



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.12.21**

**(21)** Номер заявки  
**201590026**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.06.14**

**(51)** Int. Cl. **A01H 5/00** (2006.01)  
**C11B 1/10** (2006.01)  
**C12N 15/52** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 15/79** (2006.01)

**(54) ВЫРАБОТКА ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫХ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ**

**(31)** 61/660,392; 61/663,344; 61/697,676;  
61/782,680

**(32)** 2012.06.15; 2012.06.22; 2012.09.06;  
2013.03.14

**(33)** US

**(43)** 2015.05.29

**(86)** PCT/AU2013/000639

**(87)** WO 2013/185184 2013.12.19

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**КОММОНВЕЛТ САЙНТИФИК  
ЭНД ИНДАСТРИЭЛ РИСЕРЧ  
ОРГАНИЗЭЙШН; ГРЕЙНЗ  
РИСЕРЧ ЭНД ДИВЕЛОПМЕНТ  
КОРПОРЕЙШН; НУСИД ПТИ ЛТД  
(AU)**

**(72)** Изобретатель:  
**Петри Джеймс Робертсон, Сингх  
Суриндер Пал, Де Фейтер Роберт  
Чарльз (AU)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** WO-A1-2005103253  
ZHOU, X.-R. et al., "Isolation and characterization of genes from the marine microalga Pavlova salina encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis", *Phytochemistry*, 2007, Vol. 68, p. 785-796, table 1

ROBERT, S.S. et al., "Isolation and characterisation of a  $\Delta 5$ -fatty acid elongase from the marine microalga Pavlova salina", *Mar. Biotechnol.*, 2009, Vol. 11, p. 410-418, table 2

RYCKEBOSCH, E. et al. "Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids", *Lipid Technology*, 2012 (13 June), Vol. 24, No. 6, p. 128-130, table 1

WO-A1-2010057246

PETRIE, J.R. et al. "Expanding the docosahexaenoic acid food web for sustainable production: engineering lower plant pathways into higher plants", *AoB PLANTS*, 2011, Article plr011 (doi: 10.1093/aobpla/plr011), A posteriori lack of unity

WU, G. et al. "Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants", *Nat. Biotechnol.*, 2005, Vol. 23, p. 1013-1017, figures 1 & 2; table 1

RUIZ-LOPEZ, N. et al. "Enhancing the accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic Arabidopsis thaliana via iterative metabolic engineering and genetic crossing", *Transgenic Res.*, 2012 (February), Vol. 21, p. 1233-1243, figures 1-4; table 1

WO-A2-2004101757

PETRIE, J.R. et al. "Rapid expression of transgenes driven by seed-specific constructs in leaf tissue: DHA production", *Plant Methods*, 2010, Vol. 6, e8, figure 2

US-A1-20110039010

LIN, L. et al. "Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, Vol. 100, No. 10, p. 5962-5967, figure 3

WO-A1-2009017821

CHEN, Q.-J. et al. "MISSA is a highly efficient in vivo DNA assembly method for plant multiple-gene transformation", *Plant Physiol*, 2010, Vol. 153, p. 41-51, figure 5A

HU, Q. et al. "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances", *Plant J.*, 2008, Vol. 54, p. 621-639, abstract

PETRIE, J.R. et al. "Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA", *PLoS ONE*, 2012 (November), Vol. 7, No. 11, e49165, abstract; figures 2 & 3; table 1

UNTERGASSER, A. et al. "One-step Agrobacterium mediated transformation of eight genes essential for Rhizobium symbiotic signaling using the novel binary vector system pHUGE", *PLoS ONE*, 2012 (October), Vol. 7, No. 10, e47885, figure 3

LENIHAN-GHEELS, G. et al. "Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish?", *Nutrients*, 2013 (April), Vol. 5, p. 1301-1315, page 1309, paragraph 4 - page 1310, paragraph 1

WO-A2-2013016546

**(57)** Изобретение относится к способам синтеза длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот, особенно докозагексаеновой кислоты, в рекомбинантных растительных клетках.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к способам синтеза длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот, особенно докозагексаеновой кислоты, в рекомбинантных растительных клетках.

### Уровень техники

Длинноцепочечные омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ДЦ-ПНЖК) на сегодняшний день широко признаны как значимые соединения для здоровья человека и животных. Указанные жирные кислоты могут быть получены из пищевых источников или путем превращения линолевой (ЛК, 18:2 $\omega$ 6) или  $\alpha$ -линоленовой (АЛК, 18:3 $\omega$ 3) жирных кислот, обе из которых рассматриваются как незаменимые жирные кислоты в рационе человека. Хотя человек и многие другие позвоночные животные могут превращать ЛК или АЛК, полученные из растительных источников, в С22, они осуществляют такое превращение с очень низкой скоростью. Кроме того, большинству современных обществ присуще несбалансированное питание, в котором по меньшей мере 90% полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) составляют  $\omega$ 6 жирные кислоты, вместо соотношения 4:1 или менее для  $\omega$ 6: $\omega$ 3 жирных кислот, которое считается идеальным (Trautwein, 2001). Непосредственным пищевым источником ДЦ-ПНЖК, например эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК, 20:5 $\omega$ 3) и докозагексаеновой кислоты (ДГК, 22:6 $\omega$ 3), для человека в основном является рыба или рыбий жир. Таким образом, медицинские работники рекомендуют регулярно включать рыбу, содержащую значительные уровни ДЦ-ПНЖК в рацион человека. Все чаще полученные из рыбьего жира ДЦ-ПНЖК вводят, например, в пищевые продукты и детское питание. Однако за счет уменьшения глобальной и национальной ловли рыбы необходимы альтернативные источники указанных благоприятно влияющих на здоровье масел.

Цветковые растения, в противоположность животным, не обладают способностью синтезировать полиненасыщенные жирные кислоты с длиной цепи более 18 атомов углерода. В частности, культивируемые и садовые растения, наряду с другими покрытосеменными, не содержат ферментов, необходимых для синтеза  $\omega$ 3 жирных кислот с более длинной цепью, например ЭПК, докозапентаеновой кислоты (ДПК, 22:5 $\omega$ 3) и ДГК, полученных из АЛК. Важной целью в биотехнологии растений, таким образом, является создание культивируемых растений, которые вырабатывают существенные количества ДЦ-ПНЖК, таким образом обеспечивая альтернативный источник этих соединений.

#### Пути биосинтеза ДЦ-ПНЖК.

Биосинтез ДЦ-ПНЖК в организмах, таких как микроводоросли, мхи и грибы, обычно происходит как серия реакций кислород-зависимой десатурации и элонгации (фиг. 1). Самый распространенный путь получения ЭПК в указанных организмах включает  $\Delta$ 6-десатурацию,  $\Delta$ 6-элонгацию и  $\Delta$ 5-десатурацию (называется путем  $\Delta$ 6-десатурации), тогда как в менее распространенном пути используется  $\Delta$ 9-элонгация,  $\Delta$ 8-десатурация и  $\Delta$ 5-десатурация (носит название пути  $\Delta$ 9-десатурации). Указанные последовательные реакции десатурации и элонгации могут начинаться с субстрата  $\omega$ 6 жирной кислоты ЛК, схематически проиллюстрированного в верхней левой части фиг. 1 ( $\omega$ 6) или субстрата  $\omega$ 3 АЛК до ЭПК, проиллюстрированного на нижней правой части фиг. 1 ( $\omega$ 3). Если начальная  $\Delta$ 6-десатурация осуществляется на субстрате  $\omega$ 6 ЛК, продукт серии из трех ферментов ДЦ-ПНЖК будет представлять собой  $\omega$ 6 жирную арахидоновую кислоту (АРК). Организмы, синтезирующие ДЦ-ПНЖК, могут превращать  $\omega$ 6 жирные кислоты в  $\omega$ 3 жирные кислоты с использованием  $\omega$ 3-десатуразы, что проиллюстрировано как стадия  $\Delta$ 17-десатуразы на фиг. 1, для превращения арахидоновой кислоты (АРК, 20:4 $\omega$ 6) в ЭПК. Некоторые члены семейства  $\omega$ 3-десатуразы могут воздействовать на различные субстраты, варьирующие от ЛК до АРК. Растительные  $\omega$ 3-десатуразы часто специфично катализируют  $\Delta$ 15-десатурацию ЛК до АЛК, тогда как грибковые и дрожжевые  $\omega$ 3-десатуразы могут быть специфичными в отношении  $\Delta$ 17-десатурации АРК до ЭПК (Pereira et al., 2004a; Zank et al., 2005). Некоторые отчеты наводят на мысль о том, что могут существовать неспецифичные  $\omega$ 3-десатуразы, которые могут превращать широкий спектр  $\omega$ 6 субстратов в соответствующие  $\omega$ 3 продукты (Zhang et al., 2008).

Превращение ЭПК в ДГК в таких организмах происходит путем  $\Delta$ 5-элонгации ЭПК, с образованием ДПК, после чего следует  $\Delta$ 4-десатурация с образованием ДГК (фиг. 1). И наоборот, млекопитающие используют так называемый путь "Шпрехера", в котором ДПК превращается в ДГК в ходе трех отдельных реакций, независимых от  $\Delta$ 4-десатуразы (Sprecher et al., 1995).

Front end десатуразы, в общем найденные в растениях, мхах, микроводорослях и низших животных, например *Caenorhabditis elegans*, в основном принимают субстраты жирных кислот, этерифицированных в положении sn-2 фосфатидилхолинового (ФХ) субстрата. Указанные десатуразы, таким образом, известны как ацил-ФХ, связанные с липидом, front-end десатуразы (Domergue et al., 2003). И наоборот, front-end десатуразы высших животных в общем принимают субстраты ацил-КоА, где жирнокислотный субстрат связан с КоА вместо ФХ (Domergue et al., 2005). Известно, что некоторые десатуразы микроводорослей и одна растительная десатураза используют жирнокислотные субстраты, этерифицированные до КоА (табл. 2).

Каждая реакция элонгации ПНЖК состоит из четырех стадий, катализируемых многокомпонентным белковым комплексом: вначале, реакция конденсации приводит к добавлению модуля 2С из мало-

нил-КоА к жирной кислоте, результатом чего является образование  $\beta$ -кетоацильного промежуточного соединения. Далее оно восстанавливается НАДФ-Н с последующей дегидратацией и образованием енольного промежуточного соединения. В конце, данное промежуточное соединение повторно восстанавливается с образованием удлиненной жирной кислоты. В общем, считается, что стадия конденсации в числе указанных четырех реакций является специфичной для субстрата, а другие стадии - нет. На практике это означает, что природный аппарат элонгации растения способен к элонгации ПНЖК при условии, что введен конденсационный фермент (обычно под названием "элонгаза"), специфичный в отношении ПНЖК, хотя эффективность природного аппарата элонгации растения с точки зрения элонгации неприродных субстратов ПНЖК может быть низкой. В 2007 г. была опубликована информация относительно идентификации и описания цикла элонгации дегидратазы дрожжей (Denic and Weissman, 2007).

Десатурация ПНЖК в растениях, мхах и микроводорослях естественным путем происходит на жирнокислотных субстратах, в основном в пуле ацил-ФХ, тогда как элонгация происходит на субстратах в пуле ацил-КоА. Перенос жирных кислот от молекул ацил-ФХ к носителю КоА выполняется фосфолипазами (ФЛА), тогда как перенос жирных кислот ацил-КоА к носителю ФХ выполняется лизофосфатидилхолин ацилтрансферазами (ЛФХАТ) (фиг. 21) (Singh et al., 2005).

Сконструированная выработка ДЦ-ПНЖК.

Большая часть метаболического конструирования ДЦ-ПНЖК осуществлялась с использованием аэробного пути  $\Delta 6$ -десатурация/элонгация. О биосинтезе  $\gamma$ -линоленовой кислоты (ГЛК, 18:3 $\omega 6$ ) в табаке с использованием  $\Delta 6$ -десатуразы из цианобактерии *Synechocystis* впервые сообщалось в 1996 году (Reddy and Thomas, 1996). Позже, ГЛК была получена в культивируемых растениях, таких как сафлор (73% ГЛК в масле из семян; Knauf et al., 2006) и соя (28% ГЛК; Sato et al., 2004). Выработка ДЦ-ПНЖК, например ЭПК и ДГК, включает более сложное конструирование, за счет увеличения количества вовлеченных стадий десатурации и элонгации. О выработке ЭПК в наземном растении впервые сообщалось Qi et al. (2004), которые ввели гены, кодирующие  $\Delta 9$ -элонгазу из *Isochrysis galbana*,  $\Delta 8$ -десатуразу из *Euglena gracilis* и  $\Delta 5$ -десатуразу из *Mortierella alpina* в *Arabidopsis* с получением до 3% ЭПК. Данная работа была завершена Abbadì et al. (2004), которые сообщили о выработке до 0,8% ЭПК в зерне льна с использованием генов, кодирующих  $\Delta 6$ -десатуразу и  $\Delta 6$ -элонгазу из *Physcomitrella patens* и  $\Delta 5$ -десатуразу из *Phaeodactylum tricornutum*.

Первый отчет о получении ОДЦ-ДГК, и на сегодняшний день самых высоких зарегистрированных уровней ПНЖК с очень длинной цепью, содержится в WO 04/017467, где раскрыта выработка 3% ДГК в зародышах сои, но не семени, посредством введения генов, кодирующих  $\Delta 6$ -десатуразу *Saprolegnia diclina*,  $\Delta 6$ -десатуразу *Mortierella alpina*,  $\Delta 5$ -десатуразу *Mortierella alpina*,  $\Delta 4$ -десатуразу *Saprolegnia diclina*,  $\Delta 17$ -десатуразу *Saprolegnia diclina*,  $\Delta 6$ -элонгазу *Mortierella alpina* и  $\Delta 5$ -элонгазу *Pavlova lutheri*. Максимальный уровень ЭПК в эмбрионах, также вырабатывающих ДГК, составлял 19,6%, указывая на низкую эффективность превращения ЭПК в ДГК (WO 2004/071467). Это открытие было подобно опубликованному Robert et al. (2005), где выход превращения ЭПК в ДГК был низким, с выработкой 3% ЭПК и 0,5% ДГК в *Arabidopsis* с использованием  $\Delta 5/6$ -десатуразы *Danio rerio*,  $\Delta 6$ -элонгазы *Caenorhabditis elegans*, и  $\Delta 5$ -элонгазы и  $\Delta 4$ -десатуразы *Pavlova salina*. Также, в 2005 году Wu et al. опубликовали сообщение о выработке 25% АРК, 15% ЭПК и 1,5% ДГК в *Brassica juncea* с использованием  $\Delta 6$ -десатуразы *Pythium irregulare*,  $\Delta 5$ -десатуразы *Thraustochytrid*,  $\Delta 6$ -элонгазы *Physcomitrella patens*,  $\Delta 12$ -десатуразы *Calendula officianalis*,  $\Delta 5$ -элонгазы *Thraustochytrid*,  $\Delta 17$ -десатуразы *Phytophthora infestans*, элонгазы ДЦ-ПНЖК *Oncorhynchus mykiss*,  $\Delta 4$ -десатуразы *Thraustochytrid* и ЛФХАТ *Thraustochytrid* (Wu et al., 2005). Краткое описание усилий по получению урожая семян масличных культур, которые синтезируют  $\omega 3$  ДЦ-ПНЖК, приведено в Venegas-Caleron et al. (2010) и Ruiz-Lopez et al. (2012). Как указано Ruiz-Lopez et al. (2012), на дату публикации результаты по получению ДГК в трансгенных растениях даже отдаленно не напоминают уровней, наблюдаемых в рыбьем жире.

Таким образом, остается потребность в более эффективной выработке ДЦ-ПНЖК в рекомбинантных клетках, в частности ДГК в семенах растений масличных культур.

#### **Краткое описание изобретения**

Авторами настоящего изобретения идентифицированы способы и растения для получения липида с высокими уровнями ДГК.

В первом аспекте настоящего изобретения раскрывается экстрагированный растительный липид, содержащий жирные кислоты в этерифицированной форме, причем жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту,  $\omega 6$  жирные кислоты, которые включают линолевую кислоту (ЛК),  $\omega 3$  жирные кислоты, которые включают  $\alpha$ -линоленовую кислоту (АЛК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), и необязательно одну или более из стеарионовой кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), докозапентаеновой кислоты (ДПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), притом, что уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет приблизительно 7-20%.

В варианте реализации экстрагированный липид обладает одним или более или всеми из следующих признаков:

i) уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 2 до 18%, от приблизительно 2 до 16% или от приблизительно 2 до 15%,

ii) уровень миристиновой кислоты (C14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 6, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2 или менее чем приблизительно 1%,

iii) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 1 до приблизительно 30%, от приблизительно 3 до приблизительно 30%, от приблизительно 6 до приблизительно 30%, от 1 до приблизительно 20%, от приблизительно 30 до приблизительно 60%, от приблизительно 45 до приблизительно 60% или составляет приблизительно 30%,

iv) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35%, от приблизительно 4 до приблизительно 20% или от приблизительно 4 до 17%,

v) уровень  $\alpha$ -линоленовой кислоты (АЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 40%, от приблизительно 7 до приблизительно 40%, от приблизительно 10 до приблизительно 35%, от приблизительно 20 до приблизительно 35%, от приблизительно 4 до приблизительно 16% или от приблизительно 2 до приблизительно 16%,

vi) уровень  $\gamma$ -линоленовой кислоты (ГЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2, менее чем приблизительно 1, менее чем приблизительно 0,5, от 0,05 до приблизительно 7%, от 0,05 до приблизительно 4%, от 0,05 до приблизительно 3% или от 0,05 до приблизительно 2%,

vii) уровень стеариновой кислоты (СДК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 7, менее чем приблизительно 6, менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 3, от приблизительно 0,05 до приблизительно 7%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 6%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 4%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3% или от 0,05 до приблизительно 2%,

viii) уровень эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 6, менее чем приблизительно 5, менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 1, менее чем приблизительно 0,5, от приблизительно 0,05 до приблизительно 6%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 5%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 4%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3% или от приблизительно 0,05 до приблизительно 2%,

ix) уровень эйкозатриеновой кислоты (ЭТрК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 2, менее чем приблизительно 1, от приблизительно 0,05 до приблизительно 4%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 2% или от приблизительно 0,05 до приблизительно 1%,

x) уровень эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2, от приблизительно 0,05 до приблизительно 10%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 5%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3% или от приблизительно 0,05 до приблизительно 2%,

xi) уровень докозапентаеновой кислоты (ДПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2, от приблизительно 0,05 до приблизительно 8%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 5%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3% или от приблизительно 0,05 до приблизительно 2%,

xii) уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18, от приблизительно 8 до 20%, от приблизительно 10 до 20%, от приблизительно 11 до 20%, от приблизительно 10 до приблизительно 16% или от приблизительно 14 до 20%,

xiii) липид содержит  $\omega$ 6-докозапентаеновую кислоту ( $22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ ) в числе содержащихся в нем жирных кислот,

xiv) липид по существу не содержит  $\omega$ 6-докозапентаеновой кислоты ( $22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ ) в числе содержащихся в нем жирных кислот,

xv) липид по существу не содержит СДК, ЭПК и ЭТК в числе содержащихся в нем жирных кислот,

xvi) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 25%, от приблизительно 4 до приблизительно 20%, от приблизительно 6 до приблизительно 20%, от приблизительно 4 до приблизительно 60%, от приблизительно 30 до приблизительно 60% или от приблизительно 45 до приблизительно 60%,

xvii) уровень общих мононенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35%, от приблизительно 8 до



меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 25, от приблизительно 15 до приблизительно 50%, от приблизительно 20 до приблизительно 40% или от приблизительно 20 до приблизительно 30%,

xxxiii) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения АЛК в ДГК по меньшей мере приблизительно 17, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 24, от приблизительно 17 до приблизительно 55%, от приблизительно 22 до приблизительно 35% или от приблизительно 24 до приблизительно 35%,

xxxiv) общие жирные кислоты в экстрагированном липиде содержат менее чем 1% С20:1,

xxxv) содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере 95, от приблизительно 70 до приблизительно 99% или от приблизительно 90 до приблизительно 99%,

xxxvi) липид содержит диацилглицерол (ДАГ),

xxxvii) липид содержит менее чем приблизительно 10, менее чем приблизительно 5, менее чем приблизительно 1% или от приблизительно 0,001 до приблизительно 5% свободных (неэтерифицированных) жирных кислот и/или фосфолипидов, или по существу не содержит их,

xxxviii) по меньшей мере 70 или по меньшей мере 80% этерифицированной ДГК в форме ТАГ находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ,

xxxix) наиболее распространенными ДГК-содержащими видами ТАГ в липиде являются ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12) и

x1) липид содержит три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18).

В другом варианте реализации экстрагированный липид находится в форме масла, причем липид составляет по меньшей мере приблизительно 90 или по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 98% или от приблизительно 95 до приблизительно 98 мас.% масла.

В предпочтительном варианте реализации липид или масло, предпочтительно масло из семян, обладает следующими признаками: в общем содержании жирных кислот липида или масла уровень ДГК составляет от приблизительно 7 до 20%, уровень пальмитиновой кислоты составляет от приблизительно 2 до приблизительно 16%, уровень миристиновой кислоты составляет менее чем приблизительно 6%, уровень олеиновой кислоты составляет от приблизительно 1 до приблизительно 30%, уровень ЛК составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35%, АЛК присутствует, ГЛК присутствует, уровень СДК составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 7%, уровень ЭТК составляет менее чем приблизительно 4%, уровень ЭПК составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 10%, уровень ДПК составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 8%, уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 25%, уровень общих мононенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35%, уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 20 до приблизительно 75%, соотношение общих ω6 жирных кислот:общих ω3 жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 3,0, соотношение новых ω6 жирных кислот:новых ω3 жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,03 до приблизительно 3,0, предпочтительно менее чем приблизительно 0,50, состав жирных кислот липида основан на: эффективности превращения олеиновой кислоты в ЛК под действием Δ12-десатуразы по меньшей мере приблизительно 60%, эффективности превращения СДК в кислоту ЭТК под действием Δ6-элонгазы по меньшей мере приблизительно 60%, эффективности превращения ЭПК в ДПК под действием Δ5-элонгазы от приблизительно 50 до приблизительно 95%, эффективности превращения ДПК в ДГК под действием Δ4-десатуразы от приблизительно 50 до приблизительно 95%, эффективности превращения олеиновой кислоты в ДГК по меньшей мере приблизительно 10%, и содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере приблизительно 70%, и необязательно липид по существу не содержит холестерина и/или липид содержит три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18).

В более предпочтительном варианте реализации липид или масло, предпочтительно масло из семян, обладает следующими признаками: в общем содержании жирных кислот липида уровень ДГК составляет от приблизительно 7 до 20%, уровень пальмитиновой кислоты составляет от приблизительно 2 до приблизительно 16%, уровень миристиновой кислоты составляет менее чем приблизительно 2%, уровень олеиновой кислоты составляет от приблизительно 1 до приблизительно 30%, уровень ЛК составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35%, уровень АЛК составляет от приблизительно 7 до приблизительно 40%, уровень ГЛК составляет менее чем приблизительно 4%, уровень СДК составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 7%, уровень ЭТК составляет менее чем приблизительно 4%, уровень ЭТрК составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 4%, уровень ЭПК составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 10%, уровень ДПК составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 8%, уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 25%, уровень общих мононенасыщенных

жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35%, уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 20 до приблизительно 75%, уровень новых  $\omega 6$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 10%, уровень общих  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 36 до приблизительно 75%, уровень новых  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 9 до приблизительно 33%, соотношение общих  $\omega 6$  жирных кислот: общих  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 3,0, соотношение новых  $\omega 6$  жирных кислот: новых  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,03 до приблизительно 3,0, состав жирных кислот липида основан на: эффективности превращения олеиновой кислоты в ЛК под действием  $\Delta 12$ -десатуразы по меньшей мере приблизительно 60%, эффективности превращения СДК в кислоту ЭТК под действием  $\Delta 6$ -элонгазы по меньшей мере приблизительно 60%, эффективности превращения ЭТК в ЭПК под действием  $\Delta 5$ -десатуразы по меньшей мере приблизительно 60%, эффективности превращения ЭПК в ДПК под действием  $\Delta 5$ -элонгазы от приблизительно 50 до приблизительно 95%, эффективности превращения ДПК в ДГК под действием  $\Delta 4$ -десатуразы от приблизительно 50 до приблизительно 95%, эффективности превращения олеиновой кислоты в ДГК по меньшей мере приблизительно 10%, эффективности превращения ЛК в ДГК по меньшей мере приблизительно 15%, эффективности превращения АЛК в ДГК по меньшей мере приблизительно 17%, и в содержании общих жирных кислот в экстрагированном липиде С20:1 составляет менее чем 1%, содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере приблизительно 70%, липид по существу не содержит холестерина, и липид содержит три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18). Предпочтительно липид или масло представляет собой масло рапса и/или не обработан способом переэтерификации после экстракции из растения или части растения. В конкретном варианте реализации липид или масло рапса может быть впоследствии обработан, с целью превращения жирных кислот в масле в алкиловые эфиры, например метиловые или этиловые эфиры. Дополнительная обработка может применяться для обогащения липида или масла ДГК.

В варианте реализации липид или масло, предпочтительно масло из семян, обладает следующими признаками: в общем содержании жирных кислот липида уровень ДГК составляет от приблизительно 7 до 20%, уровень пальмитиновой кислоты составляет от приблизительно 2 до приблизительно 16%, уровень миристиновой кислоты составляет менее чем приблизительно 2%, уровень олеиновой кислоты составляет от приблизительно 30 до приблизительно 60%, предпочтительно от приблизительно 45 до приблизительно 60%, уровень ЛК составляет от приблизительно 4 до приблизительно 20%, уровень АЛК составляет от приблизительно 2 до приблизительно 16%, уровень ГЛК составляет менее чем приблизительно 3%, уровень СДК составляет менее чем приблизительно 3%, уровень ЭТК составляет менее чем приблизительно 4%, уровень ЭТрК менее чем приблизительно 2%, уровень ЭПК составляет менее чем приблизительно 4%, уровень ДПК составляет менее чем приблизительно 4%, уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 25%, уровень общих мононенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 30 до приблизительно 60% или от приблизительно 40 до приблизительно 60%, уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 20 до приблизительно 75%, уровень новых  $\omega 6$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 10%, уровень общих  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 10 до приблизительно 20%, уровень новых  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 9 до приблизительно 20%, соотношение общих  $\omega 6$  жирных кислот: общих  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 3,0, предпочтительно менее чем приблизительно 0,50, соотношение новых  $\omega 6$  жирных кислот: новых  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,03 до приблизительно 3,0, содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере приблизительно 70%, липид по существу не содержит холестерина, и липид содержит три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18). Предпочтительно липид или масло по существу не содержит СДК, ЭПК и ЭТК и/или представляет собой масло рапса и/или не обработан способом переэтерификации после извлечения из растения или части растения. В конкретном варианте реализации липид или масло рапса впоследствии может быть обработан, с целью превращения жирных кислот в масле в алкиловые эфиры, например метиловые или этиловые эфиры. Дополнительная обработка может применяться для обогащения липида или масла ДГК.

В еще одном предпочтительном варианте реализации липид или масло, предпочтительно масло из семян, обладает следующими признаками: в общем содержании жирных кислот липида или масла уровень ДГК составляет от приблизительно 7 до 20%, уровень пальмитиновой кислоты составляет от при-

близительно 2 до приблизительно 16%, уровень миристиновой кислоты составляет менее чем приблизительно 6%, уровень олеиновой кислоты составляет от приблизительно 1 до приблизительно 30%, уровень ЛК составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35%, АЛК присутствует, ГЛК присутствует, уровень СДК составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 7%, уровень ЭТК составляет менее чем приблизительно 6%, уровень ЭПК составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 10%, уровень ДПК составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 8%.

В дальнейшем варианте реализации экстрагированный липид дополнительно содержит один или более стеролов, предпочтительно растительных стеролов.

В другом варианте реализации экстрагированный липид находится в форме масла и содержит менее чем приблизительно 10, менее чем приблизительно 7 мг стеролов/г масла, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 мг стеролов/г масла, или от приблизительно 1,5 до приблизительно 7 мг стеролов/г масла.

Примеры стеролов, которые могут присутствовать в экстрагированном липиде, включают, не обязательно ограничиваясь ими, один или более или все из следующего: кампэстрол/24-метилхолестерин,  $\Delta^5$ -стигмастерол, эбурикол,  $\beta$ -ситостерол/24-этилхолестерин,  $\Delta^5$ -авенастерол/изофукостерол,  $\Delta^7$ -стигмастерол/стигмаст-7-ен-3 $\beta$ -ол и  $\Delta^7$ -авенастерол.

В варианте реализации вид растения представляет собой один из перечисленных в табл. 26, например рапс, и уровень стеролов является приблизительно таким же, как приведенный в табл. 26 для данного конкретного вида растения.

В варианте реализации экстрагированный липид содержит менее чем приблизительно 0,5 мг холестерина/г масла, менее чем приблизительно 0,25 мг холестерина/г масла, от приблизительно 0 до приблизительно 0,5 мг холестерина/г масла или от приблизительно 0 до приблизительно 0,25 мг холестерина/г масла, или по существу не содержит холестерина.

В дальнейшем варианте реализации липид представляет собой масло, предпочтительно масло из масличной культуры. Примеры таких масел включают, без ограничения, масло вида *Brassica*, например масло рапса, масло *Gossypium hirsutum*, масло *Linum usitatissimum*, масло вида *Helianthus*, масло *Carthamus tinctorius*, масло *Glycine max*, масло *Zea mays*, масло *Arabidopsis thaliana*, масло *Sorghum bicolor*, масло *Sorghum vulgare*, масло *Avena sativa*, масло вида *Trifolium*, масло *Elaeisis guineensis*, масло *Nicotiana benthamiana*, масло *Hordeum vulgare*, масло *Lupinus angustifolius*, масло *Oryza sativa*, масло *Oryza glaberrima*, масло *Camelina sativa*, масло *Crambe abyssinica*, масло *Miscanthus x giganteus* или масло *Miscanthus sinensis*.

Также раскрыт экстрагированный растительный липид, предпочтительно экстрагированное масло из семян рапса, содержащий жирные кислоты в этерифицированной форме, причем жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту,  $\omega 6$  жирные кислоты, которые включают линолевую кислоту (ЛК),  $\omega 3$  жирные кислоты, которые включают  $\alpha$ -линоленовую кислоту (АЛК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), и необязательно одну или более из стеарионовой кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), докозапентаеновой кислоты (ДПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), притом, что липид обладает следующими признаками в отношении общего содержания жирных кислот в липиде:

- i) уровень ДГК составляет приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6 или приблизительно 7%,
- ii) уровень пальмитиновой кислоты составляет от приблизительно 2 до приблизительно 16%,
- iii) уровень миристиновой кислоты составляет менее чем приблизительно 2%,
- iv) уровень олеиновой кислоты составляет от приблизительно 30 до приблизительно 60%, предпочтительно от приблизительно 45 до приблизительно 60%,
- v) уровень ЛК составляет от приблизительно 4 до приблизительно 20%,
- vi) уровень АЛК составляет от приблизительно 2 до приблизительно 16%,
- vii) уровень ГЛК составляет менее чем приблизительно 4%,
- viii) уровень СДК составляет менее чем приблизительно 6 или менее чем приблизительно 4%,
- ix) уровень ЭТК составляет менее чем приблизительно 6 или менее чем приблизительно 4%,
- x) уровень ЭТрК составляет менее чем приблизительно 1%,
- xi) уровень ЭПК составляет менее чем приблизительно 10% и/или уровень ЭПК составляет 0,5-2,0 x уровень ДГК,
- xii) уровень ДПК составляет менее чем приблизительно 4%,
- xiii) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 25%,
- xiv) уровень общих мононенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 30 до приблизительно 70%,
- xv) уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 15 до приблизительно 75%, предпочтительно от приблизительно 15 до приблизительно 30%,



xvi) уровень новых  $\omega 6$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 10%,

xvii) уровень общих  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 10 до приблизительно 20%,

xviii) уровень новых  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 3 до приблизительно 20%,

xix) соотношение общих  $\omega 6$  жирных кислот:общих  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 3,0, предпочтительно менее чем приблизительно 0,50,

xx) соотношение новых  $\omega 6$  жирных кислот:новых  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,03 до приблизительно 3,0,

xxi) содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере приблизительно 70% и

xxii) липид по существу не содержит холестерина.

В варианте реализации липид содержит три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18). Более предпочтительно липид по существу не содержит СДК и ЭТК, и/или не обработан способом переэтерификации после извлечения из растения или части растения.

В другом аспекте раскрыт экстрагированный растительный липид, содержащий жирные кислоты в этерифицированной форме, причем жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту,  $\omega 6$  жирные кислоты, которые включают линолевую кислоту (ЛК),  $\omega 3$  жирные кислоты, которые включают  $\alpha$ -линоленовую кислоту (АЛК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), и одну или больше из стеариδοновой кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), докозапентаеновой кислоты (ДПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), притом, что (i) уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 7 до 20%, (ii) уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 2 до 16%, (iii) уровень миристиновой кислоты (С14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 6%, (iv) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 1 до 30% или от 30 до 60%, (v) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 35%, (vi) уровень  $\alpha$ -линоленовой кислоты (АЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 40%, (vii) уровень эйкозатриеновой кислоты (ЭТрК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 4%, (viii) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 25%, (ix) соотношение общих  $\omega 6$  жирных кислот:общих  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 1,0 до 3,0 или от 0,1 до 1, (x) содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере 70% и (xi) по меньшей мере 70% этерифицированной ДГК в форме ТАГ находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ.

В варианте реализации присутствуют один или более или все из следующих признаков:

i) уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 2 до 15%,

ii) уровень миристиновой кислоты (С14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 1%,

iii) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 3 до приблизительно 30%, от приблизительно 6 до приблизительно 30%, от 1 до приблизительно 20%, от приблизительно 45 до приблизительно 60% или составляет приблизительно 30%,

iv) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 20% или от приблизительно 4 до 17%,

v) уровень  $\alpha$ -линоленовой кислоты (АЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 7 до приблизительно 40%, от приблизительно 10 до приблизительно 35%, от приблизительно 20 до приблизительно 35% или от приблизительно 4 до 16%,

vi) уровень  $\gamma$ -линоленовой кислоты (ГЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2, менее чем приблизительно 1, менее чем приблизительно 0,5, от 0,05 до 7%, от 0,05 до 4%, или от 0,05 до приблизительно 3%, или от 0,05 до приблизительно 2%,

vii) уровень стеариδοновой кислоты (СДК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 3, от приблизительно 0,05 до приблизительно 7%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 4%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3% или от 0,05 до приблизительно 2%,

viii) уровень эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 1, менее чем при-

близительно 0,5, от приблизительно 0,05 до приблизительно 5%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 4%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3% или от приблизительно 0,05 до приблизительно 2%,

ix) уровень эйкозатриеновой кислоты (ЭТрК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 2, менее чем приблизительно 1, от 0,05 до 4%, от 0,05 до 3%, или от 0,05 до приблизительно 2%, или от 0,05 до приблизительно 1%,

x) уровень эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2, от 0,05 до 10%, от 0,05 до 5%, или от 0,05 до приблизительно 3%, или от 0,05 до приблизительно 2%,

xi) уровень докозапентаеновой кислоты (ДПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2, от 0,05 до 8%, от 0,05 до 5%, или от 0,05 до приблизительно 3%, или от 0,05 до приблизительно 2%,

xii) уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18, от приблизительно 8 до 20%, от приблизительно 10 до 20%, от приблизительно 11 до 20%, от приблизительно 10 до приблизительно 16% или от приблизительно 14 до 20%,

xiii) липид содержит  $\omega$ 6-докозапентаеновую кислоту ( $22:5^{\lambda 4,7,10,13,16}$ ) в числе содержащихся в нем жирных кислот,

xiv) липид в существенной мере не содержит  $\omega$ 6-докозапентаеновой кислоты ( $22:5^{\lambda 4,7,10,13,16}$ ) в числе содержащихся в нем жирных кислот,

xv) липид по существу не содержит СДК, ЭПК и ЭТК в числе содержащихся в нем жирных кислот,

xvi) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 20% или от приблизительно 6 до приблизительно 20%,

xvii) уровень общих мононенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35%, от приблизительно 8 до приблизительно 25% или от 8 до приблизительно 22%,

xviii) уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 20 до приблизительно 75%, от приблизительно 50 до приблизительно 75% или от приблизительно 60 до приблизительно 75%,

xix) уровень общих  $\omega$ 6 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 35 до приблизительно 50%, от приблизительно 20 до приблизительно 35%, от приблизительно 6 до 20%, менее 20, менее чем приблизительно 16, менее чем приблизительно 10, от приблизительно 1 до приблизительно 16%, от приблизительно 2 до приблизительно 10% или от приблизительно 4 до приблизительно 10%,

xx) уровень новых  $\omega$ 6 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 10, менее чем приблизительно 8, менее чем приблизительно 6, менее 4, от приблизительно 1 до приблизительно 20%, от приблизительно 1 до приблизительно 10%, от приблизительно 0,5 до приблизительно 8% или от приблизительно 0,5 до 4%,

xxi) уровень общих  $\omega$ 3 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 36 до приблизительно 65%, от 40 до приблизительно 60%, от приблизительно 20 до приблизительно 35%, от приблизительно 10 до приблизительно 20%, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35 или приблизительно 40%,

xxii) уровень новых  $\omega$ 3 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 9 до приблизительно 33%, от приблизительно 10 до приблизительно 20%, от приблизительно 20 до приблизительно 30%, от приблизительно 12 до приблизительно 25%, приблизительно 13, приблизительно 15, приблизительно 17 или приблизительно 20%,

xxiii) соотношение общих  $\omega$ 6 жирных кислот:общих  $\omega$ 3 жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5, менее чем приблизительно 0,50, менее чем приблизительно 0,40, менее чем приблизительно 0,30, менее чем приблизительно 0,20, менее чем приблизительно 0,15, приблизительно 1,0, приблизительно 0,1 или приблизительно 0,2,

xxiv) соотношение новых  $\omega$ 6 жирных кислот:новых  $\omega$ 3 жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 1,0 до приблизительно 3,0, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5, менее чем приблизительно 0,50, менее чем приблизительно 0,40, менее чем приблизительно 0,30, менее чем приблизительно 0,20, менее чем приблизительно 0,15, приблизительно 0,1, приблизительно 0,2 или приблизительно 1,0,

xxv) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения олеиновой кислоты в ДГК по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере

приблизительно 20, от приблизительно 10 до приблизительно 50%, от приблизительно 10 до приблизительно 30% или от приблизительно 10 до приблизительно 25%,

ххvi) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения ЛК в ДГК по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 25, от приблизительно 15 до приблизительно 50%, от приблизительно 20 до приблизительно 40% или от приблизительно 20 до приблизительно 30%,

ххvii) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения АЛК в ДГК по меньшей мере приблизительно 17, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 24, от приблизительно 17 до приблизительно 55%, от приблизительно 22 до приблизительно 35% или от приблизительно 24 до приблизительно 35%,

ххviii) общие жирные кислоты в экстрагированном липиде содержат менее 1% C20:1,

ххix) содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере 95, от приблизительно 70 до приблизительно 99% или от приблизительно 90 до приблизительно 99%,

ххx) липид содержит диацилглицерол (ДАГ),

ххxi) липид содержит менее чем приблизительно 10, менее чем приблизительно 5, менее чем приблизительно 1% или от приблизительно 0,001 до приблизительно 5% свободных (неэтерифицированных) жирных кислот и/или фосфолипида, или по существу не содержит их,

ххxii) по меньшей мере 80% этерифицированной ДГК в форме ТАГ находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ,

ххxiii) наиболее распространенными ДГК-содержащими видами ТАГ в липиде являются ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12) и

ххxiv) липид содержит три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18).

С особым вниманием к упомянутому выше аспекту в варианте реализации:

i) липид находится в форме масла, причем масло содержит один или более стеролов, например один или более или все из кампэстера, Δ5-стигмастера, эбурикола, β-ситостерола, Δ5-авенастера, Δ7-стигмастера и Δ7-авенастера, и

масло необязательно содержит менее 10 мг стеролов/г масла и/или масло в существенной степени не содержит холестерина, и/или

ii) липид находится в форме масла из семени масличной культуры, такого как семя масличной культуры, представляющее собой семя вида Brassica или семя рапса.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ получения экстрагированного растительного липида, включающий стадии:

i) получение содержащей липид части растения, причем липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, притом, что жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, ω6 жирные кислоты, которые включают линолевую кислоту (ЛК), ω3 жирные кислоты, которые включают α-линоленовую кислоту (АЛК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), и необязательно одну или более из эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), стеариноновой кислоты (СДК), докозапентаеновой кислоты (ДПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), и, при этом, уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагируемого липида в части растения составляет приблизительно 7-20%, и

ii) экстракция липида из части растения,

причем уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет приблизительно 7-20%.

В предпочтительном варианте реализации экстрагированный липид обладает одним или более признаков, определенных выше.

В варианте реализации, в котором часть растения представляет собой семя, предпочтительным является семя масличной культуры. Примеры таких семян включают, без ограничения, семя вида Brassica, Gossypium hirsutum, Linum usitatissimum, вида Helianthus, Carthamus tinctorius, Glycine max, Zea mays, Arabidopsis thaliana, Sorghum bicolor, Sorghum vulgare, Avena sativa, вида Trifolium, Elaeis guineensis, Nicotiana benthamiana, Hordeum vulgare, Lupinus angustifolius, Oryza sativa, Oryza glaberrima, Camelina sativa или Crambe abyssinica, предпочтительно Brassica napus, B. juncea или C. sativa.

В другом варианте реализации семя содержит по меньшей мере приблизительно 18, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 26, от приблизительно 18 до приблизительно 100 мг, от приблизительно 22 до приблизительно 70 мг или от приблизительно 24 до приблизительно 50 мг ДГК на 1 г семени.

В дальнейшем варианте реализации часть растения содержит экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

i) ω3-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-элонгаза и Δ5-элонгаза,

ii) Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-элонгаза и Δ5-элонгаза,

iii) Δ12-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ6-элонгаза и Δ5-элонгаза,

iv) Δ12-десатураза, ω3-десатураза или Δ15-десатураза, Δ6-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза,

Δ6-элонгаза и Δ5-элонгаза,

v) ω3-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-элонгаза и Δ5-элонгаза,

vi) Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-элонгаза и Δ5-элонгаза,

vii) Δ12-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-элонгаза и Δ5-элонгаза или

viii) Δ12-десатураза, ω3-десатураза или Δ15-десатураза, Δ8-десатураза, Δ5-десатураза, Δ4-десатураза, Δ9-элонгаза и Δ5-элонгаза,

причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторами, способными направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в клетке части растения.

Еще в одном варианте реализации часть растения обладает одним или более или всеми из следующих признаков:

i) Δ12-десатураза превращает олеиновую кислоту в линолевую кислоту в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80, от приблизительно 60 до приблизительно 98%, от приблизительно 70 до приблизительно 95% или от приблизительно 75 до приблизительно 90%,

ii) ω3-десатураза превращает ω6 жирные кислоты в ω3 жирные кислоты в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 65, по меньшей мере приблизительно 75, по меньшей мере приблизительно 85, от приблизительно 65 до приблизительно 95%, от приблизительно 75 до приблизительно 95% или от приблизительно 80 до приблизительно 95%,

iii) Δ6-десатураза превращает АЛК в СДК в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, от приблизительно 30 до приблизительно 70%, от приблизительно 35 до приблизительно 60% или от приблизительно 50 до приблизительно 70%,

iv) Δ6-десатураза превращает линолевую кислоту в γ-линоленовую кислоту в одной или более клеток растения с эффективностью менее чем приблизительно 5, менее чем приблизительно 2,5, менее чем приблизительно 1, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5%, от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,5% или от приблизительно 0,5 до приблизительно 1%,

v) Δ6-элонгаза превращает СДК в ЭТК в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 75, от приблизительно 60 до приблизительно 95%, от приблизительно 70 до приблизительно 88% или от приблизительно 75 до приблизительно 85%,

vi) Δ5-десатураза превращает ЭТК в ЭПК в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 75, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90, от приблизительно 60 до приблизительно 99%, от приблизительно 70 до приблизительно 99% или от приблизительно 75 до приблизительно 98%,

vii) Δ5-элонгаза превращает ЭПК в ДПК в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 85, по меньшей мере приблизительно 90, от приблизительно 50 до приблизительно 95% или от приблизительно 85 до приблизительно 95%,

viii) Δ4-десатураза превращает ДПК в ДГК в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере приблизительно 93, от приблизительно 50 до приблизительно 95%, от приблизительно 80 до приблизительно 95% или от приблизительно 85 до приблизительно 95%,

ix) эффективность превращения олеиновой кислоты в ДГК в одной или более клеток части растения составляет по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, от приблизительно 10 до приблизительно 50%, от приблизительно 10 до приблизительно 30% или от приблизительно 10 до приблизительно 25%,

x) эффективность превращения ЛК в ДГК в одной или более клеток части растения составляет по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 25, от приблизительно 15 до приблизительно 50%, от приблизительно 20 до приблизительно 40% или от приблизительно 20 до приблизительно 30%,

xi) эффективность превращения АЛК в ДГК в одной или более клеток части растения составляет по меньшей мере приблизительно 17, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 24, от приблизительно 17 до приблизительно 55%, от приблизительно 22 до приблизительно 35% или от приблизительно 24 до приблизительно 35%,

xii) одна или более клеток части растения содержат по меньшей мере приблизительно на 15, по меньшей мере приблизительно на 20, от приблизительно 15 до приблизительно 30% или от приблизительно 22,5 до приблизительно 27,5%, больше жирных кислот ω3, чем соответствующие клетки, без экзогенных полинуклеотидов,

xiii) Δ6-десатураза предпочтительно уменьшает насыщенность α-линоленовой кислоты (АЛК) относительно линолевой кислоты (ЛК),

- xiv) Δ6-элонгаза дополнительно обладает активностью Δ9-элонгазы,
  - xv) Δ12-десатураза дополнительно обладает активностью Δ15-десатуразы,
  - xvi) Δ6-десатураза дополнительно обладает активностью Δ8-десатуразы,
  - xvii) Δ8-десатураза дополнительно обладает активностью Δ6-десатуразы или не обладает активностью Δ6-десатуразы,
  - xviii) Δ15-десатураза дополнительно обладает активностью ω3-десатуразы в отношении ГЛК,
  - xix) ω3-десатураза дополнительно обладает активностью Δ15-десатуразы в отношении ЛК,
  - xx) ω3-десатураза уменьшает насыщенность ЛК и/или ГЛК,
  - xxi) ω3-десатураза предпочтительно уменьшает насыщенность ГЛК относительно ЛК,
  - xxii) уровень ДГК в части растения основан на эффективности превращения олеиновой кислоты в ДГК в части растения по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, от приблизительно 10 до приблизительно 50%, от приблизительно 15 до приблизительно 30% или от приблизительно 20 до приблизительно 25%,
  - xxiii) уровень ДГК в части растения основан на эффективности превращения ЛК в ДГК в части растения по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 22, от приблизительно 15 до приблизительно 60%, от приблизительно 20 до приблизительно 40% или от приблизительно 22 до приблизительно 30%,
  - xxiv) уровень ДГК в части растения основан на эффективности превращения АЛК в ДГК в части растения по меньшей мере приблизительно 17, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 24, от приблизительно 17 до приблизительно 65%, от приблизительно 22 до приблизительно 35% или от приблизительно 24 до приблизительно 35%,
  - xxx) одна или более или все десатуразы обладают более высокой активностью на субстрате ацил-КоА, чем на соответствующем субстрате ацил-фосфатидилхолина (ацил-ФХ),
  - xxxi) Δ6-десатураза обладает более высокой активностью Δ6-десатуразы в отношении АЛК, чем ЛК как жирнокислотного субстрата,
  - xxxii) Δ6-десатураза обладает более высокой активностью Δ6-десатуразы на АЛК-КоА как жирнокислотном субстрате, чем в отношении АЛК, присоединенной к положению sn-2 ФХ, как жирнокислотного субстрата,
  - xxxiii) Δ6-десатураза обладает по меньшей мере в 2 раза более высокой активностью Δ6-десатуразы, по меньшей мере в 3 раза более высокой активностью, по меньшей мере в 4 раза более высокой активностью или по меньшей мере в 5 раз более высокой активностью в отношении АЛК как субстрата, по сравнению с ЛК,
  - xxxiv) Δ6-десатураза обладает более высокой активностью в отношении АЛК-КоА как жирнокислотного субстрата, чем в отношении АЛК, присоединенной к положению sn-2 ФХ, как жирнокислотного субстрата,
  - xxxv) Δ6-десатураза обладает по меньшей мере в 5 раз более высокой активностью Δ6-десатуразы или по меньшей мере в 10 раз более высокой активностью в отношении АЛК-КоА как жирнокислотного субстрата, чем в отношении АЛК, присоединенной к положению sn-2 ФХ, как жирнокислотного субстрата,
  - xxxvi) десатураза представляет собой фронт-энд десатуразу,
  - xxxvii) Δ6-десатураза не обладает обнаружимой активностью Δ5-десатуразы в отношении ЭТК.
- Еще в одном варианте реализации часть растения обладает одним или более или всеми из следующих признаков:
- i) Δ12-десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 10, ее биологически активный фрагмент или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 10,
  - ii) ω3-десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, ее биологически активный фрагмент или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 12,
  - iii) Δ6-десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 16, ее биологически активный фрагмент или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 16,
  - iv) Δ6-элонгаза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 25, ее биологически активный фрагмент, такой как SEQ ID NO: 26, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 25 и/или SEQ ID NO: 26,
  - v) Δ5-десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 30, ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 30,
  - vi) Δ5-элонгаза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 37, ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 50% иден-

тичную SEQ ID NO: 37,

vii)  $\Delta 4$ -десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 41, ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 41.

В варианте реализации часть растения дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий диацилглицерол ацилтрансферазу (ДГАТ), моноацилглицерол ацилтрансферазу (МГАТ), глицерол-3-фосфат ацилтрансферазу (ГФАТ), 1-ацилглицерол-3-фосфат ацилтрансферазу (ЛФКАТ) предпочтительно ЛФКАТ, которая может использовать полиненасыщенный жирный ацил-КоА субстрат С22, ацил-КоА:лизофосфатидилхолин ацилтрансферазу (ЛФХАТ), фосфолипазу  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>), фосфолипазу С (PLC), фосфолипазу D (PLD), СДП-холин диацилглицеролхолин фосфотрансферазу (ХФТ), фосфатидилхолин диацилглицерол ацилтрансферазу (ФДАТ), фосфатидилхолин: диацилглицерол холин фосфотрансферазу (ФДХТ), ацил-КоА синтазу (АКС) или комбинацию двух или более из указанных ферментов.

В другом варианте реализации часть растения дополнительно содержит введенную мутацию или экзогенный полинуклеотид, который в клетке части растения отрицательно регулирует выработку и/или активность эндогенного фермента, выбранного среди FAE1, ДГАТ, МГАТ, ГФАТ, ЛФКАТ, ЛФХАТ, PLA<sub>2</sub>, PLC, PLD, ХФТ, ФДАТ, тиоэстеразы, например FATB или  $\Delta 12$ -десатуразы, или комбинации двух или более из указанных ферментов.

В дальнейшем варианте реализации по меньшей мере один или все промоторы представляют собой специфичные для семени промоторы. В варианте реализации по меньшей мере один или все промоторы получены из генов биосинтеза или аккумуляции масла, таких как олеозин, или из генов хранения белка в семени, таких как конлинин.

В другом варианте реализации промотор(ы), направляющий(ие) экспрессию экзогенных полинуклеотидов, кодирующих  $\Delta 4$ -десатуразу и  $\Delta 5$ -элонгазу инициирует экспрессию полинуклеотидов в развивающемся семени части растения перед или достигает пика экспрессии перед промотором(ами), направляющим(и) экспрессию экзогенных полинуклеотидов, кодирующих  $\Delta 12$ -десатуразу и  $\omega 3$ -десатуразу.

В дальнейшем варианте реализации экзогенные полинуклеотиды ковалентно соединены в молекулу ДНК, предпочтительно молекулу Т-ДНК, интегрированную в геном клеток части растения, причем количество таких молекул ДНК, интегрированных в геном клеток части растения предпочтительно составляет не более одной, двух или трех, или составляет две или три.

Еще в одном варианте реализации растение содержит по меньшей мере два различных экзогенных полинуклеотида, каждый из которых кодирует  $\Delta 6$ -десатуразу с такой же или другой последовательностью аминокислот.

В дальнейшем варианте реализации общее содержание масла в части растения, содержащей экзогенные полинуклеотиды, составляет по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50, или по меньшей мере приблизительно 60, или по меньшей мере приблизительно 70% или от приблизительно 50 до приблизительно 80% от общего содержания масла в соответствующей части растения, в которой отсутствуют экзогенные полинуклеотиды. В этих вариантах максимальное содержание масла может составлять приблизительно 100% от содержания масла в соответствующей части растения дикого типа.

В другом варианте реализации липид находится в форме масла, предпочтительно масла из семян масличной культуры, причем по меньшей мере приблизительно 90, или по меньшей мере приблизительно 95, по меньшей мере приблизительно 98% или от приблизительно 95 до приблизительно 98 мас.% липида составляют триацилглицеролы.

В дальнейшем варианте реализации процесс дополнительно включает обработку липида, с целью повышения уровня ДГК как процента от общего содержания жирных кислот. Например, обработка может представлять собой переэтерификацию. Например, липид, такой как масло рапса, может быть подвергнут обработке с целью превращения жирных кислот в масле в алкиловые эфиры, например метиловые или этиловые эфиры, которые далее могут быть фракционированы с обогащением липида или масла ДГК.

Дополнительно раскрыт способ получения экстрагированного растительного липида, включающий стадии:

i) получение части растения, предпочтительно семени рапса, содержащей липид, причем липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, притом, что жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту,  $\omega 3$  жирные кислоты, которые включают линолевую кислоту (ЛК),  $\omega 3$  жирные кислоты, которые включают  $\alpha$ -линоленовую кислоту (АЛК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), и необязательно одну или более из эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), стеариновой кислоты (СДК), докозапентаеновой кислоты (ДПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), и, при этом, уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагируемого липида в части растения составляет приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6 или от приблизительно 7%, и

ii) экстракция липида из части растения,

причем экстрагированный липид обладает следующими признаками общего содержания жирных кислот в липиде;

- i) уровень ДГК составляет приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6 или приблизительно 7%,
- ii) уровень пальмитиновой кислоты составляет от приблизительно 2 до приблизительно 16%,
- iii) уровень миристиновой кислоты составляет менее чем приблизительно 2%,
- iv) уровень олеиновой кислоты составляет от приблизительно 30 до приблизительно 60%, предпочтительно от приблизительно 45 до приблизительно 60%,
- v) уровень ЛК составляет от приблизительно 4% до приблизительно 20%,
- vi) уровень АЛК составляет от приблизительно 2 до приблизительно 16%,
- vii) уровень ГЛК составляет менее чем приблизительно 4%,
- viii) уровень СДК составляет менее чем приблизительно 6% или менее чем приблизительно 4%,
- ix) уровень ЭТК составляет менее чем приблизительно 6 или менее чем приблизительно 4%,
- x) уровень ЭТрК составляет менее чем приблизительно 1%,
- xi) уровень ЭПК составляет менее чем приблизительно 10% и/или уровень ЭПК составляет 0,5-2,0 x уровень ДГК,
- xii) уровень ДПК составляет менее чем приблизительно 4%,
- xiii) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 25%,
- xiv) уровень общих мононенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 30 до приблизительно 70%,
- xv) уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 15 до приблизительно 75%, предпочтительно от приблизительно 15 до приблизительно 30%,
- xvi) уровень новых  $\omega 6$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 10%,
- xvii) уровень общих  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 10 до приблизительно 20%,
- xviii) уровень новых  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 3 до приблизительно 20%,
- xix) соотношение общих  $\omega 6$  жирных кислот:общих  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 3,0, предпочтительно менее чем приблизительно 0,50,
- xx) соотношение новых  $\omega 6$  жирных кислот:новых  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,03 до приблизительно 3,0,
- xxi) содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере приблизительно 70% и
- xxii) липид по существу не содержит холестерина.

В варианте реализации липид содержит три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18). Более предпочтительно липид по существу не содержит СДК и ЭТК, и/или не обработан способом переэтерификации после извлечения из растения или части растения.

Также раскрыт способ получения экстрагированного растительного липида, включающий стадии:

- i) получение содержащей липид части растения, причем липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, притом, что жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту,  $\omega 6$  жирные кислоты, которые включают линолевую кислоту (ЛК),  $\omega 3$  жирные кислоты, которые включают  $\alpha$ -линоленовую кислоту (АЛК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), и одну или более из стеариноидной кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), докозапентаеновой кислоты (ДПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), и, при этом: (i) уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 7 до 20%, (ii) уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 2 до 16%, (iii) уровень миристиновой кислоты (С14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее 6%, (iv) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 1 до 30% или от 30 до 60%, (v) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 35%, (vi) уровень  $\alpha$ -линоленовой кислоты (АЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 40%, (vii) уровень эйкозатриеновой кислоты (ЭТрК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее 4%, (viii) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 25%, (ix) соотношение общих  $\omega 6$  жирных кислот:общих  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 1,0 до 3,0 или от 0,1 до 1, (x) содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере 70% и (xi) по меньшей мере 70% этерифицированных ДГК в форме ТАГ находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ;

%, и

ii) экстракция липида из части растения, при этом уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет приблизительно 7-20%.

Кроме того, раскрыт липид, или масло, содержащее липид, полученные с применением способа по изобретению.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ получения этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот, включающий переэтерификацию триацилглицеролов в экстрагированном растительном липиде, причем экстрагированный растительный липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, притом, что жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, ω6 жирные кислоты, которые включают линолевую кислоту (ЛК), ω3 жирные кислоты, которые включают α-линоленовую кислоту (АЛК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), и необязательно одну или более из стеариноновой кислоты (СДК), эйкозопентаеновой кислоты (ЭПК), докозопентаеновой кислоты (ДПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), притом, что уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет приблизительно 7-20%, с получением таким образом этиловых эфиров.

В предпочтительном варианте реализации экстрагированный липид обладает одним или более признаков, определенных выше.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ получения этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот, включающий переэтерификацию триацилглицеролов в экстрагированном растительном липиде, причем экстрагированный растительный липид содержит этерифицированные жирные кислоты в форме триацилглицеролов, причем жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, ω6 жирные кислоты, которые включают линолевую кислоту (ЛК), ω3 жирные кислоты, которые включают α-линоленовую кислоту (АЛК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), и одну или более из стеариноновой кислоты (СДК), эйкозопентаеновой кислоты (ЭПК), докозопентаеновой кислоты (ДПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), притом, что (i) уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6% или от 7 до 20%, (ii) уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 2 до 16%, (iii) уровень миристиновой кислоты (C14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее 6%, (iv) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 1 до 30% или от 30 до 60%, (v) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 35%, (vi) уровень α-линоленовой кислоты (АЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 40%, (vii) уровень эйкозатриеновой кислоты (ЭТрК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее 4%, (viii) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 25%, (ix) соотношение общих ω6 жирных кислот:общих ω3 жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 1,0 до 3,0 или от 0,1 до 1, (x) содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере 70% и (xi) по меньшей мере 70% этерифицированной ДГК в форме ТАГ находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ, с получением таким образом этиловых эфиров. В варианте реализации экстрагированный растительный липид обладает одним или более или всеми из следующих признаков:

i) уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 2 до 15%,

ii) уровень миристиновой кислоты (C14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее 1%,

xxxv) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 3 до приблизительно 30%, от приблизительно 6 до приблизительно 30%, от 1 до приблизительно 20%, от приблизительно 45 до приблизительно 60% или составляет приблизительно 30%,

xxxvi) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 20% или от приблизительно 4 до 17%,

xxxvii) уровень α-линоленовой кислоты (АЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 7 до приблизительно 40%, от приблизительно 10 до приблизительно 35%, от приблизительно 20 до приблизительно 35% или от приблизительно 4 до 16%,

xxxviii) уровень γ-линоленовой кислоты (ГЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2, менее чем приблизительно 1%, менее чем приблизительно 0,5, от 0,05 до 7%, от 0,05 до 4%, или от 0,05 до приблизительно 3%, или от 0,05 до приблизительно 2%,

xxxix) уровень стеариноновой кислоты (СДК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 3, от приблизительно



0,05 до приблизительно 7%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 4%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3%, или от 0,05 до приблизительно 2%,

x1) уровень эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 1, менее чем приблизительно 0,5%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 5%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 4%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3% или от приблизительно 0,05 до приблизительно 2%,

x1i) уровень эйкозатриеновой кислоты (ЭТрК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 2, менее чем приблизительно 1%, от 0,05 до 4%, от 0,05 до 3%, или от 0,05 до приблизительно 2%, или от 0,05 до приблизительно 1%,

x1ii) уровень эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2%, от 0,05 до 10%, от 0,05 до 5%, или от 0,05 до приблизительно 3%, или от 0,05 до приблизительно 2%,

x1iii) уровень докозапентаеновой кислоты (ДПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2%, от 0,05 до 8%, от 0,05 до 5%, или от 0,05 до приблизительно 3%, или от 0,05 до приблизительно 2%,

x1iv) уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18%, от приблизительно 8 до 20%, от приблизительно 10 до 20%, от приблизительно 11 до 20%, от приблизительно 10 до приблизительно 16% или от приблизительно 14 до 20%,

x1v) липид содержит  $\omega$ 6-докозапентаеновую кислоту ( $22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ ) в числе содержащихся в нем жирных кислот,

x1vi) липид по существу не содержит  $\omega$ 6-докозапентаеновой кислоты ( $22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ ) в числе содержащихся в нем жирных кислот,

x1vii) липид по существу не содержит СДК, ЭПК и ЭТК в числе содержащихся в нем жирных кислот,

x1viii) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 20% или от приблизительно 6 до приблизительно 20%,

x1ix) уровень общих мононенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35%, от приблизительно 8 до приблизительно 25% или от 8 до приблизительно 22%,

1) уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 20 до приблизительно 75%, от приблизительно 50 до приблизительно 75% или от приблизительно 60 до приблизительно 75%,

1i) уровень общих  $\omega$ 6 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 35 до приблизительно 50%, от приблизительно 20 до приблизительно 35%, от приблизительно 6 до 20%, менее чем 20, менее чем приблизительно 16, менее чем приблизительно 10, от приблизительно 1 до приблизительно 16%, от приблизительно 2 до приблизительно 10% или от приблизительно 4 до приблизительно 10%,

1ii) уровень новых  $\omega$ 6 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 10, менее чем приблизительно 8, менее чем приблизительно 6, менее 4%, от приблизительно 1 до приблизительно 20%, от приблизительно 1 до приблизительно 10%, от приблизительно 0,5 до приблизительно 8% или от приблизительно 0,5 до 4%,

1iii) уровень общих  $\omega$ 3 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 36 до приблизительно 65%, от 40 до приблизительно 60%, от приблизительно 20 до приблизительно 35%, от приблизительно 10 до приблизительно 20%, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35 или приблизительно 40%,

1iv) уровень новых  $\omega$ 3 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 9 до приблизительно 33%, от приблизительно 10 до приблизительно 20%, от приблизительно 20 до приблизительно 30%, от приблизительно 12 до приблизительно 25%, приблизительно 13, приблизительно 15, приблизительно 17 или приблизительно 20%,

1v) соотношение общих  $\omega$ 6 жирных кислот:общих  $\omega$ 3 жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5, менее чем приблизительно 0,50, менее чем приблизительно 0,40, менее чем приблизительно 0,30, менее чем приблизительно 0,20, менее чем приблизительно 0,15, приблизительно 1,0, приблизительно 0,1 или приблизительно 0,2,

1vi) соотношение новых  $\omega$ 6 жирных кислот:новых  $\omega$ 3 жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 1,0 до приблизительно 3,0, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5, менее чем приблизительно 0,50,

менее чем приблизительно 0,40, менее чем приблизительно 0,30, менее чем приблизительно 0,20, менее чем приблизительно 0,15, приблизительно 0,1, приблизительно 0,2 или приблизительно 1,0,

1vii) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения олеиновой кислоты в ДГК по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, от приблизительно 10 до приблизительно 50%, от приблизительно 10 до приблизительно 30% или от приблизительно 10 до приблизительно 25%,

1viii) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения ЛК в ДГК по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 25%, от приблизительно 15 до приблизительно 50%, от приблизительно 20 до приблизительно 40% или от приблизительно 20 до приблизительно 30%,

1ix) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения АЛК в ДГК по меньшей мере приблизительно 17, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 24%, от приблизительно 17 до приблизительно 55%, от приблизительно 22 до приблизительно 35% или от приблизительно 24 до приблизительно 35%,

1x) общие жирные кислоты в экстрагированном липиде содержат менее 1% C20:1,

1xi) содержание триацилглицерола (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере 95%, от приблизительно 70 до приблизительно 99% или от приблизительно 90 до приблизительно 99%,

1xii) липид содержит диацилглицерол (ДАГ),

1xiii) липид содержит менее чем приблизительно 10, менее чем приблизительно 5, менее чем приблизительно 1% или от приблизительно 0,001 до приблизительно 5% свободных (неэтерифицированных) жирных кислот и/или фосфолипида, или по существу не содержит их,

1xiv) по меньшей мере 80% этерифицированной ДГК в форме ТАГ находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ,

1xv) наиболее распространенными ДГК-содержащими видами ТАГ в липиде являются ДГК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12) и

1xvi) липид содержит три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18).

С особым вниманием к упомянутому выше аспекту в варианте реализации применяют одно или более или все из следующего:

i) липид находится в форме масла, причем масло содержит один или более стеролов, например один или более или все из кампэстера,  $\Delta^5$ -стигмастера, эбурикола,  $\beta$ -ситостерола,  $\Delta^5$ -авенастера,  $\Delta^7$ -стигмастера и  $\Delta^7$ -авенастера, и масло необязательно содержит менее 10 мг стеролов/г масла и/или масло в существенной степени не содержит холестерина,

ii) липид находится в форме масла из семени масличной культуры, такого как семя масличной культуры, представляющее собой семя вида Brassica или семя рапса,

iii) уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6%, или составляет от 7 до 20%.

В дальнейшем аспекте настоящего изобретения раскрывается химерная генетическая конструкция, содержащая в указанном порядке первый ген, второй ген, третий ген, четвертый ген, пятый ген и шестой ген, все из которых ковалентно соединены в единой молекуле ДНК, причем первый, второй и третий гены объединены как первый кластер генов, и четвертый, пятый и шестой гены объединены как второй кластер генов, притом, что каждый ген содержит промотор, кодирующий участок и терминатор транскрипции и/или участок полиаденилирования таким образом, что каждый промотор функционально связан с кодирующим участком и терминатором транскрипции и/или участком полиаденилирования, при этом каждый промотор независимо идентичен или отличается от других промоторов таким образом, что молекула ДНК содержит три, четыре, пять или шесть различных промоторов, причем один или более или все промоторы являются гетерологичными относительно кодирующего участка, с которым они функционально связаны, притом, что направление транскрипции первого гена идет от третьего гена и противоположно направлению транскрипции третьего гена, при этом, направление транскрипции четвертого гена идет от шестого гена и противоположно направлению транскрипции шестого гена, причем направление транскрипции второго гена такое же, как и первого гена или третьего гена, притом, что направление транскрипции пятого гена такое же, как и четвертого гена или шестого гена, при этом, терминатор транскрипции и/или участок полиаденилирования второго гена отделен от промотора первого или третьего гена, в зависимости от того, какой из них ближе, первым участком распорки размером от приблизительно 0,2 до приблизительно 3,0 тысяч оснований, причем первый кластер генов отделен от второго кластера генов вторым участком распорки размером от приблизительно 1,0 до приблизительно 10,0 тысяч оснований, и при этом терминатор транскрипции и/или участок полиаденилирования пятого гена отделен от промотора четвертого или шестого гена, в зависимости от того, какой из них ближе, третьим участком распорки размером от приблизительно 0,2 до приблизительно 3,0 тысяч оснований,

В варианте реализации молекула ДНК содержит седьмой ген, который отделен от первого кластера

генов или второго кластера генов, в зависимости от того, какой из них ближе, участком распорки размером от приблизительно 1,0 до приблизительно 10,0 тысяч оснований.

В другом варианте реализации молекула ДНК содержит два или более различных терминаторов транскрипции и/или участков полиаденилирования.

Еще в одном варианте реализации по меньшей мере один из участков распорки содержит участок прикрепления к матриксу (УПМ).

В дальнейшем варианте реализации молекула ДНК содержит правые и левые участки границы, фланкирующие гены, и представляет собой молекулу Т-ДНК.

В другом варианте реализации генетическая конструкция находится в клетке *Agrobacterium* или интегрирована в геном клетки растения.

В предпочтительном варианте реализации по меньшей мере один из генов кодирует десатуразу жирных кислот или элонгазу жирных кислот.

В другом варианте реализации генетическая конструкция содержит гены, кодирующие набор ферментов, как определяется в настоящем документе, и/или один или более генов кодируют фермент, как определяется в настоящем документе.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается выделенный и/или экзогенный полинуклеотид, содержащий:

i) последовательность нуклеотидов, выбранную как любая из SEQ ID NO: 1-9, 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 или 45, и/или

ii) последовательность нуклеотидов, по меньшей мере на 95% идентичную или на 99% идентичную одной или более последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-9, 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 или 45.

В особенно предпочтительном варианте реализации выделенный и/или экзогенный полинуклеотид содержит:

i) последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 2 и/или

ii) последовательность нуклеотидов, по меньшей мере на 95% идентичную или на 99% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается вектор или генетическая конструкция, содержащая полинуклеотид по изобретению и/или генетическую конструкцию по изобретению.

В варианте реализации последовательность нуклеотидов, выбранная как любая из SEQ ID NO: 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 или 45, или последовательность нуклеотидов, по меньшей мере на 95% идентичная или на 99% идентичная одной или более последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 или 45, функционально связана с промотором.

В еще одном аспекте настоящего изобретения раскрывается клетка-хозяин, содержащая экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

i)  $\omega$ 3-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 4-десатураза,  $\Delta$ 6-элонгаза и  $\Delta$ 5-элонгаза,

ii)  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 4-десатураза,  $\Delta$ 6-элонгаза и  $\Delta$ 5-элонгаза,

iii)  $\Delta$ 12-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 4-десатураза,  $\Delta$ 6-элонгаза и  $\Delta$ 5-элонгаза,

iv)  $\Delta$ 12-десатураза,  $\omega$ 3-десатураза или  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 6-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 4-десатураза,  $\Delta$ 6-элонгаза и  $\Delta$ 5-элонгаза,

v)  $\omega$ 3-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 4-десатураза,  $\Delta$ 9-элонгаза и  $\Delta$ 5-элонгаза,

vi)  $\Delta$ 15-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 4-десатураза,  $\Delta$ 9-элонгаза и  $\Delta$ 5-элонгаза,

vii)  $\Delta$ 12-десатураза,  $\Delta$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 4-десатураза,  $\Delta$ 9-элонгаза и  $\Delta$ 5-элонгаза или

viii)  $\Delta$ 12-десатураза,  $\omega$ 3-десатураза или  $\Delta$ 15-десатураза,  $\lambda$ 8-десатураза,  $\Delta$ 5-десатураза,  $\Delta$ 4-десатураза,  $\lambda$ 9-элонгаза и  $\Delta$ 5-элонгаза,

и при этом каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторов, которые способны направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в клетке.

В варианте реализации клетка содержит липид, как определяется выше, или в ней одна или более или все десатуразы или элонгазы обладают одним или более признаков, как определяется выше.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается клетка-хозяин, содержащая:

i) первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий  $\Delta$ 12-десатуразу, которая содержит аминокислоты с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10, ее биологически активный фрагмент или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 10, и

ii) второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий  $\omega$ 3-десатуразу, которая содержит аминокислоты с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12,

ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 12,

причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторов, способных направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в клетке.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается клетка-хозяин, содержащая один или больше полинуклеотидов по изобретению, генетическую конструкцию по изобретению, или вектор или

генетическую конструкцию изобретения.

В варианте реализации клетка находится в растении, в части растения и/или представляет собой клетку зрелого семени растения.

В варианте реализации растение или семя растения представляет собой растение масличной культуры или семя масличной культуры соответственно.

Также раскрыт трансгенный организм, не принадлежащий к человеческому роду, который содержит клетку по изобретению. Предпочтительно трансгенный организм, не принадлежащий к человеческому роду, представляет собой трансгенное растение, предпочтительно растение масличной культуры или *Arabidopsis thaliana*. В варианте реализации растение представляет собой растение Brassica, предпочтительно *B. napus* или *B. juncea*, или растение, не являющееся *Arabidopsis thaliana*.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается растение масличной культуры, содержащее:

- а) липид в его семени, причем липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, и
- б) экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

i)  $\Delta 12$ -десатураза, грибковая  $\omega 3$ -десатураза и/или грибковая  $\lambda 15$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 6$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза, или

ii)  $\Delta 12$ -десатураза, грибковая  $\omega 3$ -десатураза и/или грибковая  $\Delta 15$ -десатураза,  $\lambda 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\lambda 9$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза,

притом, что каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более специфичными для семян промоторами, которые способны направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в развивающемся семени растения, и при этом жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту,  $\omega 6$  жирные кислоты, включающие линолевую кислоту (ЛК) и  $\gamma$ -линоленовую кислоту (ГЛК),  $\omega 3$  жирные кислоты, которые включают  $\alpha$ -линоленовую кислоту (АЛК), стеарионовую кислоту (СДК), докозапентаеновую кислоту (ДПК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), и необязательно эйкозапентаеновую кислоту (ЭПК) и/или эйкозатетраеновую кислоту (ЭТК), причем уровень ДГК в общем содержании жирных кислот липида составляет приблизительно 7-20%.

Примеры растений масличной культуры включают, без ограничения, вид Brassica, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, вид Helianthus, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, вид Trifolium, *Elaeagnus guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa* или *Crambe abyssinica*. В варианте реализации растение масличной культуры представляет собой рапс, *Glycine max*, растение *Camelina sativa* или *Arabidopsis thaliana*. В альтернативном варианте реализации растение масличной культуры представляет собой растение, не являющееся *A. thaliana*.

В варианте реализации одна или более десатураз способны использовать субстрат ацил-КоА. В предпочтительном варианте реализации одна или более из  $\Delta 6$ -десатуразы,  $\Delta 5$ -десатуразы,  $\Delta 4$ -десатуразы и  $\Delta 8$ -десатуразы, если они присутствуют, способны использовать субстрат ацил-КоА, предпочтительно каждая из i)  $\Delta 6$ -десатуразы,  $\Delta 5$ -десатуразы и  $\Delta 4$ -десатуразы или ii)  $\Delta 5$ -десатуразы,  $\Delta 4$ -десатуразы и  $\Delta 8$ -десатуразы способна использовать субстрат ацил-КоА. В варианте реализации  $\Delta 12$ -десатураза и/или  $\omega 3$ -десатураза способны использовать субстрат ацил-КоА. Субстрат ацил-КоА предпочтительно представляет собой АЛК-КоА, ЭТК-КоА, ДПК-КоА, ЭТрК-КоА, ЛК-КоА, ГЛК-КоА или АРК-КоА.

В варианте реализации зрелое, собранное в процессе сбора урожая семя растения содержит ДГК в количестве по меньшей мере около 28 мг на 1 г семени, предпочтительно по меньшей мере около 32 мг на 1 г семени, по меньшей мере около 36 мг на 1 г семени, по меньшей мере около 40 мг на 1 г семени, более предпочтительно по меньшей мере около 44 мг на 1 г семени или по меньшей мере около 48 мг на 1 г семени. Максимальное содержание ДГК может составлять от приблизительно 80 до приблизительно 100 мг на 1 г семени, или приблизительно 80 мг или приблизительно 100 мг на 1 г семени.

В дальнейшем аспекте настоящего изобретения раскрывается растение Brassica napus, *B. juncea* или *Camelina sativa*, которое способно давать семя, содержащее ДГК, причем собранное в процессе сбора урожая, зрелое семя растения содержит ДГК в количестве по меньшей мере около 28 мг на 1 г семени, предпочтительно по меньшей мере около 32 мг на 1 г семени, по меньшей мере около 36 мг на 1 г семени, по меньшей мере около 40 мг на 1 г семени, более предпочтительно по меньшей мере около 44 мг на 1 г семени, или по меньшей мере около 48 мг на 1 г семени. Максимальное содержание ДГК может составлять от приблизительно 80 до приблизительно 100 мг на 1 г семени, или приблизительно 80 мг или приблизительно 100 мг на 1 г семени.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается клетка растения по изобретению, содержащая экзогенные полинуклеотиды.

Также раскрыта часть растения, предпочтительно семя, которая обладает одним или более из следующих признаков:

- i) получена из растения по изобретению,
- ii) содержит липид, раскрытый в настоящем документе,
- iii) может использоваться в способе по изобретению,

- iv) содержит генетическую конструкцию по изобретению или
- v) содержит набор экзогенных полинуклеотидов, как определено в настоящем документе.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения раскрывается зрелое, собранное в процессе сбора урожая семя *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa*, содержащее ДГК, с содержанием влаги от приблизительно 4 до приблизительно 15 мас.%, причем содержание ДГК в семени составляет по меньшей мере около 28 мг на 1 г семени, предпочтительно по меньшей мере около 32 мг на 1 г семени, по меньшей мере около 36 мг на 1 г семени, по меньшей мере около 40 мг на 1 г семени, более предпочтительно по меньшей мере около 44 мг на 1 г семени или по меньшей мере около 48 мг на 1 г семени. Максимальное содержание ДГК может составлять от приблизительно 80 до приблизительно 100 мг на 1 г семени, или приблизительно 80 мг, или приблизительно 100 мг на 1 г семени.

В варианте реализации клетка по изобретению, трансгенный организм по изобретению, растение масличной культуры по изобретению, растение *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa* по изобретению, часть растения по изобретению или семя по изобретению, которые могут применяться для получения экстрагированного липида, обладающего одним или более или всеми признаками, определенными в настоящем документе.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения раскрывается способ получения клетки по изобретению, включающий:

- а) введение в клетку, предпочтительно клетку, которая не способна к синтезу ДЦ-ПНЖК, генной конструкции по изобретению, выделенного и/или экзогенного полинуклеотида по изобретению, вектора или генетической конструкции по изобретению, одной или более комбинаций экзогенных полинуклеотидов, определенных в настоящем документе,
- б) необязательно экспрессию генов или полинуклеотида(ов) в клетке;
- в) необязательно анализ состава жирных кислот в клетке и
- г) необязательно селекцию клетки, которая экспрессирует гены или полинуклеотид(ы).

В варианте реализации липид в клетке обладает одним или более признаков, определенных в настоящем документе.

В другом варианте реализации генетическая конструкция, выделенный и/или экзогенный полинуклеотид, вектор, генетическая конструкция или комбинация экзогенных полинуклеотидов становятся стабильно интегрированными в геном клетки.

В другом варианте реализации клетка представляет собой клетку растения, и способ дополнительно включает стадию регенерации трансформированного растения из клетки со стадии а).

В другом варианте реализации гены и/или экзогенный полинуклеотид(ы) временно экспрессируются в клетке.

Также раскрыта клетка, полученная с применением способа по изобретению.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ получения семени, включающий:

- а) выращивание растения по изобретению или растения, которое образует часть, раскрытую в настоящем документе, предпочтительно в поле как часть популяции размером по меньшей мере 1000 таких растений или на площади по меньшей мере 1 га, насаженных со стандартной плотностью насаждения,
- б) сбор урожая семени с растения или растений и
- в) необязательно, экстракцию липида из семени предпочтительно с получением масла с общим выходом ДГК по меньшей мере 60 кг ДГК/га.

В варианте реализации растение, клетка растения, часть растения или семя по изобретению обладает одним или более из следующих признаков: i) масло является таким, как раскрыто в настоящем документе, ii) часть растения или семя могут применяться в способе по изобретению, iii) экзогенные полинуклеотиды введены в генетическую конструкцию по изобретению, iv) экзогенные полинуклеотиды включают экзогенный полинуклеотид по изобретению, v) клетка растения представляет собой клетку по изобретению и vi) семя получено в соответствии со способом по изобретению. В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ получения одной или более десатурат жирных кислот и/или элонгаз жирных кислот, или одной или более десатурат жирных кислот и одной или более элонгаз жирных кислот, причем указанный способ включает экспрессию в клетке или неклеточной системе экспрессии генетической конструкции по изобретению, выделенный и/или экзогенный полинуклеотид по изобретению, вектор или генетическую конструкцию по изобретению, одну или более комбинаций экзогенных полинуклеотидов, раскрытых в настоящем документе, предпочтительно в развивающемся семени масличной культуры в растении масличной культуры в поле.

В дальнейшем аспекте настоящего изобретения раскрывается липид или масло, продуцированные или полученные, с применением способа по изобретению, из клетки по изобретению, трансгенного организма по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению или растения, клетки растения, части растения или семени по изобретению.

В варианте реализации липид или масло получены экстракцией масла из масличной культуры. Примеры масла из масличных культур включают, без ограничения, масло рапса (*Brassica napus*, подвид *Brassica rapa*), горчичное масло (*Brassica juncea*), масло другого вида *Brassica*, масло подсолнечника (*He-*

lianthus annus), льняное масло (*Linum usitatissimum*), соевое масло (*Glycine max*), сафлоровое масло (*Carthamus tinctorius*), кукурузное масло (*Zea mays*), масло табака (*Nicotiana tabacum*), арахисовое масло (*Arachis hypogaea*), пальмовое масло, хлопковое масло (*Gossypium hirsutum*), кокосовое масло (*Cocos nucifera*), масло авокадо (*Persea americana*), оливковое масло (*Olea europaea*), масло кэшью (*Anacardium occidentale*), масло макадамии (*Macadamia intergrifolia*), миндальное масло (*Prunus amygdalus*) или масло семени *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*).

В дальнейшем аспекте настоящего изобретения раскрывается жирная кислота, продуцированная или полученная с применением способа по изобретению из клетки по изобретению, трансгенного организма по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению, или растения, клетки растения, части растения или семени по изобретению. Предпочтительно жирная кислота представляет собой ДГК. Жирная кислота может находиться в смеси жирных кислот, состав жирных кислот в которой является таким, как описано в настоящем документе. В варианте реализации жирная кислота является неэтерифицированной.

Также раскрывается жмых, полученный из семени по изобретению. Предпочтительный жмых включает, не обязательно ограничиваясь ими, жмых *Brassica napus*, *B. juncea*, *Camelina sativa* или *Glycine max*. В варианте реализации жмых содержит экзогенный полинуклеотид(ы) и/или генетические конструкции, как раскрыто в настоящем документе.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается композиция, содержащая одно или более из липида или масла по изобретению, жирной кислоты по изобретению, генетической конструкции по изобретению, выделенного и/или экзогенного полинуклеотида по изобретению, вектора или генетической конструкции по изобретению, клетки по изобретению, трансгенного организма по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению, растения, растительной клетки, части растения или семени по изобретению или жмыха по изобретению. В вариантах реализации композиция содержит носитель, подходящий для фармацевтического, пищевого или сельскохозяйственного применения, соединение для обработки семени, удобрение, другой пищевой продукт или питательный ингредиент, или дополнительный белок или витамины.

Также раскрыты корма, косметика или химические вещества, содержащие одно или более из липида или масла по изобретению, жирной кислоты по изобретению, генетической конструкции по изобретению, выделенного и/или экзогенного полинуклеотида по изобретению, вектора или генетической конструкции по изобретению, клетки по изобретению, трансгенного организма по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению, растения растительной клетки, части растения или семени по изобретению, жмыха по изобретению или композиции по изобретению.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ получения корма, включающий смешивание одного или более из липида или масла по изобретению, жирной кислоты по изобретению, генетической конструкции по изобретению, выделенного и/или экзогенного полинуклеотида по изобретению, вектора или генетической конструкции по изобретению, клетки по изобретению, трансгенного организма по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению, растения, растительной клетки, части растения или семени по изобретению, жмыха по изобретению или композиции по изобретению, по меньшей мере с еще одним питательным ингредиентом.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ лечения или предупреждения состояния, при котором ПНЖК оказывают благоприятное воздействие, причем указанный способ включает введение субъекту одного или более из липида или масла по изобретению, жирной кислоты по изобретению, генетической конструкции по изобретению, выделенного и/или экзогенного полинуклеотида по изобретению, вектора или генетической конструкции по изобретению, клетки по изобретению, трансгенного организма по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению, растения, растительной клетки, части растения или семени по изобретению, жмыха по изобретению, композиции по изобретению или корма по изобретению.

Примеры состояний, при которых ПНЖК оказывают благоприятное воздействие, включают, без ограничения, сердечную аритмию, ангиопластику, воспаление, астму, псориаз, остеопороз, камни в почках, СПИД, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, болезнь Крона, шизофрению, рак, плодный алкогольный синдром, синдром гиперактивности и дефицита внимания, муковисцидоз, фенилкетонурию, униполярную депрессию, агрессивную враждебность, аденолейкодистрофию, заболевание коронарных сосудов сердца, гипертензию, диабет, ожирение, болезнь Альцгеймера, хроническое обструктивное заболевание легких, язвенный колит, рестеноз после ангиопластики, экзему, гипертонию, агрегацию тромбоцитов, желудочно-кишечное кровотечение, эндометриоз, предменструальный синдром, миалгический энцефаломиелит, хроническую усталость после вирусных инфекций или заболевание глаз.

Также раскрыто применение одного или более из липида или масла по изобретению, жирной кисло-

ты по изобретению, генетической конструкции по изобретению, выделенного и/или экзогенного полинуклеотида по изобретению, вектора или генетической конструкции по изобретению, клетки по изобретению, трансгенного организма по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению, растения, растительной клетки, части растения или семени по изобретению, жмыха по изобретению, композиции по изобретению или корма по изобретению для производства лекарственного средства для лечения или предупреждения состояния, при котором ПНЖК оказывают благоприятное воздействие. Получение лекарственного средства может включать смешивание масла по изобретению с фармацевтически приемлемым носителем, с целью лечения состояния, раскрытого в настоящем документе. Способ может включать, во-первых, очистку и/или перэтерификацию масла, и/или фракционирование масла, с целью повышения уровня ДГК. В конкретном варианте реализации способ включает обработку липида или масла, например масла рапса, с целью превращения жирных кислот в масле в алкиловые эфиры, например метиловые или этиловые эфиры. Дальнейшая обработка, например фракционирование или дистилляция, может применяться для обогащения липида или масла ДГК. В предпочтительном варианте реализации лекарственное средство содержит этиловые эфиры ДГК. В еще более предпочтительном варианте реализации уровень этиловых эфиров ДГК в лекарственном средстве составляет от 30 до 50%. Лекарственное средство может дополнительно содержать этиловые эфиры ЭПК, например, от 30 до 50% от общего содержания жирных кислот в лекарственном средстве. Такие лекарственные средства пригодны для введения субъектам-людям или животным при лечении медицинских состояний, как раскрыто в настоящем документе.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ торговли семенем, включающий получение семени по изобретению и торговли полученным семенем с получением денежной выгоды.

В варианте реализации получение семени включает культивацию растений по изобретению и/или сбор урожая семени с растений.

В другом варианте реализации получение семени дополнительно включает помещение семени в емкость и/или хранение семени.

В дальнейшем варианте реализации получение семени дополнительно включает перевозку семени в другое место.

Еще в одном варианте реализации способ дополнительно включает перевозку семени в другое место после продажи семени.

В дальнейшем варианте реализации торговля осуществляется с использованием электронных средств, например компьютера.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения раскрывается способ получения бункеров с семенем, включающий:

а) валкование, рядковое компостирование и/или жатву наземных частей растений, содержащих семя по изобретению,

б) молотьбу и/или веяние частей растений, с отделением семени от остатка частей растения, и

в) просеивание и/или сортировку семени, отделенного на стадии б), и загрузку просеянного и/или сортированного семени в бункеры, с получением таким образом бункеров с семенем.

В варианте реализации, если это уместно, липид или масло, предпочтительно масло из семян, по изобретению или пригодные в соответствии с изобретением содержат приблизительно такие уровни жира, как раскрыто в таблице в разделе примеров, например семя 14 из табл. 16.

Любой вариант реализации в настоящем документе следует интерпретировать как применимый, с соответствующими поправками, к любому другому варианту, если конкретно не указано иное.

Контекст настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами, раскрытыми в настоящем документе, которые приведены только с целью иллюстрации. Функционально эквивалентные продукты, композиции и способы очевидно находятся в пределах контекста изобретения, раскрытого в настоящем документе.

В настоящем документе, если конкретно не указано иное или из контекста очевидно не следует иное, ссылка на единственную стадию, композицию вещества, группу стадий или группу композиций вещества должна быть интерпретирована как включающая единственное и множественное число (т.е. одна или более) таких стадий, композиций вещества, групп стадий или групп композиций вещества.

Изобретение дополнительно раскрыто посредством следующих не ограничивающих примеров со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1 - аэробные пути биосинтеза ДГК.

Фиг. 2 - карта участка вставки Т-ДНК от левой до правой границ rJP3416-GA7. RB обозначает правую границу; LB, левая граница; TER, участок терминатора транскрипции/полиаденилирования; PRO, промотор; кодирующие участки показаны над стрелками, промоторы и терминаторы - под стрелками. Мисри-Δ6D, Δ6-десатураза *Micromonas pusilla*; Ругсо-Δ6Е, Δ6-элонгаза *Ryamimonas cordata*; Pavsa-Δ5D, Δ5-десатураза *Pavlova salina*; Писра-ω3D, ω3-десатураза *Pichia pastoris*; Pavsa-Δ4D, Δ4-десатураза *P. salina*;

Lack1-Δ12D, Δ12-десатураза *Lachancea kluyveri*; Pyc5-Δ5E, Δ5-элонгаза *Pyramimonas cordata*. NOS обозначает участок терминатора транскрипции/полиаденилирования нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens*; FP1, укороченный промотор напина *Brassica napus*; FAE1, промотор *Arabidopsis thaliana* FAE1; Lec1in, участок терминатора транскрипции/полиаденилирования лектина *Glycine max*; Cnl1 и Cnl2 обозначает промотор или терминатор конлинина 1 или конлинина 2 *Linum usitatissimum*. УПМ обозначает участок прикрепления к матриксу Rb7 из *Nicotiana tabacum*.

Фиг. 3 - карта участка вставки Т-ДНК от левой до правой границы rJP3404. Обозначения такие же, как на фиг. 2.

Фиг. 4 - карта участка вставки от левой до правой границы rJP3367. Обозначения такие же, как на фиг. 2.

Фиг. 5 - уровни ДГК как процент общих жирных кислот в липиде семени нескольких независимых трансгенных зерен *Arabidopsis thaliana* в поколениях T<sub>2</sub> и T<sub>3</sub>. Заключенные в скобки события T<sub>2</sub> были взяты для T<sub>3</sub>. Проиллюстрированы события из мутантного генетического окружения *A. thaliana* Columbia и fad2.

Фиг. 6 - содержание масла (мас./мас.) против содержания ДГК, как процент от общего содержания жирных кислот липида из трансгенных зерен *Arabidopsis thaliana*.

Фиг. 7 - характерный ОТ-ПЦР гель, иллюстрирующий низкую экспрессию гена Δ6-десатуразы относительно других трансгенов в Т-ДНК зародышей *B. napus*, трансформированных с использованием rJP3416-GA7. Дорожки слева иллюстрируют продукты ОТ-ПЦР: 1, ДНК маркеры размера; дорожка 2, Δ12-десатураза; дорожка 3, ω3-десатураза; дорожка 4, Δ6-десатураза (низкая экспрессия); дорожка 5, Δ6-элонгаза; дорожка 6, Δ5-десатураза; дорожка 7, Δ5-элонгаза; дорожка 8, Δ4-десатураза.

Фиг. 8 - процент АЛК, нанесенный на график против процента олеиновой кислоты, каждый как процент общих жирных кислот в липиде, полученном из трансгенных 35S:LEC2 соматических эмбрионов *Brassica napus*.

Фиг. 9 - позиционный анализ распределения ЯМР на А) жире тунца и В) масле трансгенных зерен ДГК *Arabidopsis*. Пики, обозначенные "ДГК-альфа", представляют количество ДГК, присутствующей в положениях sn-1 и sn-3 ТАГ (без позиционного предпочтения это равнялось бы 66% от общей ДГК), тогда как пики, обозначенные "ДГК-бета", представляют количество ДГК, присутствующей в положении sn-2 ТАГ (без предпочтения это равнялось бы 33% ДГК).

Фиг. 10 - анализ методом ЖХ-МС основных ДГК-содержащих разновидностей триацилглицеролов в трансгенных развивающихся (серые) и зрелых (черные) семенах *A. thaliana*. Число, следующее за ДГК, обозначает общее количество атомов углерода и общее количество двойных связей в двух других жирных кислотах. Таким образом, ДГК/34:1 может также быть обозначен как ТАГ 56:7 и т.п.

Фиг. 11 - карта участка вставки Т-ДНК от левой до правой границы pORE04+HABGBEC\_Cowpea\_EPA\_insert. Обозначения такие же, как на фиг. 2. SSU, промотор маленькой субъединицы рубиско *Arabidopsis thaliana*.

Фиг. 12 - карта бинарного вектора rJP3364, иллюстрирующая рестрикционный сайт NotI, в который были клонированы Δ12-десатуразы-кандидаты.

Фиг. 13 - коробчатая диаграмма, сгенерированная с использованием SigmaPlot и иллюстрирующая процент жирной кислоты 20:4ω6 (АРК) в липиде семени из популяций семян T2 *Arabidopsis*, трансформированных rFN045-rFN050. Граница каждого прямоугольника, ближайшая к нулю, указывает на 25-й процент, линия в пределах каждого прямоугольника обозначает медиану, и граница каждого прямоугольника, наиболее далекая от нуля, указывает на 75-й процент. Столбики ошибки, приведенные выше и ниже каждого прямоугольника, указывают на 90-й и 10-й проценты.

Фиг. 14 - средний уровень АРК как процент от общего содержания жирных кислот в липиде семени из семени T2 *Arabidopsis*, трансформированного rFN045-rFN050.

Фиг. 15 - коробчатая диаграмма, иллюстрирующая процент жирной кислоты 20:2ω6 (ЭДК) в липиде семени из популяций семени T2 *Arabidopsis*, трансформированных rFN045-rFN050. Коробчатая диаграмма представляет значения, как определено на фиг. 13.

Фиг. 16 - коробчатая диаграмма, иллюстрирующая процент АРК в липиде семени из популяций семени T4 *Arabidopsis*, трансформированных rFN045-rFN050. Коробчатая диаграмма представляет значения, как определено на фиг. 13.

Фиг. 17 - средний уровень АРК как процент от общего содержания жирных кислот в липиде семени из популяций семени T4 *Arabidopsis*, трансформированных rFN045-rFN050.

Фиг. 18 - коробчатая диаграмма, иллюстрирующая процент ЭДК в липиде семени из популяций семени *Arabidopsis* T4, трансформированных rFN045-rFN050. Коробчатая диаграмма представляет значения, как определено на фиг. 13.

Фиг. 19(A) - основная структура фитостерина с кольцом и нумерацией боковой цепи. (B) - химические структуры некоторых фитостеринов.

Фиг. 20 - филогенетическое дерево известных ЛФКАТ (LPAAT).

Фиг. 21 - различные ферменты обмена ацила, которые переносят жирные кислоты между ФХ, пу-



лами КоА и пулами ТАГ. Адаптировано из Singh et al. (2005).

#### Ключ к перечню последовательностей

- SEQ ID NO: 1 - последовательность нуклеотидов pJP3416-GA7.  
 SEQ ID NO: 2 - последовательность нуклеотидов pGA7-mod\_B.  
 SEQ ID NO: 3 - последовательность нуклеотидов pGA7-mod\_C.  
 SEQ ID NO: 4 - последовательность нуклеотидов pGA7-mod\_D.  
 SEQ ID NO: 5 - последовательность нуклеотидов pGA7-mod\_E.  
 SEQ ID NO: 6 - последовательность нуклеотидов pGA7-mod\_F.  
 SEQ ID NO: 7 - последовательность нуклеотидов pGA7-mod\_G.  
 SEQ ID NO: 8 - последовательность нуклеотидов pORE04+ 11ABGBEC\_Cowpea\_EPA\_insert.  
 SEQ ID NO: 9 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 12-десатуразы *Lachancea kluyveri* в растениях.  
 SEQ ID NO: 10 -  $\Delta$ 12-десатураза *Lachancea kluyveri*.  
 SEQ ID NO: 11 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\omega$ 3-десатуразы *Pichia pastoris* в растениях.  
 SEQ ID NO: 12 -  $\omega$ 3-десатураза *Pichia pastoris*.  
 SEQ ID NO: 13 - открытая рамка считывания, кодирующая  $\Delta$ 6-десатуразу *Micromonas pusilla*.  
 SEQ ID NO: 14 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 6-десатуразы *Micromonas pusilla* в растениях (версия 1).  
 SEQ ID NO: 15 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 6-десатуразы *Micromonas pusilla* в растениях (версия 2).  
 SEQ ID NO: 16 -  $\Delta$ 6-десатураза *Micromonas pusilla*.  
 SEQ ID NO: 17 - открытая рамка считывания, кодирующая  $\Delta$ 6-десатуразу *Ostreococcus lucimarinus*.  
 SEQ ID NO: 18 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 6-десатуразы *Ostreococcus lucimarinus* в растениях.  
 SEQ ID NO: 19 -  $\Delta$ 6-десатураза *Ostreococcus lucimarinus*.  
 SEQ ID NO: 20 -  $\Delta$ 6-десатураза *Ostreococcus tauri*.  
 SEQ ID NO: 21 - открытая рамка считывания, кодирующая  $\Delta$ 6-элонгазу *Pyramimonas cordata*.  
 SEQ ID NO: 22 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 6-элонгазы *Pyramimonas cordata* в растениях (укороченная на 3'-конце и кодирующая функциональную элонгазу) (версия 1).  
 SEQ ID NO: 23 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 6-элонгазы *Pyramimonas cordata* в растениях (укороченная на 3'-конце и кодирующая функциональную элонгазу) (версия 2).  
 SEQ ID NO: 24 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 6-элонгазы *Pyramimonas cordata* в растениях (укороченная на 3'-конце и кодирующая функциональную элонгазу) (версия 3).  
 SEQ ID NO: 25 -  $\Delta$ 6-элонгаза *Pyramimonas cordata*.  
 SEQ ID NO: 26 - укороченная  $\Delta$ 6-элонгаза *Pyramimonas cordata*.  
 SEQ ID NO: 27 - открытая рамка считывания, кодирующая  $\Delta$ 5-десатуразу *Pavlova salina*.  
 SEQ ID NO: 28 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 5-десатуразы *Pavlova salina* в растениях (версия 1).  
 SEQ ID NO: 29 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 5-десатуразы *Pavlova salina* в растениях (версия 2).  
 SEQ ID NO: 30 -  $\Delta$ 5-десатураза *Pavlova salina*.  
 SEQ ID NO: 31 - открытая рамка считывания, кодирующая  $\Delta$ 5-десатуразу *Pyramimonas cordata*.  
 SEQ ID NO: 32 -  $\Delta$ 5-десатураза *Pyramimonas cordata*.  
 SEQ ID NO: 33 - открытая рамка считывания, кодирующая  $\Delta$ 5-элонгазу *Pyramimonas cordata*.  
 SEQ ID NO: 34 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 5-элонгазы *Pyramimonas cordata* в растениях (версия 1).  
 SEQ ID NO: 35 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 5-элонгазы *Pyramimonas cordata* в растениях (версия 2).  
 SEQ ID NO: 36 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 5-элонгазы *Pyramimonas cordata* в растениях (версия 3).  
 SEQ ID NO: 37 -  $\Delta$ 5-элонгаза *Pyramimonas cordata*.  
 SEQ ID NO: 38 - открытая рамка считывания, кодирующая  $\Delta$ 4-десатуразу *Pavlova salina*.  
 SEQ ID NO: 39 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 4-десатуразы *Pavlova salina* в растениях (версия 1).  
 SEQ ID NO: 40 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии  $\Delta$ 4-десатуразы *Pavlova salina* в растениях (версия 2).

- SEQ ID NO: 41 - Δ4-десатураза Pavlova salina.  
 SEQ ID NO: 42 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ9-элонгазу Isochrysis galbana.  
 SEQ ID NO: 43 - Δ9-элонгаза Isochrysis galbana.  
 SEQ ID NO: 44 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ9-элонгазу Emilia huxleyi CCMP1516.  
 SEQ ID NO: 45 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии Δ9-элонгазы Emilia huxleyi в растениях.  
 SEQ ID NO: 46 - Δ9-элонгаза Emilia huxleyi CCMP1516.  
 SEQ ID NO: 47 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ9-элонгазу Pavlova pinguis.  
 SEQ ID NO: 48 - Δ9-элонгаза Pavlova pinguis.  
 SEQ ID NO: 49 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ9-элонгазу Pavlova salina.  
 SEQ ID NO: 50 - Δ9-элонгаза Pavlova salina.  
 SEQ ID NO: 51 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ8-десатуразу Pavlova salina.  
 SEQ ID NO: 52 - Δ8-десатураза Pavlova salina.  
 SEQ ID NO: 53 - вирусный супрессор P19.  
 SEQ ID NO: 54 - вирусный супрессор V2.  
 SEQ ID NO: 55 - вирусный супрессор P38.  
 SEQ ID NO: 56 - вирусный супрессор Pe-P0.  
 SEQ ID NO: 57 - вирусный супрессор RPV-P0.  
 SEQ ID NO: 58 - открытая рамка считывания, кодирующая вирусный супрессор P19.  
 SEQ ID NO: 59 - открытая рамка считывания, кодирующая вирусный супрессор V2.  
 SEQ ID NO: 60 - открытая рамка считывания, кодирующая вирусный супрессор P38.  
 SEQ ID NO: 61 - открытая рамка считывания, кодирующая вирусный супрессор Pe-P0.  
 SEQ ID NO: 62 - открытая рамка считывания, кодирующая вирусный супрессор RPV-P0.  
 SEQ ID NO: 63 - ЛФКАТ2 Arabidopsis thaliana.  
 SEQ ID NO: 64 - ЛФКАТ Limnanthes alba.  
 SEQ ID NO: 65 - ЛФКАТ Saccharomyces cerevisiae.  
 SEQ ID NO: 66 - ЛФКАТ Micromonas pusilla.  
 SEQ ID NO: 67 - ЛФКАТ Mortierella alpina.  
 SEQ ID NO: 68 - ЛФКАТ Brassica napus.  
 SEQ ID NO: 69 - ЛФКАТ Brassica napus.  
 SEQ ID NO: 70 - ω3 десатураза Phytophthora infestans.  
 SEQ ID NO: 71 - ω3 десатураза Thalassiosira pseudonana.  
 SEQ ID NO: 72 - ω3 десатураза Pythium irregulare.

#### **Подробное описание сущности изобретения**

Общие методы и определения.

Если конкретно не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, следует понимать, как имеющие такое же значение, как обычно придает им средний специалист в данной области (например, в культивировании клеток, молекулярной генетике, синтезе жирных кислот, трансгенных растениях, химии белка и биохимии).

Если не указано иное, рекомбинантный белок, культура клеток и иммунологические методы, используемые в настоящем изобретении, представляют собой стандартные методики, хорошо известные специалистам из уровня техники. Такие методики описаны и объяснены в литературных источниках, например 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 (редакторы), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 и 1996), F.M. Ausubel et al. (редакторы), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, включая все издания до сегодняшнего дня), Ed Harlow and David Lane (редакторы), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory (1988) и J.E. Coligan et al. (редакторы), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (включая все издания до сегодняшнего дня).

Термин "и/или", например "X и/или Y", следует понимать как подразумевающий любой из "X и Y" или "X или Y" и следует интерпретировать как явно поддерживающий оба значения или любое из значений.

В настоящем документе термин "около", если только не указано противоположное, подразумевает +/- 10%, более предпочтительно +/- 5%, более предпочтительно +/- 1% от приведенного значения.

В настоящем документе слово "включают" или вариации, например "включает" или "включающий", следует понимать как обозначающие включение заявленного элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий, но не исключение любого другого элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий.

Некоторые определения.

В настоящем документе термины "экстрагированный растительный липид" и "выделенный растительный липид" обозначают липидную композицию, которая извлечена, например, путем измельчения из растения или его части, такой как семя. Экстрагированный липид может представлять собой относительно неочищенную композицию, полученную, например, путем измельчения семени растения, или в большей степени очищенную композицию, из которой большинство, если не все из одного или более или каждого из воды, нуклеиновых кислот, белков и углеводов, происходящих из растительного материала, удалены. Ниже раскрыты примеры способов очистки. В варианте реализации экстрагированный или выделенный растительный липид содержит по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90 или по меньшей мере приблизительно 95% (мас./мас.) липида в композиции. Липид может быть твердым или жидким при комнатной температуре, если он представляет собой жидкость, то называется маслом. В варианте реализации экстрагированный липид по изобретению не смешивается с другим липидом, например ДГК, не продуцированной другим источником (например, ДГК из рыбьего жира). В варианте реализации после экстракции одно или более или все из соотношений олеиновая кислота:ДГК, пальмитиновая кислота:ДГК, линолевая кислота:ДГК, и общие ω6 жирные кислоты:общие ω3 жирные кислоты, в существенной мере не изменяются (например, не более чем 10 или 5% изменений), по сравнению с соотношением в интактном семени или клетке. В другом варианте реализации экстрагированный растительный липид не обрабатывается процедурой, такой как гидрогенизация или фракционирование, которая может изменить одно или более или все из соотношений олеиновая кислота:ДГК, пальмитиновая кислота:ДГК, линолевая кислота:ДГК и общие ω6 жирные кислоты:общие ω3 жирные кислоты, по сравнению с соотношением в интактном семени или клетке. Если экстрагированный растительный липид по изобретению содержится в масле, масло может дополнительно содержать молекулы, не являющиеся жирными кислотами, например стеролы.

В настоящем документе термины "экстрагированное растительное масло" и "выделенное растительное масло" обозначают вещество или композицию, содержащую экстрагированный растительный липид или выделенный растительный липид, которая является жидкой при комнатной температуре. Масло получают из растения или его части, например семени. Экстрагированное или выделенное масло может представлять собой относительно неочищенную композицию, полученную, например, путем измельчения семени растения, или в большей степени очищенную композицию, из которой большинство, если не все, из одного или более или каждого из воды, нуклеиновых кислот, белков и углеводов, происходящих из растительного материала, удалены. Композиция может содержать другие компоненты, которые могут быть липидными или не липидными. В варианте реализации масляная композиция содержит по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90 или по меньшей мере приблизительно 95% (мас./мас.) экстрагированного растительного липида. В варианте реализации экстрагированное масло по изобретению не смешивается с другим маслом, таким как ДГК, не продуцированная другим источником (например, ДГК из рыбьего жира). В варианте реализации после экстракции, одно или более или все из соотношений олеиновая кислота:ДГК, пальмитиновая кислота:ДГК, линолевая кислота:ДГК и общие ω6 жирные кислоты:общие ω3 жирные кислоты существенно не изменяются (например, не более чем 10 или 5% изменений), по сравнению с соотношением в интактном семени или клетке. В другом варианте реализации экстрагированное масло растения не обрабатывают процедурой, такой как гидрогенизация или фракционирование, которая может изменять одно или более или все из соотношений олеиновая кислота:ДГК, пальмитиновая кислота:ДГК, линолевая кислота:ДГК и общие ω6 жирные кислоты:общие ω3 жирные кислоты, по сравнению с соотношением в интактном семени или клетке. Экстрагированное растительное масло по изобретению может содержать молекулы, не являющиеся жирными кислотами, например стеролы.

В настоящем документе "масло" представляет собой композицию, которая содержит в основном липид и является жидкой при комнатной температуре. Например, масло по изобретению предпочтительно содержит по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85 или по меньшей мере 90 мас.% липида. Обычно очищенное масло содержит по меньшей мере 90 мас.% триацилглицеролов (ТАГ) от содержания липида в масле. Незначительные компоненты масла, такие как диацилглицеролы (ДАГ), свободные жирные кислоты (СЖК), фосфолипид и стеролы, могут присутствовать, как раскрыто в настоящем документе.

В настоящем документе термин "жирная кислота" обозначает карбоновую кислоту (или органическую кислоту), часто с длинным алифатическим хвостом, насыщенным или ненасыщенным. Обычно жирные кислоты содержат цепь углерод-углеродных связей длиной по меньшей мере 8 атомов углерода, более предпочтительно длиной по меньшей мере 12 атомов углерода. Большинство встречающихся в природе жирных кислот содержит четное количество атомов углерода, поскольку в их биосинтезе принимает участие ацетат, содержащий два атома углерода. Жирные кислоты могут быть в свободном состоянии (неэтерифицированные) или в этерифицированной форме, например, как часть триглицерола, диацилглицерола, моноацилглицерола, связи с ацил-КоА (тиоэфир) или другой формы связи. Жирная

кислота может быть этерифицированной как фосфолипид, например формы фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилглицерола, фосфатидилинозитола или дифосфатидилглицерола.

"Насыщенные жирные кислоты" не содержат двойных связей или других функциональных групп вдоль цепи. Термин "насыщенный" обозначает водород, с тем, что все атомы углерода (кроме группы карбоновой кислоты [-COOH]) содержат максимально возможное количество водорода. Другими словами, омега ( $\omega$ ) конец содержит 3 атома водорода (CH<sub>3</sub>-), и каждый атом углерода в пределах цепи содержит 2 атома водорода (-CH<sub>2</sub>-).

"Ненасыщенные жирные кислоты" по форме сходны с насыщенными жирными кислотами, за исключением того, что одна или более алкеновых функциональных групп присутствуют вдоль цепи, причем каждый алкен заменяет одинарную связь "-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-" части цепи двойной связью "-CH=CH-" (т.е. углерод присоединен двойной связью к другому атому углерода). Два следующих атома углерода в цепи, которые присоединены к каждой из сторон двойной связи, могут присутствовать в цис- или транс-конфигурации.

В настоящем документе термин "мононенасыщенная жирная кислота" обозначает жирную кислоту, которая содержит по меньшей мере 12 атомов углерода в углеродной цепи, и только одну алкеновую группу (двойная углерод-углеродная связь) в цепи. В настоящем документе термины "полиненасыщенная жирная кислота" или "ПНЖК" обозначают жирную кислоту, которая содержит по меньшей мере 12 атомов углерода в углеродной цепи и по меньшей мере две алкеновые группы (двойные углерод-углеродные связи).

В настоящем документе термины "длинноцепочечная полиненасыщенная жирная кислота" и "ДЦ-ПНЖК" обозначают жирную кислоту, которая содержит по меньшей мере 20 атомов углерода в углеродной цепи и по меньшей мере две двойных углерод-углеродных связи, и таким образом включают ОДЦ-ПНЖК. В настоящем документе термины "полиненасыщенная жирная кислота с очень длинной цепью" и "ОДЦ-ПНЖК" обозначают жирную кислоту, которая содержит по меньшей мере 22 атома углерода в углеродной цепи и по меньшей мере три двойных углерод-углеродных связи. Обычно количество атомов углерода в углеродной цепи жирных кислот относится к неразветвленной углеродной цепи. Если углеродная цепь разветвлена, количество атомов углерода исключает атомы углерода боковых групп. В одном варианте реализации длинноцепочечная полиненасыщенная жирная кислота представляет собой  $\omega$ 3 жирную кислоту, т.е. содержит десатурацию (двойную углерод-углеродную связь) в положении третьей углерод-углеродной связи от метильного конца жирной кислоты. В другом варианте реализации длинноцепочечная полиненасыщенная жирная кислота представляет собой  $\omega$ 6 жирную кислоту, т.е. содержит десатурацию (двойную углерод-углеродную связь) в положении шестой углерод-углеродной связи от метильного конца жирной кислоты. В другом варианте реализации длинноцепочечная полиненасыщенная жирная кислота выбрана из группы, состоящей из арахидоновой кислоты (АРК, 20:4 $\Delta$ 5,8,11,14;  $\omega$ 6), эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК, 20:4 $\Delta$ 8,11,14,17;  $\omega$ 3), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК, 20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17;  $\omega$ 3), докозапентаеновой кислоты (ДПК, 22:5 $\Delta$ 7,10,13,16,19;  $\omega$ 3) или докозагексаеновой кислоты (ДГК, 22:6 $\Delta$ 4,7,10,13,16,19;  $\omega$ 3). Кроме того, ДЦ-ПНЖК могут представлять собой дигомо- $\gamma$ -линолевую кислоту (ДГЛК) или эйкозатриеновую кислоту (ЭТрК, 20:3 $\Delta$ 11,14,17;  $\omega$ 3). Будет очевидно, что ДЦ-ПНЖК, полученная в соответствии с изобретением, может быть смесью любых или всех упомянутых выше соединений, и может содержать другую ДЦ-ПНЖК или производные любой из перечисленных ДЦ-ПНЖК. В предпочтительном варианте реализации  $\omega$ 3 жирные кислоты представляют собой, по меньшей мере, ДГК, предпочтительно ДПК и ДГК или ЭПК, ДПК и ДГК.

Дополнительно, в настоящем документе термины "длинноцепочечная полиненасыщенная жирная кислота" и "полиненасыщенная жирная кислота с очень длинной цепью" обозначают жирную кислоту, находящуюся в свободном состоянии (неэтерифицированную) или в этерифицированной форме, например как часть триглицерола, диацилглицерола, моноацилглицерола, связи с ацил-КоА (тиоэфир) или другой формы связи. Жирная кислота может быть этерифицированной как фосфолипид, например, формы фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилглицерола, фосфатидилинозитола или дифосфатидилглицерола. Поэтому ДЦ-ПНЖК может присутствовать как смесь форм в липиде клетки или очищенного масла или липиде, экстрагированном из клеток, тканей или организмов. В предпочтительных вариантах реализации изобретения раскрывается масло, содержащее по меньшей мере 75 или по меньшей мере 85% триацилглицеролов, причем остаток представляет собой другие формы липида, такие как упомянутые выше, в которых присутствуют, по меньшей мере, указанные триацилглицеролы, содержащие ДЦ-ПНЖК. Впоследствии масло может быть дополнительно очищено или обработано, например, гидролизом с сильным основанием с целью высвобождения свободных жирных кислот, или дистилляцией и т.п.

В настоящем документе выражение "общие  $\omega$ 6 жирные кислоты" или "общее содержание  $\omega$ 6 жирных кислот" или подобное обозначает сумму всех  $\omega$ 6 жирных кислот, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяется контекстом, выраженную как процент от общего содержания жирных кислот. Указанные

ω6 жирные кислоты включают (если они присутствуют) ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК и ω6-ДПК, но исключают любые ω3 жирные кислоты и мононенасыщенные жирные кислоты.

В настоящем документе выражение "новые ω6 жирные кислоты" или "содержание новых ω6 жирных кислот" или подобное обозначает сумму всех ω6 жирных кислот, за исключением ЛК, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяется контекстом, выраженную как процент от общего содержания жирных кислот. Такие новые ω6 жирные кислоты представляют собой жирные кислоты, продуцированные в клетках, растениях, частях растения и семенах по изобретению посредством экспрессии генетических конструкций (экзогенные полинуклеотиды), введенных в клетки, и включают (если они присутствуют) ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК и соб-ДПК, но исключают ЛК и любые ω3 жирные кислоты и мононенасыщенные жирные кислоты. Характерное общее содержание ω6 жирных кислот и содержание новых ω6 жирных кислот определяется по превращению жирных кислот в образце в МЭЖК и результатам анализа ГХ, как раскрыто в примере 1.

В настоящем документе выражение "общие ω3 жирные кислоты" или "общее содержание ω3 жирных кислот" или подобное обозначает сумму всех ω3 жирных кислот, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяется контекстом, выраженную как процент от общего содержания жирных кислот. Такие ω3 жирные кислоты включают (если они присутствуют) АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК и исключают любые ω6 жирные кислоты и мононенасыщенные жирные кислоты.

В настоящем документе выражение "новые ω3 жирные кислоты" или "содержание новых ω3 жирных кислот" или подобное обозначает сумму всех ω3 жирных кислот, за исключением АЛК, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяется контекстом, выраженную как процент от общего содержания жирных кислот. Такие новые ω3 жирные кислоты представляют собой жирные кислоты, продуцированные в клетках, растениях, частях растений и семенах по изобретению посредством экспрессии генетических конструкций (экзогенные полинуклеотиды), введенных в клетки, и включают (если они присутствуют) СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК, но исключают АЛК и любые ω6 жирные кислоты и мононенасыщенные жирные кислоты. Характерное общее содержание ω3 жирных кислот и содержание новых ω3 жирных кислот определяется по превращению жирных кислот в образце в МЭЖК и результатам анализа ГХ, как описано в примере 1.

Белки десатураза, элонгаза и ацилтрансфераза и гены, кодирующие их, которые могут применяться в соответствии с изобретением, представляют собой любые из известных в уровне техники или их гомологи или производные. Примеры таких генов и размер кодируемых белков приведены в табл. 1. Ферменты десатуразы, для которых продемонстрировано участие в биосинтезе ДЦ-ПНЖК, все принадлежат к группе так называемых "фронт-энд" десатураз.

В настоящем документе термин "фронт-энд десатураза" обозначает члена класса ферментов, которые вводят двойную связь между карбоксильной группой и уже существующей ненасыщенной частью ацильной цепи липидов, которые структурно характеризуются присутствием домена N-концевого пептида b5, наряду с типичным доменом десатуразы жирных кислот, содержащим три в высокой степени консервативных гистидиновых бокса (Napier et al., 1997).

Активность любой из элонгаз или десатураз для применения в соответствии с изобретением может быть протестирована посредством экспрессии гена, кодирующего фермент, в клетке, такой как, например, дрожжевая клетка, растительная клетка или предпочтительно в соматических эмбрионах или трансгенных растениях, и определения того, обладает ли клетка, эмбрион или растение повышенной способностью к выработке ДЦ-ПНЖК, по сравнению со сравнимой клеткой, эмбрионом или растением, в котором фермент не экспрессируется.

В одном варианте реализации одна или более десатураз и/или элонгаз для применения в соответствии с изобретением могут быть получены из микроводоросли и очищены, т.е. иметь последовательность аминокислот, идентичную полипептиду, который может быть получен из микроводоросли и очищен.

Хотя некоторые ферменты конкретно раскрываются в настоящем документе как "бифункциональные", отсутствие такого термина не обязательно подразумевает, что конкретный фермент не обладает другой активностью, кроме конкретно раскрытой.

#### Десатуразы.

В настоящем документе термин "десатураза" обозначает фермент, который способен вводить двойную углерод-углеродную связь в ацильную группу жирнокислотного субстрата, который обычно находится в этерифицированной форме, например эфиры ацил-КоА. Ацильная группа может быть этерифицирована до фосфолипида, например фосфатидилхолин (ФХ), или до белка-носителя ацила (БНА), или, в предпочтительном варианте реализации, до КоА. Десатуразы в общем могут быть разделены на три группы соответственно. В одном варианте реализации десатураза представляет собой фронт-энд десатуразу.

В настоящем документе "Δ4-десатураза" обозначает белок, который осуществляет реакцию десатурации с введением двойной углерод-углеродной связи в положении 4-ой углерод-углеродной связи от карбоксильного конца жирнокислотного субстрата. "Δ4-десатураза", по меньшей мере, способна трансформировать ДПК в ДГК. Стадия десатурации с образованием ДГК из ДПК катализируется Δ4-десатуразой в организмах, не относящихся к млекопитающим, и ген, кодирующий данный фермент, выделен от вида пресноводных простейших *Euglena gracilis* и морских видов *Thraustochytrium* (Qiu et al., 2001; Meyer et al., 2003). В одном варианте реализации последовательность аминокислот Δ4-десатуразы соответствует представленной в SEQ ID NO: 41, или Δ4-десатуразе вида *Thraustochytrium*, ее биологически активному фрагменту или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 41.

Таблица 1  
Клонированные гены, принимающие участие в биосинтезе ДЦ-ПНЖК

Фермент	Тип организма	Вид	Номера доступа	Размер белка (ак)	Ссылки	
Δ4-десатураза	Простейшие	<i>Euglena gracilis</i>	AY278558	541	Meyer et al., 2003	
	Водоросли	<i>Pavlova lutherii</i>	AY332747	445	Tanon et al., 2003	
		<i>Isochrysis galbana</i>	AAV33631	433	Pereira et al., 2004b	
		<i>Pavlova salina</i>	AAV15136	447	Zhou et al., 2007	
	Траустохитридиевые	<i>Thraustochytrium aureum</i>	AAN75707 AAN75708 AAN75709 AAN75710	515	Отсутствуют	
		вид <i>Thraustochytrium</i> ATCC21685	AAM09688	519	Qiu et al., 2001	
Δ5-десатураза	Млекопитающие	<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	
	Грибы	<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
	Диатомовые	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	AY082392	469	Domergue et al., 2002	
	Водоросли	вид <i>Thraustochytrium</i>	AF489588	439	Qiu et al., 2001	
		<i>Thraustochytrium aureum</i>		439	WO02081668	
		<i>Isochrysis galbana</i>		442	WO02081668	
Мох	<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583465	484	Kajikawa et al., 2004		
Δ6-десатураза	Млекопитающие	<i>Homo sapiens</i>	NM_013402	444	Cho et al., 1999a; Leonard et al., 2000	
		<i>Mus musculus</i>	NM_019699	444	Cho et al., 1999a	
	Нематода	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Z70271	443	Napier et al., 1998	
	Растения	<i>Borago officinales</i>	U79010	448	Sayanova et al., 1997	
		<i>Echium</i>	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto et al., 2002	
		<i>Primula vialii</i>	AY234127	453	Sayanova et al., 2003	

		<i>Anemone leveillei</i>	AF536525	446	Whitney et al., 2003
	Мхи	<i>Ceratodon purpureus</i>	AJ250735	520	Sperling et al., 2000
		<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583463	481	Kajikawa et al., 2004
		<i>Physcomitrella patens</i>	CAA11033	525	Girke et al., 1998
	Грибы	<i>Mortierella alpina</i>	AF110510 AB020032	457	Huang et al., 1999; Sakuradani et al., 1999
		<i>Pythium irregulare</i>	AF419296	459	Hong et al., 2002a
		<i>Mucor circinelloides</i>	AB052086	467	NCBI*
		вид <i>Rhizopus</i>	AY320288	458	Zhang et al., 2004
		<i>Saprolegnia diclina</i>		453	WO02081668
	Диатомовые	<i>Phaedactylum tricorutum</i>	AY082393	477	Domergue et al., 2002
	Бактерии	<i>Synechocystis</i>	L11421	359	Reddy et al., 1993
	Водоросли	<i>Thraustochytrium aureum</i>		456	WO02081668
Бифункциональная $\Delta 5/\Delta 6$ -десатураза	Рыба	<i>Danio rerio</i>	AF309556	444	Hastings et al., 2001
C20 $\Delta 8$ -десатураза	Водоросли	<i>Euglena gracilis</i>	AF139720	419	Wallis and Browne, 1999
	Растения	<i>Borago officinales</i>	AAG43277	446	Sperling et al., 2001
$\Delta 6$ -элонгаза	Нематода	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NM_069288	288	Beaudoin et al., 2000
	Мхи	<i>Physcomitrella patens</i>	AF428243	290	Zank et al., 2002
		<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583464	290	Kajikawa et al., 2004
	Грибы	<i>Mortierella alpina</i>	AF206662	318	Parker-Barnes et al., 2000
	Водоросли	<i>Pavlova lutheri</i> **		501	WO 03078639
		<i>Thraustochytrium</i>	AX951565	271	WO 03093482
		вид <i>Thraustochytrium</i> **	AX214454	271	WO 0159128
ПНЖК-элонгаза	Млекопитающие	<i>Homo sapiens</i>	AF231981	299	Leonard et al., 2000b; Leonard et al., 2002
		<i>Rattus norvegicus</i>	AB071985	299	Inagaki et al., 2002
		<i>Rattus norvegicus</i> **	AB071986	267	Inagaki et al., 2002
		<i>Mus musculus</i>	AF170907	279	Tvrđik et al., 2000
		<i>Mus musculus</i>	AF170908	292	Tvrđik et al., 2000
	Рыба	<i>Danio rerio</i>	AF532782	291 (282)	Agaba et al., 2004
		<i>Danio rerio</i> **	NM_199532	266	Lo et al., 2003
	Червь	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Z68749	309	Abbott et al., 1998 Beaudoin et al., 2000
	Водоросли	<i>Thraustochytrium aureum</i> **	AX464802	272	WO 0208401-A2
		<i>Pavlova lutheri</i> **		320	WO 03078639
$\Delta 9$ -элонгаза	Водоросли	<i>Isochrysis galbana</i>	AF390174	263	Qi et al., 2002
		<i>Euglena gracilis</i>		258	WO 08/128241
$\Delta 5$ -элонгаза	Водоросли	<i>Ostreococcus tauri</i>	AAV67798	300	Meyer et al., 2004
		<i>Pyramimonas cordata</i>		268	WO 2010/057246
		вид <i>Pavlova CCMP459</i>	AAV33630	277	Pereira et al., 2004b
		<i>Pavlova salina</i>	AAV15135	302	Robert et al., 2009
	Диатомовые	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	AAV67800	358	Meyer et al., 2004
	Рыба	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CAM55862	295	WO 06/008099
	Мох	<i>Marchantia polymorpha</i>	BAE71129	348	Kajikawa et al., 2006

\* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

\*\* Функция не доказана/не продемонстрирована.

В настоящем документе " $\Delta 5$ -десатураза" обозначает белок, который осуществляет реакцию десатурации, с введением двойной углерод-углеродной связи в положении 5-ой углерод-углеродной связи от карбоксильного конца жирнокислотного субстрата. Примеры " $\Delta 5$ -десатураз" приведены в Ruiz-Lopez et al. (2012) и Petrie et al. (2010a) а также в табл. 1 настоящего документа. В одном варианте реализации последовательность аминокислот  $\Delta 5$ -десатуразы соответствует представленной в SEQ ID NO: 30, ее биологически активному фрагменту или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 30. В другом варианте реализации последовательность аминокислот  $\Delta 5$ -десатуразы соответствует представленной SEQ ID NO: 32, ее биологически активному фрагменту, или последова-

тельности аминокислот, которая по меньшей мере на 53% идентична SEQ ID NO: 32. В другом варианте реализации  $\Delta 5$ -десатураза получена из вида *Thraustochytrium* или *Emiliana huxleyi*.

В настоящем документе " $\Delta 6$ -десатураза" обозначает белок, который осуществляет реакцию десатурации, с введением двойной углерод-углеродной связи в положении 6-й углерод-углеродной связи от карбоксильного конца жирнокислотного субстрата. Примеры  $\Delta 6$ -десатураз приведены в Ruiz-Lopez et al. (2012) и Petrie et al. (2010a), а также в табл. 1 настоящего документа. Предпочтительные  $\Delta 6$ -десатуразы получены из *Micromonas pusilla*, *Pythium irregulare* или *Ostreococcus taurii*.

В варианте реализации  $\Delta 6$ -десатураза дополнительно характеризуется наличием по меньшей мере двух, предпочтительно всех трех и предпочтительно в растительной клетке, из следующего; i) более высокая активность  $\Delta 6$ -десатуразы в отношении  $\alpha$ -линоленовой кислоты (АЛК, 18:3 $\Delta 9,12,15$ ,  $\omega 3$ ), чем в отношении линолевой кислоты (ЛК, 18:2 $\Delta 9,12$ ,  $\omega 6$ ) в качестве жирнокислотного субстрата; и ii) более высокая активность  $\Delta 6$ -десатуразы в отношении АЛК-КоА в качестве жирнокислотного субстрата, чем в отношении АЛК, присоединенной в положении sn-2 ФХ, в качестве жирнокислотного субстрата; и iii) активность  $\Delta 8$ -десатуразы в отношении ЭТрК. Примеры таких  $\Delta 6$ -десатураз приведены в табл. 2.

В варианте реализации  $\Delta 6$ -десатураза обладает более высокой активностью в отношении  $\omega 3$  субстрата, чем в отношении соответствующего  $\omega 6$  субстрата, и обладает активностью в отношении АЛК с образованием октадекатетраеновой кислоты (стеарионовая кислота, СДК, 18:4 $\Delta 6,9,12,15$ ,  $\omega 3$ ), с эффективностью по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, или наиболее предпочтительно по меньшей мере 50%, при экспрессии из экзогенного полинуклеотида в рекомбинантной клетке, такой как растительная клетка, или по меньшей мере 35% при экспрессии в дрожжевой клетке. В одном варианте реализации  $\Delta 6$ -десатураза обладает более высокой активностью, например по меньшей мере приблизительно в 2 раза более высокой активностью  $\Delta 6$ -десатуразы в отношении АЛК, чем в отношении ЛК как жирнокислотного субстрата. В другом варианте реализации  $\Delta 6$ -десатураза обладает более высокой активностью, например по меньшей мере приблизительно в 5 раз более высокой активностью  $\Delta 6$ -десатуразы или по меньшей мере в 10 раз более высокой активностью в отношении АЛК-КоА как жирнокислотного субстрата, чем в отношении АЛК, присоединенной в положении sn-2 ФХ, как жирнокислотного субстрата. В другом варианте реализации,  $\Delta 6$ -десатураза обладает активностью в отношении обоих жирнокислотных субстратов - АЛК-КоА и АЛК, присоединенных в положении sn-2 ФХ.

Таблица 2

Десатуразы, которые продемонстрировали активность на субстрате ацил-КоА

Фермент	Тип организма	Вид	Номера доступа	Размер белка (ак)	Ссылки
$\Delta 6$ -десатураза	Водоросли	<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)
$\Delta 5$ -десатураза	Водоросли	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30478	482	Hoffmann et al., 2008
	Растение	<i>Anemone leveillei</i>	Отсутствует		Sayanova et al., 2007
$\omega 3$ -десатураза	Грибы	<i>Pythium aphanidermatum</i>	FW362186.1	359	Xue et al., 2012; WO2008/054565
	Грибы (оомицет)	<i>Phytophthora sojae</i>	FW362214.1	363	Xue et al., 2012; WO2008/054565
	Грибы (оомицет)	<i>Phytophthora ramorum</i>	FW362213.1	361	Xue et al., 2012; WO2008/054565

В одном варианте реализации  $\Delta 6$ -десатураза не обладает обнаружимой активностью  $\Delta 5$ -десатуразы в отношении ЭТК. В другом варианте реализации последовательность аминокислот  $\Delta 6$ -десатуразы представлена SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20, их биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 77% идентичной SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20. В другом варианте реализации последовательность аминокислот  $\Delta 6$ -десатуразы представлена SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20, их биологически активным фрагментом или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 67% идентичной одной или обоим из SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20. Кроме того,  $\Delta 6$ -десатураза может обладать активностью  $\Delta 8$ -десатуразы.

В настоящем документе " $\Delta 8$ -десатураза" обозначает белок, который осуществляет реакцию десатурации, с введением двойной углерод-углеродной связи в положении 8-й углерод-углеродной связи от карбоксильного конца жирнокислотного субстрата.  $\Delta 8$ -Десатураза, по меньшей мере, способна превращать ЭТрК в ЭТК. Примеры  $\Delta 8$ -десатураз приведены в табл. 1. В одном варианте реализации последовательность аминокислот  $\Delta 8$ -десатуразы соответствует представленной SEQ ID NO: 52, ее биологически



активным фрагментом или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 52.

В настоящем документе " $\omega$ 3-десатураза" обозначает белок, который осуществляет реакцию десатурации, с введением двойной углерод-углеродной связи в положении 3-й углерод-углеродной связи от метилового конца жирнокислотного субстрата. Таким образом,  $\omega$ 3-десатураза может превращать ЛК в АЛК и ГЛК в СДК (все С18 жирные кислоты), или ДГЛК в ЭТК и/или АРК в ЭПК (С20 жирные кислоты). Некоторые  $\omega$ 3-десатуразы (группа I) обладают активностью только на С18 субстратах, таких как растительные и пиаобактериальные  $\omega$ 3-десатуразы. Такие  $\omega$ 3-десатуразы также являются  $\Delta$ 15-десатуразами. Другие  $\omega$ 3-десатуразы проявляют активность на субстратах С20 без активности (группа II) или с некоторой активностью (группа III) на субстратах С18. Такие  $\omega$ 3-десатуразы также являются  $\Delta$ 17-десатуразами. Предпочтительными  $\omega$ 3-десатуразами является группа III типа, которая превращает ЛК в АЛК, ГЛК в СДК, ДГЛК в ЭТК и АРК в ЭПК, например *Pichia pastoris*  $\omega$ 3-десатураза (SEQ ID NO: 12). Примеры  $\omega$ 3-десатураз включают описанные Pereira et al. (2004a) ( $\omega$ 3-десатураза *Saprolegnia diclina*, группа II), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) и Spychalla et al. (1997) ( $\omega$ 3-десатураза *C. elegans*, группа III). В предпочтительном варианте реализации  $\omega$ 3-десатураза представляет собой грибковую  $\omega$ 3-десатуразу. В настоящем документе "грибковая  $\omega$ 3-десатураза" обозначает  $\omega$ 3-десатуразу, которая получена из грибкового источника, в том числе оомицетного источника, или ее вариант с последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 95% идентичной ей. Гены, кодирующие многочисленные  $\omega$ 3-десатуразы, выделены из грибковых источников, таких как, например, *Phytophthora infestans* (номер доступа CAJ30870, WO2005083053; SEQ ID NO: 70), *Saprolegnia diclina* (номер доступа AAR20444, Pereira et al., 2004a и патент США № 7211656), *Pythium irregulare* (WO2008022963, группа II; SEQ ID NO: 72), *Mortierella alpina* (Sakuradani et al., 2005; номер доступа BAD91495; WO2006019192), *Thalassiosira pseudonana* (Armbrast et al., 2004; номер доступа XP002291057; WO2005012316, SEQ ID NO: 71), *Lachancea kluyveri* (также известный как *Saccharomyces kluyveri*; Oura et al., 2004; номер доступа AB118663). Xue et al. (2012) описывает  $\omega$ 3-десатуразы из оомицетов *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora sojae* и *Phytophthora gamsii*, способные эффективно превращать жирнокислотные субстраты  $\omega$ 6 в соответствующие  $\omega$ 3 жирные кислоты, с предпочтением в отношении субстратов С20, т.е. обладающие более выраженной активностью  $\Delta$ 17-десатуразы, чем активностью  $\Delta$ 15-десатуразы. Такие ферменты не обладают активностью  $\Delta$ 12-десатуразы, но способны использовать жирные кислоты в ацил-КоА и фосфолипидной фракции в качестве субстратов.

В более предпочтительном варианте реализации грибковая  $\omega$ 3-десатураза представляет собой  $\omega$ 3-десатуразу/ $\Delta$ 15-десатуразу *Pichia pastoris* (также известна как *Komagataella pastoris*) (Zhang et al., 2008; номер доступа EF116884; SEQ ID NO: 12) или полипептид, который по меньшей мере на 95% идентичен ей.

В варианте реализации  $\omega$ 3-десатураза способна осуществлять по меньшей мере одну из следующих трансформаций: АРК в ЭПК, ДГЛК в ЭТК, ГЛК в СДК, АРК в ЭПК и ДГЛК в ЭТК, АРК в ЭПК и ГЛК в СДК или все три из них.

В одном варианте реализации  $\omega$ 3-десатураза обладает активностью  $\Delta$ 17-десатуразы в отношении жирной кислоты С20, которая содержит по меньшей мере три двойных углерод-углеродных связи, предпочтительно АРК. В другом варианте реализации  $\omega$ 3-десатураза обладает активностью  $\Delta$ 15-десатуразы в отношении жирной кислоты С18, которая содержит три двойных углерод-углеродных связи, предпочтительно ГЛК. Предпочтительно оба вида активности присутствуют.

В настоящем документе " $\Delta$ 12-десатураза" обозначает белок, который осуществляет реакцию десатурации, с введением двойной углерод-углеродной связи в положении 12-й углерод-углеродной связи от карбоксильного конца жирнокислотного субстрата.  $\Delta$ 12-Десатуразы обычно превращают олеил-фосфатидилхолин или олеил-КоА в линолеил-фосфатидилхолин (18:1-ФХ) или линолеил-КоА (18:1-КоА) соответственно. Подкласс, использующий связанный с ФХ субстрат, называют фосфолипид-зависимыми  $\Delta$ 12-десатуразами, второй подкласс - ацил-КоА-зависимыми  $\Delta$ 12-десатуразами. Растительные и грибковые  $\Delta$ 12-десатуразы обычно относятся к первому подклассу, тогда как животные  $\Delta$ 12-десатуразы относятся ко второму подклассу, например  $\Delta$ 12-десатуразы, кодируемые генами, которые клонированы из насекомых Zhou et al. (2008). Множество других последовательностей  $\Delta$ 12-десатуразы могут быть легко идентифицированы посредством поиска в базах данных последовательностей.

В настоящем документе " $\Delta$ 15-десатураза" обозначает белок, который осуществляет реакцию десатурации, с введением двойной углерод-углеродной связи в положении 15-й углерод-углеродной связи от карбоксильного конца жирнокислотного субстрата. Многочисленные гены, кодирующие  $\Delta$ 15-десатуразы, клонированы из растительных и грибковых видов. Например, в US5952544 раскрыты нуклеиновые кислоты, кодирующие растительные  $\Delta$ 15-десатуразы (FAD3). Эти ферменты содержат мотивы аминокислот, которые были характерны для растительных  $\Delta$ 15-десатураз. В WO200114538 раскрыт ген, кодирующий FAD3 сои. Множество других последовательностей  $\Delta$ 15-десатуразы могут быть легко идентифици-

рованы посредством поиска в базах данных последовательностей.

В настоящем документе "Δ17-десатураза" обозначает белок, который осуществляет реакцию десатурации, с введением двойной углерод-углеродной связи в положении 17-й углерод-углеродной связи от карбоксильного конца жирнокислотного субстрата. Δ17-Десатураза также расценивается как ω3-десатураза, если она действует на субстрат C20, с введением десатурации в положении связи ω3.

В предпочтительном варианте реализации Δ12-десатураза и/или λ<sup>15</sup>-десатураза представляет собой грибковую Δ12-десатуразу или грибковую λ<sup>15</sup>-десатуразу.

В настоящем документе "грибковая Δ12-десатураза" или "грибковая Δ15-десатураза" обозначает Δ12-десатуразу или Δ15-десатуразу, полученную из грибкового источника, в том числе оомицетного источника, или ее вариант, последовательность аминокислот которого по меньшей мере на 95% идентична ей. Гены, кодирующие многочисленные десатуразы, выделены из грибковых источников. В US 7211656 раскрыта Δ12-десатураза из *Saprolegnia diclina*. В WO2009016202 раскрыты грибковые десатуразы из *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* и *Microdochium nivale*. В WO2005/012316 раскрыта Δ12-десатураза из *Thalassiosira pseudonana* и других грибов. В WO2003/099216 раскрыты гены, кодирующие грибковые Δ12-десатуразы и Δ15-десатуразы, выделенные из *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* и *Mortierella alpina*. В WO2007133425 раскрыты грибковые Δ15 десатуразы, выделенные из: *Saccharomyces kluyveri*, *Mortierella alpina*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* и *Magnaporthe grisea*. Предпочтительная Δ12 десатураза выделена из *Phytophthora sojae* (Ruiz-Lopez et al., 2012).

Отличным подклассом грибковых Δ12-десатураз и грибковых Δ15-десатураз являются бифункциональные грибковые Δ12/Δ15-десатуразы. Гены, кодирующие их, клонированы из *Fusarium moniliforme* (номер доступа DQ272516, Damude et al., 2006), *Acanthamoeba castellanii* (номер доступа EF017656, Sayanova et al., 2006), *Perkinsus marinus* (WO2007042510), *Claviceps purpurea* (номер доступа EF536898, Meesapyodsuk et al., 2007) и *Coprinus cinereus* (номер доступа AF269266, Zhang et al., 2007).

В другом варианте реализации ω3-десатураза обладает, по меньшей мере, некоторой активностью, предпочтительно большей активностью, в отношении субстрата ацил-КоА, чем субстрата соответствующего ацил-ФХ. В настоящем документе "соответствующий субстрат ацил-ФХ" обозначает этерифицированный жирной кислотой в положении sn-1 фосфатидилхолин (ФХ), в котором жирная кислота представляет собой такую же жирную кислоту, как в субстрате ацил-КоА. Например, субстрат ацил-КоА может представлять собой АРК-КоА, и соответствующий субстрат ацил-ФХ представляет собой sn-2 АРК-ФХ. В варианте реализации активность по меньшей мере двукратно выше. Предпочтительно ω3-десатураза обладает, по меньшей мере, некоторой активностью в отношении субстрата ацил-КоА и соответствующего субстрата ацил-ФХ, и обладает активностью в отношении субстратов C18 и C20. Примеры таких ω3-десатураз известны среди клонированных грибковых десатураз, перечисленных выше.

В другом варианте реализации ω3-десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 12, ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60% идентична SEQ ID NO: 12, предпочтительно по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 12.

Еще в одном варианте реализации десатураза для использования в настоящем изобретении обладает более высокой активностью в отношении субстрата ацил-КоА, чем соответствующего субстрата ацил-ФХ. В другом варианте реализации десатураза для использования в настоящем изобретении обладает более высокой активностью в отношении субстрата ацил-ФХ, чем соответствующего субстрата ацил-КоА, но обладает некоторой активностью в отношении обоих субстратов. Как описано выше, "соответствующий субстрат ацил-ФХ" обозначает этерифицированный жирной кислотой в положении sn-2 фосфатидилхолин (ФХ), в котором жирная кислота является такой же, как жирная кислота в субстрате ацил-КоА. В варианте реализации более высокая активность обозначает по меньшей мере двукратно более высокую активность. В варианте реализации десатураза представляет собой Δ5 или Δ6-десатуразу, или ω3-десатуразу, примеры которых раскрыты, без ограничения, в табл. 2. Чтобы протестировать, на какой субстрат действует десатураза, а именно на субстрат ацил-КоА или ацил-ФХ, могут быть проведены анализы на дрожжевых клетках, как описано в Domergue et al. (2003) и (2005). Кроме того, способность десатуразы действовать на субстрат ацил-КоА может предполагаться, если элонгаза, которая экспрессируется вместе с десатуразой, демонстрирует эффективность ферментного превращения в растительных клетках по меньшей мере около 90%, если элонгаза катализирует элонгацию продукта десатуразы. На этой основе Δ5-десатураза и λ<sup>4</sup>-десатураза, экспрессирующиеся из конструкта GA7 (примеры 2 и 3), и их варианты (пример 5) способны к десатурации соответствующих ацил-КоА субстратов, ЭТК-КоА и ДПК-КоА.

Элонгазы.

Биохимическое доказательство наводит на мысль о том, что элонгация жирной кислоты состоит из

4 стадий: конденсация, восстановление, дегидратация и второе восстановление. В контексте данного изобретения, "элонгаза" обозначает полипептид, катализирующий стадию конденсации в присутствии других членов комплекса элонгации, в подходящих физиологических условиях. Показано, что гетерологичная или гомологичная экспрессия в клетке только конденсирующего компонента ("элонгаза") комплекса элонгации белка требуется для элонгации соответствующей ацильной цепи. Поэтому введенная элонгаза может успешно рекрутировать восстанавливающую и дегидратирующую активность из трансгенного хозяина с целью осуществления успешной элонгации ацила. Считается, что за специфичность реакции элонгации относительно длины цепи и степени десатурации жирнокислотных субстратов отвечает компонент конденсации. Кроме того, считается, что данный компонент является ограничивающим фактором скорости в реакции элонгации.

В настоящем документе "Δ5-элонгаза", по меньшей мере, способна превращать ЭПК в ДПК. Примеры Δ5-элонгаз включают раскрытые в WO2005/103253. В одном варианте реализации Δ5-элонгаза обладает активностью в отношении ЭПК с образованием ДПК с эффективностью по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 65%, более предпочтительно по меньшей мере 70% или наиболее предпочтительно по меньшей мере 80% или 90%. В дополнительном варианте реализации последовательность аминокислот Δ5-элонгазы представлена SEQ ID NO: 37, ее биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 47% идентичной SEQ ID NO: 37. В дальнейшем варианте реализации Δ6-элонгаза происходит из *Ostreococcus taurii* или *Ostreococcus lucimarinus* (US2010/088776).

В настоящем документе "Δ6-элонгаза", по меньшей мере, способна превращать СДК в ЭТК. Примеры Δ6-элонгаз включают перечисленные в табл. 1. В одном варианте реализации элонгаза содержит последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 25, ее биологически активный фрагмент (например, фрагмент, раскрытый как SEQ ID NO: 26), или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 55% идентичную одной или обеим из SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 26. В варианте реализации Δ6-элонгаза получена из *Physcomitrella patens* (Zank et al., 2002; номер доступа AF428243) или *Thalassiosira pseudonana* (Ruiz-Lopez et al., 2012).

В настоящем документе "Δ9-элонгаза", по меньшей мере, способна превращать АЛК в ЭТрК. Примеры Δ9-элонгаз включают приведенные в табл. 1. В одном варианте реализации последовательность аминокислот Δ9-элонгазы представлена SEQ ID NO: 43, ее биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 43. В другом варианте реализации последовательность аминокислот Δ9-элонгазы представлена SEQ ID NO: 46, ее биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 81% идентичной SEQ ID NO: 46. В еще одном варианте реализации последовательность аминокислот Δ9-элонгазы представлена SEQ ID NO: 48, ее биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичной SEQ ID NO: 48. В другом варианте реализации последовательность аминокислот Δ9-элонгазы представлена SEQ ID NO: 50, ее биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичной SEQ ID NO: 50. В дальнейшем варианте реализации Δ9-элонгаза обладает более высокой активностью в отношении ω6 субстрата, чем соответствующего ω3 субстрата, или наоборот.

В настоящем документе термин "обладает более высокой активностью в отношении субстрата ω6, чем соответствующего субстрата ω3" обозначает относительную активность фермента в отношении субстратов, которая отличается по активности ω3 десатуразы. Предпочтительно субстрат ω6 представляет собой ЛК, и субстрат ω3 представляет собой АЛК.

Элонгаза с активностью Δ6-элонгазы и Δ9-элонгазы, по меньшей мере, способна (i) превращать СДК в ЭТК и (ii) превращать АЛК в ЭТрК, а также обладает более высокой активностью Δ6-элонгазы, чем активностью Δ9-элонгазы. В одном варианте реализации элонгаза обладает эффективностью превращения СДК с образованием ЭТК, которая составляет по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, и/или эффективностью превращения АЛК с образованием ЭТрК, которая составляет по меньшей мере 6% или более предпочтительно по меньшей мере 9%. В другом варианте реализации элонгаза обладает активностью Δ6-элонгазы, по меньшей мере приблизительно в 6,5 раз превышающей активность Δ9-элонгазы.

В дальнейшем варианте реализации элонгаза не обладает обнаружимой активностью Δ5-элонгазы.

Другие ферменты.

В настоящем документе термин "1-ацилглицерол-3-фосфат ацилтрансфераза" (ЛФКАТ), также называемый ацилтрансферазой лизофосфатидиновой кислоты или ацил-КоА-лизофосфатидат-ацилтрансферазой, обозначает белок, который ацилирует sn-1-ацилглицерол-3-фосфат (sn-1 G-3-P) в положении sn-2, с образованием фосфатидной кислоты (ФК). Таким образом, термин "активность 1-ацилглицерол-3-фосфат ацилтрансферазы" обозначает ацилирование (sn-1 G-3-P) в положении sn-2, с образованием ФК (ЕС 2.3.1.51). Предпочтительными ЛФКАТ являются такие, которые могут использовать полиненасыщенный C22 ацил-КоА в качестве субстрата, для переноса полиненасыщенной группы

ацила С22 в положение sn-2 ЛФК, с образованием ФК. Примеры таких ЛФКАТ приведены в примере 13 и могут быть протестированы, как раскрыто в настоящем документе. В варианте реализации последовательность аминокислот ЛФКАТ, пригодная в соответствии с изобретением, представлена любой из SEQ ID NO: 63-69, ее биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 40% идентичной любой одной или более из SEQ ID NO: 63-69. В предпочтительном варианте реализации последовательность аминокислот ЛФКАТ, пригодная в соответствии с изобретением, представлена любой из SEQ ID NO: 64, 65 и 67, ее биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 40% идентичной любой одной или более из SEQ ID NO: 64, 65 и 67.

В настоящем документе термин "диацилглицерол ацилтрансфераза" (ЕС 2.3.1.20; ДГАТ) обозначает белок, который переносит жирную группу ацила из ацил-КоА к диацилглицерольному субстрату, с образованием триацилглицерола. Поэтому термин "активность диацилглицерол ацилтрансферазы" обозначает перенос ацил-КоА к диацилглицеролу с образованием триацилглицерола. Существует три известных вида ДГАТ, обозначенных как ДГАТ1, ДГАТ2 и ДГАТ3 соответственно. Полипептиды ДГАТ1 обычно содержат 10 трансмембранных доменов, ДГАТ2 обычно содержат 2 трансмембранных домена, тогда как ДГАТ3 обычно является растворимым. Примеры полипептидов ДГАТ1 включают полипептиды, кодируемые генами ДГАТ1 из *Aspergillus fumigatus* (номер доступа XP\_755172), *Arabidopsis thaliana* (САВ44774), *Ricinus communis* (ААР11479), *Vernicia fordii* (АВС94472), *Vernonia galamensis* (АВВ21945, АВВ21946), *Euonymus alatus* (ААВ31083), *Caenorhabditis elegans* (ААФ82410), *Rattus norvegicus* (NР 445889), *Homo sapiens* (NР036211), а также их варианты и/или мутанты. Примеры полипептидов ДГАТ2 включают полипептиды, кодируемые генами ДГАТ2 из *Arabidopsis thaliana* (номер доступа NР566952), *Ricinus communis* (ААУ16324), *Vernicia fordii* (АВС94474), *Mortierella ramanniana* (ААК84179), *Homo sapiens* (Q96PD7, Q58HT5), *Bos taurus* (Q70VD8), *Mus musculus* (ААК84175), *Micromonas CСMP1545*, а также их варианты и/или мутанты. Примеры полипептидов ДГАТ3 включают полипептиды, кодируемые генами ДГАТ3 из арахиса (*Arachis hypogaea*, Saha, et al., 2006), а также их варианты и/или мутанты.

Полипептиды/пептиды.

Термин "рекомбинантный" в контексте полипептида обозначает полипептид, который вырабатывается клеткой или неклеточной системой экспрессии в измененном количестве или с измененной скоростью, по сравнению с его природным состоянием, если он вырабатывается природным путем. В одном варианте клетка представляет собой клетку, которая в природе не вырабатывает полипептид. Однако клетка может представлять собой клетку, которая содержит неэндогенный ген, который приводит к выработке модифицированного количества полипептида. Рекомбинантный полипептид по изобретению включает полипептиды в клетке, ткани, органе или организме, или неклеточной системе экспрессии, в которой он вырабатывается, т.е. полипептид, который не был очищен или отделен от других компонентов трансгенной (рекомбинантной) клетки, в которой он был продуцирован, и полипептидов, продуцированных в таких клетках или неклеточных системах, которые впоследствии очищают, по меньшей мере, от некоторых других компонентов.

Термины "полипептид" и "белок" в общем используются равнозначно.

Полипептид или класс полипептидов может быть определен по степени идентичности (% идентичности) его последовательности аминокислот референтной последовательности аминокислот, или по большему % идентичности одной референтной последовательности аминокислот, чем другой. % идентичности полипептида референтной последовательности аминокислот обычно определяется анализом GАР (Needleman and Wunsch, 1970; программа GCG) с параметрами штраф на открытие промежутка = 5, и штрафом на продление промежутка = 0,3. Длина последовательности запроса составляет по меньшей мере 15 аминокислот, и анализ GАР выравнивает две последовательности на протяжении участка длиной по меньшей мере 15 аминокислот. Более предпочтительно длина последовательности запроса составляет по меньшей мере 50 аминокислот, и анализ GАР выравнивает две последовательности на протяжении участка длиной по меньшей мере 50 аминокислот. Более предпочтительно длина последовательности запроса составляет по меньшей мере 100 аминокислот, и анализ GАР выравнивает две последовательности на протяжении участка длиной по меньшей мере 100 аминокислот. Даже более предпочтительно длина последовательности запроса составляет по меньшей мере 250 аминокислот, и анализ GАР выравнивает две последовательности на протяжении участка длиной по меньшей мере 250 аминокислот. Даже более предпочтительно анализ GАР выравнивает две последовательности на протяжении их полной длины. Полипептид или класс полипептидов может обладать такой же ферментной активностью или иной активностью или не обладать активностью референтного полипептида. Предпочтительно полипептид обладает ферментной активностью по меньшей мере 10, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75 или по меньшей мере 90% от активности референтного полипептида.

"Биологически активный фрагмент" представляет собой часть полипептида, определенного в настоящем документе, которая сохраняет определенную активность полноразмерного референтного полипептида, например, обладающую активностью десатуразы и/или элонгазы или другой ферментной активностью. Биологически активные фрагменты в настоящем документе исключают полноразмерный по-

липептид. Биологически активные фрагменты могут быть частью любого размера, до тех пор, пока они сохраняют определенную активность. Предпочтительно биологически активный фрагмент сохраняет по меньшей мере 10, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75 или по меньшей мере 90% активности полноразмерного белка.

Относительно определенного полипептида или фермента, необходимо понимать, что % идентичности, превышающий раскрытые в настоящем документе, включает предпочтительные варианты. Таким образом, если это уместно, в свете минимума % идентичности предпочтительно, чтобы полипептид/фермент содержал последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, более предпочтительно по меньшей мере на 65, более предпочтительно по меньшей мере на 70, более предпочтительно по меньшей мере на 75, более предпочтительно по меньшей мере на 80, более предпочтительно по меньшей мере на 85, более предпочтительно по меньшей мере на 90, более предпочтительно по меньшей мере на 91, более предпочтительно по меньшей мере на 92, более предпочтительно по меньшей мере на 93, более предпочтительно по меньшей мере на 94, более предпочтительно по меньшей мере на 95, более предпочтительно по меньшей мере на 96, более предпочтительно по меньшей мере на 97, более предпочтительно по меньшей мере на 98, более предпочтительно по меньшей мере на 99, более предпочтительно по меньшей мере на 99,1, более предпочтительно по меньшей мере на 99,2, более предпочтительно по меньшей мере на 99,3, более предпочтительно по меньшей мере на 99,4, более предпочтительно по меньшей мере на 99,5, более предпочтительно по меньшей мере на 99,6, более предпочтительно по меньшей мере на 99,7, более предпочтительно по меньшей мере на 99,8 и даже более предпочтительно по меньшей мере на 99,9% идентична указанной в связи с ней SEQ ID NO.

Варианты/мутанты аминокислотной последовательности полипептидов, раскрытых в настоящем документе, могут быть получены посредством введения подходящих модификаций нуклеотидов в нуклеиновую кислоту, раскрытую в настоящем документе, или синтеза целевого полипептида *in vitro*. Такие варианты/мутанты включают, например, делеции, вставки или замены остатков в пределах последовательности аминокислот. Комбинация делеции, вставки и замены может быть осуществлена таким образом, чтобы получить конечную конструкцию, при условии, что конечный пептидный продукт обладает желательной ферментной активностью.

Мутантные (модифицированные) пептиды могут быть получены с применением любой техники, известной из уровня техники. Например, полинуклеотид, раскрытый в настоящем документе, может быть обработан методами мутагенеза *in vitro* или тасования ДНК, как подробно описано Нагауама (1998). Скрининг продуктов, получаемых из видоизмененной/модифицированной ДНК, может быть с легкостью проведен с применением способов, раскрытых в настоящем документе, для определения того, обладают ли они, например, десатуразной или элонгазной активностью.

При конструировании мутантов последовательности аминокислот, местоположение сайта мутации и природа мутации будут зависеть от характеристики(ик), которую модифицируют. Сайты для мутации могут быть модифицированы индивидуально или посериально, например, посредством: (1) замены вначале выбранных консервативных аминокислот, а затем более радикальных замен, в зависимости от достигнутых результатов, (2) удаления остатка-мишени или (3) вставки других остатков, смежных с размещенным сайтом.

Делеции в аминокислотной последовательности в общем варьируют от приблизительно 1 до 15 остатков, более предпочтительно от приблизительно 1 до 10 остатков и обычно приблизительно от 1 до 5 смежных остатков.

В мутантах замены удален по меньшей мере один остаток аминокислоты в молекуле полипептида, и другой остаток вставлен на его место. Наиболее интересные положения для мутагенеза посредством замены включают сайты, которые не являются консервативными в природных десатуразах или элонгазах. Эти сайты предпочтительно заменяются относительно консервативным образом для того, чтобы сохранить активность фермента. Такие консервативные замены проиллюстрированы в табл. 3 под заголовком "примеры замен".

В предпочтительном варианте мутантный/вариантный полипептид содержит только или не более чем один или два или три или четыре консервативные модификации аминокислоты, по сравнению с природным полипептидом. Подробности консервативных модификаций аминокислот приведены в табл. 3. Как будет понятно квалифицированному специалисту, такие незначительные модификации могут в разумных пределах быть спрогнозированы как не влияющие на активность полипептида, при экспрессии в рекомбинантной клетке.

Полипептиды могут быть получены различными путями, в том числе продуцирование и выделение природных полипептидов или рекомбинантных полипептидов в соответствии с методами, известными из уровня техники. В одном варианте реализации рекомбинантный полипептид вырабатывается культивируемой клеткой, способной экспрессировать полипептид в условиях, эффективных для выработки полипептида, например клеткой-хозяином, раскрытой в настоящем документе. Более предпочтительной клеткой для выработки полипептида является клетка в растении, особенно в семени в растении.

Полинуклеотиды.

Кроме того, в изобретении раскрываются и/или применяются полинуклеотиды, которые могут представлять собой, например, ген, выделенный полинуклеотид, химерную генетическую конструкцию, такую как молекула Т-ДНК или химерная ДНК. Это может быть ДНК или РНК геномного или синтетического происхождения, двухцепочечная или одноцепочечная, а также комбинированная с углеводом, липидами, белком или другими материалами для осуществления конкретной активности, раскрытой в настоящем документе. Термин "полинуклеотид" используется в настоящем документе равнозначно с термином "молекула нуклеиновой кислоты". Под "выделенным полинуклеотидом" мы подразумеваем полинуклеотид, который, при получении из природного источника, был отделен от полинуклеотидных последовательностей, с которыми он ассоциирован или связан в природном состоянии, или не встречающийся в природе полинуклеотид. Предпочтительно выделенный полинуклеотид является по меньшей мере на 60% свободным, более предпочтительно по меньшей мере на 75% свободным и более предпочтительно по меньшей мере на 90% свободным от других компонентов, с которыми он связан в природе.

Таблица 3

## Примеры замен

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

В варианте реализации полинуклеотид по изобретению не встречается в природе. Примеры не встречающихся в природе полинуклеотидов включают, без ограничения, мутировавшие (например, в результате применения способов, раскрытых в настоящем документе), и полинуклеотиды, в которых открытая рамка считывания, кодирующая белок, функционально связана с промотором, с которым она не связана в природе (например, в конструкциях, раскрытых в настоящем документе).

В настоящем документе термин "ген" используется в самом широком контексте и включает дезоксирибонуклеотидные последовательности, содержащие транскрибированный участок и, в случае трансляции, участок кодирования белка структурного гена, включая последовательности, размещенные смежно с кодирующим участком на 5'- и 3'-концах на расстоянии по меньшей мере приблизительно 2 тысячи пар оснований на любом конце, которые принимают участие в экспрессии гена. В этом отношении, ген содержит контрольные сигналы, например промоторы, энхансеры, сигналы терминации и/или полиаденилирования, которые в природе ассоциированы с данным геном, или гетерологичные контрольные сигналы, и в этом случае ген носит название "химерного гена". Последовательности, которые размещены на 5'-конце кодирующего белок участка, и которые присутствуют на мРНК, обозначаются как 5'-нетранслируемые последовательности. Последовательности, которые размещены на 3'-конце или ниже по отношению к кодирующему белок участку, и которые присутствуют на мРНК, обозначаются как 3'-нетранслируемые последовательности. Термин "ген" включает кДНК и геномные формы гена. Геномная форма или клон гена содержит кодирующий участок, который может прерываться некодирующими последовательностями под названием "интроны" или "промежуточные участки" или "промежуточные последовательности".

Интроны представляют собой сегменты гена, которые транскрибированы в ядерную РНК (гетерогенную ядерную РНК, гЯРНК). Интроны могут содержать регуляторные элементы, например энхансеры. Интроны удаляют или "сращивают" с ядерным или первичным транскриптом; таким образом, интроны отсутствуют в транскрипте матричной РНК (мРНК). Функция мРНК в ходе трансляции состоит в конкретизации последовательности или порядка аминокислот в возникающем полипептиде. Термин "ген" включает синтетическую или слитую молекулу, кодирующую все или часть белков по изобретению, раскрытых в настоящем документе, и комплементарную нуклеотидную последовательность к любому из упомянутого выше.

В настоящем документе "химерная ДНК" или "химерная генетическая конструкция" обозначает любую молекулу ДНК, которая не является природной молекулой ДНК в ее природном местоположении, также обозначаемую в настоящем документе как "конструкция ДНК". Обычно химерная ДНК или химерный ген содержит регуляторную и транскрибируемую или кодирующую белок последовательности, которые не найдены функционально связанными друг с другом в природе, т.е. которые гетерологичны по отношению друг к другу. Соответственно химерная ДНК или химерный ген могут содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из различных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из одного источника, но организованные отличным образом от найденных в природе.

Термин "эндогенный" используется в настоящем документе для обозначения субстанции, которая обычно присутствует или продуцируется, например, в немодифицированном растении на такой же стадии развития, что и исследуемое растение. "Эндогенный ген" обозначает природный ген в его естественном положении в геноме организма. В настоящем документе "молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты", "рекомбинантный полинуклеотид" или их вариации обозначают молекулу нуклеиновой кислоты, которая конструируется или модифицируется с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Термины "чужеродный полинуклеотид" или "экзогенный полинуклеотид" или "гетерологичный полинуклеотид" и подобные обозначают любую нуклеиновую кислоту, которая введена в геном клетки с помощью экспериментальных манипуляций. Чужеродные или экзогенные гены могут представлять собой гены, вставленные в неприродный организм, природные гены, которые введены в новое местоположение в пределах природного хозяина, или химерные гены. "Трансген" представляет собой ген, который введен в геном процедурой трансформации. Термины "генетически модифицированный", "трансгенный" и их вариации включают введение генов в клетки посредством трансформации или трансдукции, мутацию генов в клетках и модификацию или модулирование регуляции гена в клетке или организмах, с которыми осуществлялись указанные действия, или их потомстве. "Геномный участок" в настоящем документе обозначает положение в пределах генома, в котором трансген или группа трансгенов (также обозначенная в настоящем документе как кластер) вставлены в клетку или ее предка. Такие участки включают только нуклеотиды, которые введены путем вмешательства человека, например, способами, раскрытыми в настоящем документе.

Термин "экзогенный" в контексте полинуклеотида обозначает полинуклеотид, присутствующий в клетке в измененном количестве, по сравнению с его природным состоянием. В одном варианте реализации клетка представляет собой клетку, которая в природе не содержит полинуклеотида. Однако клетка может быть клеткой, которая содержит неэндогенный полинуклеотид, что приводит к изменению уровня выработки кодируемого полипептида. Экзогенный полинуклеотид по изобретению включает полинуклеотиды, которые не отделены от других компонентов трансгенной (рекомбинантной) клетки или неклеточной системы экспрессии, в которой он присутствует, и полинуклеотиды, продуцированные в таких клетках или неклеточных системах, которые впоследствии были очищены, по меньшей мере, от некоторых других компонентов. Экзогенный полинуклеотид (нуклеиновая кислота) может представлять собой непрерывную цепь нуклеотидов, существующую в природе, или содержать два или более смежных нуклеотидных участков из различных источников (природных и/или синтетических), соединенных таким образом, чтобы образовать единый полинуклеотид. Обычно такие химерные полинуклеотиды содержат, по меньшей мере, открытую рамку считывания, кодирующую полипептид по изобретению, функционально связанный с промотором, подходящим для управления транскрипцией открытой рамки считывания в целевой клетке.

В настоящем документе термин "различные экзогенные полинуклеотиды" или его вариации означают, что нуклеотидная последовательность каждого полинуклеотида отличается по меньшей мере одним, предпочтительно более нуклеотидами. Полинуклеотиды кодируют РНК, которые могут транслироваться или не транслироваться в белок в пределах клетки. В примере, каждый полинуклеотид предпочтительно кодирует белок с отличающейся активностью. В другом примере каждый экзогенный полинуклеотид менее чем на 95, менее чем на 90 или менее чем на 80% идентичен другим экзогенным полинуклеотидам. Предпочтительно экзогенные полинуклеотиды кодируют функциональные белки/ферменты. Кроме того, различные экзогенные полинуклеотиды предпочтительно являются частично не перекрывающимися в том смысле, что каждый полинуклеотид представляет собой четкий участок, например внехромосомно переносимую нуклеиновую кислоту, которая частично не перекрывается с другим экзогенным полинуклеотидом. По меньшей мере, каждый экзогенный полинуклеотид содержит сайт старта и

остановки транскрипции, а также обозначенный промотор. Отдельный экзогенный полинуклеотид может включать или не включать интроны.

Относительно раскрытых полинуклеотидов необходимо понимать, что более высокий % идентичности, чем раскрытые выше, будет включать предпочтительные варианты. Таким образом, если это уместно, в свете минимального % идентичности, полинуклеотид предпочтительно содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 60, более предпочтительно по меньшей мере на 65, более предпочтительно по меньшей мере на 70, более предпочтительно по меньшей мере на 75, более предпочтительно по меньшей мере на 80, более предпочтительно по меньшей мере на 85, более предпочтительно по меньшей мере на 90, более предпочтительно по меньшей мере на 91, более предпочтительно по меньшей мере на 92, более предпочтительно по меньшей мере на 93, более предпочтительно по меньшей мере на 94, более предпочтительно по меньшей мере на 95, более предпочтительно по меньшей мере на 96, более предпочтительно по меньшей мере на 97, более предпочтительно по меньшей мере на 98, более предпочтительно по меньшей мере на 99, более предпочтительно по меньшей мере на 99,1, более предпочтительно по меньшей мере на 99,2, более предпочтительно по меньшей мере на 99,3, более предпочтительно по меньшей мере на 99,4, более предпочтительно по меньшей мере на 99,5, более предпочтительно по меньшей мере на 99,6, более предпочтительно по меньшей мере на 99,7, более предпочтительно по меньшей мере на 99,8 и даже более предпочтительно по меньшей мере на 99,9% идентична соответствующей указанной SEQ ID NO.

Полинуклеотид по настоящему изобретению может селективно гибридизоваться, в строгих условиях с полинуклеотидом, который кодирует полипептид по настоящему изобретению. В настоящем документе строгие условия представляют собой следующее: (1) применение в ходе гибридизации денатурирующего агента, такого как формамид, например 50% (об./об.) формамида, содержащего 0,1% (мас./об.) альбумина телячьей сыворотки, 0,1% фикола, 0,1% поливинилпирролидона, 50 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 6,5, содержащего 750 мМ NaCl, 75 мМ натрия цитрата при 42°C; или (2) применение 50% формамида, 5 × натрия хлорид + натрия цитрат (ХЦН, 0,75 М NaCl, 0,075 М натрия цитрата), 50 мМ натрия фосфата (pH 6,8), 0,1% натрия пиродифосфата, 5х раствор Денхардта, обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося (50 г/мл), 0,1% натрия додецилсульфата и 10% декстрана сульфата при 42°C в 0,2 × натрия хлорид + натрия цитрат и 0,1% натрия додецилсульфата и/или (3) применение низкой ионной силы и высокотемпературного промывания, например 0,015 М NaCl/0,0015 М натрия цитрата/0,1% натрия додецилсульфата при 50°C.

Полинуклеотиды по изобретению могут содержать, по сравнению с встречающимися в природе молекулами, одну или больше мутаций, которые представляют собой делеции, вставки или замены нуклеотидных остатков. Полинуклеотиды, которые содержат мутации относительно референтной последовательности, могут быть природными (т.е. выделенными из природного источника) или синтетическими (например, полученными в результате сайт-направленного мутагенеза или тасования ДНК из нуклеиновой кислоты, как раскрыто выше). Таким образом, очевидно, что полинуклеотиды по изобретению могут быть получены из природного источника или могут быть рекомбинантными. Предпочтительными полинуклеотидами являются содержащие кодирующие участки, которые кодон-оптимизированы для трансляции в клетках растения, как известно из уровня техники.

Рекомбинантные векторы.

Один вариант реализации настоящего изобретения включает рекомбинантный вектор, который содержит по меньшей мере одну молекулу полинуклеотида, раскрытую в настоящем документе, вставленную в любой вектор, способный доставить молекулу полинуклеотида в клетку-хозяина. Рекомбинантные векторы включают векторы экспрессии. Рекомбинантные векторы содержат гетерологичные полинуклеотидные последовательности, т.е. полинуклеотидные последовательности, которые в природе не найдены смежными с молекулами полинуклеотида, раскрытыми в настоящем документе, которые предпочтительно получены из других видов, нежели те из которых получена(ы) молекула(ы) полинуклеотида. Вектор может представлять собой РНК или ДНК, и обычно является плазмидой. Плазмидные векторы обычно содержат дополнительные последовательности нуклеиновых кислот, которые обеспечивают простоту селекции, амплификации и трансформации кассеты экспрессии в прокариотных клетках, например полученные из pUC векторы, полученные из pSK векторы, полученные из pGEM векторы, полученные из pSP векторы, полученные из pBS векторы, или предпочтительно бинарные векторы, содержащие один или более участков Т-ДНК. Дополнительные последовательности нуклеиновых кислот включают источники репликации для обеспечения автономной репликации вектора, гены селекционных маркеров, предпочтительно кодирующие резистентность к антибиотику или гербициду, уникальные множественные сайты клонирования, обеспечивающие множественные сайты вставки последовательностей нуклеиновых кислот или генов, кодируемых в конструкции нуклеиновой кислоты, и последовательности, которые повышают активность трансформации прокариотных и эукариотных (особенно растительных) клеток. Рекомбинантный вектор может содержать более чем один полинуклеотид, раскрытый в настоящем документе, например три, четыре, пять или шесть полинуклеотидов, раскрытых в настоящем документе, в комбинации, предпочтительно химерную генетическую конструкцию по изобретению, в которой каждый



полинуклеотид функционально связан с последовательностями контроля экспрессии, которые активны в целевой клетке. Более чем один полинуклеотид, раскрытый в настоящем документе, например 3, 4, 5 или 6 полинуклеотидов, предпочтительно ковалентно соединены в едином рекомбинантном векторе, предпочтительно в пределах единой молекулы Т-ДНК, которая в дальнейшем может быть введена как единая молекула в клетку, с получением рекомбинантной клетки по изобретению, и предпочтительно интегрирована в геном рекомбинантной клетки, например, в трансгенном растении. Таким образом, полинуклеотиды, соединенные таким способом, будут унаследованы вместе как единый генетический локус у потомка рекомбинантной клетки или растения. Рекомбинантный вектор или растение может содержать два или более таких рекомбинантных векторов, каждый из которых содержит несколько полинуклеотидов, например каждый рекомбинантный вектор содержит 3, 4, 5 или 6 полинуклеотидов.

"Функционально связанный" в настоящем документе обозначает функциональное взаимоотношение между двумя или более сегментами нуклеиновой кислоты (например, ДНК). Обычно это обозначает функциональное взаимоотношение транскрипционного регуляторного элемента (промотора) и транскрибируемой последовательности. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, такой как полинуклеотид, раскрытый в настоящем документе, если он стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в подходящей клетке. В общем, транскрипционные регуляторные элементы промотора, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, являются физически смежными с транскрибируемой последовательностью, т.е. они являются *cis*-действующими. Однако для некоторых транскрипционных регуляторных элементов, таких как энхансеры, нет необходимости быть физически смежными или расположенными в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, транскрипцию которых они увеличивают.

Если присутствуют несколько промоторов, каждый промотор может независимо быть таким же или отличным.

Кроме того, рекомбинантные молекулы, например химерные ДНК или генетические конструкции, могут содержать: (а) один или более секреторных сигналов, кодирующих сигнальные пептидные последовательности, чтобы позволить экспрессируемому полипептиду, раскрытому в настоящем документе, секретироваться из клетки, которая вырабатывает полипептид, или которая обеспечивает локализацию экспрессируемого полипептида, например, для удержания полипептида в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) клетки или переноса в пластиду, и/или (б) слитые последовательности, которые приводят к экспрессии молекул нуклеиновых кислот как слитых белков. Примеры подходящих сигнальных сегментов включают любой сигнальный сегмент, способный направлять секрецию или локализацию полипептида, раскрытого в настоящем документе. Дополнительно, рекомбинантные молекулы могут содержать промежуточные и/или нетранслируемые последовательности, вокруг и/или в пределах последовательностей нуклеиновых кислот молекул нуклеиновых кислот, раскрытых в настоящем документе.

Чтобы упростить идентификацию трансформантов, желательно, чтобы конструкция нуклеиновой кислоты содержала ген селекционного или скринингового маркера как, или в дополнение к чужеродному или экзогенному полинуклеотиду. "Ген маркера" обозначает ген, который придает отличный фенотип клеткам, экспрессирующим ген маркера, таким образом, что трансформированные клетки отличаются от клеток, не содержащих маркера. Ген селекционного маркера предоставляет признак, по которому можно "осуществлять селекцию" на основании резистентности к селекционному агенту (например, гербицид, антибиотик, излучение, тепло или другой вид обработки, повреждающий нетрансформированные клетки). Ген пригодного для скрининга маркера (или репортерный ген) обеспечивает признак, по которому можно идентифицировать, посредством наблюдения или тестирования, например посредством "скрининга" (например, активность  $\beta$ -глюкуронидазы, люциферазы, зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ) или другого фермента, отсутствующую в нетрансформированных клетках). Ген маркера и целевая нуклеотидная последовательность не должны быть связаны. Фактически выбор маркера не является критическим, до тех пор, пока он функционален (т.е. селективен) в сочетании с клетками выбора, такими как растительная клетка.

Примерами бактериальных селекционных маркеров являются маркеры, которые обеспечивают резистентность к антибиотикам, например резистентность к ампициллину, эритромицину, хлорамфениколу или тетрациклину, предпочтительно резистентность к канамицину. Примеры селекционных маркеров для селекции растений-трансформантов включают, без ограничения, ген *hug*, который кодирует резистентность к гигромицину В; ген неомидин фосфотрансферазы (*nptII*), обеспечивающий резистентность к канамицину, паромомицину, G418; ген глутатион-S-трансферазы из печени крыс, обеспечивающий резистентность к гербицидам-производным глутатиона, таким как, например, раскрытые в EP 256223; гена глутаминсинтетазы, при чрезмерной экспрессии обеспечивающий резистентность к ингибиторам глутаминсинтетазы, таким как фосфинотрицин, например, раскрытый в WO 87/05327, ген ацетилтрансферазы из *Streptomyces viridochromogenes*, обеспечивающий резистентность к селекционному агенту фосфинотрипину, например, раскрытый в EP 275957, ген, кодирующий 5-енолпирикат-3-фосфат синтаза (ЭШФС), обеспечивающий переносимость N-фосфонометилглицина, например, раскрытый Hinchee et al. (1988), ген *bar*, обеспечивающий резистентность к биалафосу, например, раскрытый в WO91/02071; ген нитрилазы, например, *bxn* из *Klebsiella ozaenae*, который обеспечивает резистентность к бромоксилину

(Stalker et al., 1988); ген дигидрофолатредуктазы (ДФР), обеспечивающий резистентность к метотрексату (Thillet et al., 1988); мутантный ген ацетолактатсинтазы (АЛС), который обеспечивает резистентность к имидазолинону, сульфонилмочевине или другим ингибирующим АЛС химическим веществам (EP 154204); мутировавший ген антранилат синтазы, который обеспечивает резистентность к 5-метилтриптофану; или ген далапон дегалогеназы, который обеспечивает резистентность к гербициду.

Предпочтительные скрининговые маркеры включают, без ограничения, ген *uidA*, кодирующий β-глюкуронидазу (GUS), фермент, для которого известны различные хромогенные субстраты, ген зеленого флуоресцентного белка (Niedz et al., 1995) или его производные; ген люциферазы (*luc*) (Ow et al., 1986), который позволяет обнаружить биолюминесценцию, и другие, известные из уровня техники. "Молекулой репортера" в настоящем документе называется молекула, которая, по своей химической природе, обеспечивает аналитически идентифицируемый сигнал, упрощающий определение активности промотора на основании белкового продукта.

Предпочтительно конструкция нуклеиновой кислоты стабильно инкорпорирована в геном клетки, например растительной клетки. Соответственно нуклеиновая кислота может содержать подходящие элементы, которые позволяют молекуле инкорпорироваться в геном, предпочтительно последовательности правой и левой грани молекулы Т-ДНК, или конструкция размещена в подходящем векторе, который может быть инкорпорирован в хромосому клетки.

#### Экспрессия.

В настоящем документе вектор экспрессии представляет собой вектор ДНК, который способен трансформировать клетку-хозяина и осуществлять экспрессию одной или более указанных молекул полинуклеотида. Предпочтительные векторы экспрессии по настоящему изобретению могут направлять экспрессию гена в дрожжевых и/или растительных клетках. Векторы экспрессии, пригодные в соответствии с изобретением, содержат регуляторные последовательности, например последовательности для контроля транскрипции, последовательности для контроля трансляции, источники репликации и другие регуляторные последовательности, которые совместимы с рекомбинантной клеткой и которые управляют экспрессией молекул полинуклеотида по настоящему изобретению. В частности, полинуклеотиды или векторы, пригодные в соответствии с настоящим изобретением, содержат последовательности для контроля транскрипции. Последовательности для контроля транскрипции представляют собой последовательности, которые управляют инициацией, элонгацией и терминацией транскрипции. Особенно важными последовательностями для контроля транскрипции являются такие, которые управляют инициацией транскрипции, например последовательности промотора и энхансера. Подходящие последовательности для контроля транскрипции включают любую последовательность для контроля транскрипции, которая может функционировать по меньшей мере в одной из рекомбинантных клеток по настоящему изобретению.

Выбор используемых регуляторных последовательностей зависит от организма-мишени, такого как растение, и/или органа-мишени или целевой ткани. Такие регуляторные последовательности могут быть получены из любого эукариотного организма, такого как растения, или вирусы растений, или могут быть химически синтезированы. Множество таких последовательностей для контроля транскрипции известно специалистам из уровня техники. Особенно предпочтительными последовательностями для контроля транскрипции являются промоторы, активно направляющие транскрипцию в растениях, конститутивно или специфичным для стадии и/или ткани образом, в зависимости от использования растения или его частей.

Целый ряд векторов, подходящих для стабильной трансфекции растительных клеток или получения трансгенных растений, описаны, например, в Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, supp. 1987; Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989 и Gelvin et al., *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, 1990. Обычно векторы экспрессии в растениях содержат, например, один или более клонированных генов растения под транскрипциональным контролем 5'- и 3'-регуляторных последовательностей и доминантный селекционный маркер. Дополнительно, такие векторы экспрессии в растениях могут содержать регуляторный участок промотора (например, регуляторный участок, управляющий индуцибельной или конститутивной, регулируемой условиями окружающей среды или стадией развития, или клеточно- или тканеспецифичной экспрессией), сайт-сайт инициации транскрипции, сайт связывания с рибосомой, сигнал процессинга РНК, сайт терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования.

Описан целый ряд конститутивных промоторов, которые активны в клетках растения. Подходящие промоторы для конститутивной экспрессии в растениях включают, без ограничения, промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV), 35S мозаичного вируса норичника шишковатого (FMV), промотор палочковидного вируса сахарного тростника, промотор вируса желтой крапчатости коммелины, индуцибельный светом промотор из маленькой субъединицы рибулозо-1,5-бис-фосфат карбоксилазы, промотор цитозольной триосефосфат изомеразы риса, промотор аденин фосфорибозилтрансферазы *Arabidopsis*, промотор гена рисового актлина 1, промоторы маннопинсинтазы и октопинсинтазы, промотор *Adh*, промотор синтазы сахарозы, промотор комплекса R гена и промотор гена хлорофилл-связывающего белка

$\alpha/\beta$ .

С целью экспрессии в исходных тканях растения, таких как лист, семя, корень или стебель, промоторам, используемым в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно свойственна относительно высокая экспрессия в этих конкретных тканях. Для данной цели можно осуществлять выбор из целого ряда промоторов для генов с ткане- или клеточноспецифичной или -усиленной экспрессией. Примеры таких промоторов, известные из литературы, включают промотор глутамин синтетазы GS2 из хлоропласта гороха, промотор фруктозо-1,6-бисфосфатазы хлоропласта из пшеницы, промотор ядерного фотосинтетического ST-LS 1 из картофеля, промотор серин/треонин киназы и промотор глюкоамилазы (CHS) из *Arabidopsis thaliana*. Также сообщалось об активности в фотосинтетически активных тканях промоторов риболозо-1,5-бисфосфат карбоксилазы и промоторов Cab.

Различные промоторы растительных генов, которые регулируются в ответ на экологические, гормональные, химические и/или связанные с развитием сигналы, также могут использоваться для экспрессии генов в клетках растения, в том числе промоторы, регулируемые (1) нагреванием, (2) освещением (например, промотор RbcS-3A гороха, промотор RbcS маиса); (3) гормонами, например абсцизиновой кислотой, (4) повреждениями (например, Wun1) или (5) химическими веществами, например метилжасмонатом, салициловой кислотой, стероидными гормонами, спиртом, сафенерами (WO97/06269), или может быть предпочтительным использование (6) орган-специфичных промоторов.

В настоящем документе термин "промотор, специфичный для семени растения" или его вариации обозначает промотор, который предпочтительно, по сравнению с другими тканями растения, направляет транскрипцию гена в развивающемся семени растения. В варианте реализации промотор, специфичный для семени, экспрессируется по меньшей мере в 5 раз активнее в развивающемся семени растения относительно листьев и/или стеблей растения, и предпочтительно экспрессируется активнее в эмбрионе развивающегося семени, по сравнению с другими тканями растения. Предпочтительно промотор только направляет экспрессию целевого гена в развивающемся семени, и/или экспрессия целевого гена в других частях растения, таких как листья, не может быть обнаружена нозерн-блоттингом и/или ОТ-ПЦР. Обычно промотор управляет экспрессией генов в процессе роста и развития семени, в частности в ходе фазы синтеза и аккумуляции запасных веществ в семени. Такие промоторы могут управлять экспрессией гена в целом запасном органе растения или только в его части, например оболочке семени или семядоле(ях), предпочтительно в эмбрионах, в семенах двудольных растений или эндосперме или алейроновом слое семян однодольных растений.

Предпочтительные промоторы специфичной для семени экспрессии включают: i) промоторы из генов, кодирующих ферменты, принимающие участие в биосинтезе жирных кислот и их аккумуляции в семенах, например десатуразы и элонгазы, ii) промоторы из генов, кодирующих запасные белки для хранения в семени, и iii) промоторы из генов, кодирующих ферменты, принимающие участие в биосинтезе углеводов и их аккумуляции в семенах. Подходящими специфичными для семени промоторами являются промотор гена напина масличного рапса (US 5608152), промотор USP *Vicia faba* (Baumlein et al., 1991), промотор олеозина *Arabidopsis* (W098/45461), промотор фазеолина *Phaseolus vulgaris* (US 5504200), промотор Vse4 *Brassica* (WO91/13980) или промотор легумина LeB4 из *Vicia faba* (Baumlein et al., 1992), и промоторы, которые обеспечивают специфичную для семени экспрессию в однодольных, таких как маис, ячмень, пшеница, рожь, рис и т.п. В качестве подходящих следует отметить такие промоторы: промотор гена *lpt2* или *lpt1* ячменя (W095/15389 и W095/23230) или промоторы, раскрытые в WO99/16890 (промоторы из гена гордеина ячменя, гена глютелина риса, гена оризина риса, гена проламина риса, гена глиаина пшеницы, гена глютелина пшеницы, гена зеина маиса, гена глютелина овса, гена казирина сорго, гена секалина ржи). Другие промоторы включают раскрытые Broun et al. (1998), Potenza et al. (2004), US20070192902 и US20030159173. В варианте реализации специфичный для семени промотор предпочтительно экспрессируется в определенных частях семени, таких как эмбрион, семядоля(и) или эндосперм. Примеры таких специфичных промоторов включают, без ограничения, промотор FP1 (Ellerstrom et al., 1996), промотор легумина гороха (Peggin et al., 2000), промотор фитогемагглютинина боба (Peggin et al., 2000), промоторы конлинин 1 и конлинин 2 для генов, кодирующих запасные белки 2S льна (Cheng et al., 2010), промотор гена FAE1 из *Arabidopsis thaliana*, промотор VnGLP гена глобулин-подобного белка *Brassica napus*, промотор LPXR гена пероксиредоксина из *Linum usitatissimum*.

5'-нетранслируемая лидерная последовательность может быть получена из промотора, выбранного для экспрессии гетерологичной последовательности гена полинуклеотида по настоящему изобретению, или предпочтительно является гетерологичной относительно участка, кодирующего фермент, который вырабатывается, и может быть специфично модифицирована, при желании, таким образом, чтобы увеличить трансляцию мРНК. Обзор оптимизации экспрессии трансгенов см. в Koziel et al. (1996). Дополнительно, 5'-нетранслируемые участки могут быть получены из РНК вирусов растений (среди прочего, вирус мозаики табака, вирус гравировки табака, вирус карликовой мозаичности маиса, вирус мозаики люцерны), из подходящих эукариотных генов, растительных генов (лидер гена связывающегося белка  $\alpha/\beta$  хлорофилла пшеницы и маиса), или из синтетической последовательности гена. Настоящее изобретение не ограничивается конструкциями, в которых нетранслируемый участок получен из 5'-нетранслируемой последовательности, сопровождающей последовательность промотора. Дополнительно, лидерная после-

довательность может быть получена из неродственного промотора или кодирующей последовательности. Лидерные последовательности, пригодные в контексте настоящего изобретения, включают лидер Hsp70 маиса (US 5362865 и US 5859347) и омега-элемент вируса мозаики табака (TMV).

Терминация транскрипции обеспечивается 3'-нетранслируемой последовательностью ДНК, функционально связанной в химерном векторе с целевым полинуклеотидом. 3'-Нетранслируемый участок рекомбинантной молекулы ДНК содержит сигнал полиаденилирования, функционирующий в растениях, чтобы обеспечить добавление аденилатных нуклеотидов к 3'-концу РНК. 3'-Нетранслируемые участки могут быть получены из различных генов, которые экспрессируются в клетках растений. 3'-Нетранслируемый участок нопалинсинтазы, 3'-нетранслируемый участок из маленькой субъединицы гена Rubisco гороха, 3'-нетранслируемый участок из гена запасного белка 7S семени сои или гена конлина льна обычно используются в таком случае. 3'-Транскрибируемые, нетранслируемые участки, содержащие полиаденилатный сигнал индуцирующих опухоль (Ti) *Agrobacterium* плазмидных генов, также являются подходящими.

Технологии рекомбинантной ДНК могут применяться для улучшения экспрессии трансформированной молекулы полинуклеотида посредством манипуляции, например количеством копий молекулы полинуклеотида в пределах клетки-хозяина, эффективностью, с которой такие молекулы полинуклеотида транскрибируются, эффективностью, с которой образующиеся в результате копии транслируются, и эффективностью посттрансляционных модификаций. Рекомбинантные методы, пригодные для увеличения экспрессии молекул полинуклеотида, раскрытых в настоящем документе, включают, без ограничения, интеграцию молекулы полинуклеотида в одну или более хромосом клетки-хозяина, введение стабилизирующих последовательностей в мРНК, замены или модификации сигналов контроля транскрипции (например, промоторы, операторы, энхансеры), замены или модификации сигналов контроля трансляции (например, сайты связывания с рибосомой, последовательности Шайна-Дальгарно), модификацию молекул полинуклеотида для соответствия использованию кодонов в клетке-хозяине и деления последовательностей, которые дестабилизируют транскрипты.

Рекомбинантные клетки.

В изобретении также раскрывается рекомбинантная клетка, предпочтительно рекомбинантная клетка растения, которая является клеткой-хозяином, трансформированной одной или более рекомбинантных молекул, таких как полинуклеотиды, химерные генетические конструкции или рекомбинантные векторы, раскрытые в настоящем документе. Рекомбинантная клетка может содержать любую их комбинацию, например два или три рекомбинантных вектора или рекомбинантный вектор и один или более дополнительных полинуклеотидов или химерных ДНК. Пригодные клетки по изобретению включают любую клетку, которая может быть трансформирована полинуклеотидом, химерной ДНК или рекомбинантным вектором по изобретению, такую как молекула, кодирующая полипептид или фермент, раскрытый в настоящем документе. Предпочтительно клетка представляет собой клетку, которая, таким образом, пригодна для использования с целью получения ДЦ-ПНЖК. Рекомбинантная клетка может быть клеткой в культуре, клеткой *in vitro*, или в организме, таком как, например, растение, или в органе, таком как, например, семя или лист. Предпочтительно клетка находится в растении или части растения, более предпочтительно в семени растения.

Клетки-хозяева, в которые введен(ы) полинуклеотид(ы), могут быть нетрансформированными клетками или клетками, которые уже трансформированы по меньшей мере одной молекулой нуклеиновой кислоты. Такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть связаны с синтезом ДЦ-ПНЖК или не связаны с ним. Клетки-хозяева по настоящему изобретению могут быть эндогенно (т.е. естественным образом) способны к выработке белков, раскрытых в настоящем документе, и в этом случае рекомбинантная клетка, полученная из них, обладает повышенной способностью к выработке полипептидов, или они могут быть способны к выработке таких белков только после трансформации по меньшей мере одним полинуклеотидом по изобретению. В варианте реализации рекомбинантная клетка по изобретению обладает повышенной способностью к синтезу длинноцепочечной полиненасыщенной жирной кислоты. В настоящем документе термин "клетка с повышенной способностью к синтезу длинноцепочечной полиненасыщенной жирной кислоты" является относительным термином, посредством которого рекомбинантная клетка по изобретению сравнивается с клеткой-хозяином, в которой отсутствует(ют) полинуклеотид(ы) по изобретению, с рекомбинантной клеткой, продуцирующей полиненасыщенные жирные кислоты с более длинной цепью, или с большей концентрацией ДЦ-ПНЖК, например ДГК (относительно других жирных кислот), чем в природной клетке. Клетка с повышенной способностью к синтезу другого продукта, например другой жирной кислоты, липида, углевода, такого как крахмал, молекулы РНК, полипептида, фармацевтического или другого продукта, имеет соответствующее значение.

Клетки-хозяева по настоящему изобретению могут представлять собой любую клетку, способную к выработке по меньшей мере одного белка, раскрытого в настоящем документе, и включают клетки бактерий, грибов (в том числе дрожжей), паразитов, членистоногих, животных и растений. Клетки могут быть прокариотными или эукариотными. Предпочтительные клетки-хозяева представляют собой клетки дрожжей и растений. В предпочтительном варианте реализации клетка растения представляет собой клетку семени, в частности клетку в семядоле или эндосперме семени. В одном варианте реализации

клетка представляет собой животную клетку или водорослевую клетку. Животная клетка может принадлежать к любому виду животных, например клетка животного, не принадлежащего к человеческому роду, клетка позвоночного, не принадлежащего к человеческому роду, клетка млекопитающего, не принадлежащего к человеческому роду, или клетки водных животных, таких как рыба или ракообразные, беспозвоночных, насекомых, и т.п. Клетки могут принадлежать организму, пригодному для процесса ферментации. В настоящем документе термин "процесс ферментации" обозначает любой процесс ферментации или какой-нибудь процесс, содержащий стадию ферментации. Примеры ферментирующих микроорганизмов включают грибковые организмы, например дрожжи. В настоящем документе "дрожжи" включают вид *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlbergensis*, вид *Candida*, виды *Kluveromyces*, виды *Pichia*, вид *Hansenula*, вид *Trichoderma*, *Lipomyces starkey* и *Yarrowia lipolytica*. Предпочтительные дрожжи включают штаммы видов *Saccharomyces* и, в частности, *Saccharomyces cerevisiae*.

Трансгенные растения.

Дополнительно, в изобретении раскрывается растение, содержащее клетку по изобретению, например трансгенное растение, содержащее один или более полинуклеотидов по изобретению. Термин "растение" в настоящем документе как имя существительное обозначает целые растения, но при использовании в качестве прилагательного ("растительный") обозначает любую субстанцию, в которой присутствует, полученную из, происходящую из или связанную с растением, например органы растения (такие как листья, стебли, корни, цветы), единичные клетки (такие как пыльца), семена, растительные клетки, и т.п. Термин "часть растения" обозначает все части растения, которые содержат ДНК растения, в том числе вегетативные структуры, например листья или стебли, корни, цветочные органы или структуры, пыльца, семя, части семени, такие как эмбрион, эндосперм, щиток зародыша или оболочка семени, ткань растения, такую как сосудистая ткань, клетки и их потомство, до тех пор, пока часть растения синтезирует липид по изобретению.

"Трансгенное растение", "генетически модифицированное растение" или их вариации обозначают растение, которое содержит генетическую конструкцию ("трансген"), не найденную в растении дикого типа такого же вида, разновидности или сорта. Трансгенные растения в контексте настоящего изобретения включают растения и их потомство, генетически модифицированные с применением рекомбинантных методов, что приводит к выработке липида или по меньшей мере одного полипептида, раскрытого в настоящем документе в целевом растении или органе растения. Трансгенные клетки растения и трансгенные части растения имеют соответствующее значение. "Трансген" в настоящем документе имеет обычное значение для данной области биотехнологии и содержит генетическую последовательность, которая получена или модифицирована технологией рекомбинации ДНК или РНК, и которая введена в клетку по изобретению, предпочтительно клетку растения. Трансген может содержать генетические последовательности, полученные из клетки растения, которая может принадлежать к тому же виду, разновидности или сорту, что и клетка растения, в которую введен трансген, или к другому виду, разновидности или сорту, или из клетки, не являющейся растительной. Обычно трансген вводят в клетку, например растительную, посредством манипуляции человеком, например трансформации, причем может применяться любой способ на усмотрение специалиста в данной области.

Термины "семя" и "зерно" в настоящем документе используются равнозначно. "Зерно" обозначает зрелое зерно, например собранное в процессе сбора урожая зерно, или зерно, которое еще находится на растении, но готово для сбора урожая, а также может обозначать семя после набухания или прорастания, согласно контексту. Зрелое зерно или семя обычно содержит влагу в количестве менее чем приблизительно 18-20%. "Развивающееся семя" в настоящем документе обозначает семя до наступления зрелости, обычно найденное в репродуктивных структурах растения после оплодотворения или цветения, но может также обозначать такие семена до наступления зрелости, которые выделены из растения.

В настоящем документе термин "получение части растения" или "получение семени" обозначает любые средства для получения части растения или семени соответственно, в том числе сбор урожая частей растения или семян с растений в поле или в закрытом пространстве, таком как теплица или камера для роста, или покупку или получение от поставщика частей растения или семян. Семя может быть пригодным для насаждения, т.е. способным к прорастанию и образованию растения-потомка или, альтернативно, обработано таким образом, что больше не может прорасти, например расколотое, шлифованное или смолоченное семя, которое件годно для применения при получении пищевых продуктов или в питании, или для экстракции липида по изобретению.

В настоящем документе термин "запасающий орган растения" обозначает часть растения, специализирующуюся на хранении энергии в форме, например, белков, углеводов, жирных кислот и/или масел. Примерами запасующих органов растения являются семя, плод, клубневидные корни и клубни. Предпочтительным запасующим органом растения по изобретению является семя.

В настоящем документе термин "фенотипически нормальный" обозначает генетически модифицированное растение или орган растения, особенно запасующий орган, такой как семя, клубень или плод по изобретению, не обладающий в существенной мере сниженной способностью к росту и воспроизведению по сравнению с немодифицированным растением или органом растения. В варианте реализации генетически модифицированное растение или орган растения, которые являются фенотипически нормаль-

ными, содержат экзогенный полинуклеотид, кодирующий супрессор сайленсинга, функционально связанный с промотором, специфичным для запасающего органа растения, и обладает способностью к росту или воспроизводству, по существу такой же, как изогенное растение или орган, не содержащие указанного полинуклеотида. Предпочтительно биомасса, темпы роста, скорость прорастания, размер запасающего органа, размер семени и/или количество образованных жизнеспособных зерен составляет не менее 90% от показателей растения, не содержащего указанного экзогенного полинуклеотида, при выращивании в идентичных условиях. Данный термин не охватывает признаков растения, которое может отличаться от растения дикого типа, но которые не влияют на полноценность растения с точки зрения коммерческих целей, например фенотип балерины листьев саженца.

Растения, раскрытые или включенные для использования в практике настоящего изобретения, включают однодольные растения и двудольные растения. В предпочтительных вариантах реализации растения по настоящему изобретению представляют собой урожайные растения (например, злаковые и зернобобовые, маис, пшеницу, картофели, тапиоку, рис, сорго, просо, маниоку, ячмень или горох) или другие бобовые. Растения могут быть выращены для получения съедобных корней, клубней, листьев, стеблей, цветков или плода. Растения могут быть овощными или декоративными растениями. Растения по изобретению могут представлять собой: кукурузу (*Zea mays*), рапс (*Brassica napus*, подвид *Brassica para*), горчицу (*Brassica juncea*), лен (*Linum usitatissimum*), люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), подсолнечник (*Helianthus annuus*), пшеницу (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), арахис (*Arachis hypogaea*), хлопчатник (*Gossypium hirsutum*), сладкий картофель (*Lopmoea batatas*), маниоку (*Manihot esculenta*), кофе (вид *Cofea*), кокосовый орех (*Cocos nucifera*), ананас (*Anana comosus*), цитрусовое дерево (вид *Citrus*), какао (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia senensis*), банан (вид *Musa*), авокадо (*Persea americana*), смоковницу (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifer indica*), маслину (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), кэшью (*Anacardium occidentale*), макадамиию (*Macadamia intergrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), сахарную свеклу (*Beta vulgaris*), овес или ячмень.

В предпочтительном варианте реализации растение представляет собой покрытосеменное растение.

В варианте реализации растение представляет собой растение масличной культуры, предпочтительно урожайное растение масличной культуры. В настоящем документе "растение масличной культуры" представляет собой вид растения, используемый для коммерческого получения масел из семян растения. Растение масличной культуры может представлять собой масличный рапс (например, рапс), маис, подсолнечник, сою, сорго, лен (семя льна) или сахарную свеклу. Кроме того, растение масличной культуры может быть другими представителями *Brassica*, хлопчатником, арахисом, маком, горчицей, клещевинной обыкновенной, кунжутом, сафлором или дающим орехи растением. Растение может вырабатывать высокие уровни масла в плоде, например маслина, масличная пальма или кокосовый орех. Садовые растения, к которым может быть применено настоящее изобретение, представляют собой салат, эндивий или крестоцветные овощи, включая капусту, брокколи или цветную капусту. Настоящее изобретение может быть применено к табаку, тыквенным, моркови, землянике, помидору или перцу.

В еще одном предпочтительном варианте реализации реализации нетрансгенное растение, используемое для получения трансгенного растения по изобретению, вырабатывает масло, особенно в семени, которое содержит: i) менее 20, менее 10 или менее 5% жирных кислот 18:2 и/или ii) менее 10 или менее 5% жирных кислот 18:3.

В предпочтительном варианте реализации трансгенное растение является гомозиготным по всем и каждому введенному гену (трансгену), таким образом, что его потомство не разделяется для желательного фенотипа. Кроме того, трансгенное растение может быть гетерозиготным по введенному(ым) трансгену(ам), предпочтительно однородно гетерозиготным по трансгену, например, в потомстве F1, которое выращено из гибридного семени. Такие растения могут обеспечивать преимущества, например гибридную силу, хорошо известную из уровня техники.

Если это уместно, трансгенные растения могут содержать дополнительные трансгены, кодирующие ферменты, которые принимают участие в выработке ДЦ-ПНЖК, такие как, без ограничения,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 9$ -элонгаза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 6$ -элонгаза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\omega 3$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 5$ -элонгаза, диацилглицерол ацилтрансфераза, ЛФКАТ,  $\Delta 17$ -десатураза,  $\Delta 15$ -десатураза и/или  $\Delta 12$ -десатураза. Примеры таких ферментов с одним или более из указанных видов активности известны из уровня техники и включают раскрытые в настоящем документе. В конкретных примерах, трансгенное растение по меньшей мере содержит экзогенные полинуклеотиды, кодирующие:

- а)  $\Delta 4$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -элонгазу и  $\Delta 6$ -элонгазу,
- б)  $\Delta 4$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 8$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -элонгазу и  $\Delta 9$ -элонгазу,
- в)  $\Delta 4$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -элонгазу,  $\Delta 6$ -элонгазу и  $\Delta 15$ -десатуразу,
- г)  $\Delta 4$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 8$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -элонгазу,  $\Delta 9$ -элонгазу и  $\Delta 15$ -десатуразу,
- д)  $\Delta 4$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 6$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -элонгазу,  $\Delta 6$ -элонгазу и  $\Delta 17$ -десатуразу или
- е)  $\Delta 4$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -десатуразу,  $\Delta 8$ -десатуразу,  $\Delta 5$ -элонгазу,  $\Delta 9$ -элонгазу и  $\Delta 17$ -десатуразу.

В варианте реализации экзогенные полинуклеотиды кодируют набор полипептидов, которые пред-

ставляют собой  $\Delta 6$ -дезатуразу *Pythium irregulare*,  $\Delta 5$ -дезатуразу *Thraustochytrid* или  $\Delta 5$ -дезатуразу *Emiliana huxleyi*,  $\Delta 6$ -элонгазу *Physcomitrella patens*,  $\Delta 5$ -элонгазу *Thraustochytrid* или  $\Delta 5$ -элонгазу *Ostreococcus taurii*,  $\omega 3$ -дезатуразу *Phytophthora infestans* или  $\omega 3$ -дезатуразу *Pythium irregulare* и  $\Delta 4$ -дезатуразу *Thraustochytrid*.

В варианте реализации растения по изобретению выращены в поле, предпочтительно как популяция размером по меньшей мере 1000 или 1000000 растений, которые по существу одинаковы, или на площади по меньшей мере 1 га. Плотность насаждения варьирует в соответствии с видом растения, разновидностью растения, климатом, условиями почвы, нормами применения удобрений и другими факторами, как известно из уровня техники. Например, рапс обычно выращивают с плотностью насаждения 1,2-1,5 млн растений на 1 га. Урожай растений собирают, как известно из уровня техники, что может включать валкование, рядковое компостирование и/или жатву плодов растений, с последующей молотьюбой и/или веянием растительного материала для отделения семени от остальных частей растения, часто в форме мякины. Альтернативно, урожай семени может быть собран с растений в поле в ходе единственного процесса, а именно комбайнирования.

Трансформация растений.

Трансгенные растения могут быть получены с применением методов, известных из уровня техники, таких как в общем описаны в A. Slater et al., *Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press (2003), и P. Christou and H. Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley and Sons (2004).

В настоящем документе термины "стабильно трансформирующий", "стабильно трансформированный" и их вариации обозначают интеграцию экзогенных молекул нуклеиновых кислот в геном клетки таким образом, что они передаются клеткам потомства в процессе деления клетки, без необходимости в проведении положительной селекции на предмет их присутствия. Стабильные трансформанты или их потомство могут быть отобраны любыми средствами, известными из уровня техники, такими как саузерн-блоты на хромосомной ДНК или гибридизация геномной ДНК *in situ*.

Опосредованный *Agrobacterium* перенос представляет собой широко применяемую систему для введения генов в клетки растения, поскольку ДНК может быть введена в клетки в цельных тканях растения или органах растения или эксплантах в культуре ткани, с целью временной экспрессии или стабильной интеграции ДНК в геном клетки растения. Использование опосредованных *Agrobacterium* интегрирующихся векторов для растений с целью введения ДНК в клетки растения хорошо известно из уровня техники (см., например, US 5177010, US 5104310, US 5004863 или US 5159135), включая методы погружения цветков с использованием *Agrobacterium* или других бактерий, которые могут переносить ДНК в клетки растения. Участок ДНК для переноса определяется последовательностями границы, причем промежуточная ДНК (Т-ДНК) обычно вставляется в геном растения. В дальнейшем, интеграция Т-ДНК представляет собой относительно точный процесс, приводящих к нескольким реорганизациям. В тех разновидностях растений, в которых опосредованная *Agrobacterium* трансформация является эффективной, она является способом выбора благодаря легкой и определенной природе переноса гена. Предпочтительные векторы трансформации *Agrobacterium* способны к репликации в *E. coli*, также как *Agrobacterium*, позволяя осуществить необходимые манипуляции, как было описано (Klee et al., в *Plant DNA Infectious Agents*, Hohn and Schell, eds., Springer-Verlag, New York, p. 179-203 (1985)).

Способы ускорения, которые могут применяться, включают, например, баллистическую трансфекцию и т.п. Один из примеров способа доставки трансформирующих молекул нуклеиновых кислот в клетки растения представляет собой баллистическую трансфекцию. Данный способ рассмотрен Yang et al., *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, Oxford Press, Oxford, England (1994). Небиологические частицы (микрочастицы) в нем могут быть покрыты нуклеиновыми кислотами и доставлены в клетки движущей силой. Примеры частиц включают состоящие из вольфрама, золота, платины, и т.п. Конкретное преимущество баллистической трансфекции, в дополнение к тому, что она является эффективным средством воспроизводимой трансформации однодольных, является то, что не требуется ни выделения протопластов, ни восприимчивости к инфекции *Agrobacterium*.

В другом альтернативном варианте реализации пластиды могут быть стабильно трансформированы. Способы, раскрытые для трансформации пластиды в высших растениях, включают доставку с помощью генной пушки частицы ДНК, содержащей селекционный маркер, и нацеливание ДНК на геном пластиды посредством гомологичной рекомбинации (US 5451513, US 5545818, US 5877402, US 5932479 и WO 99/05265).

Другие способы превращения клетки могут также применяться и включают, без ограничения, введение ДНК в растения прямым переносом ДНК в пыльцу, прямой инъекцией ДНК в репродуктивные органы растения или прямой инъекцией ДНК в клетки незрелых эмбрионов, с последующей регидратацией высушенных эмбрионов.

Регенерация, развитие и культивирование растений из одианных трансформантов протопласта растения или из различных трансформированных эксплантов хорошо известны из уровня техники (Weissbach et al., In: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, Calif., (1988)). Такая

регенерация и процесс роста обычно включают стадии селекции трансформированных клеток, культивирования таких индивидуальных клеток через обычные стадии эмбрионального развития, в том числе стадию укоренения саженца. Трансгенные эмбрионы и семена регенерируют подобным образом. Полученные трансгенные укоренившиеся побеги в дальнейшем высаживают в подходящую среду для роста растения, такую как грунт.

Развитие или регенерация растений, содержащих чужеродный, экзогенный ген, хорошо известны из уровня техники. Предпочтительно регенерируемые растения являются самоопыляющимися, чтобы обеспечить гомозиготные трансгенные растения. В другом случае, пыльцу, полученную от регенерируемых растений, скрещивают с выращенными из семян растениями важных с агрономической точки зрения линий. С другой стороны, пыльца растений таких важных линий используется для опыления регенерируемых растений. Трансгенное растение по настоящему изобретению, содержащее желательную экзогенную нуклеиновую кислоту, культивируют с применением способов, хорошо известных специалисту в данной области.

Чтобы подтвердить присутствие трансгенов в трансгенных клетках и растениях, может быть осуществлена амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или анализ методом саузэрн-блота, с применением способов, известных специалистам в данной области. Продукты экспрессии трансгенов могут быть обнаружены любым из множества путей, в зависимости от природы продукта, и включают вестерн-блот и ферментный анализ. Как только трансгенные растения получены, их можно выращивать для получения тканей или частей растения, содержащих желательный фенотип. Ткань растения или части растения могут быть собраны как урожай, и/или собрано семя. Семя может служить источником выращивания дополнительных растений с тканями или частями, которые обладают желательными характеристиками.

Трансгенное растение, полученное с применением *Agrobacterium* или других способов трансформации, обычно содержит единственный генетический локус на одной хромосоме. Такие трансгенные растения могут носить название гемизиготных по введённому(ым) гену(ам). Более предпочтительным является трансгенное растение, гомозиготное по введённому(ым) гену(ам); т.е. трансгенное растение, которое содержит два дополнительных гена, один ген в таком же локусе на каждой хромосоме из пары хромосом. Гомозиготное трансгенное растение может быть получено путем самооплодотворения гемизиготного трансгенного растения, проращивания части полученных семян и анализа полученных растений на предмет присутствия целевого гена.

Кроме того, необходимо понимать, что два различных трансгенных растения, которые содержат два независимо сегрегирующих экзогенных гена или локуса, могут быть скрещены (спарены), с целью получения потомства, которое содержит оба набора генов или локусов. Самооплодотворение подходящего потомка F1 может давать растения, гомозиготные по обоим экзогенным генам или локусам. Обратное скрещивание с материнским растением и уничтожение нетрансгенного растения также рассматриваются, как вегетативное разведение. Описание других способов разведения, которые обычно используются для различных признаков и урожая, можно найти в Fehr, в: *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Повышение уровней экзогенной РНК и стабилизированная экспрессия.

Супрессоры сайленсинга.

В варианте реализации клетка, растение или часть растения по изобретению содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий белок супрессора сайленсинга.

Посттранскрипционный сайленсинг гена (ПТСГ) представляет собой специфичный для последовательности нуклеотидов механизм защиты, который может быть нацелен как на клеточные, так и на вирусные мРНК с целью разложения. ПТСГ возникает в растениях или грибах, стабильно или временно трансформированных чужеродной (гетерологичной) или эндогенной ДНК, и приводит к уменьшению аккумуляции молекул РНК, последовательность которых сходна с введённой нуклеиновой кислотой.

Широко изучен тот факт, что соэкспрессия супрессора сайленсинга с целевым трансгеном будет повышать уровни присутствующей в клетке РНК, которая транскрибирована из трансгена. Хотя это доказанный факт для клеток *in vitro*, значимые побочные эффекты наблюдаются во многих исследованиях соэкспрессии в цельных растениях. Более конкретно, как 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) и Meng et al. (2008) растения, экспрессирующие супрессоры сайленсинга, в общем под контролем конститутивных промоторов, часто являются фенотипически аномальными до такой степени, что они непригодны для коммерческого производства.

Недавно было обнаружено, что уровни молекул РНК могут быть увеличены и/или уровни молекул РНК могут быть стабилизированы на протяжении множества поколений посредством ограничения экспрессии супрессора сайленсинга семенем растения или его частью (WO2010/057246). В настоящем документе "белок-супрессор сайленсинга" или БСС представляет собой любой полипептид, который может экспрессироваться в клетке растения, что повышает уровень продукта экспрессии другого трансгена в клетке растения, особенно в последующих поколениях, полученных от изначально трансформированного растения. В варианте реализации БСС представляет собой вирусный супрессор сайленсинга или его му-



тант. Большое количество вирусных супрессоров сайленсинга известно из уровня техники и включает, без ограничения, P19, V2, P38, Pe-Po и RPV-P0. В варианте реализации вирусный супрессор сайленсинга содержит последовательность аминокислот, представленную любой из SEQ ID NO: 53-57, ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичную любой одной или более из SEQ ID NO: 53-57, которая дополнительно обладает активностью супрессора сайленсинга.

В настоящем документе термины "стабилизирующий экспрессию" "стабильно экспрессируемый", "стабилизированная экспрессия" и их вариации обозначают уровень молекулы РНК, по существу такой же или превышающий уровень в растениях-потомках на протяжении следующих поколений, например по меньшей мере 3, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 10 поколений, по сравнению с изогенными растениями, которые не содержат экзогенного полинуклеотида, кодирующего супрессор сайленсинга. Однако данный(ые) термин(ы) не исключает(ют) возможности некоторого снижения уровней молекулы РНК в следующих поколениях по сравнению с предыдущим поколением, например снижение не менее 10% на поколение.

Супрессор может быть выбран из любого источника, например растения, вируса, млекопитающего, и т.п.; см. WO2010/057246 относительно перечня вирусов, из которых может быть получен супрессор и обозначения белка (например, B2, P14 и т.д.) или кодирующего участка для супрессора из каждого конкретного вируса. Множественные копии супрессора могут быть использованы. Различные супрессоры могут использоваться совместно (например, в тандеме).

Молекулы РНК.

По существу любая молекула РНК, которую желательно экспрессировать в семени растения, может быть соэкспрессирована с супрессором сайленсинга. Кодированные полипептиды могут принимать участие в метаболизме масла, крахмала, углеводов, питательных веществ и т.п. или могут быть ответственными за синтез белков, пептидов, жирных кислот, липидов, восков, масел, крахмалов, сахара, углеводов, вкусоароматических веществ, ароматических веществ, токсинов, каротиноидов, гормонов, полимеров, флавоноидов, запасаемых белков, феноловых кислот, алкалоидов, лигнина, танинов, целлюлозы, гликопротеинов, гликолипидов и т.д., предпочтительно биосинтез или сборку ТАГ.

В конкретном примере растения вырабатывают повышенные уровни ферментов для продуцирования масла в растениях, например видах Brassica, таких как рапс, или подсолнечнике, сафлоре, льне, хлопчатнике, соевом бобе, Camelina или маисе.

Уровни выработки ДЦ-ПНЖК.

Уровни ДЦ-ПНЖК или комбинации ДЦ-ПНЖК, вырабатываемые в рекомбинантной клетке или части растения, например семена имеют большое значение. Уровни могут быть выражены, как состав (в процентах) общих жирных кислот, которые представляют собой конкретные ДЦ-ПНЖК или группу родственных ДЦ-ПНЖК, например ω3 ДЦ-ПНЖК или ω6 ДЦ-ПНЖК, или ОДЦ-ПНЖК, или другие, что может быть определено способами, известными из уровня техники. Кроме того, уровень может быть выражен, как содержание ДЦ-ПНЖК, например как процент ДЦ-ПНЖК в сухой массе материала, содержащего рекомбинантные клетки, например процент от массы семени, который представляет ДЦ-ПНЖК. Необходимо понимать, что уровень ДЦ-ПНЖК, вырабатываемой в масличной культуре, может быть значительно более высоким в показателях содержания ДЦ-ПНЖК, чем в овоще или семени, которое не выращивалось для целей получения масла, хотя оба могут иметь сходный состав ДЦ-ПНЖК и оба могут использоваться в качестве источников ДЦ-ПНЖК для потребления человеком или животным.

Уровни ДЦ-ПНЖК могут быть определены любым из способов, известных в данной области. В предпочтительном способе общий липид извлекают из клеток, тканей или организмов, и жирную кислоту превращают в метиловые эфиры перед анализом газовой хроматографией (ГХ). Такие методы описаны в примере 1. Положение пика на хроматограмме может использоваться для идентификации каждой конкретной жирной кислоты, и площадь каждого пика интегрируют для определения количества. В настоящем документе, если не указано иное, процент конкретной жирной кислоты в образце определяют, выражая площадь пика указанной жирной кислоты как процент от общей площади пиков жирных кислот на хроматограмме. По существу, это соответствует массовому проценту (мас./мас.). Идентичность жирных кислот может быть подтверждена ГХ-МС. Общие липиды могут быть выделены методами, известными из уровня техники, для очистки фракций, например фракции ТАГ. Например, тонкослойная хроматография (ТСХ) может быть выполнена в аналитическом масштабе, чтобы отделить ТАГ от других фракций липида, таких как ДАГ, ацил-КоА или фосфолипид, для того, чтобы определить состав жирных кислот конкретно для ТАГ.

В одном варианте реализации общая сумма АРК, ЭПК, ДПК и ДГК в жирных кислотах экстрагированного липида составляет от приблизительно 7 до приблизительно 25% общих жирных кислот в клетке. В дальнейшем варианте реализации общие жирные кислоты в клетке содержат менее 1% C20:1. В предпочтительных вариантах реализации экстрагируемый ТАГ в клетке содержит жирные кислоты в количествах, указанных в настоящем документе. Каждая из возможных комбинаций признаков, определяющих липид, раскрытый в настоящем документе, также включена.

Дополнительно, уровень выработки ДЦ-ПНЖК в рекомбинантной клетке, растении или части рас-

тения, например семени, может быть выражен, как процент превращения конкретного жирнокислотного субстрата в один или более жирнокислотных продуктов, который в настоящем документе дополнительно носит название "эффективности превращения" или "эффективности фермента". Данный параметр основан на жирнокислотном составе липида, экстрагированного из клетки, растения, части растения или семени, т.е. количестве образованной ДЦ-ПНЖК (в том числе другой ДЦ-ПНЖК, полученной из нее), выраженном как процент от одного или более жирнокислотных субстратов (в том числе все другие жирные кислоты, полученные из него). Общая формула для процента превращения:  $100 \times (\text{сумма процентов продукта ДЦ-ПНЖК и всех продуктов, полученных из него}) / (\text{сумма процентов жирнокислотного субстрата и всех продуктов, полученных из него})$ . Относительно ДГК, например, это может быть выражено, как соотношение уровня ДГК (в виде процента от общего содержания жирных кислот в липиде) к уровню жирнокислотного субстрата (например, Ж, ЛК, АЛК, СДК, ЭТК или ЭПК) и всех продуктов, кроме ДГК, полученных из субстрата. Процент превращения или эффективность превращения могут быть выражены для единой ферментной стадии в пути, а также для части или целого пути.

Специфическая эффективность превращения вычислена в настоящем документе по следующим формулам:

1. ОК в ДГК =  $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ для ОК, ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК, АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

2. ЛК в ДГК =  $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ для ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК, АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

3. АЛК в ДГК =  $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ для АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

4. ЭПК в ДГК =  $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ для ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

5. ДПК в ДГК (эффективность  $\Delta 4$ -десатуразы) =  $100 \times (\% \text{ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ для ДПК и ДГК})$ .

6. Эффективность  $\Delta 12$ -десатуразы =  $100 \times (\text{сумма } \% \text{ для ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК, АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ для ОК, ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК, АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

7. Эффективность  $\omega 3$ -десатуразы =  $100 \times (\text{сумма } \% \text{ для АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК, АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

8. ОК в АЛК =  $100 \times (\text{сумма } \% \text{ для АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ для ОК, ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК, АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

9. Эффективность  $\Delta 6$ -десатуразы (на  $\omega 3$  субстрате АЛК) =  $100 \times (\text{сумма } \% \text{ для СДК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК}) / (\% \text{ АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

10. Эффективность  $\Delta 6$ -элонгазы (на  $\omega 3$  субстрате СДК) =  $100 \times (\text{сумма } \% \text{ для ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ для СДК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

11. Эффективность  $\Delta 5$ -десатуразы (на  $\omega 3$  субстрате ЭТК) =  $100 \times (\text{сумма } \% \text{ для ЭПК, ДПК и ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ для ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

12. Эффективность  $\Delta 5$ -элонгазы (на  $\omega 3$  субстрате ЭПК) =  $100 \times (\text{сумма } \% \text{ для ДПК и ДГК}) / (\text{сумма } \% \text{ для ЭПК, ДПК и ДГК})$ .

Жирнокислотный состав липида, предпочтительно масла из семян, по изобретению также отличается соотношением  $\omega 6$  жирных кислот:  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот, для любых общих  $\omega 6$  жирных кислот: общих  $\omega 3$  жирных кислот или для новых  $\omega 6$  жирных кислот:  $\omega 3$  новых жирных кислот. Термины общие  $\omega 6$  жирные кислоты, общие  $\omega 3$  жирные кислоты, новые  $\omega 6$  жирные кислоты и новые  $\omega 3$  жирные кислоты имеют значения, определенные в настоящем документе. Соотношения вычисляются на основе состава жирных кислот в липиде, экстрагированном из клетки, растения, части растения или семени липида, способом, пример которого приведен в настоящем документе. Желательно присутствие в липиде более высокого уровня  $\omega 3$  жирных кислот, чем  $\omega 6$  жирных кислот, и таким образом соотношение  $\omega 6$ :  $\omega 3$  менее 1,0 является предпочтительным. Соотношение 0,0 указывает на полное отсутствие определенных  $\omega 6$  жирных кислот; соотношение 0,03 было достигнуто, как описано в примере 6.

Такие низкие значения соотношения могут быть достигнуты посредством сочетанного использования Δ6-десатуразы с предпочтением в отношении субстрата ω3, вместе с ω3-десатуразой, особенно грибковой ω3-десатуразой, такой как ω3-десатураза *Pichia pastoris*, пример которого приведен в настоящем документе.

Дополнительно, выход ДЦ-ПНЖК на массу семени может быть вычислен на основании общего содержания масла в семени и %ДГК в масле. Например, если содержание масла в семени рапса составляет приблизительно 40% (мас./мас.), и приблизительно 12% от общего содержания жирных кислот в масле составляет ДГК, содержание ДГК в семени составляет приблизительно 4,8% или около 48 мг на 1 г семени. Как раскрыто в примере 2, содержание ДГК в семени *Arabidopsis*, содержащем приблизительно 9% ДГК, в котором содержание масла ниже, чем в рапсе, составляло 25 мг/г семени. При содержании ДГК приблизительно 7%, семя рапса или семя *Camelina sativa* имеет уровень ДГК приблизительно 28 мг на 1 г семени. В настоящем изобретении таким образом раскрываются растения *Brassica napus*, *B. juncea* и *Camelina sativa*, и полученные из них семена, которые содержат по меньшей мере около 28 мг ДГК на 1 г семени.

Содержание влажности в семени стандартное для собранного в процессе сбора урожая зрелого семени после сушки (4-15% влажности). В изобретении также раскрывается способ получения масла, включающий получение семени и извлечение масла из семени, применение масла и способы получения семени, включающие сбор урожая семян с растений по изобретению.

Кроме того, может быть вычислено количество ДГК, вырабатываемое на 1 га, если выход семени с 1 га известен или может быть оценен. Например, рапс в Австралии обычно дает приблизительно 2,5 т семени на 1 га, что при содержании масла 40% дает около 1000 кг масла. При содержании ДГК 12% в конечном масле, это обеспечивает около 120 кг ДГК на 1 га. Если содержание масла снижается на 50%, это все еще обеспечивает около 60 кг ДГК/га.

Полученные на сегодняшний день доказательства свидетельствуют о том, что некоторые десатуразы, гетерологично экспрессируемые в дрожжах или растениях, обладают относительно низкой активностью в комбинации с некоторыми элонгазами. Данную ситуацию можно улучшить, придавая десатуразе способность использовать форму ацил-КоА жирной кислоты в качестве субстрата в синтезе ДЦ-ПНЖК, и это считается предпочтительным в рекомбинантных клетках, особенно в клетках растения. Особенно предпочтительная комбинация для эффективного синтеза ДГК представляет собой грибковую ω3-десатуразу, например, такую как ω3-десатураза *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 12), которая представляет собой Δ6-десатуразу с предпочтением в отношении ω3 ацильных субстратов, например, такую как Δ6-десатураза *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 13), или ее варианты с идентичностью последовательности аминокислот по меньшей мере 95%.

В настоящем документе термин "по существу не содержащий" означает, что композиция (например, липид или масло) содержит небольшое количество (например, менее чем приблизительно 0,5%, менее чем приблизительно 0,25%, менее чем приблизительно 0,1% или менее чем приблизительно 0,01%) или не содержит определенного компонента. В варианте реализации "по существу не содержащий" означает, что компонент невозможно обнаружить с помощью шаблонной методики анализа, например конкретная жирная кислота (например, ω6-докозапентаеновая кислота) не может быть обнаружена с помощью газовой хроматографии, как в общих чертах описано в примере 1.

#### Получение масел.

Методы, которые шаблононо практикуются в данной области, могут применяться для выделения, обработки и анализа масел, продуцированных клетками, растениями, семенами и т.п., по настоящему изобретению. Обычно семена растения термически обрабатывают, прессуют и экстрагируют, чтобы продуцировать неочищенное масло, которое далее дегуммируют, рафинируют, отбеливают и дезодорируют. В общем, методы измельчения семени известны из уровня техники. Например, семена масличных культур могут быть смягчены посредством обрызгивания их водой для повышения содержания влажности, например, до 8,5% и провальцованы с помощью гладкого валика с щелями размером 0,23-0,27 мм. В зависимости от вида семени, перед измельчением можно не добавлять воду. Применение нагревания инактивирует ферменты, облегчает дальнейший разрыв клетки, объединение масляных капелек, и обеспечивает агломерацию частиц белка, все из этого упрощают процесс экстракции.

В варианте реализации большинство масла из семени высвобождается при пропускании сквозь винтовой пресс. Жмых, выходящий из винтового пресса, в дальнейшем экстрагируют, например, гексаном, с использованием колонки с проводительным теплоконтролем. Альтернативно, неочищенное масло, полученное в ходе операции прессования, может быть пропущено сквозь резервуар для осаждения с проволочным дренажным верхом с прорезями, чтобы удалить твердые вещества, которые попадают в масло в ходе операции прессования. Осветленное масло может быть пропущено сквозь рамный и фильтр-пресс для удаления любых оставшихся тонких механических включений. При желании, масло после процесса экстракции может быть объединено с осветленным маслом, с получением смешанного сырого масла.

Как только растворитель десорбирован из неочищенного масла, прессованные и экстрагированные порции объединяют и обрабатывают обычными процедурами обработки масла. В настоящем документе

термин "очищенный", используемый в связи с липидом или маслом по изобретению, обычно означает, что экстрагированный липид или масло прошли одну или более стадий обработки, которые повышают степень чистоты липидного/масляного компонента. Например, стадия очистки может включать одно или более или все из группы, состоящей из дегуммирования, дезодорирования, отбеливания, сушки и/или фракционирования экстрагированного масла. Однако в настоящем документе термин "очищенный" не включает процесс переэтерификации или другой процесс, модифицирующий состав жирных кислот липида или масла по изобретению для увеличения содержания ДГК как процента от общего содержания жирных кислот. Другими словами, состав жирных кислот очищенного липида или масла по существу такой же, как состав неочищенного липида или масла.

#### Дегуммирование.

Дегуммирование представляет собой раннюю стадию рафинации масел, и его основная цель состоит в удалении из масла большинства фосфолипидов, которые могут присутствовать, как приблизительно 1-2% от общего экстрагированного липида. Добавление к неочищенному маслу ~2% воды, обычно содержащей фосфорную кислоту, при 70-80°C приводит к отделению большинства фосфолипидов, в сопровождении следовых металлов и пигментов. Нерастворимый материал, который удаляется, в основном представляет собой смесь фосфолипидов и триацилглицеролов, и также известен как лецитин. Дегуммирование может выполняться посредством добавления концентрированной фосфорной кислоты к неочищенному маслу из семян, чтобы перевести неспособные к гидратации фосфатиды в способную к гидратации форму, и образовать хелаты металлов, которые присутствуют в незначительных количествах. Смолу отделяют от масла из семян центрифугированием.

#### Щелочная рафинация.

Щелочная рафинация представляет собой один из способов очистки для обработки неочищенного масла, который иногда также называют нейтрализацией. Она обычно следует за дегуммированием и предшествует отбеливанию. После дегуммирования масло из семян может быть обработано добавлением достаточного количества раствора щелочи, чтобы оттитровать все жирные кислоты и фосфорные кислоты, с последующим удалением образовавшегося мыла. Подходящие щелочные материалы включают натрия гидроксид, калия гидроксид, натрия карбонат, лития гидроксид, кальция гидроксид, кальция карбонат и аммония гидроксид. Данный способ обычно осуществляют при комнатной температуре с удалением фракции свободных жирных кислот. Мыло удаляют центрифугированием или экстракцией в растворитель для мыла, и нейтрализованное масло промывают водой. При необходимости, избыток щелочи в масле может быть нейтрализован подходящей кислотой, такой как хлористоводородная кислота или серная кислота.

#### Отбеливание.

Отбеливание представляет собой способ очистки, при котором масла нагревают до 90-120°C, выдерживая при этой температуре в течение 10-30 мин в присутствии отбеливающей глины (0,2-2,0%) и в отсутствие кислорода, в атмосфере азота или пара или в вакууме. Данная стадия обработки масла разработана таким образом, чтобы удалять нежелательные пигменты (каротиноиды, хлорофилл, госсипол и т.д.), причем способ дополнительно удаляет продукты окисления, следовые металлы, соединения серы и следы мыла.

#### Дезодорирование.

Дезодорирование представляет собой обработку масел и жиров при высокой температуре (200-260°C) и низком давлении (0,1-1 мм рт. ст.). Это обычно достигается посредством введения пара в масло из семян со скоростью приблизительно 0,1 мл/мин/100 мл масла из семян. Приблизительно через 30 мин орошения маслу из семян дают остыть под вакуумом. Масло из семян обычно переносят в стеклянный контейнер и пропускают аргон, после чего хранят при низких температурах. Такая обработка улучшает цвет масла из семян и удаляет большинство летучих субстанций или пахучих соединений, включая оставшиеся свободные жирные кислоты, моноацилглицеролы и продукты окисления.

#### Винтеризация.

Винтеризация представляет собой способ, иногда применяемый в коммерческом производстве масел с целью разделения масел и жиров на твердые (стеарин) и жидкие (олеин) фракции посредством кристаллизации при температурах ниже температуры окружающей среды. Первоначально его применяли к хлопковому маслу для получения продукта, не содержащего твердых веществ. Обычно данный способ применяют для уменьшения содержания насыщенных жирных кислот в масле.

#### Переэтерификация.

Переэтерификация представляет собой способ обмена жирных кислот в пределах и между ТАГ или переноса жирных кислот на другой спирт, с образованием эфира, первоначально посредством высвобождения жирных кислот из ТАГ в форме свободных жирных кислот или в форме эфиров жирных кислот, обычно метиловых эфиров или этиловых эфиров жирных кислот. В случае сочетания со способом фракционирования, переэтерификация может применяться для модификации жирнокислотного состава липидов (Marangoni et al., 1995). Для переэтерификации могут использоваться химические (например, катализируемые сильной кислотой или основанием) или ферментные средства, причем последние включают

липазы, которые могут быть специфичными для положения (sn-1/3 или sn-2 специфичными) жирной кислоты в ТАГ, или с предпочтением в отношении некоторых жирных кислот по сравнению с другими (Speranza et al., 2012). Фракционирование жирных кислот, с целью повышения концентрации ДЦ-ПНЖК в масле может быть осуществлено любым из способов, известных из уровня техники, таких как, например, кристаллизация вымораживанием, образование комплексов с использованием мочевины, молекулярная дистилляция, экстракция сверхкритической жидкостью и образование комплексов с ионом серебра. Образование комплексов с мочевиной является предпочтительным способом вследствие его простоты и эффективности с точки зрения снижения уровня насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в масле (Gamez et al., 2003). Вначале ТАГ в масле расщепляют на составляющие жирные кислоты, часто в форме эфиров жирных кислот, посредством гидролиза в условиях катализа кислотой или основанием, в результате чего один моль ТАГ реагирует по меньшей мере с 3 моль спирта (например, этанола для этиловых эфиров или метанола для метиловых эфиров), причем используют избыток спирта, чтобы позволить разделение образовавшихся алкиловых эфиров и глицерина, который также образуется, или с помощью липаз. Такие свободные жирные кислоты или эфиры жирных кислот, которые обычно остаются в неизменном виде в составе жирных кислот после обработки, в дальнейшем могут быть смешаны с этанольным раствором мочевины для образования комплексов. Насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты легко образуют комплексы с мочевиной, кристаллизуются при охлаждении и впоследствии могут быть удалены фильтрацией. Фракция, не образовавшая комплексы с мочевиной, таким образом, обогащается ДЦ-ПНЖК.

Продукты питания (корма).

Настоящее изобретение включает композиции, которые могут использоваться в качестве продуктов питания (кормов). Для целей настоящего изобретения "продукты питания (корма)" включают любой продукт питания или препарат для потребления человеком или животным, который при попадании в организм: (а) служит целям питания или образования тканей или снабжения энергией и/или (б) поддерживает, восстанавливает или способствует надлежащему пищевому статусу или метаболической функции. Продукты питания (корма) по изобретению включают питательные составы для младенцев и/или детей младшего возраста, такие как, например, молочная смесь для детского питания, и жмых по изобретению.

Продукты питания (корма) по изобретению включают, например, клетку по изобретению, растение по изобретению, часть растения по изобретению, семя по изобретению, экстракт по изобретению, продукт способа по изобретению, продукт процесса ферментации по изобретению, или композицию вместе с подходящим(и) носителем(ями). Термин "носитель" используется в самом широком смысле и включает любой компонент, который может иметь или не иметь пищевого значения. Как будет понятно квалифицированному специалисту, носитель должен быть пригодным для использования (или используемым в достаточно низкой концентрации) в продукте питания (корме), таким образом, что он не оказывает вредного влияния на организм, потребляющий продукт питания (корм).

Продукт питания (корм) по настоящему изобретению включает масло, эфир жирной кислоты или жирную кислоту, полученную прямо или косвенно с применением способов, клеток или растений, раскрытых в настоящем документе. Дополнительно, композиция может находиться в твердой или жидкой форме. Кроме того, композиция может содержать съедобные микронутриенты, белок, углеводы, витамины и/или минералы в количествах, желательных для конкретного применения. Количества этих ингредиентов будут варьировать в зависимости от того, предназначается ли композиция для применения у здоровых индивидуумов или для применения у индивидуумов с особыми потребностями, например индивидуумов, страдающих метаболическими расстройствами, и т.п.

Примеры подходящих носителей, имеющих пищевое значения, включают, без ограничения, макронутриенты, например съедобные жиры, углеводы и белки. Примеры таких съедобных жиров включают, без ограничения, кокосовое масло, масло бурчника, грибное масло, масло черной смородины, соевое масло, а также моно- и диглицеролы. Примеры таких углеводов включают (без ограничения): глюкозу, съедобную лактозу и гидролизованный крахмал. Дополнительно, примеры белков, которые могут использоваться в питательном составе по изобретению, включают (без ограничения) белки сои, обработанную электродиализом сыворотку, обработанное электродиализом снятое молоко, молочную сыворотку или гидролизаты указанных белков.

Относительно витаминов и минералов, следующее может быть добавлено к композициям пищевых продуктов (кормов) по настоящему изобретению: кальций, фосфор, калий, натрий, хлорид, магний, марганец, железо, медь, цинк, селен, йод, витамины А, Е, D, С и витамины группы В. Кроме того, другие такие витамины и минералы могут быть добавлены.

Компоненты, используемые в композициях продукта питания (корма) по настоящему изобретению, могут быть полуочищенными или очищенными. Под полуочищенным или очищенным подразумевается материал, который получен посредством очистки природного материала или синтеза *de novo*.

Дополнительно, композиция пищевого продукта (корма) по настоящему изобретению может быть добавлена к пище даже в том случае, если нет необходимости в добавках к рациону. Например, композиция может быть добавлена к пище любого типа, в том числе (без ограничения) маргарин, модифицированное масло, сыры, молоко, йогурт, шоколад, конфеты, легкие закуски, масла для салатов, масла для

приготовления пищи, кулинарные жиры, мясо, рыба и напитки.

Вид рода *Saccharomyces* используется как при варке пива, так и в виноделии, а также как агент в выпечке, особенно хлеба. Кроме того, другие дрожжи, такие как маслянистые дрожжи, включая, например, вид *Yarrowia*, пригодны для получения ДЦ-ПНЖК. Дрожжи могут использоваться в качестве добавки к питанию животных, например в аквакультуре. Необходимо понимать, что могут быть предложены генетически сконструированные штаммы дрожжей, адаптированные к синтезу ДЦ-ПНЖК, как раскрыто в настоящем документе. Такие штаммы дрожжей или вырабатывающие ДЦ-ПНЖК могут в дальнейшем использоваться в продовольственных продуктах, а также производстве вина и пива, с целью обеспечения продуктов с повышенным содержанием жирных кислот.

Дополнительно, жирные кислоты, продуцированные в соответствии с настоящим изобретением или клетками-хозяевами, трансформированными таким образом, что в них содержатся и экспрессируются целевые гены, могут использоваться в качестве пищевых добавок для животных, с целью модификации состава жирных кислот в ткани, яйце или молоке животного до более желательного для потребления человеком или животным. Примеры таких животных включают овцу, крупный рогатый скот, лошадей, домашнюю птицу, например кур, и т.п.

К тому же, продукты питания (корма) по изобретению могут использоваться в аквакультуре с целью повышения уровней жирных кислот в организме рыбы или ракообразных, таких как, например, креветки, для потребления человеком или животным. Предпочтительно рыба является лососем.

Предпочтительные продукты питания (корма) по изобретению представляют собой растения, семена и другие части растения, например листья и стебли, которые непосредственно могут использоваться в качестве пищи или корма для человека или животных. Например, животные могут непосредственно пастись на таких растениях, выращиваемых в поле, или им могут скармливаться более точные количества в ходе контролируемого кормления. Изобретение включает применение таких растений и частей растения в качестве пищи для повышения уровней ДЦ-ПНЖК в организме человека и животных.

Композиции.

Настоящее изобретение также включает композиции, особенно фармацевтические композиции, содержащие одну или более жирных кислот и/или масел, полученных с применением способов по изобретению.

Фармацевтическая композиция может содержать одну или более жирных кислот и/или масел, в комбинации со стандартным, известным, нетоксичным фармацевтически приемлемым носителем, адьювантом или растворителем, таким как фосфатно-солевой буфер, вода, этанол, полиолы, растительные масла, увлажняющий агент или эмульсия, например эмульсия вода/масло. Композиция может находиться в жидкой или твердой форме. Например, композиция может находиться в форме таблетки, капсулы, проглатываемой жидкости или порошка, инъекционной форме или в форме мази или крема для местного применения. Необходимая текучесть может поддерживаться, например, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и использованием поверхностно-активных веществ. Кроме того, может быть желательным введение изотонических агентов, например сахара, натрия хлорида, и т.п. Кроме таких инертных разбавителей, композиция может содержать адьюванты, такие как увлажнители, эмульгаторы и суспендирующие агенты, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы.

Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры сорбита и полиоксиэтилен сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, мета-гидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант или смеси этих субстанций.

Твердые лекарственные формы, такие как таблетки и капсулы, могут быть получены с применением способов, хорошо известных из уровня техники. Например, жирные кислоты, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут быть таблетированы с обычными основами таблеток, такими как лактоза, сахароза и кукурузный крахмал, в комбинации со связующими веществами, такими как акация, кукурузный крахмал или желатин, дезинтегрантами, такими как картофельный крахмал или альгиновая кислота, и смазывающими веществами, такими как стеариновая кислота или магния стеарат. Капсулы могут быть получены путем объединения этих вспомогательных веществ в желатиновой капсуле с антиоксидантами и подходящей жирной(ыми) кислотой(ами).

Для внутривенного введения жирные кислоты, полученные в соответствии с настоящим изобретением, или их производные могут быть введены в коммерческие препараты.

Типичные дозы конкретной жирной кислоты составляют от 0,1 мг до 20 г, при введении от 1 до 5 раз в день (до 100 г ежедневно), и предпочтительно находятся в интервале от приблизительно 10 мг до приблизительно 1, 2, 5 или 10 г ежедневно (в виде одной или нескольких доз). Как известно из уровня техники, желательно вводить по меньшей мере приблизительно 300 мг/день жирной кислоты, особенно ДЦ-ПНЖК. Однако необходимо понимать, что любое количество жирной кислоты будет благоприятным для субъекта.

Возможные способы введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению включают, например, энтеральный (например, пероральный и ректальный) и парентеральный. Например, жидкий препарат может быть введен перорально или ректально. Дополнительно, гомогенная смесь мо-

жет быть полностью диспергирована в воде, предварительно смешанной в стерильных условиях с физиологически приемлемыми разбавителями, консервантами, буферами или пропеллентами для получения спрея или средства для ингаляций.

Дозы композиции для введения пациенту могут быть определены обычным специалистом в данной области и зависят от различных факторов, таких как масса тела пациента, возраст пациента, общее состояние здоровья пациента, анамнез пациента, иммунный статус пациента и т.п.

Дополнительно, композиции по настоящему изобретению могут применяться для косметических целей. Они могут добавляться к существующим косметическим композициям таким образом, что образуется смесь, или жирная кислота, полученная в соответствии с настоящим изобретением, может использоваться в качестве единственного "активного" ингредиента в косметической композиции.

### Примеры

#### Пример 1. Материалы и методы.

Экспрессия генов в клетках растения в системе временной экспрессии.

Экзогенные генетические конструкции экспрессируют в клетках растения в системе временной экспрессии, как по существу описано Voinnet et al. (2003) и Wood et al. (2009). Плазмиды, содержащие кодирующий участок, который экспрессируется из высокоактивного конститутивного промотора, например промотора CaMV 35S, вводят в *Agrobacterium tumefaciens*, штамм AGL1. Химерный ген 35S:p19 для экспрессии вирусного супрессора сайленсинга p19 отдельно вводят в AGL1, как раскрыто в WO 2010/057246. Рекомбинантные клетки *Agrobacterium* выращивают при 28°C в лизогенном бульоне (ЛБ), содержащем 50 мг/л канамицина и 50 мг/л рифампицина до фазы плато. Далее бактерии гранулируют центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего ресуспендируют до OD600 = 1,0 в инфльтрационном буфере, содержащем 10 мМ морфолиноэтансульфоново́й кислоты (МЭС), pH 5,7, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 100 мкМ ацетосирингона. Затем клетки инкубируют при 28°C со встряхиванием в течение 3 ч, и далее равные объемы культур *Agrobacterium*, содержащих 35S:p19 и исследуемую целевую химерную конструкцию(и), смешивают перед инфльтрацией листовой ткани. Растения обычно выращивают еще в течение 5 дней после инфльтрации, после чего, листовые диски извлекают и сушат вымораживанием для анализа жирных кислот методом ГХ.

Сложные метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) общих листовых липидов в лиофилизированных образцах получают, инкубируя образцы в растворе метанол/HCl/дихлорметан (10/1/1, об./об.) в течение 2 ч при 80°C, содержащем известное количество гексадекановой кислоты в качестве внутреннего стандарта. МЭЖК извлекают в гексан/ДХМ, концентрируют до небольшого объема в гексане и вводят в прибор для ГХ. Количество присутствующих индивидуальных и общих жирных кислот в липидных фракциях определяют на основании известного количества внутреннего стандарта.

Анализ жирных кислот методом газовой хроматографии (ГХ).

МЭЖК анализируют методом газовой хроматографии с помощью газового хроматографа Agilent Technologies 7890A GC (Пало-Альто, Калифорния, США), оборудованного колонкой SGE-BPX70 (70% цианопропил полисилфенилин-силоксана, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мм) длиной 30 м, ПИД (плазменно-ионизационным детектором), инжектором с разделением/без разделения, а также серийным аутосемплером Agilent Technologies 7693 и инжектором. Гелий используют в качестве газа-носителя. Образцы вводят инъекцией в методе с разделением (соотношение 50:1) при температуре печи 150°C. После инъекции температуру печи поддерживают на уровне 150°C в течение 1 мин, затем повышают до 210°C со скоростью 3°C/мин, снова повышают до 240°C со скоростью 50°C/мин и окончательно поддерживают в течение 1,4 мин на уровне 240°C. Площадь пиков определяют с помощью программного обеспечения Agilent Technologies ChemStation (версия Rev B.04.03 (16), Пало-Альто, Калифорния, США), на основании ответа известного количества внешнего стандарта GLC-411 (Nuchek) и внутреннего стандарта C17:0-ME.

Анализ липидов методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ОКХ-МС).

Общие липиды экстрагируют из лиофилизированных развивающихся семян через 12 дней после цветения (дпц) и зрелых семян после добавления известного количества три-C17:0-ТАГ в качестве внутреннего стандарта для количественной оценки. Экстрагированные липиды растворяют в 1 мл 10 мМ бутилированного гидрокситолуола в смеси бутанол/метанол (1:1, об./об.) на 5 мг сухого материала и анализируют с помощью жидкостного хроматографа серии Agilent 1200 с ЖХ и ионизацией электрораспылением с помощью ЖХ-МС 6410b с тремя квадрупольными линзами. Липиды хроматографически разделяют с использованием колонки Ascentis Express RP-Amide (50 мм × 2,1 мм, 2,7 мкм, Supelco) в режиме бинарного градиента со скоростью потока 0,2 мл/мин. Подвижные фазы: А) 10 мМ аммония формиата в смеси H<sub>2</sub>O:метанол:тетрагидрофуран (50:20:30 об./об./об.); В) 10 мМ аммония формиата в смеси H<sub>2</sub>O:метанол:тетрагидрофуран (5:20:75, об./об./об.). Перечни для мониторинга множественных реакций (ММР) основаны на следующих основных жирных 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, с использованием энергии столкновения 30 В и фрагментатора 60 В. Индивидуальные ТАГ согласно ММР идентифицируют на основании иона аммонизированного прекурсора и иона продукта, образованного в результате потери нейтральных частиц 22:6. Количество ТАГ определя-

ют с использованием 10 мкМ внешнего стандарта тристеарина.

Определение профиля жирных кислот и содержания масла в семени.

Если необходимо определить содержание масла в семени, семена сушат в эксикаторе в течение 24 ч и приблизительно 4 мг семени переносят в стеклянный флакон емкостью 2 мл с покрытой тефлоном навинчивающейся крышкой. 0,05 мг тригептадеканоина, растворенного в 0,1 мл толуола, добавляют во флакон в качестве внутреннего стандарта.

МЭЖК семени получают, добавляя 0,7 мл 1н. метанольного HCl (Supelco) во флакон, содержащий материал семени, кратковременно обрабатывают вихревым перемешиванием и инкубируют при 80°C в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры, 0,3 мл 0,9% (мас./об.) раствора NaCl и 0,1 мл гексана добавляют во флакон и тщательно перемешивают в течение 10 мин в Heidolph Vibramax 110. МЭЖК собирают в стеклянную вставку емкостью 0,3 мл и анализируют методом ГХ с плазменно-ионизационным детектором (ПВД), как было упомянуто ранее.

Площадь пика отдельного МЭЖК вначале корректируют на основании ответа в виде площади пика известного количества таких же МЭЖК, присутствующих в коммерческом стандарте GLC-411 (NU-CHEK PREP, INC., США). GLC-411 содержит равные количества 31 жирной кислоты (мас.%), в интервале от C8:0 до C22:6. В случае жирных кислот, которые отсутствуют в стандарте, изобретатели использовали ответы в виде площади пика наиболее сходного МЭЖК. Например, ответ в виде площади пика МЭЖК 16:1d9 использовали для 16:1d7, и ответ МЭЖК C22:6 использовали для C22:5. Скорректированные значения площади пика используют для вычисления массы каждого МЭЖК в образце, в сравнении с массой внутреннего стандарта. Масло хранится в основном в форме ТАГ, и его массу вычисляют на основании массы МЭЖК. Общее количество моль глицерина определяют путем вычисления количества моль каждого МЭЖК и деления общего количества моль МЭЖК на три. Содержание ТАГ вычисляют как сумму глицерина и жирных ацильных фрагментов, с использованием соотношения: мас.% масла =  $100 \times ((41 \times \text{общее количество моль МЭЖК}/3) + (\text{общее количество грамм МЭЖК} - (15 \times \text{общее количество моль МЭЖК}))) / \text{грамм семени}$ , где 41 и 15 - молекулярная масса остатка глицерола и метильной группы соответственно.

Анализ содержания стеролов в образцах масла.

Образцы приблизительно по 10 мг масла, вместе с добавленной аликвотой C24:0 монола в качестве внутреннего стандарта, омыляют с помощью 4 мл 5% раствора КОН в 80% MeOH и нагревания до 80°C, выдерживания в течение 2 ч при этой температуре, в покрытой тефлоном стеклянной пробирке с навинчивающейся крышкой. После охлаждения реакционной смеси добавляют 2 мл воды Milli-Q, и стеролы экстрагируют 2 мл смеси гексан:дихлорметан (4:1, об./об.) при встряхивании и вихревом перемешивании. Смесь центрифугируют, экстракт стеролов извлекают и промывают 2 мл воды Milli-Q. Затем экстракт стеролов отделяют после встряхивания и центрифугирования. Экстракт упаривают в потоке газообразного азота, и стеролы силилируют с использованием 200 мл N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (БСТФА) при нагревании до 80°C, выдерживая в течение 2 ч при этой температуре.

Для анализа стеролов методом ГХ/ГХ-МС производные стерол-О-триметилсилила (стерол-OTMSi) сушат в потоке газообразного азота на термоблоке при 40°C, а затем повторно растворяют в хлороформе или гексане непосредственно перед анализом методом ГХ/ГХ-МС. Производные стерол-OTMS анализируют газовой хроматографией (ГХ) с помощью газового хроматографа Agilent Technologies 6890A GC (Пало-Альто, Калифорния, США), оборудованного капиллярной колонкой из кварцевого стекла Supelco Equity™ -1 (15 м × 0,1мм внутренний диаметр, толщина пленки 0,1 мкм), ПВД и инжектором с расщеплением/без расщепления, а также серийным аутосемплером Agilent Technologies 7683B и инжектором. В качестве газа-носителя используют гелий. Инъекцию образцов осуществляют в режиме без расщепления при температуре печи 120°C. После инъекции температуру печи повышают до 270°C со скоростью 10°C/мин, и в конце до 300°C со скоростью 5°C/мин. Площадь пиков определяют с помощью программного обеспечения Agilent Technologies ChemStation (Пало-Альто, Калифорния, США). Результаты ГХ содержат ошибку ±5%, от значений площади пика отдельных компонентов.

Анализ методом ГХ-масс-спектрометрии (ГХ-МС) выполняют с помощью приборов для ГХ-МС Finnigan Thermoquest GCQ и Finnigan Thermo Electron Corporation, притом, что обе системы оборудованы инжектором для введения проб непосредственно на колонку, и программного обеспечения Thermoquest Xcalibur (Остин, Техас, США). Каждый из приборов для ГХ оборудован капиллярной колонкой, полярность которой сходна с описанной выше. Индивидуальные компоненты идентифицируют, используя данные масс-спектрометрии и сравнивая данные времени удерживания с полученными для аутентичных и лабораторных стандартов. Полную методику холостого анализа осуществляют параллельно с серией образцов.

Условия ОТ-ПЦР.

Аmplификацию методом ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) обычно осуществляют с использованием системы ОТ-ПЦР Superscript III One-Step (Invitrogen) в объеме 25 мкл, с использованием 10 пмоль прямого праймера и 30 пмоль обратного праймера, MgSO<sub>4</sub> до конечной концентрации 2,5 мМ,



400 нг общей РНК с буфером и нуклеотидными компонентами согласно инструкциям производителя. Типичные температурные режимы представляли собой: 1 цикл при температуре 45°C в течение 30 мин для возникновения обратной транскрипции; затем 1 цикл при температуре 94°C в течение 2 мин, и далее 40 циклов с температурой 94°C в течение 30 с, 52°C в течение 30 с, 70°C в течение 1 мин; затем 1 цикл при температуре 72°C в течение 2 мин перед охлаждением реакционных смесей до 5°C.

Получение соматических эмбрионов *V. parus* посредством индукции с помощью 35S-LEC2.

Семена *V. parus* (сорт Oscar) стерилизуют газообразным хлором, как описано (Attila Kereszt et al., 2007). Стерилизованные семена проращивают на средах MS (Murashige and Skoog, 1962) с 1/2 активности, содержащих 0,8% агар, с коррекцией pH до 5,8, и выращивают при 24°C при освещении флуоресцентным светом (50 мкЕ/м с) с фотопериодом 18/6 ч (освещение/темнота) в течение 6-7 дней. Семядольные черешки с длиной ножки 2-4 мм выделяют в асептических условиях из полученных побегов и используют в качестве эксплантов. Культуры трансформированного *A. tumefaciens*, штамм AGL1, одна из которых несет специфичный для семени бинарный вектор и вторая - конструкцию 35S-LEC2, инокулируют из единичных колоний со свежих планшетов и выращивают в 10 мл среды Лурия-Бертани с подходящими антибиотиками на протяжении ночи при 28°C и взбалтывании со скоростью 150 об/мин. Бактериальные клетки собирают центрифугированием со скоростью 4000 об/мин в течение 5 мин, промывают средами MS, содержащими 2% сахарозы, ресуспендируют в 10 мл такой же среды и выращивают с антибиотиками для селекции в подходящих условиях на протяжении 4 ч после добавления ацетосирингона до концентрации 100 мкМ. За 2 ч до добавления растительных тканей, добавляют спермидин до конечной концентрации 1,5 мМ, и конечную плотность бактерий доводят до OD 600 нм = 0,4 с помощью свежей среды. Две культуры бактерий, одна из которых несет специфичную для семени конструкцию, а другая несет 35S-AtLEC2, смешивают в соотношениях от 1:1 до 1:1,5.

Свежевыделенные семядольные черешки *V. parus* инфицируют 20 мл культур *A. tumefaciens* в течение 6 мин. Семядольные черешки промокают стерильной фильтровальной бумагой для удаления избытка *A. tumefaciens*, и затем переносят в среды со-культивирования (среды MS, содержащие 1 мг/л тиазурина (ТДЗ), 0,1 мг/л  $\alpha$ -нафталинуксусной кислоты (НУК), 100 мкМ ацетосирингона с добавлением L-цистеина (50 мг/л), аскорбиновой кислоты (15 мг/л) и морфолиноэтанолсульфоновой кислоты (МЭС, 250 мг/л)). Планшеты запечатывают микропористой лентой и инкубируют в темноте при 24°C на протяжении 48 ч. Со-культивированные экспланты переносят в предселекционные среды (MS, содержащие 1 мг/л ТДЗ, 0,1 мг/л НУК, 3 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 250 мг/л цефотаксима и 50 мг/л тиментина) и культивируют в течение 4-5 дней при температуре 24°C с фотопериодом 16/8 ч. Затем экспланты переносят на селекционные среды (MS, содержащие 1 мг/л ТДЗ, 0,1 мг/л НУК, 3 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 250 мг/л цефотаксима и 50 мг/л тиментина), соответствующие гену селекционного маркера на специфичном для семени векторе, и культивируют в течение 2-3 недель при 24°C с фотопериодом 16/8 ч. Экспланты с зеленым эмбрионным каллюсом переносят в среды MS, не содержащие гормонов (MS, содержащие 3 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 250 мг/л цефотаксима, 50 мг/л тиментина и селекционный агент), и культивируют еще на протяжении 2-3 недель. Торпедовидные эмбрионы или эмбрионы семядольной стадии, выделенные из выживших эксплантов на селекционной среде, анализируют на предмет состава жирных кислот в общем липиде методом ГХ.

Пример 2. Стабильная экспрессия трансгенных путей ДГК в семенах *Arabidopsis thaliana*.

Конструкция бинарного вектора.

Бинарные векторы rJP3416-GA7 и rJP3404, каждый из которых содержит 7 гетерологичных генов биосинтеза жирных кислот, кодирующих 5 десатураз и 2 элонгазы, и селекционный маркер для растений между повторами левой и правой границ Т-ДНК, присутствующими в каждом векторе (фиг. 2 и 3). В SEQ ID NO: 1 раскрыта нуклеотидная последовательность участка Т-ДНК rJP3416-GA7 от правой до левой граничных последовательностей. Обе генетические конструкции содержат растительные кодон-оптимизированные гены, кодирующие  $\Delta$ 12-десатуразу *Lachancea kluyveri* (содержит нуклеотиды 14143-16648 из SEQ ID NO: 1),  $\omega$ 3-десатуразу *Pichia pastoris* (содержит нуклеотиды 7654-10156 из SEQ ID NO: 1),  $\Delta$ 6-десатуразу *Micromonas pusilla* (содержит нуклеотиды 226-2309 из SEQ ID NO: 1),  $\Delta$ 5- и  $\Delta$ 4-десатуразы *Pavlova salina* (содержат нуклеотиды 4524-6485 и 10157-14142 из SEQ ID NO: 1 соответственно) и  $\Delta$ 6- и  $\Delta$ 5-элонгазы *Rugamimonas cordata* (содержит нуклеотиды 2310-4523 и 17825-19967 из SEQ ID NO: 1 соответственно). Конкретные участки участка Т-ДНК (ориентация: от правой к левой граничной последовательности) бинарного вектора rJP3416-GA7 относительно SEQ ID NO: 1 следующие: нуклеотиды 1-163: правая граница; 480-226, терминатор нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (TER\_NOS); 1883-489,  $\Delta$ 6-десатураза *Micromonas pusilla*; 2309-1952, укороченный промотор напина *Brassica napus* (PRO\_FP1); 2310-3243, промотор FAE1 *Arabidopsis thaliana* (PRO\_FAE1); 3312-4181,  $\Delta$ 6-элонгаза *Rugamimonas cordata*; 4190-4523, терминатор лектина *Glycine max* (TER\_Lectin); 4524-4881, PRO\_FP1; 4950-6230:  $\Delta$ 5-десатураза *Pavlova salina*; 6231-6485: TER\_NOS; 7653-6486, участок прикрепления к матриксу Rb7 *Nicotiana tabacum* (УПМ); 8387-7654, терминатор конлинина 1 *Linum usitatissimum* (TER\_Cnll); 9638-8388,  $\omega$ 3-десатураза *Pichia pastoris*; 10156-9707, промотор конлинина 1 *Linum usitatissimum* (PRO\_Cnll); 10157-12189, промотор конлинина 1 *Linum usitatissimum*; 12258-13604,  $\Delta$ 4-десатураза

Pavlova salina; 13605-14142, терминатор конглинина 2 *Linum usitatissimum*; 14143-14592, PRO\_Cnll; 14661-15914,  $\Delta$ 12-десатураза *Lachancea kluyveri*; 15915-16648, TER\_Cnll; 17816-16649, УПМ; 17825-18758, PRO\_FAE1; 18827-19633,  $\Delta$ 5-элонгаза *Pygamimonas cordata*; 19634-19967, TER\_Lectin; 19990-20527, промотор вируса мозаики цветной капусты 35S с удвоенным участком энхансера; 20537-21088, гены фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазы *Streptomyces viridochromo*; 21097-21349, TER\_NOS; 21367-21527, левая граница.

Каждый из 7 кодирующих участков в конструкциях находится под контролем специфичного для семени промотора, причем используются три различных промотора, а именно укороченный промотор напина *Brassica napus* (pBnFP1), промотор *Arabidopsis thaliana* FAE1 (pAtFAE1) и промотор конглинина 1 *Linum usitatissimum* (pLuCnll). Семь генов биосинтеза жирных кислот совместно кодируют полный путь синтеза ДГК, сконструированный с целью превращения 18:1 <sup>$\Delta$ 9</sup> (олеиновая кислота) в 22:6 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16,19</sup> (ДГК). Оба бинарных вектора содержат селекционный маркер для растений BAR, кодирующий участок, функционально связанный с промотором вируса мозаики цветной капусты 35S (CaMV), который содержит удвоенный участок энхансера, а также с терминатором транскрипции-участком полиаденилирования pos3' *A. tumefaciens*. Селекционный маркер для растений расположен смежно с левой границей Т-ДНК, т.е. дистально на Т-ДНК относительно ориентации переноса Т-ДНК в клетки растения. Это повышает вероятность того, что частичный перенос Т-ДНК, который, вероятно, не включает ген селекционного маркера, не пройдет селекцию. Каждый из rJP3416-GA7 и rJP3404 содержит источник репликации RiA4 из *Agrobacterium rhizogenes* (Hamilton, 1997).

rJP3416-GA7 генерируют посредством синтеза участка ДНК, соответствующего нуклеотидам 226-19975 SEQ ID NO: 1 (участок GA7) и вставки данного участка в бинарный вектор-реципиент rJP3416 на сайте PspOMI. Каждый ген биосинтеза жирных кислот на GA7 содержит последовательность 5'-нетранслируемого участка (5'UTR) вируса мозаики табака, функционально связанный с каждым кодирующим участком, между промотором и кодоном инициации трансляции ATG, с целью максимизации эффективности трансляции мРНК, полученных из генов. Конструкция GA7 также содержит две последовательности участка прикрепления к матриксу Rb7 (УПМ) *Nicotiana tabacum*, как описано Hall et al. (1991). Последовательности УПМ, иногда называемые ядерными участками прикрепления, известны как специфично связывающиеся с ядерным матриксом *in vitro*, и могут опосредовать связывание хроматина с ядерным матриксом *in vivo*. Считается, что УПМ уменьшают сайленсинг трансгена. В rJP3416-GA7 УПМ также вставлены и расположены в пределах участка Т-ДНК для того, чтобы они выполняли функцию распорок ДНК, с целью изоляции трансгенных кассет экспрессии. Вектор rJP3416 перед вставкой участка GA7 содержит только кассету селекционного маркера для растений между границами.

Генетическую конструкцию rJP3404 получают последовательной вставкой, базирующейся на рестриционных ферментах, в ходе которой кассеты генов добавляют к двоичному вектору, rJP3367, который содержит гены для выработки СДК в семенах. Данная конструкция содержит гены, кодирующие  $\Delta$ 12-десатуразу *L. kluyveri* и  $\omega$ 3-десатуразу *P. pastoris*, причем обе экспрессируются укороченным промотором напина *B. napus* (FP1), и  $\Delta$ 6-десатуразу *M. pusilla*, экспрессируемую промотором FAE1 *A. thaliana* (фиг. 4). Вначале, интрон FAD2 *A. thaliana* фланкируют сайтами EcoRI и клонируют в сайт MfeI rJP3367 с получением rJP3395. Фрагмент, содержащий кассеты  $\Delta$ 6- и  $\lambda$ 5-элонгазы *P. cordata* под контролем промоторов FAE1 и FP1 соответственно, клонируют в сайт KasI rJP3395 с получением rJP3398. Далее получают rJP3399 посредством замены источника репликации RK2 в rJP3398 источником репликации RiA4. Конечный бинарный вектор rJP3404 получают посредством клонирования SbfI-фланкированного фрагмента, содержащего кассеты  $\Delta$ 5- и  $\lambda$ 4-десатуразы *P. Salina* под управлением промоторов FP1 и FAE1 соответственно, в сайт SbfI rJP3399. Трансформация *A. thaliana* и анализ состава жирных кислот. Химерные векторы вводят в *A. tumefaciens*, штамм AGL1, и клетки из культур трансформированной *Agrobacterium* используют для обработки, растений *A. thaliana* (экоотипы Columbia и мутант fad2), применяя для трансформации способ погружения цветков (Clough and Bent, 1998). После созревания урожай зерен T<sub>1</sub> с обработанных растений собирают и переносят на планшеты MS, содержащие фосфинотрицин (ФФТ), с целью селекции растений, содержащих ген селекционного маркера BAR. Выжившие, здоровые саженцы T<sub>1</sub> переносят в грунт. После выращивания растений до состояния зрелости и предоставления им возможности для самооплодотворения, собирают урожай зерен T<sub>2</sub> с полученных растений, и состав жирных кислот в липиде их семени анализируют методом ГХ, как раскрыто в примере 1.

Данные для уровня ДГК в липидах семени проиллюстрированы на фиг. 5 (узкие дорожки с меткой T<sub>2</sub>) для 13 трансформантов с rJP3416-GA7, введенным в генетический фон Columbia, и для 6 трансформантов с использованием мутанта fad2. Конструкция rJP3416-GA7 приводит к выработке несколько более высоких уровней ДГК, выраженных как процент от общего содержания жирных кислот, в среднем относительно конструкции rJP3404. в табл. 4 приведен состав жирных кислот в общем липиде семени линий T<sub>2</sub> с наиболее высокими уровнями ДГК. Вычисленная эффективность превращения для каждой стадии ферментации в продуцировании ДГК из олеиновой кислоты в тех же семенах приведена в табл. 5. Эффективность превращения вычислена как (% продуктов x 100)/(% оставшегося субстрата + % продуктов), и таким образом выражена в процентах.

Наиболее высокий наблюдаемый уровень выработки ДГК в трансформированных rJP3416-GA7 линиях T<sub>2</sub> составляет 6,2%, дополнительно с 0,5% ЭПК и 0,2% ДПК (линия #14). Указанные семена T<sub>2</sub> все еще были сегрегированными по трансгену, т.е. еще не были однородно гомозиготными. Компилированные данные из профилей общего липида семени для независимого трансгенного семени (табл. 4) приведены в табл. 6. Уровень ω3 жирных кислот, продуцированных в результате наличия трансгенов в этих семенах (новые общие ω3 жирные кислоты, за исключением уровня АЛК, которая вырабатывается эндогенно в экотипе Columbia), составляет 10,7%, в то время как уровень ω6 жирных кислот (новые общие ω6 жирные кислоты, за исключением 18:2<sup>Δ9,12</sup>) составляет 1,5%. Это представляет чрезвычайно благоприятное соотношение новых ω3 жирных кислот:новых ω6 жирных кислот, а именно 7,3:1.

Семена T<sub>2</sub> отобранных линий, трансформированных rJP3416-GA7, а именно линий, обозначенных 7, 10, 14, 22 и 34 в экотипе Columbia, и линий, обозначенных 18, 21 и 25 в мутантном экотипе fad2, наносят на планшеты со средами MS, содержащими ФФТ для селекции трансгенных саженцев in vitro. По 20 ФФТ-резистентных саженцев из каждой линии переносят в грунт и выращивают до состояния зрелости после самооплодотворения. Было в высокой степени вероятным, эти растения будут гомозиготными по гену селекционного маркера, и таким образом по меньшей мере по одной вставке Т-ДНК в геноме растений. Урожай зерен T<sub>3</sub> с этих растений собирают и анализируют состав жирных кислот в масле из семян методом ГХ. Данные приведены в табл. 7. Данный анализ выявил, что конструкции rJP3416-GA7 генерируют более высокие уровни ω3 ДЦ-ПНЖК ДГК в семенах T<sub>3</sub> гомозиготных растений, чем в сегрегированном семени T<sub>2</sub>. До приблизительно 13,9% ДГК наблюдается в трансформированной rJP3416-GA7 линии T<sub>3</sub>, обозначенной 22.2 в экотипе Columbia, что означает увеличение с уровня приблизительно 5,5% в гомозиготном семени T<sub>2</sub>, причем суммарный уровень новых ω3 жирных кислот составляет приблизительно 24,3% от содержания общих жирных кислот в липиде семени. Уровень новых ω6 жирных кислот составляет 1,1% от общих жирных кислот, представляя очень благоприятное соотношение новых ω3 жирных кислот:новых ω6 жирных кислот, а именно, приблизительно 22:1. Подобным образом, трансформанты в экотипе fad2 дают суммарное количество новых ω3 жирных кислот 20,6%, включая 11,5% ДГК, как процент от общего содержания жирных кислот в липиде семени.

Таблица 4

Состав жирных кислот в общем липиде семени независимых трансгенных семян T<sub>2</sub> Arabidopsis с уровнями ДГК на верхней границе наблюдаемого интервала

	rJP3404_Col_#1	rJP3404_FAD2_#31	GA7_Col_#7	GA7_Col_#34	GA7_Col_#2	GA7_Col_#10	GA7_Col_#22	GA7_Col_#14	GA7_FAD2_#25	GA7_FAD2_#21	GA7_FAD2_#18
16:0	9,6	7,8	8,7	8,2	8,7	8,6	8,3	9,7	7,2	8,5	7,5
18:0	2,9	3,9	3,7	3,9	3,6	3,3	3,4	3,6	3,2	3,9	3,0
18:1d11	2,2	1,8	2,0	1,9	2,0	2,3	2,3	2,7	1,9	2,0	1,8
20:0	1,6	2,3	2,0	2,0	2,1	1,6	1,6	1,8	1,6	2,2	1,5

20:1d13	2,2	1,8	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5	1,7	1,5	1,7	1,4
20:1d9/d11	13,0	15,9	16,1	16,1	16,3	15,0	13,9	13,5	18,3	15,9	17,0
22:1d13	1,1	1,2	1,1	1,1	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,3	1,2
Другие незначительные	1,9	1,5	1,5	1,4	1,5	1,3	1,6	1,7	1,6	1,4	1,6
18:1d9	10,8	14,0	10,6	10,6	10,1	11,1	10,0	7,7	26,0	8,2	20,9
18:2ω6	28,9	28,3	16,4	16,1	18,2	13,7	13,7	11,4	6,6	16,6	4,3
18:3ω3	16,6	14,9	29,6	29,6	27,5	32,4	30,4	32,8	21,9	27,7	30,1
18:3ω6	0,7	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
20:2ω6	1,6	1,5	1,1	1,2	1,3	1,0	1,0	1,0	0,4	1,4	0,4
20:3ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:4ω6	1,6	0,6	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4
22:5ω6	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:4ω3	1,0	0,5	1,2	1,1	1,1	1,5	2,7	2,7	1,9	1,8	1,7
20:3ω3	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,6	0,7	0,0	0,8	0,6
20:4ω3	0,4	0,6	0,6	0,7	0,5	0,8	0,8	0,4	1,0	0,8	0,8
<b>20:5ω3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>
<b>22:5ω3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
<b>22:6ω3</b>	<b>3,6</b>	<b>2,4</b>	<b>3,0</b>	<b>3,1</b>	<b>3,3</b>	<b>3,9</b>	<b>5,5</b>	<b>6,2</b>	<b>4,3</b>	<b>4,4</b>	<b>4,8</b>

"Col" обозначает экотип Columbia, и "FAD2" обозначает мутантный экотип fad2. "GA7" обозначает трансформацию с помощью Т-ДНК из вектора рJP3416-GA7, рJP3404 - с помощью Т-ДНК из вектора рJP3404. Жирные кислоты 20:1n-9 и 20:1n-11 не разделяли в ходе анализа ГХ. "Другие незначительные" жирные кислоты включают 14:0, 16:1n7, 16:1n9, 16:1n13t, 16:2n6, 16:3n3, i18:0, 18:1n5, 20:1n5, 22:0, 22:1n7, 22:1n11/n13, 24:0, 24:1n9.

Таблица 5

Эффективность превращения для отдельных ферментных стадий в процессе получения ДГК из олеиновой кислоты, наблюдаемая в общем липиде семян независимого трансгенного семени, приведенного в табл. 4

		рJP3404_Col_#1	рJP3404_FAD2_#31	GA7_Col_#7	GA7_Col_#34	GA7_Col_#2	GA7_Col_#10	GA7_Col_#22	GA7_Col_#14	GA7_FAD2_#25	GA7_FAD2_#21	GA7_FAD2_#18
	d12-дес	69,6%	62,5%	66,4%	66,6%	66,7%	67,5%	70,2%	72,7%	45,9%	69,5%	53,7%
	d15-	39,8%	37,8%	66,1%	66,8%	62,3%	72,1%	72,7%	77,2%	79,7%	66,0%	88,1%
	дес											
Омега-6	d6-дес	4,5%	2,5%	0,7%	0,7%	0,7%	0,9%	1,3%	1,0%	1,6%	1,1%	1,1%
	(d9-элю)	3,1%	3,1%	2,2%	2,3%	2,4%	1,8%	1,8%	1,7%	1,2%	2,7%	0,9%
	d6-элю	71,4%	56,9%	83,3%	83,4%	83,0%	84,7%	70,3%	74,5%	85,5%	66,1%	88,0%
	d5-дес	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	d5-элю	100,0%	97,8%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	d4-дес	6,2%	13,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Омега 3	d6-дес	23,9%	21,0%	15,2%	15,4%	16,4%	17,1%	24,7%	23,6%	27,1%	21,9%	21,0%
	(d9-элю)	0,0%	0,0%	0,0%	1,8%	0,0%	0,0%	2,0%	2,2%	0,0%	2,6%	2,1%
	d6-элю	80,6%	86,6%	77,7%	79,6%	79,4%	77,5%	72,7%	73,0%	76,7%	77,4%	79,2%
	d5-дес	93,7%	92,1%	91,7%	91,4%	91,5%	92,6%	89,6%	92,4%	88,0%	91,8%	91,0%
	d5-элю	93,7%	92,1%	91,7%	91,4%	91,5%	92,6%	89,6%	92,4%	88,0%	91,8%	91,0%
	d4-дес	100,0%	90,6%	94,8%	94,0%	95,3%	94,4%	95,8%	96,9%	93,1%	92,9%	94,2%

Таблица 6

Компилированные данные из профилей общего липида семени для независимого трансгенного семени, приведенного в табл. 2

Параметр	PJF3404_Col_#1	PJF3404_FAD2_#31	GA7_Col_#7	GA7_Col_#34	GA7_Col_#2	GA7_Col_#10	GA7_Col_#22	GA7_Col_#14	GA7_FAD2_#25	GA7_FAD2_#21	GA7_FAD2_#18
Общие w3 (% от общих ЖК)	21,8	18,8	34,9	35,6	32,9	39,1	40,9	43,5	30,0	36,2	38,8
Общие w6 (% от общих ЖК)	32,9	31,0	17,9	17,7	19,9	1,52	15,4	12,9	7,6	18,6	5,2
Соотношение w3/w6	0,66	0,61	1,95	2,01	1,65	2,57	2,66	3,37	3,95	1,95	7,46
Соотношение w6/w3	1,51	1,65	0,51	0,50	0,60	0,39	0,38	0,30	0,25	0,51	0,13
Общие новые w3 (% от общих ЖК)	5,2	3,9	5,3	6,0	5,4	6,7	10,5	10,7	8,1	8,5	8,7
Общие новые w6 (% от общих ЖК)	4,0	2,7	1,5	1,6	1,7	1,5	1,7	1,5	1,0	2,0	0,9
Соотношение новых w3/w6	1,30	1,44	3,53	3,75	3,18	4,47	6,18	7,13	8,10	4,25	9,67
Соотношение новых w6/w3	0,77	0,69	0,28	0,27	0,31	0,22	0,16	0,14	0,12	0,24	0,10
Эффективность превращения ОК в ЭПК	4,8%	3,5%	4,3%	4,4%	4,7%	5,4%	7,9%	8,8%	6,3%	6,4%	6,7%
Эффективность превращения ОК в ДГК	4,5%	3,0%	3,7%	3,8%	4,1%	4,8%	6,8%	7,9%	5,2%	5,5%	5,8%
Эффективность превращения ЛК в ЭПК	6,9%	5,6%	6,6%	6,8%	7,2%	8,1%	11,4%	12,2%	13,8%	9,3%	12,7%
Эффективность превращения ЛК в ДГК	6,6%	4,8%	5,7%	5,8%	6,3%	7,2%	9,8%	11,0%	11,4%	8,0%	10,9%
Эффективность превращения АЛК в ЭПК	17,4%	14,9%	10,0%	10,1%	11,6%	11,3%	15,6%	15,9%	17,3%	14,1%	14,4%
Эффективность превращения АЛК в ДГК	16,5%	12,8%	8,6%	8,7%	10,0%	10,0%	13,4%	14,3%	14,3%	12,2%	12,4%
Общие насыщенные жирные кислоты	14,1	14,0	14,4	14,1	14,4	13,5	13,3	15,1	12,0	14,6	12,0
Общие монона- сыщенные жирные кислоты	29,3	34,7	31,4	31,2	31,4	31,0	28,7	26,6	48,7	29,1	42,3
Общие полина- сыщенные жирные кислоты	54,7	49,8	52,8	53,3	52,8	54,3	56,3	56,4	37,6	54,8	44,0
Общие С20	17,4	20	19,7	20,4	20,1	18,7	18,5	17,8	21,8	21	20,7
Общие С22	6,4	4,5	4,6	4,7	5,1	5,5	7,2	7,8	6,1	6,4	6,7
Соотношение Общие С20/С22	2,72	4,44	4,28	4,34	3,94	3,40	2,57	2,28	3,57	3,28	3,09

Вычисления не включают "незначительные жирные кислоты" в табл. 4.

Таблица 7

Состав жирных кислот общего липида семени для независимых трансгенных семян потомков T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> Arabidopsis, полученных из линий растений, приведенных в табл. 3

	GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2_25.10	GA7_FAD2_21.2	GA7_FAD2_18.14	T <sub>4</sub> Col_22.2 (среднее значение ± стандартное отклонение)	T <sub>4</sub> Col_22.2 (лучшая линия)
16:0	9,8	9,0	9,5	11,2	10,4	8,1	10,7	7,7	10,6 ± 0,9	12,2
18:0	4,0	3,8	4,2	3,4	3,5	3,5	3,8	3,3	3,5 ± 0,4	3,6
18:1n7	2,0	1,9	2,2	2,9	2,5	1,7	2,2	1,6	2,3 ± 0,2	2,6
20:0	2,2	1,9	1,7	1,4	2,3	1,8	2,0	1,9	1,9 ± 0,3	2,0
20:1d13	1,4	1,3	1,2	1,6	2,5	1,2	1,4	1,3	1,6 ± 0,2	1,9
20:1d9/11	13,6	14,7	12,4	9,5	13,0	15,7	12,4	18,4	11,7 ± 1,7	9,5
22:1d13	1,2	1,2	0,8	0,6	1,6	1,0	1,1	1,5	0,9 ± 0,1	0,8
Другие незначительные	1,8	1,5	1,5	2,1	2,6	1,7	1,9	1,6	1,9 ± 0,1	2,3
18:1d9	5,5	6,7	6,8	4,6	6,9	11,3	4,2	11,5	4,6 ± 1,0	3,3
18:2ω6	7,5	7,9	7,4	5,6	14,8	5,8	8,9	5,6	5,3 ± 0,9	4,3
18:3ω3	33,7	33,7	36,1	31,5	26,1	28,3	28,9	30,8	31,0 ± 1,1	29,5
18:3ω6	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,3	0,6	0,1	0,4 ± 0,1	0,4
20:2ω6	1,0	1,0	0,7	0,7	1,4	0,6	1,2	0,6	0,9 ± 0,1	0,9
20:3ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
20:4ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
22:4ω6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1 ± 0,0	0,1
22:5ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
18:4ω3	3,1	2,6	3,0	5,3	3,3	3,7	5,2	2,6	4,8 ± 0,9	5,5
20:3ω3	1,4	1,3	1,2	1,3	1,2	1,1	1,3	1,3	1,5 ± 0,2	1,7
20:4ω3	0,7	0,6	0,6	0,9	0,2	1,7	0,9	0,9	0,8 ± 0,2	0,8
<b>20:5ω3</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>0,7</b>	<b>1,9</b>	<b>0,8</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>1,5 ± 0,3</b>	<b>1,8</b>
<b>22:5ω3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>1,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>1,1 ± 0,2</b>	<b>1,5</b>
<b>22:6ω3</b>	<b>9,5</b>	<b>9,2</b>	<b>9,4</b>	<b>13,9</b>	<b>6,6</b>	<b>10,3</b>	<b>11,5</b>	<b>7,9</b>	<b>13,3 ± 1,6</b>	<b>15,1</b>

Ошибка, указанная в поколении T<sub>4</sub>, обозначает стандартное отклонение (CO) для n = 10.

Эффективность ферментного превращения для каждой ферментной стадии в пути получения ДГК из олеиновой кислоты приведена в табл. 8 для семян T<sub>3</sub> с более высокими уровнями ДГК. Эффективность превращения под действием Δ12-десатуразы в семенах линии 22.2 составила 81,6%, и эффективность ω3-десатуразы составила 89,1%, причем оба значения являются весьма высокими и указывают на то, что данные грибковые (дрожжевые) ферменты могут хорошо функционировать в развивающихся семенах. Активность других экзогенных ферментов в пути ДГК была сходным образом высокой в отношении субстратов ω3, причем эффективность Δ6-десатуразы составляет 42,2%, Δ6-элонгазы - 76,8%, Δ5-десатуразы - 95,0%, Δ5-элонгазы - 88,7% и Δ4-десатуразы - 93,3%. Активность Δ6-десатуразы в отношении субстрата ω6 ЛК намного ниже, и эффективность превращения ЛК под действием Δ6-десатуразы составляет только 0,7%. ГЛК присутствует на уровне всего 0,4% и представляет собой единственный новый продукт ω6, за исключением 20:2ω6, обнаруженной в семенах T<sub>3</sub> с наиболее высоким содержанием ДГК. Компилированные данные из профилей общего липида семени для независимого трансгенного семени (табл. 7) приведены в табл. 9. Такие данные для линии с наиболее высоким уровнем ДГК включают соотношение общего содержания ω6 ФК (в том числе ЛК) к общему содержанию ω3 ФК (в том числе АЛК) равное 0,10. Соотношение новых ω6 ФК (за исключением ЛК) и новых ω3 ФК (за исключением АЛК) в липиде данной линии составило 0,05. Уровни общих полиненасыщенных жирных кислот составляют более 50% в данных линиях и более 60% по меньшей мере в 4 линиях. Общая эффективность превращения вычислена как: ОК в ЭПК = 21,8%, ОК в ДГК = 18,0%, ЛК в ЭПК = 26,9%, ЛК в

ДГК = 22,2%, АЛК в ЭПК = 30,1%, АЛК в ДГК = 24,9%.

Таблица 8

Эффективность превращения для отдельных ферментных стадий получения ДГК из олеиновой кислоты, наблюдаемая в общем липиде семени для трансгенных семян T<sub>3</sub> Arabidopsis, приведенных в табл. 7

	GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2_25.10	GA7_FAD2_21.2	GA7_FAD2_18.14	T <sub>4</sub> Col_22.2 (среднее значение +/- стандартное отклонение)	T <sub>4</sub> Col_22.2 (лучшая линия)	
d12-дес	75,4%	73,1%	75,7%	81,6%	73,4%	66,6%	78,5%	63,1%	67,6%	82,7%	
d15-дес	85,3%	84,4%	86,2%	89,1%	70,2%	87,5%	82,2%	87,6%	81,0%	90,9%	
Омега-6	d6-дес	0,3%	0,3%	0,3%	0,7%	0,3%	0,6%	1,0%	0,2%	1,3%	0,7%
	(d9-эло)	1,7%	1,7%	1,2%	1,2%	2,6%	1,1%	2,0%	1,3%	1,6%	1,5%
	d6-эло										
	d5-дес										
	d5-эло										
d4-дес											
Омега 3	d6-дес	30,7%	29,3%	28,2%	42,2%	30,2%	38,5%	40,0%	29,2%	41,0%	45,7%
	(d9-эло)	2,7%	2,7%	2,3%	2,4%	3,0%	2,3%	2,7%	2,9%	2,8%	3,1%
	d6-эло	79,0%	81,1%	79,0%	76,8%	70,9%	79,2%	73,2%	79,1%	77,5%	77,7%
	d5-дес	94,0%	94,6%	94,5%	95,0%	97,9%	87,8%	93,3%	91,1%	95,0%	95,8%
	d5-эло	91,9%	91,7%	93,6%	88,7%	89,5%	89,9%	92,2%	91,6%	90,8%	90,2%
d4-дес	93,2%	93,7%	94,4%	93,3%	93,7%	92,5%	95,0%	93,9%	92,2%	90,9%	

Таблица 9

Компилированные данные из профилей общего липида семени для независимого трансгенного семени, приведенного в табл. 5

Параметр	GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2_25.10	GA7_FAD2_21.2	GA7_FAD2_18.14	T <sub>4</sub> Col_22.2 (среднее значение)	T <sub>4</sub> Col_22.2 (лучшая линия)
Общие w3 (% от общих ЖК)	50,0	48,9	51,6	55,8	38,6	47,1	49,4	44,8	54,0	55,9
Общие w6 (% от общих ЖК)	8,7	9,1	8,3	6,7	16,3	6,7	10,7	6,3	6,7	5,7
Соотношение w3/w6	5,75	5,37	6,22	8,33	2,37	7,03	4,62	7,11	806	9,81
Соотношение w6/w3	0,17	0,19	0,16	0,12	0,42	0,14	0,22	0,14	0,12	0,10
Общие новые w3 (% от общих ЖК)	16,3	15,2	15,5	24,3	12,5	18,8	20,5	14,0	23,0	26,4
Общие новые w6 (% от общих ЖК)	1,2	1,2	0,9	1,1	1,5	0,9	1,8	0,7	1,4	1,4
Соотношение новых w3/w6	13,58	12,67	17,22	22,09	8,33	20,89	11,39	20,00	16,43	18,86
Соотношение новых w6/w3	0,07	0,08	0,06	0,05	0,12	0,05	0,09	0,05	0,06	0,05
Эффективность превращения ОК в ЭПК	14,1%	13,3%	13,4%	21,8%	10,2%	15,0%	16,8%	11,2%	20,4%	24,5%
Эффективность превращения ОК в ДГК	12,0%	11,4%	11,8%	18,0%	8,6%	12,6%	14,8%	9,6%	17,1%	20,1%
Эффективность превращения ЛК в ЭПК	18,9%	18,4%	17,9%	26,9%	14,2%	22,9%	21,8%	18,0%	26,2%	29,9%
Эффективность превращения ЛК в ДГК	16,2%	15,9%	15,7%	22,2%	12,0%	19,1%	19,1%	15,5%	21,9%	24,5%
Эффективность превращения АЛК в ЭПК	22,2%	21,9%	20,7%	30,1%	20,2%	26,1%	26,5%	20,5%	29,4%	32,9%
Эффективность превращения АЛК в ДГК	19,0%	18,8%	18,2%	24,9%	17,1%	21,9%	23,3%	17,6%	24,6%	27,0%
Общие насыщенные жирные кислоты	16,0	14,7	15,4	16,0	16,2	13,4	16,5	12,9	16,0	17,8
Общие мононенасыщенные жирные кислоты	23,7	25,8	23,4	19,2	26,5	30,9	21,3	34,3	21,1	18,1
Общие полиненасыщенные жирные кислоты	58,7	58,0	59,9	62,5	54,9	53,8	60,1	51,1	60,7	61,6
Общие C20	19	19,8	16,8	15,9	19,1	21,5	18,2	23,3	18	16,6
Общие C22	11,4	11	10,8	15,5	8,6	12,1	13,2	9,9	15,4	17,5
Соотношение C20/C22	1,67	1,80	1,56	1,03	2,22	1,78	1,38	2,35	1,17	0,95

Вычисления не включают "незначительные жирные кислоты", как в табл. 7.

Семена T<sub>3</sub> линии rP3416-GA7 22.2 в экотипе Columbia, которые являются потомками линии T<sub>2</sub> 22, высевает непосредственно в грунт, и состав жирных кислот в зрелом семени полученных в результате растений T<sub>3</sub> анализируют методом ГХ. Средний уровень ДГК в данных семенах составляет 13,3% ± 1,6 (n = 10) как процент от общих жирных кислот в липиде семени. Как проиллюстрировано в табл. 6 (правая колонка), линия с наиболее высоким уровнем ДГК содержит 15,1% ДГК от общего содержания жир-

ных кислот в липиде семени.

Ферментная эффективность превращения приведена в табл. 8 для каждой стадии получения ДГК из олеиновой кислоты.

Соотношение общего содержания  $\omega 6$  ФК (в том числе ЛК) к общему содержанию  $\omega 3$  ФК (в том числе АЛК) в линии с самым высоким уровнем ДГК составило 0,102. Соотношение новых  $\omega 6$  ФК (за исключением ЛК) и новых  $\omega 3$  ФК (за исключением АЛК) в линии с самым высоким уровнем ДГК составило 0,053. Уровень общих насыщенных жирных кислот составил приблизительно 17,8%, и уровень общих мононенасыщенных жирных кислот составил около 18,1%. Уровень общих  $\omega 6$ -жирных кислот составил около 5,7%, и уровень  $\omega 3$ -жирных кислот составил около 55,9%. Вычисленная общая эффективность превращения составила: ОК в ЭПК = 24,5%, ОК в ДГК = 20,1%, ЛК в ЭПК = 29,9%, ЛК в ДГК = 24,5%, АЛК в ЭПК = 32,9%, АЛК в ДГК = 27,0%. Обнаружено, что общие омега-3 жирные кислоты аккумулируются на уровне 55,9% от общих жирных кислот, тогда как омега-6 жирные кислоты составляют 5,7% от общего профиля.

Выполняют анализ гибридизации методом саузерн-блота. Результаты показывают, что линии с высоким уровнем аккумуляция ДГК содержат одинарную или двойную копию Т-ДНК из конструкции рJP3416-GA7, за исключением трансгенной линии Columbia #22, которая содержит три вставки Т-ДНК в геноме растения *Arabidopsis*. Семя поколения T5 также проанализировано, и обнаружено содержание до 13,6% ДГК в общих липидах семени. Конструкция GA7 продемонстрировала устойчивость на протяжении нескольких поколений с точки зрения способности к образованию ДГК.

Определение содержимого масла в трансгенных линиях *A. thaliana* ДГК.

Содержание масла в трансгенных семенах *A. thaliana* с различными уровнями ДГК определяют методом ГХ, как раскрыто в примере 1. Данные проиллюстрированы на фиг. 6, на которой приведен график содержания масла (% масла от массы семени) против содержания ДГК (как процента от общих жирных кислот). Найдено до 26,5 мг ДГК на 1 г семени (табл. 10). Обнаружено, что содержание масла в трансгенных семенах *Arabidopsis* отрицательно коррелирует с содержимым ДГК. Количество ДГК на массу семени было большим в трансформированных семенах, с уровнем ДГК приблизительно 9% относительно семян с содержанием ДГК приблизительно 14%. Будет ли это справедливо для других семян, кроме *Arabidopsis*, неизвестно.

Таблица 10  
Доля и количество ДГК в семенах трансформированного GA7 *Arabidopsis*

	Содержание ДГК (% от ОЖК)	Содержание масла (% масла на грамм семян)	Содержание ДГК по массе (мг/г семени)
GA7/col 22.2-1	14,2	14,89	20,2
GA7/col 22.2-2	14,3	15,02	20,5
GA7/col 22.2-3	14,0	15,92	21,2
GA7/col 10.15-1	8,7	30,23	25,06
GA7/col 10.15-2	8,6	31,25	25,77
GA7/col 10.15-3	8,8	31,70	26,49

Пример 3. Стабильная экспрессия трансгенного пути ДГК в семенах *Camelina sativa*.

Бинарный вектор рJP3416-GA7, раскрытый выше, вводят в *A. tumefaciens*, штамм AGL1, и клетки из культуры трансформированного *Agrobacterium* используют для обработки цветущего растения *C. sativa*, с применением способа погружения цветков для трансформации (Lu and Kang, 2008). После выращивания и созревания растений, урожай семян T<sub>1</sub> с обработанных растений собирают, высевают в грунт, и полученные в результате растения обрабатывают путем опрыскивания гербицидом BASTA для селекции трансгенных растений, которые экспрессируют ген селекционного маркера bar на Т-ДНК рJP3416-GA7. Выжившие растения T<sub>1</sub>, толерантные к гербициду, выращивают до состояния зрелости после того, как им давали возможность самооплодотворения, и собирают урожай образовавшегося семени T<sub>2</sub>. Пять трансгенных растений были получены, только три из них содержали полную Т-ДНК.

Липид экстрагируют из пула приблизительно 20 семян каждого из трех растений, которые содержали полную Т-ДНК. Два из объединенных в пул образцов содержали очень низкие, едва обнаружимые уровни ДГК, но третий пул образцов содержал приблизительно 4,7% ДГК (табл. 12). Таким образом, липид был извлечен от 10 индивидуальных семян T<sub>2</sub> данного растения, и состав жирных кислот проанализирован методом ГХ. Данные относительно состава жирных кислот индивидуальных семян для данной трансформированной линии также приведены в табл. 11. Компилированные данные из профилей (табл. 11) общего липида семян приведены в табл. 12.



Таблица 11

Состав жирных кислот общего липида семян из трансгенных семян T<sub>2</sub> Camelina sativa, трансформированных T-ДНК из рJP3416-GA7. Состав жирных кислот приведен для объединенной в пул серии (FD5.46) семени и для 10 отдельных семян, ранжированных (слева направо) от самого высокого до самого низкого

Жирная кислота	Пул FD5.46	уровня ДГК									
		#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
14:0	0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
16:0	11,6	12,1	12,3	12,1	13,2	12,3	12,8	11,9	11,4	11,5	11,7
16:1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2
16:3	0,3	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	3,7	3,3	3,2	3,2	3,0	3,1	3,2	3,3	3,1	3,2	3,2
18:1	10,8	8,0	8,0	8,6	8,5	9,4	11,0	10,2	8,3	9,4	8,6
18:1d11	1,7	1,3	1,4	1,4	1,7	1,4	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3
18:2	24,7	18,2	19,5	19,2	18,5	20,1	23,8	32,2	30,3	29,8	31,6
18:3 $\omega$ 3	27,4	26,7	26,6	27,3	28,9	28,2	27,4	28,3	29,2	29,5	28,2
18:3 $\omega$ 6	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
18:4 $\omega$ 3	2,2	6,8	6,4	5,7	7,2	5,7	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:1d11	5,3	4,4	4,6	4,8	3,3	4,1	3,5	4,4	6,1	5,8	5,5
20:1iso	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
20:2 $\omega$ 6	0,8	0,8	0,9	0,8	0,6	0,8	0,7	1,3	1,5	1,4	1,4
20:3 $\omega$ 3	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
20:4 $\omega$ 3	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
20:5 $\omega$ 3	0,7	1,3	1,6	1,5	1,6	1,1	1,7	0,0	0,0	0,0	0,1
22:2 $\omega$ 6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,2	0,2
22:4 $\omega$ 6+22:3 $\omega$ 3	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
22:5 $\omega$ 3	0,3	1,1	1,2	1,1	1,1	0,9	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>22:6<math>\omega</math>3</b>	<b>4,7</b>	<b>9,0</b>	<b>8,5</b>	<b>8,3</b>	<b>8,3</b>	<b>7,1</b>	<b>4,9</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>

Таблица 12

Компилированные данные из профилей общего липида семян для трансгенного семени, приведенного в табл. 11

Параметр	Пул FD5.46	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
Общие ω3 (% от общих ЖК)	36,1	46	45,4	45	48,2	44,2	40,1	28,9	29,9	30,2	28,9
Общие ω6 (% от общих ЖК)	25,8	20,4	20,7	20,3	19,5	21,1	25	33,7	32,6	31,8	33,8
Соотношение ω3/ω6	1,40	2,25	2,19	2,22	2,47	2,09	1,60	0,86	0,92	0,95	0,86
Соотношение ω6/ω3	0,71	0,44	0,46	0,45	0,40	0,48	0,62	1,17	1,09	1,05	1,17
Общие новые ω3 (% от общих ЖК)	8,1	18,5	18	16,9	18,6	15,2	12	0	0	0	0,1
Общие новые ω6 (% от общих ЖК)	1,1	2,2	1,2	1,1	1	1	1,2	1,5	2,3	2	2,2
Соотношение новых ω3/ω6	7,36	8,41	15,00	15,36	18,60	15,20	10,00				0,05
Соотношение новых ω6/ω3	0,14	0,12	0,07	0,07	0,05	0,07	0,10				22,00
Эффективность превращения ОК в ЭПК	8,2%	15,6%	15,5%	15,1%	15,1%	12,8%	10,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
Эффективность превращения ОК в ДГК	6,7%	12,3%	11,6%	11,5%	11,4%	10,0%	7,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Эффективность превращения ЛК в ЭПК	9,2%	17,2%	17,1%	16,7%	16,2%	13,9%	11,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%
Эффективность превращения ЛК в ДГК	7,6%	13,6%	12,9%	12,7%	12,3%	10,9%	7,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Эффективность превращения АЛК в ЭПК	15,8%	24,8%	24,9%	24,2%	22,8%	20,6%	18,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%
Эффективность превращения АЛК в ДГК	13,0%	19,6%	18,7%	18,4%	17,2%	16,1%	12,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Общие насыщенные жирные кислоты	17,6	17,8	17,8	17,6	18	17,8	18,1	18,2	17,7	17,8	18,1
Общие монона- сыщенные жирные кислоты	19,8	15,5	16	16,6	14,3	16,6	16,8	18,7	19,3	19,6	18,6
Общие полина- сыщенные жирные кислоты	62,5	66,6	66,4	65,6	67,7	65,6	65,1	63	63,1	62,5	63,2
Общие С20	9,6	9,3	9,8	9,9	8,1	8,9	8,5	8,6	11	10,3	10,1
Общие С22	5,4	10,3	10	9,7	9,4	8,3	5,7	0,6	0,9	0,7	0,7
Соотношение Общие С20/С22	1,78	0,90	0,98	1,02	0,86	1,07	14,9	14,33	12,22	14,71	14,43

Вычисления не включают "незначительных жирных кислот", включенных в табл. 11.

ДГК присутствовала в 6 из 10 индивидуальных семян. Четыре остальных семени не содержали ДГК, и предположительно были нулевыми сегрегантами, не содержащими Т-ДНК, на основании гемизиготности вставки Т-ДНК в материнском растении. Экстрагированный липид из единственного семени с наиболее высоким уровнем ДГК содержал 9,0% ДГК, в то время как суммарный процент для ЭПК, ДПК и ДГК составил 11,4%. Суммарный процент для новых ω3 жирных кислот, продуцированных в данном семени в результате превращения (СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК, ДГК) составил 19,3%, тогда как соответствующий суммарный процент для новых ω6 жирных кислот (ГЛК, ЭДК, ДГЛК, АРК и любых продуктов ω6 элонгации) составил 2,2%; только ГЛК и ЭДК были обнаружены в качестве новых ω6 жирных кислот. Соотношение общих ω6 ЖК (включая ЛК) к ω3 ЖК (включая АЛК) составило 0,44. Соотношение новых ω6 ЖК (за исключением ЛК к новым ω3 ЖК (за исключением АЛК) в семени с наиболее высоким уровнем ДГК составило 0,12. Уровень общих насыщенных жирных кислот составил приблизительно 17,8%, и уровень мононенасыщенных жирных кислот составил приблизительно 15,5%. Уровень общих ω6 жирных кислот составил приблизительно 20,4%, и уровень ω3 жирных кислот составил приблизительно 46%. Вычисленная общая эффективность превращения составила: ОК в ЭПК = 15,6%, ОК в ДГК = 12,3%, ЛК в ЭПК = 17,2%, ЛК в ДГК = 13,6%, АЛК в ЭПК = 24,8%, АЛК в ДГК = 19,6%.

Гомозиготное семя данной линии получают в поколении Т4. До 10,3% ДГК вырабатывается в событии FD5-46-18-110 со средней величиной 7,3% ДГК, наблюдаемой для всего поколения Т4.

Гомозиготное семя высаживают в несколько теплиц, с целью получения в сумме свыше 600 инди-

видуальных растений. Масло экстрагируют из семени с применением различных способов, в том числе аппарата Сокслета, экстракции ацетоном и гексаном.

Поскольку количество полученных независимо трансформированных линий *C. sativa*, как раскрыто выше, было низким, выполняются дальнейшие эксперименты по трансформации *C. sativa* с помощью rJP3416-GA7. Изобретатели прогнозируют, что в дальнейших трансформированных линиях будут достигнуты уровни ДГК, превышающие 10%, как процент от общего содержания жирных кислот в масле из семян, и в растениях, гомозиготных по Т-ДНК - до 20% ДГК. Получены 20 событий *C. sativa* GA7\_modH, и семя проанализировано на предмет содержания ДГК. Получены 3 события GA7\_modB, и анализ семени T1 от события CMD17.1 выявил содержание ДГК в пуле семени 9,8%. Наиболее высокое содержание ДГК, обнаруженное в отдельных семенах, составляет 13,5%.

Пример 4. Стабильная экспрессия трансгенных путей ДГК в семенах *Brassica napus*.

Трансформация *B. napus* и анализ состава жирных кислот с использованием единственного вектора.

Бинарный вектор rJP3416-GA7 используют для получения трансформированных растений *Brassica napus* и семени из растений. Вектор rJP3416-GA7, раскрытый выше, вводят в *Agrobacterium tumefaciens*, штамм AGL1, посредством стандартных процедур электропорации. Культуры трансгенных клеток *Agrobacterium* выращивают на протяжении ночи при 28°C в среде Лурия-Бертани при взбалтывании со скоростью 150 об/мин. Бактериальные клетки собирают центрифугированием со скоростью 4000 об/мин в течение 5 мин, промывают средой Winans AB (Winans, 1988), ресуспендируют в 10 мл среды Winans AB (рН 5,2) и продолжают культивирование на протяжении ночи в присутствии канамицина (50 мг/л), рифампицина (25 мг/л) и 100 мкМ ацетосирингона. За 2 ч до инфицирования клеток *Brassica* добавляют спермидин (120 мг/л), и конечную плотность бактерий корректируют до OD 600 нм 0,3-0,4 свежей средой AB. Свежевыделенные семядольные черешки 8-дневных саженцев *Brassica napus*, выращенных на среде MS (Murashige and Skoog, 1962) с 1/2 активности или сегменты подсемядольного колена, предварительно кондиционированные в течение 3-4 дней на средах MS, содержащих 1 мг/л тиадiazурона (ТДЗ) и 0,1 мг/л  $\alpha$ -нафталинуксусной кислоты (НУК), инфицируют 10 мл культуры *Agrobacterium* в течение 5 мин. Экспланты, инфицированные *Agrobacterium*, в дальнейшем промокают стерильной фильтровальной бумагой для удаления избытка *Agrobacterium* и переносят в среды со-культивирования (среды MS, содержащие 1 мг/л ТДЗ, 0,1 мг/л НУК и 100 мкМ ацетосирингона), с добавлением или без добавления различных антиоксидантов (L-цистеин, 50 мг/л и аскорбиновая кислота 15 мг/л). Все планшеты герметизируют парафином и инкубируют в темноте при температуре 23-24°C в течение 48 ч.

Обработанные экспланты далее промывают стерильной дистиллированной водой, содержащей 500 мг/л цефотаксима и 50 мг/л тиментина, в течение 10 мин, ополаскивают стерильной дистиллированной водой в течение 10 мин, промокают стерильной фильтровальной бумагой, переносят в предселекционные среды (MS, содержащие 1 мг/л ТДЗ, 0,1 мг/л НУК, 20 мг/л аденина сульфата (АДС), 1,5 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 250 мг/л цефотаксима и 50 мг/л тиментина) и культивируют в течение 5 дней при температуре 24°C с фотопериодом 16/8 ч. После этого их переносят в селекционные среды (MS, содержащие 1 мг/л ТДЗ, 0,1 мг/л НУК, 20 мг/л АДС, 1,5 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 250 мг/л цефотаксима и 50 мг/л тиментина) с добавлением 1,5 мг/л аммония глюфофината в качестве агента для селекции трансформированных клеток, и культивируют в течение 4 недель при температуре 24°C с фотопериодом 16/8 ч, каждые две недели перевивая в такие же среды. Экспланты с зеленым каллюсом переносят в среды инициации побегов (MS, содержащие 1 мг/л кинетина, 20 мг/л АДС, 1,5 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 250 мг/л цефотаксима, 50 мг/л тиментина и 1,5 мг/л аммония глюфофината) и культивируют еще в течение 2-3 недель. Побеги, появляющиеся от резистентных эксплантов, переносят в среды удлинения побегов (среды MS, содержащие 0,1 мг/л гибберелловой кислоты, 20 мг/л АДС, 1,5 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 250 мг/л цефотаксима и 1,5 мг/л аммония глюфофината) и культивируют еще в течение двух недель. Здоровые побеги длины 2-3 см отбирают и переносят в среды корнеобразования (1/2 MS, содержащих 1 мг/л НУК, 20 мг/л АДС, 1,5 мг/л AgNO<sub>3</sub> и 250 мг/л цефотаксима) и культивируют в течение 2-3 недель. Хорошо развитые побеги с корнями переносят в горшки, содержащие смесь для роста саженцев, выращивают в комнате для роста в течение двух недель и далее переносят в теплицу. Приблизительно 40 (T<sub>0</sub>) растений, трансформированных конструкцией GA7, были получены данным способом.

Растения выращивают до состояния зрелости после предоставления им возможности для самооплодотворения. Семена, полученные от трансформированных растений, анализируют на предмет состава жирных кислот в масле из семян, как раскрыто в примере 1. Данные для трансформированной линии с наиболее высоким уровнем ДГК приведены в табл. 13. Существенно более низкие уровни ДГК в среднем присутствовали в масле из семян *B. napus*, трансформированных Т-ДНК из rJP3416-GA7, чем в семенах *A. thaliana* (пример 2) или семенах *Camelina* (пример 3), трансформированных такой же конструкцией. Наиболее высокий уровень ДГК приблизительно в 40 линиях был определен как составляющий 1,52%, причем большинство трансгенных линий содержали обнаружимые уровни ДГК. Следует отметить, что значимой была аккумуляция АЛК, приблизительно 35% от общих жирных кислот, в тех семенах, которые не осуществляли эффективного превращения в СДК или следующие продукты в пути.

Проанализированы профили жирных кислот в отдельных семенах *B. napus* от события T<sub>1</sub>, СТ125-2,

с целью более точного определения количества ДГК, продуцированной в трансгенных семенах. Обнаружено содержание в семенах от 0% (нулевые семена) до 8,5% ДГК (табл. 13).

Некоторые из семян от линии растений СТ116, а также других трансгенных линий, демонстрирующих выработку ДГК, высевают с целью получения растений-потомков. ОТ-ПЦР выполняют на общей РНК, выделенной из развивающихся эмбрионов от таких растений, для определения того, почему конструкция GA7 оказывает слабый эффект с точки зрения получения ДГК относительно трансгенных *A. thaliana* и *C. Sativa*, содержащих такую же конструкцию, и слабый эффект относительно комбинации генов на rJP3115 и rJP3116 (ниже). ОТ-ПЦР проводят на общей РНК с использованием набора для одностадийной ОТ-ПЦР (Invitrogen) и специфичных для гена праймеров, нацеленных на каждый трансген. Это подтвердило, что каждый из генов в конструкции GA7 надлежащим образом экспрессируется в трансформантах *V. parus*, за исключением Δ6-десатуразы, которая слабо экспрессировалась в большинстве трансформированных семян. Другие гены из указанного конструкта функционируют надлежащим образом в семенах *V. parus* и *A. thaliana*, например Δ12- и λ15-десатуразы, функция которых состоит в выработке повышенных уровней ЛК и АЛК в семенах, при снижении уровней олеиновой кислоты. Характерный гелевый ОТ-ПЦР проиллюстрирован на фиг. 7 и четко демонстрирует низкую экспрессию Δ6-десатуразы относительно других трансгенов из rJP3416-GA7.

Трансгенные растения и семя, гомозиготные по трансгенам, получают выращиванием потомства линий с наиболее высоким содержанием ДГК.

Таблица 13

Состав жирных кислот как процент от общих жирных кислот в масле из семян для независимого семени *T<sub>1</sub> Brassica napus*, трансформированного rJP3416-GA7, линии СТ116-11 и СТ-125-2, по сравнению с контролем дикого типа (нетрансформированный)

	Контроль	СТ116-11	СТ125-2	СТ125-2 #2 SS	СТ125-2 #3 SS	СТ125-2 #10 SS
14:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
16:0	4,3	7,2	5,2	6,5	4,7	7,7
16:1	0,2	0,5	0,4	0,3	0,3	0,8
16:3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
18:0	2,1	2,2	2,4	2,3	2,3	2,8
18:1d9	59,1	27,0	38,1	34,0	19,3	14,8
18:1d11	3,7	6,6	4,2	4,4	4,3	9,6
18:2	19,7	14,1	16,6	13,9	10,2	10,2
18:3ω3	8,3	35,2	27,7	34,1	49,5	37,9
20:0	0,6	0,5	0,6	0,4	0,3	0,7
18:4ω3	0,0	0,9	0,3	0,5	0,6	2,6
20:1d11	1,2	1,1	1,0	1,0	0,8	0,6
20:1is0		0,2		0,1		0,2
20:2ω6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20:3ω3		1,3	0,7	0,8	1,6	0,9
22:0	0,3	0,4	0,3	0,1	0,1	0,4
20:4ω3		0,1	0,3	0,4	0,6	0,5
22:1						
20:5ω3					0,1	0,3
22:3ω3					0,1	
24:0	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3
24:1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1
22:5ω3		0,1	0,1	0,1	0,1	0,5
<b>22:6ω3</b>		<b>1,52</b>	<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	<b>2,7</b>	<b>8,5</b>

22:6ω3 представляет ДГК. Данные единичных семян СТ125-2 *V. parus* обозначены "SS".

Трансформация *V. parus* и анализ состава жирных кислот с использованием двух векторов.

В другом эксперименте с *V. parus*, и в качестве альтернативного формата для введения трансгенов, бинарные векторы rJP3115 и rJP3116, раскрытые в WO 2010/057246, используют для отдельного получения трансформированных растений *V. parus*, и получают трансформированные семена от растений. Т-ДНК на rJP3115 содержит химерные гены, кодирующие Δ12-десатуразу *Crepis palestina*, Δ6-десатуразу *Micromonas pusilla*, Δ6-элонгазу *Ryamimonas cordata* и Δ5-десатуразу *Pavlova salina*, и Т-ДНК на rJP3116 содержит химерные гены, кодирующие Δ15-десатуразу *Perilla frutescens*, Δ5-элонгазу *Ryamimonas cordata* и Δ4-десатуразу *Pavlova salina*. Две Т-ДНК, если они присутствуют совместно и экспрессируются в развивающихся семенах, образуют 7-генный путь для получения ДГК из эндогенно вырабатываемой олеиновой кислоты. Указанные векторы вводят в *Agrobacterium tumefaciens*, штамм AGL1, посредством

стандартных процедур электропорации, и трансформированные клетки используют независимо для трансформации *V. parvus* с применением раскрытого выше способа для получения стабильно трансформированных растений T<sub>0</sub>. Были получены 29 трансформантов rJP3115 и 19 трансформантов rJP3116, указанные растения были выращены до состояния зрелости, и полученные семена после самооплодотворения были проанализированы на предмет состава жирных кислот в масле из семян. В случае T-ДНК из rJP3115 ожидалось, что превращение будет приводить к образованию ЭПК из эндогенно вырабатываемой АЛК, тогда как в случае T-ДНК из rJP3116 ожидался результат в виде повышенной выработки АЛК из ЛК. Идентифицированы некоторые растения, которые демонстрировали указанные фенотипы. Большинство событий демонстрировали фенотип снижения ОК/повышения ЛК в результате Δ12 десатурации, с низким уровнем продуцирования ЭПК. До 2,6% ЭПК наблюдалось в пуле трансгенного семени rJP3115. Подобным образом, обнаружено, что большинство событий rJP3116 содержат фенотип повышения АЛК в результате активности Δ15-десатуразы. До 18,5% АЛК обнаружено в пуле семени, трансформированного T-ДНК из rJP3116.

Растения T<sub>1</sub> из линий с наиболее высокими уровнями ЭПК и АЛК скрещивают, и семена потомков (F1) от 24 выделенных событий анализируют на предмет содержания ДГК. В 17 из этих событий обнаружена ДГК, причем до 1,9% ДГК найдено в пуле семени от этих событий. Анализ единичных семян выполняют с целью определения интервала выработки ДГК - данные приведены в табл. 14. Большой интервал уровней ДГК наблюдается у потомков скрещивания, вероятно за счет гемизиготной природы T-ДНК в материнских растениях, таким образом, что некоторые семена не получили обеих T-ДНК. До 6,7% ДГК наблюдается в общем липиде семени.

Таблица 14

Состав жирных кислот как процент от общих жирных кислот в масле из семян для единичных семян *V. parvus* F1, полученных в результате скрещивания растений, трансгенных по T-ДНК из rJP3115, с растениями, трансгенными по T-ДНК из rJP3116. B1, B2 и B4 обозначают события

	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4-g	B1.5-g	B2.1	B2.2	B2.3-g	B2.4-g	B2.5-g	B3.1	B3.2
14:0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
16:0	6,6	6,4	4,5	12,3	7,9	5,1	5,0	10,1	8,5	6,8	5,3	7,2
16:1	0,4	0,5	0,2	1,0	0,6	0,4	0,4	0,6	1,1	0,5	0,5	0,6
16:3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2
18:0	2,3	2,6	2,2	1,6	2,9	2,9	3,4	2,2	1,8	2,9	3,4	2,4
18:1	34,1	39,3	46,9	14,9	20,7	41,6	46,3	14,4	23,4	38,3	43,6	32,0
18:1d11	4,6	5,8	2,7	6,8	6,2	3,8	4,9	5,9	8,7	4,5	5,5	5,1
18:2	33,6	30,7	30,4	29,2	34,4	31,7	27,7	33,2	23,9	33,3	27,9	33,4
18:3ω6	0,2	0,3	0,1	0,4	0,4	0,2	0,2	0,7	0,1	0,2	0,2	0,3
18:3ω3	10,3	7,1	7,7	18,7	14,9	8,2	5,9	14,8	28,1	6,3	7,3	10,0
20:0	0,6	0,7	0,6	0,5	0,7	0,8	0,9	0,6	0,4	0,7	0,9	0,7
18:4ω3	0,2	0,1	0,1	0,8	0,5	0,2	0,2	0,8	0,0	0,2	0,2	0,2
20:1d11	1,0	1,1	1,1	0,7	0,8	1,1	1,1	0,5	0,9	1,1	1,1	0,9
20:liso	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
20:2ω6	0,4	0,3	0,2	0,5	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5	0,5	0,3	0,5
20:3ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:3ω3	1,8	1,6	1,1	2,8	2,1	1,1	1,0	2,7	0,7	1,4	0,9	1,6
22:0	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4
20:4ω3	0,3	0,2	0,2	0,4	0,4	0,1	0,1	0,5	0,0	0,2	0,1	0,2
22:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5ω3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
22:2ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:4ω6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2
24:0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3
22:5ω6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,5	0,0	0,2	0,1	0,2
24:1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
22:5ω3	0,7	0,7	0,3	2,1	1,6	0,3	0,4	3,2	0,0	0,5	0,4	1,2
<b>22:6ω3</b>	<b>1,4</b>	<b>1,0</b>	<b>0,5</b>	<b>5,5</b>	<b>3,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,7</b>	<b>6,7</b>	<b>0,0</b>	<b>1,1</b>	<b>0,8</b>	<b>2,0</b>

0.0 = невозможно обнаружить методом ГХ.

Таблица 15

Компилированные данные из профилей общего липида семени  
для трансгенного семени, приведенного в табл. 14

Параметр	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4-g	B1.5-g	B2.1	B2.2	B2.3-g	B2.4-g	B2.5-g	B3.1
Общие ω3 (% от общих ЖК)	4,6	3,9	2,3	12,1	9	2,7	2,6	14,8	0,8	3,6	2,6
Общие ω6 (% от общих ЖК)	44,5	38,5	38,5	48,8	50,3	40,5	34,1	49,4	52,7	40,5	35,7
Соотношение ω3/ω6	0,10	0,10	0,06	0,25	0,18	0,07	0,08	0,30	0,02	0,09	0,07
Соотношение ω6/ω3	9,67	9,87	16,74	4,03	5,59	15,00	13,12	3,34	65,88	11,25	13,73
Общие новые ω3 (% от общих ЖК)	2,6	2	1,1	8,9	6,5	1,4	1,4	11,4	0	2	1,5
Общие новые ω6 (% от общих ЖК)	10,5	7,5	7,9	19,1	15,4	8,4	6,1	15,8	28,3	6,7	7,5
Соотношение новых ω3/ω6	0,25	0,27	0,14	0,47	0,42	0,17	0,23	0,72	0,00	0,30	0,20
Соотношение новых ω6/ω3	4,04	3,75	7,18	2,15	2,37	6,00	4,36	1,39		3,35	5,00
Эффективность превращения	2,5%	2,1%	0,9%	10,1%	6,9%	1,3%	1,3%	12,8%		1,9%	1,4%
Эффективность превращения ОК в ЭПК											
Эффективность превращения ОК в ДГК	1,7%	1,2%	0,6%	7,2%	4,8%	0,9%	0,8%	8,5%		1,3%	1,0%
Эффективность превращения ЛК в ЭПК	4,3%	4,0%	2,0%	12,6%	9,4%	2,5%	3,0%	15,7%		3,6%	3,1%
Эффективность превращения ЛК в ДГК	2,9%	2,4%	1,2%	9,0%	6,6%	1,9%	1,9%	10,4%		2,5%	2,1%
Эффективность превращения АЛК в ЭПК	47,7%	44,7%	36,4%	68,1%	65,9%	44,0%	45,8%	72,1%		47,1%	50,0%
Эффективность превращения АЛК в ДГК	31,8%	26,3%	22,7%	48,7%	45,9%	32,0%	29,2%	47,9%		32,4%	33,3%
Общие насыщенные жирные кислоты	10,2	10,6	7,9	15,1	12,4	9,6	10,2	13,7	11,6	11,3	10,6
Общие мононенасыщенные жирные кислоты	40,4	47	51,1	23,8	28,7	47,2	53	21,8	34,7	44,7	51
Общие полиненасыщенные жирные кислоты	49,2	42,5	40,9	61	59,4	43,3	36,8	64,3	53,7	44,2	38,4
Общие С20	4,2	4	3,2	5,1	4,7	3,6	3,5	5,1	2,8	4	3,4
Общие С22	2,6	2,5	1,3	8,3	6,4	1,7	1,8	11,1	0,5	2,4	1,9
Соотношение Общее С20/С22	1,62	1,60	2,46	0,61	0,73	2,12	1,94	0,46	5,60	1,67	1,79

Вычисления не включают "незначительных жирных кислот", включенных в табл. 14.

Компилированные данные профилей общего липида (табл. 14) приведены в табл. 15. На основе данных табл. 15 соотношение общих ω6 ЖК (включая ЛК) и ω3 ЖК (включая АЛК) в семени с наиболее высоким уровнем ДГК составляло 3,34. Соотношение новых ω6 ЖК (за исключением ЛК) и новых ω3 ЖК (за исключением АЛК) составляло 1,39. Уровень общих насыщенных жирных кислот составлял приблизительно 13,7%, и уровень мононенасыщенных жирных кислот составлял приблизительно 21,8%. Уровень общих ω6 жирных кислот составлял приблизительно 46,4%, и уровень ω3 жирных кислот составлял приблизительно 14,8%. Вычисленная общая эффективность превращения составляла: ОК в

ЭПК = 12,8%, ОК в ДГК = 8,5%, ЛК в ЭПК = 15,7%, ЛК в ДГК = 10,4%, АЛК в ЭПК = 72,1%, АЛК в ДГК = 47,9%. Сниженная эффективность превращения  $\omega 6$  жирных кислот в  $\omega 3$  жирные кислоты, которая наблюдалась в данном эксперименте при использовании комбинации рJP3115 и рJP3116, была отнесена на счет более низкой эффективности растительной  $\Delta 15$ -десатуразы, по сравнению с грибковой  $\Delta 15/\omega 3$  десатуразой (примеры 2 и 3) при комбинации с генами для превращения АЛК в ДГК.

Потомство ДГК-содержащих линий, гомозиготных по всем введенным трансгенам, было получено для анализа.

Пример 5. Модификации Т-ДНК, кодирующих пути ДГК в семенах растений.

Для улучшения уровня выработки ДГК в *B. napus* по сравнению с уровнями, описанными в примере 4, бинарные векторы рJP3416-GA7-modA, рJP3416-GA7-modB, рJP3416-GA7-modC, рJP3416-GA7-modD, рJP3416-GA7-modE и рJP3416-GA7-modF были сконструированы, как раскрыто ниже. Эти бинарные векторы представляют собой варианты конструкции рJP3416-GA7, раскрытой в примере 2, и были сконструированы с целью дальнейшего повышения синтеза ДГК в семенах растений, особенно путем улучшения функций  $\Delta 6$ -десатуразы и  $\Delta 6$ -элонгазы. Наблюдалась аккумуляция СДК в некоторых семенах, трансформированных конструкцией GA7, вследствие относительно низкой эффективности элонгации, по сравнению с  $\Delta 5$ -элонгазой, поэтому, среди прочих модификаций, положение двух генов элонгазы было поменяно в Т-ДНК.

Две последовательности, кодирующие элонгазы в рJP3416-GA7, были поменяны местами на Т-ДНК, с получением рJP3416-GA7-modA первым клонированием новой кассеты  $\Delta 6$ -элонгазы *P. cordata* между сайтами SbjI рJP3416-GA7, для замены кассеты  $\Delta 5$ -элонгазы *P. cordata*. Данная конструкция была дополнительно модифицирована посредством обмена промотора FP1, управляющего  $\Delta 6$ -десатуразой *M. pusilla*, с промотором конлинина Cnl2 (pLuCnl2), чтобы получить рJP3416-GA7-modB. Данная модификация была осуществлена с целью увеличения экспрессии  $\Delta 6$ -десатуразы, и таким образом эффективности фермента. Считается, что промотор Cnl2 может давать более высокую экспрессию трансгена в *B. napus*, чем укороченный промотор напина. рJP3416-GA7-modC был получен посредством добавления второй кассеты  $\Delta 6$ -десатуразы *M. pusilla* с несколько иным использованием кодонов (SEQ ID NO: 15), управляемой промотором FP1, который был вставлен в сайт PmeI только внутри правой границы рJP3416-GA7-modB. Вторая кассета  $\Delta 6$ -десатуразы добавлена к рJP3416-GA7-modB и рJP3416-GA7-modF с целью повышения уровня экспрессии  $\Delta 6$ -десатуразы и увеличения периода времени в процессе развития семени для экспрессии  $\Delta 6$ -десатуразы посредством использования нескольких промоторов. Различные способы использования кодонов применялись в двух нуклеотидных последовательностях, чтобы осуществить трансляцию одной и той же последовательности белка без риска ко-супрессии со стороны подобных кодирующих участков в пределах одной и той же Т-ДНК. рJP3416-GA7-modD и рJP3416-GA7-modE представляют собой сходные варианты, в которых третья последовательность УПМ, соответствующая нуклеотидам 16649-17816 SEQ ID NO: 1, добавлена к рJP3416-GA7 и рJP3416-GA7-modB соответственно на сайте PmeI. рJP3416-GA7-modF получен путем добавления второй кассеты  $\Delta 6$ -десатуразы *M. pusilla*, содержащей нуклеотидную последовательность природной  $\Delta 6$ -десатуразы и управляемой промотором FP1 на сайте PmeI в правой границе рJP3416-GA7-modB. рJP3416-GA7-modG получен вначале заменой кассеты  $\Delta 6$ -десатуразы *M. pusilla* на кассету Cnl2: $\Delta 5$ -элонгазы *P. cordata* рестрикционным клонированием на сайтах AscI-PacI. Далее рJP3416-GA7-modG был получен посредством замены оригинальной кассеты FAE1: $\Delta 5$ -элонгазы *P. cordata* на кассету FAE1: $\Delta 6$ -десатураза *M. pusilla* рестрикционным клонированием на сайтах SbfI. Нуклеотидные последовательности Т-ДНК из каждой из указанных генетических конструкций приведены как: рJP3416-GA7-modB (SEQ ID NO: 2), рJP3416-GA7-modC (SEQ ID NO: 3), рJP3416-GA7-modD (SEQ ID NO: 4), рJP3416-GA7-modE (SEQ ID NO: 5), рJP3416-GA7-modF (SEQ ID NO: 6) и рJP3416-GA7-modG (SEQ ID NO: 7).

Бинарные векторы рJP3416-GA7-modB, рJP3416-GA7-modC, рJP3416-GA7-modD, рJP3416-GA7-modE, рJP3416-GA7-modF и рJP3416-GA7-modG используются для получения трансформированных соматических эмбрионов *Brassica* и растений *Brassica napus*, *Camelina sativa* и *Arabidopsis thaliana*, а также семян потомства. Данные для рJP3416-GA7-modB приведены в следующем примере.

Получены 8 трансгенных событий рJP3416-GA7-modB *A. thaliana* и 15 трансгенных событий рJP3416-GA7-modG *A. thaliana*. Наблюдается от 3,4 до 7,2% ДГК в пуле семени рJP3416-GA7-modB, и от 0,6 до 4,1% ДГК в пуле семени T2 рJP3416-GA7-modG. Некоторые из событий рJP3416-GA7-modB с наиболее высоким уровнем высевают на селекционные среды, и выжившие саженцы отбирают для следующего поколения. Семя анализируют на предмет содержания ДГК. Поскольку объединенные в пул семена T1 представляют популяции, сегрегированные по трансгенам, и включают любые нулевые сегреганты, ожидается, что в гомозиготном семени растений-потомков уровни ДГК будут выше, до 20% от общего содержания жирных кислот в масле семени. Другие модифицированные конструкции использовались для трансформации *A. thaliana*. Хотя получено только небольшое количество трансформированных линий, ни одна из них не давала более высоких уровней ДГК, чем конструкция modB.

Конструкция рJP3416-GA7-modB также использовалась для получения трансформированных растений *B. napus* сорта Oscar и в линии разведения, обозначенной NX005. Таким образом были получены

10 независимых трансформированных растений (Т0) для трансформации Oscar, и 20 независимых линий - для NX005. Урожай семени (семя Т1) получен от указанных трансгенных линий. Пулы семени были проанализированы на предмет уровней ДГК в масле из семян, и две линии, которые продемонстрировали самые высокие уровни, были выбраны и обозначены как линии СТ132.5 (в сорте Oscar) и СТ133.15 (в NX005). Набухают 20 семян из СТ132.5 и 11 семян из СТ133.15, и через два дня масло извлекают из половины семядоли каждого из индивидуальных семян. Вторую половину семядоли с эмбриональными осями содержат и культивируют на средах, чтобы сохранить конкретные линии потомков. Состав жирных кислот в масле определяют; данные для СТ132.5 приведены в табл. 16. Уровень ДГК в 10 из проанализированных 20 семян, по данным анализа методом ГХ, находится в интервале 7-20% от общего содержания жирных кислот. Другие семена содержали менее 7% ДГК и могли содержать частичную (неполную) копию Т-ДНК из rJP3416-GA7-modB. По-видимому, трансгенная линия содержит множественные вставки трансгена, которые были генетически разъединены. Семена трансгенной линии СТ133.15 продемонстрировали уровни ДГК в интервале 0-5%. Семена без ДГК, вероятно, были нулевыми сегрегантами. Эти данные подтверждают, что конструкция modB функционирует надлежащим образом для получения ДГК в семени рапса.

Конструкции rJP3416-GA7-modB и rJP3416-GA7-modF также использовались для получения трансформированных растений *Camelina sativa*. По меньшей мере 24 независимых трансформированных растения (Т0) были получены и более подробно изучены посредством анализа потомков. Урожай семени (семя Т1) был собран с указанных трансгенных линий. Пулы семени были проанализированы на предмет уровней ДГК в масле из семян, и 6 линий, которые продемонстрировали самые высокие уровни ДГК (от 6 до 9%), были отобраны. Уровни ДГК в 20 семенах Т1 из каждой линии были проанализированы, и большинство семян продемонстрировали уровни ДГК в интервале 6-14% от общего содержания жирных кислот, по данным анализа методом ГХ. Состав жирных кислот в масле был определен; данные для нескольких трансгенных семян приведены в табл. 17. Эти данные подтверждают, что конструкции modB и modF обе надлежащим образом функционируют для продуцирования ДГК в зерне *Camelina*.

Таблица 16

Профили жирных кислот в половинках семядоли пророщенных трансгенных семян Т1 *V. napus*, содержащих конструкт modB

Семя	14:0	16:0	16:1n3?	16:1	16:3	18:0	18:1	18:1n1	18:2	18:3n6	18:3n3	20:0	18:4n3	C20:1n1	20:1n13	C20:2n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
1	0.1	4.2	0.1	0.1	0.2	1.8	29.9	2.5	9.9	0.1	38.4	0.5	0.8	1.0	0.0	0.1	2.1	0.3	2.8	0.3	0.1	0.2	0.2	0.5	3.9
2	0.1	4.7	0.1	0.1	0.2	4.0	23.0	2.3	7.4	0.3	29.3	1.0	4.3	1.1	0.0	0.1	1.9	0.4	6.9	1.0	0.0	0.3	0.1	1.7	9.5
3	0.1	3.7	0.2	0.1	0.2	1.8	55.1	1.9	4.7	0.2	15.2	0.8	1.8	1.4	0.0	0.1	0.3	0.5	11.3	0.0	0.0	0.3	0.2	0.0	0.0
4	0.1	4.6	0.2	0.2	0.2	2.9	22.1	1.8	6.6	0.4	26.5	1.0	7.2	1.0	0.0	0.1	0.8	0.5	11.2	1.9	0.0	0.2	0.2	1.7	8.7
5	0.1	4.0	0.1	0.1	0.2	1.7	27.4	2.1	8.1	0.3	26.4	0.6	2.8	1.0	0.0	0.1	1.5	0.3	7.6	1.5	0.0	0.1	0.1	1.8	12.2
6	0.1	3.5	0.1	0.1	0.2	1.6	59.8	2.0	4.3	0.1	18.5	0.6	0.5	1.3	0.0	0.0	0.7	0.3	6.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0
7	0.1	6.0	0.3	0.3	0.3	1.7	16.6	2.6	23.9	1.0	23.2	0.6	5.4	0.8	0.0	0.2	0.6	0.4	2.6	1.1	0.0	0.3	0.3	1.7	9.9
8	0.1	4.9	0.1	0.1	0.2	2.7	12.9	1.4	11.7	0.3	34.3	0.9	5.0	0.9	0.0	0.2	2.4	0.5	4.1	1.3	0.0	0.2	0.2	1.8	13.8
9	0.1	3.9	0.1	0.1	0.1	2.4	41.6	1.7	21.5	0.0	23.4	0.7	0.0	1.2	0.0	0.1	2.2	0.4	0.0	0.0	0.1	0.3	0.2	0.0	0.0
10	0.1	3.7	0.2	0.1	0.1	2.1	30.9	1.7	19.2	0.4	23.6	0.7	2.1	1.1	0.0	0.1	1.5	0.4	3.6	0.6	0.0	0.2	0.1	0.7	6.9
11	0.1	5.7	0.4	0.3	0.2	3.8	41.2	2.4	26.7	2.1	7.2	1.3	0.3	1.2	0.0	0.2	0.3	0.8	4.8	0.0	0.0	0.6	0.3	0.0	0.0
12	0.1	4.6	0.0	0.1	0.2	2.4	25.5	1.7	16.1	0.3	28.9	0.8	3.9	1.1	0.0	0.1	1.9	0.4	3.9	0.6	0.0	0.2	0.0	1.1	6.2
13	0.1	4.3	0.1	0.1	0.1	4.2	19.4	1.6	9.2	0.1	45.5	1.0	0.2	1.1	0.0	0.1	5.2	0.4	2.6	0.3	0.2	0.2	0.1	0.4	3.4
14	0.1	6.3	0.2	0.2	0.2	4.0	10.5	2.3	8.4	1.3	31.1	1.3	3.9	0.8	0.0	0.1	2.3	0.6	4.6	1.8	0.1	0.3	0.2	2.5	18.1
15	0.1	5.1	0.1	0.2	0.2	3.3	16.8	2.4	11.2	0.3	28.8	1.0	4.5	0.9	0.0	0.1	2.1	0.6	3.2	1.5	0.1	0.3	0.1	1.8	15.1
16	0.1	4.4	0.1	0.1	0.2	4.0	16.2	1.5	11.6	0.2	33.5	0.9	2.8	1.1	0.0	0.2	3.7	0.4	4.6	0.7	0.1	0.3	0.1	1.3	12.1
17	0.2	7.2	0.2	0.2	0.2	4.9	15.0	2.1	8.9	0.3	25.9	1.4	5.1	0.9	0.0	0.0	1.6	0.8	4.9	2.1	0.0	0.6	0.3	2.2	15.0
18	0.1	4.0	0.1	0.1	0.2	2.3	64.8	1.2	7.2	0.1	12.5	1.0	3.5	1.5	0.0	0.1	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.5	0.2	0.0	0.0
19	0.1	3.9	0.1	0.1	0.2	4.6	36.9	1.7	7.1	0.2	28.6	1.2	1.8	1.2	0.0	0.1	1.4	0.5	4.3	0.4	0.0	0.4	0.1	0.8	4.3
20	0.1	4.8	0.1	0.1	0.2	6.0	18.5	1.2	12.8	0.2	34.8	1.4	2.4	1.1	0.0	0.1	3.4	0.6	3.2	0.4	0.1	0.3	0.1	0.7	7.6

До 18,1% ДГК наблюдалось в многочисленных образцах, содержащих более 10% ДГК.

Таблица 17

Профили жирных кислот трансгенных семян Т1 *C. sativa*, содержащих конструкты modB или modF

	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1n1	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1n1	20:1n13	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	C22:1	20:5n3	C22:2n6	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
123-12	0.1	8.3	0.0	5.2	7.9	1.0	7.7	0.7	29.9	2.3	2.5	6.7	7.1	0.4	0.7	0.0	0.9	0.4	1.3	1.0	4.6	0.0	0.1	0.2	0.3	1.5	13.3
5-8	0.1	8.3	0.1	3.5	9.4	1.3	8.1	1.1	29.0	1.0	9.3	7.9	0.4	0.8	0.0	0.0	0.8	0.2	0.4	0.8	3.4	0.0	0.1	0.2	0.4	0.9	12.6
5-9	0.1	8.1	0.0	3.5	9.4	1.2	8.4	1.2	29.2	1.0	9.0	8.1	0.3	0.8	0.0	0.0	0.8	0.2	0.5	0.8	3.5	0.0	0.1	0.1	0.3	0.9	12.6
17-10	0.1	8.7	0.1	4.1	8.4	1.3	5.5	1.2	26.1	1.6	11.8	7.2	0.3	0.0	0.4	0.03	0.8	0.3	0.4	0.7	5.5	0.0	0.0	0.2	0.3	1.3	13.5
17-26	0.1	8.8	0.1	5.5	5.0	1.3	7.6	0.9	27.8	2.7	10.1	6.2	0.3	0.0	0.7	0.03	1.1	0.6	0.5	1.0	4.7	0.1	0.1	0.3	0.4	1.0	13.1

Изобретатели считают, что, в общем, эффективность ограничивающей скорость ферментной активности в пути ДГК может быть выше в трансформантах, содержащих несколько копий Т-ДНК, по сравнению с трансформантами, содержащими единственную копию Т-ДНК, или может быть увеличена посредством вставки в Т-ДНК нескольких генов, кодирующих фермент, который может быть ограничивающим в пути. Доказательства возможной значимости трансформантов, содержащих несколько копий, наблюдались в семенах *Arabidopsis*, трансформированных конструкцией GA7 (пример 2), в которых событие с



наиболее высоким содержанием ДГК включало три Т-ДНК, вставленные в геном хозяина. Несколько генов могут быть идентичными или предпочтительно представляют собой различные варианты, кодирующие один и тот же полипептид, или находящиеся под контролем различных промоторов, которым свойственен частично перекрывающийся характер экспрессии. Например, увеличенная экспрессия могла бы быть достигнута путем экспрессии нескольких участков, кодирующих  $\Delta 6$ -десатуразу, даже, если вырабатывается один и тот же белок. Например, в рJP3416-GA7-modF и рJP3416-GA7-modC присутствуют две версии  $\Delta 6$ -десатуразы *M. pusilla*, которые экспрессируются различными промоторами. Кодированные последовательности включают различное использование кодонов, и таким образом различные нуклеотидные последовательности, с целью уменьшения потенциального сайленсинга или эффектов ко-супрессии, но приводящие к выработке одного и того же белка.

Пример 6. Активность специфичных для семени конструкций в соматических эмбрионах.

Для получения системы быстрого анализа, которая будет прогностической для экспрессии генетических конструкций в семенах под контролем специфичных для семени промоторов, система соматических эмбрионов была получена для *Brassica napus*. Это осуществляется с использованием вектора для экспрессии фактора транскрипции LEC2, который принимает участие в инициации соматического эмбриогенеза. В качестве демонстрации бинарные векторы 35S:LEC2 и рJP107 (Petrie et al., 2010a и b) вводят в *Agrobacterium tumefaciens*, штамм AGL1, посредством стандартной электропорации, и трансформантов *Agrobacterium* используют для со-трансформации *Brassica napus* посредством со-культивирования. Участок Т-ДНК рJP107 содержит гены, кодирующие  $\Delta 9$ -элонгазу *Isochrysis galbana*,  $\Delta 8$ -десатуразу *P. salina* и  $\Delta 5$ -десатуразу *P. Salina*, причем каждый ген экспрессируется специфичным для семени промотором. Для контрольной трансформации используют только векторы 35S:LEC2. Экспрессия 35S:LEC2 приводит к генерации соматических эмбрионов в культуре ткани непосредственно из ткани каллуса трансформированной *B. napus*, как раскрыто в примере 1.

Анализ жирных кислот продемонстрировал, что специфичные для семени гены на Т-ДНК конструкции рJP107 экспрессируются в трансгенных соматических эмбрионах в присутствии со-трансформирующего гена LEC2 и функционируют для выработки АРК (20:4<sup>A5,8,11,14</sup>) из ЛК и ЭПК (20:5<sup>A5,8,11,14,17</sup>) из АЛК. Данные для трех со-трансформированных соматических эмбрионов приведены в табл. 18, и состав жирных кислот каждого из них сравнивается с составом жирных кислот масла из семян для семени *Brassica napus*, которое было трансгенным, и экспрессирующим Т-ДНК рJP107 (Petrie et al., 2010a и b). Сходный общий процент АРК и промежуточных жирных кислот ЭДК (20:2 $\omega$ 6) и ДГЛК (20:3 $\omega$ 6), а также эффективность превращения, наблюдались для соматической эмбриональной ткани, при сравнении с профилями стабильно трансформированных семян. Подобные результаты наблюдались для состава жирных кислот стабильного трансгенного семени T<sub>2</sub> и соматических эмбрионов: содержание  $\omega$ 6 жирных кислот находилось на уровне 26,6 и 25,6% (средняя величина) соответственно, тогда как уровни АРК составляли 9,7 и 10,6% (средняя величина) соответственно.

При введении только 35S:LEC2 и анализе соматических эмбрионов во времени было обнаружено, что профиль жирных кислот меняется на более сходный с эмбрионами профиль, причем содержание 18:3<sup>A9,12,15</sup> снижается, и содержание 18:1<sup>A9</sup> повышается обратным коррелирующим образом (фиг. 8). Полученные результаты указывают на то, что соматические эмбрионы действительно становились сходными по характеру с семенем, и экспрессировались гены на Т-ДНК из рJP107. Это является демонстрацией того, что система соматических эмбрионов позволяет быструю характеристику специфичных для семени трансгенных конструкций в *B. napus*, без необходимости в осуществлении полного способа получения трансгенного растения и его зрелого семени.

Таблица 18

Состав жирных кислот липида, полученного из соматических эмбрионов *Brassica napus*, генерированных посредством со-трансформации рJP107 и 35S:LEC2, по сравнению с контрольными нетрансформированными семенами (ДТ) и семенами T<sub>2</sub>, трансформированными рJP107

	ДТ	Трансгенное семя T <sub>2</sub> рJP107	LEC2:#45	LEC2:#57	LEC2:#58
18:1 <sup>A9</sup>	57,2	45,7	3,8	2,5	1,9
18:2 <sup>A9,12</sup>	19,1	8,7	10	10,6	10
18:3 <sup>A9,12,15</sup>	10,2	4,1	22,5	27,5	24,2
20:2 <sup>A11,14</sup>		7,1 ± 1,9 (67% D9-эло)	5,2 (61,8% D9-эло)	3,7 (56,7% D9-эло)	4,6 (61,8% D9-эло)
20:3 <sup>A8,11,14</sup>		1,1 ± 0,2 (60% D8-дес)	0,4 (67% D8-дес)	0,2 (73% D8-дес)	0,4 (73% D8-дес)
20:4 <sup>A5,8,11,14</sup>		9,7 ± 0,9 (90% D5-дес)	10,6 (98% D5-дес)	10 (96% D5-дес)	11,2 (97% D5-дес)

20:3 <sup>Δ11,14,17</sup>		4,0 ± 0,8	9,9	5,5	7,3
20:4 <sup>Δ8,11,14,17</sup>		0,3 ± 0,1	0,4	0,3	0,4
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>		2,4 ± 0,2	7,6	6,4	7,9
<b>Всего новых</b>		24,6	34,1	26,1	31,8

Эффективность превращения для отдельных ферментов приведена в скобках после соответствующих ферментных стадий. D9-Эло обозначает Δ9-элонгазу, D8-Дес обозначает Δ8-десатуразу, и D5-Дес обозначает Δ5-десатуразу.

С использованием такой же системы для генерации соматических эмбрионов клетки *Brassica napus* по отдельности трансформируют рJP3416-GA7-modB и рJP3416-GA7-modD. Были получены 42 эмбриона, 18 для modB и 24 для modD. Общий липид экстрагируют из эмбрионов и анализируют состав жирных кислот. Эмбрионы содержат от 0 до 16,9% ДГК (табл. 19). Результаты с 0% ДГК предположительно были получены вследствие только частичной интеграции Т-ДНК или вставки в транскрипционно "молчащий" участок генома. Соотношение общих ω3 ЖК (в том числе АЛК) к общим ω6 ЖК (в том числе ЛК) составляет 2,3 для эмбриона #270 и 11,96 для эмбриона #284. Соотношение общих ω6 ЖК (в том числе ЛК) к общим ω3 ЖК (в том числе АЛК) составляет 0,08 для #284. Соотношение новых ω6 ЖК (за исключением ЛК) к новым ω3 ЖК (за исключением АЛК) составляет 0,03 для #284. Вычисленная общая эффективность превращения составляет: (для эмбрионов #270, #284) ОК в ЭПК = 14,0%, 29,8%; ОК в ДГК = 9,7%, 24,2%; ЛК в ЭПК = 15,4%, 30,7%; ЛК в ДГК = 10,7%, 25,0%; АЛК в ЭПК = 22,1%, 33,3%; АЛК в ДГК = 15,3%, 27,0%. Эти значения эффективности сходны или превышают, в случае #284, наблюдаемые для линий T<sub>3</sub> рJP3416-GA7 *Arabidopsis*, что указывает на способность вектора рJP3416-GA7-modB к надлежащему функционированию в клетках *B. napus*. Уровень СДК составляет менее 3,0%, указывая на то, что Δ6-элонгаза функционирует даже лучше, чем конструкция GA7. Индивидуальная эффективность ферментов, достигнутая в #284, составляла: 97,4% для Δ12-десатуразы; 92,3% для ω3-десатуразы; 38,2% для Δ6-десатуразы; 88,2% для Δ6-элонгазы; 98,8% для Δ5-десатуразы; 94,1% для Δ5-элонгазы; и 86,3% для Δ4-десатуразы. Общее содержание насыщенных жирных кислот составляет 21,2%, общее содержание мононенасыщенных жирных кислот составляет 10,2%, общее содержание полиненасыщенных жирных кислот составляет 68,6%.

Изобретатели считают, что это был самый высокий уровень ДГК, достигнутый в клетках *B. napus* на данный момент, за исключением дальнейших данных, раскрытых ниже. Это также продемонстрировало, что модификация рJP3416-GA7-modB относительно рJP3416-GA7 является эффективной с точки зрения повышения уровня экспрессии гена Δ6-десатуразы. Бинарные векторы рJP3416-GA7, рJP3416-GA7-modA, рJP3416-GA7-modC, рJP3416-GA7-modD, рJP3416-GA7-modE и рJP3416-GA7-modF, раскрытые выше, используются для со-трансформации с 35S:LEC2 для получения трансформированных соматических эмбрионов *B. napus*. До 7,0% ДГК наблюдается в эмбрионах modD, 9,9% - в эмбрионах modE, 8,3% - в эмбрионах modF и 3,6% - в небольшом количестве эмбрионов modG.

Таблица 19

Состав жирных кислот масла из соматических эмбрионов *Brassica napus* #270 и #284, полученных со-трансформацией специфичной для семян конструкцией кислоты ДГК рJP3416-GA7-modB и 35S:LEC2, а также #286 и #289 (рJP3416-GA7-modD)

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

Пример 7. Анализ ТАГ из трансгенного семени *A. thaliana*, вырабатывающего ДГК.

Позиционное распределение ДГК в ТАГ из трансформированного семени *A. thaliana* определяли методом ЯМР. Общий липид экстрагируют приблизительно из 200 мг семени, вначале раздавливая его под слоем гексана, с последующим переносом давленного семени в стеклянную пробирку, содержащую 10 мл гексана. Пробирку нагревают приблизительно до 55°C на водяной бане, после чего обрабатывают вихревым перемешиванием и центрифугируют. Гексановый раствор извлекают, и процедуру повторяют с дополнительными порциями 4 × 10 мл. Экстракты объединяют, упаривают с помощью роторного испарителя, и ТАГ в экстрагированном липиде очищают от полярных липидов путем пропускания сквозь короткую колонку с кремния диоксидом, с использованием 20 мл 7% диэтилового эфира в гексане. Позиционное распределение ацильной группы на очищенном ТАГ определяют количественно, как было описано ранее (Petrie et al., 2010a и b).

Анализ продемонстрировал, что большая часть ДГК в общем масле из семян расположена в положениях sn-1/3 ТАГ, и небольшое количество обнаружено в положении sn-2 (фиг. 9). В противоположность этому, ТАГ из вырабатывающих АРК семян продемонстрировали, что 50% АРК (20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>) расположены в положении sn-2 масла трансгенного рапса, тогда как ожидаемая величина для случайного распределения составляет только 33% (Petrie et al., 2012).

Позиционное распределение ДГК в ТАГ из семени *B. napus*, трансформированного рJP3416-GA7 или комбинацией рJP3115 и рJP3116, определяли по существу таким же способом.

Дополнительно, общий липид из трансгенного, семени *A. thaliana* был проанализирован ЖХ-МС с тройной квадрупольной линзой, чтобы определить основные ДГК-содержащие разновидности триацилглицерола (ТАГ) (фиг. 10). Обнаружено, что разновидности ТАГ с наиболее высоким содержанием ДГК представляют собой ДГК-18:3-18:3 (ТАГ 58:12; номенклатура не описывает позиционного распределения), и на втором месте находится ДГК-18:3-18:2 (ТАГ 58:11). Три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18) наблюдается в общем масле семян, хотя и с низкими, но обнаружимыми уровнями. Другие основные ДГК-содержащие разновидности ТАГ 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) и ДГК-38:4 (ТАГ 60:10). Идентичность двух основных ДГК-содержащих ТАГ была дополнительно подтверждена квадрупольной времяпролетной (Q-TOF) МС/МС.

Пример 8. Прогнозирование выработки ДГК в семени *B. Napus*.

Эффективная выработка ДГК в семенах *Arabidopsis* с уровнем 15% при использовании генетической конструкции GA7 была продемонстрирована в примере 2. Такая же конструкция в семенах *Brassica*

parus приводила к выработке только приблизительно 1,5% ДГК у многих (но не всех) из трансформантов, прежде всего за счет слабой экспрессии гена  $\Delta 6$ -десатуразы GA7 в данном виде (пример 4). На основании предположения о том, что модификации конструкции GA7 могут преодолеть проблему (см. пример 5, как продемонстрировано в примере 6) экспрессии гена  $\Delta 6$ -десатуразы, были произведены вычисления для определения вероятного профиля жирных кислот для трансгенных семян *V. parus*, экспрессирующих гены из варианта rJP3416-GA7, в котором каждый кодируемый трансгеном фермент функционирует так же эффективно, как наблюдается для *A. thaliana*, содержащего конструкцию GA7. Предсказанный состав жирных кислот для трех вычислений (#1, #2, #3) приведен в табл. 20. Данные основываются на составе жирных кислот дикого типа (не-трансформированный) для *V. parus*, содержащей 59% олеиновой кислоты, 20% ЛК и 8% АЛК. Три предсказанных частичных профиля жирных кислот, приведенный в нижней половине таблицы, основываются на эффективности превращения для каждой ферментной стадии, приведенной в верхней половине таблицы. В прогнозе #2, комбинация  $\Delta 12$ -десатурации с эффективностью 75%,  $\Delta 15$ -десатурации с эффективностью 75%,  $\Delta 6$ -десатурации с эффективностью 35%,  $\Delta 6$ -элонгации с эффективностью 80%,  $\Delta 5$ -десатурации с эффективностью 90%,  $\Delta 5$ -элонгации с эффективностью 90% и  $\Delta 4$ -десатурации с эффективностью 90% приводила бы к выработке приблизительно 10% ДГК в типичном трансгенном семени рапса. Все приведенные значения эффективности ниже или приблизительно равны индивидуальной эффективности, наблюдаемой в *Arabidopsis*, поэтому прогноз #2 представляет консервативную оценку. Эффективность трансформации, приведенная в #3, представляет собой приближения, основанные на эффективных превращениях, которые наблюдались в *A. thaliana*, трансформированной rJP3416-GA7. Согласно прогнозу, ДГК будет вырабатываться на уровне приблизительно 15% от общего содержания жирных кислот в масле из семян, вырабатываемом в семени *V. parus*, причем данный результат отражает наиболее эффективные уровни выработки, наблюдаемые в *A. thaliana*. Ожидается, что вставка нескольких Т-ДНК в гомозиготном состоянии будет повышать уровень ДГК до 20% в *V. parus*.

Таблица 20

Прогнозируемый состав жирных кислот для отобранных жирных кислот как процент от общего содержания жирных кислот в масле из семян *Brassica napus*, трансформированных конструкцией пути ДГК, основанный на наблюдаемой ферментной эффективности в трансгенном *Arabidopsis*

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

Ферменты перечислены в порядке пути для получения ДГК из олеиновой кислоты, дес = десатураза, эло = элонгаза. Предсказанный состав жирных кислот #1, #2 и #3 основан на значениях эффективности, приведенных в верхней половине таблицы. Ферменты перечислены в порядке пути для получения ДГК из олеиновой кислоты, дес = десатураза, эло = элонгаза. Предсказанный состав жирных кислот #1, #2 и #3 основан на значениях эффективности, приведенных в верхней половине таблицы.

Пример 9. Стабильная экспрессия трансгенного пути ЭПК в листе растения.

Конструкция бинарного вектора.

Бинарный вектор, pORE04+11ABGBEC\_Cowpea\_EPA\_insert (SEQ ID NO: 8) сконструирован для введения Т-ДНК в растения с целью синтеза ЭПК в тканях листа. Он содержит химерные гены, кодирующие ферменты:  $\Delta 6$ -десатуразу *M. pusilla* (SEQ ID NO: 16),  $\Delta 6$ -элонгазу *P. cordata* (SEQ ID NO: 25) и  $\Delta 5$ -десатуразу *P. salina* (SEQ ID NO: 30), каждую под контролем CaMV 35S и промоторов маленькой субъединицы (ПМС) рубиско *A. thaliana* (фиг. 9). Бинарный вектор конструируют посредством синтеза участка 199-10878 SEQ ID NO: 2 и клонирования его в бинарный вектор-реципиент pORE04 (Coutu et al., 1997) на сайтах BsiWI и KasI. Три гена биосинтеза жирных кислот, кодирующие ферменты, необходимы для превращения АЛК,  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  в ЭПК,  $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ .

Временная экспрессия конструкции ЭПК в клетках листьев *N. Benthamiana*.

Для проверки правильности конструкции и ее способности эффективно экспрессировать гены в тканях листа, химерный вектор pORE04+11ABGBEC\_Cowpea\_EPA\_insert вводят в *A. tumefaciens*, штамм AGL1. Химерный вектор 35S:p19 также вводят в *A. tumefaciens*, штамм AGL1, как раскрыто в примере 1. Клетками из полученных культур инфильтруют ткань листа растений *Nicotiana benthamiana* в комнате для роста с температурой 24°C. Несколько образцов для прямого сравнения инфильтруют образцами для сравнения, размещенными с обеих сторон одного и того же листа. Эксперименты выполняют в трех повторениях. После инфильтрации растения выращивают еще в течение 5 пяти дней, после чего листовые диски извлекают для анализа профиля жирных кислот методом ГХ, как раскрыто в примере 1. Анализ методом ГХ выявил, что вектор ЭПК выполняет свою функцию для выработки ЭПК в листе

*Nicotiana benthamiana* (табл. 21) с наиболее высоким уровнем ЭПК, который составляет 10,7% от общих липидов листа.

Стабильная трансформация *Nicotiana tabacum*.

Химерный вектор pORE04+11ABGBEC\_Cowpea\_EPA\_insert используют для стабильной трансформации *Nicotiana tabacum*. Вектор вводят в *A. tumefaciens*, штамм AGL1, посредством стандартной процедуры электропорации. Трансформированные клетки выращивают на твердых средах Лурия-Бертани с добавлением канамицина (50 мг/л) и рифампицина (25 мг/л) и инкубируют при температуре 28°C в течение двух дней. Единичную колонию используют для инициации свежей культуры. Через 48 ч интенсивного культивирования, клетки собирают центрифугированием при  $2000 \times g$ , и супернатант удаляют. Клетки ресуспендируют в свежем растворе, содержащем 50% среды Лурия-Бертани и 50% среды MS, с плотностью  $OD_{600} = 0,5$ .

Таблица 21

Состав жирных кислот общего липида листьев трансгенных событий *Nicotiana benthamiana* (временный) и *Nicotiana tabacum* (стабильный первичный трансформант) с наиболее высокими уровнями ЭПК из каждого эксперимента

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

Омега-6	18:3ω6	2,3	2,9
	20:2ω6	0,0	0,0
	20:3ω6	0,1	0,0
	20:4ω6	0,3	0,7
Омега-3	18:3ω3	37,1	32,4
	18:4ω3	1,6	1,9
	20:3ω3	0,1	0,3
	20:4ω3	0,3	1,1
	20:5ω3	10,7	12,1
	22:5ω3	0,3	0,4

Образцы листа *N. tabacum*, сорт W38, выращенного *in vitro*, срезают и разрезают на квадратные секции размером приблизительно  $0,5-1 \text{ см}^2$  с помощью острого скальпеля в погруженном в раствор *A. tumefaciens* состоянии. Раненым фрагментам листьев *N. tabacum*, погруженным в *A. tumefaciens*, позволяют достичь комнатной температуры в течение 10 мин, после чего промокают стерильной фильтровальной бумагой и переносят на планшеты MS без добавок. После периода со-культивирования в течение двух дней при  $24^\circ\text{C}$ , экспланты трижды промывают стерильной жидкой средой MS, затем промокают досуха стерильной фильтровальной бумагой и помещают на селекционный агар MS, содержащий 1,0 мг/л бензиламинопурина (БАП), 0,25 мг/л индолуксусной кислоты (ИУК), 50 мг/л канамицина и 250 мг/л цефотаксима. Планшеты инкубируют при температуре  $24^\circ\text{C}$  в течение двух недель, чтобы позволить развитие побегов из трансформированных фрагментов листьев *N. tabacum*.

Для получения укоренившихся трансгенных растений *in vitro* здоровые зеленые побеги срезают и переносят в горшки для культуры ткани емкостью 200 мл, содержащие агаровую среду MS с добавлением 25 мкг/л ИУК, 50 мг/л канамицина и 250 мг/л цефотаксима. После образования корней трансгенные побеги переносят в грунт и выращивают до состояния зрелости в теплице. Листовые диски достаточно большого размера получены от 21 зрелого трансгенного растения, и профиль жирных кислот проанализирован, как раскрыто в примере 1. Обнаружено, все трансгенные образцы содержат ЭПК (табл. 21), причем наиболее высокий уровень ЭПК найден в первичном гемизиготном трансформанте и составляет 12,1% от общих липидов листа, причем образцы листьев также содержат небольшое количество ( $< 0,5\%$ ) ДПК в липиде, что является результатом элонгации ЭПК с низким уровнем  $\Delta 5$ -элонгазной активности у  $\Delta 6$ -элонгазы. Соотношение общих ω3 ЖК (в том числе АЛК) к ω6 ЖК (в том числе ЛК) составляет 2,7. Вычисленная общая эффективность превращения составляет: ОК в ЭПК = 18,4%, ЛК в ЭПК = 18,9%, АЛК в ЭПК = 25,9%. Выработка 12,1% ЭПК является особенно значимой, поскольку события были первоначальными гемизиготными трансформантами. В частности, эффективность превращения АЛК в ЭПК близка к наблюдаемой в стабильных трансформантах семян. Также следует отметить, что конструкция не содержит  $\Delta 12$ - или  $\Delta 15$ -десатуразы, чтобы увеличить превращение ОК и ЛК в АЛК. Ожидается повышение эффективности при добавлении такой активности.

Урожай семени гемизиготных трансформантов собирают и высевают для получения гомозиготных растений.

Набор семян линий с наиболее высокими уровнями ЭПК выглядит нормальным, и семя линий #10 и #17 прорастает достаточно хорошо, чтобы получить поколение  $T_2$ . Соотношение ЭПК к указанным нулевым (отсутствие ЭПК) линиям показывает, что событие #28 было однолокусным, и поколение  $T_3$  было таким же. Анализ профиля жирных кислот указанной популяции  $T_3$  показал, что трансгены были гомозиготными без нулевых событий и со стабильным количеством ЭПК. Среднее количество ЭПК в общих липидах листьев общей популяции  $T_3$  составляет  $9,4 \pm 0,3\%$  (табл. 22).

Таблица 22

Характерные профили жирных кислот общих липидов листьев дикого типа (ДТ) и независимых трансгенных или временно трансформированных линий (ЭПК). Представлены виды *Nicotiana benthamiana* (временная трансформация), *N. tabacum* (стабильно трансформированная популяция Т<sub>3</sub>), *Vigna unguiculata* (стабильно трансформированное событие Т<sub>1</sub>)

		<i>N. benthamiana</i>		<i>N. tabacum</i>		<i>V. unguiculata</i>	
		ДТ	ЭПК	ДТ	ЭПК	ДТ	ЭПК
	<b>16:0</b>	17,1 ± 0,1	18,7 ± 0,2	15,0 ± 0,6	16,5 ± 0,5	18,0	18,2 ± 0,2
	<b>16:1<math>\omega</math>13t</b>	3,2 ± 0,1	2,2 ± 0	3,5 ± 0,1	3,0 ± 0,3	3,8	2,0 ± 0,9
	<b>16:3</b>	6,8 ± 0,1	6,2 ± 0,1	5,2 ± 0,5	5,4 ± 0,3	—	—
	<b>18:0</b>	3,1 ± 0	3,5 ± 0,3	2,2 ± 0,2	2,6 ± 0,1	1,8	4,5 ± 0,4
	<b>Незначительные</b>	1,4 ± 0	1,4 ± 0,1	3,1 ± 0,4	2,5 ± 0,3	2,3	2,5 ± 0,4
	<b>ОК</b>	1,7 ± 0,1	2,7 ± 0,2	1,6 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,0	4,3 ± 1,3
	<b>ЛК</b>	12,5 ± 0,4	12,7 ± 0,2	17,0 ± 1,1	18,0 ± 0,9	13,4	18,2 ± 3,0
	<b>АЛК</b>	53,3 ± 0,2	37,2 ± 0,2	52,2 ± 1,9	34,0 ± 0,6	58,6	38,2 ± 0
<b>Омега-6</b>	<b>ГЛК</b>	—	2,3 ± 0,1	—	2,3 ± 0,3	—	0,6 ± 0,2
	<b>20:2<math>\omega</math>6</b>	0,1 ± 0	—	0,1 ± 0	0,1 ± 0	—	0,1 ± 0
	<b>ДГЛК</b>	0,1 ± 0	0,1 ± 0	—	—	—	—
	<b>АРК</b>	—	0,3 ± 0	—	0,7 ± 0,1	—	0,2 ± 0
<b>Омега-3</b>	<b>СДК</b>	—	1,5 ± 0,1	—	1,6 ± 0,1	—	1,5 ± 0
	<b>20:3<math>\omega</math>3</b>	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,3 ± 0	0,1 ± 0	1,5 ± 0,1
	<b>ЭТК</b>	—	0,4 ± 0	—	1,1 ± 0,1	—	0,3 ± 0,2
	<b>ЭПК</b>	—	10,2 ± 0,5	—	9,4 ± 0,3	—	7,1 ± 0,2
	<b>ДПК</b>	—	0,3 ± 0,1	—	0,4 ± 0	—	0,8 ± 0,1
<b>Превращение омега-3</b>	<b><math>\Delta</math>6-дес</b>		25%		27%		20%
	<b><math>\Delta</math>6-эло</b>		88%		87%		85%
	<b><math>\Delta</math>5-дес</b>		97%		90%		96%
	<b><math>\Delta</math>5-эло</b>		3%		4%		10%

Ошибка обозначает стандартное отклонение для нескольких образцов. Очевидная эффективность превращения, приведенная внизу, описывает путь  $\omega$ 3 и вычислена как сумма продуктов в виде ЖК/сумму субстрата + продуктов в виде ЖК.

Образцы листьев гомозиготных растений Т<sub>3</sub> *N. tabacum* подвергают дальнейшему биохимическому анализу. Общие липиды экстрагируют из лиофилизированного листового материала и фракционируют тонкослойной хроматографией (ТСХ). Обнаружено, что ЭПК присутствует в ТАГ *N. tabacum* в количестве до 30,1%, а также полярных липидах в количестве 6,3% (табл. 23). Было интересно отметить, что ЭПК, продуцированная трансгенным путем, присутствовала во всех оцененных липидных фракциях, в том числе ТАГ, моногалактозилдиглицеролы (МГДГ), дигалактозилдиглицеролы (ДГДГ), сульфохиновазилдиацилглицеролы (СХДГ), фосфатидилглицерол (ФГ), ФХ, фосфатидилэтанолламин (ФЭ), фосфатидилинозитол (ФИ) и фосфатидилсерин (ФС). Все пулы липидов содержали низкие уровни нового промежуточного соединения или  $\omega$ 6 жирных кислот ДЦ-ПНЖК, с соотношением ТАГ новых  $\omega$ 3 и  $\omega$ 6 жирных кислот, составляющим 10:1.

Стабильная трансформация вигны китайской (коровий горох, Cowpea).

Химерный вектор pORE04+11ABGBEC-Cowpea-EPA-insert трансформируют в вигну китайскую (*Vigna unguiculata*), как раскрыто ниже. Зрелые сухие семена являются предпочтительным исходным материалом, хотя семена, собранные из незрелых стручков с максимальной массой свежих семян, также могут использоваться. Сухие семена молотят вручную, чтобы избежать раскола оболочки семени, и таким образом уменьшить инфицирование микроорганизмами.

Сухие семена или незрелые стручки погружают в 70% этанол на 2 мин, а затем обрабатывают в течение 30 мин в 20% коммерческом отбеливателе (конечная концентрация натрия гипохлорита 8,4 г/л). Далее семена несколько раз промывают стерильной водой. Незрелые семена извлекают из стручков в асептических условиях, в то время как зрелые семена замачивают для набухания на протяжении ночи. Два различных экспланта могут использоваться для получения множественных побегов, а именно, эмбриональная ось и семядоля непосредственно, предпочтительно семядоля с присоединенной, разрезанной пополам эмбриональной осью. Побегов и корневые почки удаляют с оси перед нанесением повреждения в семядольном узле, т.е. точке прикрепления оси к семядолю. На основании начального сравнения 19 сортов и линий, сейчас ясно, что большинство линий вигны китайской может быть трансформировано, и единственное предостережение состоит в том, что различные условия культуры тканей следует оптимизировать.

зировать для каждой линии.

Таблица 23

Анализ триацилглицерола (ТАГ) липидных фракций молодых и зрелых (молодых/зрелых) листьев, общего полярного липида (ПЛ), моногалактозилдиацилглицерола (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерола (ДГДГ), сульфохиновозилдиацилглицерола (СХДГ), фосфатидилглицерола (ФГ), фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилинозитола (ФИ) и фосфатидилсерина (ФС) из образцов трансгенных листьев *Nicotiana tabacum*

	Хлоропластидные					Внехлоропластидные					
	ТАГ	ФЛ	МГДГ	ДГДГ	СХДГ	ФГ	ФХ	ФЭ	ФИ	ФС	
16:0	9,8 18,3	17,8 23,8	3,1 3,2	18,0 16,8	48,3 50,0	21,0 26,4	22,9 30,0	24,0 30,5	38,7 43,3	31,9 36,2	
16:1 $\omega$ 13t	0 0	3,4 3,1	0 0	0 0	0 0	34,0 32,0	0 0	0 0	0 0	1,0 1,4	
16:3	0,2 0,9	5,6 6,4	14,8 19,4	1,2 1,8	0,4 1,2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
18:0	7,3 3,7	2,9 3,9	1,1 1,2	3,5 3,5	5,4 7,1	4,7 6,9	6,6 9,1	11,0 11,4	9,4 9,3	20,2 19,4	
Незначительные	2,5 2,9	1,4 2,4	1,0 0,4	0,8 1,0	1,9 2,1	1,0 1,5	1,4 1,6	4,9 4,1	6,5 7,7	2,5 3,7	
ОК	5,5 0,8	2,8 1,1	0,8 0,3	1,8 1,0	2,7 1,3	5,3 4,9	8,1 2,9	2,5 1,1	2,5 0,8	4,9 2,3	
ЛК	27,7 13,7	17,3 12,3	8,0 6,8	9,2 10,5	11,7 8,9	17,1 13,2	39,2 25,2	37,9 28,5	22,0 13,4	24,4 17,1	
АЛК	9,6 17,2	39,0 34,4	60,3 51,9	61,2 58,6	23,7 21,5	15,7 14,1	7,3 18,2	5,5 10,5	7,6 10,0	4,8 10,5	
Омега-6	ГЛК	2,5 3,0	1,5 2,1	2,1 3,0	1,1 1,8	1,4 1,9	0,2 0	1,8 2,5	1,7 2,7	0,8 0,9	1,1 1,3
	20:2 $\omega$ 6	0 0	0,1 1,1	0 0	0 0	0 0	0 0	0,5 0	0 0	0 0	
	ДГЛК	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
	АРК	0,6 0,9	0,1 0,2	0,2 0,4	0 0	0 0	0 0	0,3 0,3	0,4 0,4	0,4 0,6	0 0,2
Омега-3	СДК	4,0 7,6	1,6 2,0	1,7 2,0	0,6 0,7	1,2 1,2	0 0	2,1 3,6	1,3 2,0	0,8 0,8	0,9 1,6
	20:3 $\omega$ 3	0,2 0,3	0,1 0,2	0 0	0,2 0,3	0 0	0 0,1	0,2 0	0,3 0,4	0 0	0 0
	ЭТК	0,9 0,2	0,2 0,3	0 0,2	0 0,3	0 0	0 0	0,2 0	0,4 0,2	0,1 0,2	0 0
	ЭПК	28,8 30,1	6,1 6,3	6,9 11,2	2,3 3,6	3,4 4,6	1,0 0,8	9,7 6,4	9,1 7,8	11,2 12,8	8,4 6,2
	ДПК	0,4 0,5	0 0	0 0,1	0 0	0 0	0 0	0,3 0,4	0,5 0,4	0 0,2	0 0,1

Ошибка означает стандартное отклонение для нескольких образцов. До 30% ЭПК наблюдается в ТАГ листьев, причем ЭПК также распространена в полярных липидах. Кроме того, для нескольких жирных кислот наблюдались отличия в профилях между молодыми и зрелыми листьями.

Гены селекционных маркеров *bar* или *NptII* могут использоваться для трансформации. *Agrobacterium tumefaciens*, штамм AGL1, представляет собой предпочтительный штамм для трансформации вигны китайской. *Agrobacterium*, несущую вектор pORE04+11ABGBEC-Cowpea-EPA-insert культивируют на протяжении ночи при 28°C на шейкере со скоростью вращения 180 об/мин, суспензию центрифугируют при 8000 g в течение 10 мин и ресуспендируют в среде 1 (среда на основе MS, разбавленная 1/10 и содержащая 30 г/л сахарозы, 20 мМ 2-МЭС, pH доводят до 5,6 перед автоклавированием, с добавлением обработанных стерилизующей фильтрацией витаминов MS, 100 мг/л миоинозитола, 1,7 мг/л БАП, 0,25 мг/л гибберелловой кислоты (GA<sub>3</sub>), 0,2 мМ ацетосирингона, 250 мг/л Na тиосульфата, 150 мг/л дитиотрейтола и 0,4 г/л L-цистеина). Экспланты погружают без встряхивания в бактериальную суспензию на 1 ч после нанесения повреждений в меристематических участках с использованием скальпеля. Затем обработанные экспланты промокают стерильной фильтровальной бумагой и переносят в затвердевшую среду 2 (среда 1, содержащая 0,8 % агара), накрытую фильтровальной бумагой. Через 4 дня сокультивирования экспланты переносят в среду 3 (среда MS с полной активностью, содержащая 100 мг/л миоинозитола, 150 мг/л тиментина, 30 г/л сахарозы, 3 мМ МЭС, 1,7 мг/л БАП, 5 мг/л ФФТ или 25-50 мг/л генетицина или 150 мг/л канамицина, 0,8 г/л агара, pH доведено до 5,6) для инициации побегов и селекции трансформированных побегов. Через две недели появляются первые побеги. Семядоли удаляют с участка семядольного узла, и культуры переносят в свежую среду 3. Культуры переносят в свежую среду 3 каждые две недели после удаления мертвой и умирающей ткани. Первые четыре субкультуры выращивают с селекцией канамицином, и далее чередуют генетицин и канамицин. После шести субкультур выжившие зеленые побеги переносят в среду 4 (среда 3 без БАП, но с добавлением 0,5 мг/л GA<sub>3</sub>, 50 мг/л аспарагина, 0,1 мг/л 3-индолуксусной кислоты (ПУК), 150 мг/л тиментина или ФФТ (10 мг/л), генетицина (50 мг/л) или канамицина (150 мг/л)) для удлинения побегов. Побеги перевивают каждые две недели до тех пор, пока длина единичных побегов не составит более 1 см. Такие большие побеги переносят из чашек Петри в банки для культуры (высотой 80 мм) для дальнейшего роста в условиях селекции.

Большинство регенерированных побегов может укорениться *in vitro*, причем растения с образовавшимися корнями переносят в землю и позволяют укорениться в камере с высокой влажностью в течение 14-21 дня перед переносом в теплицу с условиями окружающей среды.

Для увеличения переноса гена в вигну китайскую, к средам для сокультивирования добавляют тильные соединения. Добавление L-цистеина, дитиотрейтола и натрия тиосульфата сокращает появление бурой окраски раненной ткани.

Большие количества эксплантов вигны китайской могут обрабатываться по упрощенному протоколу. Вкратце, протокол состоит из следующих стадий: набухание стерилизованных зрелых семян на про-



тяжении ночи в воде, получение эксплантов посредством продольного разрезания семени пополам, в результате чего расщепленная эмбриональная ось (с удаленными верхушками побегов и корней) все еще присоединена к семядоле, инфицирование *Agrobacterium*, штамм AGL1, которому способствует нанесение местных повреждений на меристематических участках, со-культивирование на средах, содержащих тиольные соединения, в течение 4 дней при 25°C на свету, инициация побегов и элонгации на среде, содержащей селективные агенты, укоренение побегов *in vitro* и перенос их в условия теплицы для цветения и образования семени, ПЦР или ферментный анализ предполагаемых трансгенных растений, и скрининг следующего поколения потомков методом ПЦР или ферментной активности.

Потомство трансгенных растений  $T_0$  является фенотипически нормальным. Трансгены передаются потомству, и гомозиготные растения  $T_2$  идентифицируют посредством скрининга их потомков  $T_3$  на предмет ферментной активности или ПЦР.

С применением данной системы трансформации получены приблизительно 10 трансгенных растений на 1000 эксплантов, что сходно с частотой трансформации для других бобовых. В зависимости от сорта или линии, которая трансформирована, данный протокол требует 5-8 месяцев с момента получения экспланта до сбора урожая семени  $T_1$ .

Система трансформации используется для введения бинарного вектора pORE04+11ABGBEC-Cowpea-EPA-insert в регенерированные, трансформированные растения вигны китайской.

Были осуществлены модификации бинарного вектора pORE04+11ABGBEC-Cowpea-EPA-insert, в ходе которых добавлены гены, кодирующие  $\Delta 5$ -элонгазу и  $\Delta 4$ -десатуразу, чтобы обеспечить генетическую конструкцию, обладающую дополнительной способностью превращения выработанной ЭПК в ДПК. Конструкцию трансформируют в растения для получения ДПК в вегетативных тканях.

Присутствие ЭПК было обнаружено в небольшом количестве событий, выживших в результате химической селекции. Линия с наиболее высоким содержанием содержала  $7,1 \pm 0,2\%$  ЭПК в общих липидах листьев. Скорость превращения была ниже, чем обычно наблюдается для вигны китайской, причем только 6 линий были подтверждены как трансгенные. Это означает, что на данный момент неизвестно, что именно вызвало данный эффект, хотя интересно отметить, что большая, чем обычно доля трансгенных событий содержала неполный участки Т-ДНК. Возможно, большой размер конструкции способствовал снижению эффективности. Кроме того, была вычислена очевидная эффективность превращения для каждого из трех трансгенных ферментов (табл. 22). Результаты были в высокой степени сходными для всех трех видов, с высоким уровнем превращения в ЭПК после начальной  $\Delta 6$ -десатурации природной АЛК. Некоторая степень  $\Delta 5$ -элонгации ЭПК до ДПК была отмечена, несмотря на отсутствие специфичной  $\Delta 5$ -элонгазы.  $\Delta 6$ -элонгаза *P. cordata* предварительно продемонстрировала низкий уровень  $\Delta 9$ -элонгазной активности (т.е. превращения  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  в  $20:3^{\Delta 11,14,17}$ ), хотя в дрожжевом анализе  $\Delta 5$ -элонгазной активности обнаружено не было.

Пример 10. Тестирование вариаций генов  $\Delta 12$ -десатуразы.

Конструкция бинарного вектора.

В попытке протестировать и сравнить серии химерных генов  $\Delta 12$ -десатуразы было сконструировано несколько бинарных векторов, которые используются для трансформации *A. thaliana* и *B. napus*. Каждый из бинарных векторов rJP3365, rJP3366, rJP3367, rJP3368 и rJP3369 содержит гены, кодирующие ферменты  $\omega 3$ -десатуразу *P. pastoris* (SEQ ID NO: 12) и  $\Delta 6$ -десатуразу *M. pusilla* (SEQ ID NO: 16), и одну из серии  $\Delta 12$ -десатураз.  $\Delta 12$ -десатуразы получены из *Cryptococcus neoformans* (номер доступа XP570226 в rJP3365), версии  $\Delta 12$ -десатуразы *Cryptococcus neoformans*, которая содержит мутацию L151M, цель которой состоит в увеличении активности гена (в rJP3366), *Lachancea kluyveri* (SEQ ID NO: 10 в rJP3367), *Synechocystis* PCC6803 (номер доступа BAA18169 в rJP3368) и *Sterpis palaestina* (номер доступа CAA76157, Lee et al., 1998, в rJP3369). Десатураза *Sterpis* является единственной растительной десатуразой в серии; остальные являются грибковыми ферментами. Векторы получены посредством вставки растительного кодон-оптимизированного участка кодирования белка, за исключением  $\Delta 12$ -десатуразы *Sterpis palaestina*, который был участком дикого типа, для каждой  $\Delta 12$ -десатуразы в сайт NotI вектора rJP3364 (см. фиг. 12), в ориентации, функционально связанной с промотором FP1, чтобы обеспечить специфичную для семени экспрессию каждой десатуразы. Вектор rJP3364 уже содержит химерные гены, кодирующие  $\omega 3$ -десатуразу *P. pastoris* и  $\Delta 6$ -десатуразу *M. pusilla*, каждая под контролем специфичных для семени промоторов (фиг. 12). Комбинация трех ферментов биосинтеза жирных кислот, а именно  $\Delta 12$ -десатуразы,  $\omega 3$ -десатуразы и  $\Delta 6$ -десатуразы, была разработана таким образом, чтобы осуществить сборку пути превращения олеиновой кислоты ( $18:1^{\Delta 9}$ ) в СДК ( $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ ). Далее проводят анализы для изменения уровня образования СДК в трансформированных семенах.

Трансформация и анализ *A. thaliana* и *B. Napus*.

Химерные бинарные векторы вводят в *A. tumefaciens*, штамм AGL1, и клетки от культур трансформированной *Agrobacterium* используют для трансформации *fad2* мутантных растений *A. thaliana*, применяя для трансформации способ погружения цветков (Clough and Bent, 1998). После созревания урожая семян  $T_1$  обработанных растений собирают и осуществляют скрининг на планшетах MS, содержащих

канамицин для селекции саженцев, несущих ген селекционного маркера NptII, присутствующий на T-ДНК каждого химерного вектора. Выжившие саженцы T<sub>1</sub> переносят в грунт. После того, как растениям позволяют самооплодотвориться и выращивают их до состояния зрелости, урожай семян T<sub>2</sub> указанных растений собирают, и состав жирных кислот липидов семени анализируют методом ГХ.

Химерный вектор rJP3367 также использовали для трансформации *V. parvus* способом, описанным в примере 4, с получением 12 трансгенных событий. Содержание СДК было обнаружено в интервале от 0,6% до 2,2% в пуле семени растений, и 9 индивидуальных семян трансгенного растения с наиболее высоким уровнем СДК были проанализированы на предмет состава жирных кислот. Полученные в результате такого анализа данные о составе жирных кислот приведены в табл. 24.

Данные продемонстрировали, что активность Δ12-десатуразы, экспрессируемой из каждой из T-ДНК в *A. thaliana* и *V. parvus*, была неожиданно низкой, обеспечивая эффективность ферментного превращения приблизительно 20% вместо 70-80%, наблюдаемых для такой же кассеты экспрессии в конструкции GA7 (примеры 2 и 3). Причина такой относительно слабой экспрессии генов Δ12-десатуразы из указанных векторов не ясна, но может быть связана с положением генов в конструкции в целом.

И наоборот, анализ экспрессии методом ОТ-ПЦР продемонстрировал, что гены ω3-десатуразы *P. pastoris* и Δ6-десатуразы *M. pusilla* на T-ДНК относительно хорошо экспрессировались в трансформированном семени. Табл. 24 включает эффективность превращения под действием Δ6-десатуразы в трансформированных семенах, которая варьирует от приблизительно 11 до приблизительно 25% в одной трансформированной линии *V. parvus*. Это значительно выше, чем эффективность превращения под действием Δ6-десатуразы приблизительно 7%, которая наблюдалась в семенах *V. parvus*, трансформированных конструкцией GA7 (пример 4).

Таблица 24

Состав жирных кислот как процент от общих жирных кислот в масле из семян, полученном из единичных семян растения T<sub>1</sub> *Brassica napus*, трансформированного T-ДНК из rJP3367

Образец	СТ110-3#1	СТ110-3#2	СТ110-3#3	СТ110-3#4	СТ110-3#5	СТ110-3#6	СТ110-3#7	СТ110-3#8	СТ110-3#9
C14:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C16:0	4,3	4,2	4,1	4,5	3,8	4,3	4,0	5,0	4,7
16:1d7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
C16:1d9	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
16:3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C18:0	1,9	1,9	1,3	1,8	2,1	1,8	2,4	3,1	2,2
C18:1	58,1	59,4	55,5	59,1	62,1	56,0	57,2	52,0	53,2
C18:1d11	3,5	3,6	3,0	3,2	2,9	3,6	3,2	4,4	3,5
C18:2	18,4	17,1	19,2	17,3	17,4	18,7	19,0	20,3	20,2
C18:3ω6	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
C18:3ω3	8,2	9,0	11,1	8,6	7,5	10,2	9,8	9,3	9,8
C20:0	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6	0,7	0,6
<b>18:4ω3</b>	<b>2,4</b>	<b>2,0</b>	<b>2,8</b>	<b>2,5</b>	<b>1,4</b>	<b>2,6</b>	<b>1,3</b>	<b>2,4</b>	<b>3,2</b>
C20:1d11	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1
20:1iso	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,03	0,02	0,03	0,02
C20:2ω6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C22:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
C24:0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2
C24:1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Δ6-дес %	22,9	17,9	20,3	22,8	15,8	20,2	11,7	20,9	24,9

Таким образом, чтобы получить преимущество более высокой эффективности превращения под действием Δ6-десатуразы, предоставляемой T-ДНК из rJP3367, растения *V. parvus*, трансформированные данной T-ДНК, скрещивают с растениями, трансформированными T-ДНК из rJP3416-GA7 (пример 4), с целью получения растений-потомков и семян, несущих обе T-ДНК. Состав жирных кислот масла, экстрагированного из семян F<sub>1</sub>, анализируют методом ГХ на предмет содержания ДГК и содержания других жирных кислот. Наблюдаются повышенные уровни ДГК как следствие увеличенной экспрессии Δ6-десатуразы. Растения, которые являются гомозиготными по обеим T-ДНК, получены и должны вырабатывать более высокие уровни ДГК.

Пример 11. Увеличение аккумуляции жирных кислот с использованием белков-супрессоров сайленсинга.

Конструкция бинарного вектора.

В WO 2010/057246 раскрыто использование белков-супрессоров сайленсинга (БСС) для увеличения

экспрессии трансгена в семенах растений. Для демонстрации того, что использование таких белков может увеличить и стабилизировать выработку ДЦ-ПНЖК в масличных культурах на протяжении нескольких поколений, несколько БСС были выбраны с целью тестирования, а именно V2 (номер доступа GU178820.1), p19 (номер доступа AJ288943.1), p38 (номер доступа DQ286869.1) и P0<sup>PE</sup> (номер доступа L04573.1). p19 представляет собой белок-супрессор из вируса кустистой карликовости томатов (ВККТ), который связывается с мРНК длиной 21 нуклеотид перед тем, как они будут управлять Argonaute-направляемым расщеплением гомологичной РНК (Voinnet et al., 2003). V2, белок-супрессор из вируса желтой курчавости листьев томата (ВЖКЛТ), связывается с растительным белком SGS3 (Glick et al., 2008), т.е. белком, который считается необходимым для получения промежуточных соединений двухцепочечных РНК из субстратов оцРНК (Beclin et al., 2002), или связывается со структурами дцРНК, которые содержат 5' выступ (Fukunaga et al., 2009). p38 представляет собой белок-супрессор из вируса складчатости репы (ВСР), который создает помехи в механизме сайленсинга растения посредством связывания с белками Dicer и Argonaute (Azevedo et al., 2010). Белки P0, например P0<sup>PE</sup> и RPV-P0, из полеровирусов нацеливаются на белки Argonaut, чтобы усилить разложение (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007; Fusaro et al., 2012). Генетические конструкции были таким образом подготовлены для экспрессии данных БСС в зерне растения, в комбинации с набором генов биосинтеза жирных кислот для получения АРК (20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>) из ЛК (18:1<sup>Δ9,12</sup>), как указано ниже.

Гены биосинтеза жирных кислот, кодирующие Δ9-элонгазу *Isochrysis galbana* и Δ8- и Δ5-десатуразы *Pavlova salina* и бактериальный селекционный маркер, получены на едином фрагменте ДНК из rJP3010 посредством расщепления PmeI и AvrII, что дает фрагмент размером 9560 пар оснований. Участок, кодирующий Δ9-элонгазу, на данном фрагменте соединяют с промотором FAE1 *A. thaliana* (pAtFAE1) и участком терминации транскрипции/полиаденилирования конлинина (LuCnl2-3'). Каждый из участков, кодирующих десатуразу, присоединяют к укороченному промотору напина FP1 (pBnFP1) и участку терминации транскрипции/полиаденилирования nos3'. Три гена биосинтеза жирных кислот на данном фрагменте ориентированы и размещены таким же образом, как в rJP107 (Petrie et al., 2012), и кодируют такие же белки, как rJP107. Фрагмент ДНК также содержит ген rFP1:GFIP:nos3' из pCW141 (см. WO 2010/057246), который кодирует зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ). Данный ген скринингового маркера используется в качестве специфичного для семени визуального маркера, что дает возможность простой и неразрушительной идентификации и таким образом селекции трансгенного семени, несущего и экспрессирующего ген.

Фрагмент PmeI-AvrII вставляют в сайт PmeI-AvrII каждой из серий пяти векторов, каждый из которых содержит другой ген БСС (WO 2010/057246), с получением генетических конструкций, обозначенных rFN045, rFN046, rFN047, rFN048 и rFN049. Они содержат гены, кодирующие БСС P0<sup>PE</sup>, p38, p19, 35S:V2 и V2 соответственно. Каждый из генов БСС находится под контролем промотора FP1 и участка терминации транскрипции/полиаденилирования ocs3', за исключением конструкции rFN048, в которой участок, кодирующий V2, находится под контролем конститутивного промотора CaMV 35S. Ген БСС в каждом случае находится в пределах участка Т-ДНК конструкций, смежного с правой границей (ПГ) Т-ДНК. Шестая конструкция, rFN050, в которой отсутствуют последовательности, кодирующие БСС, получена посредством расщепления rFN045 AhdI и NheI, с последующей рециркуляризацией ДНК-лигазой, чтобы удалить ген FP1:P0<sup>PE</sup>. Каждая из 6 конструкций содержит ген селекционного маркера NptII в пределах Т-ДНК, смежно с левой границей Т-ДНК. Все конструкции содержат источники репликации RK2 для поддержания плазмид в *Agrobacterium*.

Трансформация *A. thaliana* векторами экспрессии АРК в комбинации с БСС.

Для трансформации генотипа МС49 *Arabidopsis*, который представляет собой двойной мутант *fad2/fae1* с высокими уровнями линолевой кислоты в липиде семени, растения обрабатывают способом погружения цветков (Clough and Bent, 1998) с использованием *A. tumefaciens*, штамм GV3101, отдельно трансформированной каждой из шести конструкций rFN045-rFN050. Обработанные растения выращивают до состояния зрелости, и собранный с них урожай семени T<sub>1</sub> помещают на планшеты со средой MS, содержащей канамицин, для селекции трансформированных растений T<sub>1</sub>. Скрининг на предмет экспрессии ЗФБ в семени также применяют в качестве визуального маркера для трансформированных семян T<sub>1</sub>. Саженьцы, выжившие на планшетах MS/Кап, или которые были получены из ЗФБ-положительных семян, переносят в грунт и выращивают до состояния зрелости для получения семян T<sub>2</sub>. Количество полученных трансформированных растений составило 5, 14, 32, 8, 23 и 24 для трансформации rFN045, rFN046, rFN047, rFN048, rFN049 и rFN050 соответственно. На данной стадии было обнаружено, что ген, кодирующий p38 в rFN046, был нефункциональным и, таким образом, растения, трансформированные вектором rFN046, рассматривались как дополнительный контроль, т.е. по существу такие же, как и rFN050.

Пул численностью около 100 семян T<sub>2</sub> получен от каждого трансформированного растения для определения состава жирных кислот в липиде семени путем получения МЭЖК и анализа методом ГХ. Кроме того, 6 саженьцев T<sub>2</sub> из каждой трансгенной линии были выращены для получения семени T<sub>3</sub>.

Состав жирных кислот в общем липиде, экстрагированном из семян T<sub>2</sub>, определяют с помощью ГХ. Анализ показал интервал уровней АРК и промежуточных соединений ЭДК (20:2ω6) и ДГЛК (20:3ω6) в

популяциях T<sub>2</sub>. Данные для АРК показаны на фиг. 13 и 14.

Фиг. 13 иллюстрирует анализ методом коробчатой диаграммы уровня АРК в липиде популяций семян T<sub>2</sub>. Очевидно, что медианный уровень (50-й перцентиль) АРК в популяциях семян, которые содержали гены FP1:p19 и 35S:V2, в дополнение к генам биосинтеза АРК, существенно выше, чем в семенах, содержащих дефектный ген FP1:p38 или контрольную Т-ДНК из rFP050, не содержащую гена БСС. Средние уровни АРК для семян, трансформированных генами, которые кодируют p19 и V2, выше, чем для семян, трансформированных геном p38 или не содержащих БСС (фиг. 14). Одна линия FP1:p19 и две линии FP1:V2 продемонстрировали около 19, 20 и 23% АРК соответственно. Они представляют резко отклоняющиеся значения, и таким образом не входили в вычисления для анализа методом коробчатой диаграммы. Выжило меньшее количество растений, трансформированных Т-ДНК, содержащими гены FP1:PO<sup>PE</sup> и 35S:V2, по сравнению с другими конструкциями; считается, что эти гены могут вредить здоровью растения на фоне МС49.

Не только уровни АРК значительно отличались для разных конструкций, но и наблюдаемые уровни в липиде семени первого промежуточного соединения пути от ЛК до АРК, а именно ЭДК (20:2ω6) были ниже в линиях, экспрессирующих V2 или p19, чем в семенах, не содержащих БСС или содержащих конструкцию p38 (фиг. 15). Среди семян T<sub>3</sub> одна популяция, содержащая конструкт, который экспрессирует p19, продемонстрировала уровень АРК 38% как процент от общих жирных кислот в липиде семени.

Ряд трансгенных линий T<sub>3</sub> прогрессировал до поколения T<sub>4</sub>. Уровни АРК в семенах T<sub>4</sub>, экспрессирующих V2, являются такими же, как и в предыдущем поколении, или действительно демонстрируют повышенные уровни по сравнению с их родителями T<sub>3</sub> (фиг. 16). Линии, экспрессирующие p19, продемонстрировали более разнообразные уровни АРК. Уровень АРК был снижен в некоторых линиях, в то время как в других он был таким же или выше по сравнению с родителями T<sub>3</sub>. И наоборот, линии, содержащие дефектный ген p38 или не содержащие БСС, в общем продемонстрировали снижение уровня АРК и повышение уровней промежуточных соединений (фиг. 18). В некоторых из этих линий содержание АРК было уменьшено до приблизительно 1%, и уровни ЭДК возросли до приблизительно 20%. Средний уровень АРК в семенах T<sub>4</sub> был выше для линий, экспрессирующих p19 и V2, по сравнению с линиями, экспрессирующими p38 или не содержащими БСС (фиг. 17).

Данный эксперимент проиллюстрировал, что экспрессия БСС в семенах трансгенного растения, наряду с дополнительными генами для биосинтетического пути ДЦ-ПНЖК, не только повышает уровень выработки желательной жирной кислоты в первом поколении потомков, но и стабилизирует уровень выработки жирной кислоты в более поздних поколениях, например третьем или четвертом поколении потомков. Увеличенная выработка жирных кислот сопровождается снижением уровней промежуточных жирных кислот в биосинтетическом пути. БСС p19 и V2, которые экспрессируются из специфичных для семени промоторов, являются предпочтительными. Конструкция, разработанная для экспрессии БСС p38, оказалась дефектной, и пригодные данные не были получены при использовании данной конструкции. БСС V2 и его гомологи из других вирусов считаются особенно предпочтительными, поскольку они позволяют максимальную экспрессию генов биосинтетического пути и одновременный сайленсинг других генов в тех же клетках развивающегося семени.

Пример 12. Анализ содержания и состава стеролов в маслах.

Фитостерины из 12 образцов растительного масла, приобретенных из коммерческих источников в Австралии, охарактеризованы методами ГХ и ГХ-МС, как производные О-триметилсилилового эфира (OTMSi-эфир), как раскрыто в примере 1. Стероиды идентифицировали по данным удерживания интерпретацией масс-спектров и сравнением с литературными данными и данными масс-спектропии лабораторных стандартов. Количество стеролов определяют с использованием внутреннего стандарта 5 $\beta$ (H)-холан-24-ола. Базовая структура фитостерина и химическая структура некоторых из идентифицированных стеролов проиллюстрированы на фиг. 19 и в табл. 25.

Анализировали растительные масла кунжута (*Sesamum indicum*), маслин (*Olea europaea*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), клещевины (*Ricinus communis*), рапса (*Brassica napus*), сафлора (*Carthamus tinctorius*), арахиса (*Arachis hypogaea*), льна (*Linum usitatissimum*) и сои (*Glycine max*). В порядке снижения относительного содержания, во всех образцах масла, основными фитостеринами были  $\beta$ -ситостерол (интервал 28-55% от общего содержания стеролов),  $\Delta$ 5-авенастерол (изофукостерол) (3-24%), кампэстерол (2-33%),  $\Delta$ 5-стигмастерол (0,7-18%),  $\Delta$ 7-стигмастерол (1-18%) и  $\Delta$ 7-авенастерол (0,1-5%). Были идентифицированы несколько других минорных стеролов: холестерин, браассикастерол, чалинастерол, кампестанол и эбурикол. Дополнительно, были обнаружены четыре C29:2 и два C30:2 стерола, но необходимо дальнейшее исследование для окончательной идентификации этих минорных компонентов. Кроме того, в некоторых из масел присутствовали несколько других неидентифицированных стеролов, но из-за очень низкого их содержания, масс-спектры не были достаточно интенсивными, чтобы позволить идентификацию их структуры.

Содержание стеролов, выраженное как мг/г масла, в порядке снижения: масло рапса (6,8 мг/г), кунжутное масло (5,8 мг/г), льняное масло (4,8-5,2 мг/г), масло подсолнечника (3,7-4,1 мг/г), арахисовое масло (3,2 мг/г), сафлоровое масло (3,0 мг/г), соевое масло (3,0 мг/г), оливковое масло (2,4 мг/г), касто-

ровое масло (1,9 мг/г). % стеролов в составе и общее содержание стеролов приведены в табл. 26.

Таблица 25

Названия по ИЮПАК/систематические названия идентифицированных стеролов

Стерол №	Общее название(я)	ИЮПАК/систематическое название
1	холестерин	холест-5-ен-3 $\beta$ -ол
2	брасикастерол	24-метилхолеста-5,22Е-диен-3 $\beta$ -ол
3	чалинастерол / 24-метиленхолестерин	24-метилхолеста-5,24(28)Е-диен-3 $\beta$ -ол
4	кампэстерол /	24-метилхолест-5-ен-3 $\beta$ -ол
	24-метилхолестерин	
5	кампэстанол / 24-метилхолестанол	24-метилхолестан-3 $\beta$ -ол
7	$\Delta$ 5-стигмастерол	24-этилхолеста-5,22Е-диен-3 $\beta$ -ол
9	эргост-7-ен-3 $\beta$ -ол	24-метилхолест-7-ен-3 $\beta$ -ол
11	эбурикол	4,4,14-триметилэргоста-8,24(28)-диен-3 $\beta$ -ол
12	$\beta$ -ситостерол / 24-этилхолестерин	24-этилхолест-5-ен-3 $\beta$ -ол
13	D5-авенастерол / изофукостерол	24-этилхолеста-5,24(28)Z-диен-3 $\beta$ -ол
19	D7-стигмастерол / стигмаст-7-ен-3 $\beta$ -ол	24-этилхолест-7-ен-3 $\beta$ -ол
20	D7-авенастерол	24-этилхолеста-7,24(28)-диен-3 $\beta$ -ол

В общем, среди всех образцов масла из семян основным фитостерином был  $\beta$ -ситостерол (интервал 30-57% от общего содержания стеролов). Для масел наблюдался широкий интервал доли других основных стеролов: кампэстерол (2-17%),  $\Delta$ 5-стигмастерол (0,7-18%),  $\Delta$ 5-авенастерол (4-23%),  $\Delta$ 7-стигмастерол (1-18%). Масла различных видов содержали другой профиль стеролов, причем некоторые профили были весьма отличными. В случае масла рапса, оно содержало самую высокую долю кампэстера (33,6%), в то время как образцы других видов в общем содержали более низкие уровни, например до 17% в арахисовом масле. Сафлоровое масло содержало относительно высокую долю  $\Delta$ 7-стигмастера (18%), в то время как содержание данного стерола обычно было низким в маслах других видов, до 9% в масле подсолнечника. Поскольку они являются характерными для каждого вида, профили стеролов могут, таким образом, использоваться как вспомогательные для идентификации конкретных овощных или растительных масел и проверки их неподдельности или подделки другими маслами.

Таблица 26

Содержание и состав стеролов в проанализированных растительных маслах

Номер стерола*	Общее название стерола	Кунжут	Олива	Подсолнечник	Подсолнечник холодное прессование	Клеверная	Канола	Сафлор	Сафлор холодное прессование	Арахис	Лен (семя льна)	Лен (семя льна)	Соя
1	холестерин	0,2	0,8	0,2	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4	0,2
2	брасикастерол	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
3	чалинастерол / 24-метилхолестерин	1,5	0,1	0,3	0,1	1,1	2,4	0,2	0,1	0,9	1,5	1,4	0,8
4	кампэстерол / 24-метилхолестерин	16,2	2,4	7,4	7,9	8,4	33,6	12,1	8,5	17,4	15,7	14,4	16,9
5	кампастанол / 24-метилхолестанол	0,7	0,3	0,3	0,1	0,9	0,2	0,8	0,8	0,3	0,2	0,2	0,7
6	C29:2*	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,5	0,5	0,0	1,2	1,3	0,1
7	Δ5-стигмастерол	6,4	1,2	7,4	7,2	18,6	0,7	7,0	4,6	6,9	5,1	5,8	17,6
8	неизвестен	0,5	1,3	0,7	0,6	0,8	0,7	0,7	1,3	0,4	0,7	0,6	1,3
9	эргост-7-ен-3β-ол	0,1	0,1	1,9	1,8	0,2	0,4	2,7	4,0	1,4	1,4	1,4	1,0
10	неизвестен	0,0	1,3	0,9	0,8	1,2	0,9	1,8	0,7	1,2	0,7	0,5	0,7
11	эбурикол	1,6	1,8	4,1	4,4	1,5	1,0	1,9	2,9	1,2	3,5	3,3	0,9
12	β-ситостерол / 24-этилхолестерин	55,3	45,6	43,9	43,6	37,7	50,8	40,2	35,1	57,2	29,9	28,4	40,2
13	Δ5-авенастерол / изофукостерол	8,6	16,9	7,2	4,1	19,3	4,4	7,3	6,3	5,3	23,0	24,2	3,3
14	тритерпеновый спирт	0,0	2,4	0,9	1,1	0,0	0,0	1,6	1,9	0,0	0,0	0,0	0,9
15	тритерпеновый спирт	0,0	0,0	0,7	0,6	0,0	0,0	2,8	1,8	0,0	0,0	0,3	0,0
16	C29:2*	0,0	0,5	0,7	0,7	1,5	1,2	2,8	1,9	2,0	1,0	0,7	0,5
17	C29:2*	1,0	0,9	2,3	2,4	0,6	0,4	1,3	1,9	0,9	1,0	1,0	1,0
18	C30:2*	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19	Δ7-стигмастерол / стигмаст-7-ен-3β-ол	2,2	7,1	9,3	10,9	2,3	0,9	10,5	18,3	1,1	7,9	8,7	5,6
20	Δ7-авенастерол	1,3	0,1	4,0	3,6	0,6	0,2	2,0	4,7	0,7	0,4	0,4	0,6
21	неизвестен	0,7	7,1	0,9	0,8	0,0	0,4	0,3	0,4	0,0	3,0	3,6	0,0
22	неизвестен	0,3	0,0	0,3	0,9	0,0	0,0	1,2	1,3	0,2	0,1	0,0	0,3
23	неизвестен	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5
24	неизвестен	0,0	3,1	0,9	1,3	0,6	0,4	0,2	0,4	0,7	1,7	1,9	0,8
25	неизвестен	0,9	0,4	0,3	0,5	0,3	0,1	0,5	0,7	0,3	0,1	0,1	0,6
26	C30:2	2,2	6,0	4,6	5,7	1,4	0,6	1,0	1,2	1,2	1,2	1,1	5,2
27	неизвестен	0,0	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,0	0,3
	Сумма	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Общий стерол (мг/г масла)	5,8	2,4	4,1	3,7	1,9	6,8	3,2	3,0	3,2	4,8	5,2	3,0

C29:2\* и C30:2\* обозначают стерол C29 с двумя двойными связями и стерол C30 с двумя двойными связями соответственно.

Сравнивали по два образца из подсолнечника и сафлора, в каждом случае один был получен холодным прессованием семян и был нерафинированным, в то время как другой не был получен холодным прессованием и был рафинированным. Хотя наблюдались некоторые отличия, два источника масел содержали подобный состав стеролов и общее содержание стеролов, наводя на мысль о том, что обработка и рафинирование оказывают незначительное влияние на два указанных параметра. Содержание стеролов среди образцов различалось в 3 раза и варьировало от 1,9 до 6,8 мг/г. В масле рапса было самое высокое, и в касторовом масле самое низкое содержание стеролов.

Пример 13. Увеличение аккумуляции ДГК в положении sn-2 ТАГ.

Авторы настоящего изобретения предполагали, что аккумуляция ДГК в положении sn-2 ТАГ может быть увеличена путем со-экспрессии 1-ацилглицерол-3-фосфат ацилтрансферазы (ЛФКАТ) с путем биосинтеза ДГК, например, предоставленной конструкцией GA7 или ее вариантами. Предпочтительными ЛФКАТ являются такие, которые могут воздействовать на полиненасыщенный C22 жирный ацил-КоА в качестве субстрата, что приводит к увеличению вставки полиненасыщенной цепи C22 в положении sn-2 ЛФК с образованием ФК, относительно эндогенного ЛФКАТ. Цитоплазматические ферменты ЛФКАТ часто демонстрируют варьирующие предпочтения в отношении субстрата, особенно, если вид синтезирует и аккумулирует необычные жирные кислоты в ТАГ. Продемонстрировано, что ЛФКАТ2 из *Limnanthes douglasii* может использовать эрукоил-КоА (C22:1-КоА) в качестве субстрата для синтеза ФК, в противоположность ЛФКАТ1 из того же вида, которая не может утилизировать субстрат C22 (Brown et al., 2002).

Рассматривались известные ЛФКАТ, и многие были выбраны для тестирования, в том числе те, от которых не ожидалось увеличения инкорпорации ДГК в положении sn-2, в качестве контроля. Известные ЛФКАТ включали: ЛФКАТ2: *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 63, номер доступа ABG48392, Kim et al., 2005), ЛФКАТ *Limnanthes alba* (SEQ ID NO: 64, номер доступа AAC49185, Lassner et al., 1995), S1c1p *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 65, номер доступа NP010231, Zou et al., 1997), ЛФКАТ 1 *Mortierella alpina* (SEQ ID NO: 67, номер доступа AED33305; патент США №7879591) и ЛФКАТ *Brassica napus* (SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, номера доступа ADC97479 и ADC97478 соответственно). Они были выбра-

ны таким образом, чтобы охватить три группы ферментов ЛФКАТ: 1) контрольные растительные ЛФКАТ семян, обычно с низкой активностью в отношении необычных длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот (в том числе ЛФКАТ *Arabidopsis* и *Brassica*); 2) ЛФКАТ, которые ранее продемонстрировали воздействие на жирные кислоты С22 и использование С22 ацил-КоА в качестве субстрата, в данном случае, эруковой кислоты С22:1 (в том числе ЛФКАТ *Limnanthes* и *Saccharomyces*); 3) ЛФКАТ, которые изобретатели считали наиболее вероятно способными утилизировать длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты, такие как ЭПК и ДГК, в качестве субстратов (в том числе ЛФКАТ *Mortierella*).

ЛФКАТ2 *Arabidopsis* (также обозначенная ЛФАТ2) представляет собой локализованный в эндоплазматическом ретикулуме фермент, который продемонстрировал активность в отношении субстратов С16 и С18, однако активность в отношении субстратов С20 или С22 не тестировалась (Kim et al., 2005). ЛФКАТ2 *Limnanthes alba* продемонстрировала вставку ацильной цепи С22:1 в положение sn-2 ФК, хотя способность использовать ДГК в качестве субстрата не тестировалась (Lassner et al., 1995). Выбранная ЛФКАТ *S. cerevisiae* Slc1p продемонстрировала активность в виде использования 22:1-КоА в дополнение к 18:1-КоА в качестве субстратов, указывая на широкую специфичность в отношении субстратов с учетом длины цепи (Zou et al., 1997). Снова, ДГК-КоА и другие ДЦ-ПНЖК не тестировались в качестве субстратов. Ранее было продемонстрировано, что ЛФКАТ *Mortierella* обладает активностью в отношении жирнокислотных субстратов ЭПК и ДГК в трансгенном *Yarrowia lipolytica* (US 7879591).

Дополнительные ЛФКАТ были идентифицированы изобретателями. *Micromonas pusilla* представляет собой микроводоросль, которая вырабатывает и аккумулирует ДГК в масле, хотя позиционное распределение ДГК на ТАГ в данном виде не было подтверждено. ЛФКАТ *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 66, номер доступа XP002501997) была идентифицирована посредством поиска среди геномных последовательностей *Micromonas pusilla*, с использованием ЛФКАТ2 *Arabidopsis* в качестве последовательности запроса BLAST. Возникли несколько последовательностей-кандидатов, и последовательность XP002501997 была синтезирована для тестирования в качестве вероятного фермента ЛФКАТ с активностью в отношении С22 ДЦ-ПНЖК. ЛФКАТ *Ricinus communis* была аннотирована как предполагаемая ЛФКАТ в последовательности генома клещевины (Chan et al., 2010). Четыре кандидата на ЛФКАТ из генома клещевины были синтезированы и протестированы на неочищенных лизатах листьев инфильтрованной ткани листа *N. benthamiana*. Раскрытая в настоящем документе последовательность-кандидат продемонстрировала активность ЛФКАТ.

Целый ряд кандидатов на ЛФКАТ был выровнен с известным ЛФКАТ на филогенетическом древе (фиг. 20). Следует отметить, что предполагаемая ЛФКАТ *Micromonas* не группируется с предполагаемыми С22 ЛФКАТ, но имеет дивергирующую последовательность.

В качестве первичного анализа различных ЛФКАТ на предмет их способности использовать ДГК-КоА в качестве субстрата, получают химерные генетические конструкции для конститутивной экспрессии экзогенных ЛФКАТ в листьях *N. benthamiana*, каждая под контролем промотора 35S, как раскрыто ниже: 35S:Arath-ЛФАТ2 (*Arabidopsis* ER ЛФКАТ); 35S:Riccо-ЛФКАТ2; 35S:Limal-ЛФКАТ (ЛФКАТ *Limnanthes alba*); 35S:Sacce-Slc1p (ЛФКАТ *S. cerevisiae*); 35S:Мicru-ЛФКАТ (ЛФКАТ *Micromonas pusilla*); 35S:Moral-ЛФКАТ1 (ЛФКАТ *Mortierella alpina*). Конструкции 35S:p19, не содержащие экзогенной ЛФКАТ, используются в эксперименте в качестве контроля. Каждую из указанных конструкций вводят с помощью *Agrobacterium* в листья *N. benthamiana*, как раскрыто в примере 1, и через 5 дней после инфильтрации обработанные зоны листьев вырезают и измельчают для получения лизата листьев. Каждый лизат содержит экзогенную ЛФКАТ, а также эндогенные ферменты для синтеза ЛФК. Реакционные смеси получают *in vitro*, по отдельности добавляя меченые <sup>14</sup>С ОК, ЛК или АЛК (субстраты С18), АРК (субстрат С20) и ДГК (С22) к лизатам, в трех повторениях. Реакционные смеси инкубируют при 25°C и уровень инкорпорации меченых <sup>14</sup>С жирных кислот в ФК определяют методом ТСХ. Вычисляют способность каждой ЛФКАТ использовать ДГК относительно АРК и жирных кислот С18. Обнаружено, что ЛФКАТ пенника лугового, *Mortierella* и *Saccharomyces* обладают активностью в отношении субстрата ДГК, причем радиомеченая ФК возникает в случае этих, но не других ЛФКАТ. Активность всех ЛФКАТ была подтверждена сходным потреблением олеиновой кислоты.

Для тестирования активности ЛФКАТ в семенах некоторое количество кодирующих белок последовательностей или ЛФКАТ вставляют в бинарный вектор под контролем промотора конлиннина (pLuCnll). Получающиеся в результате генетические конструкции, содержащие химерные гены CnllArath-ЛФКАТ (отрицательный контроль), Cnll:Limal-ЛФКАТ, Cn1:Sacce-Slc1p, и Cn1Moral-ЛФКАТ, соответственно, далее используют для трансформации растений *V. napus* и *A. thaliana*, чтобы получить стабильные трансформанты, экспрессирующие ЛФКАТ в специфичной для семени форме. Трансформированные растения, содержащие конструкции Cn11-ЛФКАТ, скрещивают с растениями, экспрессирующими конструкцию GA7 или ее варианты (пример 5), которые вырабатывают ДГК в семени, чтобы достичь увеличения инкорпорации ДГК в положении sn-2 ТАГ. Кроме того, конструкции используются для трансформации растений *V. napus*, *S. sativa* и *A. thaliana*, которые уже содержат конструкцию GA7 и ее варианты (примеры 2-5), с целью получения потомства, несущего материнские и ЛФКАТ генетические конструкции. Ожидается увеличение инкорпорации ДГК в положении sn-2 ТАГ относительно

инкорпорации в растениях без кодирующих ЛФКАТ трансгенов. Содержание масла также повышается в семенах, особенно в случае семян, вырабатывающих более высокие уровни ДГК, нейтрализуя тенденцию, наблюдаемую в семени *Arabidopsis*, как раскрыто в примере 2.

Квалифицированным специалистам в данной области будет понятно, что многочисленные вариации и/или модификации изобретения могут быть осуществлены, как раскрыто в конкретных вариантах, без отхода от духа или контекста изобретения в его широком смысле. Представленные варианты, таким образом, следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, но не ограничивающие.

В этой заявке заявлен приоритет по US 61/660392, поданной 15 июня 2012 г., US 61/663344, поданной 22 июня 2012 г., US 61/697676, поданной 6 сентября 2012 г., и US 61/782680, поданной 14 марта 2013 г., каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Все публикации, обсуждаемые и/или на которые есть ссылки в настоящем документе включены в настоящий документ в полном объеме.

Данная заявка включает в настоящий документ посредством ссылки US 61/660392, поданную 15 июня 2012 г., US 61/663344, поданную 22 июня 2012 г., US 61/697676, поданную 6 сентября 2012 г.

Любое обсуждение документов, действий, материалов, устройств, изделий и т.п., которое включено в настоящий документ, предназначено исключительно для целей обеспечения контекста для настоящего изобретения. Не следует делать допущение, что любые или все эти вопросы образуют часть известного уровня техники или представляли собой общедоступное знание в области, к которой относится настоящее изобретение, в том виде, в котором оно существовало до даты приоритета каждого из пунктов формулы данной заявки.



## Ссылки.

- Abbadì et al. (2004) *Plant Cell* 16: 2734-2748.
- Abbott et al. (1998) *Science* 282:2012-2018.
- Abdullah et al. (1986) *Biotech.* 4:1087.
- Agaba et al. (2004) *Marine Biotechnol. (NY)* 6:251-261.
- Alvarez et al. (2000) *Theor Appl Genet* 100:319-327.
- Armbrust et al. (2004) *Science* 306:79-86.
- Attila Kereszt et al. (2007) *Nature Protocols* 2:948 - 952.
- Baumberger et al. (2007) *Curr. Biol.* 17:1609-1614.
- Baumlein et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225:459-467.
- Baumlein et al. (1992) *Plant J.* 2:233-239.
- Beaudoin et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6421-6426.
- Beclin et al. (2002) *Curr. Biol.* 12:684-688.
- Berberich, et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 36:297-306.
- Bortolamiol et al. (2007) *Curr. Biol.* 17:1615-1621.
- Broun et al. (1998) *Plant J.* 13:201-210.
- Brown et al. (2002) *Biochem J.* 364:795-805.
- Chapman et al. (2004) *Gen. Dev.* 18:1179-1186.
- Chen et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1302-1313.
- Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
- Cheng et al. (2010) *Transgenic Res* 19: 221-229.
- Chikwamba et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:11127-11132.
- Cho et al. (1999a) *J. Biol. Chem.* 274:471-477.
- Cho et al. (1999b) *J. Biol. Chem.* 274:37335-37339.
- Clough and Bent (1998) *Plant J.* 16:735-43.
- Coutu et al. (2007) *Transgenic Res.* 16: 771-781.
- Damude et al. (2006). *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9446-9451.
- Denic and Weissman (2007) *Cell* 130:663-677.
- Domergue et al (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4105-4113.
- Domergue et al. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4105-4113.
- Domergue et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 35115-35126.
- Domergue et al. (2005) *Biochem. J.* 1 389: 483-490.

- Dunoyer et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1235-1250.
- Ellerstrom et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1019-1027.
- Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Culture Lett.* 2:74.
- Fukunaga (2009) *EMBO J.* 28:545-55.
- Gamez et al. (2003) *Food Res International* 36: 721-727.
- Garcia-Maroto et al. (2002) *Lipids* 37:417-426.
- Girke et al. (1998) *Plant J.* 15:39-48.
- Glick et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 105-157-161.
- Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258.
- Hall et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9320-9324
- Hamilton and Baulcombe (1999) *Science* 286:950-952.
- Hamilton et al. (1997) *Gene* 200:107-16.
- Harayama (1998). *Trends Biotechnol.* 16: 76-82.
- Hastings et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:14304-14309.
- Hinchee et al. (1988) *Biotechnology* 6:915-922.
- Hoffmann et al. (2008) *J Biol. Chem.* 283:22352-22362.
- Hong et al. (2002a) *Lipids* 37:863-868.
- Horiguchi et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39:540-544.
- Horvath et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:1914-1919.
- Huang et al. (1999) *Lipids* 34:649-659.
- Inagaki et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:613-621.
- Johansen and Carrington (2001) *Plant Physiol.* 126-930-938.
- Kajikawa et al. (2004) *Plant Mol. Biol.* 54:335-52.
- Kajikawa et al. (2006) *FEBS Lett* 580:149-154.
- Kim et al. (2005) *Plant Cell.* 2005 1073-89.
- Knutzon et al. (1998) *J. Biol Chem.* 273:29360-6.
- Kozziel et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:393-405.
- Lassner (1995) *Plant Physiol.* 109:1389-94.
- Leonard et al. (2000) *Biochem. J.* 347:719-724.
- Leonard et al. (2000b) *Biochem. J.* 350:765-770.
- Leonard et al. (2002) *Lipids* 37:733-740.
- Lewsey et al. (2007) *Plant J.* 50:240-252.

- Lo et al. (2003) *Genome Res.* 13:455-466.
- Lu and Kang (2008) *Plant Cell Rep.* 27:273-8.
- Mallory et al. (2002) *Nat. Biotech.* 20:622-625.
- Marangoni et al. (1995) *Trends in Food Sci. Technol.* 6: 329-335.
- Meesapyodsuk et al. (2007) *J Biol Chem* 282: 20191-20199.
- Meng et al. (2008) *J. Gen. Virol.* 89:2349-2358.
- Meyer et al. (2003) *Biochem.* 42:9779-9788.
- Meyer et al. (2004) *Lipid Res* 45:1899-1909.
- Michaelson et al. (1998a) *J. Biol. Chem.* 273:19055-19059.
- Michaelson et al. (1998b) *FEBS Lett.* 439:215-218.
- Murashige and Skoog (1962) *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Napier et al. (1998) *Biochem. J.* 330:611-614.
- Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- Niedz et al. (1995) *Plant Cell Reports* 14:403.
- Ow et al. (1986) *Science* 234:856-859.
- Parker-Barnes et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8284-8289.
- Pereira et al. (2004a) *Biochem. J.* 378:665-671.
- Pereira et al. (2004b) *Biochem. J.* 384:357-366.
- Perrin et al. (2000) *Mol Breed* 6:345-352.
- Petrie et al. (2010a) *Metab. Eng.* 12:233-240.
- Petrie et al. (2010b) *Plant Methods* 11:6:8.
- Petrie et al. (2012) *Transgenic Res.* 21:139-147.
- Potenza et al. (2004) *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 40:1-22.
- Prasher et al (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127:31-36.
- Qi et al. (2002) *FEBS Lett.* 510:159-165.
- Qi et al. (2004) *Nat. Biotech.* 22: 739-745.
- Qiu et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:31561-31566.
- Reddy and Thomas (1996) *Nat. Biotech.* 14:639-642.
- Reddy et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:293-300.
- Robert et al. (2005) *Func. Plant Biol.* 32:473-479.
- Robert et al. (2009) *Marine Biotech* 11:410-418.
- Ruiz-Lopez et al. (2012) *Transgenic Res.* 21:139-147.

- Saha et al. (2006) *Plant Physiol.* 141:1533-1543.
- Saito et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:1813-1818.
- Sakuradani et al. (1999) *Gene* 238:445-453.
- Sato et al. (2004) *Crop Sci.* 44: 646-652.
- Sakuradani et al. (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:648-654.
- Sayanova et al. (2006) *J Biol Chem* 281: 36533-36541.
- Sayanova et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4211-4216.
- Sayanova et al. (2003) *FEBS Lett.* 542:100-104.
- Sayanova et al. (2006) *Planta* 224:1269-1277.
- Sayanova et al. (2007) *Plant Physiol* 144:455-467.
- Singh et al. (2005) *Curr. Opin. in Plant Biol.* 8:197-203.
- Speranza et al. (2012) *Process Biochemistry* (In Press).
- Sperling et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:3801-3811.
- Sperling et al. (2001) *Arch. 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.
- Stalker et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314.
- Thillet et al. (1988) *J. Biol. Chem* 263:12500-12508.
- Tonon et al. (2003) *FEBS Lett.* 553:440-444.
- Toriyama et al. (1986) *Theor. Appl. Genet.* 205:34.
- Trautwein (2001) *European J. Lipid Sci. and Tech.* 103:45-55.
- Tvrdek (2000) *J. Cell Biol.* 149:707-718.
- Venegas-Caleron et al. (2010) *Prog. Lipid Res.* 49:108-119.
- Voinnet et al. (2003) *Plant J.* 33:949-956.
- Wallis and Browse (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 365:307-316.
- Watts and Browse (1999b) *Arch. Biochem. Biophys.* 362:175-182.
- Weiss et al. (2003) *Int. J. Med. Microbiol.* 293:95:106.
- Whitney et al. (2003) *Planta* 217:983-992.
- Winans (1988) *J. Bacteriol.* 170:4047-54.
- Wood (2009) *Plant Biotechnol J.* 7:914-24.
- Wu et al. (2005) *Nat. Biotech.* 23:1013-1017.
- Yang et al. (2003) *Planta* 216:597-603.

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

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экстрагированный растительный липид, содержащий жирные кислоты в этерифицированной форме, включающие олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту,  $\omega 3$  жирные кислоты, включающие линоленовую кислоту (ЛК) и  $\gamma$ -линоленовую кислоту (ГЛК),  $\omega 3$  жирные кислоты, включающие  $\alpha$ -линоленовую кислоту (АЛК), стеарионовую кислоту (СДК), докозапентаеновую кислоту (ДПК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), при этом уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет 7-20%, а уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 2 до 16%, причем уровень миристиновой кислоты (С14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее 1%.

2. Липид по п.1, отличающийся тем, что обладает по меньшей мере одним из следующих признаков:

i) дополнительно содержащий эйкозапентаеновую кислоту (ЭПК) и/или эйкозатетраеновую кислоту (ЭТК),

ii) уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 2 до 15%,

iii) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 1 до приблизительно 30%, от приблизительно 3 до приблизительно 30% или от приблизительно 6 до приблизительно 30%, или от 1 до приблизительно 20%, или от приблизительно 30 до приблизительно 60%, или от приблизительно 45 до приблизительно 60% или составляет приблизительно 30%,

iv) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35%, или от приблизительно 4 до приблизительно 20%, или от приблизительно 4 до 17%,

v) уровень  $\alpha$ -линоленовой кислоты (АЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 40%, от приблизительно 7 до приблизительно 40% или от приблизительно 10 до приблизительно 35%, или от приблизительно 20 до приблизительно 35%, или от приблизительно 4 до 16%, или от приблизительно 2 до 16%,

vi) уровень  $\gamma$ -линоленовой кислоты (ГЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 0,05 до 4%,

vii) липид дополнительно содержит эйкозатриеновую кислоту (ЭТрК), где уровень ЭТрК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 4, менее чем приблизительно 2, менее чем приблизительно 1%, от 0,05 до 4%, от 0,05 до 3% или от 0,05 до приблизительно 2%, или от 0,05 до приблизительно 1%,

viii) уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18%, от приблизительно 8 до 20%, от приблизительно 10 до 20%, от приблизительно 11 до 20%, от приблизительно 10 до приблизительно 16% или от приблизительно 14 до 20%,

ix) липид содержит  $\omega 6$ -докозапентаеновую кислоту (22:5 $\Delta$ 4,7,10,13,16),

x) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 25% или от приблизительно 4 до приблизительно 20%, от приблизительно 6 до приблизительно 20%, от приблизительно 4 до приблизительно 60%,

xi) уровень общих мононенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 4 до приблизительно 35% или от приблизительно 8 до приблизительно 25%, или от 8 до приблизительно 22%,

xii) уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 20 до приблизительно 75% или от приблизительно 50 до приблизительно 75%, или от приблизительно 60 до приблизительно 75%,

xiii) уровень общих  $\omega 6$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 35 до приблизительно 50%, от приблизительно 20 до приблизительно 35%, от приблизительно 6 до 20%, менее чем 20, менее чем приблизительно 16, менее чем приблизительно 10%, от приблизительно 1 до приблизительно 16%, от приблизительно 2 до приблизительно 10% или от приблизительно 4 до приблизительно 10%,

xiv) уровень общих  $\omega 6$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 10, менее чем приблизительно 8, менее чем приблизительно 6, менее чем 4%, от приблизительно 1 до приблизительно 20%, от приблизительно 1 до приблизительно 10%, от приблизительно 0,5 до приблизительно 8% или от приблизительно 0,5 до 4%, где общие  $\omega 6$  жирные кислоты не содержат ЛК,

xv) уровень общих  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 36 до приблизительно 65%, от 40 до приблизительно 60%, от приблизительно 20 до приблизительно 35%, от приблизительно 10 до приблизительно 20%, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35 или приблизительно 40%,

xvi) уровень общих  $\omega 3$  жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 9 до приблизительно 33%, от приблизительно 10 до приблизительно 20%, от приблизительно 20 до приблизительно 30%, от приблизительно 12 до приблизительно 25%, приблизительно 13, приблизительно 15, приблизительно 17 или приблизительно 20%, где общие  $\omega 3$  жирные кислоты не содержат АЛК,

xvii) соотношение общих  $\omega 6$  жирных кислот:общих  $\omega 3$  жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 1,0 до приблизительно 3,0, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5, менее чем приблизительно 0,50, менее чем приблизительно 0,40, менее чем приблизительно 0,30, менее чем приблизительно 0,20, менее чем приблизительно 0,15, приблизительно 1,0, приблизительно 0,1 или приблизительно 0,2,

xviii) соотношение общих  $\omega 6$  жирных кислот из подпункта xiv:общих  $\omega 3$  жирных кислот из подпункта xv в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от приблизительно 1,0 до приблизительно 3,0, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5, менее чем приблизительно 0,50, менее чем приблизительно 0,40, менее чем приблизительно 0,30, менее чем приблизительно 0,20, менее чем приблизительно 0,15, приблизительно 0,1, приблизительно 0,2 или приблизительно 1,0,

xix) общие жирные кислоты в экстрагированном липиде содержат менее чем 1% C20:1,

xx) липид содержит триацилглицерол (ТАГ), где содержание ТАГ составляет по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере 95, от приблизительно 70 до приблизительно 99% или от приблизительно 90 до приблизительно 99%,

xxi) липид содержит диацилглицерол (ДАГ),

xxii) липид содержит менее чем приблизительно 10, менее чем приблизительно 5, менее чем приблизительно 1% или от приблизительно 0,001 до приблизительно 5% свободных (неэтерифицированных) жирных кислоты и/или фосфолипида,

xxiii) по меньшей мере 70% этерифицированной ДГК в форме ТАГ находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ и

xxiv) липид содержит три-ДГК ТАГ (ТАГ 66:18).

3. Липид по п.2, отличающийся тем, что обладает по меньшей мере одним из следующих признаков:

i) уровень стеарионовой кислоты (СДК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 7, менее чем приблизительно 6, менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 3%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 7%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 6%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 4%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3% или от 0,05 до приблизительно 2%,

ii) уровень эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем приблизительно 6, менее чем приблизительно 5, менее чем приблизительно 4, менее чем приблизительно 1, менее чем приблизительно 0,5%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 6%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 5%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 4%, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3% или от приблизительно 0,05 до приблизительно 2%,

iii) уровень эйкозопентаеновой кислоты (ЭПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2, от 0,05 до 10%, от 0,05 до 5% или от 0,05 до приблизительно 3%, или от 0,05 до приблизительно 2% и

iv) уровень докозапентаеновой кислоты (ДПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 4, менее чем приблизительно 3, менее чем приблизительно 2, от 0,05 до 8%, от 0,05 до 5% или от 0,05 до приблизительно 3%, или от 0,05 до приблизительно 2%.

4. Липид по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что дополнительно содержит один или более стеролов.

5. Липид по п.4, отличающийся тем, что содержит по меньшей мере один из следующего кампестерол/24-метилхолестерин,  $\Delta 5$ -стигмастерол, эбурикол,  $\beta$ -ситостерол/24-этилхолестерин,  $\Delta 5$ -авенастерол/изофукостерол,  $\Delta 7$ -стигмастерол/стигмаст-7-ен-3 $\beta$ -ол и  $\Delta 7$ -авенастерол или их комбинацию.

6. Липид по п.4 или 5, отличающийся тем, что содержит менее чем приблизительно 0,5 мг холестерина/г липида, менее чем приблизительно 0,25 мг холестерина/г липида или по существу не содержит холестерина.

7. Липид по любому из пп.1-6, который происходит из масличной культуры.

8. Липид по п.7, отличающийся тем, что масличная культура выбрана из *Brassica*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, вида *Helianthus*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, вида *Trifolium*, *Elaeisis guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa*, *Crambe abyssinica*, *Miscanthus x giganteus* или *Miscanthus sinensis*.

9. Способ получения экстрагированного растительного липида по любому из пп.1-8, включающий стадии:

i) получение содержащей липид части растения, причем липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, притом, что жирные кислоты содержат олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту,  $\omega 3$  жирные кислоты, включающие линолевую кислоту (ЛК) и  $\gamma$ -линоленовую кислоту (ГЛК),  $\omega 3$  жирные кислоты, включающие  $\alpha$ -линоленовую кислоту (АЛК), стеарионовую кислоту (СДК), докозапентаеновую кислоту (ДПК) и докозагексаеновую кислоту (ДГК), причем уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагируемого липида в части растения составляет приблизительно 7-20% и при этом уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагируемого липида составляет от приблизительно 2 до 16%, причем уровень миристиновой кислоты (C14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагируемого липида составляет менее 1%, и

ii) экстракцию липида из части растения.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что экстрагированный липид обладает одним или более признаков, определенных в пп.2-8.

11. Способ по п.9 или 10, отличающийся тем, что часть растения представляет собой семя масличной культуры.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что масличная культура выбрана из *Brassica*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, вида *Helianthus*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, вида *Trifolium*, *Elaeisis guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa* или *Crambe abyssinica*, предпочтительно *Brassica napus*, *B. juncea* или *C. sativa*.

13. Способ по п.11 или 12, отличающийся тем, что семя содержит по меньшей мере приблизительно 18, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 26, от приблизительно 18 до приблизительно 100 мг, от приблизительно 22 до приблизительно 70 мг или от приблизительно 24 до приблизительно 50 мг ДГК на 1 г семени.

14. Способ по любому из пп.9-13, отличающийся тем, что часть растения содержит экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

i)  $\omega 3$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 6$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза,

ii)  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 6$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза,

iii)  $\Delta 12$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 6$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза,

iv)  $\Delta 12$ -десатураза,  $\omega 3$ -десатураза или  $\lambda 15$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 6$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза,

v)  $\omega 3$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 9$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза,

vi)  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 9$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза,

vii)  $\Delta 12$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 9$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза или

viii)  $\Delta 12$ -десатураза,  $\omega 3$ -десатураза или  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 9$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза,

причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторов, способных направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в клетке части растения.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что ферменты обладают по меньшей мере одной из следующих активностей:

i)  $\Delta 12$ -десатураза превращает олеиновую кислоту в линолевую кислоту в одной или более клеток части растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80%, от приблизительно 60 до приблизительно 95%, от прибли-

зительно 70 до приблизительно 90% или от приблизительно 75 до приблизительно 85%,

ii)  $\omega$ 3-десатураза превращает  $\omega$ 6 жирные кислоты в  $\omega$ 3 жирные кислоты в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 65, по меньшей мере приблизительно 75, по меньшей мере приблизительно 85, от приблизительно 65 до приблизительно 95%, от приблизительно 75 до приблизительно 91% или от приблизительно 80 до приблизительно 91%,

iii)  $\Delta$ 6-десатураза превращает АЛК в СДК в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70%, от приблизительно 30 до приблизительно 70%, от приблизительно 35 до приблизительно 60% или от приблизительно 50 до приблизительно 70%,

iv)  $\Delta$ 6-десатураза превращает линолеовую кислоту в  $\gamma$ -линоленовую кислоту в одной или более клеток растения с эффективностью менее чем приблизительно 5, менее чем приблизительно 2,5, менее чем приблизительно 1%, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5%, от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,5% или от приблизительно 0,5 до приблизительно 1%,

v)  $\Delta$ 6-элонгаза превращает СДК в ЭТК в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 75%, от приблизительно 60 до приблизительно 95%, от приблизительно 70 до приблизительно 80% или от приблизительно 75 до приблизительно 80%,

vi)  $\Delta$ 5-десатураза превращает ЭТК в ЭПК в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 75, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90%, от приблизительно 60 до приблизительно 95%, от приблизительно 70 до приблизительно 95% или от приблизительно 75 до приблизительно 95%,

vii)  $\Delta$ 5-элонгаза превращает ЭПК в ДПК в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 85, по меньшей мере приблизительно 90%, от приблизительно 50 до приблизительно 90% или от приблизительно 85 до приблизительно 95%,

viii)  $\Delta$ 4-десатураза превращает ДПК в ДГК в одной или более клеток растения с эффективностью по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере приблизительно 93%, от приблизительно 50 до приблизительно 95%, от приблизительно 80 до приблизительно 95% или от приблизительно 85 до приблизительно 95%,

ix)  $\Delta$ 6-десатураза предпочтительно осуществляет десатурацию  $\alpha$ -линоленовой кислоты (АЛК) относительно линолевой кислоты (ЛК),

x)  $\Delta$ 6-элонгаза также обладает активностью  $\Delta$ 9-элонгазы,

xi)  $\Delta$ 12-десатураза также обладает активностью  $\Delta$ 15-десатуразы,

xii)  $\Delta$ 6-десатураза также обладает активностью  $\Delta$ 8-десатуразы,

xiii)  $\Delta$ 8-десатураза также обладает активностью  $\Delta$ 6-десатуразы или не обладает активностью  $\Delta$ 6-десатуразы,

xiv)  $\Delta$ 15-десатураза также обладает активностью  $\omega$ 3-десатуразы в отношении ГЛК,

xv)  $\omega$ 3-десатураза также обладает активностью  $\Delta$ 15-десатуразы в отношении ЛК,

xvi)  $\omega$ 3-десатураза осуществляет десатурацию ЛК и/или ГЛК,

xvii)  $\omega$ 3-десатураза предпочтительно осуществляет десатурацию ГЛК относительно ЛК,

xviii) по меньшей мере одна десатураза обладает более высокой активностью по отношению к ацил-КоА чем ацил-ФХ (ацил-ФосфатидилХолин),

xix)  $\Delta$ 6-десатураза обладает более высокой активностью в отношении АЛК, чем в отношении ЛК,

xx)  $\Delta$ 6-десатураза обладает более высокой активностью в отношении АЛК-КоА, чем в отношении АЛК, присоединенной к положению sn-2 ФХ, как жирнокислотного субстрата,

xxi)  $\Delta$ 6-десатураза обладает по меньшей мере приблизительно в 2 раза более высокой активностью, по меньшей мере в 3 раза более высокой активностью, по меньшей мере в 4 раза более высокой активностью или по меньшей мере в 5 раз более высокой активностью в отношении АЛК, по сравнению с ЛК,

xxii)  $\Delta$ 6-десатураза обладает более высокой активностью в отношении АЛК-КоА, чем в отношении АЛК, присоединенной к положению sn-2 ФХ,

xxiii)  $\Delta$ 6-десатураза обладает по меньшей мере приблизительно в 5 раз более высокой активностью или по меньшей мере в 10 раз более высокой активностью в отношении АЛК-КоА, чем в отношении АЛК, присоединенной к положению sn-2 ФХ,

xxiv) десатураза представляет собой front-end десатуразу,

xxv)  $\Delta$ 6-десатураза не обладает обнаруживаемой активностью  $\Delta$ 5-десатуразы в отношении ЭТК.

16. Способ по п.14, отличающийся тем, что ферменты обладают по меньшей мере одной из следующих активностей:

i) эффективность превращения олеиновой кислоты в ДГК в одной или более клеток части растения



составляет по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20%, от приблизительно 10 до приблизительно 50%, от приблизительно 10 до приблизительно 30% или от приблизительно 10 до приблизительно 25%,

ii) эффективность превращения ЛК в ДГК в одной или более клеток части растения составляет по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 25, от приблизительно 15 до приблизительно 50%, от приблизительно 20 до приблизительно 40% или от приблизительно 20 до приблизительно 30%,

iii) эффективность превращения АЛК в ДГК в одной или более клеток части растения составляет по меньшей мере приблизительно 17, по меньшей мере приблизительно 22, по меньшей мере приблизительно 24%, от приблизительно 17 до приблизительно 55%, от приблизительно 22 до приблизительно 35% или от приблизительно 24 до приблизительно 35% и

iv) одна или более клеток части растения содержат по меньшей мере приблизительно на 15, по меньшей мере приблизительно на 20%, приблизительно на 15-30% или приблизительно на 22,5-27,5% больше  $\omega 3$  жирных кислот, чем соответствующие клетки без экзогенных полинуклеотидов.

17. Способ по любому из пп.14-16, отличающийся тем, что по меньшей мере один из указанных ферментов обладает следующей структурой:

i)  $\Delta 12$ -десатураза содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 10,

ii)  $\omega 3$ -десатураза содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 12 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 12,

iii)  $\Delta 6$ -десатураза содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 16,

iv)  $\Delta 6$ -элонгаза содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 25 и/или SEQ ID NO: 26 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 25 и/или SEQ ID NO: 26,

v)  $\Delta 5$ -десатураза содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 30 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 30,

vi)  $\Delta 5$ -элонгаза содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 37 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 37, и

vii)  $\Delta 4$ -десатураза содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 41 или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 41.

18. Способ по любому из пп.14-17, отличающийся тем, что часть растения дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий диацилглицерол ацилтрансферазу (ДГАТ), моноацилглицерол ацилтрансферазу (МГАТ), глицерол-3-фосфат ацилтрансферазу (ГФАТ), 1-ацилглицерол-3-фосфат ацилтрансферазу (ЛФКАТ) предпочтительно ЛФКАТ, которая может использовать полиненасыщенный жирный С22 ацил-КоА субстрат, ацил-КоА:лизофосфатидилхолин ацилтрансферазу (ЛФХАТ), фосфолипазу А<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), фосфолипазу С (PLC), фосфолипазу D (PLD), СДФ-холин диацилглицеролхолин фосфотрансферазу (ХФТ), фосфатидилхолин диацилглицерол ацилтрансферазу (ФДАТ), фосфатидилхолин:диацилглицерол холин фосфотрансферазу (ФДХТ), ацил-КоА синтазу (АКС) или комбинацию двух или более из указанных ферментов.

19. Способ по любому из пп.9-18, отличающийся тем, что часть растения дополнительно содержит введенную мутацию или экзогенный полинуклеотид, который в клетке части растения подавляет выработку и/или активность эндогенного фермента, выбранного из FAE1, ДГАТ, МГАТ, ГФАТ, ЛФКАТ, ЛФХАТ, PLA<sub>2</sub>, PLC, PLD, ХФТ, ФДАТ, тиоэстеразы, например FATB, или  $\Delta 12$ -десатуразы, или из комбинации двух или более указанных ферментов.

20. Способ по любому из пп.14-19, отличающийся тем, что по меньшей мере один или все указанные промоторы представляют собой специфичные для семян промоторы.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что по меньшей мере один или все указанные промоторы получены из генов биосинтеза или аккумуляции масла, таких как гены, кодирующие олеозин, или из генов хранения белка в семени, таких как гены, кодирующие конлинин.

22. Способ по любому из пп.14-21, отличающийся тем, что промотор(ы), направляющий(е) экспрессию экзогенных полинуклеотидов, кодирующих  $\Delta 4$ -десатуразу и  $\Delta 5$ -элонгазу, инициирует экспрессию полинуклеотидов в развивающемся семени части растения раньше или достигает пика экспрессии раньше промотора(ов), направляющего(их) экспрессию экзогенных полинуклеотидов, кодирующих  $\Delta 12$ -десатуразу и  $\omega 3$ -десатуразу.

23. Способ по любому из пп.14-22, отличающийся тем, что экзогенные полинуклеотиды ковалентно соединены в молекулу ДНК, предпочтительно молекулу Т-ДНК, интегрированную в геном клеток части растения, причем количество таких молекул ДНК составляет одну, две или три.

24. Способ по п.23, отличающийся тем, что растение содержит по меньшей мере два различных экзогенных полинуклеотида, каждый из которых кодирует  $\Delta 6$ -десатуразу, где  $\Delta 6$ -десатуразы имеют последовательности аминокислот, которые отличаются друг от друга.

25. Способ по любому из пп.14-24, отличающийся тем, что общее содержание липида в части рас-

тения, содержащей экзогенные полинуклеотиды, составляет по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50, или по меньшей мере приблизительно 60, или по меньшей мере приблизительно 70%, или от приблизительно 50 до приблизительно 80% от общего содержания липида в соответствующей части растения, в которой отсутствуют экзогенные полинуклеотиды.

26. Способ по любому из пп.9-25, отличающийся тем, что по меньшей мере приблизительно 90, или по меньшей мере приблизительно 95, по меньшей мере приблизительно 98% или от приблизительно 95 до приблизительно 98 мас.% липида составляют триацилглицеролы.

27. Способ по любому из пп.9-26, отличающийся тем, что дополнительно включает переэтерификацию липида для повышения уровня ДГК в процентном выражении от общего содержания жирных кислот.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что переэтерификацию проводят с целью превращения жирных кислот в алкиловые эфиры.

29. Липид, полученный с применением способа по любому из пп.9-28.

30. Масло, содержащее липид, полученный с применением способа по любому из пп.9-28.

31. Растение масличной культуры, содержащее экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

i)  $\Delta 12$ -десатураза, грибковая  $\omega 3$ -десатураза и/или грибковая  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 6$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\Delta 6$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза или

ii)  $\Delta 12$ -десатураза, грибковая  $\omega 3$ -десатураза и/или грибковая  $\Delta 15$ -десатураза,  $\Delta 8$ -десатураза,  $\Delta 5$ -десатураза,  $\Delta 4$ -десатураза,  $\lambda 9$ -элонгаза и  $\Delta 5$ -элонгаза,

каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более специфичными для семени промоторами, способными направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в развивающемся семени растения и семя растения содержит липид по любому из пп.1-8.

32. Растение по п.31, представляющее собой растение рапса, *Glycine max*, *Camelina sativa* или *Arabidopsis thaliana*.

33. Растение по п.31 или 32, отличающееся тем, что одна или более указанная десатураза способна к использованию субстрата ацил-КоА.

34. Растение по п.33, отличающееся тем, что одна или более из  $\Delta 6$ -десатуразы,  $\Delta 5$ -десатуразы,  $\Delta 4$ -десатуразы и  $\Delta 8$ -десатуразы, если они присутствуют, способны использовать субстрат ацил-КоА, предпочтительно каждая из i)  $\Delta 6$ -десатуразы,  $\Delta 5$ -десатуразы и  $\Delta 4$ -десатуразы или ii)  $\Delta 5$ -десатуразы,  $\Delta 4$ -десатуразы и  $\Delta 8$ -десатуразы способна использовать субстрат ацил-КоА.

35. Клетка растения по любому из пп.31-34, содержащая экзогенные полинуклеотиды, охарактеризованные в п.31 и липид по любому из пп.1-8.

36. Часть растения от растения по любому из пп.31-34, которая содержит липид по любому из пп.1-8.

37. Часть растения по п.36, которая представляет собой семя.

38. Часть растения по п.37, представляющая собой семя, которое имеет содержание ДНА по меньшей мере приблизительно 28 мг на 1 г семян, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 32 мг на 1 г семян, по меньшей мере приблизительно 36 мг на 1 г семян, по меньшей мере приблизительно 40 мг на 1 г семян, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 44 мг на 1 г семян или по меньшей мере приблизительно 48 мг на 1 г семени.

39. Способ получения клетки по п.35, включающий:

а) введение в клетку одной или более комбинаций экзогенных полинуклеотидов, определенных в любом из пп.14, 31 или 34,

б) обеспечение экспрессии указанных генов или полинуклеотида(ов) в клетке,

в) анализ состава жирных кислот в клетке и

г) селекцию клетки, которая экспрессирует указанные гены или полинуклеотид(ы) и которая содержит липид по любому из пп.1-8.

40. Способ по п.39, где клетка не способна к синтезу ДЦ-ПНЖК перед введением полинуклеотидов.

41. Способ по п.39 или 40, где:

i)  $\Delta 12$ -десатураза содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 10,

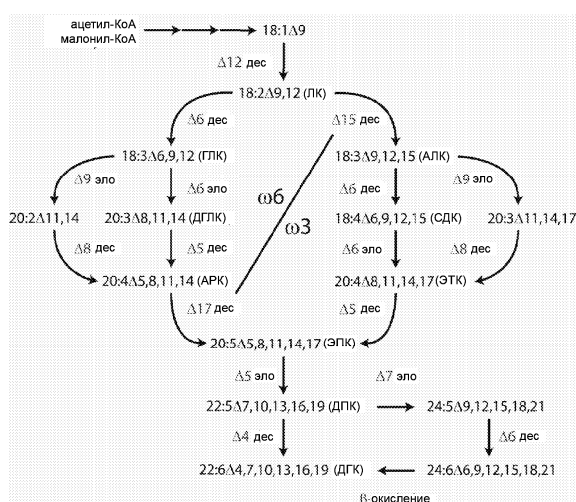
ii)  $\omega 3$ -десатураза содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 12 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 12.

42. Способ по любому из пп.39-41, отличающийся тем, что комбинации экзогенных полинуклеотидов являются стабильно интегрированными в геном клетки.

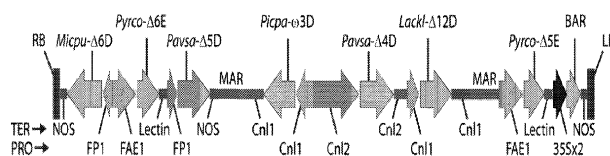
43. Способ получения растения, включающий стадию регенерации трансформированного растения из клетки в соответствии с п.35.

44. Способ по п.43, отличающийся тем, что экзогенный полинуклеотид(ы) экспрессируется в клетке временно.

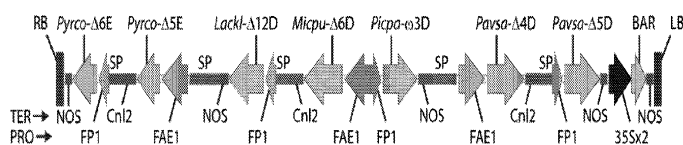
45. Способ получения семени, включающий:
- выращивание растения по любому из пп.31-34 или растения, которое образует часть, определенную в любом из пп.36 или 37, и
  - сбор урожая семени растения.
46. Способ по п.45, где растение вырастает в поле как часть популяции размером по меньшей мере 1000 таких растений или на площади размером по меньшей мере 1 га, культивируемых со стандартной плотностью насаждения.
47. Растение, клетка растения, часть растения или семя по любому из пп.31-36, которое содержит липид, как определено в любом из пп.2, 3 или 4-6, причем часть растения или семя пригодны для применения в способе по любому из пп.13, 15-19 или 21-28.
48. Жмых, полученный из семени по любому из пп.37 или 47, который содержит липид, как определено в любом из пп.1-8.
49. Композиция для получения корма для животных, содержащая липид или масло по любому из пп.1-8, 29 или 30.
50. Фармацевтическая композиция для введения человеку, композиция содержит липид или масло по любому из пп.1-8, 29 или 30.
51. Корм для животных, содержащий липид или масла по любому из пп.1-8 или 29, клетку растения по п.35, растение масличной культуры по любому из пп.31-34, часть растения по п.36 или 37, растение, клетку растения, часть растения или семя по п.47, жмых по п.48, композицию по п.49 или их комбинацию.
52. Способ получения корма для животных, включающий смешивание липида или масла по любому из пп.1-8, 29 или 30 по меньшей мере с еще одним питательным ингредиентом.
53. Способ получения корма для животных, включающий смешивание жмыха по п.48 по меньшей мере с еще одним питательным ингредиентом.



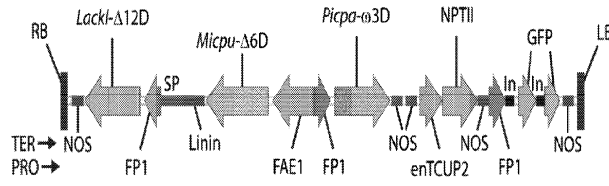
Фиг. 1



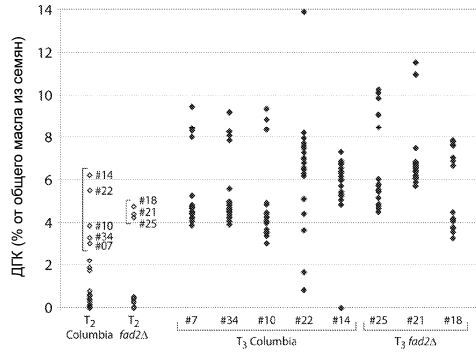
Фиг. 2



Фиг. 3

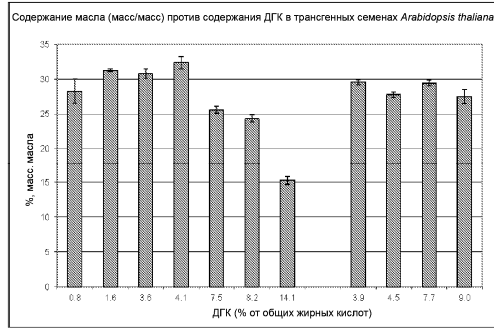


Фиг. 4

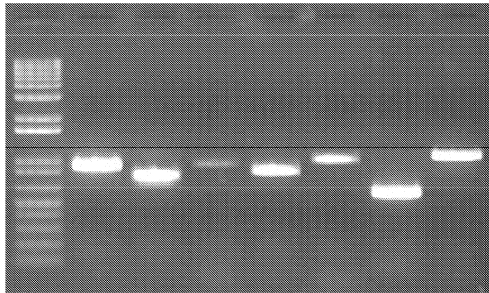


Поклоения *Arabidopsis* T<sub>2</sub> и T<sub>3</sub>

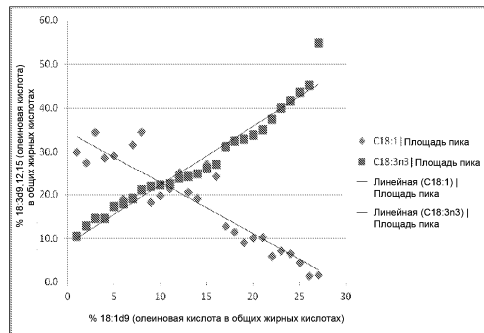
Фиг. 5



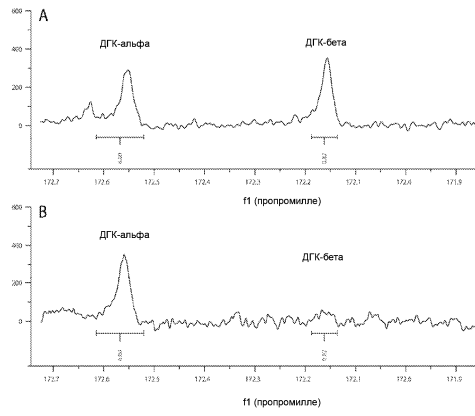
Фиг. 6



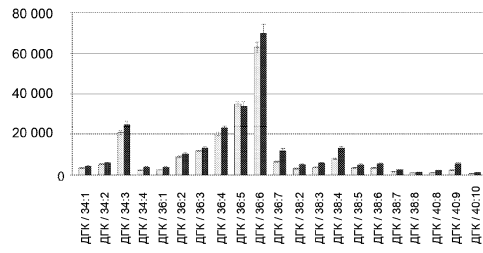
Фиг. 7



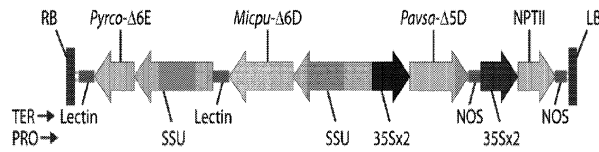
Фиг. 8



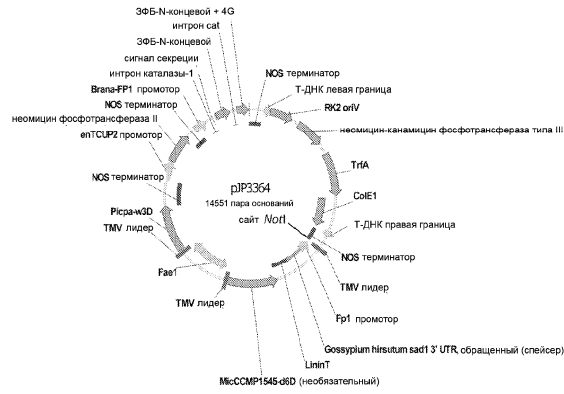
Фиг. 9



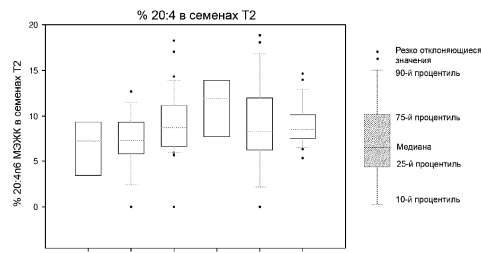
Фиг. 10



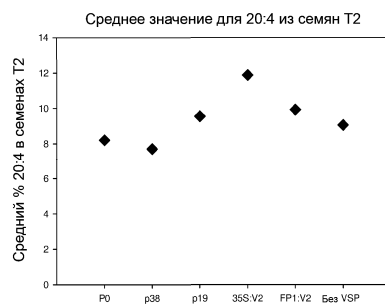
Фиг. 11



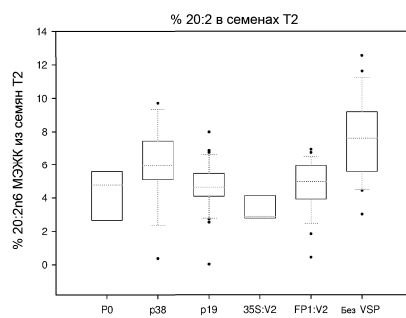
Фиг. 12



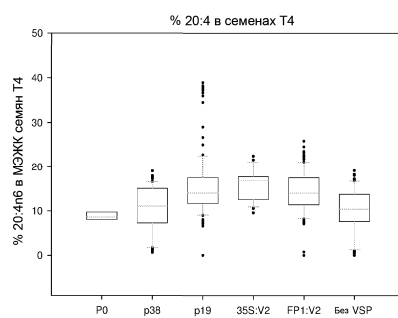
Фиг. 13



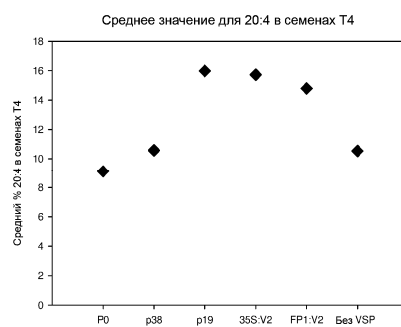
Фиг. 14



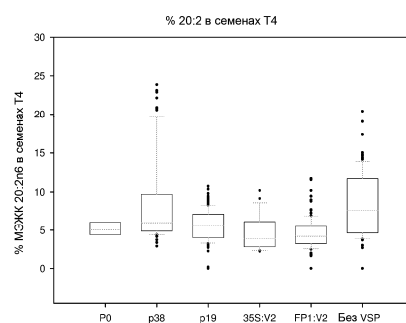
Фиг. 15



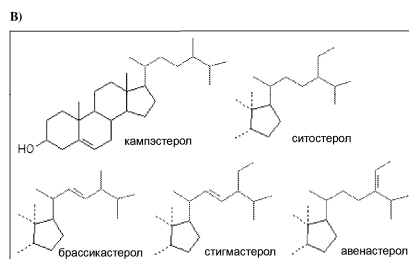
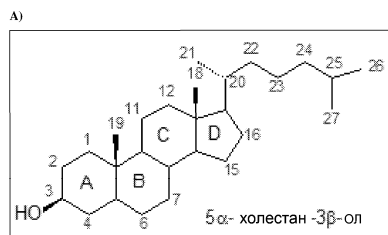
Фиг. 16



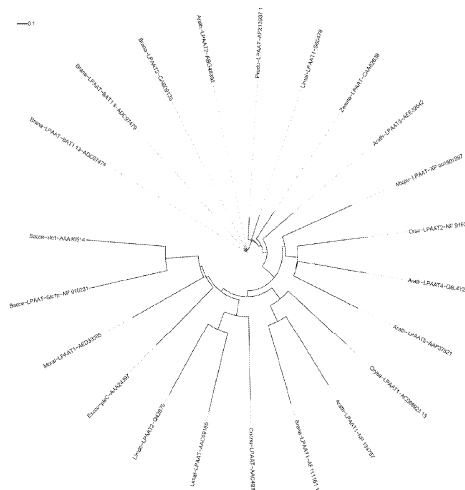
Фиг. 17



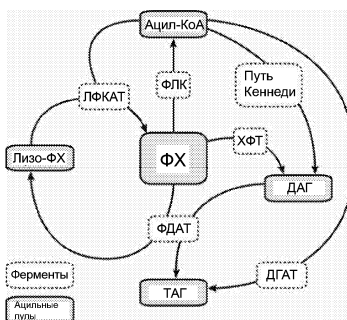
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21