

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037184**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.16

(21) Номер заявки
201700030

(22) Дата подачи заявки
2015.06.18

(51) Int. Cl. *A61K 36/00* (2006.01)
A61K 31/232 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) ЛИПИД, СОДЕРЖАЩИЙ ДОКОЗАПЕНТАЕНОВУЮ КИСЛОТУ

(31) 2014902471; 20140104761; PCT/
AU2014/050433; 14/575,756
(32) 2014.06.27; 2014.12.18; 2014.12.18;
2014.12.18
(33) AU; AR; AU; US
(43) 2017.06.30
(86) PCT/AU2015/050340
(87) WO 2015/196250 2015.12.30

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

(72) Изобретатель:
**Петри Джеймс Робертсон, Сингх
Суриндер Пал, Шреста Пушкар,
Макаллистер Джейсон Тимоти (AU),
Дивайн Малколм Дэвид (CA), Де
Фейтер Роберт Чарльз (AU)**

(74) Представитель:
Рыбина Н.А., Рыбин В.Н. (RU)

(56) US-A1-20100227924
WO-A1-2002092540
WO-A2-2007005727
WO-A1-2010147900
WO-A1-2010057246
WO-A2-2013185184
WO-A1-2005103253

(57) Изобретение относится к экстрагированному растительному липиду или микробному липиду, содержащему докозапентаеновую кислоту, и способам получения экстрагированного липида.

037184 B1

037184 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к липиду, содержащему докозапентаеновую кислоту, полученную из растительных клеток или микробных клеток, и способам получения и применения липида.

Уровень техники изобретения

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 ω 6) или α -линоленовой (АЛК, 18:3 ω 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 ω 6 жирные кислоты, вместо соотношения 4:1 или менее для ω 6: ω 3 жирных кислот, которое считается идеальным (Tautwein, 2001). Непосредственным пищевым источником ДЦ-ПНЖК, например эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК, 20:5 ω 3), докозапентаеновой кислоты (ДПК) и докозагексаеновой кислоты (ДГК, 22:6 ω 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 ω 3 жирных кислот с более длинной цепью, например ЭПК, докозапентаеновой кислоты (ДПК, 22:5 ω 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 Δ 6-десатурацию, Δ 6-элонгацию и Δ 5-десатурацию (называется путем Δ 6-десатурации), тогда как в менее распространенном пути используется Δ 9-элонгация, Δ 8-десатурация и Δ 5-десатурация (носит название пути Δ 9-десатурации). Указанные последовательные реакции десатурации и элонгации могут начинаться с субстрата Δ 6 жирной кислоты ЛК, схематически проиллюстрированного в верхней левой части фиг. 1 (ω 6) или субстрата ω 3 АЛК до ЭПК, проиллюстрированного на нижней правой части фиг. 1 (ω 3). Если начальная Δ 6-десатурация осуществляется на субстрате ω 6 ЛК, продукт серии из трех ферментов ДЦ-ПНЖК будет представлять собой ω 6 жирную арахидоновую кислоту (АРК). Организмы, синтезирующие ДЦ-ПНЖК, могут превращать ω 6 жирных кислот в ω 3 жирные кислоты с использованием ω 3-десатуразы, что проиллюстрировано как стадия Δ 17-десатуразы на фиг. 1, для превращения арахидоновой кислоты (АРК, 20:4 ω 6) в ЭПК. Некоторые члены семейства ω 3-десатуразы могут воздействовать на различные субстраты, варьирующие от ЛК до АРК. Растительные ω 3-десатуразы часто специфично катализируют Δ 15-десатурацию ЛК до АЛК, тогда как грибковые и дрожжевые ω 3-десатуразы могут быть специфичными в отношении Δ 17-десатурации АРК до ЭПК (Pereira et al., 2004a; Zank et al., 2005). Некоторые отчеты наводят на мысль о том, что могут существовать неспецифичные ω 3-десатуразы, способные превращать широкий спектр ω 6 субстратов в соответствующие ω 3 продукты (Zhang et al., 2008).

Превращение ЭПК в ДГК в таких организмах происходит путем Δ 5-элонгации ЭПК с образованием ДПК, после чего следует Δ 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 Δ 4-десатуразы (Sprecher et al., 1995).

Фронт-энд 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, фронт-энд десатуразы (Domergue et al., 2003). И наоборот, фронт-энд 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 β -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 году была опубликована информация относительно идентификации и описания цикла элонгации дегидратазы дрожжей (Denic и 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) (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 γ -линоленовой кислоты (ГЛК, 18:3 $\omega 6$) в табаке с использованием $\Delta 6$ -десатуразы из цианобактерии *Synechocystis* впервые сообщалось в 1996 г. (Reddy и Thomas, 1996). Позже ГЛК была получена в культивируемых растениях, таких как сафлор (73% ГЛК в масле из семян; WO 2006/127789) 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 Abbad et al. (2004), которые сообщали 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 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 г. 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 officinalis*, $\Delta 5$ -элонгазы *Thraustochytrid*, $\Delta 17$ -десатуразы *Phytophthora infestans*, элонгазы ДЦ-ПНЖК *Onocorhynchus 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 уровни, наблюдаемых в рыбьем жире. Позже Petrie et al. (2012) сообщали о выработке около 15% ДГК в семенах *Arabidopsis thaliana*, и в WO2013/185184 сообщалось о выработке некоторых масел из семян, содержащих от 7 до 20% ДГК. Однако не существует сообщений о выработке растительных масел, содержащих более 20% ДГК.

Не существует сообщений о выработке ДПК в рекомбинантных клетках на значимых уровнях без сопутствующей выработки ДГК. В действительности, авторам настоящего изобретения неизвестно о какой-либо опубликованной наводящей мысли или идее выработки ДПК в рекомбинантных клетках без выработки ДГК.

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

Сущность изобретения

Некоторые организмы вырабатывают масло с содержанием ДПК более чем 1-2% и, таким образом, существуют ограниченные возможности выработки ДПК в больших масштабах в природных источниках, если они вообще существуют. Авторами настоящего изобретения идентифицированы способы и растения для выработки липида с намного более высокими уровнями ДПК, чем в природных источниках.

В первом аспекте изобретения предлагается экстрагированный липид, предпочтительно экстрагированный растительный липид или экстрагированный микробный липид, содержащий жирные кислоты в

этерифицированной форме, причем жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, $\omega 6$ жирные кислоты, включающие линолевую кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирные кислоты, включающие α -линоленовую кислоту (АЛК) и докозапентаеновую кислоту (ДПК), и необязательно одну или более из стеариновой кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), и при этом уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 7 до 35%. В вариантах реализации данного аспекта, уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет около 7, около 8, около 9, около 10, около 12, около 15, около 18, около 20, около 22, около 24, около 26, около 28, около 30, от около 7 до около 28%, от около 7 до около 25%, от около 10 до 35%, от около 10 до около 30%, от около 10 до около 25%, от около 10 до около 22%, от около 14 до 35%, от около 16 до 35%, от около 16 до около 30%, от около 16 до около 25% или от около 16 до около 22%.

В варианте реализации упомянутого выше аспекта ДПК присутствует на уровне менее чем 2 или менее чем 0,5% от общего содержания жирных кислот экстрагированного липида и более предпочтительно отсутствует в общем содержании жирных кислот липида.

В другом аспекте изобретения предлагается экстрагированный липид, предпочтительно экстрагированный растительный липид или экстрагированный микробный липид, содержащий жирные кислоты в этерифицированной форме, причем жирные кислоты включают докозапентаеновую кислоту (ДПК) и при этом по меньшей мере 35% ДПК, этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), этерифицированы в положении sn-2 ТАГ. В варианте реализации изобретения экстрагированный липид дополнительно обладает одним или более или всеми признаками из (i) он содержит жирные кислоты, включая олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, $\omega 6$ жирные кислоты, включающие кислоту линолевую (ЛК), $\omega 3$ жирные кислоты, включающие α -линоленовую кислоту (АЛК), и необязательно одну или более из стеариновой кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), (ii) по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 48%, от 35 до около 60% или от 35 до около 50% ДПК, этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), этерифицированы в положении sn-2 ТАГ, и (iii) уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 1 до 35%, или от около 7 до 35%, или от около 20,1 до 35%. В вариантах реализации данного аспекта уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет около 7, около 8, около 9, около 10, около 12, около 15, около 18, около 20, около 22, около 24, около 26, около 28, около 30%, от около 7 до около 28%, от около 7 до около 25%, от около 10 до 35%, от около 10 до около 30%, от около 10 до около 25%, от около 10 до около 22%, от около 14 до 35%, от около 16 до 35%, от около 16 до около 30%, от около 16 до около 25% или от около 16 до около 22%. В предпочтительных вариантах реализации изобретения экстрагированный липид обладает признаками (i) и (ii), (i) и (iii) или (ii) и (iii), более предпочтительно всеми из (i), (ii) и (iii). Предпочтительно экстрагированный липид дополнительно характеризуется уровнем пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида, который составляет от около 2 до 16%, и, при этом, уровень миристиновой кислоты (C14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида, если она присутствует, составляет менее 1%.

Варианты реализации каждого из описанных выше аспектов более подробно раскрыты ниже. Как будет понятно квалифицированному специалисту, любые из признаков описанного варианта реализации изобретения, которые являются шире соответствующего признака в упомянутом выше аспекте, не применяются к данному аспекту.

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

i) уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 2 до 18%, от около 2 до 16%, от около 2 до 15% или от около 3 до около 10%,

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

iii) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 1 до около 30%, от около 3 до около 30%, от около 6 до около 30%, от 1 до около 20%, от около 30 до около 60%, от около 45 до около 60%, около 30 или от около 15 до около 30%,

iv) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 35%, от около 4 до около 20%, от около 4 до около 17% или от около 5 до около 10%,

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

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

vii) уровень стеариновой кислоты (СДК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного

липида составляет менее чем около 10, менее чем около 8, менее чем около 7, менее чем около 6, менее чем около 4, менее чем около 3%, от около 0,05 до около 7%, от около 0,05 до около 6%, от около 0,05 до около 4%, от около 0,05 до около 3%, от около 0,05 до около 10% или от 0,05 до около 2%,

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

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

x) уровень эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 15%, менее чем 4%, менее чем около 3, менее чем около 2%, от 0,05 до 10%, от 0,05 до 5%, от 0,05 до 3% или от 0,05 до 2%,

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

xii) липид содержит менее 0,1% ω 6-докозапентаеновой кислоты ($22:5\Delta^{4,7,10,13,16}$) в числе содержащихся в нем жирных кислот,

xiii) липид содержит менее 0,1% одной или более или всех из СДК, ЭПК и ЭТК в числе содержащихся в нем жирных кислот,

xiv) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 25%, от около 4 до около 20%, от около 6% до около 20% или от около 6% до около 12%,

xv) уровень общих моновенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 40%, от около 4 до около 35%, от около 8 до около 25%, от 8 до около 22%, от около 15 до около 40% или от около 15 до около 35%,

xvi) уровень общих поли ненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 20 до около 75%, от около 30 до около 75%, от около 50 до около 75%, около 60, около 65, около 70, около 75% или от около 60 до около 75%,

xvii) уровень общих ω 6 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 35 до около 50%, от около 20 до около 35%, от около 6 до 20%, менее чем 20%, менее чем около 16, менее чем около 10%, от около 1 до около 16%, от около 2 до около 10% или от около 4 до около 10%,

xviii) уровень новых ω 6 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем около 10, менее чем около 8, менее чем около 6%, менее чем 4%, от около 1 до около 20%, от около 1 до около 10%, от 0,5 до около 8% или от около 0,5 до 4%,

xix) уровень общих ω 3 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 36 до около 65%, от 36 до около 70%, от около 40 до около 60%, от около 30 до около 60%, от около 35 до около 60%, от 40 до около 65%, от около 30 до около 65%, от около 35 до около 65%, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60, около 65 или около 70%,

xx) уровень новых ω 3 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 21 до около 45%, от 21 до около 45%, от около 23 до около 35%, от около 25 до около 35%, от около 27 до около 35%, около 23, около 25, около 27, около 30, около 34, около 40 или около 45%,

xxi) соотношение общих ω 6 жирных кислот: общих ω 3 жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 1,0 до около 3,0, от около 0,1 до около 1, от около 0,1 до около 0,5, менее чем около 0,50, менее чем около 0,40, менее чем около 0,30, менее чем около 0,20, менее чем около 0,15, около 1,0, около 0,1, от около 0,1 до около 0,4 или около 0,2,

xxii) соотношение новых ω 6 жирных кислот: новых ω 3 жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 1,0 до около 3,0, от около 0,02 до около 0,1, от около 0,1 до около 1, от около 0,1 до около 0,5, менее чем около 0,50, менее чем около 0,40, менее чем около 0,30, менее чем около 0,20, менее чем около 0,15, около 0,02, около 0,05, около 0,1, около 0,2 или около 1,0,

xxiii) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения олеиновой кислоты в ЛК под действием Δ 12-десатуразы по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80%, от около 60 до около 98%, от около 70 до около 95% или от около 75 до около 90%,

xxiv) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения АЛК в СДК под действием Δ 6-десатуразы по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70%, от около 30 до около 70%, от около 35 до около 60% или от около 50 до около 70%,

xxv) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения СДК в кислоту

ЭТК под действием Δ6-элонгазы по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75%, от около 60 до около 95%, от около 70 до около 88% или от около 75 до около 85%,

ххvi) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения ЭТК в ЭПК под действием Δ5-десатуразы по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75%, от около 60 до около 99%, от около 70 до около 99% или от около 75 до около 98%,

ххvii) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения ЭПК в ДПК под действием Δ5-элонгазы по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, от около 50 до около 99%, от около 85 до около 99%, от около 50 до около 95% или от около 85 до около 95%,

ххviii) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения олеиновой кислоты в ДПК по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25%, около 20, около 25, около 30%, от около 10 до около 50%, от около 10 до около 30%, от около 10 до около 25% или от около 20 до около 30%,

ххix) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения ЛК в ДПК по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 40%, около 25, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50%, от около 15 до около 50%, от около 20 до около 40% или от около 20 до около 30%,

ххx) состав жирных кислот липида основывается на эффективности превращения АЛК в ДПК по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 30%, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60%, от около 22 до около 70%, от около 17 до около 55%, от около 22 до около 40% или от около 24 до около 40%,

ххxi) общие жирные кислоты в экстрагированном липиде содержат менее чем 1,5% C20:1, менее чем 1% C20:1 или около 1% C20:1,

ххxii) содержание триацилглицерида (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90, по меньшей мере 95%, от около 70 до около 99% или от около 90 до около 99%,

ххxiii) липид содержит диацилглицерид (ДАГ), причем ДАГ предпочтительно содержит ДПК,

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

ххxv) по меньшей мере 70, по меньшей мере 72 или по меньшей мере 80% этерифицированной ДПК в форме ТАГ находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ,

ххxvi) наиболее распространенными ДПК-содержащими видами ТАГ в липиде являются ДПК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12), липид, содержащий три-ДПК ТАГ (ТАГ 66:18), и

ххxvii) уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет около 7, около 8, около 9, около 10, около 12, около 15, около 18, около 20, около 22, около 24, около 26, около 28, около 31%, от около 7 до около 31%, от около 7 до около 28%, от около 10 до 35%, от около 10 до около 30%, от около 10 до около 25%, от около 10 до около 22%, от около 14 до 35%, от около 16 до 35%, от около 16 до около 30%, от около 16 до около 25% или от около 16 до около 22%, причем уровень ДПК необязательно составляет менее чем 0,5% от общего содержания жирных кислот экстрагированного липида.

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

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

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

iii) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет от 1 до 30%,

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

v) уровень α-линоленовой кислоты (АЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет от 4 до 40%,

vi) уровень γ-линоленовой кислоты (ГЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет от 0,05 до 7%,

vii) уровень стеариновой кислоты (СДК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет от 0,05 до 10%,

viii) уровень эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет менее чем 6%,

ix) уровень эйкозатриеновой кислоты (ЭтРК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет менее чем 4%,

х) экстрагированный растительный липид содержит менее чем 0,1% $\omega 6$ -докозапентаеновой кислоты ($22:5\Delta^{4,7,10,13,16}$) в числе содержащихся в нем жирных кислот,

xi) уровень новых $\omega 6$ жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет менее чем 10%,

xii) соотношение общего содержания $\omega 6$ жирных кислот: общего содержания $\omega 3$ жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет от 1,0 до 3,0 или от 0,1 до 1,

xiii) соотношение новых $\omega 6$ жирных кислот: новых $\omega 3$ жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет от 1,0 до 3,0, от 0,02 до 0,1 или от 0,1 до 1,

xiv) состав жирных кислот экстрагированного растительного липида основывается на эффективности превращения олеиновой кислоты в ДПК по меньшей мере 10%,

xv) состав жирных кислот экстрагированного растительного липида основывается на эффективности превращения ЛК в ДПК по меньшей мере 15%,

xvi) состав жирных кислот экстрагированного растительного липида основывается на эффективности превращения АЛК в ДПК по меньшей мере 17%,

xvii) общие жирные кислоты в экстрагированном растительном липиде содержат менее чем 1,5% C20:1 и

xviii) содержание триацилглицеридов (ТАГ) экстрагированного растительного липида составляет по меньшей мере 70% и может характеризоваться одним или более из следующих признаков:

xix) экстрагированный растительный липид содержит диацилглицерид (ДАГ), который содержит ДПК,

xx) экстрагированный растительный липид содержит менее чем 10% свободных (неэтерифицированных) жирных кислот и/или фосфолипида или по существу не содержит их,

xxi) по меньшей мере 70% ДПК, этерифицированной в форме ТАГ, находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ,

xxii) наиболее распространенные ДПК-содержащие виды ТАГ в экстрагированном растительном липиде представляют собой ДПК/18:3/18:3 (ТАГ 58:12) и

xxiii) экстрагированный растительный липид содержит три-ДПК ТАГ (ТАГ 66:18).

В варианте реализации уровень эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет от 0,05 до 10%.

В дальнейшем варианте реализации уровень ДГК в общем содержании жирных кислот экстрагированного растительного липида составляет менее чем 2%, предпочтительно менее чем 1% или от 0,1 до 2%, более предпочтительно она не определяется. Предпочтительно растение или его часть, такая как семя, или микробная клетка не содержит полинуклеотида, кодирующего $\Delta 4$ -десатуразу, или не содержит полипептида $\Delta 4$ -десатуразы. В другом варианте реализации экстрагированный липид находится в форме масла, причем липид составляет по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98% или от около 95 до около 98 мас.% масла.

Предпочтительно экстрагированный липид представляет собой липид из масла семян вида *Brassica* или липид из масла семян *Camelina sativa*.

В предпочтительном варианте реализации первого аспекта изобретения выше липид или масло, предпочтительно масло семян, более предпочтительно масло семян вида *Brassica* или масло семян *Camelina sativa* обладает следующими признаками: в общем содержании жирных кислот липида или масла уровень ДПК составляет от около 7 до 30% или от 7 до 35%, уровень пальмитиновой кислоты составляет от около 2 до около 16%, уровень миристиновой кислоты составляет менее чем 1%, уровень олеиновой кислоты составляет от 1 до около 30%, уровень ЛК составляет от около 4 до около 35%, АЛК присутствует, уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 25%, соотношение общего содержания $\omega 6$ жирных кислот: общего содержания $\omega 3$ жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 0,05 до около 3,0, и содержание триацилглицеридов (ТАГ) липида составляет по меньшей мере около 70%, и необязательно липид по существу не содержит холестерина и/или липид содержит три-ДПК ТАГ (ТАГ 66:15). Более предпочтительно липид или масло, предпочтительно масло семян, дополнительно обладает одним или более или всеми из следующих признаков: по меньшей мере 70% ДПК этерифицировано в положении sn-1 или sn-3 триацилглицерида (ТАГ), АЛК присутствует на уровне от 4 до 40% от общего содержания жирных кислот, ГЛК присутствует и/или уровень ГЛК составляет менее чем 4% от общего содержания жирных кислот, уровень СДК составляет от 0,05 до около 10%, уровень ЭТК составляет менее чем около 4%, уровень ЭПК составляет от 0,05 до около 10%, уровень общих мононенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 35%, уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 20 до около 75%, соотношение новых $\omega 6$ жирных кислот: новых $\omega 3$ жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 0,03 до около 3,0, предпочтительно менее чем около 0,50, состав жирных кислот ли-

пида основывается на: эффективности превращения олеиновой кислоты в ЛК под действием $\Delta 12$ -десатуразы по меньшей мере около 60%, эффективности превращения СДК в ЭТК кислоту под действием $\Delta 6$ -элонгазы по меньшей мере около 60%, эффективности превращения ЭПК в ДПК под действием $\Delta 5$ -элонгазы от около 50 до около 95%, и эффективности превращения олеиновой кислоты в ДПК по меньшей мере около 10%. Наиболее предпочтительно по меньшей мере 81% ДПК этерифицировано в положении sn-1 или sn-3 триацилглицерида (ТАГ).

В другом предпочтительном варианте реализации описанного выше второго аспекта изобретения липид или масло, предпочтительно масло семян, более предпочтительно масло семян вида *Brassica* или масло семян *Camelina sativa*, содержащее ДПК, обладает следующими признаками: в общем содержании жирных кислот липида или масла уровень пальмитиновой кислоты составляет от около 2 до около 16%, уровень миристиновой кислоты составляет менее чем 1%, уровень олеиновой кислоты составляет от около 1 до около 30%, уровень ЛК составляет от около 4 до около 35%, АЛК присутствует, общий уровень насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 25%, соотношение общего содержания $\omega 6$ жирных кислот:общего содержания $\omega 3$ жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 0,05 до около 3,0, содержание триацилглицеридов (ТАГ) липида составляет по меньшей мере около 70%, и необязательно липид содержит три-ДПК ТАГ (ТАГ 66:15), причем по меньшей мере 35% ДПК, этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), этерифицировано в положении sn-2 ТАГ. Более предпочтительно липид или масло, предпочтительно масло семян, дополнительно обладает одним или более или всеми из следующих признаков: АЛК присутствует на уровне от 4 до 40% от общего содержания жирных кислот, ГЛК присутствует, и/или уровень ГЛК составляет менее чем 4% от общего содержания жирных кислот, уровень СДК составляет от 0,05 до около 10%, уровень ЭТК составляет менее чем около 4%, уровень ЭПК составляет от 0,05 до около 10%, уровень общих моновенесыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 35%, уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 20 до около 75%, соотношение новых $\omega 6$ жирных кислот: новых $\omega 3$ жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 0,03 до около 3,0, предпочтительно менее чем около 0,50, состав жирных кислот липида основан на эффективности превращения олеиновой кислоты в ЛК под действием $\Delta 12$ -десатуразы по меньшей мере около 60%, эффективности превращения СДК в кислоту ЭТК под действием $\Delta 6$ -элонгазы по меньшей мере около 60%, эффективности превращения ЭПК в ДПК под действием $\Delta 5$ -элонгазы от около 50 до около 95%, эффективности превращения олеиновой кислоты в ДПК по меньшей мере около 10%.

В контексте экстрагированного липида или масла по изобретению, в варианте реализации изобретения уровень ДПК в экстрагированном липиде или масле не повышен или является в существенной мере таким же, как уровень ДПК в липиде или масле части растения или микроба до экстракции. Другими словами, после экстракции не проводилось процедур для повышения уровня ДПК в липиде или масле относительно других жирных кислот. Как будет очевидно, липид или масло впоследствии могут быть обработаны фракционированием или другими методами, с целью модификации состава жирных кислот.

В другом предпочтительном варианте реализации липид или масло, предпочтительно масло семян и более предпочтительно масло семян *Brassica*, такое как горчичное масло или рапсовое масло или масло семян *C. sativa*, обладает следующими признаками: в общем содержании жирных кислот липида или масла уровень ДПК составляет от около 7 до 35%, уровень пальмитиновой кислоты составляет от около 2 до около 16%, уровень миристиновой кислоты составляет менее чем около 6% и предпочтительно менее чем 1%, уровень олеиновой кислоты составляет от около 1 до около 30%, уровень ЛК составляет от около 4 до около 35%, АЛК присутствует, уровень СДК составляет от около 0,05 до около 10%, уровень ЭТК составляет менее чем около 6%, уровень ЭПК составляет от около 0,05 до около 10%. ДГК определяется или предпочтительно не определяется в липиде или масле. Предпочтительно ДГК, если она присутствует, присутствует на уровне не более чем 2 или не более чем 0,5% от общего содержания жирных кислот липида или масла и более предпочтительно отсутствует в общем содержании жирных кислот липида или масла. Необязательно, липид по существу не содержит холестерина и/или липид содержит три-ДПК ТАГ (ТАГ 66:15). Более предпочтительно липид или масло, предпочтительно масло семян, дополнительно обладает одним или более или всеми из следующих признаков: по меньшей мере 70% ДПК этерифицировано в положении sn-1 или sn-3 триацилглицерида (ТАГ), АЛК присутствует на уровне от 4 до 40% от общего содержания жирных кислот, ГЛК присутствует и/или уровень ГЛК составляет менее чем 4% от общего содержания жирных кислот, уровень СДК составляет от 0,05 до около 10%, уровень ЭТК составляет менее чем около 4%, уровень ЭПК составляет от 0,05 до около 10%, уровень общих ненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 35%, уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 20 до около 75%, соотношение новых $\omega 6$ жирных кислот:новых $\omega 3$ жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 0,03 до около 3,0, предпочтительно менее чем около 0,50, состав жирных кислот липи-

да основывается на: эффективности превращения олеиновой кислоты в ЛК под действием $\Delta 12$ -десатуразы по меньшей мере около 60%, эффективности превращения СДК в ЭТК кислоту под действием $\Delta 6$ -элонгазы по меньшей мере около 60%, эффективности превращения ЭПК в ДПК под действием $\Delta 5$ -элонгазы от около 50 до около 95% и эффективности превращения олеиновой кислоты в ДПК по меньшей мере около 10%. В варианте реализации по меньшей мере 81% ДПК этерифицировано в положении sn-1 или sn-3 триацилглицерида (ТАГ). В качестве альтернативы по меньшей мере 35% ДПК, этерифицированной в форме ТАГ, этерифицировано в положении sn-2 ТАГ.

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

В другом варианте реализации экстрагированный липид находится в форме масла и содержит менее чем около 10, менее чем около 7 мг стеролов/г масла, от около 1,5 до около 10 мг стеролов/г масла или от около 1,5 до около 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, β -ситостерол/24-этилхолестерин, $\Delta 5$ -авенастерол/изофукостерол, $\Delta 7$ -стигмастерол/стигмаст-7-ен-3 β -ол и $\Delta 7$ -авенастерол.

В варианте реализации вид растения представляет собой один из перечисленных в табл. 11, например рапс, и уровень стеролов является около таким же, как приведенный в табл. 11 для данного конкретного вида растений. Виды растений могут представлять собой *B. napus*, горчицу (*B. juncea*) или *C. sativa* и содержат уровень стеролов около найденного в экстрагированном масле горчицы дикого типа *B. napus*, горчицы или *C. sativa* соответственно.

В варианте реализации экстрагированный растительный липид содержит один или более или все из кампэстера/24-метилхолестерина, $\Delta 5$ -стигмастера, эбурикола, β -ситостера/24-этилхолестерина, $\Delta 5$ -авенастера/изофукостера, $\Delta 7$ -стигмастера/стигмаст-7-ен-3 β -ола и $\Delta 7$ -авенастера, или содержит уровень стеролов, по существу такой же, как в масле рапса дикого типа.

В варианте реализации экстрагированный липид содержит уровень стеролов, по существу такой же, как в масле рапса, горчичном масле или масле *C. sativa* дикого типа.

В варианте реализации экстрагированный липид содержит менее чем около 0,5, менее чем около 0,25 мг холестерина/г масла, от около 0 до около 0,5 мг холестерина/г масла или от около 0 до около 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 или масло горчицы, 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 *Elaeagnus 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*. Более предпочтительно масло представляет собой масло вида *Brassica*, масло *Camelina sativa* или масло *Glycine max* (сои). В варианте реализации липид содержит или представляет собой масло вида *Brassica*, такое как масло *Brassica napus* или масло *Brassica juncea*, масло *Gossypium hirsutum*, масло *Linum usitatissimum*, масло вида *Helianthus*, масло *Carthamus tinctorius*, масло *Glycine max*, масло *Zea mays*, масло *Elaeagnus guineensis*, масло *Nicotiana benthamiana*, масло *Lupinus angustifolius*, масло *Camelina sativa*, масло *Crambe abyssinica*, масло *Miscanthus x giganteus* или масло *Miscanthus sinensis*. В дальнейшем варианте реализации масло представляет собой масло рапса, масло горчицы (*B. juncea*), масло сои (*Glycine max*), масло *Camelina sativa* или масло *Arabidopsis thaliana*. В альтернативном варианте реализации масло представляет собой масло растения, кроме масла *A. thaliana* и/или кроме масла *C. sativa*. В варианте реализации масло растения представляет собой масло, кроме масла *G. max* (сои). В варианте реализации масло было получено из растения, выращенного в стандартных условиях, например, как описано в примере 1, или из растения, выращенного в поле или в теплице в стандартных условиях.

В дальнейшем аспекте настоящего изобретения предлагается способ получения экстрагированного растительного липида или микробного липида, включающий стадии:

i) получение части растения, предпочтительно семени *Brassica* или семени *Camelina sativa*, или микробных клеток, содержащих липид, причем липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, и, при этом, жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, $\omega 6$ жирные кислоты, которые включают линолевую кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирные кислоты, которые включают α -линоленовую кислоту (АЛК) и докозапентаеновую кислоту (ДПК), и необязательно одну или более из стеарионовой кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), притом, что уровень ДПК в общем содержании жирных кислот липида из части растения или микробных клеток составляет от около 7 до 35%, и

ii) экстракцию липида из части растения или микробных клеток,

причем уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 7 до 35%. В варианте реализации изобретения уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 7 до 20% или от 20,1 до 35%. В варианте реализации изобретения уровень ДПК составляет от 7 до 20% или от 20,1 до 30%, предпочтительно от 20,1 до 35%, более предпочтительно от 30 до 35%. В варианте реализации изобретения уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 8 до 20% или от 10 до 20%, предпочтительно от 11 до 20% или от 12 до 20%.

В варианте реализации описанного выше аспекта изобретения предлагается способ получения экстрагированного растительного липида или микробного липида, включающий стадии:

i) получение части растения, предпочтительно семени *Brassica*, семени *C. sativa* или микробных клеток, содержащих липид, причем липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, и, при этом, состав жирных кислот липида включает олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, $\omega 6$ жирные кислоты, включающие линолевую кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирные кислоты, включающие α -линоленовую кислоту (АЛК) и докозапентаеновую кислоту (ДПК), и одну или больше из стеариновой кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), притом, что (i) уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 7 до 30% или от 7 до 35%, предпочтительно от 30 до 35%, (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 чем 6%, предпочтительно менее чем 1%, (iv) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 1 до 30%, (v) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 35%, (vi) уровень α -линоленовую кислоту (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) общий уровень насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 25%, (ix) соотношение общего содержания $\omega 6$ жирных кислот:общего содержания $\omega 3$ жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 0,05 и 1, (x) содержание триацилглицеридов (ТАГ) липида составляет по меньшей мере 70% и (xi) по меньшей мере 70% ДПК, этерифицированной в форме ТАГ, находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ, и

ii) экстракцию липида из части растения,

причем уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 7 до 30% или от 7 до 35%, предпочтительно от 30 до 35%. Предпочтительно по меньшей мере 81 или по меньшей мере 90% ДПК, этерифицированной в форме ТАГ, находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ.

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

i) получение содержащих липид клеток, предпочтительно части растения, содержащей клетки, или микробных клеток, более предпочтительно семени *Brassica* или семени *C. sativa*, причем липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме и при этом жирные кислоты включают докозапентаеновую кислоту (ДПК), притом, что по меньшей мере 35% ДПК, этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), этерифицировано в положении sn-2 ТАГ, и

ii) экстракцию липида из клеток,

причем по меньшей мере 35% ДПК, этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида, этерифицировано в положении sn-2 ТАГ. В варианте реализации экстрагированный липид, полученный по способу, дополнительно характеризуется одним или более или всеми из следующего: (i) он содержит жирные кислоты, включающие олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, $\omega 6$ жирные кислоты, включающие линолевую кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирные кислоты, включающие α -линоленовую кислоту (АЛК) и необязательно одну или более из стеариновой кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), (ii) по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 48%, от 35 до около 60% или от 35 до около 50%, ДПК, этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), этерифицировано в положении sn-2 ТАГ, и (iii) уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 1 до 35% или от около 7 до 35% или от около 20,1 до 35%. В вариантах реализации данного аспекта уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет около 7, около 8, около 9, около 10, около 12, около 15, около 18, около 20, около 22, около 24, около 26, около 28, около 30%, от около 7 до около 28%, от около 7 до около 25%, от около 10 до 35%, от около 10 до около 30%, от около 10 до около 25%, от около 10 до около 22%, от около 14 до 35%, от около 16 до 35%, от около 16 до около 30%, от около 16 до около 25% или от около 16 до около 22%. В предпочтительных вариантах реализации экстрагированный липид характеризуется (i) и (ii), (i) и (iii) или (ii) и (iii), более предпочтительно всеми из (i), (ii) и (iii). Предпочтительно экстрагированный липид до-

полнительно характеризуется уровнем пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида, который составляет от около 2 до 16%, причем уровень миристиновой кислоты (C14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида, если она присутствует, составляет менее чем 1%.

В варианте реализации упомянутого выше аспекта изобретения предлагается способ получения экстрагированного липида, включающий стадии:

i) получение содержащих липид клеток, предпочтительно части растения, содержащей клетки, или микробных клеток, более предпочтительно семени *Brassica* или семени *C. sativa*, причем липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, и, при этом, жирные кислоты включают докозапентаеновую кислоту (ДПК) и дополнительно включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, $\omega 6$ жирные кислоты, включающие линолевую кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирные кислоты, включающие α -линоленовую кислоту (АЛК), и одну или более из стеариновой кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), причем (i) уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 2 до 16%, (ii) уровень миристиновой кислоты (C14:0) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 1%, (iii) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 1 до 30%, (iv) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 35%, (v) уровень α -линоленовой кислоты (АЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 40%, (vi) уровень эйкозатриеновой кислоты (ЭТРК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее 4%; (vii) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 25%, (viii) соотношение общих $\omega 6$ жирных кислот:общих $\omega 3$ жирных кислот в содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 0,05 до около 1%, (ix) содержание триацилглицерида (ТАГ) в липиде составляет по меньшей мере около 70%, и (x) по меньшей мере 35% ДПК, этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), этерифицировано в положении sn-2 ТАГ, и

ii) экстракцию липида из части растения,

причем по меньшей мере 35% ДПК, этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида, этерифицировано в положении sn-2 ТАГ.

Стадия получения части растения или микробных клеток может включать сбор урожая частей растения, предпочтительно семени, с растений, которые образуют части растения, выделение микробных клеток из культур таких клеток или получение частей растения или микробных клеток путем приобретения у производителя или поставщика, или посредством импорта. Способ может включать стадию определения состава жирных кислот липида в образце частей растения или микробных клеток или экстрагированного липида.

В предпочтительном варианте реализации экстрагированный липид, полученный способом по изобретению, обладает, если это уместно, одним или более признаков, определенных в данном описании, например как определено выше для первых двух аспектов.

Варианты реализации раскрытых выше аспектов изобретения описаны более подробно ниже. Квалифицированному специалисту будет понятно, что никакие из признаков, описанных в вариантах реализации изобретения, которые являются шире, чем соответствующий признак в упомянутом выше аспекте, не применяются к этому аспекту.

В варианте реализации часть растения является семенем, предпочтительно семенем 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*, *Elaeagnus guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa* или *Crambe abyssinica*, предпочтительно семя вида *Brassica*, семя *C. sativa* или семя *G. max* (сои), более предпочтительно семя *Brassica napus*, *B. juncea* или *C. sativa*. В варианте реализации часть растения является семенем, предпочтительно масличной культуры, такой как вид *Brassica*, такой как *Brassica napus* или *Brassica juncea*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, вид *Helianthus*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Elaeagnus guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Lupinus angustifolius*, *Camelina sativa* или *Crambe abyssinica*, предпочтительно семенем *Brassica napus*, *B. juncea* или *C. sativa*. В варианте реализации семя представляет собой семя рапса, семя горчицы, семя сои, семя *Camelina sativa* или семя *Arabidopsis thaliana*. В альтернативном варианте реализации семя представляет собой семя кроме семени *A. thaliana* и/или кроме *C. sativa*. В варианте реализации семя представляет собой семя, кроме семени сои. В варианте реализации часть растения представляет собой семя вида *Brassica*. Часть растения предпочтительно представляет собой семя вида *Brassica* или семя *Camelina sativa*. В варианте реализации семя было получено от растения, выращенного в стандартных условиях, например, как описано в примере 1, или от растения, выращенного в поле или в теплице в стандартных условиях.

В другом варианте реализации семя содержит по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 26 мг, от около 18 до около 100 мг, от около 22 до около 70 мг, около 80 мг,

от около 30 до около 80 мг или от около 24 до около 50 мг ДПК на 1 г семени.

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

- i) ω 3-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- ii) Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- iii) Δ 12-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- iv) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза и/или Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- v) ω 3-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- vi) Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- vii) Δ 12-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- viii) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза и/или Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,

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

В дальнейшем варианте реализации часть растения, такая как семя, или рекомбинантные клетки, такие как микробные клетки, содержат экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов;

- i) ω 3-десатураза и/или Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- ii) Δ 12-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- iii) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза и/или Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- iv) ω 3-десатураза и/или Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- v) Δ 12-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- vi) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза и/или Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,

причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторами, способными управлять экспрессией указанных полинуклеотидов в клетке части растения или клетках.

В варианте реализации если часть растения или клетка содержит липид, который содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, причем жирные кислоты содержат докозапентаеновую кислоту (ДПК) и/или докозагексаеновую кислоту (ДГК), причем по меньшей мере 35% ДПК и/или ДГК (если она присутствует), этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), этерифицировано в положении sn-2 ТАГ, то часть растения, такая как семя, или рекомбинантные клетки, такие как микробные клетки, содержат экзогенный полинуклеотид, кодирующий 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), и, при этом, полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторами, которые способны управлять экспрессией полинуклеотйда в клетке части растения или клетках. В дальнейшем варианте реализации клетка содержит экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

- i) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), ω 3-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- ii) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- iii) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- iv) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 2-десатураза, ω 3-десатураза и/или Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- v) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), ω 3-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- vi) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- vii) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза, Δ 5-элонгаза и необязательно Δ 4-десатураза,
- viii) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза и/или Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,

причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторами, способными управлять экспрессией указанных полинуклеотидов в клетке. Предпочтительно ЛФААТ может использовать полиненасыщенный С22 жирный ацил-КоА субстрат, такой как ДПК-КоА.

Предпочтительно растение или его часть, такая как семя, или микробная клетка не содержит полинуклеотида, кодирующего Δ 4-десатуразу, или не содержит полипептида Δ 4-десатуразы.

В варианте реализации $\Delta 12$ -десатураза дополнительно обладает $\omega 3$ -десатуразной и/или $\Delta 15$ -десатуразной активностью, т.е. виды активности обеспечиваются единым полипептидом. В качестве альтернативы, $\Delta 12$ -десатураза не обладает $\omega 3$ -десатуразной активностью и не обладает $\Delta 15$ -десатуразной активностью, т.е. $\Delta 12$ -десатураза представляет собой отдельный полипептид от полипептида, обладающего $\omega 3$ -десатуразной и/или $\Delta 15$ -десатуразной активностью.

Еще в одном варианте реализации часть растения, такая как семя, или рекомбинантные клетки, такие как микробные клетки, обладает одним или более или всеми из следующих признаков:

i) $\Delta 12$ -десатураза превращает олеиновую кислоту в линолевую кислоту в одной или более клеток части растения или в рекомбинантных клетках с эффективностью по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80%, от около 60 до около 95%, от около 70 до около 90% или от около 75 до около 85%,

ii) $\omega 3$ -десатураза превращает $\omega 6$ жирные кислоты в $\omega 3$ жирные кислоты в одной или более клеток части растения или в рекомбинантных клетках с эффективностью по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 85%, от около 65 до около 95%, от около 75 до около 91% или от около 80 до около 91%,

iii) $\Delta 6$ -десатураза превращает АЛК в СДК в одной или более клеток части растения или в рекомбинантных клетках с эффективностью по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70%, от около 30 до около 70%, от около 35 до около 60% или от около 50 до около 70%,

iv) $\Delta 6$ -десатураза превращает линолевую кислоту в γ -линоленовую кислоту в одной или более клеток части растения или в рекомбинантных клетках с эффективностью менее чем около 5, менее чем около 2,5, менее чем около 1%, от около 0,1 до около 5%, от около 0,5 до около 2,5% или от около 0,5 до около 1%,

v) $\Delta 6$ -элонгаза превращает СДК в ЭТК в одной или более клеток части растения или в рекомбинантных клетках с эффективностью по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75%, от около 60 до около 95%, от около 70 до около 80% или от около 75 до около 80%,

vi) $\Delta 5$ -десатураза превращает ЭТК в ЭПК в одной или более клеток части растения или в рекомбинантных клетках с эффективностью по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90%, от около 60 до около 95%, от около 70 до около 95% или от около 75 до около 95%,

vii) $\Delta 5$ -элонгаза превращает ЭПК в ДПК в одной или более клеток части растения или в рекомбинантных клетках с эффективностью по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90%, от около 50 до около 90% или от около 85 до около 95%,

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

x) эффективность превращения ЛК в ДПК в одной или более клеток части растения или в рекомбинантных клетках составляет по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30%, около 25, около 30, около 35%, от около 15 до около 50%, от около 20 до около 40% или от около 20 до около 30%,

xi) эффективность превращения АЛК в ДПК в одной или более клеток части растения или в рекомбинантных клетках составляет по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 30%, около 30, около 35, около 40%, от около 17 до около 55%, от около 22 до около 35% или от около 24 до около 35%,

xii) одна или более клеток части растения или рекомбинантных клеток содержат по меньшей мере около на 25, по меньшей мере около на 30%, от около 25 до около 40% или от около 27,5 до около 37,5% больше жирных кислот $\omega 3$, чем соответствующие клетки без экзогенных полинуклеотидов,

xiii) $\Delta 6$ -десатураза предпочтительно уменьшает степень насыщенности α -линоленовую кислоту (АЛК) относительно линолевой кислоты (ЛК),

xiii) $\Delta 6$ -элонгаза дополнительно обладает активностью $\Delta 9$ -элонгазы,

xiv) $\Delta 12$ -десатураза дополнительно обладает активностью $\Delta 15$ -десатуразы,

xv) $\Delta 6$ -десатураза дополнительно обладает активностью $\Delta 8$ -десатуразы,

xvi) $\Delta 8$ -десатураза дополнительно обладает активностью $\Delta 6$ -десатуразы или не обладает активностью $\Delta 6$ -десатуразы,

xvii) $\Delta 15$ -десатураза дополнительно обладает активностью $\omega 3$ -десатуразы в отношении ГЛК,

xviii) $\omega 3$ -десатураза дополнительно обладает активностью $\Delta 15$ -десатуразы в отношении ЛК,

xix) $\omega 3$ -десатураза уменьшает степень насыщенности ЛК и/или ГЛК,

xx) $\omega 3$ -десатураза предпочтительно уменьшает степень насыщенности ГЛК относительно ЛК,

xxi) одна или более или все десатуразы, предпочтительно $\Delta 6$ -десатураза и/или $\Delta 5$ -десатураза, обла-

дают более высокой активностью на субстрате ацил-КоА, чем на соответствующем субстрате ацил-фосфатидилхолина (ацил-ФХ),

xxii) $\Delta 6$ -десатураза обладает более высокой $\Delta 6$ -десатуразной активностью в отношении АЛК, чем ЛК как жирнокислотного субстрата,

xxiii) $\Delta 6$ -десатураза обладает более высокой $\Delta 6$ -десатуразной активностью в отношении АЛК-КоА как жирнокислотного субстрата, чем в отношении АЛК, присоединенной к положению sn-2 ФХ, как жирнокислотного субстрата,

xxiv) $\Delta 6$ -десатураза обладает по меньшей мере в 2 раза более высокой $\Delta 6$ -десатуразной 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 как субстрата, по сравнению с ЛК,

xxv) $\Delta 6$ -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,

xxvi) $\Delta 6$ -десатураза обладает по меньшей мере 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 к положению sn-2 ФХ, как жирнокислотного субстрата,

xxvii) десатураза представляет собой фронт-энд десатуразу,

xxviii) $\Delta 6$ -десатураза не обладает обнаружимой активностью $\Delta 5$ -десатуразы в отношении ЭТК.

Еще в одном варианте реализации часть растения, такая как семя, предпочтительно семя *Brassica* или семя *C. sativa*, или рекомбинантная клетка, такая как микробные клетки, обладает одним или более из следующих признаков:

i) $\Delta 12$ -десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4, ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 4,

ii) $\omega 3$ -десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6, ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 6,

iii) $\Delta 6$ -десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9, ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 9,

iv) $\Delta 6$ -элонгаза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 16, ее биологически активный фрагмент, такой как SEQ ID NO: 17, или последовательность аминокислот по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 16 и/или SEQ ID NO: 17,

v) $\Delta 5$ -десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 20, ее биологически активный фрагмент или последовательность аминокислот по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 20, и

vi) $\Delta 5$ -элонгаза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 25, ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 25.

В варианте реализации часть растения, такая как семя, или рекомбинантные клетки, такие как микробные клетки, дополнительно содержит(ат) экзогенный полинуклеотид, кодирующий диацилглицеридацилтрансферазу (ДГАТ), моноацилглицеридацилтрансферазу (МГАТ), глицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ГФАТ), 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФКАТ), предпочтительно ЛФКАТ, которая может использовать полиненасыщенный жирный ацил-КоА субстрат C22, такой как ДПК-КоА. ацил-КоА:лизофосфатидилхолинацилтрансферазу (ЛФХАТ), фосфолипазу A₂ (РЛК₂), фосфолипазу С (PLC), фосфолипазу D (PLD), СДП-холин диацилглицеридхолин фосфотрансферазу (ХФТ), фосфатидилхолин диацилглицерид ацилтрансферазу (ФДАТ), фосфатидилхолин: диацилглицерид холин фосфотрансферазу (ФДХТ), ацил-КоА синтазу (АКС) или комбинацию двух или более из указанных ферментов.

В другом варианте реализации часть растения, такая как семя, или рекомбинантные клетки, такие как микробные клетки, дополнительно содержит(ат) 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, РЛК₂, PLC, PLD, ХФТ, ФДАТ, тиоэстеразы, например FАТВ или $\Delta 12$ -десатуразы, или комбинации двух или более из указанных ферментов.

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

В другом варианте реализации промотор(ы), направляющий(ие) экспрессию экзогенных полинуклеотидов, которые кодируют $\Delta 5$ -элонгазу, инициирует экспрессию полинуклеотидов в развивающемся семени растения или рекомбинантных клетках, таких как микробные клетки, 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 или рекомбинантных клеток, таких как микробные клетки, причем количество таких молекул ДНК, интегрированных в геном клеток части растения или рекомбинантных клеток, предпочтительно составляет не более одной, двух или трех, или составляет две или три.

Еще в одном варианте реализации часть растения 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 около 40 или по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70%, от около 50 до около 80% или от около 80 до около 100% от общего содержания масла в соответствующей части растения, в которой отсутствуют экзогенные полинуклеотиды. В дальнейшем варианте реализации масса семени, содержащего экзогенные полинуклеотиды, составляет по меньшей мере около 40, меньшей мере около 50, меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70%, от около 50 до около 80% или от около 80 до 100% от массы соответствующего семени, не содержащего экзогенных полинуклеотидов.

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

В дальнейшем варианте реализации способ дополнительно включает обработку липида с целью повышения уровня ДПК как процента от общего содержания жирных кислот. Например, обработка включает гидролиз этерифицированных жирных кислот с образованием свободных жирных кислот или 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 ДПК. В вариантах реализации состав жирных кислот липида после такой обработки включает по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80 или по меньшей мере 90% ДПК. В варианте реализации изобретения уровень ДПК в общем содержании жирных кислот липида после обработки составляет менее чем 2,0 или менее чем 0,5%, предпочтительно она не определяется в липиде.

Кроме того, предлагается липид или масло, содержащее липид, такой как свободные жирные кислоты или алкиловые эфиры, полученные с применением способа по изобретению.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ получения метиловых или этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот, включающий введение триацилглицеридов в реакцию с метанолом или этанолом, в экстрагированном растительном липиде или в ходе процесса экстракции соответственно, причем экстрагированный растительный липид содержит этерифицированные жирные кислоты в форме ТАГ, и, при этом, жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, $\omega 6$ жирные кислоты, включающие линолевую кислоту (ЛК), $\omega 3$ жирные кислоты, включающие α -линоленовую кислоту (АЛК), и докозапентаеновую кислоту (ДПК), и необязательно одну или более из стеариноновой кислоты (СДК), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), докозапентаеновой кислоты (ДПК) и эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК), притом, что уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 7 до 35%, предпочтительно от 20,1 до 30% или от 20,1 до 35%, с получением таким образом метила или этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ получения метиловых или этиловых эфиров докозапентаеновой кислоты (ДПК), включающий введение триацилглицеридов (ТАГ) в реакцию с метанолом или этанолом, в экстрагированном растительном липиде или в ходе процесса экстракции соответственно, причем экстрагированный растительный липид содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, и, при этом, жирные кислоты включают докозапентаеновую кислоту (ДПК), причем по меньшей мере 35% ДПК, этерифицированной в форме ТАГ, этерифицировано в положении sn-2 ТАГ, с получением таким образом метиловых или этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот.

В предпочтительном варианте реализации липид, который используется в способе согласно описанному выше двум аспектам, обладает одним или более признаков, определенных в данном описании в контексте экстрагированного липида или масла по изобретению.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается масличное растение или его часть, такая как семя, предпочтительно растение *Brassica* или растение *C. sativa*, содержащее липид в семени, или микробная клетка, содержащая:

а) липид, содержащий жирные кислоты в этерифицированной форме и

б) экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

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

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

iii) $\omega 3$ -десатураза и/или $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза или

iv) $\omega 3$ -десатураза и/или $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 9$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более специфических для семени промоторов, способных управлять экспрессией указанных полинуклеотидов в развивающемся семени растения, или с одним или более промоторов, способных направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в микробной клетке, и, при этом, жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, $\omega 6$ жирные кислоты, включающие линолевую кислоту (ЛК) и необязательно γ -линоленовую кислоту (ГЛК), $\omega 3$ жирные кислоты, включающие α -линоленовую кислоту (АЛК), стеарионовую кислоту (СДК), и докозапентаеновую кислоту (ДПК) и необязательно эйкозапентаеновую кислоту (ЭПК) и/или эйкозатетраеновую кислоту (ЭТК), притом, что уровень ДПК в общем содержании жирных кислот липида семени или микробной клетки составляет от 7 до 35%. В предпочтительном варианте реализации данного аспекта ДГК присутствует на уровне менее чем 2 или менее чем 0,5% от общего содержания жирных кислот липида семени и экстрагированного липида и более предпочтительно не определяется в общем содержании жирных кислот липидов.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается клетка, предпочтительно клетка в или из растения, такого как растение масличной культуры, или его части, такой как семя, или растение масличной культуры или его часть, предпочтительно растение *Brassica* или растение *C. sativa*, или микробная клетка, содержащие:

а) жирные кислоты в этерифицированной форме, причем жирные кислоты включают докозапентаеновую кислоту (ДПК) и при этом по меньшей мере 35% ДПК, этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), этерифицировано в положении sn-2 ТАГ, и

б) экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

i) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), $\omega 3$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

ii) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

iii) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), $\Delta 12$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

iv) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), $\Delta 12$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза и/или $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

v) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), $\omega 3$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 9$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

vi) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 9$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

vii) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), $\Delta 12$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 9$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

viii) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза (ЛФААТ), $\Delta 12$ -десатураза, $\omega 3$ -десатураза и/или $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 9$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторами, способными управлять экспрессией указанных полинуклеотидов в клетке. Предпочтительно ЛФААТ может использовать полиненасыщенный жирный ацил-КоА субстрат C22, такой как ДПК-КоА, и уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 1 до 35% или от около 7 до 35% или от около 20,1 до 35%. В вариантах реализации по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 48%, от 35 до около 60% или от 35 до около 50% ДПК и/или ДГК, этерифицированной в форме триацилглицерида (ТАГ), этерифицировано в положении sn-2 ТАГ.

В предпочтительных вариантах реализации каждого из упомянутых выше двух аспектов изобретения $\Delta 15$ -десатураза представляет собой грибковую $\Delta 15$ -десатуразу, и $\omega 3$ -десатураза представляет собой грибковую $\omega 3$ -десатуразу.

В предпочтительном варианте реализации растение масличной культуры, микробная клетка или клетка по изобретению обладает, если это уместно, одним или более признаков, определенных в данном описании, например, как определено выше для экстрагированного растительного липида, экстрагированного микробного липида или способа их получения.

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*, *Elaeisis guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa* или *Crambe abyssinica*. В варианте реализации растение масличной культуры представляет собой растение вида *Brassica*, растение *C. sativa* или растение *G. max* (соя). В варианте реализации масличное растение представляет собой растение рапса, *B. juncea*, *Glycine max*, *Camelina sativa* или *Arabidopsis thaliana*. В альтернативном варианте реализации растение масличной культуры представляет собой растение, кроме *A. thaliana* и/или кроме *C. sativa*. В варианте реализации растение масличной культуры представляет собой растение, кроме *G. max* (соя). Предпочтительно растение представляет собой растение вида *Brassica* или *Camelina sativa*. В варианте реализации растение масличной культуры находится в поле или было выращено в поле или было выращено в теплице в стандартных условиях, например, как описано в примере 1.

В варианте реализации одна или более десатураз, применяемых в способе по изобретению или присутствующих в клетке или растении или его части по изобретению, способны использовать субстрат ацил-КоА. В предпочтительном варианте реализации одна или более из $\Delta 6$ -десатуразы, $\Delta 5$ -десатуразы и $\Delta 8$ -десатуразы, если они присутствуют, способны использовать субстрат ацил-КоА, предпочтительно каждая из i) $\Delta 6$ -десатуразы и $\Delta 5$ -десатуразы или ii) $\Delta 5$ -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 для $\Delta 6$ -десатуразы, ЭТК-КоА для $\Delta 5$ -десатуразы, ЭТрК-КоА для $\Delta 8$ -десатуразы, олеил-КоА для $\Delta 8$ -десатуразы или один или более из ЛК-КоА, ГЛК-КоА и АРК-КоА для $\omega 3$ -десатуразы.

В варианте реализации зрелое, собранное в процессе сбора урожая семя растения содержит ДПК 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, около 80 мг на 1 г семени или от около 30 до около 80 мг на 1 г семени.

В дальнейшем аспекте настоящего изобретения раскрывается растение *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa*, которое способно давать семя, содержащее ДПК, причем собранное в процессе сбора урожая, зрелое семя растения содержит ДПК 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, около 80 мг на 1 г семени или от около 30 до около 80 мг на 1 г семени.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается клетка растения по изобретению, содержащая экзогенные полинуклеотиды, раскрытые в данном описании.

Также раскрыта часть растения, предпочтительно семя, или рекомбинантные клетки, такие как микробные клетки, которые обладают одним или более из следующих признаков:

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

Еще в одном аспекте настоящего изобретения раскрывается зрелое, собранное в процессе сбора урожая семя *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa*, содержащее ДПК, с содержанием влаги от около 4 до около 15 мас.%, предпочтительно от около 6 до около 8 мас.% или от около 4 до около 8 мас.%, более предпочтительно от около 4 до около 6 мас.%, причем содержание ДПК 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, около 80 мг на 1 г семени или от около 30 до около 80 мг на 1 г семени.

В варианте реализации клетка 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 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 растения или клетки по изобретению, которые могут применяться для получения экстрагированного липида по изобретению, причем способ включает:

а) анализ уровня ДПК в липиде, продуцированном одной или более частями растения, такими как семена, или рекомбинантными клетками, такими как микробные клетки, от нескольких растений или рекомбинантных клеток, таких как микробные клетки, причем каждое растение или рекомбинантная клетка, такая как микробная клетка, содержит один или более экзогенных полинуклеотидов, кодирующих один из следующих наборов ферментов;

- i) $\omega 3$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,
- ii) $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,
- iii) $\Delta 12$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -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, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

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

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

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

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

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

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

xi) $\Delta 12$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза, причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторами, способными управлять экспрессией указанных полинуклеотидов в клетке части растения или рекомбинантной клетке, и

б) идентификацию из множества растений или рекомбинантных клеток растения или рекомбинантной клетки, которые могут применяться для получения экстрагированного растительного липида или клеточного липида по изобретению в одной или более их частей, и

в) необязательно, получение потомства растений или рекомбинантных клеток от идентифицированного растения или рекомбинантной клетки, или их семени.

В варианте реализации растение или рекомбинантная клетка дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий ЛФААТ, как определено в данном описании.

Предпочтительно растение-потомок принадлежит, по меньшей мере, по второму или третьему поколению относительно идентифицированного растения и предпочтительно является гомозиготным по одному или более полинуклеотидам. Более предпочтительно один или более полинуклеотидов присутствуют в растении-потомке только в одном инсерционном локусе. Таким образом, в изобретении предлагается способ, который может применяться в качестве способа скрининга для идентификации растения или его семени из множества трансформированных растений или семян кандидатов, причем идентифицированное растение или его растение-потомок вырабатывает липид по изобретению, предпочтительно в семени. Такое растение или растение-потомок или его семя отбирают, если оно вырабатывает липид по изобретению, в частности, с указанным уровнем ДПК, или не отбирают, если оно не вырабатывает липида по изобретению.

В варианте реализации экзогенные полинуклеотиды, которые присутствуют в клетке, такой как микробная клетка, или растении или его части, как определено в данном описании, становятся стабильно интегрированными в геном клетки, растения или части растения, такой как семя. Предпочтительно экзогенный(е) полинуклеотид(ы) становится стабильно интегрированным в геном клетки, растения или части растения, такой как семя, в одном локусе в геноме, и предпочтительно является гомозиготными для вставки. Более предпочтительно растение, часть растения или семя дополнительно характеризуется тем, что в нем отсутствуют экзогенные полинуклеотиды, кроме одной или более молекул Т-ДНК.

Таким образом, никакие экзогенные векторные последовательности не интегрированы в геном, кроме последовательностей Т-ДНК.

В варианте реализации, перед стадией а) способ включает введение одного или более экзогенных полинуклеотидов в одну или более клеток растения.

Дополнительно предлагается растение, полученное с применением способа по изобретению, и семена такого растения.

В варианте реализации растение по изобретению обладает как мужской, так и женской фертильностью, предпочтительно с уровнями как мужской, так и женской фертильности, которые составляют по меньшей мере 70% относительно соответствующего растения дикого типа, или предпочтительно являются такими же. В варианте реализации пыльца, вырабатываемая растением по изобретению или растением, полученным из семени по изобретению, является на 90-100% жизнеспособной по данным окрашивания красителем для определения жизнеспособности. Например, жизнеспособность пыльцы можно оценить, как описано в примере 1.

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

а) выращивание растения по изобретению или растения, которое образует часть по изобретению, предпочтительно в поле как часть популяции размером по меньшей мере 1000 или 2000 или 3000 таких растений или на площади по меньшей мере 1, или 2, или 3 га со стандартной плотностью насаждения, или, в качестве альтернативы, в теплице со стандартными условиями,

б) сбор урожая семени с растения или растений и

в) необязательно, экстракцию липида из семени предпочтительно с получением масла с общим выходом ДПК по меньшей мере 60, или 70, или 80 кг ДПК на 1 га.

В варианте реализации растение, клетка растения, часть растения или семя или рекомбинантная клетка по изобретению обладает одним или более из следующих признаков:

i) масло является таким, как раскрыто в настоящем документе, или

ii) часть растения или семя или рекомбинантная клетка могут применяться в способе по изобрете-

нию.

Например, семя может применяться для получения растения по изобретению. Растение может быть выращено в поле или в теплице со стандартными условиями, например, как описано в примере 1.

В дальнейшем аспекте настоящего изобретения раскрывается липид или масло, продуцированные или полученные с применением способа по изобретению, из клетки по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения вида *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *G. max* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению или растения, клетки растения, части растения или семени по изобретению. Предпочтительно липид или масло очищают для удаления загрязняющих веществ, таких как нуклеиновая кислота (ДНК и/или РНК), белок и/или углевод, или пигментов, таких как хлорофилл. Кроме того, липид или масло могут быть очищены с целью увеличения содержания ТАГ, например, путем удаления свободных жирных кислот (СЖК) или фосфолипида.

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 (*Helianthus annuus*), 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 кешью (*Anacardium occidentale*), масло макадамии (*Macadamia intergrifolia*), миндальное масло (*Prunus amygdalus*) или масло семени *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*).

В варианте реализации клетка (рекомбинантная клетка) по изобретению или применяемая согласно изобретению представляет собой микробную клетку, такую как клетка, подходящая для ферментации, предпочтительно маслянистая микробная клетка, способная аккумулировать триацилглицериды до уровня по меньшей мере 25% в пересчете на массу. Предпочтительными процессами ферментации являются анаэробные процессы ферментации, как хорошо известные из уровня техники. Подходящие ферментирующие клетки, обычно микроорганизмы, способны ферментировать, т.е. превращать сахара, такие как глюкоза или мальтоза, прямо или косвенно, в желательные жирные кислоты. Примеры ферментирующих микроорганизмов включают грибковые организмы, такие как дрожжи. В данном описании "дрожжи" включают виды *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlbergensis*, виды *Candida*, виды *Kluveromyces*, виды *Pichia*, виды *Hansenula*, виды *Trichoderma*, *Lipomyces starkey* и предпочтительно *Yarrowia lipolytica*.

В дальнейшем аспекте настоящего изобретения раскрывается жирная кислота, продуцированная или полученная с применением способа по изобретению из клетки по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения вида *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *G. max* 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 ДПК. Жирная кислота может находиться в смеси жирных кислот, состав жирных кислот в которой является таким, как описано в настоящем документе, или смесь может быть обогащена таким образом, чтобы жирная кислота, предпочтительно ДПК, составляла по меньшей мере 40 или по меньшей мере 90% от содержания жирных кислот в смеси. В варианте реализации жирная кислота является неэтерифицированной. В качестве альтернативы, жирная кислота этерифицирована с применением, например, метильной, этильной, пропильной или бутильной групп.

Дополнительно раскрывается жмых, полученный из семени по изобретению или полученный из растения по изобретению. Предпочтительный жмых включает, но не ограничиваясь этим, жмых *Brassica napus*, *B. juncea*, *Camelina sativa* или *Glycine max*. В варианте реализации жмых содержит экзогенный(е) полинуклеотид(ы) и/или генетические конструкции, как раскрыто в настоящем документе. В предпочтительном варианте реализации в жмыхе остается часть липида или масла, выработанного в семени, из которого получен жмых, но на низком уровне (например, менее чем 2 мас.%) после экстракции большей части липида или масла. Жмых может применяться в качестве корма для животных или в качестве ингредиента в производстве пищевых продуктов.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается композиция, содержащая одно или более из липида или масла по изобретению, жирной кислоты по изобретению, клетки по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения вида *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Glycine max* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, 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.

Кроме того, раскрыты продукты питания (корма), косметика или химические вещества, содержащие одно или более из липида или масла по изобретению, жирной кислоты по изобретению, клетки по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения вида *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Glycine max* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению, жмыха по изобретению или композиции по изобретению. Предпочтительным продуктом пи-

тания является детская смесь, содержащая липид или масло по изобретению.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ получения продукта питания, предпочтительно детской смеси, включающий смешивание одного или более из липида или масла по изобретению, жирной кислоты по изобретению, клетки по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения вида *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Glycine max* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению, жмыха по изобретению или композиции по изобретению по меньшей мере с еще одним питательным ингредиентом. Способ может включать стадии смешивания, термической обработки, выпечки, экструдирования, эмульгации или другой обработки продукта питания или упаковка продукта питания или анализа содержания липида или масла в продукте питания.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрывается способ лечения или предупреждения состояния, при котором ПНЖК, предпочтительно ДПК, оказывают благоприятное воздействие, причем указанный способ включает введение субъекту одного или более из липида или масла по изобретению, жирной кислоты по изобретению, клетки по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения вида *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Glycine max* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, семени по изобретению, жмыха по изобретению, композиции по изобретению или корма по изобретению. В предпочтительном варианте реализации ПНЖК вводят в форме фармацевтической композиции, содержащей этиловый эфир ПНЖК. Субъект может быть человеком или животным.

Примеры состояний, при которых ПНЖК оказывают благоприятное воздействие, включают, без ограничения, повышенные уровни триглицеридов в сыворотке, повышенные уровни холестерина в сыворотке, например повышенные уровни ЛПНП холестерина, 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, адренолейкодистрофию, 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 кислоты по изобретению, клетки по изобретению, растения масличной культуры по изобретению, растения вида *Brassica*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Glycine max* или *Camelina sativa* по изобретению, части растения по изобретению, 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, предпочтительно ДПК, 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 ДПК. 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 ДПК. В предпочтительном варианте реализации лекарственное средство содержит этиловые эфиры ДПК. В еще более предпочтительном варианте реализации уровень этиловых эфиров ДПК в лекарственном средстве составляет от 30 до 50%. Лекарственное средство может дополнительно содержать этиловые эфиры ЭПК, например, от 30 до 50% или по меньшей мере 90% 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) молотью 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 такие уровни жира, как раскрыто в таблицах в разделе "Примеров".

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 ДПК.

Фиг. 2 - карта участка вставки Т-ДНК от левой до правой границ рJP3416-GA7. ПГ обозначает правую границу; ЛГ, левая граница; ТЕР, участок терминатора транскрипции/полиаденилирования; ПРО, промотор; кодирующие участки показаны над стрелками, промоторы и терминаторы - под стрелками. Micru-Δ6D, Δ6-десатураза *Micromonas pusilla*; Pyrgco-Δ6E, Δ6-элонгаза *Pyramimonas cordata*; Pavsa-Δ5D, Δ5-десатураза *Pavlova salina*; Picpa-ω3D, ω3-десатураза *Pichia pastoris*; Pavsa-Δ4D, Δ4-десатураза *P. salina*; Lack1-Δ12D, Δ12-десатураза *Lachancea kluyveri*; Pyrgco-Δ5E, Δ5-элонгаза *Pyramimonas cordata*. НОС обозначает участок терминатора транскрипции/полиаденилирования нопалинсинтетазы *Agrobacterium tumefaciens*; FP1, укороченный промотор напина *Brassica napus*; FAE1, промотор *Arabidopsis thaliana* FAE1; Лектин, 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(A) - основная структура фитостерина с кольцом и нумерацией боковой цепи; (B) - химические структуры некоторых фитостеринов.

Фиг. 4 - карта участка вставки Т-ДНК между левой и правой границами рJP3662. ПГ обозначает правую границу; ЛГ, левая граница; ТЕР, участок терминатора транскрипции/полиаденилирования, ПРО, промотор; кодирующие участки указаны над стрелками, промоторы и терминаторы - под стрелками. Micru-Δ6D, *Micromonas pusilla* Δ6-десатураза; Pyrgco-Δ6E, *Pyramimonas cordata* Δ6-элонгаза; Pavsa-Δ5D, *Pavlova salina* Δ5-десатураза; Picpa-ω3D, *Pichia pastoris* ω3-десатураза; Lack1-Δ12D, *Lachancea kluyveri* Δ12-десатураза; Pyrgco-Δ5E, *Pyramimonas cordata* Δ5-элонгаза. НОС обозначает участок терминатора транскрипции/полиаденилирования нопалинсинтетазы *Agrobacterium tumefaciens*; FP1, укороченный промотор напина; *Brassica napus* FAE1, промотор FAE1 *Arabidopsis thaliana*; Лектин, участок терминатора транскрипции/полиаденилирования лектина *Glycine max*; Cnl1 обозначает промотор или терминатор конлинина 1 *Linum usitatissimum*. УПМ обозначает участок присоединения к матриксу Rb7 *Nicotiana tabacum*.

Ключ к перечню последовательностей

SEQ ID NO: 1 - последовательность нуклеотидов рJP3416-GA7. SEQ ID NO: 2 - последовательность нуклеотидов рGA7-mod_B. SEQ ID NO: 3 - ЭПК кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии Δ12-десатуразы *Lachancea kluyveri* в растениях. SEQ ID NO: 4 - Δ12-десатураза *Lachancea kluyveri*;

SEQ ID NO: 5 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии ω3-десатуразы *Pichia pastoris* в растениях;

SEQ ID NO: 6 - ω3-десатураза *Pichia pastoris*;

SEQ ID NO: 7 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ6-десатуразу *Micromonas pusilla*;

SEQ ID NO: 8 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии Δ6-десатуразы *Micromonas pusilla* в растениях (версия 2);

SEQ ID NO: 9 - Δ6-десатураза *Micromonas pusilla*;

SEQ ID NO: 10 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ6-десатуразу *Ostreococcus lucimarinus*;

SEQ ID NO: 11 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии Δ6-

десатуразы *Ostreococcus lucimarinus* в растениях;

SEQ ID NO: 12 - Δ6-десатураза *Ostreococcus lucimarinus*;

SEQ ID NO: 13 - Δ6-десатураза *Ostreococcus tauri*;

SEQ ID NO: 14 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ6-элонгазу *Pyramimonas cordata*;

SEQ ID NO: 15 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии Δ6-элонгазы *Pyramimonas cordata* в растениях (укороченная на 3'-конце и кодирующая функциональную элонгазу) (версия 1);

SEQ ID NO: 16 - Δ6-элонгаза *Pyramimonas cordata*;

SEQ ID NO: 17 - укороченная Δ6-элонгаза *Pyramimonas cordata*;

SEQ ID NO: 18 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ5-десатуразу *Pavlova salina*;

SEQ ID NO: 19 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии Δ5-десатуразы *Pavlova salina* в растениях;

SEQ ID NO: 20 - Δ5-десатураза *Pavlova salina*;

SEQ ID NO: 21 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ5-десатуразу *Pyramimonas cordata*;

SEQ ID NO: 22 - Δ5-десатураза *Pyramimonas cordata*;

SEQ ID NO: 23 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ5-элонгазу *Pyramimonas cordata*;

SEQ ID NO: 24 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии Δ5-элонгазы *Pyramimonas cordata* в растениях;

SEQ ID NO: 25 - Δ5-элонгаза *Pyramimonas cordata*;

SEQ ID NO: 26 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ4-десатуразу *Pavlova salina*;

SEQ ID NO: 27 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии Δ4-десатуразы *Pavlova salina* в растениях;

SEQ ID NO: 28 - Δ4-десатураза *Pavlova salina*;

SEQ ID NO: 29 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ9-элонгазу *Isochrysis galbana*;

SEQ ID NO: 30 - кодон-оптимизированная открытая рамка считывания для экспрессии Δ9-элонгазы *Emiliania huxleyi* в растениях;

SEQ ID NO: 32 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ9-элонгазу *Pavlova pinguis*;

SEQ ID NO: 33 - Δ9-элонгаза *Pavlova pinguis*;

SEQ ID NO: 34 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ9-элонгазу *Pavlova salina*;

SEQ ID NO: 35 - Δ9-элонгаза *Pavlova salina*;

SEQ ID NO: 36 - открытая рамка считывания, кодирующая Δ8-десатуразу *Pavlova salina*;

SEQ ID NO: 37 - Δ8-десатураза *Pavlova salina*;

SEQ ID NO: 38 - вирусный супрессор V2;

SEQ ID NO: 39 - открытая рамка считывания, кодирующая вирусный супрессор V2;

SEQ ID NO: 40 - ЛФКАТ *Arabidopsis thaliana*;

SEQ ID NO: 41 - ЛФКАТ *Limnanthes alba*;

SEQ ID NO: 42 - ЛФКАТ *Saccharomyces cerevisiae*;

SEQ ID NO: 43 - ЛФКАТ *Micromonas pusilla*;

SEQ ID NO: 44 - ЛФКАТ *Mortierella alpina*;

SEQ ID NO: 45 - ЛФКАТ *Brassica napus*;

SEQ ID NO: 46 - ЛФКАТ *Brassica napus*;

SEQ ID NO: 47 - ω3 десатураза *Phytophthora infestans*;

SEQ ID NO: 48 - ω3 десатураза *Thalassiosira pseudonana*;

SEQ ID NO: 49 - ω3 десатураза *Pythium irregulare*;

SEQ ID NO: 50-58 - олигонуклеотидные праймеры/зонды.

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, рекомбинантных клетках, химии белка и биохимии).

Если не указано иное, 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 около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90 или по меньшей мере около 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 ДПК, продуцированной другим источником (например, ДПК из рыбьего жира). В варианте реализации после экстракции одно или более или все из соотношений олеиновая кислота:ДПК, пальмитиновая кислота:ДПК, линолевая кислота:ДПК, и общие $\omega 6$ жирные кислоты:общие $\omega 3$ 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:ДПК, пальмитиновая кислота:ДПК, линолевая кислота:ДПК и общие $\omega 6$ жирные кислоты:общие $\omega 3$ 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 около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90 или по меньшей мере около 95% (мас./мас.) экстрагированного растительного липида. В варианте реализации экстрагированное масло по изобретению не смешивается с другим маслом, таким как ДПК, продуцированная другим источником (например, ДПК из рыбьего жира). В варианте реализации после экстракции одно или более или все из соотношений олеиновая кислота:ДПК, пальмитиновая кислота:ДПК, линолевая кислота:ДПК и общие $\omega 6$ жирные кислоты:общие $\omega 3$ 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 изменить одно или более или все из соотношений олеиновая кислота:ДПК, пальмитиновая кислота:ДПК, линолевая кислота:ДПК и общие $\omega 6$ жирные кислоты:общие $\omega 3$ 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 данном описании такие термины, как "экстрагированный микробный липид" или "экстрагированное микробное масло" имеют значение, аналогичное соответствующим терминам "экстрагированный растительный липид" и "экстрагированное растительное масло" соответственно, причем основное различие состоит в источнике липида или масла.

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.% триацилглицеридов (ТАГ) от содержания липида в масле. Незначительные компоненты масла, такие как диацилглицериды (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. Предпочтительные жирные кислоты по изобретению содержат углеродные цепи длиной 18-22 атомов углерода (жирные кислоты C18, C20, C22), более предпочтительно 20-22 атома углерода (C20, C22) и наиболее предпочтительно 22 атома углерода (C22). 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 триглицерида, диацилглицерида, моноацилглицерида, связи с ацил-КоА (тиоэфир) или другой формы связи. Жирная кислота может быть этерифицированной как фосфолипид, например формы фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилглицерида, фосфатидилинозитола или дифосфатидилглицерида. В варианте реализации жирная кислота этерифицирована метильной или этильной группой, например метил или этиловый эфир ПНЖК C20 или C22. Предпочтительными жирными кислотами являются метиловые или этиловые эфиры ЭПК или ДПК или ЭПК, ДПК и ДГК или ЭПК и ДПК.

"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 (ω) конец содержит 3 атома водорода (CH₃-), и каждый атом углерода в пределах цепи содержит 2 атома водорода (-CH₂-).

"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 "-CH₂-CH₂-" 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 трансконфигурации, предпочтительно в цис-конфигурации. В варианте реализации состав жирных кислот липида или масла по изобретению включает менее чем 1% жирных кислот, содержащих двойные углерод-углеродные связи в трансконфигурации (трансжирные кислоты).

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 ω 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 ω 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 Δ 5,8,11,14; ω 6), эйкозатетраеновой кислоты (ЭТК, 20:4 Δ 8,11,14,17, ω 3), эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК, 20:5 Δ 5,8,11,14,17; ω 3), докозапентаеновой кислоты (ДПК, 22:5 Δ 7,10,13,16,19, ω 3) или докозагексаеновой кислоты (ДГК, 22:6 Δ 4,7,10,13,16,19, ω 3). Кроме того, ДЦ-ПНЖК могут представлять собой дигомо-γ-линолевую кислоту (ДГЛК) или эйкозатриеновую кислоту (ЭТрК, 20:3 Δ 11,14,17, ω 3). Будет очевидно, что ДЦ-ПНЖК, полученная в соответствии с изобретением, может быть смесью любых или всех упомя-

нутых 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, ДПК или ДПК и ДГК, или ЭПК, ДПК и ДГК, или ЭПК и ДПК. В варианте реализации ДПК присутствует на уровне от около 7 до 30 или 35%, и ДГК присутствует или отсутствует, или, если она присутствует, то присутствует на уровне менее чем 2,0%, предпочтительно менее чем 1,0%, более предпочтительно менее чем 0,5% от общего состава жирных кислот в композиции и наиболее предпочтительно отсутствует или не поддается обнаружению. Это может обеспечиваться отсутствием активности $\Delta 4$ -десатуразы в клетке. В варианте реализации уровень ДПК превышает ЭПК, более предпочтительно превышает уровень каждой из ЭПК и ДГК, наиболее предпочтительно превышает суммарный уровень ЭПК и ДГК. В данном варианте реализации ДГК может отсутствовать или, если она присутствует, то присутствует на уровне менее чем 0,5% от состава общих жирных кислот.

Дополнительно, в настоящем документе термины "длинноцепочечная полиненасыщенная жирная кислота" (ДЦ-ПНЖК) и "полиненасыщенная жирная кислота с очень длинной цепью" (ОДЦ-ПНЖК) обозначают жирную кислоту, находящуюся в свободном состоянии (неэтерифицированную) или в этерифицированной форме, например, как часть триглицерида (триглицерид), диацилглицерида, моноацилглицерида, связи с ацил-КоА (тиоэфир) или другой формы связи. В триглицериде, ДЦ-ПНЖК или ОДЦ-ПНЖК, такие как ДПК, могут быть этерифицированы в положениях sn-1/3 или sn-2, или триглицерид может содержать две или три ацильных группы, выбранные из ацильных групп ДЦ-ПНЖК и ОДЦ-ПНЖК. Например, триглицерид может содержать ДПК как в sn-1, так и в sn-3 положениях. Жирная кислота может быть этерифицированной как фосфолипид, например формы фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилглицерида, фосфатидилинозитола или дифосфатидилглицерида. 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% триацилглицеридов, причем остаток представляет собой другие формы липида, такие как упомянутые выше, в которых присутствуют, по меньшей мере, указанные триацилглицериды, содержащие ДЦ-ПНЖК. Впоследствии масло может быть дополнительно очищено или обработано, например гидролизом с сильным основанием, с целью высвобождения свободных жирных кислот, или переэтерификацией, 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 $\omega 6$ жирных кислот включают (если они присутствуют) ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК и $\omega 6$ -ДПК, но исключают любые $\omega 3$ жирные кислоты и мононенасыщенные жирные кислоты. Все $\omega 6$ жирные кислоты, присутствующие в растениях, семенах, липиде или маслах по изобретению, входят в класс полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК).

В настоящем документе выражение "новые $\omega 6$ жирные кислоты" или "содержание новых $\omega 6$ жирных кислот" или подобное обозначает сумму всех $\omega 6$ 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 $\omega 6$ 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 $\omega 6$ -ДПК, но исключают ЛК и любые $\omega 3$ жирные кислоты и мононенасыщенные жирные кислоты. Характерное общее содержание $\omega 6$ жирных кислот и содержание новых $\omega 6$ 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 $\omega 3$ жирные кислоты" или "общее содержание $\omega 3$ жирных кислот" или подобное обозначает сумму всех $\omega 3$ 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 $\omega 3$ жирных кислот включают (если они присутствуют) АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК и исключают любые $\omega 6$ жирные кислоты и мононенасыщенные жирные кислоты. Все $\omega 3$ жирные кислоты, присутствующие в растениях, семенах, липиде или маслах по изобретению, входят в класс полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК).

В настоящем документе выражение "новые $\omega 3$ жирные кислоты" или "содержание новых $\omega 3$ жирных кислот" или подобное обозначает сумму всех $\omega 3$ 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 $\omega 3$ жирные кислоты представляют собой $\omega 3$ 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 $\omega 6$ жирные кислоты и мононенасыщенные жирные кислоты. Характерное общее содержание $\omega 3$ жирных кислот и содержание новых $\omega 3$ жирных кислот определяется по превращению жирных кислот в образце в МЭЖК и результатам анализа ГХ, как описано в примере 1.

Как будет понятно квалифицированному специалисту, термин "получение части растения" в качестве стадии в способе по изобретению может включать получение одной или более частей растения для использования в способе. Получение части растения включает сбор урожая части растения с растения, например, с помощью комбайна или приобретение части растения или получение части растения от поставщика. В другом примере, получение части растения может быть приобретением растения у кого-либо другого, кто собрал урожай части растения.

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. Предпочтительными белками или комбинациями белков являются кодируемые генетическими конструкциями, предложенными в данном описании как SEQ ID NO: 1 и 2.

В настоящем документе термин "фронт-энд десатураза" обозначает член класса ферментов, который вводит двойную связь между карбоксильной группой и уже имеющейся ненасыщенной частью ацильной цепи липидов, причем он структурно характеризуется присутствием N-концевого домена цитохромом b5, вместе с типичным доменом десатуразы жирных кислот, который содержит три в высокой степени консервативных гистидиновых бокса (Napier et al., 1997).

Активность любой из элонгаз или десатураз для применения в изобретении может быть протестирована путем экспрессии гена, кодирующего фермент, в клетке, такой как, например, растительная клетка, или предпочтительно в соматических эмбрионах или трансгенных растениях, и определения наличия у клетки повышенной способности к выработке ДЦ-ПНЖК по сравнению со сравнимой клеткой, эмбрионом или растением, в которых фермент не экспрессируется.

В одном варианте реализации изобретения одна или более десатураз и/или элонгаз для применения в изобретении, могут быть выделены из микроводорослей, т.е. их аминокислотная последовательность идентична полипептиду, который может быть выделен из микроводорослей.

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

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 tricornutum</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>Phaeodactylum tricornutum</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 Δ5/Δ6-десатураза	Рыба	<i>Danio rerio</i>	AF309556	444	Hastings et al., 2001
C20 Δ8-десатураза	Водоросли	<i>Euglena gracilis</i>	AF139720	419	Wallis and Browse, 1999
	Растения	<i>Borago officinales</i>	AAG43277	446	Sperling et al., 2001
Δ6-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	Tvrdek et al., 2000
		<i>Mus musculus</i>	AF170908	292	Tvrdek 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
Δ9-элонгаза	Водоросли	<i>Isochrysis galbana</i>	AF390174	263	Qi et al., 2002
		<i>Euglena gracilis</i>		258	WO 08/128241
Δ5-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.

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-й углерод-углеродной связи от карбоксильного конца жирнокислотного субстрата. "Δ4-десатураза", по меньшей мере, способна трансформировать ДПК в ДГК. Предпочтительно "Δ4-десатураза" способна преобразовывать ДПК-КоА в ДГК-КоА, т.е. она является ацил-КоА десатуразой. В варианте реализации "Δ4-десатураза" способна преобразовывать ДПК, этерифицированную в положении sn-2 ФХ в ДГК-ФХ. Предпочтительно Δ4-десатураза обладает более высокой активностью в отношении ДПК-КоА, чем в отношении ДПК-ФХ. 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 Δ4-десатураза содержит последовательность аминокислот, соответствующую представленной в SEQ ID NO: 28, или Δ4-десатуразе вида *Thraustochytrium*, ее биологически активному фрагменту или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 28. В варианте реализации растение, часть растения (такая как семя) или клетка по изобретению или применяемые согласно изобретению, которые продуцируют высокие уровни ДПК, например ДПК составляет от 5 до 35% от общего содержания экстрагируемых жирных кислот, не содержат гена, кодирующего функциональную Δ4-десатуразу.

В настоящем документе "Δ5-десатураза" обозначает белок, который осуществляет реакцию десатурации, с введением двойной углерод-углеродной связи в положении 5-й углерод-углеродной связи от карбоксильного конца жирнокислотного субстрата. В варианте реализации жирнокислотный субстрат представляет собой ЭТК, и фермент продуцирует ЭПК. Предпочтительно "Δ5-десатураза" способна трансформировать ЭТК-КоА в ЭПК-КоА, т.е. является ацил-КоА десатуразой. В варианте реализации "Δ5-десатураза" способна трансформировать ЭТК, этерифицированную в положении sn-2 ФХ. Предпоч-

тительно Δ5-десатураза обладает более высокой активностью в отношении ЭТК-КоА, чем в отношении ЭТК-ФХ. Примеры "Δ5-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 Δ5-десатуразы соответствует представленной в SEQ ID NO: 20, ее биологически активному фрагменту или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 20. В другом варианте реализации последовательность аминокислот Δ5-десатуразы соответствует представленной SEQ ID NO: 22, ее биологически активному фрагменту, или последовательности аминокислот, которая по меньшей мере на 53% идентична SEQ ID NO: 22. В другом варианте реализации Δ5-десатураза получена из вида *Thraustochytrium* или *Emiliana huxleyi*.

В настоящем документе "Δ6-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. В варианте реализации жирнокислотный субстрат представляет собой АЛК, и фермент продуцирует СДК. Предпочтительно "Δ6-десатураза" способна преобразовывать АЛК-КоА в СДК-КоА, т.е. является ацил-КоА десатуразой. В варианте реализации "Δ6-десатураза" способна преобразовывать АЛК, этерифицированную в положении sn-2 ФХ. Предпочтительно Δ6-десатураза обладает более высокой активностью в отношении АЛК-КоА, чем в отношении АЛК-ФХ. Кроме того, Δ6-десатураза может обладать активностью Δ5-десатуразы, и при этом носить название Δ5/Δ6 бифункциональной десатуразы, при условии, что она обладает более высокой активностью Δ6-десатуразы в отношении АЛК, чем активностью Δ5-десатуразы в отношении ЭТК. Примеры Δ6-десатураз приведены в Ruiz-Lopez et al. (2012) и Petrie et al. (2010a), а также в табл. 1 настоящего документа. Предпочтительные Δ6-десатуразы получены из *Micromonas pusilla*, *Pythium irregulare* или *Ostreococcus tauri*.

В варианте реализации Δ6-десатураза дополнительно характеризуется наличием по меньшей мере двух, предпочтительно всех трех и предпочтительно в растительной клетке, из следующего: i) более высокая активность Δ6-десатуразы в отношении α-линоленовой кислоты (АЛК, 18:3Δ9,12,15, ω3), чем в отношении линолевой кислоты (ЛК, 18:2Δ9,12, ω6) в качестве жирнокислотного субстрата; ii) более высокая активность Δ6-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 Δ8-десатуразы в отношении ЭТрК. Примеры таких Δ6-десатураз приведены в табл. 2.

В варианте реализации Δ6-десатураза обладает более высокой активностью в отношении ω3 субстрата, чем в отношении соответствующего ω6 субстрата, и обладает активностью в отношении АЛК с образованием октадекатетраеновой кислоты (стеарионовая кислота, СДК, 18:4Δ6,9,12,15, ω3), 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 Δ6-десатураза обладает более высокой активностью, например по меньшей мере около в 2 раза более высокой активностью Δ6-десатуразы в отношении АЛК, чем в отношении ЛК как жирнокислотного субстрата. В другом варианте реализации Δ6-десатураза обладает более высокой активностью, например по меньшей мере около 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 в положении sn-2 ФХ, как жирнокислотного субстрата. В другом варианте реализации, Δ6-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
Δ6-десатураза	Водоросли	<i>Mantomella squamata</i>	CAQ30479	449	Hoffmann et al., 2008
		<i>Ostreococcus tauri</i>	AAW70159	456	Domergue et al., 2005
		<i>Micromonas pusilla</i>	EEH58637		Petrie et al., 2010a (SEQ ID

					NO: 13)
Δ5-десатураза	Водоросли	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30478	482	Hoffmann et al., 2008
	Растение	<i>Anemone leveillei</i>	Отсутствует		Sayanova et al., 2007
ω3-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 Δ6-десатураза не обладает обнаружимой активностью Δ5-десатуразы в отношении ЭТК. В другом варианте реализации последовательность аминокислот Δ6-десатуразы представлена SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13, их биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 77% идентичной SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13. В другом варианте реализации последовательность аминокислот Δ6-десатуразы представлена SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13, их биологически активным фрагментом или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 67% идентичной одной или обоим из SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13. Кроме того, Δ6-десатураза может обладать активностью Δ8-десатуразы.

В настоящем документе "Δ8-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. Δ8-Десатураза, по меньшей мере, способна превращать ЭТрК в ЭТК. Предпочтительно "Δ8-десатураза" способна преобразовывать ЭТрК-КоА в ЭТК-КоА, т.е. является ацил-КоА десатуразой. В варианте реализации "Δ8-десатураза" способна преобразовывать ЭТрК, этерифицированную в положении sn-2 ФХ. Предпочтительно Δ8-десатураза обладает более высокой активностью в отношении ЭТрК-КоА, чем в отношении ЭТрК-ФХ. Кроме того, Δ8-десатураза может обладать активностью Δ8-десатуразы, и при этом носить название Δ6/Δ8 бифункциональной десатуразы, при условии, что она обладает более высокой активностью Δ8-десатуразы в отношении ЭТрК, чем активностью Δ6-десатуразы в отношении АЛК. Примеры Δ8-десатураз приведены в табл. 1. В одном варианте реализации последовательность аминокислот Δ8-десатуразы соответствует представленной SEQ ID NO: 37, ее биологически активным фрагментом или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 37.

В настоящем документе "ω3-десатураза" обозначает белок, который осуществляет реакцию десатурации, с введением двойной углерод-углеродной связи в положении 3ой углерод-углеродной связи от метилового конца жирнокислотного субстрата. Таким образом, ω3-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 ω3-десатуразы (группа I) обладают активностью только на С18 субстратах, таких как растительные и цианобактериальные ω3-десатуразы. Такие ω3-десатуразы также являются Δ15-десатуразами. Другие ω3-десатуразы проявляют активность на субстратах С20 без активности (группа II) или с некоторой активностью (группа III) на субстратах С18. Такие ω3-десатуразы также являются Δ17-десатуразами. Предпочтительными ω3-десатуразами является группа III типа, которая превращает ЛК в АЛК, ГЛК в СДК, ДГЛК в ЭТК и АРК в ЭПК, например *Pichia pastoris* ω3-десатураза (SEQ ID NO: 6). Примеры ω3-десатураз включают описанные Pereira et al. (2004a) (ω3-десатураза *Saprolegnia diclina*, группа II), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) и Spsychalla et al. (1997) (ω3-десатураза *S. elegans*, группа III). В предпочтительном варианте реализации ω3-десатураза представляет собой грибковую ω3-десатуразу. В настоящем документе "грибковая ω3-десатураза" обозначает ω3-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 ω3-десатуразы, выделены из грибковых источников, таких как, например, *Phytophthora infestans* (номер доступа CAJ30870, WO2005083053; SEQ ID NO: 47), *Saprolegnia diclina* (номер доступа AAR20444, Pereira et al., 2004a и US 7211656), *Pythium irregulare* (WO2008022963, группа II; SEQ ID NO: 49), *Mortierella alpina* (Sakuradani et al., 2005; номер доступа BAD91495; WO2006019192), *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al., 2004; номер доступа XP_002291057; WO2005012316, SEQ ID NO: 48), *Lachancea kluyveri* (также известный как *Saccharomyces kluyveri*; Oura et al., 2004; номер доступа AB118663). Xue et al. (2012) описывает ω3-десатуразы из оомицетов *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora sojae* и *Phytophthora ramorum*, способные эффективно превращать жирнокислотные субстраты ω6 в соответствующие ω3 жирные кислоты, с предпочтением в отношении субстратов С20, т.е. обладающие более выраженной активностью Δ17-десатуразы, чем активностью Δ15-десатуразы. Такие ферменты не обладают активностью Δ12-десатуразы, но способны использовать жирных кислот в ацил-КоА и фосфолипидной фракции в качестве субстратов.

В более предпочтительном варианте реализации грибковая ω3-десатураза представляет собой ω3-

десатуразу/ $\Delta 15$ -десатуразу *Pichia pastoris* (также известна как *Komagataella pastoris*) (Zhang et al., 2008; номер доступа EF116884; SEQ ID NO: 6) 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 C20, 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 C18, 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 идентифицированы посредством поиска в базах данных последовательностей.

В настоящем документе " $\Delta 17$ -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. $\Delta 17$ -Десатураза также расценивается как $\omega 3$ -десатураза, если она действует на субстрат C20, с введением десатурации в положении связи $\omega 3$.

В предпочтительном варианте реализации $\Delta 12$ -десатураза и/или $\Delta 15$ -десатураза представляет собой грибковую $\Delta 12$ -десатуразу или грибковую $\Delta 15$ -десатуразу. В настоящем документе "грибковая $\Delta 12$ -десатураза" или "грибковая $\Delta 15$ -десатураза" обозначает $\Delta 12$ -десатуразу или $\Delta 15$ -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 $\Delta 12$ -десатураза из *Saprolegnia diclina*. В WO2009016202 раскрыты грибковые десатуразы из *Helobdella robusta*, *Laccaria bicolor*, *Lottia gigantea*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Monosiga brevicollis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Nectria haematococca*, *Nematostella vectensis*, *Phycomyces blakesleeana*, *Trichoderma reesei*, *Physcomitrella patens*, *Postia placenta*, *Selaginella moellendorffii* и *Microdochium nivale*. В WO2005/012316 раскрыта $\Delta 12$ -десатураза из *Thalassiosira pseudonana* и других грибов. В WO2003/099216 раскрыты гены, кодирующие грибковые $\Delta 12$ -десатуразы и $\Delta 15$ -десатуразы, выделенные из *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* и *Mortierella alpina*. В WO2007133425 раскрыты грибковые $\Delta 15$ десатуразы, выделенные из: *Saccharomyces kluyveri*, *Mortierella alpina*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* и *Magnaporthe grisea*. Предпочтительная $\Delta 12$ десатураза выделена из *Phytophthora sojae* (Ruiz-Lopez et al., 2012).

Отличным подклассом грибковых $\Delta 12$ -десатураз и грибковых $\Delta 15$ -десатураз являются бифункциональные грибковые $\Delta 12/\Delta 15$ -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 $\omega 3$ -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-2 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 ω 3-десатураза обладает, по меньшей мере, некоторой активностью в отношении субстрата ацил-КоА и соответствующего субстрата ацил-ФХ, и обладает активностью в отношении субстратов С18 и С20. Примеры таких ω 3-десатураз известны среди клонированных грибковых десатураз, перечисленных выше.

В другом варианте реализации ω 3-десатураза содержит последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 6, 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: 6.

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 Δ 5 или Δ 6-десатуразу, или ω 3-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, Δ 5-десатураза и Δ 4-десатуразы, экспрессирующиеся из конструкта GA7 (см. пример 2, фиг. 2 и SEQ ID NO: 1) и их варианты (пример 3) способны к десатурации соответствующих ацил-КоА субстратов, ЭТК-КоА и ДПК-КоА.

Элонгазы.

Биохимические доказательства наводят 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 скорость в реакции элонгации.

В настоящем документе " Δ 5-элонгаза", по меньшей мере, способна превращать ЭПК в ДПК. Примеры Δ 5-элонгаз включают раскрытые в WO2005/103253. В одном варианте реализации Δ 5-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 Δ 5-элонгазы представлена SEQ ID NO: 25, ее биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 47% идентичной SEQ ID NO: 25. В дальнейшем варианте реализации Δ 6-элонгаза происходит из *Ostreococcus taurii* или *Ostreococcus lucimarinus* (US2010/088776).

В настоящем документе " Δ 6-элонгаза", по меньшей мере, способна превращать СДК в ЭТК. Примеры Δ 6-элонгаз включают перечисленные в табл. 1. В одном варианте реализации элонгаза содержит последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 16, ее биологически активный фрагмент (например, фрагмент, раскрытый как SEQ ID NO: 17), или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 55% идентичную одной или обеим из SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17. В варианте реализации Δ 6-элонгаза получена из *Physcomitrella patens* (Zank et al., 2002; номер доступа AF428243) или *Thalassiosira pseudonana* (Ruiz-Lopez et al., 2012).

В настоящем документе " Δ 9-элонгаза", по меньшей мере, способна превращать АЛК в ЭТрК. Примеры Δ 9-элонгаз включают приведенные в табл. 1. В одном варианте реализации последовательность аминокислот Δ 9-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 Δ 9-элонгаза содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 31, ее биологически активный фрагмент или последовательности аминокислот, которая по меньшей мере

на 81% идентична SEQ ID NO: 31. В другом варианте реализации Δ9-элонгазы содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 33, ее биологически активный фрагмент или последовательность аминокислот, по меньшей мере 50% идентичную SEQ ID NO: 33. В другом варианте реализации последовательность аминокислот Δ9-элонгазы представлена SEQ ID NO: 35, ее биологически активным фрагментом, или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 50% идентичной SEQ ID NO: 35. В дальнейшем варианте реализации Δ9-элонгазы 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 элонгазы 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 элонгазы обладает активностью Δ6-элонгазы по меньшей мере около в 6,5 раз превышающей активность Δ9-элонгазы. В дальнейшем варианте реализации элонгазы не обладает обнаружимой активностью Δ5-элонгазы.

Другие ферменты.

Трансгены, введенные в рекомбинантную клетку, такую как микробная клетка, или трансгенное растение или его часть, могут дополнительно кодировать ЛФААТ. В настоящем документе термин "1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансфераза" (ЛФКАТ), также называемый ацилтрансферазой лизофосфатидиновой кислоты или ацил-КоА-лизофосфатидат-ацилтрансферазой, обозначает белок, который ацилирует sn-1-ацилглицерид-3-фосфат sn-1 G-3-P в положении sn-2, с образованием фосфатидной кислоты (ФК). Таким образом, термин "активность 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазы" 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 C22 в положение sn-2 ЛФК, с образованием ФК. В варианте реализации полиненасыщенный C22 ацил-КоА представляет собой ДПК-КоА. Примеры таких ЛФКАТ приведены в примере 6 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: 40-46, ее биологически активным фрагментом или последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 40% идентичной любой из SEQ ID NO: 40-46. В другом варианте реализации ЛФААТ не содержит последовательности аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 44. В предпочтительном варианте реализации ЛФААТ, пригодная в соответствии с изобретением, которая может использовать полиненасыщенный жирный ацил-КоА субстрат C22, предпочтительно ДПК-КоА, содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 41, 42 и 44, ее биологически активный фрагмент или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 40% идентичную любой одной или более из SEQ ID NO: 41, 42 и 44. В предпочтительном варианте реализации ЛФААТ, пригодная в соответствии с изобретением, которая может использовать полиненасыщенный жирный ацил-КоА субстрат C22, предпочтительно ДПК-КоА, содержит последовательность аминокислот, представленную любой из SEQ ID NO: 41 или 42, ее биологически активный фрагмент или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 40% идентичную любой одной или более из SEQ ID NO: 41 и 42. В варианте реализации изобретения ЛФААТ предпочтительно представляет собой ЛФААТ *Mortierella alpina*, последовательность аминокислот которой приведена как SEQ ID NO: 44, или другую ЛФААТ, которая способна использовать ДПК-КоА в качестве субстрата для переноса ДПК в ЛПК, с образованием ФК, содержащей ДПК в положении sn-2.

Трансгены, введенные в рекомбинантную клетку, трансгенное растение или его часть могут дополнительно кодировать ДГАТ. В настоящем документе термин "диацилглицерид ацилтрансфераза" (ЕС 2.3.1.20; ДГАТ), обозначает белок, который переносит жирную группу ацила из ацил-КоА к диацилглицеридному субстрату, с образованием триацилглицерида. Поэтому, термин "активность диацилглицерид ацилтрансферазы" обозначает перенос ацил-КоА к диацилглицериду, с образованием триацилглицерида. 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* (CAB44774), *Ricinus communis* (AAR11479), *Vernicia fordii* (ABC94472), *Vernonia galamensis* (ABV21945, ABV21946), *Euonymus alatus* (AAV31083), *Caenorhabditis elegans* (AAF82410), *Rattus norvegicus* (NP_445889), *Homo sapiens* (NP_036211), а также их варианты и/или му-

танты. Примеры полипептидов ДГАТ2 включают полипептиды, кодируемые генами ДГАТ2 из *Arabidopsis thaliana* (номер доступа NP_566952), *Ricinus communis* (AAV16324), *Vernicia fordii* (ABC94474), *Mortierella ramanniana* (AAK84179), *Homo sapiens* (Q96PD7, Q58HT5), *Bos taurus* (Q70VD8), *Mus musculus* (AAK84175), *Micromonas CCMR1545*, 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.

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 GAP (Needleman и 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 GAP 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 GAP 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 GAP 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 GAP выравнивает две последовательности на протяжении участка длиной по меньшей мере 250 аминокислот. Даже более предпочтительно анализ GAP 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 полипептид. 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 76, 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, инсерции 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 Narayana (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 посерийно, 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 около 1 до 15 остатков, более предпочтительно от около 1 до 10 остатков и обычно около 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.

Таблица 3

Примеры замен аминокислот

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

Полинуклеотиды.

Кроме того, в изобретении предлагается применение полинуклеотидов, 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".

В варианте реализации полинуклеотид является неприродным. Примеры неприродных полинуклеотидов включают, но не ограничиваясь этим, мутировавшие (например, с применением способов, описанных в данном описании), и полинуклеотиды, в которых открытая рамка считывания, кодирующая белок,

функционально связана с промотором, с которым она не связана в природе (как, например, в конструкциях, описанных в данном описании).

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 около 2000 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, раскрытых в настоящем документе, и комплементарную нуклеотидную последовательность к любому из упомянутого выше.

В настоящем документе "химерная ДНК" или "химерная генетическая конструкция" или подобное выражение 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.

"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 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 образовывать единый полинуклеотид. Обычно такие химерные полинуклеотиды содержат, по меньшей мере, открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, функционально связанный с промотором, подхо-

дающим для управления транскрипцией открытой рамки считывания в целевой клетке.

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.

Полинуклеотиды 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 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.

Рекомбинантная экспрессия может применяться для получения рекомбинантных клеток или растений или частей растения по изобретению. 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 rUC векторы, полученные из rSK векторы, полученные из rGEM векторы, полученные из rSP векторы, полученные из rBS 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, описанную в данном описании, в которой каждый полинуклеотид функционально связан с последовательностями контроля экспрессии, которые активны в целевой клетке. Предпочтительно контроль экспрессии последовательностей включает или представляет собой все из гетерологичных промоторов, т.е. гетерологичных в отношении кодирующих участков, которые они контролируют. Более чем один полинуклеотид, раскрытый в настоящем документе, например 3, 4, 5 или 6 полинуклеотидов, предпочтительно 7 или 8 полинуклеотидов, каждый из которых кодирует другой полипептид, 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. Интеграция в геном может осуществляться в ядерном геноме или в плазмидном геноме трансгенного растения. 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 независимо может быть таким же или отличным. Предпочтительно по меньшей мере 3 и максимум до 6 различных промоторных последовательностей применяются в рекомбинантном векторе, чтобы управлять экспрессией экзогенных полинуклеотидов.

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 β -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 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 неомизин 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 фосфинотрицину, например, раскрытый в EP 275957, ген, кодирующий 5-енолпикилат-3-фосфат синтазу (ЭШФС), обеспечивающий переносимость N-фосфонометилглицина, например, раскрытый Hinchee et al. (1988), или предпочтительно ген *bar*, обеспечивающий резистентность к биалафосу, например, раскрытый в WO91/02071.

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 границ 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. Векторы экспрессии по настоящему изобретению могут управлять экспрессией гена в растительных клетках или в рекомбинантных клетках, таких как микробные клетки. 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 транскрипционным 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-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) и индуцибельным светом промотор из маленькой субъединицы рибулозо-1,5-бис-фосфат карбоксилазы.

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. Множество примеров хорошо известно из уровня техники. Кроме того, различные промоторы растительных генов, которые регулируются в ответ на экологические, гормональные, химические и/или связанные с развитием сигналы, могут использоваться для экспрессии генов в клетках растения, или может быть предпочтительным использование орган-специфичных промоторов.

В настоящем документе термин "промотор, специфичный для семени" или его вариации обозначает промотор, который предпочтительно по сравнению с другими тканями растения направляет транскрипцию гена в развивающемся семени растения, предпочтительно растения вида *Brassica*, *Camelina sativa* или *G. max*. 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 жирных кислот, 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* (WO98/45461), промотор фазеолиина *Phaseolus vulgaris* (US 5504200), промотор Vce4 *Brassica* (WO91/13980) или промотор легумина LeB4 из *Vicia faba* (Baum-

lein 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 *Ipt2* или *Ipt1* ячменя (WO95/15389 и WO95/23230) 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 (Perrin et al., 2000), промотор фитогемагглютини-на боба (Perrin 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 *BnGLP* 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 *a/b* 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 последовательность 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 конлинина 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 делеция последовательностей, которые дестабилизируют транскрипты.

Трансгенные растения.

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, цветки), 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 изобре-

ния 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 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 семя, например, собранное в процессе сбора урожая, или семя, которое еще находится на растении, но готово для сбора урожая, а также может обозначать семя после набухания или прорастания согласно контексту. Зрелое семя или семя обычно содержит влагу в количестве менее чем около 18-20%, предпочтительно менее чем 10%. Содержание влаги в семени Brassica, например семени рапса в зрелом состоянии, обычно составляет около 4-8% или 6-8%, предпочтительно от около 4 до около 6%. "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. Стандартные условия роста в теплице включают дневную температуру 22-24°C и ночную температуру 16-18°C с естественным солнечным светом. Семя может быть пригодным для высадки, 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 пригодно 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 запасающих органов растения являются семя, плод, клубневидные корни и клубни. Предпочтительным запасающим органом растения является семя.

Растения или части растений по изобретению или применяемые в соответствии с изобретением предпочтительно являются фенотипически нормальными. В настоящем документе термин "фенотипически нормальный" обозначает генетически модифицированное растение или орган растения, особенно запасающий орган, такой как семя, клубень или плод, 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 нормальными, обладают способностью к росту или воспроизведению, по существу такой же, как изогенное растение или орган, не содержащие экзогенного(ых) полинуклеотида(ов). Предпочтительно биомасса, темпы роста, скорость прорастания, размер запасающего органа, жизнеспособность пыльцы, фертильность мужских и женских растений, размер семени и/или количество образованных жизнеспособных семян составляет не менее 90% от показателей растения, не содержащего указанного экзогенного полинуклеотида, при выращивании в идентичных условиях. Предпочтительно жизнеспособность пыльцы растения по изобретению или растений, полученных из семени по изобретению, составляет около 100% относительно жизнеспособности пыльцы соответствующего растения дикого типа. Данный термин не охватывает признаков растения, которое может отличаться от растения дикого типа, но которые не влияют отрицательно 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 или пригодные в соответствии с изобретением могут представлять собой кукурузу (*Zea mays*), рапс (*Brassica napus*, подвид *Brassica rapa*), горчицу (*Brassica juncea*), лен (*Linum usitatissimum*), люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожд (Secale cereale), сорго (*Sorghum bicolor*), сорго (*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 batatus*), 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*), макадамию (*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, подсолнечником, сафлором, *Camelina*, *Crambe* 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 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 или его часть являются гомозиготным по всем и каждому гену (экзогенный полинуклеотид), которые были введены (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, или могут применяться в разведении или обратном скрещивании растений.

Если это уместно, трансгенное растение или его часть 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, $\Delta 5$ -элонгаза, диацилглицерид ацилтрансфераза, ЛФАТ, $\Delta 17$ -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 набор экзогенных полинуклеотидов, кодирующих:

- а) $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -элонгазу и $\Delta 6$ -элонгазу,
- б) $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -элонгазу и $\Delta 9$ -элонгазу,
- в) $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -элонгазу, $\Delta 6$ -элонгазу и $\Delta 15$ -десатуразу,
- г) $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -элонгазу, $\Delta 9$ -элонгазу и $\Delta 15$ -десатуразу,
- д) $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -элонгазу, $\Delta 6$ -элонгазу и $\Delta 17$ -десатуразу,
- е) $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -элонгазу, $\Delta 9$ -элонгазу и $\Delta 17$ -десатуразу,
- ж) $\omega 3$ -десатуразу или $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу,
- з) $\omega 3$ -десатуразу или $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 9$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу,
- и) $\Delta 12$ -десатуразу, $\omega 3$ -десатуразу или $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу,
- й) $\Delta 12$ -десатуразу, $\omega 3$ -десатуразу или $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 9$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу,
- к) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), $\omega 3$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу,
- л) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу,
- м) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), $\Delta 12$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу,
- н) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), $\Delta 12$ -десатуразу, $\omega 3$ -десатуразу и/или $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу,
- о) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), $\omega 3$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 9$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу,
- п) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -

десатуразу, $\Delta 9$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу,

р) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), $\Delta 12$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 9$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу или

с) 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазу (ЛФААТ), $\Delta 12$ -десатуразу, $\omega 3$ -десатуразу и/или $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 8$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 9$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу.

В варианте реализации экзогенные полинуклеотиды кодируют набор полипептидов, которые представляют собой $\Delta 6$ -десатуразу *Pythium irregulare*, $\Delta 5$ -десатуразу *Thraustochytrid* или $\Delta 5$ -десатуразу *Emilia huxleyi*, $\Delta 6$ -элонгазу *Physcomitrella patens*, $\Delta 5$ -элонгазу *Thraustochytrid* или $\Delta 5$ -элонгазу *Ostreococcus taurii* и $\omega 3$ -десатуразу *Phytophthora infestans* или $\omega 3$ -десатуразу *Pythium irregulare*.

В варианте реализации растения по изобретению или применяемые в соответствии с изобретением выращены в поле, предпочтительно как популяция размером по меньшей мере 1000, 1000000 или 2000000 растений, которые по существу одинаковы, или на площади по меньшей мере 1 или 2 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 мякоти. 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*. Предпочтительно трансформацию растений осуществляют так, как описано в примерах в данном описании.

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 одианых 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 саутерн-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 введенному(ым) гену(ам). Более предпочтительным является трансгенное растение, гомозиготное по введенному(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 растительная клетка, растение или часть растения 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 введенной нуклеиновой кислотой.

Широко изучен тот факт, что созэкспрессия 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 созэкспрессии 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 мутант. 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 SEQ ID NO: 38, ее биологически активный фрагмент, или последовательность аминокислот по меньшей мере на 50% идентичную SEQ ID NO: 38, 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, таннинов, 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 семени, 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 $\omega 3$ ДЦ-ПНЖК или $\omega 6$ 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 экстрагиро-

ванного липида составляет от около 21 до около 40% общих жирных кислот в клетке. В дальнейшем варианте реализации общие жирных кислот в клетке содержат менее 1% C20:1. В предпочтительных вариантах реализации экстрагируемый ТАГ в клетке содержит жирных кислот 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 растения, 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 ДПК, например, это может быть выражено как соотношение уровня ДПК (в виде процента от общего содержания жирных кислот в липиде) к уровню жирнокислотного субстрата (например ОК, ЛК, АЛК, СДК, ЭТК или ЭПК) и всех продуктов, включая ДПК, 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 ДПК = $100 \times (\% \text{ДГК} + \% \text{ДПК}) / (\text{сумма} \% \text{ для ОК, ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК, АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$.
2. ЛК в ДПК = $100 \times (\% \text{ДГК} + \% \text{ДПК}) / (\text{сумма} \% \text{ для ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК, АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$.
3. АЛК в ДПК = $100 \times (\% \text{ДГК} + \% \text{ДПК}) / (\text{сумма} \% \text{ для АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$.
4. ЭПК в ДПК = $100 \times (\% \text{ДГК} + \% \text{ДПК}) / (\text{сумма} \% \text{ для ЭПК, ДПК и ДГК})$.
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 = $100 \times (\text{сумма} \% \text{ для АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК}) / (\text{сумма} \% \text{ для ЛК, ГЛК, ДГЛК, АРК, ЭДК, АЛК, СДК, ЭТрК, ЭТК, ЭПК, ДПК и ДГК})$.
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 вычисляют 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. Такие низкие значения соотношения могут быть достигнуты посредством сочетанного использования $\Delta 6$ -десатуразы с предпочтением в отношении субстрата $\omega 3$, вместе с $\omega 3$ -десатуразой, особенно грибковой $\omega 3$ -десатуразой, такой как $\omega 3$ -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 % ДПК в масле. Например, если содержание масла в семени рапса составляет около 40% (мас./мас.) и около 12% от общего содержания жирных кислот в масле составляет ДПК, то содержание ДПК в семени составляет около 4,8% или около 48 мг на 1 г семени. При содержании ДПК

около 21% семян рапса или семян *Camelina sativa* имеет уровень ДПК около 84 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 80 мг или по меньшей мере около 84 мг ДПК 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 ДПК, вырабатываемое на 1 га, если выход семени с гектара известен или может быть оценен. Например, рапс в Австралии обычно дает около 2,5 т семени на 1 га, что при содержании масла 40% дает около 1000 кг масла. При содержании ДПК 20,1% в конечном масле, это обеспечивает около 200 кг ДПК на 1 га. Если содержание масла снижается на 50%, это все еще обеспечивает около 100 кг ДПК на 1 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 ДПК представляет собой грибковую ω 3-десатуразу, например, такую как ω 3-десатураза *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 6), которая представляет собой Δ 6-десатуразу с предпочтением в отношении ω 3 ацильных субстратов, например, такую как Δ 6-десатураза *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 9), 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 около 0,5%, менее чем около 0,25%, менее чем около 0,1% или менее чем около 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, ω -докозапентаеновая кислота) не может быть обнаружена с помощью газовой хроматографии, как в общих чертах описано в примере 1.

В варианте реализации изобретения экстрагированный липид, экстрагированное масло, растение или его часть, такая как семя (по изобретению или применяемое в процессе/способе по изобретению), продукт питания или композиция по изобретению не содержит все-цис-6,9,12,15,18-генэйкозапентаеновой кислоты (n-3 ГПК).

Получение масел.

Способы, которые шаблонно 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 продюцировать 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 сопроводительным 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 ДПК 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 около 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 триацилглицеридов, 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 образовывать 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 около 0,1 мл/мин/100 мл масла из семян. Около 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, моноацилглицериды 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.

В данном документе "переэтерификация" обозначает способ обмена жирных кислот в пределах и между ТАГ или переноса жирных кислот на другой спирт с образованием эфира. Это может включать первичное высвобождение жирных кислот из ТАГ в форме свободных жирных кислот или прямое получение эфиров жирных кислот, предпочтительно метиловых эфиров или этиловых эфиров жирных кислот. В ходе реакции переэтерификации ТАГ со спиртом, таким как метанол или этанол, алкильная группа спирта образует эфирную связь с ацильными группами (включая ДПК) ТАГ. В случае сочетания со способом фракционирования, переэтерификация может применяться для модификации жирнокислотного состава липидов (Magangoni 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 (Speganza 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, противоточная хроматография 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 моновенасыщенных 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 1 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 моновенасыщенные 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, предназначена 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 значение, включают, без ограничения, макро-нутриенты, например съедобные жиры, углеводы и белки. Примеры таких съедобных жиров включают, без ограничения, кокосовое масло, масло бурачника, грибное масло, масло черной смородины, соевое масло, а также моно- и диглицериды. 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.

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 че-

ловеком 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.

В варианте реализации изобретения продукт питания представляет собой детскую смесь, содержащую липид или масло по изобретению. В настоящем документе "детская смесь" обозначает не существующую в природе композицию, которая, по меньшей мере, частично удовлетворяет потребности младенца в питательных веществах. "Младенец" обозначает субъекта-человека в возрасте от момента рождения до не более чем одного года и включает младенцев со скорректированным возрастом от 0 до 12 месяцев. Выражение "скорректированный возраст" обозначает хронологический возраст младенца минус количество времени, на которое младенец родился недоношенным. Таким образом, скорректированный возраст представляет собой возраст младенца, как если бы он родился доношенным. В настоящем документе "не существующий в природе" означает, что продукт не найден в природе, но создан вмешательством человека. В настоящем документе детская смесь по изобретению исключает чистое грудное молоко человека (Koletzko et al., 1988) и чистое молоко, выработанное животными, хотя детская смесь по изобретению может содержать компоненты, полученные из молока, такие как молочный белок или углеводы, например белок сыворотки или лактозу. Детская смесь по изобретению исключает встречающиеся в природе виды мяса, такие как телятина, мясо морских котиков, китовое мясо, или рыбу, хотя детская смесь по изобретению может содержать компоненты из указанных источников, такие как белки. Детская смесь по изобретению всегда содержит липид, содержащий ДПК по изобретению, предпочтительно на уровне от 0,05 до около 0,5 мас.% от общего содержания жирных кислот. ДПК может присутствовать в виде ТАГ, в виде фосфолипида или в виде незатерифицированной жирной кислоты или их смеси. Липид или масло по изобретению может быть введен в детскую смесь с применением способов, известных из уровня техники. Например, квалифицированный специалист может с легкостью получить детскую смесь по изобретению, в общем с применением способов, описанных в WO 2008/027991, US20150157048, US2015094382 и US20150148316, в которых ДПК добавляют в дополнение к или вместо одной или более полиненасыщенных жирных кислот, описанных в указанных документах.

В одном примере детская смесь содержит ДПК (т.е. омега-3 ДПК, как описано в настоящем документе), необязательно с пробиотиками, особенно полидекстрозой (ПДТ) и галактоолигосахаридами (ГОС), лактоферрин из источника, не принадлежащего к человеческому роду, и другие длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (ДЦ-ПНЖК). В некоторых вариантах реализации изобретения питательный состав дополнительно содержит СДК и/или гамма-линоленовую кислоту (ГЛК). В некоторых вариантах реализации изобретения детская смесь содержит до 7 г/100 кКал источника жиров или липидов, более предпочтительно от около 3 г/100 кКал до около 7 г/100 кКал источника жиров или липидов, причем источник жиров или липидов содержит по меньшей мере около 0,5 г/100 кКал, и более предпочтительно от около 1,5 г/100 кКал до около 7 г/100 кКал источника белка или эквивалента белка, более предпочтительно от около 1 г/100 кКал до около 7 г/100 кКал источника белка или источника эквивалента белка; и по меньшей мере около 5 г/100 кКал углевода, более предпочтительно от около 5 г до около 25 г/100 кКал углевода. Дополнительно детская смесь может содержать один или более или все из 1) по меньшей мере около 10 мг/100 кКал лактоферрина, более предпочтительно от около 10 мг/100 кКал до около 200 мг/100 кКал лактоферрина; 2) от около 0,1 г/100 кКал до около 1 г/100 кКал пробиотической композиции, содержащей ПДТ и ГОС; и 3) по меньшей мере около 5 мг/100 кКал дополнительной ДЦ-ПНЖК (т.е. ДЦ-ПНЖК, не являющейся ДПК), включая ДГК, более предпочтительно от около 5 мг/100 кКал до около 75 мг/100 кКал дополнительной ДЦ-ПНЖК, включая ДГК.

В варианте реализации изобретения соотношение ДПК:ДГК в общем содержании жирных кислот детской смеси составляет от 1:3 до 2:1. Кроме того, может присутствовать ЭПК, но предпочтительно она отсутствует. Если она присутствует, то соотношение ЭПК:ДПК в общем содержании жирных кислот предпочтительно составляет менее чем 1:2, более предпочтительно менее чем 1:5. Дополнительно, АРК может отсутствовать, но предпочтительно она присутствует, и предпочтительно соотношение АРК:ДПК в общем содержании жирных кислот составляет от 1:3 до 2:1. Более предпочтительно уровни каждой ДЦ-ПНЖК в детской смеси приблизительно такие же, как найдены в любом грудном молоке человека, которому от природы присущи вариации, в зависимости от возраста матери, генетических факторов, употребления с пищей и алиментарного статуса; например, см. Koletzko et al. (1988). В предпочтительном варианте реализации изобретения детская смесь не содержит обнаружимых уровней генэйкозапентаеновой кислоты (ГПК, 21:5 ω 3).

Детская формула может обозначать, например, жидкости, порошки, гели, пасты, твердые вещества, концентраты, суспензии или готовые к употреблению формы энтеральных смесей, пероральных смесей, смесей для младенцев.

Пробиотики, пригодные в соответствии с настоящим документом, могут включать полидекстрозу, порошок полидекстрозы, лактулозу, лактосахарозу, раффинозу, глюкоолигосахарид, инулин, фруктоолигосахарид, изомальтоолигосахарид, олигосахариды сои, лактосахарозу, ксилоолигосахарид, хитоолигосахарид, манноолигосахарид, арибиноолигосахарид, сиаллилолигосахарид, фукоолигосахарид, галактоолигосахарид и генциоолигосахариды.

Кроме того, лактоферрин может быть введен в питательный состав согласно настоящему документу. Лактоферрины представляют собой одноцепочечные полипептиды размером приблизительно 80 кДа, содержащие 1-4 гликана, в зависимости от вида. 3-D структура лактоферрина у различных видов в высокой степени сходна, но не идентична. Каждый лактоферрин содержит две гомологичные части, под названием N- и С-доли, что обозначает N-концевую и С-концевую часть молекулы соответственно.

Источник белка или эквивалента белка может быть любым, который применяется в уровне техники, например обезжиренное молоко, белок сыворотки, казеин, соевый белок, гидролизированный белок, аминокислоты и т.п. Источники белка из коровьего молока, пригодные согласно настоящему документу, включают, но не ограничиваясь этим, порошок молочного белка, концентраты молочного белка, изоляты молочного белка, сухие вещества обезжиренного молока, обезжиренное молоко, сухое обезжиренное молоко, белок сыворотки, изоляты белка сыворотки, концентраты белка сыворотки, сладкую сыворотку, кислую сыворотку, казеин, кислый казеин, казеинат (например, натрий казеинат, натрий кальций казеинат, кальций казеинат) и любые их комбинации.

Подходящие источники углеводов могут представлять собой любые, применяемые в уровне техники, например лактоза, глюкоза, фруктоза, сухие вещества кукурузного сиропа, мальтодекстрины, сахара, крахмал, сухие вещества рисового сиропа и т.п. Количество углеводного компонента в питательном составе составляет по меньшей мере около 5 г/100 кКал и обычно может варьировать от около 5 г до около 25 г/100 кКал. В некоторых вариантах реализации изобретения количество углевода составляет от около 6 г до около 22 г/100 кКал. В других вариантах реализации изобретения количество углевода составляет от около 12 г до около 14 г/100 кКал. В некоторых вариантах реализации изобретения сухие вещества кукурузного сиропа являются предпочтительными. Кроме того, может быть желательным введение в питательный состав гидролизированных, частично гидролизированных и/или высокогидролизированных углеводов за счет их легкой усвояемости. Конкретно, гидролизированные углеводы с меньшей вероятностью будут содержать аллергенные эпитопы. Неограничивающие примеры углеводных материалов, пригодных для применения согласно настоящему документу, включают гидролизированные или интактные, природные или химически модифицированные виды крахмала из кукурузы, тапиоки, риса или картофеля, в восковых или невосковых формах. Неограничивающие примеры подходящих углеводов включают различные виды гидролизованного крахмала, а именно гидролизированный кукурузный крахмал, мальтодекстрин, мальтозу, кукурузный сироп, глюкозу, сухие вещества кукурузного сиропа, глюкозу и различные другие полимеры глюкозы и их комбинации. Неограничивающие примеры других подходящих углеводов включают те, которые часто называют сахарозой, лактозой, фруктозой, кукурузным сиропом с высоким содержанием фруктозы, неусваиваемыми олигосахаридами, например фруктоолигосахаридами, и их комбинации.

Кроме того, один или более витаминов и/или минералов предпочтительно могут быть добавлены в детскую смесь в количествах, достаточных, чтобы удовлетворять ежедневные пищевые потребности субъекта. Обычному специалисту в данной области будет понятно, что потребность в витаминах и минералах будет варьировать, например, в соответствии с возрастом ребенка. Питательный состав необязательно может содержать, но не ограничиваясь этим, один или более из следующих витаминов или их производных: витамин В1 (тиамин, тиамин пироглутамат, ТПФ, тиамин трифосфат, ТТФ, тиамин гидрохлорид, тиамин монокитрат), витамин В2 (рибофлавин, флавин моноклеотид, ФМН, аденин флавин динуклеотид, ФАД, лактофлавин, овофлавин), витамин В3 (ниацин, никотиновая кислота, никотинамид, ниацинамид, никотинамид аденин динуклеотид, НАД, никотиновой кислоты моноклеотид, НикМН, пиридин-3-карбоновая кислота), прекурсор витамина В3, триптофан, витамин В6 (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин, пиридоксина гидрохлорид), пантотеновая кислота (пантотенат, пантенол), фолат (фолиевая кислота, фоламин, птероглутаминовая кислота), витамин В12 (кобаламин, метилкобаламин, дезоксиаденозилкобаламин, цианокобаламин, гидроксикобаламин, аденозилкобаламин), биотины, витамин С (аскорбиновая кислота), витамин А (ретинол, ретинил ацетат, ретинил пальмитат, эфиры ретинила и других длинноцепочечных жирных кислот, ретиналь, ретиноевая кислота, эфиры ретинола), витамин D (кальциферол, холекальциферол, витамин 3, 1,25-дигидроксивитамин D), витамин Е (α-токоферол, α-токоферола ацетат, α-токоферола сукцинат, α-токоферола никотинат, α-токоферол), витамин К (витамин К1, филлохинон, нафтохинон, витамин К2, менахинон-7, витамин К3, менахинон-4, менадион, менахинон-8, менахинон-8Н, менахинон-9, менахинон-9Н, менахинон-10, менахинон-11, менахинон-12, менахинон-13), холин, инозитол, β-каротин и любые их комбинации. Кроме того, питательный состав необя-

зательно может содержать, но не ограничиваясь этим, один или более из следующих минералов или их производных: бор, кальций, кальция ацетат, кальция глюконат, кальция хлорид, кальция лактат, кальция фосфат, кальция сульфат, хлорид, хром, хрома хлорид, хрома пиколинат, медь, меди сульфат, меди глюконат, меди сульфат, фторид, железо, железа карбонил, железа(II), железа(III), железа(III) ортофосфат, тритурация железа, железа полисахарид, йодид, йод, магний, магния карбонат, магния гидроксид, магния оксид, магния стеарат, магния сульфат, марганец, молибден, фосфор, калий, калия фосфат, калия йодид, калия хлорид, калия ацетат, селен, сера, натрий, натрия докунат, натрия хлорид, натрия селенат, натрия молибдат, цинк, цинка оксид, цинка сульфат и их смеси. Неограничивающие примеры производных минеральных соединений включают соли, щелочные соли, эфиры и хелаты любого минерального соединения. Минералы могут быть добавлены в питательные составы в форме солей, таких как кальция фосфат, кальция глицерилфосфат, натрия цитрат, калия хлорид, калия фосфат, магния фосфат, железа (II) сульфат, магния сульфат, меди сульфат, марганца сульфат и натрия селенат. Дополнительные витамины и минералы могут быть добавлены, как известно из уровня техники.

В варианте реализации изобретения детская смесь по изобретению или полученная в соответствии с изобретением, не содержит грудного молока человека или животного или экстракта из него, содержащего ДПК.

В другом варианте реализации изобретения уровень омега-6 ДПК в общем содержании жирных кислот детской смеси составляет менее чем 2, предпочтительно менее чем 1% или от 0,1 до 2%, более предпочтительно она отсутствует.

Композиции.

Настоящее изобретение дополнительно включает композиции, особенно фармацевтические композиции, содержащие одну или более жирных кислот и/или масел, полученных с применением способов по изобретению, предпочтительно в форме этиловых эфиров жирных кислот.

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 около 10 мг до около 1, 2, 5 или 10 г ежедневно (в виде одной или нескольких доз). Как известно из уровня техники, желательно вводить по меньшей мере около 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 может 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).

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 (ЖХ-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 mM 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 × 2,1 мм, 2,7 мкм, Supelco) в режиме бинарного градиента со скоростью потока 0,2 мл/мин. Подвижные фазы: А) 10 mM аммония формиата в смеси H₂O:метанол:тетрагидрофуран (50:20:30 об./об./об.); В) 10 mM аммония формиата в смеси H₂O: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 определяют с использованием 10 мкМ внешнего стандарта тристеарина.

Определение профиля липидов с помощью ЖХ-МС.

Экстрагированные общие липиды были проанализированы с применением ЖХ серии Agilent 1200, соединенной с устройством для ионизации электрораспылением (Agilent, Пало-Альто, Калифорния, США). Инъекцию 5 мкл каждого экстракта общих липидов разделяли хроматографически с помощью ВЭЖХ колонки Ascentis Express RP-Amide 50 × 2,1 мм, 2,7 мкм (Sigma-Aldrich, Касл-Хилл, Австралия) с применением бинарного градиента со скоростью потока 0,2 мл/мин. Подвижные фазы: А) 10 mM аммония формиата в H₂O:метаноле:тетрагидрофуране (50:20:30, об./об./об.); В) 10 mM аммония формиата в H₂O:метаноле:тетрагидрофуране (5:20:75, об./об./об.). Выбранные нейтральные липиды (ТАГ и ДАГ) и фосфолипиды (ФЛ, в том числе ФХ, ФЭ, ФИ, ФС, ФА, ФГ) были проанализированы с помощью мониторинга множественных реакций (ММР) с применением энергии столкновения 30 В и энергии фрагментации 60 В. Нейтральные липиды исследовали на предмет следующих основных жирных кислот: 16:0 (пальмитиновая кислота), 18:0 (стеариновая кислота), 18:1ω9 (олеиновая кислота, ОК), 18:2ω6 (линолевая кислота, ЛК), 18:3ω3 (α-линоленовая кислота, АЛК), 18:4ω3 (стеариноновая кислота, СДК), 20:1, 20:2, 20:3, 20:4ω3, 20:5ω3, 22:4ω3, 22:5ω3, 22:6ω3, в то время как фосфолипиды сканировали на предмет наличия молекул C₁₆, C₁₈, C₂₀ и C₂₂ с двойными связями 0-3, 0-4, 0-5, 4-6 соответственно.

Отдельные ММР ТАГ были идентифицированы на основе аммонизированного иона-прекурсора и иона продукта, образованного в результате потери нейтронов 20:1, СДК, ЭПК и ДГК. ТАГ и ДАГ количественно определяли с применением 50 мкМ тристеарина и дистеарина в качестве внешних стандартов. ФЛ количественно определяли с использованием 10 мкМ внешних стандартов ди-18:0-ФХ, ди-17:0-ФА, ди-17:0-ФЭ, 17:0-17:1-ФГ, ди-18:1-ФИ и ди-17:0-ФС (Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабама, США). Для выбранных видов ТАГ, ДАГ и ФЛ проводили дальнейшее подтверждение с помощью МС/МС 6520 Q-TOF.

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 около 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 (ПИД), 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: $\text{мас.}\% \text{ масла} = 100 \times ((41 \times \text{общее количество моль МЭЖК}/3) + (\text{общее количество грамм МЭЖК} - (15 \times \text{общее количество моль МЭЖК}))) / \text{грамм семени}$, где 41 и 15 - молекулярная масса остатка глицерида и метильной группы соответственно.

Анализ содержания стеролов в образцах масла.

Образцы около 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 × 0,1 мм внутренний диаметр, толщина пленки 0,1 мкм), ПИД 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.

Аmplification 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, MgSO₄ до конечной концентрации 2,5 mM, 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.

Определение количества копий трансгенов с помощью цифровой ПЦР.

Для определения количества копий трансгенов в трансгенном растении применяли метод ПЦР, как описано ниже. Кроме того, данный метод может быть применен для определения, является ли растение трансгенным по генетическим конструкциям, описанным в данном описании. Около квадратного сантиметра листовой ткани получают от каждого индивидуального растения и помещают в коллекционную микропробирку (Qiagen). Далее образцы сушат вымораживанием в течение 24-48 ч. Для разрушения образцов с целью экстракции ДНК, к каждому высушенному образцу добавляют шарики из нержавеющей стали, и пробирки встряхивают на лизаторе для тканей Qiagen. 375 мкл буфера для экстракции (0,1 М Трис-НСl, pH 8, 0,05 М ЭДТА, pH 8, и 1,25% НДС) добавляют в каждую пробирку, смеси инкубируют при 65°C в течение 1 ч и затем охлаждают перед добавлением 187 мкл 6 М аммония ацетата в каждую пробирку (4°C) при тщательном перемешивании. Далее образцы центрифугируют в течение 30 мин при 3000 об/мин. Супернатант из каждой пробирки переносят в новые микропробирки, каждая из которых содержит 220 мкл изопропанола, для осаждения ДНК при комнатной температуре в течение 5 мин. ДНК собирают центрифугированием пробирок при 3000 об/мин в течение 30 мин, гранулы ДНК промывают 320 мкл 70% этанола и сушат перед ресуспендированием ДНК в 225 мкл воды. Нерастворенный материал гранулируют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, и 150 мкл каждого супернатанта переносят на 96-луночные планшеты для длительного хранения.

Для эффективного и количественного проведения цифровой ПЦР (ddPCR) ДНК расщепляют рестрикционными ферментами перед проведением реакций амплификации, чтобы гарантировать физическое разделение нескольких копий трансгенов или множественных инсерций. Таким образом, аликвоты препаратов ДНК расщепляют с помощью EcoRI и BamHI, вместе взятых, в объеме 20 мкл, с применением 10× буфера EcoRI, 5 мкл ДНК и около 4 единиц каждого фермента на образец, с инкубацией протяжении на ночь при 37°C.

Праймеры, применяемые в этих реакциях ПЦР, были сконструированы с применением программного обеспечения Primer3, чтобы подтвердить, что предсказано отсутствие взаимодействия между праймерами для референтных генов и генов-мишеней, или такое взаимодействие не создает проблем при используемых условиях. Референтным геном в анализе был ген рапса Hmg (группа высокой подвижности), присутствующий в одном экземпляре в геноме рапса (Weng et al., 2004). Поскольку рапс является аллотетраплоидом, было допущено наличие 4 копий гена Hmg, т.е. 2 аллелей каждого из двух генов, в *Brassica napus*. В реакциях референтного гена применяли пару праймеров и содержащий двойную метку зонд, как указано ниже: смысловой праймер, GCGAAGCACATCGAGTCA (SEQ ID NO: 50); антисмысловой праймер, Can12 GGTGAGGTGGTAGCTGAGG (SEQ ID NO: 51); Hmg-P3 5'-Hex/TCTCTAC/zen/CCGTCTCACATGACGC/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO: 52). Размер продукта амплификации составлял 73 пары оснований.

В одной реакции амплификации гена-мишени, в ходе которой обнаруживали ген селекционного маркера ФФТ для скрининга всех трансгенных растений, смысловой праймер представлял собой Can17, ATACAAGCACGGTGGATGG (SEQ ID NO: 53); антисмысловой праймер, Can18 TGGTCTAACAGGTCTAGGAGGA (SEQ ID NO: 54); зонд, PPT-P3 5'-/FAM/TGGCAAAGA/zen/GATTTTCGAGCTTCCTGC/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO: 55). Размер данного продукта амплификации гена-мишени составлял 82 пары оснований. В некоторых случаях, параллельно выполняли второй анализ гена-мишени, чтобы обнаружить частичные инсерции Т-ДНК. В ходе такого второго анализа обнаруживали участок гена Δ6-десатуразы с помощью смыслового праймера, Can23 CAAGCACCGTAGTAAGAGAGCA (SEQ ID NO: 56), антисмыслового праймера, Can24 CAGACAGCCTGAGGTTAGCA (SEQ ID NO: 57); зонда, D6des-P3 5'-/FAM/TCCCCACTT/zen/CTTAGCGAAAGGAACGA/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO: 58). Размер данного продукта амплификации гена-мишени составлял 89 пар оснований. В реакциях шаблононо использовали 2 мкл расщепленных препаратов ДНК. Состав реакционной смеси на образец: референтный смысловой праймер (10 пМ), 1 мкл; референтный антисмысловой праймер (10 пМ), 1 мкл; зонд референтного гена (10 пМ), 0,5 мкл; смысловой праймер гена-мишени (10 пМ), 1 мкл; антисмысловой праймер гена-мишени (10 пМ), 1 мкл; зонд гена-мишени (10 пМ), 0,5 мкл; смесь реактивов ddPCR, 12,5 мкл; вода 5,5 мкл, в общем объеме 25 мкл.

Далее смеси помещали в генератор капелек QX100, который делил каждый образец на 20000 капелек в диапазоне нл. Это проделывали в 8-луночных картриджах до тех пор, пока все образцы не были обработаны и перенесены на 96-луночный ПЦР планшет. Затем планшет опечатывали термоусадочной прокалываемой фольгой с помощью устройства для запечатывания планшетов. После этого образцы обрабатывали со следующими условиями реакции: 95°C, 10 мин, подъем со скоростью 2,5°C/с; затем 39 циклов при 94°C, 30 с подъем со скоростью 2,5°C/с; 61°C, 1 мин, подъем со скоростью 2,5°C/с; 98°C, 10 мин, с последующим охлаждением до 12°C. После реакций амплификации ДНК в каплях, планшеты помещали на устройство для считывания капелек QX100, с помощью которого анализировали каждую капелку индивидуально с применением двухцветной системы обнаружения (набор для обнаружения

ФАМ или Нех). Цифровые данные ПЦР капельки рассматривали как 1-D график, на котором каждая капелька образца была нанесена на график интенсивности флуоресценции, или 2-D график, на который наносили флуоресценцию (ФАМ) против флуоресценции (Нех) для каждой капельки. С помощью программного обеспечения измеряли количество положительных и отрицательных капелек для каждого флюорофора (ФАМ или Нех) в каждом образце. Далее с помощью программного обеспечения аппроксимировали фракцию положительных капелек к алгоритму Пуассона, чтобы определить концентрацию целевой молекулы ДНК в единицах копий/мкл входа. Вариацию количества копий вычисляли с применением формулы: $CNV = (A/B) \cdot Nb$, где концентрация A = концентрация гена-мишени, B = концентрация референтного гена и $Nb = 4$, количество копий референтного гена в геноме.

Оценка жизнеспособности пыльцы.

Флуоресцеина диацетат (ФДА) растворяли в ацетоне в концентрации 2 мг/мл с получением запасного раствора. Разведения ФДА готовили непосредственно перед использованием, по каплям добавляя запасной раствор ФДА к 2 мл раствора сахарозы (0,5 М) до насыщения, на которое указывало появление устойчивой мутности.

Пропидия йодид (ПЙ) растворяли в стерильной дистиллированной воде в концентрации 1 мг/мл с получением запасного раствора. Непосредственно перед использованием 100 мкл запасного раствора добавляли к 10 мл стерильной дистиллированной воды с получением рабочего раствора. Для проверки соотношения жизнеспособной и нежизнеспособной пыльцы, запасные растворы ПЙ и ФДА смешивали в соотношении 2:3.

Растения рапса и горчицы, трансгенные и дикого типа, выращивали в стандартных условиях в теплице при $22 \pm 2^\circ\text{C}$ с фотопериодом 16 ч в сутки. Зрелые бутоны, которые были готовы раскрыться на следующий день, маркировали и собирали на следующее утро в 9-10 ч. Пыльцу из раскрытых цветков окрашивали смесью ФДА/ПЙ и визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica MZFLIII. Использовали эмиссионный фильтр с пропусканием в длинноволновой области спектра GFP-2 510 нм (пропускание красного и зеленого света) с фильтром возбуждения 480/40 нм для обнаружения жизнеспособной и нежизнеспособной пыльцы. Нежизнеспособная пыльца, которая захватывала краситель ПЙ, имела красный цвет под флуоресцентным микроскопом, тогда как жизнеспособная пыльца при окрашивании ПЙ и ФДА имела ярко-зеленый цвет.

Пример 2. Стабильная экспрессия трансгенного пути ДГК в семенах *Camelina sativa*.

Бинарный вектор rJP3416-GA7 (см. фиг. 2 и SEQ ID NO: 1) 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 и Kang, 2008). После выращивания и созревания растений урожай семян T_1 с обработанных растений собирают, высевая 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 rJP3416-GA7. Выжившие растения T_1 , толерантные к гербициду, выращивают до состояния зрелости после того, как им давали возможность самооплодотворения, и собирают урожай образовавшегося семени T_2 . Пять трансгенных растений были получены, только три из них содержали полную Т-ДНК.

Липид экстрагируют из пула около 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 около 4,7% ДГК. Таким образом, липид был извлечен от 10 индивидуальных семян T_2 данного растения, и состав жирных кислот проанализирован методом ГХ. Данные относительно состава жирных кислот индивидуальных семян для данной трансформированной линии также приведены в табл. 4. Компилированные данные из профилей (табл. 4) общего липида семян приведены в табл. 5.

ДГК присутствовала в шести из 10 индивидуальных семян. Четыре другие семени не содержали ДГК и были приняты в качестве нулевых сегрегантов, не содержащих Т-ДНК, на основании гемизиготности инсерции 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%.

Таблица 4

Состав жирных кислот общего липида семян из трансгенных семян T₂ Camelina sativa, трансформированных Т-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 уровня ДГК

Жирная кислота	Пул FD5.46	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
14:0	0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
16:0	11,6	12,1	12,3	12,1	13,2	12,3	12,8	11,9	11,4	11,5	11,7
16:1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2
16:3	0,3	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	3,7	3,3	3,2	3,2	3,0	3,1	3,2	3,3	3,1	3,2	3,2
18:1	10,8	8,0	8,0	8,6	8,5	9,4	11,0	10,2	8,3	9,4	8,6
18:1Δ11	1,7	1,3	1,4	1,4	1,7	1,4	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3
18:2	24,7	18,2	19,5	19,2	18,5	20,1	23,8	32,2	30,3	29,8	31,6
18:3ω3	27,4	26,7	26,6	27,3	28,9	28,2	27,4	28,3	29,2	29,5	28,2
18:3ω6	0,2	1,4	0,3	0,3	0,4	0,2	0,5	0,0	0,5	0,4	0,6
20:0	1,6	1,4	1,3	1,4	1,2	1,4	1,4	1,8	2,1	1,9	2,0
18:4ω3	2,2	6,8	6,4	5,7	7,2	5,7	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:1Δ11	5,3	4,4	4,6	4,8	3,3	4,1	3,5	4,4	6,1	5,8	5,5
20:1iso	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
20:2ω6	0,8	0,8	0,9	0,8	0,6	0,8	0,7	1,3	1,5	1,4	1,4
20:3ω3	0,6	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6
22:0	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6
20:4ω3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1	1,1	1,1	1,2	1,1	0,5	0,9	0,8	1,6	2,2	1,9	2,0
20:5ω3	0,7	1,3	1,6	1,5	1,6	1,1	1,7	0,0	0,0	0,0	0,1
22:2ω6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,2	0,2
22:4ω6+22:3ω3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,6	0,5	0,5
24:0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,4	0,4	0,4
24:1	0,3	0,4	0,4	0,3	0,0	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
22:5ω3	0,3	1,1	1,2	1,1	1,1	0,9	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
22:6ω3	4,7	9,0	8,5	8,3	8,3	7,1	4,9	0,0	0,0	0,0	0,0

Таблица 5

Компилированные данные из профилей общего липида семян для трансгенного семени, приведенного в табл. 4. Вычисления не включают "незначительных жирных кислот", включенных в табл. 4

Параметр	Пул FD5.46	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
Общие $\omega 3$ (% от общих ЖК)	36,1	46	45,4	45	48,2	44,2	40,1	28,9	29,9	30,2	28,9
Общие $\omega 6$ (% 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 $\omega 3/\omega 6$	1,40	2,25	2,19	2,22	2,47	2,09	1,60	0,86	0,92	0,95	0,86
Соотношение $\omega 6/\omega 3$	0,71	0,44	0,46	0,45	0,40	0,48	0,62	1,17	1,09	1,05	1,17
Общие новые $\omega 3$ (% от общих ЖК)	8,1	18,5	18	16,9	18,6	15,2	12	0	0	0	0,1
Общие новые $\omega 6$ (% от общих ЖК)	1,1	2,2	1,2	1,1	1	1	1,2	1,5	2,3	2	2,2
Соотношение новых $\omega 3/\omega 6$	7,36	8,41	15,00	15,36	18,60	15,20	10,00				0,05
Соотношение новых $\omega 6/\omega 3$	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 C20	9,6	9,3	9,8	9,9	8,1	8,9	8,5	8,6	11	10,3	10,1
Общие C22	5,4	10,3	10	9,7	9,4	8,3	5,7	0,6	0,9	0,7	0,7
Соотношение Общие C20/C22	1,78	0,90	0,98	1,02	0,86	1,07	14,9	14,33	12,22	14,71	14,43

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. Последующее поколение (Т5) было получено с целью дополнительного тестирования стабильности выработки ПНЖК на протяжении нескольких поколений, особенно ДГК. Обнаружено, что наблюдаемые максимальные уровни ДГК были стабильными в пятом поколении, даже несмотря на то, что содержание ДГК в пуле семени не стабилизировалось до поколения Т4 из-за присутствия многочисленных трансгенных локусов. Дополнительно, партии семени Т5 проращивали на средах MS *in vitro* вместе с семенем материнской *S. sativa*, причем очевидных различий в эффективности или скорости прорастания не наблюдалось. Дальнейшие поколения трансгенной линии (поколения Т6, Т7 и т.д) не проявляли снижения уровня ДГК в семени. Трансгенные растения обладали полноценной мужской и женской фертильностью, и пыльца продемонстрировала около 100% жизнеспособности относительно растений дикого типа. Анализ содержания масла в семенах, содержащих различные уровни ДГК, не выявил корреляции между уровнем ДГК и содержанием масла, в противоположность корреляции, наблюдаемой для *Arabidopsis thaliana*.

В нескольких дальнейших трансгенных линиях, содержание ДГК в отдельных семенах от независимых событий превышало 12%. Соотношение трансгенных:нулевых для этих линий составляло около от 3:1 до 15:1. Анализ характерных профилей жирных кислот для образцов с наиболее высоким содержанием ДГК от каждой конструкции выявил только 1,2-1,4% ГЛК при отсутствии других новых $\omega 6$ РНЖК. И наоборот, было обнаружено, что новые $\omega 3$ ПНЖК (СДК) $\omega 3$ ДЦ-ПНЖК (ЭТК, ЭПК, ДПК,

ДГК) аккумулируются до 18,5% при уровне ДНК 9,6% в общем содержании жирных кислот. Степень $\Delta 6$ -десатурации составляла 32%, и содержание ЭПК составляло 0,8% от общего содержания жирных кислот. Эффективность $\Delta 5$ -элонгации составляла 93%, и эффективность $\Delta 6$ -элонгации составляла 60%. ДГК была обнаружена в полярной фракции липидов семени линий GA7.

Было отмечено, что наблюдаемые соотношения сегрегации (от ~3:1 до ~15:1) указывают на то, что один или максимум два трансгенных локуса были необходимы для выработки ДГК в *S. sativa* на уровнях, подобных уровням в рыбьем жире. Это имеет важное значение для простоты разведения трансгенного признака, а также для стабильности трансгена.

Гомозиготное семя высаживают в несколько теплиц с целью получения в сумме свыше 600 индивидуальных растений. Масло экстрагировали из семени с применением различных способов, в том числе аппарата Сокслета, экстракции ацетоном и гексаном.

Проводили ^{13}C ЯМР анализ региоспецифичности для масла семени трансгенной *S. sativa* с целью определения позиционного распределения $\omega 3$ ДЦ-ПНЖК в ТАГ. Событие с около равным содержанием ЭПК и ДГК было выбрано для максимизации ответа на данные жирные кислоты, причем соотношение sn-1,3 к sn-2 было найдено на уровне 0,75:0,25 для ЭПК и 0,86:0,14 для ДГК, притом, что объективное распределение должно было бы составлять 0,66:0,33. Т.е. 75% ЭПК и 86% ДГК были расположены в положении sn-1,3 ТАГ. Это показывает, что обе жирные кислоты были предпочтительно локализованы в положениях ТАГ *S. sativa*, хотя предпочтение для ЭПК было выражено слабее, чем для ДГК. Тот факт, что ДГК была предпочтительно найдена в sn-1,3, был сходен с результатами, о которых ранее сообщалось для семени *A. thaliana* (Petrie et al., 2012).

Поскольку количество независимых трансгенных линий, полученных в раскрытых выше экспериментах с трансформацией, было низким, дальнейшие трансформации *S. sativa* были осуществлены с применением конструкции мотива GA7-modB (пример 3). Получено большее количество трансформантов, и идентифицированы гомозиготные линии, вырабатывающие ДГК в количестве более 20,1%.

Пример 3. Модификации Т-ДНК, кодирующих пути ДГК в семенах растений.

Для улучшения уровня выработки ДГК в *B. napus* по сравнению с уровнями, описанными в WO2013/185184, бинарные векторы pJP3416-GA7-modA, pJP3416-GA7-modB, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416-GA7-modE и pJP3416-GA7-modF были сконструированы, как описано в WO2013/185184, и протестированы на трансгенных растениях. Эти бинарные векторы представляют собой варианты конструкции pJP3416-GA7 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 $\Delta 6$ 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 pJP3416-GA7, были поменены местами на Т-ДНК, с получением pJP3416-GA7-modA первым клонированием новой кассеты $\Delta 6$ -элонгазы *P. cordata* между сайтами SbfI pJP3416-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 конплинина Cnl2 (pLuCnl2), чтобы получить pJP3416-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.

Получены 8 трансгенных событий pJP3416-GA7-modB *A. thaliana* и 15 трансгенных событий pJP3416-GA7-modG *A. thaliana*. Наблюдается от 3,4 до 7,2% ДГК в пуле семени pJP3416-GA7-modB и от 0,6 до 4,1% ДГК в пуле семени T2 pJP3416-GA7-modG. Некоторые из событий pJP3416-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 30% 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.

Конструкцию pJP3416-GA7-modB дополнительно применяли для генерации трансформированных растений *B. napus* сорта Oscar и серии сортовых линий, обозначенных NX002, NX003, NX005, NX050, NX052 и NX054. Всего было получено 1558 трансформированных растений, включая 77 независимых трансформированных растений (T0) для трансформации Oscar, и 1480 независимых растений для сортовых линий, включая 189 для NX005, которая представляет собой линию с высоким содержанием олеиновой кислоты в масле семян благодаря мутациям в генах FAD2. Другие сортовые линии содержали более высокие уровни ЛК и АЛК. Трансгенные растения, которые продемонстрировали более 4 копий Т-ДНК по данным метода цифровой ПЦР (пример 1), были отброшены; около 25% растений T0 было отброшено по данному критерию. Около 53% трансгенных растений T0 содержали 1 или 2 копии Т-ДНК, по данным

метода цифровой ПЦР, 12% содержали около 3 копии, и 24% - 4 или более копий. Урожай семян (семя Т1) был собран около с 450 трансгенных линий после самоопыления, достигнутого путем изолирования растений мешочками во время цветения, чтобы избежать скрещивания. Урожай семян Т1 собран с остальных трансгенных растений после созревания. Около 1-2% линий растений были стерильными с точки зрения мужской или женской фертильности и не давали жизнеспособных семян; такие растения Т0 были отброшены.

Пулы семени (по 20 семян Т1 в каждом пуле) тестировали на предмет уровней ДГК в пуле масла семян, и линии, которые продемонстрировали самые высокие уровни, отбирали. В частности, были отобраны линии с содержанием ДГК по меньшей мере 2% от общего содержания жирных кислот в пуле семян Т1. Около 15% трансгенных линий было отобрано таким образом; остальные 85% были отброшены. Некоторые из них были обозначены как линии СТ132-5 (сорт Oscar), СТ133.15-15, -24, -63, -77, -103, -129 и -130 (в NX005). Отобранные линии в NX050 включали СТ136-4, -8, -12, -17, -19, -25, -27, -49 и -51. Обеспечивали набухание двадцати семян из отобранных линий, включая СТ132.5 и 11 семян СТ133.15, и через два дня экстрагировали масло из половины семян каждого из индивидуальных семян. Вторую половину семян 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. 6. 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.

Двадцать или 40 индивидуальных семян (семена Т2), полученных от каждого из множества растений Т1 после самоопыления, от отобранных трансформированных линий, индивидуально тестировали на предмет состава жирных кислот. Были идентифицированы семена, содержащие уровни ДГК выше 20% (табл. 7). Два репрезентативных образца, СТ136-27-18-2 и СТ136-27-18-19, содержали 21,2 до 22,7% ДГК соответственно. Общее содержание $\omega 3$ жирных кислотных в этих семенах составило около 60% как процент от общего содержания жирных кислот, и содержание $\omega 6$ составило менее чем 10%. Другие наборы по 20 или 40 семян Т2 от каждого из растений Т1 тестировали на предмет состава жирных кислот. Семена, содержащие до 34,3% ДГК, были идентифицированы, например, среди семени СТ136-27-47-25 (табл. 9). Состав жирных кислот для масла семян, полученного из СТ136-27-47-25, приведен в табл. 9. Состав жирных кислот включал 34,3% ДГК, вместе с около 1,5% ДПК, 0,6% ЭПК и 0,5% ЭТК. Уровень СДК составлял около 7,5%, АЛК - около 21,9%, и ЛК - около 6,9%. Новые $\omega 6$ ПНЖК продемонстрировали 1,1% ГЛК, при отсутствии обнаружимых $\omega 6$ -С20 или -С22 ДЦ-ПНЖК. Общие насыщенные жирные кислоты: 9,6%; мононенасыщенные жирные кислоты, 12,5%; общие ПНЖК, 75,2%; общие $\omega 6$ ПНЖК (включая ЛК), 7,2%; общие $\omega 3$ ПНЖК, 66,9%; соотношение общего содержания $\omega 6$: $\omega 3$ жирных кислот, 9,3:1; новые $\omega 6$:новые $\omega 3$ жирные кислоты, 37:1. Эффективность каждой из стадий ферментации от олеиновой кислоты к ДГК была такой, как указано ниже: $\Delta 12$ -десатураза, 90%; $\Delta 15/\omega 3$ -десатураза, 89%; $\Delta 6$ -десатураза, 67%; $\Delta 6$ -элонгаза, 83%; $\Delta 5$ -десатураза, 99%; $\Delta 5$ -элонгаза, 98%; $\Delta 4$ -десатураза, 96%. Общая эффективность превращения олеиновой кислоты в ДГК составила около 50%. Таким образом, было очевидно, что семена, вырабатывающие ДГК в диапазоне 20,1-35% от общего содержания жирных кислот в масле семян могли бы быть идентифицированы и отобраны, в том числе семена, содержащие от 20,1 до 30% ДГК или от 30 до 35% ДГК в общем содержании жирных кислот.

Содержание масла в некоторых семенах было снижено от около 44% в семенах дикого типа до около 31-39% в некоторых из вырабатывающих ДГК семян, но было сходным с уровнями дикого типа в других вырабатывающих ДГК семенах.

Различные трансформированные линии растений, которые вырабатывали ДГК на уровнях по меньшей мере 10% в семени Т2, скрещивали и добивались самоопыления потомства F1, чтобы получить потомство F2, гомозиготное по множественным инсерциям Т-ДНК. Масло семян из гомозиготного семени проанализирован и обнаружили, что ДГК составляет 30 или 35% от общего содержания жирных кислот в масле семени.

ТАГ в масле, полученном из СТ136-27-18-2 и СТ136-27-18-19, проанализировали региоспецифичным методом ^{13}C ЯМР на предмет позиционного распределения ДГК в глицериновой основе молекул ТАГ. ДГК была преимущественно присоединена в положении sn-1,3. Более чем 70%, фактически более чем 90% ДГК находилось в положении sn-1,3.

В нескольких дальнейших трансгенных линиях содержание ДГК в индивидуальных семенах от независимых событий превышало 12%. Соотношение трансгенных:нулевых для этих линий составляло около 3:1, что соответствовало одному трансгенному локусу, или 15:1, что соответствовало двум трансгенным локусам. Анализ характерных профилей жирных кислот для образцов от каждой конструкции с наиболее высокими уровнями ДГК выявил только 1,2-1,4% ГЛК при отсутствии других обнаружимых

новых $\omega 6$ ПНЖК. В противоположность этому, новые $\omega 3$ ПНЖК (СДК) и $\omega 3$ ДЦ-ПНЖК (ЭТК, ЭПК, ДПК, ДГК) аккумулировались до суммарного уровня 25,8% для конструкции modF и 21,9% для конструкции modG, по сравнению с 18,5% для GA7-трансформированного семени. Уровни ДГК в масле из этих семян составляли 9,6, 12,4 и 11,5% соответственно. Степень $\Delta 6$ -десатурации была ниже в GA7-трансформированных семенах, чем в modF- и modG-трансформированных семенах (32% против 47% и 43%), что приводило к снижению уровня АЛК в семенах modF и modG, по сравнению с GA7. Другим значимым отличием была аккумуляция ЭПК в семени modF (3,3% против 0,8% в двух других трансгенных семенах), и это отображалось в снижении степени $\Delta 5$ -элонгации, наблюдаемом в семени modF (80%), по сравнению с семенами GA7 и modG (93 и 94%). Наблюдалось небольшое увеличение степени $\Delta 6$ -элонгации в этих семенах (66% против 60 и 61%), хотя количество СДК фактически увеличивалась вследствие несколько более активной $\Delta 6$ -десатурации. ДГК была обнаружена в полярной фракции липидов семени линий GA7.

Проанализирован состав жирных кислот в липиде семени T1 для 70 независимых трансгенных растений *V. parus* сортовой линии NX54, трансформированной конструкцией modB Т-ДНК. Обнаружено, что одно из этих трансгенных растений дает семя, содержащее ДПК, но в масле семян ДГК отсутствовала. В семени T1 данной линии (СТ-137-2) вырабатывалось около 4% ДПК, при отсутствии обнаружимой ДГК в пуле семени T1. Изобретателями был изучен вопрос о том, вызвано ли это инактивацией гена $\Delta 4$ -десатуразы в конкретной инсерционной Т-ДНК в результате спонтанной мутации. Анализ методом ПЦР и секвенирование ДНК показали присутствие делеции, которая была определена как удаленные нуклеотиды 12988-15317 Т-ДНК мотива GA7-modB (SEQ ID NO: 2). Удаленные нуклеотиды соответствуют части промотора Linus Cn12, направляющего экспрессию участка кодирования $\Delta 4$ -десатуразы, а также самого по себе участка кодирования $\Delta 4$ -десатуразы, объясняя, почему семена, трансформированные Т-ДНК и содержащие делецию, не вырабатывали ДГК.

Около 50 семян T1 от данной трансгенной линии проростили, и один появившийся котиледон из каждого проанализировали на предмет состава жирных кислот в остаточном масле. Отобранные саженцы, демонстрирующие более чем 5% ДПК, в дальнейшем были выращены до состояния зрелости, и собран урожай семени T2. Состав жирных кислот в пуле семени проиллюстрирован в табл. 8, причем в этих линиях наблюдалось более чем 7% ДПК. Семя T4 было получено от линии СТ-137-2 ДПК *V. parus* и проанализировано на предмет профиля жирных кислот. До 13% ДПК наблюдалось в пуле образцов зрелого семени.

Масло из семян, которое содержало около 10% ДПК, обрабатывали мягкой щелочью для гидролиза жирных кислот.

Другая трансгенная линия, обозначенная B0003-514, демонстрировала около 10-16% ДПК в семени T2. Было отобрано семя, содержащее 15,8% ДПК, 0,2-0,9% ДГК и 0,1-2,5% ЭПК. Популяция семени T2 демонстрировала соотношение сегрегации 1:2:1 для высокого содержания:низкого содержания:отсутствия ДПК, указывая на присутствие одинарного генетического локуса для выработки ДПА в указанной трансгенной линии.

Масло было экстрагировано с помощью винтового пресса из образцов семян, вырабатывающих ДЦ-ПНЖК, с получением таким образом жмыха.

Дизайн конструкции.

Хотя фокус данного эксперимента находился на демонстрации выработки ДГК и ДПК в видах масличной культуры, отмеченные выше результаты также были интересными с точки зрения перспективы дизайна конструкции. Во-первых, переключение локализации участка, кодирующего $\Delta 6$ - и $\Delta 5$ -элонгазу в конструкции modF приводит к предусмотренным модификациям профиля, когда аккумулируется больше ЭПК вследствие более низкой степени $\Delta 5$ -элонгации.

Сопутствующее увеличение степени $\Delta 6$ -элонгации наблюдалось, но не приводило к более низким уровням СДК. Это было результатом повышения степени $\Delta 6$ -десатурации в трансформированном modF семени, вызванной добавлением дополнительной экспрессионной кассеты $\Delta 6$ -десатуразы *M. pusilla*, а также заменой укороченного промотора напина (FP1) более активным промотором конглинина 2 льна. Несколько менее выраженное повышение степени $\Delta 6$ -десатурации, наблюдаемое в случае конструкта modG, было вызвано капитализацией на кассете $\Delta 5$ -элонгазы с высокой экспрессией в GA7. Переключение положений участков, кодирующих $\Delta 6$ -десатуразу и $\Delta 5$ -элонгазу, приводило к более высокой степени $\Delta 6$ -десатурации. Активность $\Delta 5$ -элонгазы не снижалась в этом случае благодаря замене промотора FP1 промотором Cn12.

Эти данные подтверждают, что конструкции modB, modF и modG эффективны с точки зрения выработки ДГК в семени *Camelina*, относительно *Arabidopsis* и рапса.

Авторы изобретения считали, что, в общем, эффективность ограничивающей скорость ферментной активности в биохимическом пути ДГК может быть более высокой в мультикопийных Т-ДНК трансформантах, по сравнению с однокопийными Т-ДНК трансформантами, или может быть увеличена путем инсерции в Т-ДНК нескольких генов, кодирующих фермент, который может быть ограничивающим в биохимическом пути. Доказательства возможной важности мультикопийных трансформантов наблюда-

лись в семенах *Arabidopsis*, трансформированных конструкцией GA7, в которых событие с наиболее высоким выходом ДГК содержало три инсерции Т-ДНК в геноме хозяина. Несколько генов могут быть идентичными, или предпочтительно представляют собой различные варианты, которые кодируют один и тот же полипептид или находятся под контролем различных промоторов с перекрывающимися паттернами экспрессии. Например, повышенная экспрессия может быть достигнута путем экспрессии нескольких участков, кодирующих $\Delta 6$ -десатуразу, даже если вырабатывается один и тот же белок. Например, в rJP3416-GA7-modF и rJP3416-GA7-modC, две версии $\Delta 6$ -десатуразы *M. pusilla* присутствовали и экспрессировались различными промоторами. В кодирующих последовательностях кодоны использовались по-разному и, таким образом, их нуклеотидные последовательности были различными, чтобы снизить потенциал сайленсинга или эффекты косупрессии, но приводили к выработке одного и того же белка.

Таблица 6

Состав жирных кислот липида при прорастании трансгенных семян T1 *B. napus*, содержащих Т-ДНК из конструкции GA7-modB. Липиды дополнительно содержали по 0,1-0,3% каждой из C16:1, C16:3, C24:0 и C24:1 и не содержали C20:1 Δ 11

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

Таблица 7

Состав жирных кислот липида в трансгенных семенах T2 *B. napus*, содержащих Т-ДНК из конструкции GA7-modB

Образцы (семя T2)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1 Δ 11	C18:2	C18:3 ω 6	C18:3 ω 3	C18:4 ω 3	C20:1 Δ 11	C20:2 ω 6	C20:3 ω 3	C20:4 ω 3	C20:5 ω 3	C22:5 ω 3	C22:6 ω 3	Всего ω 3 (%)	Всего ω 6 (%)	Соотношение ω 6 и ω 3	Общие содержание ЛНЖК (%)
СТ136-27-18-1	5,0	2,6	25,4	3,6	6,7	0,2	37,5	1,4	1,0	0,1	2,1	0,8	0,4	0,9	10,2	53,4	7,1	0,13	60,5
СТ136-27-18-2	7,1	2,8	16,9	4,3	5,5	0,4	29,1	5,4	0,8	0,1	1,2	0,5	0,5	1,9	21,2	59,8	6,1	0,10	66,0
СТ136-27-18-3	5,4	2,5	26,5	3,8	6,4	0,4	26,4	4,7	1,0	0,1	0,7	1,1	0,6	1,2	17,3	52,0	6,9	0,13	58,9
СТ136-27-18-4	5,3	2,4	34,7	4,0	5,9	0,3	30,3	1,3	1,1	0,1	1,1	1,5	0,3	0,4	9,3	44,4	6,3	0,14	50,7
СТ136-27-18-5	4,8	2,7	34,5	3,8	5,6	0,3	23,5	3,9	1,2	0,1	0,7	1,1	0,5	1,1	14,2	45,1	6,0	0,13	51,1
СТ136-27-18-6	5,0	2,1	54,3	3,8	5,7	0,2	18,2	0,6	1,5	0,1	1,1	0,7	0,1	0,2	4,4	25,5	6,1	0,24	31,5
СТ136-27-18-7	5,3	2,1	43,8	4,2	5,6	0,4	18,3	2,2	1,3	0,2	0,6	1,5	0,4	0,5	11,6	35,2	6,2	0,18	41,4
СТ136-27-18-8	5,4	2,7	25,8	4,1	6,7	0,4	26,6	5,7	1,0	0,1	0,6	1,3	0,6	1,2	15,8	51,9	7,1	0,14	59,0
СТ136-27-18-9	4,6	1,6	53,8	3,7	17,5	0,5	9,2	0,5	1,6	0,3	0,6	0,4	0,1	0,1	3,7	14,5	18,3	1,26	32,8
СТ136-27-18-10	4,8	2,4	44,1	3,7	5,4	0,4	19,1	2,3	1,1	0,1	0,6	1,5	0,5	0,8	11,4	36,1	5,9	0,16	42,0
СТ136-27-18-11	5,1	2,2	48,3	4,1	10,9	0,7	12,5	1,2	1,3	0,2	0,5	1,5	0,3	0,3	9,1	25,3	11,8	0,47	37,1
СТ136-27-18-12	5,3	2,7	23,3	3,7	6,0	0,4	27,9	4,9	0,9	0,1	0,7	1,3	0,8	1,5	18,5	55,7	6,6	0,12	62,2
СТ136-27-18-13	5,5	3,4	30,7	5,6	5,1	0,4	23,1	3,5	1,1	0,1	1,2	1,1	0,6	1,2	14,9	45,8	5,5	0,12	51,3
СТ136-27-18-14	5,4	2,3	23,9	3,5	6,0	0,4	30,1	3,7	1,0	0,1	1,0	0,7	0,6	1,2	18,2	55,5	6,6	0,12	62,1
СТ136-27-18-15	5,0	2,3	45,4	4,0	5,3	0,4	16,2	2,3	1,2	0,1	0,5	1,9	0,6	0,7	12,3	34,4	5,8	0,17	40,3
СТ136-27-18-18	5,1	2,3	29,0	3,6	5,7	0,4	26,5	3,8	1,1	0,2	0,8	0,8	0,6	1,0	17,4	50,8	6,3	0,12	57,1
СТ136-27-18-19	5,8	2,3	19,7	4,2	6,7	0,7	23,7	7,7	0,9	0,1	0,4	0,7	0,6	1,7	22,7	57,6	7,5	0,13	65,1
СТ136-27-18-20	5,7	2,9	23,2	4,0	5,6	0,3	35,8	2,4	1,0	0,1	1,3	1,1	0,5	1,0	13,0	55,1	6,1	0,11	61,2

АРК (C20:4 ω 6) и ДПК ω 6 не были обнаружены ни в одном из образцов. Кроме того, образцы содержали 0,1% C14:0, около 0,2% или 0,3% C16:1, около 0,1-0,3% C16:3, от около 0,7% до 1,0% C20:0, около 0,3% C22:0, причем некоторые образцы содержали следовые количества (< 0,1%) C20:1 Δ 13, C22:3 ω 3, C24:0 и C24:1

Таблица 8

Состав жирных кислот липида в трансгенных семенах T2 B. napus, трансформированных T-ДНК из конструкции GA7-modB, с мутацией в гене Δ4-десатуразы. Липиды дополнительно содержали около 0,1% 14:0, 0,2% 16:3, 0,2-0,4% ГЛК, 0,1% 20:1Δ13, 0,3-0,4% 22:0, а АРК, ДРАω6 (22:5ω6), 16:2 и 22:1 не были обнаружены

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:2ω6	C22:3ω3	C24:0	C24:1	C22:5ω3	C22:6ω3
СТ-137-2-34	5,3	0,2	3,7	26,8	3,1	12,4	29,1	0,8	2,5	0,8	0,1	0,0	1,1	1,7	0,8	0,0	0,1	0,1	0,1	10,0	0,0
СТ-137-2-38	5,3	0,2	4,2	24,4	3,0	12,6	29,4	0,9	2,5	0,8	0,1	0,0	1,3	2,2	0,9	0,0	0,1	0,2	0,1	10,8	0,0
СТ-137-2-48	5,0	0,2	4,2	24,1	3,1	11,9	31,0	0,9	2,4	0,9	0,1	0,0	1,5	2,0	1,0	0,0	0,1	0,1	0,1	10,5	0,0
СТ-137-2-51	5,7	0,2	4,6	22,3	3,4	12,3	34,5	1,0	2,0	0,8	0,1	0,0	1,9	1,2	0,5	0,0	0,1	0,2	0,2	7,9	0,0
СТ-137-2-59	5,4	0,2	3,9	25,7	3,4	12,9	27,8	0,9	2,6	0,8	0,1	0,0	1,0	1,9	0,9	0,0	0,1	0,2	0,1	11,0	0,0

Таблица 9

Состав жирных кислот масла из семени T2 B. napus, трансформированного T-ДНК из мотива GA7-modB

C16:0	C18:0	C18:1Δ9	C18:1Δ7	C18:2ω6	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	C20:1ω9c	C20:2ω6 + C21:0	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:5ω3	C22:6ω3
6.3	2.4	8.4	3.1	6.9	1.1	21.9	0.7	7.5	0.7	0.1	0.5	0.5	0.6	0.2	34.3

Образцы масла из семян дополнительно содержали 0,1% C14:0; 0,2% C16:1; 0,1% C20:3ω6; не содержали C22:1 и C22:2ω6; содержали 0,1% C24:0 и 0,2% C24:1, 2,6% других жирных кислот.

Пример 4. 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 около из 200 мг семени, вначале раздавливая его под слоем гексана, с последующим переносом давленного семени в стеклянную пробирку, содержащую 10 мл гексана. Пробирку нагревают около 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. В противоположность этому, ТАГ из вырабатывающих АРК семян продемонстрировали, что 50% АРК (20:4Δ^{5,8,11,4}) расположены в положении sn-2 масла трансгенного рапса, тогда как ожидаемая величина для случайного распределения составляет только 33% (Petrie et al., 2012).

Дополнительно, общий липид из трансгенного семени A. thaliana был проанализирован ЖХ-МС с тройной квадрупольной линзой, чтобы определить основные ДГК-содержащие разновидности триацилглицерида (ТАГ). 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 обнаруживаемыми 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 5. 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-спектроскопии лабораторных стандартов. Количество стеролов определяют с использованием внутреннего стандарта 5β(H)-холан-24-ола. Базовая структура фитостерина и химическая структура некоторых из идентифицированных стеролов проиллюстрированы на фиг. 3 и в табл. 10.

Анализировали растительные масла кунжута (Sesamum indicum), маслины (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 β-ситостерол (интервал 28-55% от общего содержания стеролов), Δ5-авенастерол (изофукостерол) (3-24%), кампесте-

рол (2-33%), Δ^5 -стигмастерол (0,7-18%), Δ^7 -стигмастерол (1-18%) и Δ^7 -авенастерол (0,1-5%). Были идентифицированы несколько других минорных стеролов: холестерин, brassicaстерол, 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.

Таблица 10

Названия по ИЮПАК/систематические названия идентифицированных стеролов

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

Содержание стеролов, выраженное как мг/г масла, в порядке уменьшения количества было следующим: 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), касторовое масло (1,9 мг/г). Состав стеролов в % и общее содержание стеролов приведены в табл. 11.

В общем, среди всех образцов масла из семян основным фитостерином был β -ситостерол (интервал 30-57% от общего содержания стеролов). Для масел наблюдался широкий интервал доли других основных стеролов: кампэстерол (2-17%), Δ^5 -стигмастерол (0,7-18%), Δ^5 -авенастерол (4-23%), Δ^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 Δ^7 -стигмастерола (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.

Сравнивали по два образца из подсолнечника и сафлора, в каждом случае один из них 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 имели подобный состав стеролов и общее содержание стеролов, указывая на то, что обработка и рафинация оказывают небольшое влияние на эти два параметра. Содержание стеролов варьировало в три раза между образцами и находилось в диапазоне от 1,9 до 6,8 мг/г. Масло рапса имело самое высокое, а касторовое масло - самое низкое содержание стеролов.

Пример 6. Повышение аккумуляции ДГК и ДПК в положении sn-2 ТАГ.

Авторы настоящего изобретения считали, что аккумуляция ДГК и/или ДПК в положении sn-2 в ТАГ могла бы быть увеличена путем соэкспрессии 1-ацилглицерид-3-фосфатацилтрансферазы (ЛФААТ) с путем биосинтеза ДГК или ДПК, например, как обеспечивается конструкцией GA7 или ее вариантами. Предпочтительными ЛФААТ являются такие, которые могут воздействовать на полиненасыщенный C22

жирный ацил-КоА как субстрат, предпочтительно ДГК-КоА и/или ДПК-КоА, особенно те, которые могут использовать как ДГК-КоА, так и ДПК-КоА в качестве субстратов, приводя к увеличению инсерции полиненасыщенной цепи C22 в положении sn-2 ЛФХ с образованием ФХ, относительно эндогенного ЛФААТ. Цитоплазматические ферменты ЛФААТ часто демонстрируют разнообразные предпочтения в отношении субстрата, особенно, если виды синтезируют и аккумулируют необычные жирные кислоты в ТАГ. Было показано, что ЛФААТ2 из *Limnanthes douglasii* использует эрукоил-КоА (C22:1-КоА) в качестве субстрата для синтеза ФХ, в противоположность ЛФААТ1 тех же видов, которые не могли бы утилизировать субстрат C22 (Brown et al., 2002).

Таблица 11

Содержание и состав стеролов в проанализированных растительных маслах

Общее название стерола	Кунжут	Олива	Подсолнечник	Клеверина	Рапс	Сафлор	Арахис	Лен (семя льна)	Соя
холестерин	0,2	0,8	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2
брасикастерол	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0
чалинастерол / 24-метилхолестерин	1,5	0,1	0,3	1,1	2,4	0,2	0,9	1,5	0,8
кампастерол / 24-метилхолестерин	16,2	2,4	7,4	8,4	33,6	12,1	17,4	15,7	16,9
кампастанол / 24-метилхолестанол	0,7	0,3	0,3	0,9	0,2	0,8	0,3	0,2	0,7
C29:2*	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,5	0,0	1,2	0,1
Δ5-стигмастерол	6,4	1,2	7,4	18,6	0,7	7,0	6,9	5,1	17,6
неизвестен	0,5	1,3	0,7	0,8	0,7	0,7	0,4	0,7	1,3
эргост-7-ен-3β-ол	0,1	0,1	1,9	0,2	0,4	2,7	1,4	1,4	1,0
неизвестен	0,0	1,3	0,9	1,2	0,9	1,8	1,2	0,7	0,7
эбурикол	1,6	1,8	4,1	1,5	1,0	1,9	1,2	3,5	0,9
β-ситостерол	/	/	/	/	/	/	/	/	/
24-этилхолестерин	55,3	45,6	43,9	37,7	50,8	40,2	57,2	29,9	40,2
Δ5-авенастерол / изофукостерол	8,6	16,9	7,2	19,3	4,4	7,3	5,3	23,0	3,3
тритерпеновый спирт	0,0	2,4	0,9	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,9
тритерпеновый спирт	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0
Δ7-стигмастерол	/	/	/	/	/	/	/	/	/
стигмаст-7-ен-3β-ол	2,2	7,1	9,3	2,3	0,9	10,5	1,1	7,9	5,6
Δ7-авенастерол	1,3	0,1	4,0	0,6	0,2	2,0	0,7	0,4	0,6
Общее содержание стеролов (мг/г масла)	5,8	2,4	4,1	1,9	6,8	3,2	3,2	4,8	3,0

C29:2* обозначает стерол C29 с двумя двойными связями.

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: 40, номер доступа ABG48392, Kim et al., 2005), ЛФКАТ *Limnanthes alba* (SEQ ID NO: 41, номер доступа AAC49185, Lassner et al., 1995), *Slc1p Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 42, номер доступа NP_010231, Zou et al., 1997), ЛФКАТ 1 *Mortierella alpina* (SEQ ID NO: 44, номер доступа AED33305; US 7879591) и ЛФКАТ *Brassica napus* (SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, номера доступа ADC97479 и ADC97478 соответственно).

ЛФКАТ2 *Arabidopsis* (также обозначенная ЛФАТ2) представляет собой локализованный в эндоплазматическом ретикулуме фермент, который продемонстрировал активность в отношении субстратов C16 и C18, однако активность в отношении субстратов C20 или C22 не тестировалась (Kim et al., 2005). ЛФКАТ2 *Limnanthes alba* продемонстрировала вставку ацильной цепи C22:1 в положение sn-2 ФК, хотя способность использовать ДГК или ДПК 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, ДПК-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), но их активность в растительных клетках неизвестна.

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: 43, номер доступа XP002501997) была идентифицирована посредством поиска среди геномных последовательностей *Micromonas pusilla*, с использованием ЛФКАТ2 *Arabidopsis* в качестве последовательности запроса ВЛК-ST. Возникли несколько последовательностей-кандидатов, и последовательность XP002501997 была синтезирована для тестирования в отношении C22 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. Следует отметить, что предполагаемая ЛФКАТ *Micromonas* не группируется с предполагаемыми C22 ЛФКАТ, но имеет дивергирующую последовательность.

В качестве первичного анализа различных ЛФКАТ на Предмет их способности использовать ДГК-КоА и/или ДПК-КоА в качестве субстрата, получены 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::Limal-ЛФКАТ (ЛФКАТ *Limnanthes*

alba); 35S:Sacce-Slc1p (ЛФКАТ *S. cerevisiae*); 35S:Micpu-ЛФКАТ (ЛФКАТ *Micromonas pusilla*); 35S:Moral-ЛФКАТ1 (ЛФКАТ *Mortierella alpina*); 35S:Bran-LPAAT1.13 (*Brassica napus* ЛФААТ1.13); 35S:Bran-LPAAT1,5 (*Brassica napus* ЛФААТ1,5). Конструкции 35S:p19, не содержащие экзогенной ЛФКАТ, использовали в эксперименте в качестве контроля: его включали в каждую инокуляцию *N. benthamiana*. Каждую из указанных конструкций вводили с помощью *Agrobacterium* в листья *N. benthamiana*, как раскрыто в примере 1, и через 5 дней после инфильтрации обработанные зоны листьев вырезали и измельчали для получения лизата листьев. Каждый лизат содержит экзогенную ЛФКАТ, а также эндогенные ферменты для синтеза ЛФК. Реакционные смеси получали *in vitro*, по отдельности добавляя меченые ^{14}C ОК и ДГК к лизатам. Реакционные смеси инкубировали при 25°C и уровень инкорпорации меченных ^{14}C жирных кислот в ФК определяют методом ТСХ. Оценивали способность каждой ЛФКАТ использовать ДГК относительно АРК и жирных кислот C18. Обнаружено, что ЛФКАТ пенника лугового (*Limnanthes alba*), *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 контрольным потреблением олеиновой кислоты.

Для тестирования активности ЛФКАТ в семенах, некоторое количество кодирующих белок последовательностей или ЛФКАТ вставляли в бинарный вектор под контролем промотора конлиннина (pLuCn12). Получающиеся в результате генетические конструкции, содержащие химерные гены Cn12Arath-ЛФКАТ (отрицательный контроль), Cn12:Limal-ЛФКАТ, Cn2:Sacce-Slc1p и Cn12Moral-ЛФКАТ соответственно, далее использовали для трансформации растений *A. thaliana*, образующих ДГК в семени, чтобы получить стабильные трансформанты, экспрессирующие ЛФКАТ и трансгенный путь ДНК в специфичной для семени форме, чтобы протестировать, будет ли увеличиваться инкорпорация ДГК в положении sn-2 ТАГ. Кроме того, конструкции используются для трансформации растений *B. napus* и *C. sativa*, которые уже содержат конструкцию GA7 и ее варианты (примеры 2 и 3), с целью получения потомства, несущего материнские и ЛФКАТ генетические конструкции. Протестировано увеличение инкорпорации ДГК и/или ДПК 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.

Специфичную для семян конструкцию pCn12:Moral-LPAAT1 использовали для трансформации уже трансгенной линии *Arabidopsis thaliana*, которая была гомозиготной по Т-ДНК из конструкции GA7 и семя которой содержало около 15% ДГК в липидах семени (Petrie et al., 2012). Для этого применяли ген селекционного маркера канамицина в конструкции pCn12:Moral-LPAAT1, который был отличен от гена селекционного маркера *bar*, уже присутствующего в трансгенной линии. Были отобраны трансгенные саженцы, устойчивые к канамицину, и выращены до состояния зрелости в теплице. Урожай семян T2 был собран, и состав жирных кислот в общих липидах семян проанализирован методом ГХ (табл. 12). Три фенотипа наблюдали среди 33 независимо трансформированных линий. В первой группе (6/33 линий) содержание ДПК существенно повышалось до значительно более высокого уровня, чем уровень ДГК, до около 10,6% в общих липидах семян. Это происходило за счет ДГК, содержание которой было существенно снижено в данной группе линий. В двух линиях из указанной первой группы суммарное содержание ДПК + ДГК было снижено, но не в других 4 линиях. Во второй группе (5/33), уровни ДПК и ДГК были равными, с около таким же суммарным содержанием ДПК + ДГК, как и в семени материнского растения. В третьей группе уровни ДПК и ДГК были сходны с уровнями в семенах материнских растений. Одно из возможных объяснений для повышенного уровня ДПК в первой и второй группах состоит в том, что ЛФААТ вытесняет $\Delta 4$ -десатуразу на субстрате ДПК-КоА и преимущественно инкорпорирует ДПК в ФХ и далее в ТАГ, относительно $\Delta 4$ -десатурации. Второе возможное объяснение состоит в том, что $\Delta 4$ -десатурация частично ингибируется.

Собирали семена растений *Arabidopsis*, трансформированных Т-ДНК конструкцией GA7, которые были дополнительно трансформированы вектором pCn12:Moral-LPAAT, и из семян экстрагировали масло. Далее фракцию ТАГ выделяли из экстрагированного масла методами ТСХ и выделяли с пластинки ТСХ. Полученные образцы ТАГ и образцы масла семян до фракционирования анализированы при помощи расщепления липазой *Rhizopus*, чтобы определить позиционное распределение ДГК. Липаза специфична в отношении ацильных групп, этерифицированных в положении sn-1 или sn-3 ТАГ. Это осуществляли путем приготовления эмульсии каждого образца липида в 5% аравийской камеди, с применением устройства для обработки ультразвуком, и добавляя раствор липазы *Rhizopus* в 0,1 М Трис-HCl, pH 7,7, содержащий 5 mM CaCl_2 , с инкубацией смесей при 30°C и непрерывном встряхивании. Реакцию в каждой реакционной смеси останавливали, добавляя хлороформ:метанол (2/1, об./об.) и один объем 0,1 М KCl к каждой смеси. Липид экстрагировали в хлороформную фракцию, и определяли относительные количества sn-2 МАГ, sn-1/3 ФФХ, ДАГ и компонентов ТАГ полученного липида разделением на пропитанной 2,3% борной кислотой пластинке ТСХ с применением гексана/диэтилового эфира/уксусной кислоты (50/50/1, об./об.). Полосы липидов визуализировали, обрызгивая 0,01% примулином в ацетоне/воде (80/20, об./об.) на пластинке ТСХ с визуализацией в УФ-свете. Отдельные полосы липидов иден-

тифицировали на основании пятен липидных стандартов, нанесенных на такую же пластинку ТСХ. ТСХ полосы липидов собирали в стеклянные флаконы, и получали из них метиловые эфиры жирных кислот с применением 1н. метанольной HCl (Supelco), с инкубацией при 80°C в течение 2 ч. Состав жирных кислот индивидуальных липидов был проанализирован ГХ.

Данный анализ продемонстрировал, что ДГК в семенах материнских растений, трансформированных GA7 (линии 22-2-1-1 и 22-2-38-7), преимущественно была этерифицирована в положении sn-1 или sn-3 ТАГ. И наоборот, липиды в семени NY11 и NY15, трансформированном как конструкцией GA7, так и трансгеном, кодирующим ЛФААТ, были обогащены ДГК в sn-2, причем 35% ДГК в одной из линий и 48% ДГК в другой линии были этерифицированы в положении sn-2 ТАГ, т.е. после расщепления липазой ДГК присутствовала, как sn-2-МАТ (табл. 13). Аналогичные результаты получены для семени *V. parvus* и *V. juncea*, трансформированного как Т-ДНК из конструкции GA7-modB, так и геном, кодирующим ЛФААТ, и вырабатывающего ДГК, а также для семени *V. parvus* и *V. juncea*, вырабатывающего ДПК.

Для того чтобы определить, существует ли предпочтение ЛФААТ *Mortierella* или другой ЛФААТ в отношении ДПК-КоА или ДГК-КоА, *in vitro* получали реакционные смеси, добавляя по отдельности ¹⁴С-меченый-ДПК-КоА или -ДГК-КоА к лизатам листьев *N. benthamiana*, временно экспрессирующих ЛФААТ-кандидата под контролем конститутивного промотора, как изложено выше. Реакционные смеси инкубировали при 25°C, и уровни инкорпорации меченных ¹⁴С жирных кислот в ФХ определяли ТСХ методом анализа липидов. Оценивали способность каждой ЛФААТ использовать ДГК-КоА относительно ДПК-КоА. Гены, кодирующие ЛФААТ с доказано высокой ДГК инкорпорирующей активностью ЛФААТ, применяли для получения трансформированных ДГК-вырабатывающих растений рапса и семени.

Гены, кодирующие ЛФААТ с высокой активностью использования ДПК-КоА, применяли для трансформации ДПК-вырабатывающих растений и семени, чтобы увеличить количество ДПК, этерифицированной в положении sn-2 ТАГ.

Таблица 12

Состав жирных кислот (% от общих жирных кислот) трансгенных семян *A. thaliana*, трансформированных конструкцией ЛФААТ1, а также Т-ДНК из конструкции GA7 для выработки ДГК. C20:4ω6 в семенах не обнаруживалась. Кроме того, семена содержали 0,3-0,9% C22:0 и 0,4-1,5% C22:1

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:1Δ13	C20:2ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:5ω3	C22:6ω3
NY-1	9,3	3,2	9,1	6,8	9,4	0,5	23,8	1,6	4,1	7,9	5,1	0,6	0,9	0,6	1,2	7,9	4,5
NY-2	10,7	3,3	6,5	4,4	7,6	0,3	28,1	1,9	4,3	8,5	3,7	0,7	1,1	1,1	1,4	1,1	11,6
NY-3	9,3	2,8	6,3	3,4	10,3	0,2	32,8	2,2	2,7	6,2	3,6	1,1	1,9	1,4	0,7	1,0	10,7
NY-4	11,4	3,5	4,5	3,1	7,0	0,3	32,5	2,1	4,7	5,5	2,3	1,0	1,9	0,8	1,1	0,9	14,3
NY-5	14,6	4,5	7,0	7,7	6,7	0,3	20,7	2,2	5,7	5,4	4,8	0,4	0,9	0,8	1,2	1,0	11,7
NY-6	7,8	2,7	12,5	2,2	18,0	0,1	24,9	1,8	0,7	15,5	3,1	1,4	1,2	0,5	0,3	3,0	0,8
NY-7	9,3	2,9	6,7	3,8	9,2	0,2	31,5	2,1	3,2	7,5	3,7	0,9	1,6	1,3	0,8	1,1	10,9
NY-8	8,8	3,2	8,2	5,5	11,0	0,3	25,3	1,9	3,0	8,3	5,4	1,0	1,2	0,8	0,8	6,1	6,0
NY-9	12,3	3,7	5,0	4,6	7,1	0,2	28,3	2,3	4,2	5,6	3,8	0,8	1,6	0,7	1,1	1,2	13,8
NY-10	8,6	3,2	8,5	3,1	9,7	0,3	31,5	1,6	3,4	8,7	2,8	1,0	1,3	0,9	1,1	10,6	1,0
NY-11	11,5	3,2	4,5	2,5	7,1	0,3	33,3	2,1	3,9	5,7	1,9	0,9	2,0	0,7	0,8	1,0	15,6
NY-12	8,7	3,2	7,5	5,1	8,5	0,2	26,8	2,0	3,7	8,7	5,1	0,9	1,2	1,1	1,2	10,0	2,6
NY-13	11,5	3,4	5,2	3,4	8,3	0,3	30,0	2,2	5,0	6,2	3,2	0,9	1,7	1,5	1,1	1,0	11,6
NY-14	9,2	2,9	6,6	2,0	10,3	0,2	34,7	1,9	3,3	7,7	1,6	1,2	1,8	1,2	0,9	0,8	11,1
NY-15	10,9	3,3	4,6	2,7	7,0	0,3	34,1	1,9	5,1	5,5	2,0	0,9	1,8	0,8	1,0	1,0	14,7
NY-16	10,5	3,4	6,0	4,6	7,8	0,3	30,3	1,8	4,4	5,4	2,9	0,7	1,5	0,9	1,1	1,3	14,2
NY-17	9,1	2,4	5,9	2,5	10,4	0,2	35,4	1,6	3,6	6,4	2,1	1,1	1,9	1,2	1,0	0,9	11,7
NY-18	9,7	3,6	8,8	6,2	12,1	0,3	21,0	1,9	4,0	8,3	5,9	0,8	0,9	0,6	1,0	5,7	5,1
NY-19	8,4	3,1	12,0	3,1	14,6	0,2	28,8	1,7	1,6	11,3	3,2	1,0	1,4	0,6	0,6	3,9	1,2
NY-20	10,1	3,2	5,4	3,3	8,9	0,3	32,8	2,1	4,1	5,5	2,8	1,0	1,9	1,1	0,9	1,1	12,1
NY-21	10,5	3,6	5,6	3,8	8,2	0,3	31,9	2,0	4,6	5,9	2,8	0,9	1,7	0,8	1,0	0,9	12,5
NY-22	8,4	3,3	7,4	2,3	9,4	0,2	33,5	1,8	3,4	8,8	2,2	1,2	1,7	1,3	1,0	5,5	6,1

Таблица 13

Присутствие ДГК в положении sn-2 ТАГ или в общем масле трансгенных семян *A. thaliana*, трансформированных геном Cn12::Mogal-ЛФААТ, а также Т-ДНК из конструкта GA7, демонстрирующее позиционное распределение ДГК в ТАГ. Кроме того, в составе жирных кислот ТАГ и sn-2 МАГ присутствовало 0-0,4% каждой из 14:0, 16:1ω13t, 16:2, 16:3, 22:0 и 24:0. В семенах не были обнаружены C20:3ω6, C20:4ω6

Образец	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4	C20:1Δ11	C20:1Δ13	C20:2ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C22:1	C20:5ω3	C22:5ω6	C22:4ω3	C22:5ω3	C22:6ω3
22-2-1-1 ТАГ	12,2	0,4	4,4	6,4	3,9	7,2	0,8	28,8	1,6	4,3	9,7	2,3	0,7	1,3	1,0	0,6	2,1		0,0	0,7	10,1
2-МАГ	0,6	0,1	0,3	8,3	2,5	10,1	0,7	53,9	0,2	6,5	0,3	0,1	0,1	0,3	0,2	0,0	3,8		0,0	2,3	9,1
ДГК в sn-2 = 30%																					
22-2-38-7 масло	10,0	0,2	3,7	6,0	2,7	6,4	0,4	33,8	1,6	3,7	11,3	1,8	0,8	1,3	0,9	0,6	1,2		0,7	11,6	
2-МАГ	0,5	0,1	0,3	9,7	2,4	11,1	0,6	60,0	0,1	3,6	0,3	0,1	0,1	0,4	0,2	0,0	2,1		0,1	1,3	6,7
ДГК в sn-2 = 19%																					
Дополнительно трансформированные геном, кодирующим ЛФААТ <i>Mortierella alpina</i> :																					
NY11-ТАГ	11,0	0,2	3,4	6,0	2,8	9,2	0,3	34,8	1,6	3,6	6,3	1,8	1,0	1,8	0,7	0,6	0,9	0,0	0,1	0,6	12,2
2-МАГ	0,7	0,1	0,2	6,7	1,1	11,8	0,3	49,8	0,2	3,7	0,5	1,5	0,3	1,6	0,6	0,1	0,8	0,1	0,2	1,6	17,8
ДГК в sn-2 = 48%																					
NY-15-масло	11,0	0,0	3,3	4,6	2,8	6,9	0,3	33,6	2,0	5,1	5,5	2,1	0,9	1,9	0,7	0,6	0,9	0,4		0,9	14,9
2-МАГ	0,8	0,1	0,3	6,4	1,3	11,4	0,3	50,2	0,2	4,9	0,4	1,4	0,2	1,5	0,6	0,1	0,9	0,0	0,2	1,6	16,7
ДГК в sn-2 = 37%																					

Пример 7. Дальнейший анализ трансгенных семян *Camelina sativa*.

Общее содержание липидов.

Семя *C. sativa*, гомозиготное по Т-ДНК из конструкции GA7 и содержащее ДГК в общем содержании жирных кислот, было проанализировано на предмет содержания состава общих липидов и как указано ниже. Для семян выполняли две последовательные стадии экстракции растворителем, вначале с применением гексана, и затем с применением хлороформа/метанола. В ходе экстракции и анализа не добавляли антиоксидантов. Метод экстракции Сокслета, который обычно применяется для извлечения липидов из семени путем длительного нагревания и кипячения с обратным холодильником смеси липида/растворителя, в данном случае не применялся из-за потенциального разложения или окисления $\omega 3$ ПНЖК, таких как ДГК.

Гексан применяли в качестве растворителя для первой экстракции, поскольку он является промышленным стандартом для масличных культур. Кроме того, он преимущественно экстрагирует ТАГ-содержащее масло за счет своих сольватирующих свойств и относительно слабой сольубилизации полярных липидов, особенно при комнатной температуре. Трансформированные и контрольные семена *Camelina* (130 и 30 г соответственно) смачивали гексаном и измельчали при помощи электрической агатовой ступки и пестика (Retsch Muhle, Германия). Смеси переносили в делительные воронки и четыре раза экстрагировали с применением общего объема 800 мл гексана, включая статическую экстракцию на протяжении ночи для третьей экстракции. Для каждой экстракции экстракты фильтровали сквозь фильтр из стекловолокна GFC под вакуумом для удаления мелких частиц, после чего выпаривали на ротационном испарителе при 40°C под вакуумом. Экстракты объединяли в пул с получением богатых ТАГ гексановых экстрактов.

После экстракции гексаном оставшийся жмых семян далее экстрагировали с применением хлороформа-метанола (ХМ, 1:1 об./об.) по такой же методике, как проводили экстракцию гексаном. Затем жмых удаляли фильтрацией, и объединенные экстракты выпаривали на ротационном испарителе. Объединенные в пул неочищенные ХМ общего липида затем растворяли с применением однофазной смеси метанола-хлороформа-воды (2:1:0,8, об./об./об.). Фракции разделяли добавлением хлороформа-воды (конечное соотношение растворителей, 1:1:0,9 об./об./об. метанола/хлороформа/воды). Очищенный липид в каждом экстракте, распределенный в нижней хлороформной фазе, концентрировали с применением ротационного испарения, и получали ХМ экстракты, богатые полярными липидами. Содержание липида в каждом из этих экстрактов определяли гравиметрически.

Для анализа состава жирных кислот аликвоты гексановых и ХМ экстрактов транс-метиловали по способу Christie et al. (1982) с получением метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), применяя метанол-хлороформ-конц. хлористоводородную кислоту (3 мл, 10:1:1, 80°C, 2 ч). МЭЖК экстрагировали гексаном-хлороформом (4:1, 3 × 1,8 мл). Кроме того, образцы жмыха семени (1-2 г), оставшегося после экстракции гексаном и ХМ, транс-метиловали для гравиметрического измерения содержания любого остаточного липида в виде МЭЖК. Общее содержание липидов в семени вычисляли, суммируя содержание липидов в гексановых и ХМ экстрактах и содержание МЭЖК в трансметилованном жмыхе после экстракции растворителями.

Трансгенные семена содержали несколько меньшее количество общих липидов, на уровне 36,2% от массы семени, по сравнению с семенами *Camelina sativa* дикого типа, 40,9% от массы семени. Для семян, включая семена масличных культур, общие липиды определяли как сумму экстрагированного растворителями липида, полученного последовательной экстракцией гексаном, а затем хлороформом-метанолом, и остаточного липида, высвобожденного трансметилованием экстрагированного жмыха после экстракции растворителями, как описано в качестве примера в данном описании. Такие общие липиды состояли по большей части из липидов, содержащих жирные кислоты, таких как триацилглицериды и полярные липиды, и небольших количеств липидов, не содержащих жирных кислот, таких как фитостерины и жирные спирты, которые могут присутствовать в свободной неэтерифицированной форме или могут быть этерифицированы жирными кислотами. Кроме того, любые эфиры стеролов или эфиры восков и углеводороды, такие как каротиноиды, например β -каротин, также входили в экстрагируемый растворителями липид, если они присутствовали. Они были включены в общее гравиметрическое определение и были показаны в анализе ТСХ-ПВД (табл. 14).

Из общих липидов, 31-38% липидов от массы семени было экстрагировано гексаном для трансгенных и контрольных семян соответственно, что отвечает 86 и 92% общих липидов в семенах. С помощью экстракции ХМ извлекали еще 4,8 и 2,4% (от массы семени), в основном богатый полярными липидами экстракт из трансгенных и контрольных семян соответственно. Остаточный липид, высвобождающийся трансметилованием оставшегося после экстракции растворителями жмыха семян масличной культуры, составил 0,3 и 0,4% от массы семени соответственно. Т.е. первая и вторая экстракция растворителями суммарно извлекает 99% от общего содержимого липидов в семени (т.е. 36,2 или 40,9% от массы семени, что в основном представляет собой липид, содержащий жирные кислоты, например триглицериды и полярные липиды, состоящие из глико- и фосфолипидов (см. следующий раздел - анализ классов липидов)).

Анализ классов липидов.

Классы липидов в гексановых и ХМ экстрактах были проанализированы тонкослойной хроматографией с обнаружением при помощи плазменно-ионизационного детектора (ТСХ-ПВД; Iatroscan Mark V, Iatron Laboratories, Токио, Япония), с применением гексана/диэтилового эфира/ледяной уксусной кислоты (70:10:0,1, об./об./об.) в качестве системы растворителей для проявления, в сочетании с кремния диоксидом Chromarod S-III на кварцевых палочках. Подходящие калибровочные кривые получали с применением репрезентативных стандартов, полученных от Nu-Chek Prep, Inc. (Элизаиян, Миннесота, США). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения SIC-480II (Версия SISC: 7.0-E). Различные виды фосфолипидов разделяли с применением очищенной фосфолипидной фракции, полученной после колоночной хроматографии на кремния диоксиде, с проявлением палочек в хлороформе/метаноле/ледяной уксусной кислоте/воде (85:17:5:2, об./об./об.) перед обнаружением с помощью ПВД.

Для отделения ТАГ, гликолипидных и фосфолипидных фракций от ХМ экстрактов применяли гель кремния диоксида 60 (100-200 меш) (0,3-1 г) в короткой стеклянной колонке или пипетке Пастера, заполненной стекловатой, чтобы очистить 10 мг очищенного ХМ экстракта липидов. Остаточную фракцию ТАГ в ХМ экстракте элюировали с применением 20 мл 10% диэтилового эфира в гексане, гликолипиды элюировали 20 мл ацетона, и фосфолипиды элюировали в две стадии, вначале 10 мл метанола, и затем 10 мл метанола-хлороформа-воды (5:3:2). Указанная вторая элюация увеличивает выход фосфолипидов. Выход каждой фракции определяли гравиметрически, и чистоту проверяли ТСХ-ПВД. Все экстракции и фракции хранили в дихлорметане при -20°C до дальнейшего анализа ГХ и ГХ-МС.

Богатые ТАГ гексановые экстракты от каждого из трансгенных и контрольных семян содержали около 96% ТАГ. ХМ экстракты содержали остаточные количества ТАГ 44 и 13 мас.% ХМ экстрактов соответственно для трансгенных семян и семян дикого типа. В противоположность гексановым экстрактам, ХМ экстракты были богаты полярными липидами, а именно фосфолипидами и гликолипидами, содержание которых соответствовало 50 и 76 мас.% ХМ экстрактов соответственно для трансгенных и контрольных семян (табл. 14). Основным фосфолипидом был фосфатидилхолин (ФХ), который составлял 70-79% общих фосфолипидов, далее следовал фосфатидилэтаноламин (ФЭ, 7-13%), при относительно низких уровнях фосфатидиновой кислоты (ФК, 2-5%) и фосфатидилсерина (ФС, < 2%). Существуют процедурные преимущества при подаче ответа на окончательное заключение эксперта до 7 июля 2015 г.

Состав жирных кислот.

В общем для семян, вырабатывающих ДГК и/или ДПК, авторы изобретения наблюдали состав жирных кислот общих липидов в семенах, по данным прямого трансметилирования общих липидов в семени, сходный с составом липидов во фракции ТАГ. Это было результатом того, что более 90% общих липидов, присутствующих в семени, находились в форме ТАГ.

Состав жирных кислот различных классов липидов в гексановых и ХМ экстрактах определяли газовой хроматографией (ГХ) и методом ГХ-МС с применением прибора для ГХ Agilent Technologies 6890A (Пало-Альто, Калифорния, США), оборудованного капиллярной колонкой из плавленого кварца Supelco Equity™-1 (15 м × 0,1 мм в.д., толщина пленки 0,1 мкм, Беллефон, Пенсильвания, США), ПВД, инжектором с расщеплением/без расщепления, аутосемлером Agilent Technologies серии 7683B и инжектором. Газом-носителем был гелий. Образцы вводили инъекцией в режиме без расщепления при температуре печи 120°C. После инъекции температуру печи повышали до 270°C со скоростью 10°C/мин, и в конце до 300°C со скоростью 5°C/мин. Элюированные соединения определяли количественно с помощью программного обеспечения Agilent Technologies ChemStation (Пало-Альто, Калифорния, США). Результаты ГХ содержали ошибку не более чем ±5% площади пика индивидуальных соединений.

Таблица 14

Состав класса липидов (% от общих липидов, полученный для каждой стадии экстракции) в гексановых и ХМ экстрактах трансгенного и контрольного семени *Camelina sativa*. ЭС, ЭВ и УВ не разделяли

Класс липидов	Трансгенные семена		Контрольные семена	
	Гексановый	ХМ	Гексановый	ХМ
ЭС/ЭВ/УВ*	1,0	1,4	1,0	1,4
ТАГ	95,6	44,2	96,0	13,1
СЖК	0,9	1,3	0,8	1,4
Н/о**	0,9	1,1	0,8	1,2
СТ	0,5	0,7	0,4	0,4
МАГ	0,7	1,1	0,8	6,2
ФЛ	0,3	50,3	0,3	76,3
Всего	100,0	100,0	100,0	100,0

Сокращения: эфиры стеролов (ЭС), эфиры восков (ЭВ), углеводороды (УВ), триацилглицериды (ТАГ), свободные жирные кислоты (СЖК), не определено (н/о), стеролы (СТ), моноацилглицериды (МАГ), полярные липиды (ПЛ), состоящие из гликолипидов и фосфолипидов; ЭС, ЭВ и УВ из этой сис-

темы элюировались вместе; может содержать жирные спирты и диацилглицериды (ДАГ).

Анализы методом ГХ-масс-спектрометрии (ГХ-МС) выполняли на приборе ГХ-МС с квадрупольными линзами Finnigan Trace ultra (модель: ThermoQuest Trace DSQ, Thermo Electron Corporation). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ThermoQuest Xcalibur (Остин, Техас, США). Прибор для ГХ был оборудован инжектором на колонке и капиллярной колонкой HP-5 Ultra Agilent J & W (50 м × 0,32 мм в.д., толщина пленки 0,17 мкм, Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) с полярностью, сходной с описанной выше. Индивидуальные компоненты были идентифицированы с применением данных масс-спектра и сравнением времени удерживания с полученным для аутентичных и лабораторных стандартов. Холостой анализ по полной методике проводили параллельно с серией образцов.

Данные состава жирных кислот в различных классах липидов в экстрактах приведены в табл. 15. В ДГК-вырабатывающем семени *Camelina* ДГК распределяются на основные липидные фракции (ТАГ, фосфолипиды и гликолипиды) в пропорции, варьирующей от 1,6 до 6,8%, с обратной корреляцией между долями ДГК и АЛК. Богатый ТАГ гексановый экстракт из трансгенного семени содержал 6,8% ДГК и 41% АЛК (табл. 15). Богатый полярными липидами ХМ экстракт содержал 4,2% ДГК и 50% АЛК, т.е. относительно меньшее количество ДГК и больше АЛК. Остаточные ТАГ из богатого полярными липидами ХМ экстракта содержали 6% ДГК и 40% АЛК. Гликолипидная фракция, выделенная из ХМ экстракта, содержала 3% ДГК и 39% АЛК, и фосфолипидная фракция содержала самый низкий уровень ДГК (1,6%) и самые высокие уровни АЛК (54%). Трансгенное семя *Camelina* содержало более высокие уровни АЛК и более низкие уровни ЛК (линолевая кислота, 18:2 ω 6), по сравнению с контрольными семенами, в основных классах липидов (ТАГ, гликолипиды и фосфолипиды). Доли АЛК и ЛК составляли: АЛК 39-54% и ЛК 4-9% для трансгенных семян и АЛК 12-32% и ЛК 20-29% для контрольных семян. Относительный уровень эруковой кислоты (22:1 ω 9) был ниже во всех фракциях из трансгенных семян, чем в контрольных семенах, например 1,3% против 2,7% в гексановых экстрактах (табл. 15).

Состав стеролов в семенах.

Для определения содержания и состава стеролов в экстрагированных липидах, образцы, содержащие около 10 мг общих липидов из богатого ТАГ гексанового экстракта и богатого полярными липидами ХМ экстракта омыляли с применением 4 мл 5% КОН в 80% MeOH и нагревали в течение 2 ч при 80°C в покрытой тефлоном стеклянной пробирке с навинчивающейся пробкой. После охлаждения реакционных смесей добавляли 2 мл воды Milli-Q, стеролы и спирты экстрагировали трижды по 2 мл гексана:дихлорметана (4:1, об./об.), встряхивая и перемешивая вихревым перемешиванием. Смеси центрифугировали, и каждый экстракт в органической фазе промывали 2 мл воды Milli-Q, встряхивая и центрифугируя. После отбора верхнего, стерол-содержащего органического слоя, растворитель выпаривали при помощи потока газообразного азота, а стеролы и спирты силилировали с применением 200 мкл бис-(триметилсилил)трифторацетамида (БСТФА, Sigma-Aldrich), нагревая в течение 2 ч при 80°C в закупоренном ГХ флаконе. Таким способом свободные гидроксильные группы превращали в их триметилсилиловые эфиры. Производные стерол- и спирт-OTMSi сушили в потоке газообразного азота на нагревательном блоке (40°C) и повторно растворяли в дихлорметане (ДХМ) непосредственно перед анализом ГХ/ГХ-МС, как изложено выше.

Таблица 15

Состав жирных кислот (% общих жирных кислот) липидных экстрактов и фракции из трансгенных и контрольных семян *C. sativa*

Жирная кислота	Трансгенные семена						Контрольные семена					
	Гексан		ХМ			Жмых	Гексан		ХМ			Жмых
	ТАГ	Общие	ТАГ	ГЛ	ФЛ		ТАГ	Общие	ТАГ	ГЛ	ФЛ	
16:1 ω 7	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	-	-	0,3
16:0	6,2	12,8	6,8	21,3	19,4	10,4	6,7	12,8	7,8	29,6	13,7	10,3
18:4 ω 3	3,7	3,3	3,4	2,1	2,9	3,6	-	-	-	-	-	-
18:2 ω 6	7,1	3,9	8,8	7,2	3,7	8,8	22,2	28,4	29,4	20,8	29,3	27,9
18:3 ω 3	41,9	50,3	39,9	38,6	54,1	38,9	32,0	20,6	19,7	13,0	12,3	20,0
18:1 ω 9	11,1	4,7	9,6	7,2	2,8	8,1	14,0	25,4	13,3	14,7	35,7	14,3
18:1 ω 7	1,4	2,3	2,1	3,7	3,4	2,8	1,0	1,5	2,2	4,0	2,8	2,2
18:0	3,2	4,0	3,0	4,5	5,7	3,1	3,0	2,7	2,9	5,7	3,6	2,7
20:5 ω 3	0,4	0,2	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-
20:4 ω 3	0,4	0,4	0,4	-	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-
20:2 ω 6	0,7	0,7	0,8	0,6	0,4	0,7	1,8	0,8	2,1	1,2	-	1,8
20:3 ω 3	0,8	1,2	0,9	0,6	1,3	0,5	0,9	0,3	-	-	-	0,4
20:1 ω 9/11	11,6	6,1	10,9	5,1	1,3	8,4	12,5	3,0	11,1	4,2	1,7	9,4
20:1 ω 7	0,6	0,8	1,4	0,6	0,2	1,1	0,6	0,6	2,0	1,3	-	1,8

20:0	1,3	0,8	1,4	0,6	0,1	1,4	1,5	0,7	2,0	1,4	-	1,8
22:6ω3	6,8	4,2	6,1	3,0	1,6	5,4	-	-	-	-	-	-
22:5ω3	0,3	1,1	0,4	0,6	1,4	0,3	-	-	-	-	-	-
22:1ω9	1,3	1,0	1,8	0,6	0,1	1,5	2,7	0,7	3,6	0,9	-	2,9
22:0	0,3	0,2	0,3	0,6	0,1	0,7	0,3	0,2	0,7	0,8	-	0,8
24:1ω9	0,3	0,4	0,4	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,7	0,9	0,5	1,0
24:0	0,1	0,4	0,2	0,9	0,4	1,1	0,1	0,4	0,5	1,4	0,4	1,3
другие *	0,4	1,0	1,0	1,4	0,5	1,8	0,3	1,1	0,9	0,1	-	1,1
Всего	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Сокращения: триацилглицериды (ТАГ), гликолипиды (ГЛ), фосфолипиды (ФЛ);

общие: богатый полярными липидами экстракт, содержащий ГЛ и ПЛ из ХМ экстракта;

ТАГ, ГЛ и ФЛ разделяли хроматографией на колонке с кремния диоксидом из ХМ экстрактов;

* суммарное содержание минорных жирных кислот.

Основными стеролами как в трансгенных, так и в контрольных семенах были 24-этилхолестерин (ситостерол, 43-54% от общих стеролов), 24-метилхолестерин (кампэстерол, 20-26%) с более низкими уровнями холестерина (5-8%), брассикастерол (2-7%), изофукостерол (Δ^5 -авенастерол, 4-6%), стигмастерол (0,5%-3%), холест-7-ен-3 β -ол, (0,2-0,5%), 24-метилхолестанол (кампэстанол, 0,4-1%) и 24-дегидрохолестерин (0,5-2%) (табл. 16). Эти девять стеролов отвечают за 86-95% общих стеролов, тогда как остальные компоненты, являющиеся стеролами, идентифицированы только частично по количеству атомов углерода и двойных связей. Общие профили стеролов были сходными для трансгенных и контрольных семян, как в случае гексановых, так и в случае ХМ экстрактов.

Анализ жирных спиртов.

Жирные спирты из семян были дериватизированы и проанализированы на предмет стеролов. Серии жирных спиртов от C16-C22, с сопутствующими изо-разветвленными жирными спиртами были идентифицированы как в гексановых, так и ХМ экстрактах. Сходные профили наблюдались для трансгенных и контрольных семян, с некоторой вариацией в долях наблюдаемых индивидуальных компонентов. Фитол, образованный из хлорофилла, был основным алифатическим спиртом и отвечал за 47 и 37% общих жирных спиртов в гексановых фракциях из трансгенных и контрольных семян соответственно. Спирты с нечетной длиной цепи присутствовали с более высокими уровнями в ХМ экстракте (37-38% от общего содержания жирных спиртов), чем в гексановом экстракте (16-23%). Изо-17:0 (16-38%) преобладал над 17:0 (0,3-5,7%). Содержание других спиртов с нечетной длиной цепи составляло 19:0 (4,5-6,5%). Другие обнаруженные спирты включали изо-16:0, 16:0, изо-18:0, 18:1, 18:0, с незначительными уровнями изо-20:0, 20:1, 20:0, а также присутствовали изо-22:0, 22:1 и 22:0.

Обсуждение.

Результаты показывают, что измельчение с помощью механизированной ступки и пестика с многократной экстракцией гексаном при комнатной температуре было эффективным с точки зрения извлечения большей части ТАГ-содержащего масла из трансгенных семян. В дополнение к маслу из трансгенных семян, содержащему умеренные уровни ДГК, трансгенные семена также содержали значительно более высокие уровни АЛК в основных классах липидов (триацилглицериды, гликолипиды и фосфолипиды) по сравнению с контрольными семенами. Это показало, что активность Δ^15 -десатуразы значительно повышалась в трансгенных семенах в ходе развития семени. Интересно, что существовали некоторые небольшие отличия в составе жирных кислот и долях ДГК в различных экстрактах и фракциях, причем уровни ДГК были выше в богатом ТАГ гексановом экстракте и ТАГ из ХМ экстракта (6-6,8%) и ниже во фракциях полярных липидов (3% в гликолипидах и 1,6% в фосфолипидах). Уровень 16:0 был выше во фракциях полярных липидов, гликолипидов и фосфолипидов в ХМ экстрактах (19-21%) по сравнению с богатым ТАГ гексановым экстрактом и ТАГ из ХМ экстракта (6-7%).

Таблица 16

Состав стеролов (% от общих стеролов) в трансгенных и контрольных семенах *Camelina*

Стеро́лы	Трансгенные семена		Контрольные семена	
	Гексан	ХМ	Гексан	ХМ
24-дегидрохолестерин	0,8	1,8	0,5	1,4
Холестерин	5,7	7,6	4,7	7,2
Брассикастерол	4,4	6,5	1,9	4,2
Холест-7-ен-3 β -ол	0,2	0,5	0,3	0,4
Кампэстерол	24,5	20,8	25,7	21,7
Кампэстанол	0,4	1,1	0,4	0,9
Сигмастерол	1,0	2,6	0,5	1,6
Ситостерол	54,3	43,7	53,8	42,9
Δ 5-авенастерол	4,2	5,2	4,7	5,5
Сумма	95,5	89,6	92,6	85,9
Другие				
UN1 C28 1db	0,6	1,2	0,7	1,2
UN2 C29 1db	1,2	2,0	1,2	2,4
UN3 C29 2db	0,9	1,8	1,3	2,4
UN4 C28 1db	0,3	0,9	0,6	1,1
UN5 C30 2db	1,2	1,8	1,4	1,8
UN6 C29 1db + C30 2db	0,3	2,7	2,2	5,2
Сумма других	4,5	10,4	7,4	14,1
Всего	100	100	100	100

Сокращения: Н/о означает неизвестный стерол;
 число после С указывает на количество атомов углерода;
 db обозначает количество двойных связей.

Состав стеролов в трансгенных семенах и контрольных семенах был сходным к найденному в рафинированном масле *Camelina* (Shukla et al., 2002), присутствовали те же основные стеролы, указывая на то, что добавленные гены не влияли на синтез стеролов в семенах. Уровень холестерина в масле *Camelina* был выше встречающегося в большинстве растительных масел. Присутствовал брассикастерол, который является характерным стеролом, найденным в семействе Brassicaceae, которое включает *Camelina sativa*.

Пример 8. Выработка ДЦ-ПНЖК в семенах *Brassica juncea*.

Трансгенные растения *Brassica juncea* получали с применением конструкции GA7-modB (пример 3) для выработки ДГК, как указано ниже. Семена *B. juncea* сорта, чувствительного к длительному световому дню, стерилизовали с применением газообразного хлора, как описано Kereszt et al. (2007). Стерилизованные семена проращивали средах МС с 1/2 активности (Murashige and Skoog, 1962), затвердевших с 0,8% агара, с коррекцией pH до 5,8, и выращивали при 24°C и флуоресцентном освещении (50 мкЕ/м²с) с фотопериодом 16/8 ч (свет/темнота) в течение 6-7 дней. Черешки котилено́нов со стеблем 2-4 мм были выделены из этих саженцев в асептических условиях и использовались в качестве эксплантов. *Agrobacterium tumefaciens* штамм AGL1 трансформировали бинарной конструкцией GA7. Культура *Agrobacterium* была посеяна и обработана для инфицирования, как описано Belide et al. (2013). Для всех трансформаций около 50 свежесделанных котилоно́нных черешков инфицировали 10 мл культуры *A. tumefaciens* в течение 6 мин. Инфицированные черешки промокали стерильной фильтровальной бумагой для удаления избытка *A. tumefaciens* и переносили в среды для совместного культивирования (МС, содержащие 1,5 мг/л БА, 0,01 мг/л НКК и 100 мкМ ацетосирингона, также содержащие L-цистеин (50 мг/л), аскорбиновую кислоту (15 мг/л) и МЭС (250 мг/л)). Все планшеты опечатывали микропористой лентой и инкубировали в темноте при 24°C в течение 48 ч совместного культивирования. Далее экспланты переносили в предселекционную среду (агар МС, содержащий 1,5 мг/л БА, 0,01 мг/л НКК, 3 мг/л AgNO₃, 250 мг/л цефотаксима и 50 мг/л тиментина) и культивировали в течение 4-5 дней при 24°C с фотопериодом 16/8 ч, после чего экспланты переносили в селекционную среду (агар МС, содержащий 1,5 мг/л БА, 0,01 мг/л НКК, 3 мг/л AgNO₃, 250 мг/л цефотаксима, 50 мг/л тиментина и 5 мг/л ФФТ) и культивировали в течение 4 недель при 24°C с фотопериодом 16/8 ч. Экспланты с зеленым каллусом переносили в среду для регенерации побегов (агар МС, содержащий 2,0 мг/л БА, 3 мг/л AgNO₃, 250 мг/л цефотаксима, 50 мг/л тимен-

тина и 5 мг/л ФФТ) и культивировали еще на протяжении 2 недель. Маленькие почки регенерирующих побегов переносили в среду МС без гормонов (агар МС, содержащий 3 мг/л AgNO_3 , 250 мг/л цефотаксима, 50 мг/л тиментина и 5 мг/л ФФТ) и культивировали еще в течение 2-3 недель.

Потенциально трансгенные побеги размером по меньшей мере 1,5 см выделяли и переносили в среду для корнеобразования (агар МС, содержащий 0,5 мг/л НКК, 3 мг/л AgNO_3 , 250 мг/л цефотаксима и 50 мг/л тиментина) и культивировали в течение 2-3 недель. Трансгенные побеги с большим количеством корней, подтвержденные ПЦР, переносили в грунт в теплице и выращивали с фотопериодом 16/8 ч (свет/темнота) при 22°C. Были получены три подтвержденных трансгенных растения. Трансформированные растения выращивали в теплице, позволяли им самоопылиться и собирали урожай семян Т1. Состав жирных кислот липида анализировали в пулах семян Т1 от каждого из трансформированных растений Т0, и обнаружили присутствие 2,8% ДПК и 7,2% ДГК в одной линии, обозначенной JT1-4, тогда как другая линия, обозначенная JT1-6, продемонстрировала 2,6% ДПК.

Масло семян из индивидуальных семян Т1 проанализировали на предмет состава жирных кислот; часть данных приведена в табл. 17. Несколько семян Т1 вырабатывали ДГК на уровне от 10% до около 21% от общего содержания жирных кислот, включая JT1-4-A-13, JT1-4-A-5 и JT1-4-B-13. Удивительно и неожиданно было обнаружено, что некоторые из семян Т1 содержали ДПК на уровнях от 10% до около 18% от общего содержания жирных кислот, при отсутствии обнаружимой ДГК ($< 0,1\%$). Авторы изобретения сделали вывод о том, что ген $\Delta 4$ -десатуразы в Т-ДНК, вставленной в этих растениях, инактивировался в результате спонтанной мутации, сходной с описанной в примере 2. Семена Т1 проращивали, и один появляющийся котиледон с каждого анализировали на предмет состава жирных кислот в оставшемся масле. Остальную часть каждого саженца сохраняли и выращивали до состояния зрелости, чтобы получить семя Т2.

Трансгенные растения, которые были гомозиготными по единичным инсерциям Т-ДНК, были идентифицированы и отобраны. Растения одной отобранной линии, обозначенной JT1-4-17, содержали единичную инсерцию Т-ДНК и вырабатывали ДГК и только низкие уровни ДПК, тогда как растения из второй отобранной линии, обозначенной JT1-4-34, также содержали единичную инсерцию Т-ДНК, но вырабатывали ДПК без выработки ДГК. Авторами изобретения был сделан вывод о том, что оригинальный трансформант содержал две отдельных Т-ДНК, одна из которых обеспечивала выработку ДГК, а другая обеспечивала выработку ДПК без ДГК. Растения *V. juncea*, вырабатывающие ДГК в семенах, были скрещены с растениями, вырабатывающими ДПК в семенах. Потомство F1 включало растения, которые были гетерозиготными по обеим инсерциям Т-ДНК. В семенах этих растений-потомков наблюдалась выработка около 20% ДГК и около 6% ДПК, с общим содержанием ДГК + ДПК 26%. Растения F1 самоопылялись, и ожидалось, что потомство, гомозиготное по обеим инсерциям Т-ДНК, будет вырабатывать до 35% ДГК и ДПК.

Около 18% ДПК наблюдалось в липиде пула семени потомства T3, обозначенного JT1-4-34-11. Подобным образом, около 17,5% ДГК наблюдалось в липиде пула семени потомства T3 JT1-4-17-20. Состав жирных кислот пула семени JT1-4 T1, единичного семени T1, пула семени T2, единичного семени T2 и пула семени T3, единичного семени T3 приведен в табл. 18-21. JT1-4 T3 сегрегант JT-1-4-34-11 содержал в пуле семени T3 18% ДПК, и единичное семя от данного конкретного сегреганта содержало около 26% ДПК, в каждом случае как процент от общего содержания жирных кислот.

Следующие параметры были вычислены для масла из семени, содержащего 17,9% ДПК: общие насыщенные жирные кислоты, 6,8%, общие мононенасыщенные жирные кислоты, 36,7%; общие полиненасыщенные жирные кислоты, 56,6%, общие $\omega 6$ жирные кислоты, 7,1%; новые $\omega 6$ жирные кислоты, 0,4% из которых составляла ГЛК; общие $\omega 3$ жирные кислоты, 46,5%; новые $\omega 3$ жирные кислоты, 24,0%; соотношение общих $\omega 6$:общих $\omega 3$ жирных кислот, 6,5; соотношение новых $\omega 6$:новых $\omega 3$ жирных кислот, 60; эффективность превращения олеиновой кислоты в ЛК под действием $\Delta 12$ -десатуразы, 61%; эффективность превращения АЛК в СДК под действием $\Delta 6$ -десатуразы, 51%; эффективность превращения СДК в кислоту ЭТК под действием $\Delta 6$ -элонгазы, 90%; эффективность превращения ЭТК в ЭПК под действием $\Delta 5$ -десатуразы, 87%; эффективность превращения ЭПК в ДПК под действием $\Delta 5$ -элонгазы, 98%.

Для получения большего количества трансгенных растений *V. juncea* с конструкцией modB, трансформацию повторяли пять раз, и регенерировали 16 предполагаемых трансгенных побегов/саженцев. Провели анализ семени Т1, чтобы определить содержание ДПК и ДГК.

С целью получения другого семени, содержащего ДПК и не содержащего ДГК, генетическая конструкция, которая представляла собой вариант Конструкции modB без гена $\Delta 4$ -десатуразы, была получена следующим образом. Были синтезированы два фрагмента ДНК, фрагмент ЭПК-ДПК 1 и фрагмент ЭПК-ДПК 2 (Genart, Германия) с подходящими рестрикционными сайтами. Промежуточный клонирующий вектор, pJP3660, был получен клонированием фрагмента AatII-MluI фрагмента ЭПК-ДПК 1 в сайты AscI-AatII вектора, обозначенного 11ABNZHC_GA7-frag_d6D_pMS, причем данный вектор ранее применялся при конструировании GA7-modB, содержащего кассету $\Delta 6$ -десатуразы. Далее получали pJP3661 клонированием фрагмента PmeI-PspOMI pJP3660 в сайты PmeI-PspOMI modB. После этого собирали вектор ДПК, pJP3662 (фиг. 4), путем клонирования фрагмента BsWI-PspOMI фрагмента ЭПК-ДПК 2 в сайты

BsiWI-PspOMI pJP3661. Данный вектор содержал гены биосинтеза жирных кислот, кодирующие ферменты, которые превращают олеиновую кислоту в ДРА ω 3 и соответствующую ω б жирную кислоту. Полученную в результате конструкцию применяли для трансформации *V. juncea* и *V. parus*. Получено семя потомства, содержащее до 35% ДПК в общем содержании жирных кислот в липиде семени.

При анализе методом ЯМР масла, экстрагированного из семян растения, вырабатывающего ДГК, по меньшей мере 95% наблюдаемой ДГК присутствовало в положении sn-1,3 молекул ТАГ.

Таблица 17

Состав жирных кислот в масле семян из семян T1 *V. juncea*, трансформированных Т-ДНК из GA7

Семя T1 №	C16:0	C16:1 Δ 9	C18:0	C18:1	18:1 Δ 11	C18:2	C18:3 ω 6	C18:3 ω 3	C20:0	C18:4 ω 3	20:1 Δ 11	C20:2 ω 6	C20:3 ω 3	C20:4 ω 3	C20:5 ω 3	C22:5 ω 3	C22:6 ω 3
JT1-4-A-1	5,0	0,2	2,7	23,5	3,4	17,0	0,7	24,8	0,7	2,0	1,1	0,2	0,8	4,0	0,6	2,4	9,9
JT1-4-A-2	4,3	0,3	2,6	37,2	3,2	11,0	0,3	22,1	0,7	0,9	1,3	0,2	1,4	3,2	0,3	9,4	0,0
JT1-4-A-3	5,6	0,3	2,7	20,8	3,7	16,0	0,6	24,4	0,7	2,0	0,9	0,2	1,1	4,5	0,7	3,1	11,4
JT1-4-A-4	4,6	0,4	2,8	36,2	3,4	10,6	0,3	24,5	0,8	9,9	1,7	0,2	0,3	0,5	0,0	2,5	0,0
JT1-4-A-5	5,0	0,2	3,2	20,3	3,6	13,7	0,7	25,9	0,7	2,0	0,9	0,2	1,3	4,4	1,5	1,6	13,5
JT1-4-A-6	4,8	0,4	3,4	37,9	3,7	7,4	0,4	19,9	0,9	1,4	1,4	0,1	0,8	1,9	0,4	13,9	0,0
JT1-4-A-7	5,6	0,3	3,0	26,2	4,0	8,9	0,3	26,6	0,6	1,8	1,0	0,1	1,8	3,7	1,3	2,2	11,3
JT1-4-A-8	4,8	0,4	2,9	40,3	3,4	7,8	0,3	22,2	0,8	1,4	1,3	0,1	0,8	2,4	0,4	9,6	0,0
JT1-4-A-9	7,1	0,3	3,6	17,7	4,3	17,9	0,7	23,1	1,0	2,1	0,8	0,2	1,5	3,6	0,8	2,0	11,9
JT1-4-A-10	5,1	0,2	4,2	22,3	3,4	19,5	0,7	21,7	0,8	1,5	0,9	0,2	1,7	7,8	0,9	1,0	6,5
JT1-4-A-11	5,0	0,5	2,8	37,6	4,0	7,1	0,4	19,2	0,7	1,9	1,4	0,2	0,5	1,6	0,3	15,5	0,0
JT1-4-A-12	5,2	0,3	3,0	28,2	4,0	9,2	0,3	27,4	0,6	1,9	0,9	0,1	1,5	3,2	1,1	1,8	10,2
JT1-4-A-13	5,4	0,2	3,0	16,7	4,1	9,9	0,6	29,9	0,7	2,2	1,0	0,2	1,7	2,0	1,1	2,0	17,9
JT1-4-A-14	5,1	0,4	3,1	30,0	4,0	11,5	0,3	27,7	0,7	2,2	1,0	0,1	0,6	2,4	0,8	1,3	7,8
JT1-4-A-15	5,1	0,4	2,5	34,2	3,6	6,9	0,6	20,4	0,7	1,6	1,1	0,2	0,6	4,7	0,9	15,2	0,0
JT1-4-B-1	5,5	0,2	2,7	18,9	4,0	17,6	0,8	24,1	0,8	2,2	1,0	0,2	1,2	4,6	0,9	2,2	11,5
JT1-4-B-2	5,5	0,2	2,7	20,2	4,0	14,3	0,5	25,5	0,7	1,7	0,9	0,2	1,6	8,7	1,3	2,2	8,5
JT1-4-B-3	5,3	0,3	3,6	34,1	3,5	35,0	0,6	9,3	0,8	0,2	1,4	0,4	0,6	0,9	0,1	0,3	2,1
JT1-4-B-4	5,3	0,3	3,1	25,2	3,6	17,0	0,7	24,1	0,7	1,9	1,0	0,2	0,8	4,3	0,5	2,3	7,8
JT1-4-B-5	5,5	0,5	2,2	30,1	4,6	10,2	0,5	21,7	0,6	1,4	1,1	0,2	0,9	2,4	0,5	16,1	0,0
JT1-4-B-8	6,2	0,5	1,9	33,1	4,0	30,0	0,5	12,7	0,6	0,3	1,3	0,4	1,4	0,9	0,1	4,4	0,0
JT1-4-B-13	5,6	0,3	2,8	20,9	3,9	11,9	0,4	27,0	0,7	2,0	1,0	0,2	1,7	2,3	0,7	4,1	13,5

Образцы масла из семян дополнительно содержали 0,1% C14:0; 0,1-0,2% C16:3; 0,0-0,1% каждой из C20:1 Δ 13, C20:3 ω 6 и C20:4 ω 6; 0,3-0,4% C22:0; не содержали C22:1 и C22:2 ω 6; содержали 0,2% C24:0 и 0,2-0,4% C24:1.

Таблица 18

Состав жирных кислот липида из семян T1 (пул) *V. juncea*, трансформированных Т-ДНК из GA7-modB. Липиды дополнительно содержали около 0,1% каждой из 14:0, 16:3, 20:1 Δ 13 и 16:2, а 22:1 не была обнаружена

Семя	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1 Δ 11	C18:2	C18:3 ω 6	C18:3 ω 3	C20:0	C18:4 ω 3	C20:1 Δ 11	C20:2 ω 6	C20:3 ω 6	C20:4 ω 6	C20:3 ω 3	C22:0	C20:4 ω 3	C20:5 ω 3	C22:2 ω 6	C22:3 ω 3	C24:0	C24:1	C22:5 ω 3	C22:6 ω 3
JT1-2	4,2	0,3	2,5	42,4	3,2	27,7	0,1	16,4	0,6	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-3	4,5	0,3	2,7	44,6	3,1	26,8	0,1	14,8	0,7	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-4	5,1	0,3	3,2	26,8	3,5	17,4	0,5	22,8	0,7	2,5	1,1	0,2	0,0	0,0	1,2	0,3	2,9	0,7	0,0	0,1	0,2	0,3	2,8	7,2
JT1-5	4,7	0,4	2,4	41,6	3,4	28,4	0,1	15,8	0,7	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-6	4,8	0,4	2,3	37,3	3,3	30,2	0,4	13,2	0,7	0,2	1,4	0,3	0,0	0,0	0,7	0,3	0,6	0,1	0,0	0,3	0,2	0,5	2,6	0,0

Таблица 19

Состав жирных кислот масла семян T1 (единичных) *V. juncea*, трансформированных Т-ДНК из GA7-modB

Семя T1 №	C16:0	C16:1 Δ 9	C18:0	C18:1	18:1 Δ 11	C18:2	C18:3 ω 6	C18:3 ω 3	C20:0	C18:4 ω 3	20:1 Δ 11	C20:2 ω 6	C20:3 ω 3	C20:4 ω 3	C20:5 ω 3	C22:5 ω 3	C22:6 ω 3
JT1-4-A-1	5,0	0,2	2,7	23,5	3,4	17,0	0,7	24,8	0,7	2,0	1,1	0,2	0,8	4,0	0,6	2,4	9,9
JT1-4-A-2	4,3	0,3	2,6	37,2	3,2	11,0	0,3	22,1	0,7	0,9	1,3	0,2	1,4	3,2	0,3	9,4	0,0
JT1-4-A-3	5,6	0,3	2,7	20,8	3,7	16,0	0,6	24,4	0,7	2,0	0,9	0,2	1,1	4,5	0,7	3,1	11,4
JT1-4-A-4	4,6	0,4	2,8	36,2	3,4	10,6	0,3	24,5	0,8	9,9	1,7	0,2	0,3	0,5	0,0	2,5	0,0
JT1-4-A-5	5,0	0,2	3,2	20,3	3,6	13,7	0,7	25,9	0,7	2,0	0,9	0,2	1,3	4,4	1,5	1,6	13,5
JT1-4-A-6	4,8	0,4	3,4	37,9	3,7	7,4	0,4	19,9	0,9	1,4	1,4	0,1	0,8	1,9	0,4	13,9	0,0
JT1-4-A-7	5,6	0,3	3,0	26,2	4,0	8,9	0,3	26,6	0,6	1,8	1,0	0,1	1,8	3,7	1,3	2,2	11,3
JT1-4-A-8	4,8	0,4	2,9	40,3	3,4	7,8	0,3	22,2	0,8	1,4	1,3	0,1	0,8	2,4	0,4	9,6	0,0

ЛТ1-4-А-9	7,1	0,3	3,6	17,7	4,3	17,9	0,7	23,1	1,0	2,1	0,8	0,2	1,5	3,6	0,8	2,0	11,9
ЛТ1-4-А-10	5,1	0,2	4,2	22,3	3,4	19,5	0,7	21,7	0,8	1,5	0,9	0,2	1,7	7,8	0,9	1,0	6,5
ЛТ1-4-А-11	5,0	0,5	2,8	37,6	4,0	7,1	0,4	19,2	0,7	1,9	1,4	0,2	0,5	1,6	0,3	15,5	0,0
ЛТ1-4-А-12	5,2	0,3	3,0	28,2	4,0	9,2	0,3	27,4	0,6	1,9	0,9	0,1	1,5	3,2	1,1	1,8	10,2
ЛТ1-4-А-13	5,4	0,2	3,0	16,7	4,1	9,9	0,6	29,9	0,7	2,2	1,0	0,2	1,7	2,0	1,1	2,0	17,9
ЛТ1-4-А-14	5,1	0,4	3,1	30,0	4,0	11,5	0,3	27,7	0,7	2,2	1,0	0,1	0,6	2,4	0,8	1,3	7,8
ЛТ1-4-А-15	5,1	0,4	2,5	34,2	3,6	6,9	0,6	20,4	0,7	1,6	1,1	0,2	0,6	4,7	0,9	15,2	0,0
ЛТ1-4-В-1	5,5	0,2	2,7	18,9	4,0	17,6	0,8	24,1	0,8	2,2	1,0	0,2	1,2	4,6	0,9	2,2	11,5
ЛТ1-4-В-2	5,5	0,2	2,7	20,2	4,0	14,3	0,5	25,5	0,7	1,7	0,9	0,2	1,6	8,7	1,3	2,2	8,5
ЛТ1-4-В-3	5,3	0,3	3,6	34,1	3,5	35,0	0,6	9,3	0,8	0,2	1,4	0,4	0,6	0,9	0,1	4,3	2,1
ЛТ1-4-В-4	5,3	0,3	3,1	25,2	3,6	17,0	0,7	24,1	0,7	1,9	1,0	0,2	0,8	4,3	0,5	2,3	7,8
ЛТ1-4-В-5	5,5	0,5	2,2	30,1	4,6	10,2	0,5	21,7	0,6	1,4	1,1	0,2	0,9	2,4	0,5	16,1	0,0
ЛТ1-4-В-6	5,6	0,3	2,5	19,5	3,8	15,2	0,5	27,7	0,6	2,1	0,9	0,2	1,1	3,7	0,6	3,3	11,1
ЛТ1-4-В-7	5,9	0,5	2,0	29,9	4,0	11,2	0,3	26,2	0,6	11,5	1,4	0,2	0,3	0,4	0,0	4,1	0,1
ЛТ1-4-В-8	6,2	0,5	1,9	33,1	4,0	30,0	0,5	12,7	0,6	0,3	1,3	0,4	1,4	0,9	0,1	4,4	0,0
ЛТ1-4-В-9	4,9	0,2	3,4	24,6	3,0	18,5	0,3	26,2	0,8	1,3	1,1	0,2	2,0	5,5	0,6	0,8	5,2
ЛТ1-4-В-10	5,2	0,3	2,7	19,0	4,0	12,0	0,6	30,5	0,7	1,6	1,0	0,2	1,7	4,9	1,1	3,0	10,2
ЛТ1-4-В-11	4,8	0,2	3,0	23,7	3,1	18,1	0,6	23,5	0,7	1,6	1,2	0,2	1,5	4,5	0,8	1,6	9,6
ЛТ1-4-В-12	5,0	0,2	2,6	19,6	3,4	12,5	0,6	26,9	0,8	3,1	1,1	0,2	0,9	5,6	0,9	3,5	11,7
ЛТ1-4-В-13	5,6	0,3	2,8	20,9	3,9	11,9	0,4	27,0	0,7	2,0	1,0	0,2	1,7	2,3	0,7	4,1	13,5
ЛТ1-4-В-14	5,1	0,3	3,1	25,5	3,3	16,7	0,7	23,9	0,8	1,8	1,2	0,2	0,9	2,6	0,4	2,9	9,2
ЛТ1-4-В-15	5,6	0,3	2,7	19,5	4,1	14,0	0,8	24,6	0,7	2,7	0,9	0,2	0,7	9,4	1,3	2,5	8,5

Образцы масла семян дополнительно содержали 0,1% С14:0; 0,1-0,2% С16:3; по 0,0-0,1% каждой из С20:1Δ13, С20:3ω6 и С20:4ω6; 0,3-0,4% С22:0; не содержали С22:1 и С22:2ω6; содержали 0,2% С24:0 и 0,2-0,4% С24:1.

Таблица 20

Состав жирных кислот масла из единичных семян Т2 В. juncea, трансформированной Т-ДНК из GA7-modB. Липиды дополнительно содержали 0,1-0,2% С16:1Δ9, С16:3 и С20:2ω6, 0,5-0,6% С20:0, не содержали С20:3ω6, С20:4ω6 и С22:2ω6

Семя №	С16:0	С18:0	С18:1	С18:1Δ11	С18:2	С18:3ω6	С18:3ω3	С18:4	С20:1Δ11	С20:3ω3	С22:0	С20:4ω3	С20:5ω3	С22:3ω3	С24:0	С22:5ω6	С22:4ω3	С24:1	22:5ω3	С22:6ω3
1	4,4	1,7	36,3	2,9	8,3	0,5	22,0	1,4	1,2	0,4	0,3	4,2	0,6	0,1	0,1	0,0	1,8	0,3	12,1	0,0
2	5,6	1,9	39,1	3,1	8,4	0,4	18,9	1,2	1,3	0,5	0,3	2,5	0,4	0,1	0,2	0,0	1,5	0,4	12,6	0,0
3	5,5	1,8	42,3	3,2	9,9	0,3	24,0	5,9	1,5	0,2	0,4	0,5	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,4	1,5	0,0
4	5,6	1,5	36,8	3,7	9,4	0,3	19,6	0,6	1,4	1,4	0,3	1,9	0,3	0,2	0,2	0,0	1,6	0,4	13,1	0,0
5	4,6	1,7	36,3	2,7	7,2	0,3	22,6	1,0	1,5	0,7	0,3	2,1	0,3	0,1	0,2	0,0	2,2	0,3	14,4	0,0
6	4,9	1,8	38,3	3,1	7,4	0,3	20,2	0,8	1,3	0,8	0,3	2,7	0,5	0,2	0,2	0,0	1,7	0,3	13,7	0,0
7	4,7	1,7	36,2	3,0	8,2	0,4	20,9	0,7	1,3	0,9	0,3	2,9	0,5	0,2	0,2	0,0	2,0	0,3	14,2	0,0
8	4,8	2,2	41,0	3,0	9,8	0,2	27,0	4,2	1,8	0,3	0,3	0,5	0,0	0,1	0,2	0,0	0,7	0,3	2,2	0,0
9	5,8	1,7	36,6	3,7	9,1	0,3	21,3	0,9	1,4	0,8	0,3	1,5	0,3	0,1	0,2	0,0	1,2	0,4	12,7	0,0
10	4,8	2,1	47,1	2,9	7,4	0,2	23,9	4,8	1,7	0,2	0,3	0,5	0,0	0,0	0,2	0,0	0,5	0,3	1,5	0,0
11	5,1	1,7	37,4	3,3	7,7	0,3	20,7	0,9	1,4	0,8	0,3	2,5	0,4	0,1	0,2	0,0	1,6	0,4	13,6	0,0
12	4,7	1,8	37,3	2,7	7,9	0,4	20,6	1,1	1,3	0,5	0,3	4,3	0,6	0,1	0,1	0,0	2,2	0,3	12,3	0,0
13	4,9	2,0	37,9	3,0	7,1	0,4	20,1	1,1	1,3	0,6	0,3	4,1	0,5	0,1	0,1	0,0	2,1	0,3	12,6	0,0
14	4,7	1,6	35,7	3,2	6,9	0,3	22,4	0,7	1,4	1,3	0,3	3,0	0,5	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	14,0	0,0
15	4,7	1,8	37,6	3,4	7,8	0,3	23,7	0,6	1,5	1,2	0,2	1,7	0,3	0,2	0,1	0,0	1,8	0,3	11,4	0,0
16	5,3	1,6	35,3	3,5	8,1	0,5	21,1	0,8	1,2	0,7	0,3	3,1	0,5	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	13,9	0,0
17	4,9	1,7	39,4	3,3	7,7	0,3	21,1	0,7	1,4	0,8	0,3	2,0	0,3	0,2	0,1	0,0	1,7	0,3	12,3	0,0
18	5,0	1,8	38,5	3,1	7,8	0,4	20,5	0,8	1,3	0,8	0,2	2,3	0,3	0,2	0,1	0,0	2,0	0,3	13,1	0,0
19	5,1	1,8	39,5	2,9	9,0	0,2	22,2	0,6	1,5	1,0	0,3	1,7	0,2	0,1	0,2	0,0	1,6	0,3	10,2	0,0
20	4,8	1,8	38,2	3,2	7,8	0,4	21,1	0,7	1,4	0,7	0,3	2,1	0,4	0,2	0,1	0,0	1,7	0,3	13,3	0,0
21	5,0	2,0	39,7	2,9	7,9	0,4	20,2	0,7	1,3	0,7	0,3	2,3	0,3	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	12,2	0,0
22	4,7	1,6	36,0	3,3	8,3	0,3	23,7	0,6	1,5	1,2	0,3	1,7	0,3	0,2	0,1	0,0	1,8	0,3	12,7	0,0
23	6,2	2,1	32,0	4,4	7,2	0,6	19,4	1,2	1,2	0,6	0,4	2,2	0,5	0,3	0,2	0,0	1,6	0,4	17,6	0,0

Таблица 21

Состав жирных кислот масла из единичных семян ТЗ В. juncea, трансформированной Т-ДНК из GA7-modB. Семена дополнительно содержали по 0,1-0,2% каждой из C16:3, C20:1Δ13, C20:2ω6. Не обнаружены C20:3ω6, C20:4ω6, C22:2ω6, C22:5ω6 и C22:6ω3

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

Пример 9. Дальнейший анализ трансформированных растений и полевые испытания.

Гибридизационный анализ методом саузерн-блоттинга проводили для отобранных растений Т2 В. parus, трансформированных Т-ДНК из конструкции GA7-modB. ДНК, экстрагированную из образцов ткани растения, расщепляли несколькими рестрикционными ферментами для гибридизационного анализа методом саузерн-блоттинга. Радиоактивный зонд, соответствующий части Т-ДНК, гибридизовали с пятнами, которые промывали в строгих условиях, и пятна приводили в контакт с пленкой, чтобы обнаружить полосы гибридизации. Некоторые из образцов продемонстрировали единичные полосы гибридизации для каждой из смесей после расщепления рестрикционными ферментами, что соответствовало единичным инсерциям Т-ДНК в растениях, в то время как другие продемонстрировали две полосы, а следующие снова продемонстрировали несколько полос Т-ДНК, что соответствовало 4-6 инсерциям. Количество полос гибридизации, наблюдаемых в саузерн-блоттинг анализе, хорошо соотносилось с количеством копий Т-ДНК в трансгенных растениях, определенным методом цифровой ПЦР, до количества копий около 3 или 4. При количестве копий большем чем около 5 метод цифровой ПЦР был менее надежным.

Некоторые из отобранных линий использовали в качестве доноров пыльцы при скрещивании с сериями из около 30 различных сортов В. parus с различным фоновым генотипом. Дальнейшие обратное скрещивание проводили, чтобы определить, являются ли множественные инсерции Т-ДНК генетически связанными или нет, и позволить сегрегацию генетически несвязанных трансгенных локусов. Таким образом были отобраны линии, содержащие единичные трансгенные локусы.

Однопраймерные реакции ПЦР проводили в трансгенных линиях с применением праймеров, смежных с левыми и правыми границами Т-ДНК, и любые линии, демонстрирующие присутствие обращенных повторов Т-ДНК, отбрасывали.

Некоторое количество трансгенных линий продемонстрировало задержку цветения, тогда как у других было снижено семяобразование и, таким образом, снижен выход семян на растение после выращивания в теплице, что согласовалось со сниженной мужской или женской фертильностью. Исследовали морфологию цветка в этих растениях и наблюдали, что в некоторых случаях раскрытие семенных коробочек и высвобождение пыльцы от пыльников задерживалось таким образом, что рыльца пестика удлинялись до раскрытия семенных коробочек и высвобождения пыльцы, таким образом отдаляя пыльники от рылец. Полная фертильность могла бы быть восстановлена искусственным опылением. Кроме того, определяли жизнеспособность пыльцы в момент раскрытия семенных коробочек и высвобождения пыльцы с помощью окрашивания красителями для определения жизнеспособности FDA и ПЙ (пример 1), и показано, что она была снижена в некоторых линиях, тогда как в большинстве трансгенных линий жизнеспособность пыльцы составила около 100% от жизнеспособности в контрольных растениях дикого типа. В качестве дальнейшего анализа для выявления возможной причины уменьшения выхода семени с некоторых растений, анализировали содержание и состав жирных кислот в цветочных почках, включая пыльники и рыльца/пестики некоторых растений Т3 и Т4. ДГК не была обнаружена в экстрагированных липидах, указывая на то, что гены в генетической конструкции не экспрессировались в цветочных почках в процессе развития растения, и исключая это как причину сниженного выхода семян.

Содержание масла измеряли методом ЯМР, и определяли уровень ДГК в общем содержании жирных кислот для семян T2. Трансгенные линии, содержащие менее чем 6% ДГК, отбрасывали. Количество копий Т-ДНК в образцах листьев растений поколений T1, T2 и T3 определяли методом цифровой ПЦР (пример 1).

Отобранные партии семян T3 и T4 высевали в поле на двух участках в Виктории, Австралия, каждую в рядах длиной 10 м с плотностью посева 10 семян/м. Отобранные партии семян включали полученную из В003-5-14 линию, которая демонстрирует уровни ДГК в пуле семени около 8-11% и уровни ДГК для индивидуальных семян T2 до около 19%, с количеством копий Т-ДНК 3 в растении T0. Кроме того, отобранные партии семян включали полученные из В0050-27 линии, которые продемонстрировали уровни ДГК в семенах T2 свыше 20%, и количество копий Т-ДНК 1 или 2 в растениях T2. Семена, высеваемые в поле, прорастали и давали побеги с той же скоростью, что и семена дикого типа. Растения, выращенные из большинства, но не всех высеянных партий семян, были фенотипически нормальными, например демонстрировали морфологию, скорость роста, высоту растений, мужскую и женскую фертильность, жизнеспособность пыльцы (100%), образование семян, размер и морфологию стручков, которые были по существу такими же, как у контрольных растений дикого типа, выращенных в таких же условиях. Выход семян на растение был сходен с выходом для контрольных растений дикого типа, выращенных в таких же условиях. Другие образцы семени высевали на больших площадях для массового производства отобранных трансгенных линий. Общее содержание ДГК в урожае собранных семян составляло по меньшей мере 30 мг/г семян.

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.

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.

- Abbadi et al. (2004) *Plant Cell* 16: 2734-2748.
- Abbott et al. (1998) *Science* 282:2012-2018.
- Agaba et al. (2004) *Marine Biotechnol. (NY)* 6:251-261.
- Alvarez et al. (2000) *Theor Appl Genet* 100:319-327.
- Armbrust et al. (2004) *Science* 306:79-86.
- Baumlein et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225:459-467.
- Baumlein et al. (1992) *Plant J.* 2:233-239.
- Beaudoin et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6421-6426.
- Belide et al. (2002) *Curr. Biol.* 12:684-688(2013) *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 113:543-553.
- Berberich. et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 36:297-306.
- Broun et al. (1998) *Plant J.* 13:201-210.
- Brown et al. (2002) *Biochem J.* 364:795-805.
- Chan et al. (2006) *Nature Biotechnology* 28:951-956.
- Chapman et al. (2004) *Gen. Dev.* 18:1179-1186.
- Chen et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1302-1313.
- Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
- Cheng et al. (2010) *Transgenic Res* 19: 221-229.
- Cho et al. (1999a) *J. Biol. Chem.* 274:471-477.
- Cho et al. (1999b) *J. Biol. Chem.* 274:37335-37339.
- Christie (1982) *J. Lipid Res.* 23:1072-1075.
- Damude et al. (2006). *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9446-9451.
- Denic and Weissman (2007) *Cell* 130:663-677.
- Domergue et al. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4105-4113.
- Domergue et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 35115-35126.
- Domergue et al. (2005) *Biochem. J.* 1 389: 483-490.
- Dunoyer et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1235-1250.
- Ellerstrom et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1019-1027.
- Gamez et al. (2003) *Food Res International* 36: 721-727.
- Garcia-Maroto et al. (2002) *Lipids* 37:417-426.
- Girke et al. (1998) *Plant J.* 15:39-48.

- Harayama (1998). Trends Biotechnol. 16: 76-82.
- 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.
- Huang et al. (1999) Lipids 34:649-659.
- Inagaki et al. (2002) Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:613-621.
- Kajikawa et al. (2004) Plant Mol. Biol. 54:335-52.
- Kajikawa et al. (2006) FEBS Lett 580:149-154.
- Kereszt et al. (2007) Nature Protoc 2:948-952.
- Kim et al. (2005) Plant Cell. 2005 1073-89.
- Knutzon et al. (1998) J. Biol Chem. 273:29360-6.
- Koletzko et al. (1988) Am. J. Clin. Nutr. 47:954-959
- Koziel et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:393-405.
- Lassner (1995) Plant Physiol. 109:1389-94.
- 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.
- 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.
- 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.
- Shukla et al. (2002) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 79:965-969.
- Singh et al. (2005) *Curr. Opin. in Plant Biol.* 8:197-203.
- Speranza et al. (2012) *Process Biochemistry* (In Press).
- Sperling et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:3801-3811.
- Sperling et al. (2001) *Arch. Biochm. Biophys.* 388:293-8.

- Sprecher et al. (1995) *J. Lipid Res.* 36:2471-2477.
- Spychalla et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1142-1147.
- Tonon et al. (2003) *FEBS Lett.* 553:440-444.
- Trautwein (2001) *European J. Lipid Sci. and Tech.* 103:45-55.
- 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.
- Weng et al., (2004) *Plant Molecular Biology Reporter* 22:289-300.
- Whitney et al. (2003) *Planta* 217:983-992.
- Wood (2009) *Plant Biotechnol J.* 7:914-24.
- Wu et al. (2005) *Nat. Biotech.* 23:1013-1017.
- 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. (2007) *FEBS Letters* 581: 315-319.
- Zhang et al. (2008) *Yeast* 25: 21-27.
- Zhou et al. (2007) *Phytochem.* 68:785-796.
- Zhou et al. (2008) *Insect Mol Biol* 17: 667-676.
- Zou et al. (1997) *Plant Cell.* 9:909-23.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экстрагированный растительный липид, содержащий жирные кислоты в этерифицированной форме, причем жирные кислоты включают олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, ω6 жирные кислоты, включающие линолевую кислоту (ЛК), ω3 жирные кислоты, включающие α-линолевую кислоту (АЛК), докозапентаеновую кислоту (ДПК), стеариδοновую кислоту (СДК), эйкозапентаеновую кислоту (ЭПК) и эйкозатетраеновую кислоту (ЭТК), причем уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 7 до 35%.

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

i) уровень пальмитиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 2 до 15% или от около 3 до около 10%,

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

iii) уровень олеиновой кислоты в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 1 до около 30%, от около 3 до около 30%, от около 6 до около 30%, от 1 до около 20%, от около 30 до около 60%, от около 45 до около 60%, около 30% или от около 15 до около 30%,

iv) уровень линолевой кислоты (ЛК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 35%, от около 4 до около 20%, от около 4 до 17% или от около 5 до около 10%,

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

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

vii) уровень стеариδοновой кислоты (СДК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем около 10, менее чем около 8, менее чем около 7, менее чем около 6, менее

чем около 4, менее чем около 3%, от около 0,05 до около 7%, от около 0,05 до около 6%, от около 0,05 до около 4%, от около 0,05 до около 3%, от около 0,05 до около 10% или от 0,05 до около 2%,

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

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

x) уровень эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 4 до 15%, менее чем 4%, менее чем около 3, менее чем около 2%, от 0,05 до 10%, от 0,05 до 5%, от 0,05 до около 3% или от 0,05 до около 2%,

xi) уровень докозагексаеновой кислоты (ДГК) в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем 2% или от 0,05 до около 2%,

xii) липид содержит менее чем 0,1% ω 6-докозапентаеновой кислоты (22:5 $\Delta^{4,7,10,13,16}$) в общем содержании жирных кислот,

xiii) уровень общих насыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 25%, от около 4 до около 20%, от около 6 до около 20%, от около 6 до около 12%,

xiv) уровень общих моновенасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 4 до около 40%, около 4 до около 35%, от около 8 до около 25%, от 8 до около 22%, от около 15 до около 40% или от около 15 до около 35%,

xv) уровень общих полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 20 до около 75%, от 30 до 75%, от около 50 до около 75%, около 60, около 65, около 70, около 75% или от около 60 до около 75%,

xvi) уровень общих ω 6 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от около 35 до около 50%, от около 20 до около 35%, от около 6 до 20%, менее чем 20, менее чем около 16, менее чем около 10%, от около 1 до около 16%, от около 2 до около 10% или от около 4 до около 10%,

xvii) уровень общих ω 6 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет менее чем около 10, менее чем около 8, менее чем около 6%, менее чем 4%, от около 1 до около 20%, от около 1 до около 10%, от 0,5 до около 8% или от 0,5 до 4%, при этом указанные ω 6 жирные кислоты представляют собой сумму всех ω 6 жирных кислот, кроме ЛК, в экстрагированном липиде, выраженную в процентах от общего содержания жирных кислот в экстрагированном липиде,

xviii) уровень общих ω 3 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 36 до около 65%, от 36 до около 70%, от 40 до около 60%, от около 30 до около 60%, от около 35 до около 60%, от 40 до около 65%, от около 30 до около 65%, от 35 до около 65%, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60, около 65 или около 70%,

xix) уровень общих ω 3 жирных кислот в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 21 до около 45%, от 21 до около 35%, от около 23 до около 35%, от около 25 до около 35%, от около 27 до около 35%, около 23, около 25, около 27, около 30, около 35, около 40 или около 45%, при этом указанные ω 3 жирные кислоты представляют собой сумму всех ω 3 жирных кислот, кроме АЛК, в экстрагированном липиде, выраженную в процентах от общего содержания жирных кислот в экстрагированном липиде,

xx) соотношение общих ω 6 жирных кислот к общим ω 3 жирным кислотам в экстрагированном липиде составляет от около 1,0 до около 3,0, от около 0,1 до около 1, от около 0,1 до около 0,5, менее чем около 0,50, менее чем около 0,40, менее чем около 0,30, менее чем около 0,20, менее чем около 0,15, около 1,0, около 0,1, от около 0,10 до около 0,4 или около 0,2,

xxi) соотношение общих ω 6 жирных кислот (xvii) к общим ω 3 жирным кислотам (xix) в экстрагированном липиде составляет от около 1,0 до около 3,0, от около 0,02 до около 0,1, от около 0,1 до около 1, от около 0,1 до около 0,5, менее чем около 0,50, менее чем около 0,40, менее чем около 0,30, менее чем около 0,20, менее чем около 0,15, около 0,02, около 0,05, около 0,1, около 0,2 или около 1,0,

xxii) общие жирные кислоты в экстрагированном липиде содержат менее чем 1,5% C20:1, менее чем 1% C20:1 или около 1% C20:1,

xxiii) содержание триацилглицерида (ТАГ) в экстрагированном липиде составляет по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90, по меньшей мере 95% (мас./мас.), от около 70 до около 99% (мас./мас.) или от около 90 до около 99% (мас./мас.),

xxiv) липид содержит диацилглицерид (ДАГ), причем ДАГ содержит ДПК,

xxv) по меньшей мере 70% этерифицированной ДГК и/или ДПК в составе ТАГ находится в положении sn-1 или sn-3 ТАГ и

xxvi) уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет око-

ло 7, около 8, около 9, около 10, около 12, около 15, около 18, около 20, около 22, около 24, около 26, около 28, около 31, от около 7 до около 31%, от около 7 до около 28%, от около 10 до 35%, от около 10 до около 30%, от около 10 до около 25%, от около 10 до около 22%, от около 14 до 35%, от около 16 до 35%, от около 16 до около 30%, от около 16 до около 25% или от около 16 до около 22%.

3. Липид по п.2, отличающийся тем, что уровень ДГК составляет менее чем 0,5% от общего содержания жирных кислот экстрагированного липида.

4. Липид по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что является компонентом масла, полученного из масличной культуры.

5. Липид по п.4, отличающийся тем, что масло получено из растений рода *Brassica* или растений рода *Camelina*, в частности *C. sativa*.

6. Способ получения экстрагированного растительного липида по любому из пп.1-5, включающий стадии:

I) получения части растения, содержащей липид, включающий профиль жирных кислот по любому из пп.1-5, при этом часть растения содержит экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

- a) ω 3-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
 - b) Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
 - c) Δ 12-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
 - d) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза и/или Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
 - e) ω 3-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
 - f) Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
 - g) Δ 12-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
 - h) Δ 12-десатураза, ω 3-десатураза и/или Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
 - i) ω 3-десатураза или Δ 15-десатураза, Δ 6-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 6-элонгаза и Δ 5-элонгаза или
 - j) ω 3-десатураза или Δ 15-десатураза, Δ 8-десатураза, Δ 5-десатураза, Δ 9-элонгаза и Δ 5-элонгаза,
- причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторами, способными направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в клетке части растения, и

II) экстракции липида из части растения, причем уровень ДПК в общем содержании жирных кислот экстрагированного липида составляет от 7 до 35%, при этом одна или более клеток части растения содержат по меньшей мере около на 25% больше ω 3 жирных кислот, чем соответствующие клетки без экзогенных полинуклеотидов.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что часть растения представляет собой семя.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что семя представляет собой семя *Brassica napus*, *B. juncea* или *C. sativa*.

9. Способ по любому из пп.6-8, отличающийся тем, что часть растения содержит экзогенные полинуклеотиды, кодирующие Δ 12-десатуразу, ω 3-десатуразу и/или Δ 15-десатуразу, Δ 6-десатуразу, Δ 5-десатуразу, Δ 6-элонгазу и Δ 5-элонгазу.

10. Способ по любому из пп.6 или 9, отличающийся тем, что указанные ферменты имеют следующие активности:

- i) Δ 6-десатураза предпочтительно осуществляет десатурацию α -линоленовой кислоты (АЛК) относительно линолевой кислоты (ЛК),
- ii) Δ 6-элонгаза также обладает активностью Δ 9-элонгазы,
- iii) Δ 12-десатураза также обладает активностью Δ 15-десатуразы,
- iv) Δ 6-десатураза также обладает активностью Δ 8-десатуразы,
- v) Δ 8-десатураза также обладает активностью Δ 6-десатуразы,
- vi) Δ 15-десатураза также обладает активностью ω 3-десатуразы в отношении ГЛК,
- vii) ω 3-десатураза также обладает активностью Δ 15-десатуразы в отношении ЛК,
- viii) ω 3-десатураза осуществляет десатурацию ЛК и/или ГЛК,
- ix) ω 3-десатураза осуществляет десатурацию ГЛК относительно ЛК,
- x) одна или более или все десатуразы обладают более высокой активностью по отношению к ацил-КоА чем по отношению к ацил-ФХ (ацил-фосфатидилхолин),
- xi) Δ 6-десатураза обладает более высокой активностью Δ 6-десатуразы в отношении АЛК, чем в отношении к ЛК,
- xii) Δ 6-десатураза обладает более высокой активностью в отношении АЛК-КоА чем в отношении АЛК, присоединенной к положению sn-2 ФХ,
- xiii) Δ 6-десатураза обладает по меньшей мере в 2 раза более высокой Δ 6-десатуразной 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 чем в отношении ЛК,

xiv) $\Delta 6$ -десатураза обладает более высокой активностью в отношении АЛК-КоА чем в отношении АЛК, присоединенной к положению sn-2 ФХ,

xv) $\Delta 6$ -десатураза обладает по меньшей мере в 5 раз или 10 раз более высокой $\Delta 6$ -десатуразной активностью в отношении АЛК-КоА чем в отношении АЛК, присоединенной к положению sn-2 ФХ,

xvi) десатураза представляет собой фронт-энд десатуразу и

xvii) $\Delta 6$ -десатураза не обладает обнаруживаемой активностью $\Delta 5$ -десатуразы в отношении ЭТК.

11. Способ по любому из пп.6-10, отличающийся тем, что экзогенные полинуклеотиды ковалентно соединены в молекулу Т-ДНК, которая интегрирована в геном клеток части растения, причем количество таких молекул Т-ДНК, интегрированных в геном клеток части растения, составляет одну, две или три.

12. Способ по любому из пп.6-11, отличающийся тем, что дополнительно включает обработку экстрагированного липида для повышения уровня ДПК в процентном выражении от общего содержания жирных кислот, причем обработка включает фракционирование, перегонку или переэтерификацию, в частности, с получением метиловых или этиловых эфиров ДПК или комбинацию указанных методов.

13. Растение масличной культуры, содержащее липид по любом из пп.1-5, в семени, или его часть, включающие экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

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

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

iii) $\omega 3$ -десатураза и/или $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза или

iv) $\omega 3$ -десатураза и/или $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 9$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более специфическими для семени промоторами, способными направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в развивающемся семени растения.

14. Растение или его часть по п.13, включающие экзогенные полинуклеотиды, кодирующие $\Delta 12$ -десатуразу, $\omega 3$ -десатуразу и/или $\Delta 15$ -десатуразу, $\Delta 6$ -десатуразу, $\Delta 5$ -десатуразу, $\Delta 6$ -элонгазу и $\Delta 5$ -элонгазу.

15. Растение по п.13 или 14, которое представляет собой *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa*, причем зрелое семя указанного растения содержит ДПК в количестве по меньшей мере около 28 мг на 1 г семян.

16. Клетка растения по любому из пп.13-15, содержащая экзогенные полинуклеотиды, кодирующие один из следующих наборов ферментов:

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

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

iii) $\omega 3$ -десатураза и/или $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза или

iv) $\omega 3$ -десатураза и/или $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 9$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза,

причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более специфическими для семени промоторами, способными направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в развивающемся семени растения.

17. Семя растения, которое получено из растения по любому из пп.13 или 15 и содержит липид по любому из пп.1-5.

18. Семя по п.17, которое представляет собой зрелое, собранное семя *Brassica napus*, *B. juncea* или *Camelina sativa*, содержащее влагу от около 4 до около 15 мас.%, причем содержание ДПК в указанном семени составляет по меньшей мере около 28 мг на 1 г семян.

19. Способ получения экстрагированного растительного липида по любому из пп.1-5, включающий следующие стадии:

i) получение семени по п.17 или 18 и

ii) экстракцию липида из семени.

20. Способ получения растения, содержащего липид по любому из пп.1-5, включающий:

а) количественное определение уровня ДПК в липиде, который образуется в одной или более частях множества растений, причем каждое растение содержит по меньшей мере один экзогенный полинуклеотид, кодирующий один из следующих наборов ферментов;

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

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

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

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

и $\Delta 5$ -элонгаза,

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

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

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

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

и $\Delta 5$ -элонгаза,

ix) $\omega 3$ -десатураза или $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 6$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 6$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза или

x) $\omega 3$ -десатураза или $\Delta 15$ -десатураза, $\Delta 8$ -десатураза, $\Delta 5$ -десатураза, $\Delta 9$ -элонгаза и $\Delta 5$ -элонгаза, причем каждый полинуклеотид функционально связан с одним или более промоторами, способными направлять экспрессию указанных полинуклеотидов в клетке части растения, и

б) идентификацию растения среди множества растений, одна или более частей которого содержат липид по любому из пп.1-5, и

в) получение потомства от идентифицированного растения или его семян.

21. Способ получения семян, включающий:

а) выращивание в поле одного или более растений по любому из пп.13-15, которые образуют семена по п.17 или 18, и

б) сбор урожая семян указанных растений.

22. Способ получения липида по любому из пп.1-5, включающий получение семян способом по п.21 и экстракцию липида из указанных семян, который имеет общий выход ДПК по меньшей мере 60 кг ДПК на 1 га.

23. Жмых, полученный из семян по п.17 или 18, или из семян, полученных от растения по любому из пп.13-15.

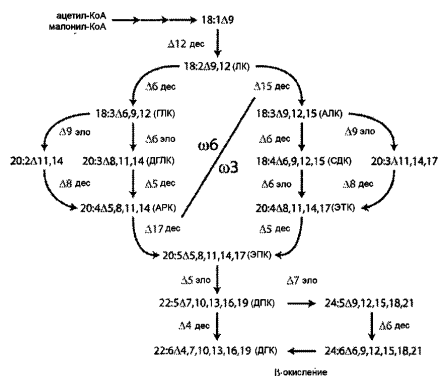
24. Композиция, содержащая липид по любому из пп.1-5 в комбинации со стандартным, известным, нетоксичным приемлемым для использования в пищевых продуктах или сельском хозяйстве носителем, адъювантом или растворителем, таким как фосфатно-солевой буфер, вода, этанол, полиолы, растительные масла, увлажняющий агент или эмульсия, такая как эмульсия вода/масло, а также с изотоническим агентом, сахаром, натрием хлоридом, подсластителями, вкусовыми добавками и ароматизаторами, витаминами, жирными кислотами, протеинами или витаминами, другими ингредиентами для пищевых продуктов или кормов, причем указанная композиция находится в форме, выбранной из таблеток, капсул, проглатываемой жидкости или порошка, инъекционной форме или в форме мази или крема для местного применения для использования в пищевой промышленности или сельском хозяйстве.

25. Корм, содержащий липид по любому из пп.1-5, растение или часть растения по любому из пп.13-15, растительные клетки по п.16, семена по п.17 или 18, жмых по п.23 или их комбинацию.

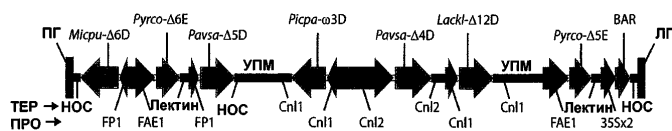
26. Способ получения корма, включающий смешивание липида по любому из пп.1-5, растения или части растения по любому из пп.13-15, растительных клеток п.16, семян по п.17 или 18 или жмыха по п.23 по меньшей мере с еще одним кормовым ингредиентом.

27. Способ получения пищевого продукта, включающий смешивание липида по любому из пп.1-5, растения или части растения по любому из пп.13-15, растительных клеток по п.16, семян по п.17 или 18 или жмыха по п.23 по меньшей мере с еще одним пищевым ингредиентом.

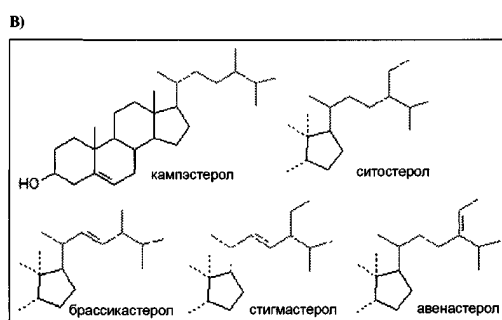
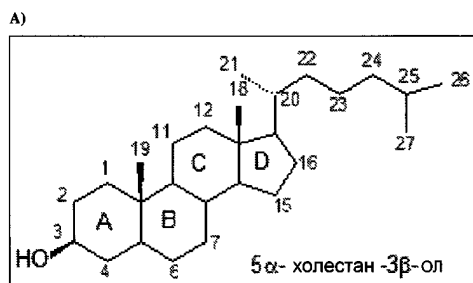
28. Применение липида по любому из пп.1-5 для получения лекарственного средства для лечения или предупреждения состояния, при котором ПНЖК оказывают благоприятное воздействие.



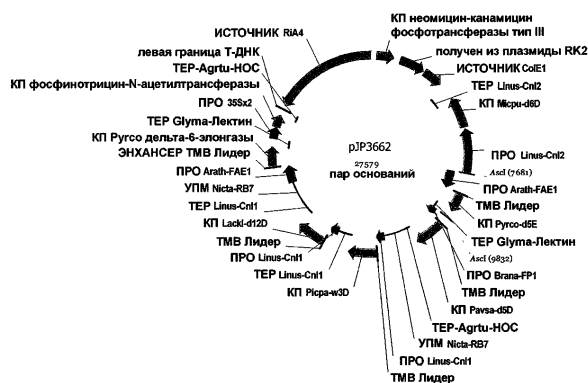
Фиг. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4