



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122770** (13) **C2**  
(51) МПК (2021.01)

**A61K 36/31** (2006.01)  
**A61K 31/232** (2006.01)  
**A01H 5/00**  
**C11B 1/10** (2006.01)  
**C12N 15/52** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A61K 127/00** (2006.01)  
**A61P 3/06** (2006.01)  
**A61P 43/00**  
**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 13628**  
(22) Дата подання заявки: **18.06.2015**  
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **07.01.2021**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2014902471, 20140104761, РСТ/AU2014/050433, 14/575,756**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **27.06.2014, 18.12.2014, 18.12.2014, 18.12.2014**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **AU, AR, AU, US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.08.2017, Бюл.№ 15**  
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **06.01.2021, Бюл.№ 1**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/AU2015/050340, 18.06.2015**

(72) Винахідник(и):  
**Пітрі Джеймс Робертсон (AU), Сінгх Сарайндер Пол (AU), Шрестха Пушкар (AU), МакАлістер Джейсон Тімоті (AU), Девайн Малколм Девід (CA), де Файтер Роберт Чарльз (AU)**  
(73) Володілець (володільці):  
**КОММОНВЕЛЗ САЙНТІФІК ЕНД ІНДАСТРІАЛ РИСЕРЧ ОРГАНІЗЕЙШН, Clunies Ross St, Acton, Australian Capital Territory, 2601, Australia (AU), ГРАІНС РЕСЕРЧ АНД ДЕВЕЛОПМЕНТ КОРПОРЕЙШН, Level 4, 4 National Circuit, Barton, Australian Capital Territory 2600, Australia (AU), НУСІД ПТИ ЛТД, 103-105 Pipe Road, Laverton North, Victoria 3026, Australia (AU)**  
(74) Представник:  
**Портна Людмила Семенівна, реєстр. №150**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
**WO 2008124048 A2, 16.10.2008**  
**WO 2013153404 A1, 17.10.2013**  
**WO 2013185184 A2, 19.12.2013**  
**James R. Petrie et al, "Metabolic Engineering Camelina sativa with Fish Oil-Like Levels of DHA", Plos One, 21.01.2014, vol. 9, no. 1, P. e85061**  
**US 2010227924 A1, 09.09.2010**  
**WO 02092540 A1, 21.11.2002**  
**WO 2007005727 A2, 11.01.2007**  
**WO 2010147900 A1, 23.12.2010**  
**WO 2010057246 A1, 27.05.2010**  
**WO 2013185184 A2, 19.12.2013**  
**WO 2005103253 A1, 03.11.2005**

**UA 122770 C2**

**(54) ЛІПІД, ЩО МІСТИТЬ ДОКОЗАПЕНТАЄНОВУ КИСЛОТУ**

---

**(57) Реферат:**

Винахід належить до екстрагованого рослинного ліпиду або мікробного ліпиду, що містить докозапентаєнову кислоту, і способів одержання екстрагованого ліпиду.

## ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

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

## РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

5 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 джерел або шляхом перетворення лінолевої (ЛК, 18:2 $\omega$ 6) або  $\alpha$ -ліноленової (АЛК, 18:3 $\omega$ 3) жирних кислот, обидві з яких розглядаються як незамінні жирні кислоти в раціоні людини. Хоча людина і багато інших хребетних тварин можуть перетворювати ЛК або АЛК, одержані з рослинних джерел, на С22, вони здійснюють таке перетворення з дуже низькою швидкістю. Крім того, більшості сучасних суспільств властиве незбалансоване харчування, в якому щонайменше 90 % поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) складають  $\omega$ 6 жирні кислоти, замість співвідношення 4:1 або менше для  $\omega$ 6: $\omega$ 3 жирних кислот, яке вважається ідеальним (Trautwein, 2001). Безпосереднім харчовим джерелом ДЛ-ПНЖК, наприклад, 15 ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК, 20:5 $\omega$ 3), докозапентаєнової кислоти (ДПК) і докозагексаєнової кислоти (ДГК, 22:6 $\omega$ 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. Однак за рахунок зменшення глобального і національного вилову риби, необхідні альтернативні джерела вказаних жирів, що проявляють позитивний вплив на 20 здоров'я.

Квіткові рослини, на противагу тваринам, не володіють здатністю синтезувати поліненасичені жирні кислоти з довжиною ланцюга більше 18 атомів вуглецю. Зокрема, культивовані і садові рослини разом з іншими покритонасінними не мають ферментів, 25 необхідних для синтезу  $\omega$ 3 жирних кислот з довшим ланцюгом, наприклад, ЕПК, докозапентаєнової кислоти (ДПК, 22:5 $\omega$ 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

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

Перетворення ЕПК на ДГК в таких організмах відбувається шляхом  $\Delta$ 5-елонгації ЕПК з утворенням ДПК, після чого слідує  $\Delta$ 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  $\Delta$ 4-десатурази (Sprecher et al., 1995).

Фронт-енд десатурази, загалом знайдені в рослинах, мохах, мікрободоростях 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 мікрободоростей 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  $\beta$ -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 i 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) (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  $\gamma$ -ліноленової кислоти (ГЛК, 18:3 $\omega$ 6) в тютюні з використанням  $\Delta 6$ -десатурази із ціанобактерії *Synechocystis* вперше повідомлялося в 1996 році (Reddy i 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 *Isochrysis 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 рибацькому 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 ДПК у насінні рослин олійних культур.

#### КОРОТКИЙ ОПИС СУТІ ВІНАХОДУ

Деякі організми продукують масло із вмістом ДПК більш ніж 1-2 % і, таким чином, існують обмежені можливості продукування ДПК у великих масштабах в природних джерелах, якщо вони взагалі існують. Авторами даного винаходу ідентифіковані способи і рослини для продукування ліпиду з набагато вищими рівнями ДПК, ніж у природних джерелах.

В першому 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, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 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 менш ніж 2 % або менш ніж 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), і, при цьому, щонайменше 35 % ДПК, естерифікованої 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, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 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 % ДГК, естерифікованої у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковані в положенні sn-2 ТАГ, і (iii) рівень ДПК 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 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 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 описаних вище аспектів детальніше розкриті нижче. Як буде зрозуміло кваліфікованому фахівцю, будь-які з ознак описаного варіанта реалізації винаходу, які є ширшими за відповідної ознаки у згаданому вище аспекті, не застосовуються до даного аспекту.

У варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід володіє однією або більше із наступних 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 %,

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 %, 5
- 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 %, 5
- v) рівень  $\alpha$ -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 %, 10
- vi) рівень  $\gamma$ -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 %, 15
- 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 %, 20
- 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 %, 25
- 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 %, 30
- 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 %, 30
- xi) ліпід містить  $\omega$ 6-докозапентаєнову кислоту ( $22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ ) серед жирних кислот, що містяться в ньому, 35
- xii) ліпід містить менше 0,1 %  $\omega$ 6-докозапентаєнової кислоти ( $22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ ) серед жирних кислот, що містяться в ньому, 35
- xiii) ліпід містить менше 0,1 % однієї або більш або всіх із СДК, ЕПК і ЕТК серед жирних кислот, що містяться в ньому, 35
- xiv) 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 %, 40
- xv) 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 %, 45
- xvi) 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 %, 50
- xvii) 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 близько 10 %, 50
- xviii) 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 близько 0,5 % до 4 %, 55
- xix) рівень загальних  $\omega$ 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 60

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 %,

5        хх) рівень нових  $\omega$ -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 %,

10       ххі) співвідношення загальних  $\omega$ -жирних кислот : загальних  $\omega$ -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,

15       ххіі) співвідношення нових  $\omega$ -жирних кислот : нових  $\omega$ -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,

20       ххііі) 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 %,

25       ххіііі) 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 близько 50 % до близько 70 %,

30       ххv) 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 %,

35       ххvi) 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 %,

40       ххvii) 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 %,

45       ххviii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на 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 %,

50       ххix) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ЛК на 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 %,

55       ххx) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення АЛК на 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 %,

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

65       ххxii) 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 %,

70       ххxiii) ліпід містить диацилгліцерол (ДАГ), причому ДАГ переважно містить ДПК,

xxxiv) 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,

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

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

xxxvii) 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 %, 20

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 %, 25

iv) рівень лінолевої кислоти (ЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 4 % до 20 %,

v) рівень  $\alpha$ -ліноленової кислоти (АЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 4 % до 40 %,

vi) рівень  $\gamma$ -ліноленової кислоти (ГЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 0,05 % до 7 %, 30

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 %, 35

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 %  $\omega$ 6-докозапентаєнової кислоти (22:5 $\Delta$ 4,7,10,13,16) серед жирних кислот, що містяться в ньому,

xi) рівень нових  $\omega$ 6 жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить менш ніж 10 %, 40

xii) співвідношення загального вмісту  $\omega$ 6 жирних кислот: загального вмісту  $\omega$ 3 жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить від 1,0 до 3,0 або від 0,1 до 1,

xiii) співвідношення нових  $\omega$ 6 жирних кислот : нових  $\omega$ 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, 45

xiv) склад жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДПК щонайменше 10 %,

xv) склад жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду базується на ефективності перетворення ЛК на ДПК щонайменше 15 %, 50

xvi) склад жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду базується на ефективності перетворення АЛК на ДПК щонайменше 17 %,

xvii) загальні жирні кислоти у екстрагованому рослинному ліпіді містять менш ніж 1,5 % C20:1, і

xviii) вміст триацилгліцеролів (ТАГ) екстрагованого рослинного ліпиду становить щонайменше 70 %, і може характеризуватися однією або більше із наступних ознак 55

xix) екстрагований рослинний ліпід містить діацилгліцерол (ДАГ), який містить ДПК,

xx) екстрагований рослинний ліпід містить менш ніж 10 % вільних (неестерифікованих) жирних кислот та/або фосфоліпиду або по суті не містить їх,

xxi) щонайменше 70 % ДПК, естерифікованої у формі ТАГ, знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ,

xxii) найбільш розповсюджені ДПК-вмісні види ТАГ в екстрагованому рослинному ліпіді являють собою ДПК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12), і

5 xxiii) екстрагований рослинний ліпід містить три-ДПК 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 %.

У подальшому варіанті реалізації рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого рослинного ліпиду становить менш ніж 2 %, переважно менш ніж 1 % або від 0,1 % до 2 %, більш переважно, вона не визначається. Переважно, рослина або її частина, така як насіння, або мікробна клітина не містить полінуклеотиду, що кодує  $\Delta 4$ -десатуразу, або не містить поліпептиду  $\Delta 4$ -десатурази. В 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.

15 Переважно, екстрагований ліпід є ліпідом з олії насіння виду *Brassica* або ліпідом з олії насіння *Camelina sativa*.

У переважному варіанті реалізації першого аспекту винаходу вище ліпід або олія, переважно олія з насіння, більш переважно, олія з насіння виду *Brassica* або олія з насіння *Camelina sativa*, 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 реалізації описаного вище другого аспекту винаходу, ліпід або олія, переважно олія з насіння, більш переважно, олія з насіння виду *Brassica* або олія з насіння *Camelina sativa*, що містить 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-ДПК ТАГ (ТАГ 66:15), причому щонайменше 35 % ДПК, естерифікованої 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 олеїнової кислоти на ДПК щонайменше близько 10 %.

В контексті екстрагованого ліпиду або олії за винаходом, у варіанті реалізації винаходу рівень ДПК у екстрагованому ліпіді або олії не підвищений або є істотною мірою таким же, як рівень ДПК в ліпіді або олії частини рослини або мікроба до екстракції. Іншими словами, після екстракції не проводилося процедур для підвищення рівня 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 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 або олія з насіння *C. sativa*, 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 визначається або, переважно, не визначається в ліпіді або олії. Переважно, ДГК, якщо вона присутня, присутня на рівні не більше ніж 2 % або 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 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 % 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,  $\Delta 5$ -стигмастерол, ебурикол,  $\beta$ -ситостерол/24-етилхолестерин,  $\Delta 5$ -авенастерол/ізофукостерол  $\square\square\Delta 7$ -стигмастерол/стигмаст-7-ен-3 $\beta$ -ол і  $\Delta 7$ -авенастерол.

У варіанті реалізації вид рослини є одним із наведених у Табл. 11, наприклад, рапс, і рівень стеролів є близько таким же, як наведений у Табл. 11 для даного конкретного виду рослин. Види рослин можуть являти собою *B. napus*, гірчицю (*B. juncea*) або *C. sativa* і містять рівень стеролів, близький до знайденого в екстрагованій олії гірчиці дикого типу *B. napus*, гірчиці або *C. sativa*, відповідно.

У варіанті реалізації екстрагований рослинний ліпід містить один або більше або всі з кампестеролу/24-метилхолестерину,  $\Delta 5$ -стигмастеролу, ебуриколу,  $\beta$ -ситостеролу/24-етилхолестерину,  $\Delta 5$ -авенастеролу/ізофукостеролу,  $\Delta 7$ -стигмастеролу/стигмаст-7-ен-3 $\beta$ -олу і  $\Delta 7$ -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 олію, переважно олію 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, окрім 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 подальшому аспекті даного винаходу пропонується спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпиду або мікробного ліпиду, який включає стадії:

i) одержання частини рослини, переважно насіння *Brassica* або насіння *Camelina sativa*, або мікробних клітин, що містять ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти в естерифікованій формі, 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  $\alpha$ -ліноленову кислоту (АЛК) і докозапентаєнову кислоту (ДПК), і необов'язково одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) та ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), при тому, що рівень ДПК в загальному вмісті жирних кислот ліпиду з частини рослини або мікробних клітин становить від близько 7% до 35%, і

ii) екстракцію ліпиду з частини рослини або мікробних клітин, причому рівень ДПК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 7% до 35%. У варіанті реалізації винаходу рівень ДПК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 7% до 20% або від 20,1% до 35%. У варіанті реалізації винаходу рівень ДПК становить від 7 % до 20 % або від 20,1 % до 30 %, переважно від 20,1 % до 35 %, більш переважно, від 30 % до 35 %. У варіанті реалізації винаходу рівень ДПК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 8 % до 20 % або від 10 % до 20 %, переважно від 11 % до 20 % або від 12 % до 20 %.

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

i) одержання частини рослини, переважно насіння *Brassica*, насіння *C. sativa*, 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  $\alpha$ -ліноленову кислоту (АЛК) і докозапентаєнову кислоту (ДПК), і одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), при тому, що (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) 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 % ДПК, естерифікованої 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 35 %, переважно від 30 % до 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, більш переважно, насіння Brassica або насіння *C. sativa*, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, жирні кислоти включають докозопентаєнову кислоту (ДПК), притому, що щонайменше 35 % ДПК, естерифікованої у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ, і

ii) екстракцію ліпиду із клітин,

причому щонайменше 35 % ДПК, 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, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК) і необов'язково одну або більш із стеаридонової кислоти (СДК), ейкозопентаєнової 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, естерифіковано у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковано у положенні sn-2 ТАГ, і (iii) рівень ДПК 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, більш переважно, насіння Brassica або насіння *C. sativa*, причому ліпід містить жирні кислоти у естерифікованій формі, і, при цьому, жирні кислоти включають докозопентаєнову кислоту (ДПК) і додатково включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які включають α-ліноленову кислоту (АЛК), і одну або більш із стеаридонової кислоти (СДК),

ейкозапентаєнної кислоти (ЕПК) і ейкозатетраєнної 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  $\alpha$ -ліноленової кислоти (АЛК) у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 % до 40 %, (vi) рівень ейкозатриєнної 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, естерифікованої у формі триацилгліцеролу (ТАГ), естерифіковано в положенні sn-2 ТАГ, і

ii) екстракцію ліпиду із частини рослини, причому щонайменше 35 % ДПК, 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 двох аспектів.

Варіанти реалізації розкритих вище аспектів винаходу більш детально описані нижче. Кваліфікованому фахівцю буде зрозуміло, що жодна із ознак, описаних у варіантах реалізації винаходу, які є ширшими за відповідну ознаку 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 glauca*, *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 glauca*, *Lupinus angustifolius*, *Camelina sativa* або *Crambe abyssinica*, переважно насінням *Brassica napus*, *B. 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*. Частина рослини переважно являє собою насіння виду *Brassica* або насіння *Camelina sativa*. 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 ДПК на грам насіння.

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

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

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

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

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

- v)  $\omega$ 3-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,
- vi)  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,
- vii)  $\Delta$ 12-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,
- viii)  $\Delta$ 12-десатураза,  $\omega$ 3-десатураза та/або  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,

5  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 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)  $\omega$ 3-десатураза та/або  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 6-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,

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

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

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

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

20 vi)  $\Delta$ 12-десатураза,  $\omega$ 3-десатураза та/або  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 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 клітина містить 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 (якщо вона присутня), 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 клітина містить екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів;

i) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\omega$ 3-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 6-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,

35 ii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 6-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,

iii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta$ 12-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 6-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,

iv) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta$ 12-десатураза,  $\omega$ 3-десатураза та/або  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 6-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,

v) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\omega$ 3-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,

vi) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,

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

viii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta$ 12-десатураза,  $\omega$ 3-десатураза та/або  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,

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 ДПК-КоА.

Переважно, рослина або її частина, така як насіння, або мікробна клітина не містить полінуклеотиду, що кодує  $\Delta$ 4-десатуразу, або не містить поліпептиду  $\Delta$ 4-десатурази.

У варіанті реалізації  $\Delta$ 12-десатураза додатково володіє  $\omega$ 3-десатуражною та/або  $\Delta$ 15-десатуражною активністю, тобто види активності забезпечуються єдиним поліпептидом. Як альтернатива,  $\Delta$ 12-десатураза не володіє  $\omega$ 3-десатуражною активністю і не володіє  $\Delta$ 15-десатуражною активністю, тобто  $\Delta$ 12-десатураза є окремим поліпептидом від поліпептиду, що володіє  $\omega$ 3-десатуражною та/або  $\Delta$ 15-десатуражною 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)  $\Delta 12$ -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 %, 5

ii)  $\omega 3$ -десатураза перетворює  $\omega 6$  жирні кислоти на  $\omega 3$  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 %, 10

iii)  $\Delta 6$ -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 %, 15

iv)  $\Delta 6$ -десатураза перетворює лінолеву кислоту на  $\gamma$ -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 %, 20

v)  $\Delta 6$ -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 %, 25

vi)  $\Delta 5$ -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 %, 30

vii)  $\Delta 5$ -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 %, 35

ix) ефективність перетворення олеїнової кислоти на 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 %, 40

x) ефективність перетворення ЛК на 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 %, 45

xi) ефективність перетворення АЛК на 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 %, 50

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, 55

xiii)  $\Delta 6$ -елонгаза додатково володіє активністю  $\Delta 9$ -елонгази, 55

xiv)  $\Delta 12$ -десатураза додатково володіє активністю  $\Delta 15$ -десатурази, 55

xv)  $\Delta 6$ -десатураза додатково володіє активністю  $\Delta 8$ -десатурази, 55

xvi)  $\Delta 8$ -десатураза додатково володіє активністю  $\Delta 6$ -десатурази або не володіє активністю  $\Delta 6$ -десатурази, 55

xvii)  $\Delta 15$ -десатураза додатково володіє активністю  $\omega 3$ -десатурази по відношенню до ГЛК, 55

xviii)  $\omega 3$ -десатураза додатково володіє активністю  $\Delta 15$ -десатурази по відношенню до ЛК, 55

xix)  $\omega 3$ -десатураза зменшує ступінь насиченості ЛК та/або ГЛК, 55

хх)  $\omega 3$ -десатураза переважно зменшує ступінь насиченості ГЛК відносно ЛК,  
ххі) 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),

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

ххііі)  $\Delta 6$ -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,

10 ххіііі)  $\Delta 6$ -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;

15 ххiv)  $\Delta 6$ -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,

ххivі)  $\Delta 6$ -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,

ххivіі) десатураза являє собою фронт-енд десатуразу,

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

25 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,

30 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,

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,

35 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,

40 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.

У варіанті реалізації частина рослини, така як насіння, або рекомбінантні клітини, такі як 45 мікробні клітини, додатково містить(ять) екзогенний поліуклеотид, 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 ДПК-КоА, ацил-КоА : лізофосфатидилхолінацилтрансферазу (ЛФХАТ), фосфоліпазу A<sub>2</sub> (РЛК<sub>2</sub>), фосфоліпазу C (PLC), фосфоліпазу D (PLD), СДП- 50 холіндіацилгліцеролхолінфосфоттрансферазу (ХФТ), фосфатидилхоліндіацилгліцеролацилтрансферазу (ФДАТ), фосфатидилхолін : діацилгліцеролхолінфосфоттрансферазу (ФДХТ), ацил-КоА синтетазу (АКС) або комбінацію двох або більше із вказаних ферментів.

55 У іншому варіанті реалізації частина рослини, така як насіння, або рекомбінантні клітини, такі як мікробні клітини, додатково містить(ять) введену мутацію або екзогенний поліуклеотид, який у клітині частини рослини негативно регулює продукування та/або активність ендогенного ферменту, вибраного з числа FAE1, ДГАТ, МГАТ, ГФАТ, ЛФКАТ, ЛФХАТ, РЛК<sub>2</sub>, PLC, PLD, ХФТ, ФДАТ, тіоестерази, наприклад, FATB або D12-десатурази, або комбінації двох або більше із 60 вказаних ферментів.

У подальшому варіанті реалізації щонайменше один або переважно 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.

5 В іншому варіанті реалізації промотор(и), що спрямовує(ють) експресію екзогенних полінуклеотидів, які кодують  $\geq \Delta 5$ -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.

10 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.

15 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  
20 %, 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  
25 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 триацилгліцеролі.

30 У подальшому варіанті реалізації спосіб додатково включає обробку ліпиду з метою підвищення рівня ДПК як відсотка від загального вмісту жирних кислот. Наприклад, обробка включає гідроліз естерифікованих жирних кислот з утворенням вільних жирних кислот або переестерифікацію. Наприклад, ліпід, такий як олія рапсу, може бути підданий обробці з метою перетворення жирних кислот в олії на алкілові естери, наприклад, метилові або етилові естери,  
35 які в подальшому можуть бути фракціоновані із збагаченням ліпиду або олії 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 % ДПК. У варіанті реалізації винаходу рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот ліпиду після обробки становить менш ніж 2,0 % або менш ніж 0,5 %, переважно вона не визначається в  
40 ліпіді.

Крім того, пропонується ліпід або олія, що містить ліпід, такий як вільні жирні кислоти або алкілові естери, одержані із застосуванням способу за винаходом.

У іншому аспекті даного винаходу розкривається спосіб одержання метилових або етилових естерів поліненасичених жирних кислот, який включає введення триацилгліцеролів у реакцію з  
45 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  $\alpha$ -ліноленову кислоту (АЛК), і докозапентаєнову кислоту (ДПК), і необов'язково одну або більше із стеаринової кислоти (СДК), ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК), докозапентаєнової кислоти (ДПК) та ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК), притому, що рівень ДПК у загальному вмісті жирних  
50 кислот екстрагованого ліпиду становить від близько 7 % до 35 %, переважно від 20,1 % до 30 % або від 20,1 % до 35 %, переважно від 30 % до 35 %, з одержанням в такий спосіб метилових або етилових естерів поліненасичених жирних кислот.

55 У іншому аспекті даного винаходу пропонується спосіб одержання метилових або етилових естерів докозапентаєнової кислоти (ДПК), 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),  
60 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 естерів поліненасичених жирних кислот.

У переважному варіанті реалізації ліпід, який використовується у способі у відповідності до описаних вище двох 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, переважно рослина *Brassica* або рослина *C. sativa*, що містить у насінні, або мікробна клітина, що містить:

а) ліпід, що містить жирні кислоти в естерифікованій формі, та

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,  $\Delta 6$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза, або

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

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

iv)  $\omega 3$ -десатураза та/або  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -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, або з одним або більше промоторів, здатних спрямовувати експресію вказаних полінуклеотидів у мікробній клітині, і, при цьому, жирні кислоти включають олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту,  $\omega 6$  жирні кислоти, які включають лінолеву кислоту (ЛК) і необов'язково  $\gamma$ -ліноленову кислоту (ГЛК),  $\omega 3$  жирні кислоти, які включають  $\alpha$ -ліноленову кислоту (АЛК), стеаридонову кислоту (СДК) і докозапентаєнову кислоту (ДПК) і необов'язково 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 ДПК присутній на рівні менш ніж 2 % або менш ніж 0,5 % від загального вмісту жирних кислот ліпиду насіння і екстрагованого ліпиду і, більш переважно, не визначається 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, переважно рослина *Brassica* або рослина *C. sativa*, або мікробна клітина, що містить:

а) жирні кислоти у естерифікованій формі, причому жирні кислоти включають докозапентаєнову кислоту (ДПК), і, при цьому, щонайменше 35 % ДПК, 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),  $\omega 3$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 6$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,

ii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 6$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,

iii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta 12$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 6$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,

iv) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta 12$ -десатураза,  $\omega 3$ -десатураза та/або  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 6$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,

v) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\omega 3$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 9$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,

vi) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 9$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,

vii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta 12$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 9$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,

viii) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ),  $\Delta 12$ -десатураза,  $\omega 3$ -десатураза та/або  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 9$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,

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 ДПК-КоА, і рівень ДПК 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 переважних варіантах реалізації кожного із згаданих вище двох аспектів винаходу,  $\Delta 15$ -десатураза є грибковою  $\Delta 15$ -десатуразою, і  $\omega 3$ -десатураза є грибковою  $\omega 3$ -десатуразою.

5 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.

10 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 glauca*, *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 15 реалізації 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). Переважно рослина являє собою рослину виду *Brassica* або *Camelina sativa*. У варіанті реалізації рослина олійної культури знаходиться у полі або була 20 вирощена у полі або була вирощена в теплиці у стандартних умовах, наприклад, як описано у Прикладі 1.

У варіанті реалізації винаходу одна або більше десатураз здатні використовувати субстрат ацил-КоА. У переважному варіанті реалізації винаходу одна або більш з  $\Delta 6$ -десатурази,  $\Delta 5$ -десатурази і  $\Delta 8$ -десатурази, якщо вони присутні, здатні використовувати субстрат ацил-КоА, 25 переважно кожна з i)  $\Delta 6$ -десатурази і  $\Delta 5$ -десатурази або ii)  $\Delta 5$ -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, ЕТрК-КоА для  $\Delta 8$ -десатурази, олеїл-КоА для  $\Delta 12$ -десатурази, або один або більше з ЛК-КоА, ГЛК-КоА або 30 АРК-КоА для  $\omega 3$ -десатурази.

У варіанті реалізації винаходу зріле, зібране в процесі збору урожаю насіння рослини містить ДПК в кількості щонайменше близько 28 мг на грам насіння, переважно щонайменше 32 мг на грам насіння, щонайменше близько 36 мг на грам насіння, щонайменше 40 мг на грам насіння, більш переважно щонайменше близько 44 мг на грам насіння 35 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 ДПК, причому зібране в процесі збору урожаю, зріле насіння рослини містить ДПК в кількості щонайменше близько 28 мг на грам 40 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. 45

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,
- 50 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 ДПК, із вмістом вологи від близько 4 % до близько 15 % мас., переважно від близько 6 % до близько 8 % мас. або від 55 близько 4 % до близько 8 % мас., більш переважно від близько 4 % до близько 6 % мас., причому вміст ДПК 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

5 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 ДПК у ліпіді, продукованому 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,  $\Delta$ 6-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,  
 15 ii)  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 6-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,  
 iii)  $\Delta$ 12-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-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,  $\Delta$ 6-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,

v)  $\omega$ 3-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,  
 20 vi)  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,  
 vii)  $\Delta$ 12-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,  
 viii)  $\Delta$ 12-десатураза,  $\omega$ 3-десатураза або  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 9-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза, або

ix)  $\omega$ 3-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 6-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза,  
 25 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,  
 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

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.

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 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 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.

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 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 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 ліпідів з насіння, переважно з одержанням олії із загальним виходом ДПК щонайменше 60 кг або 70 кг або 80 кг 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, продукovanі 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 фосфоліпідів.

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 integrifolia*), 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, продукowana 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 ДПК. 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, переважно ДПК, 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(и) полінуклеотид(и) та/або генетичні конструкції, як розкрито у даному документі. У переважному варіанті реалізації в шроті залишається частина ліпиду або олії, продукowanego 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 шроту 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 продукти харчування (корми), косметика або хімічні речовини, що містять одне або більше з ліпиду 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. Переважним продуктом харчування є дитяча суміш, що містить ліпід або олію за винаходом.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб одержання продукту харчування, переважно дитячої суміші, 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, екструдування, емульгації або іншої обробки продукту харчування або пакування продукту харчування або аналізу вмісту ліпиду або олії у продукті харчування.

В іншому аспекті цього винаходу розкривається спосіб лікування або попередження стану, при якому ПНЖК, переважно ДПК, здійснюють сприятливу дію, причому вказаний спосіб включає введення суб'єкту одного 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, шроту за винаходом, композиції за винаходом або корму за винаходом. У переважному варіанті реалізації ПНЖК вводять у формі фармацевтичної композиції, що містить етиловий естер ПНЖК. Суб'єкт може бути людиною або твариною.

Приклади станів, при яких ПНЖК здійснюють сприятливу дію, включають, без обмеження, підвищені рівні тригліцеролів у 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, адренолейкодистрофію, 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 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, 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 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 ДПК. У конкретному варіанті реалізації винаходу спосіб включає обробку ліпиду або олії, наприклад, олії рапсу, з метою перетворення жирних кислот в олії на алкілові естери, наприклад, метилові або етилові естери. Подальша обробка, наприклад, фракціонування або дистиляція, може застосовуватися для збагачення ліпиду або олії ДПК. У переважному варіанті реалізації винаходу лікарський засіб містить етилові естери ДПК. У ще більш переважному варіанті реалізації винаходу рівень етилових естерів ДПК в лікарському засобі становить від 30 % до 50 %. Лікарський засіб може додатково містити етилові естери 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 Таблицях у розділі Прикладів.

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 необмежуваних Прикладів, з посиланням на додані графічні матеріали.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фігура 1. Аеробні шляхи біосинтезу ДПК.

Фігура 2. Карта ділянки вставки Т-ДНК від лівої до правої меж rJP3416-GA7. ПМ позначає праву межу; ЛМ, ліва межа; ТЕР, ділянка термінатора транскрипції/поліаденілування; ПРО, промотор; кодуєчі ділянки показані над стрілками, промотори і термінатори — під стрілками. Місру-Δ6D, Δ6-десатураза *Micromonas pusilla*; Pyrho-Δ6E, Δ6-елонгаза *Pyramimonas cordata*; Pavsa-Δ5D, Δ5-десатураза *Pavlova salina*; Пісра-ω3D, ω3-десатураза *Pichia pastoris*; Pavsa-Δ4D, Δ4-десатураза *P. salina*; Lackl-Δ12D, Δ12-десатураза *Lachancea kluyveri*; Pyrho-Δ5E, Δ5-елонгаза *Pyramimonas cordata*. НОС позначає ділянку термінатора транскрипції/поліаденілування нопалінсинтетази *Agrobacterium tumefaciens*; FP1, укорочений промотор напіну *Brassica napus*; FAE1, промотор *Arabidopsis thaliana* FAE1; Лектин, ділянка термінатора транскрипції/поліаденілування 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. (А) Основна структура фітостерину з кільцем і нумерацією бічного ланцюга. (В) Хімічні структури деяких фітостеринів.

Фігура 4. Карта ділянки вставки Т-ДНК між лівою и правою межами rJP3662. ПМ позначає праву межу; ЛМ, ліва межа; ТЕР, ділянка термінатора транскрипції/поліаденілування, ПРО, промотор; кодуєчі ділянки вказані над стрілками, промотори і термінатори — під стрілками. Місру-Δ6D, *Micromonas pusilla* Δ6-десатураза; Pyrho-Δ6E, *Pyramimonas cordata* Δ6-елонгаза; Pavsa-Δ5D, *Pavlova salina* Δ5-десатураза; Пісра-ω3D, *Pichia pastoris* ω3-десатураза; Lackl-Δ12D, *Lachancea kluyveri* Δ12-десатураза; Pyrho-Δ5E, *Pyramimonas cordata* Δ5-елонгаза. НОС позначає ділянку термінатора транскрипції/поліаденілування нопалінсинтетази *Agrobacterium tumefaciens*; FP1, вкорочений промотор напіну; *Brassica napus* FAE1, промотор FAE1 *Arabidopsis thaliana*; Лектин, ділянка термінатора транскрипції/поліаденілування лектину *Glycine max*; Cnl1 позначає промотор або термінатор конлініну 1 *Linum usitatissimum*. ДПМ позначає ділянку приєднання до матриксу Rb7 *Nicotiana tabacum*.

#### КЛЮЧ ДО ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

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

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*.

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, кодуєча Δ6-десатуразу *Micromonas pusilla*.

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 14 — відкрита рамка зчитування, кодуєча 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 кодуєча функціональну елонгазу).

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

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

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

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

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

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

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

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

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, кодуєча Δ4-десатуразу *Pavlova salina*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

15 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*.

SEQ ID NO 42 — ЛФКАТ *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO 43 — ЛФКАТ *Micromonas pusilla*.

20 SEQ ID NO 44 — ЛФКАТ *Mortierella alpina*.

SEQ ID NO 45 — ЛФКАТ *Brassica napus*.

SEQ ID NO 46 — ЛФКАТ *Brassica napus*.

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

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

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

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

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

##### Загальні способи і визначення

30 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).

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 сьогоднішнього дня), Ed Harlow and David Lane (редактори), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988) і J.E. Coligan et al. (редактори), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (включаючи всі видання до сьогоднішнього дня).

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

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

50 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

55 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, ДПК, продукуюваною іншим джерелом (наприклад, ДПК з риб'ячого жиру). У варіанті реалізації винаходу після екстракції одне або більше або всі із співвідношень олеїнова кислота : ДПК, пальмітинова кислота : ДПК, лінолева кислота : 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 або фракціонування, яка може змінити одне або більше або всі із співвідношень олеїнова кислота : ДПК, пальмітинова кислота : ДПК, лінолева кислота : 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 кислотами, наприклад, стероли.

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

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 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 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 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

(тіоестер) або іншої форми зв'язку. Жирна кислота може бути естерифікованою як фосфоліпід, наприклад, форми фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну, фосфатидилсерину, фосфатидилгліцеролу, фосфатидилінозиту або дифосфатидилгліцеролу. У варіанті реалізації жирна кислота естерифікована метильною або етильною групою, наприклад, метиловий або етиловий естер ПНЖК C20 або C22. Переважними жирними кислотами є метилові або етилові естери ЕПК або ДПК 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 ( $\omega$ ) кінець містить 3 атоми водню (CH<sub>3</sub>-), і кожен атом вуглецю в межах ланцюга містить 2 атоми водню (-CH<sub>2</sub>-).

«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<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-» 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- $\gamma$ -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 ДПК або ДПК і ДГК або ЕПК, ДПК і ДГК, або ЕПК і ДПК. Наприклад, ДГК присутня на рівні від 30,1 % до 35 % від складу загальних жирних кислот. У 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 (тіоестер) або іншої форми зв'язку. У тригліцеролі, ДЛ-ПНЖК або ДДЛ-ПНЖК, такі як 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 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, фосфатидилінозиту 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.

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 кодовані генетичними конструкціями, запропонованими в даному описі як SEQ ID NO: 1 і 2.

У даному документі термін «фрон-енд десатураза» позначає члена класу ферментів, який вводить подвійний зв'язок між карбоксильною групою і вже наявною ненасиченою частиною ацильного ланцюга ліпідів, причому він структурно характеризується присутністю N-кінцевого домену цитохром b5, разом з типовим доменом десатурази жирних кислот, який містить три високою мірою консервативних гістидинових бокси (Napier et al., 1997).

Активність будь-якої з елонгаз або десатураз для застосування у винаході може бути протестована шляхом експресії гена, що кодує фермент, у клітині, такий як, наприклад, рослинна клітина, або переважно у соматичних ембріонах або трансгенних рослинах, і визначення наявності у клітині підвищеної здатності до продукування ДЛ-ПНЖК, в порівнянні з порівнянною клітиною, ембріоном або рослиною, у яких фермент не експресується.

В одному варіанті реалізації винаходу одна або більш десатураз та/або елонгаз для застосування у винаході, можуть бути виділені з мікроводоростей, тобто їх амінокислотна послідовність є ідентичною поліпептиду, що може бути виділений з мікроводоростей.

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

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 sp.</i> 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 sp.</i>	AF489588	439	Qiu et al., 2001
		<i>Thraustochytrium aureum</i>		439	WO02081668
		<i>Isochrysis galbana</i>		442	WO02081668

Фермент	Тип організму	Вид	Номери доступу	Розмір білка (ак)	Посилання
	Мох	Marchantia polymorpha	AY583465	484	Kajikawa et al., 2004
Δ6-десатураза	Ссавці	Homo sapiens	NM_013402	444	Cho et al., 1999a; Leonard et al., 2000
		Mus musculus	NM_019699	444	Cho et al., 1999a
	Нематода	Caenorhabditis elegans	Z70271	443	Napier et al., 1998
	Рослини	Borago officinales	U79010	448	Sayanova et al., 1997
		Echium	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto et al., 2002
		Primula vialii	AY234127	453	Sayanova et al., 2003
		Anemone leveillei	AF536525	446	Whitney et al., 2003
	Мохи	Ceratodon purpureus	AJ250735	520	Sperling et al., 2000
		Marchantia polymorpha	AY583463	481	Kajikawa et al., 2004
		Physcomitrella patens	CAA11033	525	Girke et al., 1998
	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
С20 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., 2000
	Водорості	Thraustochytrium aureum**	AX464802	272	WO 0208401-A2

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

\* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> \*\* Функція не доведена/не продемонстрована  
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, естери ацил-КоА. Ацильна група може бути естерифікована до фосфоліпіду, наприклад, фосфатидилхолін (ФХ), або до білка-носія ацилу (БНА), або, в переважному варіанті реалізації винаходу, до КоА. Десатурази загалом можуть бути розділені на три групи, відповідно. В одному варіанті реалізації винаходу десатураза являє собою 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-десатуразі 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 Δ5-десатураза 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 *Emiliana 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.

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, такій 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.

Таблиця 2

Десатурази, які продемонстрували активність на субстраті ацил-КоА

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

В одному варіанті реалізації винаходу  $\Delta 6$ -десатураза не володіє активністю  $\Delta 5$ -десатурази по відношенню до ЕТК, яка могла би бути виявлена. В іншому варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот  $\Delta 6$ -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  $\Delta 6$ -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,  $\Delta 6$ -десатураза може володіти активністю  $\Delta 8$ -десатурази.

В цьому документі « $\Delta 8$ -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  $\Delta 8$ -десатураза здатна перетворювати ЕТрК на ЕТК. Переважно, « $\Delta 8$ -десатураза» здатна перетворювати ЕТрК-КоА на ЕТК-КоА, тобто є ацил-КоА десатуразою. У варіанті реалізації « $\Delta 8$ -десатураза» здатна перетворювати ЕТрК, естерифіковану в положенні sn-2 ФХ. Переважно  $\Delta 8$ -десатураза володіє більш високою активністю по відношенню до ЕТрК-КоА, ніж по відношенню до ЕТрК-ПК. Крім того,  $\Delta 8$ -десатураза може володіти активністю  $\Delta 8$ -десатурази, і при цьому носити назву  $\Delta 6/\Delta 8$  біфункціональної десатурази, за умови, що вона володіє більш високою активністю  $\Delta 8$ -десатурази по відношенню до ЕТрК, ніж активністю  $\Delta 6$ -десатурази по відношенню АЛК. Приклади  $\Delta 8$ -десатураз наведені у Табл. 1. В одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот  $\Delta 8$ -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 « $\omega 3$ -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,  $\omega 3$ -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  $\omega 3$ -десатурази (група I) володіють активністю тільки на С18 субстратах, таких як рослинні і ціанобактеріальні  $\omega 3$ -десатурази. Такі  $\omega 3$ -десатурази також є  $\Delta 15$ -десатуразами. Інші  $\omega 3$ -десатурази виявляють активність на субстратах С20 без активності (група II) або з деякою активністю (група III) на субстратах С18. Такі  $\omega 3$ -десатурази також є  $\Delta 17$ -десатуразами. Переважними  $\omega 3$ -десатуразами є група III типу, яка перетворює ЛК на АЛК, ГЛК на СДК, ДГЛК на ЕТК і АРК на ЕПК, наприклад, *Pichia pastoris*  $\omega 3$ -десатураза (SEQ ID NO: 6). Приклади  $\omega 3$ -десатураз включають описані Pereira et al. (2004a) ( $\omega 3$ -десатураза *Saprolegnia diclina*, група II), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) і Spsychalla et al. (1997) ( $\omega 3$ -десатураза *C. elegans*, група III). В переважному варіанті реалізації винаходу  $\omega 3$ -десатураза являє собою грибову  $\omega 3$ -десатуразу. В цьому документі «грибова  $\omega 3$ -десатураза» позначає  $\omega 3$ -десатуразу, одержану з грибового джерела, в тому числі, оомицетного джерела, або її варіант з послідовністю амінокислот, щонайменше на 95 % ідентичною їй. Гени, що кодуєть численні  $\omega 3$ -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  $\omega 3$ -десатурази з оомицетів *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora sojae* і *Phytophthora ramorum*, здатні ефективно перетворювати жирнокислотні субстрати  $\omega 6$  на відповідні  $\omega 3$  жирні кислоти, з перевагою у відношенні субстратів С20, тобто ті, що володіють вираженішою активністю  $\Delta 17$ -десатурази порівняно з активністю  $\Delta 15$ -десатурази. Такі ферменти не володіють активністю  $\Delta 12$ -десатурази, але здатні використовувати жирні кислоти в ацил-КоА і фосфоліпідній фракції як субстрати.

У більш переважному варіанті реалізації винаходу грибова  $\omega 3$ -десатураза являє собою  $\omega 3$ -десатуразу/ $\Delta 15$ -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  $\omega 3$ -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  $\omega 3$ -десатураза володіє активністю  $\Delta 17$ -десатурази по відношенню до жирної кислоти С20, яка містить щонайменше три подвійних вуглець-вуглецевих

зв'язки, переважно АРК. В іншому варіанті реалізації винаходу  $\omega$ 3-десатураза володіє активністю  $\Delta$ 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 « $\Delta$ 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  $\Delta$ 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  $\Delta$ 12-десатуразами, другий підклас — ацил-КоА-залежними  $\Delta$ 12-десатуразами. Рослинні і грибові  $\Delta$ 12-десатурази звичайно відносяться до першого підкласу, тоді як тваринні  $\Delta$ 12-десатурази відносяться до другого підкласу, наприклад,  $\Delta$ 12-десатурази, кодовані генами, які клоновані з комах Zhou et al. (2008). Численні інші послідовності  $\Delta$ 12-десатурази можуть бути легко ідентифіковані шляхом пошуку в базах даних послідовностей.

В цьому документі « $\Delta$ 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  $\Delta$ 15-десатурази, клоновані з рослинних і грибових видів. Наприклад, в US5952544 розкриті нуклеїнові кислоти, що кодують рослинні  $\Delta$ 15-десатурази (FAD3). Ці ферменти містять мотиви амінокислот, які були характерними для рослинних  $\Delta$ 15-десатураз. У WO200114538 розкритий ген, що кодує FAD3 сої. Численні інші послідовності  $\Delta$ 15-десатурази можуть бути легко ідентифіковані шляхом пошуку в базах даних послідовностей.

В цьому документі « $\Delta$ 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,  $\Delta$ 17-десатураза розцінюється як  $\omega$ 3-десатураза, якщо вона діє на субстрат C20, з введенням десатурації в положенні зв'язку  $\omega$ 3.

У переважному варіанті реалізації винаходу  $\Delta$ 12-десатураза та/або  $\Delta$ 15-десатураза являє собою грибову  $\Delta$ 12-десатуразу або грибову  $\Delta$ 15-десатуразу. В цьому документі «грибова  $\Delta$ 12-десатураза» або «грибова  $\Delta$ 15-десатураза» позначає  $\Delta$ 12-десатуразу або  $\Delta$ 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 грибових джерел. У US 7211656 розкрита  $\Delta$ 12-десатураза із *Saprolegnia diclina*. У WO2009016202 розкриті грибові десатурази з *Helobdella robusta*, *Laccaria bicolor*, *Lottia gigantea*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Monosiga brevicollis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Naegleria gruberi*, *Nectria haematococca*, *Nematostella vectensis*, *Phycomyces blakesleeanus*, *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 грибові  $\Delta$ 12-десатурази і  $\Delta$ 15-десатурази, виділені з *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* і *Mortierella alpina*. У WO2007133425 розкриті грибові  $\Delta$ 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 грибових  $\Delta$ 12-десатураз і грибових  $\Delta$ 15-десатураз є біфункціональні грибові  $\Delta$ 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, Meesaryodsuk 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 грибових 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 (див. Приклад 2, Фіг. 2 і SEQ ID NO: 1) та їх варіанти (Приклад 3) 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 хазяїна, з метою здійснення успішної елонгації ацилу. Вважається, що за специфічність реакції елонгації щодо довжини ланцюга і ступеня десатурації жирнокислотних субстратів відповідає компонент конденсації. Крім того, вважається, що цей компонент є обмежуючим швидкість в реакції елонгації.

В цьому документі « $\Delta$ 5-елонгаза» щонайменше здатна перетворювати ЕПК на ДПК. Приклади  $\Delta$ 5-елонгаз включають розкриті у WO2005/103253. В одному варіанті реалізації винаходу  $\Delta$ 5-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  $\Delta$ 5-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  $\Delta$ 6-елонгаза походить з *Ostreococcus taurii* або *Ostreococcus lucimarinus* (US2010/088776).

В цьому документі « $\Delta$ 6-елонгаза» щонайменше здатна перетворювати СДК на ЕТК. Приклади  $\Delta$ 6-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  $\Delta$ 6-елонгаза одержана з *Physcomitrella patens* (Zank et al., 2002; номер доступу AF428243) або *Thalassiosira pseudonana* (Ruiz-Lopez et al., 2012).

В цьому документі « $\Delta$ 9-елонгаза» щонайменше здатна перетворювати АПК на ЕТрК. Приклади  $\Delta$ 9-елонгаз включають наведені в Табл. 1. В одному варіанті реалізації винаходу послідовність амінокислот  $\Delta$ 9-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  $\Delta$ 9-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  $\Delta$ 9-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  $\Delta$ 9-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 «І-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 І-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 ДПК-КоА. Приклади таких ЛФКАТ наведені в Прикладі 6 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 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 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 однієї або більше із SEQ ID NO: 41 і 42. У варіанті реалізації винаходу 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 ФК, 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* (AAY16324), *Vernicia fordii* (ABC94474), *Mortierella ramanniana* (AAK84179), *Homo*

sapiens (Q96PD7, Q58HT5), Bos taurus (Q70VD8), Mus musculus (AAK84175), Micromonas CCM1545, а також їх варіанти та/або мутанти. Приклади поліпептидів ДГАТЗ включають поліпептиди, кодовані генами ДГАТЗ з арахісу (Arachis hypogaea, Saha, et al., 2006), а також їх варіанти та/або мутанти.

#### 5 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 і 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, місцезнаходження 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 5 вибраних консервативних амінокислот, а потім більш радикальних заміни, 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. 10

У мутантах заміни видалення 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 15 консервативним чином, з метою збереження активності ферменту. Такі консервативні заміни проілюстровані в Табл. 3 під заголовком «приклади заміни».

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 20 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.

Таблиця 3

## Приклади заміни амінокислот

Початковий залишок	Приклади заміни
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

## 25 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 30 «молекула нуклеїнової кислоти».

У варіанті реалізації полінуклеотид є неприродним. 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).  
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, енхансери, сигнали термінації та/або поліаденілування, 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, енхансери. Інтрони видаляють або «зрощують» з ядерним або первинним транскриптом; таким чином, інтрони відсутні в транскрипті матричної РНК (мРНК). Функція мРНК в ході трансляції полягає в конкретизації послідовності або порядку амінокислот у виникаючому поліпептиді. Термін «ген» включає синтетичну або 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 кодуючу білок послідовності, які не знайдені функціонально пов'язаними одна з однією в природі, тобто які є гетерологічними по відношенню одна до одної. Відповідно, химерна ДНК або химерний ген можуть містити регуляторні послідовності і кодуючі послідовності, що походять з різних джерел, або регуляторні послідовності і кодуючі послідовності, що походять з одного джерела, але організовані в інший спосіб, ніж знайдені в природі.

«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 кодуєчі ділянки, кодон-оптимізовані для трансляції в клітинах рослини, як відомо з рівня техніки.

#### Рекомбінантні вектори

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 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 pUC вектори, одержані з pSK вектори, одержані з pGEM вектори, одержані з pSP вектори, одержані з pBS вектори, або переважно бінарні вектори, що містять одну або більш ділянок Т-ДНК. Додаткові послідовності нуклеїнових кислот включають джерела реплікації для забезпечення автономної реплікації вектора, гени селекційних маркерів, переважно кодуєчі резистентність до антибіотика або гербіциду, унікальні множинні сайти клонування, які забезпечують множинні сайти вставки послідовностей нуклеїнових кислот або генів, кодованих в конструкції нуклеїнової кислоти, і послідовності, які підвищують активність трансформації прокаріотних і еукаріотних (особливо рослинних) клітин. Рекомбінантний вектор може містити більш ніж один полінуклеотид, розкритий в цьому документі, наприклад, три, чотири, п'ять або шість полінуклеотидів, розкритих в цьому документі, в комбінації, переважно химерну генетичну конструкцію за винаходом, в якій кожен полінуклеотид функціонально пов'язаний з послідовностями контролю експресії, активними в цільовій клітині. Більш ніж один полінуклеотид, розкритий в цьому документі, наприклад, 3, 4, 5 або 6 полінуклеотидів, переважно ковалентно сполучені в єдиному рекомбінантному векторі, переважно в межах єдиної молекули Т-ДНК, яка в подальшому може бути введена як єдина молекула в клітину, з одержанням 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

більше таких рекомбінантних векторів, кожен з яких містить декілька полінуклеотидів, наприклад, кожен рекомбінантний вектор містить 3, 4, 5 або 6 полінуклеотидів.

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

Якщо присутні декілька промоторів, кожен промотор незалежно може бути таким же або іншим. Переважно, щонайменше 3 і максимум до 6 різних промоторних послідовностей 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, секретуватися з клітини, яка продукує поліпептид, або яка забезпечує локалізацію експресованого поліпептиду, наприклад, для утримання поліпептиду в ендоплазматичному ретикулумі (ЕР) клітини або перенесення в пластиду, та/або (б) химерні послідовності, які приводять до експресії молекул нуклеїнових кислот у вигляді химерних білків. Приклади відповідних сигнальних сегментів включають будь-який сигнальний сегмент, здатний спрямовувати секрецію або локалізацію поліпептиду, розкритого в цьому документі. Додатково, рекомбінантні молекули можуть містити проміжні та/або нетрансльовані послідовності, навколо та/або в межах послідовностей нуклеїнових кислот молекул нуклеїнових кислот, розкритих в цьому документі.

Для спрощення ідентифікації трансформантів, бажано, щоб конструкція нуклеїнової кислоти містила ген селекційного або скринінгового маркера у вигляді або на додаток до чужорідного або екзогенного полінуклеотиду. «Ген маркера» позначає ген, який надає відмінного фенотипу клітинам, що експресують ген маркера, таким чином, що трансформовані клітини відрізняються від клітин, які не містять маркера. Ген селекційного маркера забезпечує ознаку, за якою можна «здійснювати селекцію» на базі резистентності до селекційного агента (наприклад, гербіцид, антибіотик, випромінювання, нагрівання або інший вид обробки, ушкоджуючий нетрансформовані клітини). Ген придатного для скринінгу маркера (або репортерний ген) забезпечує ознаку, за якою можна ідентифікувати, шляхом спостереження або тестування, наприклад, за допомогою «скринінгу» (наприклад, активність  $\beta$ -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 (*nptII*), що забезпечує резистентність до канаміцину, паромоміцину, G418; ген глутатіон-S-трансферази з печінки щурів, що забезпечує резистентність до гербіцидів-похідних глутатіону, наприклад, таких як, розкриті у 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-фосфонометилгліцину, наприклад, розкритий Hinchee et al. (1988), або переважно ген *bar*, що забезпечує резистентність до білафосу, наприклад, розкритий у WO91/02071.

Переважаюча 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 енхансеру. Відповідні послідовності для контролю транскрипції включають будь-яку послідовність для контролю транскрипції, яка може функціонувати щонайменше в одній з рекомбінантних клітин за даним винаходом. Вибір використовуваних регуляторних послідовностей залежить від організму-мішені, такого як рослина, та/або органу-мішені або цільової тканини. Такі регуляторні послідовності можуть бути одержані з будь-якого еукаріотного організму, такого як рослини, або віруси рослин, або можуть бути хімічно синтезовані. Численні такі послідовності для контролю транскрипції відомі фахівцям з рівня техніки. Особливо переважними послідовностями для контролю транскрипції є промотори, що активно спрямовують транскрипцію в рослинах, конститутивно або специфічним для стадії та/або тканини чином, в залежності від використання рослини або її частин.

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

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 шишуватого (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 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 щонайменше в 5 разів активніше у насінні рослини, що розвивається, відносно листя та/або стебел рослини, і переважно експресується активніше в ембріоні насіння, що розвивається, в порівнянні з іншими тканинами рослини. Переважно промотор тільки спрямовує експресію цільового гена в насінні, що розвивається, та/або експресія цільового гена у інших частинах рослини, таких як листя, не може бути виявлена нозерн-блотингом та/або ЗТ-ПЛР. Звичайно, промотор контролює експресією генів в процесі росту і розвитку насіння, зокрема, в ході фази синтезу і акумуляції запасних речовин в насінні. Такі промотори можуть контролювати

експресією гена в суцільному запасному органі рослини або тільки в його частині, наприклад, оболонці насіння або сім'ядолі(ях), переважно в ембріонах, у насінні дводольних рослин або ендоспермі або алейроновому шарі насіння однодольних рослин.

5 Переважні промотори специфічної для насіння експресії включають: i) промотори з генів, що кодують ферменти, які беруть участь в біосинтезі жирних кислот та їх акумуляції в насінні, наприклад, десатурази і елонгази 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 напіню олійної рапсу (US 5608152), промотор USP *Vicia faba* (Baumlein et al., 1991), промотор олеозину *Arabidopsis* (WO98/45461), промотор фазеоліну *Phaseolus vulgaris* (US 5504200), промотор *Bce4 Brassica* (WO91/13980) або промотор легуміну LeB4 з *Vicia faba* (Baumlein et al., 1992), і промотори, які забезпечують специфічну для насіння експресію в однодольних, таких як маїс, ячмінь, пшениця, жито, рис, тощо. Як придатні слід зазначити такі промотори: промотор гена *lpt2* або *lpt1* ячменю (WO95/15389 і WO95/23230) або промотори, розкриті у WO99/16890 (промотори з гена гордеїну ячменю, гена глютеліну рису, гена оризину рису, гена проламіну рису, гена гліадину пшениці, гена глютеліну пшениці, гена зеїну маїсу, гена глютеліну вівса, гена 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 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).

40 Термінація транскрипції забезпечується 3' нетрансльованою послідовністю ДНК, функціонально пов'язаною в химерному векторі з цільовим полінуклеотидом. 3' нетрансльована ділянка рекомбінантної молекули ДНК містить сигнал поліаденілування, 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 нопалінсинтети, 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.

50 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 рибосомами, 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 врожаю 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 ліпиду за винаходом.

В цьому документі термін «запасаючий орган рослини» позначає частину рослини, що спеціалізується на зберіганні енергії у формі, наприклад, білків, вуглеводів, жирних кислот та/або олій. Прикладами запасаючих органів рослини є насіння, плід, бульбоподібне коріння і бульби. Переважним запасаючим органом рослини 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 запасаючий 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 запасаючого 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 олії в плоді, наприклад, олива, олійна пальма або кокосовий горіх. Садовими рослинами, до яких може бути застосований даний винахід, є салат, ендивій або хрестоцвітні овочі, включаючи капусту, броколі або цвітну капусту. Цей винахід може бути застосований до тютюну, гарбузових, моркви, суниці, помідора або перцю.

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

У переважному варіанті реалізації винаходу трансгенна рослина 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,  $\Delta 5$ -елонгаза, діацилгліцерол ацилтрансфераза, ЛФКАТ,  $\Delta 17$ -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)  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -елонгазу і  $\Delta 6$ -елонгазу,
- б)  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 8$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -елонгазу і  $\Delta 9$ -елонгазу,
- в)  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -елонгазу,  $\Delta 6$ -елонгазу і  $\Delta 15$ -десатуразу,
- г)  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 8$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -елонгазу,  $\Delta 9$ -елонгазу і  $\Delta 15$ -десатуразу,
- д)  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -елонгазу,  $\Delta 6$ -елонгазу і  $\Delta 17$ -десатуразу, або

- е)  $\Delta 5$ -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 (ЛФААТ),  $\omega 3$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -елонгазу і  $\Delta 5$ -елонгазу,
- л) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ),  $\Delta 15$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -елонгазу і  $\Delta 5$ -елонгазу,
- м) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ),  $\Delta 12$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -елонгазу і  $\Delta 5$ -елонгазу,
- н) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ),  $\Delta 12$ -десатуразу,  $\omega 3$ -десатуразу та/або  $\Delta 15$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -елонгазу і  $\Delta 5$ -елонгазу,
- о) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ),  $\omega 3$ -десатуразу,  $\Delta 8$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 9$ -елонгазу і  $\Delta 5$ -елонгазу,
- п) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ),  $\Delta 15$ -десатуразу,  $\Delta 8$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 9$ -елонгазу і  $\Delta 5$ -елонгазу,
- р) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ),  $\Delta 12$ -десатуразу,  $\Delta 8$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 9$ -елонгазу і  $\Delta 5$ -елонгазу, або
- с) 1-ацил-гліцерол-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ),  $\Delta 12$ -десатуразу,  $\omega 3$ -десатуразу та/або  $\Delta 15$ -десатуразу,  $\Delta 8$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 9$ -елонгазу і  $\Delta 5$ -елонгазу.

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

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 молотьюю 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 регідратацією висушених ембріонів.

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

Розвиток або регенерація рослин, що містять чужорідний, екзогенний ген, добре відомі з рівня техніки. Переважно регенеровані рослини є такими, що самозапильються, 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 за введеним(ими) геном(ами). 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. Зворотнє 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 із цільовим трансгеном підвищує рівні присутньої в клітині РНК, що транскрибована із трансгену. 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 трансгену 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, Рє-Рє і РРV-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 олій, 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

5 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 визначено 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.

15 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 естери 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 % C20:1. 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.

35 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 ДПК, наприклад, це може бути виражено, як співвідношення рівня ДПК (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 ДПК, одержаних з субстрату. Відсоток перетворення або ефективність перетворення можуть бути виражені для єдиної ферментної стадії біохімічного шляху, а також для частини або всього шляху.

50 Специфічна ефективність перетворення обчислена в цьому документі за наступними формулами:

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

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

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

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

5. ДПК на ДГК (ефективність  $\Delta 4$ -десатурази) =  $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сума } \% \text{ для ДПК і ДГК})$ .

6. Ефективність  $\Delta 12$ -десатурази =  $100 \times (\text{сума \% для ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК}) / (\text{сума \% для ОК, ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$ .

7. Ефективність  $\omega 3$ -десатурази =  $100 \times (\text{сума \% для АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК}) / (\text{сума \% ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЕДК, АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$ .

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

9. Ефективність  $\Delta 6$ -десатурази (на  $\omega 3$  субстраті АЛК) =  $100 \times (\text{сума \% для СДК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК}) / (\text{\% АЛК, СДК, ЕТрК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$ .

10. Ефективність  $\Delta 6$ -елонгази (на  $\omega 3$  субстраті СДК) =  $100 \times (\text{сума \% для ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК}) / (\text{сума \% для СДК, ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$ .

11. Ефективність  $\Delta 5$ -десатурази (на  $\omega 3$  субстраті ЕТК) =  $100 \times (\text{сума \% для ЕПК, ДПК і ДГК}) / (\text{сума \% для ЕТК, ЕПК, ДПК і ДГК})$ .

12. Ефективність  $\Delta 5$ -елонгази (на  $\omega 3$  субстраті ЕПК) =  $100 \times (\text{сума \% для ДПК і ДГК}) / (\text{сума \% для ЕПК, ДПК і ДГК})$ .

Жирнокислотний склад ліпиду, переважно олії з насіння, за винаходом також відрізняється за співвідношенням  $\omega 6$  жирних кислот :  $\omega 3$  жирних кислот у загальному вмісті жирних кислот, для будь-яких загальних  $\omega 6$  жирних кислот : загальних  $\omega 3$  жирних кислот або для нових  $\omega 6$  жирних кислот :  $\omega 3$  нових жирних кислот. Терміни загальні  $\omega 6$  жирні кислоти, загальні  $\omega 3$  жирні кислоти, нові  $\omega 6$  жирні кислоти і нові  $\omega 3$  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  $\omega 3$  жирних кислот, ніж  $\omega 6$  жирних кислот, і таким чином співвідношення  $\omega 6$ : $\omega 3$  менше 1,0 є переважним. Співвідношення 0,0 вказує на повну відсутність певних  $\omega 6$  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.

Додатково, вихід ДЛ-ПНЖК на масу насіння може бути обчислений на базі загального вмісту олії в насінні і % ДПК 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 ДПК, то вміст ДПК в насінні становить близько 4,8 % або близько 48 мг на грам насіння. При вмісті ДПК близько 21 %, насіння рапсу або насіння *Camelina sativa* містить рівень ДПК близько 84 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 80 мг або щонайменше близько 84 мг ДПК на грам насіння. Вміст води в насінні є стандартним для зібраного в процесі збору урожаю зрілого насіння після сушіння (4–15 % води). 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 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 ДПК 20,1 % в кінцевій олії, це забезпечує близько 200 кг ДПК на гектар. Якщо вміст олії знижується на 50 %, це все ще забезпечує близько 100 кг 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 ДПК 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

У варіанті реалізації винаходу екстрагований ліпід, екстрагована олія, рослина або її частина, така як насіння (за винаходом або застосовуване у процесі/способі за винаходом), продукт харчування або композиція за винаходом не містить всі-цис-6,9,12,15,18-генейкозапентаєнної кислоти (n-3 ГПК).

#### Одержання олій

Способи, які шаблонно практикуються в цій галузі техніки, можуть застосовуватися для виділення, обробки і аналізу олій, продуктованих 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 агрегацію 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 відокремлений від 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.

#### Дегумація

Дегумація є початковою стадією рафінації олій, і її 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. Смолу відокремлюють від олії з насіння центрифугуванням.

#### Лужна рафінація

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

нейтралізований відповідною кислотою, такою як хлористоводнева кислота або сірчана кислота.

#### Відбілювання

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

#### Дезодорування

Дезодорування є обробкою олій і жирів за високої температури (200–260 °C) і низького тиску (0,1–1 мм рт. ст). Зазвичай, це досягається шляхом введення пари в олію з насіння із швидкістю 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 речовин 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 естеру. Це може включати первинне вивільнення жирних кислот з ТАГ у формі вільних жирних кислот або пряме одержання естерів жирних кислот, переважно метилових естерів або етилових естерів жирних кислот. В ході реакції переестерифікації ТАГ із спиртом, таким як метанол або етанол, алкільна група спирту утворює естерний зв'язок із ацильними групами (включаючи ДПК) 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, протитоккова 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 естерів 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 естерів або метанолу у випадку метилових естерів), причому використовують надлишок спирту, щоб забезпечує розділення алкільових естерів, які утворилися, і гліцерину, який також утворюється, або за допомогою ліпаз. Такі вільні жирні кислоти або естери жирних кислот, що звичайно залишаються в незміненому виді у складі жирних кислот після обробки, в подальшому можуть бути змішані з етанольним розчином сечовини для утворення комплексів. Насичені і мононенасичені жирні кислоти легко утворюють комплекси із сечовиною, кристалізуються при охолодженні і далі можуть бути видалені фільтрацією. Фракція, що не утворила комплекси із сечовиною, таким чином, збагачується ДЛ-ПНЖК.

#### Продукти харчування (корми)

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

дітей молодшого віку, такі як, наприклад, молочна суміш для дитячого харчування, і шрот за винаходом.

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

Продукт харчування (корм) за цим винаходом включає олію, естер 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.

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

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

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

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

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

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

У варіанті реалізації винаходу продукт харчування є дитячою сумішшю, що містить ліпід або олію за винаходом. У даному документі «дитяча суміш» позначає не існуючу в природі композицію, яка щонайменше частково задовольняє потребу немовляти у поживних речовинах. «Немовля» позначає суб'єкта-людину віком від моменту народження до не більше ніж одного року і включає немовлят із скоректованим віком від 0 до 12 місяців. Вираз «скоректований вік»

означає хронологічний вік немовляти мінус кількість часу, на яку немовля народилося недоношеним. Таким чином, скоректований вік є віком немовляти, неначебто воно народилося доношеним. В даному документі не «існуючий в природі» означає, що продукт не знайдений у природі, але створений втручанням людини. В даному документі дитяча суміш за винаходом виключає чисте грудне молоко людини (Koletzko et al., 1988) і чисте молоко, продуковане тваринами, хоча дитяча суміш за винаходом може містити компоненти, одержані з молока, такі як молочний білок або гідрокарбони, наприклад, білок сироватки або лактозу. Дитяча суміш за винаходом виключає види м'яса, що зустрічаються в природі, такі як телятина, м'ясо морських котиків, китове м'ясо, або рибу, хоча дитяча суміш за винаходом може містити компоненти з указаних джерел, такі як білки. Дитяча суміш за винаходом завжди містить ліпід, що містить ДПК за винаходом, переважно на рівні від 0,05 % до близько 0,5 % мас. від загального вмісту жирних кислот. ДПК може бути присутня у вигляді ТАГ, у вигляді фосфоліпиду або у вигляді неестерифікованої жирної кислоти або їх суміші. Ліпід або олія за винаходом може бути введений до дитячої суміші із застосуванням способів, відомих з рівня техніки. Наприклад, кваліфікований фахівець може з легкістю одержати дитячу суміш за винаходом, загалом із застосуванням способів, описаних у WO 2008/027991, US20150157048, US2015094382 і US20150148316, у яких ДПК додають на додаток до або замість однієї або більше поліненасичених жирних кислот, описаних у вказаних документах.

В одному прикладі дитяча суміш містить ДПК (тобто, омега-3 ДПК, як описано у даному документі), необов'язково з пробіотиками, особливо полідекстрозою (ПДТ) і галактоолігосахаридами (ГОС), лактоферин з джерела, що не належить до людського роду, та інші довголанцюгові поліненасичені жирні кислоти (ДЛ-ПНЖК). У деяких варіантах реалізації винаходу поживний склад додатково містить СДК та/або гама-ліноленову кислоту (ГЛК). У деяких варіантах реалізації винаходу дитяча суміш містить до 7 г/100 кКал джерела жирів або ліпідів, більш переважно, від близько 3 г/100 кКал до близько 7 г/100 кКал джерела жирів або ліпідів, причому джерело жирів або ліпідів містить щонайменше близько 0,5 г/100 кКал, і, більш переважно, від близько 1,5 г/100 кКал до близько 7 г/100 кКал джерела білка або еквівалента білка, більш переважно, від близько 1 г/100 кКал до близько 7 г/100 кКал джерела білка або джерела еквівалента білка; і щонайменше близько 5 г/100 кКал гідрокарбону, більш переважно, від близько 5 г до близько 25 г/100 кКал гідрокарбону. Додатково дитяча суміш може містити один або більше або всі із 1) щонайменше близько 10 мг/100 кКал лактоферину, більш переважно, від близько 10 мг/100 кКал до близько 200 мг/100 кКал лактоферину; 2) від близько 0,1 г/100 кКал до близько 1 г/100 кКал пробіотичної композиції, що містить ПДТ і ГОС; і 3) щонайменше близько 5 мг/100 кКал додаткової ДЛ-ПНЖК (тобто, ДЛ-ПНЖК, що не є ДПК), включаючи ДГК, більш переважно, від близько 5 мг/100 кКал до близько 75 мг/100 кКал додаткової ДЛ-ПНЖК, включаючи ДГК.

У варіанті реалізації винаходу співвідношення ДПК:ДГК у загальному вмісті жирних кислот дитячої суміші становить від 1:3 до 2:1. Крім того, може бути присутня ЕПК, але переважно вона відсутня. Якщо вона присутня, то співвідношення ЕПК:ДПК у загальному вмісті жирних кислот переважно становить менш ніж 1:2, більш переважно, менш ніж 1:5. Додатково, АРК може бути відсутня, але переважно вона присутня, і переважно співвідношення АРК:ДПК у загальному вмісті жирних кислот становить від 1:3 до 2:1. Більш переважно, рівні кожної ДЛ-ПНЖК у дитячій суміші є приблизно такими ж, як знайдені в будь-якому грудному молоці людини, якому від природи властиві варіації, в залежності від віку матері, генетичних факторів, вживання їжі і аліментарного статусу. Наприклад, див. Koletzko et al. (1988). У переважному варіанті реалізації винаходу дитяча суміш не містить рівнів генейкозапентаєнової кислоти (ГПК, 21:5 $\omega$ 3), що піддавалися б виявленню.

Дитяча формула може позначати, наприклад, рідини, порошки, гелі, пасти, тверді речовини, концентрати, суспензії або готові до вживання форми ентеральних сумішей, пероральних сумішей, сумішей для немовлят.

Пробіотики, що є придатними у відповідності до даного документу, можуть включати полідекстрозу, порошок полідекстрози, лактулозу, лактосахарозу, рафінозу, глюкоолігосахарид, інулін, фруктоолігосахарид, ізомальтоолігосахарид, олігосахариди сої, лактосахарозу, ксилоолігосахарид, хітоолігосахарид, манноолігосахарид, арибіноолігосахарид, сіалілолігосахарид, фукоолігосахарид, галактоолігосахарид і генціоолігосахаридами.

Крім того, лактоферин може бути введений до поживного складу у відповідності до даного документу. Лактоферини являють собою однопептиди розміром приблизно 80 кДа, що містять 1-4 глікани, в залежності від виду. 3-D структура лактоферину у різних видів є високою мірою подібною, але не ідентичною. Кожен лактоферин містить дві гомологічні частини, під назвою N- і C-долі, що позначає N-кінцеву і C-кінцеву частину молекули, відповідно.

Джерело білка або еквівалента білка може бути будь-яким, яке застосовується у рівні техніки, наприклад, знежирене молоко, білок сироватки, казеїн, соєвий, білок гідролізований білок, амінокислоти і т.п. Джерела білка з коров'ячого молока, придатні у відповідності до даного документу, включають, але не обмежуючись цим, порошок молочного білка, концентрати молочного білка, ізоляти молочного білка, сухі речовини знежиреного молока, знежирене молоко, сухе знежирене молоко, білок сироватки, ізоляти білка сироватки, концентрати білка сироватки, солодку сироватку, кислу сироватку, казеїн, кислий казеїн, казеїнат (наприклад, натрій казеїнат, натрій кальцій казеїнат, кальцій казеїнат) і будь-які їх комбінації.

Придатні джерела гідрокарбонів можуть бути будь-якими, які застосовуються в рівні техніки, наприклад, лактоза, глюкоза, фруктоза, сухі речовини кукурудзяного сиропу, мальтодекстрини, сахароза, крохмаль, сухі речовини рисового сиропу і т.п. Кількість гідрокарбонів у поживному складі становить щонайменше близько 5 г/100 кКал і звичайно може варіювати від близько 5 г до близько 25 г/100 кКал. У деяких варіантах реалізації винаходу кількість гідрокарбону становить від близько 6 г до близько 22 г/100 кКал. У інших варіантах реалізації винаходу кількість гідрокарбону становить від близько 12 г до близько 14 г/100 кКал. У деяких варіантах реалізації винаходу сухі речовини кукурудзяного сиропу є переважними. Крім того, може бути бажаним введення до поживного складу гідролізованих, частково гідролізованих та/або високогідролізованих гідрокарбонів за рахунок їх легкої засвоюваності. Конкретно, гідролізовані гідрокарбони з меншою ймовірністю будуть містити алергенні епітопи. Необмежуючі приклади гідрокарбонів матеріалів, придатних для застосування у відповідності до даного документу, включають гідролізовані або інтактні, природні або хімічно модифіковані види крохмалю з кукурудзи, тапіоки, рису або картоплі, у воскових або невоскових формах. Необмежуючі приклади придатних гідрокарбонів включають різні види гідролізованого крохмалю, а саме гідролізований кукурудзяний крохмаль, мальтодекстрин, мальтозу, кукурудзяний сироп, глюкозу, сухі речовини кукурудзяного сиропу, глюкозу та різні інші полімери глюкози і їх комбінації. Необмежуючі приклади інших придатних гідрокарбонів включають ті, які часто називають сахарозою, лактозою, фруктозою, кукурудзяним сиропом з високим вмістом фруктози, незасвоюваними олігосахаридами, наприклад, фруктоолігосахаридами, і їх комбінації.

Крім того, один або більше вітамінів та/або мінералів переважно можуть бути додані до дитячої суміші в кількостях, достатніх, щоб задовольняти щоденні харчові потреби суб'єкта. Звичайному фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що потреба у вітамінах і мінералах буде варіювати, наприклад, у відповідності до віку дитини. Крім того, поживний склад необов'язково може містити, але не обмежуючись цим, один або більше із наступних мінералів або їх похідних: бор, кальцій, кальцій ацетат, кальцій глюконат, кальцій хлорид, кальцій лактат, кальцій фосфат, кальцій сульфат, хлорид, хром, хром хлорид, хром піколінат, мідь, мідь сульфат, мідь глюконат, мідь сульфат, флуорид, залізо, залізо карбоніл, залізо (II), залізо (III), залізо (III) ортофосфат, тритурція заліза, заліза полісахарид, йодид, йод, магній, магній карбонат, магній гідроксид, магній оксид, магній стеарат, магній сульфат, марганець, молібден, фосфор, калій, калій фосфат, калій йодид, калій хлорид, калій ацетат, селен, сульфур, натрій, натрій докзат, натрій хлорид, натрій селенат, натрій молібдат, цинк, цинк оксид, цинк сульфат і їх суміші. Необмежуючі приклади похідних мінеральних сполук включають солі, лужні солі, етери (естери) і хелати будь-якої мінеральної сполуки. Мінерали можуть бути додані до поживних складів у формі солей, таких як кальцій фосфат, кальцій гліцерилфосфат, натрій цитрат, калій хлорид, калій фосфат, магній фосфат, залізо (II) сульфат, магній сульфат, мідь сульфат, марганець сульфат і натрій селенат. Додаткові вітаміни і мінерали можуть бути додані, як відомо з рівня техніки.

У варіанті реалізації винаходу дитяча суміш за винаходом або одержана у відповідності до винаходу, не містить грудного молока людини або тварини або екстракту з нього, що містив би ДПК.

В іншому варіанті реалізації винаходу рівень омега-6 ДПК у загальному вмісті жирних кислот дитячої суміші становить менш ніж 2 %, переважно менш ніж 1 % або від 0,1 % до 2 %, більш переважно, вона відсутня.

#### Композиції

Цей винахід додатково 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 естерів жирних кислот.

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.

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

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

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

Типові дози конкретної жирної кислоти становлять від 0,1 мг до 20 г, при введенні від 1 до 5 разів на день (до 100 г щоденно), і переважно знаходяться в інтервалі від 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 необхідно розуміти, що будь-яка кількість жирної кислоти буде корисною для суб'єкта.

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

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

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

#### ПРИКЛАДИ

##### Приклад 1. Матеріали і способи

Експресія генів в клітинах рослини в системі тимчасової експресії

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

Аналіз жирних кислот методом газової хроматографії (ГХ)

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

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

Загальні ліпіди екстрагують з ліофілізованого насіння, що розвивається, через 12 днів після цвітіння (дпц) і зрілого насіння після додавання відомої кількості три-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 РХ та іонізацією електророзпиленням за допомогою РХ-МС 6410b з трьома квадрупольними лінзами. Ліпіди хроматографічно розділяють з використанням колонки Ascentis Express RP-Amide (50 мм x 2,1 мм, 2,7 мкм, Supelco) в режимі бінарного градієнта із швидкістю потоку 0,2 мл/хвилину. Рухомі фази: А. 10 мМ амонію форміату в суміші Н<sub>2</sub>О/метанол/тетрагідрофуран (50:20:30 об/об/об); В. 10 мМ амонію форміату в суміші Н<sub>2</sub>О/метанол/тетрагідрофуран (5:20:75, об/об/об). Переліки для моніторингу множинних реакцій (ММР) базуються на наступних основних жирних кислотах: 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4, 20:1, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5, 22:6, з використанням енергії зіткнення 30 В і фрагментора 60 В. Окремі ТАГ у відповідності до ММР були ідентифіковані на базі амонізованого іона-прекурсора, утвореного в результаті втрати нейтральних частинок 22:6. ТАГ кількісно визначали із застосуванням 10 мкМ тристеарину як зовнішнього стандарту.

Визначення профілю ліпідів за допомогою РХ-МС

Екстраговані загальні ліпіди були проаналізовані із застосуванням РХ серії Agilent 1200, сполученого з пристроєм для іонізації електророзпиленням (Agilent, Пало-Альто, Каліфорнія, США). Інжекцію 5 мкл кожного екстракту загальних ліпідів розділяли хроматографічно за допомогою ВЕРХ колонки Ascentis Express RP-Amide 50 мм x 2,1 мм, 2,7 мкм (Sigma-Aldrich, Касл-Хіл, Австралія) із застосуванням бінарного градієнта із швидкістю потоку 0,2 мл/хв. Рухомі фази: А. 10 мМ амоній форміату в Н<sub>2</sub>О:метанолі:тетрагідрофурані (50:20:30, об/об/об.); В. 10 мМ амоній форміату в Н<sub>2</sub>О:метанолі:тетрагідрофурані (5:20:75, об/об/об). Вибрані нейтральні ліпіди (ТАГ і ДАГ) і фосфоліпіди (ФЛ, зокрема ФХ, ФЕ, ФІ, ФС, ФА, ФГ) були проаналізовані за допомогою моніторингу множинних реакцій (ММР) із застосуванням енергії зіткнення 30 В і енергії фрагментації 60 В. Нейтральні ліпіди досліджували щодо 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 С<sub>16</sub>, С<sub>18</sub>, С<sub>20</sub> і С<sub>22</sub> з подвійними зв'язками 0-3, 0-4, 0-5, 4-6, відповідно.

Окремі ММР ТАГ були ідентифіковані на базі амонізованого іону-прекурсора та іону продукту, утвореного внаслідок 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 із застосуванням 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, 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

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 нагвинчуваною кришкою. 0,05 мг тригептадеканоїну, розчиненого в 0,1 мл толуолу, додають у флакон як внутрішній стандарт.

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

Площу піку окремого МЕЖК спочатку коректують на базі відповіді у вигляді площі піку відомої кількості таких же МЕЖК, присутніх в комерційному стандарті GLC-411 (NU-CHEK PREP, INC., США). GLC-411 містить рівні кількості 31 жирної кислоти ( % мас.), в інтервалі від С8:0 до С22:6. У випадку жирних кислот, які відсутні в стандарті, винахідники використовували відповіді у вигляді площі піку найбільш подібного МЕЖК. Наприклад, відповідь у вигляді площі піку МЕЖК 16:1d9 використовували для 16:1d7, і відповідь МЕЖК С22:6 використовували для С22:5. 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.

5 Аналіз вмісту стеролів у зразках олії

Зразки близько по 10 мг олії, разом з доданою аліквотою C24:0 монолу як внутрішнього стандарту, обмилують за допомогою 4 мл 5 % розчину КОН у 80 % MeOH і нагрівання до 80 °C, витримуючи протягом 2 годин при цій температурі, у вкритій Тефлоном скляній пробірці з нагвинчуваною 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)трифлуорацетаміду (БСТФА) при нагріванні до 80 °C, витримуючи протягом 15 2 годин при цій температурі.

Для аналізу стеролів методом ГХ/ГХ-МС, похідні стерол-О-триметилсилілу (стерол-OTMSi) сушать в потоку газоподібного азоту на термоблоці при 40 °C, і далі повторно розчиняють у хлороформі або гексані безпосередньо перед аналізом методом ГХ/ГХ-МС. Похідні стерол-OTMS аналізують газовою хроматографією (ГХ) за допомогою газового хроматографа Agilent Technologies 6890A GC (Пало-Альто, Каліфорнія, США), обладнаного капілярною колонкою з кварцового 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 °C. Після інжекції температуру печі підвищують до 270 °C із швидкістю 10 °C/хвилину, і в кінці до 300 °C із швидкістю 5 °C/хвилину. Площу піків визначають за допомогою програмного забезпечення Agilent Technologies ChemStation (Пало-Альто, Каліфорнія, США). Результати ГХ містять помилку  $\pm 5$  %, 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 утримання з одержаними для автентичних і лабораторних стандартів. Повну методику холостого аналізу виконують паралельно із серією зразків.

#### Умови ЗТ-ПЛР

Ампліфікацію методом ПЛР із зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР) звичайно здійснюють з використанням системи ЗТ-ПЛР Superscript III One-Step (Invitrogen) в об'ємі 25 мкл, з використанням 10 пмоль прямого праймера і 30 пмоль зворотного праймера, MgSO<sub>4</sub> 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 °C протягом 30 хвилин для виникнення зворотної транскрипції; потім 1 цикл при температурі 94 °C протягом 2 хвилин, і далі 40 циклів з температурою 94 °C протягом 30 секунд, 52 °C протягом 30 секунд, 70 °C протягом 1 хвилини; потім 1 цикл при температурі 72 °C протягом 2 хвилин перед охолодженням реакційних сумішей до 5 °C.

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 за генетичними конструкціями, описаними 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 °C протягом 1 години, і потім охолоджують перед додаванням в кожну пробірку 187 мкл 6 М амонію ацетату (4 °C) 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.

5 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.

10 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.

20 У одній реакції ампліфікації гена-мішені, в ході якої виявляли ген селекційного маркера ФТТ для скринінгу всіх трансгенних рослин, смисловий праймер являв собою Can17, atacaagcacggtgatgg (SEQ ID NO: 53); антисмисловий праймер, Can18 tggctaacaggcttaggagga (SEQ ID NO: 54); зонд, PPT-P3 5'-FAM/tggcgaaga/zen/gatttcgagcttcctgc/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 шаблононо 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.

30 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 °С, 10 хвилин, підйом із швидкістю 2,5 °С/с; потім 39 циклів при 94 °С, 30 з підйомом із швидкістю 2,5 °С/с; 61 °С, 1 хвилина, підйом із швидкістю 2,5 °С/с; 98 °С, 10 хвилин, з подальшим охолодженням до 12 °С. 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 флуорофору (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 М) до насичення, на яке вказувала поява стійкої мутності.

Пропідію йодид (ПІ) 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 ПІ 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/ПІ 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 ПІ, мав червоний колір під флуоресцентним мікроскопом, тоді як життєздатний пилок при фарбуванні ПІ і ФДА мав яскраво-зелений колір.

Приклад 2. Стабільна експресія трансгенного шляху ДГК в насінні *Camelina sativa*

Бінарний вектор rJP3416-GA7 (див. Фіг. 2 і SEQ ID NO:1) вводять у штам *A. tumefaciens* AGL1, і клітини з культури трансформованої *Agrobacterium* використовують для обробки квітучої рослини *C. sativa*, із застосуванням способу занурення квіток для трансформації (Lu and Kang, 2008). Після вирощування і дозрівання рослин, урожай насіння T<sub>1</sub> з оброблених рослин збирають, висівають в ґрунт, і одержані в результаті рослини обробляють шляхом обприскування гербіцидом BASTA для селекції трансгенних рослин, що експресують ген селекційного маркера bar на Т-ДНК rJP3416-GA7. Рослини T<sub>1</sub>, що вижили і є толерантними до гербіциду, вирощують до стану зрілості після того, як їм дають можливість самозапліднення, і збирають урожай насіння T<sub>2</sub>, 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. 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 T<sub>2</sub> даної рослини, і склад жирних кислот проаналізований методом ГХ. Дані щодо складу жирних кислот індивідуального насіння для даної трансформованої лінії також наведені в Табл. 4. Компільовані дані з профілів (Табл. 4) загального ліпиду насіння наведені в Табл. 5.

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 гемізиготності 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 4

Склад жирних кислот загальних ліпідів насіння з трансгенного насіння T<sub>2</sub> *Camelina sativa*, трансформованих Т-ДНК з rJP3416-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
18:1Δ11	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
20:1Δ11	5,3	4,4	4,6	4,8	3,3	4,1	3,5	4,4	6,1	5,8	5,5

Жирна кислота	Пул FD5.46	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
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 5

Компільовані дані з профілів загального ліпиду насіння для трансгенного насіння, наведеного в Табл. 5. Обчислення не включають «незначних жирних кислот», включених в Табл. 5.

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
Загальні нові ω6 ( % 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 ω3/ω6	7,36	8,41	15,00	15,36	18,60	15,20	10,00				0,05
Співвідношен- ня нових ω6/ω3	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 %

Параметр	Пул FD5.46	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
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 поліненасичені жирні кислоти	62,5	66,6	66,4	65,6	67,7	65,6	65,1	63	63,1	62,5	63,2
Загальні C20	9,6	9,3	9,8	9,9	8,1	8,9	8,5	8,6	11	10,3	10,1
Загальні C22	5,4	10,3	10	9,7	9,4	8,3	5,7	0,6	0,9	0,7	0,7
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.
- 5 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 MC *in vitro* разом із
- 10 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
- 15 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
- 20 вмістом ДГК від кожної конструкції виявив тільки 1,2-1,4 % ГЛК за відсутності інших нових  $\omega 6$  РНЖК. І навпаки, було знайдено, що нові  $\omega 3$  ПНЖК (СДК)  $\omega 3$  ДЦ-ПНЖК (ЕТК, ЕПК, ДПК, ДГК) акумулюються до 18,5 % при рівні ДНК 9,6 % у загальному вмісті жирних кислот. Ступінь  $\Delta 6$ -десатурації становив 32 %, і вміст ЕПК становив 0,8 % від загального вмісту жирних кислот. Ефективність  $\Delta 5$ -десатурації становила 93 %, і ефективність  $\Delta 6$ -елонгації становила 60 %. ДГК була знайдена у полярній фракції ліпідів насіння ліній GA7.
- 25 Було відзначено, що спостережувані співвідношення сегрегації (від  $\sim 3:1$  до  $\sim 15:1$ ) вказують на те, що один або максимум два трансгенних локуси були необхідними для продукування ДГК у *C. sativa* на рівнях, подібних до рівнів у риб'ячому жирі. Це має важливе значення для простоти розведення трансгенної ознаки, а також для стабільності трансгену.
- Гомозиготне насіння висаджують в декілька теплиць, з метою одержання сумарно понад 600
- 30 індивідуальні рослини. Олію екстрагують з насіння із застосуванням різноманітних способів, зокрема, апарату Сокслета, екстракції ацетоном і гексаном.
- Здійснювали  $^{13}\text{C}$  ЯМР аналіз регіоспецифічності для олії насіння трансгенної *C. sativa* із метою визначення позиційного розподілу  $\omega 3$  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 3). Одержана більша кількість трансформантів, та ідентифіковані гомозиготні лінії, які продукують ДГК в кількості більше 20,1 %.

Приклад 3. 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 і були сконструйовані з метою подальшого підвищення синтезу ДГК в насінні рослин, особливо шляхом покращення функцій Δ6-десатурази і Δ6-елонгази. Спостерігалася акумуляція СДК в деякому насінні, трансформованому конструкцією GA7, внаслідок відносно низької ефективності 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 Sbfl 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 за трансгенами, 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 *B. napus* 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 відкинуті; близько 25 % рослин T0 було відкинуто 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 відкинуті.

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 відкинуті. Деякі з них були позначені як лінії CT132-5 (сорт Oscar), CT133.15-15, -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 набухання 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'ядолі 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. 6. 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 трансгену, 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 Т2), одержаного від кожної з множини рослин Т1 після самозапилення, від відібраних трансформованих ліній, індивідуально тестували щодо складу жирних кислот. Було ідентифіковане насіння, що містить рівні ДГК вище 20 % (Табл. 7). 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 Т2 від кожної із рослин Т1 тестували щодо складу жирних кислот. Насіння, що містило до 34,3 % ДГК, було ідентифіковане, наприклад, серед насіння СТ136-27-47-25 (Табл. 9). Склад жирних кислот для олії з насіння, одержаної із СТ136-27-47-25, наведений у Табл. 9. 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  $\omega 6$ -С20 або -С22 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 Т2, схрещували і забезпечували самозапилення потомства F1, щоб одержати потомство F2, гомозиготні по множинним інсерціям 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  $^{13}\text{C}$  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 Δ6-елонгації у цьому насінні (66 % проти 60 % і 61 %), хоча кількість СДК фактично збільшувалася унаслідок дещо активнішої Δ6-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. parvus* 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 було вивчено питання щодо того, чи спричинено це інактивацією гена Δ4-десатурази у конкретній інсерційній Т-ДНК в результаті спонтанної мутації. Аналіз методом ПЛР і секвенування ДНК показав присутність делеції, що була визначена як видалені нуклеотиди 12988-15317 Т-ДНК мотиву GA7-modB (SEQ ID NO: 2). Видалені нуклеотиди відповідають частині промотору *Linus Cnl2*, який спрямовує експресію ділянки кодування Δ4-десатурази, а також самої по собі ділянки кодування Δ4-десатурази, пояснюючи, чому насіння, що є трансформованим Т-ДНК і містить делецію, не продукувало ДГК.

Близько 50 насінин T1 від даної трансгенної лінії проростили, та із кожної проаналізували один котиледон, 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. 8, причому у цих лініях спостерігалось більш ніж 7 % ДПК. Насіння T4 було одержане від лінії СТ-137-2 ДПК *V. parvus* і проаналізоване щодо профілю жирних кислот. До 13 % ДПК спостерігалось в пулі зразків зрілого насіння.

Олію з насіння, що містила близько 10 % ДПК, обробляли м'яким лугом для гідролізу жирних кислот.

Інша трансгенна лінія, позначена B0003-514, демонструвала близько 10-16 % ДПК у насінні T2. Було відібране насіння, що містило 15,8 % ДПК, 0,2-0,9 % ДГК і 0,1-2,5 % ЕПК. Популяція насіння T2 демонструвала співвідношення сегрегації 1:2:1 для високого вмісту : низького вмісту : відсутності ДПК, вказуючи на присутність одинарного генетичного локусу для продукування ДПА у вказаній трансгенній лінії.

Олія була екстрагована за допомогою гвинтового преса із зразків насіння, що продукує ДЛ-ПНЖК, з одержанням в такий спосіб шроту.

#### Дизайн конструкції

Хоча фокус даного експерименту знаходився на демонстрації продукування ДГК і ДПК у видах олійної культури, відзначені вище результати також були цікавими з точки зору перспективи дизайну конструкції. По-перше, перемикання локалізації ділянки, що кодує Δ6- і Δ5-елонгазу в конструкції modF приводить до передбачуваних модифікацій профілю, коли акумулюється більше ЕПК унаслідок нижчого ступеня Δ5-елонгації. Супутнє збільшення ступеня Δ6-елонгації спостерігалось, але не приводило до нижчих рівнів СДК. Це було результатом підвищення ступеня Δ6-десатурації у трансформованому modF насінні, спричиненого додаванням додаткової експресійної касети Δ6-десатурази *M. pusilla*, а також заміною вкороченого промотору напіну (FP1) активнішим промотором конлініну2 льону. Дещо менш виражене підвищення ступеня Δ6-десатурації, спостережуване у разі конструкта modG, було спричинене капіталізацією на касеті Δ5-елонгазі з високою експресією у GA7. Перемикання положень ділянок, що кодують Δ6-десатуразу та Δ5-елонгазу, приводило до вищого ступеня Δ6-десатурації. Активність Δ5-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 рапсу.

Автори винаходу вважали, що, загалом, ефективність обмежуючої швидкості ферментної активності в біохімічному шляху ДГК може бути вищою в мультикопійних Т-ДНК трансформантах, у 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, де подія з найвищим виходом ДГК містила три інсерції Т-ДНК в геномі хазяїна. 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 Δ6-десатуразу, навіть якщо продукується один і той же білок. Наприклад, у rJP3416-GA7-modF і rJP3416-GA7-modC, дві версії Δ6-десатурази *M. pusilla* були

присутні та експресувалися різними промоторами. У кодуєчих 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.

5

Таблиця 6

Склад жирних кислот ліпиду при проростанні трансгенного насіння T1 В. парус, що містить Т-ДНК із конструкції GA7-modB. Ліпіди додатково містили по 0,1-0,3 % кожної з C16:1, C16:3, C24:0 і C24:1, та не містили C20:1Δ11.

Насіння	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω3	C22:0	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:3ω3	22:5n3	C22:6n3
1	0,1	4,2	1,8	29,9	2,5	9,9	0,1	38,4	0,5	0,8	1,0	0,1	2,1	0,3	2,8	0,3	0,1	0,5	3,9
2	0,1	4,7	4,0	23,0	2,3	7,4	0,3	29,3	1,0	4,3	1,1	0,1	1,9	0,4	6,9	1,0	0,0	1,7	9,5
3	0,1	3,7	1,8	55,1	1,9	4,7	0,2	15,2	0,8	1,8	1,4	0,1	0,3	0,5	11,3	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,1	4,6	2,9	22,1	1,8	6,6	0,4	26,5	1,0	7,2	1,0	0,1	0,8	0,5	11,2	1,9	0,0	1,7	8,7
5	0,1	4,0	1,7	27,4	2,1	8,1	0,3	26,4	0,6	2,8	1,0	0,1	1,5	0,3	7,6	1,5	0,0	1,8	12,2
6	0,1	3,5	1,6	59,8	2,0	4,3	0,1	18,5	0,6	0,5	1,3	0,0	0,7	0,3	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	0,1	6,0	1,7	16,6	2,6	23,9	1,0	23,2	0,6	5,4	0,8	0,2	0,6	0,4	2,6	1,1	0,0	1,7	9,9
8	0,1	4,9	2,7	12,9	1,4	11,7	0,3	34,3	0,9	5,0	0,9	0,2	2,4	0,5	4,1	1,3	0,0	1,8	13,8
9	0,1	3,9	2,4	41,6	1,7	21,5	0,0	23,4	0,7	0,0	1,2	0,1	2,2	0,4	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
10	0,1	3,7	2,1	30,9	1,7	19,2	0,4	23,6	0,7	2,1	1,1	0,1	1,5	0,4	3,6	0,6	0,0	0,7	6,9
11	0,1	5,7	3,8	41,2	2,4	26,7	2,1	7,2	1,3	0,3	1,2	0,2	0,3	0,8	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0
12	0,1	4,6	2,4	25,5	1,7	16,1	0,3	28,9	0,8	3,9	1,1	0,1	1,9	0,4	3,9	0,6	0,0	1,1	6,2
13	0,1	4,3	4,2	19,4	1,6	9,2	0,1	45,5	1,0	0,2	1,1	0,1	5,2	0,4	2,6	0,3	0,2	0,4	3,4
14	0,1	6,3	4,0	10,5	2,3	8,4	0,3	31,1	1,3	3,9	0,8	0,1	2,3	0,6	4,6	1,8	0,1	2,5	18,1
15	0,1	5,1	3,3	16,8	2,4	11,2	0,3	28,8	1,0	4,5	0,9	0,1	2,1	0,6	3,2	1,5	0,1	1,8	15,1
16	0,1	4,4	4,0	16,2	1,5	11,6	0,2	33,5	0,9	2,8	1,1	0,2	3,7	0,4	4,6	0,7	0,1	1,3	12,1
17	0,2	7,2	4,9	15,0	2,1	8,9	0,3	25,9	1,4	5,1	0,9	0,0	1,6	0,8	4,9	2,1	0,0	2,2	15,0
18	0,1	4,0	2,3	64,8	1,2	7,2	0,1	12,5	1,0	3,5	1,5	0,1	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Таблиця 7

Склад жирних кислот ліпиду у трансгенному насінні T2 В. парус, що містить Т-ДНК із конструкції GA7-modB.

Зразок (насіння T2)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:0	C22:3ω3	Всього ω3 (%)	Всього ω6 (%)	Співвідношення ω6 до ω3	Загальний вміст ПНЖК (%)
СТ136-27-18-1	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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
СТ136-27-18-17	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	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) і ДПКω6 не були виявлені в жодному із зразків. Крім того, зразки містили 0,1% C14:0, 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, причому деякі зразки містили слідові кількості (< 0,1%) C20:1Δ13, C22:3ω3, C24:0 і C24:1

АРК (C20:4 $\omega$ 6) і ДПК $\omega$ 6 не були виявлені в жодному із зразків. Крім того, зразки містили 0,1% C14:0, 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, причому деякі зразки містили слідові кількості (< 0,1%) C20:1 $\Delta$ 13, C22:3 $\omega$ 3, C24:0 і C24:1

Таблиця 8

Склад жирних кислот ліпиду у трансгенному насінні T2 *B. napus*, трансформованому Т-ДНК із конструкції GA7-modB, з мутацією в гені  $\Delta$ 4-десатуразы. Ліпіди додатково містили близько 0,1% 14:0, 0,2% 16:3, 0,2-0,4% ГЛК, 0,1% 20:1 $\Delta$ 13, 0,3-0,4% 22:0, а АРК, ДРА $\omega$ 6 (22:5 $\omega$ 6), 16:2 і 22:1 не були виявлені.

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1 $\Delta$ 11	C18:2	C18:3 $\omega$ 3	C20:0	C18:4 $\omega$ 3	C20:1 $\Delta$ 11	C20:2 $\omega$ 6	C20:3 $\omega$ 6	C20:3 $\omega$ 3	C20:4 $\omega$ 3	C20:5 $\omega$ 3	C22:2 $\omega$ 6	C22:3 $\omega$ 3	C24:0	C24:1	C22:5 $\omega$ 3	C22:6 $\omega$ 3
СТ-137-2-34	5,3	0,2	3,7	26,8	3,1	12,4	29,1	0,8	2,5	0,8	0,1	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	0,2	4,2	24,4	3,0	12,6	29,4	0,9	2,5	0,8	0,1	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	0,2	4,2	24,1	3,1	11,9	31,0	0,9	2,4	0,9	0,1	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	0,2	4,6	22,3	3,4	12,3	34,5	1,0	2,0	0,8	0,1	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	0,2	3,9	25,7	3,4	12,9	27,8	0,9	2,6	0,8	0,1	0,0	1,0	1,9	0,9	0,0	0,1	0,2	0,1	11,0	0,0

Таблиця 9

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

C16:0	C18:0	C18:1 $\Delta$ 9	C18:1 $\Delta$ 7	C18:2 $\omega$ 6	C18:3 $\omega$ 6	C18:3 $\omega$ 3	C20:0	C18:4 $\omega$ 3	C20:1 $\omega$ 9c	C20:2 $\omega$ 6 + C21:0	C20:3 $\omega$ 3	C20:4 $\omega$ 3	C20:5 $\omega$ 3	C22:5 $\omega$ 6	C22:5 $\omega$ 3	C22:6 $\omega$ 3
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 $\omega$ 6; не містили C22:1 і C22:2 $\omega$ 6; містили 0,1% C24:0 і 0,2% C24:1, 2,6% інших жирних кислот.

Приклад 4. 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 °С 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 етеру 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. 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).

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 часопротіною (Q-TOF) МС/МС

Приклад 5. 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 етеру (OTMSi-етер), 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 $\beta$ (Н)-холан-24-олу. Базова структура фітостерину і хімічна структура деяких з ідентифікованих стеролів проілюстровані на Фіг. 3 і в Табл. 10.

Аналізували рослинні олії: кунжуту (*Sesamum indicum*), оливи (*Olea europaea*), соняшнику (*Helianthus annuus*), рицини (*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:  $\beta$ -ситостерол (інтервал 28-55 % від загального вмісту стеролів),  $\Delta^5$ -авенастерол (ізофукостерол) (3–24 %), кампестерол (2–33 %),  $\Delta^5$ -стигмастерол (0,7–18 %),  $\Delta^7$ -стигмастерол (1–18 %) і  $\Delta^7$ -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 не ідентифікованих стеролів, але через дуже низький їх вміст, мас-спектри не були достатньо інтенсивними, щоб дозволити ідентифікацію їх структури.

Таблиця 10

Назви за ІЮПАК / систематичні назви ідентифікованих стеролів

Стерол №	Загальна назва(и)	ІЮПАК/систематична назва
1	холестерин	холест-5-ен-3 $\beta$ -ол
2	брасікастерол	24-метилхолеста-5,22Е-дієн-3 $\beta$ -ол
3	чалінастерол / 24-метилхолестерин	24-метилхолеста-5,24(28)Е-дієн-3 $\beta$ -ол
4	кампестерол / 24-метилхолестерин	24-метилхолест-5-ен-3 $\beta$ -ол
5	кампестанол / 24-метилхолестанол	24-метилхолестан-3 $\beta$ -ол
7	$\Delta^5$ -стигмастерол	24-етилхолеста-5,22Е-дієн-3 $\beta$ -ол
9	ергост-7-ен-3 $\beta$ -ол	24-метилхолест-7-ен-3 $\beta$ -ол
11	ебурикол	4,4,14-триметилергоста-8,24(28)-дієн-3 $\beta$ -ол
12	$\beta$ -ситостерол / 24-етилхолестерин	24-етилхолест-5-ен-3 $\beta$ -ол
13	$\Delta^5$ -авенастерол / ізофукостерол	24-етилхолеста-5,24(28)Z-дієн-3 $\beta$ -ол
19	$\Delta^7$ -стигмастерол / стигмаст-7-ен-3 $\beta$ -ол	24-етилхолест-7-ен-3 $\beta$ -ол
20	$\Delta^7$ -авенастерол	24-етилхолеста-7,24(28)-дієн-3 $\beta$ -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. 11.

Загалом, серед усіх зразків олії з насіння основним фітостерином був  $\beta$ -ситостерол (інтервал 30–57 % від загального вмісту стеролів). Для олій спостерігався широкий інтервал частки інших основних стеролів: кампестерол (2–17 %),  $\Delta^5$ -стигмастерол (0,7–18 %),  $\Delta^5$ -

авенастерол (4–23 %),  $\Delta^7$ -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  $\Delta^7$ -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 6. Збільшення акумуляції ДГК і ДПК 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, переважно ДГК/КоА та/або ДПК/КоА, особливо ті, що можуть використовувати як ДГК-КоА, так і ДПК-КоА як субстрати, що приводить до збільшення інсерції поліненасиченого ланцюга C22 в положенні sn-2 ЛФХ з утворенням ФХ, відносно ендегенного 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 ФХ, на протилежність ЛФКАТ1 з того ж виду, яка не може утилізувати субстрат C22 (Brown et al., 2002).

Таблиця 11

Вміст і склад стеролів у проаналізованих рослинних оліях

Загальна назва стеролу	Кунжут	Олива	Соняшник	Рицина	Рапс	Сафлор	Арахіс	Льон (насіння льону)	Соя
холестерин	0,2	0,8	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2
брасікастерол	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0
чалінастерол / 24-метиленхолестерин	1,5	0,1	0,3	1,1	2,4	0,2	0,9	1,5	0,8
кампестерол / 24-метилхолестерин	16,2	2,4	7,4	8,4	33,6	12,1	17,4	15,7	16,9
кампестанол / 24-метилхолестанол	0,7	0,3	0,3	0,9	0,2	0,8	0,3	0,2	0,7
C29:2*	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,5	0,0	1,2	0,1
$\Delta^5$ -стигмастерол	6,4	1,2	7,4	18,6	0,7	7,0	6,9	5,1	17,6
невідомий	0,5	1,3	0,7	0,8	0,7	0,7	0,4	0,7	1,3
ергост-7-ен-3 $\beta$ -ол	0,1	0,1	1,9	0,2	0,4	2,7	1,4	1,4	1,0
невідомий	0,0	1,3	0,9	1,2	0,9	1,8	1,2	0,7	0,7
ебурикол	1,6	1,8	4,1	1,5	1,0	1,9	1,2	3,5	0,9
$\beta$ -ситостерол / 24-етилхолестерин	55,3	45,6	43,9	37,7	50,8	40,2	57,2	29,9	40,2
$\Delta^5$ -авенастерол / ізофукостерол	8,6	16,9	7,2	19,3	4,4	7,3	5,3	23,0	3,3
тритерпеновий спирт	0,0	2,4	0,9	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,9
тритерпеновий спирт	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0
$\Delta^7$ -стигмастерол / стигмаст-7-ен-3 $\beta$ -ол	2,2	7,1	9,3	2,3	0,9	10,5	1,1	7,9	5,6
$\Delta^7$ -авенастерол	1,3	0,1	4,0	0,6	0,2	2,0	0,7	0,4	0,6

Загальна назва стеролу	Кунжут	Олива	Соня- шник	Рицина	Рапс	Са- флор	Арахіс	Льон (насіння льону)	Соя
Загальний вміст стеролів (мг/г олії)	5,8	2,4	4,1	1,9	6,8	3,2	3,2	4,8	3,0

C29:2\*позначає стерол C29 із двома подвійними зв'язками.

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 *Limnanthes 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 *Limnanthes 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 листя *N. benthamiana*. Розкрита в цьому документі послідовність-кандидат продемонструвала активність ЛФКАТ.

Ряд кандидатів на ЛФКАТ був вирівняний з відомим ЛФКАТ на філогенетичному дереві. 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 та/або ДПК-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 *Limnanthes alba*); 35S:Sacce-Slc1p (ЛФКАТ *S. cerevisiae*); 35S:Micpu-ЛФКАТ (ЛФКАТ *Micromonas pusilla*); 35S:Moral-ЛФКАТ1 (ЛФКАТ *Mortierella alpina*); 35S:Brana-LPAAT1.13 (*Brassica napus* ЛФААТ1.13); 35S:Brana-LPAAT1,5 (*Brassica napus* ЛФААТ1,5). Конструкції 35S:p19, що не містять екзогенної ЛФКАТ, використовували у експерименті як контроль: його включали до кожної інокуляції *N. benthamiana*. 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 ендogenous ферменти для синтезу ЛФК. Реакційні суміші одержували *in vitro*, окремо додаючи до лізатів мічені  $^{14}\text{C}$  ОК і ДГК. Реакційні суміші інкубують при 25 °C, і рівень інкорпорації мічених  $^{14}\text{C}$  жирних кислот у ФК визначають за методом ТШХ. Обчислювали здатність кожної ЛФКАТ використовувати ДГК відносно АРК і жирних кислот C18. 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 (pLuCn12). Одержані в результаті генетичні конструкції, що містять химерні гени Cn12Arath-ЛФКАТ (негативний контроль), Cn12:Limal-ЛФКАТ, Cn2:Sacce-Slc1p, і Cn12Moral-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 *V. parus* і *C. sativa*, які вже містять конструкцію GA7 та її варіанти (Приклади 2 і 3), з метою одержання потомства, що несе материнські і ЛФКАТ генетичні конструкції. Протестоване збільшення інкорпорації ДГК та/або ДПК 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, спостережану в насінні *Arabidopsis*, як розкрито у Прикладі 2.

Специфічну для насіння конструкцію pCln2: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 pCln2: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. 12). 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 pCln2:Moral-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<sub>2</sub>, 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 етеру/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 естери 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 трансгеном, 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. 13). Аналогічні результати одержані для насіння *V. parus*

і *B. juncea*, трансформованого як Т-ДНК із конструкції GA7-modB, так і геном, що кодує ЛФААТ, і продукуючого ДГК, а також для насіння *B. napus* і *B. juncea*, що продукує ДПК.

- 5 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  $^{14}\text{C}$ -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 25°C, і рівні інкорпорації мічених  $^{14}\text{C}$  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
- 10 для одержання трансформованих ДГК-продукуючих рослин рапсу і насіння.

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.

Таблица 12

Склад жирних кислот (% від загальних жирних кислот) трансгенного насіння *A. thaliana*, трансформованого конструкцією ЛФААТ1, а також Т-ДНК із конструкції GA7 для продукування ДГК. C20:4 $\omega$ 6 у насінні не була виявлена. Крім того, насіння містило 0,3-0,9% C22:0 і 0,4-1,5% C22:1.

	C16:0	C18:0	C18:1	18:1 $\Delta$ 11	C18:2	C18:3 $\omega$ 6	C18:3 $\omega$ 3	C20:0	18:4 $\omega$ 3	20:1 $\Delta$ 11	20:1 $\Delta$ 13	C20:2 $\omega$ 6	C20:3 $\omega$ 3	C20:4 $\omega$ 3	C20:5 $\omega$ 3	22:5 $\omega$ 3	C22:6 $\omega$ 3
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	0,9	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	1,1	1,1	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	1,9	1,4	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	1,9	0,8	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	0,9	0,8	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	1,2	0,5	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	1,6	1,3	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	1,2	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	1,6	0,7	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	1,3	0,9	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	2,0	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	1,2	1,1	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	1,7	1,5	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	1,8	1,2	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	1,8	0,8	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	1,5	0,9	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	1,9	1,2	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	0,9	0,6	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	1,4	0,6	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	1,9	1,1	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	1,7	0,8	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	1,7	1,3	1,0	5,5	6,1

Таблиця 13

Присутність ДГК в положенні sn-2 ТАГ або в загальній олій трансгенного насіння *A. thaliana*, трансформованого геном Cn12:Moral-ЛФААТ, а також Т-ДНК із конструкта GA7, яка демонструє позиційний розподіл ДГК у ТАГ. Крім того, у складі жирних кислот ТАГ і sn-2 МАГ було присутнє 0-0,4% кожної з 14:0, 16:1 $\omega$ 13t, 16:2, 16:3, 22:0 і 24:0. У насінні не були виявлені C20:3 $\omega$ 6, C20:4 $\omega$ 6.

Зразок	C16:0	C16:1 $\Delta$ 9	C18:0	C18:1	C18:1 $\Delta$ 11	C18:2	C18:3 $\omega$ 6	C18:3 $\omega$ 3	C20:0	C18:4	C20:1 $\Delta$ 11	C20:1 $\Delta$ 13	C20:2 $\omega$ 6	C20:3 $\omega$ 3	C20:4 $\omega$ 3	C22:1	C20:5 $\omega$ 3	C22:5 $\omega$ 6	C22:4 $\omega$ 3	C22:5 $\omega$ 3	C22:6 $\omega$ 3
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	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	0,3	0,2	0,0	3,8		0,0	2,3	9,1
ДГК у 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		0,7	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	0,4	0,2	0,0	2,1		0,1	1,3	6,7
ДГК у sn-2 = 19%																					
Додатково трансформовані геном, що кодує ЛФААТ <i>Mortierella alpina</i> :																					
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	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	1,6	0,6	0,1	0,8	0,1	0,2	1,6	17,8
ДГК у 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	1,9	0,7	0,6	0,9	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	1,5	0,6	0,1	0,9	0,0	0,2	1,6	16,7
ДГК у sn-2 = 37%																					

#### Приклад 7. 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  $\omega$ 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
- 15 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 ділільних лійок і чотири рази екстрагували із застосуванням загального об'єму 800 мл гексану, включаючи статичну
- 20 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
- 25 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
- 30 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
- 35 способом Christie et al. (1982) з одержанням метилових естерів 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.

5 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 екстрагованого шроту 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 фітостерини і жирні спирти, що можуть бути присутніми у вільній неестерифікованій формі або можуть бути естерифіковані жирними кислотами. Крім того, будь-які етери стеролів або етери воску і вуглеводні, такі як каротиноїди, наприклад,  $\beta$ -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. 14).

10 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

30 Класи ліпідів у гексанових і ХМ екстрактах були проаналізовані тонкошаровою хроматографією з виявленням за допомогою плазмово-іонізаційного детектора (ТШХ-ПІД; *latroscan Mark V*, *Iatron Laboratories*, Токіо, Японія), із застосуванням гексану/діетилового етеру/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.

40 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 етеру 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.

50 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. 14). 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 фосфатидилсерину (ФС, < 2 %). Існують процедурні переваги при поданні відповіді на кінцевий Висновок експерта до 7 липня 2015 року.

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.

5 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, Белефонт, Пенсільванія, США), ПІД, інжектором з розщепленням/без розщеплення, аутосемплером Agilent Technologies серії 10 7683В 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 15 індивідуальних сполук.

Таблиця 14

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: етери стеролів (ЕС), етери 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. 20 Індивідуальні компоненти були ідентифіковані із застосуванням даних мас-спектру і порівнянням часу утримання з одержаним для аутентичних і лабораторних стандартів. 25 Холостий аналіз за повною методикою проводили паралельно із серією зразків.

Дані складу жирних кислот у різних класах ліпідів в екстрактах наведені у Табл. 15. У ДГК-продукуючому 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. 15). 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, 18:2ω6), 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 (22:1ω9) був нижчим у всіх фракціях із трансгенного насіння, ніж в контрольному насінні, наприклад, 1,3 % проти 2,7 % у гексанових екстрактах (Табл. 15).

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 обмилювали із застосуванням 4 мл 5 % КОН у 80 % MeOH і нагрівали протягом 2 годин при 80 °С у вкритій тефлоном скляній пробірці із нагвинчуальною 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)трифлуорацетаміду (БСТФА, Sigma-Aldrich), нагріваючи протягом 2 годин при 80 °С у закупореному ГХ флаконі. В такий спосіб вільні гідроксильні групи перетворювали на їх триметилсилілові етери. 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 15

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 %), холест-7-ен-3β-ол, (0,2 %–0,5 %), 24-метилхолестанол (кампестанол, 0,4 %–1 %) і 24-дегідрохолестерин (0,5 %–2 %) (Табл. 16). 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 з насіння 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 Δ15-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 %).

Таблица 16

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-3β-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
Сигмастерол	1,0	2,6	0,5	1,6
Ситостерол	54,3	43,7	53,8	42,9
Δ5-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 характерним стеролом, знайденим у родині Brassicaceae, що включає *Camelina sativa*.

Приклад 8. Продукування ДЛ-ПНЖК у насінні *Brassica juncea*

Трансгенні рослини *Brassica juncea* одержували із застосуванням конструкції GA7-modB (Приклад 3) 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 і Skoog, 1962), затверділих з 0,8 % агару, з корекцією рН до 5,8, і вирощували при 24 °С і флуоресцентному освітленні (50 мкЕ/м²с) з фотоперіодом 16/8 години (світло/темрява) протягом 6-7 днів. Черешки котиледонів 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 котиледонних 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 AgNO<sub>3</sub>, 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 AgNO<sub>3</sub>, 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 AgNO<sub>3</sub>, 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 AgNO<sub>3</sub>, 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 AgNO<sub>3</sub>, 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 °С. Були одержані три підтверджені трансгенні рослини. Трансформовані рослини вирощували у теплиці, дозволяли їм самозапилюватися і збирали урожай насіння Т1. Склад жирних кислот ліпиду аналізували в пулах насіння Т1 від кожної із трансформованих рослин Т0, 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 Т1 проаналізували щодо складу жирних кислот; частина даних наведена у Табл. 17. Декілька насінин Т1 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 Т1 містили ДПК на рівнях від 10 % до близько 18 % від загального вмісту жирних кислот, за відсутності ДГК, що піддавалася б виявленню (< 0,1 %). Автори винаходу зробили висновок про те, що ген Δ4-десатурази у Т-ДНК, вставлений в цих рослинах, інактивувався, можливо внаслідок спонтанної мутації, подібної до описаної у Прикладі 2. Насіння Т1 пророщували, і один котиледон, 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 за обома інсерціями 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 за обома інсерціями Т-ДНК, буде продукувати до 35 % ДГК і ДПК.

Близько 18 % ДПК спостерігалось в ліпіді пулу насіння потомства T3, позначеного JT1-4-34-11. Так само, близько 17,5 % ДГК спостерігалось в ліпіді пулу насіння потомства T3 JT1-4-17-20. Склад жирних кислот пулу насіння JT1-4 T1, одиничного насіння T1, пулу насіння T2, одиничного насіння T2 і пулу насіння T3, одиничного насіння T3 наведений у Табл. 18–21. JT1-4 T3 сегрегант JT-1-4-34-11 містив у пулі насіння T3 18 % ДПК, і одиничне насіння від даного конкретного сегреганту 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 %.

Для одержання більшої кількості трансгенних рослин *B. juncea* з конструкцією modB, трансформацію повторювали п'ять разів, і регенерували 16 передбачуваних трансгенних пагонів/саджанців. Провели аналіз насіння T1, щоб визначити вміст ДПК і ДГК.

З метою одержання іншого насіння, що містить ДПК і не містить ДГК, генетична конструкція, що являла собою варіант конструкції modB без гена  $\Delta 4$ -десатурази, була одержана наступним чином. Були синтезовані два фрагменти ДНК, фрагмент ЕПК-ДПК 1 і фрагмент ЕПК-ДПК 2 (Geneart, Німеччина) з придатними рестрикційними сайтами. Проміжний клонуючий вектор, pJP3660, було одержано клонуванням фрагменту AatII-MluI фрагменту ЕПК-ДПК 1 у сайти AscI-AatII вектора, позначеного як 11ABHZHC\_GA7-frag\_d6D\_pMS, причому даний вектор раніше застосовували при конструюванні GA7-modB, що містить касету  $\Delta 6$ -десатурази. Далі одержували pJP3661 клонуванням фрагмента PmeI-PspOMI pJP3660 у сайти PmeI-PspOMI modB. Після цього збирали вектор ДПК, pJP3662 (Фіг. 4), шляхом клонування фрагменту BsiWI-PspOMI фрагменту ЕПК-ДПК 2 у сайти BsiWI-PspOMI pJP3661. Даний вектор містив гени біосинтезу жирних кислот, що кодують ферменти, які перетворюють олеїнову кислоту на DPA $\omega 3$  і відповідну  $\omega 6$  жирну кислоту. Одержану в результаті конструкцію застосовували для трансформації *B. juncea* і *B. napus*. Одержано насіння потомства, що містить до 35 % ДПК у загальному вмісті жирних кислот в ліпіді насіння.

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 17

Склад жирних кислот в олії насіння із насіння T1 B. juncea, трансформованих Т-ДНК зі GA7.

Насіння T1 №	C16 :0	:1Δ 9	C18 :0	C18 :1	18:1 Δ11	C18 :2	C18 :3ω 6	C18 :3ω 3	C20 :0	C18 :4ω 3	20:1 Δ11	C20 :2ω 6	C20 :3ω 3	C20 :4ω 3	C20 :5ω 3	C22 :5ω 3	C22 :6ω 3
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
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-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-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

Зразки олії з насіння додатково містили 0,1 % C14:0; 0,1-0,2 % C16:3; 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 18

Склад жирних кислот ліпиду з насіння T1 (пул) B. juncea, трансформованого Т-ДНК з GA7-modB.

Ліпіди додатково містили близько 0,1 % кожної з 14:0, 16:3, 20:1Δ13 і 16:2, а 22:1 не була виявлена.

Насіння	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω6	C20:4ω6	C20:5ω3	C22:0	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:2ω6	C22:3ω3	C24:0	C24:1	C22:5ω3	C22:6ω3
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	<b>2,8</b>	<b>7,2</b>
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	<b>2,6</b>	0,0

Таблиця 19

Склад жирних кислот олії з насіння Т1 (одиночного) В. јупсеа, трансформованого Т-ДНК із GA7-modB.

Насіння Т1 №	C16 :0	C16 :1Δ <sub>9</sub>	C18 :0	C18 :1	18:1 Δ11	C18 :2	C18 :3ω <sub>6</sub>	C18 :3ω <sub>3</sub>	C20 :0	C18 :4ω <sub>3</sub>	20:1 Δ11	C20 :2ω <sub>6</sub>	C20 :3ω <sub>3</sub>	C20 :4ω <sub>3</sub>	C20 :5ω <sub>3</sub>	C22 :5ω <sub>3</sub>	C22 :6ω <sub>3</sub>
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
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 20

Склад жирних кислот олії з одиничного насіння T2 B. juncea, трансформованого T-ДНК з GA7-modB. Ліпіди додатково містили 0,1-0,2 % C16:1Δ9, C16:3 і C20:2ω6, 0,5-0,6 % C20:0, не містили C20:3ω6, C20:4ω6 і C22:2ω6

Насіння №	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C18:4	C20:1Δ11	C20:3ω3	C22:0	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:3ω3	C24:0	C22:5ω6	C22:4ω3	C24:1	22:5ω3	C22:6ω3
1	4,4	1,7	36,3	2,9	8,3	0,5	22,0	1,4	1,2	0,4	0,3	4,2	0,6	0,1	0,1	0,0	1,8	0,3	12,1	0,0
2	5,6	1,9	39,1	3,1	8,4	0,4	18,9	1,2	1,3	0,5	0,3	2,5	0,4	0,1	0,2	0,0	1,5	0,4	12,6	0,0
3	5,5	1,8	42,3	3,2	9,9	0,3	24,0	5,9	1,5	0,2	0,4	0,5	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,4	1,5	0,0
4	5,6	1,5	36,8	3,7	9,4	0,3	19,6	0,6	1,4	1,4	0,3	1,9	0,3	0,2	0,2	0,0	1,6	0,4	13,1	0,0
5	4,6	1,7	36,3	2,7	7,2	0,3	22,6	1,0	1,5	0,7	0,3	2,1	0,3	0,1	0,2	0,0	2,2	0,3	14,4	0,0
6	4,9	1,8	38,3	3,1	7,4	0,3	20,2	0,8	1,3	0,8	0,3	2,7	0,5	0,2	0,2	0,0	1,7	0,3	13,7	0,0
7	4,7	1,7	36,2	3,0	8,2	0,4	20,9	0,7	1,3	0,9	0,3	2,9	0,5	0,2	0,2	0,0	2,0	0,3	14,2	0,0
8	4,8	2,2	41,0	3,0	9,8	0,2	27,0	4,2	1,8	0,3	0,3	0,5	0,0	0,1	0,2	0,0	0,7	0,3	2,2	0,0
9	5,8	1,7	36,6	3,7	9,1	0,3	21,3	0,9	1,4	0,8	0,3	1,5	0,3	0,1	0,2	0,0	1,2	0,4	12,7	0,0
10	4,8	2,1	47,1	2,9	7,4	0,2	23,9	4,8	1,7	0,2	0,3	0,5	0,0	0,0	0,2	0,0	0,5	0,3	1,5	0,0
11	5,1	1,7	37,4	3,3	7,7	0,3	20,7	0,9	1,4	0,8	0,3	2,5	0,4	0,1	0,2	0,0	1,6	0,4	13,6	0,0
12	4,7	1,8	37,3	2,7	7,9	0,4	20,6	1,1	1,3	0,5	0,3	4,3	0,6	0,1	0,1	0,0	2,2	0,3	12,3	0,0
13	4,9	2,0	37,9	3,0	7,1	0,4	20,1	1,1	1,3	0,6	0,3	4,1	0,5	0,1	0,1	0,0	2,1	0,3	12,6	0,0
14	4,7	1,6	35,7	3,2	6,9	0,3	22,4	0,7	1,4	1,3	0,3	3,0	0,5	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	14,0	0,0
15	4,7	1,8	37,6	3,4	7,8	0,3	23,7	0,6	1,5	1,2	0,2	1,7	0,3	0,2	0,1	0,0	1,8	0,3	11,4	0,0
16	5,3	1,6	35,3	3,5	8,1	0,5	21,1	0,8	1,2	0,7	0,3	3,1	0,5	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	13,9	0,0
17	4,9	1,7	39,4	3,3	7,7	0,3	21,1	0,7	1,4	0,8	0,3	2,0	0,3	0,2	0,1	0,0	1,7	0,3	12,3	0,0
18	5,0	1,8	38,5	3,1	7,8	0,4	20,5	0,8	1,3	0,8	0,2	2,3	0,3	0,2	0,1	0,0	2,0	0,3	13,1	0,0
19	5,1	1,8	39,5	2,9	9,0	0,2	22,2	0,6	1,5	1,0	0,3	1,7	0,2	0,1	0,2	0,0	1,6	0,3	10,2	0,0
20	4,8	1,8	38,2	3,2	7,8	0,4	21,1	0,7	1,4	0,7	0,3	2,1	0,4	0,2	0,1	0,0	1,7	0,3	13,3	0,0
21	5,0	2,0	39,7	2,9	7,9	0,4	20,2	0,7	1,3	0,7	0,3	2,3	0,3	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	12,2	0,0
22	4,7	1,6	36,0	3,3	8,3	0,3	23,7	0,6	1,5	1,2	0,3	1,7	0,3	0,2	0,1	0,0	1,8	0,3	12,7	0,0
23	6,2	2,1	32,0	4,4	7,2	0,6	19,4	1,2	1,2	0,6	0,4	2,2	0,5	0,3	0,2	0,0	1,6	0,4	17,6	0,0

Таблиця 21

Склад жирних кислот олії з одиничного насіння T3 B. juncea, трансформованого T-ДНК з GA7-modB. Насіння додатково містило по 0,1-0,2 % кожної з C16:3, C20:1Δ13, C20:2ω6. Не виявлені C20:3ω6, C20:4ω6, C22:2ω6, C22:5ω6 і C22:6ω3.

Насіння	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4	C20:1Δ11	C20:3ω3	C22:0	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:3ω3	C22:4ω3	C24:1	C22:5ω3
1	4,8	0,4	2,8	38,4	3,7	5,7	0,4	18,0	0,7	1,0	1,5	1,1	0,3	1,4	0,4	0,3	1,4	0,5	16,3
2	4,3	0,4	3,0	43,3	3,6	5,2	0,2	18,5	0,7	0,8	1,7	1,4	0,3	1,2	0,3	0,2	1,2	0,3	12,4
3	4,6	0,4	2,8	33,1	4,1	5,1	0,4	18,5	0,7	1,2	1,4	1,1	0,3	1,6	0,5	0,3	1,4	0,4	20,8
4	4,5	0,4	2,9	39,5	3,3	6,3	0,4	18,5	0,8	1,2	1,5	1,0	0,3	1,7	0,3	0,2	1,8	0,3	14,2
5	4,9	0,5	2,8	32,2	3,9	4,7	0,3	20,7	0,8	1,2	1,4	2,0	0,3	1,4	0,5	0,3	1,2	0,4	19,4
6	4,3	0,3	3,0	38,1	3,2	5,8	0,3	19,4	0,7	1,1	1,5	1,2	0,3	1,5	0,4	0,2	1,3	0,4	16,0
7	5,4	0,5	3,2	29,3	4,0	4,6	0,4	18,6	0,9	1,7	1,3	1,2	0,4	1,6	0,7	0,3	1,4	0,5	22,9
8	5,2	0,5	3,7	34,5	4,1	4,5	0,3	17,2	1,0	1,4	1,4	1,5	0,4	1,4	0,6	0,3	1,2	0,5	19,4
9	5,3	0,5	3,4	33,4	3,7	4,6	0,3	17,6	0,9	1,7	1,2	1,1	0,4	1,5	0,6	0,2	1,2	0,5	20,7
10	4,6	0,4	3,0	39,5	3,5	5,1	0,3	17,8	0,8	0,8	1,6	1,4	0,4	1,3	0,4	0,3	1,3	0,4	16,1
11	4,3	0,4	3,1	41,7	3,5	5,6	0,2	19,0	0,7	0,9	1,6	1,3	0,3	1,4	0,3	0,2	1,5	0,3	12,7
12	4,8	0,5	2,8	33,8	4,0	5,3	0,4	18,2	0,7	1,4	1,3	1,2	0,3	1,6	0,6	0,3	1,3	0,4	20,1
13	4,4	0,4	3,5	40,3	3,5	5,2	0,2	19,1	0,7	1,0	1,5	1,6	0,3	1,4	0,4	0,2	1,4	0,3	13,8
14	4,8	0,4	3,2	36,1	3,7	5,9	0,3	19,9	0,7	1,4	1,3	1,1	0,3	1,9	0,5	0,2	1,7	0,3	15,4
15	4,0	0,3	2,8	37,2	3,2	4,9	0,3	19,6	0,8	0,9	1,6	1,5	0,4	1,3	0,5	0,3	1,1	0,4	17,9
16	4,5	0,4	3,8	36,7	3,2	4,5	0,2	19,0	0,9	1,1	1,4	1,8	0,4	1,2	0,5	0,2	1,0	0,5	17,8
17	5,2	0,4	2,8	27,8	3,7	5,3	0,5	18,3	0,8	1,7	1,3	1,0	0,4	1,9	0,7	0,3	1,7	0,5	24,7
18	5,4	0,6	2,8	31,7	4,1	4,6	0,3	18,5	0,8	1,3	1,3	1,4	0,4	1,4	0,6	0,2	1,3	0,4	21,8
19	6,4	0,6	2,7	30,3	3,5	4,1	0,4	16,1	0,8	2,1	1,1	0,9	0,4	1,4	0,7	0,2	1,1	0,5	25,8
20	4,3	0,3	3,2	39,2	3,3	5,7	0,2	20,1	0,7	0,9	1,6	1,7	0,3	1,3	0,3	0,2	1,3	0,3	14,1

Приклад 9. Подальший аналіз трансформованих рослин і польові випробування

- Гібридаційний аналіз методом саузерн-блотингу проводили для відібраних рослин T2 B. parus, трансформованих T-ДНК із конструкції GA7-modB. ДНК, екстраговану із зразків тканини рослини, розщеплювали декількома рестрикційними ферментами для гібридаційного аналізу методом саузерн-блотингу. Радіоактивний зонд, що відповідав частині T-ДНК, гібридували 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 T-ДНК у рослинах, тоді як інші продемонстрували дві смуги, а наступні знову продемонстрували декілька смуг T-ДНК, що відповідало 4-6 інсерціям. Кількість смуг гібридизації, спостережуваних в саузерн-блотинг аналізі, добре співвідносилася із кількістю копій T-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 B. parus із різним фоновим генотипом. Подальші зворотне схрещування здійснювали для визначення того, чи є множинні інсерції T-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 T-ДНК, і будь-які лінії, що демонстрували присутність обернених повторів T-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

насінневих коробочок і вивільнення пилку із пильовиків затримувалося таким чином, що рильця товчачика подовжувалися до розкриття насінневих 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 насінневих

5 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

10 бруньках, включаючи пильовики і рильця/товчачики деяких рослин T3 і T4. 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 T2. Трансгенні лінії, що містили менш ніж 6 % ДГК, відкидали. Кількість копій Т-ДНК у зразках листя рослин покоління T1, T2 і T3 визначали методом цифрової ПЛР (Приклад 1).

Відібрані партії насіння T3 і T4 висівали у полі на двох ділянках у Вікторії, Австралія, кожен у рядах завдовжки 10 м із щільністю висіву 10 насінин/м. Відібрані партії насіння включали одержану із B003-5-14 лінію, яка демонструє рівні ДГК в пулі насіння близько 8-11 % і рівні ДГК

20 для індивідуального насіння T2 до близько 19 %, із кількістю копій Т-ДНК 3 у рослині T0. Крім того, відібрані партії насіння включали одержані із B0050-27 лінії, які продемонстрували рівні ДГК у насінні T2 понад 20 %, і кількість копій Т-ДНК 1 або 2 у рослинах T2. Насіння, висіяне в полі, проростало і давало пагони із такою ж швидкістю, що і насіння дикого типу. Рослини,

25 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,

30 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,

35 слід розглядати в усіх відношеннях як ілюстративні, але не обмежуючі.

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

40 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

- Abbadi et al. (2004) *Plant Cell* 16: 2734-2748.
- 45 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.
- Baumlein et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225:459-467.
- 50 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.
- Broun et al. (1998) *Plant J.* 13:201-210.
- 55 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.
- Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
- 60 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.  
 Damude et al. (2006). Proc Natl Acad Sci USA 103: 9446-9451.  
 5 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.  
 Domergue et al. (2005) Biochem. J. 1 389: 483-490.  
 Dunoyer et al. (2004) The Plant Cell 16:1235-1250.  
 10 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.  
 Girke et al. (1998) Plant J. 15:39-48.  
 Harayama (1998). Trends Biotechnol. 16: 76-82.  
 15 Hastings et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14304-14309.  
 Hinchee et al. (1988) Biotechnology 6:915-922.  
 Hoffmann et al. (2008) J Biol. Chem. 283:22352-22362.  
 Hong et al. (2002a) Lipids 37:863-868.  
 Horiguchi et al. (1998) Plant Cell Physiol. 39:540-544.  
 20 Huang et al. (1999) Lipids 34:649-659.  
 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.  
 25 Kim et al. (2005) Plant Cell. 2005 1073-89.  
 Knutzon et al. (1998) J. Biol Chem. 273:29360-6.  
 Koletzko et al. (1988) Am. J. Clin. Nutr. 47:954-959  
 Koziel et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:393-405.  
 Lassner (1995) Plant Physiol. 109:1389-94.  
 30 Leonard et al. (2000) Biochem. J. 347:719-724.  
 Leonard et al. (2000b) Biochem. J. 350:765-770.  
 Leonard et al. (2002) Lipids 37:733-740.  
 Lewsey et al. (2007) Plant J. 50:240-252.  
 Lo et al. (2003) Genome Res. 13:455-466.  
 35 Lu and Kang (2008) Plant Cell Rep. 27:273-8.  
 Mallory et al. (2002) Nat. Biotech. 20:622-625.  
 Marangoni et al. (1995) Trends in Food Sci. Technol. 6: 329-335.  
 Meesapyodsuk et al. (2007) J Biol Chem 282: 20191-20199.  
 Meng et al. (2008) J. Gen. Virol. 89:2349-2358.  
 40 Meyer et al. (2003) Biochem. 42:9779-9788.  
 Meyer et al. (2004) Lipid Res 45:1899-1909.  
 Michaelson et al. (1998a) J. Biol. Chem. 273:19055-19059.  
 Michaelson et al. (1998b) FEBS Lett. 439:215-218.  
 Murashige and Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15:473-497.  
 45 Napier et al. (1998) Biochem. J. 330:611-614.  
 Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453.  
 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.  
 50 Perrin et al. (2000) Mol Breed 6:345-352.  
 Petrie et al. (2010a) Metab. Eng. 12:233-240.  
 Petrie et al. (2010b) Plant Methods 11:6:8.  
 Petrie et al. (2012) Transgenic Res. 21:139-147.  
 Potenza et al. (2004) In Vitro Cell Dev Biol-Plant 40:1-22.  
 55 Qi et al. (2002) FEBS Lett. 510:159-165.  
 Qi et al. (2004) Nat. Biotech. 22: 739-745.  
 Qiu et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:31561-31566.  
 Reddy and Thomas (1996) Nat. Biotech. 14:639-642.  
 Reddy et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:293-300.  
 60 Robert et al. (2005) Func. Plant Biol. 32:473-479.

- Robert et al. (2009) *Marine Biotech* 11:410-418.  
 Ruiz-Lopez et al. (2012) *Transgenic Res.* 21:139-147.  
 Saha et al. (2006) *Plant Physiol.* 141:1533-1543.  
 Saito et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:1813-1818.  
 5 Sakuradani et al. (1999) *Gene* 238:445-453.  
 Sato et al. (2004) *Crop Sci.* 44: 646-652.  
 Sakuradani et al. (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:648-654.  
 Sayanova et al. (2006) *J Biol Chem* 281: 36533-36541.  
 Sayanova et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4211-4216.  
 10 Sayanova et al. (2003) *FEBS Lett.* 542:100-104.  
 Sayanova et al. (2006) *Planta* 224:1269-1277.  
 Sayanova et al. (2007) *Plant Physiol* 144:455-467.  
 Shukla et al. (2002) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 79:965-969.  
 Singh et al. (2005) *Curr. Opin. in Plant Biol.* 8:197-203.  
 15 Speranza et al. (2012) *Process Biochemistry* (In Press).  
 Sperling et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:3801-3811.  
 Sperling et al. (2001) *Arch. Biochem. 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.  
 20 Tonon et al. (2003) *FEBS Lett.* 553:440-444.  
 Trautwein (2001) *European J. Lipid Sci. and Tech.* 103:45-55.  
 Tvrdik (2000) *J. Cell Biol.* 149:707-718.  
 Venegas-Caleron et al. (2010) *Prog. Lipid Res.* 49:108-119.  
 Voinnet et al. (2003) *Plant J.* 33:949-956.  
 25 Wallis and Browse (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 365:307-316.  
 Watts and Browse (1999b) *Arch. Biochem. Biophys.* 362:175-182.  
 Weiss et al. (2003) *Int. J. Med. Microbiol.* 293:95-106.  
 Weng et al., (2004) *Plant Molecular Biology Reporter* 22:289-300.  
 Whitney et al. (2003) *Planta* 217:983-992.  
 30 Wood (2009) *Plant Biotechnol J.* 7:914-24.  
 Wu et al. (2005) *Nat. Biotech.* 23:1013-1017.  
 Yang et al. (2003) *Planta* 216:597-603.  
 Zank et al. (2002) *Plant J.* 31:255-268.  
 Zank et al. (2005) *WO 2005/012316*  
 35 Zhang et al. (2004) *FEBS Lett.* 556:81-85.  
 Zhang et al. (2006) 20:3255-3268.  
 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.  
 40 Zhou et al. (2008) *Insect Mol Biol* 17: 667-676.  
 Zou et al. (1997) *Plant Cell.* 9:909-23.

#### ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- 45 <110> Nuseed Pty Ltd  
 Grain Research and Development Corporation  
 Commonwealth Scientific and Industrial Research  
 Organisation
- 50 <120> ЛІПІД, ЩО МІСТИТЬ ДОКОЗАПЕНТАЄНОВУ КИСЛОТУ  
 <130> 517416  
 <150> AU 2014902471  
 <151> 2014-06-27  
 <150> US 14/575,756  
 55 <151> 2014-12-18  
 <150> AR 20140104761  
 <151> 2014-12-18  
 <150> PCT/AU2014/050433  
 <151> 2014-12-18  
 60 <160> 58  
 <170> PatentIn версія 3.5  
 <210> 1  
 <211> 21527

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; рJР3416-GA7 нуклеотидна послідовність.

&lt;400&gt; 1

5	tcctgtggtt	ggcatgcaca	tacaaatgga	cgaacgggata	aacctttttca	cgcccttttta	60
	aatatccgat	tattctaata	aacgctcttt	tctcttaggt	ttaccgcgcca	atatatcctg	120
	tcaaacactg	atagttttaa	ctgaaggcgg	gaaacgacaa	tctgctagt	gatctcccag	180
	tcacgacgtt	gtaaaacggg	cgccccgcgg	aaagcttgcg	gccgcccgat	ctagtaacat	240
10	agatgacacc	gcgcgcgata	atttatccta	gtttgcgcgc	tatatattgt	tttctatcgc	300
	gtattaaatg	tataattgcg	ggactcta	cataaaaacc	catctcataa	ataacgtcat	360
	gcattacatg	ttaattatta	cgtgcttaac	gtaattcaac	agaaattata	tgataatcat	420
	cgcaagaccg	gcaacaggat	tcaatcttaa	gaaactttat	tgccaaatgt	ttgaacgatc	480
	ggcgcgcctc	attagttagc	cttctcagcc	tttccgttaa	cgtagtagtg	ctgtcccacc	540
15	ttatcaagg	tagagaaagt	agccttccaa	gcaccgtagt	aagagagcac	ctttagattg	600
	agtccccact	tcttagcgaa	aggaacgaat	cttctgctaa	cctcaggctg	tctgaattga	660
	ggcatatcag	ggaagagg	gtggataacc	tgacagttaa	ggtatcccat	aagccagttc	720
	acgtatcctc	tagaaggatc	gatatcaacg	gtgtgatcaa	cagcgtagt	aaccaagaa	780
	aggtgcttat	cagatggaac	aacagggagg	tgagtatgag	aagtagagaa	gtgagcgaaa	840
20	aggtacatgt	aagcgatcca	gtttccgaaa	gtgaaccacc	agtaagcaac	aggccaagag	900
	tatccagtag	caagcttgat	aacagcgggt	ctaacaacat	gagaaacgag	catccaagaa	960
	gcctcttcgt	agttcttctt	acggagaact	tgtctagggt	ggagaacgta	gatccagaaa	1020
	gcttgaacaa	gaagtccaga	ggtaacagga	acgaaagtcc	aagcttgaag	tctagcccaa	1080
	gctctagaga	atcctctagg	tctgttatcc	tcaacagcag	tggtgaagaa	agccacagca	1140
25	ggagtgggtat	caagatccat	atcgtgtcta	accttttgag	gggtagcatg	gtgcttggtt	1200
	tgcatctggt	tccacatctc	accagaagta	gaaagtcgga	atccacaagt	catagcctga	1260
	agtctcttgt	ccacgtaaac	agatccggta	agagagttat	gtccaccctc	atggtgaacc	1320
	catccacatc	tagctccgaa	gaaagcaccc	taaacaacag	aagcaatgat	agggtagtcca	1380
	gcgtacataa	gagcagttcc	aagagcgaat	gtagcaagaa	gctcgagaag	tctgtaagcc	1440
30	acatgggtga	tagaaggctt	gaagaatcca	tctctctcaa	gctcagcacg	ccatctagcg	1500
	aaatcctcaa	gcataggagc	atcctcagac	tcagatctct	tgatctcagc	aggtctagaa	1560
	ggcaaagctc	taagcatctt	ccaagccttg	agagaacgca	tgtggaattc	tttgaaagcc	1620
	tcagtagcat	cagcaccagt	gttagcaagc	atgtagaaga	tcacagatcc	accaggggtg	1680
	ttgaagttag	tcacatcgta	ctcaacgtcc	tcaactctaa	cccatctagt	ctcgaaagta	1740
35	gcagcaagct	catgaggctc	aagagtctta	agatcaacag	gagcagtaga	agcatcctta	1800
	gcatcaagag	cctcagcaga	agatttagac	ctggtaagt	gagatctagg	agaagatctt	1860
	ccatcagctc	taggagggca	catgggtatg	taattgtaaa	tgtaattgta	atggtgtgtg	1920
	ttgtttgttg	ttgttggtta	ttgttgtaaa	agatcctcgt	gtatgttttt	aatcttggtt	1980
	gtatcgatga	gttttggttt	gagtaagag	tgaagcggat	gagtttaatt	ataggctata	2040
40	aaggagattt	gcatggcgat	cacgtgtaat	aatgcattga	cgcattgtgt	tgattgtgtg	2100
	tgctgtgaga	gagaagctct	taggtgtttg	aagggagtga	caagtggcga	agaaaaacaa	2160
	ttctccgcgg	ctgcatgcta	tgtgtaacgt	gtagctaatt	ttctggcatg	gcatcttatg	2220
	aacgattctt	tttaaaaaca	aggtaaaaac	tttaacttcat	aaaattaaaa	aaaaaaacgt	2280
	ttactaagtt	ggtttaaaag	gggatgagac	tagtagattg	gttggttggt	ttccatgtac	2340
45	cagaaggctt	accctattag	ttgaaagtgt	aaacttttgt	ccctactcaa	ttcctatgtg	2400
	tgtaaatgta	tgtatatgta	atgtgtataa	aacgtagtac	ttaaatgact	aggagtgggt	2460
	cttgagaccg	atgagagatg	ggagcagaac	taaagatgat	gacataatta	agaacgaatt	2520
	tgaaaggctc	ttaggtttga	atcctattcg	agaatgtttt	tgtaaagat	agtggcgatt	2580
	ttgaaccaaa	gaaaacattt	aaaaaatcag	tatccgggtta	cgttcatgca	aatagaaagt	2640
50	ggtctaggat	ctgattgtaa	tttttagactt	aaagagtctc	tttaagattca	atcctggctg	2700
	tgtacaaaa	tacaaataat	atatttttaga	ctattttggc	tttaactaaac	ttccactcat	2760
	tatttactga	ggtttagagaa	tagacttgcg	aataaacaca	ttcccagagaa	atactcatga	2820
	tcccataatt	agtcagaggg	tatgccaatc	agatctaaga	acacacattc	cctcaaattt	2880
	taatgcacat	gtaatcatag	tttagcacia	ttcaaaaata	atgtagtatt	aaagacagaa	2940
55	atgtgtagac	tttttttttg	cgttaaaaga	agactaagtt	tatacgtaga	ttttatttta	3000
	agtggaaaac	cgaatttttc	catcgaaata	tatgaattta	gtatatatat	ttctgcaatg	3060
	tactattttg	ctatttttgg	aactttcagt	ggactactac	tttattacaa	tgtgtatgga	3120
	tgcatgagtt	tgagtataca	catgtctaaa	tgcatgcttt	gtaaaacgta	acggaccaca	3180
	aaagaggatc	catacaata	catctcatag	cttctctccat	tattttccga	cacaaacaga	3240
60	gcattttaca	acaattacca	acaacaacaa	acaacaacaa	acattacaat	tacattttaca	3300
	attaccatac	catggaattc	gcccagcctc	ttgtttgctat	ggctcaagag	caatacgctg	3360
	ctatcgatgc	tggtgttgct	cctgctatct	tctctgctac	tgattctatc	ggatggggac	3420
	ttaaagcctat	ctcttctgct	actaaggact	tgctctttgt	tgagtctcct	acacctctca	3480
	tcctttcttt	gcttgctttac	ttcgctatcg	ttggatctgg	actcgtttac	agaaagggtt	3540
65	tccctagaac	cgtgaaggga	caagatccat	tccttttgaa	ggctcttatg	cttgctcaca	3600
	acgtgttcct	tatcggactt	tctctttaca	tgtgcctcaa	gcttggtgac	gaggcttacg	3660
	ttacaagata	ctctttctgg	ggaaacgctt	acaaccctgc	tcaaaactgag	atgggctaagg	3720
	ttatctggat	cttctacgtg	agcaagatct	acgagttcat	ggataccttc	atcatgtctc	3780
	tcaagggaata	tgtaaccag	gttagctttc	ttcacgttta	ccatcacgga	tctatctctg	3840
70	gaatctgggtg	gatgattact	tacgctgctc	ctgggtgggtga	tgcttacttc	tctgctgctc	3900

	ttaactcttg	ggttcacgtg	tgtatgtaca	cctactat	tatggctgcc	gtgcttccta	3960
	aggacgagaa	aactaagaga	aagtacctct	gggtggggaag	ataccttact	caaatgcaga	4020
	tggtccaggt	cttctcgaac	cttctccagg	ctgtttac	tctctactct	tactctctct	4080
	accctaagtt	tatcgctcag	ctcctcgtg	tgtacatggt	tactcttctc	atgcttttcg	4140
5	gaaacttcta	ctacatgaag	caccacgcta	gcaagtgatg	aggcgcgccg	ggccgcccgc	4200
	atgtgacaga	tcgaaggaag	aaagtgtaat	aagacgactc	tcactactcg	atcgctagtg	4260
	attgtcattg	ttatatataa	taatgttatc	tttcacaact	tatcgtaatg	catgtgaaac	4320
	tataacacat	taatcctact	tgtcatatga	taacactctc	cccatttaaa	actcttgtca	4380
	atttaaagat	ataagattct	ttaaatgatt	aaaaaaaaa	tattataaat	tcaatcactc	4440
10	ctactaataa	attattaatt	attattttatt	gattaaaaaa	atacttatac	taatttagtc	4500
	tgaatagaat	aattagattc	tagtctcatc	cccttttaaa	ccaacttagt	aaacgttttt	4560
	ttttttaatt	ttatgaagtt	aagtttttac	cttgttttta	aaaagaatcg	ttcataagat	4620
	gccatgccag	aacattagct	acacgttaca	catagcatgc	agccgcggag	aattgttttt	4680
	cttcgccact	tgtcactccc	ttcaaacacc	taagagcttc	tctctcacag	cacacacata	4740
15	caatcacatg	cgtgcacgca	ttattacacg	tgatcgccat	gcaaactctc	ttttatgcct	4800
	ataaaattaac	tcatacgcgtt	cactctttac	tcaaaccaaa	actcatcgat	acaatacaaga	4860
	ttaaaaacat	acacgaggat	cttttacaac	aattaccaac	aacaacaaac	aacaacaaac	4920
	attacaatta	catttacaat	taccatacca	tgcctccaag	ggactcttac	tcttatgctg	4980
	ctcctccttc	tgtcacaact	cacgaagttg	atactcctca	agagcacgac	aagaaagagc	5040
20	ttgttatcgg	agatagggct	tacgatgtta	ccaacttcgt	taagagacac	cctgggtggaa	5100
	agatcattgc	ttaccaagtt	ggaactgatg	ctaccgatgc	ttacaagcag	ttccatgtta	5160
	gatctgctaa	ggctgacaag	atgctttaagt	ctcttccttc	tcgtcctggt	cacaagggat	5220
	actctccaag	aagggctgat	cttatcgctg	atttccaaga	gttcaccaag	caacttgagg	5280
	ctgagggaa	gttcgagcct	tctcttcctc	atgttgctta	cagacttgct	gaggttatcg	5340
25	ctatgcatgt	tgtgtgtgct	gctcttatct	ggcatggata	cactttcgct	ggaatcgcta	5400
	tgtttggagt	tgttcagggg	agatgtggat	ggcttatgca	tgaggggtgga	cattactctc	5460
	tcactggaaa	cattgctttc	gacagagcta	tccaagttgc	ttgttacgga	cctggatgtg	5520
	gaatgtctg	tgtttgggtg	cgtaaccagc	ataacaagca	ccatgctact	cctcaaaagc	5580
	ttcagcacga	tgttgatctt	gatacccttc	ctctcgttgc	tttccatgag	agaatcgctg	5640
30	ctaaggttaa	gtctcctgct	atgaaggctt	ggctttctat	gcaagctaag	cttttcgctc	5700
	ctgttaccac	tcttcttggt	gctcttggat	ggcagcttta	ccttcacctc	agacacatgc	5760
	tcaggactaa	gcactacgat	gagcttgcta	tgtcggaa	cagatacggg	cctgttggat	5820
	accttgctgc	taactacggt	gctggatacg	ttctcgcttg	ttaccttctt	tacgttcagc	5880
	ttggagctat	tgacatcttc	tgcaacttgc	ctgtttctca	tactcacctc	cctgttgggt	5940
35	agcctaacga	gcatgctact	tgggttgagt	acgctgctaa	ccacactact	aactgttctc	6000
	catcttggtg	gtgtgattgg	tggatgtctt	accttaacta	ccagatcgag	caccaccttt	6060
	acccttctat	gcctcaattc	agacacccta	agatcgctcc	tagagttaag	cagcttttcg	6120
	agaagcacgg	acttcactac	gatgttagag	gatacttcga	ggctatggct	gatactttcg	6180
	ctaaccttga	atacgttgcc	catgctcctg	agaagaaaa	gcagtaatga	gatcgttcaa	6240
40	acatttggca	ataaagtttc	ttaaagtatga	atctgttgc	cggcttgcg	atgattatca	6300
	tataatttct	gttgaattac	gttaagcacg	taataattaa	catgtaatgc	atgacgttat	6360
	ttatgagatg	ggtttttatg	attagagtcc	cgcaattata	catttaatac	gcgatagaaa	6420
	acaaaatata	gcgcgcaaac	taggataaat	tatcgcgcg	gggtgcatct	atgttactag	6480
	atcggctgat	taaaaatccc	aatttatatt	gggtctaatt	agtttggtat	tgagtaaaac	6540
45	aaattcgaac	caaaccaaaa	tataaatata	tagtttttat	atataatgc	ttaaagcttt	6600
	ttatagaatt	ttcttttaaa	aatatctaga	aatatttgcg	actcttctg	catgtaatat	6660
	ttcgttaaat	atgaagtgc	ccatttttat	taacttttaa	taattgggtg	tacgatcact	6720
	ttcttatcaa	gtgttactaa	aatgcgtcaa	tctctttggt	cttccatatt	catatgtcaa	6780
	aatctatcaa	aattcttata	tatctttttc	gaatttgaag	tgaaatttcg	ataattttaa	6840
50	attaaataga	acatatcatt	atttaggtat	catattgatt	tttatactta	attactaaat	6900
	ttggtttaact	ttgaaagtgt	acatcacaga	aaaattagtc	aaacgactaa	aataaataaa	6960
	tatcatgtgt	tattaaagaaa	attctcctat	agaatatatt	taatagatca	tatgtttgta	7020
	aaaaaaatta	attttttacta	acacatatat	ttactttatca	aaaatttgac	aaagtaagat	7080
	taaaataata	ttcatctaac	aaaaaaaaaa	ccagaaaatg	ctgaaaacc	ggcaaaaccg	7140
55	aaccaatcca	aaccgatata	gttggttttg	tttgattttg	atataaaccg	aaccaactcg	7200
	gtccatttgc	acccctaatt	ataatagctt	taatatctta	agatattatt	aagttaacgt	7260
	tgtcaaatatc	ctggaaattt	tgcaaaatga	atcaagccta	tatggctgta	atatgaattt	7320
	aaaagcagct	cgatgtgggtg	gtaatatgta	atttacttga	ttctaaaaaa	atatcccaag	7380
	tattaataat	ttctgctagg	agaagggtta	gctacgat	acagcaaagc	cagaatacaa	7440
60	agaaccataa	agtgattgaa	gctcgaaata	tacgaaggaa	caaataattt	taaaaaata	7500
	cgcaatgact	tggaaacaaa	gaaagtgata	tattttttgt	tcttaaacaa	gcatccccct	7560
	taaagaatgg	cagttttcct	ttgcatgtaa	ctattatgct	cccttcgtta	caaaaatttt	7620
	ggactactat	tgggaacttc	ttctgaaaat	agtgatagaa	cccacacgag	catgtgcttt	7680
	ccattttaatt	ttaaaaacca	agaaacatac	atacataaca	ttccatcagc	ctctctctct	7740
65	ttttattacg	gttaatgact	taaaacacat	cttattatcc	catccttaac	acctagcagt	7800
	gtcttttatac	gatctcatcg	atcaccactt	caaaaccatg	cagactgctg	ctgcccctgg	7860
	agctggcatc	ggctaggctg	ggtgccgcac	tgtcccggaa	ggtccctagc	gacttgttta	7920
	gattgatggg	accacctctc	aacttccctg	tgtgtctcct	gctgtctggat	gtcctgcctc	7980
	atctggccga	tgtcacgctc	cagtcccctg	catgtgcact	cgctcctcaa	ttgttttaaga	8040
70	tcatcgcagc	agctatcgaa	gtgctggctc	tgttgccttc	ctccacggcc	ttggttgtag	8100

	tagtagctgc	cgccgccctt	ctggactttt	tcccacagga	accgccgaat	aattcgatag	8160
	aaccacacga	gcatgtgctt	tcattttattt	taaaaaccaa	gaaacataca	taacattttca	8220
	tcagcctctc	tctctctctc	tctctctctc	tctctctctc	tctctctctc	tctctctctc	8280
	ttacagctgt	tacactaact	taaaacacat	tcattctcatt	attattatta	tattccatcc	8340
5	ttaacaccta	gcagtgtctt	tgtacgatct	cataatcgat	cacccttca	tcaggtatcc	8400
	ttaggcttca	ctccaacggt	gttgacgtta	cggaaacatgt	acacaccatc	atgggttctca	8460
	acgaactggc	aagatctcca	agttttccaa	aggctaacc	acatgttctc	atcggtgtgt	8520
	ctgtagtgct	ctcccataac	tttcttgatg	cactcggtag	cttctctagc	atggtagaat	8580
	gggatccctg	aaacgtagtg	atggagcaca	tgagtctcga	tgatgtcatg	gaagatgatt	8640
10	ccgaggattc	cgaactctct	atcgatagta	gcagcagcac	ccttagcgaa	agtcactct	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
15	aacttagaaa	caccagggtg	aggttggtcca	gtagcgttag	tagcaaggta	aagagaaagt	9000
	ctccaagct	gttggaacaa	gagagcgaaa	acagagttag	taggagtttc	ctcagcgata	9060
	tcgtgaaggc	tggttaacttg	gtgcttctct	ttgaattcct	cggcgggtgta	aggaacgaaa	9120
	accatatctc	tggtcatgtg	tccagtagcc	ttatggtgct	tagcatgaga	gaacttccag	9180
	ctgaagtaag	gaaccataac	aagagagtgg	agaacccatc	caacgggtatc	gttaacccat	9240
20	ccgtagttag	agaaagcaga	atgtccacac	tcattgtccaa	ggatccagat	tccgaatccg	9300
	aaacaagaga	tagagaacac	gtaagcagac	caagcagcga	atctaaggaa	ttcgttaggg	9360
	agaagagggg	tgtaggtaag	tccaacgtaa	cgcgatagcag	agatagccac	gatattctct	9420
	accacgtaag	acatagactt	cacgagagat	ctctcgtaac	agtgccttagg	gatagcgtca	9480
	aggatatcct	tgatggtgta	atctggcacc	ttgaaaacgt	ttccgaagg	atcgatagcg	9540
25	gtcttttgct	gcttgaaaga	tgcaacgttt	ccagaacgcc	taacgggtctt	agtagatccc	9600
	tcaaggatct	cagatccaga	cacggtaacc	ttagacatgg	tatggtaatt	gtaaatgtaa	9660
	ttgtaatggt	gtttgttggt	gtttgttggt	ggtaattggt	gtaaaatttt	tggtggtgat	9720
	tggttcttta	aggtgtgaga	gtgagttgtg	agttgtgtgg	tggtgtgtgg	tggtgtgtgg	9780
	atggtgggtt	tatatagtg	agactgagga	atggggtcgt	gagtgttaac	tttgcattgg	9840
30	ctacacgtgg	gttcttttgg	gcttacacgt	agtattattc	atgcaaatgc	agccaataca	9900
	tatacgggtat	tttaataatg	tgtgggaata	caatatgccc	agtattttac	taattttggc	9960
	aatgacaagt	gtacatttgg	attatcttac	ttggcctctc	ttgctttaat	ttggattatt	10020
	tttattctct	taccttgccc	gttcattatc	acatccctaa	aggcaagaca	gaattgaatg	10080
	gtggccaaaa	attaaaaacga	tggatatgac	ctacatagtg	taggatcaat	taacgtcgaa	10140
35	ggaaaatact	gattctctca	agcatacggg	caagggtaaa	taacatagtc	accagaacat	10200
	aataaatact	aagtgcagaa	gcaagactaa	aaaaatttagc	tatggacatt	caggttcata	10260
	ttggaaacat	cattatccca	gtcttgtgac	catccttctc	cctgctctag	ttgagaggcc	10320
	ttgggactaa	cgagaggcca	gttgggtag	cagatcctta	tcctggacta	gcctttctgg	10380
	tgtttcagag	tcttctgtgc	gccgtctaca	tctattctca	ttaggtctga	agatgactct	10440
40	tcacaccaac	gacgtttaag	gtctctatcc	tactcctagc	ttgcaatacc	tggtttgcaa	10500
	tacctggagc	atcgtgcacg	atgattggat	actgtggagg	aggagtgttt	gctgatttag	10560
	agctcccggg	tggttgattt	gacttcgatt	tcagtttagg	cttgttgaaa	tttttcagg	10620
	tccatttgta	agcctttaga	gcttgagctt	ccttccatgt	taatgccttg	atcgaatact	10680
	cctagagaaa	agggaaagtcg	atctctgagt	attgaaatcg	aagtgcacat	tttttttcaa	10740
45	cgtgtccaat	caatccacaa	acaaagcaga	agacaggtaa	tctttcatal	tatactgac	10800
	aagtaatagt	cttaccgtca	tgcaataata	cgtctcgctt	cttcaagagg	gggtttccga	10860
	catccataac	gacccgaagc	ctcatgaaag	cattagggaa	gaacttttgg	ttcttcttgt	10920
	catggccttt	ataggtgtca	gccgagctcg	ccaattcccg	tccgactggc	tccgcaaaat	10980
	attcgaacgg	caagttatgg	acttgcaacc	ataactccac	ggtattgagc	aggacctatt	11040
50	gtgaagactc	atctcatgga	gcttcagaat	gtggttgatc	gcaaaccaat	gaccgaaatc	11100
	catcataaga	cggacgtcca	gtgggtgagc	gaaacgaaac	aggaagcgcc	tacttttcag	11160
	agtcgtgagc	tccacaccgg	attccggcaa	ctacgtgttg	ggcaggcttc	gccgtattag	11220
	agatatgttg	aggcagaccc	atctgtgcca	ctcgtacaat	tacgagaggt	gttttttttg	11280
	tgatttttct	agtttctcgt	tgatggtgag	ctcatattct	acatcgtagt	gtctctcaac	11340
55	gtcgttttct	gtcatctgat	atcccgtcat	ttgcatccac	gtgcgccgcc	tcccgtgcca	11400
	agtccttagg	tgtcatgcac	gccaaattgg	tggtggtgag	ggctgccctg	tgcttcttac	11460
	cgatgggtgg	aggttgagtt	tggtggtctc	cgcggcgatg	gtagtgggtt	gacgggttgg	11520
	tggtgggtga	cggcattgat	caatttactt	cttgcttcaa	attcttttgg	agaaaacaat	11580
	tcattagatt	agaactggaa	accagagtga	tgagacggat	taagtcagat	tccaacagag	11640
60	ttacatctct	taagaaataa	tgtaaccctt	ttagacttta	tattatttga	attaaaaaaa	11700
	taattttaact	tttagacttt	atatatagtt	ttataaacta	agtttaacca	ctctattatt	11760
	tatatcgaaa	ctatttgtat	gtctccccct	tataataaact	tggtattgtg	tttacagaac	11820
	ctataatgaa	ataactcaata	ctcaactgaa	gtttgtgcag	tttaattgaag	ggattacaag	11880
	ccaaaatgca	ctagtattat	caaccgaata	gattcacact	agatggccat	ttccatcaat	11940
65	atcatcgccg	ttcttcttct	gtccacatat	cccctctgaa	acttgagaga	cacctgcact	12000
	tcattgtcct	tattacgtgt	tacaaaatga	aaccatgca	tccatgcaaa	ctgaagaatg	12060
	gcgcaagaac	ccttccccct	catttcttat	gtggcgacca	tccatttcac	catctcccgc	12120
	tataaaacac	ccccatcact	tcacatgaa	catcatcact	acttgcttat	ccatccaaaa	12180
	gataccacac	tttacaacaa	ttaccaacaa	caaacaacaa	tacaataaca	tactactggtg	12240
70	tttacaatta	ccataccatg	ccacctagcg	ctgctaagca	aatgggagct	tctactggtg	12300

	ttcatgctgg	tgttactgac	tcttctgctt	tcaccagaaa	ggatggttgc	gatagacctg	12360
	atctcaccat	cgttggagat	tctgttttac	atgctaaggc	tttcagatct	gagcatcctg	12420
	gtggtgctca	tttcgtttct	ttgttcggag	gaagagatgc	tactgaggct	tctcatggaat	12480
	accatagaag	ggcttggcct	aagtctagaa	tgtctagatt	ccacgttggg	tctcttgcct	12540
5	ctactgagga	acctgttgct	gctgatgagg	gataccttca	actttgtgct	aggatcgcta	12600
	agatggtgcc	ttctgtttct	tctggattcg	ctcctgcttc	ttactgggtt	aaggctggac	12660
	ttatccttgg	atctgctatc	gctccttgagg	cttacatgct	ttacgctgga	aagagacttc	12720
	tccccttctat	cgttcttggg	tggccttttc	ctcttatcgg	tcttaacatc	cagcatgatg	12780
	ctaaccatgg	tgctttgtct	aagtctgctt	ctgttaacct	tgctccttga	ctttgtcagg	12840
10	attggatcgg	aggatctatg	atcctttggc	ttcaagagca	tggtgttatg	caccacctcc	12900
	acactaacga	tggtgataag	gatcctgata	aaaaggctca	cgggtgctct	agactcaagc	12960
	ctactgatgc	ttggtcacct	atgcattggc	ttcagcatct	ttaccttttg	cctggtgaga	13020
	ctatgtacgc	tttcaagcct	ttgttcctcg	acatctctga	gcttggttat	tggcgttggg	13080
	aggggtgagcc	tatctctaag	cttgctggat	acctctttat	gccttctttg	cttctcaagc	13140
15	ttacctttctg	ggctagattc	gttgcttttg	ctctttacct	tgctccttct	gttcatactg	13200
	ctgtgtgtat	cgctgctact	gttatgactg	gatctttcta	cctcgctttc	ttcttcttca	13260
	tctccacaa	cttcgagggg	gttgcttctg	ttggacctga	tggatctatc	acttctatga	13320
	ctagaggtgc	tagcttccct	aagagacaag	ctgagacttc	ttctaacggt	ggaggacctc	13380
	ttcttgctac	tcttaacggg	ggactcaact	accaaattga	gcatcacttg	ttccctagag	13440
20	ttcaccatgg	attctaccct	agacttgctc	ctcttggtta	ggctgagcct	gaggctagag	13500
	gaatcgagta	caagcactac	cctactatct	ggcttaacct	tgcttctacc	ctcagacata	13560
	tgtacgctct	tggagaagg	cctagatcta	aggctgagta	atgacaagct	tatgtgacgt	13620
	gaaataataa	cggtaaaata	tatgtaataa	taataataat	aaagccacaa	agtgagaatg	13680
	aggggaaggg	gaaatgtgta	atgagccagt	agccgggtgg	gctaattttg	tatcgtattg	13740
25	tcaataaaatc	atgaattttg	tgggtttttat	gtgttttttt	aaatcatgaa	ttttaaattt	13800
	tataaaataa	tctccaatcg	gaagaacaac	attccatatc	catgcatgga	tgtttcttta	13860
	cccaaatcta	gttcttgaga	ggatgaagca	tcaccgaaca	gttctgcaac	tatccctcaa	13920
	aagcttttaaa	atgaacaaca	aggaacagag	caacgtttcca	aagatcccaa	acgaaacata	13980
	ttatctatac	taataactata	ttattaatta	ctactgcccg	gaatcacaa	ccctgaatga	14040
30	ttcctattaa	ctacaagcct	tggtggcggc	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	ttaaagcaaga	gaggccaagt	aagataatcc	aaatgtacac	ttgtcattgc	14340
35	caaaattagtt	aaaataactcg	gcatattgta	ttccacacaa	ttattaaaaat	accgtatatg	14400
	tattggctgc	atttgcata	ataatactac	gtgtaagccc	aaaagaaccc	acgtgtagcc	14460
	catgcaaagt	taacactcac	gaccccatct	ctcagctctc	actatataaa	cccaccatcc	14520
	ccaatctcac	caaaccacc	acacaactca	caactcactc	tcacacctta	aagaaccaat	14580
	caccaccaa	aattttacaa	caattaccaa	caacaacaaa	caacaacaaa	cattacaatt	14640
40	acattttacaa	ttaccatacc	atgagcgctg	ttaccgttac	tggatctgat	cctaagaaca	14700
	gaggatcttc	tagcaacacc	gagcaagagg	ttccaaaagt	tgctatcgat	accaacggaa	14760
	acgtgttctc	tgttcctgat	ttcaccatca	aggacatcct	tggagctatc	cctcatgagt	14820
	gttacgagag	aagattggct	acctctctct	actacgtggt	cagagatata	ttctgcatgc	14880
	ttaccaccgg	ataccttacc	cataagatcc	tttaccctct	cctcatctct	tacacctcta	14940
45	acagcatcat	caagttcact	ttctgggccc	tttacactta	cgttcaagga	cttttcggaa	15000
	ccggaatctg	ggttctcgct	catgagtggt	gacatcaagc	tttctctgat	tacggaatcg	15060
	tgaacgattt	cgttggatgg	accttccact	cttaccttat	ggttccttac	ttcagctgga	15120
	agtactctca	tggaaagcac	cataaggcta	ctggacacat	gaccagagat	atgggttttcg	15180
	ttcctgccac	caaagaggaa	ttcaagaagt	ctaggaactt	cttcggtaac	ctcgtgaggt	15240
50	actctgagga	ttctccactt	agaacccttt	acgagcttct	tggtcaacaa	cttggaggat	15300
	ggatcgctta	ccttctcggt	aacgtttacag	gacaacctta	ccctgatggt	ccttcttggg	15360
	aatggaaacca	cttctggcct	acctctccac	ttttcgagca	aagagatgct	ctctcatctt	15420
	tcctttctga	tcttggaaatc	ctcaccaggg	gaatcgcttct	tactcttttg	tacaagaaat	15480
	tcggaggatg	gtcccttttc	atcaactggt	tcgttccctta	catctgggtt	aaccactggc	15540
55	tcgttttcat	cacattcctt	cagcacactg	atcctactat	gcctcattac	aacgctgagg	15600
	aatggacttt	cgctaagggt	gctgctgcta	ctatcgatag	aaagttcgga	ttcatcgagc	15660
	ctcacatctt	ccatgatata	atcgagactc	atgtgcttca	ccactactgt	tctaggatcc	15720
	cattctacaa	cgctagacct	gcttctgagg	ctatcaagaa	agttatggga	aagcactaca	15780
	ggtctagcga	cgagaacatg	tggaaagtcac	tttggaagtc	tttcaggctc	tgccaatacg	15840
60	ttgacggtga	taacggtggt	ctcatgttcc	gtaacatcaa	caactgcgga	gttggagctg	15900
	ctgagaagta	atgaaggggt	gatcgattat	gagatcgtag	aaagacactg	ctaggtgtta	15960
	aggatggata	ataataataa	taatgagatg	aatgtgtttt	aagttagtgt	aacagctgta	16020
	ataagagagag	agagagagag	agagagagag	agagagagag	agagagagag	atcagagctg	16080
	atgaaatggt	atgtatgttt	cttgggtttt	aaaataaaatg	aaagcacatg	ctcgtgtggt	16140
65	tctatcgaat	tattcggcgg	ttcctgtggg	aaaaagtcca	gaagggccgc	cgcagctact	16200
	actacaacca	aggccgtgga	ggagggcaac	agagccagca	cttcgatagc	tgctgcatg	16260
	atcttaagca	attgaggagc	gagtgcacat	gcaggggact	ggagcgtgca	atcggccaga	16320
	tgaggcagga	catccagcag	cagggacagc	agcaggaagt	tgagaggtgg	tcccatcaat	16380
	ctaaacaagt	cgctagggac	cttccgggac	agtgcggcac	ccagcctagc	cgtatgacgc	16440
70	tccaggggca	gcagcagctc	gcatggtttt	gaagtgggtga	tcgatgagat	cgtataaaga	16500

	cactgctagg	tgtaaggat	gggataataa	gatgtgtttt	aagtcattaa	ccgtaataaa	16560
	aagagagaga	ggctgatgga	atgttatgta	tgtatgtttc	ttggttttta	aaattaaatg	16620
	gaaagcacat	gctcgtgtgg	gttctatctc	gattaaaaat	cccaattata	tttggcttaa	16680
	tttagtttgg	tattgagtaa	aacaaattcg	aaccaaacca	aaatataaat	atatagtttt	16740
5	tatatatatg	cctttaagac	tttttataga	attttcttta	aaaaatatct	agaaatattt	16800
	gcgactcttc	tggtcatgta	tatttcgtta	aatatgaagt	gctccatttt	tattaacttt	16860
	aaataattgg	ttgtacgatc	actttcttat	caagtgttac	taaaatgcgt	caatctcttt	16920
	gttcttccat	attcatatgt	caaaatctat	caaaattctt	atatatcttt	ttcgaatttg	16980
	aagtgaattt	tcgataattt	aaaattaaat	agaacatatc	attatttagg	tatcatattg	17040
10	atttttatatac	ttaattacta	aattttggtta	actttgaaag	tgtacatcaa	cgaaaaatta	17100
	gtcaaacgac	taaaataaat	aaatatcatg	tgttattaag	aaaattctcc	tataagaata	17160
	ttttaataga	tcatatgttt	gtaaaaaaa	ttaattttta	ctaacacata	tatttactta	17220
	tcaaaaatttt	gacaaagtaa	gattaaaata	atattcatct	aacaaaaaaa	aaaccagaaa	17280
	atgctgaaaa	cccggcaaaa	ccgaaccaat	ccaaaccgat	atagttgggt	tggttttgatt	17340
15	ttgatataaa	ccgaaccaac	tcggtccatt	tgcaccctta	atcataatag	ctttaatatt	17400
	tcaagatatt	attaagttta	cgttgtcaat	atcctggaaa	ttttgcaaaa	tgtaactaagc	17460
	ctatatggct	gtaatatgaa	tttaaaagca	gctcgatgtg	gtggtaatat	gtaatttact	17520
	tgattctaaa	aaaatatccc	aagtattaat	aatttctgct	aggaagaagg	ttagctacga	17580
	tttacagcaa	agccagaata	caaagaacca	taaagtgatt	gaagctcgaa	atatacgaag	17640
20	gaacaaatat	ttttaaaaaa	atacgcaatg	acttggaaac	aaagaaagtg	atatattttt	17700
	tgttcttaaa	caagcatccc	ctctaaagaa	tggcagtttt	cctttgcattg	taactattat	17760
	gctcccttcg	gtttacgttc	tttgactcat	tattgggaac	ttcttctgaa	aatagtcctg	17820
	caggctagta	gattgggttg	ttggtttcca	tgtaccagaa	ggcttaccct	attagttgaa	17880
	agttgaaact	ttgttcccta	ctcaattcct	agttgtgtaa	atgtatgtat	atgtaatgtg	17940
25	tataaaacgt	agtacttaaa	tgactaggag	tggttcttga	gaccgatgag	agatgggagc	18000
	agaactaaag	atgatgacat	aattaagaac	gaatttgaaa	ggctcttagg	tttgaatcct	18060
	attcgagaat	gtttttgtca	aagatagtgg	cgattttgaa	ccaaagaaaa	catttaaaaa	18120
	atcagtatcc	ggttacgttc	atgcaaatag	aaagtggctc	aggatctgat	tgtaattttta	18180
	gacttaaaaga	gtctcttaag	attcaatcct	ggctgtgtac	aaaactacaa	ataatatatt	18240
30	ttagactatt	tggtcctaac	taaacttcca	ctcattattt	actgagggtta	gagaatagac	18300
	ttgcgaataa	acacattccc	gagaaatact	catgatccca	taattagtca	gaggggtatgc	18360
	caatcagatc	taagaacaca	cattccctca	aatttttaatg	cacatgtaat	catagtttag	18420
	cacaattcaa	aaataatgta	gtattaaaga	cagaaatttg	tagacttttt	tttggcgtaa	18480
	aaagaagact	aagttttatac	gtacattttta	ttttaagtgg	aaaaccgaaa	ttttccattcg	18540
35	aaatatatga	atttagtata	tatatttctg	caatgtacta	ttttgctatt	ttggcaactt	18600
	tcagtggact	actactttat	tacaatgtgt	atggatgcat	gagtttgagt	atacacatgt	18660
	ctaaatgcat	gctttgtaaa	acgtaacgga	ccacaaaaga	ggatccatac	aaatacatct	18720
	catagcttcc	tccattattt	tccgacacaa	acagagcatt	ttacaacaat	taccaacaac	18780
	aacaaacaac	aaacaacatt	acaatttacc	ttacaattac	cataccatgg	cctctattcg	18840
40	tatccctgct	gctcttgctg	gaactcttgg	atacgtttac	tacaatgtgg	tacaacctga	18900
	tatcccagct	tctgagaaag	ttcctgctta	cttcatgcag	gttgagtact	ggggacctac	18960
	tatcggaact	attggatacc	tcctcttcat	ctacttcgga	aagcgtatca	tgcagaacag	19020
	atctcaacct	ttcggactca	agaacgctat	gctcgtttac	aacttctacc	agaccttctt	19080
	caacagctac	tgcatctacc	ttttcgttac	ttctcatatg	gctcagggac	ttaaggtttg	19140
45	gggaaacatc	cctgatatga	ctgctaactc	ttggggaatc	tctcaggtta	tctggcttca	19200
	ctacaacaac	aagtacgttg	agcttctcga	cacttcttcc	atggtgatga	ggaagaagtt	19260
	cgaccagctt	tctttccttc	acatctacca	ccacactctt	ctcatctggg	catggttcgt	19320
	tgttatgaag	cttgagcctg	ttggagattg	ctacttcgga	tcttctgtta	acaccttcgt	19380
	gcacgtgatc	atgtactctt	actacggact	tgctgctctt	ggagtttaact	gtttctggaa	19440
50	gaagtacatc	accagatcc	agatgcttca	gttctgtatc	tgtgcttctc	actctatcta	19500
	caccgctttac	gttcagaata	ccgcttcttg	gcttctttac	cttcaactct	gggttatggg	19560
	gaacatgttc	gttctcttcg	ccaacttcta	ccgtaagagg	tacaagtcta	aggggtgctaa	19620
	gaagcagtga	taagggccgc	cgccatgtga	cagatcgaag	gaagaaagtg	taataagacg	19680
	actctcacta	ctcgatcgct	agtgattgtc	attgttatat	ataataatgt	tatctttcac	19740
55	aacttatcgt	aatgcatgtg	aaactataac	acattaatcc	tacttgtcat	atgataacac	19800
	tctccccatt	taaaactctt	gtcaatttta	agatataaga	ttcttttaaa	gattaaaaaa	19860
	aatatattat	aaattcaatc	actcctacta	ataaattatt	aattattatt	tattgtttta	19920
	aaaaataactt	atactaattt	agtctgaata	gaataattag	attctagcct	gcagggcggc	19980
	cgcggtatccc	atggagtcaa	agattcaaat	agaggacctc	acagaactcg	ccgtaaagac	20040
60	tggcgaacag	ttcatacaga	gtctcttacg	actcaatgac	aagaagaaaa	tcttcgtaaa	20100
	catgggtggag	cacgacacac	ttgtctactc	caaaaatatc	aaagatacag	tctcagaaga	20160
	ccaaagggca	attgagactt	ttcaacaaag	ggtaatatcc	ggaaacctcc	tcggattcca	20220
	ttgcccagct	attctgcact	ttattgtgaa	gatagtggaa	aaggaagggtg	gctcctacaa	20280
	atgccatcat	tgcgataaag	gaaaggccat	cggtgaagat	gcctctgccg	acagtgggtcc	20340
65	caaagatgga	ccccaccca	cgaggagcat	cgtggaaaaa	gaagacgttc	caaccacgtc	20400
	ttcaaagcaa	gtggattgat	gtgatattct	cactgacgta	agggatgacg	cacaatccca	20460
	ctatccttcg	caagaccctt	cctctatata	aggaagttca	tttcattttg	agagaacacg	20520
	ggggactgaa	ttaaatatga	gccctgagag	gcgtcctgtt	gaaatcagac	ctgctactgc	20580
	tgctgatatg	gctgctgttt	gtgatattcg	gaaccactac	atcgagactt	ctccggttaa	20640
70	cttcagaact	gagcctcaaa	ctcctcaaga	gtggatcgat	gatcttgaga	gactccaaga	20700

	tagataccct	tggcttggtg	ctgaggttga	gggtggttgt	gctggaatcg	cttacgctgg	20760
	accttggaag	gctagaaacg	cttacgattg	gactggttag	tctaccgttt	acgttttcaca	20820
	cagacatcag	agacttgagc	ttggatctac	ccttttacact	cacctttctca	agtctatgga	20880
	agctcaggga	ttcaagtctg	ttgttgctgt	tatcggactc	cctaacgatac	cttctgttag	20940
5	acttcatgag	gctcttggtg	acactgctag	aggaactctt	agagctgctg	gatacaagca	21000
	cggtggatgg	catgatgttg	gattctggca	aagagatttc	gagcttcctg	ctcctcctag	21060
	acctgttaga	ccagttactc	agatctgaat	ttgctgtgac	gttcaaacat	ttggcaataa	21120
	agtttcttaa	gattgaatcc	tgttgccggt	cttgcgatga	ttatcatata	atttctgttg	21180
	aattacgtta	agcatgtaat	aattaacatg	taatgcata	cgttatttat	gagatgggtt	21240
10	tttatgatta	gagtcccgcg	attatacatt	taatacgcga	tagaaaacaa	aatatagcgc	21300
	gcaaaactag	ataaattatc	gcgcgcggtg	tcattctatgt	tactagatca	ctagtgatgt	21360
	acggttaaaa	ccaccccgat	acattaaaaa	cgtccgcaat	gtgttattaa	gttgtctaag	21420
	cgtcaatttg	tttacaccac	aatatatcct	gccaccagcc	agccaacagc	tccccgaccg	21480
	gcagctcggc	acaaaatcac	cactcgatac	aggcagccca	tcagtc		21527
15	<210>	2					
	<211>	23512					
	<212>	ДНК					
	<213>	Штучна послідовність					
	<220>						
20	<223>	pGA7-mod_V нуклеотидна послідовність					
	<400>	2					
	tcctgtggtt	ggcatgcaca	tacaaatgga	cgaacggata	aaccttttca	cgccctttta	60
	aatatccgat	tattctaata	aacgctcttt	tctcttaggt	ttaccgcgca	atatatcctg	120
	tcaaacactg	atagttttaa	ctgaaggcgg	gaaacgacaa	tctgctagt	gatctcccag	180
25	tcacgacgtt	gtaaaacggg	cgccccgcgg	aaagcttgcg	gccgcgggtac	cgcccggtcg	240
	actcagatct	tcgaaggcct	cgtctccgag	tccgctgctt	ctcgccgcgc	cgatcacttc	300
	tccgccgcca	acaaggcttg	tagttaatat	gaatcattca	gggattgtga	ttccgggcag	360
	tagtaattaa	taatatagta	ttagtataga	taatatgttt	cgtttgggat	ctttggaacg	420
	ttgctctggt	ccttggtgtt	catttttaag	cttttgaggg	atagttgcag	aactgttcgg	480
30	tgatgcttca	tcctctcaag	aactagattt	gggtaaagaa	acatccatgc	atggatatgg	540
	aatgttgttc	ttccgattgg	agattatttt	ataaaattta	aaattcatga	tttaaaaaaa	600
	cacataaaaa	ccacaaaatt	catgatttat	tgacaatacg	atacaaaatt	agcaccaccg	660
	gctactggct	cattacacat	ttcccccttc	cctcattctc	actttgtggc	tttattatta	720
	ttattattac	atatatttta	ccgttattat	ttcacgctac	ataagcttgt	taattaatca	780
35	ttagttagcc	ttctcagcct	ttccgttaac	gtagttagtc	tgtccacact	tatcaagggt	840
	agagaaagta	gccttccaag	caccgtagta	agagagcacc	ttgtagttag	gtccccactt	900
	cttagcgaag	ggaacgaatc	ttctgctaac	ctcaggctgt	ctgaattgag	gcataatcagg	960
	gaagaggtgg	tggataacct	gacagttaag	gtatcccata	agccagttca	cgtatcctct	1020
	agaaggtatg	atatcaacgg	tgtgatcaac	agcgtagtta	accacaagaa	gggtcctatc	1080
40	agatggaaac	acagggaggt	gagtagagaa	agtagagaag	tgagcgaaaa	gtacatagta	1140
	agcgatccag	tttccgaaag	tgaaccacca	gtaagcaaca	ggccaagagt	atccagtagc	1200
	aagcttgata	acagcggttc	taacaacatg	agaaacgagc	atccaagaag	cctcttcgta	1260
	gttcttctta	cggagaactt	gtctaggggtg	gagaacgtag	atccagaaag	cttgaacaag	1320
	aagtccagag	gtaacaggaa	cgaaagtcca	agcttgaagt	ctagcccaag	ctctagagaa	1380
45	tcctctaggt	tcgttatcct	caacagcagt	ggtgaagaaa	gccacagcag	gagtggtatc	1440
	aagatccata	tcgtgtctaa	ccgtttgagg	ggtagcatgg	tgcttggtat	gcattctgggt	1500
	ccacatctca	ccagaagtag	aaagtccgaa	tccacaagtc	atagcctgaa	gtctcttgct	1560
	cacgtaaaaca	gatccggtaa	gagagttagt	tccaccctca	tggtgaacct	atccacatct	1620
	agctccgaag	aaagcaccgt	aaacaacaga	agcaatgata	gggtatccag	cgtacataag	1680
50	agcagttcca	agagcgaatg	tagcaagaag	ctcgagaagt	ctgtaagcca	catgggtgat	1740
	agaaggcttg	aagaatccat	ctctctcaag	ctcagcacgc	catctagcga	aatcctcaag	1800
	cataggagca	tcctcagact	cagatctctt	gatctcagca	gggtctagaag	gcaaagctct	1860
	aagcatcttc	caagccttga	gagaacgcac	gtggaattct	ttgaaagcct	cagtagcatc	1920
	agcaccagtg	ttagcaagca	tgtagaagat	cacagatcca	ccagggtgct	tgaagttagt	1980
55	cacatcgtag	tcaacgtcct	caactctaac	ccatctagtc	tcgaaagtag	cagcaagctc	2040
	atgaggctca	agagtcttaa	gatcaacagg	agcagtagaa	gcattccttag	catcaagagc	2100
	ctcagcagaa	gatttagacc	tggttaagtgg	agatctagga	gaagatcttc	catcagctct	2160
	aggagggcac	atgggtatgg	aattgttaaat	gtaattgtaa	tggtgtttgt	tggtgtttgt	2220
	tggttgtaaat	tggtgttaaaa	ttaatgaagt	gggtatcttt	tggttggtata	agcaagtagt	2280
60	gatgatgttc	taggtgaagt	gatgggggtg	ttttatagcg	ggagatgggtg	aatggatgg	2340
	tcgccacata	agaaatggag	gggaagggtt	cttgcgccat	tcttcagttt	gcattggatgc	2400
	atgggtttca	ttttgtaaca	cgtaataagg	acaatgaagt	gcaggtgtct	ctcaagtttc	2460
	agaggggata	tgtggacaga	agaagaacgg	cgatgatatt	gatggaaatg	gccaatagtg	2520
	gtgaatctat	tcggttgata	atactagtgc	attttggccg	ttaatccctt	caattaactg	2580
65	cacaaacttc	agttgagtat	tgattatttg	attataggtt	ctgtaaacac	aataccaagt	2640
	ttatttagag	gggagacata	caaatagttt	cgatataaat	aatagagtgg	ttaaacttag	2700
	ttatttaaac	tatatataaa	gtctaaaagt	ttaattattt	ttttaattgc	aatatatataa	2760
	agtctaagg	ggtttacatta	tttcttaaga	gatgtaactc	tggttgaatc	tgacttaatc	2820
	cgtctcatca	ctctggtttc	cagttctaat	ctaattgaatt	gttttctgccc	aaagaatttg	2880
70	aagcaagaag	ttaattgatc	aatgccgtca	accacacca	aaccgtcaac	ccactaccat	2940

	cgccgcggag	acccccaaac	tcaacctcca	cccatcggtg	agaagcacag	ggcagcccg	3000
	accaccacca	atttggcgtg	catgacacct	agggacttgg	cacgggaggc	ggcgacgtg	3060
	gatgcaaat	acgggatatc	agatgacagg	aaacgacgtt	gagagaccat	acgagttaga	3120
	atatgagctc	accatcaacg	agaaactagg	aaaaacacaa	aaaaaacaac	tctcgtaatt	3180
5	gtacgagtgg	cacagatggg	tctgcctcaa	catatctcta	atacggcgaa	gcctgcccaa	3240
	cacgtagttg	ccggaatccg	gtgtggagct	cacgactctg	aaagataggc	gcttcctggt	3300
	tcgtttcgct	caccacttgg	acgtccgtca	tgtgatggat	ttcggtcatt	ggtttgctga	3360
	caaccacatt	ctgaagctcc	atgagatgag	tcttcacaat	aggtcctgct	caataccgtg	3420
	gagttatggg	tgcaagtcca	taacttgcgg	ttcgaatatt	ttgcggagcc	agtcggacgg	3480
10	gaattggcga	gctcggctga	cacctataaa	ggccatgaca	agaagaacca	aaagttcttc	3540
	cctaattgctt	tcattgaggct	tcgggtcggt	atggatgtcg	gaaaaccctt	cttgaaggaa	3600
	cgagacgtta	ttatgcatga	cggttaagact	attacttgtc	agtataagta	tgaaagatta	3660
	cctgtcttct	gctttgtttg	tggattgatt	ggacacgttg	aaaaaaaaatg	tgcacttcga	3720
	tttcaatact	cagagatcga	cttccctttt	ctctaggagt	attcgatcaa	ggcattaaca	3780
	tggaagggaag	ctcaagctct	aaaggtctta	caatggaacc	tgaaaaattt	caacaagcct	3840
15	aaactgaaat	cgaagtcaaa	tcacccaacc	gggagctcta	aatcagcaaa	cactcctcct	3900
	ccacagtatc	caatcatcgt	gcacgatgct	ccagggtattg	caagccagggt	attgcaagct	3960
	aggagtagga	tagagacctt	aaacgtcgtt	ggtgtgaaga	gtcatcttca	gacctaattg	4020
	agatagatgt	agacggcggc	acgaagactc	tgaaacacca	gaaaggctag	tccaggataa	4080
20	ggatctgcta	tcccaactga	cctctcgtaa	gtcccaaggc	ctctcaacta	gagcaggagg	4140
	aaggatgggt	acaagactag	gataatgatg	tttccaatat	gaacctgaat	gtccatagct	4200
	aatTTTTTTT	gtcttgcttc	tgcacttttt	gtttattatg	ttctgggtgac	tatgttattt	4260
	acccttgttc	gtatgcttga	gggtacccta	gtagatttgt	tggttgggtt	ccatgtacca	4320
	gaaggcttac	cctattagtt	gaaagttgaa	actttgttcc	ctactcaatt	cctagtgtgt	4380
25	taaattgtatg	tatatgtaat	gtgtataaaa	cgtagtactt	aaatgactag	gagtgggtct	4440
	tgagaccgat	gagagatggg	agcagaacta	aagatgatga	cataattaag	aacgaatttg	4500
	aaaggctctt	aggtttgaat	cctatttcgag	aatgtttttg	tcaaagatag	tggcgatttt	4560
	gaaccaaaga	aaacatttaa	aaaatcagta	tccggttacg	ttcatgcaaa	tagaaagtgg	4620
	tctaggatct	gattgtaatt	ttagacttaa	agagtctctt	aagattcaat	cctggctgtg	4680
30	tacaaaacta	caaataatat	atTTtagact	atTTggcctt	aactaaactt	ccactcatta	4740
	tttactgagg	ttagagaata	gacttgcgaa	taaacacatt	cccagaaaat	actcatgatc	4800
	ccataattag	tcagagggtg	tgccaatcag	atctaagaac	acacattccc	tcaaatttta	4860
	atgcacatgt	aatcataagt	tagcacaatt	caaaaataat	gtagtattaa	agacagaaat	4920
	ttgtagactt	ttttttggcg	ttaaaagaag	actaaggTTT	tacgtacatt	tatttttaag	4980
35	tggaaaaccg	aaattttcca	tcgaaatata	tgaatttagt	atatatatatt	ctgcaatgta	5040
	ctattttgct	atTTtgcaa	ctttcagtgg	actactactt	tattacaatg	tgtatggatg	5100
	catgagtttg	agtatacaca	tgtctaaatg	catgctttgt	aaaacgtaac	ggaccacaaa	5160
	agaggatcca	tacaaatata	tctcatagct	tcttccatta	ttttccgaca	caaacagagc	5220
	atTTtacaac	aattaccaac	aacaaacaac	aacaaacaac	attacaatta	catTTtacaat	5280
40	taccatacca	tggcctctat	cgctatccct	gctgctcttg	ctggaactct	tggatacgtt	5340
	acctacaatg	tggctaacc	tgatatccca	gcttcttgaga	aagtctctgc	ttacttcatg	5400
	caggttgagt	actggggacc	tactatcgga	actattggat	acctcctctt	catctacttc	5460
	ggaaagcgta	tcattgcagaa	cagatctcaa	cctttcggac	tcaagaacgc	tatgctcggt	5520
	tacaacttct	accagacctt	cttcaacagc	tactgcatct	accttttctg	tacttctcat	5580
45	agggctcagg	gacttaagggt	ttggggagac	atccctgata	tgactgctaa	ctcttgggga	5640
	atctctcagg	ttattctggct	tcactacaac	aacaagtacg	ttgagcttct	cgacaccttc	5700
	ttcatgggtga	tgaggaagaa	gttcgaccag	ctttcttttc	ttcacatcta	ccaccacact	5760
	cttctcatct	ggtcatgggt	cgttgttatg	aagcttgagc	ctgttggaga	ttgctacttc	5820
	ggatcttctg	ttaacacctt	cgtgcacgtg	atcatgtact	cttactacgg	acttgctgct	5880
50	cttggagttg	actgtttctg	gaagaagtac	atcacccaga	tccagatgct	tcagtctctg	5940
	atctgtgctt	ctactctat	ctacaccgt	tacgttctga	ataccgcttt	ctggcttctt	6000
	taccttcaac	tctgggttat	ggtgaacatg	ttcggttctt	tcgccaactt	ctaccgtaag	6060
	aggtacaagt	ctaagggtgc	taagaagcag	tgataaggcg	cgcgccgcgc	cgggcccgcg	6120
	ccatgtgaca	gatcgaagga	agaaagtgtg	ataagacgac	tctcactact	cgatcgctag	6180
55	tgattgtcat	tgttatatat	aataatgtta	tctttcacaa	cttatcgtaa	tgcattgtgaa	6240
	actataacac	attaatccta	cttgtcatat	gataaacact	tccccattta	aaactcttgt	6300
	caattttaag	tataagatt	ctttaaatga	ttaaaaaaa	tattattata	attcaatcac	6360
	tcctactaat	aaattattaa	ttattattta	ttgattaaaa	aaatacttat	actaatttag	6420
	tctgaataga	ataattagat	tctagtctca	tccccTTTT	aaccaactta	gtaaacgttt	6480
60	tttttttttaa	ttttatgaag	tttaagtttt	accttgTTTT	taaaaagaat	cgttcataag	6540
	atgccatgcc	agaacattag	ctacacgtta	cacatagcat	gcagccgcgc	agaattgttt	6600
	ttcttcgcca	cttgtcactc	ccttcaaaca	cctaagagct	tctctctcac	agcacacaca	6660
	tacatacaca	tgcgtgcatt	cattattaca	cgtgatcgcc	atgcaaatct	ctttatagc	6720
	ctataaatta	actcatccgc	ttcactcttt	actcaaacca	aaactcatcg	atacaaacaa	6780
65	gattaaaaac	atacacgagg	atctttttaca	acaattacca	acaacaacaa	acaacaacaa	6840
	acattacaat	tacattttaca	attaccatac	catgcctcca	agggactctt	actcttatgc	6900
	tgctcctcct	tctgctcaac	ttcacgaagt	tgatactcct	caagagcacg	acaagaaaga	6960
	gcttggttat	ggagataggg	cttacgagt	taccaacttc	gttaagagac	accttggtgg	7020
	aaagatcatt	gctttaccaag	ttggaactgt	tgctaccgat	gcttacaagc	agttccatgt	7080
70	tagatctgct	aaggctgaca	agatgcttaa	gtctcttctt	tctcgtcctg	ttcacaaagg	7140

	atactctcca	agaagggctg	atcttatcgc	tgattttcaa	gagttcacca	agcaacttga	7200
	ggctgagggg	atgttcgagc	cttctcttcc	tcattgttgct	tacagacttg	ctgagggttat	7260
	cgctatgcat	gttgctggtg	ctgctcttat	ctggcattga	tacactttcg	ctggaatcgc	7320
	tatgcttttg	gttggttcagg	gaagatgttg	atggcttatg	catgaggggtg	catgactactc	7380
5	tctcactgga	aacattgctt	tcgacagagc	tatccaagtt	gcttggttacg	gacttggtatg	7440
	tggaatgtct	ggtgcttggt	ggcgtaacca	gcataacaag	caccatgcta	ctcctcaaaa	7500
	gcttcagcac	gatgttgatc	ttgataccct	tcctctcggt	gctttccatg	agagaatcgc	7560
	tgctaagggtt	aagtctcctg	ctatgaaggc	ttggctttct	atgcaagcta	agcttttcgc	7620
	tcctgttacc	actcttcttg	ttgctcttgg	atggcagctt	taccttcacg	ctagacacat	7680
10	gctcaggact	aagcactacg	atgagcttgc	tatgctcgga	atcagatacg	gacttggttg	7740
	ataccttgct	gctaactacg	gtgctggata	cgcttctcgct	tggttaccttc	tttacgttca	7800
	gcttgagact	atgtacatct	tctgcaactt	cgctgtttct	catactcacc	tccctgttgt	7860
	tgagcctaac	gagcatgcta	cttgggttga	gtacgctgct	aaccacacta	ctaactgttc	7920
	tccatcttgg	tggtgtgatt	ggtggatgtc	ttaccttaac	taccagatcg	agcaccacct	7980
15	ttacccttct	atgcctcaat	tcagacaccc	taagatcgct	cctagagtta	agcagctttt	8040
	cgagaagcac	ggacttcact	acgatattag	aggatacttc	gaggctatgg	ctgatacttt	8100
	cgctaaccct	gataacgttg	cccatgctcc	tgagaagaaa	atgcagtaat	gagatcggtc	8160
	aaacatttgg	caataaagtt	tcttaagatt	gaatcctgtt	gccggctctg	cgatgattat	8220
	catataattt	ctgttggaatt	acgttaagca	cgtaataatt	aacatgtaat	gcatgacgtt	8280
20	atztatgaga	tgggttttta	tgattagagt	cccgcattta	tacatttaac	acgcgataga	8340
	aaacaaaata	tagcgcgcaa	actaggataa	attatcgcgc	gcgggtgcat	ctatgtttat	8400
	agatcggtcg	attaaaaatc	ccaattatat	ttggtctaat	ttagtttggg	attgagttaa	8460
	acaaattcga	accaaaccac	aatataaata	tatatgtttt	atatatatgc	ctttaagact	8520
	ttttatagaa	ttttctttta	aaaatatcta	gaaatatttg	cgactcttct	ggcatgtaat	8580
25	atctcggtta	atatgaagtg	ctccattttt	attaacttta	aataattggg	tgtacgatca	8640
	ctttcttctc	aagtgttact	aaaatgcgct	aatctctttg	ttcttccata	ttcatatgtc	8700
	aaaatctatc	aaaattctta	tatatctttt	tcgaatttga	agtgaatttt	cgataattta	8760
	aaattaaata	gaacatatca	ttattttagg	atcatattga	tttttatact	taattactaa	8820
	atcttggtta	ctttgaaagt	gtacatcaac	gaaaaattag	tcaaacgact	aaaataaata	8880
30	aatatcatgt	gttattaaga	aaattctcct	ataagaatat	tttaatagat	catatgtttg	8940
	taaaaaaaaa	taattttttac	taacacatat	atttacttat	caaaaatttg	acaaagtaag	9000
	attaaaaata	tattcatcta	acaaaaaaa	aaccagaaaa	tgctgaaaac	ccggcaaaaac	9060
	cgaaccaatc	caaaccgata	tagttggttt	ggtttgattt	tgatataaac	cgaaccaact	9120
	cggtccattt	gcacccctaa	tcataatagc	tttaattatt	caagatatta	tttaagttaac	9180
35	gttgctcaata	tcctggaaat	tttgcaaaat	gaatcaagcc	tatatggctg	taatatgaat	9240
	ttaaaagcag	ctcgatgtgg	tggtaatatg	taattttact	gattctaaaa	aaatatccca	9300
	agtattaata	atcttctgcta	ggaagaagg	tagctacgat	ttacagcaaa	gccagaatac	9360
	aaagaaccat	aaagtgattg	aagctcgaaa	tatacgaagg	aacaaatatt	tttaaaaaaa	9420
	tacgcaatga	cttggaaaca	aagaaagtga	tatatttttt	gttcttaaac	aagcatcccc	9480
40	tctaaagaat	ggcagttttc	ctttgcattg	aaactattatg	ctcccttcgt	tacaaaaaatt	9540
	ttggactact	attgggaact	tcttctgaaa	atagtgatag	aaccacacacg	agcatgtgct	9600
	ttccatttaa	ttttaaaaac	caagaaacat	acatacataa	cattccatca	gcctctctct	9660
	ctttttatta	cggttaatga	cttaaaacac	atcttattat	cccattcctta	acacctagca	9720
	gtgtctttat	acgatctcat	cgatcaccac	ttcaaaaacca	tgacagactgc	tgctgcccct	9780
45	ggagctggga	tcggctaggc	tggtgtccgc	actgtcccgc	aagggtcccta	gcgactgtgt	9840
	tagattgatg	ggaccacctc	tcaacttctc	gctgtgtctc	ctgctgtctg	atgtctgtcc	9900
	tcatctggcc	gattgcacgc	tccagtcccc	tgcatgtgca	ctcgtctctc	aattgcttaa	9960
	gatcatcgca	gcagctatcg	aagtgttggt	tctgttgccc	tcctccacgg	ccttggttgt	10020
	agtagtagct	gccgccgccc	ttctggactt	tttcccacag	gaaccgccga	ataattcgat	10080
50	agaaccacac	gagcatgtgc	tttcatattt	tttaaaaaac	aagaaacata	cataacattt	10140
	catcagcctc	tctctctctc	tctctctctc	tctctctctc	tctctctctc	tctctctctt	10200
	tattacagct	gttacactaa	cttaaaacac	attcatctca	ttattattat	tattatccat	10260
	ccttaacacc	tagcagtgtc	tttgtacgat	ctcataatcg	atcaccctct	catcaggtat	10320
	ccttaggctt	cactccaacg	ttgttgagct	tacggaacat	gtacacacca	tcattggttct	10380
55	caacgaactg	gcaagatctc	caagtttttc	aaaggctaac	ccacatgttc	tcattcggtgt	10440
	gtctgtagt	ctctcccata	actttcttga	tgactctggt	agcttctcta	gcatggtaga	10500
	atgggattcct	tgaaacgtag	tgatggagca	catgagtctc	gatgatgtca	tggaagatga	10560
	ttccgaggat	tccgaactct	ctatcgatag	tagcagcagc	acccttagcg	aaagtccact	10620
	cttgagcatc	gtaatgaggc	atagaagaat	cggtgtgtctg	aagggaaggta	acgaaaacaa	10680
60	gccagtgggt	aacaaggatc	caaggacaga	accatgtgat	gaaagttagg	cagaatccga	10740
	aaaccttgta	agcgggtgta	acagaagtga	gggttagcaag	gattccaaga	tcagaaagaa	10800
	cgatgtacca	gtagtccttc	ttatcgaaaa	cagggctaga	aggccagtag	tgagacttga	10860
	agaaccttaga	aacaccaggg	taagggtgtc	cagtacggtt	agtagcaagg	tgaagagaaa	10920
	gtcctccaag	ctgttggaac	aagagagcga	aaacagagta	gataggagtt	tcctcagcga	10980
65	tatcgtgaag	gctggtaact	tggtgttctt	ctttgaattc	ctcggcggtg	taaggaaacga	11040
	aaaccatata	tctgggtcatg	tgtccagtag	ccttatggtg	cttagcatga	gagaacttcc	11100
	agctgaagta	aggaaccata	acaagagagt	ggagaaccca	tccaacggta	tcgttaaccc	11160
	atccgtagtt	agagaaagca	gaatgtccac	actcatgtcc	aaggatccag	attccgaatc	11220
	cgaacaaga	gatagagaac	acgtaagcag	accaagcagc	gaatctaagg	attctgttag	11280
70	ggagaagagg	gatgtaggta	agtccaacgt	aagcgatagc	agagatagcc	acgatattct	11340

	tcaccacgta	agacatagac	ttcacgagag	atctctcgta	acagtgccta	gggatatgcgt	11400
	caaggatatc	cttgatggtg	taatctggca	ccttgaaaac	gtttccgaag	gtatcgatag	11460
	cggctctttg	ctgcttgaaa	gatgcaacgt	ttccagaacg	cctaaccggtc	ttagtagatc	11520
	cctcaaggat	ctcagatcca	gacacggtaa	ccttagacat	ggtaggtaa	ttgtaaatgt	11580
5	aattgtaatg	ttgtttgttg	tttgttgttg	ttggtaattg	ttgtaaaatt	tttgggtggtg	11640
	attgggttctt	taagggtgtga	gagtgagttg	tgagttgtgt	ggtaggtttg	gtgagattgg	11700
	ggatgggtggg	tttatatagt	ggagactgag	gaatgggggtc	gtgagtggtta	actttgcatg	11760
	ggctacacgt	gggttctttt	gggcttacac	gtagtattat	tcatgcaaat	gcagccaata	11820
	catatacggg	attttaataa	tgtgtgggaa	tacaatatgc	cgagtatttt	actaattttg	11880
10	gcaatgacaa	gtgtacattt	ggattatctt	acttggcctc	tcttgcttta	attinggatta	11940
	tttttattct	cttaccttgg	ccgttcataat	tcacatccct	aaaggcaaga	cagaattgaa	12000
	tggtggccaa	aaattaaaac	gatggatatg	acctacatag	tgtaggatca	attaacgtcg	12060
	aaggaaaata	ctgattctct	caagcatacg	gacaagggtta	aataacatag	tcaccagaac	12120
	ataataaaca	aaaagtgcag	aagcaagact	aaaaaaatta	gctatggaca	ttcagggttca	12180
15	tattggaaac	atcattatcc	tagtcttgtg	accatccttc	ctcctgctct	agttgagagg	12240
	ccttgggact	aacgagaggt	cagttgggat	agcagatcct	tatcctggac	tagcctttct	12300
	ggtgtttcag	agtcttcgtg	ccgccgtcta	catctatctc	cattaggtct	gaagatgact	12360
	cttcacacca	acgacgttta	aggtctctat	cctactccta	gcttgcaata	cctggcctgc	12420
	aatacctgga	gcatcgtgca	cgatgattgg	atactgtgga	ggaggagtgt	ttgctgattt	12480
20	agagctcccg	gttgggtgat	ttgacttcga	tttcagttaa	ggcttgttga	aatttttcag	12540
	gttcatttgt	gaagccttta	gagcttgagc	ttccttccat	gttaatgcct	tgatcgaata	12600
	ctcctagaga	aaagggaggt	cgatctctga	gtattgaaat	cgaagtgcac	atgttttttc	12660
	aacgtgtcca	atcaatccac	aaacaaagca	gaagacaggt	aatctttcat	acttatactg	12720
	acaagtaata	gtcttaccgt	catgcataat	aacgtctcgt	tccttcaaga	ggggttttcc	12780
25	gacatccata	acgacccgaa	gcctcatgaa	agcattaggg	aagaactttt	ggttcttctt	12840
	gtcatggcct	ttataggtgt	cagccgagct	cgccaatttc	cgtccgactg	gctccgcaaa	12900
	atattcgaac	ggcaagttat	ggacttgcga	ccataactcc	acggtattga	gcaggacctta	12960
	ttgtgaagac	tcattctcatg	gagcttccaga	atgtggttgt	cagcaaacca	atgaccgaaa	13020
	tccatcacat	gacggacgtc	cagtgggtga	gcgaaacgaa	acaggaagcg	cctatctttc	13080
30	agagtcgtga	gctccacacc	ggattccggc	aactacgtgt	tgggcaggct	tcgccgtatt	13140
	agagatatgt	tgaggcagac	ccatctgtgc	cactcgtaca	attacgagag	ttgttttttt	13200
	tgtgattttc	ctagtttctc	gttgatgggtg	agctcatatt	ctacatcgta	tggtctctca	13260
	acgtcgtttc	ctgtcatctg	atatcccgtc	atttgcatcc	acgtgcgccg	cctcccgtgc	13320
	caagttcccta	ggtgtcatgc	acgccaaatt	ggttgggtgtg	cgggctgccc	ctgtcttctt	13380
35	accgatgggt	ggaggttgag	tttgggggtc	tccgcggcga	tggtagtggg	ttgacggttt	13440
	ggtgtgggtt	gacggcattg	atcaattttac	ttcttgcttc	aaattctttg	gcagaaaaca	13500
	attcattaga	ttagaactgg	aaaccagagt	gatgagacgg	attaagtcag	attccaacag	13560
	agttacatct	cttaagaaat	aatgtaaccc	ctttagactt	tatatatttg	caattaaaaa	13620
	aataatttaa	cttttagact	ttatatatag	ttttaataac	taagttaaac	cactctatta	13680
40	tttatatcga	aactatttgt	atgtctcccc	tctaaataaa	cttgggtattg	tgttctacaga	13740
	acctataatc	aaataatcaa	tactcaactg	aagtttgtgc	agttaattga	agggattaac	13800
	ggccaaaatg	cactagtatt	atcaaccgaa	tagattcaca	ctagatggcc	atttccatca	13860
	atatcatcgc	cgttcttctt	ctgtccacat	atcccctctg	aaacttgaga	gacacctgca	13920
	cttcattgtc	cttattacgt	gttacaaaat	gaaacccatg	catccatgca	aactgaagaa	13980
45	tggcgcaaga	acccttcccc	tccatttctt	atgtggcgac	catccatttc	accatctccc	14040
	gctataaaaac	acccccatca	cttcacctag	aacatcatca	ctacttgctt	atccatccaa	14100
	aagataccca	cttttacaac	aattaccaac	aacaacaaac	aacaacaaac	attacaatta	14160
	catttacaat	taccatacca	tgccacctag	cgctgctaag	caaatgggag	cttctactgg	14220
	tgttcatgct	ggtgttactg	actcttctgc	tttcaccaga	aaggatgttg	ctgatagacc	14280
50	tgatctcacc	atcgttggag	attctgttta	cgatgctaag	gctttcagat	ctgagcatcc	14340
	tggtgggtgct	cttttcgttt	ctttgttcgg	aggaagagat	gctactgagg	ctttctgga	14400
	ataccataga	agggcttggc	ctaagtctag	aatgtctaga	ttccacgttg	gatctcttgc	14460
	ttctactgag	gaacctgttg	ctgctgatga	gggatacctt	caactttgtg	ctaggatcgc	14520
	taagatgggt	ccttctgttt	cttctggatt	cgctctctgt	tcttactggg	ttaaggctgg	14580
55	acttatcctt	ggatctgcta	tcgctcttga	ggcttacatg	ctttacgctg	gaaagagact	14640
	tctcccctct	atcgttcttg	gatggctttt	cgctcttatt	ggtcttaaca	tccagcatga	14700
	tgtaaacctt	ggtgctttgt	ctaagcttgc	ttctgtaaac	cttgctcttg	gtctttgtca	14760
	ggattggatc	ggaggatcta	tgatcctttg	gcttcaagag	catgtttgta	tgaccacctt	14820
	ccacactaac	gatgttgata	aggatcctga	tcaaaaggct	cacgggtgctc	ttagactcaa	14880
60	gcctactgat	gcttgggtcac	ctatgcattg	gcttcagcat	ctttaccttt	tgccctggta	14940
	gactatgtac	gctttcaagc	ttttgttcct	cgacatctct	gagcttggtta	tgtggcggtg	15000
	ggaggggtgag	cctatctcta	agcttgcctg	atacctcttt	atgccttctt	tgcttctcaa	15060
	gcttaccttc	tgggctagat	tcgttgcctt	gcctctttac	cttgctcctt	ctgttctatac	15120
	tgctgtgtgt	atcgctgcta	ctgttatgac	tggtatctttc	tacctcgctt	tcttcttctt	15180
65	catctccac	aacttcgagg	gtgttgcttc	tggttgacct	gatggatcta	tcacttctat	15240
	gactagagggt	gctagcttcc	ttaaagagaca	agctgagact	tcttctaacg	ttggaggacc	15300
	tcttcttgc	actcttaacg	gtggactcaa	ctaccaaatt	gagcatcact	tgttccctag	15360
	agttcaccat	ggattctacc	ctagacttgc	tcctcttgtt	aaggctgagc	ttgaggctag	15420
	aggaatcgag	tacaagcact	accctactat	ctgtgttaac	cttgcttcta	ccctcagaca	15480
70	tatgtacgct	ccttgaagaa	ggcctagatc	taaggctgag	taatgacaag	ccttatgtgac	15540

	gtgaaataat	aacggtaaaa	tatatgtaat	aataataata	ataaagccac	aaagtgagaa	15600
	tgaggggaag	gggaaatgtg	taatgagcca	gtagccggtg	gtgctaattt	tgtatcgtat	15660
	tgtcaataaaa	tcatgaattt	tgtggttttt	atgtgttttt	ttaaatcatg	aatttttaaa	15720
	tttataaaaat	aatctccaat	cggaagaaca	acattccata	tccatgcatg	gatgtttctt	15780
5	tacccaaatc	tagttcttga	gaggatgaag	catcaccgaa	cagttctgca	actatccctc	15840
	aaaagcttta	aaatgaacaa	caaggaacag	agcaacgttc	caaagatccc	aaacgaaaca	15900
	tattatctat	actaatacta	tattattaat	tactactgcc	cggaatcaca	atccctgaat	15960
	gattcctatt	aactacaagc	cttggttgcg	gcggaagaag	gatcggcgcg	gcgagaagca	16020
	gcgactcgg	agacgaggcc	ttggaagatc	tgagtccaac	gggcagaatc	agtattttcc	16080
10	ttcgacgtta	attgatccta	cactatgtag	gtcatatcca	tcgttttaat	ttttggccac	16140
	cattcaattc	tgtcttgcct	ttagggatgt	gaatatgaac	ggccaaggta	agagaataaa	16200
	aataatccaa	attaaagcaa	gagaggccaa	gtaagataat	ccaaatgtac	acttgtcatt	16260
	gccaaaatta	gtaaaatact	cggcataattg	tattcccaca	cattattaaa	ataccgtata	16320
	tgtattggct	gcatttgcac	gaataatact	acgtgtaagc	ccaaaagaac	ccacgtgtag	16380
15	cccattgcaa	gttaaacactc	acgaccccat	tcctcagctc	ccactatata	aaccacacct	16440
	ccccaatctc	accaaaccaca	ccacaaactc	cacaactcac	tctcacacct	taaagaacca	16500
	atcaccacca	aaaatttttac	aacaattacc	aacaacaaca	aacaacaac	aacattacaa	16560
	ttacattttac	aattaccata	ccatgagcgc	tgttaccgtt	actggatctg	atcctaagaa	16620
	cagaggatct	tctagcaaca	ccgagcaaga	ggttccaaaa	gttgctatcg	ataccaacgg	16680
20	aaacgtgttc	tctgttccctg	atttcaccat	caaggacatc	cttgagagta	tccctcatga	16740
	gtgttacagg	agaagattgg	ctacctctct	ctactacgtg	ttcagagata	tcttctgcac	16800
	gcttaccacc	ggataacctta	cccataagat	cctttaccct	ctcctcatct	cttacacctc	16860
	taacagcatc	atcaagttca	ctttctgggc	cctttacact	tacgttcaag	gacttttcgg	16920
	aaccggaatc	tgggttctcg	ctcatgagtg	tggacatcaa	gctttctctg	attacggaat	16980
25	cgtgaacgat	ttcgttggat	ggacccttca	ctcttacctt	atgggttcctt	acttcagctg	17040
	gaagtactct	catggaaagc	accataaggc	tactggacac	atgaccagag	atatggtttt	17100
	cgttccctgc	accaaagagg	aattcaagaa	gtctaggaac	ttcttcggta	acctcgtga	17160
	gtactctgag	gattctccac	ttagaaccct	ttacgagctt	cttggttcaac	aacttggagg	17220
	atggatcgct	tacctcttcg	ttaacgttac	aggacaacct	tacctgatg	ttccttcttg	17280
30	gaaatggaac	cacttctggc	ttacctctcc	acttttctgag	caaagagatg	ctctctacat	17340
	cttccitttct	gatcttggaa	tcctcaccca	gggaatcggt	cttactcttt	ggtagaagaa	17400
	attcggagga	tgggtcccttt	tcatacaactg	gttctgttct	tacatctggg	ttaaccactg	17460
	gctcgttttc	atcacatttc	ttcagcacac	tgactctact	atgcctcatt	acaacgtga	17520
	ggaatggact	ttcgctaagg	gtgctgctgc	tactatcgat	agaaagtctg	gattcatcgg	17580
35	acctcacatc	ttccatgata	tcatacgagac	tcattgtgctt	caccactact	gttctaggat	17640
	cccattctac	aacgctagac	ctgcttctga	ggctatcaag	aaagtatttg	gaaagcacta	17700
	caggtctagc	gacgagaaca	tgtggaagtc	acttttggaa	tccttcagggt	cttgccaata	17760
	cgttgacggt	gataacggtg	ttctcatggt	ccgtaacatc	aacaactgcg	gagttggagc	17820
	tgttgagaag	taatgaaggg	gtgatctgatt	atgatagctt	acaaagacac	tgtcaggtgt	17880
40	taaggttgga	taataataat	aataatgaga	tgaatgtggt	ttaaagttagt	gtaacagctg	17940
	taataaagag	agagagagag	agagagagag	agagagagag	agagagagag	agagagaggc	18000
	tgatgaaatg	ttatgtatgt	ttcttgggtt	ttaaaataaa	tgaaagcaca	tgctcgtgtg	18060
	gttctatcga	attattcggc	ggttcctgtg	ggaaaaagtc	cagaagggcc	gccgcagcta	18120
	ctactacaac	caaggccgtg	gaggagggca	acagagccag	cacttcgata	gctgctgcga	18180
45	tgatcttaag	caattgagga	gcgagtgcac	atgcagggga	ctggagcgtg	caatcgcca	18240
	gatgagcgag	gaattccagc	agcagggaca	gcagcaggaa	gttgagaggt	gggtccatca	18300
	atctaaacaa	gtcgctaggg	accttccggg	acagtgcggc	acccagccta	gccgatgcc	18360
	gctccagggg	cagcagcagt	ctgcatgggt	ttgaagtggg	gatcgatgag	atcgataaaa	18420
	gacactgcta	ggtgttaagg	atgggataat	aagatgtggt	ttaaagtcatt	aaccgtaata	18480
50	aaaagagaga	gaggctgatg	gaatgttatg	tatgtatggt	tccttgggtt	taaaattaaa	18540
	tggaaagcac	atgctcgtgt	gggttctatc	tcgattaaaa	atcccaatta	tatttggctt	18600
	aattttagttt	ggatttgagt	aaaacaaatt	cgaaccaaac	caaaatataa	atatatagtt	18660
	tttatatata	tgcctttaag	actttttata	gaattttctt	taaaaaatat	ctagaaatat	18720
	ttgcgactct	tctggcatgt	aatatttctg	taaatatgaa	gtgctccatt	tttattaact	18780
55	ttaaataatt	ggttgtagca	tcactttctt	atcaagtgtt	actaaaatgc	gtcaatctct	18840
	ttgttcttcc	atattcatat	gtcaaaatct	atcaaaatct	ttatatatct	ttttcgaatt	18900
	tgaagtgaag	tttcgataat	ttaaaattaa	atagaacata	tcattattta	ggtatcatat	18960
	tgatttttat	acttaattac	taaatttggg	taactttgaa	agtgtacatc	aacgaaaaat	19020
	tagtcaaacg	actaaaataa	ataaataatc	tgtgttatta	agaaaattct	cctataagaa	19080
60	tatttttaata	gatcatatgt	ttgtaaaaaa	aattaatatt	tactaacaca	tatatattact	19140
	tatcaaaaat	ttgacaaagt	aagattaaaa	taatattcat	ctaacaaaaa	aaaaaccaga	19200
	aaatgctgaa	aacccggcaa	aaccgaacca	atccaaaccg	atatagttgg	tttggtttga	19260
	ttttgatata	aaccgaacca	actcgggtcca	tttgcacccc	taatcataat	agctttaata	19320
	tttcaagata	ttattaagtt	aacgttgtca	atatcctgga	aattttgcaa	aatgaatcaa	19380
65	gcctatatgg	ctgtaatatg	aatttaaaag	cagctcgatg	tggtggtaat	atgtaattta	19440
	cttgattcta	aaaaaatatc	ccaagtatta	ataatttctg	ctaggaagaa	ggtagctac	19500
	gatttacagc	aaagccagaa	tacaaagaac	cataaagtga	ttgaagctcg	aatataacga	19560
	aggaacaaat	aattttaaaa	aaatacgcaa	tgacttggaa	caaaagaaag	tgatataatt	19620
	ttgtttctta	aactagcatc	ccctctaaag	aatggcagtt	ttcctttgca	tgaatactatt	19680
70	atgctccctt	cgttacaaaa	attttggact	actattggga	acttcttctg	aaaatagtcc	19740

	tgcaggctag	tagattgggt	ggttgggttc	catgtaccag	aaggcttacc	ctattagttg	19800
	aaagttgaaa	ctttgttccc	tactcaattc	ctagttgtgt	aaatgtatgt	atatgtaatg	19860
	tgtataaaa	gtagtactta	aatgactagg	agtggttctt	gagaccgatg	agagatggga	19920
	gcagaactaa	agatgatgac	ataaattaga	acgaatttga	aaggctctta	ggtttgaatc	19980
5	ctattcgaga	atgtttttgt	caaagatagt	ggcgattttg	aaccaaagaa	aacattttaa	20040
	aaatcagtat	ccggttacgt	tcatgcaaat	agaaagtggg	ctaggatctg	attgtaattt	20100
	tagacttaaa	gagtctctta	agattcaatc	ctggctgtgt	acaaaactac	aaataatata	20160
	ttttagacta	tttggcctta	actaaacttc	cactcattat	ttactgaggt	tagagaatag	20220
	acttgcgaa	aaacacattc	ccgagaaata	ctcatgatcc	cataattagt	cagaggggat	20280
10	gccaatcaga	tctaagaaca	cacattccct	caaattttaa	tgcacatgta	atcatagttt	20340
	agcacaattc	aaaaataatg	tagtattaaa	gacagaaatt	tgtagacttt	tttttggcgt	20400
	taaaagaaga	ctaagtttat	acgtacattt	tatttttaagt	ggaaaaccga	aattttccat	20460
	cgaaatatat	gaatttagta	tatatatttc	tgcaatgtac	tatttttgcta	ttttggcaac	20520
	tttcagtggg	ctactacttt	attacaatgt	gtatggatgc	atgagtttga	gtatacacat	20580
15	gtctaaatgc	atgcttttga	aaacgtaacg	gaccacaaaa	gaggatccat	acaaatacat	20640
	ctcatagctt	cctccattat	tttcgacac	aaacagagca	ttttacaaca	gttaccaca	20700
	acaacaaca	acaacaaca	ttacaattac	atttacaatt	accataccat	ggaatttgct	20760
	caacctctcg	ttgctatggc	tcaagagcag	tacgctgcta	tcgatgctgt	tggtgctcct	20820
	gctatcttct	ctgctaccga	ctctattgga	tggggactca	agcctatctc	ttctgctact	20880
20	aaggatctcc	ctctcgttga	atctcctacc	cctcttatcc	tttctctcct	cgcttacttc	20940
	gctatcgttg	gttctggact	cgtttaccgt	aaagtgttcc	ctagaaccgt	taagggacag	21000
	gatccctttc	ttctcaaggc	tcttatgctc	gctcacaacg	ttttccttat	cggactcagc	21060
	ctttacatgt	gcctcaagct	cgtttaccag	gcttacgtga	acaagtactc	cttctgggga	21120
	aacgcttaca	accctgctca	aaccgagatg	gctaagggtga	tctggatctt	ctacgtgtcc	21180
25	aagatctacg	agttcatgga	caccttcac	atgcttctca	agggaaacgt	taaccagggt	21240
	tccttctctc	atgtttacca	ccacggatct	atctctggaa	tctgggtggat	gatcacttat	21300
	gctgctccag	gtggagatgc	ttacttctct	gctgctctca	actcttgggt	tcagtgtgtc	21360
	atgtacacct	actacttcac	ggctgtgtgt	cttcttaagg	acgaaaagac	caagagaaag	21420
	tacctttggg	ggggaagata	ccttaccacg	atgcaaatgt	tccagtctct	catgaacctt	21480
30	ctccaggctg	tttacctcct	ctactcttct	tctccttacc	ctaagttcat	tgctcaactc	21540
	ctcgttggtt	acatgggttac	cctcctcatg	cttttcggaa	acttctacta	catgaagcac	21600
	cacgcttcta	agtataaagg	gccgccgcca	tgtgacagat	cgaaggaaga	aagtgtataa	21660
	agacgactct	cactactcga	tcgctagtga	ttgtcattgt	tatatataat	aatgttatct	21720
	ttcacaaact	atcgtaatgc	atgtgaact	ataacacatt	aatcctactt	gtcatatgat	21780
35	aacactctcc	ccatttaaaa	ctcttgtcaa	tttaaagata	taagattctt	taaatgatta	21840
	aaaaaaatat	attataaatt	caatcactcc	tactaataaa	ttattaatta	ttattttattg	21900
	attaaaaaaa	tacttatact	aatttagtct	gaatagaata	attagattct	agcctgcagg	21960
	gcggccgcgg	atcccatgga	gtcaaagatt	caaataagag	acctaacaga	actcgcgcta	22020
	aagactggcg	acaggttcac	acagagtctc	ttacgactca	atgacaagaa	gaaaaacttc	22080
40	gtcaacatgg	tggagcacga	cacacttgtc	tactcctaaa	atatcaaaaga	tacagtctca	22140
	gaagaccaaa	gggcaattga	gacttttcaa	caaagggtaa	tatccggaaa	cctcctcgga	22200
	ttccattgcc	cagctatctg	tcactttatt	gtgaagatag	tggaagagga	aggtggctcc	22260
	tacaaatgcc	atcattgcca	taaaggaaag	gccatcggtg	aagatgcctc	tgccgcagct	22320
	ggtcccaaag	atggaccccc	acccacgagg	agcatcggtg	aaaaagaaga	cgttccaacc	22380
45	acgtcttcaa	agcaagtggg	ttgatgtgat	atctccactg	acgtaaggga	tgacgcacaa	22440
	tcccataatc	cttcgcaaga	cccttctctc	atataaggaa	gttcatttca	tttggagaga	22500
	acacggggga	ctgaattaaa	tatgagccct	gagaggcgct	ctgttgaaat	cagacctgct	22560
	actgctgctg	atatggctgc	tgtttgtgat	atcgtgaacc	actacatcga	gacttctacc	22620
	gttaacttca	gaactgagcc	tcaaactcct	caagagtggg	tcgatgatct	tgagagactc	22680
50	caagatagat	acccttggct	tgttgctgag	gttgagggtg	ttgttgctgg	aatcgcttac	22740
	gctggacctt	ggaaggctag	aaacgcttac	gattggactg	ttgagtctac	cgtttacggt	22800
	tcacacagac	atcagagact	tggacttggg	tctacccttt	acactcacct	tctcaagtct	22860
	atggaagctc	agggattcaa	gtctgttgtt	gctgttatcg	gactccctaa	cgatccttct	22920
	gttagacttc	atgaggctct	tggtacactc	gctagaggaa	ctcttagagc	tgctggatac	22980
55	aagcacgggtg	gatggcatga	tggtggattc	tggcaaagag	atttcgagct	tcctgctcct	23040
	cctagacctg	ttagaccagt	tactcagatc	tgaatttgcg	tgatcgttca	aacatttggc	23100
	aataaagttt	cttaagattg	aatcctgttg	ccggtcttgc	gatgattatc	atataatttc	23160
	tgttgaatta	cgtaagcat	gtaataatta	acatgtaatg	catgacgtta	tttatgagat	23220
	gggtttttat	gattagagtc	ccgcaattat	acatttaata	cgcgatagaa	aacaaaatat	23280
60	agcgcgcaaa	ctaggataaa	ttatcgcgcg	cggtgtcatc	tatgttacta	gatcactagt	23340
	gatgtacggt	taaaaccacc	ccagtacatt	aaaaacgtcc	gcaatgtgtt	attaagttgt	23400
	ctaagcgtca	atttgtttac	accacaatat	atcctgccac	cagccagcca	acagctcccc	23460
	gaccggcagc	tcggcaca	atcaccactc	gatacaggca	gcccatcagt	cc	23512
	<210>	3					
65	<211>	1254					
	<212>	ДНК					
	<213>	Штучна послідовність					
	<220>						
	<223>	Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії					
70		12 десатурази Lachancea kluyveri в рослинах					

	<400> 3																
	atgagc	gctg	ttaccg	ttac	tggatc	tgtat	cctaaga	acac	gaggat	ccttc	tagcaac	acc	60				
	gagca	agagg	ttccaaa	aggt	tgctat	cgtat	accaac	ggaa	acgtgt	tctc	tgttc	ctgat	120				
	ttcacc	atca	aggacat	cct	tgagat	ctatc	cctcat	gagt	gttacg	agag	aagatt	ggct	180				
5	acctct	ctct	actacg	tgtt	cagagat	atc	ttctgc	atgc	ttaccac	cg	atac	cttacc	240				
	cataag	atcc	tttacc	ctct	cctcat	ctct	tacac	ctcta	acagca	tcat	caagtt	caact	300				
	ttctgg	ggccc	tttacac	tta	cgttca	agga	cTTTTc	ggaa	ccgga	atctg	ggttct	cgct	360				
	catgag	tgtg	gacatca	agc	tttctc	tgtat	tacgga	atcg	tgaac	gattt	cgttg	gatgg	420				
	accctt	caact	cttac	cttat	ggttc	cttac	ttcagc	tggga	agtact	ctca	tggaa	agcac	480				
10	cataag	gcta	ctggac	acat	gaccaga	gat	atggtt	tttcg	ttcctg	ccac	caaaga	ggaa	540				
	ttcaaga	agt	ctagga	actt	cttcg	gtaac	ctcgct	gagt	actctg	agga	ttctcc	actt	600				
	agaacc	cttt	acgagc	ttct	tgttca	acaa	cttgga	ggat	cgctta	cctctt	cggtt		660				
	aacgtt	acag	gacaac	ctta	ccctga	tgtt	ccttct	tggga	aatgga	acca	cttctg	gctt	720				
	acctct	ccac	ttttcg	agca	aagaga	tgt	ctctac	atct	tccttt	ctga	tcttgg	aatc	780				
15	ctcacc	cagg	gaatc	gttct	tactct	tttgg	tacaaga	aat	tcggag	gatg	gtccc	ttttc	840				
	atcaac	tgggt	tcgttc	cttta	catctg	gggtt	aaccact	ggc	tcgtttt	cat	cacatt	ctctt	900				
	cagcac	actg	atccta	tactat	gcctca	tattac	aacgct	gagg	aatgg	acttt	cgcta	agggt	960				
	gctgct	gcta	ctatcg	atag	aaagtt	cggga	ttcatc	ggac	ctcac	atctt	ccatga	tatc	1020				
	atcgag	actc	atgtgc	ttca	ccacta	ctgt	tctagg	atcc	cattct	tacaa	cgtaga	cct	1080				
20	gcttct	gagg	ctatca	agaa	agttat	ggga	aagcact	taca	ggtcta	gcga	cgaga	acatg	1140				
	tggaag	tcac	tttgg	aagtc	tttcagg	tct	tgcca	atacg	ttgac	ggtga	taacg	gtgtt	1200				
	ctcatg	ttcc	gtaac	atcaa	caactg	cggga	gttgg	agctg	ctgaga	agta	atga		1254				
	<210> 4																
	<211> 416																
25	<212> Білок																
	<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		
30	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				
35	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			
40	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	
45		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		
50	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	
55			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		
60	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	
65			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		
70	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						
5	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				
10	<210>	5																	
	<211>	1251																	
	<212>	ДНК																	
	<213>	Pichia pastoris																	
	<400>	5																	
15	atgtctaagg	ttaccgtgtc	tggatctgag	atccttgagg	gatctactaa	gaccgtagg											60		
	cgttctggaa	acgttgcatac	tttcaagcag	caaaagaccg	ctatcgatac	cttcggaaac											120		
	gttttcaagg	tgccagatta	caccatcaag	gatatacctt	acgctatccc	taagcactgt											180		
	tacgagagat	ctctcgtgaa	gtctatgtct	tacgtggtga	gagatatcgt	ggctatctct											240		
	gctatcgctt	acgttggact	tacctacatc	cctcttctcc	ctaacgaatt	ccttagattc											300		
20	gctgcttggg	ctgcttacgt	gttctctatc	tcttgtttcg	gattcggaat	ctggatcctt											360		
	ggacatgagt	gtggacattc	tgtcttctct	aactacggat	gggttaacga	taccgttggg											420		
	tgggttctcc	actctcttgt	tatgggttct	tacttcagct	ggaagttctc	tcattgctaag											480		
	caccataagg	ctactggaca	catgaccaga	gatattggtt	tcgttcctta	caccgccgag											540		
	gaattcaaag	agaagcacca	agttaccagc	cttcacgata	tcgctgagga	aactcctatc											600		
25	tactctgttt	tcgctctctt	gttccaacag	cttgaggagc	tttctcttta	ccttgctact											660		
	aacgctactg	gacaacctta	ccctggtggt	tctaagttct	tcaagtctca	ctactggcct											720		
	tctagccctg	ttttcgataa	gaaggactac	tggtacatcg	ttctttctga	tcttggaaatc											780		
	cttgctaccc	tcacttctgt	ttacaccgct	tacaagggtt	tcggattctg	gcctactttc											840		
	atcacatggt	tctgtccttg	gatccttgtt	aaccactggc	ttgttttcgt	taccttcctt											900		
30	cagcacaccg	attcttctat	gcctcattac	gatgctcaag	agtggacttt	cgctaagggt											960		
	gctgctgcta	ctatcgatag	agagttcggg	atcctcggaa	tcattcttcca	tgacatcatc											1020		
	gagactcatg	tgctccatca	ctacgtttca	aggatcccat	tctaccatgc	tagagaagct											1080		
	accgagtgcg	tcaagaaagt	tatgggagag	cactacagac	acaccgatga	gaacatgtgg											1140		
	gttagccttt	ggaaaacttg	gagatcttgc	cagttcggtt	agaaccatga	tgggtgtgtac											1200		
35	atgttccgta	actgcaacaa	cgttggagtg	aagcctaagg	atacctgatg	a											1251		
	<210>	6																	
	<211>	415																	
	<212>	Білок																	
	<213>	Pichia pastoris																	
	<400>	6																	
40	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					
45	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							
50	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					
55	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			
60		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					
65	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							
70	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	
	Asp	Leu	Gly	Ile	245	Ala	Thr	Leu	Thr	250	Val	Tyr	Thr	Ala	255	Tyr	Lys
				260	Leu				265	Ser				270			
5	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					
10	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			
15	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					
20	Lys	Thr	Trp	Arg	Ser	Cys	Gln	Phe	Val	Glu	Asn	His	Asp	Gly	Val	Tyr	
	385					390					395					400	
	Met	Phe	Arg	Asn	Cys	Asn	Asn	Val	Gly	Val	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr		
				405					410						415		
	<210> 7																
	<211> 1392																
25	<212> ДНК																
	<213> Micromonas pusilla																
	<400> 7																
	atgtgcccg	cgaagacgga	cggccgcat	tccccgcgat	cgccgctgac	gcgcagcaaa	60										
	tcctccg	aggcgctcga	cgccaaggac	gcgtcgaccg	cgcccgtcga	tctcaaaacg	120										
30	ctcgagccg	acgagctcgc	ggcgacgttc	gagacgcgat	gggtgcgcgt	ggaggacgtc	180										
	gagtacgacg	tcacaaactt	caaacacccg	ggaggcagcg	tgatattcta	catgctcgcg	240										
	aacacggg	cggacgccac	ggaggcggtc	aaggagttcc	acatgcgatc	gcttaaggcg	300										
	tggaagatgc	tcagagcgct	gccgtcgcgc	cccgcggaga	tcaaacgcag	cgagagcgag	360										
	gacgcgccga	tggtggagga	tttcgcgcgcg	tggcgcgcgcg	agctcgaacg	cgacgggttc	420										
35	tttaagccct	cgataacgca	cgctcgcgat	cggttactcg	agctcctcgc	gaccttcgcc	480										
	ctcggcaccg	ccctcatgta	cgccgggtac	ccgatcatcg	cgctccgctgt	gtacggcgcg	540										
	ttcttcggcg	ctcgggtgcg	ttgggtccag	cacgagggcg	ggcacaactc	gctcacgggg	600										
	tccgtctacg	tcgacaagcg	cctccaagcg	atgacgtg	ggttcgggct	gtccacgagc	660										
	ggggagatgt	ggaaccagat	gcacaataag	caccacgcga	cgccgcagaa	agtgaaggac	720										
40	gacatgggac	tggaacgac	ccccgcgggtg	gcgtttttta	acaccgccgt	ggaggacaac	780										
	cgcccgaggg	ggttctcccg	cgcggtgggt	cggcttcagg	cgtaggacgtt	cgtcccgggtg	840										
	acctccgggc	tgctcgtcca	ggcgttcttg	atctacgtcc	tgaccccgcg	gcaggtgttg	900										
	cgaaagaaga	actacgagga	ggcgctcggtg	atgctcgtct	ctcacgtcgt	caggaccgcg	960										
	gtgattaaac	tcgagcggg	gtactcgtg	cccgtcgcgt	actggtgggt	caccttcggc	1020										
45	aactggatcg	cgtacatgta	cctcttcgcg	cattcttcca	cgagccacac	gcacctcccg	1080										
	gtcgtgccct	cgataagca	cctgagctgg	gtgaactacg	cggtcgatca	caccgtggac	1140										
	atcgaccctg	cgcgcggtg	cgtgaactgg	ttgatgggat	atctgaactg	ccaggtcatt	1200										
	catcacctgt	tcccggacat	gccgcagttt	cgccagcccg	aggtgagccg	gcgggttcgtc	1260										
	ccgttcgcga	agaagtggg	gctgaactac	aaggtgctgt	cctattacgg	cgccgtggaag	1320										
50	gcgacgttct	cgaacttgga	taaggtcggg	cagcactact	acgtcaacgg	caaggcggag	1380										
	aaggcgact	ga					1392										
	<210> 8																
	<211> 1395																
	<212> ДНК																
55	<213> Штучна послідовність																
	<220>																
	<223> Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії																
	Micromonas pusilla 6 десатурази в рослинах (версія 1)																
	<400> 8																
60	atgtgccctc	ctaagactga	tggaagatct	tctcctagat	ctccacttac	caggtctaaa	60										
	tcttctgctg	aggctcttga	tgctaaggat	gcttctactg	ctcctgttga	tcttaagact	120										
	cttgagcctc	atgagcttgc	tgctactttc	gagactagat	gggttagagt	tgaggacgtt	180										
	gagtacgatg	tgactaactt	caagcaccct	ggtggatctg	tgatcttcta	catgcttgct	240										
	aacactgggtg	ctgatgctac	tgaggctttc	aaagaattcc	acatgcgttc	tctcaaggct	300										
65	tggaagatgc	ttagagcttt	gccttctaga	cctgctgaga	tcaagagatc	tgagtctgag	360										
	gatgctccta	tgcttgagga	tttcgctaga	tggcgtgctg	agcttgagag	agatggattc	420										
	ttcaagcctt	ctatcaccca	tgtggcttac	agacttctcg	agcttcttgc	tacattcgct	480										
	cttggaactg	ctcttatgta	cgctggatac	cctatcattg	cttctgttgt	ttacggtgct	540										
	ttcttcggag	ctagatgtgg	atgggttcaa	catgagggtg	gacataactc	ctttaccgga	600										
70	tctgtttacg	tggaacaagag	acttcaggct	atgacttgtg	gattcggact	ttctacttct	660										

	ggtgagatgt	ggaaccagat	gcataacaag	caccatgcta	cccctcaaaa	ggtagacac	720
	gatatggatc	ttgataccac	tcctgctgtg	gctttcttca	acactgctgt	tgaggataac	780
	agacctagag	gattctctag	agcttgggct	agacttcaag	cttggacttt	cgttcctggt	840
	acctctggac	ttcttgttca	agctttcttg	atctacgttc	tccaccctag	acaagttctc	900
5	cgtaagaaga	actacgaaga	ggcttcttgg	atgctcgttt	ctcatgttgt	tagaaccgct	960
	gttatcaagc	ttgctactgg	atactcttgg	cctgttgctt	actgggtggt	cactttcgga	1020
	aactggatcg	cttacatgta	ccttttcgct	cactttctcta	cttctcatac	tcacctccct	1080
	gttggtccat	ctgataagca	cctttcttgg	gttaactacg	ctgttgatca	caccgttgat	1140
	atcgatcctt	ctagaggata	cgtgaactgg	cttatgggat	accttaactg	tcagggttatc	1200
10	caccacctct	tccctgatat	gcctcaattc	agacagcctg	aggtttagcag	aagattcggt	1260
	cctttcgcta	agaagtgggg	actcaactac	aagggtgctct	cttactacgg	tgcttggaag	1320
	gctactttct	ctaaccttga	taagggtggga	cagcactact	acgttaacgg	aaaggctgag	1380
	aaggctcact	aatga					1395
	<210>	9					
15	<211>	463					
	<212>	Білок					
	<213>	Micromonas pusilla					
	<400>	9					
20	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						
25	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						
30	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						
35	Ala Arg Trp Arg Ala Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser						
	130 135 140						
	Ile Thr His Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Leu Ala Thr Phe Ala						
	145 150 155 160						
40	Leu Gly Thr Ala Leu Met Tyr Ala Gly Tyr Pro Ile Ile Ala Ser Val						
	165 170 175 180						
	Val Tyr Gly Ala Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu						
	185 190 195						
	Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Ser Val Tyr Val Asp Lys Arg Leu						
	200 205 210						
45	Gln Ala Met Thr Cys Gly Phe Gly Leu Ser Thr Ser Gly Glu Met Trp						
	215 220 225						
	Asn Gln Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His						
	230 235 240						
50	Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala						
	245 250 255 260						
	Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Arg Ala Trp Ala Arg Leu						
	265 270 275 280						
	Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Leu Leu Val Gln Ala						
	285 290 295 300						
55	Phe Trp Ile Tyr Val Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Lys Lys Asn						
	305 310 315 320						
	Tyr Glu Glu Ala Ser Trp Met Leu Val Ser His Val Val Arg Thr Ala						
	325 330 335 340						
60	Val Ile Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Trp Pro Val Ala Tyr Trp Trp						
	345 350 355 360						
	Phe Thr Phe Gly Asn Trp Ile Ala Tyr Met Tyr Leu Phe Ala His Phe						
	365 370 375 380						
65	Ser Thr Ser His Thr His Leu Pro Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu						
	385 390 395 400						
	Ser Trp Val Asn Tyr Ala Val Asp His Thr Val Asp Ile Asp Pro Ser						
	405 410 415						
70	Arg Gly Tyr Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile						
	His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser						

	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			
5	Val	Gly	Gln	His	Tyr	Tyr	Val	Asn	Gly	Lys	Ala	Glu	Lys	Ala	His	
		450					455					460				
	<210>	10														
	<211>	1449														
	<212>	ДНК														
10	<213>	Ostreococcus lucimarinus														
	<400>	10														
	atgtgctg	aaacgaccga	aggcacatcg	cgaacgatgg	cgaacgaacg	cacgagctcg										60
	tcgtcgtcgc	tgagcgaagg	cggaacgccg	acggtgacgg	tcgggatggg	aagcgaagac										120
	gcggggaaga	agactcgaag	cgcgagcgctc	acggcggtga	cgaagagatt	ggagccgcac										180
15	gcgatcgca	agacgttcga	acggcggtac	gtgacgatcg	aaggcggtga	atacgaatgtg										240
	acggatttta	agcatcccg	aggatcgggt	atttattaca	tgctgtcgaa	cacgggagcg										300
	gacgcgacgg	aggcttttaa	agagtttcat	tatcggtcga	aaaaggcgcg	caaggcggtg										360
	gcggcggttg	cgcataagcc	agtggacgcg	gcgacgcggg	aaccgatcga	agatgaggcg										420
	atgctgaagg	atttcgcgca	gtggcgcaag	gaattggagc	gtgagggatt	ttttaagccc										480
20	tcgccggcgc	acgtggcgta	tcgattcgcc	gagctcgcg	cgatgttcgc	gctcggcacg										540
	gcgttgatgc	acgcgcgttg	gcacgtcgct	tccgtgatcg	tgtagctgtg	tttcttcggc										600
	gcgcgatgcg	gttgggtgca	gcacgagggg	gggcacaatt	cgtagctgg	aaacatttgg										660
	tgggacaagc	gaatccaagc	cttcgcgcgc	gggttcggct	tggtcgtag	tggtcgacatg										720
	tggacaaca	tgacaaca	gcatacgcg	acgccccaaa	aggtgcgaca	cgatatggat										780
25	ctcgacacca	ctccacggg	ggcggttcttc	aactccgcgc	ttgaagaaaa	tcgcccgcgc										840
	ggattcagta	agttgtggtt	gcgccttcaa	gcgtggacct	tcgtgcccgt	gacgtccggt										900
	atggttttgt	tcttctggat	gttcgtcttg	cacccgcgta	acgcgctgcg	acgcaaaagc										960
	ttcgaagaag	cggcttggtg	gttttcgcgc	cacgtcattc	gcacggcggt	tatcaaaagc										1020
	gtcaccggct	actcctggat	cgctcgtac	ggcttggtcg	cggtcgacgat	gtgggcgagc										1080
30	ggatgttact	tggtcgcgca	cttttcacgc	tctcacacgc	acttgatgt	cgtgccgagc										1140
	gataaacacc	tctcgtgggt	gcgatacgc	gtcgatcaca	cgatcgacat	caatccgaac										1200
	aacagcgtcg	tcaactgggt	gatgggctac	ttgaactgcc	aagtcattca	tcacctgttc										1260
	ccgatatgc	ctcagttccg	ccaaccgcaa	gtctccgcgc	gattcgtccc	gtttgcgaag										1320
	aagtggaaac	taaaactaca	ggctctgacg	tattatgggg	cctggaaagg	gacgttcggc										1380
35	aacttgaacg	acgtcgggaa	gcactattac	gtgcacggat	ctcagcgcg	caaatacaag										1440
	tcggcgtag															1449
	<210>	11														
	<211>	1449														
	<212>	ДНК														
40	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії														
		Ostreococcus lucimarinus 6-десатурази в рослині														
	<400>	11														
45	atgtgtgttg	agactactga	gggaacctct	agaactatgg	ctaacgagag	gacctcttct										60
	tcttcttcac	tctctgagg	tggaactcct	actgttactg	tggaatggg	atctgaggat										120
	gctggaaaga	aaaccagaaa	cgcttctgtt	actgcttgga	caaagagct	tgagcctcac										180
	gctatcgcta	agaccttcga	gagaagatac	gttaccatcg	aggggtgttg	gtacgatgtg										240
	accgatttca	aacaccctgg	tgatctgtg	atctactaca	tgctctctaa	cactgggtgct										300
50	gatgctactg	aggctttcaa	agagttccac	taccgttcta	agaaggctag	aaaggctctt										360
	gctgcttttc	ctcacagcc	tggtgatgct	gctactagag	agcctattga	ggacgaggct										420
	atgcttaagg	atttcgctca	gtggagaaaa	gagttggaga	gagagggatt	cttcaagcct										480
	tctcctgctc	atgttgctta	ccgtttcgct	gaactcgctg	ctatgttcgc	tcttgaacc										540
	gctcttatgc	atgctagatg	gcacgttgct	agcgttatcg	tgtagctctg	tttcttcgga										600
55	gctagatgtg	gatgggttca	acatgagggt	ggacacaaact	ctcttaccgg	aaacatctgg										660
	tgggataaga	gaatccaagc	tttcgctgct	ggattcggac	ttgtctcttc	tggtgacatg										720
	tggaaaca	tgacaaca	gcaccatgct	actcctcaga	aagtgaagaca	cgatatggat										780
	cttgataacca	cccctaccgt	tgctttcttc	aactctgctg	tggaagaaaa	cagacctagg										840
	ggattctcta	agctttggct	cagacttcaa	gcttggaact	tcgttctctg	tacctctgga										900
60	atgggtgctc	tcttctggat	gttcgttctc	catcctagaa	acgctctccg	tcgtaagtct										960
	ttcgaagagg	ctgcttggtg	gttctctgct	cacgttatca	gaaccgctgt	tatcaaggct										1020
	gttaccggat	actcttggtg	cgtagctac	ggacttttgc	ctgctactat	gtgggtctct										1080
	ggatgctacc	cttctgctca	cttctctact	tctcacacc	acctcgatgt	gtttccatct										1140
	gataagcacc	ttagctgggt	taggtacgct	gttgatcaca	ccatcgacat	caaccctaac										1200
65	aactctgttg	tgaactggct	tatgggatac	cttaactgcc	aggttatcca	ccatctcttc										1260
	cctgatatgc	ctcaattcag	acagcctgag	gtgtcaagaa	gattcgtccc	tttcgctaag										1320
	aagtggaaac	tcaactacaa	ggtgctcact	tactacggtg	cttggaaagg	tactttcgga										1380
	aacctcaacg	atgttggaag	gcactactac	gttcacggat	ctcagagagt	gaagagcaag										1440
	agcgcttga															1449
70	<210>	12														

<211> 482  
 <212> Білок  
 <213> *Ostreococcus lucimarinus*  
 <400> 12

5	Met	Cys	Val	Glu	Thr	Thr	Glu	Gly	Thr	Ser	Arg	Thr	Met	Ala	Asn	Glu
	1				5				10					15		
	Arg	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Ser	Glu	Gly	Gly	Thr	Pro	Thr	Val
			20						25					30		
10	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	
15	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		
20	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	
25	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		
30	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	
35	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		
40	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	
45	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		
50	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	
55	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		
60	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
65	Ser	Ala														

<210> 13  
 <211> 456  
 <212> Білок  
 <213> *Ostreococcus tauri*

	<400>	13														
	Met	Cys	Val	Glu	Thr	Glu	Asn	Asn	Asp	Gly	Ile	Pro	Thr	Val	Glu	Ile
5	Ala	Phe	Asp	Gly	Glu	Arg	Glu	Arg	Ala	Glu	Ala	Asn	Val	Lys	Leu	Ser
	Ala	Glu	Lys	Met	Glu	Pro	Ala	Ala	Leu	Ala	Lys	Thr	Phe	Ala	Arg	Arg
	Tyr	Val	Val	Ile	Glu	Gly	Val	Glu	Tyr	Asp	Val	Thr	Asp	Phe	Lys	His
10	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Ile	Phe	Tyr	Ala	Leu	Ser	Asn	Thr	Gly	Ala	Asp
	Ala	Thr	Glu	Ala	Phe	Lys	Glu	Phe	His	His	Arg	Ser	Arg	Lys	Ala	Arg
	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	Ser	Arg	Pro	Ala	Lys	Thr	Ala	Lys	Val
15	Asp	Asp	Ala	Glu	Met	Leu	Gln	Asp	Phe	Ala	Lys	Trp	Arg	Lys	Glu	Leu
	Glu	Arg	Asp	Gly	Phe	Phe	Lys	Pro	Ser	Pro	Ala	His	Val	Ala	Tyr	Arg
20	Phe	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Met	Tyr	Ala	Leu	Gly	Thr	Tyr	Leu	Met	Tyr
	Ala	Arg	Tyr	Val	Val	Ser	Ser	Val	Leu	Val	Tyr	Ala	Cys	Phe	Phe	Gly
	Ala	Arg	Cys	Gly	Trp	Val	Gln	His	Glu	Gly	Gly	His	Ser	Ser	Leu	Thr
25	Gly	Asn	Ile	Trp	Trp	Asp	Lys	Arg	Ile	Gln	Ala	Phe	Thr	Ala	Gly	Phe
	Gly	Leu	Ala	Gly	Ser	Gly	Asp	Met	Trp	Asn	Ser	Met	His	Asn	Lys	His
30	His	Ala	Thr	Pro	Gln	Lys	Val	Arg	His	Asp	Met	Asp	Leu	Asp	Thr	Thr
	Pro	Ala	Val	Ala	Phe	Phe	Asn	Thr	Ala	Val	Glu	Asp	Asn	Arg	Pro	Arg
35	Gly	Phe	Ser	Lys	Tyr	Trp	Leu	Arg	Leu	Gln	Ala	Trp	Thr	Phe	Ile	Pro
	Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Val	Leu	Leu	Phe	Trp	Met	Phe	Phe	Leu	His	Pro
	Ser	Lys	Ala	Leu	Lys	Gly	Gly	Lys	Tyr	Glu	Glu	Leu	Val	Trp	Met	Leu
40	Ala	Ala	His	Val	Ile	Arg	Thr	Trp	Thr	Ile	Lys	Ala	Val	Thr	Gly	Phe
	Thr	Ala	Met	Gln	Ser	Tyr	Gly	Leu	Phe	Leu	Ala	Thr	Ser	Trp	Val	Ser
	Gly	Cys	Tyr	Leu	Phe	Ala	His	Phe	Ser	Thr	Ser	His	Thr	His	Leu	Asp
45	Val	Val	Pro	Ala	Asp	Glu	His	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Tyr	Ala	Val	Asp
	His	Thr	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ser	Gln	Gly	Trp	Val	Asn	Trp	Leu	Met
50	Gly	Tyr	Leu	Asn	Cys	Gln	Val	Ile	His	His	Leu	Phe	Pro	Ser	Met	Pro
	Gln	Phe	Arg	Gln	Pro	Glu	Val	Ser	Arg	Arg	Phe	Val	Ala	Phe	Ala	Lys
	Lys	Trp	Asn	Leu	Asn	Tyr	Lys	Val	Met	Thr	Tyr	Ala	Gly	Ala	Trp	Lys
55	Ala	Thr	Leu	Gly	Asn	Leu	Asp	Asn	Val	Gly	Lys	His	Tyr	Tyr	Val	His
	Gly	Gln	His	Ser	Gly	Lys	Thr	Ala								
60	<210>	14														
	<211>	894														
	<212>	DHK														
	<213>	Pyramimonas cordata														
	<400>	14														
65	atggagtttcg	ctcagccttct	tgtggctatg	gcacaggagc	agtatgccgc	aattgacgcg										60
	gtggttagccc	ctgcaatttt	ctcagctacc	gacagcatcg	gttggggtct	taagccatt										120
	agcagcgcca	caaaggatct	tcctctcggt	gagagtccga	cgccgctcat	actgagcctg										180
	ttggcctatt	ttgcgatcgt	cggctctggg	ctggtgtacc</												

	tccttctggg	gaaacgccta	caaccccgca	cagaccgaga	tggcgaaggt	catctggatt	420
	ttctacgtct	ccaagatcta	tgagttcatg	gacacgttca	tcattgctctt	gaagggcaac	480
	gtcaaccagg	tctcttttct	gcatgtgtac	catcatggct	ccatctcttg	tatctggtgg	540
	atgatcacct	acgctgcccc	tggcggtgac	gcgtacttct	cggcggcgct	caactcgtgg	600
5	gtgcacgtgt	gcatgtacac	gtactacttc	atggcggcgg	tgctgcccac	ggacgagaag	660
	accaagcgca	agtacctctg	gtggggccgc	tacctgaccc	agatgcagat	gttccagttc	720
	ttcatgaacc	tgctccaggc	ggcttacctc	ctctactcct	ctagccccta	ccccaaagttc	780
	atcgcccagc	tgctggtggg	gtacatggtc	acgctgctga	tgctcttcgg	caacttctac	840
	tacatgaagc	accacgcgag	caagaagcag	aagctggcca	gcaagaagca	gtag	894
10	<210>	15					
	<211>	870					
	<212>	ДНК					
	<213>	Штучна послідовність					
	<220>						
15	<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	tggtgctatg	gctcaagagc	aatacgctgc	tatcgatgct	60
20	gttggtgctc	ctgctatctt	ctctgctact	gattctatcg	gatggggact	taagcctatc	120
	tctttctgta	ctaaggactt	gcctcttggt	gagtcctcta	cacctctcat	cctttctttg	180
	cttgcttact	tcgctatcgt	tggatctgga	ctcgtttaca	gaaagggttt	ccctagaacc	240
	gtgaagggac	aagatccatt	ccttttgaag	gctcttatgc	ttgctcaca	cgtgttcctt	300
	atcggtactt	ctctttacat	gtgcctcaag	cttggtgacg	aggcttacgt	taacaagtac	360
25	tctttctggg	gaaacgccta	caaccctgct	caaactgaga	tggctaaggt	tatctggatc	420
	ttctacgtga	gcaagatcta	cgagttcatg	gataccttca	tcattgctctt	caagggaaat	480
	gttaaccagg	ttagcttctc	tcacgtttac	catcacggat	ctatctctgg	aatctggtgg	540
	atgattactt	acgctgctcc	tggtggtgat	gcttacttct	ctgctgctct	taactcttgg	600
	gttcacgtgt	gtatgtacac	ctactatttt	atggctgccc	tgcttcctaa	ggacgagaaa	660
30	actaagagaa	agtacctctg	gtggggaaga	taccttactc	aaatgcagat	gttccagttc	720
	ttcatgaacc	ttctccaggc	tgtttacctt	ctctactctt	catctcctta	ccctaagttt	780
	atcgctcagc	tcctcgtggg	gtacatgggt	actcttctca	tgcttttcgg	aaacttctac	840
	tacatgaagc	accacgcgag	caagtgatga				870
	<210>	16					
35	<211>	297					
	<212>	Білок					
	<213>	Pyramimonas cordata					
	<400>	16					
40	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	
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	
	Val Lys Gly	Gln Asp Pro	Phe Leu	Leu Lys	Ala Leu	Met Leu	Ala His
50			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	
55	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	
	Val Asn Gln	Val Ser Phe	Leu His	Val Tyr	His His	Gly Ser	Ile Ser
60			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	
65	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	
	Phe Met Asn	Leu Leu Gln	Ala Val	Tyr Leu	Leu Tyr	Ser Ser	Ser Pro
70			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				
5	Lys	Gln	Lys	Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Gln								
		290					295										
	<210>	17															
	<211>	288															
	<212>	Білок															
10	<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		
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					
20	Ala	Ile	Val	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Tyr	Arg	Lys	Val	Phe	Pro	Arg	Thr	
						70					75					80	
	Val	Lys	Gly	Gln	Asp	Pro	Phe	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Met	Leu	Ala	His	
					85					90					95		
25	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					
30	Lys	Ile	Tyr	Glu	Phe	Met	Asp	Thr	Phe	Ile	Met	Leu	Leu	Lys	Gly	Asn	
						150					155					160	
	Val	Asn	Gln	Val	Ser	Phe	Leu	His	Val	Tyr	His	His	Gly	Ser	Ile	Ser	
					165					170					175		
35	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					
40	Tyr	Leu	Trp	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu	Thr	Gln	Met	Gln	Met	Phe	Gln	Phe	
						230					235					240	
	Phe	Met	Asn	Leu	Leu	Gln	Ala	Val	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Ser	Ser	Ser	Pro	
				245						250					255		
45	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															
50	<212>	ДНК															
	<213>	Pavlova salina															
	<400>	18															
	atgccgcccgc	gcatagctga	ctcgtacgcc	gccccgccgt	cgccccagct	gcacgaggtc		60									
	gataccccgc	aggagcatga	taagaaggag	ctcgtcatcg	gtgaccgcgc	gtacgacgtg		120									
55	accaactttg	tgaagcgcca	cccgggtggc	aagatcatcg	cataccaggt	tggcacagat		180									
	gcgacggacg	cgtacaagca	gttccatgtg	cggtctgcca	aggcggacaa	gatgctcaag		240									
	tcgctgcctt	cgcgcccggg	gcacaagggc	tactcgcccc	gccgcgctga	cctcattggc		300									
	gacttcagg	agttcaccaa	gcagctggag	gcgaggggca	tgtttgagcc	gtcgctgccg		360									
	cacgtggcat	accgcctggc	ggaggtgatc	gcatgacacg	tgcccgccgc	cgcgctcatc		420									
60	tgccacgggt	acaccttcgc	gggcattggc	atgctcgccg	ttgtgcaggg	ccgctgcggc		480									
	tggtctcatg	acgagggcgg	ccactactcg	ctcacgggca	acattgcttt	tgaccgtgcc		540									
	atccaagtgc	cgtgctacgg	ccttggtcgc	ggcatgtcgg	gcgcgtgggt	gcgcaaccag		600									
	cacaacaagc	accacgcgac	gccgcagaag	ttgcagcacg	acgtcgacct	cgacaccctc		660									
	ccgctcgctg	ccttccacga	gcggatagcc	gccaaggtga	agagccccgc	gtgaaggcgc		720									
65	tggttagta	tgcaggcgaa	gctcttcgcg	ccagtgaacca	cgctgctggg	cgcgctgggc		780									
	tgccagctgt	acctgcaccc	gcgccatatg	ctgctgcacca	agcactacga	cgagctcgcg		840									
	atgctcggca	ttcgctacgg	ccttgctcgg	tacctcgccg	cgaactacgg	cgcggggtac		900									
	gtgctcgcgt	gctacctgct	gtacgtgcag	ctcggcgcga	tgtacatctt	ctgcaacttt		960									
	gccgtgtcgc	acacacacct	gccggttgct	gagcctaacc	agcacgcaac	gtgggtggag		1020									
70	tacgccgcga	accacacgac	caactgctcg	ccctcgctgg	gggtgcgactg	gtggatgtcg		1080									

	tacctcaact	accagatcga	gcaccacctc	tacccgtcca	tgccgcagtt	ccgccacccg	1140
	aagattgcgc	cgcggttgaa	gcagctcttc	gagaagcacg	gcctgcacta	cgacgtgcgt	1200
	ggctacttcg	aggccatggc	ggacacgttt	gccaaccttg	acaacgtcgc	gcacgcgccg	1260
	gagaagaaga	tgcaagtga					1278
5	<210>	19					
	<211>	1281					
	<212>	ДНК					
	<213>	Штучна послідовність					
10	<220>	Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pavlova salina 5 десатурази в рослинах (версія 1)					
	<400>	19					
	atgcctccaa	gggactctta	ctcttatgct	gctcctcctt	ctgctcaact	tcacgaagtt	60
	gatactcctc	aagagcacga	caagaaagag	cttggttatcg	gagatagggc	ttacgatggt	120
15	accaacttcg	ttaagagaca	ccctgggtga	aagatcattg	cttaccaggt	tggaactgat	180
	gctaccgatg	cttacaagca	gttccatggt	agatctgcta	aggctgacaa	gatgcttaag	240
	tctcttcctt	ctcgtcctgt	tcacaaggga	tactctccaa	gaagggctga	tcttatcgct	300
	gatttccaag	agttcaccaa	gcaacttgag	gctgagggaa	tgttcgagcc	ttctcttcct	360
	catgttgctt	acagacttgc	tgagggttatc	gctatgcatg	ttgctgggtgc	tgctcttatc	420
20	tggtcatggat	acactttcgc	tggaatcgct	atgcttggag	ttgttcaggg	aagatgtgga	480
	tggttatgct	atgaggggtg	acattactct	ctcactggaa	acattgcttt	cgacagagct	540
	atccaagtgt	cttggttacgg	acttggatgt	ggaatgtctg	gtgcttggtg	gcgtaaccag	600
	cataacaagc	accatgctac	tcctcaaaag	cttcagcacg	atgttgatct	tgataccctt	660
	cctctcggtg	ctttccatga	gagaatcgct	gctaagggtta	agtctcctgc	tatgaaggct	720
25	tggttttcta	tgcaagctaa	gcttttcgct	cctgttacca	ctcttcttgt	tgctcttgga	780
	tggtcagctt	accttcaccc	tagacacatg	ctcaggacta	agcactacga	tgagcttgct	840
	atgtctcgaa	tcagatacgg	acttgttgga	taccttgctg	ctaactacgg	tgctggatac	900
	gttctcgctt	gttaccttct	ttacgtttcag	cttggagcta	tgtacatctt	ctgcaacttc	960
	gctgtttctc	atactcacct	ccctgttggt	gagcctaacg	agcatgctac	ttgggttgag	1020
30	tacgtgcta	accacactac	taactgttct	ccatcttggt	ggtgtgattg	gtggatgtct	1080
	taccttaact	accagatcga	gcaccacctt	tacccttcta	tgcttcaatt	cagacaccct	1140
	aagatcgctc	ctagagttaa	gcagcttttc	gagaagcacg	gacttcacta	cgatgttaga	1200
	ggatacttcg	aggctatggc	tgatactttc	gctaaccttg	ataacgttgc	ccatgctcct	1260
	gagaagaana	tgcaagtaag	a				1281
35	<210>	20					
	<211>	425					
	<212>	Білок					
	<213>	Pavlova salina					
	<400>	20					
40	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						
45	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						
50	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						
55	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						
60	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						
65	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 Lys Val Lys Ser Pro Ala Met Lys Ala						
	225 230 235 240						
70	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				
5	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			
10	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		
15			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			
20	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																
25	<211>	1329																
	<212>	ДНК																
	<213>	Pyramimonas cordata																
	<400>	21																
	atgggaaagg	gaggcaatgc	tagcgcctcct	actgcgaaga	aggaggtggt	gatcgagggg											60	
30	aagttttacg	atgtcaccga	cttcaggcac	cccgggtggt	cgatcatcaa	gtttctctcg											120	
	ggttctggtg	ctgacgccac	cgcttcctac	cgcgagttcc	acgttaggtc	agcgaaggca											180	
	gacaagttct	tgaagacgct	gccctcccgc	gaagccactc	cccaggagct	gaagcaggcg											240	
	gttgagttct	ccaagctcaa	cccgccttcc	gcggagagtg	cctctgctcc	cctgaccgac											300	
	cttgccaagg	tggaagcgct	gaacaaggac	ttcgaggctt	tccgtgagca	gctcattcag											360	
35	gagggcttct	ttaagcccaa	tatcccgcct	gtggtcaagc	gcatcacgga	agtcgtggcg											420	
	atgatggccg	tagcctcctg	gatgatgggt	cagaccaacg	ctcttggtgt	gaccctcgga											480	
	gttctgatcc	gcggcattgc	acagggccgg	tgcggttggc	ttatgcacga	gggcggccac											540	
	tatagtctta	ctgggaagat	ctccattgat	aggcgtctgc	aggagtcaat	ttacggattc											600	
	ggctgtggaa	tgtccggcgc	ctggtggcgc	aaccagcaca	acaagcacca	cgcaacccca											660	
40	cagaagctgc	agcatgacgt	cgacctggag	acccttcctc	tgatggcttt	caacaacgct											720	
	gttaccgata	gacgcaaggt	gaagcctggg	agtctccagg	ctctgtggct	caagtaccag											780	
	gccttcctct	tcttccccgt	gacctccctt	ctggtcggcc	tcggttggac	caccgtcctc											840	
	caccccaggc	acagcttgcg	caccaagcac	tatttcgagc	tgctctgcat	ggctgctcgt											900	
	tacgcgagtt	tcgctgctct	tttcgctccc	aagtacggag	ttgcaggagc	tgccgggctc											960	
45	tacctcgcca	ccttcgctgt	cgggtgcaac	tatatatttc	tcaacttctc	ggtctctcac											1020	
	actcacctgc	ccgtgagcgg	tgcgagcgag	tacctgcatt	gggtcgtgta	ttcggccatc											1080	
	cacaccacta	acatcaaadc	cagcatgctg	tgcgattggg	ggatgtcatt	cctcaacttc											1140	
	cagatcgagc	atcacctgtt	cccttcaatg	ccccagttcc	gccacaagat	tatctccccg											1200	
	cgtgtaaagg	ccttgtttga	gaagcacggg	cttggtgatg	atgtgcgccc	ctattggggg											1260	
50	gccatggctg	acaccttcaa	gaacttgaat	gacgttggca	ctcacgcata	tcactccaag											1320	
	gcgcactag																1329	
	<210>	22																
	<211>	442																
	<212>	Білок																
55	<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			
60	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						
65	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			
70	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					
5	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		
10	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					
15	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		
20	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					
25	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		
30	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					
35	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		
40	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															
45	<212>	ДНК															
	<213>	Pyramimonas cordata															
	<400>	23															
	atggcgtcta	ttgcgattcc	ggctgcgctg	gcagggactc	ttggttatgt	gacgtacaat											60
	gtcgcaaac	cagatattcc	tgcattccgag	aaggtgcctg	cttactttat	gcaggtcgag											120
50	tattgggggc	caacgattgg	gaccatccgtt	tatcttctgt	tcattctactt	tggtaaacgg											180
	attatgcaaa	acaggagcca	gccgtttggc	ctgaagaacg	ctatgctggt	gtacaacttc											240
	tatcagactt	tcttcaactc	gtactgcata	tacctttttg	tcacgtcgca	ccgcgctcag											300
	gggctgaaag	tttggggaaa	catccccgat	atgactgcca	acagctgggg	gatctcacag											360
	gtgatctggc	tgactacaa	caacaagtac	gttgagctgc	tggaacacgtt	cttcatgggtc											420
55	atgcaaga	agtttgacca	gctttcgttc	ctgcacattt	accatcatac	cctgttgatc											480
	tggtcttggg	tcgtggtgat	gaaattggag	cccgttgggg	actgctactt	tggtcttagc											540
	gtcaacacgt	ttgtgcacgt	cattatgtac	tcgtactatg	gccttgccgc	gctcgggggtg											600
	aattgcttct	ggaagaagta	cattacgcag	attcagatgc	tgcaagttctg	tatctgcgct											660
	tcgcactcga	tttataccgc	ctatgtgcag	aacaccgcgt	tctggttgcc	ttacttgacg											720
60	ctgtgggtga	tggtgaacat	gttcgtgttg	ttcgccaact	tctatcgcaa	gcgctacaag											780
	agcaagggtg	ccaagaagca	gtaa														804
	<210>	24															
	<211>	807															
	<212>	ДНК															
65	<213>	Штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії															
		Pyramimonas cordata															
		5 елонгази в рослинах (версія 1)															
	<400>	24															
70	atggcctcta	tcgctatccc	tgctgctctt	gctggaactc	ttggatacgt	tacctacaat											60

	gtggctaacc	ctgatatccc	agcttctgag	aaagtccctg	cttacttcat	gcagggtgag	120
	tactggggac	ctactatcgg	aactattgga	tacctcctct	tcattctactt	cggaaagcgt	180
	atcatgcaga	acagatctca	acctttcggg	ctcaagaacg	ctatgctcgt	ttacaacttc	240
	taccagacct	tcttcaacag	ctactgcac	taccttttcg	ttactttctca	tagggctcag	300
5	ggacttaagg	tttggggaaa	catccctgat	atgactgcta	actcttgggg	aatctctcag	360
	ggtatctggc	ttcactacaa	caacaagtac	gttgagcttc	tcgacacctt	cttcatggtg	420
	atgaggaaga	agttcgacca	gctttctttc	cttcacatct	accaccacac	tcttctcatc	480
	tggatcatgg	tcgttggtat	gaagcttgag	cctgttgagg	attgctactt	cggatcttct	540
	gtaaacacct	tcgtgcacgt	gatcatgtac	tcttactacg	gacttgctgc	tcttgaggtt	600
10	aactgtttct	ggaagaagta	catcaccag	atccagatgc	ttcagttctg	tatctgtgct	660
	tctcactcta	tctacaccgc	ttacgttcag	aataccgctt	tctggcttcc	ttaccttcaa	720
	ctctgggtta	tggatgaacat	gttcgttctc	ttcgccaact	tctaccgtaa	gaggtacaag	780
	tctaagggtg	ctaagaagca	gtgataa				807
	<210>	25					
15	<211>	267					
	<212>	Білок					
	<213>	Pyramimonas cordata					
	<400>	25					
20	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						
25	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						
30	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						
35	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						
40	Trp Ser Trp Phe 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						
45	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						
50	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					
55	<212>	ДНК					
	<213>	Pavlova salina					
	<400>	26					
60	atgcctccga	gcgcggcgaa	gcagatgggc	gcgagcacgg	gcgtgcatgc	gggcgtcaca	60
	gattcgtcgg	ccttcacgcg	caaggatgtc	gccgacaggc	cggacctcac	gatcgtgggt	120
	gacagcgtgt	acgatgcgaa	ggcgttccgc	tccgagcatc	cgggtggcgc	gcactttgtg	180
	tcgctgttcg	gcggggcgca	tgccacggag	gcgttcatgg	agtaccaccg	gcgcgcctgg	240
	cccaagtcgc	gcatgtcgcg	cttccacgtc	ggctctcttg	catcgaccga	ggagcccgtc	300
	gccgcgcatg	agggctacct	ccagctgtgc	gctcgcacgc	ccaagatggg	gccgtcggtc	360
	agcagcgggt	tcgcgcgggc	gtcgtactgg	gtgaaggccg	ggctgatcct	cggctccgcg	420
65	atcgcgctcg	aggcgtacat	gctgtacgcg	ggcaagcgcc	tgctcccgtc	gatcgtgctc	480
	gggtggctgt	ttgcgctgat	tgccctgaac	atccagcacg	atgccaacca	cggcgcgctc	540
	tccaagtcgg	cctcgggtcaa	cctggcgctc	gggttgtgcc	aggactggat	cggcggggagc	600
	atgatcctct	ggctgcagga	gcacgttgct	atgcaccact	tgcacaccaa	cgacgttgac	660
	aaggaccggg	accagaaggc	gcacggcgcc	ctcgggtcca	agccgaccga	cgcgtggagc	720
70	ccgatgcact	ggctgcagca	cctctacctg	ctgcctgggg	agacgatgta	cgccttcaag	780

	ctgctgtttc	tcgacatcag	cgagctggtg	atgtggcggt	gggagggcga	gccccatcagc	840
	aagctggccg	ggtacctctt	catgccctcg	ctgctcctca	agctcacctt	ctgggcgcgc	900
	tttgtcgcgc	tgccgctgta	cctcgcgccc	agcgtgcaca	cggcggtgtg	catcgcggcg	960
	acggtaaatga	cggggagcctt	ctacctcgcc	ttcttcttct	tcattctcgca	caacttcgag	1020
5	ggcgtggcga	gcgtcggacc	ggacggcagc	atcaccagca	tgacgcgcgg	cgcataccttc	1080
	ctcaagcggc	aggccgagac	ctcgtccaac	gtgggcggcc	cgctgctcgc	cacgctcaac	1140
	ggcggcctca	actaccaaatt	cgagcaccac	ctcttcccca	gggtgcacca	cggcttctac	1200
	cctcgcctcg	cgccgttggg	caaggcggag	ctcagggcgc	gcggcattga	gtacaagcac	1260
	tacccacca	tatggagcaa	cctggcatcc	acgctgaggc	acatgtacgc	gctcggccgc	1320
10	aggccgcgca	gcaaggcgga	gtga				1344
	<210>	27					
	<211>	1347					
	<212>	ДНК					
	<213>	Штучна послідовність					
15	<220>						
	<223>	Кодон-оптимізована відкрита рамка зчитування для експресії Pavlova salina 4 десатурази в рослинах (версія 1)					
	<400>	27					
	atgccaccta	gcgctgctaa	gcaaatggga	gcttctactg	gtgttcatgc	tggtgttact	60
20	gactcttctg	ctttcaccag	aaaggatgtt	gctgatagac	ctgatctcac	catcgttggg	120
	gattctgttt	acgatgctaa	ggctttcaga	tctgagcatc	ctgggtggtg	tcatttctgt	180
	tctttgttcg	gaggaagaga	tgctactgag	gctttcatgg	aataccatag	aagggttgg	240
	cctaagtcta	gaatgtctag	attccacgtt	ggatctcttg	cttctactga	ggaacctgtt	300
	gctgctgatg	agggatacct	tcaactttgt	gctaggatcg	ctaagatggg	gccttctgtt	360
25	tcttctggat	tcgctcctgc	ttcttactgg	gttaaggctg	gacttatcct	tggtatctgct	420
	atcgctcttg	aggcttacat	gctttacgct	ggaaagagac	ttctcccttc	tatcgttcct	480
	ggatggcttt	tcgctcttat	cggtcttaac	atccagcatg	atgctaacca	tggtgctttg	540
	tctaagtctg	cttctgttaa	ccttgctctt	ggactttgtc	aggattggat	cggaggatct	600
	atgatccttt	ggcttcaaga	gcatgttggt	atgcaccacc	tccacactaa	cgatgttgat	660
30	aaggatcctg	atcaaaaaggc	tcacgggtgct	cttagactca	agcctactga	tgcttggtca	720
	cctatgcatt	ggcttcagca	tctttacctt	ttgcctgggtg	agactatgta	cgctttcaag	780
	cttttggttc	tcgacatctc	tgagcttggt	atgtggcggt	gggaggggtga	gcctatctct	840
	aagcttgctg	gatacctctt	tatgccttct	ttgcttctca	agcttacctt	ctgggctaga	900
	ttcgttgctt	tgccctctta	ccttgctcct	tctgttcata	ctgctgtgtg	tatcgctgct	960
35	actgttatga	ctggatcttt	ctacctcgct	ttcttcttct	tcattctcca	caacttcgag	1020
	gggtgttgctt	ctgttgacc	tgatggatct	atcatttcta	tgactagagg	tgctagcttc	1080
	cttaagagac	aagctgagac	ttcttctaac	ggttgaggac	ctcttcttgc	tactcttaac	1140
	ggtggactca	actaccaaatt	tgagcatcac	ttgttcccta	gagttcacca	tggtattctac	1200
	cctagacttg	ctcctcttgt	taaggctgag	cttgaggcta	gaggaatcga	gtacaagcac	1260
40	taccctacta	tctgggtctaa	ccttgcttct	accctcagac	atatgtacgc	tcttggaaga	1320
	aggcctagat	ctaaggctga	gtaatga				1347
	<210>	28					
	<211>	447					
	<212>	Білок					
45	<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						
50	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						
55	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						
60	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						
65	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						
70	180 185 190						

	Cys	Gln	Asp	Trp	Ile	Gly	Gly	Ser	Met	Ile	Leu	Trp	Leu	Gln	Glu	His
	Val	Val	195	His	His	Leu	His	200	Asn	Asp	Val	Asp	205	Lys	Asp	Pro
		210	Met				215	Thr				220				Asp
5	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	
10	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				
15	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	
20	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				
25	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	
30	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														
35	<212>	Білок														
	<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	
40	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			
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	
50	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			
55	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	
60	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			
65	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	
70	Ala	Lys	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu									

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

	gtgatcatgt	gcgtgtttctc	gctgggtgtgc	ttcatctgcc	agctcgcagc	cctgggctat	240
	gacatgggct	acttgacagt	ggtgcgtgac	ctcacagggg	acgagattgt	ccccctctac	300
	caggacgtgt	ccccgtcccc	cgcctttctc	aacaagctct	tcaagtattc	gtctattgcc	360
	ttccactact	ccaagtatgt	tgagtacatg	gacaccgcat	ggctgggtgat	gaagggcaag	420
5	cccgtgtcct	tgctccaggg	cttccaccac	tttggcgccg	cctgggacac	ctactttggc	480
	atcaccttcc	agaacgaggg	catctacgtg	ttcgtgggtg	tcaacgcctt	catccacacg	540
	atcatgtacg	catactacgc	ggccactgcg	gcggtgtctc	agttctcact	gaagttcgtc	600
	atcacgctca	tgcagatcac	ccaattcaac	gtgggcttcg	taatgggtga	tcactacatc	660
	accctggagt	acttccgcaa	ctcaccggag	ctcgtcttct	cctacctttt	caactatgcg	720
10	tacgtctgca	cggttctcct	cctcttcacg	cagttcttct	acatggacaa	ctttggcaag	780
	aagaaggccg	ctgccgccgc	gggcaagaag	aagaagtag			819
	<210>	33					
	<211>	272					
	<212>	Білок					
15	<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						
20	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						
25	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						
30	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						
35	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						
40	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						
45	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						
50	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					
55	<400>	34					
	atggcgactg	aagggatgcc	ggcgataacg	ctggactggc	tgctctcgcc	cgggctgaag	60
	gatgccgtaa	ttggcgggga	ggtgctctac	ttttcgcttg	ggtatctgct	gctcgagccc	120
	atcctcaagc	gctcaccgtt	tgtggacaag	cgcaagggcg	cataccgcaa	cggcatgata	180
	gcgtacaaca	tcctcatgtg	cggttttctc	ctggtatgct	tcgtgtgcca	gatggcggcg	240
60	ctcggccttg	atcgcggcca	cctgcagttt	gtccgcgacc	tcacgggcga	cagcgtgggtg	300
	cagctctacc	aggacgtgag	cccatccctt	gcatttcgca	acaagctctt	ccggtactca	360
	gcggtggcgt	tccactactc	aaagtacgtg	gagtacatgg	acacagcgtg	gcttgtgctg	420
	aagggaagc	ccgtctcggt	cctgcagggc	ttccaccact	tcggcgccgc	gtgggacacc	480
	tactttggca	tcacgtttca	gaacgagggc	acctacgtct	ttgtgctgct	caacgcattc	540
65	atccacacaa	tcatgtacac	ctactacggc	gcgacggcag	cgggcatcaa	aatctcgatg	600
	aagccgctga	tcaccctcat	gcagatcacg	cagttcctgc	tgggcttcgc	gctcgtctac	660
	ccgtacattg	acctcggcta	cttccgtgcg	tcgcccagac	tcgtgtggag	ctacctgttc	720
	aactatgcgt	acgtactcat	ggtgctcttc	ctcttcacgc	gcttcttcta	ccacgacaac	780
	tttagcaagc	acaagccaat	ctcgcgcacg	gactccagca	accgcatgaa	aaccgagtag	840
70	<210>	35					

<211> 279  
 <212> Білок  
 <213> Pavlova salina  
 <400> 35

5 Met Ala Thr Glu Gly Met Pro Ala Ile Thr Leu Asp Trp Leu Leu Ser  
 1 1 5 10 15  
 Pro Gly Leu Lys Asp Ala Val Ile Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser  
 20 25 30  
 10 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 80  
 15 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  
 20 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  
 25 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  
 30 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  
 35 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  
 40 Ser Asn Arg Met Lys Thr Glu  
 275  
 <210> 36  
 <211> 1284  
 <212> ДНК  
 <213> Pavlova salina  
 <400> 36

45 atgggacgcg gcgagacag cagtgggacg ggcacatccg cggcgagagct ggcgggtcccg 60  
 agcgaccgcg cggaggtgag caacgctgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc 120  
 aagcgctgg atgtgaccaa gttccaacgc acgcaccccg gtggtagcaa ggtcttccgg 180  
 atcttccagg accgcatgac gacggagcag ttcgagtcct accactcgaa gcgcgcgac 240  
 50 aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgctc ccgccgacac gcccttgccc 300  
 tcccagtcac cgatggggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt 360  
 tactacgatc catgccgct cgatgagctg ttcaagctca gcctcgtgct cctcccgacc 420  
 tttgcgggca tgtacatgct caaggcgggc gtcgggtccc cgctctgcgg cgccctcatg 480  
 gtgagctttg gctggtacct cgatggctgg ctgcgcacg actatctgca ccactccgctc 540  
 55 ttcaaggggt ccgtcgcacg caccgtcggg tggaaacaacg cggcgggcta cttcctcggc 600  
 ttcgtgcagg ggtatgcggg cgagtgggtg cgcgcgcggc ataacacgca ccacgtgtgc 660  
 accaatgagg acggctcgga ccccgacatc aaaacggcgc cgtgctcat atacgtgcgc 720  
 aacaagccga gcatcgccaa gcgcctgaac gccttcagc gctaccagca gtactactat 780  
 gtgccggtga tggcaatcct cgacctgtac tggcggctcg agtcgatcgc ctacgtcgcg 840  
 60 atgcgcctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctgcgactcg tcgcgcacta cgccatcgctc 900  
 gcgtgggtct ttgcgggcaa ctaccacctg ctcccgtcgt tgacggttct gcgcggggttt 960  
 ggcactggga tcaccgtttt cgcgacgcac tacggtgagg acattctcga cgcggaccag 1020  
 gtgcgtcaca tagcgtcgt cgagcagacg gcactcact cgcgcaacat ctcgggcggc 1080  
 tggctcgtga acgtgctcac cggcttcacg tcaactgcaga cggagcacca cctgttccc 1140  
 65 atgatgcaa ccggcaacct catgactatc cagcccaggg tgcgcgcctt cttcaagaag 1200  
 cacggacttg agtaccgca gggcaacctc attgagtgcg tgcggcagaa catccgtgcg 1260  
 cttgcattcg agcacctgct ttga 1284  
 <210> 37  
 <211> 427  
 70 <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	
5	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				
10	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		
15	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				
20	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		
25	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			
30	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	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		
35	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			
40	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	
45	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				
50	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		
55	Asn	Ile	Arg	Ala	Leu	Ala	Phe	Glu	His	Leu	Leu					
				420					425							
	<210> 38															
	<211> 116															
	<212> Білок															
60	<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		
65	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					
70	His	Ala	Arg	Leu	Glu	Gly	Ser	Pro	Lys	Ala	Glu	Leu	Arg	Gln	Pro	Ile

65	Gln	Gln	Pro	Cys	Cys	70	Cys	Pro	His	Cys	75	Arg	His	Lys	Gln	Ala	80	Thr
	Ile	Met	Asp	Val	85	Gln	Ala	His	Val	Pro	90	Glu	Ala	Gln	Asn	Ile	95	Gln
5	Val	Ser	Lys	Pro	100					105					110			
					115													
	<210>	39																
	<211>	351																
10	<212>	ДНК																
	<213>	Вірус жовтої кучерявості листя томату																
	<400>	39																
	atgtggg	atc	cactt	tctaaa	tgaatttc	cct	gaatct	gttc	acggatttc	g	ttgtat	gtta						60
	gctattaa	at	ttgcag	tc	cgttgag	gaa	acttac	gagc	ccaata	catt	gggccac	gat						120
15	ttaattagg	g	atcttata	tc	tggtgta	agg	gcccg	tgact	atgtcga	agc	gaccagg	cga						180
	tataatcatt	tccacg	ccccg	cctcga	agg	tcgccga	agg	ctgaacttc	g	acagccc	ata							240
	cagcagccg	t	gctgctgt	cc	attgtcca	aggcaca	aac	aagcgac	gat	catggac	gta							300
	caggcccatg	taccgga	agc	ccagaatata	cagaatgtat	cgaagcc	ctg	a										351
	<210>	40																
20	<211>	389																
	<212>	Білок																
	<213>	Arabidopsis thaliana																
	<400>	40																
	Met	Val	Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Ile	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Phe		
25	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					
30	Ala	Glu	Thr	Leu	Trp	Leu	Glu	Leu	Val	Trp	Ile	Val	Asp	Trp	Trp	Ala		
							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		
35				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				
40	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		
45				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					
50	Ala	Val	Ser	Asn	Met	Arg	Ser	Phe	Val	Pro	Ala	Ile	Tyr	Asp	Met	Thr		
							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		
55				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					
60	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		
65				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					
70	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  
 5 <210> 41  
 <211> 281  
 <212> Білок  
 <213> *Limnanthus alba*  
 <400> 41  
 10 Met Ala Lys Thr Arg Thr Ser Ser Leu Arg Asn Arg Arg Gln Leu Lys  
 1 Thr Ala Val Ala Ala Thr Ala Asp Asp Asp Lys Asp Gly Ile Phe Met  
 Val Leu Leu Ser Cys Phe Lys Ile Phe Val Cys Phe Ala Ile Val Leu  
 15 Ile Thr Ala Val Ala Trp Gly Leu Ile Met Val Leu Leu Pro Trp  
 Pro Tyr Met Arg Ile Arg Leu Gly Asn Leu Tyr Gly His Ile Ile Gly  
 20 Gly Leu Val Ile Trp Leu Tyr Gly Ile Pro Ile Glu Ile Gln Gly Ser  
 Glu His Thr Lys Lys Arg Ala Ile Tyr Ile Ser Asn His Ala Ser Pro  
 Ile Asp Ala Phe Phe Val Met Trp Leu Ala Pro Ile Gly Thr Val Gly  
 25 Val Ala Lys Lys Glu Val Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Leu Tyr  
 Thr Leu Ala His His Ile Arg Ile Asp Arg Ser Asn Pro Ala Ala Ala  
 30 Ile Gln Ser Met Lys Glu Ala Val Arg Val Ile Thr Glu Lys Asn Leu  
 Ser Leu Ile Met Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Gly Asp Gly Arg Leu  
 Leu Pro Phe Lys Lys Gly Phe Val His Leu Ala Leu Gln Ser His Leu  
 35 Pro Ile Val Pro Met Ile Leu Thr Gly Thr His Leu Ala Trp Arg Lys  
 Gly Thr Phe Arg Val Arg Pro Val Pro Ile Thr Val Lys Tyr Leu Pro  
 40 Pro Ile Asn Thr Asp Asp Trp Thr Val Asp Lys Ile Asp Asp Tyr Val  
 Lys Met Ile His Asp Ile Tyr Val Arg Asn Leu Pro Ala Ser Gln Lys  
 Pro Leu Gly Ser Thr Asn Arg Ser Lys  
 45 <210> 42  
 <211> 303  
 <212> Білок  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*  
 <400> 42  
 50 Met Ser Val Ile Gly Arg Phe Leu Tyr Tyr Leu Arg Ser Val Leu Val  
 1 Val Leu Ala Leu Ala Gly Cys Gly Phe Tyr Gly Val Ile Ala Ser Ile  
 Leu Cys Thr Leu Ile Gly Lys Gln His Leu Ala Gln Trp Ile Thr Ala  
 55 Arg Cys Phe Tyr His Val Met Lys Leu Met Leu Gly Leu Asp Val Lys  
 Val Val Gly Glu Glu Asn Leu Ala Lys Lys Pro Tyr Ile Met Ile Ala  
 60 Asn His Gln Ser Thr Leu Asp Ile Phe Met Leu Gly Arg Ile Phe Pro  
 Pro Gly Cys Thr Val Thr Ala Lys Lys Ser Leu Lys Tyr Val Pro Phe  
 65 Leu Gly Trp Phe Met Ala Leu Ser Gly Thr Tyr Phe Leu Asp Arg Ser  
 Lys Arg Gln Glu Ala Ile Asp Thr Leu Asn Lys Gly Leu Glu Asn Val  
 Lys Lys Asn Lys Arg Ala Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser  
 70 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		
5	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
10	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		
15	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														
20	<212>	Білок														
	<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	
25	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			
30	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	
35	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			
40	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	
45	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			
50	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	
55	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			
60	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	
65	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			
70	Asp	Pro	Ala	Trp	Trp											
		370														

<210> 44  
 <211> 314  
 <212> Білок  
 <213> Mortierella alpina  
 5 <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  
 10 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  
 15 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  
 20 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  
 25 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  
 30 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  
 35 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  
 40 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  
 45 Ala Ile Thr Lys Arg Arg Thr Pro Lys Glu  
 305 310  
 <210> 45  
 <211> 391  
 <212> Білок  
 <213> Braccisa napus  
 50 <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  
 55 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  
 65 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  
 70 Ala Lys Asp Glu Ser Thr 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
	Thr	Glu	Ala	Lys	165 Leu	Lys	Ala	Ala	Gln	170 Glu	Tyr	Ala	Ala	Ser	175 Ser	Gln
5	Leu	Pro	Val	Pro	Arg	Asn	Val	Leu	Ile	Pro	Arg	Thr	Lys	Gly	Phe	Val
	Ser	Ala	Val	Ser	Asn	Met	Arg	Ser	Phe	Val	Pro	Ala	Ile	Tyr	Asp	Met
	Thr	Val	Ala	Ile	Pro	Lys	Thr	Ser	Pro	Pro	Pro	Thr	Met	Leu	Arg	Leu
10	225 Phe	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Val	His	Val	His	Ile	Lys	Cys	His	Ser
	Met	Lys	Asp	Leu	Pro	Glu	Ser	Asp	Asp	Ala	Ile	Ala	Gln	Trp	Cys	Arg
15	Asp	Gln	Phe	Val	Ala	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Lys	His	Ile	Ala	Ala
	Asp	Thr	Phe	Pro	Gly	Gln	Lys	Glu	His	Asn	Ile	Gly	Arg	Pro	Ile	Lys
20	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Val	Ser	Trp	Ala	Cys	Leu	Leu	Thr	Leu	Gly	Ala
	Met	Lys	Phe	Leu	His	Trp	Ser	Asn	Leu	Phe	Ser	Ser	Leu	Lys	Gly	Ile
	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Ile	Ile	Thr	Leu	Cys	Met	Gln	Ile
25	Leu	Ile	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Glu	Arg	Ser	Thr	Pro	Ala	Lys	Val	Ala
	Pro	Ala	Lys	Pro	Lys	Asp	Lys	His	Gln	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gln	Thr
30	Glu	Val	Glu	Glu	Lys	Gln	Lys									
	<210>	46														
	<211>	390														
	<212>	Білок														
	<213>	Braccisa	napus													
35	<400>	46														
	Met	Ala	Met	Ala	Ala	Ala	Val	Ile	Val	Pro	Leu	Gly	Ile	Leu	Phe	Phe
	1	Ile	Ser	Gly	Leu	Val	Val	Asn	Leu	Leu	Gln	Ala	Ile	Cys	Tyr	Val
40	Ile	Arg	Pro	Leu	Ser	Lys	Asn	Thr	Tyr	Arg	Lys	Ile	Asn	Arg	Val	Val
	Ala	Glu	Thr	Leu	Trp	Leu	Glu	Leu	Val	Trp	Ile	Val	Asp	Trp	Trp	Ala
45	Gly	Val	Lys	Ile	Gln	Val	Phe	Ala	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Asn	Arg	Met
	Gly	Lys	Glu	His	Ala	Leu	Val	Val	Cys	Asn	His	Arg	Ser	Asp	Ile	Asp
	Trp	Leu	Val	Gly	Trp	Ile	Leu	Ala	Gln	Arg	Ser	Gly	Cys	Leu	Gly	Ser
50	Ala	Leu	Ala	Val	Met	Lys	Lys	Ser	Ser	Lys	Phe	Leu	Pro	Val	Ile	Gly
	Trp	Ser	Met	Trp	Phe	Ser	Glu	Tyr	Leu	Phe	Leu	Glu	Arg	Asn	Trp	Ala
55	Lys	Asp	Glu	Ser	Thr	Leu	Lys	Ser	Gly	Leu	Gln	Arg	Leu	Asn	Asp	Phe
	Pro	Arg	Pro	Phe	Trp	Leu	Ala	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	Thr	Arg	Phe	Thr
	Glu	Ala	Lys	Leu	Lys	Ala	Ala	Gln	Glu	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Glu	Leu
60	Pro	Val	Pro	Arg	Asn	Val	Leu	Ile	Pro	Arg	Thr	Lys	Gly	Phe	Val	Ser
	Ala	Val	Ser	Asn	Met	Arg	Ser	Phe	Val	Pro	Ala	Ile	Tyr	Asp	Met	Thr
65	Val	Ala	Ile	Pro	Lys	Thr	Ser	Pro	Pro	Pro	Thr	Met	Leu	Arg	Leu	Phe
	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Val	His	Val	His	Ile	Lys	Cys	His	Ser	Met
	Lys	Asp	Leu	Pro	Glu	Ser	Asp	Asp	Ala	Ile	Ala	Gln	Trp	Cys	Arg	Asp
70	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	
	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Ser	Trp	Ser	Cys	Leu	Leu	Ile	Leu	Gly	Ala	Met	
5	Lys	Phe	Leu	His	Trp	Ser	Asn	Leu	Phe	Ser	Ser	Trp	Lys	Gly	Ile	Ala	
	Phe	Ser	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Ile	Ile	Thr	Leu	Cys	Met	Gln	Ile	Leu	
10	Ile	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Glu	Arg	Ser	Thr	Pro	Ala	Lys	Val	Val	Pro	
	Ala	Lys	Pro	Lys	Asp	Asn	His	Asn	Asp	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gln	Thr	
15	Glu	Val	Glu	Lys	Gln	Lys											
	<210>	47															
	<211>	361															
	<212>	Білок															
20	<213>	Phytophthora infestans															
	<400>	47															
	Met	Ala	Thr	Lys	Glu	Ala	Tyr	Val	Phe	Pro	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Lys	
	Arg	Ser	Leu	Pro	Lys	Asp	Cys	Phe	Glu	Ala	Ser	Val	Pro	Leu	Ser	Leu	
25	Tyr	Tyr	Thr	Val	Arg	Cys	Leu	Val	Ile	Ala	Val	Ala	Leu	Thr	Phe	Gly	
	Leu	Asn	Tyr	Ala	Arg	Ala	Leu	Pro	Glu	Val	Glu	Ser	Phe	Trp	Ala	Leu	
30	Asp	Ala	Ala	Leu	Cys	Thr	Gly	Tyr	Ile	Leu	Leu	Gln	Gly	Ile	Val	Phe	
	Trp	Gly	Phe	Phe	Thr	Val	Gly	His	Asp	Ala	Gly	His	Gly	Ala	Phe	Ser	
	Arg	Tyr	His	Leu	Asn	Phe	Val	Val	Gly	Thr	Phe	Met	His	Ser	Leu		
35	Ile	Leu	Thr	Pro	Phe	Glu	Ser	Trp	Lys	Leu	Thr	His	Arg	His	His	His	
	Lys	Asn	Thr	Gly	Asn	Ile	Asp	Arg	Asp	Glu	Val	Phe	Tyr	Pro	Gln	Arg	
40	Lys	Ala	Asp	Asp	His	Pro	Leu	Ser	Arg	Asn	Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Gly	
	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Tyr	Leu	Val	Glu	Gly	Phe	Pro	Pro	Arg	Lys	Val	
	Asn	His	Phe	Asn	Pro	Phe	Glu	Pro	Leu	Phe	Val	Arg	Gln	Val	Ser	Ala	
45	Val	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Ala	His	Phe	Phe	Val	Ala	Gly	Leu	Ser	Ile	
	Tyr	Leu	Ser	Leu	Gln	Leu	Gly	Leu	Lys	Thr	Met	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	
50	Gly	Pro	Val	Phe	Val	Phe	Gly	Ser	Met	Leu	Val	Ile	Thr	Thr	Phe	Leu	
	His	His	Asn	Asp	Glu	Glu	Thr	Pro	Trp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Glu	Trp	Thr	
	Tyr	Val	Lys	Gly	Asn	Leu	Ser	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	Tyr	Gly	Ala	Leu	
55	Ile	Asp	Asn	Leu	Ser	His	Asn	Ile	Gly	Thr	His	Gln	Ile	His	His	Leu	
	Phe	Pro	Ile	Ile	Pro	His	Tyr	Lys	Leu	Lys	Lys	Ala	Thr	Ala	Ala	Phe	
60	His	Gln	Ala	Phe	Pro	Glu	Leu	Val	Arg	Lys	Ser	Asp	Glu	Pro	Ile	Ile	
	Lys	Ala	Phe	Phe	Arg	Val	Gly	Arg	Leu	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Gly	Val	Val	
	Asp	Gln	Glu	Ala	Lys	Leu	Phe	Thr	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Ala	Ala	Thr	
65	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Thr	Lys	Ser	Thr								
	<210>	48															
	<211>	418															
	<212>	Білок															
70	<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		
5	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					
10	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		
15	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					
20	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		
25	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					
30	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		
35	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					
40	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		
45	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					
50	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															
55																	
	<210>	49															
	<211>	363															
	<212>	Білок															
	<213>	Pythium irregulare															
60	<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			
65	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					
70	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  
 Gly His Gly Ala Phe Ser Arg Ser His Val Leu Asn Phe Ser Val Gly  
 5 Thr Leu Met His Ser Ile Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu  
 Ser His Arg His His His Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Lys Asp Glu  
 10 Ile Phe Tyr Pro Gln Arg Glu Ala Asp Ser His Pro Val Ser Arg His  
 Leu Val Met Ser Leu Gly Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Leu Phe Ala Gly  
 Phe Pro Pro Arg Thr Met Asn His Phe Asn Pro Trp Glu Ala Met Tyr  
 15 Val Arg Arg Val Ala Ala Val Ile Ser Leu Gly Val Leu Phe Ala  
 Phe Ala Gly Leu Tyr Ser Tyr Leu Thr Phe Val Leu Gly Phe Thr Thr  
 20 Met Ala Ile Tyr Tyr Phe Gly Pro Leu Phe Ile Phe Ala Thr Met Leu  
 Val Val Thr Thr Phe Leu His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr  
 Ala Asp Ser Glu Trp Thr Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp  
 25 Arg Ser Tyr Gly Ala Leu Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr  
 His Gln Ile His His Leu Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Asn  
 30 Asp Ala Thr Ala Ala Phe Ala Lys Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys  
 Asn Ala Ala Pro Ile Ile Pro Thr Phe Phe Arg Met Ala Ala Met Tyr  
 Ala Lys Tyr Gly Val Val Asp Thr Asp Ala Lys Thr Phe Thr Leu Lys  
 35 Glu Ala Lys Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Ser  
 <210> 50  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 40 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер  
 <400> 50  
 gcgaagcaca tcgagtca  
 45 <210> 51  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 50 <223> Олігонуклеотидний праймер  
 <400> 51  
 ggttgagggtg gtagctgagg  
 <210> 52  
 <211> 26  
 55 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер  
 <220>  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N = Hex  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 65 <222> (9)..(9)  
 <223> N = Zen  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (26)..(26)  
 70 <223> N = 3IABkFQ

18

20

	<400> 52	
	ntctctacnc cgtctcacat gacgcn	26
	<210> 53	
	<211> 19	
5	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Олігонуклеотидний праймер	
	<400> 53	
10	atacaagcac ggtggatgg	19
	<210> 54	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
15	<220>	
	<223> Олігонуклеотидний праймер	
	<400> 54	
	tggtctaaca ggtctaggag ga	22
	<210> 55	
20	<211> 29	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Олігонуклеотидний праймер	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> N = FAM	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
	<223> N = Zen	
	<220>	
	<221> misc_feature	
35	<222> (29)..(29)	
	<223> N = 3IABkFQ	
	<400> 55	
	ntggcaaga ngatttcgag cttcctgcn	29
	<210> 56	
40	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Олігонуклеотидний праймер	
45	<400> 56	
	caagcacccgt agtaagagag ca	22
	<210> 57	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
50	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Олігонуклеотидний праймер	
	<400> 57	
	cagacagcct gaggttagca	20
55	<210> 58	
	<211> 29	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
60	<223> Олігонуклеотидний праймер	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> N = FAM	
65	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
	<223> N = Zen	
	<220>	
70	<221> misc_feature	

<222> (29)..(29)  
 <223> N = 3IABkFQ  
 <400> 58  
 ntccccactt ncttagcgaa aggaacgan

29

5

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Екстрагований *Brassica sp.* ліпід, що містить жирні кислоти в естерифікованій формі, причому жирні кислоти містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту, ω6 жирні кислоти, які містять лінолеву кислоту (ЛК), ω3 жирні кислоти, які містять α-лінолеву кислоту (АЛК), докозапентаєнову кислоту (ДПК), стеаринонову кислоту (СДК), ейкозапентаєнову кислоту (ЕПК) і ейкозатетраєнову кислоту (ЕТК), і при цьому рівень ДПК в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 7 до 35 %, і причому рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 2 до 16 %, і при цьому рівень міристинової кислоти (С14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, якщо вона присутня, є менше ніж 1 %.
2. Ліпід за п. 1, де щонайменше 70 % ДПК, естерифікованої у формі триацилгліцерину (ТАГ), знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ.
3. Ліпід за п. 1 або п. 2, який **відрізняється** тим, що має одну або більше з наступних ознак:
  - i) рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 2 до 15 % або від 3 до 10 %,
    - ii) рівень олеїнової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 1 до 30 %, від 3 до 30 %, від 6 до 30 %, від 1 до 20 %, від 30 до 60 % або 30 %, або від 15 до 30 %,
    - iii) рівень лінолевої кислоти (ЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 до 35 %, від 4 до 20 %, від 4 до 17 % або від 5 до 10 %,
    - iv) рівень α-ліноленої кислоти (АЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 до 40 %, від 7 до 40 %, від 10 до 35 %, від 20 до 35 %, від 4 до 16 % або від 2 до 16 %,
    - v) рівень γ-ліноленої кислоти (ГЛК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше 4 %, менше ніж 3 %, менше ніж 2 %, менше ніж 1 %, менше ніж 0,5 %, від 0,05 до 7 %, від 0,05 до 4 %, від 0,05 до 3 % або від 0,05 до 2 %,
    - vi) рівень стеаринової кислоти (СДК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше ніж 10 %, менше ніж 8 %, менше ніж 7 %, менше ніж 6 %, менше ніж 4 %, менше ніж 3 %, від 0,05 до 7 %, від 0,05 до 6 %, від 0,05 до 4 %, від 0,05 до 3 %, від 0,05 до 10 % або від 0,05 до 2 %,
    - vii) рівень ейкозатетраєнової кислоти (ЕТК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше ніж 6 %, менше ніж 5 %, менше ніж 4 %, менше ніж 1 %, менше ніж 0,5 %, від 0,05 до 6 %, від 0,05 до 5 %, від 0,05 до 4 %, від 0,05 до 3 % або від 0,05 до 2 %,
    - viii) рівень ейкозатриєнової кислоти (ЕТрК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше ніж 4 %, менше ніж 2 %, менше ніж 1 %, від 0,05 до 4 %, від 0,05 до 3 % або від 0,05 до 2 %, або від 0,05 до 1 %,
    - ix) рівень ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 до 15 %, менше ніж 4 %, менше ніж 3 %, менше ніж 2 %, від 0,05 до 10 %, від 0,05 до 5 %, від 0,05 до 3 % або від 0,05 до 2 %,
    - x) рівень ДГК у загальному вмісті жирних кислот у екстрагованому насінні олійної культури становить менш ніж 2 % або від 0,05 до 2 %,
    - xi) ліпід містить ω6-докозапентаєнову кислоту (22:5<sup>Δ4,7,10,13,16</sup>) серед жирних кислот, що містяться в ньому,
    - xii) ліпід містить менш ніж 0,1 % ω6-докозапентаєнової кислоти (22:5<sup>Δ4,7,10,13,16</sup>) серед жирних кислот, що містяться в ньому,
    - xiii) ліпід містить менш ніж 0,1 % однієї або більше або всіх із СДК, ЕПК і ЕТК серед жирних кислот, що містяться в ньому,
    - xiv) рівень загальних насичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 до 25 %, від 4 до 20 %, від 6 до 20 %, від 6 до 12 %,
    - xv) рівень загальних мононенасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 4 до 40 %, від 4 до 35 %, від 8 до 25 %, від 8 до 22 %, від 15 до 40 % або від 15 до 35 %,
    - xvi) рівень загальних поліненасичених жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 20 до 75 %, від 30 до 75 % або від 50 до 75 %, або від 60 до 75 %,

- xvii) рівень загальних  $\omega 6$  жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 35 до 50 %, від 20 до 35 %, від 6 до 20 %, менше ніж 20 %, менше ніж 16 %, менше ніж 10 %, від 1 до 16 %, від 2 до 10 % або від 4 до 10 %,
- 5 xviii) рівень нових  $\omega 6$  жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить менше ніж 10 %, менше ніж 8 %, менше ніж 6 %, менше ніж 4 %, від 1 до 20 %, від 1 до 10 %, від 0,5 до 8 % або від 0,5 до 4 %,
- xix) рівень загальних  $\omega 3$  жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 36 до 65 %, від 36 до 70 %, від 40 до 60 %, від 30 до 60 %, від 35 до 60 %, від 40 до 65 %, від 30 до 65 %, від 35 до 65 %,
- 10 xx) рівень нових  $\omega 3$  жирних кислот в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 21 до 45 %, від 21 до 35 %, від 23 до 35 %, від 25 до 35 %, від 27 до 35 %,
- xxi) співвідношення загальних  $\omega 6$  жирних кислот: загальних  $\omega 3$  жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 1,0 до 3,0, від 0,1 до 1, від 0,1 до 0,5, менше ніж 0,50, менше ніж 0,40, менше ніж 0,30, менше ніж 0,20, менше ніж 0,15,
- 15 xxii) співвідношення нових  $\omega 6$  жирних кислот: нових  $\omega 3$  жирних кислот у вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 1,0 до 3,0, від 0,02 до 0,1, від 0,1 до 1, від 0,1 до 0,5, менше ніж 0,50, менше ніж 0,40, менше ніж 0,30, менше ніж 0,20, менше ніж 0,15,
- xxii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ЛК під дією  $\Delta 12$ -десатурази щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, від 60 до 98 %, від 70 до 95 % або від 75 до 90 %,
- 20 xxiv) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення АЛК на СДК під дією  $\Delta 6$ -десатурази щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, від 30 до 70 %, від 35 до 60 % або від 50 до 70 %,
- xxv) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення СДК на кислоту ЕТК під дією  $\Delta 6$ -елонгази щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, від 60 до 95 %, від 70 до 88 % або від 75 до 85 %,
- 25 xxvi) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ЕТК на ЕПК під дією  $\Delta 5$ -десатурази щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, від 60 до 99 %, від 70 до 99 % або від 75 до 98 %,
- 30 xxvii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ЕПК на ДПК під дією  $\Delta 5$ -елонгази щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, від 50 до 99 %, від 85 до 99 %, від 50 до 95 % або від 85 до 95 %,
- xxviii) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення олеїнової кислоти на ДПК щонайменше 10 %, щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, щонайменше 25 %, від 10 до 50 %, від 10 до 30 %, від 10 до 25 % або від 20 до 30 %,
- 35 xxix) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення ЛК на ДПК щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, щонайменше 22 %, щонайменше 25 %, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, від 15 до 50 %, від 20 до 40 % або від 20 до 30 %,
- 40 xxx) склад жирних кислот ліпиду базується на ефективності перетворення АЛК на ДПК щонайменше 17 %, щонайменше 22 %, щонайменше 24 %, щонайменше 30 %, від 22 до 70 %, від 17 до 55 %, від 22 до 40 % або від 24 до 40 %,
- xxxi) загальні жирні кислоти в екстрагованому ліпіді містять менше ніж 1,5 % C20:1, менше ніж 1 % C20:1 xxxii) вміст (ТАГ) в ліпіді становить щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, від 70 до 99 % або від 90 до 99 %,
- 45 xxxiii) ліпід містить діацилгліцерол (ДАГ), який містить ДПК;
- xxxiv) ліпід містить менше ніж 10 %, менше ніж 5 %, менше ніж 1 % або від 0,001 до 5 % вільних (неестерифікованих) жирних кислот та/або фосфоліпиду
- xxxv) щонайменше 72 % або щонайменше 80 % естерифікованої ДГК та/або ДПК у формі ТАГ знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ,
- 50 xxxvi) в ліпіді найпоширенішими видами ТАГ, що містять ДПК, є ДПК/18:3/18:3 (ТАГ 56:12),
- xxxvii) ліпід містить три-ДПК ТАГ (ТАГ 66:15),
- xxxviii) рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 7 до 31 %, від 7 до 28 %, від 10 до 35 %, від 10 до 30 %, від 10 до 25 %, від 10 до 22 %, від 14 до 35 %, від 16 до 35 %, від 16 до 30 %, від 16 до 25 % або від 16 до 22 %.
- 55 4. Ліпід за будь-яким одним з пп. 1-3, який є олією *Brassica napus*.
5. Ліпід за будь-яким одним з пп. 1-3, який є олією *Brassica juncea*.
6. Спосіб одержання екстрагованого рослинного ліпиду *Brassica napus*, який включає стадії, в яких:
- i) одержують насіння *Brassica sp.*, що містить ліпід, причому ліпід містить жирні кислоти в естерифікованій формі, і при цьому жирні кислоти містять олеїнову кислоту, пальмітинову
- 60

кислоту,  $\omega 6$  жирні кислоти, які містять лінолеву кислоту (ЛК),  $\omega 3$  жирні кислоти, які містять  $\alpha$ -ліноленову кислоту (АЛК), стеаридонову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК), ейкозапентаєнову кислоту (ЕПК) та ейкозатетраєнову кислоту (ЕТК), причому рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду у насінні становить від 7 до 35 %, при цьому рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду в насінні становить від 2 до 16 %, і при цьому рівень міристинової кислоти (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду в насінні, якщо вона присутня, є менше ніж 1 %.

ii) екстрагують ліпід із насіння,

причому рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 7 до 35 %, причому рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду становить від 2 до 16 %, і при цьому рівень міристинової кислоти (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот екстрагованого ліпиду, якщо вона присутня, є менше ніж 1 %.

7. Спосіб за п. 6, який **відрізняється** тим, що екстрагований ліпід має одну або більше ознак, визначених за будь-яким з пп. 2-5.

8. Спосіб за п. 6 або п. 7, який **відрізняється** тим, що насіння містить екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів:

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

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

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

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

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

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

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

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

ix)  $\omega 3$ -десатураза або  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 6$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза, або

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

причому кожен полінуклеотид функціонально зв'язаний з одним або більше промоторів, здатних керувати експресією вказаних полінуклеотидів в клітині насіння.

9. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що насіння має одну або більше, або всі з наступних ознак:

i)  $\Delta 12$ -десатураза перетворює олеїнову кислоту на лінолеву кислоту в одній або більше клітинах насіння з ефективністю щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, від 60 до 95 %, від 70 до 90 % або від 75 до 85 %,

ii)  $\omega 3$ -десатураза перетворює  $\omega 6$  жирні кислоти на  $\omega 3$  жирні кислоти в одній або більше клітинах насіння з ефективністю щонайменше 65 %, щонайменше 75 %, щонайменше 85 %, від 65 до 95 %, від 75 до 91 % або від 80 до 91 %,

iii)  $\Delta 6$ -десатураза перетворює АЛК на СДК в одній або більше клітинах насіння з ефективністю щонайменше 20 %, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, від 30 до 70 %, від 35 до 60 % або від 50 до 70 %,

iv)  $\Delta 6$ -десатураза перетворює лінолеву кислоту на  $\gamma$ -ліноленову кислоту в одній або більше клітинах насіння з ефективністю менше ніж 5 %, менше ніж 2,5 %, менше ніж 1 %, від 0,1 до 5 %, від 0,5 до 2,5 % або від 0,5 до 1 %,

v)  $\Delta 6$ -елонгаза перетворює СДК на ЕТК в одній або більше клітинах насіння з ефективністю щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, від 60 до 95 %, від 70 до 80 % або від 75 до 80 %,

vi)  $\Delta 5$ -десатураза перетворює ЕТК на ЕПК в одній або більше клітинах насіння з ефективністю щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, від 60 до 95 %, від 70 до 95 % або від 75 до 95 %,

vii)  $\Delta 5$ -елонгаза перетворює ЕПК на ДПК в одній або більше клітинах насіння з ефективністю щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, від 50 до 90 % або від 85 до 95 %,

viii) ефективність перетворення олеїнової кислоти на ДПК в одній або більше клітинах насіння становить щонайменше 10 %, щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, щонайменше 25 %, 20 %, від 10 до 50 %, від 10 до 30 %, від 10 до 25 % або від 20 до 30 %.

ix) ефективність перетворення ЛК на ДПК в одній або більше клітинах насіння становить щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, щонайменше 22 %, щонайменше 25 %, щонайменше 30 %, від 15 до 50 %, від 20 до 40 % або від 20 до 30 %,

- х) ефективність перетворення АЛК на ДПК в одній або більше клітинах частини рослини становить щонайменше 17 %, щонайменше 22 %, щонайменше 24 %, щонайменше 30 %, від 17 до 55 %, від 22 до 35 % або від 24 до 35 %,   
 xi) одна або більше клітин насіння містять щонайменше на 25 %, щонайменше на 30 %, від 25 до 40 % або від 27,5 до 37,5 % більше  $\omega 3$  жирних кислот, ніж відповідні клітини без екзогенних полінуклеотидів,   
 xii)  $\Delta 6$ -десатураза переважно здійснює десатурацію  $\alpha$ -ліноленової кислоти (АЛК) відносно лінолевої кислоти (ЛК),   
 xiii)  $\Delta 6$ -елонгаза також має активність  $\Delta 9$ -елонгази,   
 xiv)  $\Delta 12$ -десатураза також має активність  $\Delta 15$ -десатурази,   
 xv)  $\Delta 6$ -десатураза також має активність  $\Delta 8$ -десатурази,   
 xvi)  $\Delta 8$ -десатураза також має активність  $\Delta 6$ -десатурази,   
 xvii)  $\Delta 15$ -десатураза також має активність  $\omega 3$ -десатурази відносно ГЛК,   
 xviii)  $\omega 3$ -десатураза також має активність  $\Delta 15$ -десатурази відносно ЛК,   
 xix)  $\omega 3$ -десатураза здійснює десатурацію ЛК та/або ГЛК,   
 xx)  $\omega 3$ -десатураза переважно здійснює десатурацію ГЛК відносно ЛК,   
 xxi) одна або більше, або всі десатурази виявляють вищу активність на субстраті ацил-КоА, ніж на відповідному субстраті ацил-ФХ,   
 xxii)  $\Delta 6$ -десатураза має вищу активність  $\Delta 6$ -десатурази відносно АЛК, ніж ЛК як жирнокислотного субстрату,   
 xxiii)  $\Delta 6$ -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,   
 xxiv)  $\Delta 6$ -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,   
 xxv)  $\Delta 6$ -десатураза має вищу активність відносно АЛК-КоА як жирнокислотного субстрату, ніж відносно АЛК, приєднаної до положення sn-2 ФХ, як жирнокислотного субстрату,   
 xxvi)  $\Delta 6$ -десатураза має щонайменше 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,   
 xxvii) десатураза являє собою фронт-енд десатуразу, і   
 xxviii)  $\Delta 6$ -десатураза не має активності  $\Delta 5$ -десатурази, що піддавалася б виявленню, відносно ЕТК.
10. Спосіб за п. 8 або п. 9, який **відрізняється** тим, що екзогенні полінуклеотиди ковалентно з'єднані в молекулу Т-ДНК, інтегровану в геном клітин насіння, і кількість таких молекул ДНК, інтегрованих в геном клітин насіння, переважно становить не більше однієї, не більше двох або трьох, або становить дві або три.
11. Спосіб за будь-яким із пп. 6-10, який **відрізняється** тим, що загальний вміст олії в насінні, що містить екзогенні полінуклеотиди, становить щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, від 50 до 80 % або від 80 до 100 % від загального вмісту олії у відповідному насінні, у якому відсутні екзогенні полінуклеотиди.
12. Спосіб за будь-яким із пп. 6-11, який **відрізняється** тим, що додатково включає стадію, в якій обробляють ліпід для підвищення рівня ДГК у відсотковому вираженні від загального вмісту жирних кислот, причому обробка включає одне або більше із фракціонування, перегонки або переестерифікації, такої як одержання метилових або етилових естерів ДПК.
13. Рослина *Brassica sp.* або її насіння, що містить:
- ліпід у насінні, який містить жирні кислоти в естерифікованій формі, і
  - екзогенні полінуклеотиди, що кодують один із наступних наборів ферментів;
    - $\Delta 12$ -десатураза,  $\omega 3$ -десатураза та/або  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 6$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,
    - $\Delta 12$ -десатураза,  $\omega 3$ -десатураза та/або  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 9$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,
    - $\omega 3$ -десатураза та/або  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 6$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза, або
    - $\omega 3$ -десатураза та/або  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 9$ -елонгаза і  $\Delta 5$ -елонгаза,
- причому кожен полінуклеотид функціонально зв'язаний з одним або більше специфічними для насіння промоторами, здатними керувати експресією вказаних полінуклеотидів у насінні рослини, що розвивається, і при цьому жирні кислоти містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту,  $\omega 6$  жирні кислоти, які містять лінолеву кислоту (ЛК),  $\omega 3$  жирні кислоти, які містять  $\alpha$ -

ліноленову кислоту (АЛК), стеаридонову кислоту (СДК), докозапентаєнову кислоту (ДПК), ейкозапентаєнову кислоту (ЕПК) та/або ейкозатетраєнову кислоту (ЕТК), при тому, що рівень ДПК у загальному вмісті жирних кислот ліпиду насіння становить від 7 до 35 % і причому рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот ліпиду насіння становить від 2 до 16 %, і при цьому рівень міристинової кислоти (С14:0) в загальному вмісті жирних кислот ліпиду насіння, якщо вона присутня, є менше ніж 1 %.

14. Насіння *Brassica sp.*, що має одну або більше із наступних ознак:

i) одержана із рослини за п. 13,

ii) містить ліпід за будь-яким із пп. 1-5, або

iii) може застосовуватися у способі за будь-яким із пп. 6-12.

15. Спосіб одержання рослини *Brassica sp.*, яка може застосовуватися для одержання екстрагованого рослинного ліпиду за будь-яким із пп. 1-5, який включає стадії, в яких:

а) визначають кількісно рівень ДПК у ліпіді, продукуюваному однією або більше насінинами від множини рослин *Brassica sp.*, причому кожна рослина містить один або більше екзогенних полінуклеотидів, що кодують один із наступних наборів ферментів;

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

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

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

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

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

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

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

ix)  $\omega$ 3-десатураза або  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 6-елонгаза і  $\Delta$ 5-елонгаза, або

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

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

б) ідентифікують рослину *Brassica sp.* із множини рослин *Brassica sp.*, яка може застосовуватися для одержання екстрагованого рослинного ліпиду за будь-яким із пп. 1-5 в одній або більше її насінині.

16. Спосіб за п. 15, що додатково включає одержання потомства рослин від ідентифікованої рослини або її насіння.

17. Рослина або насіння за п. 13 або п. 14, які **відрізняються** тим, що містить ліпід за пп. 2-5.

18. Шрот, одержаний із насіння за п. 14.

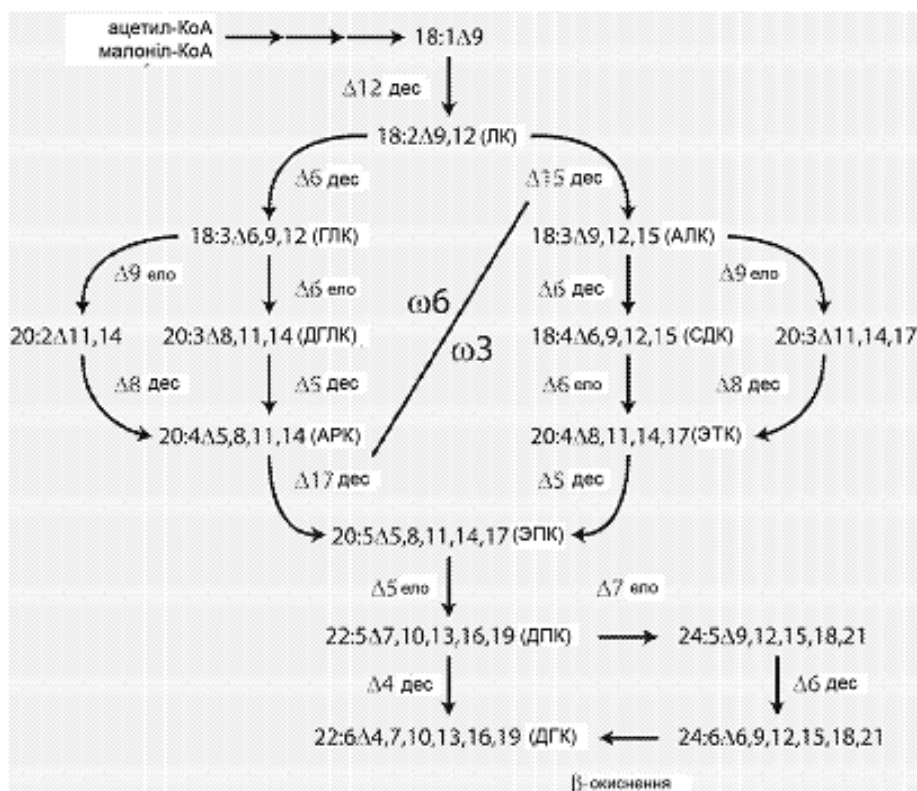
19. Корм, що містить одне або більше із ліпідів за будь-яким з пп. 1-5 або шроту за п. 18.

20. Спосіб одержання корму, який включає стадію, в якій змішують один або обидва із ліпідів за будь-яким із пп. 1-5 або шроту за п. 18, щонайменше із ще одним поживним інгредієнтом.

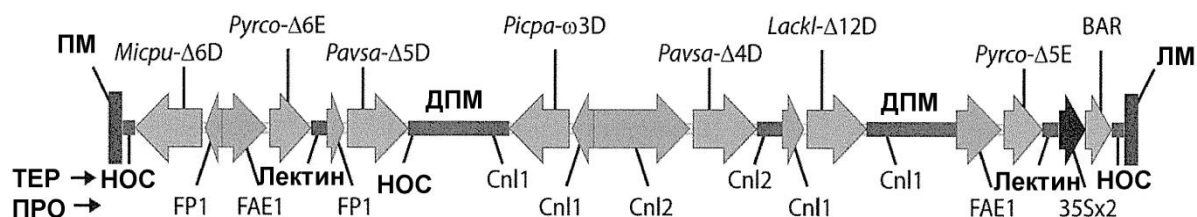
21. Застосування ліпиду за будь-яким із пп. 1-5 в лікуванні або попередженні стану, при якому ПНЖК здійснюють сприятливу дію, де стани включають підвищені рівні тригліцеролів у сироватці, підвищені рівні холестерину у сироватці, наприклад, підвищені рівні ЛПНП холестерину, серцеву аритмію, ангіопластику, 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, адренолейкодистрофію, 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.

22. Насіння олійної культури виду роду *Brassica sp.*, яке містить жирні кислоти в естерифікованій формі, при цьому жирні кислоти містять олеїнову кислоту, пальмітинову кислоту,  $\omega$ 6 поліненасичені жирні кислоти, які містять лінолеву кислоту (ЛК),  $\omega$ 3 поліненасичені жирні кислоти, які містять  $\alpha$ -ліноленову кислоту (АЛК), докозапентаєнову кислоту (ДПК), докозагексаєнову кислоту (ДГК), стеаридонову кислоту (СДК), ейкозапентаєнову кислоту (ЕПК) і ейкозатетраєнову кислоту (ЕТК), причому рівень пальмітинової кислоти в загальному вмісті жирних кислот насіння олійної культури становить від 2 до 16 %, рівень міристинової кислоти

- (C14:0) в загальному вмісті жирних кислот насіння олійної культури, при наявності, становить менше ніж 1 %, рівень ДПК в загальному вмісті жирних кислот насіння олійної культури становить від 1 до 16 %, рівень ДГК в загальному вмісті жирних кислот насіння олійної культури становить менше ніж 2 % і щонайменше 70 % естерифікованої ДПК у формі триацилгліцеролу (ТАГ) знаходиться в положенні sn-1 або sn-3 ТАГ.
- 5

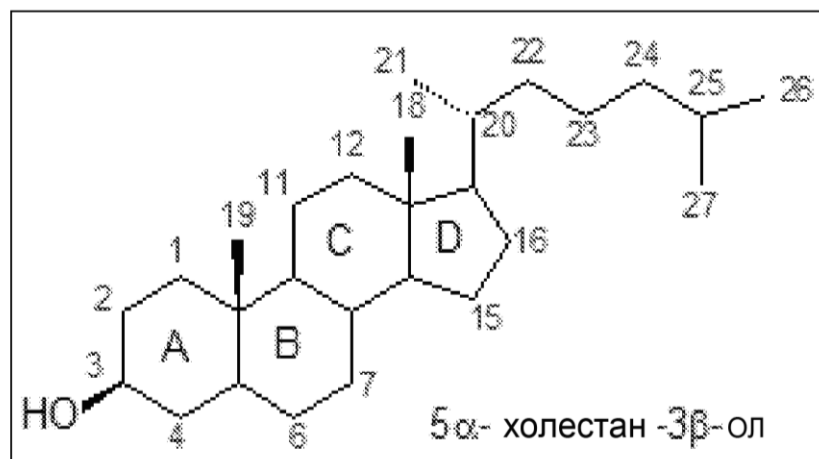


ФІГ. 1

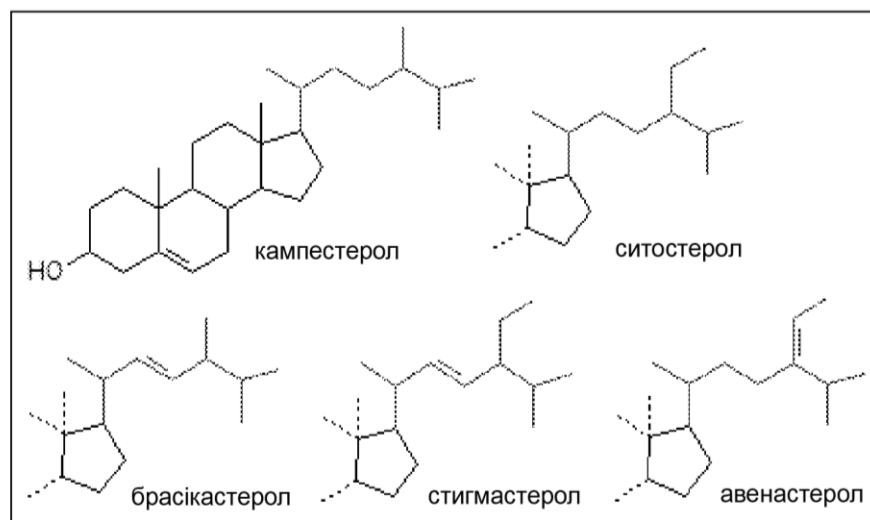


ФІГ. 2

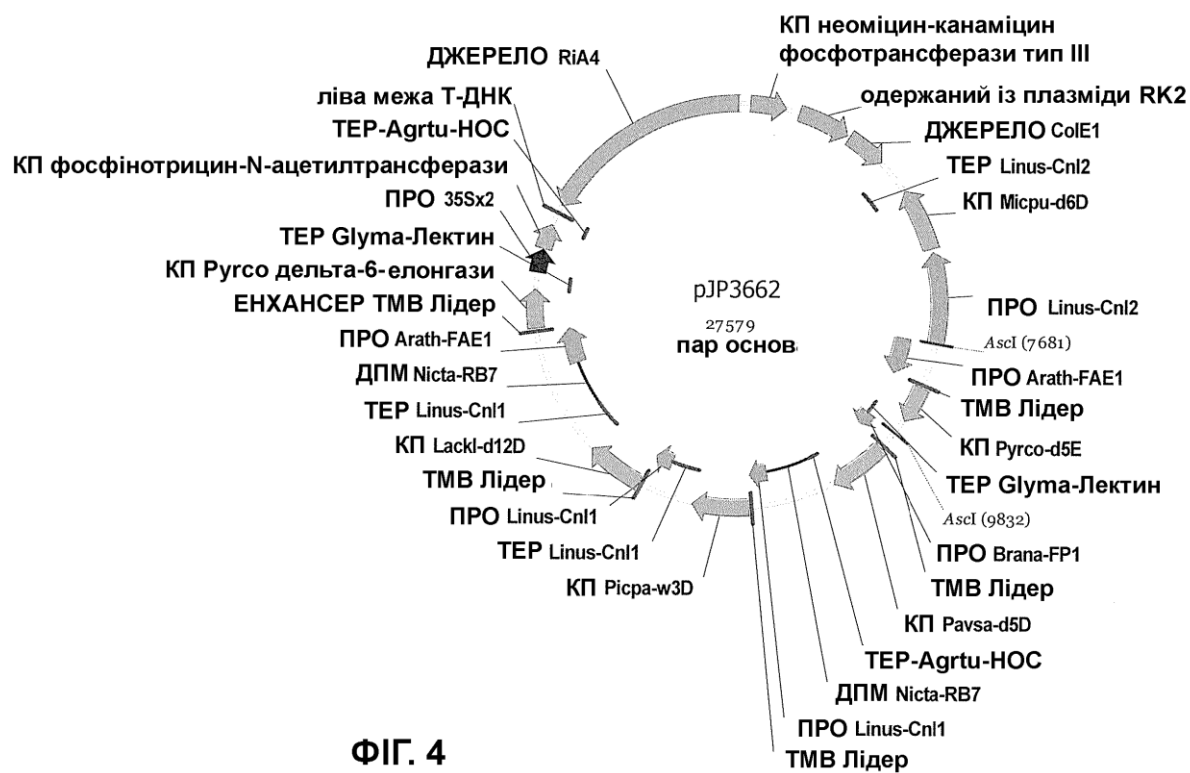
A)



B)



ФІГ. 3



ФІГ. 4