



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122768** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)

A01H 5/00
C11B 1/10 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
G01N 33/50 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 07729	(72) Винахідник(и):	Пітрі Джемс Робертсон (AU), Сінгх Сарайндер Пол (AU), Шрестха Пушкар (AU), МакАлістер Джейсон Тімоті (AU), Девайн Малколм Девід (CA), де Файтс Роберт Чарльз (AU)
(22) Дата подання заявки:	18.12.2014	(73) Володілець (володільці):	КОММОНВЕЛЗ САЙНТІФІК ЕНД ІНДАСТРІАЛ РИСЕРЧ ОРГАНІЗЕЙШН, CSIRO Black Mountain, Science and Innovation Park, Clunies Ross Street, Acton, Australian Capital Territory, 2612, Australia (AU), НУСІД ПТИ ЛТД, 103-105 Pipe Road, Laverton North, Victoria 3026, Australia (AU), ІРАІНС РЕСЕРЧ АНД ДЕВЕЛОПМЕНТ КОРПОРАТІОН, Level 4, 4 National Circuit, Barton, Australian Capital Territory 2600, Australia (AU)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	07.01.2021	(74) Представник:	Портна Людмила Семенівна, реєстр. №150
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	2013905033, 2014902471	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2010147900 A1, 23.12.2010 US 7550286 B2, 23.06.2009 US 20130309772 A1, 21.11.2013 WO 2005103253 A1, 03.11.2005 WO 2013185184 A2, 19.12.2013 Petrie, J.R. et al., "Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA", Plos One, (20121107), vol. 7, P. E49161- E49165 Ruiz-Lopez, N. et al., "Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants", Journal of experimental Botany, (2012), vol. 63, P. 2397 - 2410 WO 02092540 A1, 21.11.2002 WO 2013153404 A1, 17.10.2013 US 2010227924 A1, 09.09.2010
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	18.12.2013, 27.06.2014		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	AU, AU		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.10.2016, Бюл.№ 20		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	06.01.2021, Бюл.№ 1		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/AU2014/050433, 18.12.2014		

UA 122768 C2

(54) ЕКСТРАГОВАНИЙ РОСЛИННИЙ ЛІПІД, ЩО МІСТИТЬ ДОВГОЛАНЦЮГОВІ ПОЛІНЕНАСИЧЕНІ ЖИРНІ КИСЛОТИ

(57) Реферат:

Винахід належить до екстрагованого рослинного ліпиду, що містить докозагексаєнову кислоту (ДГК), причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20,1 до 30 % або від 20,1 до 35 %. Крім того, даний винахід належить до рослинного та/або мікробного ліпиду, що містить докозапентаєнову кислоту (ДГК), причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 7 до 35 %, і способів одержання екстрагованого ліпиду.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Цей винахід відноситься до ліпиду, що містить докозагексаєнову кислоту та/або докозапентаєнову кислоту, одержані із рослинних клітин або мікробних клітин, і способів одержання та застосування ліпиду.

5 РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Довголанцюгові омега-3 поліненасичені жирні кислоти (ДЛ-ПНЖК) на сьогоднішній день широко визнані як важливі сполуки для здоров'я людини і тварин. Вказані жирні кислоти можуть бути одержані з харчових джерелом або шляхом перетворення лінолевої (ЛК, 18:2 ω 6) або α -ліноленової (АЛК, 18:3 ω 3) жирних кислот, обидві з яких розглядаються як незамінні жирні 10 кислоти в раціоні людини. Хоча людина і багато інших хребетних тварин можуть перетворювати ЛК або АЛК, одержані з рослинних джерел, на С22, вони здійснюють таке перетворення з дуже низькою швидкістю. Крім того, більшості сучасних суспільств властиве незбалансоване харчування, в якому щонайменше 90 % поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) складають ω 6 15 жирні кислоти, замість співвідношення 4:1 або менше для ω 6: ω 3 жирних кислот, яке вважається ідеальним (Trautwein, 2001). Безпосереднім харчовим джерелом ДЛ-ПНЖК, наприклад, ейкозапентаєнної кислоти (ЕПК, 20:5 ω 3) і докозагексаєнної кислоти (ДГК, 22:6 ω 3) для людини, в основному, є риба або риб'ячий жир. Таким чином, медичні працівники рекомендують регулярно включати рибу до раціону людини, що містить значні рівні ДЛ-ПНЖК. Все частіше ДЛ-ПНЖК, одержані з риб'ячого жиру, вводять, наприклад, в харчові продукти і дитяче харчування. 20 Однак за рахунок зменшення глобального і національного вилову риби, необхідні альтернативні джерела вказаних жирів, що проявляють позитивний вплив на здоров'я.

Квіткові рослини, на противагу тваринам, не здатні синтезувати поліненасичені жирні кислоти з довжиною ланцюга більше 18 атомів вуглецю. Зокрема, культивовані і садові рослини разом з іншими покритонасінними не мають ферментів, необхідних для синтезу ω 3 жирних 25 кислот з довшим ланцюгом, наприклад, ЕПК, докозапентаєнної кислоти (ДПК, 22:5 ω 3) і ДГК, одержаних з АЛК. Важливою метою в біотехнології рослин, таким чином, є створення культивованих рослин, що продукують значні кількості ДЛ-ПНЖК, таким чином забезпечуючи альтернативне джерело цих сполук.

Шляхи біосинтезу ДЛ-ПНЖК

Біосинтез ДЛ-ПНЖК в організмах, таких як мікроводорості, мохи і гриби, звичайно відбувається як серія реакцій кисень-залежної десатурації і елонгації (Фіг. 1). Найпоширеніший 30 шлях одержання ЕПК у вказаних організмах включає Δ 6-десатурацію, Δ 6-елонгацію і Δ 5-десатурацію (має назву шляху Δ 6-десатурації), тоді як в менш поширеному шляху використовується Δ 9-елонгація, Δ 8-десатурація і Δ 5-десатурація (має назву шляху Δ 9-десатурації). Вказані послідовні реакції десатурації і елонгації можуть починатися із субстрату ω 6 жирної кислоти ЛК, схематично проілюстрованого у верхній лівій частині Фіг. 1 (ω 6) або субстрату ω 3 АЛК до ЕПК, проілюстрованого на нижній правій частині Фіг. 1 (ω 3). Якщо 35 початкова Δ 6-десатурація здійснюється на субстраті ω 6 ЛК, продукт серії із трьох ферментів ДЛ-ПНЖК буде ω 6 жирною арахідоновою кислотою (АРК). Організми, які синтезують ДЛ-ПНЖК, можуть перетворювати ω 6 жирні кислоти на ω 3 жирні кислоти з використанням ω 3-десатурази, що проілюстровано як стадія Δ 17-десатурази на Фіг. 1, для перетворення арахідонової кислоти (АРК, 20:4 ω 6) на ЕПК. Деякі члени родини ω 3-десатурази можуть впливати на різні субстрати, що варіюють від ЛК до АРК. Рослинні ω 3-десатурази часто специфічно каталізують Δ 15-десатурацію ЛК до АЛК, тоді як грибові і дріжджові ω 3-десатурази можуть бути специфічними 45 по відношенню до Δ 17-десатурації АРК до ЕПК (Pereira et al., 2004a; Zank et al., 2005). Деякі звіти наводять на думку про те, що можуть існувати неспецифічні ω 3-десатурази, які можуть перетворювати широкий спектр ω 6 субстратів на відповідні ω 3 продукти (Zhang et al., 2008).

Перетворення ЕПК на ДГК в таких організмах відбувається шляхом Δ 5-елонгації ЕПК з утворенням ДПК, після чого слідує Δ 4-десатурація з утворенням ДГК (Фіг. 1). І навпаки, ссавці використовують так званий шлях "Шпрехера", в якому ДПК перетворюється на ДГК в ході трьох 50 окремих реакцій, незалежних від Δ 4-десатурази (Sprecher et al., 1995).

Фронт-енд десатурази, загалом знайдені в рослинах, мохах, мікроводоростях і нижчих тваринах, наприклад, *Caenorhabditis elegans*, в основному приймають субстрати жирних кислот, естерифікованих в положенні sn-2 фосфатидилхолінового (ФХ) субстрату. Вказані десатурази, 55 таким чином, відомі як ацил-ФХ, зв'язані з ліпідом, фронт-енд десатурази (Domergue et al., 2003). І навпаки, фронт-енд десатурази вищих тварин загалом приймають субстрати ацил-КоА, де жирнокислотний субстрат зв'язаний з КоА замість ФХ (Domergue et al., 2005). Відомо, що деякі десатурази мікроводоростей і одна рослинна десатураза використовують жирнокислотні субстрати, естерифіковані до КоА (Табл. 2).

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

Десатурація ПНЖК в рослинах, мохах і мікроводоростях природним чином відбувається на жирнокислотних субстратах, в основному, в пулі ацил-ФХ, тоді як елонгація відбувається на субстратах в пулі ацил-КоА. Перенесення жирних кислот від молекул ацил-ФХ до носія КоА здійснюється фосфоліпазами (ФЛА), тоді як перенесення жирних кислот ацил-КоА до носія ФХ здійснюється лізофосфатидил-холін ацилтрансферазами (ЛФХАТ) (Fig. 9) (Singh et al., 2005).

Сконструйоване продукування ДЛ-ПНЖК

Велика частина метаболічного конструювання ДЛ-ПНЖК здійснювалася з використанням аеробного шляху $\Delta 6$ -десатурація/елонгація. Про біосинтез γ -ліноленової кислоти (ГЛК, 18:3 ω 6) в тютюні з використанням $\Delta 6$ -десатурази із ціанобактерії *Synechocystis* вперше повідомлялося в 1996 році (Reddy and Thomas, 1996). Пізніше, ГЛК була одержана в культивованих рослинах, таких як сафлор (73 % ГЛК в олії з насіння; WO 2006/127789). Продукування ДЛ-ПНЖК, наприклад, ЕПК і ДГК, включає складніше конструювання за рахунок збільшення кількості залучених стадій десатурації та елонгації. Про продукування ЕПК в наземній рослині вперше повідомлялося Qi et al. (2004), які ввели гени, що кодують $\Delta 9$ -елонгазу з *Ischyrasis galbana*, $\Delta 8$ -десатуразу з *Euglena gracilis* і $\Delta 5$ -десатуразу з *Mortierella alpina* в *Arabidopsis* з одержанням до 3 % ЕПК. Ця робота була продовжена Abbadi et al. (2004), які повідомляли про продукування до 0,8 % ЕПК в насінні льону з використанням генів, що кодують $\Delta 6$ -десатуразу і $\Delta 6$ -елонгазу з *Physcomitrella patens* і $\Delta 5$ -десатуразу з *Phaeodactylum tricornutum*.

Перший звіт про одержання ДДЛ-ДГК у WO 04/017467, в якій розкрито продукування 3 % ДГК у зародках сої, але не насінні, шляхом введення генів, що кодують $\Delta 6$ -десатуразу *Saprolegnia diclina*, $\Delta 6$ -десатуразу *Mortierella alpina*, $\Delta 5$ -десатуразу *Mortierella alpina*, $\Delta 4$ -десатуразу *Saprolegnia diclina*, $\Delta 17$ -десатуразу *Saprolegnia diclina*, $\Delta 6$ -елонгазу *Mortierella alpina* та $\Delta 5$ -елонгазу *Pavlova lutheri*. Максимальний рівень ЕПК в ембріонах, які також продукують ДГК, становив 19,6 %, вказуючи на низьку ефективність перетворення ЕПК на ДГК (WO 2004/071467). Це відкриття було подібним до опублікованого Robert et al. (2005), де вихід перетворення ЕПК на ДГК був низьким, з продукуванням 3 % ЕПК і 0,5 % ДГК в *Arabidopsis* з використанням $\Delta 5/6$ -десатурази *Danio rerio*, $\Delta 6$ -елонгази *Caenorhabditis elegans* та $\Delta 5$ -елонгази і $\Delta 4$ -десатурази *Pavlova salina*. Крім того, в 2005 році Wu et al. опублікували повідомлення щодо продукування 25 % АРК, 15 % ЕПК і 1,5 % ДГК у *Brassica juncea* з використанням $\Delta 6$ -десатурази *Pythium irregulare*, $\Delta 5$ -десатурази *Thraustochytrid*, $\Delta 6$ -елонгази *Physcomitrella patens*, $\Delta 12$ -десатурази *Calendula officinalis*, $\Delta 5$ -елонгази *Thraustochytrid*, $\Delta 17$ -десатурази *Phytophthora infestans*, елонгази ДЦ-ПНЖК *Oncorhynchus mykiss*, $\Delta 4$ -десатурази *Thraustochytrid* і ЛФХАТ *Thraustochytrid* (Wu et al., 2005). Короткий опис зусиль з одержання врожаю насіння олійних культур, яке синтезує $\omega 3$ ДЛ-ПНЖК, наведений у Venegas-Caleron et al. (2010) і Ruiz-Lopez et al. (2012). Як вказано Ruiz-Lopez et al. (2012), на дату публікації результати з одержання ДГК у трансгенних рослинах навіть віддалено не нагадують рівнів, що спостерігаються в риб'ячому жирі. Пізніше, Petrie et al (2012) повідомляли про продукування близько 15 % ДГК в насінні *Arabidopsis thaliana*, та у WO2013/185184 повідомлялося про продукування деяких олій з насіння, що містили від 7 % до 20 % ДГК. Однак, не існує повідомлень щодо продукування рослинних олій, які містили б більше 20 % ДГК.

Не існує повідомлень щодо продукування ДПК у рекомбінантних клітинах із значущими рівнями без супутнього продукування ДГК. Насправді, авторам даного винаходу невідомо про будь-яку опубліковану навідну думку або ідею продукування ДПК у рекомбінантних клітинах без продукування ДГК.

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

КОРОТКИЙ ОПИС СУТІ ВІНАХОДУ

Авторами даного винаходу ідентифіковані способи і рослини для одержання ліпиду з високими рівнями ДГК та/або ДПК. Як описано у WO2013/185184, авторами даного винаходу раніше був розкритий екстрагований рослинний ліпід, а також рослини і частини рослин для продукування такого ліпиду, що містять ДГК в кількості від 7 % до 20 % від загального вмісту жирних кислот у екстрагованому ліпіді. Була визначена верхня межа 20 %, оскільки на той час це вважалося максимальною кількістю ДГК, що може продукуватися в рослинах. Однак, як описано у даній заявці, винахідниками несподівано було знайдено, що можна одержати рівні ДГК більше 20 % від загального вмісту жирних кислот. Крім того, авторами знайдений рослинний ліпід, а також частини рослин і рослини для продукування ліпиду, що містить ДПК у кількості від 7 % до 35 % від загального вмісту жирних кислот в екстрагованому ліпіді, особливо за відсутності ДГК.

Відповідно, у першому аспекті даного винаходу пропонується екстрагований рослинний ліпід, який містить жирні кислоти у естерифікованій формі, причому жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і необов'язково одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) та ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), і, при цьому, рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, переважно від 30 % до 35 %.

В іншому аспекті даного винаходу розкривається екстрагований рослинний ліпід, що містить жирні кислоти в естерифікованій формі, причому жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), та необов'язково одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) та ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК) притому, що рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 2 % до 16 %, і, при цьому, рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, якщо вона присутня, становить менше 1 %, причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, переважно від 30 % до 35 %.

В іншому аспекті винаходу пропонується екстрагований ліпід, переважно екстрагований рослинний ліпід або екстрагований мікробний ліпід, що містить жирні кислоти в естерифікованій формі, причому жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК) і докозапентаєнову кислоту (ДПК), і необов'язково одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), і, при цьому, рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 7 % до 35 %. У варіантах реалізації даного аспекту, рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить близько 7 %, близько 8 %, близько 9 %, близько 10 %, близько 12 %, близько 15 %, близько 18 %, близько 20 %, близько 22 %, близько 24 %, близько 26 %, близько 28 %, близько 30 %, від близько 7 % до близько 28 %, від близько 7 % до близько 25 %, від близько 10 % до 35 %, від близько 10 % до близько 30 %, від близько 10 % до близько 25 %, від близько 10 % до близько 22 %, від близько 14 % до 35 %, від близько 16 % до 35 %, від близько 16 % до близько 30 %, від близько 16 % до близько 25 % або від близько 16 % до близько 22 %.

У варіанті реалізації згаданого вище аспекту ДГК присутня на рівні менше 0,5 % від загального вмісту жирних кислот екстрагованого ліпиду і, більш переважно, відсутня у загальному вмісті жирних кислот ліпиду.

В іншому аспекті винаходу пропонується екстрагований ліпід, переважно екстрагований рослинний ліпід або екстрагований мікробний ліпід, що містить жирні кислоти у естерифікованій формі, причому жирні кислоти включають докозапентаєнову кислоту (ДПК) та/або докозагексаєнову кислоту (ДГК), і, при цьому, щонайменше 35 % ДПК та/або ДГК, естерифікованих у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковані в положенні sn-2 ТАГ. У варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід додатково має одну або більше або всі ознаками з (i) він містить жирні кислоти, включаючи олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК), і необов'язково одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), (ii) щонайменше близько 40 %, щонайменше близько 45 %, щонайменше близько 48 %, від 35 % до близько 60 % або від 35 % до близько 50 % ДПК та/або ДГК, естерифікованих у формі триацилгліцеролу (ТАГ),

естерифіковані в положенні sn-2 ТАГ, і (iii) рівень ДПК та/або ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 1 % до 35 %, або від близько 7 % до 35 % або від близько 20,1 % до 35 %. У варіантах реалізації даного аспекту рівень ДПК та/або ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить близько 7 %, близько 8 %,
 5 близько 9 %, близько 10 %, близько 12 %, близько 15 %, близько 18 %, близько 20 %, близько 22 %, близько 24 %, близько 26 %, близько 28 %, близько 30 %, від близько 7 % до близько 28 %, від близько 7 % до близько 25 %, від близько 10 % до 35 %, від близько 10 % до близько 30 %, від близько 10 % до близько 25 %, від близько 10 % до близько 22 %, від близько 14 % до 35 %, від близько 16 % до 35 %, від близько 16 % до близько 30 %, від близько 16 % до близько 25 %
 10 % або від близько 16 % до близько 22 %. У переважних варіантах реалізації винаходу екстрагований ліпід володіє ознаками (i) і (ii), (i) і (iii) або (ii) і (iii), переважніше, все з (i), (ii) і (iii). Переважно, екстрагований ліпід додатково характеризується рівнем пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, що становить від близько 2 % до 16 %, і, при цьому, рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, якщо вона присутня, становить менше 1 %.

Варіанти реалізації кожного із чотирьох описаних вище аспектів детальніше розкриті нижче. Як буде зрозуміло кваліфікованому фахівцю, будь-які з варіантів реалізації винаходу, описані ширше відповідної ознаки у згаданому вище аспекті, не застосовуються до даного аспекту.

У варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід володіє однією або більше із наступних
 20 ознак:

i) рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 2 % до 18 %, від близько 2 % до 16 %, від близько 2 % до 15 % або від близько 3 % до близько 10 %,

25 ii) рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше 6 %, менше 3 %, менше 2 %, менше 1 % або близько 0,1 %,

iii) рівень олеїнової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 1 % до близько 30 %, від близько 3 % до близько 30 %, від близько 6 % до близько 30 %, від 1 % до близько 20 %, від близько 30 % до близько 60 %, від близько 45 % до близько 60 %, близько 30 % або від близько 15 % до близько 30 %,

30 iv) рівень лінолевої кислоти (ЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 % до близько 35 %, від близько 4 % до близько 20 %, від близько 4 % до близько 17 % або від близько 5 % до 10 %,

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

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

vii) рівень стеаринової кислоти (СДК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше, ніж близько 10 %, менше, ніж близько 8 %, менше, ніж близько 7 %, менше, ніж близько 6 %, менше, ніж близько 4 %, менше, ніж близько 3 %, від близько 0,05 % до близько 7 %, від близько 0,05 % до близько 6 %, від близько 0,05 % до близько 4 %, від близько 0,05 % до близько 3 %, від близько 0,05 % до близько 10 %, або від 0,05 % до близько 2 %,

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

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

55 x) рівень ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 15 % менше, ніж 4 %, менше, ніж близько 3 %, менше, ніж близько 2 %, від 0,05 % до 10 %, від 0,05 % до 5 %, від 0,05 % до 3 % або від 0,05 % до 2 %,

60 xi) якщо рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20,1 % до 35 %, то рівень докозапентаєнової кислоти (ДПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше, ніж 4 %, менше, ніж близько 3 %, менше, ніж близько 2

%, від 0,05 % до 8 %, від 0,05 % до 5 %, від 0,05 % до 3 % або від 5 % до 15 %, від 5 % до 10 % або від 0,05 % до близько 2 %,

хii) рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить близько 22 %, близько 24 %, близько 26 %, близько 28 %, близько 31 %, від 20,1 % до 29 %, від 20,1 % до 28 %, від 20,1 % до близько 27 %, від 20,1 % до близько 26 %, від 20,1 % до близько 25 %, від 20,1 % до близько 24 %, від 21 % до 35 %, від 21 % до 30 %, від 21 % до 28 %, від 21 % до близько 26 % або від 21 % до приблизне 24 %,

хiii) ліпід містить ω 6-докозапентаєнову кислоту (22:5^{Δ4,7,10,13,16}) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

хiv) ліпід містить менше 0,1 % ω 6-докозапентаєнної кислоти (22:5^{Δ4,7,10,13,16}) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

хv) ліпід містить менше 0,1 % однієї або більш або всіх із СДК, ЕПК і ЕТК серед жирних кислот, що містяться в ньому,

хvi) рівень загальних насичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 % до близько 25 %, від близько 4 % до близько 20 %, від близько 6 % до близько 20 % або від близько 6 % до близько 12 %,

хvii) рівень загальних мононенасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 % до близько 40 %, від близько 4 % до близько 35 %, від близько 8 % до близько 25 %, від 8 % до близько 22 %, від близько 15 % до близько 40 % або від близько 15 % до близько 35 %,

хviii) рівень загальних поліненасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 20 % до близько 75 %, від близько 30 % до близько 75 %, від близько 50 % до близько 75 %, близько 60 %, близько 65 %, близько 70 %, близько 75 % або від близько 60 % до близько 75 %,

хix) рівень загальних ω 6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 35 % до близько 50 %, від близько 20 % до близько 35 %, від близько 6 % до 20 %, менше, ніж 20 %, менше, ніж близько 16 %, менше, ніж близько 10 %, від близько 1 % до близько 16 %, від близько 2 % до близько 10 % або від близько 4 % до близько 10 %,

хx) рівень нових ω 6 жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше, ніж близько 10 %, менше, ніж близько 8 %, менше, ніж близько 6 %, менше, ніж 4 %, від близько 1 % до близько 20 %, від близько 1 % до близько 10 %, від 0,5 % до близько 8 % або від близько 0,5 % до 4 %,

хxi) рівень загальних ω 3 жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 36 % до близько 65 %, від 36 % до близько 70 %, від близько 40 % до близько 60 %, від близько 30 % до близько 60 %, від близько 35 % до близько 60 %, від 40 % до близько 65 %, від близько 30 % до близько 65 %, від близько 35 % до близько 65 %, близько 35 %, близько 40 %, близько 45 %, близько 50 %, близько 55 %, близько 60 %, близько 65 % або близько 70 %,

хxii) рівень нових ω 3 жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 21 % до близько 45 %, від 21 % до близько 45 %, від близько 23 % до близько 35 %, від близько 25 % до близько 35 %, від близько 27 % до близько 35 %, близько 23 %, близько 25 %, близько 27 %, близько 30 %, близько 34 %, близько 40 % або близько 45 %,

хxiii) співвідношення загальних ω 6 жирних кислот : загальних ω 3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 1,0 до близько 3,0, від близько 0,1 до близько 1, від близько 0,1 до близько 0,5, менше, ніж близько 0,50, менше, ніж близько 0,40, менше, ніж близько 0,30, менше, ніж близько 0,20, менше, ніж близько 0,15, близько 1,0, близько 0,1, від близько 0,1 до близько 0,4 або близько 0,2,

хxiv) співвідношення нових ω 6 жирних кислот : нових ω 3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 1,0 до близько 3,0, від близько 0,02 до близько 0,1, від близько 0,1 до близько 1, від близько 0,1 до близько 1, від близько 0,1 до близько 0,5, менше, ніж близько 0,50, менше, ніж близько 0,40, менше, ніж близько 0,30, менше, ніж близько 0,20, менше, ніж близько 0,15, близько 0,1, близько 0,2 або близько 1,0,

хxv) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією Δ 12-десатурази щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 80 %, від близько 60 % до близько 98 %, від близько 70 % до близько 95 % або від близько 75 % до близько 90 %,

хxvi) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення АЛК на СДК під дією Δ 6-десатурази щонайменше близько 30 %, щонайменше близько 40 %, щонайменше

близько 50 %, щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, від близько 30 % до близько 70 %, від близько 35 % до близько 60 % або від близько 50 % до близько 70 %,

xxvii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення СДК на кислоту ЕТК під дією $\Delta 6$ -елонгази щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 75 %, від близько 60 % до близько 95 %, від близько 70 % до близько 88 % або від близько 75 % до близько 85 %,

xxviii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ЕТК на ЕПК під дією $\Delta 5$ -десатурази щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 75 %, від близько 60 % до близько 99 %, від близько 70 % до близько 99 % або від близько 75 % до близько 98 %,

xxix) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ЕПК на ДПК під дією $\Delta 5$ -елонгази щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 85 %, щонайменше близько 90 %, від близько 50 % до близько 99 % або від близько 85 % до близько 99 %, від близько 50 % до близько 95 % або від близько 85 % до близько 95 %,

xxx) якщо рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, то склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ДПК на ДГК під дією $\Delta 4$ -десатурази щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, щонайменше близько 93 %, від близько 50 % до близько 95 %, від близько 80 % до близько 95 % або від близько 85 % до близько 95 %,

xxxi) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДГК та/або ДПК щонайменше близько 10 %, щонайменше близько 15 %, щонайменше близько 20 %, щонайменше близько 25 %, близько 20 %, близько 25 %, близько 30 %, від близько 10 % до близько 50 %, від близько 10 % до близько 30 %, від близько 10 % до близько 25 % або від близько 20 % до близько 30 %,

xxxii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ЛК на ДГК та/або ДПК щонайменше близько 15 %, щонайменше близько 20 %, щонайменше близько 22 %, щонайменше близько 25 %, щонайменше близько 30 %, щонайменше близько 40 %, близько 25 %, близько 30 %, близько 35 %, близько 40 %, близько 45 %, близько 50 %, від близько 15 % до близько 50 %, від близько 20 % до близько 40 % або від близько 20 % до близько 30 %,

xxxiii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення АЛК на ДГК та/або ДПК щонайменше близько 17 %, щонайменше близько 22 %, щонайменше близько 24 %, щонайменше близько 30 %, близько 30 %, близько 35 %, близько 40 %, близько 45 %, близько 50 %, близько 55 %, близько 60 %, від близько 22 % до близько 70 %, від близько 17 % до близько 55 %, від близько 22 % до близько 40 % або від близько 24 % до близько 40 %,

xxxiv) загальні жирні кислоти у екстрагованому ліпіді містять менш ніж 1,5 % C20:1, менш ніж 1 % C20:1 або близько 1 % C20:1,

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

xxxvi) ліпід містить диацилгліцерол (ДАГ), причому ДАГ переважно містить ДГК та/або ДПК,

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

xxxviii) щонайменше 70 %, щонайменше 72 % або щонайменше 80 % естерифікованої ДГК та/або ДПК у формі ТАГ знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ,

xxxix) найпоширенішими видами ТАГ, що містять ДГК, у ліпіді є ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12), ліпід, що містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18), і

xl) рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить близько 7 %, близько 8 %, близько 9 %, близько 10 %, близько 12 %, близько 15 %, близько 18 %, близько 20 %, близько 22 %, близько 24 %, близько 26 %, близько 28 %, близько 31 %, від близько 7 % до близько 31 %, від близько 7 % до близько 28 %, від близько 10 % до 35 %, від близько 10 % до близько 30 %, від близько 10 % до близько 25 %, від близько 10 % до близько 22 %, від близько 14 % до 35 %, від близько 16 % до 35 %, від близько 16 % до близько 30 %, від близько 16 % до близько 25 %, або від близько 16 % до близько 22 %, причому рівень ДГК необов'язково становить менш ніж 0,5 % від загального вмісту жирних кислот екстрагованого ліпиду.

В іншому варіанті реалізації екстрагований ліпід володіє однією або більше із наступних ознак:

i) рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 2 % до 15 %,

- ii) рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить близько 0,1 %,
- iii) рівень олеїнової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 1 % до 30 %,
- 5 iv) рівень лінолевої кислоти (ЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 4 % до 20 %,
- v) рівень α -ліноленової кислоти (АЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 4 % до 40 %,
- 10 vi) рівень γ -ліноленової кислоти (ГЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 0,05 % до 7 %,
- vii) рівень стеаринової кислоти (СДК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 0,05 % до 10 %,
- viii) рівень ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить менш ніж 6 %,
- 15 ix) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕтрК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить менш ніж 4 %,
- x) екстрагований рослинний ліпід містить менш ніж 0,1 % ω 6-докозапентаєнової кислоти (22:5 Δ 4,7,10,13,16) серед жирних кислот, що містяться в ньому,
- 20 xi) рівень нових ω 6 жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить менш ніж 10 %,
- xii) співвідношення загального вмісту ω 6 жирних кислот: загального вмісту ω 3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 1,0 до 3,0 або від 0,1 до 1,
- 25 xiii) співвідношення нових ω 6 жирних кислот : нових ω 3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 1,0 до 3,0, від 0,02 до 0,1 або від 0,1 до 1,
- xiv) склад жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДГК щонайменше 10 %,
- 30 xv) склад жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду базується на ефективності перетворення ЛК на ДГК щонайменше 15 %,
- xvi) склад жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду базується на ефективності перетворення АЛК на ДГК щонайменше 17 %,
- xvii) загальні жирні кислоти у екстрагованому рослинному ліпіді містять менш ніж 1,5 % C20:1, i
- 35 xviii) вміст триацилгліцеролів (ТАГ) екстрагованого рослинного ліпиду становить щонайменше 70 %, i може характеризуватися однією або більше із наступних ознак
- xix) екстрагований рослинний ліпід містить діацилгліцерол (ДАГ), який містить ДГК,
- 40 xx) екстрагований рослинний ліпід містить менш ніж 10 % вільних (неетерифікованих) жирних кислот та/або фосфоліпиду або по суті не містить їх,
- xxi) щонайменше 70 % ДГК, естерифікованої у формі ТАГ, знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ,
- xxii) найбільш розповсюджені ДГК-вмісні види ТАГ в екстрагованому рослинному ліпіді являють собою ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12), i
- 45 xxiii) екстрагований рослинний ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18).
- У варіанті реалізації рівень ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 0,05 % до 10 %.
- В іншому варіанті реалізації, у якому ДГК присутня в кількості від 20,1 % до 35 %, рівень докозапентаєнової кислоти (ДПК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить менш ніж близько 4 %.
- 50 У подальшому варіанті реалізації рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 20,1 % до 30 %.
- У іншому варіанті реалізації екстрагований ліпід знаходиться у формі олії, причому ліпід складає щонайменше близько 90 %, щонайменше близько 95 %, щонайменше близько 98 % або від близько 95 % до близько 98 % мас. олії.
- 55 У переважному варіанті реалізації описаних вище перших двох аспектів ліпід або олія, переважно олія з насіння, володіє наступними ознаками: у загальному вмісті жирних кислот ліпиду або олії рівень ДГК становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, рівень пальмітинової кислоти становить від близько 2 % до близько 16 %, рівень міристинової кислоти становить менш ніж близько 6 %, рівень олеїнової кислоти становить від близько 1 % до
- 60 близько 30 %, рівень ЛК становить від близько 4 % до близько 35 %, АЛК присутня, рівень

загальних насичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 % до близько 25 %, співвідношення загального вмісту $\omega 6$ жирних кислот : загального вмісту $\omega 3$ жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 0,05 до близько 3,0, і вміст триацилгліцеролів (ТАГ) у ліпіді становить щонайменше близько 70 %, і необов'язково ліпід по суті не містить холестерину та/або ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18). Більш переважно, ліпід або олія, переважно олія з насіння, додатково має одну або більше або всі із наступних ознак: щонайменше 70 % ДГК естерифіковано у положенні sn-1 або sn-3 триацилгліцеролу (ТАГ), АЛК присутня на рівні від 4 % до 40 % від загального вмісту жирних кислот, ГЛК присутня та/або рівень ГЛК становить менш ніж 4 % від загального вмісту жирних кислот, рівень СДК становить від 0,05 % до близько 10 %, рівень ЕТК становить менш ніж близько 4 %, рівень ЕПК становить від 0,05 % до близько 10 %, рівень ДПК становить від 0,05 % до близько 8 %, рівень загальних мононенасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 % до близько 35 %, рівень загальних поліненасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 20 % до близько 75 %, співвідношення нових $\omega 6$ жирних кислот : нових $\omega 3$ жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 0,03 до близько 3,0, переважно менш ніж близько 0,50, склад жирних кислот ліпиду базується на: ефективності перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією $\Delta 12$ -десатурази щонайменше близько 60 %, ефективності перетворення СДК на ЕТК кислоту під дією $\Delta 6$ -елонгази щонайменше близько 60 %, ефективності перетворення ЕПК на ДПК під дією $\Delta 5$ -елонгази від близько 50 % до близько 95 %, ефективності перетворення ДПК на ДГК під дією $\Delta 4$ -десатурази від близько 50 % до близько 95 %, ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДГК щонайменше близько 10 %. Найбільш переважно, щонайменше 81 % ДГК естерифіковано в положенні sn-1 або sn-3 триацилгліцеролу (ТАГ).

У переважному варіанті реалізації описаного вище третього аспекту ліпід або олія, переважно олія з насіння, володіє наступними ознаками: у загальному вмісті жирних кислот ліпиду або олії рівень ДПК становить від близько 7 % до 30 % або від 7 % до 35 %, рівень пальмітинової кислоти становить від близько 2 % до близько 16 %, рівень міристинової кислоти становить менш ніж 1 %, рівень олеїнової кислоти становить від 1 % до близько 30 %, рівень ЛК становить від близько 4 % до близько 35 %, АЛК присутня, рівень загальних насичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 % до близько 25 %, співвідношення загального вмісту $\omega 6$ жирних кислот : загального вмісту $\omega 3$ жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 0,05 до близько 3,0, і вміст триацилгліцеролів (ТАГ) у ліпіді становить щонайменше близько 70 %, і необов'язково ліпід по суті не містить від холестерину, та/або ліпід містить три-ДПК ТАГ (ТАГ 66:15). Більш переважно, ліпід або олія, переважно олія з насіння, додатково має одну або більше або всі із наступних ознак: щонайменше 70 % ДПК естерифіковано у положенні sn-1 або sn-3 триацилгліцеролу (ТАГ), АЛК присутня на рівні від 4 % до 40 % від загального вмісту жирних кислот, ГЛК присутня та/або рівень ГЛК становить менш ніж 4 % від загального вмісту жирних кислот, рівень СДК становить від 0,05 % до близько 10 %, рівень ЕТК становить менш ніж близько 4 %, рівень ЕПК становить від 0,05 % до близько 10 %, рівень загальних мононенасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 % до близько 35 %, рівень загальних поліненасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 20 % до близько 75 %, співвідношення нових $\omega 6$ жирних кислот: нових $\omega 3$ жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 0,03 до близько 3,0, переважно менш ніж близько 0,50, склад жирних кислот ліпиду базується на: ефективності перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією $\Delta 12$ -десатурази щонайменше близько 60 %, ефективності перетворення СДК на ЕТК кислоту під дією $\Delta 6$ -елонгази щонайменше близько 60 %, ефективності перетворення ЕПК на ДПК під дією $\Delta 5$ -елонгази від близько 50 % до близько 95 %, і ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДПК щонайменше близько 10 %. Найбільш переважно, щонайменше 81 % ДПК естерифіковано у положенні sn-1 або sn-3 триацилгліцеролу (ТАГ).

В іншому переважному варіанті описаного вище четвертого аспекту, ліпід або олія, переважно олія з насіння, що містить ДГК та/або ДПК, володіє наступними ознаками: у загальному вмісті жирних кислот ліпиду або олії рівень пальмітинової кислоти становить від близько 2 % до близько 16 %, рівень міристинової кислоти становить менш ніж 1 %, рівень олеїнової кислоти становить від близько 1 % до близько 30 %, рівень ЛК становить від близько 4 % до близько 35 %, АЛК присутня, загальний рівень насичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 % до близько 25 %, співвідношення загального вмісту $\omega 6$ жирних кислот : загального вмісту $\omega 3$ жирних кислот у

вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 0,05 до близько 3,0, вміст триацилгліцеролів (ТАГ) ліпиду становить щонайменше близько 70 %, і необов'язково ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18) та/або три-ДПК ТАГ (ТАГ 66:15), причому щонайменше 35 % ДПК та/або ДГК, естерифікованих у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковано в положенні sn-2 ТАГ. Більш переважно, ліпід або олія, переважно олія з насіння, додатково має одну або більше або всі із наступних ознак: АЛК присутня на рівні від 4 % до 40 % від загального вмісту жирних кислот, ГЛК присутня, та/або рівень ГЛК становить менш ніж 4 % від загального вмісту жирних кислот, рівень СДК становить від 0,05 % до близько 10 %, рівень ЕТК становить менш ніж близько 4 %, рівень ЕПК становить від 0,05 % до близько 10 %, рівень загальних мононенасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 % до близько 35 %, рівень загальних поліненасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 20 % до близько 75 %, співвідношення нових $\omega 6$ жирних кислот: нових $\omega 3$ жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 0,03 до близько 3,0, переважно менш ніж близько 0,50, склад жирних кислот ліпиду базується на: ефективності перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією $\Delta 12$ -десатурази щонайменше близько 60 %, ефективності перетворення СДК на кислоту ЕТК під дією $\Delta 6$ -елонгази щонайменше близько 60 %, ефективності перетворення ЕПК на ДПК під дією $\Delta 5$ -елонгази від близько 50 % до близько 95 %, ефективності перетворення ДПК на ДГК під дією $\Delta 4$ -десатурази (якщо вони присутні) від близько 50 % до близько 95 %, ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДГК щонайменше близько 10 %.

В контексті екстрагованого ліпиду або олії за винаходом, рівень ДГК та/або ДПК у екстрагованому ліпіді або олії не підвищений або є істотною мірою таким же, як рівень ДГК та/або ДПК в ліпіді або олії частини рослини або мікроба до екстракції. Іншими словами, після екстракції не проводилося процедур для підвищення рівня ДГК та/або ДПК у ліпіді або олії відносно інших жирних кислот. Як буде очевидно, ліпід або олія в подальшому можуть бути оброблені фракціонуванням або іншими методами, з метою модифікації складу жирних кислот.

У ще одному переважному варіанті реалізації ліпід або олія, переважно олія з насіння, володіє наступними ознаками: у загальному вмісті жирних кислот ліпиду або олії рівень ДГК становить від близько 20,1 % до 30 % або від близько 20,1 % до 35 %, рівень пальмітинової кислоти становить від близько 2 % до близько 16 %, рівень міристинової кислоти становить менш ніж близько 6 % і переважно менш ніж близько 1 %, рівень олеїнової кислоти становить від близько 1 % до близько 30 %, рівень ЛК становить від близько 4 % до близько 35 %, АЛК присутня, ГЛК присутня, рівень СДК становить від близько 0,05 % до близько 10 %, рівень ЕТК становить менш ніж близько 6 %, рівень ЕПК становить від близько 0,05 % до близько 10 %, рівень ДПК становить від близько 0,05 % до близько 8 %.

У іншому переважному варіанті реалізації ліпід або олія, переважно олія з насіння і, більш переважно, олія з насіння Brassica, така як гірчична олія або рапсова олія, володіє наступними ознаками: у загальному вмісті жирних кислот ліпиду або олії рівень ДПК становить від близько 7 % до 35 %, рівень пальмітинової кислоти становить від близько 2 % до близько 16 %, рівень міристинової кислоти становить менш ніж близько 6 % і переважно менш ніж 1 %, рівень олеїнової кислоти становить від близько 1 % до близько 30 %, рівень ЛК становить від близько 4 % до близько 35 %, АЛК присутня, рівень СДК становить від близько 0,05 % до близько 10 %, рівень ЕТК становить менш ніж близько 6 %, рівень ЕПК становить від близько 0,05 % до близько 10 %. ДГК може бути присутня або може бути відсутня у ліпіді або олії. Переважно, ДГК, якщо вона присутня, присутня на рівні не більше ніж 0,5 % від загального вмісту жирних кислот в ліпіді або олії і, більш переважно, відсутня у загальному вмісті жирних кислот ліпиду або олії. Необов'язково, ліпід по суті не містить холестерину та/або ліпід містить три-ДПК ТАГ (ТАГ 66:15). Більш переважно, ліпід або олія, переважно олія з насіння, додатково має одну або більше або всі із наступних ознак: щонайменше 70 % ДПК естерифіковано в положенні sn-1 або sn-3 триацилгліцеролу (ТАГ), АЛК присутня на рівні від 4 % до 40 % від загального вмісту жирних кислот, ГЛК присутня та/або рівень ГЛК становить менш ніж 4 % від загального вмісту жирних кислот, рівень СДК становить від 0,05 % до близько 10 %, рівень ЕТК становить менш ніж близько 4 %, рівень ЕПК становить від 0,05 % до близько 10 %, рівень загальних ненасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 % до близько 35 %, рівень загальних поліненасичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 20 % до близько 75 %, співвідношення нових $\omega 6$ жирних кислот : нових $\omega 3$ жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 0,03 до близько 3,0, переважно менш ніж близько 0,50, склад жирних кислот ліпиду базується на: ефективності перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією $\Delta 12$ -десатурази щонайменше близько 60 %, ефективності перетворення СДК на

ЕТК кислоти під дією Δ6-елонгази щонайменше близько 60 %, ефективності перетворення ЕПК на ДПК під дією Δ5-елонгази від близько 50 % до близько 95 % та ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДПК щонайменше близько 10 %. У варіанті реалізації щонайменше 81 % ДПК естерифіковано у положенні sn-1 або sn-3 триацилгліцеролу (ТАГ). Як альтернатива, щонайменше 35 % ДПК, естерифікованої у формі ТАГ, естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ.

В подальшому варіанті реалізації екстрагований ліпід за винаходом додатково містить один або більше стеролів, переважно рослинних стеролів.

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

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

У варіанті реалізації вид рослини є одним із наведених у Табл. 14, наприклад, рапс, і рівень стеролів є близько таким же, як наведений у Табл. 14 для даного конкретного виду рослин. Види рослин можуть являти собою гірчицю (*B. juncea*) або *C. sativa* і містять рівень стеролів, близький до знайденого в екстрагованій олії гірчиці дикого типу або *C. sativa*, відповідно.

У варіанті реалізації екстрагований рослинний ліпід містить один або більше або всі з кампестролу/24-метилхолестерину, Δ5-стигмастеролу, ебуриколу, β-ситостеролу/24-етилхолестерину, Δ5-авенастеролу/ізофукостеролу, Δ7-стигмастеролу/стигмаст-7-ен-3β-олу і Δ7-авенастеролу, або містить рівень стеролів, по суті такий же, як в олії рапсу дикого типу.

У варіанті реалізації екстрагований ліпід містить рівень стеролів, по суті такий же, як в олії рапсу, гірчицній олії або олії *C. sativa* дикого типу.

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

У подальшому варіанті реалізації ліпід є олією, переважно олією з олійної культури. Приклади таких олій включають, без обмеження, олію виду *Brassica*, наприклад, олію рапсу або олію гірчиці, олію *Gossypium hirsutum*, олію *Linum usitatissimum*, олію виду *Helianthus*, олію *Carthamus tinctorius*, олію *Glycine max*, олію *Zea mays*, олію *Arabidopsis thaliana*, олію *Sorghum bicolor*, олію *Sorghum vulgare*, олію *Avena sativa*, олію виду *Trifolium*, олію *Elaeagnus guineensis*, олію *Nicotiana benthamiana*, олію *Hordeum vulgare*, олію *Lupinus angustifolius*, олію *Oryza sativa*, олію *Oryza glaberrima*, олію *Camelina sativa*, олію *Crambe abyssinica*, олію *Miscanthus x giganteus* або олію *Miscanthus sinensis*. Більш переважно, олія являє собою олію виду *Brassica*, олію *Camelina sativa* або олію *Glycine max* (сої). У варіанті реалізації ліпід містить або являє собою олію виду *Brassica*, таку як олія *Brassica napus* або олія *Brassica juncea*, олія *Gossypium hirsutum*, олія *Linum usitatissimum*, олія виду *Helianthus*, олія *Carthamus tinctorius*, олія *Glycine max*, олія *Zea mays*, олія *Elaeagnus guineensis*, олія *Nicotiana benthamiana*, олія *Lupinus angustifolius*, олія *Camelina sativa*, олія *Crambe abyssinica*, олія *Miscanthus x giganteus* або олія *Miscanthus sinensis*. В подальшому варіанті реалізації олія являє собою олію рапсу, олію гірчиці (*B. juncea*), олію сої (*Glycine max*), олію *Camelina sativa* або олію *Arabidopsis thaliana*. В альтернативному варіанті реалізації олія являє собою рослинну олію, крім олії *A. thaliana* та/або крім олії *C. sativa*. У варіанті реалізації рослинна олія є олією, крім олії *G. max* (сої). У варіанті реалізації олія була одержана з рослини, вирощеної у стандартних умовах, наприклад, як описано у Прикладі 1, або з рослини, вирощеної в полі або в теплиці із стандартними умовами.

В іншому аспекті даного винаходу пропонується спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпиду, який включає стадії:

i) одержання частини рослини, що містить ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, жирні кислоти, містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК) і γ-ліноленову кислоту (ГЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК), стеарионову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і необов'язково одну або більше із ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), притому, що рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду у частині рослини становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, і

ii) екстракцію ліпиду із частини рослини, причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %.

У подальшому аспекті даного винаходу пропонується спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпиду, який включає стадії:

i) одержання частини рослини, що містить ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, жирні кислоти містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК) і γ-ліноленову кислоту (ГЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК), стеарионову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і необов'язково одну або більше із ейкозапентаєнної кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнної кислоти (ЕТК), причому, що рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 2 % до 16 %, і, при цьому, рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, якщо вона присутня, становить менш ніж 1 %, причому, що рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду у частині рослини становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, і

ii) екстракцію ліпиду із частини рослини,

причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %.

В подальшому аспекті даного винаходу пропонується спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпиду, який включає стадії:

i) одержання частини рослини, що містить ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, жирні кислоти містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК), стеарионову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і необов'язково одну або більше із ейкозапентаєнної кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнної кислоти (ЕТК), причому, що рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 2 % до 16 %, і, при цьому, рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, якщо вона присутня, становить менш ніж 1 %, причому, що рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду у частині рослини становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, і

ii) екстракцію ліпиду із частини рослини,

причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %.

У варіанті реалізації трьох вищезгаданих аспектів винаходу пропонується спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпиду, який включає стадії:

i) одержання частини рослини, що містить ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, склад жирних кислот ліпиду включає олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω□ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω□ жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнної кислоти (ЕПК), докозапентаєнної кислоти (ДПК) і ейкозатетраєнної кислоти (ЕТК), причому, що (i) рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, переважно від 30 % до 35 %, (ii) рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 2 % до 16 %, (iii) рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менш ніж 1 %, (iv) рівень олеїнової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 1 % до 30 %, (v) рівень лінолевої кислоти (ЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 35 %, (vi) рівень α-ліноленової кислоти (АЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 40 %, (vii) рівень ейкозатриєнної кислоти (ЕтРК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менш ніж 4 %, (viii) загальний рівень насичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 25 %, (ix) співвідношення загального вмісту ω6 жирних кислот : загального вмісту ω3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 0,05 і 1, (x) вміст триацилгліцеролів (ТАГ) ліпиду становить щонайменше 70 %, і (xi) щонайменше 70 % ДГК, естерифікованої у формі ТАГ, знаходиться у положенні sn-1 або sn-3 ТАГ, і

ii) екстракцію ліпиду із частини рослини,

причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, переважно від 30 % до 35 %. Переважно, щонайменше 81 % або щонайменше 90 % ДГК, естерифікованої у формі ТАГ, знаходиться у положенні sn-1 або sn-3 ТАГ.

У подальшому аспекті винаходу пропонується спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпиду або мікробного ліпиду, який включає стадії:

i) одержання частини рослини або мікробних клітин, що містить ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, жирні кислоти містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК) і докозапентаєнову кислоту (ДПК), і необов'язково одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), причому рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот ліпиду з частини рослини або мікробних клітин становить від близько 7 % до 35 %, і

ii) екстракцію ліпиду із частини рослини або мікробних клітин, причому рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 7 % до 35 %. У варіанті реалізації рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 7 % до 20 % або від 20,1 % до 35 %.

У варіанті реалізації згаданого вище аспекту винаходу пропонується спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпиду або мікробного ліпиду, який включає стадії:

i) одержання частини рослини або мікробних клітин, що містять ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, склад жирних кислот ліпиду включає олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДПК), і одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), причому (i) рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 7 % до 30 % або від 7 % до 35 %, переважно від 30 % до 35 %, (ii) рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 2 % до 16 %, (iii) рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менш ніж 6 %, переважно менш ніж 1 %, (iv) рівень олеїнової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 1 % до 30 %, (v) рівень лінолевої кислоти (ЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 35 %, (vi) рівень α -ліноленової кислоти (АЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 40 %, (vii) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕТрК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менш ніж 4 %, (viii) рівень загальних насичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 25 %, (ix) співвідношення загальних $\omega 6$ жирних кислот : загальних $\omega 3$ жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 0,05 до 1, (x) вміст триацилгліцеролів (ТАГ) у ліпіді становить щонайменше 70 %, і (xi) щонайменше 70 % естерифікованої ДПК у формі ТАГ знаходиться у положенні sn-1 або sn-3 ТАГ, і

ii) екстракцію ліпиду із частини рослини, причому рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 7 % до 30 % або від 7 % до близько 35 %, переважно від 30 % до близько 35 %. Переважно щонайменше 81 % або щонайменше 90 % ДПК, естерифікованої у формі ТАГ, знаходиться у положенні sn-1 або sn-3 ТАГ.

В іншому аспекті даного винаходу пропонується спосіб одержання екстрагованого ліпиду, який включає стадії:

i) одержання клітин, що містять ліпід, переважно частини рослини, що містить клітини, або мікробних клітин, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, жирні кислоти включають докозапентаєнову кислоту (ДПК) та/або докозагексаєнову кислоту (ДГК), причому, що щонайменше 35 % ДПК та/або ДГК, естерифікованої у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ, і

ii) екстракцію ліпиду із клітин, причому щонайменше 35 % ДПК та/або ДГК, естерифікованої у формі триацилгліцеролу (ТАГ), у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ. У варіанті реалізації екстрагований ліпід, одержаний за способом, додатково характеризується одним або більше або всіма із наступного: (i) він містить жирні кислоти, що включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК) і необов'язково одну або більш із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), (ii) щонайменше близько 40 %, щонайменше близько 45 %, щонайменше близько 48 %, від 35 % до близько 60 % або від 35 % до близько 50 %, ДПК та/або ДГК, естерифіковано у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ, і (iii) рівень ДПК та/або ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 1 % до 35 % або від близько 7 % до 35 % або від близько 20,1 % до 35 %. У варіантах реалізації даного

аспекту рівень ДПК та/або ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить близько 7 %, близько 8 %, близько 9 %, близько 10 %, близько 12 %, близько 15 %, близько 18 %, близько 20 %, близько 22 %, близько 24 %, близько 26 %, близько 28 %, близько 30 %, від близько 7 % до близько 28 %, від близько 7 % до близько 25 %, від близько 10 % до 35 %, від близько 10 % до близько 30 %, від близько 10 % до близько 25 %, від близько 10 % до близько 22 %, від близько 14 % до 35 %, від близько 16 % до 35 %, від близько 16 % до близько 30 %, від близько 16 % до близько 25 %, або від близько 16 % до близько 22 %. У переважних варіантах реалізації екстрагований ліпід характеризується (i) і (ii), (i) і (iii) або (ii) і (iii), більш переважно, всіма із (i), (ii) і (iii). Переважно, екстрагований ліпід додатково характеризується рівнем пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, який становить від близько 2 % до 16 %, причому рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, якщо вона присутня, становить менш ніж 1 %.

У варіанті реалізації згаданого вище аспекту винаходу пропонується спосіб одержання екстрагованого ліпиду, який включає стадії:

i) одержання клітин, що містять ліпід, переважно частини рослини, що містить клітини, або мікробних клітин, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, жирні кислоти включають докозапентаєнову кислоту (ДПК) та/або докозагексаєнову кислоту (ДГК) і додатково включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК), і одну або більш із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), причому (i) рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 2 % до 16 %, (ii) рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менш ніж 1 %, (iii) рівень олеїнової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 1 % до 30 %, (iv) рівень лінолевої кислоти (ЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 35 %, (v) рівень α -ліноленової кислоти (АЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 40 %, (vi) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕтрК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше 4 %; (vii) рівень загальних насичених жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 25 %, (viii) співвідношення загальних $\omega 6$ жирних кислот : загальних $\omega 3$ жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 0,05 до близько 1 %, (ix) вміст триацилгліцеролу (ТАГ) у ліпіді становить щонайменше близько 70 %, і (x) щонайменше 35 % ДПК та/або ДГК, естерифікованої у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковано в положенні sn-2 ТАГ, і

ii) екстракцію ліпиду із частини рослини, причому щонайменше 35 % ДПК та/або ДГК, естерифікованої у формі триацилгліцеролу (ТАГ), в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ.

Стадія одержання частини рослини або мікробних клітин може включати збирання врожаю частин рослини, переважно насіння, із рослин, що утворюють частини рослини, виділення мікробних клітин із культур таких клітин або одержання частин рослини або мікробних клітин шляхом придбання у виробника або постачальника, або шляхом імпорту. Спосіб може включати стадію визначення складу жирних кислот ліпиду у зразку частин рослини або мікробних клітин або екстрагованого ліпиду.

У переважному варіанті реалізації екстрагований ліпід, одержаний за способом у відповідності до винаходу, володіє, якщо це доречно, однією або більше ознак, визначених у даному описі, наприклад, як визначено вище для перших чотирьох аспектів.

Варіанти реалізації кожного із п'яти розкритих вище аспектів більш детально описані нижче. Кваліфікованому фахівцю буде зрозуміло, що жоден із варіантів реалізації, описаних ширше, ніж відповідна ознака у згаданому вище аспекті, не застосовується до цього аспекту.

У варіанті реалізації частина рослини є насінням, переважно насінням олійної культури. Приклади такого насіння включають, без обмеження, насіння виду *Brassica*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, виду *Helianthus*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, виду *Trifolium*, *Elaeagnus guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa* або *Crambe abyssinica*, переважно насіння виду *Brassica*, насіння *C. sativa* або насіння *G. max* (сої), більш переважно, насіння *Brassica napus*, *B. juncea* або *C. sativa*. У варіанті реалізації частина рослини є насінням, переважно олійної культури, такої як вид *Brassica*, наприклад, *Brassica napus* або *Brassica juncea*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, вид *Helianthus*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Elaeagnus guineensis*, *Nicotiana benthamiana*,

Lupinus angustifolius, Camelina sativa або Crambe abyssinica, переважно насінням Brassica napus, В juncea або C. sativa. У варіанті реалізації насіння являє собою насіння рапсу, насіння гірчиці, насіння сої, насіння Camelina sativa або насіння Arabidopsis thaliana. В альтернативному варіанті реалізації насіння є насінням, окрім насіння A. thaliana та/або окрім C. sativa. У варіанті реалізації насіння є насінням, окрім насіння сої. У варіанті реалізації частина рослини є насінням виду Brassica. У варіанті реалізації насіння було одержане від рослини, вирощеної у стандартних умовах, наприклад, як описано у Прикладі 1, або від рослини, вирощеної в полі або в теплиці із стандартними умовами.

В іншому варіанті реалізації насіння містить щонайменше близько 18 мг, щонайменше близько 22 мг, щонайменше близько 26 мг, від близько 18 мг до близько 100 мг, від близько 22 мг до близько 70 мг, близько 80 мг, від близько 30 мг до близько 80 мг, або від близько 24 мг до близько 50 мг ДГК та/або ДПК на грам насіння.

У подальшому варіанті реалізації частина рослини, така як насіння, містить екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів:

i) ω 3-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,
ii) Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

iii) Δ 12-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

iv) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза та/або Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

v) ω 3-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

vi) Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

vii) Δ 12-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

viii) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза та/або Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

причому кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше промоторами, здатними керувати експресією вказаних полінуклеотидів у клітині частини рослини.

У подальшому варіанті реалізації частина рослини, така як насіння, або рекомбінантні клітини, такі як мікробні клітини, містять екзогенні полінуклеотиди, що кодують один з наступних наборів ферментів;

i) ω 3-десатураза та/або Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

ii) Δ 12-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

iii) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза та/або Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

iv) ω 3-десатураза та/або Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

v) Δ 12-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

vi) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза та/або Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

причому кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більш промоторами, здатними керувати експресією вказаних полінуклеотидів у клітині частини рослини або клітинах.

У варіанті реалізації, якщо частина рослини або клітини містять ліпід, що містить жирні кислоти у естерифікованій формі, причому жирні кислоти містять докозапентаєнову кислоту (ДПК) та/або докозагексаєнову кислоту (ДГК), причому щонайменше 35 % ДПК та/або ДГК, естерифікованої у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ, то частина рослини, така як насіння, або рекомбінантні клітини, такі як мікробні клітини, містить екзогенний полінуклеотид, що кодує 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), і, при цьому, полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше промоторами, що здатні керувати експресією полінуклеотиду у клітині частини рослини або клітинах. У подальшому варіанті реалізації клітини містять екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів;

i) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), ω 3-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

ii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

iii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

iv) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза та/або Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

v) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), ω 3-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

vi) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

vii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

viii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза та/або Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

причому кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше промоторами, здатними керувати експресією вказаних полінуклеотидів у клітині. Переважно, ЛФААТ може використовувати поліненасичений C22 жирний ацил-КоА субстрат, такий як ДГК-КоА та/або ДПК-КоА.

У варіанті реалізації Δ 12-десатураза додатково володіє ω 3-десатуразною та/або Δ 15-десатуразною активністю, тобто види активності забезпечуються єдиним поліпептидом. Як альтернатива, Δ 12-десатураза не володіє ω 3-десатуразною активністю і не володіє Δ 15-десатуразною активністю, тобто Δ 12-десатураза є окремим поліпептидом від поліпептиду, що володіє ω 3-десатуразною та/або Δ 15-десатуразною активністю.

Ще в одному варіанті реалізації частина рослини, така як насіння, або рекомбінантні клітини, такі як мікробні клітини, володіють одним або більше або всіма із наступних ознак:

i) Δ 12-десатураза перетворює олеїнову кислоту на лінолеву кислоту в одній або більш клітин частини рослини або у рекомбінантних клітинах із ефективністю щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 80 %, від близько 60 % до близько 95 %, від близько 70 % до близько 90 % або від близько 75 % до близько 85 %,

ii) ω 3-десатураза перетворює ω 6 жирні кислоти на ω 3 жирні кислоти в одній або більше клітинах частини рослини або у рекомбінантних клітинах із ефективністю щонайменше близько 65 %, щонайменше близько 75 %, щонайменше близько 85 %, від близько 65 % до близько 95 %, від близько 75 % до близько 91 % або від близько 80 % до близько 91 %,

iii) Δ 6-десатураза перетворює АЛК на СДК в одній або більше клітинах частини рослини або у рекомбінантних клітинах із ефективністю щонайменше близько 20 %, щонайменше близько 30 %, щонайменше близько 40 %, щонайменше близько 50 %, щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, від близько 30 % до близько 70 %, від близько 35 % до близько 60 % або від близько 50 % до близько 70 %,

iv) Δ 6-десатураза перетворює лінолеву кислоту на γ -ліноленову кислоту в одній або більше клітинах частини рослини або у рекомбінантних клітинах із ефективністю менш ніж близько 5 %, менш ніж близько 2,5 %, менш ніж близько 1 %, від близько 0,1 % до близько 5 %, від близько 0,5 % до близько 2,5 % або від близько 0,5 % до близько 1 %,

v) Δ 6-елонгаза перетворює СДК на ЕТК в одній або більше клітинах частини рослини або у рекомбінантних клітинах із ефективністю щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 75 %, від близько 60 % до близько 95 %, від близько 70 % до близько 80 % або від близько 75 % до близько 80 %,

vi) Δ 5-десатураза перетворює ЕТК на ЕПК в одній або більше клітинах частини рослини або у рекомбінантних клітинах із ефективністю щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 75 %, щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, від близько 60 % до близько 95 %, від близько 70 % до близько 95 % або від близько 75 % до близько 95 %,

vii) Δ 5-елонгаза перетворює ЕПК на ДПК в одній або більше клітинах частини рослини або у рекомбінантних клітинах із ефективністю щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 85 %, щонайменше близько 90 %, від близько 50 % до близько 90 % або від близько 85 % до близько 95 %,

viii) Δ 4-десатураза перетворює ДПК на ДГК в одній або більше клітинах частини рослини або у рекомбінантних клітинах із ефективністю щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, щонайменше близько 93 %, від близько 50 % до близько 95 %, від близько 80 % до близько 95 % або від приблизне 85 % до близько 95 %,

ix) ефективність перетворення олеїнової кислоти на ДГК або ДПК в одній або більше клітинах частини рослини або у рекомбінантних клітинах становить щонайменше близько 10 %, щонайменше близько 15 %, щонайменше близько 20 %, щонайменше близько 25 %, близько 20 %, близько 25 %, близько 30 %, від близько 10 % до близько 50 %, від близько 10 % до близько 30 %, від близько 10 % до близько 25 % або від близько 20 % до близько 30 %, 5

x) ефективність перетворення ЛК на ДГК або ДПК в одній або більше клітинах частини рослини або у рекомбінантних клітинах становить щонайменше близько 15 %, щонайменше близько 20 %, щонайменше близько 22 %, щонайменше близько 25 %, щонайменше близько 30 %, близько 25 %, близько 30 %, близько 35 %, від близько 15 % до близько 50 %, від близько 20 % до близько 40 % або від близько 20 % до близько 30 %, 10

xi) ефективність перетворення АЛК на ДГК або ДПК в одній або більше клітинах частини рослини або у рекомбінантних клітинах становить щонайменше близько 17 %, щонайменше близько 22 %, щонайменше близько 24 %, щонайменше близько 30 %, близько 30 %, близько 35 %, близько 40 %, від близько 17 % до близько 55 %, від близько 22 % до близько 35 % або від близько 24 % до близько 35 %, 15

xii) одна або більше клітин частини рослини або рекомбінантних клітин містять щонайменше близько на 25 %, щонайменше близько на 30 %, від близько 25 % до близько 40 % або від близько 27,5 % до близько 37,5 %, більше жирних кислот $\omega 3$, ніж відповідні клітини без екзогенних полінуклеотидів, 20

xiii) $\Delta 6$ -десатураза переважно зменшує ступінь насиченості α -ліноленової кислоти (АЛК) відносно лінолевої кислоти (ЛК),

xiv) $\Delta 6$ елонгаза додатково володіє активністю $\Delta 9$ -елонгази□

xv) $\Delta 12$ -десатураза додатково володіє активністю $\Delta 15$ -десатурази□

xvi) $\Delta 6$ -десатураза додатково володіє активністю $\Delta 8$ -десатурази□

xvii) $\Delta 8$ -десатураза додатково володіє активністю $\Delta 6$ -десатурази або не володіє активністю Δ -десатурази, 25

xviii) $\Delta 15$ -десатураза додатково володіє активністю $\omega 3$ -десатурази по відношенню до ГЛК,

xix) $\omega 3$ -десатураза додатково володіє активністю $\Delta 15$ -десатурази по відношенню до ЛК,

xx) $\omega 3$ -десатураза зменшує ступінь насиченості ЛК та/або ГЛК,

xxi) $\omega 3$ -десатураза переважно зменшує ступінь насиченості ГЛК відносно ЛК, 30

xxii) одна або більше або всі десатурази, переважно $\Delta 6$ -десатураза та/або $\Delta 5$ -десатураза, володіють більш високою активністю по відношенню до субстрату ацил-КоА, ніж до відповідного субстрату ацил-фосфатидилхоліну (ацил-ФХ),

xxiii) $\Delta 6$ -десатураза володіє вищою $\Delta 6$ -десатуражною активністю по відношенню до АЛК, ніж ЛК як жирно кислотного субстрату□ 35

xxiv) $\Delta 6$ -десатураза володіє більш високою $\Delta 6$ -десатуражною активністю по відношенню АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж по відношенню до АЛК, приєднаної до положення sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,

xxv) $\Delta 6$ -десатураза володіє щонайменше у 2 рази вищою $\Delta 6$ -десатуражною активністю, щонайменше в 3 рази більш високою активністю, щонайменше в 4 рази більш високою активністю або щонайменше в 5 разів більш високою активністю по відношенню до АЛК як субстрату, в порівнянні з ЛК; 40

xxvi) $\Delta 6$ -десатураза володіє більш високою активністю по відношенню до АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж по відношенню до АЛК, приєднаної до положення sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату, 45

xxvii) $\Delta 6$ -десатураза володіє щонайменше у 5 разів вищою $\Delta 6$ -десатуражною активністю або щонайменше у 10 разів вищою активністю по відношенню до АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж по відношенню до АЛК, приєднаної до положення sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату, 50

xxviii) десатураза являє собою фронт-енд десатуразу,

xxix) $\Delta 6$ -десатураза не володіє $\Delta 5$ -десатуражною активністю, що піддавалася б виявленню, по відношенню до ЕТК.

Ще в одному варіанті реалізації частина рослини, така як насіння, або рекомбінантна клітина, така як мікробні клітини, володіє одним або більше або всіма із наступних ознак:

i) $\Delta 12$ -десатураза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 4, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 4, 55

ii) $\omega 3$ -десатураза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 6, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 6, 60

iii) $\Delta 6$ -десатураза містить послідовність амінокислоту, представлену в SEQ ID NO: 9, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 9,

iv) $\Delta 6$ -елонгаза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 16, її біологічно активний фрагмент, такий як SEQ ID NO: 17, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 16 та/або SEQ ID NO: 17,

v) $\Delta 5$ -десатураза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 20, її біологічно активний фрагмент або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 20,

vi) $\Delta 5$ -елонгаза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 25, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 25,

vii) $\Delta 4$ -десатураза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 28, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 28.

У варіанті реалізації частина рослини, така як насіння, або рекомбінантні клітини, такі як мікробні клітини, додатково містить(ять) екзогенний полінуклеотид, що кодує діацилгліцеролацилтрансферазу (ДГАТ), моноацилгліцеролацилтрансферазу (МГАТ), гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ГФАТ), 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФКАТ), переважно ЛФКАТ, яка може використовувати поліненасичений жирний ацил-КоА субстрат C22, такий як ДГК-КоА або ДПК-КоА, ацил-КоА : лізофосфатидилхолінацилтрансферазу (ЛФХАТ), фосфоліпазу A_2 (РЛК₂), фосфоліпазу C (PLC), фосфоліпазу D (PLD), СДП-холіндіацилгліцеролхолінфосфотрансферазу (ХФТ), фосфатидилхоліндіацилгліцеролацилтрансферазу (ФДАТ), фосфатидилхолін : діацилгліцеролхолінфосфотрансферазу (ФДХТ), ацил-КоА синтетазу (АКС) або комбінацію двох або більше із вказаних ферментів.

У іншому варіанті реалізації частина рослини, така як насіння, або рекомбінантні клітини, такі як мікробні клітини, додатково містить(ять) введену мутацію або екзогенний полінуклеотид, який у клітині частини рослини негативно регулює продукування та/або активність ендогенного ферменту, вибраного з числа FAE1, ДГАТ, МГАТ, ГФАТ, ЛФКАТ, ЛФХАТ, РЛК₂, PLC, PLD, ХФТ, ФДАТ, тіоестерази, наприклад, FATB або D12-десатурази, або комбінації двох або більш із вказаних ферментів.

У подальшому варіанті реалізації щонайменше один або всі промотори є специфічними для насіння промоторами. У варіанті реалізації щонайменше один або всі промотори одержані із гена біосинтезу або акумуляції олії, такого як ген, що кодує олеозин, або із генів зберігання білка у насінні, таких як ген, що кодує конлінін.

В іншому варіанті реалізації промотор(и), що спрямовує(ють) експресію екзогенних полінуклеотидів, які кодують $\Delta 4$ -десатуразу $\geq \Delta 5$ -елонгазу ініціює експресію полінуклеотидів у насінні рослини, що розвивається, або рекомбінантних клітинах, таких як мікробні клітини, перед або досягає піку експресії перед промотором(ами), що спрямовує(ють) експресію екзогенних полінуклеотидів, які кодують $\Delta 12$ -десатуразу і $\omega 3$ -десатуразу.

У подальшому варіанті реалізації екзогенні полінуклеотиди ковалентно сполучені в молекулу ДНК, переважно молекулу Т-ДНК, інтегровану до геному клітин частини рослини або рекомбінантних клітин, таких як мікробні клітини, причому кількість таких молекул ДНК, інтегрованих до геному клітин частини рослини або рекомбінантних клітин, переважно становить не більш однієї, двох або трьох, або становить дві або три.

Ще в одному варіанті реалізації частина рослини містить щонайменше два різних екзогенних полінуклеотиди, кожен з яких кодує $\Delta 6$ -десатуразу з такою ж або іншою послідовністю амінокислот.

У подальшому варіанті реалізації загальний вміст олії у частині рослини, що містить екзогенні полінуклеотиди, становить щонайменше близько 40 %, або щонайменше близько 50 %, щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 70 %, від близько 50 % до близько 80 % або від близько 80 % до близько 100 % від загального вмісту олії у відповідній частині рослини, у якій відсутні екзогенні полінуклеотиди. У подальшому варіанті реалізації маса насіння, що містить екзогенні полінуклеотиди, становить щонайменше близько 40 %, меншій мірі близько 50 %, меншій мірі близько 60 %, меншій мірі близько 70 %, від близько 50 % до близько 80 % або від близько 80 % до 100 % від маси відповідного насіння, що не містить екзогенних полінуклеотидів.

У іншому варіанті реалізації ліпід знаходиться у формі олії, переважно олії з насіння олійної культури, причому щонайменше близько 90 %, або щонайменше близько 95 %, щонайменше близько 98 % або від близько 95 % до близько 98 % мас. ліпиду складають триацилгліцероли.

У подальшому варіанті реалізації спосіб додатково включає обробку ліпиду з метою підвищення рівня ДГК та/або ДПК як відсотка від загального вмісту жирних кислот. Наприклад, обробка може включати переестерифікацію. Наприклад, ліпід, такий як олія рапсу, може бути підданий обробці з метою перетворення жирних кислот в олії на алкілові ефіри, наприклад, метилові або етилові ефіри, які в подальшому можуть бути фракціоновані із збагаченням ліпиду або олії ДГК та/або ДПК. У варіантах реалізації склад жирних кислот ліпиду після такої обробки включає щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 % або щонайменше 90 % ДГК та/або ДПК. Співвідношення ДГК:ДПК у ліпіді після обробки переважно перевищує 2:1 або, в якості альтернативи, буде становити менш ніж 0.5:1. Як альтернатива, рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот ліпиду після обробки становить менш ніж 2,0 % або менш ніж 0,5 %, переважно вона відсутня у ліпіді.

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

У іншому аспекті даного винаходу розкривається спосіб одержання метилових або етилових ефірів поліненасичених жирних кислот, який включає введення триацилгліцеролів у реакцію з метанолом або етанолом, у екстрагованому рослинному ліпіді або в ході процесу екстракції, відповідно, причому екстрагований рослинний ліпід містить естерифіковані жирні кислоти у формі ТАГ, і, при цьому, жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК), і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і необов'язково одну або більше із стеаринонової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) та ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), притому, що рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, переважно від 30 % до 35 %, з одержанням в такий спосіб метилових або етилових ефірів поліненасичених жирних кислот.

У іншому аспекті даного винаходу пропонується спосіб одержання метилових або етилових ефірів поліненасичених жирних кислот, який включає введення триацилгліцеролів у реакцію з метанолом або етанолом, в екстрагованому рослинному ліпіді або в ході процесу екстракції, відповідно, причому екстрагований рослинний ліпід містить жирні кислоти, естерифіковані у формі ТАГ, і при цьому, жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК) і докозапентаєнову кислоту (ДПК), і необов'язково одну або більше із стеаринонової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) та ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), притому, що рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 7 до 35 %, переважно від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, з одержанням в такий спосіб метилових або етилових ефірів поліненасичених жирних кислот.

У іншому аспекті даного винаходу пропонується спосіб одержання метилових або етилових ефірів докозапентаєнової кислоти (ДПК) та/або кислоти докозагексаєнової (ДГК), який включає введення триацилгліцеролів (ТАГ) у реакцію з метанолом або етанолом, в екстрагованому рослинному ліпіді або в ході процесу екстракції, відповідно, причому екстрагований рослинний ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, жирні кислоти включають докозапентаєнову кислоту (ДПК) та/або докозагексаєнову кислоту (ДГК), причому щонайменше 35 % ДПК та/або ДГК, естерифікованої у формі ТАГ, естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ, з одержанням в такий спосіб метилових або етилових ефірів поліненасичених жирних кислот.

У переважному варіанті реалізації ліпід, який використовується у способі у відповідності до описаних вище трьох аспектів, володіє однією або більш ознак, визначених у даному описі в контексті екстрагованого ліпиду або олії за винаходом.

У іншому аспекті даного винаходу розкривається олійна рослина або її частина, така як насіння, що містить:

а) ліпід у своєму насінні, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і

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

i) $\Delta 12$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза та/або $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза, або

ii) $\Delta 12$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза та/або $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 9$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

причому кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше специфічними для насіння промоторами, здатними керувати експресією вказаних полінуклеотидів у насінні

рослини, що розвивається, і, при цьому, жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК) і γ-ліноленову кислоту (ГЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК), стеарионову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК) і не обов'язково ейкозапентаєнову кислоту (ЕПК) та/або ейкозатетраєнову кислоту (ЕТК), причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот ліпиду насіння становить від 20,1 % до 30 %, або від 20,1 % до 35 %, переважно від 30 % до 35 %.

У іншому аспекті даного винаходу пропонується рослина олійної культури або її частина, така як насіння, що містить:

а) ліпід у насінні, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і
б) екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів;
і) Δ12-десатураза, ω3-десатураза та/або Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза, або

ii) Δ12-десатураза, ω3-десатураза та/або Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза та Δ5-елонгаза,

причому кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше специфічними для насіння промоторами, здатними керувати експресією вказаних полінуклеотидів у насінні рослини, що розвивається, і, при цьому, жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК), стеарионову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК) і не обов'язково ейкозапентаєнову кислоту (ЕПК) та/або ейкозатетраєнову кислоту (ЕТК), причому, що рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот ліпиду насіння становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, переважно від 30 % до 35 %.

У іншому аспекті даного винаходу пропонується рослина олійної культури або її частина, така як насіння, що містить:

а) ліпід у насінні, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і
б) екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів;
і) Δ12-десатураза, ω3-десатураза та/або Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза, або

ii) Δ12-десатураза, ω3-десатураза та/або Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза та Δ5-елонгаза,

причому, що кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше специфічними для насіння промоторами, що здатні керувати експресією вказаних полінуклеотидів у насінні рослини, що розвивається, і, при цьому, жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти включають лінолеву кислоту (ЛК) і γ-ліноленову кислоту (ГЛК), ω3 жирні кислоти включають α-ліноленову кислоту (АЛК), стеарионову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК) і не обов'язково ейкозапентаєнову кислоту (ЕПК) та/або ейкозатетраєнову кислоту (ЕТК), причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот ліпиду насіння становить від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, і, при цьому, рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот ліпиду становить від близько 2 % до 16 %, причому, що рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот ліпиду, якщо вона присутня, становить менш ніж 1 %.

У іншому аспекті даного винаходу пропонується рослина олійної культури або її частина, така як насіння, що містить ліпід у насінні, або мікробна клітина, що містять:

а) ліпід, який містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і
б) екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів;
і) Δ12-десатураза, ω3-десатураза та/або Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза,

ii) Δ12-десатураза, ω3-десатураза та/або Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза,

iii) ω3-десатураза та/або Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза, або

iv) ω3-десатураза та/або Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза,

причому кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше специфічними для насіння промоторами, здатними керувати експресією вказаних полінуклеотидів у насінні рослини, що розвивається, або одним або більше промоторами, здатними керувати експресією вказаних полінуклеотидів у мікробній клітині, і, при цьому, жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК) і

необов'язково γ -ліноленову кислоту (ГЛК), ω 3 жирні кислоти, які включають α -ліноленову кислоту (АЛК), стеаридонову кислоту (СДК), і докозапентаєнову кислоту (ДПК), і необов'язково докозагексаєнову кислоту (ДГК), ейкозапентаєнову кислоту (ЕПК) та/або ейкозатетраєнову кислоту (ЕТК), притому, що рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот ліпиду насіння або мікробної клітини становить від 7 % до 35 %. У переважному варіанті реалізації даного аспекту ДГК присутній на рівні менш ніж 0,5 % від загального вмісту жирних кислот ліпиду насіння і екстрагованого ліпиду і, більш переважно, відсутній у загальному вмісті жирних кислот ліпідів.

У іншому аспекті даного винаходу пропонується клітина, переважно клітина в або із рослини, такої як рослина олійної культури, або її частини, такої як насіння, або рослина олійної культури або її частина, або мікробна клітина, що містить:

а) жирні кислоти у естерифікованій формі, причому жирні кислоти включають докозапентаєнову кислоту (ДПК) та/або докозагексаєнову кислоту (ДГК), і, при цьому, щонайменше 35 % ДПК та/або ДГК, естерифікованої у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ, і

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

i) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), ω 3-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

ii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

iii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

iv) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза та/або Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

v) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), ω 3-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

vi) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

vii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

viii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза та/або Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза, Δ 5-елонгаза і необов'язково Δ 4-десатураза,

причому кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше промоторами, здатними керувати експресією вказаних полінуклеотидів у клітині. Переважно, ЛФААТ може використовувати поліненасичений жирний ацил-КоА субстрат С22, такий як ДГК-КоА та/або ДПК-КоА, і рівень ДПК та/або ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 1 % до 35 % або від близько 7 % до 35 % або від близько 20,1 % до 35 %. У варіантах реалізації щонайменше близько 40 %, щонайменше близько 45 %, щонайменше близько 48 %, від 35 % до близько 60 %, або від 35 % до близько 50 % ДПК та/або ДГК, естерифікованої у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ.

У варіантах реалізації кожного із згаданих вище п'яти аспектів, Δ 15-десатураза є грибовою Δ 15-десатуразою, і ω 3-десатураза є грибовою ω 3-десатуразою.

У переважному варіанті реалізації рослина олійної культури, мікробна клітина або клітина за винаходом володіє, якщо це доречно, однією або більш ознак, визначених у даному описі, наприклад, як визначено вище для екстрагованого рослинного ліпиду, екстрагованого мікробного ліпиду або способу їх одержання.

Приклади рослин олійної культури включають, без обмеження, вид *Brassica*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, вид *Helianthus*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, вид *Trifolium*, *Elaeagnus guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa* або *Crambe abyssinica*. У варіанті реалізації рослина олійної культури є рослиною виду *Brassica*, рослиною *C. sativa* або рослиною *G. max* (соя). У варіанті реалізації олійна рослина є рослиною рапсу, *B. juncea*, *Glycine max*, *Camelina sativa* або *Arabidopsis thaliana*. В альтернативному варіанті реалізації рослина олійної культури є рослиною, окрім *A. thaliana* та/або окрім *C. sativa*. У варіанті реалізації рослина олійної культури є рослиною, окрім *G. max* (сої). У варіанті реалізації рослина олійної культури знаходиться у полі або була вирощена у полі або була вирощена в теплиці у стандартних умовах, наприклад, як описано у Прикладі 1.

У варіанті реалізації винаходу одна або більш десатураз здатні використовувати субстрат ацил-КоА. У переважному варіанті реалізації винаходу одна або більш з $\Delta 6$ -десатурази, $\Delta 5$ -десатурази, $\Delta 4$ -десатурази і $\Delta 8$ -десатурази, якщо вони присутні, здатні використовувати субстрат ацил-КоА, переважно кожна з i) $\Delta 6$ -десатурази, $\Delta 5$ -десатурази і $\Delta 4$ -десатурази або ii) $\Delta 5$ -десатурази, $\Delta 4$ -десатурази і $\Delta 8$ -десатурази здатна використовувати субстрат ацил-КоА. У варіанті реалізації винаходу $\Delta 12$ -десатураза та/або $\omega 3$ -десатураза здатні використовувати субстрат ацил-КоА. Субстрат ацил-КоА переважно являє собою АЛК-КоА для $\Delta 6$ -десатурази, ЕТК-КоА для $\Delta 5$ -десатурази, ДПК-КоА для $\Delta 4$ -десатурази і ЕТрК-КоА для $\Delta 8$ -десатурази, олеїл-КоА для $\Delta 12$ -десатурази, або один або більше з ЛК-КоА, ГЛК-КоА або АРК-КОА для $\omega 3$ -десатурази.

У варіанті реалізації винаходу зріле, зібране в процесі збору урожаю насіння рослини містить ДГК в кількості щонайменше близько 28 мг на грам насіння, переважно щонайменше близько 32 мг на грам насіння, щонайменше близько 36 мг на грам насіння, щонайменше близько 40 мг на грам насіння, більш переважно щонайменше близько 44 мг на грам насіння або щонайменше близько 48 мг на грам насіння, близько 80 мг на грам насіння або від близько 30 мг до близько 80 мг на грам насіння.

У подальшому аспекті цього винаходу розкривається рослина *Brassica napus*, *B. juncea* або *Camelina sativa*, яка здатна давати насіння, що містить ДГК та/або ДПК, причому зібране в процесі збору урожаю, зріле насіння рослини містить ДГК та/або ДПК в кількості щонайменше близько 28 мг на грам насіння, переважно щонайменше близько 32 мг на грам насіння, щонайменше близько 36 мг на грам насіння, щонайменше близько 40 мг на грам насіння, більш переважно щонайменше близько 44 мг на грам насіння або щонайменше близько 48 мг на грам насіння, близько 80 мг на грам насіння або від близько 30 мг до близько 80 мг на грам насіння.

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

Також розкрита частина рослини, переважно насіння, яка володіє однією або більше з наступних ознак:

- i) одержана з рослини за винаходом,
- ii) містить ліпід, розкритий в цьому документі,
- iii) може використовуватися в способі за винаходом,

Ще в одному аспекті цього винаходу розкривається зріле, зібране в процесі збору урожаю насіння *Brassica napus*, *B. juncea* або *Camelina sativa*, що містить ДГК, із вмістом вологи від близько 4 % до близько 15 % мас., переважно від близько 6 % до близько 8 % мас. або від близько 4 % до близько 8 % мас., більш переважно від близько 4 % до близько 6 % мас., причому вміст ДГК в насінні становить щонайменше близько 28 мг на грам насіння, переважно щонайменше близько 32 мг на грам насіння, щонайменше близько 36 мг на грам насіння, щонайменше близько 40 мг на грам насіння, більш переважно щонайменше близько 44 мг на грам насіння або щонайменше близько 48 мг на грам насіння, близько 80 мг на грам насіння або від близько 30 мг до близько 800 мг на грам насіння.

У варіанті реалізації винаходу розкрита клітина за винаходом, трансгенний організм за винаходом, рослина олійної культури за винаходом, рослина *Brassica napus*, *B. juncea* або *Camelina sativa* за винаходом, частина рослини за винаходом або насіння за винаходом, які можуть застосовуватися для одержання екстрагованого ліпиду, що володіє одним або більш або всіма ознаками, визначеними в цьому документі.

Ще в одному аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання рослини або клітини за винаходом, які можуть застосовуватися для одержання екстрагованого ліпиду за винаходом, причому спосіб включає:

а) аналіз рівня ДГК та/або ДПК у ліпіді, продуктованому однією або більше частинами рослини, такими як насіння, або рекомбінантними клітинами, такими як мікробні клітини, від декількох рослин або рекомбінантних клітин, таких як мікробні клітини, причому кожна рослина або рекомбінантна клітина, така як мікробна клітина, містить один або більше екзогенних полінуклеотидів, що кодують один із наступних наборів ферментів;

i) $\omega 3$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

ii) $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

iii) $\Delta 12$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

iv) $\Delta 12$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза або $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

v) $\omega 3$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 9$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

vi) $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 9$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

vii) $\Delta 12$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 9$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

5 viii) $\Delta 12$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза або $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 9$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

ix) $\omega 3$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

x) $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

xi) $\Delta 12$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

10 xiii) $\Delta 12$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза або $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза, або

xiv) $\Delta 12$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза або $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 9$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,

15 причому кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з одним або більше промоторами, здатними керувати експресією вказаних полінуклеотидів у клітині частини рослини або рекомбінантній клітині, і

б) ідентифікацію із множини рослин або рекомбінантних клітин рослини або рекомбінантної клітини, які можуть застосовуватися для одержання екстрагованого рослинного ліпиду або клітинного ліпиду за винаходу в одній або більше їх частин, і

20 в) необов'язково, одержання потомства рослин або рекомбінантних клітин від ідентифікованої рослини або рекомбінантної клітини, або їх насіння.

У варіанті реалізації рослина або рекомбінантна клітина додатково містить екзогенний полінуклеотид, що кодує ЛФААТ, як визначено у даному описі.

25 Переважно, рослина-нащадок належить щонайменше до другого або третього покоління відносно ідентифікованої рослини, і переважно є гомозиготною по одному або більше полінуклеотидах. Більш переважно, один або більш полінуклеотидів присутні у рослині-нащадку тільки в одному інсерційному локусі. Таким чином, у винаході пропонується спосіб, який може застосовуватися як спосіб скринінгу для ідентифікації рослини або її насіння з числа багатьох трансформованих рослин або насінин кандидатів, причому ідентифікована рослина або її

30 рослина-нащадок продукує ліпід за винаходом, переважно у насінні. Таку рослина або рослину-нащадок або її насіння відбирають, якщо вона продукує ліпід за винаходом, зокрема із вказаним рівнем ДГК та/або рівнем ДПК, або не відбирають, якщо вона не продукує ліпиду за винаходом. У варіанті реалізації екзогенні полінуклеотиди, що присутні у клітині, такий як мікробна клітина, або рослині або її частині, як визначено у даному описі, стають стабільно інтегрованими до геному клітини, рослини або частини рослини, такої як насіння. Переважно, екзогенний(і) полінуклеотид(и) стають стабільно інтегрованими до геному клітини, рослини або частини рослини, такої як насіння, в одному локусі в геномі, і переважно є гомозиготними по інсерції. Більш переважно, рослина, частина рослини або насіння додатково характеризується тим, що в ньому відсутні екзогенні полінуклеотиди, окрім однієї або більше молекул Т-ДНК. Таким чином, жодних екзогенних векторних послідовностей не інтегровано до геному, окрім послідовностей Т-ДНК.

У варіанті реалізації, перед стадією а) спосіб включає введення одного або більше екзогенних полінуклеотидів в одну або більше клітин рослини.

45 Додатково пропонується рослина, одержана із застосуванням способу за винаходом, і насіння такої рослини.

У варіанті реалізації рослина за винаходом володіє як чоловічою, так і жіночою фертильністю, переважно з рівнями як чоловічої, так і жіночої фертильності, що складають щонайменше 70 % відносно відповідної рослини дикого типу, або переважно є такими ж. У варіанті реалізації пилок, що продукується рослиною за винаходом або рослиною, одержаною із

50 насіння за винаходом, є на 90-100 % життєздатним за даними фарбування фарбником для визначення життєздатності. Наприклад, життєздатність пилку можна оцінити, як описано у Прикладі 1. В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання насіння, який включає:

а) вирощування рослини за винаходом або рослини, яка утворює частину, розкриту в цьому

55 документі, переважно в полі як частини популяції розміром щонайменше 1000 або 2000 або 3000 таких рослин або на площі щонайменше 1 гектар або 2 гектари або 3 гектари, насаджених із стандартною щільністю насадження,

б) збір урожаю насіння з рослини або рослин, і

в) необов'язково, екстракцію ліпиду з насіння, переважно з одержанням олії із загальним виходом ДГК та/або виходом ДПК щонайменше 60 кг або 70 кг або 80 кг ДГК та/або ДПК на гектар.

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

- i) олія є такою, як розкрито в цьому документі,
- ii) частина рослини або насіння можуть застосовуватися в способі за винаходом,

Наприклад, насіння може застосовуватися для одержання рослини за винаходом. Рослина може бути вирощена в полі або в теплиці із стандартними умовами, наприклад, як описано у Прикладі 1.

У подальшому аспекті цього винаходу розкривається ліпід або олія, продуковані або одержані із застосуванням способу за винаходом, із клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини виду *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *G. max* або *Camelina sativa* за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом або рослини, клітини рослини, частини рослини або насіння за винаходом. Переважно, ліпід або олію очищують для видалення забруднюючих речовин, таких як нуклеїнова кислота (ДНК та/або РНК), білок та/або вуглевод, або пігментів, таких як хлорофіл. Крім того, ліпід або олія можуть бути очищені з метою збільшення вмісту ТАГ, наприклад, шляхом видалення вільних жирних кислот (ВЖК) або фосфоліпиду.

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

У варіанті реалізації клітина (рекомбінантна клітина) за винаходом або використовується у відповідності до винаходу, є мікробною клітиною, такою як клітина, придатна для ферментації, переважно масляниста мікробна клітина, здатна акумулювати триацилгліцероли до рівня щонайменше 25 % в перерахунку на масу. Переважними процесами ферментації є анаеробні процеси ферментації, як добре відомі з рівня техніка. Придатні ферментуючі клітини, звичайно мікроорганізми, здатні ферментувати, тобто, перетворювати цукри, такі як глюкоза або мальтоза, прямо або непрямо, на бажані жирні кислоти. Приклади ферментуючих мікроорганізмів включають грибові організми, такі як дріжджі. В даному описі «дріжджі» включають види *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, види *Candida*, види *Kluveromyces*, види *Pichia*, види *Hansenula*, види *Trichoderma*, *Lipomyces starkey* і переважно *Yarrowia lipolytica*.

У подальшому аспекті цього винаходу розкривається жирна кислота, продукована або одержана із застосуванням способу за винаходом, з клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини виду *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *G. max* або *Camelina sativa* за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, або рослини, клітини рослини, частини рослини або насіння за винаходом. Переважно жирна кислота являє собою ДГК. Жирна кислота може знаходитися в суміші жирних кислот, склад жирних кислот у якій є таким, як розкрито в цьому документі, або суміш може бути збагачена таким чином, щоб жирна кислота становила щонайменше 40 % або щонайменше 90 % від вмісту жирних кислот в суміші. У варіанті реалізації винаходу жирна кислота є неестерифікованою. Як альтернатива, жирна кислота є естерифікованою із застосуванням, наприклад, метильної, етильної, пропільної або бутильної групи.

Додатково розкривається шрот, одержаний із насіння за винаходом або одержаний із рослини за винаходом. Переважний шрот включає, не обмежуючись цим, шрот *Brassica napus*, *B. juncea*, *Camelina sativa* або *Glycine max*. У варіанті реалізації шрот містить екзогенний(і) полінуклеотид(и) та/або генетичні конструкції, як розкрито у даному документі. У переважному варіанті реалізації в шроті залишається частина ліпиду або олії, продукованого у насінні, з якого одержаний шрот, але на низькому рівні (наприклад, менш ніж 2 % мас.) після екстракції більшої частини ліпиду або олії. Шрот може застосовуватися як корм для тварин або як інгредієнт у виробництві харчових продуктів.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається композиція, що містить один або більше з ліпиду або олії за винаходом, жирної кислоти за винаходом, генетичної конструкції за

винаходом, виділеного та/або екзогенного полінуклеотиду за винаходом, вектора або генетичної конструкції за винаходом, клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини виду *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Glycine max* або *Camelina sativa* за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, рослини, рослинної клітини, частини рослини або насіння за винаходом або макухи за винаходом. У варіантах реалізації винаходу композиція містить носій, придатний для фармацевтичного, харчового або сільськогосподарського застосування, сполуки для обробки насіння, добриво, інший харчовий продукт або поживний інгредієнт, або додатковий білок або вітаміни.

Також розкриті корми, косметика або хімічні речовини, що містять одне або більше з ліпідів або олії за винаходом, жирної кислоти за винаходом, клітини за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини виду *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Glycine max* або *Camelina sativa* за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, насіння за винаходом, шрот за винаходом або композиції за винаходом.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання корму, який включає змішування одного або більше ліпідів, або олії за винаходом, жирної кислоти за винаходом, клітини за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини виду *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Glycine max* або *Camelina sativa* за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, рослини, шроту за винаходом або композиції за винаходом, щонайменше із ще одним поживним інгредієнтом. Спосіб може включати стадії змішування, термічної обробки, випічки, екструдуювання, емульгації або іншої обробки фуражу або пакування фуражу або аналізу вмісту ліпідів або олії у фуражі.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб лікування або попередження стану, при якому ПНЖК здійснюють сприятливу дію, причому вказаний спосіб включає введення суб'єкту одного або більше з ліпідів або олії за винаходом, жирної кислоти за винаходом, генетичної конструкції за винаходом, виділеного та/або екзогенного полінуклеотиду за винаходом, вектора або генетичної конструкції за винаходом, клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини виду *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Glycine max* або *Camelina sativa* за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, рослини, рослинної клітини, частини рослини або насіння за винаходом, шроту за винаходом, композиції за винаходом або корму за винаходом. У переважному варіанті реалізації ПНЖК вводять у формі фармацевтичної композиції, що містить етиловий ефір ПНЖК. Суб'єкт може бути людиною або твариною, окрім людини.

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

Також розкриті застосування одного або більше з ліпідів або олії за винаходом, жирної кислоти за винаходом, генетичної конструкції за винаходом, виділеного та/або екзогенного полінуклеотиду за винаходом, вектора або генетичної конструкції за винаходом, клітини за винаходом, трансгенного організму за винаходом, рослини олійної культури за винаходом, рослини виду *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Glycine max* або *Camelina sativa* за винаходом, частини рослини за винаходом, насіння за винаходом, рослини, рослинної клітини, частини рослини або насіння за винаходом, шроту за винаходом, композиції за винаходом або харчових продуктів (корму) за винаходом для виробництва лікарського засобу для лікування або попередження стану, при якому ПНЖК, переважно ДГК та/або ДПК, здійснюють сприятливу дію.

Одержання лікарського засобу може включати змішування олії за винаходом з фармацевтично прийнятним носієм, з метою лікування стану, розкритого в цьому документі. Спосіб може включати, по-перше, очищення та/або переестерифікацію олії та/або фракціонування олії, з метою підвищення рівня ДГК та/або ДПК. У конкретному варіанті реалізації винаходу спосіб включає обробку ліпідів або олії, наприклад, олії рапсу, з метою перетворення жирних кислот в олії на алкілові ефіри, наприклад, метилові або етилові ефіри. Подальша обробка, наприклад, фракціонування або дистиляція, може застосовуватися для

збагачення ліпиду або олії ДГК та/або ДПК. У переважному варіанті реалізації винаходу лікарський засіб містить етилові ефіри ДГК та/або ДПК. У ще більш переважному варіанті реалізації винаходу рівень етилових ефірів ДГК та/або ДПК в лікарському засобі становить від 30 % до 50 %. Лікарський засіб може додатково містити етилові ефіри ЕПК, наприклад, від 30 % до 50 % або щонайменше 80 % або щонайменше 85 % або щонайменше 90 % або щонайменше 95 % від загального вмісту жирних кислот в лікарському засобі. Такі лікарські засоби придатні для введення суб'єктам-людям або тваринам при лікуванні медичних станів, як розкрито в цьому документі.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

У варіанті реалізації винаходу, якщо це доречно, ліпід або олія, переважно олія з насіння, за винаходом або придатні у відповідності до винаходу, містять близько такі рівні жиру, як розкрито в Таблиці в розділі Прикладів, наприклад, насіння 14 СТ136-27-18-2 або СТ136-27-18-19 з Табл. 10 або олія насіння із Табл. 12, 20, 22, 23 або 24.

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

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

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

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

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фігура 1. Аеробні шляхи біосинтезу ДГК.

Фігура 2. Карта ділянки вставки Т-ДНК від лівої до правої меж rJP3416-GA7. RB позначає праву межу; LB, ліва межа; TER, ділянка термінатора транскрипції/поліаденілювання; PRO, промотор; кодуєчі ділянки показані над стрілками, промотори і термінатори — під стрілками. Micru-Δ6D, Δ6-десатураза *Micromonas pusilla*; Pycro-Δ6E, Δ6-елонгаза *Pyramimonas cordata*; Pavsa-Δ5D, Δ5-десатураза *Pavlova salina*; Picpa-ω3D, ω3-десатураза *Pichia pastoris*; Pavsa-Δ4D, Δ4-десатураза *P. salina*; Lackl-Δ12D, Δ12-десатураза *Lachancea kluyveri*; Pycro-Δ5E, Δ5-елонгаза *Pyramimonas cordata*. NOS позначає ділянку термінатора транскрипції/поліаденілювання нопалінсинтази *Agrobacterium tumefaciens*; FP1, укорочений промотор напіву *Brassica napus*; FAE1, промотор *Arabidopsis thaliana* FAE1; Lectin, ділянка термінатора транскрипції/поліаденілювання лектину *Glycine max*; Cnl1 і Cnl2 позначає промотор або термінатор конлініну 1 або конлініну 2 *Linum usitatissimum*. ДПМ позначає ділянку прикріплення до матриксу Rb7 з *Nicotiana tabacum*.

Фігура 3. Карта ділянки вставки Т-ДНК від лівої до правої межі rJP3404. Позначення такі ж, як на Фіг. 2.

Фігура 4. Вміст олії (мас./мас.) проти вмісту ДГК, як відсоток від загального вмісту жирних кислот у ліпіді із трансгенного насіння *Arabidopsis thaliana*.

5 Фігура 5. Позиційний аналіз розподілу ЯМР на А) жири тунця і, В) олії трансгенних зерен ДГК *Arabidopsis*. Піки, позначені «ДГК-альфа» представляють кількість ДГК, присутньої в положеннях sn-1 і sn-3 ТАГ (без позиційної переваги це дорівнювало б 66 % від загальної ДГК), тоді як піки, позначені «ДГК-бета» представляють кількість ДГК, присутньої в положенні sn-2 ТАГ (без переваги це дорівнювало би 33 % ДГК).

10 Фігура 6. Аналіз методом РХ-МС основних різновидів триацилгліцеролів, що містять ДГК, в трансгенному насінні, що розвивається (сірі), і зрілих (чорні), *A. thaliana*. Число, наступне за ДГК, позначає загальну кількість атомів вуглецю і загальну кількість подвійних зв'язків у двох інших жирних кислотах. Таким чином, ДГК/34:1 може також бути позначений як ТАГ 56:7, тощо.

15 Фігура 7. (А) Основна структура фітостерину з кільцем і нумерацією бічного ланцюга. (В) Хімічні структури деяких фітостеринів.

Фігура 8. Філогенетичне дерево відомих ЛФКАТ (LPAAT).

Фігура 9. Різноманітні ферменти обміну ацилу, які переносять жирні кислоти між ФХ, пулами КоА і пулами ТАГ. Адаптовано із Singh et al. (2005).

20 Фігура 10. Рівні ДГК у загальному вмісті жирних кислот олії із насіння, одержаної з індивідуального насіння T2 від насіння *B. parvus*, трансформованого Т-ДНК із конструкції GA7-modB. Кожна точка ілюструє рівень ДГК в індивідуальному насінні, причому кожен стовпчик точок представляє насіння T2 від індивідуальної рослини T1.

КЛЮЧ ДО ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 — послідовність нуклеотидів rJP3416-GA7.

25 SEQ ID NO: 2 — послідовність нуклеотидів rGA7-mod_B.

SEQ ID NO: 3 — кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ12-десатурази *Lachancea kluyveri* в рослинах.

SEQ ID NO: 4 — Δ12-десатураза *Lachancea kluyveri*.

30 SEQ ID NO: 5 — кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії ω3-десатурази *Pichia pastoris* в рослинах.

SEQ ID NO: 6 — ω3-десатураза *Pichia pastoris*.

SEQ ID NO: 7 — відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ6-десатуразу *Micromonas pusilla*.

SEQ ID NO: 8 — кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ6-десатурази *Micromonas pusilla* в рослинах.

35 SEQ ID NO: 9 — Δ6-десатураза *Micromonas pusilla*.

SEQ ID NO: 10 — відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ6-десатуразу *Ostreococcus lucimarinus*.

SEQ ID NO: 11 — кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ6-десатурази *Ostreococcus lucimarinus* в рослинах.

40 SEQ ID NO: 12 — Δ6-десатураза *Ostreococcus lucimarinus*.

SEQ ID NO: 13 — Δ6-десатураза *Ostreococcus tauri*.

SEQ ID NO: 14 — відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ6-елонгазу *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 15 — кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ6-елонгази *Pyramimonas cordata* в рослинах (вкорочена на 3' кінці і кодуюча функціональну елонгазу).

45 SEQ ID NO: 16 — Δ6-елонгаза *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 17 — вкорочена Δ6-елонгаза *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 18 — відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ5-десатуразу *Pavlova salina*.

SEQ ID NO: 19 — кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ5-десатурази *Pavlova salina* в рослинах.

50 SEQ ID NO: 20 — Δ5-десатураза *Pavlova salina*.

SEQ ID NO: 21 — відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ5-десатуразу *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 22 — Δ5-десатураза *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 23 — відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ5-елонгазу *Pyramimonas cordata*.

55 SEQ ID NO: 24 — кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ5-елонгази *Pyramimonas cordata* в рослинах.

SEQ ID NO: 25 — Δ5-елонгаза *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 26 — відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ4-десатуразу *Pavlova salina*.

SEQ ID NO: 27 — кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ4-десатурази *Pavlova salina* в рослинах.

60 SEQ ID NO: 28 — Δ4-десатураза *Pavlova salina*.

SEQ ID NO: 29 — Δ9-елонгаза *Isochrysis galbana*.

SEQ ID NO: 30 — кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Δ9-елонгази *Emiliana huxleyi* в росликах.

SEQ ID NO: 31 — Δ9-елонгаза *Emiliana huxleyi*.

5 SEQ ID NO 32 — відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ9-елонгазу *Pavlova pinguis*.

SEQ ID NO 33 — Δ9-елонгаза *Pavlova pinguis*.

SEQ ID NO 34 — відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ9-елонгазу *Pavlova salina*.

SEQ ID NO 35 — Δ9-елонгаза *Pavlova salina*.

10 SEQ ID NO 36 — відкрита рамка зчитування, кодуюча Δ8-десатуразу *Pavlova salina*.

SEQ ID NO 37 — Δ8-десатураза *Pavlova salina*.

SEQ ID NO 38 — вірусний супресор V2.

SEQ ID NO 39 — відкрита рамка зчитування, кодуюча вірусний супресор V2.

SEQ ID NO 40 — ЛФКАТ2 *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID NO 41 — ЛФКАТ *Limnanthes alba*.

15 SEQ ID NO 42 — ЛФКАТ *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO 43 — ЛФКАТ *Micromonas pusilla*.

SEQ ID NO 44 — ЛФКАТ *Mortierella alpina*.

SEQ ID NO 45 — ЛФКАТ *Braccisa napus*.

SEQ ID NO 46 — ЛФКАТ *Brassica napus*.

20 SEQ ID NO 47 — ω3 десатураза *Phytophthora infestans*.

SEQ ID NO 48 — ω3 десатураза *Thalassiosira pseudonana*.

SEQ ID NO 49 — ω3 десатураза *Pythium irregulare*.

SEQ ID NO 50-58 — Олігонуклеотидні праймери/зонди.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

25 Загальні способи і визначення

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

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

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

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

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

Деякі визначення

В цьому документі терміни «екстрагований рослинний ліпід» і «виділений рослинний ліпід» позначають ліпідну композицію, що виділена, наприклад, шляхом подрібнення, з рослини або її частини, такої як насіння. Екстрагований ліпід може являти собою відносно неочищену композицію, одержану, наприклад, шляхом подрібнення насіння рослини, або більш очищену композицію, з якої більшість, якщо не всі з одного або більше або кожного із води, нуклеїнових кислот, білків і вуглеводів, що походять з рослинного матеріалу, видалені. Нижче розкриті приклади способів очищення. У варіанті реалізації винаходу екстрагований або виділений рослинний ліпід містить щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, або щонайменше близько 95 мас./ % мас. ліпиду в

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

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

У даному описі такі терміни, як «екстрагований мікробний ліпід» або «екстрагована мікробна олія» мають значення, аналогічне відповідним термінам «екстрагований рослинний ліпід» і «екстрагована рослинна олія», відповідно, причому основна відмінність полягає у джерелі ліпиду або олії.

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

В цьому документі термін «жирна кислота» позначає карбонову кислоту (або органічну кислоту), часто з довгим аліфатичним хвостом, насиченим або ненасиченим. Зазвичай жирні
 50 кислоти містять ланцюг вуглець-вуглецевих зв'язків завдовжки щонайменше 8 атомів вуглецю, більш переважно завдовжки щонайменше 12 атомів вуглецю. Переважні жирні кислоти за винаходом містять вуглецеві ланцюги завдовжки 18-22 атомів вуглецю (жирні кислоти C18, C20, C22), більш переважно 20-22 атоми вуглецю (C20, C22) і, найбільш переважно, 22 атоми
 55 вуглецю (C22). Більшість жирних кислот, що зустрічаються в природі, містить парну кількість атомів вуглецю, оскільки в їх біосинтезі приймає участь ацетат, що містить два атоми вуглецю. Жирні кислоти можуть бути у вільному стані (неестерифіковані) або в естерифікованій формі, наприклад, як частина тригліцеролу, діацилгліцеролу, моноацилгліцеролу, зв'язки з ацил-КоА (тіоефір) або іншої форми зв'язку. Жирна кислота може бути естерифікованою як фосфоліпід,
 60 наприклад, форми фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну, фосфатидилсерину,

фосфатидилгліцеролу, фосфатидилінозитолу або дифосфатидилгліцеролу. У варіанті реалізації жирна кислота естерифікована метильною або етильною групою, наприклад, метиловий або етиловий ефір ПНЖК C20 або C22. Переважними жирними кислотами є метилові або етилові ефіри ЕПК, ДПК або ДГК або суміші ЕПК і ДГК або ЕПК, ДПК і ДГК або ЕПК і ДПК.

«Насичені жирні кислоти» не містять подвійних зв'язків або інших функціональних груп уздовж ланцюга. Термін «насичений» позначає водень, з тим, що всі атоми вуглецю (окрім групи карбонової кислоти $[-COOH]$) містять максимально можливу кількість водню. Іншими словами, омега (ω) кінець містить 3 атоми водню (CH_3-), і кожен атом вуглецю в межах ланцюга містить 2 атоми водню ($-CH_2-$).

«Ненасичені жирні кислоти» за формою подібні до насичених жирних кислот, за винятком того, що одна або більше алкенових функціональних груп присутні вздовж ланцюга, причому кожен алкен замінює одинарний зв'язок « $-CH_2-CH_2-$ » частини ланцюга подвійним зв'язком « $-CH=CH-$ » (тобто, вуглець приєднаний подвійним зв'язком до іншого атома вуглецю). Два наступні атоми вуглецю в ланцюгу, які приєднані до кожної із сторін подвійного зв'язку, можуть бути присутніми в цис або транс конфігурації, переважно у цис конфігурації. У варіанті реалізації склад жирних кислот ліпиду або олії за винаходом включає менш ніж 1 % жирних кислот, що містять подвійні вуглець-вуглецеві зв'язки у транс конфігурації (транс жирні кислоти).

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

В цьому документі терміни «довголанцюгова поліненасичена жирна кислота» і «ДЛ-ПНЖК» позначають жирну кислоту, яка містить щонайменше 20 атомів вуглецю у вуглецевому ланцюгу і щонайменше два подвійні вуглець-вуглецеві зв'язки, і таким чином включають ДДЛ-ПНЖК. В цьому документі терміни «поліненасичена жирна кислота з дуже довгим ланцюгом» і «ДДЛ-ПНЖК» позначають жирну кислоту, яка містить щонайменше 22 атоми вуглецю у вуглецевому ланцюгу і щонайменше три подвійні вуглець-вуглецеві зв'язки. Звичайно, кількість атомів вуглецю у вуглецевому ланцюгу жирних кислот відноситься до нерозгалуженого вуглецевого ланцюга. Якщо вуглецевий ланцюг розгалужений, кількість атомів вуглецю виключає атоми вуглецю бічних груп. В одному варіанті реалізації винаходу довголанцюгова поліненасичена жирна кислота являє собою $\omega 3$ жирну кислоту, тобто, містить десатурацію (подвійний вуглець-вуглецевий зв'язок) в положенні третього вуглець-вуглецевого зв'язку від метильного кінця жирної кислоти. В іншому варіанті реалізації винаходу довголанцюгова поліненасичена жирна кислота є $\omega 6$ жирною кислотою, тобто, містить десатурацію (подвійний вуглець-вуглецевий зв'язок) в положенні шостого вуглець-вуглецевого зв'язку від метильного кінця жирної кислоти. В іншому варіанті реалізації винаходу довголанцюгова поліненасичена жирна кислота вибрана з групи, що складається з: арахідонової кислоти (АРК, 20:4 $\Delta 5,8,11,14$; $\omega 6$), ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК, 20:4 $\Delta 8,11,14,17$, $\omega 3$), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК, 20:5 $\Delta 5,8,11,14,17$; $\omega 3$), докозапентаєнової кислоти (ДПК, 22:5 $\Delta 7,10,13,16,19$, $\omega 3$) або докозагексаєнової кислоти (ДГК, 22:6 $\Delta 4,7,10,13,16,19$, $\omega 3$). Крім того, ДЛ-ПНЖК можуть являти собою дигомо- γ -лінолеву кислоту (ДГЛК) або ейкозатриєнову кислоту (ЕТрК, 20:3 $\Delta 11,14,17$, $\omega 3$). Буде очевидно, що ДЛ-ПНЖК, одержана у відповідності до винаходу, може бути сумішшю будь-яких або всіх згаданих вище сполук, і може містити іншу ДЛ-ПНЖК або похідні будь-якої з наведених ДЛ-ПНЖК. У переважному варіанті реалізації $\omega 3$ жирні кислоти являють собою щонайменше ДГК та/або ДПК, переважно, ДПК і ДГК, або ЕПК, ДПК і ДГК, або ЕПК і ДПК. Після екстракції з рослини ДГК присутня у ліпіді або олії на рівні 20,1-30 % або від 20,1 % до 35 %, переважно від 30 % до 35 % від складу загальних жирних кислот. Наприклад, ДГК присутня на рівні від 30,1 % до 35 % від складу загальних жирних кислот. У варіанті реалізації рівень ДГК перевищує рівень ДПК, більш переважно, перевищує рівень кожної з ЕПК і ДПК, найбільш переважно, перевищує сумарний рівень ЕПК і ДПК. У альтернативному варіанті реалізації ДПК присутня на рівні від близько 7 % до 30 % або 35 %, і ДГК присутня або відсутня, або, якщо вона присутня, то присутня на рівні менш ніж 2,0 %, переважно менш ніж 1,0 %, більш переважно, менш ніж 0,5 % від загального складу жирних кислот у композиції і, найбільш переважно, відсутня або не піддається виявленню. Це може забезпечуватися відсутністю активності $\Delta 4$ -десатурази у клітині. У варіанті реалізації рівень ДПК перевищує ЕПК, більш переважно перевищує рівень кожної з ЕПК і ДГК, найбільш переважно перевищує сумарний рівень ЕПК і ДГК. У даному варіанті реалізації ДГК

може бути відсутня або, якщо вона присутня, то присутня на рівні менш ніж 0,5 % від складу загальних жирних кислот.

Додатково, в цьому документі терміни «довголанцюгова поліненасичена жирна кислота» і «поліненасичена жирна кислота з дуже довгим ланцюгом» позначають жирну кислоту, що знаходиться у вільному стані (неестерифіковану) або в естерифікованій формі, наприклад, як частина тригліцеролу, діацилгліцеролу, моноацилгліцеролу, зв'язки з ацил-КоА (тіоефір) або іншої форми зв'язку. У тригліцеролі, ДЛ-ПНЖК або ДДЛ-ПНЖК, такі як ДГК або ДПК, можуть бути естерифіковані у положеннях sn-1/3 або sn-2, або тригліцерол може містити дві або три ацильних групи, вибрані із ацильних груп ДЛ-ПНЖК і ОДЛ-ПНЖК. Наприклад, тригліцерол може містити ДГК або ДПК як в sn-1, так і в sn-3 положеннях. Жирна кислота може бути естерифікованою як фосфоліпід, наприклад, форми фосфатидилхоліну (ФХ), фосфатидилетаноламіну, фосфатидилсерину, фосфатидилгліцеролу, фосфатидилінозитулу або дифосфатидилгліцеролу. Тому, ДЛ-ПНЖК може бути присутньою як суміш форм в ліпіді клітини або очищеній олії або ліпіді, екстрагованих з клітин, тканин або організмів. У переважних варіантах реалізації винаходу розкривається олія, що містить щонайменше 75 % або щонайменше 85 % триацилгліцеролів, причому решта представлена іншими формами ліпідів, такими як згадані вище, у яких присутні щонайменше вказані триацилгліцероли, що містять ДЛ-ПНЖК. В подальшому олія може бути додатково очищена або оброблена, наприклад гідролізом із сильною основою, з метою вивільнення вільних жирних кислот, або дистиляцією, тощо.

В цьому документі вираз «загальні $\omega 6$ жирні кислоти» або «загальний вміст $\omega 6$ жирних кислот» або подібний позначає суму всіх $\omega 6$ жирних кислот, естерифікованих і неестерифікованих, в екстрагованому ліпіді, олії, рекомбінантній клітині, частині рослини або насінні, як визначається контекстом, виражену як відсоток від загального вмісту жирних кислот. Вказані $\omega 6$ жирні кислоти включають (за наявності) ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК і $\omega 6$ -ДПК, але виключають будь-які $\omega 3$ жирні кислоти і мононенасичені жирні кислоти. Все $\omega 6$ жирні кислоти, присутні в рослинах, насінні, ліпіді або оліях за винаходом, входять до класу поліненасичених жирних кислот (ПНЖК).

В цьому документі вираз «нові $\omega 6$ жирні кислоти» або «вміст нових $\omega 6$ жирних кислот» або подібний позначає суму всіх $\omega 6$ жирних кислот, за винятком ЛК, естерифікованих і неестерифікованих, в екстрагованому ліпіді, олії, рекомбінантній клітині, частині рослини або насінні, як визначається контекстом, виражену, як відсоток від загального вмісту жирних кислот. Такі нові $\omega 6$ жирні кислоти є жирними кислотами, продукованими в клітинах, рослинах, частинах рослини і насінні за винаходом шляхом експресії генетичних конструкцій (екзогенні полінуклеотиди), введених в клітини, і включають (за наявності) ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК і $\omega 6$ -ДПК, але виключають ЛК і будь-які $\omega 3$ жирні кислоти і мононенасичені жирні кислоти. Характерний загальний вміст $\omega 6$ жирних кислот і вміст нових $\omega 6$ жирних кислот визначається за перетворенням жирних кислот у зразку на МЕЖК і результатами аналізу ГХ, як розкрито в Прикладі 1.

В цьому документі вираз «загальні $\omega 3$ жирні кислоти» або «загальний вміст $\omega 3$ жирних кислот» або подібний позначає суму всіх $\omega 3$ жирних кислот, естерифікованих і неестерифікованих, в екстрагованому ліпіді, олії, рекомбінантній клітині, частині рослини або насінні, як визначається контекстом, виражену, як відсоток від загального вмісту жирних кислот. Такі $\omega 3$ жирні кислоти включають (якщо вони присутні) АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК, і виключають будь-які $\omega 6$ жирні кислоти і мононенасичені жирні кислоти. Все $\omega 6$ жирні кислоти, присутні в рослинах, насінні, ліпіді або оліях за винаходом, входять до класу поліненасичених жирних кислот (ПНЖК).

В цьому документі вираз «нові $\omega 3$ жирні кислоти» або «вміст нових $\omega 3$ жирних кислот» або подібний позначає суму всіх $\omega 3$ жирних кислот, за винятком АЛК, естерифікованих і неестерифікованих, в екстрагованому ліпіді, олії, рекомбінантній клітині, частині рослини або насінні, як визначається контекстом, виражену, як відсоток від загального вмісту жирних кислот. Такі нові $\omega 3$ жирні кислоти є $\omega 3$ жирними кислотами, продукованими в клітинах, рослинах, частинах рослин і насінні за винаходом шляхом експресії генетичних конструкцій (екзогенні полінуклеотиди), введених в клітини, і включають (якщо вони присутні) СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК, але виключають АЛК і будь-які $\omega 6$ жирні кислоти і мононенасичені жирні кислоти. Характерний загальний вміст $\omega 3$ жирних кислот і вміст нових $\omega 3$ жирних кислот визначається за перетворенням жирних кислот у зразку на МЕЖК і результатами аналізу ГХ, як розкрито в Прикладі 1.

Як буде зрозуміле кваліфікованому фахівцю, термін «одержання частини рослини» як стадія у способі за винаходом може включати одержання однієї або більше частин рослини для

застосування у способі. Одержання частини рослини включає збирання врожаю частини рослини із рослини, наприклад, за допомогою комбайна, або придбання частини рослини або одержання частини рослини від постачальника. В іншому прикладі, одержання частини рослини може бути придбанням рослини у будь-кого іншого, хто зібрав урожай частини рослини.

- 5 Білки десатураза, елонгаза і ацилтрансфераза та гени, що кодують їх, які можуть застосовуватися у відповідності до винаходу, є будь-якими з відомих в рівні техніки або їх гомологами або похідними. Приклади таких генів і розмір кодованих білків наведені в Табл. 1. Ферменти десатурази, для яких продемонстровано участь в біосинтезі ДЛ-ПНЖК, всі належать до групи так званих «фронт-енд» десатураз. Переважними білками або комбінаціями білків є
- 10 кодовані генетичними конструкціями, запропонованими в даному описі як SEQ ID NO: 1 і 2.

Таблица 1

Клоновані гени, що беруть участь в біосинтезі ДЛ-ПНЖК

Фермент	Тип організму	Вид	Номери доступу	Розмір білка (ак)	Посилання
Δ4-десатураза	Найпростіші	<i>Euglena gracilis</i>	AY278558	541	Meyer et al., 2003
	Водорості	<i>Pavlova lutherii</i>	AY332747	445	Tonon et al., 2003
		<i>Isochrysis galbana</i>	AAV33631	433	Pereira et al., 2004b
		<i>Pavlova salina</i>	AAV15136	447	Zhou et al., 2007
	Траустохітридієві	<i>Thraustochytrium aureum</i>	AAN75707 AAN75708 AAN75709 AAN75710	515	Отсутствуют
		<i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC21685	AAM09688	519	Qiu et al., 2001
Δ5-десатураза	Ссавці	<i>Homo sapiens</i>	AF199596	444	Cho et al., 1999b Leonard et al., 2000b
	Нематода	<i>Caenorhabditis elegans</i>	AF11440, NM_069350	447	Michaelson et al., 1998b; Watts and Browse, 1999b
	Гриби	<i>Mortierella alpina</i>	AF067654	446	Michaelson et al., 1998a; Knutzon et al., 1998
		<i>Pythium irregulare</i>	AF419297	456	Hong et al., 2002a
		<i>Dictyostelium discoideum</i>	AB022097	467	Saito et al., 2000
		<i>Saprolegnia diclina</i>		470	WO02081668
	Діатомові	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	AY082392	469	Domergue et al., 2002
	Водорості	<i>Thraustochytrium</i> sp.	AF489588	439	Qiu et al., 2001
		<i>Thraustochytrium aureum</i>		439	WO02081668
		<i>Isochrysis galbana</i>		442	WO02081668
	Мох	<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583465	484	Kajikawa et al., 2004
Δ6-десатураза	Ссавці	<i>Homo sapiens</i>	NM_013402	444	Cho et al., 1999a; Leonard et al., 2000
		<i>Mus musculus</i>	NM_019699	444	Cho et al., 1999a
	Нематода	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Z70271	443	Napier et al., 1998

Фермент	Тип організму	Вид	Номери доступу	Розмір білка (ак)	Посилання
	Рослини	Borago officinales	U79010	448	Sayanova et al., 1997
		Echium	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto et al., 2002
		Primula vialii	AY234127	453	Sayanova et al., 2003
		Anemone leveillei	AF536525	446	Whitney et al., 2003
	Мохи	Ceratodon purpureus	AJ250735	520	Sperling et al., 2000
		Marchantia polymorpha	AY583463	481	Kajikawa et al., 2004
		Physcomitrella patens	CAA11033	525	Girke et al., 1998
	Гриби	Mortierella alpina	AF110510 AB020032	457	Huang et al., 1999; Sakuradani et al., 1999
		Pythium irregulare	AF419296	459	Hong et al., 2002a
		Mucor circinelloides	AB052086	467	NCBI*
		вид Rhizopus	AY320288	458	Zhang et al., 2004
		Saprolegnia diclina		453	WO02081668
	Діатомові	Phaedactylum tricornutum	AY082393	477	Domergue et al., 2002
	Бактерії	Synechocystis	L11421	359	Reddy et al., 1993
	Водорості	Thraustochytrium aureum		456	WO02081668
Біфункціональна Δ5/Δ6-десатураза	Риба	Danio rerio	AF309556	444	Hastings et al., 2001
C20 Δ8-десатураза	Водорості	Euglena gracilis	AF139720	419	Wallis and Browse, 1999
	Рослини	Borago officinales	AAG43277	446	Sperling et al., 2001
Δ6-елонгаза	Нематода	Caenorhabditis elegans	NM_069288	288	Beaudoin et al., 2000
	Мохи	Physcomitrella patens	AF428243	290	Zank et al., 2002
		Marchantia polymorpha	AY583464	290	Kajikawa et al., 2004
	Гриби	Mortierella alpina	AF206662	318	Parker-Barnes et al., 2000
	Водорості	Pavlova lutheri**		501	WO 03078639
		Thraustochytrium	AX951565	271	WO 03093482
		вид Thraustochytrium**	AX214454	271	WO 0159128
ПНЖК-елонгаза	Ссавці	Homo sapiens	AF231981	299	Leonard et al., 2000b; Leonard et al., 2002
		Rattus norvegicus	AB071985	299	Inagaki et al., 2002
		Rattus norvegicus**	AB071986	267	Inagaki et al., 2002
		Mus musculus	AF170907	279	Tvrđik et al., 2000
		Mus musculus	AF170908	292	Tvrđik et al., 2000
	Риба	Danio rerio	AF532782	291 (282)	Agaba et al., 2004
		Danio rerio**	NM_199532	266	Lo et al., 2003
	Черв'як	Caenorhabditis elegans	Z68749	309	Abbott et al., 1998 Beaudoin et al.,

Фермент	Тип організму	Вид	Номери доступу	Розмір білка (ак)	Посилання
					2000
	Водорості	<i>Thraustochytrium aureum</i> **	AX464802	272	WO 0208401-A2
		<i>Pavlova lutheri</i> **		320	WO 03078639
Δ9-елонгаза	Водорості	<i>Isochrysis galbana</i>	AF390174	263	Qi et al., 2002
		<i>Euglena gracilis</i>		258	WO 08/128241
Δ5-елонгаза	Водорості	<i>Ostreococcus tauri</i>	AAV67798	300	Meyer et al., 2004
		<i>Pyramimonas cordata</i>		268	WO 2010/057246
		вид <i>Pavlova</i> CCMP459	AAV33630	277	Pereira et al., 2004b
		<i>Pavlova salina</i>	AAV15135	302	Robert et al., 2009
	Діатомові	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	AAV67800	358	Meyer et al., 2004
	Риба	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CAM55862	295	WO 06/008099
	Мох	<i>Marchantia polymorpha</i>	BAE71129	348	Kajikawa et al., 2006

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

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

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

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

Хоча деякі ферменти конкретно розкриваються в цьому документі як «біфункціональні», відсутність такого терміну не обов'язково означає, що конкретний фермент не володіє іншою активністю, окрім конкретно розкритої.

Десатурази

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

В цьому документі «Δ4-десатураза» позначає білок, який здійснює реакцію десатурації із введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 4-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. Щонайменше «Δ4-десатураза» здатна перетворювати ДПК на ДГК. Переважно, «Δ4-десатураза» здатна перетворювати ДПК-КоА на ДГК-КоА, тобто, вона є ацил-КоА десатуразою. У варіанті реалізації «Δ4-десатураза» здатна перетворювати ДПК, естерифіковану в положенні sn-2 ФХ на ДГК-ФХ. Переважно Δ4-десатураза володіє більш високою активністю по відношенню до ДПК-КоА, ніж по відношенню до ДПК-ФХ. Стадія десатурації з утворенням ДГК з ДПК каталізується Δ4-десатуразою в організмах, що не відносяться до ссавців, і ген, що кодує даний фермент, виділений із виду прісноводних найпростіших *Euglena gracilis* і морських видів *Thraustochytrium* (Qiu et al., 2001; Meyer et al., 2003). В одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ4-

десатурази відповідає представлений в SEQ ID NO: 28, або Δ4-десатурази виду *Thraustochytrium*, її біологічно активному фрагменту або послідовності амінокислот, щонайменше на 80 % ідентичній SEQ ID NO: 28. У варіанті реалізації рослина, частина рослини (така як насіння) або клітина за винаходом або застосовувані у відповідності до винаходу, що продукують високі рівні ДПК, наприклад, ДПК становить від 5 % до 35 % від загального вмісту жирних кислот, що екстрагуються, не містять гена, що кодував би функціональну Δ4-десатуразу.

В цьому документі «Δ5-десатураза» позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 5-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. У варіанті реалізації жирнокислотний субстрат являє собою ЕТК, і фермент продукує ЕПК. Переважно, «Δ5-десатураза» здатна перетворювати ЕТК-КоА на ЕПК-КоА, тобто є ацил-КоА десатуразою. У варіанті реалізації «Δ5-десатураза» здатна трансформувати ЕТК, естерифіковану у положенні sn-2 ФХ. Переважно Δ⁵десатураза володіє більш високою активністю по відношенню до ЕТК-КоА, ніж по відношенню до ЕТК-ПК. Приклади «Δ5-десатураз» наведені у Ruiz-Lopez et al. (2012) і Petrie et al. (2010a), а також у Табл. 1 цього документу. В одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ5-десатурази відповідає представлений в SEQ ID NO: 20, її біологічно активному фрагменту або послідовності амінокислот, щонайменше на 80 % ідентичній SEQ ID NO: 20. В іншому варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ5-десатурази відповідає представлений SEQ ID NO: 22, її біологічно активному фрагменту, або послідовності амінокислот, щонайменше на 53 % ідентичній SEQ ID NO: 32. В іншому варіанті реалізації винаходу Δ5-десатураза одержана з виду *Thraustochytrium* або *Emiliania huxleyi*.

В цьому документі «Δ6-десатураза» позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, із введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 6-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. У варіанті реалізації жирнокислотний субстрат являє собою АЛК, і фермент продукує СДК. Переважно, «Δ6-десатураза» здатна перетворювати АЛК-КоА на СДК-КоА, тобто є ацил-КоА десатуразою. У варіанті реалізації «Δ6-десатураза» здатна перетворювати АЛК, естерифіковану в положенні sn-2 ФХ. Переважно, Δ6-десатураза володіє більш високою активністю по відношенню до АЛК-КоА, ніж по відношенню до АЛК-ФХ. Крім того, Δ6-десатураза може володіти активністю Δ5-десатурази, і при цьому носити назву Δ5/Δ6 біфункціональної десатурази, за умови, що вона володіє більш високою активністю Δ6-десатурази відносно АЛК, ніж активністю Δ5-десатурази відносно ЕТК. Приклади Δ6-десатураз наведені у Ruiz-Lopez et al. (2012) і Petrie et al. (2010a), а також в Табл. 1 цього документу. Переважні Δ6-десатурази одержані з *Micromonas pusilla*, *Pythium irregulare* або *Ostreococcus taurii*.

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

Таблиця 2

Десатурази, які продемонстрували активність на субстраті ацил-КоА

Фермент	Тип організму	Вид	Номери доступу	Размер білка (ак)	Посилання
Δ6-десатураза	Водорості	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30479	449	Hoffmann et al., 2008
		<i>Ostreococcus tauri</i>	AAW70159	456	Domergue et al., 2005
		<i>Micromonas pusilla</i>	EEH58637		Petrie et al., 2010a (SEQ ID NO: 13)

Фермент	Тип організму	Вид	Номери доступу	Размер білка (ак)	Посилання
Δ5-десатураза	Водорості	Mantoniella squamata	CAQ30478	482	Hoffmann et al., 2008
	Рослина	Anemone leveillei	Відсутній		Sayanova et al., 2007
ω3-десатураза	Гриби	Pythium aphanidermatum	FW362186.1	359	Xue et al., 2012; WO2008/054565
	Гриби (оомицет)	Phytophthora sojae	FW362214.1	363	Xue et al., 2012; WO2008/054565
	Гриби (оомицет)	Phytophthora rumorum	FW362213.1	361	Xue et al., 2012; WO2008/054565

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

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

В цьому документі «Δ8-десатураза» позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 8-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. Щонайменше Δ8-десатураза здатна перетворювати ЕТрК на ЕТК. Переважно, «Δ8-десатураза» здатна перетворювати ЕТрК-КоА на ЕТК-КоА, тобто є ацил-КоА десатуразою. У варіанті реалізації «Δ8-десатураза» здатна перетворювати ЕТрК, естерифіковану в положенні sn-2 ФХ. Переважно Δ8-десатураза володіє більш високою активністю по відношенню до ЕТрК-КоА, ніж по відношенню до ЕТРК-ПК. Крім того, Δ8-десатураза може володіти активністю Δ8-десатурази, і при цьому носити назву Δ6/Δ8 біфункціональної десатурази, за умови, що вона володіє більш високою активністю Δ8-десатурази по відношенню до ЕТрК, ніж активністю Δ6-десатурази по відношенню до АЛК. Приклади Δ8-десатураз наведені у Табл. 1. В одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ8-десатурази відповідає представленій SEQ ID NO: 37, її біологічно активним фрагментом або послідовності амінокислот, щонайменше на 80 % ідентичній SEQ ID NO: 37.

В цьому документі «ω3-десатураза» позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 3-ого вуглець-вуглецевого зв'язку від метилового кінця жирнокислотного субстрату. Таким чином, ω3-десатураза може перетворювати ЛК на АЛК і ГЛК на СДК (всі С18 жирні кислоти), або ДГЛК на ЕТК та/або АРК на ЕПК (С20 жирні кислоти). Деякі ω3-десатурази (група I) володіють активністю тільки на С18 субстратах, таких як рослинні і ціанобактеріальні ω3-десатурази. Такі ω3-десатурази також є Δ15-десатуразами. Інші ω3-десатурази виявляють активність на субстратах С20 без активності (група II) або з деякою активністю (група III) на субстратах С18. Такі ω3-десатурази також є Δ17-десатуразами. Переважними ω3-десатуразами є група III типу, яка перетворює ЛК на АЛК, ГЛК

на СДК, ДГЛК на ЕТК і АРК на ЕПК, наприклад, *Pichia pastoris* ω 3-десатураза (SEQ ID NO: 6). Приклади ω 3-десатураз включають описані Pereira et al. (2004a) (ω 3-десатураза *Saprolegnia diclina*, група II), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) і Spsychalla et al. (1997) (ω 3-десатураза *C. elegans*, група III). В переважному варіанті реалізації винаходу ω 3-десатураза являє собою грибову ω 3-десатуразу. В цьому документі «грибова ω 3-десатураза» позначає ω 3-десатуразу, одержану з грибового джерела, в тому числі, оомицетного джерела, або її варіант з послідовністю амінокислот, щонайменше на 95 % ідентичною їй. Гени, що кодують численні ω 3-десатурази, виділені з грибових джерел, таких як, наприклад, *Phytophthora infestans* (номер доступу CAJ30870, WO2005083053; SEQ ID NO: 47), *Saprolegnia diclina* (номер доступу AAR20444, Pereira et al., 2004a і патент США № 7211656), *Pythium irregulare* (WO2008022963, Група II; SEQ ID NO: 49), *Mortierella alpina* (Sakuradani et al., 2005; номер доступу BAD91495; WO2006019192), *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al., 2004; номер доступу XP_002291057; WO2005012316, SEQ ID NO: 48), *Lachancea kluyveri* (також відомий як *Saccharomyces kluyveri*; Oura et al., 2004; номер доступу AB118663). Xue et al. (2012) описує ω 3-десатурази з оомицетів *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora sojae* і *Phytophthora ramorum*, здатні ефективно перетворювати жирнокислотні субстрати ω 6 на відповідні ω 3 жирні кислоти, з перевагою у відношенні субстратів C20, тобто ті, що володіють вираженішою активністю Δ 17-десатурази порівняно з активністю Δ 15-десатурази. Такі ферменти не володіють активністю Δ 12-десатурази, але здатні використовувати жирні кислоти в ацил-КоА і фосфоліпідній фракції як субстрати.

У більш переважному варіанті реалізації винаходу грибова ω 3-десатураза являє собою ω 3-десатуразу/ Δ 15-десатуразу *Pichia pastoris* (також відома як *Komagataella pastoris*) (Zhang et al., 2008; номер доступу EF116884; SEQ ID NO: 6) або поліпептид, який щонайменше на 95 % ідентичний їй.

У варіанті реалізації винаходу ω 3-десатураза здатна здійснювати щонайменше одне з наступних перетворень: АРК на ЕПК, ДГЛК на ЕТК, ГЛК на СДК, АРК на ЕПК і ДГЛК на ЕТК, АРК на ЕПК і ГЛК на СДК, або всі три з них.

В одному варіанті реалізації винаходу ω 3-десатураза володіє активністю Δ 17-десатурази по відношенню до жирної кислоти C20, яка містить щонайменше три подвійних вуглець-вуглецевих зв'язки, переважно АРК. В іншому варіанті реалізації винаходу ω 3-десатураза володіє активністю Δ 15-десатурази по відношенню до жирної кислоти C18, яка містить три подвійних вуглець-вуглецевих зв'язки, переважно ГЛК. Переважно обидва види активності присутні.

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

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

В цьому документі « Δ 17-десатураза» позначає білок, який здійснює реакцію десатурації, з введенням подвійного вуглець-вуглецевого зв'язку в положенні 17-го вуглець-вуглецевого зв'язку від карбоксильного кінця жирнокислотного субстрату. Крім того, Δ 17-десатураза розцінюється як ω 3-десатураза, якщо вона діє на субстрат C20, з введенням десатурації в положенні зв'язку ω 3.

У переважному варіанті реалізації винаходу Δ 12-десатураза та/або Δ 15-десатураза являє собою грибову Δ 12-десатуразу або грибову Δ 15-десатуразу. В цьому документі «грибова Δ 12-десатураза» або «грибова Δ 15-десатураза» позначає Δ 12-десатуразу або Δ 15-десатуразу, одержану з грибового джерела, зокрема, оомицетного джерела, або її варіант, послідовність

амінокислот якого є щонайменше на 95 % ідентичною їй. Гени, що кодують численні десатурази, виділені з грибкових джерел. У US 7211656 розкрита $\Delta 12$ -десатураза із *Saprolegnia diclina*. У WO2009016202 розкриті грибкові десатурази з *Helobdella robusta*, *Laccaria bicolor*, *Lottia gigantea*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Monosiga brevicollis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Naegleria gruberi*, *Nectria haematococca*, *Nematostella vectensis*, *Phycomyces blakesleeanae*, *Trichoderma reesei*, *Physcomitrella patens*, *Postia placenta*, *Selaginella moellendorffii* і *Microdochium nivale*. У WO2005/012316 розкрита $\Delta 12$ -десатураза з *Thalassiosira pseudonana* та інших грибів. У WO2003/099216 розкриті гени, кодуючі грибкові $\Delta 12$ -десатурази і $\Delta 15$ -десатурази, виділені з *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* і *Mortierella alpina*. У WO2007133425 розкриті грибкові $\Delta 15$ десатурази, виділені з: *Saccharomyces kluyveri*, *Mortierella alpina*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* і *Magnaporthe grisea*. Переважна $\Delta 12$ десатураза виділена з *Phytophthora sojae* (Ruiz-Lopez et al., 2012).

Іншим підкласом грибкових $\Delta 12$ -десатураз і грибкових $\Delta 15$ -десатураз є біфункціональні грибкові $\Delta 12/\Delta 15$ -десатурази. Гени, що кодують їх, клоновані з *Fusarium moniliforme* (номер доступу DQ272516, Damude et al., 2006), *Acanthamoeba castellanii* (номер доступу EF017656, Sayanova et al., 2006), *Perkinsus marinus* (WO2007042510), *Claviceps purpurea* (номер доступу EF536898, Meesapyodsuk et al., 2007) і *Coprinus cinereus* (номер доступу AF269266, Zhang et al., 2007).

В іншому варіанті реалізації винаходу $\omega 3$ -десатураза володіє щонайменше деякою активністю, переважно більшою активністю, по відношенню до субстрату ацил-КоА, ніж до субстрату відповідного ацил-ФХ. В цьому документі «відповідний субстрат ацил-ФХ» позначає естерифікований жирною кислотою в положенні sn-2 фосфатидилхолін (ФХ), в якому жирна кислота є такою ж жирною кислотою, як в субстраті ацил-КоА. Наприклад, субстрат ацил-КоА може бути АРК-КОА, і тоді відповідний субстрат ацил-ФХ являє собою sn-2 АРК-ФХ. У варіанті реалізації винаходу активність щонайменше вдвічі вища. Переважно $\omega 3$ -десатураза володіє щонайменше деякою активністю по відношенню до субстрату ацил-КоА і відповідного субстрату ацил-ФХ, і володіє активністю по відношенню до субстратів C18 і C20. Приклади таких $\omega 3$ -десатураз відомі серед клонованих грибкових десатураз, наведених вище.

В іншому варіанті реалізації винаходу $\omega 3$ -десатураза містить послідовність амінокислот, представлену SEQ ID NO: 6, її біологічно активний фрагмент, або послідовність амінокислот, яка є щонайменше на 60 % ідентичною SEQ ID NO: 6, переважно є щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичною SEQ ID NO: 6.

Ще в одному варіанті реалізації винаходу десатураза для використання в цьому винаході володіє вищою активністю по відношенню до субстрату ацил-КоА, ніж відповідного субстрату ацил-ФХ. В іншому варіанті реалізації винаходу десатураза для використання в цьому винаході володіє вищою активністю по відношенню до субстрату ацил-ФХ, ніж відповідного субстрату ацил-КоА, але володіє деякою активністю по відношенню до обох субстратів. Як окреслено вище, «відповідний субстрат ацил-ФХ» позначає естерифікований жирною кислотою в положенні sn-2 фосфатидилхолін (ФХ), в якому жирна кислота є такою ж, як жирна кислота в субстраті ацил-КоА. У варіанті реалізації винаходу вища активність означає щонайменше вдвічі вищу активність. У варіанті реалізації винаходу десатураза являє собою $\Delta 5$ - або $\Delta 6$ -десатуразу, або $\omega 3$ -десатуразу, приклади яких розкриті, без обмеження, в Табл. 2. З метою тестування того, на який субстрат діє десатураза, а саме, на субстрат ацил-КоА або ацил-ФХ, можуть бути проведені аналізи на дріжджових клітинах, як описано в Domergue et al. (2003) і (2005). Крім того, здатність десатурази діяти на субстрат ацил-КоА може передбачатися, якщо елонгаза, яка експресується разом з десатуразою, демонструє ефективність ферментного перетворення в рослинних клітинах щонайменше близько 90 %, якщо елонгаза каталізує елонгацію продукту десатурази. Базуючись на цьому, $\Delta 5$ -десатураза і $\Delta 4$ -десатурази, що експресуються із конструкта GA7 (Приклади 2 і 3) та їх варіанти (Приклад 5) здатні до десатурації відповідних ацил-КоА субстратів, ЕТК-КоА і ДПК-КоА.

Елонгази

Біохімічні докази наводять на думку про те, що елонгація жирної кислоти складається з 4-х стадій: конденсація, відновлення, дегідратація і друге відновлення. В контексті цього винаходу, «елонгаза» позначає поліпептид, що каталізує стадію конденсації в присутності інших членів комплексу елонгації, у відповідних фізіологічних умовах. Показано, що гетерологічна або гомологічна експресія в клітині тільки конденсуючого компонента («елонгаза») комплексу елонгації білка потрібна для елонгації відповідного ацильного ланцюга. Тому, введена елонгаза може успішно рекрутувати відновлювальну і дегідратувальну активність з трансгенного хазіяїна, з метою здійснення успішної елонгації ацилу. Вважається, що за специфічність реакції елонгації

щодо довжини ланцюга і ступеня десатурації жирнокислотних субстратів відповідає компонент конденсації. Крім того, вважається, що цей компонент є обмежуючим швидкість в реакції елонгації.

В цьому документі «Δ5-елонгаза» щонайменше здатна перетворювати ЕПК на ДПК. Приклади Δ5-елонгаз включають розкриті у WO2005/103253. В одному варіанті реалізації винаходу Δ5-елонгаза володіє активністю по відношенню до ЕПК з утворенням ДПК із ефективністю щонайменше 60 %, більш переважно щонайменше 65 %, більш переважно щонайменше 70 % або найбільш переважно щонайменше 80 % або 90 %. В додатковому варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ5-елонгази представлена SEQ ID NO: 25, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 47 % ідентичною SEQ ID NO: 25. У подальшому варіанті реалізації винаходу Δ6-елонгаза походить з *Ostreococcus taurii* або *Ostreococcus lucimarinus* (US2010/088776).

В цьому документі «Δ6-елонгаза» щонайменше здатна перетворювати СДК на ЕТК. Приклади Δ6-елонгаз включають наведені в Табл. 1. В одному варіанті реалізації винаходу елонгаза містить послідовність амінокислот, представлену SEQ ID NO: 16, її біологічно активний фрагмент (наприклад, фрагмент, розкритий як SEQ ID NO: 17), або послідовність амінокислот, щонайменше на 55 % ідентичну одній або обом з SEQ ID NO: 16 або SEQ ID NO: 17. У варіанті реалізації винаходу Δ6-елонгаза одержана з *Physcomitrella patens* (Zank et al., 2002; номер доступу AF428243) або *Thalassiosira pseudonana* (Ruiz-Lopez et al., 2012).

В цьому документі «Δ9-елонгаза» щонайменше здатна перетворювати АЛК на ЕТрК. Приклади Δ9-елонгаз включають наведені в Табл. 1. В одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ9-елонгази представлена SEQ ID NO: 29, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 80 % ідентичною SEQ ID NO: 29. В іншому варіанті реалізації Δ9-елонгаза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 31, її біологічно активний фрагмент або послідовність амінокислот, щонайменше на 81 % ідентичну SEQ ID NO: 31. У іншому варіанті реалізації Δ9-елонгаза містить послідовність амінокислот, представлену в SEQ ID NO: 33, її біологічно активний фрагмент або послідовність амінокислот, щонайменше на 50 % ідентичну SEQ ID NO: 33. В іншому варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот Δ9-елонгази представлена SEQ ID NO: 35, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот, щонайменше на 81 % ідентичною SEQ ID NO: 35. У подальшому варіанті реалізації винаходу Δ9-елонгаза володіє вищою активністю по відношенню до ω6 субстрату, ніж відповідного ω3 субстрату, або навпаки.

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

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

Інші ферменти

Трансгени, введені до рекомбінантної клітини, такої як мікробна клітина, або трансгенної рослини або її частини, можуть додатково кодувати ЛФААТ. В цьому документі термін «l-ацил-гліцерол-3-фосфат ацилтрансфераза» (ЛФКАТ), що також має назву ацилтрансферази лізофосфатидинової кислоти або ацил-КоА-лізофосфатидат-ацилтрансферази, позначає білок, який ацилює sn-1-ацил-гліцерол-3-фосфат (sn-1 G-3-P) в положенні sn-2, з утворенням фосфатидної кислоти (ФК). Таким чином, термін «активність l-ацил-гліцерол-3-фосфат ацилтрансферази» позначає ацилювання (sn-1 G-3-P) в положенні sn-2, з утворенням ФК (ЄС 2.3.1.51). Переважними ЛФКАТ є такі, що можуть використовувати поліненасичений C22 ацил-КоА як субстрат, для перенесення поліненасиченої групи ацилу C22 в положення sn-2 ЛФК, з утворенням ФК. У варіанті реалізації поліненасичений C22 ацил-КоА є ДГК-КоА та/або ДПК-КоА. Приклади таких ЛФКАТ наведені в Прикладі 13 і можуть бути протестовані, як розкрито в цьому документі. У варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот ЛФКАТ, придатна у відповідності до винаходу, представлена будь-якою з SEQ ID NO: 40-46, її біологічно активним фрагментом або послідовністю амінокислот, щонайменше на 40 % ідентичною будь-якій із SEQ

ID NO: 40-46. У іншому варіанті реалізації ЛФААТ не містить послідовності амінокислот, представленої в будь-якій із SEQ ID NO: 44. У переважному варіанті реалізації ЛФААТ, придатна у відповідності до винаходу, яка може використовувати поліненасичений жирний ацил-КоА субстрат C22, переважно ДГК-КоА та/або ДПК-КоА, містить послідовність амінокислот, представлену в будь-якій із SEQ ID NO: 41, 42 і 44, її біологічно активний фрагмент або послідовність амінокислот, щонайменше на 40 % ідентичну будь-якій одній або більше із SEQ ID NO: 41, 42 і 44. У переважному варіанті реалізації ЛФААТ, придатна у відповідності до винаходу, яка може використовувати поліненасичений жирний ацил-КоА субстрат C22, переважно ДГК-КоА та/або ДПК-КоА, містить послідовність амінокислот, представлену будь-якою із SEQ ID NO: 41 або 42, її біологічно активний фрагмент або послідовність амінокислот, щонайменше на 40 % ідентичну будь-якій одній або більше із SEQ ID NO: 41 і 42. У варіанті реалізації, у якому генетична конструкція експресує $\Delta 4$ -десатуразу у трансгенній клітині, та/або трансгенна клітина продукує ДГК, ЛФААТ переважно являє собою ЛФААТ, окрім ЛФААТ *Mortierella alpina*, послідовність амінокислот якої представлена як SEQ ID NO: 44. Як альтернатива, якщо генетична конструкція не експресує $\Delta 4$ -десатурази у трансгенній клітині, та/або трансгенна клітина продукує ДПК, але не ДГК, ЛФААТ переважно являє собою ЛФААТ *Mortierella alpina*, послідовність амінокислот якої представлена як SEQ ID NO: 44, або іншу ЛФААТ, що здатна використовувати ДПК-КоА як субстрат для перенесення ДПК у ЛФХ, з утворенням ДАГ, що містить ДПК у положенні sn-2.

Трансгени, введені до рекомбінантної клітини, трансгенна рослина або її частина, можуть додатково кодувати ДГАТ. В цьому документі термін «діацилгліцерол ацилтрансфераза» (ЄС 2.3.1.20; ДГАТ), позначає білок, який переносить жирну групу ацилу з ацил-КоА до діацилгліцерольного субстрату, з утворенням триацилгліцеролу. Тому, термін «активність діацилгліцерол ацилтрансферази» позначає перенесення ацил-КоА до діацилгліцеролу, з утворенням триацилгліцеролу. Існує три відомих види ДГАТ, позначені як ДГАТ1, ДГАТ2 і ДГАТ3, відповідно. Поліпептиди ДГАТ1 звичайно містять 10 трансмембранних доменів, ДГАТ2 звичайно містять 2 трансмембранних домени, тоді як ДГАТ3 звичайно є розчинним. Приклади поліпептидів ДГАТ1 включають поліпептиди, кодовані генами ДГАТ1 з *Aspergillus fumigatus* (номер доступу XP_755172), *Arabidopsis thaliana* (CAB44774), *Ricinus communis* (AAR11479), *Vernicia fordii* (ABC94472), *Vernonia galamensis* (ABV21945, ABV21946), *Euonymus alatus* (AAV31083), *Caenorhabditis elegans* (AAF82410), *Rattus norvegicus* (NP_445889), *Homo sapiens* (NP_036211), а також їх варіанти та/або мутанти. Приклади поліпептидів ДГАТ2 включають поліпептиди, кодовані генами ДГАТ2 з *Arabidopsis thaliana* (номер доступу NP_566952), *Ricinus communis* (AAV16324), *Vernicia fordii* (ABC94474), *Mortierella ramanniana* (AAK84179), *Homo sapiens* (Q96PD7, Q58HT5), *Bos taurus* (Q70VD8), *Mus musculus* (AAK84175), *Micromonas CCMR1545*, а також їх варіанти та/або мутанти. Приклади поліпептидів ДГАТ3 включають поліпептиди, кодовані генами ДГАТ3 з арахісу (*Arachis hypogaea*, Saha, et al., 2006), а також їх варіанти та/або мутанти.

Поліпептиди/пептиди

Терміни «поліпептид» і «білок» загалом використовуються рівнозначно.

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

«Біологічно активний фрагмент» є частиною поліпептиду, визначеного в цьому документі, яка зберігає певну активність повнорозмірного референтного поліпептиду, наприклад, володіючою активністю десатурази та/або елонгази або іншою ферментною активністю. Біологічно активні фрагменти в цьому документі виключають повнорозмірний поліпептид.

Біологічно активні фрагменти можуть бути частиною будь-якого розміру, до тих пір, поки вони зберігають певну активність. Переважно біологічно активний фрагмент зберігає щонайменше 10 %, щонайменше 50 %, щонайменше 75 % або щонайменше 90 % активності повнорозмірного білка.

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

Варіанти/мутанти амінокислотної послідовності поліпептидів, розкритих в цьому документі, можуть бути одержані шляхом введення відповідних модифікацій нуклеотидів до нуклеїнової кислоти, розкритої в цьому документі, або синтезу цільового поліпептиду *in vitro*. Такі варіанти/мутанти включають, наприклад, делеції, інсерції або заміни залишків в межах послідовності амінокислот. Комбінація делеції, вставки і заміни може бути здійснена таким чином, щоб одержати кінцеву конструкцію, за умови, що кінцевий пептидний продукт володіє бажаною ферментною активністю.

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

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

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

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

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

Полінуклеотиди

Крім того, у винаході розкриваються та/або застосовуються полінуклеотиди, які можуть бути, наприклад, геном, виділеним полінуклеотидом, химерною генетичною конструкцією, такою як

молекула Т-ДНК або химерна ДНК. Це може бути ДНК або РНК геномного або синтетичного походження, двохланцюгова або одноланцюгова, а також комбінована з вуглеводом, ліпідами, білком або іншими матеріалами з метою здійснення конкретної активності, розкритої в цьому документі. Термін «полінуклеотид» використовується в цьому документі рівнозначно з терміном «молекула нуклеїнової кислоти».

У варіанті реалізації полінуклеотид не є природним. Приклади неприродних полінуклеотидів включають, але не обмежуючись цим, мутантні (наприклад, одержані із застосуванням способів, описаних у даному описі), і полінуклеотиди, у яких відкрита рамка зчитування, що кодує білок, функціонально пов'язана із промотором, з яким вона не пов'язана в природі (як, наприклад, у конструкціях, описаних у даному описі).

Таблиця 3

Приклади замінів

Початковий залишок	Приклади замінів
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pto, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

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

В цьому документі «химерна ДНК» або «химерна генетична конструкція» або подібний вираз позначає будь-яку молекулу ДНК, що не є природною молекулою ДНК в її природному місцеположенні, яка також позначається в цьому документі як «конструкція ДНК». Як правила, химерна ДНК або химерний ген містить регуляторну і транскрибовану або кодуєчу білок

послідовності, які не знайдені функціонально пов'язаними одна з однією в природі, тобто які є гетерологічними по відношенню одна до одної. Відповідно, химерна ДНК або химерний ген можуть містити регуляторні послідовності і кодуєчі послідовності, що походять з різних джерел, або регуляторні послідовності і кодуєчі послідовності, що походять з одного джерела, але організовані в інший спосіб, ніж знайдені в природі.

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

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

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

Полінуклеотиди за винаходом можуть містити, в порівнянні з молекулами, що зустрічаються в природі, одну або більше мутацій, що являють собою делеції, вставки або заміни нуклеотидних залишків. Полінуклеотиди, що містять мутації відносно референтної послідовності, можуть бути природними (тобто, виділеними з природного джерела) або синтетичними (наприклад, одержаними в результаті сайт-спрямованого мутагенезу або тасування ДНК з нуклеїнової кислоти, як розкрито вище). Таким чином, очевидно, що

полінуклеотиди за винаходом можуть бути одержані з природного джерела або можуть бути рекомбінантними. Переважними полінуклеотидами є такі, що містять кодуючі ділянки, кодон-оптимізовані для трансляції в клітинах рослини, як відомо з рівня техніки.

Рекомбінантні вектори

5 Рекомбінантна експресія може застосовуватися для одержання рекомбінантних клітин або рослин або частин рослини за винаходом. Один варіант реалізації цього винаходу включає рекомбінантний вектор, який містить щонайменше одну молекулу полінуклеотиду, розкриту в цьому документі, вставлену в будь-який вектор, здатний доставити молекулу полінуклеотиду в клітину-хазяїна. Рекомбінантні вектори включають вектори експресії. Рекомбінантні вектори 10 містять гетерологічні полінуклеотидні послідовності, тобто, полінуклеотидні послідовності, що в природі не знайдені суміжними з молекулами полінуклеотиду, розкритими в цьому документі, які переважно одержані з інших видів, ніж ті, з яких одержана(и) молекула(и) полінуклеотиду. Вектор може являти собою РНК або ДНК, і звичайно є плазмідною. Плазмідні вектори звичайно містять додаткові послідовності нуклеїнових кислот, які забезпечують простоту селекції, ампліфікації і трансформації касети експресії в прокаріотних клітинах, наприклад, одержані з рUC вектори, одержані з рSK вектори, одержані з рGEM вектори, одержані з рSP вектори, одержані з рBS вектори, або переважно бінарні вектори, що містять одну або більш ділянок Т-ДНК. Додаткові послідовності нуклеїнових кислот включають джерела реплікації для 20 забезпечення автономної реплікації вектора, гени селекційних маркерів, переважно кодуючі резистентність до антибіотика або гербіциду, унікальні множинні сайти клонування, які забезпечують множинні сайти вставки послідовностей нуклеїнових кислот або генів, кодованих в конструкції нуклеїнової кислоти, і послідовності, які підвищують активність трансформації прокаріотних і еукаріотних (особливо рослинних) клітин. Рекомбінантний вектор може містити більш ніж один полінуклеотид, розкритий в цьому документі, наприклад, три, чотири, п'ять або 25 шість полінуклеотидів, розкритих в цьому документі, в комбінації, переважно химерну генетичну конструкцію за винаходом, в якій кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з послідовностями контролю експресії, активними в цільовій клітині. Більш ніж один полінуклеотид, розкритий в цьому документі, наприклад, 3, 4, 5 або 6 полінуклеотидів, переважно ковалентно сполучені в єдиному рекомбінантному векторі, переважно в межах 30 єдиної молекули Т-ДНК, яка в подальшому може бути введена як єдина молекула в клітину, з одержанням рекомбінантної клітини за винаходом, і переважно інтегрована в геном рекомбінантної клітини, наприклад, в трансгенній рослині. Таким чином, полінуклеотиди, сполучені у такий спосіб, будуть успадковуватися разом як єдиний генетичний локус у нащадка рекомбінантної клітини або рослини. Рекомбінантний вектор або рослина може містити два або 35 більше таких рекомбінантних векторів, кожен з яких містить декілька полінуклеотидів, наприклад, кожен рекомбінантний вектор містить 3, 4, 5 або 6 полінуклеотидів.

«Функціонально пов'язаний» в цьому документі позначає функціональне взаємовідношення між двома або більш сегментами нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК). Як правило, це 40 позначає функціональне взаємовідношення транскрипційного регуляторного елементу (промотору) і транскрибованої послідовності. Наприклад, промотор функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, такою як полінуклеотид, розкритий в цьому документі, якщо він стимулює або модулює транскрипцію кодуючої послідовності у відповідній клітині. Загалом, транскрипційні регуляторні елементи промотору, які функціонально пов'язані з транскрибованою послідовністю, є фізично суміжними з транскрибованою послідовністю, тобто, 45 вони є *cis*-діючими. Однак, для деяких транскрипційних регуляторних елементів, таких як енхансери, немає необхідності бути фізично суміжними або розташованими в безпосередній близькості від кодуючих послідовностей, транскрипцію яких вони збільшують.

Якщо присутні декілька промоторів, кожен промотор незалежно може бути таким же або іншим. Переважно, щонайменше 3 і максимум до 6 різних промоторних послідовностей 50 застосовуються в рекомбінантному векторі, щоб управляти експресією екзогенних полінуклеотидів.

Крім того, рекомбінантні молекули, наприклад, химерні ДНК або генетичні конструкції, можуть містити: (а) один або більш секреторних сигналів, що кодують сигнальні пептидні послідовності, щоб дозволити експресованому поліпептиду, розкритому в цьому документі, 55 секретуватися з клітини, яка продукує поліпептид, або яка забезпечує локалізацію експресованого поліпептиду, наприклад, для утримання поліпептиду в ендоплазматичному ретикулумі (ЕР) клітини або перенесення в пластиду, та/або (б) химерні послідовності, які приводять до експресії молекул нуклеїнових кислот у вигляді химерних білків. Приклади відповідних сигнальних сегментів включають будь-який сигнальний сегмент, здатний 60 спрямовувати секрецію або локалізацію поліпептиду, розкритого в цьому документі. Додатково,

рекомбінантні молекули можуть містити проміжні та/або нетрансльовані послідовності, навколо та/або в межах послідовностей нуклеїнових кислот молекул нуклеїнових кислот, розкритих в цьому документі.

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

Прикладами селекційних маркерів є маркери, що забезпечують резистентність до антибіотиків, наприклад, резистентність до ампіциліну, еритроміцину, хлорамфеніколу або тетрацикліну, переважно резистентність до канаміцину. Приклади селекційних маркерів для селекції рослин включають, без обмеження, ген *hug*, який кодує резистентність до гігromіцину В; ген неоміцин фосфотрансферази (*nrptII*), що забезпечує резистентність до канаміцину, паромоміцину, G418; ген глутатіон-S-трансферази з печінки щурів, що забезпечує резистентність до гербіцидів-похідних глутатіону, наприклад, таких як, розкриті у EP 256223; ген глутамінсинтетази, що при надмірній експресії забезпечує резистентність до інгібіторів глутамінсинтетази, таких як фосфінотрицин, наприклад, розкритий у WO 87/05327, ген ацетилтрансферази із *Streptomyces viridochromogenes*, що забезпечує резистентність до селекційного агента фосфінотрицину, наприклад, розкритий у EP 275957, ген, що кодує 5-енолшикімат-3-фосфат синтазу (ЄШФС), що забезпечує переносимість N-фосфонометилглїцину, наприклад, розкритий Hinchee et al. (1988), або переважно ген *bar*, що забезпечує резистентність до білафосу, наприклад, розкритий у WO91/02071.

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

Експресія

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

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

Описаний цілий ряд конститутивних промоторів, які активні в клітинах рослини. Придатні промотори для конститутивної експресії в рослинах включають, без обмеження, промотор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), 35S мозаїчного вірусу ранника шишкуватого (FMV) та індукцибельний світлом промотор з маленької субдиниці рибулозо-1,5-біс-фосфат карбоксилази.

З метою експресії у вихідних тканинах рослини, таких як листя, насіння, коріння або стебло, промоторам, використовуваним у відповідності до цього винаходу, переважно властива
 20 відносно висока експресія в цих конкретних тканинах. Численні приклади добре відомі з рівня техніки. Крім того, різноманітні промотори рослинних генів, що регулюються у відповідь на екологічні, гормональні, хімічні та/або пов'язані із розвитком сигнали, також можуть використовуватися для експресії генів у клітинах рослини, або може бути переважним використання орган-специфічних промоторів.

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

Переважають промотори специфічної для насіння експресії включають: i) промотори з генів, що кодують ферменти, які беруть участь в біосинтезі жирних кислот та їх акумуляції в насінні, наприклад, десатурази і елонгази жирних кислот, ii) промотори з генів, що кодують запасні білки для зберігання в насінні, і iii) промотори з генів, що кодують ферменти, які беруть участь в біосинтезі вуглеводів та їх акумуляції в насінні. Придатними специфічними для насіння промоторами є промотор гена напину олійної рапсу (US 5608152), промотор USP *Vicia faba* (Baumlein et al., 1991), промотор олеозину *Arabidopsis* (WO98/45461), промотор фазеоліну *Phaseolus vulgaris* (US 5504200), промотор Vce4 *Brassica* (WO91/13980) або промотор легуміну LeB4 з *Vicia faba* (Baumlein et al., 1992), і промотори, які забезпечують специфічну для насіння експресію в однодольних, таких як маїс, ячмінь, пшениця, жито, рис, тощо. Як придатні слід
 45 зазначити такі промотори: промотор гена lpt2 або lpt1 ячменю (WO95/15389 і WO95/23230) або промотори, розкриті у WO99/16890 (промотори з гена гордеїну ячменю, гена глютеліну рису, гена оризину рису, гена проламіну рису, гена гліадину пшениці, гена глютеліну пшениці, гена зеїну маїсу, гена глютеліну вівса, гена казірину сорго, гена секаліну жита). Інші промотори включають розкриті Broun et al. (1998), Potenza et al. (2004), US20070192902 і US20030159173. У варіанті реалізації винаходу специфічний для насіння промотор переважно експресується в певних частинах насіння, таких як ембріон, сім'ядоля(i) або ендосперм. Приклади таких специфічних промоторів включають, без обмеження, промотор FP1 (Ellerstrom et al., 1996), промотор легуміну гороху (Perrin et al., 2000), промотор фітогемаглютиніну боба (Perrin et al., 2000), промотори конлінін 1 і конлінін 2 для генів, що кодують запасні білки 2S льону (Cheng et al., 2010), промотор гена FAE1 з *Arabidopsis thaliana*, промотор BnGLP гена глобулін-подібного
 50 білка *Brassica napus*, промотор LPXR гена пероксиредоксину з *Linum usitatissimum*.

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

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

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

Трансгенні рослини

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

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

трансформації, причому може застосовуватися будь-який спосіб за рішенням фахівця в цій галузі техніки.

Терміни «насіння» і «зерно» в цьому документі використовуються рівнозначно. «Зерно» позначає зріле зерно, наприклад, зібране в процесі збору врожаю зерно, або зерно, яке ще знаходиться на рослині, але готове для збору врожаю, а також може позначати насіння після набухання або проростання, згідно контексту. Зріле зерно або насіння звичайно містить вологу в кількості менше, ніж близько 18–20 %, переважно менш ніж 10 %. Вміст води в насінні Brassica, наприклад, насінні рапсу у зрілому стані звичайно становить близько 4-8 % або 6-8 %, переважно від близько 4 % до близько 6 %. «Насіння, що розвивається» в цьому документі позначає насіння до настання зрілості, звичайно знайдене в репродуктивних структурах рослини після запліднення або цвітіння, але може також позначати таке насіння до настання зрілості, яке виділено з рослини.

В цьому документі термін «одержання частини рослини» або «одержання насіння» позначає будь-які засоби для одержання частини рослини або насіння, відповідно, зокрема, збір урожаю частин рослини або насіння з рослин у полі або в закритому просторі, такому як теплиця або камера для росту, або придбання або одержання від постачальника частин рослини або насіння. Стандартні умови росту в теплиці включають денну температуру 22-24°C і нічну температуру 16-18°C, із природним сонячним світлом. Насіння може бути придатним для насадження, тобто здатним до проростання і утворення рослини-нащадка, або альтернативно, оброблено таким чином, що більше не може прорости, наприклад розколоне, шліфоване або змолочене насіння, придатне для застосування при одержанні харчових продуктів або в харчуванні або для екстракції ліпідів за винаходом.

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

Рослини або частини рослин за винаходом або вживані відповідно до винаходу переважно є фенотипово нормальними. В цьому документі термін «фенотипово нормальний» позначає генетично модифіковану рослину або орган рослини, особливо запасуючий орган, такий як насіння, бульбу або плід, не володіючий істотною мірою зниженою здатністю до росту і відтворення, в порівнянні з немодифікованою рослиною або органом рослини. У варіанті реалізації винаходу генетично модифікована рослина або орган рослини, які є фенотипово нормальними, володіють здатністю до росту або відтворення, по суті такою ж, як ізогенна рослина або орган, що не містить вказаного полінуклеотиду. Переважно біомаса, темпи росту, швидкість проростання, розмір запасуючого органу, життєздатність пилку, фертильність чоловічих і жіночих рослин, розмір насіння та/або кількість утворених життєздатних зерен становить не менше 90 % від показників рослини, яка не містить вказаного екзогенного полінуклеотиду, при вирощуванні в ідентичних умовах. Переважно життєздатність пилку рослини за винаходом або рослин, одержаних із насіння за винаходом, становить близько 100 % відносно життєздатності пилку відповідної рослини дикого типу. Даний термін не охоплює ознак рослини, що можуть відрізнятися від рослини дикого типу, але при цьому не впливають негативно на повноцінність рослини з точки зору комерційних цілей, наприклад, фенотип балерини листя саджанця.

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

У переважному варіанті реалізації винаходу рослина є покритонасінною рослиною.

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

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

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

Якщо це доречно, трансгенна рослина або її частина можуть містити додаткові трансгени, що кодують ферменти, які беруть участь у продукуванні ДЛ-ПНЖК, такі як, без обмеження, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 9$ -елонгаза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза, $\Delta 5$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 5$ -елонгаза, діацилгліцерол ацилтрансфераза, ЛФАТ, $\Delta 17$ -десатураза, $\Delta 15$ -десатураза та/або $\Delta 12$ -десатураза. Приклади таких ферментів з одним або більше вказаних видів активності відомі з рівня техніки і включають розкриті в цьому документі. У конкретних прикладах, трансгенна рослина щонайменше містить екзогенні полінуклеотиди, які кодують:

а) $\Delta 4$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -елонгазу і $\Delta 6$ -елонгазу,
 б) $\Delta 4$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -елонгазу і $\Delta 9$ -елонгазу,
 в) $\Delta 4$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -елонгазу, $\Delta 6$ -елонгазу і $\Delta 15$ -десатуразу,
 г) $\Delta 4$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -елонгазу, $\Delta 9$ -елонгазу і $\Delta 15$ -десатуразу,
 д) $\Delta 4$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -елонгазу, $\Delta 6$ -елонгазу і $\Delta 17$ -десатуразу, або

е) $\Delta 4$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -елонгазу, $\Delta 9$ -елонгазу і $\Delta 17$ -десатуразу,
 ж) $\omega 3$ -десатуразу або $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -елонгазу і $\Delta 5$ -елонгазу,

з) $\omega 3$ -десатуразу або $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 9$ -елонгазу і $\Delta 5$ -елонгазу,

і) $\Delta 12$ -десатуразу, $\omega 3$ -десатуразу або $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -елонгазу і $\Delta 5$ -елонгазу,

й) $\Delta 12$ -десатуразу, $\omega 3$ -десатуразу або $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 9$ -елонгазу і $\Delta 5$ -елонгазу,

к) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФАТ), $\omega 3$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -елонгазу, $\Delta 5$ -елонгазу і необов'язково $\Delta 4$ -десатуразу,

л) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФАТ), $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -елонгазу, $\Delta 5$ -елонгазу і необов'язково $\Delta 4$ -десатуразу,

м) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФАТ), $\Delta 12$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -елонгазу, $\Delta 5$ -елонгазу і необов'язково $\Delta 4$ -десатуразу,

н) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФАТ), $\Delta 12$ -десатуразу, $\omega 3$ -десатуразу та/або $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -елонгазу і $\Delta 5$ -елонгазу та необов'язково $\Delta 4$ -десатуразу,

о) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФАТ), $\omega 3$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 9$ -елонгазу, $\Delta 5$ -елонгазу і необов'язково $\Delta 4$ -десатуразу,

п) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФАТ), $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 9$ -елонгазу, $\Delta 5$ -елонгазу і необов'язково $\Delta 4$ -десатуразу,

р) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФАТ), $\Delta 12$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 9$ -елонгазу, $\Delta 5$ -елонгазу і необов'язково $\Delta 4$ -десатуразу, або

с) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), Δ 12-десатуразу, ω 3-десатуразу та/або Δ 15-десатуразу, Δ 8-десатуразу, Δ 5-десатуразу, Δ 9-елонгазу, Δ 5-елонгазу і необов'язково Δ 4-десатуразу.

У варіанті реалізації винаходу екзогенні полінуклеотиди кодують набір поліпептидів, що являють собою Δ 6-десатуразу *Pythium irregulare*, Δ 5-десатуразу *Thraustochytrid* або Δ 5-десатуразу *Emiliana huxleyi*, Δ 6-елонгазу *Physcomitrella patens*, Δ 5-елонгазу *Thraustochytrid* або Δ 5-елонгазу *Ostreococcus taurii*, ω 3-десатуразу *Phytophthora infestans* або ω 3-десатуразу *Pythium irregulare* і Δ 4-десатуразу *Thraustochytrid*.

У варіанті реалізації винаходу рослини за винаходом вирощені в полі, переважно як популяція розміром щонайменше 1000 або 1000000 або 2000000 рослин, які по суті є однаковими, або на площі щонайменше 1 гектар або 2 гектари. Щільність насадження варіює у відповідності до виду рослини, різновиду рослини, клімату, умов ґрунту, норм застосування добрив та інших факторів, як відомо з рівня техніки. Наприклад, рапс звичайно вирощують із щільністю насадження 1,2–1,5 млн. рослин на гектар. Урожай рослин збирають, як відомо з рівня техніки, що може включати валкування, рядне компостування та/або жнива плодів рослин, з подальшою молотью та/або віянням рослинного матеріалу для відокремлення насіння від решти частин рослини, часто у формі полови. Альтернативно, урожай насіння може бути зібраний з рослин у полі в ході єдиного процесу, а саме, комбайнування.

Трансформація рослин

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Підвищення рівнів екзогенної РНК і стабілізована експресія

Супресори сайленсингу

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

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

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

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

Нещодавно було виявлено, що рівні молекул РНК можуть бути збільшені та/або рівні молекул РНК можуть бути стабілізовані протягом численних поколінь шляхом допомогою обмеження експресії супресора сайленсинга насінням рослини або його частиною (WO2010/057246). В цьому документі «білок-супресор сайленсинга» або БСС являє собою будь-який поліпептид, який може експресуватися в клітині рослини, що підвищує рівень продукту експресії іншого трансгена в клітині рослини, особливо в подальших поколіннях, одержаних від початково трансформованої рослини. У варіанті реалізації винаходу БСС являє собою вірусний супресор сайленсинга або його мутант. Велика кількість вірусних супресорів сайленсинга відома з рівня техніки і включає, без обмеження, Р19, V2, Р38, Ре-Рo і RPV-Р0. У варіанті реалізації винаходу вірусний супресор сайленсинга містить послідовність амінокислот, представлену будь-якою з SEQ ID NO: 53–57, її біологічно активним фрагментом, або послідовністю амінокислот щонайменше на 50 % ідентичною будь-якій одній або більше із SEQ ID NO: 53–57, яка додатково володіє активністю супресора сайленсинга.

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

Супресор може бути вибраний з будь-якого джерела, наприклад, рослини, вірусу, ссавця, тощо. Див. WO2010/057246 щодо переліку вірусів, з яких може бути одержаний супресор і позначення білка (наприклад, В2, Р14, тощо.) або кодуючої ділянки для супресора з кожного конкретного вірусу. Множинні копії супресора можуть бути використані. Різні супресори можуть використовуватися спільно (наприклад, в тандемі).

Молекули РНК

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

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

Рівні продукування ДЛ-ПНЖК

Рівні ДЛ-ПНЖК або комбінацій ДЛ-ПНЖК, що продукуються в рекомбінантній клітині або частині рослини, наприклад, насінні, мають велике значення. Рівні можуть бути виражені, як склад (у відсотках) загальних жирних кислот, які є конкретними ДЛ-ПНЖК або групою споріднених ДЛ-ПНЖК, наприклад, $\omega 3$ ДЛ-ПНЖК або $\omega 6$ ДЛ-ПНЖК, або ДДЛ-ПНЖК, або інші, що може бути визначене за способами, відомими з рівня техніки. Крім того, рівень може бути виражений, як вміст ДЛ-ПНЖК, наприклад як відсоток ДЛ-ПНЖК в сухій масі матеріалу, що містить рекомбінантні клітини, наприклад, відсоток від маси насіння, який представляє ДЛ-ПНЖК. Необхідно розуміти, що рівень ДЛ-ПНЖК, що продукується в олійній культурі, може бути значно вищим за показниками вмісту ДЛ-ПНЖК, ніж в овочі або насінні, яке не вирощувалося для цілей одержання олії, хоча обидва можуть мати подібний склад ДЛ-ПНЖК і обидва можуть використовуватися як джерела ДЛ-ПНЖК для споживання людиною або твариною.

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

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

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

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

Специфічна ефективність перетворення обчислена в цьому документі за наступними формулами:

1. ОК на ДГК = $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сума } \% \text{ для ОК, ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$.

2. ЛК на ДГК = $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сума } \% \text{ для ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$.

3. АЛК на ДГК = $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сума } \% \text{ для АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$.

4. ЕПК на ДГК = $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сума } \% \text{ для ЕПК, ДПК і ДГК})$.

5. ДПК на ДГК (ефективність Δ4-десатурази) = $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сума } \% \text{ для ДПК і ДГК})$.

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

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

8. ОК на АЛК = $100 \times (\text{сума } \% \text{ для АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК}) / (\text{сума } \% \text{ для ОК, ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$.

9. Ефективність Δ6-десатурази (на ω3 субстраті АЛК) = $100 \times (\text{сума } \% \text{ для СДК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК}) / (\% \text{ АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$.

10. Ефективність Δ6-елонгази (на ω3 субстраті СДК) = $100 \times (\text{сума } \% \text{ для ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК}) / (\text{сума } \% \text{ для СДК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$.

11. Ефективність Δ5-десатурази (на ω3 субстраті ЕТК) = $100 \times (\text{сума } \% \text{ для ЕПК, ДПК і ДГК}) / (\text{сума } \% \text{ для ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$.

12. Ефективність Δ5-елонгази (на ω3 субстраті ЕПК) = $100 \times (\text{сума } \% \text{ для ДПК і ДГК}) / (\text{сума } \% \text{ для ЕПК, ДПК і ДГК})$.

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

розкрито у Прикладі 6. Такі низькі значення співвідношення можуть бути досягнуті шляхом сполученого використання $\Delta 6$ -десатурази з перевагою по відношенню до субстрату $\omega 3$, разом з $\omega 3$ -десатуразою, особливо грибовою $\omega 3$ -десатуразою, такою як $\omega 3$ -десатураза *Pichia pastoris*, приклад якої наведений в цьому документі.

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

Крім того, може бути обчислена кількість ДГК та/або ДПК, що продукується на гектар, якщо вихід насіння з гектара відомий або може бути оцінений. Наприклад, урожайність рапсу в Австралії зазвичай близько 2,5 тони насіння на гектар, що при вмісті олії 40 % дає близько 1000 кг олії. При вмісті ДГК та/або ДПК 20,1 % в кінцевій олії, це забезпечує близько 200 кг ДГК та/або ДПК на гектар. Якщо вміст олії знижується на 50 %, це все ще забезпечує близько 100 кг ДГК та/або ДПК на гектар.

Одержані на сьогоднішній день докази свідчать про те, що деякі десатурази, що гетерологічно експресуються в дріжджах або рослинах, володіють відносно низькою активністю в комбінації з деякими елонгазами. Дану ситуацію можна покращити, надаючи десатуразі здатність використовувати форму ацил-КоА жирної кислоти як субстрат у синтезі ДЛ-ПНЖК, і це вважається переважним в рекомбінантних клітинах, особливо у клітинах рослини. Особливо переважна комбінація для ефективного синтезу ДГК являє собою грибову $\omega 3$ -десатуразу, наприклад, таку як $\omega 3$ -десатураза *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 6), що є $\Delta 6$ -десатуразою з перевагою по відношенню до $\omega 3$ ацильних субстратів, наприклад, таку як $\Delta 6$ -десатураза *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 9) або її варіанти з ідентичністю послідовності амінокислот щонайменше 95 %.

В цьому документі термін «що по суті не містить» означає, що композиція (наприклад, ліпід або олія) містить невелику кількість (наприклад, менше, ніж близько 0,5 %, менше, ніж близько 0,25 %, менше, ніж близько 0,1 %, або менше, ніж близько 0,01 %) або не містить певного компоненту. У варіанті реалізації винаходу «такий, що по суті не містить» означає, що компонент неможливо знайти за допомогою шаблонної методики аналізу, наприклад, конкретна жирна кислота (наприклад, $\omega 6$ -докозапентаєнова кислота) не може бути знайдена за допомогою газової хроматографії, як у загальних рисах розкрито в Прикладі 1

Одержання олій

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

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

необхідності олія після процесу екстракції може бути об'єднана з освітленою олією, з одержанням змішаної неочищеної олії.

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

Гідратація

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

Лужна рафінація

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

Відбілювання

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

Дезодорування

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

Вінтеризація

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

Переестерифікація

В даному документі «переестерифікація» є способом обміну жирних кислот в межах і між ТАГ або перенесення жирних кислот на інший спирт, з утворенням ефіру. Це може включати

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

Продукти харчування (корми)

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

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

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

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

білки сої, оброблену електродіалізом сироватку, оброблене електродіалізом збиране молоко, молочну сироватку або гідролізати вказаних білків.

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

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

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

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

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

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

Композиції

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

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

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

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

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

Типові дози конкретної жирної кислоти становлять від 0,1 мг до 20 г, при введенні від 1 до 5 разів на день (до 100 г щоденно), і переважно знаходяться в інтервалі від близько 10 мг до близько 1, 2, 5 або 10 г щодня (у вигляді однієї або декількох доз). Як відомо з рівня техніки, бажано вводити щонайменше близько 300 мг/день жирної кислоти, особливо ДЛ-ПНЖК. Однак

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

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

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

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Матеріали і способи

Експресія генів в клітинах рослини в системі тимчасової експресії

Екзогенні генетичні конструкції експресують в клітинах рослини в системі тимчасової експресії, як суттєво описано Voinnet et al. (2003) і Wood et al. (2009).

Аналіз жирних кислот методом газової хроматографії (ГХ)

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

Аналіз ліпідів методом рідинної хроматографії-мас-спектрометрії (PX-MC)

Загальні ліпіди екстрагують з ліофілізованого насіння, що розвивається, через 12 днів після цвітіння (дпц) і зрілого насіння після додавання відомої кількості три-С17:0-ТАГ як внутрішнього стандарту для кількісної оцінки. Екстраговані ліпіди розчиняють в 1 мл 10 мМ бутильованого гідрокситолуолу в суміші бутанол/метанол (1:1, об/об) на 5 мг сухого матеріалу і аналізують за допомогою рідинного хроматографа серії Agilent 1200 з PX та іонізацією електророзпиленням за допомогою PX-MC 6410b з трьома квадрупольними лінзами. Ліпіди хроматографічно розділяють з використанням колонки Ascentis Express RP-Amide (50 мм x 2,1 мм, 2,7 мкм, Supelco) в режимі бінарного градієнта із швидкістю потоку 0,2 мл/хвилину. Рухомі фази: А. 10 мМ амонію форміату в суміші Н₂О/метанол/тетрагідрофуран (50:20:30 об/об/об); В. 10 мМ амонію форміату в суміші Н₂О/метанол/тетрагідрофуран (5:20:75, об/об/об). Переліки для моніторингу множинних реакцій (ММР) базуються на наступних основних жирних кислотах: 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4, 20:1, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5, 22:6, з використанням енергії зіткнення 30 В і фрагментатора 60 В. Нейтральні ліпіди досліджували відносно наступних основних жирних кислот: 16:0 (пальмітинова кислота), 18:0 (стеаринова кислота), 18:1ω9 (олеїнова кислота, ОК), 18:2ω6 (лінолева кислота, ЛК), 18:3ω3 (α-ліноленова кислота, АЛК), 18:4ω3 (стеаридонова кислота, СДК), 20:1, 20:2, 20:3, 20:4ω3, 20:5ω3, 22:4ω3, 22:5ω3, 22:6ω3, тоді як фосфоліпіди сканували щодо наявності молекул С16, С18, С20 і С22 фз подвійними зв'язками 0-3, 0-4, 0-5, 4-6, відповідно.

Окремі ММР ТАГ були ідентифіковані на базі амонізованого іона-прекурсора та іона продукту, утвореного в результаті втрати нейтронів 20:1, СДК, ЕПК і ДГК. ТАГ і ДАГ кількісно визначали із застосуванням 50 мкМ тристеарину і дистеарину як зовнішніх стандартів. ФЛ кількісно визначали з використанням 10 мкМ зовнішніх стандартів ди-18:0-ФХ, ди-17:0-ФА, ди-

17:0-ФЕ, 17:0-17:1-ФГ, ди-18:1-ФІ і ди-17:0-ФС (Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабама, США). Для вибраних видів ТАГ, ДАГ і ФЛ проводили подальше підтвердження за допомогою МС/МС 6520 Q-TOF.

Визначення профілю жирних кислот і вмісту олії в насінні

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

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

15 Площу піку окремого МЕЖК спочатку коректують на базі відповіді у вигляді площі піку відомої кількості таких же МЕЖК, присутніх в комерційному стандарті GLC-411 (NU-CHEK PREP, INC., США). GLC-411 містить рівні кількості 31 жирної кислоти (% мас.), в інтервалі від C8:0 до C22:6. У випадку жирних кислот, які відсутні в стандарті, винахідники використовували відповіді у вигляді площі піку найбільш подібного МЕЖК. Наприклад, відповідь у вигляді площі піку МЕЖК 20 16:1d9 використовували для 16:1d7, і відповідь МЕЖК C22:6 використовували для C22:5. Скоректовані значення площі піку використовують для обчислення маси кожного МЕЖК в зразку, в порівнянні з масою внутрішнього стандарту. Олія зберігається в основному у формі ТАГ, і її масу обчислюють на базі маси МЕЖК. Загальну кількість моль гліцерину визначають шляхом обчислення кількості моль кожного МЕЖК і поділу загальної кількості моль МЕЖК на три. Вміст ТАГ обчислюють як суму гліцерину і жирних ацильних фрагментів, з використанням співвідношення: % мас. олії = $100 \times ((41 \times \text{загальна кількість моль МЕЖК}/3) + (\text{загальна кількість грам МЕЖК} - (15 \times \text{загальна кількість моль МЕЖК}))/\text{грам насіння}$, де 41 і 15 — молекулярна маса залишку гліцеролу і метильної групи, відповідно.

Аналіз вмісту стеролів у зразках олії

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

40 Для аналізу стеролів методом ГХ/ГХ-МС, похідні стерол-О-триметилсилілу (стерол-OTMSi) сушать в потоку газоподібного азоту на термоблоці при 40 °С, і далі повторно розчиняють у хлороформі або гексані безпосередньо перед аналізом методом ГХ/ГХ-МС. Похідні стерол-OTMS аналізують газовою хроматографією (ГХ) за допомогою газового хроматографа Agilent Technologies 6890A GC (Пало-Альто, Каліфорнія, США), обладнаного капілярною колонкою з кварцевого скла Supelco Equity™-1 (15 м x 0,1 мм внутрішній діаметр, товщина плівки 0,1 мкм), ПІД та інжектором з розщепленням/без розщеплення, а також серійним аутосемплером Agilent Technologies 7683B та інжектором. Як газ-носії використовують гелій. Інжекцію зразків здійснюють в режимі без розщеплення при температурі печі 120 °С. Після інжекції температуру печі підвищують до 270 °С із швидкістю 10 °С/хвилину, і в кінці до 300 °С із швидкістю 5 °С/хвилину. Площу піків визначають за допомогою програмного забезпечення Agilent Technologies ChemStation (Пало-Альто, Каліфорнія, США). Результати ГХ містять помилку ± 5 %, від значень площі піку окремих компонентів.

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

Умови ЗТ-ПЛР

Ампліфікацію методом ПЛР із зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР) звичайно здійснюють з використанням системи ЗТ-ПЛР Superscript III One-Step (Invitrogen) в об'ємі 25 мкл, з використанням 10 пмоль прямого праймера і 30 пмоль зворотного праймера, MgSO₄ до кінцевої концентрації 2,5 мМ, 400 нг загальної РНК з буфером і нуклеотидними компонентами згідно інструкцій виробника. Типові температурні режими були наступними: 1 цикл при температурі 45 °С протягом 30 хвилин для виникнення зворотної транскрипції; потім 1 цикл при температурі 94 °С протягом 2 хвилин, і далі 40 циклів з температурою 94 °С протягом 30 секунд, 52 °С протягом 30 секунд, 70 °С протягом 1 хвилини; потім 1 цикл при температурі 72 °С протягом 2 хвилин перед охолодженням реакційних сумішей до 5 °С.

Визначення кількості копій трансгенів за допомогою цифрової ПЛР

Для визначення кількості копій трансгенів у трансгенній рослині застосовували метод ПЛР, як описано нижче. Крім того, даний метод може бути застосований для визначення того, чи є рослина трансгенною по генетичних конструкціях, описаних у даному описі. Близько квадратного сантиметра листової тканини одержують від кожної індивідуальної рослини і вміщують до колекційної мікропробірки (Qiagen). Далі зразки сушать виморожуванням протягом 24-48 годин. Для руйнування зразків з метою екстракції ДНК, до кожного висушеного зразка додають кульки з неіржавіючої сталі, і пробірки струшують на лізаторі для тканин Qiagen. 375 мкл буфера для екстракції (0,1 М Трис-НСІ, рН 8, 0,05 М ЕДТА, рН 8, і 1,25 % ПДВ) додають в кожну пробірку, суміші інкубують при 65 °С протягом 1 години, і потім охолоджують перед додаванням в кожну пробірку 187 мкл 6 М амонію ацетату (4 °С) при ретельному перемішуванні. Далі зразки центрифугують протягом 30 хвилин при 3000 об/хв. Супернатант із кожної пробірки переносять у нові мікропробірки, кожна з яких містить 220 мкл ізопропанолу, для осадження ДНК при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. ДНК збирають центрифугуванням пробірок при 3000 об/хв протягом 30 хвилин, гранули ДНК промивають 320 мкл 70 % етанолу і сушать перед ресуспендуванням ДНК у 225 мкл води. Нерозчинений матеріал гранулюють центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 20 хвилин, і 150 мкл кожного супернатанту переносять на 96-лункові планшети для тривалого зберігання.

Для ефективного і кількісного проведення цифрової ПЛР (ddPCR) ДНК розщеплюють рестрикційними ферментами перед проведенням реакцій ампліфікації, щоб гарантувати фізичне розділення декількох копій трансгенів або множинних інсерцій. Таким чином, аліквоти препаратів ДНК розщеплюють за допомогою EcoRI і BamHI, разом узятих, в об'ємі 20 мкл, із застосуванням 10х буфера EcoRI, 5 мкл ДНК і близько 4 одиниць кожного ферменту на зразок, з інкубацією протягом ночі при 37 °С.

Праймери, використовувані у цих реакціях ПЛР, були сконструйовані із застосуванням програмного забезпечення Primer3, щоб підтвердити, що передбачена відсутність взаємодії між праймерами для референтних генів і генів-мішеней, або така взаємодія не створює проблем за використанням умов. Референтним геном в аналізі був ген рапсу Hmg (група високої рухливості), присутній в одному екземплярі у геномі рапсу (Weng et al., 2004). Оскільки рапс є алотетраплоїдом, припускали наявність 4 копій гена Hmg, тобто 2 алелів кожного із двох генів, у Brassica napus. У реакціях референтного гена застосовували пару праймерів і зонд, що містив подвійну мітку, як указано нижче: Смисловий праймер, Can11 gcgaagcacatcgagtca (SEQ ID NO: 50); Антисмисловий праймер, Can12 gggtgaggtgtagctgagg (SEQ ID NO: 51); Hmg-P3 5'-Hex/tctctac/zen/ccgtctcacatgacgc/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO: 52). Розмір продукту ампліфікації становив 73 пари основ.

У одній реакції ампліфікації гена-мішені, в ході якої виявляли ген селекційного маркера ФФТ для скринінгу всіх трансгенних рослин, смисловий праймер являв собою Can17, atacaagcacggtgatgg (SEQ ID NO: 53); антисмисловий праймер, Can18 tggctaacaggtctaggagga (SEQ ID NO: 54); зонд, PPT-P3 5'-FAM/tggcaaaga/zen/gatttcgagcttctctgc/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO: 55). Розмір даного продукту ампліфікації гена-мішені становив 82 пари основ. У деяких випадках, паралельно проводили другий аналіз гена-мішені, щоб виявити часткові інсерції Т-ДНК. В ході такого другого аналізу виявляли ділянку гена Δ6-десатурази за допомогою смислового праймера, Can23 caagcacgtagtaagagagca (SEQ ID NO: 56), антисмислового праймера, Can24 cagacagcctgaggttagca (SEQ ID NO: 57); зонда, D6des-P3 5'-/FAM/tccccactt/zen/cttagcgaaaggaacga/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO: 58). Розмір даного продукту ампліфікації гена-мішені становив 89 пар основ. У реакціях шаблонно використовували 2 мкл розщеплених препаратів ДНК. Склад реакційної суміші на зразок: референтний смисловий праймер (10 пМ), 1 мкл; референтний антисмисловий праймер (10 пМ), 1 мкл; зонд референтного гена (10 пМ), 0,5 мкл; смисловий праймер гена-мішені (10 пМ), 1 мкл;

антисмисловий праймер гена-мішені (10 пМ), 1 мкл; зонд гена-мішені (10 пМ), 0,5 мкл; суміш реактивів ddPCR, 12,5 мкл; вода 5,5 мкл, в загальному об'ємі 25 мкл.

Далі суміші вміщували до генератора крапельок QX100, який ділив кожен зразок на 20000 крапельок у діапазоні нл. Це здійснювали у 8-лункових картриджах до тих пір, поки всі зразки не були оброблені і перенесені на 96-лунковий ПЛР планшет. Далі планшет опечатували термопластичною проколюваною фольгою за допомогою пристрою для запечатування планшетів. Після цього зразки обробляли з наступними умовами реакції: 95 °C, 10 хвилин, підйом із швидкістю 2,5 °C/с; потім 39 циклів при 94 °C, 30 з підйомом із швидкістю 2,5 °C/с; 61 °C, 1 хвилина, підйом із швидкістю 2,5 °C/с; 98 °C, 10 хвилин, з подальшим охолодженням до 12 °C. Після реакцій ампліфікації ДНК у крапельках, планшети вміщували на пристрій для зчитування крапельок QX100, за допомогою якого аналізували кожен крапельку індивідуально із застосуванням двохбарвної системи виявлення (набір для виявлення FAM або Hex). Цифрові дані ПЛР крапельки розглядали як 1-D графік, на якому кожна крапелька зразка була нанесена на графік інтенсивності флуоресценції, або 2-D графік, на який наносили флуоресценцію (FAM) проти флуоресценції (Hex) для кожної крапельки. За допомогою програмного забезпечення вимірювали кількість позитивних і негативних крапельок для кожного флюорофору (FAM або Hex) у кожному зразку. Далі за допомогою програмного забезпечення апроксимували фракцію позитивних крапельок до алгоритму Пуассона, щоб визначити концентрацію цільової молекули ДНК в одиницях копій/мкл входження. Варіацію кількості копій обчислювали із застосуванням формули: $CNV = (A/B) * Nb$, де концентрація A = концентрація гена-мішені, B = концентрація референтного гена, і Nb = 4, кількість копій референтного гена у геномі.

Оцінка життєздатності пилку

Флуоресцеїну діацетат (ФДА) розчиняли в ацетоні у концентрації 2 мг/мл з одержанням запасного розчину. Розведення ФДА готували безпосередньо перед використанням, по краплях додаючи запасний розчин ФДА до 2 мл розчину сахарози (0,5 M) до насичення, на яке вказувала поява стійкої мутності.

Пропідію йодид (ПЙ) розчиняли у стерильній дистильованій воді у концентрації 1 мг/мл з одержанням запасного розчину. Безпосередньо перед використанням 100 мкл запасного розчину додавали до 10 мл стерильної дистильованої води з одержанням робочого розчину. Для перевірки співвідношення життєздатного і нежиттєздатного пилку, запасні розчини ПЙ і ФДА змішували у співвідношенні 2:3.

Рослини рапсу і гірчиці, трансгенні і дикого типу, вирощували у стандартних умовах в теплиці при 22±2°C із фотоперіодом 16 годин на добу. Зрілі бутони, що були готові розкритися наступного дня, маркували і збирали наступного ранку у 9-10 годин. Пилок із розкритих квітів фарбували сумішшю ФДА/ПЙ та візуалізували за допомогою флуоресцентного мікроскопу Leica MZFLIII. Використовували емісійний фільтр із пропусканням у довгохвильовій ділянці спектру GFP-2 510 нм (пропускання червоного і зеленого світла) із фільтром збудження 480/40 нм для виявлення життєздатного і нежиттєздатного пилку. Нежиттєздатний пилок, який захоплював фарбник ПЙ, мав червоний колір під флуоресцентним мікроскопом, тоді як життєздатний пилок при фарбуванні ПЙ і ФДА мав яскраво-зелений колір.

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

Конструкція бінарного вектора

Бінарні вектори rJP3416-GA7 і rJP3404 (також позначені в даному описі як "GA7", описані в WO 2013/185184), кожен з яких містить 7 гетерологічних генів біосинтезу жирних кислот, кодує 5 десатураз і 2 елонгази, та селекційний маркер для рослин між повторами лівої і правої меж Т-ДНК, присутніми в кожному векторі (Фіг. 2 і 3). У SEQ ID NO: 1 розкрита нуклеотидна послідовність ділянки Т-ДНК rJP3416-GA7 від правої до лівої граничних послідовностей. Обидві генетичні конструкції містять рослинні кодон-оптимізовані гени, що кодують Δ12-десатуразу *Lachancea kluyveri* (містить нуклеотиди 14143–16648 із SEQ ID NO: 1), ω3-десатуразу *Pichia pastoris* (містить нуклеотиди 7654–10156 із SEQ ID NO: 1), Δ6-десатуразу *Micromonas pusilla* (містить нуклеотиди 226–2309 із SEQ ID NO: 1), Δ5- і Δ4-десатурази *Pavlova salina* (містять нуклеотиди 4524–6485 і 10157–14142 із SEQ ID NO: 1, відповідно) і Δ6- і Δ5-елонгази *Pyramimonas cordata* (містить нуклеотиди 2310–4523 і 17825–19967 із SEQ ID NO: 1, відповідно).

Кожна із 7 кодує 7 ділянок в конструкціях знаходиться під контролем специфічного для насіння промотору, причому використовуються три різних промотори, а саме вкорочений промотор напіню *Brassica napus* (pBnFP1), промотор *Arabidopsis thaliana* FAE1 (pAtFAE1) і промотор конлініну 1 *Linum usitatissimum* (pLuCn1). Ці гени біосинтезу жирних кислот спільно кодують повний біохімічний шлях синтезу ДГК, сконструйований з метою перетворення 18:1^{Δ9}

(олеїнова кислота) на 22:6^{A4,7,10,13,16,19} (ДГК). Обидва бінарні вектори містять селекційний маркер для рослин BAR, кодує ділянку, функціонально пов'язану з промотором вірусу мозаїки цвітної капусти 35S (CaMV), що містить подвоєну ділянку енансера, а також з термінатором транскрипції-ділянкою поліаденілювання pos3' *A. tumefaciens*. Селекційний маркер для рослин розташований суміжно з лівою межею Т-ДНК, тобто, дистально на Т-ДНК відносно орієнтації перенесення Т-ДНК в клітини рослини. Це підвищує вірогідність того, що часткове перенесення Т-ДНК, яке, ймовірно, не включає ген селекційного маркера, не пройде селекцію. Кожний з rJP3416-GA7 і rJP3404 містить джерело реплікації RiA4 з *Agrobacterium rhizogenes* (Hamilton, 1997).

Конструкція GA7 також містить дві послідовності ділянки прикріплення до матриксу Rb7 (ДПМ) *Nicotiana tabacum*, як описано Hall et al. (1991). Послідовності ДПМ, які іноді називають ядерними ділянками прикріплення, відомі як такі, що специфічно зв'язуються з ядерним матриксом *in vitro* і можуть опосередковувати зв'язування хроматину з ядерним матриксом *in vivo*. Вважається, що ДПМ зменшують сайленсинг трансгена. У rJP3416-GA7 ДПМ також вставлені і розташовані в межах ділянки Т-ДНК для того, щоб вони виконували функцію розпірок ДНК, з метою ізоляції транскрипції касет експресії. Вектор rJP3416 перед вставкою ділянки GA7 містить тільки касету селекційного маркера для рослин між межами.

Трансформація *A. thaliana* і аналіз складу жирних кислот

Химерні вектори вводять в *A. tumefaciens*, штам AGL1, і клітини з культур трансформованої *Agrobacterium* використовують для обробки рослин *A. thaliana* (екотипи Columbia і мутант *fad2*), застосовуючи для трансформації спосіб занурення квіток (Clough and Bent, 1998). Після дозрівання врожай зерен T₁ з оброблених рослин збирають і наносять на планшети MS, що містять фосфінотрицин (ФФТ), з метою селекції рослин, що містять ген селекційного маркера BAR. Саджанці T₁, що вижили і є здоровими, переносять в ґрунт. Після вирощування рослин до стану зрілості і надання їм можливості для самозапліднення, збирають урожай зерен T₂ з одержаних рослин, і склад жирних кислот у ліпіді їх насіння аналізують за методом ГХ, як розкрито у Прикладі 1.

Конструкція rJP3416-GA7 приводить до продукування дещо вищих рівнів ДГК, виражених як відсоток від загального вмісту жирних кислот, в середньому щодо конструкції rJP3404. Ефективність перетворення для кожної стадії ферментації в продукуванні ДГК з олеїнової кислоти обчислена як (% продуктів x 100)/(% субстрату, що залишився + % продуктів), і таким чином виражена у відсотках.

Найвищий спостережуваний рівень продукування ДГК в трансформованих rJP3416-GA7 лініях T₂ становить 6,2 %, додатково з 0,5 % ЕПК і 0,2 % ДПК (лінія #14). Вказане насіння T₂ все ще було сегрегованим по трансгену, тобто ще не було однорідно гомозиготним. Рівень ω3 жирних кислот, продукованих в результаті наявності трансгенів в цьому насінні (нові загальні ω3 жирні кислоти, за винятком рівня АЛК, яка виробляється ендемоно в екотипі Columbia), становить 10,7 %, тоді як рівень ω6 жирних кислот (нові загальні ω6 жирні кислоти, за винятком 18:2^{A9,12}) становить 1,5 %. Це представляє надзвичайно сприятливе співвідношення нових ω3 жирних кислот : нових ω6 жирних кислот, а саме 7,3:1.

Насіння T₂ відібраних ліній, трансформованих rJP3416-GA7, а саме ліній, позначених 7, 10, 14, 22 і 34 в екотипі Columbia, і ліній, позначених 18, 21 і 25 в мутанті екотипі *fad2*, наносять на планшети із середовищами MS, що містять ФФТ, для селекції трансгенних саджанців *in vitro*. По 20 ФФТ-резистентних саджанців з кожної лінії переносять в ґрунт і вирощують до стану зрілості після самозапліднення. Було високою мірою вірогідним, що ці рослини будуть гомозиготними по гену селекційного маркера, і таким чином, містити щонайменше по одній вставці Т-ДНК в геномі рослин. Урожай зерен T₃ з цих рослин збирають і аналізують склад жирних кислот в олії з насіння за методом ГХ. Даний аналіз виявив, що конструкції rJP3416-GA7 генерують вищі рівні ω3 ДЛ-ПНЖК ДГК в насінні T₃ гомозиготних рослин, ніж в сегрегованому насінні T₂. До близько 13,9 % ДГК спостерігається в трансформованій rJP3416-GA7 лінії T₃, позначеній 22.2 в екотипі Columbia, що означає збільшення з рівня близько 5,5 % в гемізиготному насінні T₂, причому сумарний рівень нових ω3 жирних кислот становить близько 24,3 % від вмісту загальних жирних кислот в ліпіді насіння. Рівень нових ω6 жирних кислот становить 1,1 % від загальних жирних кислот, представляючи високою мірою сприятливе співвідношення нових ω3 жирних кислот : нових ω6 жирних кислот, а саме, близько 22:1. Так само, трансформанти в екотипі *fad2* дають сумарну кількість нових ω3 жирних кислот 20,6 %, включаючи 11,5 % ДГК, як відсоток від загального вмісту жирних кислот в ліпіді насіння.

Ефективність ферментного перетворення для кожної ферментної стадії в біохімічному шляху одержання ДГК з олеїнової кислоти наведена в Табл. 8 для насіння T₃ з вищими рівнями ДГК. Ефективність перетворення під дією Δ12-десатурази в насінні лінії 22.2 становила 81,6 %, і

ефективність $\omega 3$ -десатурази становила 89,1 %, причому обидва значення є досить високими і вказують на те, що дані грибові (дріжджові) ферменти можуть добре функціонувати в насінні, що розвивається. Активність інших екзогенних ферментів в дорозі ДГК була подібним чином високою по відношенню до субстратів $\omega 3$, причому ефективність $\Delta 6$ -десатурази становить 42,2 %, $\Delta 6$ -елонгази — 76,8 %, $\Delta 5$ -десатурази — 95,0 %, $\Delta 5$ -елонгази — 88,7 % і $\Delta 4$ -десатурази — 93,3 %. Активність $\Delta 6$ -десатурази по відношенню до субстрату $\omega 6$ ЛК є набагато нижчою, і ефективність перетворення ЛК під дією $\Delta 6$ -десатурази становить тільки 0,7 %. ГЛК присутній на рівні всього 0,4 % і являє собою єдиний новий продукт $\omega 6$, за винятком 20:2 $\omega 6$, знайденої в насінні Т₃ з найвищим вмістом ДГК. Компільовані дані з профілів загального ліпиду насіння для незалежного трансгенного насіння наведені у Табл. 5.

Таблиця 4

Ефективність перетворення для окремих ферментних стадій одержання ДГК з олеїнової кислоти, що спостерігалася в загальних ліпідах насіння для трансгенного насіння Т₃ Arabidopsis.

		GA7_ Col_ 7.2	GA7_ Col_ 34.2	GA7_ Col_ 10.13	GA7_ Col_ 22.2	GA7_ Col_ 14.19	GA7_ FAD2 _25.1 0	GA7_ FAD2 _21.2	GA7_ FAD2 _18.1 4	T ₄ Col_22.2 (середнє значення +/- стандартне відхилення)	T ₄ Col_2 2.2 (найк- раща лінія)
	d12- дес	75,4 %	73,1 %	75,7 %	81,6 %	73,4 %	66,6 %	78,5 %	63,1 %	67,6 %	82,7 %
	d15- дес	85,3 %	84,4 %	86,2 %	89,1 %	70,2 %	87,5 %	82,2 %	87,6 %	81,0 %	90,9 %
Оме- га-6	d6- дес	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,7 %	0,3 %	0,6 %	1,0 %	0,2 %	1,3 %	0,7 %
	(d9- ело)	1,7 %	1,7 %	1,2 %	1,2 %	2,6 %	1,1 %	2,0 %	1,3 %	1,6 %	1,5 %
	d6- ело										
	d5- дес										
	d5- ело										
	d4- дес										
Оме- га 3	d6- дес	30,7 %	29,3 %	28,2 %	42,2 %	30,2 %	38,5 %	40,0 %	29,2 %	41,0 %	45,7 %
	(d9- ело)	2,7 %	2,7 %	2,3 %	2,4 %	3,0 %	2,3 %	2,7 %	2,9 %	2,8 %	3,1 %
	d6- ело	79,0 %	81,1 %	79,0 %	76,8 %	70,9 %	79,2 %	73,2 %	79,1 %	77,5 %	77,7 %
	d5- дес	94,0 %	94,6 %	94,5 %	95,0 %	97,9 %	87,8 %	93,3 %	91,1 %	95,0 %	95,8 %
	d5- ело	91,9 %	91,7 %	93,6 %	88,7 %	89,5 %	89,9 %	92,2 %	91,6 %	90,8 %	90,2 %
	d4- дес	93,2 %	93,7 %	94,4 %	93,3 %	93,7 %	92,5 %	95,0 %	93,9 %	92,2 %	90,9 %

Таблиця 5

Компільовані дані з профілів загальних ліпідів насіння для незалежного трансгенного насіння.

Параметр			GA7_ Col_ 10.13	GA7_ Col_ 22.2	GA7_ Col_ 14.19	GA7_ Col_ 7.2	GA7_ Col_ 34.2	GA7_ FAD2 -18.1 4	T ₄ Col_ 22.2 (се- ред- не зна- чен- ня ± ста- нда- ртне від- хи- ле- ння)	T ₄ Col_ 22.2 (най- кра- ща лінія)
Загальні w3 (% від загальних ЖК)	50,0	48,9	51,6	55,8	38,6	47,1	49,4	44,8	54,0	55,9
Загальні w6 (% від загальних ЖК)	8,7	9,1	8,3	6,7	16,3	6,7	10,7	6,3	6,7	5,7
Співвідношення w3/w6	5,75	5,37	6,22	8,33	2,37	7,03	4,62	7,11	806	9,81
Співвідношення w6/w3	0,17	0,19	0,16	0,12	0,42	0,14	0,22	0,14	0,12	0,10
Загальні нові w3 (% від загальних ЖК)	16,3	15,2	15,5	24,3	12,5	18,8	20,5	14,0	23,0	26,4
Загальні нові w6 (% від загальних ЖК)	1,2	1,2	0,9	1,1	1,5	0,9	1,8	0,7	1,4	1,4
Співвідношення нових w3/w6	13,58	12,67	17,22	22,09	8,33	20,89	11,39	20,00	16,43	18,86
Співвідношення нових w6/w3	0,07	0,08	0,06	0,05	0,12	0,05	0,09	0,05	0,06	0,05
Ефективність перетворення ОК на ЕПК	14,1 %	13,3 %	13,4 %	21,8 %	10,2 %	15,0 %	16,8 %	11,2 %	20,4 %	24,5 %
Ефективність перетворення ОК на ДГК	12,0 %	11,4 %	11,8 %	18,0 %	8,6 %	12,6 %	14,8 %	9,6 %	17,1 %	20,1 %
Ефективність перетворення ЛК на ЕПК	18,9 %	18,4 %	17,9 %	26,9 %	14,2 %	22,9 %	21,8 %	18,0 %	26,2 %	29,9 %
Ефективність перетворення ЛК на ДГК	16,2 %	15,9 %	15,7 %	22,2 %	12,0 %	19,1 %	19,1 %	15,5 %	21,9 %	24,5 %
Ефективність перетворення АЛК на ЕПК	22,2 %	21,9 %	20,7 %	30,1 %	20,2 %	26,1 %	26,5 %	20,5 %	29,4 %	32,9 %
Ефективність перетворення АЛК на ДГК	19,0 %	18,8 %	18,2 %	24,9 %	17,1 %	21,9 %	23,3 %	17,6 %	24,6 %	27,0 %
Загальні насичені жирні кислоти	16,0	14,7	15,4	16,0	16,2	13,4	16,5	12,9	16,0	17,8
Загальні мононенасичені жирні кислоти	23,7	25,8	23,4	19,2	26,5	30,9	21,3	34,3	21,1	18,1
Загальні поліненасичені жирні кислоти	58,7	58,0	59,9	62,5	54,9	53,8	60,1	51,1	60,7	61,6
Загальні C20	19	19,8	16,8	15,9	19,1	21,5	18,2	23,3	18	16,6
Загальні C22	11,4	11	10,8	15,5	8,6	12,1	13,2	9,9	15,4	17,5
Співвідношення C20/C22	1,67	1,80	1,56	1,03	2,22	1,78	1,38	2,35	1,17	0,95

Насіння T₃ лінії rJP3416-GA7 22.2 в екотипі Columbia, що є нащадками лінії T₂ 22, висівають безпосередньо в ґрунт, і склад жирних кислот в зрілому насінні одержаних в результаті рослин T₃ аналізують за методом ГХ. Середній рівень ДГК в цьому насінні становить 13,3 % ± 1,6 (n =

10) як відсоток від загальних жирних кислот в ліпіді насіння. Лінія з найвищим рівнем ДГК містить 15,1 % ДГК від загального вмісту жирних кислот в ліпіді насіння. Ферментна ефективність перетворення наведена в Табл. 4 для кожної стадії одержання ДГК з олеїнової кислоти.

5 Здійснюють аналіз гібридизації методом саузерн-блоту. Результати показують, що лінії з високим рівнем акумуляція ДГК містять одинарну або подвійну копію Т-ДНК з конструкції рJP3416-GA7, за винятком трансгенної лінії Columbia #22, що містить три вставки Т-ДНК в геномі рослини *Arabidopsis*. Насіння покоління T5 також проаналізоване, і знайдено вміст до 13,6 % ДГК в загальних ліпідах насіння. Конструкція GA7 продемонструвала стабільність 10 протягом декількох поколінь з точки зору здатності до утворення ДГК.

Визначення вмісту олії в трансгенних лініях *A. thaliana* ДГК

Вміст олії в трансгенному насінні *A. thaliana* з різними рівнями ДГК визначають за методом ГХ, як розкрито в Прикладі 1. Дані проілюстровані на Фіг. 4, де наведений графік вмісту олії (% олії від маси насіння) проти вмісту ДГК (як відсотка від загальних жирних кислот). Знайдено до 15 26,5 мг ДГК на грам насіння (Табл. 6). Знайдено, що вміст олії в трансгенному насінні *Arabidopsis* негативно корелює з вмістом ДГК. Кількість ДГК на масу насіння була великою в трансформованому насінні, з рівнем ДГК близько 9 % відносно насіння із вмістом ДГК близько 14 %. Подальші дані для інших видів, окрім *Arabidopsis*, продемонстрували, що дана негативна кореляція є більш вираженою для *Arabidopsis*, ніж для видів *C. sativa* або *Brassica* (Приклад 8 20 нижче).

Таблиця 6

Частка і кількість ДГК в насінні трансформованого GA7 *Arabidopsis*.

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

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

Бінарний вектор рJP3416-GA7, розкритий вище, вводять в штам *A. tumefaciens* AGL1, і 25 клітини з культури трансформованої *Agrobacterium* використовують для обробки квітучої рослини *C. sativa*, із застосуванням способу занурення квіток для трансформації (Lu and Kang, 2008). Після вирощування і дозрівання рослин, урожай насіння T₁ з оброблених рослин збирають, висівають в ґрунт, і одержані в результаті рослини обробляють шляхом 30 обприскування гербіцидом BASTA для селекції трансгенних рослин, що експресують ген селекційного маркера *bar* на Т-ДНК рJP3416-GA7. Рослини T₁, що вижили і є толерантними до гербіциду, вирощують до стану зрілості після того, як їм дають можливість самозапліднення, і збирають урожай насіння T₂, що утворилося. П'ять трансгенних рослин були одержані, тільки три з них містили повну Т-ДНК.

Ліпід екстрагують з пулу близько 20 насінин кожної з трьох рослин, що містили повну Т-ДНК. 35 Два з об'єднаних в пул зразків містили дуже низькі, ледве знайдені рівні ДГК, але третій пул зразків містив близько 4,7 % ДГК. Таким чином, ліпід був витягнутий із 10 індивідуальних насінин T₂ даної рослини, і склад жирних кислот проаналізований методом ГХ. Дані щодо складу жирних кислот індивідуального насіння для даної трансформованої лінії також наведені в Табл. 7. Компільовані дані з профілів (Табл. 7) загального ліпиду насіння наведені в Табл. 8.

40 ДГК була присутня у шести із 10 індивідуальних насінин. Чотири інші насінини не містили ДГК і були прийняті як нульові сегреганти, що не містять Т-ДНК, на базі гемізіготної інсерції Т-ДНК у материнській рослині. Екстрагований ліпід із єдиної насінини з найвищим рівнем ДГК містив 9,0 % ДГК, тоді як сумарний відсоток для ЕПК, ДПК і ДГК становив 11,4 %.

Таблиця 7

Склад жирних кислот загальних ліпідів насіння з трансгенного насіння T₂ Camelina sativa, трансформованих Т-ДНК з рJP3416-GA7. Склад жирних кислот наведений для об'єднаної в пул серії (FD5.46) насіння і для 10 окремих насінин, ранжированих (зліва направо) від найвищого до найнижчого рівня ДГК.

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

Таблиця 8

Компільовані дані з профілів загального ліпиду насіння для трансгенного насіння, наведеного в Табл. 7. Обчислення не включають «незначних жирних кислот», включених в Табл. 7.

Параметр	Пул FD5.46	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
Загальні ω3 (% від загальних ЖК)	36,1	46	45,4	45	48,2	44,2	40,1	28,9	29,9	30,2	28,9
Загальні ω6 (% від загальних ЖК)	25,8	20,4	20,7	20,3	19,5	21,1	25	33,7	32,6	31,8	33,8
Співвідношен- ня ω3/ω6	1,40	2,25	2,19	2,22	2,47	2,09	1,60	0,86	0,92	0,95	0,86
Співвідношен- ня ω6/ω3	0,71	0,44	0,46	0,45	0,40	0,48	0,62	1,17	1,09	1,05	1,17
Загальні нові ω3 (% від загальних ЖК)	8,1	18,5	18	16,9	18,6	15,2	12	0	0	0	0,1

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

- Гомозиготне насіння цієї лінії одержують в поколінні Т4. До 10,3 % ДГК продукується в події FD5-46-18-110, із середньою величиною 7,3 % ДГК, спостережуваною для всього покоління Т4. Наступне покоління (Т5) було одержане з метою додаткового тестування стабільності продукування ПНЖК впродовж декількох поколінь, особливе ДГК. Знайдено, що спостережувані максимальні рівні ДГК були стабільними у п'ятому поколінні, навіть незважаючи на те, що вміст ДГК в пулі насіння не стабілізувався до покоління Т4 через присутність численних трансгенних локусів. Додатково, партії насіння Т5 пророщували на середовищах МС in vitro разом із насінням материнської *C. sativa*, причому очевидних відмінностей у ефективності або швидкості проростання не спостерігалось. Подальші покоління трансгенної лінії (покоління Т6, Т7 і т.д) не виявляли зниження рівня ДГК у насінні. Трансгенні рослини володіли повноцінною чоловічою і жіночою фертильністю, і пилок продемонстрував близько 100 % життєздатності відносно рослин дикого типу. Аналіз вмісту олії в насінні, що містить різні рівні ДГК, не виявив кореляції між рівнем ДГК і вмістом олії, на протилежність кореляції, спостережуваних для *Arabidopsis thaliana*.

У декількох подальших трансгенних лініях, вміст ДГК в окремих насінинах від незалежних подій перевищував 12 %. Співвідношення трансгенних : нульових для цих ліній становило близько від 3:1 до 15:1. Аналіз характерних профілів жирних кислот для зразків із найвищим вмістом ДГК від кожної конструкції виявив тільки 1,2-1,4 % ГЛК за відсутності інших нових ω6 РНЖК. І навпаки, було знайдено, що нові ω3 ПНЖК (СДК) ω3 ДЦ-ПНЖК (ЕТК, ЕПК, ДПК, ДГК) акумулюються до 18,5 % при рівні ДНК 9,6 % у загальному вмісті жирних кислот. Ступінь Δ6-десатурації становив 32 %, і вміст ЕПК становив 0,8 % від загального вмісту жирних кислот. Ефективність Δ5-десатурації становила 93 %, і ефективність Δ6-елонгації становила 60 %. ДГК була знайдена у полярній фракції ліпідів насіння ліній GA7.

Було відзначено, що спостережувані співвідношення сегрегації (від ~3:1 до ~15:1) вказують на те, що один або максимум два трансгенних локуси були необхідними для продукування ДГК у *C. sativa* на рівнях, подібних до рівнів у рибацькому жирі. Це має важливе значення для простоти розведення трансгенної ознаки, а також для стабільності трансгена.

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

Здійснювали ^{13}C ЯМР аналіз регіоспецифічності для олії насіння трансгенної *C. sativa* із метою визначення позиційного розподілу ω3 ДЛ-ПНЖК у ТАГ. Подія із близько рівним вмістом ЕПК і ДГК була вибрана для максимізації відповіді на дані жирні кислоти, причому співвідношення sn-1,3 до sn-2 було знайдено на рівні 0,75:0,25 для ЕПК і 0,86:0,14 для ДГК, притому, що об'єктивний розподіл повинен був би становити 0,66:0,33. Тобто, 75 % ЕПК і 86 % ДГК були розташовані в положенні sn-1,3 ТАГ. Це показує, що обидві жирні кислоти були переважно локалізовані у положеннях ТАГ *C. sativa*, хоча перевага для ЕПК була виражена слабше, ніж для ДГК. Той факт, що ДГК була переважно знайдена у sn-1,3, був подібний до результатів, про які раніше повідомлялося для насіння *A. thaliana* (Petrie et al., 2012).

Оскільки кількість незалежних трансгенних ліній, одержаних у розкритих вище експериментах із трансформацією, була низькою, подальші трансформації *C. sativa* були здійснені із застосуванням конструкції мотиву GA7-modB (Приклад 4). Одержана більша кількість трансформантів, та ідентифіковані гомозиготні лінії, які продукують ДГК в кількості більше 20,1 %.

Приклад 4. Модифікації Т-ДНК, що кодують шляхи ДГК в насінні рослин

Для покращення рівня продукування ДГК у *B. napus*, в порівнянні з рівнями, описаними у WO2013/185184, бінарні вектори rJP3416-GA7-modA, rJP3416-GA7-modB, rJP3416-GA7-modC, rJP3416-GA7-modD, rJP3416-GA7-modE і rJP3416-GA7-modF були сконструйовані, як описано у WO2013/185184, і протестовані на трансгенних рослинах. Ці бінарні вектори є варіантами конструкції rJP3416-GA7, розкритої у Прикладі 2, і були сконструйовані з метою подальшого підвищення синтезу ДГК в насінні рослин, особливо шляхом покращення функції Δ6-десатурази і Δ6-елонгази. Спостерігалася акумуляція СДК в деякому насінні, трансформованому конструкцією GA7, внаслідок відносно низької ефективності Δ6 елонгації, в порівнянні з Δ5-елонгазою, тому, серед інших модифікацій, положення двох генів елонгази було змінено в Т-ДНК.

Дві послідовності, що кодують елонгази у rJP3416-GA7, були поміняні місцями на Т-ДНК, з одержанням rJP3416-GA7-modA першим клонуванням нової касети Δ6-елонгази *P. cordata* між сайтами SbfI rJP3416-GA7, для заміни касети Δ5-елонгази *P. cordata*. Ця конструкція була додатково модифікована шляхом обміну промотору FP1, який контролює Δ6-десатуразу *M. pusilla*, з промотором конлініну Cnl2 (pLuCnl2), щоб одержати rJP3416-GA7-modB. Дана модифікація була здійснена з метою збільшення експресії Δ6-десатурази, і таким чином ефективності ферменту. Вважається, що промотор Cnl2 може давати більш високу експресію трансгену у *B. napus*, ніж вкорочений промотор напіну.

Одержано 8 трансгенних подій rJP3416-GA7-modB *A. thaliana* і 15 трансгенних подій rJP3416-GA7-modG *A. thaliana*. Спостерігається від 3,4 % до 7,2 % ДГК в пулі насіння rJP3416-GA7-modB, і від 0,6 до 4,1 % ДГК в пулі насіння T2 rJP3416-GA7-modG. Деякі з подій rJP3416-GA7-modB з найвищим рівнем висівають на селекційні середовища, і саджанці, що вижили, відбирають для наступного покоління. Насіння аналізують щодо вмісту ДГК. Оскільки об'єднане в пул насіння T1 представляє популяції, сегреговані по трансгенах, і включають будь-які нульові сегреганти, очікується, що в гомозиготному насінні рослин-нащадків рівні ДГК будуть вищими, до 30 % від загального вмісту жирних кислот в олії насіння. Інші модифіковані конструкції використовувалися для трансформації *A. thaliana*. Хоча одержана тільки невелика кількість трансформованих ліній, жодна з них не давала вищих рівнів ДГК, ніж конструкція modB.

Конструкцію rJP3416-GA7-modB додатково застосовували для генерації трансформованих рослин *V. parus* сорту Oscar і серії сортових ліній, позначених NX002, NX003, NX005, NX050, NX052 і NX054. Всього було одержано 1558 трансформованих рослин, включаючи 77 незалежних трансформованих рослин (T0) для трансформації Oscar, і 1480 незалежних рослин для сортових ліній, включаючи 189 для NX005, що є лінією із високим вмістом олеїнової кислоти в олії насіння завдяки мутаціям у генах FAD2. Інші сортові лінії містили вищі рівні ЛК і АЛК. Трансгенні рослини, які продемонстрували більше 4 копій Т-ДНК за даними методу цифрової ПЛР (Приклад 1), були відкинута; близько 25 % рослин T0 було відкинута за даним критерієм. Близько 53 % трансгенних рослин T0 містили 1 або 2 копії Т-ДНК за даними методу цифрової ПЛР, 12 % містили близько 3 копії, і 24 % — 4 або більше копій. Урожай насіння (насіння T1) був зібраний близько із 450 трансгенних ліній після самозапилення, досягнутого шляхом ізолювання рослин мішечками під час цвітіння, щоб уникнути схрещування. Урожай насіння T1 зібраний із решти трансгенних рослин після дозрівання. Близько 1-2 % ліній рослин були стерильними з точки зору чоловічої або жіночої фертильності і не давали життєздатного насіння; такі рослини T0 були відкинута.

Пули насіння (по 20 насінин T1 у кожному пулі) тестували щодо рівнів ДГК в пулі олії з насіння, і лінії, які продемонстрували найвищі рівні, відбирали. Зокрема, були відібрані лінії із вмістом ДГК щонайменше 2 % від загального вмісту жирних кислот в пулі насіння T1. Близько 15 % трансгенних ліній було відібрано в такий спосіб; інші 85 % були відкинута. Деякі з них були позначені як лінії СТ132-5 (сорт Oscar), СТ133.15-15, -24, -63, -77, -103, -129 і -130 (у NX005). Відібрані лінії у NX050 включали СТ136-4, -8, -12, -17, -19, -25, -27, -49 і -51. Забезпечували набування двадцяти насінин з відібраних ліній, включаючи СТ132.5 і 11 насінин з СТ133.15, і через два дні олію витягають з половини сім'ядолі кожної з індивідуальних насінин. Другу половину сім'ядоль з ембріональними осями утримують і культивують на середовищах, щоб зберегти конкретні лінії нащадків. Склад жирних кислот в олії визначають; дані для СТ132.5 наведені в Табл. 16. Рівень ДГК в 10 із проаналізованих 20 насінин, за даними аналізу методом ГХ, знаходиться в інтервалі 7–20 % від загального вмісту жирних кислот. Інші насінини містили менше 7 % ДГК і могли містити часткову (неповну) копію Т-ДНК із rJP3416-GA7-modB. Схоже, що трансгенна лінія містить множинні вставки трансгена, які були генетично роз'єднані. Насіння трансгенної лінії СТ133.15 продемонструвало рівні ДГК в інтервалі 0–5 %. Насінини без ДГК, ймовірно, були нульовими сегрегантами. Ці дані підтверджують, що конструкція modB функціонує належним чином для одержання ДГК в насінні рапсу.

Двадцять або 40 індивідуальних насінин (насіння T2), одержаного від кожної з множини рослин T1 після самозапилення, від відібраних трансформованих ліній, індивідуально тестували щодо складу жирних кислот. Було ідентифіковане насіння, що містить рівні ДГК вище 20 % (Табл. 10). Два репрезентативних зразки, СТ136-27-18-2 і СТ136-27-18-19, містили 21,2 % до 22,7 % ДГК, відповідно. Загальний вміст $\omega 3$ жирних кислотних у цих насінинах становив близько 60 %, як відсоток від загального вмісту жирних кислот, і вміст $\omega 6$ становив менш ніж 10 %. Інші набори по 20 або 40 насінин T2 від кожної із рослин T1 тестували щодо складу жирних кислот. Репрезентативні дані рівнів ДГК у загальному вмісті жирних кислот олії насіння з індивідуального насіння T2 проілюстровані на Фіг. 10. Насіння, що містило до 34,3 % ДГК, було ідентифіковане, наприклад, серед насіння СТ136-27-47-25 (Табл. 12). Склад жирних кислот для олії з насіння, одержаної із СТ136-27-47-25, наведений у Табл. 12. Склад жирних кислот включав 34,3 % ДГК, разом із близько 1,5 % ДПК, 0,6 % ЕПК і 0,5 % ЕТК. Рівень СДК становив близько 7,5 %, АЛК — близько 21,9 %, і ЛК — близько 6,9 %. Нові $\omega 6$ ПНЖК продемонстрували 1,1 % ГЛК, за відсутності $\omega 6$ -C20 або -C22 ДЦ-ПНЖК, що піддавалися б виявленню. Загальні насичені жирні кислоти: 9,6 %; мононенасичені жирні кислоти, 12,5 %; загальні ПНЖК, 75,2 %; загальні $\omega 6$ ПНЖК (включаючи ЛК), 7,2 %; загальні $\omega 3$ ПНЖК, 66,9 %; співвідношення загального вмісту $\omega 6$: $\omega 3$ жирних кислот, 9,3:1; нові $\omega 6$: нові $\omega 3$ жирні кислоти, 37:1. Ефективність кожної із стадій ферментації від олеїнової кислоти до ДГК була такою, як указано нижче: $\Delta 12$ -десатураза, 90 %; $\Delta 15/\omega 3$ -десатураза, 89 %; $\Delta 6$ -десатураза, 67 %; $\Delta 6$ -елонгаза, 83 %; $\Delta 5$ -десатураза, 99 %; $\Delta 5$ -елонгаза, 98 %; $\Delta 4$ -десатураза, 96 %. Загальна ефективність перетворення олеїнової кислоти на ДГК становила близько 50 %. Таким чином, було очевидним, що насіння, яке продукує ДГК в діапазоні 20,1-35 % від загального вмісту жирних кислот в олії насіння, могли би бути ідентифіковані і відібрані, зокрема насіння, що містить від 20,1 % до 30 % ДГК або від 30 % до 35 % ДГК у загальному вмісті жирних кислот.

Вміст олії у деяких насінинах був зниженим від близько 44 % у насінні дикого типу до близько 31-39 % у деяких з продукуючих ДГК насінин, але був подібним до рівнів дикого типу в інших продукуючих ДГК насінинах.

Різноманітні трансформовані лінії рослин, що продукували ДГК на рівнях щонайменше 10 % у насінні T2, схрещували і забезпечували самоzapилення потомства F1, щоб одержати потомство F2, гомозиготні по множинних інсерціях Т-ДНК. Олію насіння із гомозиготного насіння проаналізували і знайшли, що до ДГК складає 30 % або 35 % від загального вмісту жирних кислот в олії з насіння.

ТАГ в олії, одержаній із СТ136-27-18-2 і СТ136-27-18-19, проаналізували регіоспецифічним методом ^{13}C ЯМР щодо позиційного розподілу ДГК у гліцериновій основі молекул ТАГ. ДГК переважно була приєднана у положенні sn-1,3. Більш ніж 70 %, фактично більш ніж 90 % ДГК знаходилося у положенні sn-1,3.

У декількох подальших трансгенних лініях, вміст ДГК в індивідуальному насінні від незалежних подій перевищував 12 %. Співвідношення трансгенних : нульових для цих ліній становило близько 3:1, що відповідало одному трансгенному локусу, або 15:1, що відповідало двом трансгенним локусам. Аналіз характерних профілів жирних кислот для зразків від кожної конструкції із найвищими рівнями ДГК виявив тільки 1,2-1,4 % ГЛК за відсутності інших нових $\omega 6$ ПНЖК, що піддавалися б виявленню. На протилежність цьому, нові $\omega 3$ ПНЖК (СДК) і $\omega 3$ ДЛ-ПНЖК (ЕТК, ЕПК, ДПК, ДГК) акумулювалися до сумарного рівня 25,8 % для конструкції modF і 21,9 % для конструкції modG, в порівнянні з 18,5 % для GA7-трансформованого насіння. Рівні ДГК в олії із цього насіння становили 9,6 %, 12,4 % і 11,5 %, відповідно. Ступінь $\Delta 6$ -десатурації був нижчим у GA7-трансформованому насінні, ніж у modF- і modG-трансформованому насінні (32 % проти 47 % і 43 %), що приводило до зниження рівня АЛК у насінні modF і modG, в порівнянні з GA7. Іншою значущою відмінністю була акумуляція ЕПК в насінні modF (3,3 % проти 0,8 % у двох інших трансгенних насінинах), і це відображалось у зниженні ступеня $\Delta 5$ -елонгації, що спостерігався у насінні modF (80 %), в порівнянні із насінням GA7 і modG (93 % і 94 %). Спостерігалось невелике збільшення ступеня $\Delta 6$ -елонгації у цьому насінні (66 % проти 60 % і 61 %), хоча кількість СДК фактично збільшувалася унаслідок дещо активнішої $\Delta 6$ -десатурації. ДГК була знайдена у полярній фракції ліпідів насіння ліній GA7.

Проаналізований склад жирних кислот у ліпіді насіння T1 для 70 незалежних трансгенних рослин *V. parvis* сортової лінії NX54, трансформованої конструкцією modB Т-ДНК. Знайдено, що одна із цих трансгенних рослин дає насіння, що містить ДПК, але в олії з насіння ДГК відсутня. У насінні T1 даної лінії (СТ-137-2) продукувалося близько 4 % ДПК, за відсутності в пулі насіння T1 ДГК, що піддавалася б виявленню. Винахідниками був зроблений висновок про те, що це спричинено інактивацією гена $\Delta 4$ -десатурази у конкретній інсерційній Т-ДНК, можливо, в результаті спонтанної мутації. Близько 50 насінин T1 від даної трансгенної лінії проростили, та із кожної проаналізували один коти́ледон, що з'являвся, щодо складу жирних кислот у залишковій олії. Відібрані саджанці, що демонстрували більш ніж 5 % ДПК, були вирощені до стану зрілості, і зібраний урожай насіння T2. Склад жирних кислот в пулі насіння проілюстрований у Табл. 11, причому у цих лініях спостерігалось більш ніж 7 % ДПК.

Хоча фокус даного експерименту знаходився на демонстрації продукування ДГК у видах олійної культури, відзначені вище відмінності також були цікавими з точки зору перспективи дизайну конструкції. По-перше, перемикання локалізації ділянки, що кодує $\Delta 6$ - і $\Delta 5$ -елонгазу в конструкції modF приводить до передбачуваних модифікацій профілю, коли акумулюється більше ЕПК унаслідок нижчого ступеня $\Delta 5$ -елонгації. Супутнє збільшення ступеня $\Delta 6$ -елонгації спостерігалось, але не приводило до нижчих рівнів СДК. Це було результатом підвищення ступеня $\Delta 6$ -десатурації у трансформованому modF насінні, спричиненого додаванням додаткової експресійної касети $\Delta 6$ -десатурази *M. pusilla*, а також заміною вкороченого промотору напіну (FP1) активнішим промотором конлініну2 льону. Дещо менш виражене підвищення ступеня $\Delta 6$ -десатурації, спостережуване у разі конструкта modG, було спричинене капіталізацією на касеті $\Delta 5$ -елонгазі з високою експресією у GA7. Перемикання положень ділянок, що кодують $\Delta 6$ -десатуразу та $\Delta 5$ -елонгазу, приводило до вищого ступеня $\Delta 6$ -десатурації. Активність $\Delta 5$ -елонгази не знижувалася в цьому випадку завдяки заміні промотору FP1 промотором Cnl2.

Ці дані підтверджують, що конструкції modB, modF і modG є ефективними з точки зору продукування ДГК у насінні *Camelina*, відносно *Arabidopsis* і *rapcy*.

Автори винаходу вважали, що, загалом, ефективність обмежуючої швидкості ферментної активності в біохімічному шляху ДГК може бути вищою в мультикопійних Т-ДНК трансформантах, в порівнянні з однокопійними Т-ДНК трансформантами, або може бути збільшена шляхом інсерції в Т-ДНК декількох генів, що кодують фермент, який може бути обмежуючим в біохімічному шляху. Докази можливої важливості мультикопійних трансформантів спостерігалися у насінні *Arabidopsis*, трансформованому конструкцією GA7 (Приклад 2), де подія з найвищим виходом ДГК містила три інсерції Т-ДНК в геномі хазіяна.

Декілька генів можуть бути ідентичними, або переважно є різними варіантами, що кодують один і той же поліпептид або знаходяться під контролем різних промоторів з патернами експресії, що перекриваються. Наприклад, підвищена експресія може бути досягнута шляхом експресії декількох ділянок, що кодують $\Delta 6$ -десатуразу, навіть якщо продукується один і той же білок.

5 Наприклад, у rJP3416-GA7-modF і rJP3416-GA7-modC, дві версії $\Delta 6$ -десатурази *M. pusilla* були присутні та експресувалися різними промоторами. У кодуючих послідовностях кодони використовувалися по-різному і, таким чином, їх нуклеотидні послідовності були різними, з метою зниження потенціалу сайленсингу або ефектів косупресії, але приводили до продукування одного і того ж білка.

10

Таблиця 9

Профілі жирних кислот у половинках сім'ядоль пророщеного трансгенного насіння T1 В. *parus*, що містять конструктор modB. До 18,1 % ДГК спостерігалось в численних зразках, що містили більше 10 % ДГК.

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

Таблиця 10

Профілі жирних кислот трансгенного насіння T2 *B. napus*, що містять конструкцію modB.

Зразок (насіння T2)	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:5n3	C22:6n3	Всього ω3 (%)	Всього ω6 (%)	Співвідношення ω6:ω3	Загальний вміст ПНЖК (%)
СТ136-27-18-1	0,1	5,0	2,6	25,4	3,6	6,7	0,2	37,5	1,4	1,0	0,1	2,1	0,8	0,4	0,9	10,2	53,4	7,1	0,13	60,5
СТ136-27-18-2	0,2	7,1	2,8	16,9	4,3	5,5	0,4	29,1	5,4	0,8	0,1	1,2	0,5	0,5	1,9	21,2	59,8	6,1	0,10	66,0
СТ136-27-18-3	0,1	5,4	2,5	26,5	3,8	6,4	0,4	26,4	4,7	1,0	0,1	0,7	1,1	0,6	1,2	17,3	52,0	6,9	0,13	58,9
СТ136-27-18-4	0,1	5,3	2,4	34,7	4,0	5,9	0,3	30,3	1,3	1,1	0,1	1,1	1,5	0,3	0,4	9,3	44,4	6,3	0,14	50,7
СТ136-27-18-5	0,1	4,8	2,7	34,5	3,8	5,6	0,3	23,5	3,9	1,2	0,1	0,7	1,1	0,5	1,1	14,2	45,1	6,0	0,13	51,1
СТ136-27-18-6	0,1	5,0	2,1	54,3	3,8	5,7	0,2	18,2	0,6	1,5	0,1	1,1	0,7	0,1	0,2	4,4	25,5	6,1	0,24	31,5
СТ136-27-18-7	0,1	5,3	2,1	43,8	4,2	5,6	0,4	18,3	2,2	1,3	0,2	0,6	1,5	0,4	0,5	11,6	35,2	6,2	0,18	41,4
СТ136-27-18-8	0,1	5,4	2,7	25,8	4,1	6,7	0,4	26,6	5,7	1,0	0,1	0,6	1,3	0,6	1,2	15,8	51,9	7,1	0,14	59,0
СТ136-27-18-9	0,1	4,6	1,6	53,8	3,7	17,5	0,5	9,2	0,5	1,6	0,3	0,6	0,4	0,1	0,1	3,7	14,5	18,3	1,26	32,8
СТ136-27-18-10	0,1	4,8	2,4	44,1	3,7	5,4	0,4	19,1	2,3	1,1	0,1	0,6	1,5	0,5	0,8	11,4	36,1	5,9	0,16	42,0
СТ136-27-18-11	0,1	5,1	2,2	48,3	4,1	10,9	0,7	12,5	1,2	1,3	0,2	0,5	1,5	0,3	0,3	9,1	25,3	11,8	0,47	37,1
СТ136-27-18-12	0,1	5,3	2,7	23,3	3,7	6,0	0,4	27,9	4,9	0,9	0,1	0,7	1,3	0,8	1,5	18,5	55,7	6,6	0,12	62,2
СТ136-27-18-13	0,1	5,5	3,4	30,7	5,6	5,1	0,4	23,1	3,5	1,1	0,1	1,2	1,1	0,6	1,2	14,9	45,8	5,5	0,12	51,3
СТ136-27-18-14	0,1	5,4	2,3	23,9	3,5	6,0	0,4	30,1	3,7	1,0	0,1	1,0	0,7	0,6	1,2	18,2	55,5	6,6	0,12	62,1
СТ136-27-18-15	0,1	5,0	2,3	45,4	4,0	5,3	0,4	16,2	2,3	1,2	0,1	0,5	1,9	0,6	0,7	12,3	34,4	5,8	0,17	40,3
СТ136-27-18-16	0,1	4,8	2,7	37,9	4,1	6,2	0,4	22,0	2,4	1,0	0,1	0,7	1,4	0,5	0,8	13,1	41,0	6,7	0,16	47,7
СТ136-27-18-17	0,1	4,5	2,3	38,8	3,3	7,6	0,3	26,8	0,9	1,4	0,2	1,6	0,9	0,2	0,7	8,6	39,9	8,0	0,20	47,9
СТ136-27-18-18	0,1	5,1	2,3	29,0	3,6	5,7	0,4	26,5	3,8	1,1	0,2	0,8	0,8	0,6	1,0	17,4	50,8	6,3	0,12	57,1
СТ136-27-18-19	0,1	5,8	2,3	19,7	4,2	6,7	0,7	23,7	7,7	0,9	0,1	0,4	0,7	0,6	1,7	22,7	57,6	7,5	0,13	65,1
СТ136-27-18-20	0,1	5,7	2,9	23,2	4,0	5,6	0,3	35,8	2,4	1,0	0,1	1,3	1,1	0,5	1,0	13,0	55,1	6,1	0,11	61,2

АРК (C20:4ω6) не була знайдена в жодному із зразків. Крім того, зразки містили близько 0,2 % або 0,3 % C16:1, близько 0,1-0,3 % C16:3, від близько 0,7 % до 1,0 % C20:0, близько 0,3 % C22:0, і деякі зразки містили слідові кількості (< 0,1 %) C20:1Δ13, C22:3ω3, C24:0 і C24:1.

Таблиця 11

Склад жирних кислот ліпиду у трансгенному насінні T2 *B. napus*, трансформованому Т-ДНК конструкцією modB, з передбачуваною мутацією в гені Δ4-десатурази. Ліпіди додатково містили близько 0,1 % 14:0, 0,2 % 16:3, 0,2-0,4 % ГЛК, 0,1 % 20:1Δ13, 0,3-0,4 % 22:0, а 16:2 і 22:1 не були знайдені.

	16:0	16:1ω13t	16:1	18:0	18:1	18:1d11	18:2	18:3n3	20:0	18:4n3	20:1d11	20:2n6	20:3n6	20:4n6	20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:2n6	22:3n3	24:0	24:1	22:5n3	22:6n3
СТ-137-2-34	5,3	0,0	0,2	3,7	26,8	3,1	12,4	29,1	0,8	2,5	0,8	0,1	0,0	0,0	1,1	1,7	0,8	0,0	0,1	0,1	0,1	10,0	0,0
СТ-137-2-38	5,3	0,0	0,2	4,2	24,4	3,0	12,6	29,4	0,9	2,5	0,8	0,1	0,0	0,0	1,3	2,2	0,9	0,0	0,1	0,2	0,1	10,8	0,0
СТ-137-2-48	5,0	0,0	0,2	4,2	24,1	3,1	11,9	31,0	0,9	2,4	0,9	0,1	0,0	0,0	1,5	2,0	1,0	0,0	0,1	0,1	0,1	10,5	0,0
СТ-137-2-51	5,7	0,0	0,2	4,6	22,3	3,4	12,3	34,5	1,0	2,0	0,8	0,1	0,0	0,0	1,9	1,2	0,5	0,0	0,1	0,2	0,2	7,9	0,0
СТ-137-2-59	5,4	0,0	0,2	3,9	25,7	3,4	12,9	27,8	0,9	2,6	0,8	0,1	0,0	0,0	1,0	1,9	0,9	0,0	0,1	0,2	0,1	11,0	0,0

Таблиця 12

Склад жирних кислот в олії з насіння T2 *B. napus*, трансформованого Т-ДНК із GA7-modB.

C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:1n7	C18:2n6	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	C18:4n3	C20:1n9c	C20:2n6 + C21:0	C20:3n3	C20:4n3	C20:5n3	C22:5n6	C22:5n3	C22:6n3
6,3	2,4	8,4	3,1	6,9	1,1	21,9	0,7	7,5	0,7	0,1	0,5	0,5	0,6	0,2	1,5	34,3

Зразки олії з насіння додатково містили 0,1 % C14:0; 0,2 % C16:1; 0,1 % C20:3 ω 6; не містили C22:1 і C22:2 ω 6; містили 0,1 % C24:0 і 0,2 % C24:1, 2,6 % інших жирних кислот.

Приклад 5. Аналіз ТАГ із трансгенного насіння *A. thaliana*, що продукує ДГК

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

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

Додатково, загальний ліпід з трансгенного насіння *A. thaliana* був проаналізований РХ-МС з потрійною квадрупольною лінзою, щоб визначити основні різновиди триацилгліцеролу (ТАГ) (Фіг. 6). Знайдено, що різновидами ТАГ з найвищим вмістом ДГК є ДГК-18:3-18:3 (ТАГ 58:12; номенклатура не описує позиційного розподілу), і на другому місці знаходиться ДГК-18:3-18:2 (ТАГ 58:11). Три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18) спостерігається в загальній олії з насіння, хоча і з низькими, але знайденими рівнями. Інші основні різновиди ТАГ, що містять ДГК, включали ДГК-34:3 (ТАГ 56:9), ДГК-36:3 (ТАГ 58:9), ДГК-36:4 (ТАГ 58:10), ДГК-36:7 (ТАГ 58:13) і ДГК-38:4 (ТАГ 60:10). Ідентичність двох основних ТАГ, що містять ДГК, була додатково підтверджена квадрупольною часопролітною (Q-TOF) МС/МС

Приклад 6. Аналіз вмісту і складу стеролів в оліях

Фітостерини з 12 зразків рослинної олії, придбаних із комерційних джерел в Австралії, охарактеризовані за методами ГХ і ГХ-МС. як похідні О-триметилсилілового ефіру (OTMSi-ефір), як розкрито у Прикладі 1. Стероли ідентифікували за даними утримання, інтерпретацією мас-спектрів і порівнянням з літературними даними та даними мас-спектроскопії лабораторних стандартів. Кількість стеролів визначають з використанням внутрішнього стандарту 5 β (H)-холан-24-олу. Базова структура фітостерину і хімічна структура деяких з ідентифікованих стеролів проілюстровані на Фіг. 7 і в Табл. 13.

Аналізували рослинні олії: кунжуту (*Sesamum indicum*), оливи (*Olea europaea*), соняшнику (*Helianthus annuus*), ріцини (*Ricinus communis*), рапсу (*Brassica napus*), сафлору (*Carthamus tinctorius*), арахісу (*Arachis hypogaea*), льону (*Linum usitatissimum*) і сої (*Glycine max*). У порядку зниження по відношенню відносного вмісту, у всіх зразках олії основними фітостеринами були: β -ситостерол (інтервал 28-55 % від загального вмісту стеролів), Δ^5 -авенастерол (ізофукостерол) (3–24 %), кампестерол (2–33 %), Δ^5 -стигмастерол (0,7–18 %), Δ^7 -стигмастерол (1–18 %) і Δ^7 -авенастерол (0,1–5 %). Були ідентифіковані декілька інших мінорних стеролів: холестерин, брасікастерол, чалінастерол, кампестанол та ебурикол. Додатково, були знайдені чотири C29:2 і два C30:2 стероли, але необхідне подальше дослідження для остаточної ідентифікації цих мінорних компонентів. Крім того, в деяких з олій присутні декілька інших неідентифікованих стеролів, але через дуже низький їх вміст, мас-спектри не були достатньо інтенсивними, щоб дозволити ідентифікацію їх структури.

Таблиця 13

Назви за ІЮПАК / систематичні назви ідентифікованих стеролів

Стерол №	Загальна назва(и)	ІЮПАК/систематична назва
1	холестерин	холест-5-ен-3 β -ол
2	брасікастерол	24-метилхолеста-5,22Е-дієн-3 β -ол
3	чалінастерол / 24-метилхолестерин	24-метилхолеста-5,24(28)Е-дієн-3 β -ол
4	кампестерол / 24-метилхолестерин	24-метилхолест-5-ен-3 β -ол

Стерол №	Загальна назва(и)	ІЮПАК/систематична назва
5	кампестанол / 24-метилхолестанол	24-метилхолестан-3 β -ол
7	Δ 5-стигмастерол	24-етилхолеста-5,22Е-дієн-3 β -ол
9	ергост-7-ен-3 β -ол	24-метилхолест-7-ен-3 β -ол
11	ебурикол	4,4,14-триметилергоста-8,24(28)-дієн-3 β -ол
12	β -ситостерол / 24-етилхолестерин	24-етилхолест-5-ен-3 β -ол
13	D5-авенастерол / ізофукостерол	24-етилхолеста-5,24(28)Z-дієн-3 β -ол
19	D7-стигмастерол / стигмаст-7-ен-3b-ол	24-етилхолест-7-ен-3 β -ол
20	D7-авенастерол	24-етилхолеста-7,24(28)-дієн-3 β -ол

Вміст стеролів, виражений як мг/г олії, у порядку зменшення кількості був наступним: олія рапсу (6,8 мг/г), кунжутна олія (5,8 мг/г), льняна олія (4,8-5,2 мг/г), олія соняшнику (3,7-4,1 мг/г), арахісове масло (3,2 мг/г), сафлорова олія (3,0 мг/г), соєва олія (3,0 мг/г), оливкова олія (2,4 мг/г), рицинова олія (1,9 мг/г). Склад стеролів у % і загальний вміст стеролів наведені у Табл. 14.

Загалом, серед усіх зразків олії з насіння основним фітостерином був β -ситостерол (інтервал 30–57 % від загального вмісту стеролів). Для олій спостерігався широкий інтервал частки інших основних стеролів: кампестерол (2–17 %), Δ 5-стигмастерол (0,7–18 %), Δ 5-авенастерол (4–23 %), Δ 7-стигмастерол (1–18 %). Олії різних видів містили інший профіль стеролів, причому деякі профілі були досить відмінними. У випадку олії рапсу, вона містило найвищу частку кампестеролу (33,6 %), тоді як зразки інших видів загалом містили нижчі рівні, наприклад, до 17 % в арахісовій олії. Сафлорова олія містила відносно високу частку Δ 7-стигмастеролу (18 %), тоді як вміст цього стеролу звичайно був низьким в оліях інших видів, до 9 % в олії соняшнику. Оскільки вони є характерними для кожного виду, профілі стеролів можуть, таким чином, використовуватися як допоміжні для ідентифікації конкретних овочевих або рослинних олій та перевірки їх непідробленості або підробки іншими оліями.

Порівнювали по два зразки соняшнику і сафлору, у кожному випадку один був одержаний холодним пресуванням насіння і був нерафінованим, тоді як інший не був одержаний холодним пресуванням і був рафінованим. Хоча спостерігалися деякі відмінності, два джерела олії містили подібний склад стеролів і загальний вміст стеролів, наводячи на думку про те, що обробка і рафінування здійснюють незначний вплив на два вказаних параметри. Вміст стеролів серед зразків відрізнявся в 3 рази і варіював від 1,9 мг/г до 6,8 мг/г. В олії рапсу він був найвищий, а в рициновій олії - найнижчий вміст стеролів.

Приклад 7. Збільшення акумуляції ДГК в положенні sn-2 ТАГ

Автори цього винаходу припускали, що акумуляція ДГК та/або ДПК в положенні sn-2 ТАГ може бути збільшена шляхом коекспресії І-ацил-гліцерол-3-фосфат ацилтрансферази (ЛФКАТ) із шляхом біосинтезу ДГК, наприклад, наданим конструкцією GA7 або її варіантами. Переважними ЛФКАТ є такі, які можуть впливати на поліненасичений C22 жирний ацил-КоА як субстрат, що приводить до збільшення вставки поліненасиченого ланцюга C22 в положенні sn-2 ЛФХ з утворенням ФХ, відносно ендогенного ЛФКАТ. Цитоплазматичні ферменти ЛФКАТ часто демонструють варіюючі переваги по відношенню до субстрату, особливо, якщо вид синтезує і акумулює в ТАГ незвичайні жирні кислоти. Продемонстровано, що ЛФКАТ2 з *Limnanthes douglasii* може використовувати ерукоїл-КоА (C22:1-КоА) як субстрат для синтезу ФК, на протилежність ЛФКАТ1 з того ж виду, яка не може утилізувати субстрат C22 (Brown et al., 2002).

Таблиця 14

Вміст і склад стеролів у проаналізованих рослинних оліях

Номер стеролу*	Загальна назва стеролу	Кун-жунт	Олива	Соняшник	Соняшник	Рицина	Рапс	Сафлор	Сафлор	Арахіс	Льон (на-сіння льо-ну)	Льон (на-сіння льо-ну)	Соя
					Хо-лод-не пре-су-ван-ня				Хо-лод-не пре-су-ван-ня				
1	холестерин	0,2	0,8	0,2	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4	0,2
2	брасікастерол	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
3	чалінастерол / 24-метилхолес-терин	1,5	0,1	0,3	0,1	1,1	2,4	0,2	0,1	0,9	1,5	1,4	0,8
4	кампестерол / 24-метилхолес-терин	16,2	2,4	7,4	7,9	8,4	33,6	12,1	8,5	17,4	15,7	14,4	16,9
5	кампестанол / 24-метилхолес-танол	0,7	0,3	0,3	0,1	0,9	0,2	0,8	0,8	0,3	0,2	0,2	0,7
6	C29:2*	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,5	0,5	0,0	1,2	1,3	0,1
7	Δ5-стигмастерол	6,4	1,2	7,4	7,2	18,6	0,7	7,0	4,6	6,9	5,1	5,8	17,6
8	невідомий	0,5	1,3	0,7	0,6	0,8	0,7	0,7	1,3	0,4	0,7	0,6	1,3
9	ергост-7-ен-3β-ол	0,1	0,1	1,9	1,8	0,2	0,4	2,7	4,0	1,4	1,4	1,4	1,0
10	невідомий	0,0	1,3	0,9	0,8	1,2	0,9	1,8	0,7	1,2	0,7	0,5	0,7
11	ебурикол	1,6	1,8	4,1	4,4	1,5	1,0	1,9	2,9	1,2	3,5	3,3	0,9
12	β-ситостерол / 24-етилхолестерин	55,3	45,6	43,9	43,6	37,7	50,8	40,2	35,1	57,2	29,9	28,4	40,2
13	Δ5-авенастерол / ізофукостерол	8,6	16,9	7,2	4,1	19,3	4,4	7,3	6,3	5,3	23,0	24,2	3,3
14	тритерпеновий спирт	0,0	2,4	0,9	1,1	0,0	0,0	1,6	1,9	0,0	0,0	0,0	0,9
15	тритерпеновий спирт	0,0	0,0	0,7	0,6	0,0	0,0	2,8	1,8	0,0	0,0	0,3	0,0
16	C29:2*	0,0	0,5	0,7	0,7	1,5	1,2	2,8	1,9	2,0	1,0	0,7	0,5
17	C29:2*	1,0	0,9	2,3	2,4	0,6	0,4	1,3	1,9	0,9	1,0	1,0	1,0
18	C30:2*	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19	Δ7-стигмастерол / стигмаст-7-ен-3β-ол	2,2	7,1	9,3	10,9	2,3	0,9	10,5	18,3	1,1	7,9	8,7	5,6
20	Δ7-авенастерол	1,3	0,1	4,0	3,6	0,6	0,2	2,0	4,7	0,7	0,4	0,4	0,6
21	невідомий	0,7	7,1	0,9	0,8	0,0	0,4	0,3	0,4	0,0	3,0	3,6	0,0
22	невідомий	0,3	0,0	0,3	0,9	0,0	0,0	1,2	1,3	0,2	0,1	0,0	0,3
23	невідомий	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5
24	невідомий	0,0	3,1	0,9	1,3	0,6	0,4	0,2	0,4	0,7	1,7	1,9	0,8
25	невідомий	0,9	0,4	0,3	0,5	0,3	0,1	0,5	0,7	0,3	0,1	0,1	0,6

Номер стеролу*	Загальна назва стеролу	Кун-жут	Олива	Со-няш-ник	Со-няш-ник	Ри-цина	Рапс	Са-флор	Са-флор	Ара-хіс	Льон (на-сіння льо-ну)	Льон (на-сіння льо-ну)	Соя
26	C30:2	2,2	6,0	4,6	5,7	1,4	0,6	1,0	1,2	1,2	1,2	1,1	5,2
27	невідомий	0,0	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,0	0,3
	Сума	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Загальний стерол (мг/г олії)	5,8	2,4	4,1	3,7	1,9	6,8	3,2	3,0	3,2	4,8	5,2	3,0

C29:2* і C30:2* позначають стерол C29 з двома подвійними зв'язками і стерол C30 з двома подвійними зв'язками, відповідно.

Розглядалися відомі ЛФКАТ, і багато з них були вибрані для тестування, зокрема, ті, від яких не очікувалося збільшення інкорпорації ДГК в положенні sn-2, як контроль. Відомі ЛФКАТ включали: ЛФКАТ2: *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 40, номер доступу ABG48392, Kim et al., 2005), ЛФКАТ *Limnathes alba* (SEQ ID NO: 41, номер доступу AAC49185, Lassner et al., 1995), Slc1p *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 42, номер доступу NP_010231, Zou et al., 1997), ЛФКАТ 1 *Mortierella alpina* (SEQ ID NO: 44, номер доступу AED33305; US 7879591) і ЛФКАТ *Brassica napus* (SEQ ID NO: 45 і SEQ ID NO: 46, номери доступу ADC97479 і ADC97478, відповідно).

ЛФКАТ2 *Arabidopsis* (також позначена як ЛФАТ2) являє собою локалізований в ендоплазматичному ретикулумі фермент, що продемонстрував активність по відношенню до субстратів C16 і C18, однак активність по відношенню до субстратів C20 або C22 не тестувалася (Kim et al., 2005). ЛФКАТ2 *Limnathes alba* продемонструвала вставку ацильного ланцюга C22:1 в положення sn-2 ФК, хоча здатність використовувати ДГК або ДПК як субстрат не тестувалася (Lassner et al., 1995). Вибрана ЛФКАТ *S. cerevisiae* Slc1p продемонструвала активність у вигляді використання 22:1-КоА на додаток до 18:1-КоА як субстратів, указуючи на широку специфічність по відношенню до субстратів з урахуванням довжини ланцюга (Zou et al., 1997). Знову, ДГК-КоА, ДПК-КоА та інші ДЛ-ПНЖК не тестувалися як субстрати. Раніше було продемонстровано, що ЛФКАТ *Mortierella* володіє активністю по відношенню до жирнокислотних субстратів ЕПК і ДГК в трансгенному *Yarrowia lipolytica* (US 7879591), але їх активність у рослинних клітинах невідома.

Додаткові ЛФКАТ були ідентифіковані винахідниками. *Micromonas pusilla* являє собою мікроводорість, що продукує та акумулює ДГК в олії, хоча позиційний розподіл ДГК на ТАГ у цьому виді не було підтверджено. ЛФКАТ *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 43, номер доступу XP_002501997) була ідентифікована шляхом пошуку серед геномних послідовностей *Micromonas pusilla* з використанням ЛФКАТ2 *Arabidopsis* як послідовності запиту BLAST. З'явилися декілька послідовностей-кандидатів, і послідовність XP_002501997 була синтезована для тестування до C22 ДЛ-ПНЖК. ЛФКАТ *Ricinus communis* була анотована як передбачувана ЛФКАТ в послідовності геному рицини (Chan et al., 2010). Чотири кандидати на ЛФКАТ з геному рицини були синтезовані і протестовані на неочищених лізатах листя інфільтрованої тканини листа *N. benthamiana*. Розкрита в цьому документі послідовність-кандидат продемонструвала активність ЛФКАТ.

Ряд кандидатів на ЛФКАТ був вирівняний з відомим ЛФКАТ на філогенетичному дереві (Фіг. 8). Слід зазначити, що передбачувана ЛФКАТ *Micromonas* не групується з передбачуваними C22 ЛФКАТ, але має дивергуючу послідовність.

Як первинний аналіз різних ЛФКАТ щодо їх здатності використовувати ДГК-КоА як субстрат, одержують химерні генетичні конструкції для конститутивної експресії екзогенних ЛФКАТ в листі *N. benthamiana*, кожна під контролем промотору 35S, як розкрито нижче: 35S:Arath-ЛФАТ2 (*Arabidopsis* ER ЛФКАТ); 35S:Limal-ЛФКАТ (ЛФКАТ *Limnathes alba*); 35S:Sacce-Slc1p (ЛФКАТ *S. cerevisiae*); 35S:Місру-ЛФКАТ (ЛФКАТ *Micromonas pusilla*); 35S:Moral-ЛФКАТ1 (ЛФКАТ *Mortierella alpina*); 35S:Brana-LPAAT1.13 (*Brassica napus* ЛФАТ1.13); 35S:Brana-LPAAT1,5 (*Brassica napus* ЛФАТ1,5). Конструкції 35S:p19, що не містять екзогенної ЛФКАТ, використовували у експерименті як контроль. Кожну із вказаних конструкцій вводили за допомогою *Agrobacterium* в листя *N. benthamiana*, як розкрито у Прикладі 1, і через 5 днів після інфільтрації оброблені зони листя вирізували і подрібнювали для одержання лізату листя. Кожен лізат містить екзогенну ЛФКАТ, а також ендогенні ферменти для синтезу ЛФК. Реакційні суміші одержували *in vitro*,

окремо додаючи до лізатів мічені ^{14}C ОК і ДГК. Реакційні суміші інкубують при 25°C , і рівень інкорпорації мічених ^{14}C жирних кислот у ФК визначають за методом ТШХ. Обчислювали здатність кожної ЛФКАТ використовувати ДГК відносно АРК і жирних кислот С18. Знайдено, що ЛФКАТ пінника лугового, *Mortierella* і *Saccharomyces* володіють активністю по відношенню до субстрату ДГК, причому радіомічена ФК виникає у випадку цих, але не інших ЛФКАТ. Активність всіх ЛФКАТ була підтверджена контрольним споживанням олеїнової кислоти.

Для тестування активності ЛФКАТ в насінні, деяку кількість кодуєчих білок послідовностей або ЛФКАТ вставляли до бінарного вектору під контролем промотору конлініну (*pLuCn1*). Одержані в результаті генетичні конструкції, що містять химерні гени *Cn1Arath*-ЛФКАТ (негативний контроль), *Cn1Limal*-ЛФКАТ, *Cn1Sacce-Slc1p*, і *Cn1Moral*-ЛФКАТ, відповідно, далі використовують для трансформації рослин *A. thaliana*, які утворюють ДГК у насінні, щоб одержати стабільні трансформанти, які експресують ЛФКАТ і трансгенний шлях ДНК у специфічній для насіння формі, щоб протестувати, чи буде збільшуватися інкорпорація ДГК у положенні *sn-2* ТАГ. Крім того, конструкції використовуються для трансформації рослин *B. napus* і *S. sativa*, які вже містять конструкцію GA7 та її варіанти (Приклади 2–4), з метою одержання потомства, що несе материнські і ЛФКАТ генетичні конструкції. Протестоване збільшення інкорпорації ДГК в положенні *sn-2* ТАГ відносно інкорпорації в рослинах без кодуєчих ЛФКАТ трансгенів. Вміст олії також підвищується в насінні, особливо у випадку насіння, що продукує вищі рівні ДГК, нейтралізуючи тенденцію, спостережувану в насінні *Arabidopsis*, як розкрито у Прикладі 2.

Конструкцію 35S:*Moral-LPAAT1* використовували для трансформації вже трансгенної лінії *Arabidopsis thaliana*, що була гомозиготною по Т-ДНК із конструкції GA7, і насіння якої містило близько 15 % ДГК у ліпідах насіння (Petrie et al., 2012). Для цього застосовували ген селекційного маркера канаміцину в конструкції 35S:*Moral-LPAAT1*, що був відмінний від гена селекційного маркера *bar*, вже присутнього у трансгенній лінії. Були відібрані трансгенні саджанці, стійкі до канаміцину, і вирощені до стану зрілості в теплиці. Урожай насіння T2 був зібраний, і склад жирних кислот в загальних ліпідах насіння проаналізований методом ГХ (Табл. 15). Три фенотипи спостерігали серед 33 незалежно трансформованих ліній. У першій групі (6/33 ліній), вміст ДПК істотно підвищувався, до значно вищого рівня, ніж рівень ДГК, до близько 10,6 % в загальних ліпідах насіння. Це відбувалося за рахунок ДГК, вміст якої був істотно знижений у даній групі ліній. У двох лініях із вказаної першої групи сумарний вміст ДПК + ДГК був знижений, але не в інших 4 лініях. У другій групі (5/33), рівні ДПК і ДГК були рівними, із близько таким же сумарним вмістом ДПК + ДГК, як і в насінні материнської рослини. У третій групі рівні ДПК і ДГК були подібними до рівнів у насінні материнських рослин. Одне з можливих пояснень для підвищеного рівня ДПК у першій і другій групах полягає в тому, що ЛФААТ витісняє $\Delta 4$ -десатуразу на субстраті ДПК-КоА і переважно інкорпорує ДПК у ПК і далі в ТАГ, відносно $\Delta 4$ -десатурації. Друге можливе пояснення полягає в тому, що $\Delta 4$ -десатурація частково інгібується.

Збирали насіння рослин *Arabidopsis*, трансформованих Т-ДНК конструкцією GA7, що були додатково трансформовані вектором *Cn1Moral-LPAAT*, і з насіння екстрагували олію. Далі фракцію ТАГ виділяли з екстрагованої олії методами ТШХ і виділяли з пластинки ТШХ. Одержані зразки ТАГ і зразки олії з насіння до фракціонування аналізували за допомогою розщеплення ліпазою *Rhizopus*, щоб визначити позиційний розподіл ДГК. Ліпаза є специфічною відносно ацильних груп, естерифікованих у положенні *sn-1* або *sn-3* ТАГ. Це здійснювали шляхом приготування емульсії кожного зразка ліпиду у 5 % аравійській камеді, із застосуванням пристрою для обробки ультразвуком, і додаючи розчин ліпази *Rhizopus* у 0,1 М Трис- HCl , pH 7,7, що містив 5 mM CaCl_2 , з інкубацією сумішей при 30°C і безперервному струшуванні. Реакцію в кожній реакційній суміші зупиняли, додаючи хлороформ : метанол (2/1, об/об) і один об'єм 0,1 М KCl до кожної суміші. Ліпід екстрагували у хлороформну фракцію, і визначали відносні кількості *sn-2* МАГ, *sn-1/3* ФФХ, ДАГ і компонентів ТАГ одержаного ліпиду розділенням на просоченій 2,3 % борною кислотою пластинці ТШХ із застосуванням гексану/діетилового ефіру/оцтової кислоти (50/50/1, об/об). Смуги ліпідів візуалізували, оббризкуючи 0,01 % примуліном в ацетоні/воді (80/20, об/об) на пластинці ТШХ з візуалізацією в УФ-світлі. Окремі смуги ліпідів ідентифікували на базі плям ліпідних стандартів, нанесених на таку ж пластинку ТШХ. ТШХ смуги ліпідів збирали у скляні флакони, і одержували з них метилові ефіри жирних кислот із застосуванням 1 н метанольної HCl (Supelco), з інкубацією при 80°C протягом 2 годин. Склад жирних кислот індивідуальних ліпідів був проаналізований ГХ.

Даний аналіз продемонстрував, що ДГК у насінні материнських рослин, трансформованих GA7 (лінії 22-2-1-1 і 22-2-38-7), переважно була естерифікована у положенні *sn-1* або *sn-3* ТАГ. І навпаки, ліпіди в насінні NY11 і NY15, трансформованому як конструкцією GA7, так і

трансеном, що кодує ЛФААТ, були збагачені ДГК у sn-2, причому 35 % ДГК в одній із ліній і 48 % ДГК у іншій лінії були естерифіковані у положенні sn-2 ТАГ, тобто після розщеплення ліпазою ДГК була присутня, як sn-2-МАГ (Табл. 16). Аналогічні результати одержані для насіння *V. parvis* і *V. juncea*, трансформованого як Т-ДНК із конструкції GA7-modB, так і геном, що кодує ЛФААТ, і

5

продукуючого ДГК. Для того, щоб визначити, чи існує перевага ЛФААТ *Mortierella* або іншої ЛФААТ відносно ДПК-КоА або ДГК-КоА, *in vitro* одержували реакційні суміші, додаючи окремо ^{14}C -мічений-ДПК-КоА або -ДГК-КоА до лізатів листя *N. benthamiana*, тимчасово експресуючого ЛФААТ-кандидату під контролем конститутивного промотору, як викладено вище. Реакційні суміші інкубували при

10

25°C, і рівні інкорпорації мічених ^{14}C жирних кислот в у ФХ визначали за ТШХ методом аналізу ліпідів. Оцінювали здатність кожної ЛФААТ використовувати ДГК-КоА відносно ДПК-КоА. Гени, що кодують ЛФААТ з доведеною високою ДГК інкорпоруючою активністю ЛФААТ застосовували для одержання трансформованих ДГК-продукуючих рослин рапсу і насіння.

15

Гени, що кодують ЛФААТ з високою активністю використання ДПК-КоА, застосовували для трансформації ДПК-продукуючих рослин і насіння, щоб збільшити кількість ДПК, естерифікованої у положенні sn-2 ТАГ.

Таблиця 15

Склад жирних кислот (% загальних жирних кислот) трансгенного насіння *A. thaliana*, трансформованого конструкцією ЛФААТ1, а також конструкцією GA7 для продукування ДГК.

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	C22:1	20:5n3	22:5n3	C22:6n3
NY-1	9.3	3.2	9.1	6.8	9.4	0.5	23.8	1.6	4.1	7.9	5.1	0.6	0.0	0.9	0.4	0.6	0.6	1.2	7.9	4.5
NY-2	10.7	3.3	6.5	4.4	7.6	0.3	28.1	1.9	4.3	8.5	3.7	0.7	0.0	1.1	0.5	1.1	0.8	1.4	1.1	11.6
NY-3	9.3	2.8	6.3	3.4	10.3	0.2	32.8	2.2	2.7	6.2	3.6	1.1	0.0	1.9	0.5	1.4	0.9	0.7	1.0	10.7
NY-4	11.4	3.5	4.5	3.1	7.0	0.3	32.5	2.1	4.7	5.5	2.3	1.0	0.0	1.9	0.6	0.8	0.6	1.1	0.9	14.3
NY-5	14.6	4.5	7.0	7.7	6.7	0.3	20.7	2.2	5.7	5.4	4.8	0.4	0.0	0.9	0.9	0.8	0.4	1.2	1.0	11.7
NY-6	7.8	2.7	12.5	2.2	18.0	0.1	24.9	1.8	0.7	15.5	3.1	1.4	0.0	1.2	0.3	0.5	1.5	0.3	3.0	0.8
NY-7	9.3	2.9	6.7	3.8	9.2	0.2	31.5	2.1	3.2	7.5	3.7	0.9	0.0	1.6	0.5	1.3	0.8	0.8	1.1	10.9
NY-8	8.8	3.2	8.2	5.5	11.0	0.3	25.3	1.9	3.0	8.3	5.4	1.0	0.0	1.2	0.5	0.8	0.8	0.8	6.1	6.0
NY-9	12.3	3.7	5.0	4.6	7.1	0.2	28.3	2.3	4.2	5.6	3.8	0.8	0.0	1.6	0.7	0.7	0.6	1.1	1.2	13.8
NY-10	8.6	3.2	8.5	3.1	9.7	0.3	31.5	1.6	3.4	8.7	2.8	1.0	0.0	1.3	0.3	0.9	0.6	1.1	10.6	1.0
NY-11	11.5	3.2	4.5	2.5	7.1	0.3	33.3	2.1	3.9	5.7	1.9	0.9	0.0	2.0	0.5	0.7	0.7	0.8	1.0	15.6
NY-12	8.7	3.2	7.5	5.1	8.5	0.2	26.8	2.0	3.7	8.7	5.1	0.9	0.0	1.2	0.5	1.1	0.8	1.2	10.0	2.6
NY-13	11.5	3.4	5.2	3.4	8.3	0.3	30.0	2.2	5.0	6.2	3.2	0.9	0.0	1.7	0.6	1.5	0.8	1.1	1.0	11.6
NY-14	9.2	2.9	6.6	2.0	10.3	0.2	34.7	1.9	3.3	7.7	1.6	1.2	0.0	1.8	0.4	1.2	0.8	0.9	0.8	11.1
NY-15	10.9	3.3	4.6	2.7	7.0	0.3	34.1	1.9	5.1	5.5	2.0	0.9	0.0	1.8	0.5	0.8	0.5	1.0	1.0	14.7
NY-16	10.5	3.4	6.0	4.6	7.8	0.3	30.3	1.8	4.4	5.4	2.9	0.7	0.0	1.5	0.5	0.9	0.5	1.1	1.3	14.2
NY-17	9.1	2.4	5.9	2.5	10.4	0.2	35.4	1.6	3.6	6.4	2.1	1.1	0.0	1.9	0.4	1.2	0.7	1.0	0.9	11.7
NY-18	9.7	3.6	8.8	6.2	12.1	0.3	21.0	1.9	4.0	8.3	5.9	0.8	0.0	0.9	0.5	0.6	0.9	1.0	5.7	5.1
NY-19	8.4	3.1	12.0	3.1	14.6	0.2	28.8	1.7	1.6	11.3	3.2	1.0	0.0	1.4	0.4	0.6	1.0	0.6	3.9	1.2
NY-20	10.1	3.2	5.4	3.3	8.9	0.3	32.8	2.1	4.1	5.5	2.8	1.0	0.0	1.9	0.5	1.1	0.7	0.9	1.1	12.1
NY-21	10.5	3.6	5.6	3.8	8.2	0.3	31.9	2.0	4.6	5.9	2.8	0.9	0.0	1.7	0.5	0.8	0.6	1.0	0.9	12.5
NY-22	8.4	3.3	7.4	2.3	9.4	0.2	33.5	1.8	3.4	8.8	2.2	1.2	0.0	1.7	0.4	1.3	0.7	1.0	5.5	6.1
NY-23	8.3	2.8	7.0	1.9	11.0	0.2	34.6	1.9	2.6	9.3	1.7	1.4	0.0	2.0	0.4	1.2	1.0	0.7	0.7	9.9
NY-24	9.0	3.3	7.0	4.3	9.9	0.2	30.0	1.8	3.2	7.7	4.3	1.0	0.0	1.6	0.4	0.6	0.8	0.8	3.4	8.8
NY-25	9.4	3.3	6.0	3.6	8.2	0.2	32.6	1.8	4.0	6.8	3.6	1.0	0.0	1.7	0.4	0.6	0.7	0.9	4.8	8.7
NY-26	10.4	4.2	8.0	3.8	16.0	0.4	18.7	2.5	2.5	10.1	4.0	1.0	0.0	0.8	0.8	1.9	1.0	1.4	1.4	8.4
NY-27	9.4	3.2	7.5	5.3	11.4	0.2	28.6	2.0	2.3	7.5	5.5	1.0	0.0	1.8	0.5	0.6	0.9	0.6	1.5	7.6
NY-28	9.4	3.4	6.5	3.6	8.8	0.3	32.4	1.8	3.9	6.7	3.3	0.9	0.0	1.6	0.4	0.7	0.6	1.0	10.1	2.7
NY-29	10.2	3.7	7.6	4.3	8.0	0.4	28.8	1.7	4.8	7.6	2.9	0.7	0.0	1.1	0.4	0.7	0.5	1.4	1.9	11.6
NY-30	11.1	3.5	5.4	4.1	7.3	0.3	30.2	2.0	4.7	6.0	3.0	0.8	0.0	1.7	0.5	0.7	0.7	1.1	1.0	13.7
NY-31	9.6	3.0	5.6	2.1	8.5	0.2	35.4	2.0	3.9	7.1	1.7	1.2	0.0	2.1	0.4	0.9	0.8	0.8	0.8	12.3
NY-32	8.5	3.1	8.0	1.9	9.5	0.3	31.7	1.5	3.3	12.9	1.4	1.0	0.1	1.1	0.3	1.2	0.8	1.2	0.8	9.8
NY-33	10.3	3.8	7.7	6.3	8.1	0.3	24.4	2.0	4.4	7.5	4.8	0.7	0.0	1.1	0.5	0.6	0.6	1.1	2.8	10.7

Таблиця 16

Присутність ДГК у положенні sn-2 ТАГ у ліпіді із трансгенного насіння *A. thaliana*, трансформованого вектором Cn11:Moral-LPAAТ, а також Т-ДНК конструкцією GA7, відносно присутності ДГК у ТАГ. Склад жирних кислот ТАГ і sn-2 МАГ також включав по 0-0,4 % кожної з 14:0, 16:1w13t, 16:2, 16:3, 22:0 і 24:0.

Зразок	C16:0	16:1d9	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:3n3	20:4n3	C22:1	20:5n3	C22:4n6	22:5n6	22:4n3	22:5n3	C22:6n3
22-2-1-1 ТАГ	12,2	0,4	4,4	6,4	3,9	7,2	0,8	28,8	1,6	4,3	9,7	2,3	0,7	0,1	0,1	1,3	1,0	0,6	2,1			0,0	0,7	10,1
2-МАГ	0,6	0,1	0,3	8,3	2,5	10,1	0,7	53,9	0,2	6,5	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	3,8			0,0	2,3	9,1
ДГК в sn-2 = 30 %																								
22-2-38-7 олія	10,0	0,2	3,7	6,0	2,7	6,4	0,4	33,8	1,6	3,7	11,3	1,8	0,8			1,3	0,9	0,6	1,2	0,1			0,7	11,6
2-МАГ	0,5	0,1	0,3	9,7	2,4	11,1	0,6	60,0	0,1	3,6	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,4	0,2	0,0	2,1			0,1	1,3	6,7
ДГК в sn-2 = 19 %																								
Додаткова трансформація геном, що кодує <i>Mortierella alpina</i> ПФААТ																								
NY11-ТАГ	11,0	0,2	3,4	6,0	2,8	9,2	0,3	34,8	1,6	3,6	6,3	1,8	1,0	0,0	0,0	1,8	0,7	0,6	0,9		0,0	0,1	0,6	12,2
2-МАГ	0,7	0,1	0,2	6,7	1,1	11,8	0,3	49,8	0,2	3,7	0,5	1,5	0,3	0,0	0,0	1,6	0,6	0,1	0,8		0,1	0,2	1,6	17,8
ДГК в sn-2 = 48 %																								
NY-15- олія	11,0	0,0	3,3	4,6	2,8	6,9	0,3	33,6	2,0	5,1	5,5	2,1	0,9	0,0	0,0	1,9	0,7	0,6	0,9	0,1	0,4		0,9	14,9
2-МАГ	0,8	0,1	0,3	6,4	1,3	11,4	0,3	50,2	0,2	4,9	0,4	1,4	0,2	0,0	0,0	1,5	0,6	0,1	0,9	0,0	0,0	0,2	1,6	16,7
ДГК в sn-2 = 37 %																								

Приклад 8. Подальший аналіз трансгенного насіння *Camelina sativa*

Загальний вміст ліпідів

- 5 Насіння *C. sativa*, гомозиготне по Т-ДНК із конструкції GA7, що містить ДГК у загальному вмісті жирних кислот, було проаналізоване щодо вмісту складу загальних ліпідів і як вказано нижче. Для насіння виконували дві послідовні стадії екстракції розчинником, спочатку із застосуванням гексану, і потім із застосуванням хлороформу/метанолу. В ході екстракції і аналізу не додавали антиоксидантів. Метод екстракції Сокслета, який звичайно застосовується
- 10 для виділення ліпідів з насіння шляхом тривалого нагрівання і кип'ятіння із зворотним холодильником суміші ліпиду/розчинника, у даному випадку не застосовувався через потенційне розкладання або окиснення ω 3 ПНЖК, таких як ДГК.

- Гексан застосовували як розчинник для першої екстракції, оскільки він є промисловим стандартом для олійних культур. Крім того, він переважно екстрагує ТАГ-вмісну олію за рахунок своїх сольватувальних властивостей і відносно слабкої сольобілізації полярних ліпідів, особливо при кімнатній температурі. Трансформоване і контрольне насіння *Camelina* (130 г і 30 г, відповідно) змочували гексаном і подрібнювали за допомогою електричної агатової ступки і товкача (Retsch Muhle, Німеччина). Суміші переносили до ділильних лійок і чотири рази екстрагували із застосуванням загального об'єму 800 мл гексану, включаючи статичну екстракцію протягом ночі для третьої екстракції. Для кожної екстракції екстракти фільтрували крізь фільтр з скловолокна GFC під вакуумом для видалення дрібних частинок, після чого випаровували на ротаційному випарнику при 40 °C під вакуумом. Екстракти об'єднували в пул з одержанням багатих на ТАГ гексанових екстрактів.

- Після екстракції гексаном шрот насіння, що залишився, далі екстрагували із застосуванням хлороформу-метанолу (ГМ, 1:1 об/об) за такою ж методикою, як здійснювали екстракцію гексаном. Далі шрот видаляли фільтрацією, і об'єднані екстракти випаровували на роторному випарнику. Об'єднані в пул неочищені ХМ загального ліпиду далі розчиняли із застосуванням однофазної суміші метанолу-хлороформу-води (2:1:0,8, об/об/об). Фракції розділяли додаванням хлороформу-води (кінцеве співвідношення розчинників, 1:1:0,9 об/об/об метанолу/хлороформу/води). Очищений ліпід у кожному екстракті, розподілений у нижній хлороформній фазі, концентрували із застосуванням роторного випаровування, і одержували ХМ екстракти, багаті на полярні ліпіди. Вміст ліпиду в кожному із цих екстрактів визначали гравіметрично.

- Для аналізу складу жирних кислот, аліквоти гексанових і ХМ екстрактів транс-метилували за способом Christie et al. (1982) з одержанням метилових ефірів жирних кислот (МЕЖК), застосовуючи метанол-хлороформ-конц. гідрохлоридну кислоту (3 мл, 10:1:1, 80 °C, 2 години). МЕЖК екстрагували гексаном-хлороформом (4:1, 3 x 1,8 мл). Крім того, зразки шроту насіння (1-

2 г), що залишився після екстракції гексаном і ХМ, транс-метилували для гравіметричного вимірювання вмісту будь-якого залишкового ліпиду у вигляді МЕЖК. Загальний вміст ліпідів у насінні обчислювали, підсумовуючи вміст ліпідів у гексанових і ХМ екстрактах та вміст МЕЖК у трансметильованому шроті після екстракції розчинниками.

Трансгенне насіння містило дещо меншу кількість загальних ліпідів, на рівні 36,2 % від маси насіння, в порівнянні з насінням *Camelina sativa* дикого типу, 40,9 % від маси насіння. Для насіння, включаючи насіння олійних культур, загальні ліпіди визначали як суму екстрагованого розчинниками ліпиду, одержаного послідовною екстракцією гексаном, а потім хлороформом-метанолом, і залишкового ліпиду, вивільненої трансметилуванням екстрагованої макухи після екстракції розчинниками, як описано для прикладу в даному описі. Такі загальні ліпіди здебільшого складалися із ліпідів, що містять жирні кислоти, таких як триацилгліцероли і полярні ліпіди, і невеликих кількостей ліпідів, що не містять жирних кислот, таких як фітостероли і жирні спирти, що можуть бути присутніми у вільній неестерифікованій формі або можуть бути естерифіковані жирними кислотами. Крім того, будь-які ефіри стеролів або ефіри воску і вуглеводні, такі як каротиноїди, наприклад, β -каротин, також входили до ліпиду, що екстрагується розчинниками, якщо вони присутні. Вони були включені до загального гравіметричного визначення і були показані в аналізі ТШХ-ПІД (Табл. 17).

Із загальних ліпідів, 31 %–38 % ліпідів від маси насіння було екстраговано гексаном для трансгенного і контрольного насіння, відповідно, що відповідає 86 % і 92 % загальних ліпідів у насінні. За допомогою екстракції ХМ добували ще 4,8 % і 2,4 % (від маси насіння), в основному багатий на полярні ліпіди екстракт із трансгенного і контрольного насіння, відповідно. Залишковий ліпід, що вивільняється трансметилуванням шроту насіння олійної культури, який залишився після екстракції розчинниками, становив 0,3 % і 0,4 % від маси насіння, відповідно. Тобто, перша і друга екстракція розчинниками сумарно добуває 99 % від загального вмісту ліпідів у насінні (тобто, 36,2 % або 40,9 % від маси насіння, що в основному є ліпідом, який містить жирні кислоти, наприклад, тригліцероли і полярні ліпіди, які складаються із гліко- і фосфоліпідів (див. наступний розділ — аналіз класів ліпідів)).

Аналіз класів ліпідів

Класи ліпиду у гексанових і ХМ екстрактах були проаналізовані тонкошаровою хроматографією з виявленням за допомогою плазмово-іонізаційного детектора (ТШХ-ПІД; *latroscan Mark V*, *latron Laboratories*, Токіо, Японія), із застосуванням гексану/діетилового ефіра/льодяної оцтової кислоти (70:10:0,1, об/об/об) як системи розчинників для проявлення, в поєднанні з кремнію діоксидом *Chromarod S-III* на кварцових паличках. Придатні калібрувальні криві отримували із застосуванням репрезентативних стандартів, одержаних від *Nu-Chek Prep, Inc.* (Елізайан, Мінесота, США). Дані обробляли за допомогою програмного забезпечення *SIC-480II* (Версія *SISC: 7.0-E*). Різні види фосфоліпідів розділяли із застосуванням очищеної фосфоліпідної фракції, одержаної після колонкової хроматографії на кремнію діоксиді, з проявленням паличок у хлороформі/метанолі/льодяній оцтовій кислоті/воді (85:17:5:2, об/об/об) перед виявленням за допомогою ПІД.

Для відокремлення ТАГ, гліколіпідних і фосфоліпідних фракцій від ХМ екстрактів застосовували гель кремнію діоксиду 60 (100–200 меш) (0,3–1 г) у короткій скляній колонці або піпетці Пастера, заповненій скловатою, щоб очистити 10 мг очищеного ГМ екстракту ліпідів. Залишкову фракцію ТАГ у ХМ екстракті елюювали із застосуванням 20 мл 10 % діетилового ефіру в гексані, гліколіпіди елюювали 20 мл ацетону, і фосфоліпіди елюювали у дві стадії, спочатку 10 мл метанолу, і потім 10 мл метанолу-хлороформу-води (5:3:2). Вказана друга елюація збільшує вихід фосфоліпідів. Вихід кожної фракції визначали гравіметрично, і чистоту перевіряли ТШХ-ПІД. Всі екстракції і фракції зберігали у дихлорметані при -20 °C до подальшого аналізу ГХ і ГХ-МС.

Багаті на ТАГ гексанові екстракти від кожного із трансгенного і контрольного насіння містили близько 96 % ТАГ. ХМ екстракти містили залишкові кількості ТАГ 44 % і 13 % мас. ХМ екстрактів, відповідно, для трансгенного насіння і насіння дикого типу. На протилежність гексановим екстрактам, ХМ екстракти були багаті на полярні ліпіди, а саме фосфоліпіди і гліколіпіди, вміст яких відповідав 50 % і 76 % мас. ХМ екстрактів, відповідно, для трансгенного і контрольного насіння (Табл. 17). Основним фосфоліпідом був фосфатидилхолін (ФХ), який складав 70 %–79 % загальних фосфоліпідів, далі слідував фосфатидилетаноламін (ФЕ, 7 %–13 %), при відносно низьких рівнях фосфатидинової кислоти (ФК, 2 %–5 %) і фосфатидилсерина (ФС, < 2 %).

Склад жирних кислот

Загалом для насіння, що продукує ДГК та/або ДПК, автори винаходу спостерігали склад жирних кислот загальних ліпідів у насінні, за даними прямого трансметилування загальних

ліпідів у насінні, подібний до складу ліпідів у фракції ТАГ. Це було результатом того, що більше 90 % загальних ліпідів, присутніх у насінні, знаходилися у формі ТАГ.

Склад жирних кислот різних класів ліпідів у гексанових і ХМ екстрактах визначали газовою хроматографією (ГХ) і методом ГХ-МС, із застосуванням приладу для ГХ Agilent Technologies 6890A (Пало-Альто, Каліфорнія, США), обладнаного капілярною колонкою із плавленого кварцу Supelco Equity™-1 (15 м x 0,1 мм в.д., товщина плівки 0,1 мкм, Беллефонт, Пенсільванія, США), ПІД, інжектором з розщепленням/без розщеплення, аутосемлером Agilent Technologies серії 7683B та інжектором. Газом-носієм був гелій. Зразки вводили інжекцією у режимі без розщеплення при температурі печі 120 °С. Після інжекції температуру печі підвищували до 270 °С із швидкістю 10 °С/хв, і в кінці до 300 °С із швидкістю 5 °С/хв. Елюйовані сполуки визначали кількісно за допомогою програмного забезпечення Agilent Technologies ChemStation (Пало-Альто, Каліфорнія, США). Результати ГХ містили помилку не більше ніж ± 5 % площі піку індивідуальних сполук.

Таблиця 17

Склад класу ліпідів (% від загальних ліпідів, одержаний для кожної стадії екстракції) у гексанових і ХМ екстрактах трансгенного і контрольного насіння *Camelina sativa*. ЕС, ЕВ і ГК не розділяли.

Клас ліпідів	Трансгенне насіння		Контрольне насіння	
	Гексановий	ХМ	Гексановий	ХМ
ЕС/ЕВ/ГК*	1,0	1,4	1,0	1,4
ТАГ	95,6	44,2	96,0	13,1
ВЖК	0,9	1,3	0,8	1,4
Н/в**	0,9	1,1	0,8	1,2
СТ	0,5	0,7	0,4	0,4
МАГ	0,7	1,1	0,8	6,2
ФЛ	0,3	50,3	0,3	76,3
Всього	100,0	100,0	100,0	100,0

Скорочення: ефіри стеролів (ЕС), ефіри восків (ЕВ), гідрокарбони (ГК), триацилгліцероли (ТАГ), вільні жирні кислоти (ВЖК), не визначено (н/в), стероли (СТ), моноацилгліцероли (МАГ), полярні ліпіди (ПЛ), що складаються з гліколіпідів і фосфоліпідів; * ЕС, ЕВ і ГК із цієї системи елюювалися разом; ** Може містити жирні спирти і діацилгліцероли (ДАГ).

Аналізи методом ГХ-мас-спектрометрії (ГХ-МС) здійснювали на приладі ГХ-МС із квадрупольними лінзами Finnigan Trace ultra (модель: ThermoQuest Trace DSQ, Thermo Electron Corporation). Дані обробляли за допомогою програмного забезпечення ThermoQuest Xcalibur (Остін, Техас, США). Прилад для ГХ був обладнаний інжектором на колонці і капілярною колонкою HP-5 Ultra Agilent J & W (50 м x 0,32 мм в.д., товщина плівки 0,17 мкм, Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія, США) з полярністю, подібною до описаної вище. Індивідуальні компоненти були ідентифіковані із застосуванням даних мас-спектру і порівнянням часу утримання з одержаним для аутентичних і лабораторних стандартів. Холостий аналіз за повною методикою проводили паралельно із серією зразків.

Дані складу жирних кислот у різних класах ліпідів в екстрактах наведені у Табл. 18. У ДГК-продуруючому насінні *Camelina* ДГК розподіляються на основні ліпідні фракції (ТАГ, фосфоліпіди і гліколіпіди) у пропорції, що варіює від 1,6 % до 6,8 %, із зворотною кореляцією між частками ДГК і АЛК. Багатий на ТАГ гексановий екстракт із трансгенного насіння містив 6,8 % ДГК і 41 % АЛК (Табл. 18). Багатий на полярні ліпіди ХМ екстракт містив 4,2 % ДГК і 50 % АЛК, тобто відносно меншу кількість ДГК і більше АЛК. Залишкові ТАГ з багатого на полярні ліпіди ХМ екстракту містили 6 % ДГК і 40 % АЛК. Гліколіпідна фракція, виділена з 3М екстракту, містила 3 % ДГК і 39 % АЛК, і фосфоліпідна фракція містила найнижчий рівень ДГК (1,6 %) і найвищі рівні АЛК (54 %). Трансгенне насіння *Camelina* містило вищі рівні АЛК і нижчі рівні ЛК (лінолева кислота, 18:2 ω 6), в порівнянні із контрольним насінням, в основних класах ліпідів (ТАГ, гліколіпіди і фосфоліпіди). Частки АЛК і ЛК складали: АЛК 39 %–54 % і ЛК 4 %–9 % для трансгенного насіння і АЛК 12 %–32 % і ЛК 20 %–29 % для контрольного насіння. Відносний рівень ерукової кислоти (22:1 ω 9) був нижчим у всіх фракціях із трансгенного насіння, ніж в контрольному насінні, наприклад, 1,3 % проти 2,7 % у гексанових екстрактах (Табл. 18).

Склад стеролів у насінні

Для визначення вмісту і складу стеролів у екстрагованих ліпідах, зразки, що містять близько 10 мг загальних ліпідів із багатого на ТАГ гексанового екстракту і багатого на полярні ліпіди ХМ екстракту омилювали із застосуванням 4 мл 5 % КОН у 80 % MeOH і нагрівали протягом 2 годин при 80 °С у вкритій тефлоном скляній пробірці із нагвинчуваною пробкою. Після охолодження реакційних сумішей додавали 2 мл води Milli-Q, стероли і спирти екстрагували тричі по 2 мл гексану : дихлорметану (4:1, об/об), струшуючи і перемішуючи вихровим перемішуванням. Суміші центрифугували, і кожен екстракт в органічній фазі промивали 2 мл води Milli-Q, струшуючи і центрифугуючи. Після відбору верхнього, стерол-вмісного органічного шару, розчинник випаровували за допомогою потоку газоподібного азоту, а стероли і спирти силілювали із застосуванням 200 мкл біс(триметилсиліл)трифторацетаміду (БСТФА, Sigma-Aldrich), нагріваючи протягом 2 годин при 80 °С у закупореному ГХ флаконі. В такий спосіб вільні гідроксильні групи перетворювали на їх триметилсилілові ефіри. Похідні стерол- і спирт-OTMSi сушили в потоці газоподібного азоту на нагрівальному блоці (40 °С) та повторно розчиняли у дихлорметані (ДХМ) безпосередньо перед аналізом ГХ/ГХ-МС, як викладено вище.

Таблиця 18

Склад жирних кислот (% загальних жирних кислот) ліпідних екстрактів і фракції з трансгенного і контрольного насіння *C. sativa*.

Жирна кислота	Трансгенне насіння						Контрольне насіння					
	Гексан	ХМ				Шрот	Гексан	ХМ				Шрот
	ТАГ	Загальні	ТАГ	ГЛ	ФЛ	Залишкові	ТАГ	Загальні	ТАГ	ГЛ	ФЛ	Залишкові
16:1ω7	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	-	-	0,3
16:0	6,2	12,8	6,8	21,3	19,4	10,4	6,7	12,8	7,8	29,6	13,7	10,3
18:4ω3	3,7	3,3	3,4	2,1	2,9	3,6	-	-	-	-	-	-
18:2ω6	7,1	3,9	8,8	7,2	3,7	8,8	22,2	28,4	29,4	20,8	29,3	27,9
18:3ω3	41,9	50,3	39,9	38,6	54,1	38,9	32,0	20,6	19,7	13,0	12,3	20,0
18:1ω9	11,1	4,7	9,6	7,2	2,8	8,1	14,0	25,4	13,3	14,7	35,7	14,3
18:1ω7	1,4	2,3	2,1	3,7	3,4	2,8	1,0	1,5	2,2	4,0	2,8	2,2
18:0	3,2	4,0	3,0	4,5	5,7	3,1	3,0	2,7	2,9	5,7	3,6	2,7
20:5ω3	0,4	0,2	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-
20:4ω3	0,4	0,4	0,4	-	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-
20:2ω6	0,7	0,7	0,8	0,6	0,4	0,7	1,8	0,8	2,1	1,2	-	1,8
20:3ω3	0,8	1,2	0,9	0,6	1,3	0,5	0,9	0,3	-	-	-	0,4
20:1ω9/11	11,6	6,1	10,9	5,1	1,3	8,4	12,5	3,0	11,1	4,2	1,7	9,4
20:1ω7	0,6	0,8	1,4	0,6	0,2	1,1	0,6	0,6	2,0	1,3	-	1,8
20:0	1,3	0,8	1,4	0,6	0,1	1,4	1,5	0,7	2,0	1,4	-	1,8
22:6ω3	6,8	4,2	6,1	3,0	1,6	5,4	-	-	-	-	-	-
22:5ω3	0,3	1,1	0,4	0,6	1,4	0,3	-	-	-	-	-	-
22:1ω9	1,3	1,0	1,8	0,6	0,1	1,5	2,7	0,7	3,6	0,9	-	2,9
22:0	0,3	0,2	0,3	0,6	0,1	0,7	0,3	0,2	0,7	0,8	-	0,8
24:1ω9	0,3	0,4	0,4	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,7	0,9	0,5	1,0
24:0	0,1	0,4	0,2	0,9	0,4	1,1	0,1	0,4	0,5	1,4	0,4	1,3
інші *	0,4	1,0	1,0	1,4	0,5	1,8	0,3	1,1	0,9	0,1	-	1,1
Всього	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Скорочення: триацилгліцероли (ТАГ), гліколіпіди (ГЛ), фосфоліпіди (ФЛ); Загальні: багатий на полярні ліпіди екстракт, що містить ГЛ і ФЛ із ХМ екстракту; ТАГ, ГЛ і ФЛ розділяли хроматографією на колонці із кремнію діоксидом з ХМ екстрактів; * Сумарний вміст міnorних жирних кислот

Основними стеролами, як у трансгенному, так і в контрольному насінні були 24-етилхолестерин (ситостерол, 43 %–54 % від загальних стеролів), 24-метилхолестерин (кампестерол, 20 %–26 %) з нижчими рівнями холестерину (5 %–8 %), брасікастерол (2 %–7 %), ізофукостерол (Δ5-авенастерол, 4 %–6 %), стигмастерол (0,5 %–3 %), холестер-7-ен-3β-ол, (0,2 %–0,5 %), 24-метилхолестанол (кампестанол, 0,4 %–1 %) і 24-дегідрохолестерин (0,5 %–2 %) (Табл. 19). Ці дев'ять стеролів відповідають за 86 %–95 % загальних стеролів, тоді як решта компонентів, що є стеролами, ідентифікована тільки частково за кількістю атомів вуглецю і

подвійних зв'язків. Загальні профілі стеролів були подібними для трансгенного і контрольного насіння, як у випадку гексанових, так і у випадку ХМ екстрактів.

Аналіз жирних спиртів

Жирні спирти в екстрактах були дериватизовані і проаналізовані щодо стеролів. Серії жирних спиртів від C16–C22, із супутніми ізо-розгалуженими жирними спиртами були ідентифіковані як у гексанових, так і ХМ екстрактах. Подібні профілі спостерігалися для трансгенного і контрольного насіння, з деякою варіацією у частках спостережуваних індивідуальних компонентів. Фітол, утворений із хлорофілу, був основним аліфатичним спиртом і відповідав за 47 % і 37 % загальних жирних спиртів у гексанових фракціях із трансгенного і контрольного насіння, відповідно. Спирти з непарною довжиною ланцюга присутні з вищими рівнями у ГМ екстракті (37 %–38 % від загального вмісту жирних спиртів), ніж у гексановому екстракті (16 %–23 %). 3-17:0 (16 %–38 %) переважав над 17:0 (0,3 %–5,7 %). Вміст інших спиртів із непарною довжиною ланцюга становив 19:0 (4,5 %–6,5 %). Інші знайдені спирти включали ізо-16:0, 16:0, ізо-18:0, 18:1, 18:0, з незначними рівнями ізо-20:0, 20:1, 20:0, а також були присутні ізо-22:0, 22:1 і 22:0.

Обговорення

Результати показують, що подрібнення за допомогою механізованої ступки і товкача із багаторазовою екстракцією гексаном при кімнатній температурі було ефективним з точки зору добування більшої частини ТАГ-вмісної олії із трансгенного насіння. На додаток до олії із трансгенного насіння, що містить помірні рівні ДГК, трансгенне насіння також містило значно вищі рівні АЛК в основних класах ліпідів (триацилгліцероли, гліколіпіди і фосфоліпіди), у порівнянні з контрольним насінням. Це показало, що активність $\Delta 15$ -десатурази значно підвищувалася у трансгенному насінні в ході розвитку насіння. Цікаво, що існували деякі невеликі відмінності у складі жирних кислот і частках ДГК у різних екстрактах і фракціях, причому рівні ДГК були вищими в багатому на ТАГ гексановому екстракті і ТАГ із ГМ екстракту (6 %–6,8 %) і нижчими у фракціях полярних ліпідів (3 % у гліколіпідах і 1,6 % у фосфоліпідах). Рівень 16:0 був вищим у фракціях полярних ліпідів, гліколіпідів і фосфоліпідів у ХМ екстрактах (19 %–21 %), в порівнянні з багатим на ТАГ гексановим екстрактом і ТАГ із ХМ екстракту (6 %–7 %).

Таблиця 19

Склад стеролів (% від загальних стеролів) у трансгенному і контрольному насінні *Camelina*.

Стероли	Трансгенне насіння		Контрольне насіння	
	Гексан	ГМ	Гексан	ГМ
24-дегідрохолестерин	0,8	1,8	0,5	1,4
Холестерин	5,7	7,6	4,7	7,2
Брасікастерол	4,4	6,5	1,9	4,2
Холест-7-ен-3 α -ол	0,2	0,5	0,3	0,4
Кампестерол	24,5	20,8	25,7	21,7
Кампестанол	0,4	1,1	0,4	0,9
Сігмастерол	1,0	2,6	0,5	1,6
Ситостерол	54,3	43,7	53,8	42,9
$\Delta 5$ -авенастерол	4,2	5,2	4,7	5,5
Сума	95,5	89,6	92,6	85,9
Інші				
UN1 C28 1db	0,6	1,2	0,7	1,2
UN2 C29 1db	1,2	2,0	1,2	2,4
UN3 C29 2db	0,9	1,8	1,3	2,4
UN4 C28 1db	0,3	0,9	0,6	1,1
UN5 C30 2db	1,2	1,8	1,4	1,8
UN6 C29 1db + C30 2db	0,3	2,7	2,2	5,2
Сума інших	4,5	10,4	7,4	14,1
Всього	100	100	100	100

Скорочення: Н/в означає невідомий стерол, число після С вказує на кількість атомів вуглецю, і db позначає кількість подвійних зв'язків.

Склад стеролів у трансгенному насінні і контрольному насінні був подібним до знайденого у рафінованій олії *Camelina* (Shukla et al., 2002), біли присутні ті ж основні стероли, вказуючи на те, що додані гени не впливали на синтез стеролів у насінні. Рівень холестерину в олії *Camelina* був вищим за той, що зустрічається у більшості рослинних олій. Присутній брасікастерол, який є

5 характерним стеролом, знайденим у родині Brassicaceae, що включає *Camelina sativa*.

Приклад 9. Продукування ДЛ-ПНЖК у насінні *Brassica juncea*

Трансгенні рослини *Brassica juncea* одержували із застосуванням конструкції GA7-modB (Приклад 4) для продукування ДГК, як указано нижче. Семена сорту *B. juncea*, чутливого до тривалого світлового дня, стерилізували із застосуванням газоподібного хлору, як описано Kereszt et al. (2007). Стерилізоване насіння пророщували у середовищах МС з 1/2 активності (Murashige and Skoog, 1962), затверділих з 0,8 % агару, з корекцією рН до 5,8, і вирощували при 24 °C і флуоресцентному освітленні (50 мкЕ/м²с) з фотоперіодом 16/8 години (світло/темрява) протягом 6-7 днів. Черешки котиyledонів із стеблом 2-4 мм були виділені із цих саджанців в асептичних умовах і використовувалися як експланти. *Agrobacterium tumefaciens* штам AGL1 трансформували бінарною конструкцією GA7. Культура *Agrobacterium* була висіяна і оброблена для інфікування, як описано Belide et al. (2013). Для всіх трансформацій близько 50 свіжовиділених котиyledонних черешків інфікували 10 мл культури *A. tumefaciens* протягом 6 хвилин. Інфіковані черешки промокали стерильним фільтрувальним папером для видалення надлишку *A. tumefaciens* і переносили у середовища для сумісного культивування (МС, що містять 1,5 мг/л БА, 0,01 мг/л НКК і 100 мкМ ацетосирингону, і також містять L-цистеїн (50 мг/л), аскорбінову кислоту (15 мг/л) і МЕС (250 мг/л). Всі планшети запечатували мікропористою стрічкою та інкубували в темряві при 24°C протягом 48 годин сумісного культивування. Далі експланти переносили у передселекційне середовище (агар МС, що містить 1,5 мг/л БА, 0,01 мг/л НКК, 3 мг/л AgNO₃, 250 мг/л цефотаксиму і 50 мг/л тиментину) і культивували протягом 4-5 днів при 24°C з фотоперіодом 16/8 годин, після чого експланти переносили у селекційне середовище (агар МС, що містить 1,5 мг/л БА, 0,01 мг/л НКК, 3 мг/л AgNO₃, 250 мг/л цефотаксиму, 50 мг/л тиментину і 5 мг/л ФФТ) та культивували протягом 4 тижнів при 24°C із фотоперіодом 16/8 годин. Експланти із зеленим калюсом переносили в середовище для регенерації пагонів (агар МС, що містить 2,0 мг/л БА, 3 мг/л AgNO₃, 250 мг/л цефотаксиму, 50 мг/л тиментину і 5 мг/л ФФТ) і культивували ще протягом 2 тижнів. Маленькі бруньки регенеруючих пагонів переносили у середовище МС без гормонів (агар МС, що містить 3 мг/л AgNO₃, 250 мг/л цефотаксиму, 50 мг/л тиментину і 5 мг/л ФФТ) і культивували ще протягом 2-3 тижнів.

Потенційно трансгенні пагони розміром щонайменше 1,5 см виділяли і переносили у середовище для коренеутворення (агар МС, що містить 0,5 мг/л НКК, 3 мг/л AgNO₃, 250 мг/л цефотаксиму і 50 мг/л тиментину) і культивували протягом 2-3 тижнів. Трансгенні пагони з великою кількістю коріння, підтверджені ПЛР, переносили в ґрунт у теплиці і вирощували з фотоперіодом 16/8 годин (світло/темрява) при 22 °C. Були одержані три підтверджені трансгенні рослини. Трансформовані рослини вирощували у теплиці, дозволяючи їм самозапилюватися і збирали урожай насіння T1. Склад жирних кислот ліпиду аналізували в пулах насіння T1 від кожної із трансформованих рослин T0, і знайшли присутність 2,8 % ДПК і 7,2 % ДГК в одній лінії, позначеній JT1-4, тоді як інша лінія, позначена JT1-6, продемонструвала 2,6 % ДПК.

Масло насіння з індивідуального насіння T1 проаналізували щодо складу жирних кислот; частина даних наведена у Табл. 20. Декілька насінин T1 продукували ДГК на рівні від 10 % до близько 21 % від загального вмісту жирних кислот, включаючи JT1-4-A-13, JT1-4-A-5 і JT1-4-B-13. Дивно і несподівано було знайдено, що деякі з насінин T1 містили ДПК на рівнях від 10 % до близько 18 % від загального вмісту жирних кислот, за відсутності ДГК, що піддавалася б виявленню (< 0,1 %). Одне з можливих пояснень для такого насіння полягає у тому, що ген Δ4-десатурази у Т-ДНК, вставлений в цих рослинах, інактивувався, можливо внаслідок спонтанної мутації. Насіння T1 пророщували, і один котиyledон, що з'являвся із кожної насінини, аналізували щодо складу жирних кислот в залишковій олії. Решту частини кожного саджанця зберігали і вирощували до стану зрілості, щоб одержати насіння T2.

Трансгенні рослини, що були гомозиготними по одиничних інсерціях Т-ДНК, були ідентифіковані і відібрані. Рослини однієї відібраної лінії, позначеної JT1-4-17, містили одиничну інсерцію Т-ДНК і продукували ДГК і тільки низькі рівні ДПК, тоді як рослини із другої відібраної лінії, позначеної JT1-4-34, також містили одиничну інсерцію Т-ДНК, але продукували ДПК без продукування ДГК. Авторами винаходу був зроблений висновок про те, що оригінальний трансформант містив дві окремих Т-ДНК, одна з яких забезпечувала продукування ДГК, а інша забезпечувала продукування ДПК без ДГК. Рослини *B. juncea*, що продукують ДГК у насінні, були схрещені з рослинами, що продукують ДПК у насінні. Потомство F1 включало рослини, що

були гетерозиготними по обом інсерціям Т-ДНК. У насінні цих рослин-нащадків спостерігалось продукування близько 20 % ДГК і близько 6 % ДПК, із загальним вмістом ДГК + ДПК 26 %. Рослини F1 самозапилювалися, і очікувалося, що потомство, гомозиготне по обом інсерціям Т-ДНК, буде продукувати до 35 % ДГК і ДПК.

- 5 Близько 18 % ДПК спостерігалось в ліпіді пулу насіння потомства ТЗ, позначеного JT1-4-34-11. Так само, близько 17,5 % ДГК спостерігалось в ліпіді пулу насіння потомства ТЗ JT1-4-17-20. Склад жирних кислот пулу насіння JT1-4 Т1, одиничного насіння Т1, пулу насіння Т2, одиничного насіння Т2 і пулу насіння ТЗ, одиничного насіння ТЗ наведений у Табл. 21-24. JT1-4 ТЗ сегрегант JT-1-4-34-11 містив у пулі насіння ТЗ 18 % ДПК, і одиничне насіння від даного
- 10 конкретного сегреганта містило близько 26 % ДПК, у кожному випадку як відсоток від загального вмісту жирних кислот.

- Наступні параметри були обчислені для олії з насіння, що містило 17,9 % ДПК: загальні насичені жирні кислоти, 6,8 %, загальні мононенасичені жирні кислоти, 36,7 %; загальні поліненасичені жирні кислоти, 56,6 %, загальні $\omega 6$ жирні кислоти, 7,1 %; нові $\omega 6$ жирні кислоти, 0,4 % з яких складала ГЛК; загальні $\omega 3$ жирні кислоти, 46,5 %; нові $\omega 3$ жирні кислоти, 24,0 %; співвідношення загальних $\omega 6$: загальних $\omega 3$ жирних кислот, 6,5; співвідношення нових $\omega 6$: нових $\omega 3$ жирних кислот, 60; ефективність перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією $\Delta 12$ -десатурази, 61 %; ефективність перетворення АЛК на СДК під дією $\Delta 6$ -десатурази, 51 %; ефективність перетворення СДК на кислоту ЕТК під дією $\Delta 6$ -елонгази, 90 %; ефективність перетворення ЕТК на ЕПК під дією $\Delta 5$ -десатурази, 87 %; ефективність перетворення ЕПК в ДПК під дією $\Delta 5$ -елонгази, 98 %.
- 20

Для одержання більшої кількості трансгенних рослин *B. juncea* з конструкцією modB, трансформацію повторювали п'ять разів, і регенерували 35 передбачуваних трансгенних пагонів/саджанців. Провели аналіз насіння Т1, щоб визначити вміст ДПК і ДГК.

- 25 Для одержання подальшого насіння, що містить ДПК і не містить ДГК, ген $\Delta 4$ -десатурази був видалений з конструкції modB, і одержану в результаті конструкцію застосовували для трансформації *B. juncea* і *B. napus*. Одержане насіння потомства, що містить до 35 % ДПК у загальному вмісті жирних кислот в ліпіді насіння.

- 30 При аналізі методом ЯМР олії, екстрагованої з насіння рослини, що продукує ДГК, щонайменше 95 % спостережуваної ДГК було присутнє в положенні sn-1,3 молекул ТАГ.

Таблиця 20

Склад жирних кислот в олії насіння із насіння Т1 *B. juncea*, трансформованих Т-ДНК зі GA7.

Насіння Т1 №	C16: 0	16:1 d9	C18: 0	C18: 1	C18: 1d11	C18: 2	C18: 3n6	C18: 3n3	C20: 0	18:4 n3	C20: 1d11	C20: 2n6	C20: 3n3	20:4 n3	20:5 n3	22:5 n3	C22: 6n3
JT1-4-A-1	5,0	0,2	2,7	23,5	3,4	17,0	0,7	24,8	0,7	2,0	1,1	0,2	0,8	4,0	0,6	2,4	9,9
JT1-4-A-2	4,3	0,3	2,6	37,2	3,2	11,0	0,3	22,1	0,7	0,9	1,3	0,2	1,4	3,2	0,3	9,4	0,0
JT1-4-A-3	5,6	0,3	2,7	20,8	3,7	16,0	0,6	24,4	0,7	2,0	0,9	0,2	1,1	4,5	0,7	3,1	11,4
JT1-4-A-4	4,6	0,4	2,8	36,2	3,4	10,6	0,3	24,5	0,8	9,9	1,7	0,2	0,3	0,5	0,0	2,5	0,0
JT1-4-A-5	5,0	0,2	3,2	20,3	3,6	13,7	0,7	25,9	0,7	2,0	0,9	0,2	1,3	4,4	1,5	1,6	13,5
JT1-4-A-6	4,8	0,4	3,4	37,9	3,7	7,4	0,4	19,9	0,9	1,4	1,4	0,1	0,8	1,9	0,4	13,9	0,0
JT1-4-A-7	5,6	0,3	3,0	26,2	4,0	8,9	0,3	26,6	0,6	1,8	1,0	0,1	1,8	3,7	1,3	2,2	11,3
JT1-4-A-8	4,8	0,4	2,9	40,3	3,4	7,8	0,3	22,2	0,8	1,4	1,3	0,1	0,8	2,4	0,4	9,6	0,0
JT1-4-A-9	7,1	0,3	3,6	17,7	4,3	17,9	0,7	23,1	1,0	2,1	0,8	0,2	1,5	3,6	0,8	2,0	11,9
JT1-4-A-10	5,1	0,2	4,2	22,3	3,4	19,5	0,7	21,7	0,8	1,5	0,9	0,2	1,7	7,8	0,9	1,0	6,5
JT1-4-A-11	5,0	0,5	2,8	37,6	4,0	7,1	0,4	19,2	0,7	1,9	1,4	0,2	0,5	1,6	0,3	15,5	0,0
JT1-4-A-12	5,2	0,3	3,0	28,2	4,0	9,2	0,3	27,4	0,6	1,9	0,9	0,1	1,5	3,2	1,1	1,8	10,2
JT1-4-A-13	5,4	0,2	3,0	16,7	4,1	9,9	0,6	29,9	0,7	2,2	1,0	0,2	1,7	2,0	1,1	2,0	17,9
JT1-4-A-14	5,1	0,4	3,1	30,0	4,0	11,5	0,3	27,7	0,7	2,2	1,0	0,1	0,6	2,4	0,8	1,3	7,8
JT1-4-A-15	5,1	0,4	2,5	34,2	3,6	6,9	0,6	20,4	0,7	1,6	1,1	0,2	0,6	4,7	0,9	15,2	0,0
JT1-4-B-1	5,5	0,2	2,7	18,9	4,0	17,6	0,8	24,1	0,8	2,2	1,0	0,2	1,2	4,6	0,9	2,2	11,5
JT1-4-B-2	5,5	0,2	2,7	20,2	4,0	14,3	0,5	25,5	0,7	1,7	0,9	0,2	1,6	8,7	1,3	2,2	8,5

Насіння Т1 №	C16: 0	16:1 d9	C18: 0	C18: 1	C18: 1d11	C18: 2	C18: 3n6	C18: 3n3	C20: 0	18:4 n3	C20: 1d11	C20: 2n6	C20: 3n3	20:4 n3	20:5 n3	22:5 n3	C22: 6n3
JT1-4-B-3	5,3	0,3	3,6	34,1	3,5	35,0	0,6	9,3	0,8	0,2	1,4	0,4	0,6	0,9	0,1	0,3	2,1
JT1-4-B-4	5,3	0,3	3,1	25,2	3,6	17,0	0,7	24,1	0,7	1,9	1,0	0,2	0,8	4,3	0,5	2,3	7,8
JT1-4-B-5	5,5	0,5	2,2	30,1	4,6	10,2	0,5	21,7	0,6	1,4	1,1	0,2	0,9	2,4	0,5	16,1	0,0
JT1-4-B-6	5,6	0,3	2,5	19,5	3,8	15,2	0,5	27,7	0,6	2,1	0,9	0,2	1,1	3,7	0,6	3,3	11,1
JT1-4-B-7	5,9	0,5	2,0	29,9	4,0	11,2	0,3	26,2	0,6	11,5	1,4	0,2	0,3	0,4	0,0	4,1	0,1
JT1-4-B-8	6,2	0,5	1,9	33,1	4,0	30,0	0,5	12,7	0,6	0,3	1,3	0,4	1,4	0,9	0,1	4,4	0,0
JT1-4-B-9	4,9	0,2	3,4	24,6	3,0	18,5	0,3	26,2	0,8	1,3	1,1	0,2	2,0	5,5	0,6	0,8	5,2
JT1-4-B-10	5,2	0,3	2,7	19,0	4,0	12,0	0,6	30,5	0,7	1,6	1,0	0,2	1,7	4,9	1,1	3,0	10,2
JT1-4-B-11	4,8	0,2	3,0	23,7	3,1	18,1	0,6	23,5	0,7	1,6	1,2	0,2	1,5	4,5	0,8	1,6	9,6
JT1-4-B-12	5,0	0,2	2,6	19,6	3,4	12,5	0,6	26,9	0,8	3,1	1,1	0,2	0,9	5,6	0,9	3,5	11,7
JT1-4-B-13	5,6	0,3	2,8	20,9	3,9	11,9	0,4	27,0	0,7	2,0	1,0	0,2	1,7	2,3	0,7	4,1	13,5
JT1-4-B-14	5,1	0,3	3,1	25,5	3,3	16,7	0,7	23,9	0,8	1,8	1,2	0,2	0,9	2,6	0,4	2,9	9,2
JT1-4-B-15	5,6	0,3	2,7	19,5	4,1	14,0	0,8	24,6	0,7	2,7	0,9	0,2	0,7	9,4	1,3	2,5	8,5

Зразки олії з насіння додатково містили 0,1 % C14:0; 0,1-0,2 % C16:3; по 0,0-0,1 % кожної з C20:1Δ13, C20:3ω6 і C20:4ω6; 0,3-0,4 % C22:0; не містили C22:1 і C22:2ω6; містили 0,2 % C24:0 і 0,2-0,4 % C24:1.

Таблиця 21

Склад жирних кислот ліпиду з насіння (пул) T1 B. juncea, трансформованих T-ДНК із GA7-modB. Ліпід додатково містив близько по 0,1 % кожної з 14:0, 16:3, 20:1Δ13 і 16:2; 22:1 не була знайдена.

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	C22:2n6	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
JT1-2	4,2	0,3	2,5	42,4	3,2	27,7	0,1	16,4	0,6	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-3	4,5	0,3	2,7	44,6	3,1	26,8	0,1	14,8	0,7	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-4	5,1	0,3	3,2	26,8	3,5	17,4	0,5	22,8	0,7	2,5	1,1	0,2	0,0	0,0	1,2	0,3	2,9	0,7	0,0	0,1	0,2	0,3	2,8	7,2
JT1-5	4,7	0,4	2,4	41,6	3,4	28,4	0,1	15,8	0,7	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-6	4,8	0,4	2,3	37,3	3,3	30,2	0,4	13,2	0,7	0,2	1,4	0,3	0,0	0,0	0,7	0,3	0,6	0,1	0,0	0,3	0,2	0,5	2,6	0,0

Таблиця 22

Склад жирних кислот в олії насіння із насінин T1 (індивідуальних) B. juncea, трансформованих T-ДНК із GA7-modB.

Насіння Т1 №	C16: 0	16:1 d9	C18: 0	C18: 1	C18: 1d11	C18: 2	C18: 3n6	C18: 3n3	C20: 0	18:4 n3	C20: 1d11	C20: 2n6	C20: 3n3	20:4 n3	20:5 n3	22:5 n3	C22: 6n3
JT1-4-A-1	5,0	0,2	2,7	23,5	3,4	17,0	0,7	24,8	0,7	2,0	1,1	0,2	0,8	4,0	0,6	2,4	9,9
JT1-4-A-2	4,3	0,3	2,6	37,2	3,2	11,0	0,3	22,1	0,7	0,9	1,3	0,2	1,4	3,2	0,3	9,4	0,0
JT1-4-A-3	5,6	0,3	2,7	20,8	3,7	16,0	0,6	24,4	0,7	2,0	0,9	0,2	1,1	4,5	0,7	3,1	11,4
JT1-4-A-4	4,6	0,4	2,8	36,2	3,4	10,6	0,3	24,5	0,8	9,9	1,7	0,2	0,3	0,5	0,0	2,5	0,0
JT1-4-A-5	5,0	0,2	3,2	20,3	3,6	13,7	0,7	25,9	0,7	2,0	0,9	0,2	1,3	4,4	1,5	1,6	13,5
JT1-4-A-6	4,8	0,4	3,4	37,9	3,7	7,4	0,4	19,9	0,9	1,4	1,4	0,1	0,8	1,9	0,4	13,9	0,0
JT1-4-A-7	5,6	0,3	3,0	26,2	4,0	8,9	0,3	26,6	0,6	1,8	1,0	0,1	1,8	3,7	1,3	2,2	11,3

Насіння Т1 №	C16: 0	16:1 d9	C18: 0	C18: 1	C18: 1d11	C18: 2	C18: 3n6	C18: 3n3	C20: 0	18:4 n3	C20: 1d11	C20: 2n6	C20: 3n3	20:4 n3	20:5 n3	22:5 n3	C22: 6n3
JT1-4-A-8	4,8	0,4	2,9	40,3	3,4	7,8	0,3	22,2	0,8	1,4	1,3	0,1	0,8	2,4	0,4	9,6	0,0
JT1-4-A-9	7,1	0,3	3,6	17,7	4,3	17,9	0,7	23,1	1,0	2,1	0,8	0,2	1,5	3,6	0,8	2,0	11,9
JT1-4-A-10	5,1	0,2	4,2	22,3	3,4	19,5	0,7	21,7	0,8	1,5	0,9	0,2	1,7	7,8	0,9	1,0	6,5
JT1-4-A-11	5,0	0,5	2,8	37,6	4,0	7,1	0,4	19,2	0,7	1,9	1,4	0,2	0,5	1,6	0,3	15,5	0,0
JT1-4-A-12	5,2	0,3	3,0	28,2	4,0	9,2	0,3	27,4	0,6	1,9	0,9	0,1	1,5	3,2	1,1	1,8	10,2
JT1-4-A-13	5,4	0,2	3,0	16,7	4,1	9,9	0,6	29,9	0,7	2,2	1,0	0,2	1,7	2,0	1,1	2,0	17,9
JT1-4-A-14	5,1	0,4	3,1	30,0	4,0	11,5	0,3	27,7	0,7	2,2	1,0	0,1	0,6	2,4	0,8	1,3	7,8
JT1-4-A-15	5,1	0,4	2,5	34,2	3,6	6,9	0,6	20,4	0,7	1,6	1,1	0,2	0,6	4,7	0,9	15,2	0,0
JT1-4-B-1	5,5	0,2	2,7	18,9	4,0	17,6	0,8	24,1	0,8	2,2	1,0	0,2	1,2	4,6	0,9	2,2	11,5
JT1-4-B-2	5,5	0,2	2,7	20,2	4,0	14,3	0,5	25,5	0,7	1,7	0,9	0,2	1,6	8,7	1,3	2,2	8,5
JT1-4-B-3	5,3	0,3	3,6	34,1	3,5	35,0	0,6	9,3	0,8	0,2	1,4	0,4	0,6	0,9	0,1	0,3	2,1
JT1-4-B-4	5,3	0,3	3,1	25,2	3,6	17,0	0,7	24,1	0,7	1,9	1,0	0,2	0,8	4,3	0,5	2,3	7,8
JT1-4-B-5	5,5	0,5	2,2	30,1	4,6	10,2	0,5	21,7	0,6	1,4	1,1	0,2	0,9	2,4	0,5	16,1	0,0
JT1-4-B-6	5,6	0,3	2,5	19,5	3,8	15,2	0,5	27,7	0,6	2,1	0,9	0,2	1,1	3,7	0,6	3,3	11,1
JT1-4-B-7	5,9	0,5	2,0	29,9	4,0	11,2	0,3	26,2	0,6	11,5	1,4	0,2	0,3	0,4	0,0	4,1	0,1
JT1-4-B-8	6,2	0,5	1,9	33,1	4,0	30,0	0,5	12,7	0,6	0,3	1,3	0,4	1,4	0,9	0,1	4,4	0,0
JT1-4-B-9	4,9	0,2	3,4	24,6	3,0	18,5	0,3	26,2	0,8	1,3	1,1	0,2	2,0	5,5	0,6	0,8	5,2
JT1-4-B-10	5,2	0,3	2,7	19,0	4,0	12,0	0,6	30,5	0,7	1,6	1,0	0,2	1,7	4,9	1,1	3,0	10,2
JT1-4-B-11	4,8	0,2	3,0	23,7	3,1	18,1	0,6	23,5	0,7	1,6	1,2	0,2	1,5	4,5	0,8	1,6	9,6
JT1-4-B-12	5,0	0,2	2,6	19,6	3,4	12,5	0,6	26,9	0,8	3,1	1,1	0,2	0,9	5,6	0,9	3,5	11,7
JT1-4-B-13	5,6	0,3	2,8	20,9	3,9	11,9	0,4	27,0	0,7	2,0	1,0	0,2	1,7	2,3	0,7	4,1	13,5
JT1-4-B-14	5,1	0,3	3,1	25,5	3,3	16,7	0,7	23,9	0,8	1,8	1,2	0,2	0,9	2,6	0,4	2,9	9,2
JT1-4-B-15	5,6	0,3	2,7	19,5	4,1	14,0	0,8	24,6	0,7	2,7	0,9	0,2	0,7	9,4	1,3	2,5	8,5

Зразки олії із насіння додатково містили 0,1 % C14:0; 0,1-0,2 % C16:3; по 0,0-0,1 % кожної із C20:1Δ13, C20:3ω6 і C20:4ω6; 0,3-0,4 % C22:0; не містили C22:1 і C22:2ω6; містили 0,2 % C24:0 і 0,2-0,4 % C24:1.

Таблиця 23

Склад жирних кислот в олії насіння з індивідуальних насінин Т2 В. јунсеа, трансформованих Т-ДНК із GA7-modB.

Код	C16:0	16:1d9	16:3	C18:0	C18:1	C18:1d1	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4	C20:1d1	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:5n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	C22:2n6	C22:3n3	C24:0	22:5n6	22:4n3?	C24:1	22:5n3	C22:6n3
ЈТ-1-4-19	4,4	0,3	0,2	1,7	36,3	2,9	8,3	0,5	22,0	0,5	1,4	1,2	0,1	0,0	0,0	0,4	0,3	4,2	0,6	0,0	0,1	0,1	0,0	1,8	0,3	12,1	0,0
ЈТ-1-4-19	5,6	0,4	0,1	1,9	39,1	3,1	8,4	0,4	18,9	0,6	1,2	1,3	0,1	0,0	0,0	0,5	0,3	2,5	0,4	0,0	0,1	0,2	0,0	1,5	0,4	12,6	0,0
ЈТ-1-4-19	5,5	0,4	0,2	1,8	42,3	3,2	9,9	0,3	24,0	0,6	5,9	1,5	0,2	0,0	0,0	0,2	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,4	1,5	0,0
ЈТ-1-4-19	4,7	0,3	0,1	2,3	42,1	2,8	10,0	0,2	27,1	0,6	4,1	1,6	0,2	0,0	0,0	0,2	0,3	0,5	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,6	0,3	1,4	0,0
ЈТ-1-4-19	5,6	0,4	0,1	1,5	36,8	3,7	9,4	0,3	19,6	0,5	0,6	1,4	0,2	0,0	0,0	1,4	0,3	1,9	0,3	0,0	0,2	0,2	0,0	1,6	0,4	13,1	0,0
ЈТ-1-4-19	4,6	0,3	0,1	1,7	36,3	2,7	7,2	0,3	22,6	0,5	1,0	1,5	0,1	0,0	0,0	0,7	0,3	2,1	0,3	0,0	0,1	0,2	0,0	2,2	0,3	14,4	0,0
ЈТ-1-4-19	4,9	0,3	0,1	1,8	38,3	3,1	7,4	0,3	20,2	0,5	0,8	1,3	0,1	0,0	0,0	0,8	0,3	2,7	0,5	0,0	0,2	0,2	0,0	1,7	0,3	13,7	0,0
ЈТ-1-4-19	4,7	0,3	0,1	1,7	36,2	3,0	8,2	0,4	20,9	0,5	0,7	1,3	0,2	0,0	0,0	0,9	0,3	2,9	0,5	0,0	0,2	0,2	0,0	2,0	0,3	14,2	0,0
ЈТ-1-4-19	4,8	0,3	0,1	2,2	41,0	3,0	9,8	0,2	27,0	0,5	4,2	1,8	0,2	0,0	0,0	0,3	0,3	0,5	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,7	0,3	2,2	0,0
ЈТ-1-4-19	5,8	0,5	0,1	1,7	36,6	3,7	9,1	0,3	21,3	0,6	0,9	1,4	0,2	0,0	0,0	0,8	0,3	1,5	0,3	0,0	0,1	0,2	0,0	1,2	0,4	12,7	0,0
ЈТ-1-4-19	4,8	0,4	0,1	2,1	47,1	2,9	7,4	0,2	23,9	0,6	4,8	1,7	0,1	0,0	0,0	0,2	0,3	0,5	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,5	0,3	1,5	0,0
ЈТ-1-4-19	5,1	0,4	0,1	1,7	37,4	3,3	7,7	0,3	20,7	0,6	0,9	1,4	0,1	0,0	0,0	0,8	0,3	2,5	0,4	0,0	0,1	0,2	0,0	1,6	0,4	13,6	0,0
ЈТ-1-4-19	4,7	0,3	0,1	1,8	37,3	2,7	7,9	0,4	20,6	0,5	1,1	1,3	0,1	0,0	0,0	0,5	0,3	4,3	0,6	0,0	0,1	0,1	0,0	2,2	0,3	12,3	0,0
ЈТ-1-4-19	4,9	0,3	0,2	2,0	37,9	3,0	7,1	0,4	20,1	0,5	1,1	1,3	0,1	0,0	0,0	0,6	0,3	4,1	0,5	0,0	0,1	0,1	0,0	2,1	0,3	12,6	0,0
ЈТ-1-4-19	4,7	0,3	0,1	1,6	35,7	3,2	6,9	0,3	22,4	0,5	0,7	1,4	0,1	0,0	0,0	1,3	0,3	3,0	0,5	0,0	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	14,0	0,0
ЈТ-1-4-34	4,7	0,4	0,1	1,8	37,6	3,4	7,8	0,3	23,7	0,5	0,6	1,5	0,2	0,0	0,0	1,2	0,2	1,7	0,3	0,0	0,2	0,1	0,0	1,8	0,3	11,4	0,0
ЈТ-1-4-34	5,3	0,4	0,1	1,6	35,3	3,5	8,1	0,5	21,1	0,5	0,8	1,2	0,1	0,0	0,0	0,7	0,3	3,1	0,5	0,0	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	13,9	0,0
ЈТ-1-4-34	4,9	0,3	0,1	1,7	39,4	3,3	7,7	0,3	21,1	0,5	0,7	1,4	0,2	0,0	0,0	0,8	0,3	2,0	0,3	0,0	0,2	0,1	0,0	1,7	0,3	12,3	0,0
ЈТ-1-4-34	5,0	0,3	0,1	1,8	38,5	3,1	7,8	0,4	20,5	0,5	0,8	1,3	0,2	0,0	0,0	0,8	0,2	2,3	0,3	0,0	0,2	0,1	0,0	2,0	0,3	13,1	0,0
ЈТ-1-4-34	5,1	0,3	0,1	1,8	39,5	2,9	9,0	0,2	22,2	0,6	0,6	1,5	0,2	0,0	0,0	1,0	0,3	1,7	0,2	0,0	0,1	0,2	0,0	1,6	0,3	10,2	0,0
ЈТ-1-4-34	4,8	0,3	0,1	1,8	38,2	3,2	7,8	0,4	21,1	0,5	0,7	1,4	0,2	0,0	0,0	0,7	0,3	2,1	0,4	0,0	0,2	0,1	0,0	1,7	0,3	13,3	0,0
ЈТ-1-4-34	5,0	0,3	0,1	2,0	39,7	2,9	7,9	0,4	20,2	0,5	0,7	1,3	0,1	0,0	0,0	0,7	0,3	2,3	0,3	0,0	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	12,2	0,0
ЈТ-1-4-34	4,7	0,3	0,1	1,6	36,0	3,3	8,3	0,3	23,7	0,5	0,6	1,5	0,2	0,0	0,0	1,2	0,3	1,7	0,3	0,0	0,2	0,1	0,0	1,8	0,3	12,7	0,0
ЈТ-1-4-34	6,2	0,5	0,2	2,1	32,0	4,4	7,2	0,6	19,4	0,6	1,2	1,2	0,2	0,0	0,0	0,6	0,4	2,2	0,5	0,0	0,3	0,2	0,0	1,6	0,4	17,6	0,0

Таблиця 24

Склад жирних кислот в олії насіння з індивідуальних насінин Т3 В. јунсеа, трансформованих Т-ДНК із GA7-modB.

	C16:0	16:1d9	16:3	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:5n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	C22:2n6	C22:3n3	22:5n6	22:4n3	C24:1	22:5n3	C22:6n3
ЈТ-1-4-34-11	4,8	0,4	0,1	2,8	38,4	3,7	5,7	0,4	18,0	0,7	1,0	1,5	0,1	0,1	0,0	0,0	1,1	0,3	1,4	0,4	0,0	0,3	0,0	1,4	0,5	16,3	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,3	0,4	0,1	3,0	43,3	3,6	5,2	0,2	18,5	0,7	0,8	1,7	0,1	0,1	0,0	0,0	1,4	0,3	1,2	0,3	0,0	0,2	0,0	1,2	0,3	12,4	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,6	0,4	0,1	2,8	33,1	4,1	5,1	0,4	18,5	0,7	1,2	1,4	0,1	0,1	0,0	0,0	1,1	0,3	1,6	0,5	0,0	0,3	0,0	1,4	0,4	20,8	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,5	0,4	0,1	2,9	39,5	3,3	6,3	0,4	18,5	0,8	1,2	1,5	0,1	0,1	0,0	0,0	1,0	0,3	1,7	0,3	0,0	0,2	0,0	1,8	0,3	14,2	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,9	0,5	0,2	2,8	32,2	3,9	4,7	0,3	20,7	0,8	1,2	1,4	0,1	0,2	0,0	0,0	2,0	0,3	1,4	0,5	0,0	0,3	0,0	1,2	0,4	19,4	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,3	0,3	0,1	3,0	38,1	3,2	5,8	0,3	19,4	0,7	1,1	1,5	0,1	0,1	0,0	0,0	1,2	0,3	1,5	0,4	0,0	0,2	0,0	1,3	0,4	16,0	0,0
ЈТ-1-4-34-11	5,4	0,5	0,2	3,2	29,3	4,0	4,6	0,4	18,6	0,9	1,7	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	1,2	0,4	1,6	0,7	0,0	0,3	0,0	1,4	0,5	22,9	0,0
ЈТ-1-4-34-11	5,2	0,5	0,2	3,7	34,5	4,1	4,5	0,3	17,2	1,0	1,4	1,4	0,1	0,1	0,0	0,0	1,5	0,4	1,4	0,6	0,0	0,3	0,0	1,2	0,5	19,4	0,0
ЈТ-1-4-34-11	5,3	0,5	0,1	3,4	33,4	3,7	4,6	0,3	17,6	0,9	1,7	1,2	0,1	0,1	0,0	0,0	1,1	0,4	1,5	0,6	0,0	0,2	0,0	1,2	0,5	20,7	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,6	0,4	0,1	3,0	39,5	3,5	5,1	0,3	17,8	0,8	0,8	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	1,4	0,4	1,3	0,4	0,0	0,3	0,0	1,3	0,4	16,1	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,3	0,4	0,1	3,1	41,7	3,5	5,6	0,2	19,0	0,7	0,9	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	1,3	0,3	1,4	0,3	0,0	0,2	0,0	1,5	0,3	12,7	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,8	0,5	0,2	2,8	33,8	4,0	5,3	0,4	18,2	0,7	1,4	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	1,2	0,3	1,6	0,6	0,0	0,3	0,0	1,3	0,4	20,1	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,4	0,4	0,1	3,5	40,3	3,5	5,2	0,2	19,1	0,7	1,0	1,5	0,1	0,1	0,0	0,0	1,6	0,3	1,4	0,4	0,0	0,2	0,0	1,4	0,3	13,8	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,8	0,4	0,1	3,2	36,1	3,7	5,9	0,3	19,9	0,7	1,4	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	1,1	0,3	1,9	0,5	0,0	0,2	0,0	1,7	0,3	15,4	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,0	0,3	0,1	2,8	37,2	3,2	4,9	0,3	19,6	0,8	0,9	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	1,5	0,4	1,3	0,5	0,0	0,3	0,0	1,1	0,4	17,9	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,5	0,4	0,1	3,8	36,7	3,2	4,5	0,2	19,0	0,9	1,1	1,4	0,1	0,1	0,0	0,0	1,8	0,4	1,2	0,5	0,0	0,2	0,0	1,0	0,5	17,8	0,0
ЈТ-1-4-34-11	5,2	0,4	0,2	2,8	27,8	3,7	5,3	0,5	18,3	0,8	1,7	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	1,0	0,4	1,9	0,7	0,0	0,3	0,0	1,7	0,5	24,7	0,0
ЈТ-1-4-34-11	5,4	0,6	0,2	2,8	31,7	4,1	4,6	0,3	18,5	0,8	1,3	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	1,4	0,4	1,4	0,6	0,0	0,2	0,0	1,3	0,4	21,8	0,0
ЈТ-1-4-34-11	6,4	0,6	0,1	2,7	30,3	3,5	4,1	0,4	16,1	0,8	2,1	1,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,9	0,4	1,4	0,7	0,0	0,2	0,0	1,1	0,5	25,8	0,0
ЈТ-1-4-34-11	4,3	0,3	0,1	3,2	39,2	3,3	5,7	0,2	20,1	0,7	0,9	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	1,7	0,3	1,3	0,3	0,0	0,2	0,0	1,3	0,3	14,1	0,0
ЈТ-1-4-34-21	4,2	0,4	0,1	2,3	39,9	3,9	5,9	0,3	20,2	0,6	0,9	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	1,1	0,3	1,5	0,3	0,0	0,3	0,0	1,8	0,4	13,3	0,0
ЈТ-1-4-34-21	4,4	0,4	0,1	2,7	38,8	3,9	5,7	0,4	18,5	0,6	1,3	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,8	0,3	1,8	0,4	0,0	0,3	0,0	1,7	0,3	15,6	0,0
ЈТ-1-4-34-21	4,2	0,4	0,1	2,0	42,4	3,6	6,0	0,4	19,1	0,5	1,0	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	0,9	0,2	1,5	0,3	0,0	0,3	0,0	1,6	0,3	12,9	0,0

Приклад 10. Подальший аналіз трансформованих рослин і польові випробування
 5 Гібридизаційний аналіз методом саузерн-блотинга проводили для відібраних рослин Т2 В. парус, трансформованих Т-ДНК із конструкції GA7-modB. ДНК, екстраговану із зразків тканини рослини, розщеплювали декількома рестрикційними ферментами для гібридизаційного аналізу

методом саузерн-блотингу. Радіоактивний зонд, що відповідав частині Т-ДНК, гібридизували з плямами, які промивали в суворих умовах, і плями приводили в контакт із плівкою, щоб знайти смуги гібридизації. Деякі із зразків продемонстрували одиничні смуги гібридизації для кожної із сумішей після розщеплення рестрикційними ферментами, що відповідало одиничним інсерціям Т-ДНК у рослинах, тоді як інші продемонстрували дві смуги, а наступні знову продемонстрували декілька смуг Т-ДНК, що відповідало 4-6 інсерціям. Кількість смуг гібридизації, спостережуваних в саузерн-блотинг аналізі, добре співвідносилася із кількістю копій Т-ДНК у трансгенних рослинах, визначеною методом цифрової ПЛР, до кількості копій близько 3 або 4. При кількості копій, більшій, ніж близько 5, метод цифрової ПЛР був менш надійним.

Деякі з відібраних ліній використовували як донори пилку при схрещуванні із серіями з близько 30 різних сортів *V. parvis* із різним фоновим генотипом. Подальші зворотне схрещування здійснювали для визначення того, чи є множинні інсерції Т-ДНК генетично пов'язаними, чи ні, і дозволити сегрегацію генетично не пов'язаних трансгенних локусів. Таким чином були відібрані лінії, що містять одиничні трансгенні локуси.

Однопраймерні реакції ПЛР проводили у трансгенних лініях із застосуванням праймерів, суміжних із лівими і правими межами Т-ДНК, і будь-які лінії, що демонстрували присутність обернених повторів Т-ДНК, відкидали.

Деяка кількість трансгенних ліній продемонструвала затримку цвітіння, тоді як у інших було знижено утворення насіння і, таким чином, знижений вихід насіння на рослину після вирощування в теплиці, що узгоджувалося із зниженою чоловічою або жіночою фертильністю. Досліджували морфологію квітки у цих рослинах і спостерігали, що в деяких випадках розкриття насіннєвих коробочок і вивільнення пилку із пильовиків затримувалося таким чином, що рильця товкачика подовжувалися до розкриття насіннєвих коробочок і вивільнення пилку, таким чином віддаляючи пильовики від рилець. Повна фертильність могла б бути відновлена штучним запиленням. Крім того, визначали життєздатність пилку у момент розкриття насіннєвих коробочок і вивільнення пилку за допомогою фарбування фарбниками для визначення життєздатності FDA і ПЙ (Приклад 1), і було показано, що вона знижена у деяких лініях, тоді як у більшості трансгенних ліній життєздатність пилку становила близько 100 % від життєздатності в контрольних рослинах дикого типу. Як подальший аналіз для виявлення можливої причини зменшення виходу насіння з деяких рослин, аналізували вміст і склад жирних кислот у квіткових бруньках, включаючи пильовики і рильця/товкачики деяких рослин Т3 і Т4. ДГК не була знайдена в екстрагованих ліпідах, вказуючи на те, що гени у генетичній конструкції не експресувалися в квіткових бруньках у процесі розвитку рослини, і виключаючи це як причину зниженого виходу насіння.

Вміст олії вимірювали методом ЯМР, і визначали рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот для насіння Т2. Трансгенні лінії, що містили менш ніж 6 % ДГК, відкидали. Кількість копій Т-ДНК у зразках листя рослин покоління Т1, Т2 і Т3 визначали методом цифрової ПЛР (Приклад 1).

Відібрані партії насіння Т3 і Т4 висівали у полі на двох ділянках у Вікторії, Австралія, кожен у рядках завдовжки 10 м із щільністю висіву 10 насінин/м. Відібрані партії насіння включали одержану із В003-5-14 лінію, яка демонструє рівні ДГК в пулі насіння близько 8-11 % і рівні ДГК для індивідуального насіння Т2 до близько 19 %, із кількістю копій Т-ДНК 3 у рослині Т0. Крім того, відібрані партії насіння включали одержані із В0050-27 лінії, які продемонстрували рівні ДГК у насінні Т2 понад 20 %, і кількість копій Т-ДНК 1 або 2 у рослинах Т2. Насіння, висіяне в полі, проростало і давало пагони із такою ж швидкістю, що і насіння дикого типу. Рослини, вирощені з більшості, але не всіх висіяних партій насіння, були фенотипово нормальними, наприклад, демонстрували морфологію, швидкість росту, висоту рослин, чоловічу і жіночу фертильність, життєздатність пилку (100 %), утворення насіння, розмір і морфологію стручків, які були по суті такими ж, як у контрольних рослин дикого типу, вирощених у таких же умовах. Вихід насіння на рослину був подібний до виходу для контрольних рослин дикого типу, вирощених у таких же умовах. Інші зразки насіння висівали на великих площах для масового виробництва відібраних трансгенних ліній. Загальний вміст ДГК в урожаї зібраного насіння становив щонайменше 30 мг/г насіння.

Кваліфікованим фахівцям в даній галузі техніки буде зрозуміло, що численні варіації та/або модифікації винаходу можуть бути здійснені, як розкрито в конкретних варіантах, без відходу від духу або контексту винаходу в його широкому значенні. Представлені варіанти, таким чином, слід розглядати в усіх відношеннях як ілюстративні, але не обмежуючі.

У цій заявці заявлений пріоритет по AU 2013905033, поданій 18 грудня 2013 року, і AU 2014902471, поданій 27 червня 2014 року, US 61/697676, всі з яких включені до даного

документу шляхом посилання в повному обсязі. Всі публікації, обговорювані та/або на які є посилання у даному документі, включені до даного документу в повному обсязі.

Будь-яке обговорення документів, дій, матеріалів, пристроїв, виробів, тощо, яке включено до цього документу, призначене виключно для цілей забезпечення контексту цього винаходу. Не слід робити припущення, що будь-які або всі ці питання утворюють частину відомого рівня техніки або являли собою загальнодоступне знання в галузі техніки, до якої відноситься це винахід, в тому вигляді, в якому воно існувало до дати пріоритету кожного з пунктів формули цієї заявки.

ПОСИЛАННЯ

- 10 Abbadi et al. (2004) *Plant Cell* 16: 2734-2748.
- Abbott et al. (1998) *Science* 282:2012-2018.
- Agaba et al. (2004) *Marine Biotechnol.* (NY) 6:251-261.
- Alvarez et al. (2000) *Theor Appl Genet* 100:319-327.
- Armbrust et al. (2004) *Science* 306:79-86.
- 15 Baumlein et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225:459-467.
- Baumlein et al. (1992) *Plant J.* 2:233-239.
- Beaudoin et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6421-6426.
- Belide et al. (2013) *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 113:543-553.
- Berberich. et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 36:297-306.
- 20 Broun et al. (1998) *Plant J.* 13:201-210.
- Brown et al. (2002) *Biochem J.* 364:795-805.
- Chan et al. (2006) *Nature Biotechnology* 28:951-956.
- Chapman et al. (2004) *Gen. Dev.* 18:1179-1186.
- Chen et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1302-1313.
- 25 Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
- Cheng et al. (2010) *Transgenic Res* 19: 221-229.
- Cho et al. (1999a) *J. Biol. Chem.* 274:471-477.
- Cho et al. (1999b) *J. Biol. Chem.* 274:37335-37339.
- Christie (1982) *J. Lipid Res.* 23:1072-1075.
- 30 Clough and Bent (1998) *Plant J.* 16:735-43.
- Damude et al. (2006). *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9446-9451.
- Denic and Weissman (2007) *Cell* 130:663-677.
- Domergue et al. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4105-4113.
- Domergue et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 35115-35126.
- 35 Domergue et al. (2005) *Biochem. J.* 1 389: 483-490.
- Dunoyer et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1235-1250.
- Ellerstrom et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1019-1027.
- Gamez et al. (2003) *Food Res International* 36: 721-727.
- Garcia-Maroto et al. (2002) *Lipids* 37:417-426.
- 40 Girke et al. (1998) *Plant J.* 15:39-48.
- Hall et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9320-9324
- Hamilton et al. (1997) *Gene* 200:107-16.
- Harayama (1998). *Trends Biotechnol.* 16: 76-82.
- Hastings et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:14304-14309.
- 45 Hinchee et al. (1988) *Biotechnology* 6:915-922.
- Hoffmann et al. (2008) *J Biol. Chem.* 283:22352-22362.
- Hong et al. (2002a) *Lipids* 37:863-868.
- Horiguchi et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39:540-544.
- Huang et al. (1999) *Lipids* 34:649-659.
- 50 Inagaki et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:613-621.
- Kajikawa et al. (2004) *Plant Mol. Biol.* 54:335-52.
- Kajikawa et al. (2006) *FEBS Lett* 580:149-154.
- Kereszt et al. (2007) *Nature Protoc* 2:948-952.
- Kim et al. (2005) *Plant Cell.* 2005 1073-89.
- 55 Knutzon et al. (1998) *J. Biol Chem.* 273:29360-6.
- Kozziel et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:393-405.
- Lassner (1995) *Plant Physiol.* 109:1389-94.
- Leonard et al. (2000) *Biochem. J.* 347:719-724.
- Leonard et al. (2000b) *Biochem. J.* 350:765-770.
- 60 Leonard et al. (2002) *Lipids* 37:733-740.

- Lewsey et al. (2007) *Plant J.* 50:240-252.
- Lo et al. (2003) *Genome Res.* 13:455-466.
- Lu and Kang (2008) *Plant Cell Rep.* 27:273-8.
- Mallory et al. (2002) *Nat. Biotech.* 20:622-625.
- 5 Marangoni et al. (1995) *Trends in Food Sci. Technol.* 6: 329-335.
- Meesapyodsuk et al. (2007) *J Biol Chem* 282: 20191-20199.
- Meng et al. (2008) *J. Gen. Virol.* 89:2349-2358.
- Meyer et al. (2003) *Biochem.* 42:9779-9788.
- Meyer et al. (2004) *Lipid Res* 45:1899-1909.
- 10 Michaelson et al. (1998a) *J. Biol. Chem.* 273:19055-19059.
- Michaelson et al. (1998b) *FEBS Lett.* 439:215-218.
- Murashige and Skoog (1962) *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Napier et al. (1998) *Biochem. J.* 330:611-614.
- Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- 15 Parker-Barnes et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8284-8289.
- Pereira et al. (2004a) *Biochem. J.* 378:665-671.
- Pereira et al. (2004b) *Biochem. J.* 384:357-366.
- Perrin et al. (2000) *Mol Breed* 6:345-352.
- Petrie et al. (2010a) *Metab. Eng.* 12:233-240.
- 20 Petrie et al. (2010b) *Plant Methods* 11:6:8.
- Petrie et al. (2012) *Transgenic Res.* 21:139-147.
- Potenza et al. (2004) *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 40:1-22.
- Qi et al. (2002) *FEBS Lett.* 510:159-165.
- Qi et al. (2004) *Nat. Biotech.* 22: 739-745.
- 25 Qiu et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:31561-31566.
- Reddy and Thomas (1996) *Nat. Biotech.* 14:639-642.
- Reddy et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:293-300.
- Robert et al. (2005) *Func. Plant Biol.* 32:473-479.
- Robert et al. (2009) *Marine Biotech* 11:410-418.
- 30 Ruiz-Lopez et al. (2012) *Transgenic Res.* 21:139-147.
- Saha et al. (2006) *Plant Physiol.* 141:1533-1543.
- Saito et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:1813-1818.
- Sakuradani et al. (1999) *Gene* 238:445-453.
- Sato et al. (2004) *Crop Sci.* 44: 646-652.
- 35 Sakuradani et al. (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:648-654.
- Sayanova et al. (2006) *J Biol Chem* 281: 36533-36541.
- Sayanova et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4211-4216.
- Sayanova et al. (2003) *FEBS Lett.* 542:100-104.
- Sayanova et al. (2006) *Planta* 224:1269-1277.
- 40 Sayanova et al. (2007) *Plant Physiol* 144:455-467.
- Shukla et al. (2002) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 79:965-969.
- Singh et al. (2005) *Curr. Opin. in Plant Biol.* 8:197-203.
- Speranza et al. (2012) *Process Biochemistry (In Press)*.
- Sperling et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:3801-3811.
- 45 Sperling et al. (2001) *Arch. Biochm. Biophys.* 388:293-8.
- Sprecher et al. (1995) *J. Lipid Res.* 36:2471-2477.
- Spychalla et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1142-1147.
- Tonon et al. (2003) *FEBS Lett.* 553:440-444.
- Trautwein (2001) *European J. Lipid Sci. and Tech.* 103:45-55.
- 50 Tvrdik (2000) *J. Cell Biol.* 149:707-718.
- Venegas-Caleron et al. (2010) *Prog. Lipid Res.* 49:108-119.
- Voinnet et al. (2003) *Plant J.* 33:949-956.
- Wallis and Browse (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 365:307-316.
- Watts and Browse (1999b) *Arch. Biochem. Biophys.* 362:175-182.
- 55 Weiss et al. (2003) *Int. J. Med. Microbiol.* 293:95-106.
- Weng et al., (2004) *Plant Molecular Biology Reporter* 22:289-300.
- Whitney et al. (2003) *Planta* 217:983-992.
- Wood (2009) *Plant Biotechnol J.* 7:914-24.
- Wu et al. (2005) *Nat. Biotech.* 23:1013-1017.
- 60 Yang et al. (2003) *Planta* 216:597-603.

Zank et al. (2002) Plant J. 31:255-268.
 Zank et al. (2005) WO 2005/012316
 Zhang et al. (2004) FEBS Lett. 556:81-85.
 Zhang et al. (2006) 20:3255-3268.
 5 Zhang et al. (2007) FEBS Letters 581: 315-319.
 Zhang et al. (2008) Yeast 25: 21-27.
 Zhou et al. (2007) Phytochem. 68:785-796.
 Zhou et al. (2008) Insect Mol Biol 17: 667-676.
 10 Zou et al. (1997) Plant Cell. 9:909-23.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Nuseed Pty Ltd
 Grain Research and Development Corporation
 Commonwealth Scientific and Industrial Research
 Organisation

<120> ЕКСТРАГОВАНИЙ РОСЛИННИЙ ЛІПІД, ЩО МІСТИТЬ ДОВГОЛАНЦЮГОВІ ПОЛІНЕНАСИЧЕНІ
 ЖИРНІ КИСЛОТИ

<130> 516028

<150> AU 2013905033
 <151> 2013-12-18

<150> AU 2014902471
 <151> 2014-06-27

<160> 58

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1
 <211> 21527
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> pJP3416-GA7 нуклеотидна послідовність.

<400> 1
 tcctgtggtt ggcatgcaca tacaatgga cgaacggata aaccttttca cgccctttta 60
 aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttaccgcga atatatcctg 120
 tcaaacactg atagttttaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180
 tcacgacgtt gtaaacggg cgcccgcg aaagcttgcg gccgcccgat ctagtaacat 240
 agatgacacc gcgcgcgata atttatccta gttgcgcgc tatattttgt tttctatcgc 300
 gtattaaatg tataattgcg ggactcctaat cataaaaacc catctcataa ataacgtcat 360
 gcattacatg ttaattatta cgtgcttaac gtaattcaac agaaattata tgataatcat 420
 cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt ttgaacgac 480
 ggccgcgcctc attagtgagc cttctcagcc ttcccgtaa cgtagtagtg ctgtcccacc 540
 ttatcaaggt tagagaaagt agccttccaa gcaccgtagt aagagagcac cttgtagttg 600
 agtccccact tcttagcgaa aggaacgaat cttctgctaa cctcaggctg tctgaattga 660
 ggcatatcag ggaagagggt gtggataacc tgacagtaa ggtatcccat aagccagttc 720
 acgtatcctc tagaaggatc gatatcaacg gtgtgatcaa cagcgtagtt aaccaagaa 780
 aggtgcttat cagatggaac aacaggagg tgagtatgag aagtagagaa gtgagcgaaa 840
 aggtacatgt aagcgatcca gtttccgaaa gtgaaccacc agtaagcaac aggccaaag 900
 tatccagtag caagcttgat aacagcggtt ctaacaacat gagaacgag catccaagaa 960

gcctcttcgt agttcttctt acggagaact tgtctagggg ggagaacgta gatccagaaa	1020
gcttgaacaa gaagtccaga ggtaacagga acgaaagtcc aagcttgaag tctagcccaa	1080
gctctagaga atcctctagg tctgttatcc tcaacagcag tggtgaagaa agccacagca	1140
ggagtgggat caagatccat atcgtgtcta accttttgag gggtagcatg gtgcttgta	1200
tgcatctggg tccacatctc accagaagta gaaagtccga atccacaagt catagcctga	1260
agtctcttgt ccacgtaaac agatccggta agagagttat gtccaccctc atgttgaacc	1320
catccacatc tagctccgaa gaaagcaccg taaacaacag aagcaatgat aggggatcca	1380
gcgtacataa gagcagttcc aagagcgaat gtagcaagaa gctcgagaag tctgtaagcc	1440
acatgggtga tagaaggctt gaagaatcca tctctctcaa gctcagcacg ccatctagcg	1500
aaatcctcaa gcataggagc atcctcagac tcagatctct tgatctcagc aggtctagaa	1560
ggcaaagctc taagcatctt ccaagccttg agagaacgca tgtggaattc ttgaaagcc	1620
tcagtagcat cagcaccagt gttagcaagc atgtagaaga tcacagatcc accaggggtgc	1680
ttgaagttag tcacatcgta ctcaacgtcc tcaactctaa cccatctagt ctgaaagta	1740
gcagcaagct catgaggctc aagagtctta agatcaacag gagcagtaga agcatcctta	1800
gcatcaagag cctcagcaga agatttagac ctggtaagtg gagatctagg agaagatctt	1860
ccatcagtct taggaggcca catggtatgg taattgtaaa tgtaattgta atgttggttg	1920
ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa agatcctcgt gtatgttttt aatcttgttt	1980
gtatcgatga gttttggtt gagtaagag tgaagcggat gagttaattt ataggctata	2040
aaggagattt gcatggcgat cacgtgtaat aatgcatgca cgcagtgtat tgtatgtgtg	2100
tgctgtgaga gagaagctct taggtgttg aagggagtga caagtggcga agaaaaacaa	2160
ttctccgcgg ctgcatgcta tgtgtaacgt gtagctaatg ttctggcatg gcatcttatg	2220
aacgattctt tttaaaaaca aggtaaaaac ttaacttcat aaaattaaaa aaaaaaacgt	2280
ttactaagtt ggtttaaaag gggatgagac tagtagattg gttggttggt ttccatgtac	2340
cagaaggctt accctattag ttgaaagttg aaactttgtt ccctactcaa ttccatgttg	2400
tgtaaatgta tgtatatgta atgtgtataa aacgtagtac ttaaatgact aggagtgggt	2460
cttgagaccg atgagagatg ggagcagaac taaagatgat gacataatta agaacgaatt	2520
tgaaaggctc ttaggtttga atcctattcg agaatgtttt tgtcaaagat agtggcgatt	2580
ttgaacccaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccggta cgttcatgca aatagaaagt	2640
ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca atcctggctg	2700
tgtacaaaac tacaaataat atattttaga ctatttggcc ttaactaaac ttccactcat	2760
tatttactga ggtagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccgagaa atactcatga	2820
ttccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc cctcaaattt	2880

taatgcacat gtaatcatag tttagcacia ttcaaaaata atgtagtatt aaagacagaa	2940
attttagac ttttttttg cgtaaaaga agactaagtt tatacgtaca ttttatttta	3000
agtgaaaaa cgaattttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat ttctgcaatg	3060
tactattttg ctattttggc aactttcagt ggactactac ttattataca tgtgtatgga	3120
tgcatgagtt tgagtataca catgtctaaa tgcatgcttt gtaaaacgta acggaccaca	3180
aaagaggatc catacaata catctcatag ctctctccat tattttccga cacaacaga	3240
gcattttaca acaattacca acaacaaca acaacaaca acattacaat tacatttaca	3300
attaccatac catggaattc gccagcctc ttgttgctat ggctcaagag caatacgctg	3360
ctatcgatgc tgttgttgct cctgctatct tctctgctac tgattctatc ggatggggac	3420
ttaagcctat ctctctgct actaaggact tgctcttgt tgagtctct acacctctca	3480
tcctttcttt gcttgettac ttctgctatc ttggatctgg actcgtttac agaaaggttt	3540
tccttagaac cgtgaaggga caagatccat tccttttgaa ggctcttatg cttgctcaca	3600
acgtgttctt tatcgactt tctctttaca tgtgcctcaa gcttgtgtac gaggttacg	3660
ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaaccctgc tcaaactgag atggctaagg	3720
ttatctggat ctctctagtg agcaagatct acgagttcat ggataccttc atcatgctcc	3780
tcaaggaaaa tgttaaccag gttagcttcc ttcacgttta ccatcacgga tctatctctg	3840
gaatctggtg gatgattact tacgctgctc ctggtggtga tgcttacttc tctgctgctc	3900
ttaactcttg gggtcacgtg tgtatgtaca cctactattt tatggctgcc gtgcttecta	3960
aggacgagaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact caaatgcaga	4020
tgttccagtt cttcatgaac cttctccagg ctgtttacct tctctactct tcatctcctt	4080
accctaagtt tatcgctcag ctctctgtgg tgtacatggt tactcttctc atgctttctg	4140
gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgcgc gccgcgcgc	4200
atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcaactactg atcgctagtg	4260
attgtcattg ttatatataa taatgttata tttcacaact tatcgtaatg catgtgaaac	4320
tataacacat taatctact tgtcatatga taacactctc cccattttaa actcttgta	4380
atttaaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaata tattataaat tcaatcactc	4440
ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaa atacttatac taatttagtc	4500
tgaatagaat aattagattc tagtctcatc ccctttttaa ccaacttagt aaacgttttt	4560
ttttttaatt ttatgaagtt aagtttttac cttgttttta aaaagaatcg ttcataagat	4620
gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag aattgttttt	4680
cttcgccact tgtcactccc ttcaaacacc taagagcttc tctctcacag cacacacata	4740
caatcacatg cgtgcatgca ttattacag tgatcgccat gcaaatctcc tttatagcct	4800



```

ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat acaaacaaga 4860
ttaaaaacat acacgaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac 4920
attacaatta cattttacaat taccatacca tgccccaag ggactcttac tcttatgctg 4980
ctcctccttc tgctcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac aagaaagagc 5040
ttgttatcgg agatagggtt tacgatgtta ccaacttcgt taagagacac cctgggtgaa 5100
agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag ttccatgtta 5160
gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctcttccttc tcgtcctggt cacaagggat 5220
actctccaag aagggtgatg cttatcgctg atttccaaga gttaccaag caacttgagg 5280
ctgaggggat gttcgagcct tctcttcctc atgttgctta cagacttgct gaggttatcg 5340
ctatgcattg tgctgggtgt gctcttatct ggcatggata cactttcgct ggaatcgcta 5400
tgcttgaggt tgttcagga agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga cattactctc 5460
tcactggaaa cattgcttcc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga cttggatgtg 5520
gaatgtctgg tgcttggtgg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact cctcaaaagc 5580
ttcagcacga tgttgatctt gatacccttc ctctcggttc ttccatgag agaatcgctg 5640
ctaaggtaa gtctcctgct atgaaggctt ggctttctat gcaagctaag ctttctgctc 5700
ctgttaccac tcttctgtt gctcttgat ggcatctta ccttcactct agacacatgc 5760
tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgctcggaat cagatacgga cttgttgat 5820
accttgctgc taactacggt gctggatacg ttctcgcttg ttacctctct tacgttcagc 5880
ttggagctat gtacatcttc tgcaacttgc ctgtttctca tactcacctc cctgttggtg 5940
agcctaacga gcatgctact tgggttgagt acgctgctaa ccacactact aactgttctc 6000
catcttggtg gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag caccacctt 6060
accttctat gcctcaattc agacacccta agatcgctcc tagagttaag cagcttttcg 6120
agaagcacgg acttcactac gatgttagag gatacttoga ggctatggct gatactttcg 6180
ctaaccttga taacgttgcc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga gatcgttcaa 6240
acatttgcca ataaagtctc ttaagattga atcctgttgc cggctctgag atgattatca 6300
tataatttct gttgaattac gtttaagcag taataattaa catgtaatgc atgacgttat 6360
ttatgagatg ggtttttatg attagagtcg cgcaattata catttaatac gcgatagaaa 6420
acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcg cgtgtcatct atgttactag 6480
atcggtcgat taaaaatccc aatttatatt ggtctaattt agtttggtat tgagtaaaac 6540
aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct ttaagacttt 6600
ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat 6660
ttcgttaaat atgaagtgtc ccatttttat taactttaaa taattggttg tacgatcact 6720

```

ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt catatgtcaa	6780
aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaaatttcg ataatttaaa	6840
attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta attactaaat	6900
ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa	6960
tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta	7020
aaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat	7080
taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccg ggcaaaaccg	7140
aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccg aaccaactcg	7200
gtccatttgc acccctaate ataatagctt taatattttca agatattatt aagttaacgt	7260
tgtaaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt	7320
aaaagcagct cgatgtgggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa atatcccaag	7380
tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa	7440
agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaata	7500
cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tattttttgt tcttaacaaa gcatccctc	7560
taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatttt	7620
ggactactat tgggaacttc ttctgaaat agtgatagaa ccacacagag catgtgcttt	7680
ccatttaatt ttaaaaacca agaacatac atacataaca ttccatcagc ctctctctct	7740
ttttattacg gttaatgact taaaacacat cttattatcc catccttaac acctagcagt	7800
gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg ctgcccctgg	7860
agctggcatc ggctaggctg ggtgccgcac tgtcccgaa ggtccctagc gacttgttta	7920
gattgatggg accacctctc aacttctgc tgcgtgccct gctgctggat gtcctgcctc	7980
atctggccga ttgcacgctc cagtccccctg catgtgcact cgctcctcaa ttgcttaaga	8040
tcatgcagc agctatcgaa gtgctggctc tgttgccctc ctccacggcc ttgggtgtag	8100
tagtagctgc cgccgcctt ctggactttt tcccacagga accgccgaat aattcgatag	8160
aaccacacga gcatgtgctt tcatttattt taaaaacca gaaacataca taacatttca	8220
tcagcctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctcttta	8280
ttacagctgt tacactaact taaaacacat tcattctcatt attattatta ttatccatcc	8340
ttaaacaccta gcagtgtcct ttgacgatct cataatcgat cacccttca tcaggtatcc	8400
ttaggttca ctccaacgtt gttgcagtta cggaaacatg acacaccatc atgggttctca	8460
acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaacc acatgttctc atcggtgtgt	8520
ctgtagtgc ctccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc atggtagaat	8580
gggatccttg aaacgtagtg atggagcaca tgagtctcga tgatgtcatg gaagatgatt	8640

ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa agtccactct	8700
tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac gaaaacaagc	8760
cagtgggttaa caaggatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca gaatccgaaa	8820
accttgtaag cgggtgtaaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc agaaagaacg	8880
atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg agacttgaag	8940
aacttagaaa caccagggta aggttgtcca gtagcgtag tagcaaggta aagagaaagt	9000
cctccaagct gttggaacaa gagagcgaaa acagagtaga taggagtttc ctcagcgata	9060
tcgtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcgggtga aggaacgaaa	9120
accatatctc tggtcagtgt tccagtagcc ttatgggtct tagcatgaga gaacttccag	9180
ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaaccctc caacggtatc gttaaccat	9240
ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat tccgaatccg	9300
aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa ttcgttaggg	9360
agaagaggga ttaggtaag tccaacgtaa gcgatagcag agatagccac gatatctctc	9420
accacgtaag acatagactt cacgagagat ctctcgtaac agtgcttagg gatagcgtca	9480
aggatatctc tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt ttccgaaggt atcgatagcg	9540
gtcttttctc gcttgaaaga tgcaacgttt ccagaacgcc taacgggtctt agtagatccc	9600
tcaaggatct cagatccaga cacggttaacc ttagacatgg tatggtaatt gtaaattgaa	9660
ttgtaattgt gtttgtgtgt tgttgtgtgt ggttaattgt gtaaaatttt tgggtgtgat	9720
tgggtcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggtttggt gagattgggg	9780
atgggtgggt tatatagtg agactgagga atggggtcgt gagtgttaac ttgcatggg	9840
ctacacgtgg gttcttttgg gcttacacgt agtattattc atgcaaatgc agccaataca	9900
tatacgggat ttaataaatg tgtgggaata caatatgccg agtattttac taattttggc	9960
aatgacaagt gtacatttgg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat ttggattatt	10020
tttattctct taccttggcc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca gaattgaatg	10080
gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat taacgtcgaa	10140
ggaaaatact gattctctca agcatacgga caagggtaaa taacatagtc accagaacat	10200
aataaacaaa aagtgcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt cagggtcata	10260
ttggaaacat cattatccta gtcttgtag cctcttctc cctgctctag ttgagaggcc	10320
ttgggactaa cgagagggtca gttgggtag cagatcctta tcttgacta gcctttcttg	10380
tgttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga agatgactct	10440
tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc tggcttgcaa	10500
tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgtt gctgatttag	10560

agctccccgt tgggtgattt gacttcgatt tcagtttagg cttgttgaaa tttttcaggt 10620
tccattgtga agcctttaga gcttgagctt ccttccatgt taatgccttg atcgaatact 10680
cctagagaaa agggaagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat tttttttcaa 10740
cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatal ttatactgac 10800
aagtaatagt cttaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg ggttttccga 10860
catccataac gacccgaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg ttcttcttgt 10920
catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc tccgcaaaat 10980
attcgaacgg caagtatttg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc aggacctatt 11040
gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtggttgtca gcaaaccaat gaccgaaatc 11100
catcacatga cggacgtcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc tatcttttcag 11160
agtcgtgagc tccacacggc attccggcaa ctacgtgttg ggcaggcttc gccgtattag 11220
agatatgttg aggcagaccc atctgtgcca ctgttacaat tacgagagtt gttttttttg 11280
tgattttcct agtttctcgt tgatgggtgag ctcatattct acatcgtatg gtctctcaac 11340
gtcgttttct gtcatctgat atcccgatc ttgcatccac gtgcgcgcgc tccgttgcca 11400
agtccttagg tgcctatgac gcaaaattgg tgggtgtgag ggctgccctg tgcttcttac 11460
cgatgggttg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt gacggttttg 11520
tgtgggttga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attcttttggc agaaaacaat 11580
tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat tccaacagag 11640
ttacatctct taagaaataa tgtaaccctt ttagacttta tatatttgca attaaaaaa 11700
taatttaact ttagactttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca ctctattatt 11760
tatatcgaaa ctatttgtat gtctcccctc taaataaact tggatttgtg ttacagaaac 11820
ctataatcaa ataataata ctcaactgaa gtttgtgcag ttaattgaag ggattaacgg 11880
ccaaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat ttccatcaat 11940
atcatcgccg ttcttcttct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga cacctgcact 12000
tcattgtcct tattacgtgt tacaaaaatg aaccatgca tccatgcaaa ctgaagaatg 12060
gcgcaagaac ccttcccctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac catctcccgc 12120
tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat ccatccaaaa 12180
gataccactt ttacaacaa ttaccaacaa caacaacaa caacaacat tacaattaca 12240
ttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct tctactggtg 12300
ttcatgctgg tgttactgac tcttctgctt tcaccagaaa ggatgttgct gatagacctg 12360
atctcaccat cgttgagat tctgtttacg atgctaaggc tttcagatct gagcatcctg 12420
gtggtgctca tttcgtttct ttgttcggag gaagagatgc tactgaggct ttcattggaat 12480

accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttgga tctcttgctt 12540
ctactgagga acctgttgct gctgatgagg gataccttca actttgtgct aggatcgcta 12600
agatggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctcttgcttc ttactgggtt aaggctggac 12660
ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgttgga aagagacttc 12720
tcctttctat cgttcttgga tggtttttcg ctcttatcgg tcttaacatc cagcatgatg 12780
ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgctt ctgttaacct tgctcttgga ctttgtcagg 12840
attggatcgg aggatctatg atccttttgg ttcaagagca tggtgttatg caccacctcc 12900
acactaacga tgttgataag gatcctgato aaaaggctca cgggtgctctt agactcaagc 12960
ctactgatgc ttggtcacct atgcattggc ttcagcatct ttaccttttg cctggtgaga 13020
ctatgtacgc tttaacgctt ttgttctcog acatctctga gcttggtatg tggcgttggg 13080
aggggtgagc tatctctaag cttgttggtt acctctttat gccttctttg cttctcaagc 13140
ttacctttcg ggctagattc gttgctttgc ctctttacct tgctccttct gttcatactg 13200
ctgtgtgtat cgtgctact gttatgactg gatctttcta cctcgtttc ttctcttca 13260
tctccacaaa cttcgagggg gttgctttcg ttggacctga tggatctatc acttctatga 13320
ctagaggtgc tagcttcctt aagagacaag ctgagacttc ttctaactgt ggaggacctc 13380
ttcttgctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcaactg ttccctagag 13440
ttcaccatgg attctacct agacttgctc ctcttgtaa ggctgagctt gaggctagag 13500
gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtetaacct tgcttctacc ctgagacata 13560
tgtacgtctt tggaagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct tatgtgacgt 13620
gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa agtgagaatg 13680
aggggaaggg gaaatgtgta atgagccagt agccggtggg gctaattttg tatcgtattg 13740
tcaataaata atgaattttg tggtttttat gtgttttttt aaatcatgaa ttttaaat 13800
tataaaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatata catgcatgga tgtttcttta 13860
cccaaatcta gttcttgaga ggatgaagca tcaccgaaca gttctgcaac tatccctcaa 13920
aagctttaaa atgaacaaca aggaacagag caacgttcca aagatcccaa acgaaacata 13980
ttatctatac taatactata ttattaatta ctactgcccg gaatcacaat ccctgaatga 14040
ttcctattaa ctacaagcct tgttggcggc ggagaagtga tcggcgcggc gagaagcagc 14100
ggactcggag acgaggcctt ggaagatctg agtcgaacgg gcagaatcag tattttcctt 14160
cgacgttaat tgatcctaca ctatgtaggt catatccatc gttttaattt ttggccacca 14220
ttcaattctg tcttgccctt agggatgtga atatgaacgg ccaaggtaag agaataaaaa 14280
taatccaaat taaagcaaga gaggccaagt aagataatcc aaatgtacac ttgtcattgc 14340
caaaattagt aaaatactcg gcatattgta ttcccacaca ttattaaaat accgtatatg 14400

tattggctgc atttgcata ataatactac gtgtaagccc aaaagaaccc acgtgtagcc	14460
catgcaaagt taacactcac gaccccatc ctcagtctcc actatataaa cccacatcc	14520
ccaatctcac caaacccacc acacaactca caactcactc tcacacctta aagaaccaat	14580
caccacaaa aattttacaa caattaccaa caacaacaaa caacaacaaa cattacaatt	14640
acatttaca ttaccatacc atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca	14700
gaggatcttc tagcaacacc gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa	14760
acgtgttctc tgttctctgat ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt	14820
gttacgagag aagattggct acctctctct actacgtgtt cagagatata ttctgcatgc	14880
ttaccaccgg ataccttacc cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacacctta	14940
acagcatcat caagttcact ttctgggccc ttacactta cgttcaagga cttttcgaa	15000
ccggaatctg ggttctcgct catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg	15060
tgaacgattt cgttggatgg acccttcaact cttaccttat gggtccttac ttacgtgga	15120
agtactctca tggaaagcac cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg	15180
ttcctgccac caaagaggaa ttcaagaagt ctaggaaact cttcggtaac ctgctgagt	15240
actctgagga ttctccactt agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat	15300
ggatcgctta cctcttcgtt aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt ccttcttgga	15360
aatggaacca cttctggctt acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct	15420
tcctttctga tcttggaaac ctcacccagg gaatcggtct tactctttgg tacaagaaat	15480
tcggaggatg gtcccttttc atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aaccactggc	15540
tcgttttcat cacattcctt cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgtgagg	15600
aatggacttt cgctaagggt gctgctgcta ctatcgatag aaagtccgga ttcatcggac	15660
ctcacatctt ccatgatata atcgagactc atgtgcttca ccaactactgt tctaggatcc	15720
cattctacaa cgctagacct gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca	15780
ggtctagcga cgagaacatg tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg	15840
ttgacgggta taacgggtgt ctcattgttc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg	15900
ctgagaagta atgaaggggt gatcgattat gagatcgtag aaagacactg ctagggtgta	15960
aggatggata ataataataa taatgagatg aatgtgtttt aagttagtgt aacagctgta	16020
ataaagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagaggctg	16080
atgaaatggt atgtatgttt cttgggtttt aaaataaatg aaagcacatg ctggtgtggt	16140
tctatcgaat tattcggcgg ttcctgtggg aaaaagtcca gaagggccgc cgcagctact	16200
actacaacca aggccgtgga ggagggcaac agagccagca cttcgatagc tgctgcgatg	16260
atcttaagca attgaggagc gagtgcacat gcaggggact ggagcgtgca atcggccaga	16320

tgaggcagga catccagcag cagggacagc agcaggaagt tgagaggtgg tcccatcaat	16380
ctaaacaagt cgctagggac cttccgggac agtgcggcac ccagcctagc cgatgccagc	16440
tccaggggca gcagcagtct gcatgggttt gaagtgggtga tcgatgagat cgtataaaga	16500
cactgctagg tgtaaggat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa ccgtaataaa	16560
aagagagaga ggctgatgga atgttatgta tgtatgtttc ttggttttta aaattaaatg	16620
gaaagcacat gctcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata tttggtctaa	16680
tttagtttg tattgagtaa aacaaattcg aacaaacca aaatataaat atatagtttt	16740
tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct agaaatattt	16800
gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgta aatatgaagt gctccatttt tattaacttt	16860
aaataattgg ttgtacgac actttcttat caagtgttac taaaatgcgt caatctcttt	16920
gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt ttcgaatttg	16980
aagtgaattt tcgataattt aaaattaaat agaacatata attatttagg tatcatattg	17040
atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa cgaaaaatta	17100
gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattcttc tataagaata	17160
ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaa ttaattttta ctaacacata tatttactta	17220
tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaa aaaccagaaa	17280
atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt tggtttgatt	17340
ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcaccccta atcataatag ctttaatat	17400
tcaagatatt attaatgtaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa tgaatcaagc	17460
ctatatgggt gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat gtaatttact	17520
tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg ttagctacga	17580
tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa atatacgaag	17640
gaacaaatat ttttaaaaaa atacgcaatg acttgggaaca aaagaaagtg atatattttt	17700
tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg taactattat	17760
gctcccttgc ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa aatagtcctg	17820
caggctagta gattgggttg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct attagttgaa	17880
agttgaaact ttgttcctta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat atgtaatgtg	17940
tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc	18000
agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg tttgaatcct	18060
attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa	18120
atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtgtctc aggatctgat tgtaatttta	18180
gacttaaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt	18240

ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcattat	18300
ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca gagggtagtc	18360
caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag	18420
cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt tttggcgta	18480
aaagaagact aagttttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa tttccatcg	18540
aaatatatga atttagtata tatattttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt	18600
tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt	18660
ctaaatgcat gctttgtaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct	18720
catagcttcc tccattat	18780
aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcgc	18840
tatccctgct gctcttgctg gaactcttg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga	18900
tatccagct tctgagaaag ttctgctta cttcatgcag gttgagtact ggggacotac	18960
tatcggaact attggatacc tctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag	19020
atctcaacct ttcgagatca agaacgctat gctcgtttac aactcttacc agaccttctt	19080
caacagctac tgcacttacc ttttcgttac ttctcatagg gctcagggac ttaaggttg	19140
gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggtta tctggcttca	19200
ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga caccttcttc atggtgatga ggaagaagtt	19260
cgaccagctt tcttctcttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catgggtcgt	19320
tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgtta acaccttctg	19380
gcacgtgac atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagtttaact gtttctggaa	19440
gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta	19500
caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttcttacc cttcaactct gggttatggt	19560
gaacatgttc gttctcttctg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta aggggtgctaa	19620
gaagcagtga taagggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagtg taataagacg	19680
actctcacta ctcgatcgct agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac	19740
aacttatcgt aatgcatgtg aaactataac acattaatcc tacttgtcat atgataacac	19800
tctcccatc taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttctttaaat gattaaaaaa	19860
aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa	19920
aaaaatactt atactaat	19980
cgcgatccc atggagtcaa agattcaaat agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac	20040
tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa	20100
catggtggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatc aaagatacag tctcagaaga	20160

```

ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca 20220
ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaggtg gctcctacaa 20280
atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtgggcc 20340
caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc 20400
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca 20460
ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagtcca ttcatcttg agagaacacg 20520
ggggactgaa ttaaatatga gccctgagag gcgtcctggt gaaatcagac ctgctactgc 20580
tgctgatatg gctgctggtt gtgatatcgt gaaccactac atcgagactt ctaccgttaa 20640
cttcagaact gagcctcaaa ctctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga 20700
tagataccct tggtctgttg ctgaggttga ggtgtgtgtt gctggaatcg cttacgtgg 20760
accttggaag gctagaaacg cttacgattg gactgttgag tctaccgttt acgtttcaca 20820
cagacatcag agacttggac ttggatctac cctttacact caccttctca agtctatgga 20880
agctcaggga ttcaagtctg ttgttgctgt taccggactc cctaacgac cttctgttag 20940
acttcatgag gctcttggtg aactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca 21000
cgttggtatg catgatgtt gattctggca aagagatttc gagcttctcg ctctcctag 21060
acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgatc gttcaaacat ttggcaataa 21120
agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 21180
aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatac cgttatctat gagatgggtt 21240
tttatgatta gaggccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 21300
gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcactctatg tactagatca ctagtgatgt 21360
acggttaaaa ccacccagc acattaaaaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 21420
cgtcaatttg ttacaccac aatatatcct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 21480
gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagtcc 21527

```

<210> 2
 <211> 23512
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> pGA7-mod_B нуклеотидна послідовність

```

<400> 2
tcctgtggtt ggcattgcaca tacaaatgga cgaacggata aaccttttca cgccctttta 60
aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttaccgcga atatctctg 120
tcaaacactg atagttaaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180
tcacgacgtt gtaaaacggg cgcgcgcggg aaagcttgcg gccgcggtac cgcccggttcg 240

```


actcagatct tccaaggcct cgtctccgag tccgctgctt ctgcgcgcgc cgatcacttc 300
tccgccgcca acaaggcttg tagttaatag gaatcattca gggattgtga ttccgggcag 360
tagtaattaa taatatagta ttagtataga taatatgttt cgtttgggat ctttggaacg 420
ttgctctgtt ccttgttgtt cattttaaag cttttgaggg atagttgcag aactgttcgg 480
tgatgcttca tcctctcaag aactagattt gggtaaagaa acatccatgc atggatatgg 540
aatgttggtt ttccgattgg agattatatt ataaaattta aaattcatga tttaaaaaaa 600
cacataaaaa ccacaaaatt catgatttat tgacaatacg atacaaaatt agcaccaccg 660
gctactggct cattacacat ttccccttcc cctcattctc actttgtggc ttattattta 720
ttattattac atatatatta ccgttattat ttcacgtcac ataagcttgt taattaatca 780
ttagtgagcc ttctcagcct ttccgttaac gtagtagtgc tgtccacact tatcaagggt 840
agagaaagta gccttccaag caccgtagta agagagcacc ttgtagttga gtccccactt 900
cttagcgaaa ggaacgaatc ttctgctaac ctccaggctgt ctgaattgag gcatatcagg 960
gaagagggtg tggataacct gacagttaag gtatccata agccagttca cgtatcctct 1020
agaaggatcg atatcaacgg tgtgatcaac agcgtagtta acccaagaaa ggtgcttatt 1080
agatggaaca acagggaggt gagtatgaga agtagagaag tgagcgaaaa ggtacatgta 1140
agcgtatccg ttctcgaaag tgaaccacca gtaagcaaca ggccaagagt atccagtagc 1200
aagcttgata acagcgggtc taacaacatg agaaacgagc atccaagaag cctcttcgta 1260
gttcttctta cggagaactt gtctaggggt gagaacgtag atccagaaaag cttgaacaag 1320
aagtccagag gtaacagtaa cgaaagtcca agcttgaagt ctgcccgaag ctctagagaa 1380
tcctctaggt ctgttatcct caacagcagt gttgaagaaa gccacagcag gagtggatatc 1440
aagatccata tcgtgtctaa ccttttgagg ggtagcatgg tgcttgttat gcatctgggt 1500
ccacatctca ccagaagtag aaagtccgaa tccacaagtc atagcctgaa gtctcttgctc 1560
cacgtaaaca gatccggtta gagagttatg tccaccctca tgttgaaccc atccacatct 1620
agctccgaag aaagcacctg aaacaacaga agcaatgata gggatatccag cgtacataag 1680
agcagttcca agagcgaatg tagcaagaag ctcgagaagt ctgtaagcca catgggtgat 1740
agaaggcttg aagaatccat ctctctcaag ctccagcgc catctagcga aatcctcaag 1800
cataggagca tcctcagact cagatctctt gatctcagca ggtctagaag gcaaagctct 1860
aagcatcttc caagccttga gagaacgcat gtggaattct ttgaaagcct cagtagcatc 1920
agcaccagtg ttagcaagca tgtagaagat cacagatcca ccagggtgct tgaagttagt 1980
cacatcgtae tcaactcctt caactctaac ccatctagtc tcgaaagtag cagcaagctc 2040
atgaggctca agagtcttaa gatcaacagg agcagtagaa gcatccttag catcaagagc 2100
ctcagcagaa gatttagacc tggttaagtgg agatctagga gaagatcttc catcagctct 2160

aggagggcac atggtatggt aattgtaaat gtaattgtaa tgttgttgtg tgtttgttgt 2220
 tgttgtaaat tgttgtaaaa ttaattaagt gggatatctt tgatggata agcaagtagt 2280
 gatgatgttc taggtgaagt gatgggggtg ttttatagcg ggagatggtg aaatggatgg 2340
 tcgccacata agaaatggag ggaagggtt cttgcgccat tcttcagttt gcatggatgc 2400
 atgggtttca ttttgtaaca cgtaataagg acaatgaagt gcaggtgtct ctcaagtctc 2460
 agaggggata tgtggacaga agaagaacgg cgatgatatt gatggaaatg gccatctagt 2520
 gtgaatctat tcggttgata atactagtgc attttgccg ttaatccctt caattaactg 2580
 cacaaacttc agttgagtat tgattatttg attatagggt ctgtaaacac aataccaagt 2640
 ttatttagag gggagacata caaatagttt cgatataaat aatagatggg ttaaacttag 2700
 ttattaaaac tatatataaa gtctaaaagt taaattattt ttttaattgc aaatatataa 2760
 agtctaaagg gggtacatta tttcttaaga gatgtaactc tgttggaatc tgacttaatc 2820
 cgtctcatca ctctggtttc cagttctaata ctaatgaatt gttttctgcc aaagaatttg 2880
 aagcaagaag taaattgatc aatgccgtca acccacacca aaccgtcaac cactaccat 2940
 cgccgaggag acccccaaac tcaacctcca cccatcggta agaagcacag ggcagccgc 3000
 acccacacca atttggcgtg catgacacct agggacttgg cacgggaggg ggcgcacgtg 3060
 gatgcaaatg acgggatatc agatgacagg aaacgacgtt gagagacat acgatgtaga 3120
 atatgagctc accatcaacg agaaactagg aaaatcacia aaaaaacaac tctcgtaatt 3180
 gtacgagtgg cacagatggg tctgcctcaa catatctcta atacggcgaa gcctgcccaa 3240
 cacgtagttg ccggaatccg gtgtggagct cacgactctg aaagataggg gcttctctgt 3300
 tcgtttcgct caccactgg acgtccgtca tgtgatggat ttcggtcatt gggttgctga 3360
 caaccacatt ctgaagctcc atgagatgag tcttcacaat aggtcctgct caataccgtg 3420
 gagttatggt tgcaagtcca taacttgccg ttogaatatt ttgcggagcc agtcggacgg 3480
 gaattggcga gctcggctga cacctataaa ggccatgaca agaagaacca aaagttcttc 3540
 cctaattgctt tcatgaggct tcgggtcgtt atggatgtcg gaaaaccct cttgaaggaa 3600
 cgagacgtta ttatgcatga cggtaagact attacttgct agtataagta tgaaagatta 3660
 cctgtcttct gctttgtttg tggattgatt ggacacgttg aaaaaaatg tgcacttcga 3720
 tttcaatact cagagatcga cttccctttt ctctaggagt attcgatcaa ggcattaaca 3780
 tggaagggaag ctcaagctct aaaggcttca caatggaacc tgaaaaattt caacaagcct 3840
 aaactgaaat cgaagtcaaa tcaccaaac gggagctcta aatcagcaaa cactcctcct 3900
 ccacagtato caatcatcgt gcacgatgct ccaggatttg caagccaggt attgcaagct 3960
 aggagtagga tagagacctt aaacgtcgtt ggtgtgaaga gtcactctca gacctaatgg 4020
 agatagatgt agacggcggc acgaagactc tgaaacacca gaaaggctag tccaggataa 4080

ggatctgcta tcccaactga cctctcgta gtcccaaggc ctctcaacta gagcaggagg 4140
aaggatggtc acaagactag gataatgatg tttccaatat gaacctgaat gtccatagct 4200
aattttttta gtcttgcttc tgcaactttt gtttattatg ttctgggtgac tatgttattt 4260
acccttgctc gtatgcttga gggtagcccta gtagattggg ttggttggtt ccatgtacca 4320
gaaggcttac cctattagtt gaaagttgaa actttgttcc ctactcaatt cctagtgtg 4380
taaatgtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aaatgactag gagtggttct 4440
tgagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag aacgaatttg 4500
aaaggctctt aggtttgaat cctattcgag aatgtttttg tcaaagatag tggcgatttt 4560
gaaccaaaga aaacatttaa aaaatcagta tccggttacg ttcatgcaaa tagaaagtgg 4620
tctaggatct gattgtaatt ttagacttaa agagtctctt aagattcaat cctggctgtg 4680
tacaaaacta caaataatat attttagact atttggcctt aactaaactt ccaactatta 4740
tttactgagg ttagagaata gacttgcgaa taaacacatt cccgagaaat actcatgac 4800
ccataattag tcagagggta tgccaatcag atctaagaac acacattccc tcaaatttta 4860
atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa agacagaaat 4920
ttgtagactt ttttttggtg ttaaaagaag actaagtta tacgtacatt ttattttaag 4980
tggaataaccg aaattttcca tcgaaatata tgaatttagt atatatatct ctgcaatgta 5040
ctattttgct attttggcaa ctttcagtgg actactactt tattacaatg tgtatggatg 5100
catgagtttg agtatacaca tgtctaaatg catgctttgt aaaacgtaac ggaccacaaa 5160
agaggatcca tacaataaca tctcatagct tcctccatta ttttcggaca caaacagagc 5220
attttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta catttacaat 5280
taccatacca tggcctctat cgctatccct gctgctcttg ctggaactct tggatacgtt 5340
acctacaatg tggctaaccg tgatatccca gcttctgaga aagttcctgc ttacttcatg 5400
caggttgagt actggggacc tactatcgga actattggat acctcctctt catctacttc 5460
ggaaagcgta tcatgcagaa cagatctcaa cctttcggac tcaagaacgc tatgctcgtt 5520
tacaacttct accagacctt cttcaacagc tactgcatct accttttcgt tacttctcat 5580
agggtcagg gacttaaggt ttggggaaac atccctgata tgactgctaa ctcttgggga 5640
atctctcagg ttatctggct tcactacaac aacaagtacg ttgagcttct cgacaccttc 5700
ttcatggtga tgaggaagaa gttagaccag ctttctttcc ttcacatcta ccaccacact 5760
cttctcatct ggtcatgggt cgttggtatg aagcttgagc ctgttgagga ttgctacttc 5820
ggatcttctg ttaacacctt cgtgcacgtg atcatgtact ctactacgg acttgcctgt 5880
cttgaggtta actgtttctg gaagaagtac atcaccaga tccagatgct tcagttctgt 5940
atctgtgctt ctactctat ctacaccgct tacgttcaga ataccgctt ctggcttcct 6000

tacottcaac tctgggttat ggtgaacatg ttcgttctct tcgccaactt ctaccgtaag	6060
aggtacaagt ctaaggggtgc taagaagcag tgataaggcg cgcggcgcgc cgggccgccg	6120
ccatgtgaca gatcgaagga agaaagtgtg ataagacgac tctcactact cgatcgctag	6180
tgattgtcat tgttatatat aataatgtta tctttcacia cttatcgtaa tgcattgtgaa	6240
actataacac attaatccta cttgtcatat gataaacactc tccccattta aaactcttgt	6300
caatttaaag atataagatt ctttaaata ttaaaaaaaaa tatattataa attcaatcac	6360
tctactaat aaattattaa ttattattta ttgattaaaa aaatacttat actaatttag	6420
tctgaataga ataattagat tctagtctca tcccccttta aaccaactta gtaaacgttt	6480
tttttttaa ttttatgaag ttaagttttt acctgttttt taaaaagaat cggtcataag	6540
atgccatgcc agaaccattag ctacacgtta cacatagcat gcagccgcgcg agaattgttt	6600
ttcttcgcca cttgtcactc cttcaaaca cctaagagct tctctctcac agcacacaca	6660
tacaatcaca tgcgtgcattg cattattaca cgtgatcgcc atgcaaatct cctttatagc	6720
ctataaatta actcatccgc ttcactcttt actcaaacca aaactcatcg atacaaacaa	6780
gattaaaaac atacacgagg atcttttaca acaattacca acaacaacaa acaacaacaa	6840
acattacaat tacatttaca attaccatac catgcctcca agggactctt actcttatgc	6900
tgctctcct tctgtctaac ttacgaagt tgatactcct caagagcacg acaagaaaga	6960
gcttgttatc ggagataggg cttacgatgt taccaacttc gttaagagac accctggtgg	7020
aaagatcatt gcttaccaag ttggaactga tgctaccgat gcttacaagc agttccatgt	7080
tagatctgct aaggctgaca agatgcttaa gtctcttct tctcgtcttg ttcacaaggg	7140
atactctcca agaagggctg atcttatcgc tgatttccaa gagttcacca agcaacttga	7200
ggctgagggg atgttcgagc cttctcttcc tcatgttgct tacagacttg ctgaggttat	7260
cgctatgcat gttgctggg ctgctcttat ctggcatgga tacactttcg ctggaatcgc	7320
tatgcttggg gttgttcagg gaagatgtgg atggcttatg catgaggggtg gacattactc	7380
tctcactgga aacattgctt tcgacagagc tatccaagtt gcttgttacg gacttggatg	7440
tggaatgtct ggtgcttggg ggcgtaacca gcataacaag caccatgcta ctctcaaaa	7500
gcttcagcac gatgttgatc ttgataccct tctctcgtt gctttccatg agagaatcgc	7560
tgctaagggt aagtctcctg ctatgaaggc ttggctttct atgcaagcta agcttttcgc	7620
tctgttacc actcttcttg ttgctcttg atggcagctt taccttcac ctagacacat	7680
gctcaggact aagcactacg atgagcttgc tatgctcgga atcagatacg gacttgttgg	7740
atacttgcct gctaactacg gtgctggata cgttctcgt tgttaccttc ttacgttca	7800
gcttgagct atgtacatct tctgcaactc cgctgtttct catactcacc tccctgttgt	7860
tgagcctaac gagcatgcta cttgggttga gtacgtgct aaccacacta ctaactgttc	7920

tccatcttgg tgggtgtgatt ggtggatgto ttacccttaac taccagatcg agcaccacct	7980
ttacccttct atgcctcaat tcagacaccc taagatcgct cctagagtta agcagctttt	8040
cgagaagcac ggacttcact acgatgttag aggatacttc gaggctatgg ctgatacttt	8100
cgtaaacctt gataacgttg cccatgctcc tgagaagaaa atgcagtaat gagatcgttc	8160
aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctggt gccggtcttg cgatgattat	8220
catataattt ctgttgaatt acgttaagca cgtaataatt aacatgtaat gcatgacgtt	8280
atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcataga	8340
aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcg gcggtgtcat ctatgttact	8400
agatcggtcg attaaaaac ccaattatat ttggtctaatt ttagtttggg attgagtaaa	8460
acaaattcga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact	8520
ttttatagaa ttttctttaa aaaatatcta gaaatatattg cgactcttct ggcatgtaat	8580
atttcgttaa atatgaagtg ctccattttt attaacttta aataattggg tgtacgatca	8640
ctttcttato aagtgttact aaaatgcgtc aatctctttg ttcttcata ttcatatgtc	8700
aaaatctatc aaaattctta tatatctttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta	8760
aaattaataa gaacatatca ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa	8820
atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata	8880
aatatcatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg	8940
taaaaaaaat taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag	9000
attaaaaata tattcatcta acaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaaa ccggcaaaac	9060
cgaaccaatc caaacggata tagttgggtt gggttgattt tgatataaac cgaaccaact	9120
cgggtccattt gcaccoccaa tcataatagc tttaatattt caagatatta ttaagttaac	9180
gttgtaataa tcctggaagt ttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat	9240
ttaaaagcag ctogatgtgg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca	9300
agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac	9360
aaagaaccaa aaagtgattg aagctcgaaa tatacgaagg aacaaatatt tttaaaaaaa	9420
tacgcaatga cttggaacaa aagaaagtga tatatttttt gttcttaaac aagcatcccc	9480
tctaaagaat ggcagttttc ctttgcattg aactattatg ctcccttcgt tacaaaaatt	9540
ttggactact attgggaact tcttctgaaa atagtgatag aaccacacg agcatgtgct	9600
ttccatttaa ttttaaaaac caagaaacat acatacataa cattccatca gcctctctct	9660
ctttttatta cggttaatga cttaaaacac atcttattat cccatcctta acacctagca	9720
gtgtctttat acgatctcat cgatcaccac ttcaaaacca tgcagactgc tgctgccct	9780
ggagctggca tcggctaggc tgggtgccgc actgtcccg aaggcccta gcgacttgtt	9840

tagattgatg ggaccacctc tcaacttctt gctgctgtcc ctgctgctgg atgtcctgcc	9900
tcctctggcc gattgcacgc tccagtcccc tgcattgtca ctgctcctc aattgcttaa	9960
gatcatcgca gcagctatcg aagtgtggc tctgttgccc tctccacgg ccttggtgt	10020
agtagtagct gccgccgcc tcttgactt tttccacag gaaccgccga ataattcgat	10080
agaaccacac gagcatgtgc tttcatttat tttaaaaacc aagaacata cataacattt	10140
catcagcctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctt	10200
tattacagct gttacactaa cttaaaacac attcatctca ttattattat tattatccat	10260
ccttaacacc tagcagtgc tttgtacgat ctcataatcg atcaccctt catcaggtat	10320
ccttaggctt cactccaacg ttgttgacgt tacggaacat gtacacacca tcatggtct	10380
caacgaactg gcaagatctc caagttttcc aaaggctaac ccacatgttc tcatcggtgt	10440
gtctgtagtg ctctccata actttcttga tgcactcggg agcttctcta gcatggtaga	10500
atgggacctc tgaacgtag tgatggagca catgagctc gatgatgtca tggaagatga	10560
ttccgaggat tccgaactct ctatcgatag tagcagcagc acccttagcg aaagtccact	10620
cttgagcatc gtaatgaggc atagaagaat cggtgtgctg aaggaagga acgaaaacaa	10680
gccagtgggt aacaaggatc caaggacaga accatgtgat gaaagtaggc cagaatccga	10740
aaaccttga agcggtgtaa acagaagtga gggtagcaag gattccaaga tcagaaagaa	10800
cgatgtacca gtagtccttc ttatcgaaaa cagggttaga aggccagtag tgagacttga	10860
agaacttaga aacaccaggg taagggtgtc cagtagcggt agtagcaagg taaagagaaa	10920
gtcctccaag ctgttggaac aagagagcga aaacagagta gataggagtt tctcagcga	10980
tatcgtgaag gctggttaact tgggtcttct ctttgaattc ctggcggtg taaggaacga	11040
aaaccatata tctggtcatg tgtccagtag ccttatgggt cttagcatga gagaacttcc	11100
agctgaagta aggaaccata acaagagagt ggagaacca tccaacggtg tcgttaaccc	11160
atccgtagtt agagaaagca gaatgtccac actcatgtcc aaggatccag attccgaatc	11220
cgaacaaga gatagagaac acgtaagcag accaagcagc gaatctaagg aattcgtag	11280
ggagaagagg gatgtaggtg agtccaacgt aagcgatagc agagatagcc acgatatctc	11340
tcaccacgta agacatagac ttcacgagag atctctcgta acagtgccta gggatagcgt	11400
caaggatata cttgatggtg taatctggca ccttgaaaac gtttccgaag gtatcgatag	11460
cggctctttg ctgcttgaaa gatgcaacgt ttccagaacg cctaacggtc ttagtagatc	11520
cctcaaggat ctcagatcca gacacggtaa ccttagacat ggtatggtaa ttgtaaatgt	11580
aattgtaatg ttgtttgttg ttgtgtgtg ttgtaattg ttgtaaaatt tttggtggtg	11640
attggttctt taagggtgta gagtgagttg tgagttgtgt ggtgggttg gtgagattgg	11700
ggatggtggg tttatatagt ggagactgag gaatggggtc gtgagtgtta actttgcatg	11760

ggctacacgt gggttctttt gggcttacac gtagtattat tcatgcaaat gcagccaata	11820
catatacggg attttaataa tgtgtgggaa tacaatatgc cgagtatttt actaattttg	11880
gcaatgacaa gtgtacattt ggattatctt acttggcctc tcttgcttta atttgatta	11940
tttttattct cttaccttgg ccgttcatac tcacatccct aaaggcaaga cagaattgaa	12000
tggtggccaa aaattaaaac gatggatatg acctacatag tgtaggatca attaacgtcg	12060
aaggaaaata ctgattctct caagcatatg gacaagggtg aataacatag tcaccagaac	12120
ataataaca aaaagtgcag aagcaagact aaaaaatta gctatggaca ttcaggttca	12180
tattggaaac atcattatcc tagtcttggt accatccttc ctctgctct agttgagagg	12240
ccttgggact aacgagaggc cagtgggat agcagatcct tatcctggac tagcctttct	12300
ggtgtttcag agtcttcgtg ccgccgtcta catctatctc cattaggtct gaagatgact	12360
cttcacacca acgacgttta aggtctctat cctactccta gcttgcaata cctggcttgc	12420
aatacctgga gcacgtgcga cgatgattgg atactgtgga ggaggagtgt ttgctgattt	12480
agagctcccg gttgggtgat ttgacttcca tttcagttta ggcttgttga aatttttcag	12540
gttcattgtg gaagccttta gagcttgagc ttccttccat gtaaatgcct tgatcgaata	12600
ctcctagaga aaaggggaagt cgatctctga gtattgaaat cgaagtgcac atttttttc	12660
aacgtgtcca atcaatccac aaacaaagca gaagacaggt aatctttcat acttatactg	12720
acaagtaata gtcttaccgt catgcataat aacgtctcgt tccttcaaga ggggttttcc	12780
gacatccata acgacccgaa gcctcatgaa agcattaggg aagaactttt ggttcttctt	12840
gtcatggcct ttataggtgt cagccgagct cgccaattcc cgtccgactg gctccgcaaa	12900
atattcgaac ggcaagttat ggacttgcaa ccataactcc acggtattga gcaggaccta	12960
ttgtgaagac tcatctcatg gagcttcaga atgtggttgt cagcaaacca atgaccgaaa	13020
tccatcacat gacggacgtc cagtgggtga gcgaaacgaa acaggaagcg cctatctttc	13080
agagtcgtga gctccacacc ggattccggc aactacgtgt tgggcaggct tcgccgtatt	13140
agagatatgt tgaggcagac ccactctgtc cactcgtaca attacgagag ttgttttttt	13200
tgtgattttc ctagtctctc gttgatggtg agctcatatt ctacatcgta tggctctctc	13260
acgtcgtttc ctgtcatctg atatcccgtc atttgcattc acgtgcgcgc cctcccgtgc	13320
caagtcccta ggtgtcatgc acgccaattt ggtgggtggt cgggctgccc tgtgcttctt	13380
accgatgggt ggaggttgag tttgggggtc tccgcggcga tggtagtggg ttgacggttt	13440
ggtgtgggtt gacggcattg atcaattttac ttcttgcttc aaattctttg gcagaaaaca	13500
attcattaga ttagaactgg aaaccagagt gatgagacgg attaatgcag attccaacag	13560
agttacatct cttaagaaat aatgtaaccc ctttagactt tatatatttg caattaaaaa	13620
aataatttaa cttttagact ttatatatag ttttaataac taagtttaac cactctatta	13680

tttatatcga aactatttgt atgtctcccc tctaaataaa cttggtattg tgtttacaga	13740
acctataatc aaataatcaa tactcaactg aagtttgtgc agttaattga agggattaac	13800
ggccaaaatg cactagtatt atcaaccgaa tagattcaca ctagatggcc atttccatca	13860
atatcatcgc cgttcttctt ctgtccacat atcccccttg aaacttgaga gacacctgca	13920
cttcattgtc cttattacgt gttacaaaat gaaacccatg catccatgca aactgaagaa	13980
tggcgcaaga acccttcccc tcatttctt atgtggcgac catccatttc accatctccc	14040
gctataaaac acccccatca cttcacctag aacatcatca ctacttgctt atccatccaa	14100
aagataccca cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta	14160
catttacaat taccatacca tgccacctag cgctgctaag caaatgggag cttctactgg	14220
tgttcattgt ggtgttactg actcttctgc ttccaccaga aaggatgttg ctgatagacc	14280
tgatctcacc atcgttgagg attctgttta cgatgctaag gctttcagat ctgagcatcc	14340
tgggtgtgct catttcgttt ctttgttcgg aggaagagat gctactgagg ctttcattgga	14400
ataccataga agggcttggc ctaagtctag aatgtctaga ttccacgttg gatctcttgc	14460
ttctactgag gaacctgttg ctgctgatga gggatacctt caactttgtg ctaggatcgc	14520
taagatggtg ccttctgttt cttctggatt cgctcctgct tcttactggg ttaaggctgg	14580
acttatcctt ggatctgcta tcgctcttga ggcttacatg ctttacgctg gaaagagact	14640
tctcccttct atcgttcttg gatggctttt cgctcttctt ggtcttaaca tccagcatga	14700
tgctaaccat ggtgctttgt ctaagtctgc ttctgttaac cttgctcttg gactttgtca	14760
ggattggatc ggaggatcta tgatccttgg gcttcaagag catgttggtta tgcaccacct	14820
ccacactaac gatgttgata aggatcctga tcaaaaggct cacggtgctc ttagactcaa	14880
gctactgat gcttggtcac ctatgcattg gcttcagcat ctttaccttt tgcctgggtga	14940
gactatgtac gctttcaagc ttttgttctt cgacatctct gagcttggtta tgtggcggtt	15000
ggaggggtgag cctatctcta agcttgctgg atacctcttt atgcttcttt tgccttctca	15060
gcttaccttc tgggctagat tcggtgcttt gcctctttac cttgctcctt ctgttcatac	15120
tgtgtgtgt atcgtctgcta ctgttatgac tggatctttc tacctcgctt tcttcttctt	15180
catctccac aacttcgagg gtgttgcttc tgttggacct gatggatcta tcacttctat	15240
gactagaggt gctagcttcc ttaagagaca agctgagact tcttctaacg ttggaggacc	15300
tcttcttgct actcttaacg gtggactcaa ctaccaaatt gagcatcact tgttccctag	15360
agttcaccat ggattctacc ctgacttgc tcctcttggt aaggctgagc ttgaggctag	15420
aggaatcgag tacaagcact accctactat ctggtctaac cttgcttcta ccctcagaca	15480
tatgtacgct cttggaagaa ggcctagatc taaggctgag taatgacaag cttatgtgac	15540
gtgaaataat aacggtaaaa tatatgtaat aataataata ataaagccac aaagtgagaa	15600

tgaggggaag gggaaatgtg taatgagcca gtagccggtg gtgctaattt tgtatcgtat	15660
tgtcaataaa tcatgaattt tgggttttt atgtgttttt ttaaatcatg aattttaaat	15720
tttataaaat aatctccaat cggaagaaca acattccata tccatgcatg gatgtttctt	15780
tacccaaatc tagttcttga gaggatgaag catcaccgaa cagttctgca actatccctc	15840
aaaagcttta aatgaacaa caaggaacag agcaacgttc caaagatccc aaacgaacaa	15900
tattatctat actaatacta tattattaat tactactgcc cggaatcaca atccctgaat	15960
gattcctatt aactacaagc cttgttggtg gcgagaagt gatcggtg gcgagaagca	16020
gcggaactcg agacgaggtc ttggaagatc tgagtgaac ggcagaatc agtattttcc	16080
ttcgacgtta attgatccta cactatgtag gtcatatcca tcgttttaatt ttttggtcac	16140
cattcaattc tgtcttgctt ttagggatgt gaatatgaac ggccaaggtg agagaataaa	16200
aataatccaa attaaagcaa gagagccaa gtaagataat ccaaatgtac acttgcatt	16260
gccccaaatta gtaaaatact cggcatattg tattcccaca cattattaaa ataccgtata	16320
tgtattggct gcatttgcat gaataatact acgtgtaagc ccaaaagaac ccacgtgtag	16380
cccattgcaa gttaacactc acgaccccat tcctcagtct ccatatata aaccacccat	16440
ccccaatctc accaaaccca ccacacaact cacaactcac tctcacacct taaagaacca	16500
atcaccacca aaaattttac aacaattacc aacaacaaca aacaacaaac aacattacaa	16560
ttacatttac aattaccata ccatgaggtc tggtaacgtt actggatctg atcctaagaa	16620
cagaggatct tctagcaaca ccgagcaaga ggttccaaaa gttgctatcg ataccaacgg	16680
aaacgtgttc tctgttctcg atttcacat caaggacatc cttggagcta tccctcatga	16740
gtgttacgag agaagattgg ctacctctct ctactacgtg ttcagagata tcttctgcat	16800
gcttacacc ccgataacct cccataagat cctttacct ctctcatct cttacacctc	16860
taacagcatc atcaagttca ctttctgggc cctttacact tacgttcaag gacttttcgg	16920
aacgggaatc tgggttctcg ctcatgagtg tggacatcaa gctttctctg attacggaat	16980
cgtgaacgat ttcgttggtt ggacccttca ctcttacctt atgggtcctt acttcagctg	17040
gaagtactct catgaaaagc accataaggt tactggacac atgaccagag atatggtttt	17100
cgttctgccc accaaagagg aattcaagaa gtctaggaac ttcttcggtg acctcgctga	17160
gtactctgag gattctccac ttagaacctt ttacgagctt cttgttcaac aacttgagag	17220
atggatcgct tacctcttgc ttaacgttac aggacaacct taccctgatg ttccttcttg	17280
gaaatggaac cacttctggc ttacctctcc acttttcgag caaagagatg ctctctacat	17340
cttctttct gatcttgtaa tcctcaccca gggaatcgtt cttactcttt ggtacaagaa	17400
attcggagga tgggtccctt tcatcaactg gttcgttctt tacatctggg ttaaccactg	17460
gctcgttttc atcacattcc ttcagcacac tgatctact atgcctcatt acaacgctga	17520

ggaatggact ttcgctaagg gtgctgctgc tactatcgat agaaagttcg gattcatcgg 17580
 acctcacato ttccatgata tcatcgagac tcatgtgctt caccactact gttctaggat 17640
 cccattctac aacgctagac ctgcttctga ggctatcaag aaagttagtg gaaagcacta 17700
 caggtctagc gacgagaaca tgtggaagtc actttggaag tctttcaggt cttgccaata 17760
 cgttgacggt gataacggtg ttctcatggt ccgtaacatc aacaactgcg gagtggagc 17820
 tgctgagaag taatgaaggg gtgacgatt atgagatcgt acaaagacac tgctaggtgt 17880
 taaggatgga taataataat aataatgaga tgaatgtgtt ttaagttagt gtaacagctg 17940
 taataaagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagaggc 18000
 tgatgaaatg ttatgtatgt ttcttggttt ttaaaataaa tgaaagcaca tgctcgtgtg 18060
 gttctatcga attattcggc ggttcctgtg ggaaaaagtc cagaagggcc gccgcagcta 18120
 ctactacaac caaggccgtg gaggagggca acagagccag cacttcgata gctgctgcga 18180
 tgatcttaag caattgagga gcgagtgcac atgcagggga ctggagcgtg caatcgcca 18240
 gatgaggcag gacatccagc agcagggaca gcagcaggaa gttgagaggt ggtcccatca 18300
 atctaaacaa gtcgctaggg accttccggg acagtgcggc acccagccta gccgatgcca 18360
 gctccagggg cagcagcagt ctgcatggtt ttgaagtgtt gatcgatgag atcgataaaa 18420
 gacactgcta ggtgttaagg atgggataat aagatgtgtt ttaagtcatt aaccgtaata 18480
 aaaagagaga gaggctgatg gaatgttatg tatgtatgtt tcttggtttt taaaattaaa 18540
 tggaaagcac atgctcgtgt gggttctatc tcgattaaaa atcccaatta tatttggtct 18600
 aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt cgaaccaaac caaaatataa atatatagtt 18660
 tttatatata tgcctttaag actttttata gaattttctt taaaaaatat ctagaaatat 18720
 ttgcgactct tctggcatgt aatatttcgt taaatatgaa gtgtccatt tttattaact 18780
 ttaataaatt ggtgtgacga tcactttctt atcaagtgtt actaaaatgc gtcaatctct 18840
 ttgttcttcc atattcatat gtcaaaatct atcaaaatc ttatatatct ttttcgaatt 18900
 tgaagtgaat tttcgataat ttaaaattaa atagaacata tcattattta ggtatcatat 18960
 tgatttttat acttaattac taaatttggg taactttgaa agtgtacatc aacgaaaaat 19020
 tagtcaaacg actaaaataa ataaatatca tgtgttatta agaaaattct cctataagaa 19080
 tattttaata gatcatatgt ttgtaaaaaa aattaatttt tactaacaca tatatttact 19140
 tatcaaaaat ttgacaaagt aagattaaaa taatattcat ctaacaaaaa aaaaaccaga 19200
 aaatgctgaa aaccggcaa aaccgaacca atccaaaccg atatagttgg tttggtttga 19260
 ttttgatata aaccgaacca actcgttcca tttgcacccc taatcataat agctttaata 19320
 tttcaagata ttattaagtt aacgttgtca atatcctgga aattttgcaa aatgaatcaa 19380
 gcctatatgg ctgtaatatg aatttaaaag cagctcgatg tgggtgtaat atgtaattta 19440

cttgattcta aaaaaatata ccaagtatta ataatttctg ctaggaagaa ggtagctac 19500
gatttacagc aaagccagaa tacaaagaac cataaagtga ttgaagctcg aaatatacga 19560
aggaacaaat atttttaaaa aaatacgcaa tgacttggaa caaaagaaag tgatatattt 19620
tttgttctta aacaagcatc cctctaaaag aatggcagtt ttctcttgca tgtaactatt 19680
atgctccctt cggtacaaaa attttggact actattggga acttcttctg aaaaagtcc 19740
tgcaggctag tagattgggt ggttggtttc catgtaccag aaggcttacc ctattagttg 19800
aaagttgaaa ctttgttccc tactcaattc ctagtgtgtt aaatgtatgt atatgtaatg 19860
tgtataaaac gtagtactta aatgactagg agtgggtctt gagaccgatg agagatggga 19920
gcagaactaa agatgatgac ataattaaga acgaatttga aaggctctta ggtttgaatc 19980
ctattcgaga atgtttttgt caaagatagt ggcgattttg aaccaaagaa aacatttaaa 20040
aaatcagtat ccggttacct tcatgcaaat agaaagtggc ctaggatctg attgtaattt 20100
tagacttaaa gagtctctta agattcaatc ctggctgtgt acaaaactac aaataatata 20160
tttagacta tttggcctta actaaacttc cactcattat ttactgaggt tagagaatag 20220
acttgcgaat aaacacattc ccgagaaata ctcgatgcc cataattagt cagaggggat 20280
gccaatcaga tctaagaaca cacattccct caaattttaa tgcacatgta atcatagttt 20340
agcacaaatc aaaaataatg tagtattaaa gacagaaatt tgtagacttt tttttggcgt 20400
taaaagaaga ctaagtttat acgtacattt tattttaagt ggaaaaccga aattttccat 20460
cgaaatata gaatttagta tatatatctc tgcaatgtac tattttgcta ttttggcaac 20520
tttcagtga ctaactactt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtatacacat 20580
gtctaataatc atgttttga aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaatacat 20640
ctcatagctt cctccattat ttcccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca 20700
acaacaaaca acaacaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaatttgct 20760
caacctctcg ttgctatggc tcaagagcag tacgctgcta tcgatgctgt tgttgctcct 20820
gctatcttct ctgctaccga ctctatttga tggggactca agcctatctc ttctgctact 20880
aaggatctcc ctctcgttga atctctacc cctcttatcc ttctctcct cgcttacttc 20940
gctatcgttg gttctggact cgtttaccgt aaagtgttcc ctagaaccgt taagggacag 21000
gatcctttcc ttctcaaggc tcttatgctc gctcacaacg ttttccttat cggactcagc 21060
ctttacatgt gcctcaagct cgtttacgag gcttacgtga acaagtactc cttctgggga 21120
aacgcttaca accctgtcca aaccgagatg gctaaggtga tctggatctt ctacgtgtcc 21180
aagatctacg agttcatgga caccttcacg atgcttctca agggaaacgt taaccaggtt 21240
tccttcctcc atgtttacca ccacggatct atctctggaa tctggtggat gatcaattat 21300
gctgctcag gtggagatgc ttacttctct gotgctctca actcttgggt tcatgtgtgc 21360



```

atgtacacct actacttcat ggtgctgtt cttcctaagg acgaaaagac caagagaaag 21420
taccttttgt ggggaagata ccttaccag atgcaaatgt tccagttctt catgaacctt 21480
ctccaggctg tttacctct ctactcttct tctccttacc ctaagttcat tgctcaactc 21540
ctcgttggtt acatggttac cctcctcatg cttttcggaa acttctacta catgaagcac 21600
cacgcttcta agtgataagg gccgcgcga tgtgacagat cgaaggaaga aagtgaata 21660
agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tatatataat aatgttatct 21720
ttcacactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt gtcataatgat 21780
aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtaa tttaaagata taagattctt taaatgatta 21840
aaaaaaatat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta ttatttattg 21900
attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct agcctgcagg 21960
gcggccgcgg atccccatga gtaaaagatt caaatagagg acctaacaga actgcgcgta 22020
aagactggcg aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc 22080
gtcaacatgg tggagcacga cacacttgct tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 22140
gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 22200
ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 22260
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 22320
ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgttg aaaaagaaga cgttccaacc 22380
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa 22440
tcccactatc cttcgcaaga cccttctct atataaggaa gttcatttca tttggagaga 22500
acacggggga ctgaattaaa tatgagccct gagaggcgct ctgttgaaat cagacctgct 22560
actgctgctg atatggctgc tgtttgtgat atcgtgaacc actacatcga gacttctacc 22620
gttaacttca gaactgagcc tcaaacctct caagagtgga tcgatgatct tgagagactc 22680
caagatagat acccttggtc tgttgctgag gttgaggggt ttgttgctgg aatcgcttac 22740
gctggacctt ggaaggctag aaacgcttac gattggactg ttgagtctac cgtttacgtt 22800
tcacacagac atcagagact tggacttgga tctacccttt acactcacct tctcaagtct 22860
atggaagctc agggattcaa gtctgttgtt gctgttatcg gactccctaa cgatccttct 22920
gttagacttc atgaggctct tggatacact gctagaggaa ctcttagagc tgctggatac 22980
aagcacggtg gatggcatga tgttggtatc tggcaaagag atttcgagct tcctgctcct 23040
cctagacctg ttagaccagt tactcagatc tgaatttgct tgatcgttca aacatttggc 23100
aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc 23160
tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat 23220
gggtttttat gattagatc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat 23280

```

agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgcatc tatgttacta gatcactagt 23340
gatgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt 23400
ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca acagctcccc 23460
gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccatcagt cc 23512

<210> 3
<211> 1254
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії
12 десатурази *Lachancea kluuyveri* в рослині

<400> 3
atgagcgtg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc 60
gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa acgtgttctc tgttcctgat 120
ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt gttacgagag aagattggct 180
acctctctct actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc ttaccaccgg ataccttacc 240
cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacacctcta acagcatcat caagtccact 300
ttctgggccc tttaactta cgttcaagga cttttcggaa ccggaatctg ggttctcgct 360
catgagtgtg gacatcaagc ttctctgat tacggaatcg tgaacgattt cgttgatgg 420
acccttcaact cttaccttat ggttccttac ttcatctgga agtactctca tggaaagcac 480
cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg ttctgccac caaaggaggaa 540
ttcaagaagt ctaggaaact cttcggtaac ctgctgagt actctgagga ttctccactt 600
agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat ggatcgctta cctcttcgtt 660
aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt ccttcttga aatggaacca cttctggctt 720
acctctcac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct tcctttctga tcttgaatc 780
ctcaccagag gaatcgttct tactcttttg tacaagaaat tcggaggatg gtcccttttc 840
atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aacctctggc tcgttttcat cacattcctt 900
cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt 960
gctgctgcta ctatcgatag aaagtctgga ttcatcggac ctcatctctt ccatgatatc 1020
atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc cattctacaa cgctagacct 1080
gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg 1140
tggaagtcac tttggaagtc ttacaggtct tgccaatacg ttgacggtga taacggtgtt 1200
ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg ctgagaagta atga 1254

<210> 4
<211> 416

```

<212> Binok
<213> Lachancea kluyveri

<400> 4

Met Ser Ala Val Thr Val Thr Gly Ser Asp Pro Lys Asn Arg Gly Ser
1          5          10          15

Ser Ser Asn Thr Glu Gln Glu Val Pro Lys Val Ala Ile Asp Thr Asn
          20          25          30

Gly Asn Val Phe Ser Val Pro Asp Phe Thr Ile Lys Asp Ile Leu Gly
          35          40          45

Ala Ile Pro His Glu Cys Tyr Glu Arg Arg Leu Ala Thr Ser Leu Tyr
          50          55          60

Tyr Val Phe Arg Asp Ile Phe Cys Met Leu Thr Thr Gly Tyr Leu Thr
65          70          75          80

His Lys Ile Leu Tyr Pro Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Ser Ile
          85          90          95

Ile Lys Phe Thr Phe Trp Ala Leu Tyr Thr Tyr Val Gln Gly Leu Phe
          100          105          110

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

Ser Asp Tyr Gly Ile Val Asn Asp Phe Val Gly Trp Thr Leu His Ser
          130          135          140

Tyr Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Gly Lys His
          145          150          155          160

His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro Ala
          165          170          175

Thr Lys Glu Glu Phe Lys Lys Ser Arg Asn Phe Phe Gly Asn Leu Ala
          180          185          190

Glu Tyr Ser Glu Asp Ser Pro Leu Arg Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Val
          195          200          205

Gln Gln Leu Gly Gly Trp Ile Ala Tyr Leu Phe Val Asn Val Thr Gly
          210          215          220

Gln Pro Tyr Pro Asp Val Pro Ser Trp Lys Trp Asn His Phe Trp Leu
          225          230          235          240

```

Thr Ser Pro Leu Phe Glu Gln Arg Asp Ala Leu Tyr Ile Phe Leu Ser
245 250 255

Asp Leu Gly Ile Leu Thr Gln Gly Ile Val Leu Thr Leu Trp Tyr Lys
260 265 270

Lys Phe Gly Gly Trp Ser Leu Phe Ile Asn Trp Phe Val Pro Tyr Ile
275 280 285

Trp Val Asn His Trp Leu Val Phe Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
290 295 300

Pro Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Glu Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
305 310 315 320

Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Lys Phe Gly Phe Ile Gly Pro His Ile
325 330 335

Phe His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Cys Ser Arg
340 345 350

Ile Pro Phe Tyr Asn Ala Arg Pro Ala Ser Glu Ala Ile Lys Lys Val
355 360 365

Met Gly Lys His Tyr Arg Ser Ser Asp Glu Asn Met Trp Lys Ser Leu
370 375 380

Trp Lys Ser Phe Arg Ser Cys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Asn Gly Val
385 390 395 400

Leu Met Phe Arg Asn Ile Asn Asn Cys Gly Val Gly Ala Ala Glu Lys
405 410 415

<210> 5
<211> 1251
<212> ДНК
<213> Pichia pastoris

<400> 5
atgtctaagg ttaccgtgtc tggatctgag atccttgagg gatctactaa gaccgttagg 60
cgttctggaa acgttgcatc ttcaagcag caaaagaccg ctatcgatac ctcggaac 120
gttttcaagg tgccagatta caccatcaag gatatccttg acgctatccc taagcactgt 180
tacgagagat ctctcgtgaa gtctatgtct tacgtggtga gagatatcgt ggctatctct 240
gctatcgctt acgttggaact tacctacatc cctcttctcc ctaacgaatt ccttagattc 300
gctgcttggt ctgcttacgt gttctctatc tcttggttcg gattcggaaat ctggatcctt 360
ggacatgagt gtggacattc tgctttctct aactacggat gggtaacga taccgttgga 420

tgggttctcc actctcttgt tatggttcct tacttcagct ggaagttctc tcatgctaag 480
caccataagg ctactggaca catgaccaga gatatggttt tcgttcttta caccgcgag 540
gaattcaaag agaagcacca agttaccagc cttcacgata tcgctgagga aactcctatc 600
tactctgttt tcgctctctt gttccaacag cttggaggac tttctcttta ccttgctact 660
aacgctactg gacaacctta ccctggtggt tctaagttct tcaagtctca ctactggcct 720
tctagccctg ttttcgataa gaaggactac tggtagatcg ttctttctga tcttggaatc 780
cttgctacco tcaattctgt ttacaccgct tacaaggttt tcggattctg gctactttc 840
atcacatggt tctgtccttg gatccttgtt aaccactggc ttgttttcgt taccttcctt 900
cagcacaccg attcttctat gcctcattac gatgctcaag agtggacttt cgctaagggt 960
gctgctgcta ctatcgatag agagtgcga atcctcgga tcatcttcca tgacatcatc 1020
gagactcatg tgctccatca ctacgtttca aggatcccat tctaccatgc tagagaagct 1080
accgagtga tcaagaaagt tatgggagag cactacagac acaccgatga gaacatgtgg 1140
gttagccttt ggaaaacttg gagatcttgc cagttcgttg agaaccatga tgggtgtgtac 1200
atgttcogta actgcaacaa cgttgagtg aagcctaagg atacctgatg a 1251

<210> 6
<211> 415
<212> Билор
<213> Pichia pastoris

<400> 6

Met Ser Lys Val Thr Val Ser Gly Ser Glu Ile Leu Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Thr Val Arg Arg Ser Gly Asn Val Ala Ser Phe Lys Gln Gln Lys
20 25 30


Thr Ala Ile Asp Thr Phe Gly Asn Val Phe Lys Val Pro Asp Tyr Thr
35 40 45

Ile Lys Asp Ile Leu Asp Ala Ile Pro Lys His Cys Tyr Glu Arg Ser
50 55 60

Leu Val Lys Ser Met Ser Tyr Val Val Arg Asp Ile Val Ala Ile Ser
65 70 75 80

Ala Ile Ala Tyr Val Gly Leu Thr Tyr Ile Pro Leu Leu Pro Asn Glu
85 90 95

Phe Leu Arg Phe Ala Ala Trp Ser Ala Tyr Val Phe Ser Ile Ser Cys
100 105 110



Phe Gly Phe Gly Ile Trp Ile Leu Gly His Glu Cys Gly His Ser Ala
 115 120 125
 Phe Ser Asn Tyr Gly Trp Val Asn Asp Thr Val Gly Trp Val Leu His
 130 135 140
 Ser Leu Val Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His Ala Lys
 145 150 155 160
 His His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro
 165 170 175
 Tyr Thr Ala Glu Glu Phe Lys Glu Lys His Gln Val Thr Ser Leu His
 180 185 190
 Asp Ile Ala Glu Glu Thr Pro Ile Tyr Ser Val Phe Ala Leu Leu Phe
 195 200 205
 Gln Gln Leu Gly Gly Leu Ser Leu Tyr Leu Ala Thr Asn Ala Thr Gly
 210 215 220
 Gln Pro Tyr Pro Gly Val Ser Lys Phe Phe Lys Ser His Tyr Trp Pro
 225 230 235 240
 Ser Ser Pro Val Phe Asp Lys Lys Asp Tyr Trp Tyr Ile Val Leu Ser
 245 250 255
 Asp Leu Gly Ile Leu Ala Thr Leu Thr Ser Val Tyr Thr Ala Tyr Lys
 260 265 270
 Val Phe Gly Phe Trp Pro Thr Phe Ile Thr Trp Phe Cys Pro Trp Ile
 275 280 285
 Leu Val Asn His Trp Leu Val Phe Val Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
 290 295 300
 Ser Ser Met Pro His Tyr Asp Ala Gln Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Glu Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ile Phe
 325 330 335
 His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Val Ser Arg Ile
 340 345 350
 Pro Phe Tyr His Ala Arg Glu Ala Thr Glu Cys Ile Lys Lys Val Met
 355 360 365

Gly Glu His Tyr Arg His Thr Asp Glu Asn Met Trp Val Ser Leu Trp
370 375 380

Lys Thr Trp Arg Ser Cys Gln Phe Val Glu Asn His Asp Gly Val Tyr
385 390 395 400

Met Phe Arg Asn Asn Asn Val Gly Val Lys Pro Lys Asp Thr
405 410 415

<210> 7
<211> 1392
<212> ДНК
<213> *Micromonas pusilla*

<400> 7
atgtgccgc cgaagacgga cgcccgatcg tccccgcgat cgccgctgac ggcagcaaaa 60
tcctccgcgg aggcgctcga cgccaaggac gcgtcgaccg cgcccgtcga tctcaaaacg 120
ctcgagccgc acgagctcgc ggcgacgttc gagacgcgat gggcgcgct ggaggacgtc 180
gagtacgacg tcacaaactt caaacacccg ggaggcagcg tgatattcta catgctcgcg 240
aacacgggcg cggaacgccc ggaggcgctc aaggagtcc acatgcgacg gcttaaggcg 300
tggaagatgc tcagagcgct gccgtcgcg cccgcggaga tcaaacgcag cgagagcgag 360
gacgcgccga tggtaggaga ttctcgcgcg tggcgcgcg agctcgaacg cgacgggttc 420
tttaagccct cgataacgca cgtcgctat cggttactcg agctcctcgc gacctcgcc 480
ctcggcaccg ccctcatgta cgccgggtac ccgatcatcg cgtccgctcg gtacggcgcg 540
ttcttcggcg ctcggtcgcg ttgggtccag cagcggggcg ggcacaaact gctcacgggg 600
tccgtctacg tcgacaagcg cctccaagcg atgacgtgcg ggttcgggct gtccacgagc 660
ggggagatgt ggaaccagat gcacaataag caccacgcga cgccgcagaa agtgaggcac 720
gacatggacc tggacacgac cccgcgggtg gcgtttttta acaccgccgt ggaggacaac 780
cgcccgaggg ggttctcccg cgcgtgggct cggttcagc cgtggacgtt cgtcccggtg 840
acctccgggc tgctcgtcca ggcgttctgg atctacgtcc tgcaccgcg gcagggtgtg 900
cgaaagaaga actacgagga ggcgtcgtgg atgctcgtct ctcacgtcgt caggaccgcg 960
gtgattaaac tcgacgacgg gtactcgtgg cccgtcgct actggtggtt cacctcggc 1020
aactggatcg cgtacatgta cctcttcgcg cacttctcca cgagccacac gcacctccg 1080
gtcgtgccct cggataagca cctgagctgg gtgaactacg cggtcgatca caccgtggac 1140
atcgaccctg cgcgcgggta cgtgaactgg ttgatgggat atctgaactg ccaggtcatt 1200
catcacctgt tcccgacat gccgcagttt cgccagccgg aggtgagccg gcggttcgtc 1260
ccgttcgcga agaagtggg gctgaactac aagtgctgt cctattacgg cgcctggaag 1320
gcgacgttct cgaacttga taaggtcggg cagcactact acgtcaacgg caaggcggag 1380

aaggcgcaact ga

1392

<210> 8
<211> 1395
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії
Micromonas pusilla 6 десатурази в рослинах (версія 1)

<400> 8
atgtgccctc ctaagactga tggaagatct tctcctagat ctccacttac caggctctaaa 60
tcttctgctg aggcctcttg tgctaaggat gcttctactg ctctgttgga tcttaagact 120
cttgagcctc atgagcttgc tgctacttcc gagactagat gggtttagagt tgaggacgtt 180
gagtacgatg tgactaactt caagcaccct ggtggatctg tgatcttcta catgcttgct 240
aacactggtg ctgatgctac tgaggcttcc aaagaattcc acatgcgttc tctcaaggct 300
tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360
gatgctccta tgcttgagga ttctgctaga tggcgtgctg agcttgagag agatggattc 420
ttcaagcctt ctatcaccca tgtggcttac agacttctcg agcttcttgc tacattcgct 480
cttggaactg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg cttctgttgt ttacggtgct 540
ttcttcggag ctatagtggt atgggttcaa catgaggggtg gacataactc tcttaccgga 600
tctgtttacg tggacaagag acttcaggct atgacttggt gattcggact ttctacttct 660
ggtagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcaaaa ggtagacac 720
gatatggate ttgataccac tcctgctgtg gctttcttca aactgctgtg tgaggataac 780
agacctagag gattctctag agcttgggtc agacttcaag cttggacttt cgttcctggt 840
acctctggac ttcttgttca agcttcttgg atctacgttc tccaccctag acaagttctc 900
cgtaagaaga actacgaaga ggcttcttgg atgctcgttt ctcatgttgt tagaacgct 960
gttatcaagc ttgctactgg atactcttgg cctgttgctt actggtggtt cactttcgga 1020
aactggatcg cttacatgta cttttctgct cacttctcta cttctcatac tcacctccct 1080
gttggtccat ctgataagca cttttcttgg gtttaactacg ctgttgatca caccgttgat 1140
atcgatcctt ctgaggata cgtgaactgg cttatgggat accttaactg tcaggttatc 1200
caccacctct tccctgatat gcctcaatc agacagcctg aggttagcag aagattcgtt 1260
cctttcgcta agaagtggg actcaactac aagtgctct cttactacgg tgcttgaag 1320
gctactttct ctaacctga taagtggtga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag 1380
aaggctcact aatga 1395

<210> 9

<211> 463
 <212> Бинок
 <213> Micromonas pusilla
 <400> 9

Met Cys Pro Pro Lys Thr Asp Gly Arg Ser Ser Pro Arg Ser Pro Leu
 1 5 10 15

Thr Arg Ser Lys Ser Ser Ala Glu Ala Leu Asp Ala Lys Asp Ala Ser
 20 25 30

Thr Ala Pro Val Asp Leu Lys Thr Leu Glu Pro His Glu Leu Ala Ala
 35 40 45

Thr Phe Glu Thr Arg Trp Val Arg Val Glu Asp Val Glu Tyr Asp Val
 50 55 60

Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Phe Tyr Met Leu Ala
 65 70 75 80

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Met Arg
 85 90 95

Ser Leu Lys Ala Trp Lys Met Leu Arg Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala
 100 105 110

Glu Ile Lys Arg Ser Glu Ser Glu Asp Ala Pro Met Leu Glu Asp Phe
 115 120 125

Ala Arg Trp Arg Ala Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser
 130 135 140

Ile Thr His Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Ala Thr Phe Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Thr Ala Leu Met Tyr Ala Gly Tyr Pro Ile Ile Ala Ser Val
 165 170 175

Val Tyr Gly Ala Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu
 180 185 190

Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Ser Val Tyr Val Asp Lys Arg Leu
 195 200 205

Gln Ala Met Thr Cys Gly Phe Gly Leu Ser Thr Ser Gly Glu Met Trp
 210 215 220

Asn Gln Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His
 225 230 235 240

Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala
 245 250 255
 Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Arg Ala Trp Ala Arg Leu
 260 265 270
 Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Leu Leu Val Gln Ala
 275 280 285
 Phe Trp Ile Tyr Val Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Lys Lys Asn
 290 295 300
 Tyr Glu Glu Ala Ser Trp Met Leu Val Ser His Val Val Arg Thr Ala
 305 310 315 320
 Val Ile Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Trp Pro Val Ala Tyr Trp Trp
 325 330 335
 Phe Thr Phe Gly Asn Trp Ile Ala Tyr Met Tyr Leu Phe Ala His Phe
 340 345 350
 Ser Thr Ser His Thr His Leu Pro Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
 355 360 365
 Ser Trp Val Asn Tyr Ala Val Asp His Thr Val Asp Ile Asp Pro Ser
 370 375 380
 Arg Gly Tyr Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
 385 390 395 400
 His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
 405 410 415
 Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Gly Leu Asn Tyr Lys Val
 420 425 430
 Leu Ser Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Ser Asn Leu Asp Lys
 435 440 445
 Val Gly Gln His Tyr Tyr Val Asn Gly Lys Ala Glu Lys Ala His
 450 455 460

<210> 10
 <211> 1449
 <212> ДНК
 <213> *Ostreococcus lucimarinus*
 <400> 10



```

atgtgcgtcg aaacgaccga aggcacatcg cgaacgatgg cgaacgaacg cacgagctcg      60
tcgtcgtcgc tgagcgaagg cggaacgccg acggtgacgg tcgggatggg aagcgaagac      120
gcggggaaga agactcgaaa cgcgagcgtc acggcgtgga cgaaagagtt ggagccgcac      180
gcgatcgca agacgttcga acggcggtac gtgacgatcg aaggcgtgga atacgatgtg      240
acggatttta agcatcccgg aggatcgggt atttattaca tgctgtcgaa cacgggagcg      300
gacgcgacgg aggcctttta agagtttcat tatcggtcga aaaaggcgcg caaggcggtg      360
gcggcggttg cgcataagcc agtgacgcg cgcacgcggg aaccgatcga agatgaggcg      420
atgctgaagg atttcgcgca gtggcgcaag gaattggagc gtgagggatt tttaagccc      480
tcgccggcgc acgtggcgta tcgattcgcc gagctcgcg cgatgttcgc gctcgccacg      540
gcgttgatgc acgcgcgttg gcacgtcgct tccgtgatcg tgtactcgtg tttcttcggc      600
gcgcgatgcg gttgggtgca gcacgagggt gggcacaatt cgttgactgg aaacatttgg      660
tgggacaagc gaatccaagc cttcgcgcg gggttcggct tggcgtcgag tggcgacatg      720
tggaacaaca tgcacaacaa gcatcacgcg acgccccaaa aggtgcgaca cgatatggat      780
ctcgacacca ctcccacggt ggcgttcttc aactccgcgg ttgaagaaaa tcgccgcgg      840
ggattcagta agttgtggtt gcgccttcaa gcgtggacct tcgtgcccg gacgtccggt      900
atggttttgt tcttctggat gttcgtcttg caccgcgta acgcgctcg acgcaaaagc      960
ttcgaagaag cggcttggtt gttttccgcg cacgtcattc gcacggcggt tatcaaagcc      1020
gtcacccggt actcctggat cgcctcgta ggcttggtcg cggcgacgat gtggcgagc      1080
ggatgttact tgctgcgca cttttccacg tctcacacgc acttggtatg cgtgccgagc      1140
gataaacacc tctcgtgggt gcgatacgcc gtcgatcaca cgatcgacat caatccgaac      1200
aacagcgtcg tcaactggtt gatgggtac ttgaactgcc aagtcatcca tcactgttc      1260
ccggatatgc ctacgttcgg ccaacccgaa gtctcccgcc gattcgtccc gtttcggaag      1320
aagtggaaact taaactacaa ggtcttgacg tattatgggg cctggaaggc gacgttcggc      1380
aacttgaacg acgtcgggaa gcactattac gtgcacggat ctacgcgcgt caaatcaaag      1440
tcggcgtga                                     1449

```

<210> 11
 <211> 1449
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії
Ostreococcus lucimarinus 6-десатурази в рослинах

```

<400> 11
atgtgtgttg agactactga gggaacctct agaactatgg ctaacgagag gacctcttct      60
tcttcttcac tctctgaggg tggaactcct actgttactg tgggaatggg atctgaggat      120

```

gctggaaga aaaccagaaa cgcttctgtt actgcttga ccaaagagct tgagcctcac 180
gctatcgcta agaccttcga gagaagatac gttaccatcg aggggtttga gtacgatgtg 240
accgatttca aacaccctgg tggatctgtg atctactaca tgctctctaa cactggtgct 300
gatgctactg aggccttcaa agagttccac tacggttcta agaaggctag aaaggctctt 360
gctgctcttc ctcacaagcc tgttgatgct gctactagag agcctattga ggacgaggct 420
atgcttaagg atttcgctca gtggagaaaa gagttggaga gagagggtatt cttcaagcct 480
tctcctgctc atgttgctta cggtttcgct gaactcgtg ctatgttcgc tcttgaacc 540
gctcttatgc atgctagatg gcacgttgct agcgttatcg tgtactcctg tttcttcgga 600
gctagatgtg gatgggttca acatgagggt ggacacaact ctcttaccgg aaacatctgg 660
tgggataaga gaatccaagc tttcgtctgct ggattcggac ttgcttcttc tggtgacatg 720
tggacaaca tgcacaaca gcacatgct actcctcaga aagtgaaca cgatatggat 780
cttgatacca cccctaccgt tgctttcttc aactctgctg tggaggaaaa cagacctagg 840
ggattctcta agctttggct cagacttcaa gcttggacct tcgttctgt tacctctgga 900
atggtgctct tcttctggat gttcgttctc catcctagaa acgctctccg tcgtaagtct 960
ttcgaagagg ctgcttgatg gttctctgct cactgtatca gaaccgctgt tatcaaggct 1020
gttaccggat actcttgatg cgctagctac ggacttttcg ctgctactat gtgggcttct 1080
ggatgctacc ttttcgctca cttctctact tctcacaccc acctcgatgt tgttccatct 1140
gataagcacc ttagctgggt taggtacgct gttgatcaca ccatcgacat caaccctaac 1200
aactctgttg tgaactggct tatgggatac cttaactgcc aggttatcca ccatctcttc 1260
cctgatatgc ctcaattcag acagcctgag gtgtcaagaa gattcgtccc tttcgctaag 1320
aagtgaacc tcaactacaa ggtgctcact tactacggtg cttggaaggc tactttcgga 1380
aacctcaacg atgttggaag gcactactac gttcacggat ctcagagagt gaagagcaag 1440
agcgcttga 1449

<210> 12
<211> 482
<212> Бинок
<213> *Ostreococcus lucimarinus*
<400> 12

Met Cys Val Glu Thr Thr Glu Gly Thr Ser Arg Thr Met Ala Asn Glu
1 5 10 15

Arg Thr Ser Ser Ser Ser Leu Ser Glu Gly Gly Thr Pro Thr Val
20 25 30

Thr Val Gly Met Gly Ser Glu Asp Ala Gly Lys Lys Thr Arg Asn Ala

35 40 45

Ser Val Thr Ala Trp Thr Lys Glu Leu Glu Pro His Ala Ile Ala Lys
50 55 60

Thr Phe Glu Arg Arg Tyr Val Thr Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val
65 70 75 80

Thr Asp Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Tyr Tyr Met Leu Ser
85 90 95

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Tyr Arg
100 105 110

Ser Lys Lys Ala Arg Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro His Lys Pro Val
115 120 125

Asp Ala Ala Thr Arg Glu Pro Ile Glu Asp Glu Ala Met Leu Lys Asp
130 135 140

Phe Ala Gln Trp Arg Lys Glu Leu Glu Arg Glu Gly Phe Phe Lys Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Phe
165 170 175

Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met His Ala Arg Trp His Val Ala Ser Val
180 185 190

Ile Val Tyr Ser Cys Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His
195 200 205

Glu Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg
210 215 220

Ile Gln Ala Phe Ala Ala Gly Phe Gly Leu Ala Ser Ser Gly Asp Met
225 230 235 240

Trp Asn Asn Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg
245 250 255

His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Thr Val Ala Phe Phe Asn Ser
260 265 270

Ala Val Glu Glu Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Lys Leu Trp Leu Arg
275 280 285

Leu Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Met Val Leu Phe

290 295 300

Phe Trp Met Phe Val Leu His Pro Arg Asn Ala Leu Arg Arg Lys Ser
305 310 315 320

Phe Glu Glu Ala Ala Trp Met Phe Ser Ala His Val Ile Arg Thr Ala
325 330 335

Val Ile Lys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Trp Ile Ala Ser Tyr Gly Leu
340 345 350

Phe Ala Ala Thr Met Trp Ala Ser Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe
355 360 365

Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
370 375 380

Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp His Thr Ile Asp Ile Asn Pro Asn
385 390 395 400

Asn Ser Val Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
405 410 415

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
420 425 430

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val
435 440 445

Leu Thr Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Gly Asn Leu Asn Asp
450 455 460

Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His Gly Ser Gln Arg Val Lys Ser Lys
465 470 475 480

Ser Ala

<210> 13
<211> 456
<212> Binok
<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 13

Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile
1 5 10 15

Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser
20 25 30

Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
35 40 45

Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His
50 55 60

Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp
65 70 75 80

Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg
85 90 95

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val
100 105 110

Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu
115 120 125

Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg
130 135 140

Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr
145 150 155 160

Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly
165 170 175

Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr
180 185 190

Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe
195 200 205

Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His
210 215 220

His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr
225 230 235 240

Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg
245 250 255

Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro
260 265 270

Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro
275 280 285



Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu
290 295 300

Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe
305 310 315 320

Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser
325 330 335

Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp
340 345 350

Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp
355 360 365

His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met
370 375 380

Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro
385 390 395 400

Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys
405 410 415

Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys
420 425 430

Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His
435 440 445

Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala
450 455

<210> 14
<211> 894
<212> ДНК
<213> Pyramimonas cordata

<400> 14	
atggagttcg ctcagcctct tgtggtatg gcacaggagc agtatgccgc aattgacgcg	60
gtggtagccc ctgcaatttt ctcagctacc gacagcatcg gttgggtct taagcccatt	120
agcagcgcca caaaggatct tcctctcggt gagagtccga cgccgctcat actgagcctg	180
ttggcctatt ttgcgatcgt cggtctggg ctggtgtacc gcaaagtatt ccctgcaca	240
gtaaaggggc aagaccctt cctgctgaag gcgctcatgc ttgcgcacaa cgtgttcctc	300
attggcctca gtctatacat gtgctgaag cttgtctacg aggcttacgt caacaagtac	360

tccttctggg gaaacgccta caaccccgca cagaccgaga tggcgaaggt catctggatt 420
 ttctacgtct ccaagatcta tgagttcatg gacacgttca tcatgctctt gaagggcaac 480
 gtcaaccagg tctcttttct gcatgtgtac catcatggct ccatctctgg tatctgggtg 540
 atgatacct acgctgcccc tggcggtgac gcgtacttct cggcggcgct caactcgtgg 600
 gtgcacgtgt gcatgtacac gtactacttc atggcggcgg tgctgcccac ggacgagaag 660
 accaagcgca agtacctctg gtggggccgc tacctgaccc agatgcagat gttccagttc 720
 ttcatgaacc tgctccaggc ggtctacctc ctctactcct ctagccccta cccaagttc 780
 atcgccagc tgctgggtgt gtacatgttc acgctgctga tgctcttcgg caactctac 840
 tacatgaagc accacgcgag caagaagcag aagctggcca gcaagaagca gtag 894

<210> 15
 <211> 870
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії
 Pyramimonas cordata 6 елонгази в рослинах (вкорочена на 3' кінці
 і кодує функціональну елонгазу) (версія 1)

<400> 15
 atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgtctg tatcgatgct 60
 gttgttgctc ctgctatctt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc 120
 tcttctgcta ctaaggactt gcctcttgtt gactctcta cactctcat cctttctttg 180
 cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctgctttaca gaaagggttt ccctagaacc 240
 gtgaagggac aagatccatt ccttttgaag gctcttatgc ttgctcaca cgtgttcctt 300
 atcggaactt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggccttacg taacaagtac 360
 tctttctggg gaaacgcta caaccctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc 420
 ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaat 480
 gttaaccagg ttagcttctt tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctgggtg 540
 atgattactt acgctgtccc tgggtgtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg 600
 gttcacgtgt gtatgtacac ctactatctt atggctgccg tgcttcttaa ggacgagaaa 660
 actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aaatgcagat gttccagttc 720
 ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctt ctctactctt catctccta ccctaagttt 780
 atcgctcagc tcctcgtggt gtacatggtt actcttctca tgcttttcgg aaactctac 840
 tacatgaagc accacgctag caagtgatga 870

<210> 16
 <211> 297
 <212> Білок

<213> Pyramimonas cordata

<400> 16

Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
1 5 10 15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
20 25 30

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

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
50 55 60

Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
85 90 95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
100 105 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
115 120 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
130 135 140

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145 150 155 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
165 170 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
180 185 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
195 200 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
210 215 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225 230 235 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
245 250 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
260 265 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
275 280 285

Lys Gln Lys Leu Ala Ser Lys Lys Gln
290 295

<210> 17
<211> 288
<212> Билок
<213> Pyramimonas cordata

<400> 17

Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
1 5 10 15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
20 25 30

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

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
50 55 60

Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
85 90 95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
100 105 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
115 120 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
130 135 140

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145 150 155 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser

165 170 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
180 185 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
195 200 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
210 215 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225 230 235 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
245 250 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
260 265 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
275 280 285

<210> 18
<211> 1278
<212> ДНК
<213> Pavlova salina

<400> 18
atgccgccgc gcgatagcta ctcgtagccc gccccgccgt cggcccagct gcacgaggtc 60
gataccccgc aggagcatga taagaaggag ctcgatcatc gtgaccgcgc gtacgacgtg 120
accaactttg tgaagcgcca cccgggtggc aagatcatcg cataccaggt tggcacagat 180
gcgacggacg cgtacaagca gttccatgtg cggctctgcca aggcggacaa gatgctcaag 240
tcgctgcctt cgcgcccggg gcacaagggc tactcgcccc gccgcgctga cctcattgcc 300
gacttcacag agttcaccaa gcagctggag gcggagggca tgtttgagcc gtcgctgccg 360
cacgtggcat accgcctggc ggaggtgac gcgatgcacg tggccggcgc cgcgctcatc 420
tggcacgggt acacottcgc gggcattgcc atgctcggcg ttgtgcaggc ccgctgcggc 480
tggctcatgc acgaggcgcg ccactactcg ctcacgggca acattgcttt tgaccgtgcc 540
atccaagtgc cgtgctacgg ccttggtcgc ggcatgtcgg gcgcgtggtg gcgcaaccag 600
cacaacaagc accacgcgac gccgcagaag ttgcagcacg acgtcgacct cgacaccctc 660
ccgctcgtcg ccttcacga gcggatagcc gccaaagtga agagccccgc gatgaaggcg 720
tggcttagta tgcaggcgaa gctcttcgcg ccagtgaacca cgtgctggt cgcgctgggc 780
tggcagctgt acctgcaccc gcgccatatg ctgcgcacca agcactacga cgagctcgcg 840

atgctcggca ttcgctacgg ccttgctggc tacctcggc cgaactacgg cgcggggtag 900
gtgctcgcgt gctacctgct gtacgtgcag ctgggcgcca tgtacatctt ctgcaacttt 960
gccgtgtgctc acacacacct gccggtgtgc gagcctaacg agcacgcaac gtgggtggag 1020
tacgcgcgca accacacgac caactgctcg ccctcgtggt ggtgcgactg gtggatgtcg 1080
tacctcaact accagatcga gcaccacctc taccgctcca tgccgcagtt ccgccacccg 1140
aagattgcgc cgcgggtgaa gcagctcttc gagaagcacg gcctgacta cgacgtgcgt 1200
ggctacttcg aggccatggc ggacacgttt gccaaccttg acaacgtcgc gcacgcgccc 1260
gagaagaaga tgcagtga 1278

<210> 19
<211> 1281
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pavlova salina 5 десатурази в рослинах (версія 1)

<400> 19
atgcctccaa gggactctta ctcttatgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaagtt 60
gatactcttc aagagcacga caagaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtt 120
accaacttcg ttaagagaca ccctgggtgga aagatcattg cttaccaagt tggaactgat 180
gctaccgatg cttacaagca gttccatgtt agatctgcta aggetgacaa gatgcttaag 240
tctcttcctt ctgctctgtt tcacaaggga tactctccaa gaagggtgga tcttatcgct 300
gatttccaag agttcaccaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgagcc ttctcttcct 360
catgttgctt acagacttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctgggtc tgctcttate 420
tggcatggat acactttcgc tggaatcgct atgcttgag ttgttcaggg aagatgtgga 480
tggcttatgc atgagggtgg acattactct ctactggaa acattgcttt cgacagagct 540
atccaagttg cttgttacgg acttggtatg ggaatgtctg gtgcttggtg gcgtaaccag 600
cataacaagc accatgctac tcctcaaaag cttcagcacg atgttgatct tgataccctt 660
cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaagggtta agtctcctgc tatgaaggct 720
tggctttcta tgcaagctaa gcttttcgct cctgttacca ctctctctgt tgctcttgga 780
tggcagcttt accttcattc tagacacatg ctcaggacta agcactacga tgagcttgct 840
atgctcggaa tcagatacgg acttggtgga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac 900
gttctcgctt gttaccttct ttacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc 960
gctgtttctc atactcacct ccctgttgtt gagcctaacg agcatgctac ttgggttgag 1020
tacgctgcta accacactac taactgttct ccatcttggt ggtgtgattg gtggatgtct 1080

taccttaact accagatcga gcaccacott tacccttcta tgccccaatt cagacaccct 1140
aagatcgctc cttaggttaa gcagcttttc gagaagcacg gacttcacta cgatgttaga 1200
ggatacttcg aggctatggc tgatacttcc gctaaccctg ataacgttgc ccatgctcct 1260
gagaagaaaa tgcagtaatg a 1281

<210> 20
<211> 425
<212> Блок
<213> Pavlova salina

<400> 20

Met Pro Pro Arg Asp Ser Tyr Ser Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gln
1 5 10 15

Leu His Glu Val Asp Thr Pro Gln Glu His Asp Lys Lys Glu Leu Val
20 25 30

Ile Gly Asp Arg Ala Tyr Asp Val Thr Asn Phe Val Lys Arg His Pro
35 40 45

Gly Gly Lys Ile Ile Ala Tyr Gln Val Gly Thr Asp Ala Thr Asp Ala
50 55 60

Tyr Lys Gln Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Met Leu Lys
65 70 75 80

Ser Leu Pro Ser Arg Pro Val His Lys Gly Tyr Ser Pro Arg Arg Ala
85 90 95

Asp Leu Ile Ala Asp Phe Gln Glu Phe Thr Lys Gln Leu Glu Ala Glu
100 105 110

Gly Met Phe Glu Pro Ser Leu Pro His Val Ala Tyr Arg Leu Ala Glu
115 120 125

Val Ile Ala Met His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Trp His Gly Tyr
130 135 140

Thr Phe Ala Gly Ile Ala Met Leu Gly Val Val Gln Gly Arg Cys Gly
145 150 155 160

Trp Leu Met His Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Asn Ile Ala
165 170 175

Phe Asp Arg Ala Ile Gln Val Ala Cys Tyr Gly Leu Gly Cys Gly Met
180 185 190

Ser Gly Ala Trp Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro
195 200 205

Gln Lys Leu Gln His Asp Val Asp Leu Asp Thr Leu Pro Leu Val Ala
210 215 220

Phe His Glu Arg Ile Ala Ala Lys Val Lys Ser Pro Ala Met Lys Ala
225 230 235 240

Trp Leu Ser Met Gln Ala Lys Leu Phe Ala Pro Val Thr Thr Leu Leu
245 250 255

Val Ala Leu Gly Trp Gln Leu Tyr Leu His Pro Arg His Met Leu Arg
260 265 270

Thr Lys His Tyr Asp Glu Leu Ala Met Leu Gly Ile Arg Tyr Gly Leu
275 280 285

Val Gly Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Val Leu Ala Cys
290 295 300

Tyr Leu Leu Tyr Val Gln Leu Gly Ala Met Tyr Ile Phe Cys Asn Phe
305 310 315 320

Ala Val Ser His Thr His Leu Pro Val Val Glu Pro Asn Glu His Ala
325 330 335

Thr Trp Val Glu Tyr Ala Ala Asn His Thr Thr Asn Cys Ser Pro Ser
340 345 350

Trp Trp Cys Asp Trp Trp Met Ser Tyr Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His
355 360 365

His Leu Tyr Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Pro Lys Ile Ala Pro
370 375 380

Arg Val Lys Gln Leu Phe Glu Lys His Gly Leu His Tyr Asp Val Arg
385 390 395 400

Gly Tyr Phe Glu Ala Met Ala Asp Thr Phe Ala Asn Leu Asp Asn Val
405 410 415

Ala His Ala Pro Glu Lys Lys Met Gln
420 425

<210> 21
<211> 1329
<212> ДНК
<213> Pyramimonas cordata

<400> 21
atgggaaagg gaggcaatgc tagcgctcct actgcaaga aggaggtgtt gatcgagggg 60
aagttttacg atgtcaccga cttcaggcac cccggtgggt cgatcatcaa gtttctctcg 120
ggttctggtg ctgacgccac cgcttctctac cgcgagttcc acgttaggtc agcgaaggca 180
gacaagttct tgaagacgct gccctcccgc gaagccactc cccaggagct gaagcaggcg 240
gttagattct ccaagctcaa cccgccctcc gcgagagtg cctctgctcc cctgaccgac 300
cttgccaagg tgggaagcgt gaacaaggac ttcgaggctt tccgtgagca gtcattcag 360
gagggcttct ttaagcccaa tatcccgcat gtggtcaagc gcatcacgga agtcgtggcg 420
atgatggcgg tagcctcctg gatgatggtg cagaccaacg ctctgttgtt gaccctcgga 480
gttctgatcc gcggcattgc acagggccgg tgcggttggt ttatgcacga gggcgccac 540
tatagtctta ctggaagat ctccattgat aggcgtctgc aggagtcaat ttacggattc 600
ggctgtgaa tgtccggcgc ctggtggcgc aaccagcaca acaagcacca cgcaacocca 660
cagaagctgc agcatgacgt cgacctggag acccttctc tgatggcttt caacaacgct 720
gttaccgata gacgcaaggt gaagcctggt agtctccagg ctctgtggct caagtaccag 780
gccttctctt tcttcccgtg gacctccctt ctggtcggcc tcggttgga caccgtctc 840
caccacaggc acagcttgcg caccaagcac tatttcgagc tgctctgcat ggctgctcgt 900
tacgcgagtt tcgctgctct ttctgctccc aagtacggac ttgcaggagc tgccgggctc 960
tacctcgcca ccttcgctgt cgggtgcaac tatattttca tcaacttctc ggtctctcac 1020
actcacctgc ccgtgagcgg tgcgagcgag tacctgcatt gggctcgtga ttcggccatc 1080
cacaccacta acatcaaata cagcatgctg tgcgattggt ggatgtcatt cctcaacttc 1140
cagatcgagc atcacctggt cccttcaatg cccagttcc gccacaagat tatctccccg 1200
cgtgtaaagg ccttggttga gaagcacggt cttgtgtatg atgtgcgccc ctattggggg 1260
gccatggctg acaccttcaa gaacttgaat gacgttgga ctcacgcata tcaactcaag 1320
gcgcactag 1329

<210> 22
<211> 442
<212> Білок
<213> Pyramimonas cordata

<400> 22

Met Gly Lys Gly Gly Asn Ala Ser Ala Pro Thr Ala Lys Lys Glu Val
1 5 10 15

Leu Ile Glu Gly Lys Phe Tyr Asp Val Thr Asp Phe Arg His Pro Gly
20 25 30

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

Lys His Tyr Phe Glu Leu Leu Cys Met Ala Ala Arg Tyr Ala Ser Phe
290 295 300

Ala Ala Leu Phe Ala Pro Lys Tyr Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu
305 310 315 320

Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Val Gly Cys Asn Tyr Ile Phe Ile Asn Phe
325 330 335

Ser Val Ser His Thr His Leu Pro Val Ser Gly Ala Ser Glu Tyr Leu
340 345 350

His Trp Val Val Tyr Ser Ala Ile His Thr Thr Asn Ile Lys Ser Ser
355 360 365

Met Leu Cys Asp Trp Trp Met Ser Phe Leu Asn Phe Gln Ile Glu His
370 375 380

His Leu Phe Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Lys Ile Ile Ser Pro
385 390 395 400

Arg Val Lys Ala Leu Phe Glu Lys His Gly Leu Val Tyr Asp Val Arg
405 410 415

Pro Tyr Trp Gly Ala Met Ala Asp Thr Phe Lys Asn Leu Asn Asp Val
420 425 430

Gly Thr His Ala Ser His Ser Lys Ala His
435 440

<210> 23
<211> 804
<212> ДНК
<213> Pyramimonas cordata

<400> 23
atggcgtcta ttgcgattcc ggctgcgctg gcagggactc ttggttatgt gacgtacaat 60
gtcgcaaac cagatattcc tgcattccgag aaggtgcctg cttactttat gcaggtcgag 120
tattgggggc caacgattgg gaccatcggt tatcttctgt tcatctactt tggtaaacgg 180
attatgcaaa acaggagcca gccgtttggc ctgaagaacg ctatgctggt gtacaacttc 240
tatcagactt tcttcaactc gtactgcata tacctttttg tcacgtcgca ccgcgctcag 300
gggctgaaag tttggggaaa catccccgat atgactgcca acagctgggg gatctcacag 360
gtgatctggc tgcactacaa caacaagtac gttgagctgc tggacacggt cttcatggtc 420
atgcgcaaga agtttgacca gctttcggtc ctgcacattt accatcatac cctgttgatc 480
tggctctggt tcgtggtgat gaaattggag cccgttgggg actgctactt tggctctagc 540

gtcaacacgt ttgtgcacgt cattatgtac tegtactatg gccttgccgc gctcggggtg 600
aattgcttct ggaagaagta cattacgcag attcagatgc tgcagttctg tatctgcgct 660
tcgcactcga tttataccgc ctatgtgcag aacaccgcgt tctggttgcc ttacttgca 720
ctgtgggtga tggggaacat gttcgtgttg ttcgccaact tctatcgcaa gcgtacaag 780
agcaagggtg ccaagaagca gtaa 804

<210> 24
<211> 807
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії
Pyramimonas cordata 5 елонгази в рослинах (версія 1)


<400> 24
atggcctcta tcgtatcccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat 60
gtggctaacc ctgatatccc agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcagggtgag 120
tactggggac ctactatcgg aactattgga tacctctctt tcactactt cggaagcgt 180
atcatgcaga acagatctca acctttcgga ctcaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc 240
taccagacct tcttcaacag ctactgcac tcacttttcg ttacttctca tagggctcag 300
ggacttaagg tttggggaac catccctgat atgactgcta actcttgggg aatctctcag 360
gttatctggc ttactacaa caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatggtg 420
atgaggaaga agttcgacca gctttcttc cttcacatct accaccacac tcttctcatc 480
tggtcatggt tcgtgtttat gaagcttgag cctgttgag attgctaett cggatcttct 540
gttaaacact tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttgaggtt 600
aactgtttct ggaagaagta catcaccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct 660
tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aataccgctt tctggcttcc ttacctcaa 720
ctctgggtta tggggaacat gttcgttctc ttcgccaact tctaccgtaa gaggtacaag 780
tctaagggtg ctaagaagca gtgataa 807

<210> 25
<211> 267
<212> Білок
<213> Pyramimonas cordata

<400> 25

Met Ala Ser Ile Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu Gly Tyr
1 5 10 15

Val Thr Tyr Asn Val Ala Asn Pro Asp Ile Pro Ala Ser Glu Lys Val
20 25 30



Pro Ala Tyr Phe Met Gln Val Glu Tyr Trp Gly Pro Thr Ile Gly Thr
35 40 45

Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Ile Tyr Phe Gly Lys Arg Ile Met Gln Asn
50 55 60

Arg Ser Gln Pro Phe Gly Leu Lys Asn Ala Met Leu Val Tyr Asn Phe
65 70 75 80

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Ser Tyr Cys Ile Tyr Leu Phe Val Thr Ser
85 90 95

His Arg Ala Gln Gly Leu Lys Val Trp Gly Asn Ile Pro Asp Met Thr
100 105 110

Ala Asn Ser Trp Gly Ile Ser Gln Val Ile Trp Leu His Tyr Asn Asn
115 120 125

Lys Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Phe Phe Met Val Met Arg Lys Lys
130 135 140

Phe Asp Gln Leu Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Leu Leu Ile
145 150 155 160

Trp Ser Trp Phe Val Val Met Lys Leu Glu Pro Val Gly Asp Cys Tyr
165 170 175

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

Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val Asn Cys Phe Trp Lys Lys Tyr Ile
195 200 205

Thr Gln Ile Gln Met Leu Gln Phe Cys Ile Cys Ala Ser His Ser Ile
210 215 220

Tyr Thr Ala Tyr Val Gln Asn Thr Ala Phe Trp Leu Pro Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Leu Trp Val Met Val Asn Met Phe Val Leu Phe Ala Asn Phe Tyr Arg
245 250 255

Lys Arg Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Lys Lys Gln
260 265

<210> 26
<211> 1344
<212> ДНК

<213> Pavlova salina

<400> 26

```

atgcctccga ggcgcggcgaa gcagatgggc gcgagcacgg gcgtgcatgc gggcgtcaca      60
gattcgctcg ccttcacgcg caaggatgtc gccgacaggc cggacctcac gatcgtgggt      120
gacagcgtgt acgatgcgaa ggcgttcgcg tccgagcatc cgggtggcgc gcactttgtg      180
tcgctgttcg gcgggcgcga tgccacggag gcgttcattg agtaccaccg gcgcgcctgg      240
cccaagtcgc gcatgtcgcg cttccacgtc ggctctctgg catcgaccga ggagcccgtc      300
gccgcccgat agggctacct ccagctgtgc gctcgcatcg ccaagatggg gccgtcggtc      360
agcagcgggt tcgcgccggc gtcgtactgg gtgaaggccg ggctgacctt cggctccgcg      420
atcgcgctcg aggcgtacat gctgtacgcg ggcaagcgcc tgctcccgtc gatcgtgctc      480
gggtggctgt ttgcgctgat tggcctgaac atccagcacg atgccaacca cggcgcgctc      540
tccaagtcgg cctcggtaaa cctggcgctc ggggtgtgcc aggaactggat cggcgggagc      600
atgatcctct ggctgcagga gcacgttgct atgcaccact tgcacaccaa cgacgttgac      660
aaggaccggy accagaaggc gcacggcgcc ctgcggctca agccgaccga cgcgtggagc      720
ccgatgcaat ggctgcagca cctctacctg ctgcctgggg agacgatgta cgccttcaag      780
ctgctgtttc tcgacatcag cgagctgggt atgtggcggt gggaggcgga gcccatcagc      840
aagctggcgg ggtacctctt catgcctcgt ctgctcctca agctcacctt ctgggcgcgc      900
tttgtcgcgc tgccgctgta cctcgcgcgc agcgtgcaca cggcggtgtg catcgcgggc      960
acggtaatga cggggagcct ctacctcgcc ttcttcttct tcatctcgca caacttcgag      1020
ggcgtggcga gcgtcgacc ggacggcagc atcaccagca tgacgcgcgg gcgcatcctc      1080
ctcaagcggc aggcgagagc ctcgccaac gtggggcgcc cgtgctcgc cagctcaac      1140
ggcggcctca actaccaaact cagcaccac ctcttcccca ggggtgacca cggcttctac      1200
cctcgctcgt cgcggttggg caaggcgag ctcgaggcgc gcggcattga gtacaagcac      1260
taccacacca tatggagcaa cctggcatcc acgctgaggc acatgtacgc gctcggccgc      1320
aggccgcgca gcaaggcgga gtga      1344

```

<210> 27

<211> 1347

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pavlova salina 4 десатурази в рослинах (версія 1)

<400> 27

```

atgccacctt gcgctgctaa gcaaatggga gcttctactg gtgttcatgc tggtgttact      60
gactcttctg ctttcaccag aaaggatggt gctgatagac ctgatctcac catcgttga      120

```

gattctgttt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcacc ctgggtggtg tcatttcggt 180
tctttgttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccatag aagggttggt 240
cctaagtcta gaatgtctag attccacgtt ggatctcttg cttctactga ggaacctgtt 300
gctgctgatg agggatacct tcaactttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtt 360
tcttctggat tcgctcctgc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct tggatctgct 420
atcgctcttg aggcttacat gctttacgct ggaaagagac ttctcccttc tatcggtctt 480
ggatggcttt tcgctcttat cggctctaac atccagcatg atgctaacca tgggtgcttg 540
tctaagtctg cttctgttaa ccttgcctct ggactttgtc aggattggat cggaggatct 600
atgatccttt ggcttcaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacactaa cgatgttgat 660
aaggatcctg atcaaaaggc tcacgggtgt cttagactca agcctactga tgcttggtca 720
cctatgcatt ggcttcagca tctttacctt ttgcctgggt agactatgta cgctttcaag 780
cttttgttcc tcgacatctc tgagcttgtt atgtggcggt gggagggtga gcctatctct 840
aagcttgctg gatacctctt tatgccttct ttgcttctca agcttacctt ctgggctaga 900
ttcggttgctt tgcctcttta ccttgcctct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgctgct 960
actgttatga ctggatcttt ctacctcgct ttcttcttct tcactctcca caacttcgag 1020
ggtgttgctt ctgttggtgc tgatggatct atcacttcta tgactagagg tgctagcttc 1080
cttaagagac aagctgagac ttcttctaac gttggaggac ctcttctgc tactcttaac 1140
ggtggactca actaccaaat tgagcatcac ttgttccta gagttcacca tggattctac 1200
cctagacttg ctctcttgtt taaggctgag cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac 1260
taccctacta tctggtctaa ccttgcctct accctcagac atatgtacgc tcttgaaga 1320
aggcctagat ctaaggctga gtaatga 1347

<210> 28
<211> 447
<212> Билор
<213> Pavlova salina
<400> 28

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

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

Arg Pro Asp Leu Thr Ile Val Gly Asp Ser Val Tyr Asp Ala Lys Ala
35 40 45

Phe Arg Ser Glu His Pro Gly Gly Ala His Phe Val Ser Leu Phe Gly
50 55 60

Gly Arg Asp Ala Thr Glu Ala Phe Met Glu Tyr His Arg Arg Ala Trp
 65 70 75 80
 Pro Lys Ser Arg Met Ser Arg Phe His Val Gly Ser Leu Ala Ser Thr
 85 90 95
 Glu Glu Pro Val Ala Ala Asp Glu Gly Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Arg
 100 105 110
 Ile Ala Lys Met Val Pro Ser Val Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala Ser
 115 120 125
 Tyr Trp Val Lys Ala Gly Leu Ile Leu Gly Ser Ala Ile Ala Leu Glu
 130 135 140
 Ala Tyr Met Leu Tyr Ala Gly Lys Arg Leu Leu Pro Ser Ile Val Leu
 145 150 155 160
 Gly Trp Leu Phe Ala Leu Ile Gly Leu Asn Ile Gln His Asp Ala Asn
 165 170 175
 His Gly Ala Leu Ser Lys Ser Ala Ser Val Asn Leu Ala Leu Gly Leu
 180 185 190
 Cys Gln Asp Trp Ile Gly Gly Ser Met Ile Leu Trp Leu Gln Glu His
 195 200 205
 Val Val Met His His Leu His Thr Asn Asp Val Asp Lys Asp Pro Asp
 210 215 220
 Gln Lys Ala His Gly Ala Leu Arg Leu Lys Pro Thr Asp Ala Trp Ser
 225 230 235 240
 Pro Met His Trp Leu Gln His Leu Tyr Leu Leu Pro Gly Glu Thr Met
 245 250 255
 Tyr Ala Phe Lys Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ser Glu Leu Val Met Trp
 260 265 270
 Arg Trp Glu Gly Glu Pro Ile Ser Lys Leu Ala Gly Tyr Leu Phe Met
 275 280 285
 Pro Ser Leu Leu Leu Lys Leu Thr Phe Trp Ala Arg Phe Val Ala Leu
 290 295 300
 Pro Leu Tyr Leu Ala Pro Ser Val His Thr Ala Val Cys Ile Ala Ala
 305 310 315 320

Thr Val Met Thr Gly Ser Phe Tyr Leu Ala Phe Phe Phe Phe Ile Ser
325 330 335

His Asn Phe Glu Gly Val Ala Ser Val Gly Pro Asp Gly Ser Ile Thr
340 345 350

Ser Met Thr Arg Gly Ala Ser Phe Leu Lys Arg Gln Ala Glu Thr Ser
355 360 365

Ser Asn Val Gly Gly Pro Leu Leu Ala Thr Leu Asn Gly Gly Leu Asn
370 375 380

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

Pro Arg Leu Ala Pro Leu Val Lys Ala Glu Leu Glu Ala Arg Gly Ile
405 410 415

Glu Tyr Lys His Tyr Pro Thr Ile Trp Ser Asn Leu Ala Ser Thr Leu
420 425 430

Arg His Met Tyr Ala Leu Gly Arg Arg Pro Arg Ser Lys Ala Glu
435 440 445

<210> 29
<211> 263
<212> Бинок
<213> Isochrysis galbana

<400> 29

Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
65 70 75 80

Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe
130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly
145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr
165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro
180 185 190

Leu Ile Thr Ala Met Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu
195 200 205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys
210 215 220

Leu Phe Ser Trp Ala Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser
245 250 255

Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
260

<210> 30
<211> 801
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії *Emiliana huxleyi* 9 елонгази в рослинах

<400> 30
atgcttgata gagcttcac tgatgctgct atttgagagc ctgtttctga tcctgagatc 60
cttatcgga ccttctctta ccttttgctt aagcctctcc tcagaaactc tggacttggt 120
gatgagagaa agggagctta ccgtacttct atgatctggt acaacgttgt tcttgctctt 180
ttctctgcta cctctttcta cgttactgct actgctcttg gatgggataa gggaactggt 240
gagtggctta gatctcttac tggtgattct cctcaacaac tttggcagtg cccttctaga 300

gtttgggaca gcaaactctt ctgtggact gctaaagcct tctactactc caagtacgtt 360
gagtaccctg atactgcttg gcttgttctc aagggaaga aggtttcatt cctccaggga 420
ttccatcatt tcggtgctcc atgggatgtt taccttgga tcaggcttaa gaacgaggga 480
gtttggatct tcatgttctt caacagcttc atccacactg ttatgtacac ttactacgga 540
cttactgctg ctggatacaa gatcagagga aagcctatca tcaccgctat gcaaactctt 600
caattcgttg gtggattcgt tcttgtgtgg gactacatca acgttccttg ttccatgct 660
gatgctggac aagttttctc ttgggtgttc aactacgctt atgtgggac tgttttcctt 720
ctttctgccc acttcttcta catggacaac attgctaagg ctaaggctaa aaaggctgtt 780
gctaccagaa aggctcttg a 801

<210> 31
<211> 266
<212> Блок
<213> Emiliana huxleyi

<400> 31

Met Leu Asp Arg Ala Ser Ser Asp Ala Ala Ile Trp Ser Ala Val Ser
1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Lys Pro
20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Arg Lys Gly Ala Tyr Arg
35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Val Leu Ala Leu Phe Ser Ala Thr
50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Lys Gly Thr Gly
65 70 75 80

Glu Trp Leu Arg Ser Leu Thr Gly Asp Ser Pro Gln Gln Leu Trp Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Arg Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Leu Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Lys Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe
130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu Lys Asn Glu Gly

145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Val Met Tyr
165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Lys Pro
180 185 190

Ile Ile Thr Ala Met Gln Ile Ser Gln Phe Val Gly Gly Phe Val Leu
195 200 205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe His Ala Asp Ala Gly Gln
210 215 220

Val Phe Ser Trp Val Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Met Asp Asn Ile Ala Lys Ala Lys Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Val Ala Thr Arg Lys Ala Leu
260 265

<210> 32
<211> 819
<212> ДНК
<213> Pavlova pinguis

<400> 32
atggttgccg caccatcac gctcgagtgg ctgctttcgc cgaagctcaa ggatgcagtg 60
ttcgggtggg aggtgctcta cttctccatt gcctacctgt ttcttgccc cattttgaag 120
cgacccccgt tgggtggacac gcggaagggc gcgtataaga gtggtatgat cgcgtacaac 180
gtgatcatgt gcgtgttctc gctggtgtgc ttcactctgcc agctcgcagc cctgggctat 240
gacatgggct acttgacagtg ggtgcgtgac ctcacagggg acgagattgt cccctctac 300
caggacgtgt ccccgctccc cgccttctcc aacaagctct tcaagtattc gtctattgcc 360
ttccactact ccaagtatgt tgagtacatg gacaccgcat ggctgggtgat gaagggcaag 420
cccgtgtcct tgctccaggg cttccaccac tttggcgccg cctgggacac ctactttggc 480
atcaccttcc agaacgaggg catctacgtg ttcgtggtgc tcaacgcctt catccacacg 540
atcatgtacg cactactacg gccactgcg gcgggtctca agttctcact gaagtctgct 600
atcacgctca tgcagatcac ccaattcaac gtgggcttcg taatggtgta tcactacatc 660
accctggagt acttccgcaa ctcaccggag ctgctcttct cctacctttt caactatgcg 720
tacgttgca cggttctcct cctcttcacg cagttcttct acatggacaa ctttgcaag 780
aagaaggccg ctgccgccgc gggcaagaag aagaagtag 819

```

<210> 33
<211> 272
<212> Билнок
<213> Pavlova pinguis

<400> 33

Met Val Ala Pro Pro Ile Thr Leu Glu Trp Leu Leu Ser Pro Lys Leu
1      5      10     15

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

Leu Phe Leu Ala Pro Ile Leu Lys Arg Thr Pro Leu Val Asp Thr Arg
      35      40     45

Lys Gly Ala Tyr Lys Ser Gly Met Ile Ala Tyr Asn Val Ile Met Cys
      50      55     60

Val Phe Ser Leu Val Cys Phe Ile Cys Gln Leu Ala Ala Leu Gly Tyr
      65      70     75     80

Asp Met Gly Tyr Leu Gln Trp Val Arg Asp Leu Thr Gly Asp Glu Ile
      85      90     95

Val Pro Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe Ser Asn Lys
      100     105    110

Leu Phe Lys Tyr Ser Ser Ile Ala Phe His Tyr Ser Lys Tyr Val Glu
      115     120    125

Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Met Lys Gly Lys Pro Val Ser Leu
      130     135    140

Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr Tyr Phe Gly
      145     150    155    160

Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Ile Tyr Val Phe Val Val Leu Asn Ala
      165     170    175

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

Leu Lys Phe Ser Leu Lys Phe Val Ile Thr Leu Met Gln Ile Thr Gln
      195     200    205

Phe Asn Val Gly Phe Val Met Val Tyr His Tyr Ile Thr Leu Glu Tyr
      210     215    220

```

Phe Arg Asn Ser Pro Glu Leu Val Phe Ser Tyr Leu Phe Asn Tyr Ala
225 230 235 240

Tyr Val Cys Thr Val Leu Leu Leu Phe Met Gln Phe Phe Tyr Met Asp
245 250 255

Asn Phe Gly Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ala Gly Lys Lys Lys Lys
260 265 270

<210> 34
<211> 840
<212> ДНК
<213> Pavlova salina

<400> 34
atggcgactg aagggatgcc ggcgataacg ctggactggc tgctctcgcc cgggctgaag 60
gatgccgtaa ttggcgggga ggtgctctac ttttcgcttg ggtatctgct gctcgagccc 120
atcctcaacg gctcaccgtt tgttgacaag cgcaaggggc cataccgcaa cggcatgac 180
gcgtacaaca tcctcatgtg cgggtttctg ctggtatgct tcgtgtgccg gatggcggcg 240
ctcggccttg atcgcggcca cctgcagttt gtccgcgacc tcacgggcga cagcgtggtg 300
cagctctacc aggacgtgag cccatcccct gcattcgcga acaagctctt ccggtactca 360
gcggtggcgt tccactactc aaagtacgtg gactacatgg acacagcgtg gcttgtgctg 420
aagggaacg ccgtctcgtt cctgcagggc ttccaccact tcggcgccgc gtgggacacc 480
tactttggca tcacgtttca gaacgagggc acctacgtct ttgtgctgct caacgcattc 540
atccacacaa tcatgtacac ctactacggc gcgacggcag cgggcatcaa aatctcgatg 600
aagccgctga tcaccctcat gcagatcacg cagttcctgc tgggcttcgc gctcgtctac 660
ccgtacattg acctcggcta ctccgtgctg tcgcccgcgc tcgtgtggag ctacctgttc 720
aactatgctg acgtactcat ggtgctcttc ctcttcacgc gcttcttcta ccacgacaac 780
tttagcaagc acaagccaat ctgcgcgcat gactccagca accgcatgaa aaccgagtag 840

<210> 35
<211> 279
<212> Білок
<213> Pavlova salina

<400> 35
Met Ala Thr Glu Gly Met Pro Ala Ile Thr Leu Asp Trp Leu Leu Ser
1 5 10 15

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

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

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

<210> 36
 <211> 1284

<212> ДНК
<213> Pavlova salina

<400> 36
atgggacgcg gcggagacag cagtgggcag gcgcatccgg cggcggagct ggcggtcccg 60
agcgaccgcg cggagggtgag caacgctgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc 120
aagcgcgtgg atgtgaccaa gttccaacgc acgcacccgg gtggtagcaa ggtcttcg 180
atcttcagg accgcgatgc gacggagcag ttcgagtcct accactcgaa gcgcgcgatc 240
aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgctc ccgcgcacac gcccttgccc 300
tcccagtcac cgatggggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt 360
tactacgatc catgcccgtc cgatgagctg ttcaagctca gcctcgtgct cctcccgacc 420
tttgcgggca tgtacatgct caaggcgggc gtcggtccc cgctctgcgg cgcctcatg 480
gtgagctttg gctggtacct cgatggctgg ctgcgcacg actatctgca cactccgctc 540
ttcaaggggt ccgtgcacg caccgtcggg tggaacaacg cggcgggcta ctctctcggc 600
ttcgtgcagg ggtatgcggt cgagtgggtg cgcgcgcggc ataacacgca ccacgtgtgc 660
accaatgagg acggctcgga ccccgacatc aaaacggcgc cgctgctcat atacgtgcgc 720
aacaagccga gcatcgccaa gcgcctgaac gccttcacg cctaccagca gtactactat 780
gtgccggtag tggcaatcct cgacctgtac tggcggctcg agtcgatcgc ctacgtcgcg 840
atgcgcctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctgcactcgc tcgcgcacta cgccatcgct 900
gcgtgggtct ttgcgggcaa ctaccacctg ctcccgcctg tgacggttct gcgcggggtt 960
ggcactggga tcaccgtttt cgcgacgcac tacggtgagg acattctcga cgcggaccag 1020
gtgcgtcaca tgacgctcgt cgagcagacg gactcacct cgcgcaacat ctggggcggc 1080
tggctcgtga acgtgctcac cggcttcac tcactgcaga cggagcacca cctgttcccg 1140
atgatgcca ccggcaacct catgactatc cagcccgagg tgcgcgcctt cttcaagaag 1200
cacggacttg agtaccgga gggcaacctc attgagtgcg tgcggcagaa catcgtgcg 1260
cttgattcgc agcacctgct ttga 1284

<210> 37
<211> 427
<212> Білок
<213> Pavlova salina

<400> 37

Met Gly Arg Gly Gly Asp Ser Ser Gly Gln Ala His Pro Ala Ala Glu
1 5 10 15

Leu Ala Val Pro Ser Asp Arg Ala Glu Val Ser Asn Ala Asp Ser Lys
20 25 30

Ala Leu His Ile Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe
35 40 45

Gln Arg Thr His Pro Gly Gly Ser Lys Val Phe Arg Ile Phe Gln Asp
50 55 60

Arg Asp Ala Thr Glu Gln Phe Glu Ser Tyr His Ser Lys Arg Ala Ile
65 70 75 80

Lys Met Met Glu Gly Met Leu Lys Lys Ser Glu Asp Ala Pro Ala Asp
85 90 95

Thr Pro Leu Pro Ser Gln Ser Pro Met Gly Lys Asp Phe Lys Ala Met
100 105 110

Ile Glu Arg His Val Ala Ala Gly Tyr Tyr Asp Pro Cys Pro Leu Asp
115 120 125

Glu Leu Phe Lys Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Thr Phe Ala Gly Met
130 135 140

Tyr Met Leu Lys Ala Gly Val Gly Ser Pro Leu Cys Gly Ala Leu Met
145 150 155 160

Val Ser Phe Gly Trp Tyr Leu Asp Gly Trp Leu Ala His Asp Tyr Leu
165 170 175

His His Ser Val Phe Lys Gly Ser Val Ala Arg Thr Val Gly Trp Asn
180 185 190

Asn Ala Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Phe Val Gln Gly Tyr Ala Val Glu
195 200 205

Trp Trp Arg Ala Arg His Asn Thr His His Val Cys Thr Asn Glu Asp
210 215 220

Gly Ser Asp Pro Asp Ile Lys Thr Ala Pro Leu Leu Ile Tyr Val Arg
225 230 235 240

Asn Lys Pro Ser Ile Ala Lys Arg Leu Asn Ala Phe Gln Arg Tyr Gln
245 250 255

Gln Tyr Tyr Tyr Val Pro Val Met Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Trp Arg
260 265 270

Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Val Ala Met Arg Leu Pro Lys Met Leu Pro
275 280 285

Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Val Ala Trp Val Phe
290 295 300

Ala Gly Asn Tyr His Leu Leu Pro Leu Val Thr Val Leu Arg Gly Phe
305 310 315 320

Gly Thr Gly Ile Thr Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu Asp Ile Leu
325 330 335

Asp Ala Asp Gln Val Arg His Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Leu
340 345 350

Thr Ser Arg Asn Ile Ser Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly
355 360 365

Phe Ile Ser Leu Gln Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr
370 375 380

Gly Asn Leu Met Thr Ile Gln Pro Glu Val Arg Ala Phe Phe Lys Lys
385 390 395 400

His Gly Leu Glu Tyr Arg Glu Gly Asn Leu Ile Glu Cys Val Arg Gln
405 410 415

Asn Ile Arg Ala Leu Ala Phe Glu His Leu Leu
420 425

<210> 38
<211> 116
<212> Вілок
<213> Вірус жовтої кучерявості листя томату

<400> 38

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ser Val Glu Glu Thr Tyr
20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
35 40 45

Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
65 70 75 80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr

85 90 95

Ile Met Asp Val Gln Ala His Val Pro Glu Ala Gln Asn Ile Gln Asn
100 105 110

Val Ser Lys Pro
115

<210> 39
<211> 351
<212> ДНК
<213> Вірус жовтої кучерявості листя томату

<400> 39
atgtgggatac cacttctaaa tgaatttcct gaatctgttc acggatttcg ttgtatgtta 60
gctattaaat atttgacgtc cgttgaggaa acttacgagc ccaatacatt gggccacgat 120
ttaattaggg atcttatatc tgttgtaagg gcccgtagct atgtcgaagc gaccaggcga 180
tataatcatt tccacgccc cctcgaaggt tcgccgaagg ctgaacttcg acagcccata 240
cagcagccgt gctgctgtcc ccattgtcca aggcacaaac aagcgacgat catggacgta 300
caggcccatg taccggaagc ccagaatata cagaatgtat cgaagccctg a 351

<210> 40
<211> 389
<212> Білок
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 40

Met Val Ile Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Leu Leu Phe Phe
1 5 10 15

Ile Ser Gly Leu Ala Val Asn Leu Phe Gln Ala Val Cys Tyr Val Leu
20 25 30

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

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
50 55 60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
65 70 75 80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
85 90 95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
100 105 110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
115 120 125

Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
130 135 140

Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Ser Asp Phe
145 150 155 160

Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
165 170 175

Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
180 185 190

Pro Ile Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
195 200 205

Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
210 215 220

Val Thr Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
225 230 235 240

Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
245 250 255

Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
260 265 270

Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
275 280 285

Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
290 295 300

Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ala Cys Val Leu Thr Leu Gly Ala Ile
305 310 315 320

Lys Phe Leu His Trp Ala Gln Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Thr
325 330 335

Ile Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
340 345 350

Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
355 360 365

Ala Lys Pro Lys Asp Asn His His Pro Glu Ser Ser Ser Gln Thr Glu
370 375 380

Thr Glu Lys Glu Lys
385

<210> 41
<211> 281
<212> Билок
<213> Limnanthes alba

<400> 41

Met Ala Lys Thr Arg Thr Ser Ser Leu Arg Asn Arg Arg Gln Leu Lys
1 5 10 15

Thr Ala Val Ala Ala Thr Ala Asp Asp Asp Lys Asp Gly Ile Phe Met
20 25 30

Val Leu Leu Ser Cys Phe Lys Ile Phe Val Cys Phe Ala Ile Val Leu
35 40 45

Ile Thr Ala Val Ala Trp Gly Leu Ile Met Val Leu Leu Leu Pro Trp
50 55 60

Pro Tyr Met Arg Ile Arg Leu Gly Asn Leu Tyr Gly His Ile Ile Gly
65 70 75 80

Gly Leu Val Ile Trp Leu Tyr Gly Ile Pro Ile Glu Ile Gln Gly Ser
85 90 95

Glu His Thr Lys Lys Arg Ala Ile Tyr Ile Ser Asn His Ala Ser Pro
100 105 110

Ile Asp Ala Phe Phe Val Met Trp Leu Ala Pro Ile Gly Thr Val Gly
115 120 125

Val Ala Lys Lys Glu Val Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Leu Tyr
130 135 140

Thr Leu Ala His His Ile Arg Ile Asp Arg Ser Asn Pro Ala Ala Ala
145 150 155 160

Ile Gln Ser Met Lys Glu Ala Val Arg Val Ile Thr Glu Lys Asn Leu
165 170 175

Ser Leu Ile Met Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Gly Asp Gly Arg Leu
180 185 190

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

Pro Ile Val Pro Met Ile Leu Thr Gly Thr His Leu Ala Trp Arg Lys
210 215 220

Gly Thr Phe Arg Val Arg Pro Val Pro Ile Thr Val Lys Tyr Leu Pro
225 230 235 240

Pro Ile Asn Thr Asp Asp Trp Thr Val Asp Lys Ile Asp Asp Tyr Val
245 250 255

Lys Met Ile His Asp Ile Tyr Val Arg Asn Leu Pro Ala Ser Gln Lys
260 265 270

Pro Leu Gly Ser Thr Asn Arg Ser Lys
275 280

<210> 42
<211> 303
<212> Білок
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 42

Met Ser Val Ile Gly Arg Phe Leu Tyr Tyr Leu Arg Ser Val Leu Val
1 5 10 15

Val Leu Ala Leu Ala Gly Cys Gly Phe Tyr Gly Val Ile Ala Ser Ile
20 25 30

Leu Cys Thr Leu Ile Gly Lys Gln His Leu Ala Gln Trp Ile Thr Ala
35 40 45

Arg Cys Phe Tyr His Val Met Lys Leu Met Leu Gly Leu Asp Val Lys
50 55 60

Val Val Gly Glu Glu Asn Leu Ala Lys Lys Pro Tyr Ile Met Ile Ala
65 70 75 80

Asn His Gln Ser Thr Leu Asp Ile Phe Met Leu Gly Arg Ile Phe Pro
85 90 95

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

Leu Gly Trp Phe Met Ala Leu Ser Gly Thr Tyr Phe Leu Asp Arg Ser
115 120 125

Lys Arg Gln Glu Ala Ile Asp Thr Leu Asn Lys Gly Leu Glu Asn Val

130 135 140

Lys Lys Asn Lys Arg Ala Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Thr Ser Glu Leu Thr Met Leu Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe His
165 170 175

Leu Ala Gln Gln Gly Lys Ile Pro Ile Val Pro Val Val Val Ser Asn
180 185 190

Thr Ser Thr Leu Val Ser Pro Lys Tyr Gly Val Phe Asn Arg Gly Cys
195 200 205

Met Ile Val Arg Ile Leu Lys Pro Ile Ser Thr Glu Asn Leu Thr Lys
210 215 220

Asp Lys Ile Gly Glu Phe Ala Glu Lys Val Arg Asp Gln Met Val Asp
225 230 235 240

Thr Leu Lys Glu Ile Gly Tyr Ser Pro Ala Ile Asn Asp Thr Thr Leu
245 250 255

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

Asn Lys Lys Ile Lys Asn Glu Pro Val Pro Ser Val Ser Ile Ser Asn
275 280 285

Asp Val Asn Thr His Asn Glu Gly Ser Ser Val Lys Lys Met His
290 295 300

<210> 43
<211> 373
<212> Binok
<213> Micromonas pusilla

<400> 43

Met Thr Pro Tyr Gln Trp Phe Asn Val Val Ser Ser Leu Gly Tyr Val
1 5 10 15

Leu Phe Thr Ala Thr Thr Ser Thr Val Thr Met Leu Val Pro Ala Ile
20 25 30

Ile Leu Leu Arg Pro Val Ser Ala Asn Leu Tyr Ala Arg Cys Thr Ser
35 40 45

Trp Ile Phe Ala Cys Trp Trp Thr Ser Cys Leu Phe Ile Thr Glu Arg
50 55 60

Leu Asn Gly Val Lys Val Arg Val Thr Gly Asp Ala Leu Pro Leu Asn
 65 70 75 80
 Ala Pro Leu Leu Ile Met Ser Asn His Lys Cys Asn Leu Asp Trp Met
 85 90 95
 Phe Leu Trp Ser Ser Ala Ile Arg Thr Gly Ser Met Phe His Val Gly
 100 105 110
 Val Phe Lys Ala Val Ala Lys Ser Glu Ile Arg Val Ile Pro Ile Phe
 115 120 125
 Gly Trp Gly Cys Lys Leu Asn Gly Phe Ala Tyr Val Arg Arg Arg Trp
 130 135 140
 Ser Ser Asp Ala Ser His Leu Thr Ser Trp Ile Gln Ser Gln Ile Arg
 145 150 155 160
 Arg Arg Leu Asn Ala Asn Trp Thr Leu Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg
 165 170 175
 Tyr Thr Asp Arg Asn Lys Glu Arg Ser Asp Leu Ser Cys Ala Lys Asp
 180 185 190
 Gly Leu Glu Pro Met Ala Gly Glu Ile Leu Arg Pro Arg Thr Lys Gly
 195 200 205
 Leu Ala Leu Leu Leu Arg Glu Ser Ala Lys Gly Gly Gly Tyr Tyr Arg
 210 215 220
 Lys Ile Val Asp Met Thr Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Asp Gly Lys Pro
 225 230 235 240
 Leu Lys Gly Ala Ala Leu Gly Thr Arg Cys Phe Gly Gln Leu Ala Lys
 245 250 255
 Gly Gln Leu Pro Val Ala Thr Cys His Val His Phe Asp Val Phe Ser
 260 265 270
 His Lys Asp Val Pro Ala Gly Glu Asp Glu Asp Glu Val Glu Ala Trp
 275 280 285
 Val Trp Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ala Asn Met Leu Glu Ala Cys Ala
 290 295 300
 Ser Ala Gly Gln Phe Glu Gly Val Arg Glu Trp Ser Thr Ser Gly Thr
 305 310 315 320



Ala Val Pro Leu Lys Thr Gln Thr Ala Leu Arg Cys Phe Phe Val Leu
325 330 335

Gln Gly Leu Val Cys Val Gly Val Ala Cys Ser Ser Thr Ala Phe Leu
340 345 350

Ala Tyr Val Ala Cys Ala Ala Val Gly Ala Ala Val Ile Ala Gln Thr
355 360 365

Asp Pro Ala Trp Trp
370

<210> 44
<211> 314
<212> Білок
<213> Mortierella alpina

<400> 44

Met Ser Ile Gly Ser Ser Asn Pro Val Leu Leu Ala Ala Ile Pro Phe
1 5 10 15

Val Tyr Leu Phe Val Leu Pro Arg Val Leu Ala Phe Leu Pro Gln Lys
20 25 30

Ala Gln Phe Leu Ala Lys Cys Ile Val Val Leu Ile Ala Thr Leu Ile
35 40 45

Met Ser Val Ala Gly Cys Phe Ile Ser Ile Val Cys Ala Leu Leu Asp
50 55 60

Lys Arg Tyr Val Ile Asn Tyr Val Val Ser Arg Leu Phe Ser Phe Leu
65 70 75 80

Ala Ala Arg Pro Cys Gly Val Thr Tyr Lys Ile Val Gly Glu Glu His
85 90 95

Leu Asp Lys Tyr Pro Ala Ile Val Val Cys Asn His Gln Ser Ser Met
100 105 110

Asp Met Met Val Leu Gly Arg Val Phe Pro Lys His Cys Val Val Met
115 120 125

Ala Lys Lys Glu Leu Leu Tyr Phe Pro Phe Leu Gly Met Phe Met Lys
130 135 140

Leu Ser Asn Ala Ile Phe Ile Asp Arg Lys Asn His Lys Lys Ala Ile
145 150 155 160

Glu Ser Thr Thr Gln Ala Val Ala Asp Met Lys Lys His Asn Ser Gly
165 170 175

Ile Trp Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Leu Asp Lys Ala Asp
180 185 190

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

Leu Pro Ile Leu Pro Ile Ile Ser Gln Gly Tyr Ser His Ile Tyr Asp
210 215 220

Ser Ser Lys Arg Tyr Phe Pro Gly Gly Glu Leu Glu Ile Arg Val Leu
225 230 235 240

Glu Pro Ile Pro Thr Thr Gly Leu Thr Thr Asp Asp Val Asn Asp Leu
245 250 255

Met Asp Lys Thr Arg Asn Leu Met Leu Lys His Leu Lys Glu Met Asp
260 265 270

Ser Gln Tyr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Asn Gly Ser Thr His Ile Asp
275 280 285

Ala Asp Ile Ala Lys Ser Thr Ala Thr Ser Ile Gly Asn Thr Asp Asp
290 295 300

Ala Ile Thr Lys Arg Arg Thr Pro Lys Glu
305 310

<210> 45
<211> 391
<212> Бинок
<213> Braccisa napus

<400> 45

Met Ala Met Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe
1 5 10 15

Phe Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Cys Tyr Val
20 25 30

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

Val Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp
50 55 60

Ala Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asp Glu Thr Phe Asn Arg
65 70 75 80

Met Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile
85 90 95

Asp Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly
100 105 110

Ser Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile
115 120 125

Gly Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp
130 135 140

Ala Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp
145 150 155 160

Phe Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe
165 170 175

Thr Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Gln
180 185 190

Leu Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val
195 200 205

Ser Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met
210 215 220

Thr Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu
225 230 235 240

Phe Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser
245 250 255

Met Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg
260 265 270

Asp Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala
275 280 285

Asp Thr Phe Pro Gly Gln Lys Glu His Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys
290 295 300

Ser Leu Ala Val Val Val Ser Trp Ala Cys Leu Leu Thr Leu Gly Ala
305 310 315 320

Met Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Leu Lys Gly Ile
325 330 335

Ala Leu Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile
340 345 350

Leu Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Ala
355 360 365

Pro Ala Lys Pro Lys Asp Lys His Gln Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
370 375 380

Glu Val Glu Glu Lys Gln Lys
385 390

<210> 46

<211> 390

<212> Білок

<213> Braccisa napus

<400> 46

Met Ala Met Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe Phe
1 5 10 15

Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Ile Cys Tyr Val Leu
20 25 30

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

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
50 55 60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
65 70 75 80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
85 90 95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
100 105 110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
115 120 125

Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
130 135 140

Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp Phe

145 150 155 160

Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
165 170 175

Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
180 185 190

Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
195 200 205

Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
210 215 220

Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
225 230 235 240

Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
245 250 255

Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
260 265 270

Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
275 280 285

Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
290 295 300

Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ser Cys Leu Leu Ile Leu Gly Ala Met
305 310 315 320

Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Ala
325 330 335

Phe Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
340 345 350

Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
355 360 365

Ala Lys Pro Lys Asp Asn His Asn Asp Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
370 375 380

Glu Val Glu Lys Gln Lys
385 390

<210> 47

```

<211> 361
<212> Білок
<213> Phytophthora infestans

<400> 47

Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys
1      5      10     15

Arg Ser Leu Pro Lys Asp Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu
20     25     30

Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Phe Gly
35     40     45

Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu
50     55     60

Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gln Gly Ile Val Phe
65     70     75     80

Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser
85     90     95

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

Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His
115    120    125

Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg
130    135    140

Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly
145    150    155    160

Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val
165    170    175

Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala
180    185    190

Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile
195    200    205

Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr
210    215    220

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

```



His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr
245 250 255

Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu
260 265 270

Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu
275 280 285

Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe
290 295 300

His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile
305 310 315 320

Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val
325 330 335

Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr
340 345 350

Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr
355 360

<210> 48
<211> 418
<212> Білок
<213> Thalassiosira pseudonana

<400> 48

Met Tyr Arg Leu Thr Ser Thr Phe Leu Ile Ala Leu Ala Phe Ser Ser
1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Phe Ser Pro Gln Arg Pro Pro Arg Thr Ile Thr Lys
20 25 30

Ser Lys Val Gln Ser Thr Val Leu Pro Ile Pro Thr Lys Asp Asp Leu
35 40 45

Asn Phe Leu Gln Pro Gln Leu Asp Glu Asn Asp Leu Tyr Leu Asp Asp
50 55 60

Val Asn Thr Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ile Met Lys Met Leu Pro Lys
65 70 75 80

Glu Thr Phe Asn Ile Asp Thr Ala Thr Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Met
85 90 95



```

Asp Met Ala Ala Val Val Ser Ser Met Thr Leu Leu Asn Ala Ile Val
      100                      105                      110

Thr Ser Asp Gln Tyr His Ala Leu Pro Leu Pro Leu Gln Ala Ala Thr
      115                      120                      125

Val Ile Pro Phe Gln Leu Leu Ala Gly Phe Ala Met Trp Cys Met Trp
      130                      135                      140

Cys Ile Gly His Asp Ala Gly His Ser Thr Val Ser Lys Thr Lys Trp
      145                      150                      155                      160

Ile Asn Arg Val Val Gly Glu Val Ala His Ser Val Val Cys Leu Thr
      165                      170                      175

Pro Phe Val Pro Trp Gln Met Ser His Arg Lys His His Leu Asn His
      180                      185                      190

Asn His Ile Glu Lys Asp Tyr Ser His Lys Trp Tyr Ser Arg Asp Glu
      195                      200                      205

Phe Asp Asp Ile Pro Gln Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Tyr Asn Pro Arg
      210                      215                      220

Met Met Gln Leu Pro Phe Leu Tyr Phe Met Tyr Leu Ala Leu Gly Ile
      225                      230                      235                      240

Pro Asp Gly Gly His Val Val Phe Tyr Gly Arg Met Trp Glu Gly Val
      245                      250                      255

Ser Leu Gln Lys Lys Phe Asp Ala Ala Ile Ser Val Ala Val Ser Cys
      260                      265                      270

Ala Thr Ala Gly Ser Leu Trp Met Asn Met Gly Thr Ala Asp Phe Thr
      275                      280                      285

Val Val Cys Met Val Pro Trp Leu Val Leu Ser Trp Trp Leu Phe Met
      290                      295                      300

Val Thr Tyr Leu Gln His His Ser Glu Asp Gly Lys Leu Tyr Thr Asp
      305                      310                      315                      320

Glu Thr Phe Thr Phe Glu Lys Gly Ala Phe Glu Thr Val Asp Arg Ser
      325                      330                      335

Tyr Gly Lys Leu Ile Asn Arg Met Ser His His Met Met Asp Gly His
      340                      345                      350

```

Val Val His His Leu Phe Phe Glu Arg Val Pro His Tyr Arg Leu Glu
355 360 365

Ala Ala Thr Glu Ala Leu Val Lys Gly Met Asp Glu Thr Gly Gln Lys
370 375 380

His Leu Tyr Lys Tyr Ile Asp Thr Pro Asp Phe Asn Ala Glu Ile Val
385 390 395 400

Asn Gly Phe Arg Asp Asn Trp Phe Leu Val Glu Glu Glu Asn Ile Lys
405 410 415

Arg Glu

<210> 49
<211> 363
<212> Бинок
<213> Pythium irregulare

<400> 49

Met Ala Ser Thr Ser Ala Ala Gln Asp Ala Ala Pro Tyr Glu Phe Pro
1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Ile Lys Arg Ala Leu Pro Ser Glu Cys Phe Glu Ala
20 25 30

Ser Val Pro Leu Ser Leu Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser Leu Ala Leu Ala
35 40 45

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

Gln Ala Asn Ala Leu Leu Asp Ala Thr Leu Cys Thr Gly Tyr Val Leu
65 70 75 80

Leu Gln Gly Ile Val Phe Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Cys
85 90 95

Gly His Gly Ala Phe Ser Arg Ser His Val Leu Asn Phe Ser Val Gly
100 105 110

Thr Leu Met His Ser Ile Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu
115 120 125

Ser His Arg His His His Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Lys Asp Glu
130 135 140

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

Leu Val Met Ser Leu Gly Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Leu Phe Ala Gly
165 170 175

Phe Pro Pro Arg Thr Met Asn His Phe Asn Pro Trp Glu Ala Met Tyr
180 185 190

Val Arg Arg Val Ala Ala Val Ile Ile Ser Leu Gly Val Leu Phe Ala
195 200 205

Phe Ala Gly Leu Tyr Ser Tyr Leu Thr Phe Val Leu Gly Phe Thr Thr
210 215 220

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

Val Val Thr Thr Phe Leu His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr
245 250 255

Ala Asp Ser Glu Trp Thr Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp
260 265 270

Arg Ser Tyr Gly Ala Leu Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr
275 280 285

His Gln Ile His His Leu Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Asn
290 295 300

Asp Ala Thr Ala Ala Phe Ala Lys Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys
305 310 315 320

Asn Ala Ala Pro Ile Ile Pro Thr Phe Phe Arg Met Ala Ala Met Tyr
325 330 335

Ala Lys Tyr Gly Val Val Asp Thr Asp Ala Lys Thr Phe Thr Leu Lys
340 345 350

Glu Ala Lys Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Ser
355 360

<210> 50

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 50
gcgaagcaca tcgagtcac 18

<210> 51
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 51
ggttgagggtg gtagctgagg 20

<210> 52
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотидний праймер

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = Hex

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> N = Zen

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> N = 3IABkFQ

<400> 52
ntctctacnc cgtctcacat gacgcn 26

<210> 53
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотидний праймер


<400> 53
atacaagcac ggtggatgg 19

<210> 54
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 54
tggcttaaca ggtctaggag ga 22

<210> 55
<211> 29



```

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотидний праймер

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = FAM

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> N = Zen

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> N = 3IABkFQ

<400> 55
ntggcaaaga ngatttcgag cttcctgcn 29

<210> 56
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 56
сааgсaccgt agtaagagag са 22

<210> 57
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 57
сagасagcct gaggttagса 20

<210> 58
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотидний праймер


<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = FAM

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> N = Zen

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> N = 3IABkFQ

<400> 58
ntccccactt ncttagcgaa aggaacgan 29

```



ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Екстрагований рослинний ліпід, що містить жирні кислоти в естерифікованій формі, які містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які містять лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які містять α-ліноленову кислоту (АЛК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозопентаєнової кислоти (ЕПК), докозопентаєнової кислоти (ДПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), при цьому рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від

10

близько 2 до 16 %, і рівень міристинової кислоти (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менш ніж 1 %, причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить:

а) від 20,1 до 30 % або

5 б) від 30 до 35 %.

2. Ліпід за п. 1, який **відрізняється** тим, що має одну або більше з наступних ознак:

i) рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 2 до 15 % або від близько 3 до близько 10 %,

10 ii) рівень міристинової кислоти (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить близько 0,1 %,

iii) рівень олеїнової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 1 до близько 30 %, від близько 3 до близько 30 %, від близько 6 до близько 30 %, від 1 до близько 20 %, від близько 30 до близько 60 %, від близько 45 до близько 60 % або від близько 15 до близько 30 %,

15 iv) рівень лінолевої кислоти (ЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 до близько 35 %, від близько 4 до близько 20 %, від близько 4 до 17 % або від близько 5 до близько 10 %,

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

vi) рівень γ -ліноленої кислоти (ГЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше 4 %, менше ніж близько 3 %, менше ніж близько 2 %, менше ніж близько 1 %, менше ніж близько 0,5 %, від 0,05 до 7 %, від 0,05 до 4 %, від 0,05 до близько 3 % або від 0,05 до близько 2 %, 25

vii) рівень стеаринової кислоти (СДК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше ніж близько 10 %, менше ніж близько 8 %, менше ніж близько 7 %, менше ніж близько 6 %, менше ніж близько 4 %, менше ніж близько 3 %, від близько 0,05 до близько 7 %, від близько 0,05 до близько 6 %, від близько 0,05 до близько 4 %, від близько 0,05 до близько 3 %, від 0,05 до близько 10 % або від 0,05 до близько 2 %, 30

viii) рівень ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше ніж близько 6 %, менше ніж близько 5 %, менше ніж близько 4 %, менше ніж близько 1 %, менше ніж близько 0,5 %, від близько 0,05 до близько 6 %, від близько 0,05 до близько 5 %, від близько 0,05 до близько 4 %, від близько 0,05 до близько 3 % або від 0,05 до близько 2 %, 35

ix) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕТрК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше ніж 4 %, менше ніж близько 2 %, менше ніж близько 1 %, від 0,05 до 4 %, від 0,05 до 3 % або від 0,05 до близько 2 %, або від 0,05 до близько 1 %, 40

x) рівень ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 до 15 %, менше ніж 4 %, менше ніж близько 3 %, менше ніж близько 2 %, від 0,05 до 10 %, від 0,05 до 5 %, від 0,05 до близько 3 % або від 0,05 до близько 2 %, 45

xi) при рівні ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду від 20,1 до 30 % або від 20,1 до 35 % рівень докозапентаєнової кислоти (ДПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше ніж 4 %, менше ніж близько 3 %, менше ніж близько 2 %, від 0,05 до 8 %, від 0,05 до 5 %, від 0,05 до близько 3 %, від 5 до 15 %, від 5 до 10 або від 0,05 до близько 2 %, 50

xii) рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20,1 до 29 %, від 20,1 до 28 %, від 20,1 до близько 27 %, від 20,1 до близько 26 %, від 20,1 до близько 25 %, від 20,1 до близько 24 %, від 21 до 35 %, від 21 до 30 %, від 21 до 28 %, від 21 до близько 26 % або від 21 до близько 24 %, 55

xiii) ліпід містить ω 6-докозапентаєнову кислоту (22:5 ^{Δ 4,7,10,13,16}) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xiv) ліпід містить менше ніж 0,1 % ω 6-докозапентаєнової кислоти (22:5 ^{Δ 4,7,10,13,16}) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xv) ліпід містить менше ніж 0,1 % однієї або більше або всіх із СДК, ЕПК і ЕТК серед жирних кислот, що містяться в ньому, 60

xvi) рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 до близько 25 %, від близько 4 до близько 20 %, від близько 6 до близько 20 %, від близько 6 до близько 12 %, 65

xvii) рівень загальних мононенасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 4 до близько 40 %, від близько 4 до близько 35 %, 70

- від близько 8 до близько 25 %, від 8 до близько 22 %, від близько 15 до 40 % або від близько 15 до близько 35 %, xviii) рівень загальних поліненасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 20 до близько 75 %, від 30 до 75 % або від близько 50 до близько 75 %, близько 60 %, близько 65 %, близько 70 %, близько 75 % або від близько 60 до близько 75 %, 5
- xix) рівень загальних $\omega 6$ жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 35 до близько 50 %, від близько 20 до близько 35 %, від близько 6 до 20 %, менше ніж 20 %, менше ніж близько 16 %, менше ніж близько 10 %, від близько 1 до близько 16 %, від близько 2 до близько 10 % або від близько 4 до 10 %, 10
- xx) рівень нових $\omega 6$ жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше ніж близько 10 %, менше ніж близько 8 %, менше ніж близько 6 %, менше ніж 4 %, від близько 1 до близько 20 %, від близько 1 до близько 10 %, від 0,5 до близько 8 % або від 0,5 до 4 %, 15
- xxi) рівень загальних $\omega 3$ жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 36 до близько 65 %, від 36 до близько 70 %, від 40 до близько 60 %, від близько 30 до близько 60 %, від близько 35 до близько 60 %, від 40 до близько 65 %, від близько 30 до близько 65 % або від 35 до близько 65 %, 20
- xxii) рівень нових $\omega 3$ жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 21 до близько 45 %, від близько 21 до близько 35 %, від близько 23 до близько 35 %, від близько 25 до близько 35 % або від близько 27 до близько 35 %, 25
- xxiii) співвідношення загальних $\omega 6$ жирних кислот: загальних $\omega 3$ жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 1,0 до близько 3,0, від близько 0,1 до близько 1, від близько 0,1 до близько 0,5, менше ніж близько 0,50, менше ніж близько 0,40, менше ніж близько 0,30, менше ніж близько 0,20, менше ніж близько 0,15 або від близько 0,10 до близько 0,4, 25
- xxiv) співвідношення нових $\omega 6$ жирних кислот: нових $\omega 3$ жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 1,0 до близько 3,0, від близько 0,02 до близько 0,1, від близько 0,1 до близько 1, від близько 0,1 до близько 0,5, менше ніж близько 0,50, менше ніж близько 0,40, менше ніж близько 0,30, менше ніж близько 0,20 або менше ніж близько 0,15, 30
- xxv) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією $\Delta 12$ -десатурази щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 80 %, від близько 60 до близько 98 %, від близько 70 до близько 95 % або від близько 75 до близько 90 %, 35
- xxvi) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення АЛК на СДК під дією $\Delta 6$ -десатурази щонайменше близько 30 %, щонайменше близько 40 %, щонайменше близько 50 %, щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, від близько 30 до близько 70 %, від близько 35 до близько 60 % або від 50 до близько 70 %, 40
- xxvii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення СДК на кислоту ЕТК під дією $\Delta 6$ -елонгази щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 75 %, від близько 60 до близько 95 %, від близько 70 до близько 88 % або від близько 75 до близько 85 %, 45
- xxviii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ЕТК на ЕПК під дією $\Delta 5$ -десатурази щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 75 %, від близько 60 до близько 99 %, від близько 70 до близько 99 % або від близько 75 до близько 98 %, 50
- xxix) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ЕПК на ДПК під дією під дією $\Delta 5$ -елонгази щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 85 %, щонайменше близько 90 %, від близько 50 до близько 99 %, від близько 85 до близько 99 %, від близько 50 до близько 95 % або від близько 85 до близько 95 %, 55
- xxx) при рівні ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду від 20,1 до 30 % або від 20,1 до 35 % склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ДПК на ДГК під дією $\Delta 4$ -десатурази щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, щонайменше близько 93 %, від близько 50 до близько 95 %, від близько 80 до близько 95 % або від близько 85 до близько 95 %, 55
- xxxi) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДПК та/або ДГК щонайменше близько 10 %, щонайменше близько 15 %, щонайменше близько 20 %, щонайменше близько 25 %, від близько 10 до близько 50 %, від близько 10 до близько 30 %, від близько 10 до близько 25 % або від близько 20 до близько 30 %, 55

- xxxii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ЛК на ДПК та/або ДГК щонайменше близько 15 %, щонайменше близько 20 %, щонайменше близько 22 %, щонайменше близько 25 %, щонайменше близько 30 %, щонайменше близько 40 %, від близько 15 до близько 50 %, від близько 20 до близько 40 % або від близько 20 до близько 30 %, 5
- xxxiii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення АЛК на ДПК та/або ДГК щонайменше близько 17 %, щонайменше близько 22 %, щонайменше близько 24 %, щонайменше близько 30 %, від близько 22 до близько 70 %, від близько 17 до близько 55 %, від близько 22 до близько 40 % або від близько 24 до близько 40 %, 10
- xxxiv) загальні жирні кислоти в екстрагованому ліпіді містять менше ніж 1,5 % C20:1, менш ніж 1 % C20:1 або близько 1 % C20:1, 10
- xxxv) вміст триацилгліцеролу (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, щонайменше 95 %, від близько 70 до близько 99 % або від близько 90 до близько 99 %, 15
- xxxvi) ліпід містить діацилгліцерол (ДАГ), причому ДАГ містить ДПК та/або ДГК; 15
- xxxvii) ліпід містить менше ніж близько 10 %, менше ніж близько 5 %, менше ніж близько 1 % або від близько 0,001 до близько 5 % вільних (неестерифікованих) жирних кислот та/або фосфоліпиду, 15
- xxxviii) щонайменше 70 %, щонайменше 72 або щонайменше 80 % естерифікованої ДГК та/або ДПК у формі ТАГ знаходиться в положенні *sn*-1 або *sn*-3 ТАГ, 20
- xxxix) в ліпіді найпоширенішими видами ТАГ, що містять ДГК, є ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12), 20
- xl) в ліпіді найпоширенішими видами ТАГ, що містять ДГК, є ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 56:12), 20
- xli) ліпід містить три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18). 20
3. Ліпід за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що є олією з олійної культури.
4. Ліпід за п. 3, який **відрізняється** тим, що містить або є олією виду *Brassica sp.*, такою як 25
- Brassica napus* олія або *Brassica juncea* олія, *Gossypium hirsutum* олія, *Linum usitatissimum* олія, *Helianthus sp.* олія, *Carthamus tinctorius* олія, *Glycine max* олія, *Zea mays* олія, *Elaeagnus guineensis* олія, *Nicotiana glauca* олія, *Lupinus angustifolius* олія, *Camelina sativa* олія, *Crambe abyssinica* олія, *Miscanthus x giganteus* олія або *Miscanthus sinensis* олія.
5. Спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпиду, який включає стадії, на яких: 30
- i) одержують частину рослини, що містить ліпід, який містить жирні кислоти в естерифікованій формі, при цьому жирні кислоти містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які містять лінолеву кислоту (ЛК) та γ-ліноленову кислоту (ГЛК), ω3 жирні кислоти, які містять α-ліноленову кислоту (АЛК), стеаридонову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і одну або більше з ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), причому рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 2 до 16 %, і рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше ніж 1 %, причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот ліпиду, що екстрагується, у частині рослини становить: 35
- a) від 20,1 до 30 % або 40
- b) від 30 до 35 %, і
- ii) екстрагують ліпід із частини рослини, при цьому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить: 40
- a) від 20,1 до 30 % або 45
- b) від 30 до 35 %.
6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що екстрагований ліпід має одну або більше ознак, визначених у п. 2 або 3.
7. Спосіб за п. 5 або 6, який **відрізняється** тим, що частина рослини містить екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів: 50
- i) ω3-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза, 50
- ii) Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза, 50
- iii) Δ12-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза, 50
- iv) Δ12-десатураза, ω3-десатураза та/або Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-елонгаза і Δ5-елонгаза, 50
- v) ω3-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза, 55
- vi) Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза, 55
- vii) Δ12-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза і Δ5-елонгаза, 55
- viii) Δ12-десатураза, ω3-десатураза та/або Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-елонгаза та Δ5-елонгаза, 55

- ix) ω 3-десатураза або Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,
 x) ω 3-десатураза або Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,
 5 xi) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза або Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-елонгаза та Δ 5-елонгаза, або
 xii) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза або Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-елонгаза та Δ 5-елонгаза,
 причому кожен полінуклеотид функціонально зв'язаний з одним або більше промоторів, які
 10 регулюють експресію вказаних полінуклеотидів в клітині частини рослини.
 8. Спосіб за п. 7, який **відрізняється** тим, що частина рослини має одну або більше, або всі з наступних ознак:
 i) Δ 12-десатураза перетворює олеїнову кислоту на лінолеву кислоту в одній або більше клітинах частини рослини з ефективністю щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 80 %, від близько 60 до близько 95 %, від близько 70 до близько 90 % або від 75 до близько 85 %,
 15 ii) ω 3-десатураза перетворює ω 6 жирні кислоти на ω 3 жирні кислоти в одній або більше клітинах частини рослини з ефективністю щонайменше близько 65 %, щонайменше близько 75 %, щонайменше близько 85 %, від близько 65 до близько 95 %, від близько 75 до близько 91 % або від близько 80 до близько 91 %,
 20 iii) Δ 6-десатураза перетворює АЛК на СДК в одній або більше клітинах частини рослини з ефективністю щонайменше близько 20 %, щонайменше близько 30 %, щонайменше близько 40 %, щонайменше близько 50 %, щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, від близько 30 до близько 70 %, від близько 35 до близько 60 % або від близько 50 до близько 70 %,
 25 iv) Δ 6-десатураза перетворює лінолеву кислоту на γ -ліноленову кислоту в одній або більше клітинах частини рослини з ефективністю менше ніж близько 5 %, менше ніж близько 2,5 %, менше ніж близько 1 %, від близько 0,1 до близько 5 %, від близько 0,5 до близько 2,5 % або від близько 0,5 до близько 1 %,
 30 v) Δ 6-елонгаза перетворює СДК на ЕТК в одній або більше клітинах частини рослини з ефективністю щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 75 %, від близько 60 до близько 95 %, від близько 70 до близько 80 % або від близько 75 до близько 80 %,
 vi) Δ 5-десатураза перетворює ЕТК на ЕПК в одній або більше клітинах частини рослини з ефективністю щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 75 %, щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, від близько 60 до близько 95 %, від близько 70 до близько 95 % або від близько 75 до близько 95 %,
 35 vii) Δ 5-елонгаза перетворює ЕПК на ДПК в одній або більше клітинах частини рослини з ефективністю щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 85 %, щонайменше близько 90 %, від близько 50 до близько 90 % або від близько 85 до близько 95 %,
 40 viii) Δ 4-десатураза перетворює ДПК на ДГК в одній або більше клітинах частини рослини з ефективністю щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, щонайменше близько 93 %, від близько 50 до близько 95 %, від близько 80 до близько 95 % або від близько 85 до близько 95 %,
 45 ix) ефективність перетворення олеїнової кислоти на ДГК та/або ДПК в одній або більше клітинах частини рослини становить щонайменше близько 10 %, щонайменше близько 15 %, щонайменше близько 20 %, щонайменше близько 25 %, від близько 10 до близько 50 %, від близько 10 до близько 30 %, від близько 10 до близько 25 % або від близько 20 до близько 30 %,
 50 x) ефективність перетворення ЛК на ДГК або ДПК в одній або більше клітинах частини рослини становить щонайменше близько 15 %, щонайменше близько 20 %, щонайменше близько 22 %, щонайменше близько 25 %, щонайменше близько 30 %, від близько 15 до близько 50 %, від близько 20 до близько 40 % або від близько 20 до близько 30 %,
 xi) ефективність перетворення АЛК на ДГК або ДПК в одній або більше клітинах частини рослини становить щонайменше близько 17 %, щонайменше близько 22 %, щонайменше близько 24 %, щонайменше близько 30 %, від близько 17 до близько 55 %, від близько 22 до близько 35 % або від близько 24 до близько 35 %,
 55 xii) одна або більше клітин частини рослини містять щонайменше близько на 25 %, щонайменше близько 30 %, від близько 25 до близько 40 % або від близько 27,5 до близько 37,5 % більше ω 3 жирних кислот, ніж відповідні клітини без екзогенних полінуклеотидів,
 60

- xiii) $\Delta 6$ -десатураза переважно здійснює десатурацію α -ліноленової кислоти (АЛК) відносно лінолевої кислоти (ЛК),
xiv) $\Delta 6$ -елонгаза також має активність $\Delta 9$ -елонгази,
xv) $\Delta 12$ -десатураза також має активність $\Delta 15$ -десатурази,
5 xvi) $\Delta 6$ -десатураза також має активність $\Delta 8$ -десатурази,
xvii) $\Delta 8$ -десатураза також має активність $\Delta 6$ -десатурази або не має активність $\Delta 6$ -десатурази,
xviii) $\Delta 15$ -десатураза також має активність $\omega 3$ -десатурази відносно ГЛК,
xix) $\omega 3$ -десатураза також має активність $\Delta 15$ -десатурази відносно ЛК,
xx) $\omega 3$ -десатураза здійснює десатурацію ЛК та/або ГЛК,
10 xxi) $\omega 3$ -десатураза переважно здійснює десатурацію ГЛК відносно ЛК,
xxii) одна або більше або всі десатурази виявляють вищу активність на субстраті ацил-КоА, ніж на відповідному субстраті ацил-ФХ,
xxiii) $\Delta 6$ -десатураза має вищу активність $\Delta 6$ -десатурази відносно АЛК, ніж ЛК як жирнокислотного субстрату,
15 xxiv) $\Delta 6$ -десатураза має вищу активність $\Delta 6$ -десатурази відносно АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж відносно АЛК, приєднаної до положення *sn*-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,
xxv) $\Delta 6$ -десатураза має щонайменше в 2 рази вищу активність $\Delta 6$ -десатурази, щонайменше в 3 рази вищу активність, щонайменше в 4 рази вищу активність або щонайменше в 5 разів вищу активність відносно АЛК як субстрату, в порівнянні з ЛК,
20 xxvi) $\Delta 6$ -десатураза має вищу активність відносно АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж відносно АЛК, приєднаної до положення *sn*-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,
xxvii) $\Delta 6$ -десатураза має щонайменше близько в 5 разів вищу активність $\Delta 6$ -десатурази або щонайменше в 10 разів вищу активність відносно АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж відносно АЛК, приєднаної до положення *sn*-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,
25 xxviii) десатураза являє собою фронт-енд десатурази,
xxix) $\Delta 6$ -десатураза не має активності $\Delta 5$ -десатурази, що піддавалася б виявленню, відносно ЕТК.
9. Спосіб за п. 7 або 8, який **відрізняється** тим, що екзогенні полінуклеотиди ковалентно з'єднані в молекулу ДНК, інтегровану в геном клітин частини рослини.
- 30 10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що кількість молекул ДНК, інтегрованих в геном клітин частини рослини дорівнює не більше одиниці, не більше двох або трьох, або дорівнює двом або трьом.
11. Спосіб за п. 9 або 10, який **відрізняється** тим, що молекула ДНК є молекулою Т-ДНК.
- 35 12. Спосіб за будь-яким із пп. 5-9, який **відрізняється** тим, що загальний вміст олії в частині рослини, що містить екзогенні полінуклеотиди, становить щонайменше близько 40 %, щонайменше близько 50 %, щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, від близько 50 до близько 80 % або від близько 80 до близько 100 % від загального вмісту олії у відповідній частині рослини, у якій відсутні екзогенні полінуклеотиди.
- 40 13. Спосіб за будь-яким із пп. 5-12, який додатково включає стадію, на якій обробляють ліпід для підвищення відсоткового рівня ДГК відносно загального рівня вмісту жирних кислот, причому обробка включає одне або більше із фракціонування, перегонки або переестерифікації, такої як одержання метилових або етилових ефірів ДГК.
14. Олійна рослина або її частина, що містить:
- 45 а) ліпід в її насінні, який містить жирні кислоти в естерифікованій формі, і
б) екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів:
- i) $\Delta 12$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза та/або $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 6$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза, або
ii) $\Delta 12$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза та/або $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 4$ -десатураза, $\Delta 9$ -елонгаза і $\Delta 5$ -елонгаза,
50 при цьому кожен полінуклеотид функціонально зв'язаний з одним або більше специфічних до насіння промоторів, які регулюють експресію вказаних полінуклеотидів в насінні рослини, що вирощують, причому жирні кислоти містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, $\omega 6$ жирні кислоти, які містять лінолеву кислоту (ЛК) і α -ліноленову кислоту (ГЛК), $\omega 3$ жирні кислоти, які містять α -ліноленову кислоту (АЛК), стеаридонову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК) і докозагексаєнову кислоту (ДГК), і один або більше з ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) та ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), причому рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот ліпиду в насінні становить:
- 55 а) від 20,1 до 30 % або
б) від 30 до 35 %,

і при цьому рівень пальмітинової кислоти у загальному вмісті жирних кислот ліпиду становить від близько 2 до 16 %, і при цьому рівень міристинової кислоти (C14:0) у загальному вмісті жирних кислот ліпиду становить менше ніж 1 %.

15. Частина олійної рослини, що має одну або більше із наступних ознак:

5 і) одержана із олійної рослини за п. 14, або

ii) містить ліпід за будь-яким із пп. 1-3.

16. Частина рослини за п. 14 або 15, яка є насінням.

17. Трансгенне зібране зріле насіння *Brassica napus*, *B. juncea* або *Camelina sativa*, що містить ліпід, за будь-яким із пп. 1-3 та вологу від близько 4 до близько 15 % мас., від близько 6 до
10 близько 8 % мас. або від близько 4 до близько 8 % мас., причому вміст ДГК у вказаному насінні становить щонайменше близько 28 мг на грам насіння, щонайменше близько 32 мг на грам насіння, щонайменше близько 36 мг на грам насіння, щонайменше близько 40 мг на грам насіння, щонайменше близько 44 мг на грам насіння, щонайменше близько 48 мг на грам насіння або щонайменше близько 72 мг на грам насіння, або від близько 30 мг до близько 80 мг
15 на грам насіння.

18. Спосіб одержання рослини, яка містить ліпід за будь-яким із пп. 1-3, який включає стадії, на яких:

20 а) здійснюють кількісне визначення рівня ДГК в ліпіді, продукованому однією або більшою кількістю частин рослини від множини рослин, причому кожна рослина містить один або більше екзогенних полінуклеотидів, що кодують один із наступних наборів ферментів;

i) ω 3-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

ii) Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

iii) Δ 12-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

25 iv) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза або Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 6-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

v) ω 3-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

vi) Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

vii) Δ 12-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза, або

30 viii) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза або Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 4-десатураза, Δ 9-елонгаза і Δ 5-елонгаза,

причому кожен полінуклеотид функціонально зв'язаний з одним або більше промоторами, які регулюють експресію вказаних полінуклеотидів у клітині частини рослини, і

35 б) ідентифікують із множини рослин рослину, яка містить ліпід за будь-яким із пп. 1-3 в одній або більше його частин, і

в) одержують потомство рослин від ідентифікованої рослини або їх насіння.

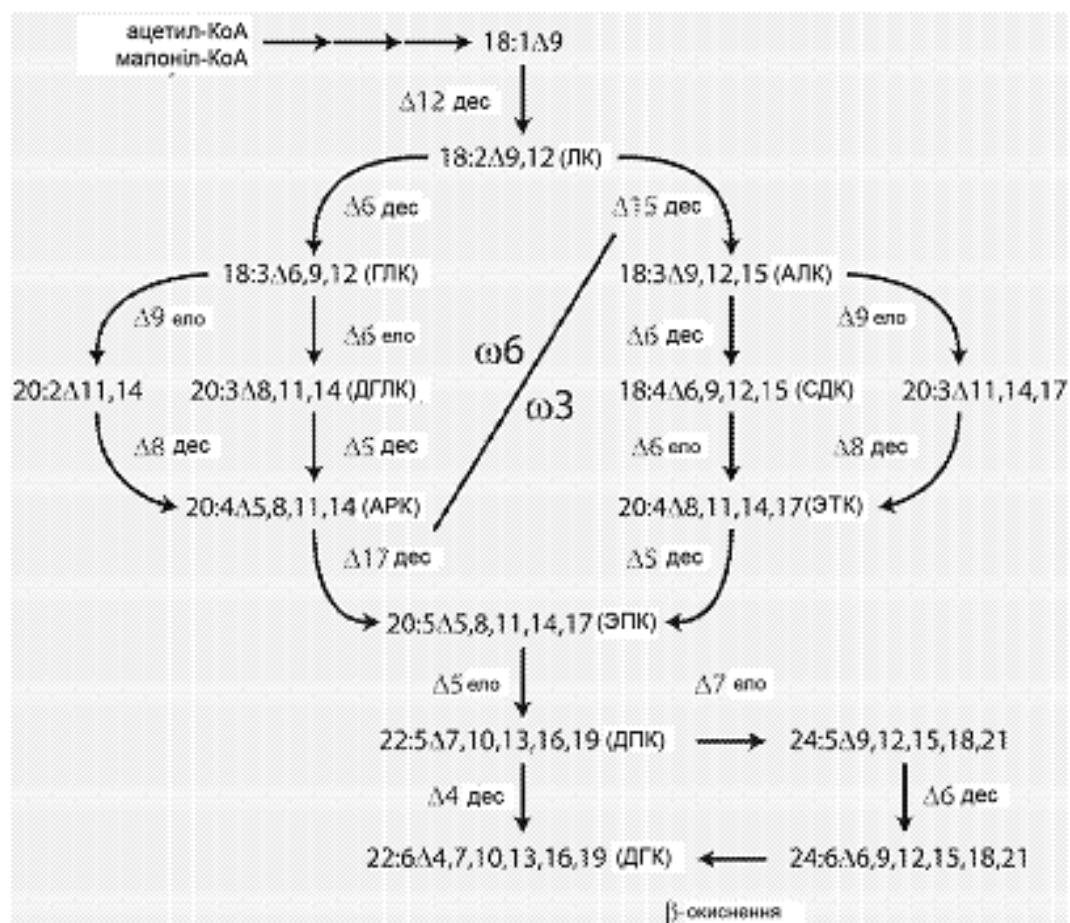
19. Олійна рослина або її частина за пп. 14-15, або вирощене насіння за будь-яким із пп. 16-17, які містять олію за п. 2 або 3.

20. Шрот, одержаний із насіння за будь-яким з пп. 16-17 або одержаний із рослини за п. 14.

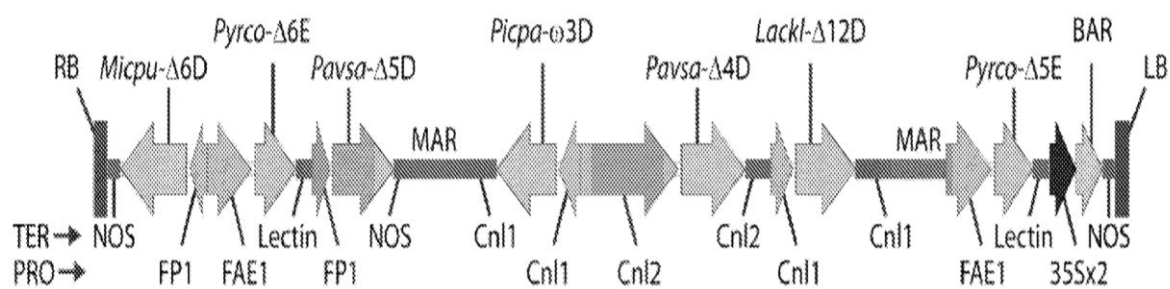
40 21. Корм, що містить одне або більше із ліпиду або олії за будь-яким з пп. 1-3, рослину олійної культури за п. 14, частину рослини за п. 19, вирощене насіння за будь-яким з пп. 16-17 або шрот за п. 20.

45 22. Спосіб одержання корму, який включає стадію, на якій змішують один або більше із ліпиду або олії за будь-яким із пп. 1-3, рослину олійної культури за п. 14, частину рослини за п. 19, вирощене насіння за будь-яким з пп. 16-17 або шрот за п. 20 щонайменше із ще одним поживним інгредієнтом.

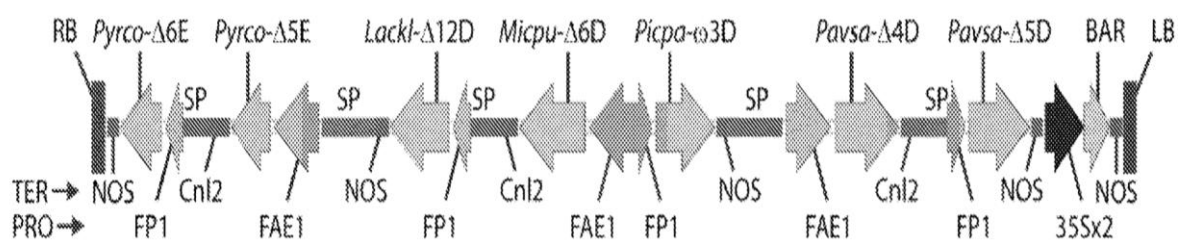
23. Спосіб лікування або попередження стану, при якому прийнятним є використання ПНЖК, у формі одного або більше з ліпиду або олії за будь-яким із пп. 1-3, частини рослини за п. 19, вирощеного насіння за будь-яким з пп. 16-17 або шроту за п. 20, при цьому вказаний стан
50 включає серцеву аритмію, ангіопластику, запалення, астму, псоріаз, остеопороз, камені в нирках, СНІД, множинний склероз, ревматоїдний артрит, хворобу Крона, шизофренію, рак, плодовий алкогольний синдром, синдром гіперактивності і дефіциту уваги, муковісцидоз, фенілкетонурію, уніполярну депресію, агресивну ворожість, адренолейкодистрофію, захворювання коронарних судин серця, гіпертензію, діабет, ожиріння, хворобу Альцгеймера,
55 хронічне обструктивне захворювання легенів, виразковий коліт, рестеноз після ангіопластики, екзему, гіпертонію, агрегацію тромбоцитів, шлунково-кишкову кровотечу, ендометріоз, передменструальний синдром, міалгічний енцефаломієліт, хронічну втомленість після вірусних інфекцій або захворювання очей.



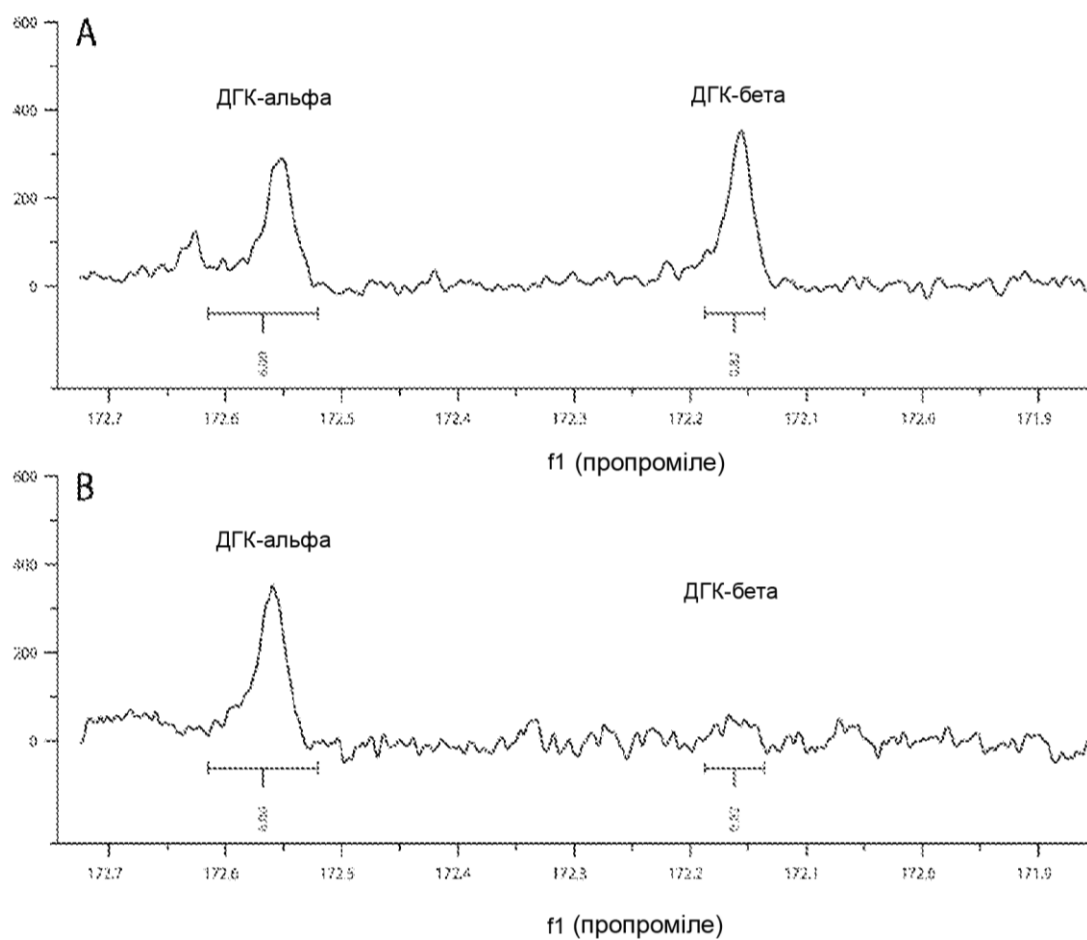
ФІГ. 1



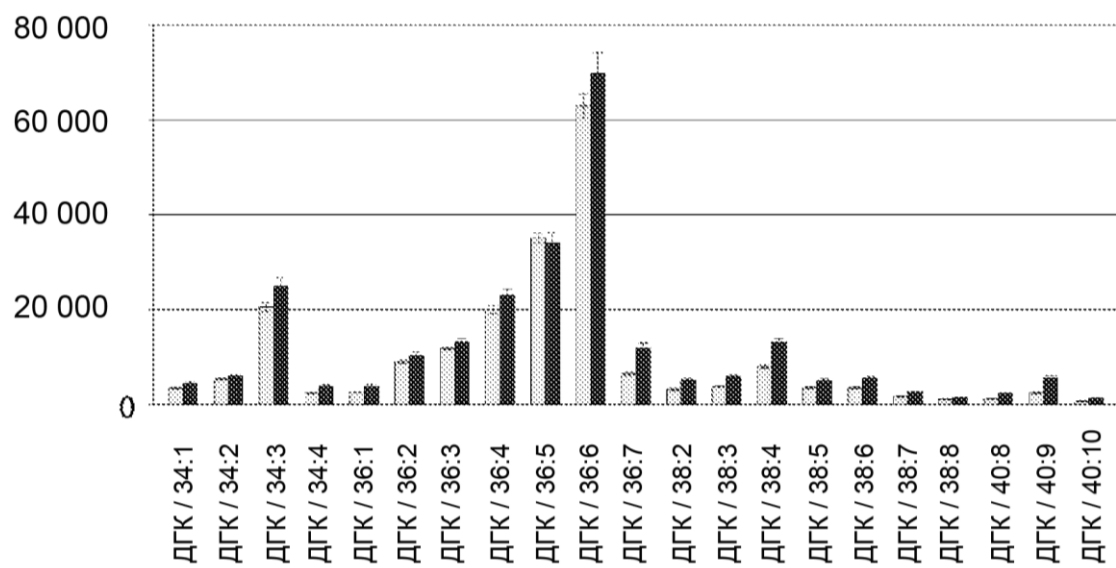
ΦΙΓ. 2



ΦΙΓ. 3

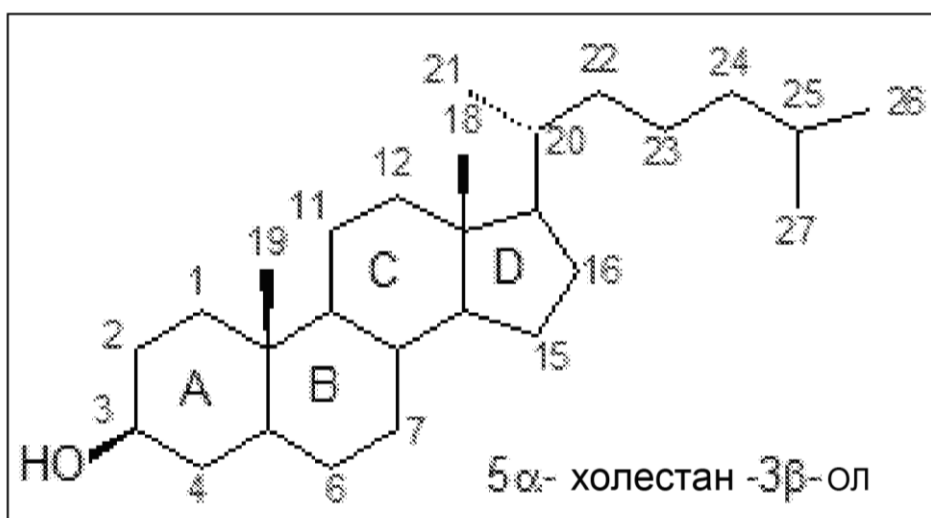


ФІГ. 5

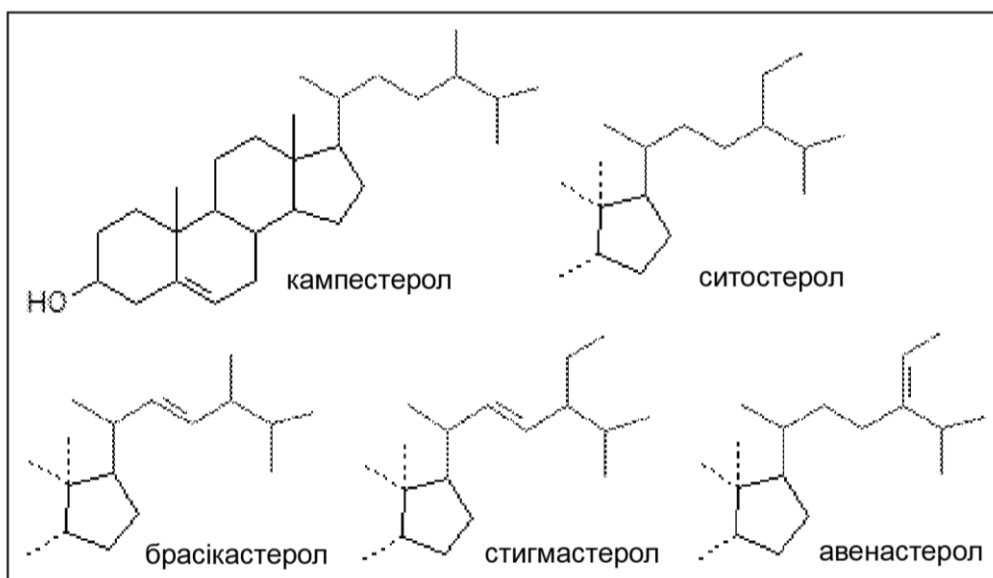


ФІГ. 6

A)



B)



ФІГ. 7

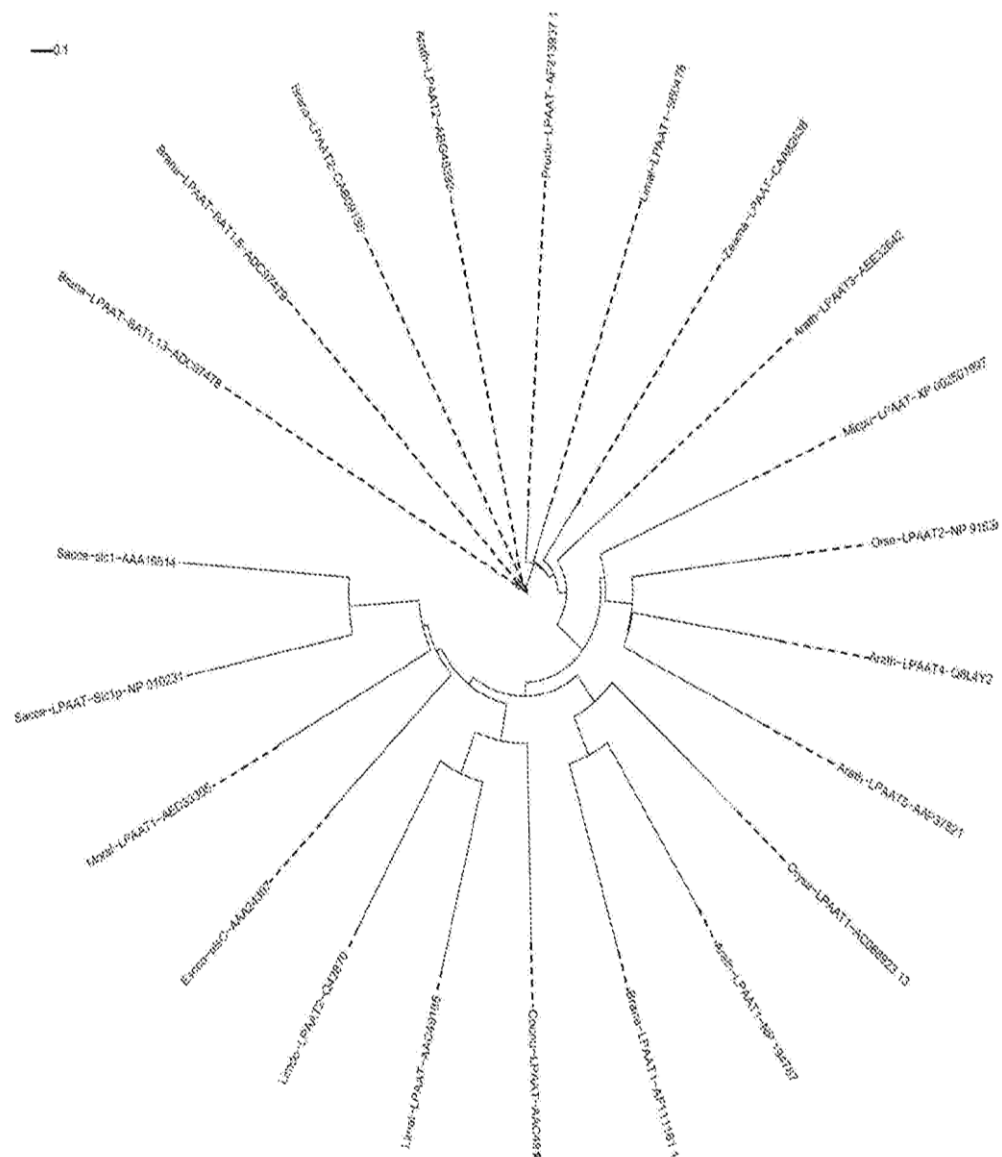
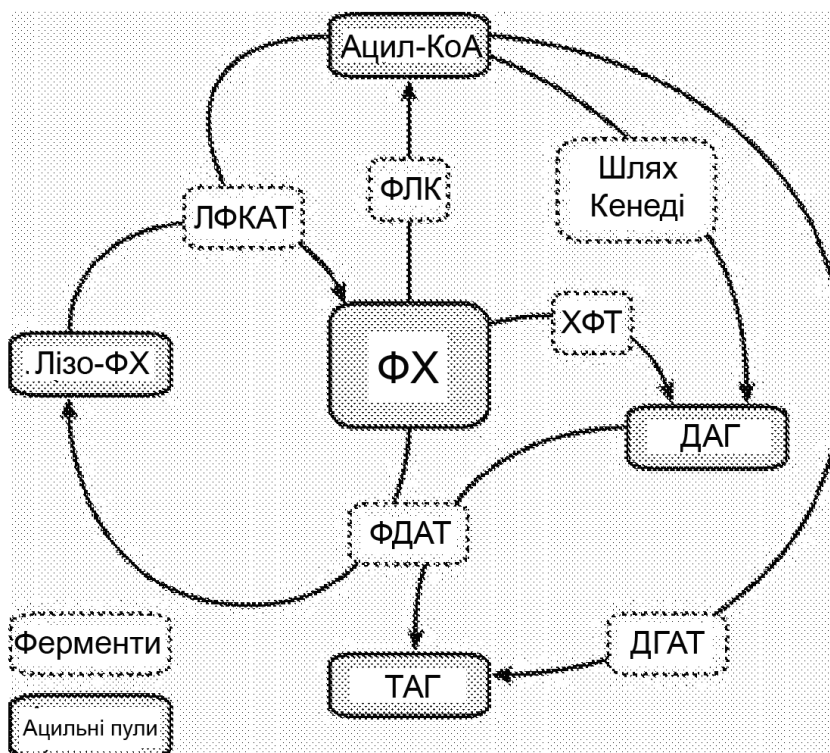
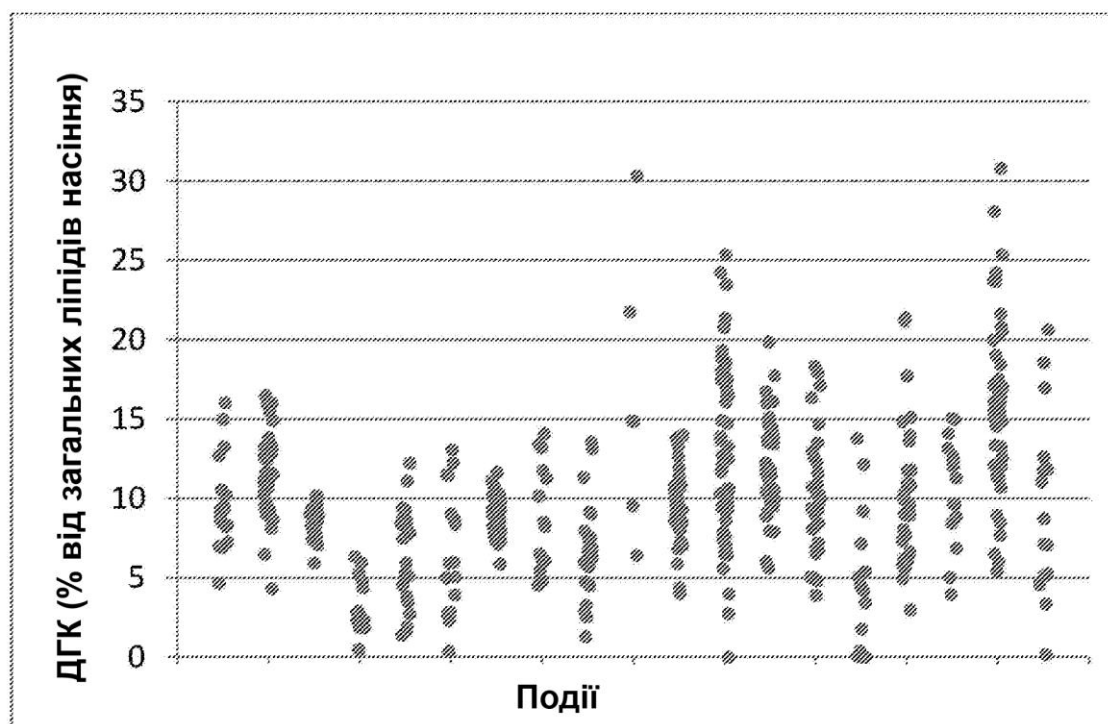


FIG. 8



ФІГ. 9



ФІГ. 10