ctc aat ttc tac ctg cag cag tac gtc ctc gcg ccc gca aaa acc 576
Phe Leu Asn Phe Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr
180 185 190

aag aag gca tag ccacgtaaca gtagaccagc agcgccgagg acgcgtgccg 628

```

Lys Lys Ala  
195

cgttatcgcg aagcacgaaa taaagaagat catttgattc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 687

<210> 4  
<211> 195  
<212> PRT  
<213> Thraustochytrium

<400> 4  
Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp  
1 5 10 15  
Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu  
20 25 30  
Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile  
35 40 45  
Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val  
50 55 60  
Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His  
65 70 75 80  
His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser  
85 90 95  
Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met  
100 105 110  
Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile  
115 120 125  
Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr  
130 135 140  
Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe  
145 150 155 160  
Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu  
165 170 175  
Phe Leu Asn Phe Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr  
180 185 190  
Lys Lys Ala  
195

<210> 5  
<211> 955  
<212> ДНК  
<213> Thraustochytrium

<220>  
<221> CDS

<222> (1)..(894)

<400> 5

gtc att tcg ggc ctc gac ctt ctc ccc gtg ctc tcg tgg gag act atg	48
Val Ile Ser Gly Leu Asp Leu Leu Pro Val Leu Ser Trp Glu Thr Met	
1 5 10 15	
aag ttc gac act gcc gaa gtt gtc tcg gtc tgg ctg cgc acg cac atg	96
Lys Phe Asp Thr Ala Glu Val Val Ser Val Trp Leu Arg Thr His Met	
20 25 30	
tgg gtc ccc ttc ctg atg tgc ttc atc tac ctg gtc gtc atc ttc ggc	144
Trp Val Pro Phe Leu Met Cys Phe Ile Tyr Leu Val Val Ile Phe Gly	
35 40 45	
atc cag tac tac atg gag gac cgc aag gag ttc gat ctg cgc aag ccg	192
Ile Gln Tyr Tyr Met Glu Asp Arg Lys Glu Phe Asp Leu Arg Lys Pro	
50 55 60	
ctg gcc gcc tgg agc gcc ttc ttg gcc att ttc agc atc ggc gcc tcc	240
Leu Ala Ala Trp Ser Ala Phe Leu Ala Ile Phe Ser Ile Gly Ala Ser	
65 70 75 80	
atc cgc acc gtg ccc gtc ctg ctc aag atg ctc tac gaa aag ggc acg	288
Ile Arg Thr Val Pro Val Leu Leu Lys Met Leu Tyr Glu Lys Gly Thr	
85 90 95	
cac cac gtg ctc tgc ggc gac acg cgc aac gac tgg gtc att gac aac	336
His His Val Leu Cys Gly Asp Thr Arg Asn Asp Trp Val Ile Asp Asn	
100 105 110	
ccg gcc ggc gtc tgg acc atg gcc ttt atc ttt tcc aag att ccc gag	384
Pro Ala Gly Val Trp Thr Met Ala Phe Ile Phe Ser Lys Ile Pro Glu	
115 120 125	
ctc atc gac acc ctc ttt atc gtg ctc cgc aag cgc aag ctc atc acc	432
Leu Ile Asp Thr Leu Phe Ile Val Leu Arg Lys Arg Lys Leu Ile Thr	
130 135 140	
ctc cac tgg tac cac cac gtg acc gtg ctc ctg ttc tgc tgg cac gcc	480
Leu His Trp Tyr His His Val Thr Val Leu Leu Phe Cys Trp His Ala	
145 150 155 160	
tgg gcc acc ttt gcg ctc acc ggc atc gtc ttt gcc gcc atc aac gcc	528
Trp Ala Thr Phe Ala Leu Thr Gly Ile Val Phe Ala Ala Ile Asn Ala	
165 170 175	
tcg gtg cac gcc atc atg tac gcc tat tac gcc ttc acg gcc ctc ggc	576
Ser Val His Ala Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Phe Thr Ala Leu Gly	
180 185 190	
tac cga cca acc tcg tac gcc atc tac att acg ctc att cag atc atg	624
Tyr Arg Pro Thr Ser Tyr Ala Ile Tyr Ile Thr Leu Ile Gln Ile Met	
195 200 205	
cag atg gtc gtc gcc acc gcc gtc acc ttt tac att ggc tac gac atg	672
Gln Met Val Val Gly Thr Ala Val Thr Phe Tyr Ile Gly Tyr Asp Met	
210 215 220	



```

gcc ttt gtc acg ccg cag ccc ttc cgc ctt gac atg aaa ctc aac tgg 720
Ala Phe Val Thr Pro Gln Pro Phe Arg Leu Asp Met Lys Leu Asn Trp
225                230                235                240

gac ccg ctc agc aag ggc gag aac acc gag ccc acc tgc aag ggc gcc 768
Asp Pro Leu Ser Lys Gly Glu Asn Thr Glu Pro Thr Cys Lys Gly Ala
                245                250                255

aac tcc tcc aac gcc atc ttc ggc gtc atc atg tac gcc tcg tac ctc 816
Asn Ser Ser Asn Ala Ile Phe Gly Val Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Leu
                260                265                270

tac ctc ttc tgc ctc ttc ttc tac atg gcc tac ctg cgc ccg aag aag 864
Tyr Leu Phe Cys Leu Phe Phe Tyr Met Ala Tyr Leu Arg Pro Lys Lys
                275                280                285

tcg acg ccc gcg gcc aag aag aca aac taa tcgcacacta ccaaacaatc 914
Ser Thr Pro Ala Ala Lys Lys Thr Asn
                290                295

ttccactcga cctagaaaaa aaaaaaaaaa aaaaactcga g 955

```

```

<210> 6
<211> 297
<212> PRT
<213> Thaustochytrium

```

```

<400> 6
Val Ile Ser Gly Leu Asp Leu Leu Pro Val Leu Ser Trp Glu Thr Met
 1                5                10                15

Lys Phe Asp Thr Ala Glu Val Val Ser Val Trp Leu Arg Thr His Met
                20                25                30

Trp Val Pro Phe Leu Met Cys Phe Ile Tyr Leu Val Val Ile Phe Gly
 35                40                45

Ile Gln Tyr Tyr Met Glu Asp Arg Lys Glu Phe Asp Leu Arg Lys Pro
 50                55                60

Leu Ala Ala Trp Ser Ala Phe Leu Ala Ile Phe Ser Ile Gly Ala Ser
 65                70                75                80

Ile Arg Thr Val Pro Val Leu Leu Lys Met Leu Tyr Glu Lys Gly Thr
                85                90                95

His His Val Leu Cys Gly Asp Thr Arg Asn Asp Trp Val Ile Asp Asn
 100                105                110

Pro Ala Gly Val Trp Thr Met Ala Phe Ile Phe Ser Lys Ile Pro Glu
 115                120                125

Leu Ile Asp Thr Leu Phe Ile Val Leu Arg Lys Arg Lys Leu Ile Thr
 130                135                140

Leu His Trp Tyr His His Val Thr Val Leu Leu Phe Cys Trp His Ala
 145                150                155                160

```

Trp Ala Thr Phe Ala Leu Thr Gly Ile Val Phe Ala Ala Ile Asn Ala  
 165 170 175  
 Ser Val His Ala Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Phe Thr Ala Leu Gly  
 180 185 190  
 Tyr Arg Pro Thr Ser Tyr Ala Ile Tyr Ile Thr Leu Ile Gln Ile Met  
 195 200 205  
 Gln Met Val Val Gly Thr Ala Val Thr Phe Tyr Ile Gly Tyr Asp Met  
 210 215 220  
 Ala Phe Val Thr Pro Gln Pro Phe Arg Leu Asp Met Lys Leu Asn Trp  
 225 230 235 240  
 Asp Pro Leu Ser Lys Gly Glu Asn Thr Glu Pro Thr Cys Lys Gly Ala  
 245 250 255  
 Asn Ser Ser Asn Ala Ile Phe Gly Val Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Leu  
 260 265 270  
 Tyr Leu Phe Cys Leu Phe Phe Tyr Met Ala Tyr Leu Arg Pro Lys Lys  
 275 280 285  
 Ser Thr Pro Ala Ala Lys Lys Thr Asn  
 290 295

<210> 7  
 <211> 708  
 <212> ДНК  
 <213> Crypthecodinium

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(645)

<400> 7  
 cgg cac gag gta cac atg acc gag aag agg gga ctg cag ttc acg atc 48  
 Arg His Glu Val His Met Thr Glu Lys Arg Gly Leu Gln Phe Thr Ile  
 1 5 10 15  
 tgc ggc tct act ggt gag ttg gtg cag aat ctc cag gat ggt ccc act 96  
 Cys Gly Ser Thr Gly Glu Leu Val Gln Asn Leu Gln Asp Gly Pro Thr  
 20 25 30  
 gcc ttg gcg ttg tgc ctc ttt tgc ttc agc aaa att ccc gag ttg atg 144  
 Ala Leu Ala Leu Cys Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Met  
 35 40 45  
 gac acg gtc ttt ctc atc ttg aag ggc aag aag gtt cgc ttt ttg cag 192  
 Asp Thr Val Phe Leu Ile Leu Lys Gly Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln  
 50 55 60  
 tgg tac cac cac gct acc gtg atg ctc ttc tgc tgg ttg gca ctg gct 240  
 Trp Tyr His His Ala Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Leu Ala Leu Ala  
 65 70 75 80  
 acg gag tac acc ccg ggc ctc tgg ttc gcg gcc act aac tac ttc gtg 288

Thr	Glu	Tyr	Thr	Pro	Gly	Leu	Trp	Phe	Ala	Ala	Thr	Asn	Tyr	Phe	Val		
				85					90						95		
cac	tcc	atc	atg	tac	atg	tac	ttc	ttc	ttg	atg	acc	ttc	aag	acg	gcc	336	
His	Ser	Ile	Met	Tyr	Met	Tyr	Phe	Phe	Leu	Met	Thr	Phe	Lys	Thr	Ala		
			100				105						110				
gca	aag	gtc	gtg	aag	ccc	att	gcc	cct	ctc	atc	acc	atc	atc	cag	atc	384	
Ala	Lys	Val	Val	Lys	Pro	Ile	Ala	Pro	Leu	Ile	Thr	Ile	Ile	Gln	Ile		
		115					120					125					
gcc	cag	atg	gtc	tgg	ggt	ctc	atc	gtc	aac	ggc	atc	gcg	atc	acc	act	432	
Ala	Gln	Met	Val	Trp	Gly	Leu	Ile	Val	Asn	Gly	Ile	Ala	Ile	Thr	Thr		
	130					135					140						
ttc	ttc	acc	acg	ggc	gcc	tgc	cag	atc	cag	tcc	gtg	acg	gtc	tac	tcg	480	
Phe	Phe	Thr	Thr	Gly	Ala	Cys	Gln	Ile	Gln	Ser	Val	Thr	Val	Tyr	Ser		
145					150					155					160		
gcc	att	gtg	atg	tac	gct	tcg	tac	ttc	tac	ctc	ttc	tcc	cag	ctc	ttc	528	
Ala	Ile	Val	Met	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Phe	Ser	Gln	Leu	Phe		
			165					170						175			
ctg	gag	gca	tac	gga	tcc	gct	ggc	aag	aac	aag	aag	aag	ctc	gcc	cgc	576	
Leu	Glu	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ala	Gly	Lys	Asn	Lys	Lys	Lys	Leu	Ala	Arg		
		180						185					190				
gag	ctc	tcc	cga	aag	atc	tcc	gag	gct	ctc	ctg	aat	agt	ggc	gac	gag	624	
Glu	Leu	Ser	Arg	Lys	Ile	Ser	Glu	Ala	Leu	Leu	Asn	Ser	Gly	Asp	Glu		
	195						200					205					
gta	gcc	aag	cac	ctc	aag	tga	actgagcgcac	ctcatccttgg	tctggtccgc							675	
Val	Ala	Lys	His	Leu	Lys												
	210				215												
caaattgccg	cgtgcatgtg	catgagatgc	tgt													708	

<210> 8  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Crypthecodinium

<400> 8																	
Arg	His	Glu	Val	His	Met	Thr	Glu	Lys	Arg	Gly	Leu	Gln	Phe	Thr	Ile		
1				5					10					15			
Cys	Gly	Ser	Thr	Gly	Glu	Leu	Val	Gln	Asn	Leu	Gln	Asp	Gly	Pro	Thr		
			20					25					30				
Ala	Leu	Ala	Leu	Cys	Leu	Phe	Cys	Phe	Ser	Lys	Ile	Pro	Glu	Leu	Met		
		35				40						45					
Asp	Thr	Val	Phe	Leu	Ile	Leu	Lys	Gly	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Gln		
	50				55						60						
Trp	Tyr	His	His	Ala	Thr	Val	Met	Leu	Phe	Cys	Trp	Leu	Ala	Leu	Ala		
65					70					75				80			

[illegible]

Tyr	Leu	Gly	Gly	Leu	Met	Ala	Leu	Arg	Ser	Val	His	Asn	Leu	Gly	Leu	
70						75				80						
tgc	ctc	ttc	tcg	ggc	gcc	gtg	tgg	atc	tac	acg	agc	tac	ctc	atg	atc	
Cys	Leu	Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Trp	Ile	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Met	Ile	
85						90				95					100	
cag	gat	ggg	cac	ttt	cgc	agc	ctc	gag	gcg	gca	acg	tgc	gag	ccg	ctc	
Gln	Asp	Gly	His	Phe	Arg	Ser	Leu	Glu	Ala	Ala	Thr	Cys	Glu	Pro	Leu	
						105				110					115	
aag	cat	ccg	cac	ttc	cag	ctc	atc	agc	ttg	ctc	ttt	gcg	ctg	tcc	aag	
Lys	His	Pro	His	Phe	Gln	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Ala	Leu	Ser	Lys	
						120				125					130	
atc	tgg	gag	tgg	ttc	gac	acg	gtg	ctc	ctc	atc	gtc	aag	ggc	aac	aag	
Ile	Trp	Glu	Trp	Phe	Asp	Thr	Val	Leu	Leu	Ile	Val	Lys	Gly	Asn	Lys	
						135				140					145	
ctc	cgc	ttc	ctg	cac	gtc	ttg	cac	cac	gcc	acg	acc	ttt	tgg	ctc	tac	
Leu	Arg	Phe	Leu	His	Val	Leu	His	His	Ala	Thr	Thr	Phe	Trp	Leu	Tyr	
150						155				160						
gcc	atc	gac	cac	atc	ttt	ctc	tcg	tcc	atc	aag	tac	ggc	gtc	gcg	gtc	
Ala	Ile	Asp	His	Ile	Phe	Leu	Ser	Ser	Ile	Lys	Tyr	Gly	Val	Ala	Val	
165						170				175					180	
aat	gct	ttc	atc	cac	acc	gtc	atg	tac	gcg	cac	tac	ttc	cgc	cca	ttc	
Asn	Ala	Phe	Ile	His	Thr	Val	Met	Tyr	Ala	His	Tyr	Phe	Arg	Pro	Phe	
						185				190					195	
ccg	aag	ggc	ttg	cgc	ccg	ctt	att	acg	cag	ttg	cag	atc	gtc	cag	ttc	
Pro	Lys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Ile	Thr	Gln	Leu	Gln	Ile	Val	Gln	Phe	
						200				205					210	
att	ttc	agc	atc	ggc	atc	cat	acc	gcc	att	tac	tgg	cac	tac	gac	tgc	
Ile	Phe	Ser	Ile	Gly	Ile	His	Thr	Ala	Ile	Tyr	Trp	His	Tyr	Asp	Cys	
						215				220					225	
gag	ccg	ctc	gtg	cat	acc	cac	ttt	tgg	gaa	tac	gtc	acg	ccc	tac	ctt	
Glu	Pro	Leu	Val	His	Thr	His	Phe	Trp	Glu	Tyr	Val	Thr	Pro	Tyr	Leu	
230						235				240						
ttc	gtc	gtg	ccc	ttc	ctc	atc	ctc	ttt	ttc	aat	ttt	tac	ctg	cag	cag	
Phe	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ile	Leu	Phe	Phe	Asn	Phe	Tyr	Leu	Gln	Gln	
245						250				255					260	
tac	gtc	ctc	gcg	ccc	gca	aaa	acc	aag	aag	gca	tag	ccacgtaaca				
Tyr	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Lys	Thr	Lys	Lys	Ala						
						265				270						
gtagaccagc agcgccgagg acgcgtgccg cggttatcgcg aagcacgaaa taaagaagat															928	
catttgattc aacgaggcta cttgcggcca cgagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa															988	
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa															1048	
ctcgag															1054	

<210> 10  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> Thraustochytrium

<400> 10

```

Met Met Glu Pro Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala
  1              5              10              15

Arg Tyr Ala Ser Ser Ala Ala Phe Lys Trp Gln Val Thr Tyr Asp Ala
      20              25              30

Lys Asp Ser Phe Val Gly Pro Leu Gly Ile Arg Glu Pro Leu Gly Leu
      35              40              45

Leu Val Gly Ser Val Val Leu Tyr Leu Ser Leu Leu Ala Val Val Tyr
      50              55              60

Ala Leu Arg Asn Tyr Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Arg Ser Val His
      65              70              75              80

Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp Ile Tyr Thr Ser
      85              90              95

Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu Glu Ala Ala Thr
      100             105             110

Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile Ser Leu Leu Phe
      115             120             125

Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val Leu Leu Ile Val
      130             135             140

Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His His Ala Thr Thr
      145             150             155             160

Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser Ser Ile Lys Tyr
      165             170             175

Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met Tyr Ala His Tyr
      180             185             190

Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile Thr Gln Leu Gln
      195             200             205

Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr Ala Ile Tyr Trp
      210             215             220

His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe Trp Glu Tyr Val
      225             230             235             240

Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu Phe Phe Asn Phe
      245             250             255

Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr Lys Lys Ala
      260             265             270

```



Phe Trp Leu Phe Met Asn Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro  
65 70 75 80  
Lys Lys Pro Ala Val Glu Glu Ser Lys Lys Lys Leu  
85 90