(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0049550**

(51)[7] **A61K 36/00**; A61K 31/232; C12N 15/82; C11B 1/10; C12N 15/52; A01H 5/00

(13) **B**

(21) 1-2017-00323 (22) 18/06/2015
(86) PCT/AU2015/050340 18/06/2015 (87) WO/2015/196250 30/12/2015
(30) 2014902471 27/06/2014 AU; 14/575,756 18/12/2014 US; PCT/AU2014/050433 18/12/2014 AU; 20140104761 18/12/2014 AR
(45) 25/08/2025 449 (43) 25/07/2017 352A
(73) 1. COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION (AU)
Clunies Ross St, Acton, Australian Capital Territory 2601, Australia
2. GRAINS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION (AU)
Level 4, 4 National Circuit, Barton, Australian Capital Territory 2600, Australia
3. Nuseed Nutritional Australia Pty Ltd (AU)
103-109 Pipe Road, Laverton North, Victoria 3026, Australia
(72) PETRIE, James Robertson (AU); SINGH, Surinder Pal (AU); SHRESTHA, Pushkar (AU); MCALLISTER, Jason, Timothy (AU); DE FEYTER, Robert, Charles (AU); DEVINE, Malcolm, David (CA).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) LIPIT CHIẾT TÁCH ĐƯỢC TỪ CÂY, VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT LIPIT NÀY

(21) 1-2017-00323

(57) Sáng chế đề cập đến lipit chiết tách được từ cây, bao gồm các axit béo ở dạng được este hóa và quy trình sản xuất lipit này. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến các loại cây có hạt chứa dầu bao gồm lipit nêu trên như *Brassica napus*, *B. junce, Camelina sativa*, các bộ phận của cây như hạt, tế bào của cây cũng như phương pháp tạo ra cây, bộ phận của cây như hạt và sản phẩm thu được bằng cách sử dụng phương pháp này như lipit, dầu, bột từ hạt, chế phẩm chứa lipit hoặc dầu, thức ăn chăn nuôi; và phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi từ chế phẩm chứa lipit hoặc dầu nêu trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lipit chứa axit docosapentaenoic thu được từ tế bào cây hoặc tế bào vi sinh vật và quy trình sản xuất và sử dụng lipit này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện nay, axit béo mạch dài không bão hòa đa (LC-PUFA: Long-chain polyunsaturated fatty acid) omega-3 đã được biết một cách rộng rãi là các hợp chất quan trọng cho sức khỏe con người và động vật. Các axit béo này có thể thu được từ các nguồn thức ăn hoặc bằng cách chuyển hóa axit béo linoleic (LA, 18:2ω6) hoặc α-linolenic (ALA, 18:3ω3), cả hai axit này đều được coi là các axit béo thiết yếu trong chế độ ăn của người. Trong khi người và các loại động vật có xương sống khác có thể chuyển hóa LA hoặc ALA, thu được từ các nguồn thực vật, thành C22, quá trình chuyển hóa này được thực hiện với tốc độ rất thấp. Hơn nữa, phần lớn xã hội hiện đại có chế độ ăn uống không cân bằng, trong đó ít nhất 90% axit béo không bão hòa đa (PUFA: polyunsaturated fatty acid) là axit béo ω6, mặc dù tỷ lệ axit béo ω6: ω3 được cho là lý tưởng là nhỏ hơn hoặc bằng 4:1 (Trautwein, 2001). Nguồn LC-PUFA từ thức ăn trực tiếp như axit eicosapentaenoic (EPA, 20:5ω3), axit docosapentaenoic (DPA) và axit docosahexaenoic (DHA, 22:6ω3) cho người phần lớn là từ cá hoặc dầu cá. Do đó, các chuyên gia về sức khỏe đã khuyến cáo việc thường xuyên đưa cá có hàm lượng LC-PUFA đáng kể vào chế độ ăn của con người. Ví dụ như ngày càng nhiều các loại dầu LC-PUFA được tạo ra từ cá được đưa vào các sản phẩm thức ăn và trong các chế phẩm công thức dành cho trẻ em. Tuy nhiên, do sự sụt giảm của ngành đánh bắt cá trên toàn cầu và cả ở mức quốc gia, cần có các nguồn khác để cung cấp các loại dầu có tác dụng tăng cường sức khỏe này.

Trái ngược với động vật, các cây ra hoa không có khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa có chiều dài mạch dài hơn 18 nguyên tử cacbon. Cụ thể

là, hoa màu và các cây trong vườn cùng với các thực vật hạt kín khác không có các enzym cần thiết để tổng hợp các axit béo ω3 mạch dài như EPA, axit docosapentaenoic (DPA, 22:5ω3) và DHA mà được tạo ra từ ALA. Do đó, mục đích quan trọng trong ngành công nghệ sinh học thực vật là tạo ra các cây hoa màu sinh ra các lượng LC-PUFA đáng kể, bằng cách đó tạo ra nguồn thay thế các hợp chất này.

Con đường sinh tổng hợp LC-PUFA

Quá trình sinh tổng hợp LC-PUFA ở các sinh vật như vi tảo, rêu và nấm thường xảy ra dưới dạng một loạt các phản ứng khử bão hòa và kéo dài mạch phụ thuộc vào oxy (Fig.1). Con đường thông thường nhất tạo ra EPA ở các sinh vật này bao gồm phản ứng khử bão hòa-Δ6, phản ứng kéo dài mạch-Δ6 và phản ứng khử bão hòa-Δ5 (được gọi là con đường khử bão hòa-Δ6), trong khi con đường ít thông dụng hơn sử dụng phản ứng kéo dài mạch-Δ9, phản ứng khử bão hòa-Δ8 và phản ứng khử bão hòa-Δ5 (được gọi là con đường khử bão hòa-Δ9). Các phản ứng khử bão hòa và kéo dài mạch liên tiếp có thể bắt đầu hoặc với cơ chất axit béo ω6 LA, được thể hiện ở dạng biểu đồ là phần trên bên trái trên Fig.1 (ω6) hoặc với cơ chất ω3 ALA thành EPA, được thể hiện là phần dưới bên phải trên Fig.1 (ω3). Nếu phản ứng khử bão hòa-Δ6 đầu tiên được thực hiện trên cơ chất ω6 LA, thì sản phẩm LC-PUFA của bộ ba enzym này sẽ là axit béo ω6 ARA. Các sinh vật tổng hợp LC-PUFA có thể chuyển hóa axit béo ω6 thành axit béo ω3 bằng cách sử dụng ω3-desaturaza, được thể hiện là bước Δ17-desaturaza trên Fig.1 để chuyển hóa axit arachidonic (ARA, 20:4ω6) thành EPA. Một số thành viên của họ ω3-desaturaza có thể tác động lên nhiều cơ chất từ LA đến ARA. Các ω3-desaturaza thực vật thường xúc tác đặc hiệu phản ứng khử bão hòa-Δ15 của LA thành ALA, trong khi ω3-desaturaza của nấm và nấm men có thể xúc tác đặc hiệu cho phản ứng khử bão hòa-Δ17 của ARA thành EPA (Pereira et al., 2004a; Zank et al., 2005). Một số báo cáo đề xuất rằng các ω3-desaturaza không đặc hiệu có thể tồn tại, chúng có thể chuyển hóa rất nhiều

cơ chất ω6 thành các sản phẩm ω3 tương ứng của chúng (Zhang et al., 2008).

Sự chuyển hóa EPA thành DHA ở các sinh vật này xảy ra bằng phản ứng kéo dài mạch-Δ5 của EPA để tạo ra DPA, sau đó là phản ứng khử bão hòa-Δ4 để tạo ra DHA (Fig.1). Ngược lại, động vật có vú sử dụng con đường gọi là "Sprecher" để chuyển hóa DPA thành DHA bằng ba phản ứng riêng biệt độc lập với Δ4-desaturaza (Sprecher et al., 1995).

Các tiền desaturaza thường được tìm thấy ở thực vật, rêu, vi tảo, và các động vật bậc thấp như *Caenorhabditis elegans* phần lớn chấp nhận cơ chất axit béo được este hóa ở vị trí *sn-2* của cơ chất phosphatidylcholin (PC). Do đó, các desaturaza này được biết là các tiền desaturaza, liên kết với lipit, axyl-PC (Domergue et al., 2003). Ngược lại, tiền desaturaza của động vật bậc cao thường chấp nhận cơ chất axyl-CoA, trong đó cơ chất axit béo được liên kết với CoA chứ không liên kết với PC (Domergue et al., 2005). Một số desaturaza của vi tảo và một desaturaza thực vật đã được biết là sử dụng cơ chất axit béo được este hóa ở CoA (Bảng 2).

Mỗi phản ứng kéo dài mạch PUFA gồm có bốn bước được xúc tác bằng phức chất protein đa thành phần: đầu tiên, phản ứng ngưng tụ tạo ra sự bổ sung đơn vị 2C từ malonyl-CoA vào axit béo, tạo ra sự hình thành chất trung gian β-ketoaxyl. Sau đó, nó được khử bằng NADPH, tiếp đó dehydrat hóa để tạo ra hợp chất trung gian enoyl. Cuối cùng, hợp chất trung gian này được khử lần thứ hai để tạo ra axit béo được kéo dài mạch. Người ta thường cho rằng bước ngưng tụ trong bốn phản ứng này là đặc hiệu cơ chất trong khi các bước khác thì không. Trong thực nghiệm, điều này có nghĩa là cơ chế kéo dài mạch ở thực vật tự nhiên có khả năng kéo dài mạch PUFA với điều kiện là enzym ngưng tụ (thường được gọi là 'elongaza') đặc hiệu với PUFA được đưa vào, mặc dù hiệu quả của cơ chế kéo dài mạch ở thực vật tự nhiên để kéo dài mạch các cơ chất PUFA không có trong tự nhiên có thể là thấp. Năm 2007, đã công bố việc nhận biết và xác định đặc điểm của dehydrataza vòng kéo dài mạch của nấm men (Denic và

Weissman, 2007).

Phản ứng khử bão hòa PUFA ở thực vật, rêu và vi tảo xảy ra trong tự nhiên với cơ chất axit béo chủ yếu là trong nhóm axyl-PC trong khi phản ứng kéo dài mạch xảy ra với cơ chất trong nhóm axyl-CoA. Việc chuyển axit béo từ phân tử axyl-PC đến chất mang CoA được thực hiện bằng phospholipaza (PLA) trong khi việc chuyển axit béo từ axyl-CoA đến chất mang PC được thực hiện bằng lysophosphatidyl-cholin axyltransferaza (LPCAT) (Singh et al., 2005).

Sản xuất LC-PUFA theo thiết kế

Hầu như việc thiết kế LC-PUFA chuyển hóa được thực hiện bằng cách sử dụng con đường khử bão hòa/kéo dài mạch Δ6 ưa khí. Quá trình sinh tổng hợp axit γ-linolenic (GLA, 18:3ω6) ở cây thuốc lá lần đầu tiên được báo cáo vào năm 1996 bằng cách sử dụng Δ6-desaturaza từ vi khuẩn lam *Synechocystis* (Reddy và Thomas, 1996). Gần đây, GLA đã được tạo ra ở các cây hoa màu như cây rum (73% GLA trong dầu ép hạt; WO 2006/127789) và đậu nành (28% GLA; Sato et al., 2004). Việc sản xuất LC-PUFA như EPA và DHA liên quan đến việc thiết kế phức tạp hơn do liên quan đến sự tăng số lượng các bước khử bão hòa và kéo dài mạch. Việc sản xuất EPA ở thực vật mặt đất lần đầu tiên được báo cáo bởi Qi et al. (2004) người đưa gen mã hóa Δ9-elongaza từ *Isochrysis galbana,* Δ8-desaturaza từ *Euglena gracilis và* Δ5-desaturaza từ *Mortierella alpina* vào *Arabidopsis* tạo ra tới 3% EPA. Sau đó, công trình này được tiếp tục thực hiện bởi Abbadi et al. (2004), người đã có báo cáo về việc tạo ra đến 0,8% EPA trong hạt lanh bằng cách sử dụng gen mã hóa Δ6-desaturaza và Δ6-elongaza từ *Physcomitrella patens* và Δ5-desaturaza từ *Phaeodactylum tricornutum.*

Báo cáo đầu tiên về sự sản sinh DHA là trong WO 04/017467, tài liệu này mô tả việc tạo ra 3% DHA ở phôi đậu nành, chứ không phải ở hạt đậu nành, bằng cách đưa vào gen mã hóa Δ6-desaturaza của *Saprolegnia diclina,* Δ6-desaturaza của *Mortierella alpina,* Δ5-desaturaza của *Mortierellaalpina,* Δ4-

desaturaza của *Saprolegnia diclina,* Δ17-desaturaza của *Saprolegnia diclina,* Δ6-elongaza của *Mortierella alpina* và Δ5-elongaza của *Pavlova lutheri.* Hàm lượng EPA tối đa trong phôi cũng tạo ra DHA với hàm lượng 19,6%, cho thấy rằng hiệu quả chuyển hóa EPA thành DHA là kém (WO 2004/071467). Phát hiện này tương tự với những điều đã được công bố bởi Robert et al. (2005), trong đó lượng chuyển hóa EPA thành DHA là thấp, với hiệu suất 3% EPA và 0,5% DHA ở *Arabidopsis* bằng cách sử dụng Δ5/6-desaturaza của *Danio rerio,* Δ6-elongaza của *Caenorhabditis elegans,* và Δ5-elongaza và Δ4-desaturaza của *Pavlova salina.* Cũng trong năm 2005, Wu et al. công bố việc tạo ra 25% ARA, 15% EPA, và 1,5% DHA ở *Brassica juncea* bằng cách sử dụng Δ6-desaturaza của *Pythium irregulare,* Δ5-desaturaza của *Thraustochytrid,* Δ6-elongaza của *Physcomitrella patens,* Δ12-desaturaza của *Calendula officianalis,* Δ5-elongaza của *Thraustochytrid,* Δ17-desaturaza của *Phytophthora infestans,* LC-PUPA elongaza của *Oncorhyncus mykiss,* Δ4-desaturaza của *Thraustochytrid* và LPCAT của *Thraustochytrid* (Wu et al., 2005). Tóm tắt về các nỗ lực để tạo ra các cây hoa màu có hạt chứa dầu tổng hợp ω3 LCPUFA được nêu trong Venegas-Caleron et al. (2010) và Ruiz-Lopez et al. (2012). Như được chỉ ra bởi Ruiz-Lopez et al. (2012), các kết quả thu được cho đến nay để tạo ra DHA ở thực vật chuyển gen chưa đạt đến được mức như quan sát được trong dầu cá. Gần đây hơn, Petrie và các đồng tác giả (2012) đã báo cáo quy trình sản xuất khoảng 15% DHA trong hạt *Arabidopsis thaliana,* và WO2013/185184 báo cáo quy trình sản xuất một số dầu ép hạt có hàm lượng DHA nằm trong khoảng từ 7% đến 20%. Tuy nhiên, chưa có báo cáo nào về quy trình sản xuất dầu thực vật có hàm lượng DHA lớn hơn 20%.

Chưa có báo cáo nào về quy trình sản xuất DPA trong các tế bào tái tổ hợp tới hàm lượng đáng kể mà không đồng thời tạo ra DHA. Thực ra, các tác giả sáng chế không biết về đề xuất hoặc động cơ bất kỳ đã được công bố để sản xuất DPA trong các tế bào tái tổ hợp mà không tạo ra DHA.

Do đó vẫn tồn tại nhu cầu về quy trình sản xuất LC-PUFA hiệu quả hơn

nữa ở các tế bào tái tổ hợp, đặc biệt là DPA trong hạt của các cây có hạt chứa dầu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một vài sinh vật tạo ra dầu với hàm lượng DPA lớn hơn 1-2% và do đó có sự hạn chế, nếu có, các phương án để tạo ra DPA trên quy mô lớn từ các nguồn tự nhiên. Các tác giả sáng chế có các phương pháp và thực vật xác định để sản xuất lipit có hàm lượng DPA cao hơn nhiều so với các nguồn tự nhiên.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất lipit chiết tách, tốt hơn là lipit thực vật chiết tách hoặc lipit vi sinh vật chiết tách chiết tách, chứa các axit béo ở dạng được este hóa, các axit béo này bao gồm axit oleic, axit palmitic, axit béo ω6 bao gồm axit linoleic (LA), axit béo ω3 bao gồm axit α-linolenic (ALA) và axit docosapentaenoic (DPA), và tùy ý một hoặc nhiều axit stearidonic (SDA), axit eicosapentaenoic (EPA), và axit eicosatetraenoic (ETA), trong đó hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 7% đến 35%. Theo các phương án của khía cạnh này, hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách bằng khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, khoảng 10%, khoảng 12%, khoảng 15%, khoảng 18%, khoảng 20%, khoảng 22%, khoảng 24%, khoảng 26%, khoảng 28%, khoảng 30%, nằm trong khoảng từ 7% đến 28%, nằm trong khoảng từ 7% đến 25%, nằm trong khoảng từ 10% đến 35%, nằm trong khoảng từ 10% đến 0%, nằm trong khoảng từ 10% đến 25%, nằm trong khoảng từ 10% đến 22%, nằm trong khoảng từ 14% đến 35%, nằm trong khoảng từ 16% đến 35%, nằm trong khoảng từ 16% đến 30%, nằm trong khoảng từ 16% đến 25%, hoặc nằm trong khoảng từ 16% đến 22%.

Theo một phương án của khía cạnh nêu trên, DHA có mặt ở hàm lượng thấp hơn 2% hoặc thấp hơn 0,5% trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách và tốt hơn nữa là không có mặt trong tổng lượng axit béo của lipit.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất lipit chiết tách, tốt hơn là lipit thực vật chiết tách hoặc lipit vi sinh vật chiết tách, chứa các axit béo ở dạng được este hóa, các axit béo này bao gồm axit docosapentaenoic (DPA), trong đó ít nhất 35% DPA được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG. Theo một phương án, lipit chiết tách còn được đặc trưng bởi một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các đặc điểm (i) nó chứa axit béo bao gồm axit oleic, axit palmitic, axit béo ω6 bao gồm axit linoleic (LA), axit béo ω3 bao gồm axit α-linolenic (ALA) và tùy ý một hoặc nhiều axit stearidonic (SDA), axit eicosapentaenoic (EPA), và axit eicosatetraenoic (ETA), (ii) ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 45%, ít nhất khoảng 48%, nằm trong khoảng từ 35% đến 60%, hoặc nằm trong khoảng từ 35% đến 50%, DPA được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG, và (iii) hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 1% đến 35%, hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 35% hoặc nằm trong khoảng từ 20,1% đến 35%. Theo các phương án của khía cạnh này, hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách bằng khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, khoảng 10%, khoảng 12%, khoảng 15%, khoảng 18%, khoảng 20%, khoảng 22%, khoảng 24%, khoảng 26%, khoảng 28%, khoảng 30%, nằm trong khoảng từ 7% đến 28%, nằm trong khoảng từ 7% đến 25%, nằm trong khoảng từ 10% đến 35%, nằm trong khoảng từ 10% đến 30%, nằm trong khoảng từ 10% đến 25%, nằm trong khoảng từ 10% đến 22%, nằm trong khoảng từ 14% đến 35%, nằm trong khoảng từ 16% đến 35%, nằm trong khoảng từ 16% đến 30%, nằm trong khoảng từ 16% đến 25%, hoặc nằm trong khoảng từ 16% đến 22%. Theo các phương án được ưu tiên, lipit chiết tách được đặc trưng bởi các đặc điểm (i) và (ii), (i) và (iii) hoặc (ii) và (iii), tốt hơn nữa là toàn bộ các đặc điểm (i), (ii) và (iii). Tốt hơn là, lipit chiết tách còn được đặc trưng bởi hàm lượng axit palmitic trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 2% đến 16%, và hàm lượng axit myristic (C14:0), nếu có mặt, trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn 1%.

Các phương án của mỗi trong số các khía cạnh nêu trên được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được rằng các đặc điểm bất kỳ của phương án được mô tả mà rộng hơn đặc điểm tương ứng trong khía cạnh nêu trên sẽ không được áp dụng vào khía cạnh này.

Theo một phương án, lipit chiết tách có một hoặc nhiều đặc điểm trong số các đặc điểm sau:

i) hàm lượng của axit palmitic trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 2% đến 18%, nằm trong khoảng từ 2% đến 16%, nằm trong khoảng từ 2% đến 15%, hoặc nằm trong khoảng từ 3% đến 10%,

ii) hàm lượng của axit myristic (C14:0) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn 6%, thấp hơn 3%, thấp hơn 2%, thấp hơn 1%, hoặc khoảng 0,1%,

iii) hàm lượng của axit oleic trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 1% đến 30%, nằm trong khoảng từ 3% đến 30%, nằm trong khoảng từ 6% đến 30%, nằm trong khoảng từ 1% đến 20%, nằm trong khoảng từ 30% đến 60%, nằm trong khoảng từ 40% đến 60%, khoảng 30%, hoặc nằm trong khoảng từ 15% đến 30%,

iv) hàm lượng của axit linoleic (LA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 35%, nằm trong khoảng từ 4% đến 20%, nằm trong khoảng từ 4% đến 17%, hoặc nằm trong khoảng từ 5% đến 10%,

(v) hàm lượng của axit α-linolenic (ALA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 40%, nằm trong khoảng từ 7% đến 40%, nằm trong khoảng từ 10% đến 35%, nằm trong khoảng từ 20% đến 35%, nằm trong khoảng từ 4% đến 16%, hoặc nằm trong khoảng từ 2% đến 16%,

(vi) hàm lượng của axit γ-linolenic (GLA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn 4%, thấp hơn khoảng 3%, thấp hơn khoảng 2%, thấp

hơn khoảng 1%, thấp hơn khoảng 0,5%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 7%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 4%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 3%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05% đến 2%,

(vii) hàm lượng của axit stearidonic (SDA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn khoảng 10%, thấp hơn khoảng 8%, thấp hơn khoảng 7%, thấp hơn khoảng 6%, thấp hơn khoảng 4%, thấp hơn khoảng 3%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 7%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 6%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 4%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 3%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05% đến 2%,

(viii) hàm lượng của axit eicosatetraenoic (ETA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn khoảng 6%, thấp hơn khoảng 5%, thấp hơn khoảng 4%, thấp hơn khoảng 1%, thấp hơn khoảng 0,5%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 6%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 5%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 4%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 3%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05% đến 2%,

(ix) hàm lượng của axit eicosatrienoic (ETrA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn 4%, thấp hơn khoảng 2%, thấp hơn khoảng 1%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 4%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 3%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05% đến 2%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05% đến 1%,

(x) hàm lượng của axit eicosapentaenoic (EPA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 15%, thấp hơn 4%, thấp hơn khoảng 3%, thấp hơn khoảng 2%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 5%, nằm trong khoảng từ 0,05% đến 3%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05% đến 2%,

(xi) lipit chứa axit ω6-docosapentaenoic ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) trong thành phần axit béo của nó,

(xii) lipit chứa axit ω6-docosapentaenoic ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) trong thành phần axit béo của nó với hàm lượng thấp hơn 0,1%,

(xiii) lipit chứa một hoặc nhiều hoặc toàn bộ SDA, EPA và ETA trong thành phần axit béo của nó với hàm lượng thấp hơn 0,1%,

(xiv) hàm lượng của toàn bộ axit béo bão hòa trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 25%, nằm trong khoảng từ 4% đến 20%, nằm trong khoảng từ 6% đến 20%, hoặc nằm trong khoảng từ 6% đến 12%,

(xv) hàm lượng của toàn bộ axit béo không bão hòa đơn trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 40%, nằm trong khoảng từ 4% đến 35%, nằm trong khoảng từ 8% đến 25%, nằm trong khoảng từ 8% đến 22%, nằm trong khoảng từ 15% đến 40% hoặc nằm trong khoảng từ 15% đến 35%,

(xvi) hàm lượng của toàn bộ axit béo không bão hòa đa trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 20% đến 75%, nằm trong khoảng từ 30% đến 75%, nằm trong khoảng từ 50% đến 75%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, hoặc nằm trong khoảng từ 60% đến 75%,

(xvii) hàm lượng của toàn bộ axit béo ω6 trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 35% đến 50%, nằm trong khoảng từ 20% đến 35%, nằm trong khoảng từ 6% đến 20%, thấp hơn 20%, thấp hơn khoảng 16%, thấp hơn khoảng 10%, nằm trong khoảng từ 1% đến 16%, nằm trong khoảng từ 2% đến 10%, hoặc nằm trong khoảng từ 4% đến 10%,

(xviii) hàm lượng của axit béo ω6 mới trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn khoảng 10%, thấp hơn khoảng 8%, thấp hơn khoảng 6%, thấp hơn 4%, nằm trong khoảng từ 1% đến 20%, nằm trong khoảng từ 1% đến 10%, nằm trong khoảng từ 0,5% đến 8%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,5% đến 4%,

(xix) hàm lượng của toàn bộ axit béo ω3 trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 36% đến 65%, nằm trong khoảng từ 36%

đến 70%, nằm trong khoảng từ 40% đến 60%, nằm trong khoảng từ 30% đến 60%, nằm trong khoảng từ 35% đến 60%, nằm trong khoảng từ 40% đến 65%, nằm trong khoảng từ 30% đến 65%, nằm trong khoảng từ 35% đến 65%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65% hoặc khoảng 70%,

(xx) hàm lượng của axit béo ω3 mới trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 21% đến 45%, nằm trong khoảng từ 21% đến 35%, nằm trong khoảng từ 23% đến 35%, nằm trong khoảng từ 25% đến 35%, nằm trong khoảng từ 27% đến 35%, khoảng 23%, khoảng 25%, khoảng 27%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40% hoặc khoảng 45%,

(xxi) tỷ lệ của toàn bộ axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3 trong thành phần axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5, thấp hơn khoảng 0,50, thấp hơn khoảng 0,40, thấp hơn khoảng 0,30, thấp hơn khoảng 0,20, thấp hơn khoảng 0,15, khoảng 1,0, khoảng 0,1, khoảng 0,10 đến khoảng 0,4, hoặc khoảng 0,2,

(xxii) tỷ lệ của axit béo ω6 mới:axit béo ω3 mới trong thành phần axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0, nằm trong khoảng từ 0,02 đến 0,1, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5, thấp hơn khoảng 0,50, thấp hơn khoảng 0,40, thấp hơn khoảng 0,30, thấp hơn khoảng 0,20, thấp hơn khoảng 0,15, khoảng 0,02, khoảng 0,05, khoảng 0,1, khoảng 0,2 hoặc khoảng 1,0,

(xxiii) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu suất chuyển hóa axit oleic thành LA bởi Δ12-desaturaza bằng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, nằm trong khoảng từ 60% đến 98%, nằm trong khoảng từ 70% đến 95%, hoặc nằm trong khoảng từ 75% đến 90%,

(xxiv) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu suất chuyển hóa ALA thành SDA bởi Δ6-desaturaza bằng ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, ít

nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, nằm trong khoảng từ 30% đến 70%, nằm trong khoảng từ 35% đến 60%, hoặc nằm trong khoảng từ 50% đến 70%,

(xxv) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu suất chuyển hóa SDA thành axit ETA bởi Δ6-elongaza bằng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, nằm trong khoảng từ 60% đến 95%, nằm trong khoảng từ 70% đến 88%, hoặc nằm trong khoảng từ 75% đến 85%,

(xxvi) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu suất chuyển hóa ETA thành EPA bởi Δ5-desaturaza bằng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, nằm trong khoảng từ 60% đến 99%, nằm trong khoảng từ 70% đến 99%, hoặc nằm trong khoảng từ 75% đến 98%,

(xxvii) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu suất chuyển hóa EPA thành DPA bởi Δ5-elongaza bằng ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, nằm trong khoảng từ 50% đến 99%, nằm trong khoảng từ 85% đến 99%, nằm trong khoảng từ 50% đến 95%, hoặc nằm trong khoảng từ 85% đến 95%,

(xxviii) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu suất chuyển hóa axit oleic thành DPA bằng ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, nằm trong khoảng từ 10% đến 50%, nằm trong khoảng từ 10% đến 30%, nằm trong khoảng từ 10% đến 25% hoặc nằm trong khoảng từ 20% đến 30%,

(xxix) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu suất chuyển hóa LA thành DPA bằng ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 22%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, nằm trong khoảng từ 15% đến 50%, nằm trong khoảng từ 20% đến 40%, hoặc nằm trong khoảng từ 20% đến 30%,

(xxx) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu suất chuyển hóa ALA thành DPA bằng ít nhất khoảng 17%, ít nhất khoảng 22%, ít nhất khoảng 24%, ít nhất khoảng 30%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, nằm trong khoảng từ 22% đến 70%, nằm trong khoảng từ 17% đến 55%, nằm trong khoảng từ 22% đến 40%, hoặc nằm trong khoảng từ 24% đến 40%,

(xxxi) toàn bộ axit béo trong lipit chiết tách có hàm lượng C20:1 thấp hơn 1,5%, C20:1 thấp hơn 1% hoặc C20:1 khoảng 1%,

(xxxii) hàm lượng triaxylglyxerol (TAG) của lipit bằng ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất 95%, nằm trong khoảng từ 70% đến 99%, hoặc nằm trong khoảng từ 90% đến 99%,

(xxxiii) lipit chứa diaxylglyxerol (DAG), trong đó tốt hơn là DAG chứa DPA,

(xxxiv) lipit chứa axit béo tự do (không được este hóa) và/hoặc phospholipit với lượng thấp hơn khoảng 10%, thấp hơn khoảng 5%, thấp hơn khoảng 1%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,001% đến 5%, hoặc gần như không chứa nó,

(xxxv) ít nhất 70%, ít nhất 72% hoặc ít nhất 80% DPA được este hóa ở dạng TAG là ở vị trí *sn*-1 hoặc *sn*-3 của TAG,

(xxxvi) loại TAG chứa DPA nhiều nhất trong lipit là DPA/18:3/18:3 (TAG 58:12), lipit chứa tri-DPA TAG (TAG 66:18), và

(xxxvii) hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách bằng khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, khoảng 10%, khoảng 12%, khoảng 15%, khoảng 18%, khoảng 20%, khoảng 22%, khoảng 24%, khoảng 26%, khoảng 28%, khoảng 31%, nằm trong khoảng từ 7% đến 31%, nằm trong khoảng từ 7% đến 28%, nằm trong khoảng từ 10% đến 35%, nằm trong khoảng từ 10% đến 30%, nằm trong khoảng từ 10% đến 25%, nằm trong khoảng từ 10%

đến 22%, nằm trong khoảng từ 14% đến 35%, nằm trong khoảng từ 16% đến 35%, nằm trong khoảng từ 16% đến 30%, nằm trong khoảng từ 16% đến 25%, hoặc nằm trong khoảng từ 16% đến 22%, trong đó, tùy ý, hàm lượng của DHA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách là thấp hơn 0,5%.

Theo phương án khác, lipit chiết tách có một hoặc nhiều đặc điểm trong số các đặc điểm sau:

i) hàm lượng của axit palmitic trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách nằm trong khoảng từ 2% đến 15%,

ii) hàm lượng của axit myristic (C14:0) trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách bằng khoảng 0,1%,

iii) hàm lượng của axit oleic trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách nằm trong khoảng từ 1% đến 30%,

iv) hàm lượng của axit linoleic (LA) trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 20%,

v) hàm lượng của axit α-linolenic (ALA) trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 40%,

vi) hàm lượng của axit γ-linolenic (GLA) trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách nằm trong khoảng từ 0,05% đến 7%,

vii) hàm lượng của axit stearidonic (SDA) trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%,

viii) hàm lượng của axit eicosatetraenoic (ETA) trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách thấp hơn 6%,

ix) hàm lượng của axit eicosatrienoic (ETrA) trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách thấp hơn 4%,

x) lipit thực vật chiết tách chứa axit ω6-docosapentaenoic ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) trong thành phần axit béo của nó với hàm lượng thấp hơn 0,1%,

xi) hàm lượng của axit béo ω6 mới trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách thấp hơn 10%,

xii) tỷ lệ của toàn bộ axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3 trong thành phần axit béo của lipit thực vật chiết tách nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0, hoặc nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1,

xiii) tỷ lệ của axit béo ω6 mới:axit béo ω3 mới trong thành phần axit béo của lipit thực vật chiết tách nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0, trong khoảng từ 0,02 đến 0,1, hoặc nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1,

xiv) thành phần axit béo của lipit thực vật chiết tách dựa trên hiệu suất chuyển hóa axit oleic thành DPA bằng ít nhất 10%,

xv) thành phần axit béo của lipit thực vật chiết tách dựa trên hiệu suất chuyển hóa LA thành DPA bằng ít nhất 15%,

xvi) thành phần axit béo của lipit thực vật chiết tách dựa trên hiệu suất chuyển hóa ALA thành DPA bằng ít nhất 17%,

xvii) toàn bộ axit béo trong lipit thực vật chiết tách có hàm lượng C20:1 thấp hơn 1,5%, và

xviii) hàm lượng triaxylglyxerol (TAG) của lipit thực vật chiết tách bằng ít nhất 70%, và có thể được đặc trưng bởi một hoặc nhiều đặc điểm trong số các đặc điểm sau

xix) lipit thực vật chiết tách chứa diaxylglyxerol (DAG) chứa DPA,

xx) lipit thực vật chiết tách chứa axit béo tự do (không được este hóa) và/hoặc phospholipit với hàm lượng thấp hơn 10%, hoặc gần như không chứa nó,

xxi) ít nhất 70% DPA được este hóa ở dạng TAG là ở vị trí *sn*-1 hoặc *sn*-3 của TAG,

xxii) loại TAG chứa DPA nhiều nhất trong lipit thực vật chiết tách là DPA/18:3/18:3 (TAG 58:12), và

xxiii) lipit thực vật chiết tách chứa tri-DPA TAG (TAG 66:18).

Theo một phương án, hàm lượng của axit eicosapentaenoic (EPA) trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%.

Theo phương án khác, hàm lượng của DHA trong tổng lượng axit béo của lipit thực vật chiết tách thấp hơn 2%, tốt hơn là thấp hơn 1%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,1% đến 2%, tốt hơn nữa là không phát hiện được. Tốt hơn, nếu cây hoặc bộ phận của cây như hạt, tế bào vi sinh vật không có polynucleotit mã hóa hoặc không có Δ4-desaturaza polypeptit.

Theo phương án khác, lipit chiết tách có mặt ở dạng dầu, trong đó ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 98%, hoặc nằm trong khoảng từ 95% đến 98%, trọng lượng của dầu là lipit.

Tốt hơn, nếu lipit chiết tách là lipit trong dầu ép hạt *Brassica sp*. hoặc lipit trong dầu ép hạt *Camelina sativa*.

Theo phương án được ưu tiên của khía cạnh đầu tiên này, lipit hoặc dầu, tốt hơn là dầu ép hạt, tốt hơn nữa là dầu ép hạt *Brassica* sp. hoặc dầu ép hạt *Camelina sativa*, có các đặc điểm sau: trong tổng lượng axit béo của lipit hoặc dầu, hàm lượng của DPA nằm trong khoảng từ 7% đến 30% hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 35%, hàm lượng của axit palmitic nằm trong khoảng từ 2% đến 16%, hàm lượng của axit myristic thấp hơn 1%, hàm lượng của axit oleic nằm trong khoảng từ 1% đến 30%, hàm lượng của LA nằm trong khoảng từ 4% đến 35%, ALA có mặt, hàm lượng của toàn bộ axit béo bão hòa trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 25%, tỷ lệ của toàn bộ axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3 trong thành phần axit béo của lipit chiết tách là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 3,0, và hàm lượng triaxylglyxerol (TAG) của lipit bằng ít nhất khoảng 70%, và, tùy ý, lipit gần như không chứa

cholesterol và/hoặc lipit chứa tri-DPA TAG (TAG 66:15). Tốt hơn nữa là, lipit hoặc dầu, tốt hơn là dầu ép hạt, có thêm một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các đặc điểm sau: ít nhất 70% DPA được este hóa ở vị trí sn-1 hoặc sn-3 của triaxylglyxerol (TAG), ALA có mặt trong tổng lượng axit béo với hàm lượng nằm trong khoảng từ 4% đến 40%, GLA có mặt và/hoặc hàm lượng của GLA trong tổng lượng axit béo thấp hơn 4%, hàm lượng của SDA nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%, hàm lượng của ETA thấp hơn khoảng 4%, hàm lượng của EPA nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%, hàm lượng của toàn bộ axit béo không bão hòa đơn trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 35%, hàm lượng của toàn bộ axit béo không bão hòa đa trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 20% đến 75%, tỷ lệ của axit béo ω6 mới:axit béo ω3 mới trong thành phần axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 0,03 đến 3,0, tốt hơn là thấp hơn khoảng 0,50, thành phần axit béo của lipit dựa trên: hiệu suất chuyển hóa axit oleic thành LA bởi Δ12-desaturaza bằng ít nhất khoảng 60%, hiệu suất chuyển hóa SDA thành axit ETA bởi Δ6-elongaza bằng ít nhất khoảng 60%, hiệu suất chuyển hóa EPA thành DPA bởi Δ5-elongaza nằm trong khoảng từ 50% đến 95%, hiệu suất chuyển hóa axit oleic thành DPA bằng ít nhất khoảng 10%. Tốt nhất là, ít nhất 81% DPA được este hóa ở vị trí sn-1 hoặc sn-3 của triaxylglyxerol (TAG).

Theo phương án được ưu tiên khác của khía cạnh thứ hai nêu trên, lipit hoặc dầu, tốt hơn là dầu ép hạt, tốt hơn nữa là dầu ép hạt *Brassica* sp. hoặc dầu ép hạt *Camelina sativa*, chứa DPA có các đặc điểm sau: trong tổng lượng axit béo của lipit hoặc dầu, hàm lượng của axit palmitic nằm trong khoảng từ 2% đến 16%, hàm lượng của axit myristic thấp hơn 1%, hàm lượng của axit oleic nằm trong khoảng từ 1% đến 30%, hàm lượng của LA nằm trong khoảng từ 4% đến 35%, ALA có mặt, hàm lượng của toàn bộ axit béo bão hòa trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 25%, tỷ lệ của toàn bộ axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3 trong thành phần axit béo của lipit chiết tách là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 3,0, hàm lượng triaxylglyxerol

(TAG) của lipit bằng ít nhất khoảng 70%, và, tùy ý, lipit chứa triDPA TAG (TAG 66:15), trong đó ít nhất 35% DPA được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG. Tốt hơn nữa là, lipit hoặc dầu, tốt hơn là dầu ép hạt, có thêm một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các đặc điểm sau: ALA có mặt trong tổng lượng axit béo với hàm lượng nằm trong khoảng từ 4% đến 40%, GLA có mặt và/hoặc hàm lượng của GLA trong tổng lượng axit béo thấp hơn 4%, hàm lượng của SDA nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%, hàm lượng của ETA thấp hơn khoảng 4%, hàm lượng của EPA nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%, hàm lượng của toàn bộ axit béo không bão hòa đơn trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 35%, hàm lượng của toàn bộ axit béo không bão hòa đa trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 20% đến 75%, tỷ lệ của axit béo ω6 mới:axit béo ω3 mới trong thành phần axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 0,03 đến 3,0, tốt hơn là thấp hơn khoảng 0,50, thành phần axit béo của lipit dựa trên: hiệu suất chuyển hóa axit oleic thành LA bởi Δ12-desaturaza bằng ít nhất khoảng 60%, hiệu suất chuyển hóa SDA thành axit ETA bởi Δ6-elongaza bằng ít nhất khoảng 60%, hiệu suất chuyển hóa EPA thành DPA bởi Δ5-elongaza nằm trong khoảng từ 50% đến 95%, hiệu suất chuyển hóa axit oleic thành DPA bằng ít nhất khoảng 10%.

Trong trường hợp của lipit chiết tách hoặc dầu theo sáng chế, theo một phương án, hàm lượng của DPA trong lipit chiết tách hoặc dầu không được tăng, hoặc gần giống như hàm lượng của DPA trong lipit hoặc dầu của bộ phận của cây hoặc vi sinh vật trước khi chiết tách. Nói theo cách khác, không thực hiện quá trình nào làm tăng hàm lượng của DPA trong lipit hoặc dầu so với với các axit béo khác sau khi chiết tách. Hiển nhiên là, lipit hoặc dầu sau đó có thể được xử lý bằng cách phân đoạn hoặc các cách khác để làm thay đổi thành phần axit béo.

Theo một phương án được ưu tiên khác, lipit hoặc dầu, tốt hơn là dầu ép hạt và tốt hơn nữa là dầu ép hạt *Brassica* như dầu mù tạc hoặc dầu canola, hoặc

dầu ép hạt *C. sativa*, có các đặc điểm sau: trong tổng lượng axit béo của lipit hoặc dầu, hàm lượng của DPA nằm trong khoảng từ 7% đến 35%, hàm lượng của axit palmitic nằm trong khoảng từ 2% đến 16%, hàm lượng của axit myristic thấp hơn khoảng 6% và tốt hơn là thấp hơn 1%, hàm lượng của axit oleic nằm trong khoảng từ 1% đến 30%, hàm lượng của LA nằm trong khoảng từ 4% đến 35%, ALA có mặt, hàm lượng của SDA nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%, hàm lượng của ETA thấp hơn khoảng 6%, hàm lượng của EPA nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%. DHA có mặt hoặc tốt hơn là không phát hiện được trong lipit hoặc dầu. Tốt hơn là, DHA, nếu có mặt, thì ở hàm lượng không lớn hơn 2% hoặc không lớn hơn 0,5% trong tổng lượng axit béo của lipit hoặc dầu và tốt hơn nữa là không có mặt trong tổng lượng axit béo của lipit hoặc dầu. Tùy ý, lipit gần như không chứa cholesterol và/hoặc lipit chứa tri-DPA TAG (TAG 66:15). Tốt hơn nữa là, lipit hoặc dầu, tốt hơn là dầu ép hạt, có thêm một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các đặc điểm sau: ít nhất 70% DPA được este hóa ở vị trí sn-1 hoặc sn-3 của triaxylglyxerol (TAG), ALA trong tổng lượng axit béo có mặt ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 4% đến 40%, GLA có mặt và/hoặc hàm lượng của GLA trong tổng lượng axit béo thấp hơn 4%, hàm lượng của SDA nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%, hàm lượng của ETA thấp hơn khoảng 4%, hàm lượng của EPA nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10%, hàm lượng của toàn bộ axit béo không bão hòa đơn trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 35%, hàm lượng của toàn bộ axit béo không bão hòa đa trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 20% đến 75%, tỷ lệ của axit béo ω6 mới:axit béo ω3 mới trong thành phần axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 0,03 đến 3,0, tốt hơn là thấp hơn khoảng 0,50, thành phần axit béo của lipit dựa trên: hiệu suất chuyển hóa axit oleic thành LA bởi Δ12-desaturaza bằng ít nhất khoảng 60%, hiệu suất chuyển hóa SDA thành axit ETA bởi Δ6-elongaza bằng ít nhất khoảng 60%, hiệu suất chuyển hóa EPA thành DPA bởi Δ5-elongaza nằm trong khoảng từ 50% đến 95%, hiệu suất chuyển hóa axit oleic thành DPA bằng ít nhất khoảng 10%. Theo

một phương án, ít nhất 81% DPA được este hóa ở vị trí sn-1 hoặc sn-3 của triaxylglyxerol (TAG). Theo cách khác, ít nhất 35% DPA este hóa ở dạng TAG được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG.

Theo phương án khác, lipit chiết tách theo sáng chế còn chứa một hoặc nhiều sterol, tốt hơn là sterol thực vật.

Theo phương án khác, lipit chiết tách có mặt ở dạng dầu, và chứa dưới khoảng 10mg sterol/g dầu, dưới khoảng 7mg sterol/g dầu, trong khoảng từ 1,5mg đến 10mg sterol/g dầu, hoặc trong khoảng từ 1,5mg đến 7mg sterol/g dầu.

Ví dụ về sterol mà có thể có mặt trong lipit chiết tách bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều hoặc toàn bộ campesterol/24-metylcholesterol, Δ5-stigmasterol, eburicol, β-sitosterol/24-etylcholesterol, Δ5-avenasterol/isofucosterol, Δ7-stigmasterol/stigmast-7-en-3β-ol, và Δ7-avenasterol.

Theo một phương án, loài thực vật là loài được liệt kê trong Bảng 14, như canola, và hàm lượng của sterol tương tự như hàm lượng được liệt kê trong Bảng 11 đối với loài thực vật cụ thể. Các loài thực vật có thể là *B. napus*, cây mù tạc (*B. juncea*) hoặc *C. sativa* và chứa hàm lượng sterol vào khoảng hàm lượng sterol có mặt trong dầu chiết tách từ *B. napus*, cây mù tạc hoặc *C. sativa* kiểu dại, tương ứng.

Theo một phương án, lipit thực vật chiết tách chứa một hoặc nhiều hoặc toàn bộ campesterol/24-metylcholesterol, Δ5-stigmasterol, eburicol, β-sitosterol/24-etylcholesterol, Δ5-avenasterol/isofucosterol, Δ7-stigmasterol/stigmast-7-en-3β-ol, và Δ7-avenasterol, hoặc có hàm lượng sterol gần giống như hàm lượng của nó trong dầu canola kiểu dại.

Theo một phương án, lipit chiết tách có hàm lượng sterol gần giống như hàm lượng của nó trong dầu canola, dầu mù tạc hoặc dầu *C. sativa* kiểu dại.

Theo một phương án, lipit chiết tách chứa dưới khoảng 0,5mg cholesterol/g dầu, dưới khoảng 0,25mg cholesterol/g dầu, khoảng từ 0mg đến 0,5mg cholesterol/g dầu, hoặc khoảng từ 0mg đến 0,25mg cholesterol/g dầu, hoặc gần như không chứa cholesterol.

Theo phương án khác, lipit là dầu, tốt hơn là dầu thu được từ hạt chứa dầu. Ví dụ về các dầu như vậy bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, dầu *Brassica sp.*, ví dụ như dầu canola hoặc dầu mù tạc, dầu *Gossypium hirsutum*, dầu *Linum usitatissimum*, dầu *Helianthus sp.*, dầu *Carthamus tinctorius*, dầu *Glycine max*, dầu *Zea mays*, dầu *Arabidopsis thaliana*, dầu *Sorghum bicolor*, dầu *Sorghum vulgare*, dầu *Avena sativa*, dầu *Trifolium sp.*, dầu *Elaesis guineenis*, dầu *Nicotiana benthamiana*, dầu *Hordeum vulgare*, dầu *Lupinus angustifolius*, dầu *Oryza sativa*, dầu *Oryza glaberrima*, dầu *Camelina sativa*, dầu *Crambe abyssinica*, dầu *Miscanthus x giganteus*, hoặc dầu *Miscanthus sinensis*. Tốt hơn nữa, nếu dầu này là dầu *Brassica sp.*, dầu *Camelina sativa* hoặc dầu *Glycine max* (đậu nành). Theo một phương án, lipit chứa hoặc là dầu *Brassica sp.* như dầu *Brassica napus* hoặc dầu *Brassica juncea*, dầu *Gossypium hirsutum*, dầu *Linum usitatissimum*, dầu *Helianthus sp.*, dầu *Carthamus tinctorius*, dầu *Glycine max*, dầu *Zea mays*, dầu *Elaesis guineenis*, dầu *Nicotiana benthamiana*, dầu *Lupinus angustifolius*, dầu *Camelina sativa*, dầu *Crambe abyssinica*, dầu *Miscanthus x giganteus*, hoặc dầu *Miscanthus sinensis*. Theo phương án khác, dầu này là dầu canola, dầu cây mù tạc (*B. juncea*), dầu đậu nành (*Glycine max*), dầu *Camelina sativa* hoặc dầu *Arabidopsis thaliana*. Theo một phương án khác, dầu này là dầu thực vật mà không phải là dầu *A. thaliana* và/hoặc không phải là dầu *C. sativa*. Theo một phương án, dầu thực vật là dầu mà không phải là dầu *G. max* (đậu nành). Theo một phương án, dầu này thu được từ cây mọc trong các điều kiện chuẩn, ví dụ như được mô tả trong Ví dụ 1, hoặc từ cây mọc trên cánh đồng hoặc trong nhà kính trong các điều kiện chuẩn.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất lipit thực vật chiết tách hoặc lipit vi sinh vật, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) thu nhận bộ phận của cây, tốt hơn là hạt *Brassica* hoặc hạt *Camelina sativa*, hoặc tế bào vi sinh vật chứa lipit, lipit này chứa axit béo ở dạng được este hóa, axit béo bao gồm axit oleic, axit palmitic, axit béo ω6 bao gồm axit linoleic (LA), axit béo ω3 bao gồm axit α-linolenic (ALA) và axit docosapentaenoic (DPA), và tùy ý một hoặc nhiều trong số axit stearidonic (SDA), axit eicosapentaenoic (EPA), và axit eicosatetraenoic (ETA), trong đó hàm lượng của DPA trong *tổng lượng axit béo* của lipit của bộ phận của cây hoặc tế bào vi sinh vật nằm trong khoảng từ 7% đến 35%, và

ii) chiết lipit ra khỏi bộ phận của cây hoặc tế bào vi sinh vật,

trong đó hàm lượng của DPA trong *tổng lượng axit béo* của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 7% đến 35%. Theo một phương án, hàm lượng của DPA trong *tổng lượng axit béo* của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 7% đến 20%, hoặc nằm trong khoảng từ 20,1% đến 35%. Theo một phương án, hàm lượng của DPA nằm trong khoảng từ 7% đến 20% hoặc nằm trong khoảng từ 20,1% đến 30%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20,1% đến 35%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30% đến 35%. Theo một phương án, hàm lượng của DPA trong *tổng lượng axit béo* của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 8% đến 20% hoặc nằm trong khoảng từ 10% đến 20%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 11% đến 20% hoặc nằm trong khoảng từ 12% đến 20%.

Theo một phương án của khía cạnh nêu trên, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất lipit thực vật chiết tách hoặc lipit vi sinh vật, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) thu nhận bộ phận của cây, tốt hơn là hạt *Brassica* hoặc hạt *C. sativa*, hoặc tế bào vi sinh vật chứa lipit, lipit này chứa các axit béo ở dạng được este hóa, trong đó lipit này có thành phần axit béo bao gồm axit oleic, axit palmitic, axit béo ω6

bao gồm axit linoleic (LA), axit béo ω3 bao gồm axit α-linolenic (ALA) và axit docosapentaenoic (DPA), và một hoặc nhiều axit trong số axit stearidonic (SDA), axit eicosapentaenoic (EPA), và axit eicosatetraenoic (ETA), trong đó (i) hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 7% đến 30% hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 35%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30% đến 35%, (ii) hàm lượng của axit palmitic trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 2% đến 16%, (iii) hàm lượng của axit myristic (C14:0) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn 6%, tốt hơn là thấp hơn 1%, (iv) hàm lượng của axit oleic trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 1% đến 30%, (v) hàm lượng của axit linoleic (LA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 35%, (vi) hàm lượng của axit α-linolenic (ALA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 40%, (vii) hàm lượng của axit eicosatrienoic (ETrA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn 4%, (viii) hàm lượng của toàn bộ axit béo bão hòa trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 25%, (ix) tỷ lệ của toàn bộ axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3 trong thành phần axit béo của lipit chiết tách là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1, (x) hàm lượng triaxylglyxerol (TAG) của lipit bằng ít nhất 70%, và (xi) ít nhất 70% DPA được este hóa ở dạng TAG là ở vị trí sn-1 hoặc sn-3 của TAG, và

ii) chiết lipit ra khỏi bộ phận của cây,

trong đó hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 7% đến 30% hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 35%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30% đến 35%. Tốt hơn là, ít nhất 81% hoặc ít nhất 90% DPA được este hóa ở dạng TAG là ở vị trí sn-1 hoặc sn-3 của TAG.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất lipit chiết tách, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) thu nhận tế bào, tốt hơn là bộ phận của cây chứa tế bào hoặc tế bào vi sinh vật, tốt hơn nữa là hạt *Brassica* hoặc hạt *C. sativa*, chứa lipit, lipit này chứa các axit béo ở dạng được este hóa, các axit béo này bao gồm axit docosapentaenoic (DPA), trong đó ít nhất 35% DPA được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG, và

ii) chiết lipit ra khỏi tế bào,

trong đó ít nhất 35% DPA được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG. Theo một phương án, lipit chiết tách được tạo ra bằng quy trình còn được đặc trưng bởi một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các đặc điểm (i) nó chứa các axit béo bao gồm axit oleic, axit palmitic, axit béo ω6 bao gồm axit linoleic (LA), axit béo ω3 bao gồm axit α-linolenic (ALA) và tùy ý một hoặc nhiều axit stearidonic (SDA), axit eicosapentaenoic (EPA), và axit eicosatetraenoic (ETA), (ii) ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 45%, ít nhất khoảng 48%, nằm trong khoảng từ 35% đến 60%, hoặc nằm trong khoảng từ 35% đến 50%, DPA được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG, và (iii) hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 1% đến 35%, hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 35% hoặc nằm trong khoảng từ 20,1% đến 35%. Theo các phương án của khía cạnh này, hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách bằng khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, khoảng 10%, khoảng 12%, khoảng 15%, khoảng 18%, khoảng 20%, khoảng 22%, khoảng 24%, khoảng 26%, khoảng 28%, khoảng 30%, nằm trong khoảng từ 7% đến 28%, nằm trong khoảng từ 7% đến 25%, nằm trong khoảng từ 10% đến 35%, nằm trong khoảng từ 10% đến 30%, nằm trong khoảng từ 10% đến 25%, nằm trong khoảng từ 10% đến 22%, nằm trong khoảng từ 14% đến 35%, nằm trong khoảng từ 16% đến 35%, nằm trong khoảng từ 16% đến 30%, nằm trong khoảng từ 16% đến 25%, hoặc nằm trong khoảng từ 16% đến 22%. Theo các phương án được ưu tiên, lipit chiết tách được đặc trưng bởi (i) và (ii), (i) và (iii) hoặc (ii) và (iii), tốt hơn nữa là toàn bộ (i), (ii) và (iii). Tốt hơn

là, lipit chiết tách còn được đặc trưng bởi hàm lượng axit palmitic trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 2% đến 16%, và hàm lượng axit myristic (C14:0), nếu có mặt, trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn 1%.

Theo một phương án của khía cạnh nêu trên, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất lipit chiết tách, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) thu nhận tế bào, tốt hơn là bộ phận của cây chứa tế bào hoặc tế bào vi sinh vật, tốt hơn nữa là hạt *Brassica* hoặc hạt *C. sativa*, chứa lipit, lipit này chứa các axit béo ở dạng được este hóa, các axit béo này bao gồm axit docosapentaenoic (DPA), và còn chứa axit oleic, axit palmitic, axit béo ω6 bao gồm axit linoleic (LA), axit béo ω3 bao gồm axit α-linolenic (ALA), và một hoặc nhiều axit trong số axit stearidonic (SDA), axit eicosapentaenoic (EPA), và axit eicosatetraenoic (ETA), trong đó (i) hàm lượng của axit palmitic trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 2% đến 16%, (ii) hàm lượng của axit myristic (C14:0) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn 1%, (iii) hàm lượng của axit oleic trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 1% đến 30%, (iv) hàm lượng của axit linoleic (LA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 35%, (v) hàm lượng của axit α-linolenic (ALA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 40%, (vi) hàm lượng của axit eicosatrienoic (ETrA) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách thấp hơn 4%, (vii) hàm lượng của toàn bộ axit béo bão hòa trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 4% đến 25%, (viii) tỷ lệ của toàn bộ axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3 trong lượng axit béo của lipit chiết tách là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1, (ix) hàm lượng triaxylglyxerol (TAG) của lipit bằng ít nhất 70%, và (x) ít nhất 35% DPA được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG, và

ii) chiết lipit ra khỏi bộ phận của cây,

trong đó ít nhất 35% DPA được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG.

Bước thu nhận bộ phận của cây hoặc tế bào vi sinh vật có thể bao gồm thu hoạch các bộ phận của cây, tốt hơn là hạt, từ thực vật mà tạo ra các bộ phận của cây, thu hồi tế bào vi sinh vật từ giống nuôi cấy của các tế bào này, hoặc thu nhận các bộ phận của cây hoặc tế bào vi sinh vật bằng cách mua từ nhà sản xuất hoặc nhà cung cấp hoặc bằng cách nhập khẩu. Quy trình này có thể bao gồm bước xác định thành phần axit béo của lipit trong mẫu của các bộ phận của cây hoặc tế bào vi sinh vật, hoặc của lipit chiết tách.

Theo phương án được ưu tiên, lipit chiết tách thu được bằng quy trình theo sáng chế, khi thích hợp, có một hoặc nhiều đặc điểm được xác định ở đây, ví dụ như được xác định trên đây trong hai khía cạnh đầu tiên.

Các phương án của các khía cạnh nêu trên theo sáng chế được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu được rằng các đặc điểm bất kỳ đã được mô tả của các phương án mà rộng hơn đặc điểm tương ứng trong khía cạnh nêu trên sẽ không áp dụng với khía cạnh đó.

Theo một phương án, bộ phận của cây là hạt, tốt hơn là hạt chứa dầu. Ví dụ về các hạt như vậy bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, *Brassica sp.*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus sp.*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium sp.*, *Elaesis guineenis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, hoặc*yza sativa*, hoặc*yza glaberrima*, *Camelina sativa*, hoặc *Crambe abyssinica*, tốt hơn là hạt *Brassica sp.*, hạt *C. sativa* hoặc hạt *G. max* (đậu nành), tốt hơn nữa là hạt *Brassica napus*, *B. juncea* hoặc *C. sativa*. Theo một phương án, bộ phận của cây là hạt, tốt hơn là hạt chứa dầu như *Brassica sp.* như *Brassica napus* hoặc *Brassica juncea*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus sp.*, *Carthamus*

tinctorius, *Glycine max*, *Zea mays*, *Elaesis guineenis*, *Nicotiana benthamiana*, *Lupinus angustifolius*, *Camelina sativa*, hoặc *Crambe abyssinica*, tốt hơn là hạt *Brassica napus, B juncea* hoặc *C. sativa*. Theo một phương án, hạt là hạt canola, hạt cây mù tạc, hạt đậu nành, hạt *Camelina sativa* hoặc hạt *Arabidopsis thaliana*. Theo phương án khác, hạt không phải là hạt *A. thaliana* và/hoặc không phải là hạt *C. sativa*. Theo một phương án, hạt không phải là hạt đậu nành. Theo một phương án, bộ phận của cây là hạt *Brassica sp.*. Bộ phận của cây tốt hơn là hạt *Brassica sp.* hoặc hạt *Camelina sativa*. Theo một phương án, hạt thu được từ cây mọc trong các điều kiện chuẩn, ví dụ như được mô tả trong Ví dụ 1, hoặc từ cây mọc trên cánh đồng hoặc trong nhà kính trong các điều kiện chuẩn.

Theo phương án khác, hạt chứa ít nhất khoảng 18mg, ít nhất khoảng 22mg, ít nhất khoảng 26mg, nằm trong khoảng từ 18mg đến 100mg, nằm trong khoảng từ 22mg đến 70mg, khoảng 80mg, nằm trong khoảng từ 30mg đến 80mg, hoặc nằm trong khoảng từ 24mg đến 50mg, DPA mỗi gam hạt.

Theo phương án khác, bộ phận của cây như hạt chứa polynucleotit ngoại sinh mã hóa một trong số các nhóm enzym sau;

i) ω3-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

ii) Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iii) Δ12-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iv) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

v) ω3-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vi) Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vii) Δ12-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

viii) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

và trong đó mỗi polynucleotit được liên kết hoạt động với một hoặc nhiều gen khởi đầu có khả năng biểu hiện trực tiếp polynucleotit này trong tế bào của bộ phận của cây.

Theo phương án khác, bộ phận của cây như hạt hoặc tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật chứa polynucleotit ngoại sinh mã hóa một trong số các nhóm enzym sau:

i) ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

ii) Δ12-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iii) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iv) ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

v) Δ12-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vi) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

và trong đó mỗi polynucleotit được liên kết hoạt động với một hoặc nhiều gen khởi đầu có khả năng biểu hiện trực tiếp polynucleotit này trong tế bào của bộ phận của cây hoặc tế bào.

Theo một phương án, nếu bộ phận của cây hoặc tế bào chứa lipit chứa các axit béo ở dạng được este hóa, thì các axit béo này bao gồm axit docosapentaenoic (DPA), trong đó ít nhất 35% DPA và/hoặc DHA (nếu có mặt) được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG, bộ phận của cây như hạt hoặc tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật chứa polynucleotit ngoại sinh mã hóa 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), trong đó polynucleotit được liên kết hoạt động với một hoặc nhiều gen khởi đầu có khả năng biểu hiện trực tiếp polynucleotit trong tế bào của bộ phận của cây hoặc tế bào. Theo phương án khác, tế bào chứa polynucleotit ngoại sinh mã hóa một trong số các nhóm enzym sau:

i) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), ω3-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

ii) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza và tùy ý

iii) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iv) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

v) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), ω3-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vi) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vii) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza và tùy ý

viii) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza và tùy ý

trong đó mỗi polynucleotit được liên kết hoạt động với một hoặc nhiều gen khởi đầu có khả năng biểu hiện trực tiếp polynucleotit này trong tế bào. Tốt hơn là, LPAAT có thể sử dụng cơ chất axyl C22 béo không bão hòa đa-CoA như DPA-CoA.

Tốt hơn là, cây hoặc bộ phận của nó như hạt, hoặc tế bào vi sinh vật không có polynucleotit mã hóa Δ4-desaturaza, hoặc không có Δ4-desaturaza polypeptit.

Theo một phương án, Δ12-desaturaza cũng có hoạt tính ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, nghĩa là hoạt tính được tạo ra bởi polypeptit đơn. Theo cách khác, Δ12-desaturaza không có hoạt tính ω3-desaturaza và không có hoạt tính Δ15-desaturaza, nghĩa là Δ12-desaturaza là một polypeptit riêng rẽ với polypeptit có hoạt tính ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza.

Theo khía cạnh khác, bộ phận của cây như hạt hoặc tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật có một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các đặc điểm sau:

i) Δ12-desaturaza chuyển hóa axit oleic thành axit linoleic trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc trong các tế bào tái tổ hợp với hiệu suất bằng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, nằm trong khoảng từ 60% đến 95%, nằm trong khoảng từ 70% đến 90%, hoặc nằm trong khoảng từ 75% đến 85%,

ii) ω3-desaturaza chuyển hóa axit béo ω6 thành axit béo ω3 trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc trong các tế bào tái tổ hợp với hiệu suất bằng ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 85%, nằm

trong khoảng từ 65% đến 95%, nằm trong khoảng từ 75% đến 91%, hoặc nằm trong khoảng từ 80% đến 91%,

iii) Δ6-desaturaza chuyển hóa ALA thành SDA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc trong các tế bào tái tổ hợp với hiệu suất bằng ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, nằm trong khoảng từ 30% đến 70%, nằm trong khoảng từ 35% đến 60%, hoặc nằm trong khoảng từ 50% đến 70%,

iv) Δ6-desaturaza chuyển hóa axit linoleic thành axit γ-linolenic trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc trong các tế bào tái tổ hợp với hiệu suất thấp hơn khoảng 5%, thấp hơn khoảng 2,5%, thấp hơn khoảng 1%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 5%, nằm trong khoảng từ 0,5% đến 2,5%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,5% đến 1%,

v) Δ6-elongaza chuyển hóa SDA thành ETA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc trong các tế bào tái tổ hợp với hiệu suất bằng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, nằm trong khoảng từ 60% đến 95%, nằm trong khoảng từ 70% đến 80%, hoặc nằm trong khoảng từ 75% đến 80%,

vi) Δ5-desaturaza chuyển hóa ETA thành EPA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc trong các tế bào tái tổ hợp với hiệu suất bằng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, nằm trong khoảng từ 60% đến 95%, nằm trong khoảng từ 70% đến 95%, hoặc nằm trong khoảng từ 75% đến 95%,

vii) Δ5-elongaza chuyển hóa EPA thành DPA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc trong các tế bào tái tổ hợp với hiệu suất bằng ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, nằm trong khoảng từ 50% đến 90%, hoặc nằm trong khoảng từ 85% đến 95%,

viii) hiệu suất chuyển hóa của axit oleic thành DPA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc trong các tế bào tái tổ hợp bằng ít nhất khoảng

10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, nằm trong khoảng từ 10% đến 50%, nằm trong khoảng từ 10% đến 30%, nằm trong khoảng từ 10% đến 25%, hoặc nằm trong khoảng từ 20% đến 30%,

ix) hiệu suất chuyển hóa của LA thành DPA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc trong các tế bào tái tổ hợp bằng ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 22%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, nằm trong khoảng từ 15% đến 50%, nằm trong khoảng từ 20% đến 40%, hoặc nằm trong khoảng từ 20% đến 30%,

x) hiệu suất chuyển hóa của ALA thành DPA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc trong các tế bào tái tổ hợp bằng ít nhất khoảng 17%, ít nhất khoảng 22%, ít nhất khoảng 24%, ít nhất khoảng 30%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, nằm trong khoảng từ 17% đến 55%, nằm trong khoảng từ 22% đến 35%, hoặc nằm trong khoảng từ 24% đến 35%,

xi) một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây hoặc các tế bào tái tổ hợp chứa nhiều axit béo ω3 hơn với lượng ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, nằm trong khoảng từ 25% đến 40%, hoặc nằm trong khoảng từ 27,5% đến 37,5% so với tế bào tương ứng không có polynucleotit ngoại sinh,

xii) Δ6-desaturaza ưu tiên khử bão hòa axit α-linolenic (ALA) so với axit linoleic (LA),

xiii) Δ6-elongaza cũng có hoạt tính Δ9-elongaza,

xiv) Δ12-desaturaza cũng có hoạt tính Δ15-desaturaza,

xv) Δ6-desaturaza cũng có hoạt tính Δ8-desaturaza,

xvi) Δ8-desaturaza cũng có hoạt tính Δ6-desaturaza hoặc không có hoạt tính Δ6-desaturaza,

xvii) Δ15-desaturaza cũng có hoạt tính ω3-desaturaza lên GLA,

xviii) ω3-desaturaza cũng có Δ15-desaturaza hoạt tính trên LA,

xix) ω3-desaturaza khử bão hòa cả LA và/hoặc GLA,

xx) ω3-desaturaza ưu tiên khử bão hòa GLA so với LA,

xxi) một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các desaturaza, tốt hơn là Δ6-desaturaza và/hoặc Δ5-desaturaza, có hoạt tính lớn hơn trên cơ chất axyl-CoA so với cơ chất axyl-PC tương ứng,

xxii) Δ6-desaturaza có hoạt tính Δ6-desaturaza trên ALA lớn hơn trên LA dưới dạng cơ chất axit béo,

xxiii) Δ6-desaturaza có hoạt tính Δ6-desaturaza trên ALA-CoA dưới dạng cơ chất axit béo lớn hơn trên ALA được liên kết với vị trí sn-2 của PC dưới dạng cơ chất axit béo,

xxiv) Δ6-desaturaza có hoạt tính Δ6-desaturaza ít nhất lớn gấp khoảng 2 lần, hoạt tính ít nhất lớn gấp 3 lần, hoạt tính ít nhất lớn gấp 4 lần, hoặc hoạt tính ít nhất lớn gấp 5 lần, trên ALA dưới dạng cơ chất so với LA,

xxv) Δ6-desaturaza có hoạt tính trên ALA-CoA dưới dạng cơ chất axit béo lớn hơn trên ALA được liên kết với vị trí sn-2 của PC dưới dạng cơ chất axit béo,

xxvi) Δ6-desaturaza có hoạt tính Δ6-desaturaza ít nhất lớn hơn khoảng 5 lần hoặc hoạt tính Δ6-desaturaza ít nhất lớn hơn 10 lần, trên ALA-CoA dưới dạng cơ chất axit béo so với trên ALA được liên kết với vị trí sn-2 của PC dưới dạng cơ chất axit béo,

xxvii) desaturaza là tiền desaturaza, và

xxviii) Δ6-desaturaza không có hoạt tính Δ5-desaturaza có thể phát hiện được trên ETA.

Theo phương án khác, bộ phận của cây như hạt, tốt hơn là hạt *Brassica* hoặc hạt *C. sativa*, hoặc tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật có một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các đặc điểm sau:

i) Δ12-desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:4, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 50% đồng nhất với SEQ ID NO:4,

ii) ω3-desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:6, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 50% đồng nhất với SEQ ID NO:6,

iii) Δ6-desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:9, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 50% đồng nhất với SEQ ID NO:9,

iv) Δ6-elongaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:16, đoạn có hoạt tính sinh học của nó như SEQ ID NO:17, hoặc trình tự axit amin ít nhất 50% đồng nhất với SEQ ID NO:16 và/hoặc SEQ ID NO:17,

v) Δ5-desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:20, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 50% đồng nhất với SEQ ID NO:20, và

vi) Δ5-elongaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:25, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 50% đồng nhất với SEQ ID NO:25.

Theo một phương án, bộ phận của cây như hạt hoặc tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật còn chứa polynucleotit ngoại sinh mã hóa diaxylglyxerol axyltransferaza (DGAT), monoaxylglyxerol axyltransferaza (MGAT), glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (GPAT), 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), tốt hơn là LPAAT mà có thể sử dụng cơ chất axyl C22 béo không bão hòa đa-CoA như DPA-CoA, axyl-CoA:lysophosphatidylcholin axyltransferaza (LPCAT), phospholipaza A_2 (PLA_2), phospholipaza C (PLC), phospholipaza D (PLD), CDP-cholin diaxylglyxerol cholin phosphotransferaza (CPT), phoshatidylcholin diaxylglyxerol axyltransferaza (PDAT),

phosphatidylcholin:diaxylglyxerol cholin phosphotransferaza (PDCT), axyl-CoA synthaza (ACS), hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều trong số chúng.

Theo phương án khác, bộ phận của cây như hạt hoặc tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật còn chứa polynucleotit đột biến hoặc ngoại sinh được đưa vào làm điều tiết giảm sự sản sinh và/hoặc hoạt tính của enzym nội sinh trong tế bào của bộ phận của cây được chọn từ FAE1, DGAT, MGAT, GPAT, LPAAT, LPCAT, PLA_2, PLC, PLD, CPT, PDAT, thioesteraza như FATB, hoặc □12-desaturaza, hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều trong số chúng.

Theo phương án khác, ít nhất một hoặc tốt hơn là toàn bộ, gen khởi đầu là gen khởi đầu đặc hiệu của hạt. Theo một phương án, ít nhất một hoặc toàn bộ, gen khởi đầu đều thu được từ quá trình sinh tổng hợp dầu hoặc gen tích lũy như gen mã hóa oleosin, hoặc từ các gen protein tích trữ trong hạt như conlinin.

Theo phương án khác, (các) gen khởi đầu điều khiển quá trình biểu hiện polynucleotit ngoại sinh mã hóa Δ5-elongaza khơi mào quá trình biểu hiện polynucleotit trong hạt đang phát triển của tế bào của cây hoặc tế bào tái tổ hợp như các tế bào vi sinh vật trước khi, hoặc đạt đến ngưỡng biểu hiện trước khi, (các) gen khởi đầu điều khiển quá trình biểu hiện polynucleotit ngoại sinh mã hóa Δ12-desaturaza và ω3-desaturaza.

Theo một phương án khác, polynucleotit ngoại sinh được liên kết đồng hóa trị trong phân tử ADN, tốt hơn là phân tử T-ADN, được sát nhập vào hệ gen của tế bào của bộ phận của cây hoặc các tế bào tái tổ hợp như các tế bào vi sinh vật và tốt hơn là trong đó số lượng phân tử ADN được sát nhập vào hệ gen của tế bào của bộ phận của cây là không nhiều hơn một, hai hoặc ba, hoặc là hai hoặc ba phân tử.

Theo một phương án khác nữa, bộ phận của cây chứa ít nhất hai polynucleotit ngoại sinh khác nhau, mỗi polynucleotit mã hóa một Δ6-desaturaza có trình tự axit amin giống hoặc khác nhau.

Theo phương án khác, toàn bộ lượng dầu của bộ phận của cây chứa polynucleotit ngoại sinh bằng ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, nằm trong khoảng từ 50% đến 80%, hoặc nằm trong khoảng từ 80% đến 100% toàn bộ lượng dầu của bộ phận của cây tương ứng không có các polynucleotit ngoại sinh này. Theo phương án khác, hạt chứa polynucleotit ngoại sinh có trọng lượng hạt bằng ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, nằm trong khoảng từ 50% đến 80%, hoặc nằm trong khoảng từ 80% đến 100% trọng lượng của hạt tương ứng không có các polynucleotit ngoại sinh này.

Theo một phương án khác, lipit có mặt ở dạng dầu, tốt hơn là dầu ép hạt thu được từ hạt chứa dầu, và trong đó ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 98%, hoặc nằm trong khoảng từ 95% đến 98%, trọng lượng của lipit là triaxylglyxerol.

Theo một phương án khác, quy trình này còn bao gồm bước xử lý lipit để tăng hàm lượng của DPA dưới dạng phần trăm của tổng lượng axit béo. Ví dụ, quá trình xử lý bao gồm bước thủy phân axit béo đã este hóa để tạo ra axit béo tự do, hoặc chuyển hóa este. Ví dụ, lipit như dầu canola có thể được xử lý để chuyển hóa các axit béo trong dầu thành alkyl este như metyl hoặc etyl este, mà sau đó có thể được cất phân đoạn để làm giàu DPA trong lipit hoặc dầu. Theo các phương án, thành phần axit béo của lipit sau qua trình xử lý này bao gồm ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80% hoặc ít nhất 90% DPA. Theo một phương án, hàm lượng của DHA trong tổng lượng axit béo của lipit sau khi xử lý thấp hơn 2,0% hoặc thấp hơn 0,5%, tốt hơn là không phát hiện được trong lipit.

Cũng được đề xuất là lipit, hoặc dầu chứa lipit, như axit béo tự do hoặc alkyl este, được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất metyl hoặc etyl este của axit béo không bão hòa đa, quy trình này bao gồm bước cho

triaxylglyxerol trong lipit thực vật chiết tách, hoặc trong quá trình chiết tách, tương ứng phản ứng với metanol hoặc etanol, trong đó lipit thực vật chiết tách chứa axit béo được este hóa ở dạng TAG, các axit béo bao gồm axit oleic, axit palmitic, axit béo ω6 bao gồm axit linoleic (LA), axit béo ω3 bao gồm axit α-linolenic (ALA), và axit docosapentaenoic (DPA), và tùy ý một hoặc nhiều axit stearidonic (SDA), axit eicosapentaenoic (EPA), và axit eicosatetraenoic (ETA), trong đó hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 7% đến 35%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20,1% đến 30% hoặc từ 20,1% đến 35%, bằng cách đó tạo ra metyl hoặc etyl este của axit béo không bão hòa đa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất metyl hoặc etyl este của axit docosapentaenoic (DPA), quy trình này bao gồm bước cho triaxylglyxerol (TAG) trong lipit thực vật chiết tách, hoặc trong quy trình chiết tách, tương ứng phản ứng với metanol hoặc etanol, trong đó lipit thực vật chiết tách chứa các axit béo ở dạng được este hóa, các axit béo này bao gồm axit docosapentaenoic (DPA), trong đó ít nhất 35% DPA được este hóa ở dạng TAG được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG, bằng cách đó tạo ra metyl hoặc etyl este của axit béo không bão hòa đa.

Theo phương án được ưu tiên, lipit được sử dụng trong quy trình theo hai khía cạnh nêu trên có một hoặc nhiều đặc điểm được xác định ở đây trong trường hợp của lipit chiết tách hoặc dầu theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cây có hạt chứa dầu hoặc bộ phận của cây, như hạt, tốt hơn là cây *Brassica* hoặc cây C. sativa, chứa lipit trong hạt của nó, hoặc *tế* bào vi sinh vật, chứa:

a) lipit chứa các axit béo ở dạng được este hóa, và

b) polynucleotit ngoại sinh mã hóa một trong số các nhóm enzym sau;

i) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

ii) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

iii) ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza, hoặc

iv) ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

trong đó mỗi polynucleotit được liên kết hoạt động với một hoặc nhiều gen khởi đầu đặc hiệu hạt có khả năng biểu hiện trực tiếp polynucleotit này ở hạt đang phát triển của cây, hoặc một hoặc nhiều gen khởi đầu có khả năng biểu hiện trực tiếp các polynucleotit này trong tế bào vi sinh vật, trong đó các axit béo bao gồm axit oleic, axit palmitic, axit béo ω6 bao gồm axit linoleic (LA) và tùy ý axit γ-linolenic (GLA), axit béo ω3 bao gồm axit α-linolenic (ALA), axit stearidonic (SDA) và axit docosapentaenoic (DPA), và tùy ý axit eicosapentaenoic (EPA) và/hoặc axit eicosatetraenoic (ETA), và trong đó hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit của hạt hoặc tế bào vi sinh vật nằm trong khoảng từ 7% đến 35%. Theo phương án được ưu tiên của khía cạnh này, DHA trong tổng lượng axit béo của lipit của hạt và của lipit chiết tách có mặt ở hàm lượng thấp hơn 2% hoặc thấp hơn 0,5% và tốt hơn nữa là không phát hiện được trong tổng lượng axit béo của lipit.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào, tốt hơn là tế bào trong hoặc từ cây như cây có hạt chứa dầu hoặc bộ phận của cây như hạt, hoặc cây có hạt chứa dầu hoặc bộ phận của cây, tốt hơn là cây *Brassica* hoặc cây *C. sativa*, hoặc tế bào vi sinh vật, chứa

a) các axit béo ở dạng được este hóa, các axit béo này bao gồm axit docosapentaenoic (DPA), trong đó ít nhất 35% DPA được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG, và

b) polynucleotit ngoại sinh mã hóa một trong số các nhóm enzym sau;

i) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), ω3-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

ii) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iii) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iv) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

v) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), ω3-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza và tùy ý

vi) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vii) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza và tùy ý

viii) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

trong đó mỗi polynucleotit được liên kết hoạt động với một hoặc nhiều gen khởi đầu có khả năng biểu hiện trực tiếp polynucleotit này trong tế bào. Tốt hơn là, LPAAT có thể sử dụng cơ chất axyl C22 béo không bão hòa đa-CoA như DPA-CoA và hàm lượng của DPA trong tổng lượng axit béo của lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 1% đến 35%, hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 35% hoặc nằm trong khoảng từ 20,1% đến 35%. Theo các phương án, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 45%, ít nhất khoảng 48%, từ 35% đến 60%, hoặc từ 35% đến 50%, DPA được este hóa ở dạng triaxylglyxerol (TAG) được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG.

Theo các phương án được ưu tiên của mỗi khía cạnh trong số hai khía cạnh nêu trên, Δ15-desaturaza là Δ15-desaturaza của nấm và ω3-desaturaza là ω3-desaturaza của nấm.

Theo phương án được ưu tiên, cây có hạt chứa dầu, tế bào vi sinh vật hoặc tế bào theo sáng chế, khi thích hợp, có một hoặc nhiều đặc điểm được xác định ở đây, ví dụ như được xác định trên đây liên quan đến lipit thực vật chiết tách, lipit vi sinh vật chiết tách hoặc quy trình sản xuất chúng.

Ví dụ về cây có hạt chứa dầu bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, *Brassica sp.*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus sp.*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium sp.*, *Elaesis guineenis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, hoặc*yza sativa*, hoặc*yza glaberrima*, *Camelina sativa*, hoặc *Crambe abyssinica*. Theo một phương án, cây là cây *Brassica sp.*, cây *C. sativa* hoặc cây *G. max* (đậu nành). Theo một phương án, cây có hạt chứa dầu là cây canola, *B. juncea*, *Glycine max*, *Camelina sativa* hoặc *Arabidopsis thaliana*. Theo phương án khác, cây có hạt chứa dầu không phải là cây *A. thaliana* và/hoặc không phải là cây *C. sativa*. Theo một phương án, cây có hạt chứa dầu không phải là cây *G. max* (đậu nành). Cây, tốt hơn là *Brassica sp.* hoặc *Camelina sativa*. Theo một phương án, cây có hạt chứa dầu có ở trên cánh đồng, hoặc được trồng trên cánh đồng, hoặc được trồng trong nhà kính trong các điều kiện chuẩn, ví dụ như được mô tả trong Ví dụ 1.

Theo một phương án, một hoặc nhiều enzym trong số các desaturaza được sử dụng trong quy trình theo sáng chế hoặc có mặt trong tế bào, hoặc cây hoặc bộ phận của cây theo sáng chế, có khả năng sử dụng cơ chất axyl-CoA. Theo phương án được ưu tiên, một hoặc nhiều enzym trong số Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza và Δ8-desaturaza, nếu có mặt, có khả năng sử dụng cơ chất axyl-CoA, tốt hơn là mỗi enzym trong số i) Δ6-desaturaza và Δ5-desaturaza hoặc ii)

Δ5-desaturaza và Δ8-desaturaza có khả năng sử dụng cơ chất axyl-CoA. Theo một phương án, Δ12-desaturaza và/hoặc ω3-desaturaza có khả năng sử dụng cơ chất axyl-CoA. Tốt hơn, nếu cơ chất axyl-CoA là ALA-CoA đối với Δ6-desaturaza, ETA-CoA đối với Δ5-desaturaza, và ETrA-CoA đối với Δ8-desaturaza, oleoyl-CoA đối với Δ12-desaturaza, hoặc một hoặc nhiều LA-CoA, GLA-CoA, và ARA-CoA đối với ω3-desaturaza.

Theo một phương án, hạt già đã được thu hoạch của thực vật có hàm lượng DPA bằng ít nhất khoảng 28mg mỗi gam hạt, tốt hơn là ít nhất khoảng 32mg mỗi gam hạt, ít nhất khoảng 36mg mỗi gam hạt, ít nhất khoảng 40mg mỗi gam hạt, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 44mg mỗi gam hạt hoặc ít nhất khoảng 48mg mỗi gam hạt, khoảng 80mg mỗi gam hạt, hoặc nằm trong khoảng từ 30mg đến 80mg mỗi gam hạt.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cây *Brassica napus, B. juncea* hoặc *Camelina sativa* có khả năng tạo ra hạt chứa DPA, trong đó hạt già đã được thu hoạch của cây này có hàm lượng DPA bằng ít nhất khoảng 28mg mỗi gam hạt, tốt hơn là ít nhất khoảng 32mg mỗi gam hạt, ít nhất khoảng 36mg mỗi gam hạt, ít nhất khoảng 40mg mỗi gam hạt, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 44mg mỗi gam hạt hoặc ít nhất khoảng 48mg mỗi gam hạt, khoảng 80mg mỗi gam hạt, hoặc nằm trong khoảng từ 30mg đến 80mg mỗi gam hạt.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào của cây hoặc cây theo sáng chế chứa polynucleotit ngoại sinh được xác định ở đây.

Cũng được đề xuất là bộ phận của cây, tốt hơn là hạt, hoặc tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật có một hoặc nhiều đặc điểm trong số các đặc điểm sau:

i) thu được từ cây theo sáng chế,

ii) chứa lipit như được xác định ở đây, hoặc

iii) có thể được sử dụng trong quy trình theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hạt già đã được thu hoạch của cây *Brassica napus, B. juncea* hoặc *Camelina sativa*, trong đó hạt này chứa /hoặc DPA và hàm lượng ẩm nằm trong khoảng từ 4% đến 15% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6% đến 8% trọng lượng hoặc nằm trong khoảng từ 4% đến 8% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 4% đến 6% trọng lượng, trong đó hàm lượng của DPA của hạt bằng ít nhất khoảng 28mg mỗi gam hạt, tốt hơn là ít nhất khoảng 32mg mỗi gam hạt, ít nhất khoảng 36mg mỗi gam hạt, ít nhất khoảng 40mg mỗi gam hạt, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 44mg mỗi gam hạt hoặc ít nhất khoảng 48mg mỗi gam hạt, khoảng 80mg mỗi gam hạt, hoặc nằm trong khoảng từ 30mg đến 80mg mỗi gam hạt.

Theo một phương án, tế bào theo sáng chế, cây có hạt chứa dầu theo sáng chế, cây *Brassica napus*, *B. juncea* hoặc *Camelina sativa* theo sáng chế, bộ phận của cây theo sáng chế, hoặc hạt theo sáng chế, có thể được sử dụng để tạo ra lipit chiết tách chứa một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các đặc điểm được xác định ở đây.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây hoặc tế bào mà có thể được sử dụng để tạo ra lipit chiết tách theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) phân tích hàm lượng của DPA trong lipit được tạo ra bởi một hoặc nhiều các bộ phận của cây như hạt hoặc tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật từ nhiều tế bào của cây hoặc tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật, mỗi tế bào của cây hoặc tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật chứa một hoặc nhiều polynucleotit ngoại sinh mã hóa một trong số các nhóm enzym sau;

i) ω3-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

ii) Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iii) Δ12-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iv) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

v) ω3-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vi) Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vii) Δ12-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

viii) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

ix) ω3-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

x) Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza, hoặc

xi) Δ12-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

trong đó mỗi polynucleotit được liên kết hoạt động với một hoặc nhiều gen khởi đầu có khả năng điều khiển quá trình biểu hiện polynucleotit này trong tế bào của bộ phận của cây hoặc các tế bào tái tổ hợp, và

b) xác định tế bào của cây hoặc tế bào tái tổ hợp, từ nhiều cây hoặc tế bào tái tổ hợp, mà có thể được sử dụng để tạo ra lipit thực vật chiết tách hoặc tế bào lipit theo sáng chế trong một hoặc nhiều bộ phận của cây, và

c) tùy ý, tạo ra cây hoặc tế bào tái tổ hợp thế hệ con từ tế bào của cây hoặc tế bào tái tổ hợp đã được xác định, hoặc hạt từ đó.

Theo một phương án, tế bào của cây hoặc tế bào tái tổ hợp còn chứa polynucleotit ngoại sinh mã hóa LPAAT như được xác định ở đây.

Tốt hơn là, cây thế hệ con là ít nhất thế hệ hai hoặc thế hệ ba thu được từ cây đã được xác định, và tốt hơn là đồng hợp tử đối với một hoặc nhiều polynucleotit. Tốt hơn nữa là, một hoặc nhiều polynucleotit có mặt ở cây thế hệ con ở chỉ một locut xen duy nhất. Như vậy, sáng chế đề xuất phương pháp mà có thể được sử dụng làm phương pháp lựa chọn để xác định cây hoặc hạt của cây đó từ nhiều cây hoặc hạt cạnh tranh đã được biến nạp, trong đó cây đã được xác định hoặc cây thế hệ con của nó tạo ra lipit theo sáng chế, tốt hơn là trong hạt của nó. Cây hoặc cây thế hệ con này hoặc hạt của nó được lựa chọn nếu nó tạo ra lipit theo sáng chế, cụ thể là có hàm lượng DPA đã định, hoặc không được lựa chọn nếu nó không tạo ra lipit theo sáng chế.

Theo một phương án, các polynucleotit ngoại sinh có mặt trong tế bào như tế bào vi sinh vật, hoặc cây hoặc bộ phận của cây như được xác định ở đây, được hợp nhất ổn định vào hệ gen của tế bào, cây hoặc bộ phận của cây như hạt. Tốt hơn là, (các) polynucleotit ngoại sinh được hợp nhất ổn định vào hệ gen của tế bào, cây hoặc bộ phận của cây như hạt ở một locut duy nhất trong hệ gen, và tốt hơn là đồng hợp tử đối với đoạn xen. Tốt hơn nữa là, cây hoặc bộ phận hoặc hạt của cây còn khác biệt ở chỗ nó không chứa polynucleotit ngoại sinh khác ngoài một hoặc nhiều phân tử T-DNA. Nghĩa là, không có trình tự vectơ ngoại sinh khác được hợp nhất vào hệ gen ngoài trình tự T-DNA.

Theo một phương án, trước bước a) phương pháp này bao gồm bước đưa một hoặc nhiều polynucleotit ngoại sinh vào một hoặc nhiều tế bào của cây.

Cũng được đề xuất là cây được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế, và hạt của các cây này.

Theo một phương án, cây theo sáng chế là hữu thụ cả đực và cái, tốt hơn là có mức hữu thụ cả đực và cái bằng ít nhất 70% so với, hoặc tốt hơn là giống như, cây kiểu dại tương ứng. Theo một phương án, hạt phấn được tạo ra bởi cây

theo sáng chế hoặc cây được tạo ra từ hạt theo sáng chế có thể sống 90-100% như được xác định bằng cách nhuộm màu bằng chất nhuộm xác định khả năng sống sót. Ví dụ, khả năng sống sót của hạt phấn có thể được đánh giá như được mô tả trong Ví dụ 1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra hạt, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) trồng cây theo sáng chế, hoặc cây cung cấp bộ phận theo sáng chế, tốt hơn là trên cánh đồng dưới dạng một phần quần thể bao gồm ít nhất 1000 hoặc 2000 hoặc 3000 cây như vậy hoặc trên diện tích bằng ít nhất 1 hecta (10000m^2) hoặc 2 hecta (20000m^2) hoặc 3 hecta (30000m^2) được trồng với mật độ trồng cây chuẩn, theo cách khác là trong nhà kính trong các điều kiện chuẩn,

b) thu hoạch hạt từ cây hoặc các cây, và

c) tùy ý, chiết lipit ra khỏi hạt, tốt hơn là tạo ra dầu với hiệu suất DPA toàn phần bằng ít nhất 60kg hoặc 70kg hoặc 80kg DPA /hecta (tương ứng, 6g hoặc 7g hoặc 8g DHA và/hoặc DPA/m^2).

Theo một phương án, cây, tế bào của cây, bộ phận hoặc hạt hoặc tế bào tái tổ hợp của cây theo sáng chế có một hoặc nhiều đặc điểm trong số các đặc điểm sau:

i) dầu của nó là như được xác định ở đây, hoặc

ii) bộ phận hoặc hạt hoặc tế bào tái tổ hợp của cây có thể được sử dụng trong quy trình theo sáng chế.

Ví dụ, hạt có thể được sử dụng để tạo ra cây theo sáng chế cây có thể được trồng trên cánh đồng hoặc trong nhà kính trong các điều kiện chuẩn, ví dụ như được mô tả trong Ví dụ 1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất lipit, hoặc dầu, được tạo ra bởi, hoặc thu được từ, bằng cách sử dụng quy trình theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, cây có hạt chứa dầu theo sáng chế, cây *Brassica sp.*, *Brassica napus*, *B.*

juncea, *G. max* hoặc *Camelina sativa* theo sáng chế, bộ phận của cây theo sáng chế, hạt theo sáng chế, hoặc cây, tế bào của cây, bộ phận hoặc hạt của cây theo sáng chế. Tốt hơn là, lipit hoặc dầu được tinh chế để loại bỏ tạp chất như axit nucleic (ADN và/hoặc ARN), protein và/hoặc carbohydrat, hoặc các chất màu như clorophyl. Lipit hoặc dầu cũng có thể được tinh chế để làm giàu tỷ lệ TAG, ví dụ bằng cách loại bỏ axit béo tự do (FFA: free fatty acid) hoặc phospholipit.

Theo một phương án, lipit hoặc dầu thu được bằng cách chiết dầu từ hạt chứa dầu. Ví dụ về dầu từ hạt có cầu bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, dầu canola (*Brassica napus, Brassica rapa* ssp.), dầu mù tạc (*Brassica juncea*), dầu *Brassica* khác, dầu hoa hướng dương (*Helianthus annus*), dầu hạt lanh (*Linum usitatissimum*), dầu đậu nành (*Glycine max*), dầu hoa rum (*Carthamus tinctorius*), dầu ngô (*Zea mays*), dầu thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), dầu lạc (*Arachis hypogaea*), dầu cọ, dầu hạt bông (*Gossypium hirsutum*), dầu dừa (*Cocos nucifera*), dầu quả bơ (*Persea americana*), dầu oliu (*Olea europaea*), dầu hạt điều (*Anacardium occidentale*), dầu hạt macadamia (*Macadamia intergrifolia*), dầu hạnh nhân (*Prunus amygdalus*) hoặc dầu hạt *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*).

Theo một phương án, tế bào (tế bào tái tổ hợp) theo, hoặc được sử dụng trong, sáng chế là tế bào vi sinh vật như tế bào thích hợp với quá trình lên men, tốt hơn là tế bào vi sinh vật chứa dầu có khả năng tích tụ triaxylglyxerol tới hàm lượng ít nhất 25% trên cơ sở trọng lượng. Các quá trình lên men được ưu tiên là quá trình lên men kị khí, như đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Tế bào lên men thích hợp, thông thường là các vi sinh vật có thể lên men, nghĩa là, chuyển hóa đường, như glucoza hoặc maltoza, trực tiếp hoặc gián tiếp thành axit béo mong muốn. Ví dụ về các vi sinh vật lên men bao gồm nấm, như nấm men. Như được sử dụng ở đây, "nấm men" bao gồm *Saccharomyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlbergensis*, *Candida* spp., *Kluveromyces* spp., *Pichia* spp., *Hansenula* spp., *Trichoderma* spp., *Lipomyces starkey*, và tốt hơn là *Yarrowia lipolytica*.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit béo được tạo ra, hoặc thu được, bằng cách sử dụng quy trình theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, cây có hạt chứa dầu theo sáng chế, cây *Brassica sp.*, *Brassica napus*, *B. juncea, G. max* hoặc *Camelina sativa* theo sáng chế, bộ phận của cây theo sáng chế, hạt theo sáng chế, hoặc cây, tế bào của cây, bộ phận hoặc hạt của cây theo sáng chế. Tốt hơn là, axit béo là DPA. Axit béo có thể là hỗn hợp axit béo có thành phần axit béo như được mô tả ở đây, hoặc có thể được làm giàu sao cho axit béo, tốt hơn là DPA, chiếm ít nhất 40% hoặc ít nhất 90% lượng hỗn hợp. Theo một phương án, axit béo không được este hóa. Theo cách khác, axit béo được este hóa ví dụ, như thành nhóm metyl, etyl, propyl hoặc butyl.

Cũng được đề xuất là bột hạt thu được từ hạt theo sáng chế hoặc thu được từ cây theo sáng chế. Bột hạt được ưu tiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bột hạt *Brassica sp.*, *Brassica napus*, *B. juncea*, *Camelina sativa* hoặc *Glycine max*. Theo một phương án, bột hạt chứa (các) polynucleotit ngoại sinh và/hoặc cấu trúc gen như được xác định ở đây. Theo phương án được ưu tiên, bột hạt giữ lại một số lipit hoặc dầu được tạo ra trong hạt mà từ đó thu được bột hạt, nhưng ở hàm lượng thấp (ví dụ, thấp hơn 2% trọng lượng) sau khi chiết tách phần lớn lipit hoặc dầu. Bột hạt có thể được sử dụng làm thức ăn cho động vật hoặc làm thành phần để sản xuất thức ăn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa một hoặc nhiều lipit hoặc dầu theo sáng chế, axit béo theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, cây có hạt chứa dầu theo sáng chế, *cây Brassica sp.*, *Brassica napus, B. juncea, Glycine max* hoặc *Camelina sativa* theo sáng chế, bộ phận của cây theo sáng chế, hạt theo sáng chế, hoặc bột hạt theo sáng chế. Theo các phương án, chế phẩm này chứa chất mang thích hợp để sử dụng trong dược phẩm, thức ăn nông nghiệp, hợp chất xử lý hạt, phân bón, thành phần thức ăn hoặc thức ăn cho súc vật khác, hoặc có protein hoặc vitamin bổ sung.

Cũng được đề xuất là sản phẩm dinh dưỡng, mỹ phẩm hoặc hóa chất chứa một hoặc nhiều lipit hoặc dầu theo sáng chế, axit béo theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, cây có hạt chứa dầu theo sáng chế, cây *Brassica sp.*, *Brassica napus, B. juncea, Glycine max* hoặc *Camelina sativa* theo sáng chế, bộ phận của cây theo sáng chế hạt theo sáng chế, bột hạt theo sáng chế, hoặc chế phẩm theo sáng chế. Sản phẩm dinh dưỡng được ưu tiên là sữa công thức dành cho trẻ nhỏ bao gồm lipit hoặc dầu theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm dinh dưỡng, tốt hơn là sữa công thức dành cho trẻ nhỏ, trong đó phương pháp này bao gồm các bước trộn một hoặc nhiều lipit hoặc dầu theo sáng chế, axit béo theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, cây có hạt chứa dầu theo sáng chế, cây *Brassica sp.*, *Brassica napus, B. juncea, Glycine max* hoặc *Camelina sativa* theo sáng chế, bộ phận của cây theo sáng chế, hạt theo sáng chế, bột hạt theo sáng chế, hoặc chế phẩm theo sáng chế, với ít nhất một thành phần thức ăn khác. Phương pháp này có thể bao gồm các bước trộn, nấu, nướng, ép đùn, tạo nhũ hoặc các cách chế biến sản phẩm dinh dưỡng khác, hoặc đóng gói sản phẩm dinh dưỡng, hoặc phân tích hàm lượng lipit hoặc dầu trong sản phẩm dinh dưỡng.

Sáng chế còn mô tả ở đây phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh mà có thể có lợi khi được cho sử dụng PUFA, tốt hơn là DPA, trong đó phương pháp này bao gồm các bước cho đối tượng sử dụng một hoặc nhiều lipit hoặc dầu theo sáng chế, axit béo theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, cây có hạt chứa dầu theo sáng chế, cây *Brassica sp.*, *Brassica napus, B. juncea, Glycine max* hoặc *Camelina sativa* theo sáng chế, bộ phận của cây theo sáng chế, hạt theo sáng chế, bột hạt theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế, hoặc sản phẩm dinh dưỡng theo sáng chế. Theo phương án được ưu tiên, PUFA được sử dụng ở dạng dược phẩm chứa etyl este của PUFA. Đối tượng này có thể là người hoặc động vật không phải là người.

Ví dụ về tình trạng bệnh mà có thể có lợi từ PUFA bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, mức triglyxerit trong huyết thanh tăng, mức cholesterol trong huyết thanh tăng như mức cholesterol LDL trong huyết thanh tăng, chứng loạn nhịp tim, tạo hình mạch, bệnh viêm, bệnh hen, bệnh vảy nến, chứng loãng xương, bệnh sỏi thận, bệnh AIDS, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh Crohn, bệnh tâm thần phân liệt, bệnh ung thư, hội chứng ngộ độc rượu ở thai nhi, rối loạn tăng động thiếu chú ý, xơ nang, axit phenylpyruvic-niệu, trầm cảm đơn cực, hội chứng xung-hấn, bệnh loạn dưỡng chất trắng thượng thận, bệnh mạch vành tim, bệnh cao huyết áp, bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, bệnh Alzheimer, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh tái phát hẹp van tim sau tạo hình mạch, bệnh eczema, bệnh cao huyết áp, tình trạng kết tụ tiểu cầu, bệnh chảy máu dạ dày, bệnh lạc nội mạc tử cung, hội chứng tiền kinh nguyệt, bệnh viêm não tủy đau cơ, chứng suy nhược mãn tính sau khi nhiễm virut hoặc bệnh của mắt.

Sáng chế còn mô tả ở đây việc sử dụng một hoặc nhiều lipit hoặc dầu theo sáng chế, axit béo theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, cây có hạt chứa dầu theo sáng chế, cây *Brassica sp.*, *Brassica napus, B. juncea, Glycine max* hoặc *Camelina sativa* theo sáng chế, bộ phận của cây theo sáng chế, hạt theo sáng chế, bột hạt theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế, hoặc sản phẩm dinh dưỡng theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng mà sẽ có lợi từ PUFA, tốt hơn là DPA.

Việc sản xuất thuốc có thể bao gồm bước trộn dầu theo sáng chế với chất mang dược dụng, để điều trị tình trạng bệnh như mô tả ở đây. Phương pháp này có thể bao gồm các bước, đầu tiên là tinh chế dầu và/hoặc chuyển hóa este, và/hoặc cất phân đoạn dầu để làm tăng hàm lượng DPA. Theo một phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm bước xử lý lipit hoặc dầu như dầu canola để chuyển hóa axit béo trong dầu thành alkyl este như metyl hoặc etyl este. Bước xử lý tiếp theo như cất phân đoạn hoặc chưng cất có thể được sử dụng để làm giàu DPA trong lipit hoặc dầu. Theo một phương án được ưu tiên, thuốc này

chứa etyl este của DPA. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, hàm lượng etyl este của DPA trong thuốc nằm trong khoảng từ 30% đến 50%, hoặc ít nhất 80% hoặc ít nhất khoảng 85% hoặc ít nhất 90% hoặc ít nhất khoảng 95%. Thuốc này còn có thể chứa etyl este của EPA, như nằm trong khoảng từ 30% đến 50%, hoặc ít nhất 90% tổng lượng axit béo trong thuốc này. Thuốc theo sáng chế thích hợp để sử dụng cho đối tượng là người hoặc động vật để điều trị các tình trạng bệnh lý như đã mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp kinh doanh hạt, trong đó phương pháp này bao gồm việc thu nhận hạt theo sáng chế, và kinh doanh hạt thu được vì mục đích doanh thu.

Theo một phương án, việc thu nhận hạt bao gồm việc trồng cây theo sáng chế và/hoặc thu hoạch hạt từ cây.

Theo một phương án khác, việc thu nhận hạt còn bao gồm việc đưa hạt vào đồ chứa và/hoặc bảo quản hạt.

Theo một phương án khác, việc thu nhận hạt còn bao gồm việc vận chuyển hạt đến một địa điểm khác.

Theo một phương án khác nữa, phương pháp này còn bao gồm việc vận chuyển hạt đến một địa điểm khác sau khi hạt được bán.

Theo một phương án khác, việc mua bán được thực hiện bằng phương tiện điện tử như máy tính.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất quy trình đóng hộp hạt bao gồm các bước:

a) xén, vun thành luống và/hoặc gặt phần trên mặt đất của cây chứa hạt theo sáng chế,

b) đập và/hoặc sàng các bộ phận của cây để tách riêng hạt ra khỏi phần còn lại của các bộ phận của cây, và

c) rây và/hoặc phân loại hạt đã được tách riêng ở bước b), và cho hạt đã được rây và/hoặc phân loại vào các hộp, bằng cách đó tạo ra các hộp chứa hạt.

Theo một phương án, khi thích hợp, lipit hoặc dầu, tốt hơn là dầu hạt, theo sáng chế hoặc có thể được sử dụng theo sáng chế, có hàm lượng chất béo được nêu trong Bảng trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Phương án bất kỳ ở đây sẽ được đưa vào áp dụng có sửa đổi thích hợp thành phương án khác bất kỳ trừ khi có quy định khác.

Sáng chế không bị giới hạn phạm vi bảo hộ ở các phương án cụ thể được mô tả ở đây, mà được dự định chỉ cho mục đích minh họa. Các sản phẩm, chế phẩm, và phương pháp tương đương về mặt chức năng rõ ràng sẽ nằm trong phạm vi sáng chế, như mô tả ở đây.

Trong toàn bộ bản mô tả này, trừ khi có quy định cụ thể khác, khi nhắc đến một bước, chế phẩm chứa vật chất, nhóm các bước hoặc nhóm các chế phẩm chứa vật chất riêng lẻ sẽ bao gồm cả nghĩa số ít và số nhiều (tức là một hoặc nhiều) bước, chế phẩm chứa vật chất, nhóm các bước hoặc nhóm các chế phẩm chứa vật chất.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả bởi các ví dụ không làm giới hạn sáng chê dưới đây và tham khảo các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện con đường sinh tổng hợp DPA ưa khí.

Fig.2 thể hiện bản đồ vùng xen T-ADN ở giữa biên phải và biên trái của pJP3416-GA7. RB là biên phải; LB là biên trái; TER là gen kết thúc phiên mã/vùng polyadenyl hóa; PRO là gen khởi đầu; Vùng mã hóa được thể hiện bên trên mũi tên, gen khởi đầu và gen kết thúc bên dưới mũi tên. Micpu-Δ6D là Δ6-desaturaza của *Micromonas pusilla*; Pyrco-Δ6E là Δ6-elongaza của *Pyramimonas cordata*; Pavsa-Δ5D là Δ5-desaturaza của *Pavlova salina*; Picpa-ω3D là ω3-desaturaza của *Pichia pastoris*; Pavsa-Δ4D là Δ4-desaturaza của *P.*

salina; Lackl-Δ12D là Δ12-desaturaza của *Lachancea kluyveri*; Pyrco-Δ5E là Δ5-elongaza của *Pyramimonas cordata*. NOS là gen kết thúc phiên mã nopalin synthaza/vùng polyadenyl hóa của *Agrobacterium tumefaciens*; FP1 là gen khởi đầu napin đã được cắt của *Brassica napus*; FAE1 là gen khởi đầu FAE1 của *Arabidopsis thaliana*; Lectin là gen kết thúc phiên mã lectin/vùng polyadenyl hóa của *Glyxin max*; Cnl1 và Cnl2 là gen khởi đầu hoặc gen kết thúc conlinin1 hoặc conlinin2 của *Linum usitatissimum*. MAR là vùng gắn cơ chất Rb7 từ *Nicotiana tabacum*.

Fig.3 thể hiện (A) cấu trúc sterol thực vật cơ bản có vòng và chuỗi bên đánh số, (B) cấu trúc hóa học của một số sterol thực vật.

Fig.4 thể hiện bản đồ của vùng xen T-DNA ở giữa biên trái và biên phải của pJP3662. RB là biên phải; LB là biên trái; TER là gen kết thúc phiên mã/vùng polyadenyl hóa; PRO là gen khởi đầu; Vùng mã hóa được thể hiện bên trên mũi tên, gen khởi đầu và gen kết thúc bên dưới mũi tên. Micpu-Δ6D là Δ6-desaturaza của *Micromonas pusilla*; Pyrco-Δ6E là Δ6-elongaza của *Pyramimonas cordata*; Pavsa-Δ5D là Δ5-desaturaza của *Pavlova salina*; Picpa-ω3D là ω3-desaturaza của *Pichia pastoris*; Lackl-Δ12D là Δ12-desaturaza của *Lachancea kluyveri*; Pyrco-Δ5E là Δ5-elongaza của *Pyramimonas cordata*. NOS là gen kết thúc phiên mã nopalin synthaza/vùng polyadenyl hóa của *Agrobacterium tumefaciens*; FP1 là gen khởi đầu napin đã được cắt của *Brassica napus*; FAE1 là gen khởi đầu FAE1 của *Arabidopsis thaliana*; Lectin là gen kết thúc phiên mã lectin/vùng polyadenyl hóa của *Glyxin max*; Cnl1 và Cnl2 là gen khởi đầu hoặc gen kết thúc conlinin1 hoặc conlinin2 của *Linum usitatissimum*. MAR là vùng gắn cơ chất Rb7 từ *Nicotiana tabacum*.

<u>Ký hiệu danh sách trình tự</u>

SEQ ID NO:1 – trình tự nucleotit pJP3416-GA7.

SEQ ID NO:2 – trình tự nucleotit pGA7- mod_B.

SEQ ID NO:3 - Khung đọc mở tối ưu hóa theo codon để biểu hiện □12 desaturaza của *Lachancea kluyveri* ở thực vật.

SEQ ID NO:4 - Δ12-desaturaza của *Lachancea kluyveri*.

SEQ ID NO:5 - Khung đọc mở tối ưu hóa theo codon để biểu hiện □□ desaturaza của *Pichia pastoris* ở thực vật.

SEQ ID NO:6 – ω3 desaturaza của *Pichia pastoris*.

SEQ ID NO:7 - Khung đọc mở mã hóa Δ6-desaturaza của *Micromonas pusilla*.

SEQ ID NO:8- Khung đọc mở mã hóa tối ưu theo codon để biểu hiện Δ6-desaturaz của *Micromonas pusilla* ở thực vật.

SEQ ID NO:9 - Δ6-desaturaza của *Micromonas pusilla*.

SEQ ID NO:10 - Khung đọc mở mã hóa Δ6-desaturaza của *Ostreococcus lucimarinus*.

SEQ ID NO:11 - Khung đọc mở mã hóa tối ưu theo codon để biểu hiện Δ6-desaturaza của *Ostreococcus lucimarinus* ở thực vật.

SEQ ID NO:12 - Δ6-desaturaza của *Ostreococcus lucimarinus*.

SEQ ID NO:13 - Δ6-desaturaza của *Ostreococcus tauri*.

SEQ ID NO:14 - Khung đọc mở mã hóa Δ6-elongaza của *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:15 - Khung đọc mở mã hóa tối ưu theo codon để biểu hiện Δ6-elongaza của *Pyramimonas cordata* ở thực vật (được cắt ngắn ở đầu 3' và mã hóa elongaza chức năng).

SEQ ID NO:16 - Δ6-elongaza của *Pyramimonas cordata*

SEQ ID NO:17 –Δ6-elongaza của *Pyramimonas cordata* bị cắt ngắn.

SEQ ID NO:18 - Khung đọc mở mã hóa Δ5-desaturaza của *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:19 - Khung đọc mở mã hóa tối ưu theo codon để biểu hiện Δ5-desaturaza của *Pavlova salina* ở thực vật.

SEQ ID NO: 20 - Δ5-desaturaza của *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:21 - Khung đọc mở mã hóa Δ5-desaturaza của *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:22 - Δ5-desaturaza của *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:23 - Khung đọc mở mã hóa Δ5-elongaza của *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:24 - Khung đọc mở mã hóa tối ưu theo codon để biểu hiện Δ5-elongaza của *Pyramimonas cordata* ở thực vật.

SEQ ID NO:25 - Δ5-elongaza của *Pyramimonas cordata*

SEQ ID NO:26 - Khung đọc mở mã hóa Δ4-desaturaza của *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:27 - Khung đọc mở mã hóa tối ưu theo codon để biểu hiện Δ4-desaturaza của *Pavlova salina* ở thực vật.

SEQ ID NO:28 - Δ4-desaturaza của *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:29 - Δ9-elongaza của *Isochrysis galbana*.

SEQ ID NO:30 - Khung đọc mở mã hóa tối ưu theo codon để biểu hiện Δ9-elongaza của *Emiliania huxleyi* ở thực vật.

SEQ ID NO:31 - Δ9-elongaza của *Emiliania huxleyi CCMP1516*.

SEQ ID NO:32 - Khung đọc mở mã hóa Δ9-elongaza của *Pavlova pinguis*.

SEQ ID NO:33 - Δ9-elongaza của *Pavlova pinguis*.

SEQ ID NO:34 - Khung đọc mở mã hóa Δ9-elongaza của *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:35 - Δ9-elongaza *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:36 - Khung đọc mở mã hóa Δ8-desaturaza của *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:37 - Δ8-desaturaza của *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:38 – gen ức chế V2 ở virut.

SEQ ID NO:39 – Khung đọc mở mã hóa gen ức chế V2 ở virut.

SEQ ID NO:40 – LPAAT2 của *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID NO:41 – LPAAT của *Limnanthes alba*.

SEQ ID NO:42 – LPAAT của *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO:43 – LPAAT của *Micromonas pusilla*.

SEQ ID NO:44 – LPAAT của *Mortierella alpina*.

SEQ ID NO:45 – LPAAT của *Braccisa napus*.

SEQ ID NO:46 – LPAAT của *Brassica napus*.

SEQ ID NO:47 - ω3 desaturaza của *Phytophthora infestans*.

SEQ ID NO:48 - ω3 desaturaza của *Thalassiosira pseudonana*.

SEQ ID NO:49 - ω3 desaturaza của *Pythium irregulare*.

SEQ ID NO:50 - 58 – đoạn mồi/đoạn dò oligonucleotit

Mô tả chi tiết sáng chế

Các kỹ thuật và định nghĩa chung

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây sẽ được hiểu theo cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, trong nuôi cấy tế bào, di truyền phân tử, tổng hợp axit béo, cây biến đổi gen, tế bào tái tổ hợp, hóa học protein, và hóa sinh).

Trừ khi có quy định khác, các kỹ thuật protein, nuôi cấy tế bào, và miễn dịch học được sử dụng trong sáng chế là các quy trình chuẩn, đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này được mô tả và giải thích trong các nguồn tài liệu như, J. Perbal, Practical Guide to

Molecular Cloning, John Wiley và Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (Người biên tập), Essential Molecular Biology: Practical Approach, Volumes 1 và 2, IRL Press (1991), D.M. Glover và B.D. Hames (Người biên tập), DNA Cloning: Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 và 1996), F.M. Ausubel et al. (Người biên tập), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates và Wiley-Interscience (1988, bao gồm tất cả các tài liệu cập nhật cho đến nay), Ed Harlow và David Lane (Người biên tập), Antibodies: Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), và J.E. Coligan et al. (Người biên tập), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (bao gồm tất cả các tài liệu cập nhật cho đến nay).

Thuật ngữ "và/hoặc", ví dụ, "X và/hoặc Y" sẽ được hiểu có nghĩa là hoặc "X và Y" hoặc "X hoặc Y" và sẽ được hiểu theo cả nghĩa "và" và "hoặc".

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng", trừ khi có quy định khác, được dùng để chỉ +/- 10%, tốt hơn nữa là +/- 5%, tốt hơn nữa là +/- 1% giá trị được nêu.

Trong suốt bản mô tả này, từ "bao gồm", hoặc các từ tương tự như "chứa", sẽ được hiểu là ngụ ý sự gồm có một yếu tố, số nguyên hoặc bước đã nêu, hoặc nhóm các yếu tố, số nguyên hoặc bước, nhưng không có nghĩa loại trừ yếu tố, số nguyên hoặc bước bất kỳ khác, hoặc nhóm các yếu tố, số nguyên hoặc bước.

<u>Định nghĩa chọn lọc</u>

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "lipit thực vật chiết tách" và "lipit thực vật phân tách" được dùng để chỉ chế phẩm lipit đã được chiết tách từ, ví dụ bằng cách ép, cây hoặc bộ phận của nó như hạt. Lipit chiết tách có thể là chế phẩm tương đối thô thu được, ví dụ, bằng cách ép hạt cây, hoặc chế phẩm tinh khiết hơn trong đó phần lớn, nếu không phải là tất cả, một hoặc nhiều hoặc mỗi thành phần trong số nước, axit nucleic, protein và carbohydrat có nguồn gốc từ

nguyên liệu thực vật đã được loại bỏ. Ví dụ về các phương pháp tinh chế được mô tả sau đây. Theo một phương án, lipit thực vật chiết tách hoặc phân tách chứa lipit với lượng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95% (trọng lượng) trọng lượng của chế phẩm. Lipit có thể là rắn hoặc lỏng ở nhiệt độ trong phòng, khi ở dạng lòng nó được gọi là dầu. Theo một phương án, lipit chiết tách theo sáng chế không được phối hợp với lipit khác như DPA được sinh ra bởi nguồn khác (ví dụ, DPA từ dầu cá). Theo một phương án, sau khi chiết, một hoặc nhiều hoặc tất cả các tỷ lệ sau, axit oleic và DPA, axit palmitic và DPA, axit linoleic và DPA, và tổng lượng axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3, không thay đổi nhiều (ví dụ, thay đổi không quá 10% hoặc 5%) khi so sánh với tỷ lệ trong hạt hoặc tế bào nguyên vẹn. Theo phương án khác, lipit thực vật chiết tách được trải qua quy trình, như quy trình hydro hóa hoặc phân đoạn, mà có thể làm thay đổi một hoặc nhiều hoặc tất cả các tỷ lệ, axit oleic và DPA, axit palmitic và DPA, axit linoleic và DPA, và tổng lượng axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3, khi so sánh với tỷ lệ trong tế bào hoặc hạt nguyên vẹn. Khi lipit thực vật chiết tách theo sáng chế có mặt trong dầu, dầu này còn có thể chứa các phân tử không phải axit béo như sterol.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dầu thực vật chiết tách" và "dầu thực vật phân tách" được dùng để chỉ một chất hoặc chế phẩm chứa lipit thực vật chiết tách hoặc lipit thực vật phân tách và là chất lỏng ở nhiệt độ trong phòng. Dầu này thu được từ cây hoặc bộ phận của nó như hạt. Dầu chiết tách hoặc phân tách có thể là chế phẩm tương đối thô thu được bằng cách, ví dụ, ép hạt cây, hoặc chế phẩm tinh khiết hơn trong đó hầu hết, nếu không phải là tất cả, một hoặc nhiều hoặc mỗi thành phần nước, axit nucleic, protein và carbohydrat có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật đã được loại bỏ. Chế phẩm này có thể bao gồm các thành phần khác có thể là lipit hoặc không phải lipit. Theo một phương án, chế phẩm dầu chứa lipit thực vật với lượng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95%

(trọng lượng). Theo một phương án, dầu chiết tách theo sáng chế không được phối hợp với dầu khác như DPA được tạo ra bởi nguồn khác (ví dụ, DPA từ dầu cá). Theo một phương án, sau khi chiết tách, một hoặc nhiều hoặc tất cả các tỷ lệ, axit oleic và DPA, axit palmitic và DPA, axit linoleic và DPA, và tổng lượng axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3, không thay đổi đáng kể (ví dụ, thay đổi không quá 10% hoặc 5%) khi so sánh với tỷ lệ trong tế bào hoặc hạt nguyên vẹn. Theo phương án khác, dầu thực vật chiết tách không được trải qua quy trình, như hydro hóa hoặc phân đoạn, mà có thể thay đổi một hoặc nhiều hoặc tất cả tỷ lệ, axit oleic và DPA, axit palmitic và DPA, axit linoleic và DPA, và tổng lượng axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3, khi so sánh với tỷ lệ trong tế bào hoặc hạt nguyên vẹn. Dầu thực vật chiết tách theo sáng chế có thể chứa phân tử không phải axit béo như sterol.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ như "lipit vi sinh vật chiết tách" hoặc "dầu vi sinh vật chiết tách" có các nghĩa tương tự như các thuật ngữ tương ứng "lipit thực vật chiết tách" và "dầu thực vật chiết tách", với sự khác biệt chính là nguồn của lipit hoặc dầu.

Như được sử dụng ở đây, "dầu" là chế phẩm chứa chủ yếu là lipit và là chất lỏng ở nhiệt độ trong phòng. Ví dụ, dầu theo sáng chế tốt hơn là chứa lipit với lượng bằng ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85% hoặc ít nhất 90% trọng lượng. Thông thường, dầu tinh khiết chứa lipit triaxylglyxerol (TAG) với lượng ít nhất 90% trọng lượng trong dầu. Các thành phần phụ của dầu như diaxylglyxerol (DAG), các axit béo tự do (FFA), phospholipit và sterol có thể có mặt như được mô tả ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "axit béo" được dùng để chỉ axit carboxylic (hoặc axit hữu cơ), thường là có đuôi béo dài, hoặc bão hòa hoặc không bão hòa. Thông thường, các axit béo có chuỗi liên kết cacbon-cacbon có chiều dài ít nhất 8 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là có chiều dài ít nhất 12 nguyên tử cacbon. Các axit béo được ưu tiên theo sáng chế có mạch cacbon có

từ 18 đến 22 nguyên tử cacbon (axit béo C18, C20, C22), tốt hơn nữa là từ 20 đến 22 nguyên tử cacbon (C20, C22) và tốt nhất là 22 nguyên tử cacbon (C22). Các axit béo có nhiều trong tự nhiên nhất có số nguyên tử cacbon chẵn do quá trình sinh tổng hợp chúng liên quan đến axetat có hai nguyên tử cacbon. Các axit béo có thể ở trạng thái tự do (không được este hóa) hoặc ở dạng được este hóa như một phần của dạng gắn kết triglyxerit, diaxylglyxerit, monoaxylglyxerit, axyl-CoA (thio-este) hoặc dạng gắn kết khác. Axit béo có thể được este hóa dưới dạng như phospholipit như dạng phosphatidylcholin, phosphatidyletanolamin, phosphatidylserin, phosphatidylglyxerol, phosphatidylinositol hoặc diphosphatidylglyxerol. Theo một phương án, axit béo được este hóa thành nhóm metyl hoặc etyl, ví dụ, như metyl hoặc etyl este của C20 hoặc C22 PUFA. Axit béo được ưu tiên là metyl hoặc etyl este của EPA, hoặc DPA, hoặc EPA, DPA và DHA, hoặc EPA và DPA.

"Axit béo bão hòa" không chứa liên kết đôi bất kỳ hoặc các nhóm chức khác trong mạch. Thuật ngữ "bão hòa" được dùng để chỉ hydro, trong đó tất cả các nguyên tử cacbon (ngoài nhóm axit carboxylic [-COOH]) chứa càng nhiều nguyên tử hydro càng tốt. Nói theo cách khác, đầu tận cùng omega (ω) chứa 3 nguyên tử hydro (CH3-) và mỗi nguyên tử cacbon trong mạch chứa 2 nguyên tử hydro (-CH2-).

"Axit béo không bão hòa" là có dạng tương tự như axit béo bão hòa, ngoại trừ việc có một hoặc nhiều nhóm chức alken trong mạch, với mỗi alken thay thế phần liên kết đơn "-CH2-CH2-" của mạch bằng phần liên kết đôi "-CH=CH-" (đó là, liên kết đôi cacbon với cacbon khác). Hai nguyên tử cacbon tiếp theo trong mạch được liên kết với bên khác của liên kết đôi có thể có cấu hình *cis* hoặc *trans*, tốt hơn là có cấu hình *cis*. Theo một phương án, lipit hoặc dầu theo sáng chế có thành phần axit béo chứa dưới 1% axit béo có liên kết đôi cacbon-cacbon ở cấu hình *trans* (axit béo *trans*).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "axit béo không bão hòa đơn" được dùng để chỉ axit béo chứa ít nhất 12 nguyên tử cacbon trong mạch cacbon của nó và chỉ có một nhóm alken (liên kết đôi cacbon-cacbon) trong mạch. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "axit béo không bão hòa đa" hoặc "PUFA" được dùng để chỉ axit béo chứa ít nhất 12 nguyên tử cacbon trong mạch cacbon của nó và ít nhất hai nhóm alken (liên kết đôi cacbon-cacbon).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "axit béo không bão hòa đa mạch dài" và "LC-PUFA" được dùng để chỉ axit béo chứa ít nhất 20 nguyên tử cacbon trong mạch cacbon của nó và ít nhất hai liên kết đôi cacbon-cacbon, và do đó bao gồm các VLC-PUFA. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "axit béo không bão hòa đa mạch rất dài" và "VLC-PUFA" được dùng để chỉ axit béo chứa ít nhất 22 nguyên tử cacbon trong mạch cacbon của nó và ít nhất ba liên kết đôi cacbon-cacbon. Thông thường, số lượng nguyên tử cacbon trong mạch cacbon của các axit béo được dùng để chỉ mạch cacbon không phân nhánh. Nếu mạch cacbon phân nhánh, thì số lượng nguyên tử cacbon không bao gồm nguyên tử cacbon trong các nhóm bên. Theo một phương án, axit béo không bão hòa đa mạch dài là axit béo ω3, nó có vị trí không bão hòa (liên kết đôi cacbon-cacbon) ở liên kết cacbon-cacbon thứ ba tính từ đầu tận cùng metyl của axit béo này. Theo một phương án khác, axit béo không bão hòa đa mạch dài là axit béo ω6, nó có vị trí không bão hòa (liên kết đôi cacbon-cacbon) trong liên kết cacbon-cacbon thứ sáu tính từ đầu metyl của axit béo. Theo một phương án khác, axit béo không bão hòa đa mạch dài được chọn từ nhóm bao gồm; axit arachidonic (ARA, 20:4Δ5,8,11,14; ω6), axit eicosatetraenoic (ETA, 20:4Δ8,11,14,17, ω3), axit eicosapentaenoic (EPA, 20:5Δ5,8,11,14,17; ω3), axit docosapentaenoic (DPA, 22:5Δ7,10,13,16,19, ω3), hoặc axit docosahexaenoic (DHA, 22:6Δ4,7,10,13,16,19, ω3). LC-PUFA cũng có thể là axit dihomo-γ-linoleic (DGLA) hoặc axit eicosatrienoic (ETrA, 20:3Δ11,14,17, ω3). Đã biết rõ rằng LC-PUFA được tạo ra theo sáng chế có thể là hỗn hợp của chất bất kỳ nêu trên hoặc tất cả chúng và có thể bao gồm LC-PUFA khác hoặc dẫn xuất của LC-

PUFA bất kỳ trong số các LC-PUFA này. Theo phương án được ưu tiên, axit béo ω3 ít nhất là DPA, và DHA, hoặc EPA, DPA và DHA, hoặc EPA và DPA. Theo một phương án, DPA có mặt ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 7% đến 30% hoặc 35% và DHA hoặc là không có mặt hoặc, nếu có mặt, thì sẽ ở hàm lượng thấp hơn 2,0%, tốt hơn là thấp hơn 1,0%, tốt hơn nữa là thấp hơn 0,5% của toàn bộ thành phần axit béo và tốt nhất là không có mặt hoặc không phát hiện được. Điều này có thể đạt được nhờ sự không có mặt của hoạt tính Δ4-desaturaza trong tế bào. Theo một phương án, hàm lượng của DPA lớn hơn hàm lượng của EPA, tốt hơn nữa là lớn hơn hàm lượng của mỗi chất trong số EPA và DHA, tốt nhất là lớn hơn hàm lượng tổng cộng của EPA và DHA. Theo phương án này, DHA có thể không có mặt hoặc, nếu có mặt, sẽ ở hàm lượng thấp hơn 0,5% của toàn bộ thành phần axit béo.

Hơn nữa, như được sử dụng ở đây thuật ngữ "axit béo không bão hòa đa mạch dài" (LC-PUFA) và "axit béo không bão hòa đa mạch rất dài" (VLC-PUFA) được dùng để chỉ axit béo ở trạng thái tự do (không được este hóa) hoặc ở dạng được este hóa như một phần của liên kết triglyxerit (triaxylglyxerol), diaxylglyxerit, monoaxylglyxerit, axyl-CoA hoặc dạng liên kết khác. Trong triglyxerit, LC-PUFA hoặc VLC-PUFA như DPA có thể được este hóa ở vị trí *sn*-1/3 hoặc *sn*-2, hoặc triglyxerit có thể chứa hai hoặc ba nhóm axyl được chọn từ nhóm axyl của LC-PUFA và VLC-PUFA. Ví dụ, triglyxerit có thể chứa DPA ở cả vị trí *sn*-1 và *sn*-3. Axit béo có thể được este hóa là phospholipit như dạng phosphatidylcholin (PC), phosphatidyletanolamin, phosphatidylserin, phosphatidylglyxerol, phosphatidyl-inositol hoặc diphosphatidylglyxerol. Do đó, LC-PUFA có thể là hỗn hợp gồm nhiều dạng trong lipit của tế bào hoặc dầu tinh khiết hoặc lipit chiết tách từ tế bào, mô hoặc sinh vật. Theo các phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất dầu chứa ít nhất 75% hoặc ít nhất 85% triaxylglyxerol, với phần còn lại là ở các dạng khác của lipit như các dạng đã nêu, trong đó ít nhất các triaxylglyxerol nêu trên chứa LC-PUFA. Dầu này sau đó có thể được tinh chế tiếp hoặc xử lý tiếp, ví dụ bằng cách thủy phân bằng

bazơ mạnh để giải phóng các axit béo tự do, hoặc bằng cách chuyển hóa este, chưng cất hoặc các cách tương tự.

Như được sử dụng ở đây, "toàn bộ axit béo ω6" hoặc "tổng lượng axit béo ω6" hoặc thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ tổng của tất cả axit béo ω6, cả dạng được este hóa và không được este hóa, trong lipit chiết tách, dầu, tế bào tái tổ hợp, bộ phận của cây hoặc hạt, là hàm lượng xác định, được thể hiện dưới dạng phần trăm của tổng lượng axit béo. Các axit béo ω6 bao gồm (nếu có) LA, GLA, DGLA, ARA, EDA và ω6-DPA, và ngoại trừ axit béo ω3 bất kỳ và axit béo không bão hòa đơn. Các axit béo ω6 có mặt trong cây, hạt, lipit hoặc dầu theo sáng chế đều được bao hàm trong nhóm các axit béo không bão hòa đa (PUFA).

Như được sử dụng ở đây, "axit béo ω6 mới" hoặc "lượng axit béo ω6 mới" hoặc thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ tổng của tất cả các axit béo ω6 trừ LA, este hóa và không được este hóa, trong lipit chiết tách, dầu, tế bào tái tổ hợp, bộ phận của cây hoặc hạt, là hàm lượng xác định, được thể hiện dưới dạng phần trăm của *tổng lượng axit béo*. Các axit béo ω6 mới là các axit béo được tạo ra trong tế bào, cây, bộ phận của cây và hạt theo sáng chế bằng cách biểu hiện cấu trúc gen (polynucleotit ngoại sinh) được đưa vào trong tế bào, và bao gồm (nếu có) GLA, DGLA, ARA, EDA và ω6-DPA, nhưng ngoại trừ LA và axit béo ω3 và các axit béo không bão hòa đơn bất kỳ. Tổng lượng axit béo ω6 và lượng axit béo ω6 mới ví dụ được xác định bằng cách chuyển hóa axit béo trong mẫu thành FAME và phân tích bằng phương pháp sắc ký GC, như mô tả trong Ví dụ 1.

Như được sử dụng ở đây, "toàn bộ axit béo ω3" hoặc "tổng lượng axit béo ω3" hoặc thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ tổng của tất cả các axit béo ω3, cả dạng được este hóa và không được este hóa, trong lipit chiết tách, dầu, tế bào tái tổ hợp, bộ phận của cây hoặc hạt, là hàm lượng xác định, được thể hiện dưới dạng phần trăm của tổng lượng axit béo. Các axit béo ω3 này bao gồm (nếu có)

ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA, và ngoại trừ các axit béo ω3 và các axit béo không bão hòa đơn bất kỳ. Các axit béo ω3 có mặt trong cây, hạt, lipit hoặc dầu theo sáng chế đều được bao hàm trong nhóm các axit béo không bão hòa đa (PUFA).

Như được sử dụng ở đây, "axit béo ω3 mới" hoặc "lượng axit béo ω3 mới" hoặc thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ tổng của tất cả các axit béo ω3 trừ ALA, cả dạng được este hóa và không được este hóa, trong lipit chiết tách, dầu, tế bào tái tổ hợp, bộ phận của cây hoặc hạt, là hàm lượng xác định, được thể hiện dưới dạng phần trăm của tổng lượng axit béo. Các axit béo ω3 mới này là các axit béo ω3 được tạo ra trong tế bào, cây, bộ phận của cây và hạt theo sáng chế bằng cách biểu hiện cấu trúc gen (polynucleotit ngoại sinh) được đưa vào trong tế bào, và bao gồm (nếu có) SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA, nhưng ngoại trừ ALA và các axit béo ω6 và các axit béo không bão hòa đơn bất kỳ. Tổng lượng axit béo ω3 và tổng lượng axit béo ω3 mới ví dụ được xác định bằng cách chuyển hóa các axit béo trong mẫu thành FAME và phân tích bằng phương pháp GC, như được mô tả trong Ví dụ 1.

Do người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được rằng thuật ngữ "thu nhận bộ phận của cây" là một bước trong quy trình theo sáng chế có thể bao gồm bước thu nhận một hoặc nhiều bộ phận của cây để sử dụng trong quy trình. Việc thu nhận bộ phận của cây bao gồm thu hoạch bộ phận của cây từ cây như bằng máy thu hoạch cơ học, hoặc mua bộ phận của cây, hoặc nhận bộ phận của cây từ người cung cấp. Trong một ví dụ khác, việc thu nhận bộ phận của cây có thể là nhận được cây từ người đã thu hoạch bộ phận của cây.

Các protein desaturaza, elongaza và axyl transferaza và gen mã hóa chúng có thể được sử dụng theo sáng chế là enzym bất kỳ đã biết trong lĩnh vực hoặc chất đồng đẳng hoặc dẫn xuất của chúng. Ví dụ về các gen này và kích thước protein mã hóa được nêu trong Bảng 1. Các enzym desaturaza mà được chỉ ra là tham gia vào quá trình sinh tổng hợp LC-PUFA đều thuộc về nhóm gọi là "tiền"

desaturaza. Các protein được ưu tiên hoặc hỗn hợp các protein là các protein được mã hóa bằng các cấu trúc gen được thể hiện ở đây là SEQ ID No: 1 và 2.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tiền desaturaza" được dùng để chỉ thành viên của nhóm enzym đưa vào liên kết đôi giữa nhóm carboxyl và phần không bão hòa đã tồn tại trước của mạch axyl của lipit, được đặc trưng về mặt cấu trúc bởi sự có mặt của vùng xytochrom b5 đầu tận cùng N, cùng với vùng desaturaza axit béo thông thường mà bao gồm ba hộp histidin có tính bảo toàn cao (Napier et al., 1997).

Hoạt tính của elongaza hoặc desaturaza bất kỳ để sử dụng theo sáng chế có thể được thử nghiệm bằng cách biểu hiện gen mã hóa enzym trong tế bào, ví dụ như tế bào thực vật hoặc tốt hơn là trong mầm sinh dưỡng hoặc cây biến đổi gen, và xác định liệu tế bào, phôi hoặc cây có làm tăng khả năng sản sinh LC-PUFA so với tế bào, phôi hoặc cây có thể so sánh được trong đó enzym không được biểu hiện hay không.

Theo một phương án, một hoặc nhiều desaturaza và/hoặc elongaza để sử dụng theo sáng chế có thể được tinh chế từ vi tảo, tức là đồng nhất về mặt trình tự axit amin với polypeptit mà có thể được tinh chế từ vi tảo.

Trong khi một số enzym nhất định được mô tả cụ thể ở đây là "có chức năng kép", thì sự không có mặt của thuật ngữ này tất nhiên không có ý là enzym cụ thể không có hoạt tính khác với hoạt tính đã được xác định cụ thể.

Bảng 1. Gen được tách dòng liên quan đến quy trình sinh tổng hợp LC-PUFA

Enzym	Kiểu sinh vật	Loài	Số hiệu lưu trữ	Kích thước protein (aa)	Tài liệu tham khảo
Δ4-desaturaza	Sinh vật đơn bào	*Euglena gracilis*	AY278558	541	Meyer et al., 2003
	Tảo	*Pavlova lutherii*	AY332747	445	Tonon et al., 2003
		Isochrysis galbana	AAV33631	433	Pereira et al., 2004b
		Pavlova salina	AAY15136	447	Zhou et al., 2007
	Thraustochytrid	*Thraustochytrium aureum*	AAN75707 AAN75708 AAN75709 AAN75710	515	N/A
		Thraustochytrium sp. ATCC21685	AAM09688	519	Qiu et al. 2001
Δ5-desaturaza	Động vật có vú	*Homo sapiens*	AF199596	444	Cho et al., 1999b Leonard et al., 2000b
	Giun	*Caenorhabditis elegans*	AF11440, NM_069350	447	Michaelson et al., 1998b; Watts và Browse, 1999b
	Nấm	*Mortierella alpina*	AF067654	446	Michaelson et al., 1998a; Knutzon et al., 1998
		Pythium irregulare	AF419297	456	Hong et al., 2002a
		Dictyostelium discoideum	AB022097	467	Saito et al., 2000
		Saprolegnia diclina		470	WO02081668
	Tảo cát	*Phaeodactylum tricornutum*	AY082392	469	Domergue et al., 2002

	Tảo	*Thraustochytrium sp*	AF489588	439	Qiu et al., 2001
		Thraustochytrium aureum		439	WO02081668
		Isochrysis galbana		442	WO02081668
	Rêu	*Marchantia polymorpha*	AY583465	484	Kajikawa et al., 2004
Δ6-desaturaza	Động vật có vú	*Người*	NM_013402	444	Cho et al., 1999a; Leonard et al., 2000
		Mus musculus	NM_019699	444	Cho et al., 1999a
	Giun tròn	*Caenorhabditis elegans*	Z70271	443	Napier et al., 1998
	Thực vật	*Borago officinales*	U79010	448	Sayanova et al., 1997
		Echium	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto et al., 2002
		Primula vialii	AY234127	453	Sayanova et al., 2003
		Anemone leveillei	AF536525	446	Whitney et al., 2003
	Rêu	*Ceratodon purpureus*	AJ250735	520	Sperling et al., 2000
		Marchantia polymorpha	AY583463	481	Kajikawa et al., 2004
		Physcomitrella patens	CAA11033	525	Girke et al., 1998
	Nấm	*Mortierella alpina*	AF110510 AB020032	457	Huang et al., 1999; Sakuradani et al., 1999
		Pythium irregulare	AF419296	459	Hong et al., 2002a
		Mucor circinelloides	AB052086	467	NCBI*
		Rhizopus sp.	AY320288	458	Zhang et al., 2004
		Saprolegnia diclina		453	WO02081668
	Tảo cát	*Phaeodactylum tricornutum*	AY082393	477	Domergue et al., 2002
	Vi khuẩn	*Synechocystis*	L11421	359	Reddy et al., 1993
	Tảo	*Thraustochytrium aureum*		456	WO02081668
Δ5/Δ6-desaturaza có chức năng kép	cá	*Danio rerio*	AF309556	444	Hastings et al., 2001
C20 Δ8-	Tảo	*Euglena gracilis*	AF139720	419	Wallis và Browse, 1999

desaturaza					
	Thực vật	*Borago officinales*	AAG43277	446	Sperling et al., 2001
Δ6-elongaza	Giun tròn	Caenorhabditis elegans	NM_069288	288	Beaudoin et al., 2000
	Rêu	*Physcomitrella patens*	AF428243	290	Zank et al., 2002
		Marchantia polymorpha	AY583464	290	Kajikawa et al., 2004
	Nấm	*Mortierella alpina*	AF206662	318	Parker-Barnes et al., 2000
	Tảo	*Pavlova lutheri***		501	WO 03078639
		Thraustochytrium	AX951565	271	WO 03093482
		*Thraustochytrium sp***	AX214454	271	WO 0159128
PUFA-elongaza	Động vật có vú	*Người*	AF231981	299	Leonard et al., 2000b; Leonard et al., 2002
		Rattus norvegicus	AB071985	299	Inagaki et al., 2002
		*Rattus norvegicus***	AB071986	267	Inagaki et al., 2002
		Mus musculus	AF170907	279	Tvrdik et al., 2000
		Mus musculus	AF170908	292	Tvrdik et al., 2000
	Cá	*Danio rerio*	AF532782	291 (282)	Agaba et al., 2004
		*Danio rerio***	NM_199532	266	Lo et al., 2003
	Giun	*Caenorhabditis elegans*	Z68749	309	Abbott et al., 1998 Beaudoin et al., 2000
	Tảo	*Thraustochytrium aureum***	AX464802	272	WO 0208401-A2
		*Pavlova lutheri***		320	WO 03078639
Δ9-elongaza	Tảo	*Isochrysis galbana*	AF390174	263	Qi et al., 2002
		Euglena gracilis		258	WO 08/128241
Δ5-elongaza	Tảo	*Ostreococcus tauri*	AAV67798	300	Meyer et al., 2004
		Pyramimonas cordata		268	WO 2010/057246
		Pavlova sp. CCMP459	AAV33630	277	Pereira et al., 2004b
		Pavlova salina	AAY15135	302	Robert et al., 2009
	Tảo cát	*Thalassiosira pseudonana*	AAV67800	358	Meyer et al., 2004
	Cá	*Oncorhynchus mykiss*	CAM55862	295	WO 06/008099
	Rêu	*Marchantia polymorpha*	BAE71129	348	Kajikawa et al., 2006

* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ** chức năng chưa được chứng minh

Desaturaza

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "desaturaza" được dùng để chỉ enzym có khả năng đưa liên kết đôi cacbon-cacbon vào trong nhóm axyl của cơ chất axit béo mà thường ở dạng được este hóa, ví dụ như axyl-CoA este. Nhóm axyl có thể được este hóa thành phospholipit như phosphatidylcholin (PC), hoặc thành protein mang axyl (ACP: acyl carrier protein), hoặc theo một phương án được ưu tiên thành CoA. Do đó, desaturaza thường có thể được phân nhóm thành ba nhóm. Theo một phương án, desaturaza là tiền-desaturaza.

Như được sử dụng ở đây, "Δ4-desaturaza" được dùng để chỉ protein thực hiện phản ứng desaturaza đưa liên kết đôi cacbon-cacbon ở liên kết cacbon-cacbon thứ 4 tính từ đầu carboxyl của cơ chất axit béo. "Δ4-desaturaza" ít nhất là có khả năng chuyển hóa DPA thành DHA. Tốt hơn là, "Δ4-desaturaza" có khả năng chuyển hóa DPA-CoA thành DHA-CoA, nghĩa là nó là axyl-CoA desaturaza. Theo một phương án, "Δ4-desaturaza" có khả năng chuyển hóa DPA được este hóa ở vị trí *sn*-2 của PC thành DHA-PC. Tốt hơn là Δ4-desaturaza có hoạt tính trên DPA-CoA lớn hơn hoạt tính trên DPA-PC. Bước khử bão hòa để tạo ra DHA từ DPA được xúc tác bởi Δ4-desaturaza ở sinh vật không phải là động vật có vú, và gen mã hóa enzyme này đã được phân tách từ loài sinh vật đơn bào nước ngọt *Euglena gracilis* và loài nước mặn *Thraustochytrium* sp. (Qiu et al., 2001; Meyer et al., 2003). Theo một phương án, Δ4-desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:28, hoặc Δ4-desaturaza *Thraustochytrium* sp., đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 80% đồng nhất với SEQ ID NO:28. Theo một phương án, cây, bộ phận của cây (như hạt) hoặc tế bào theo, hoặc được sử dụng trong, sáng chế tạo ra hàm lượng DPA, như từ

5% đến 35% tổng lượng axit béo có thể chiết tách được là DPA, nhưng không chứa gen mã hóa Δ4-desaturaza chức năng.

Như được sử dụng ở đây, "Δ5-desaturaza" được dùng để chỉ protein thực hiện phản ứng desaturaza mà đưa liên kết đôi cacbon-cacbon ở liên kết cacbon-cacbon thứ 5 tính từ đầu carboxyl của cơ chất axit béo. Theo một phương án, cơ chất axit béo là ETA và enzym này tạo ra EPA. Tốt hơn là, "Δ5-desaturaza" có khả năng chuyển hóa ETA-CoA tthành EPA-CoA, nghĩa là, nó là axyl-CoA desaturaza. Theo một phương án, "Δ5-desaturaza" có khả năng chuyển hóa ETA este hóa ở vị trí *sn*-2 của PC. Tốt hơn là, Δ5-desaturaza có hoạt tính trên ETA-CoA lớn hơn hoạt tính trên ETA-PC. Ví dụ về Δ5-desaturaza được nêu trong Ruiz-Lopez et al. (2012) và Petrie et al. (2010a) và trong Bảng 1 ở đây. Theo một phương án, Δ5-desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:20, mảnh có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất là 80% đồng nhất với SEQ ID NO:20. Theo một phương án khác, Δ5–desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:22, mảnh có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 53% đồng nhất với SEQ ID NO:22. Theo phương án khác, Δ5–desaturaza là từ loài *Thraustochytrium* hoặc *Emiliania huxleyi*.

Như được sử dụng ở đây, "Δ6-desaturaza" được dùng để chỉ protein thực hiện phản ứng desaturaza đưa liên kết đôi cacbon-cacbon vào liên kết cacbon-cacbon thứ 6 tính từ đầu carboxyl của cơ chất axit béo. Theo một phương án, cơ chất axit béo là ALA và enzym này tạo ra SDA. Tốt hơn là, "Δ6-desaturaza" có khả năng chuyển hóa ALA-CoA thành SDA-CoA, nghĩa là nó là axyl-CoA desaturaza. Theo một phương án, "Δ6-desaturaza" có khả năng chuyển hóa ALA este hóa ở vị trí *sn*-2 của PC. Tốt hơn là, Δ6-desaturaza có hoạt tính trên ALA-CoA lớn hơn hoạt tính trên ALA-PC. Δ6-

desaturaza cũng có thể có hoạt tính dưới dạng Δ5-desaturaza, được gọi là Δ5/Δ6 desaturaza hai chức năng, miễn là nó có hoạt tính Δ6-desaturaza trên ALA lớn hơn hoạt tính Δ5-desaturaza trên ETA. Ví dụ về Δ6-desaturaza được liệt kê trong Ruiz-Lopez et al. (2012) và Petrie et al. (2010a) và trong Bảng 1 ở đây. Δ6-desaturaza được ưu tiên là từ *Micromonas pusilla*, *Pythium irregulare* hoặc *Ostreococcus taurii*.

Theo một phương án, Δ6–desaturaza còn có đặc trưng là có ít nhất hai, tốt hơn là tất cả ba đặc điểm sau và tốt hơn là trong tế bào thực vật: i) hoạt tính Δ6-desaturaza trên axit α-linolenic (ALA, 18:3Δ9,12,15, ω3) dưới dạng cơ chất axit béo cao hơn so với axit linoleic (LA, 18:2Δ9,12, ω6); ii) hoạt tính Δ6-desaturaza trên ALA-CoA dưới dạng cơ chất axit béo cao hơn so với trên ALA được gắn với vị trí *sn-2* của PC dưới dạng cơ chất axit béo; và iii) hoạt tính Δ8-desaturaza trên ETrA. Ví dụ về Δ6–desaturaza như vậy được nêu trong Bảng 2.

Theo một phương án, Δ6–desaturaza có hoạt tính trên cơ chất ω3 lớn hơn so với cơ chất ω6 tương ứng và có hoạt tính trên ALA để tạo ra axit octadecatetraenoic (axit stearidonic, SDA, 18:4Δ6,9,12, 15, ω3) với hiệu suất bằng ít nhất 30%, tốt hơn nữa là ít nhất 40%, hoặc tốt nhất là ít nhất 50% khi được biểu hiện từ polynucleotit ngoại sinh trong các tế bào tái tổ hợp như tế bào thực vật, hoặc ít nhất 35% khi được biểu hiện trong tế bào nấm men. Theo một phương án, Δ6-desaturaza có hoạt tính cao hơn, ví dụ, ít nhất hoạt tính Δ6-desaturaza trên ALA dưới dạng cơ chất axit béo cao hơn khoảng 2 lần so với LA dưới dạng cơ chất axit béo. Theo phương án khác, Δ6-desaturaza có hoạt tính cao hơn, ví dụ, hoạt tính Δ6-desaturaza cao hơn ít nhất khoảng 5 lần hoặc hoạt tính cao hơn ít nhất 10 lần trên ALA-CoA dưới dạng cơ chất axit béo so với trên ALA được gắn với vị trí *sn-2* của PC dưới dạng cơ chất

axit béo. Theo một phương án khác, Δ6-desaturaza có hoạt tính trên cả cơ chất axit béo ALA-CoA và trên ALA được gắn với vị trí *sn-2* của PC.

Bảng 2. Desaturaza đã được chứng minh là có hoạt tính trên cơ chất axyl-CoA

Enzym	Dạng sinh vật	Loài	Số hiệu lưu trữ	Kích thước protein (aa)	Tài liệu tham khảo
Δ6-desaturaza	Tảo	*Mantoniella squamata*	CAQ30479	449	Hoffmann et al., 2008
		Ostreococcus tauri	AAW70159	456	Domergue et al., 2005
		Micromonas pusilla	EEH58637		Petrie et al., 2010a (SEQ ID NO: 7)
Δ5-desaturaza	Tảo	*Mantoniella squamata*	CAQ30478	482	Hoffmann et al., 2008
	Thực vật	*Anemone leveillei*	N/A		Sayanova et al., 2007
ω3-desaturaza	Nấm	*Pythium aphanidermatum*	FW362186,1	359	Xue et al., 2012; WO2008/054565
	Nấm (oomycete)	*Phytophthora sojae*	FW362214,1	363	Xue et al., 2012; WO2008/054565
	Nấm (oomycete)	*Phytophthora ramorum*	FW362213,1	361	Xue et al., 2012; WO2008/054565

Theo một phương án, Δ6-desaturaza có hoạt tính Δ5-desaturaza không thể phát hiện được trên ETA. Theo phương án khác, Δ6-desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:13, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất là 77% đồng nhất với SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:13. Theo một phương án khác, Δ6-desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:13, đoạn có hoạt

tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất là 67% đồng nhất với một hoặc cả hai SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:13. Δ6-desaturaza cũng có thể có hoạt tính Δ8-desaturaza.

Như được sử dụng ở đây, "Δ8-desaturaza" được dùng để chỉ protein thực hiện phản ứng desaturaza đưa liên kết đôi cacbon-cacbon vào liên kết cacbon-cacbon thứ 8 tính từ đầu carboxyl của cơ chất axit béo. Δ8-desaturaza ít nhất là có khả năng chuyển hóa ETrA thành ETA. Tốt hơn là, Δ8-desaturaza có khả năng chuyển hóa ETrA-CoA thành ETA-CoA, nghĩa là nó là axyl-CoA desaturaza. Theo một phương án, Δ8-desaturaza có khả năng chuyển hóa ETrA đã được este hóa ở vị trí *sn*-2 của PC. Tốt hơn là, Δ8-desaturaza có hoạt tính trên ETrA-CoA lớn hơn so với trên ETrA-PC. Δ8-desaturaza cũng có thể có hoạt tính dưới dạng Δ6-desaturaza, được gọi là Δ6/Δ8 desaturaza hai chức năng, miễn là nó có hoạt tính Δ8-desaturaza trên ETrA lớn hơn so với hoạt tính Δ6-desaturaza trên ALA. Ví dụ về Δ8-desaturazas được liệt kê trong Bảng 1. Theo một phương án, Δ8-desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:37, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 80% đồng nhất với SEQ ID NO:37.

Như được sử dụng ở đây, "ω3-desaturaza" được dùng để chỉ protein thực hiện phản ứng desaturaza đưa liên kết đôi cacbon-cacbon vào liên kết cacbon-cacbon thứ ba tính từ đầu metyl của cơ chất axit béo. Do đó, ω3-desaturaza có thể chuyển hóa LA thành ALA và GLA thành SDA (tất cả các axit béo C18), hoặc DGLA thành ETA và/hoặc ARA thành EPA (các axit béo C20). Một số ω3-desaturaza (nhóm I) có hoạt tính chỉ trên cơ chất C18, như ω3-desaturaza thực vật và vi khuẩn lam. Các ω3-desaturaza như vậy cũng là Δ15-desaturaza. Các ω3-desaturaza khác có hoạt tính trên cơ chất C20 sẽ

không có hoạt tính (nhóm II) hoặc một ít hoạt tính (nhóm III) trên cơ chất C18. Các ω3-desaturaza như vậy cũng là Δ17-desaturaza. Các ω3-desaturaza được ưu tiên là kiểu nhóm III chuyển hóa LA thành ALA, GLA thành SDA, DGLA thành ETA và ARA thành EPA, như ω3-desaturaza *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 12). Các ví dụ về ω3-desaturaza bao gồm ω3-desaturaza được mô tả bởi Pereira et al. (2004a) (ω3-desaturaza *Saprolegnia diclina*, nhóm II), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) và Spychalla et al. (1997) (ω3-desaturaza *C. elegans*, nhóm III). Theo một phương án được ưu tiên, ω3-desaturaza là ω3-desaturaza của nấm. Như được sử dụng ở đây, "ω3-desaturaza của nấm" được dùng để chỉ ω3-desaturaza được tạo ra từ nấm, kể cả nguồn gốc nấm noãn, hoặc thể biến dị của nó mà có trình tự axit amin ít nhất 95% tương đồng với nó. Gen mã hóa một số ω3-desaturaza đã được phân tách từ các nguồn nấm ví dụ, như từ *Phytophthora infestans* (Số hiệu lưu trữ: CAJ30870, WO2005083053; SEQ ID NO: 47), *Saprolegnia diclina* (Số hiệu lưu trữ: AAR20444, Pereira et al., 2004a & Patent Mỹ số 7211656), *Pythium irregulare* (WO2008022963, Nhóm II; SEQ ID NO: 49), *Mortierella alpina* (Sakuradani et al., 2005; Số hiệu lưu trữ: BAD91495; WO2006019192), *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al., 2004; Số hiệu lưu trữ: XP_002291057; WO2005012316, SEQ ID NO: 48), *Lachancea kluyveri* (cũng có tên là *Saccharomyces kluyveri*; Oura et al., 2004; Số hiệu lưu trữ: AB118663). Xue et al. (2012) mô tả ω3-desaturaza từ nấm noãn *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora sojae*, và *Phytophthora ramorum* là những enzym có khả năng chuyển hóa hiệu quả cơ chất axit béo ω6 thành axit béo ω3 tương ứng, với ưu tiên cho cơ chất C20, tức là chúng có hoạt tính Δ17-desaturaza mạnh hơn hoạt tính Δ15-desaturaza. Các enzym này không có hoạt tính Δ12-desaturaza, nhưng có thể sử dụng các axit béo trong cả axyl-CoA và phần phospholipit làm cơ chất.

Theo một phương án được ưu tiên hơn, ω3-desaturaza của nấm là ω3-desaturaza/Δ15-desaturaza của *Pichia pastoris* (cũng có tên là *Komagataella pastoris*) (Zhang et al., 2008; Số hiệu lưu trữ: EF116884; SEQ ID NO: 12), hoặc polypeptit ít nhất 95% tương đồng với nó.

Theo một phương án, ω3-desaturaza ít nhất là có khả năng chuyển hóa ARA thành EPA, DGLA thành ETA, GLA thành SDA, cả ARA thành EPA và DGLA thành ETA, cả ARA thành EPA và GLA thành SDA, hoặc tất cả ba khả năng này.

Theo một phương án, ω3-desaturaza có hoạt tính Δ17-desaturaza trên axit béo C20 có ít nhất ba liên kết đôi cacbon-cacbon, tốt hơn là ARA. Theo một phương án khác, ω3-desaturaza có hoạt tính Δ15-desaturaza trên axit béo C18 có ba liên kết đôi cacbon-cacbon, tốt hơn là GLA. Tốt hơn là, có cả hai hoạt tính này.

Như được sử dụng ở đây, "Δ12-desaturaza" được dùng để chỉ protein thực hiện phản ứng desaturaza đưa liên kết đôi cacbon-cacbon vào liên kết cacbon-cacbon thứ 12 tính từ đầu carboxyl của cơ chất axit béo. Thông thường, Δ12-desaturaza lần lượt chuyển hóa hoặc oleoyl-phosphatidylcholin hoặc oleoyl-CoA thành linoleoyl-phosphatidylcholin (18:1-PC) hoặc linoleoyl-CoA (18:1-CoA). Phân nhóm sử dụng cơ chất liên kết với PC được gọi là Δ12-desaturaza phụ thuộc phospholipit, phân nhóm sau là Δ12-desaturaza phụ thuộc axyl-CoA. Δ12-desaturaza thực vật và nấm thường thuộc phân nhóm đầu tiên, trong khi Δ12-desaturaza động vật thuộc phân nhóm sau, ví dụ Δ12-desaturaza được mã hóa bởi các gen tách dòng từ côn trùng (Zhou et al. (2008)). Nhiều trình tự Δ12-desaturaza khác có thể được xác định dễ dàng bằng cách tra cứu dữ liệu trình tự.

Như được sử dụng ở đây, "Δ15-desaturaza" được dùng để chỉ protein thực hiện phản ứng desaturaza đưa liên kết đôi cacbon-cacbon vào liên kết cacbon-cacbon thứ 15 tính từ đầu carboxyl của cơ chất axit béo. Nhiều gen mã hóa Δ15-desaturaza đã được tách dòng từ các loài thực vật và nấm. Ví dụ, US5952544 mô tả axit nucleic mã hóa Δ15-desaturaza thực vật (FAD3). Các enzym này chứa các môtip axit amin mà được đặc trưng bởi Δ15-desaturaza thực vật. WO200114538 mô tả gen mã hóa FAD3 đậu nành. Nhiều trình tự Δ15-desaturaza khác có thể được xác định dễ dàng bằng cách tra cứu dữ liệu trình tự.

Như được sử dụng ở đây, "Δ17-desaturaza" được dùng để chỉ protein thực hiện phản ứng desaturaza đưa liên kết đôi cacbon-cacbon vào liên kết cacbon-cacbon thứ 17 tính từ đầu carboxyl của cơ chất axit béo. Δ17-desaturaza cũng được coi là ω3-desaturaza nếu nó tác động lên cơ chất C20 để đưa liên kết ω3 thành không bão hòa.

Theo phương án được ưu tiên, Δ12-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza là Δ12-desaturaza của nấm hoặc Δ15-desaturaza của nấm. Như được sử dụng ở đây, "Δ12-desaturaza của nấm" hoặc "Δ15-desaturaza của nấm" được dùng để chỉ Δ12-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza thu được từ các nguồn nấm, kể cả nguồn nấm noãn, hoặc thể biến dị của nó có trình tự axit amin ít nhất 95% đồng nhất với với nó. Các gen mã hóa nhiều desaturaza đã được phân tách từ các nguồn nấm. US 7211656 mô tả Δ12 desaturaza từ *Saprolegnia diclina*. WO2009016202 mô tả desaturaza của nấm từ *Helobdella robusta*, *Laccaria bicolor*, *Lottia gigantea*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Monosiga brevicollis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycospaerella graminicola*, *Naegleria gruben*, *Nectria haematococca*, *Nematostella vectensis*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Trichoderma resii*, *Physcomitrella patens*, *Postia placenta*, *Selaginella*

moellendorffii và *Microdochium nivale*. WO2005/012316 mô tả Δ12-desaturaza từ *Thalassiosira pseudonana* và các nấm khác. WO2003/099216 mô tả gen mã hóa Δ12-desaturaza và Δ15-desaturaza của nấm được phân tách từ *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* và *Mortierella alpina*. WO2007133425 mô tả Δ15 desaturaza của nấm được phân tách từ: *Saccharomyces kluyveri*, *Mortierella alpina*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* và *Magnaporthe grisea*. Δ12 desaturaza được ưu tiên là từ *Phytophthora sojae* (Ruiz-Lopez et al., 2012).

Một phân nhóm khác của Δ12-desaturaza của nấm, và Δ15-desaturaza của nấm, là Δ12/Δ15-desaturaza của nấm có chức năng kép. Gen mã hóa enzym đã được tách dòng từ *Fusarium monoliforme* (Số hiệu lưu trữ: DQ272516, Damude et al., 2006), *Acanthamoeba castellanii* (Số hiệu lưu trữ: EF017656, Sayanova et al., 2006), *Perkinsus marinus* (WO2007042510), *Claviceps purpure* (Số hiệu lưu trữ: EF536898, Meesapyodsuk et al., 2007) và *Coprinus cinereus* (Số hiệu lưu trữ: AF269266, Zhang et al., 2007).

Theo phương án khác, ω3-desaturaza có ít nhất một ít hoạt tính, tốt hơn là hoạt tính cao hơn, trên cơ chất axyl-CoA so với cơ chất axyl-PC tương ứng. Như được sử dụng ở đây, "cơ chất axyl-PC tương ứng" được dùng để chỉ axit béo được este hóa ở vị trí *sn-2* của phosphatidylcholin (PC) trong đó axit béo là axit béo giống như trong cơ chất axyl-CoA. Ví dụ, cơ chất axyl-CoA có thể là ARA-CoA và cơ chất axyl-PC tương ứng là *sn*-2 ARA-PC. Theo một phương án, hoạt tính ít nhất là cao hơn gấp 2 lần. Tốt hơn là, ω3-desaturaza có ít nhất một ít hoạt tính trên cả cơ chất axyl-CoA và cơ chất axyl-PC tương ứng của nó và có hoạt tính trên cả cơ chất C18 và C20. Ví dụ về ω3-desaturaza đã được biết trong số các desaturaza của nấm đã được liệt kê trên đây.

Theo một phương án khác, ω3-desaturaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:6, đoạn có hoạt tính sinh học của nó hoặc trình tự axit amin ít nhất 60% đồng nhất với SEQ ID NO:6, tốt hơn là ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% đồng nhất với SEQ ID NO:6.

Theo một phương án khác nữa, desaturaza để sử dụng theo sáng chế có hoạt tính trên cơ chất axyl-CoA cao hơn so với cơ chất axyl-PC tương ứng. Theo một phương án khác, desaturaza để sử dụng theo sáng chế có hoạt tính trên cơ chất axyl-PC cao hơn so với cơ chất axyl-CoA tương ứng, nhưng có một ít hoạt tính trên cả hai cơ chất. Như đã nêu ở trên, "cơ chất axyl-PC tương ứng" được dùng để chỉ axit béo được este hóa ở vị trí *sn-2* của phosphatidylcholin (PC) trong đó axit béo là giống như axit béo trong cơ chất axyl-CoA. Theo một phương án, hoạt tính ít nhất cao gấp hai lần. Theo một phương án, desaturaza là Δ5 hoặc Δ6-desaturaza, hoặc ω3-desaturaza, ví dụ về enzym này được là, nhưng không giới hạn ở, các enzym nêu trong Bảng 2. Để kiểm tra cơ chất mà desaturaza tác động lên, đó là cơ chất axyl-CoA hoặc axyl-PC, các thử nghiệm được thực hiện trong tế bào nấm men như mô tả trong Domergue et al. (2003) và (2005). Khả năng của cơ chất axyl-CoA đối với desaturaza cũng có thể được suy ra khi elongaza được biểu hiện cùng với desaturaza, có hiệu suất chuyển hóa enzym trong tế bào thực vật ít nhất bằng khoảng 90% trong đó elongaza xúc tác sự kéo dài mạch của sản phẩm của desaturaza. Trên cơ sở này, Δ5-desaturaza và Δ4-desaturaza được biểu hiện từ cấu trúc GA7 (xem Ví dụ 2, Fig.2 và SEQ ID No:1) và thể biến dị của nó (Ví dụ 3) có khả năng khử bão hòa cơ chất axyl-CoA, ETA-CoA và DPA-CoA tương ứng của chúng.

Elongaza

Bằng chứng hóa sinh giả thuyết rằng quá trình kéo dài mạch axit béo gồm có 4 bước: ngưng tụ, khử, loại nước và khử lần thứ hai. Trong phạm vi

của sáng chế, "elongaza" được dùng để chỉ polypeptit xúc tác bước ngưng tụ với sự có mặt của các thành phần khác của phức chất kéo dài mạch, trong các điều kiện sinh lý thích hợp. Cũng đã chỉ ra rằng cần đến sự biểu hiện khác loại hoặc cùng loại chỉ trong tế bào của thành phần ngưng tụ ("elongaza") của phức chất protein kéo dài mạch để kéo dài mạch axyl đặc trưng. Do đó, elongaza được đưa vào có thể có thêm một cách thành công hoạt tính khử và hoạt tính loại nước ra khỏi vật chủ chuyển gen để thực hiện phản ứng kéo dài mạch axyl thành công. Tính đặc hiệu của phản ứng kéo dài mạch theo độ dài mạch và độ bão hòa của cơ chất axit béo được cho là nằm ở thành phần ngưng tụ. Thành phần này cũng được cho là hạn chế tốc độ trong phản ứng kéo dài mạch.

Như được sử dụng ở đây, "Δ5-elongaza" ít nhất là có khả năng chuyển hóa EPA thành DPA. Ví dụ về Δ5-elongaza bao gồm enzym được bộc lộ trong WO2005/103253. Theo một phương án, Δ5-elongaza có hoạt tính trên EPA để tạo ra DPA với hiệu suất ít nhất là 60%, tốt hơn nữa là ít nhất 65%, tốt hơn nữa là ít nhất 70% hoặc tốt nhất là ít nhất 80% hoặc 90%. Theo một phương án khác, Δ5-elongaza chứa trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:25, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 47% đồng nhất với SEQ ID NO:25. Theo một phương án khác, Δ6-elongaza là từ *Ostreococcus taurii* hoặc *Ostreococcus lucimarinus* (US2010/088776).

Như được sử dụng ở đây, "Δ6-elongaza" ít nhất có khả năng chuyển hóa SDA thành ETA. Ví dụ về Δ6-elongaza bao gồm các enzym được nêu trong Bảng 1. Theo một phương án, elongaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:16, đoạn có hoạt tính sinh học của nó (như đoạn được nêu trong SEQ ID NO:17), hoặc trình tự axit amin ít nhất 55% đồng nhất với một hoặc cả hai SEQ ID NO:16 hoặc SEQ ID NO:17. Theo

một phương án, Δ6-elongaza là từ *Physcomitrella patens* (Zank et al., 2002; Số hiệu lưu trữ: AF428243) hoặc *Thalassiosira pseudonana* (Ruiz-Lopez et al., 2012).

Như được sử dụng ở đây, "Δ9-elongaza" ít nhất là có khả năng chuyển hóa ALA thành ETrA. Ví dụ về Δ9-elongaza bao gồm các enzym được nêu trong Bảng 1. Theo một phương án, Δ9-elongaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:29, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 80% đồng nhất với SEQ ID NO:29. Theo phương án khác, Δ9-elongaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:31, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 81% đồng nhất với SEQ ID NO:31. Theo phương án khác, the Δ9-elongaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:33, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 50% đồng nhất với SEQ ID NO:33. Theo một phương án khác, Δ9-elongaza chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:35, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 50% đồng nhất với SEQ ID NO:35. Theo một phương án khác, Δ9-elongaza có hoạt tính trên cơ chất ω6 lớn hơn hoạt tính trên cơ chất ω3, hoặc ngược lại.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "có hoạt tính trên cơ chất ω6 cao hơn hoạt tính trên cơ chất ω3 tương ứng" được dùng để chỉ hoạt tính tương đối của enzym này trên cơ chất khác bởi tác dụng của ω3 desaturaza. Tốt hơn là, cơ chất ω6 là LA và cơ chất ω3 là ALA.

Elongaza có hoạt tính Δ6-elongaza và Δ9-elongaza ít nhất là có khả năng (i) chuyển hóa SDA thành ETA và (ii) chuyển hóa ALA thành ETrA và có hoạt tính Δ6-elongaza cao hơn hoạt tính Δ9-elongaza. Theo một phương án, elongaza có hiệu suất chuyển hóa trên SDA để tạo ra ETA bằng ít nhất

50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60%, và/hoặc hiệu suất chuyển hóa trên ALA để tạo ra EtrA bằng ít nhất 6% hoặc tốt hơn nữa là ít nhất 9%. Theo một phương án khác, elongaza có hoạt tính Δ6-elongaza cao hơn ít nhất khoảng 6,5 lần so với hoạt tính Δ9-elongaza. Theo một phương án khác, elongaza có hoạt tính Δ5-elongaza không phát hiện được.

Các enzym khác

Các gen chuyển được đưa vào trong các tế bào tái tổ hợp như tế bào vi sinh vật hoặc cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó cũng có thể mã hóa LPAAT. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza" (LPAAT), còn được gọi là axit lysophosphatidic-axyltransferaza hoặc axylCoA- lysophosphatidat-axyltransferaza, được dùng để chỉ protein có tác dụng axyl hóa *sn*-1-axyl-glyxerol-3-phosphat (*sn*-1 G-3-P) ở vị trí *sn-2* để tạo ra axit phosphatidic (PA). Do đó, thuật ngữ "hoạt tính 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza" được dùng để chỉ sự axyl hóa *sn*-1 G-3-P ở vị trí *sn-2* để tạo ra PA (EC 2.3,1,51). LPAAT được ưu tiên là các enzym có thể sử dụng axyl C22-CoA không bão hòa đa làm cơ chất để chuyển nhóm axyl C22 không bão hòa đa vào vị trí *sn-2* của LPA, tạo ra PA. Theo một phương án, axyl C22 không bão hòa đa-CoA là DPA-CoA. Các LPAAT như vậy được minh họa trong Ví dụ 6 và có thể được thử nghiệm như được mô tả ở đây. Theo một phương án, LPAAT có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm các axit amin có trình tự như được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 40 đến 46, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 40% đồng nhất với một hoặc nhiều trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 40 đến 46. Theo một phương án khác, LPAAT không có các axit amin có trình tự như được nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 44. Theo một phương án được ưu tiên, LPAAT có thể được sử dụng theo sáng chế có thể sử dụng cơ chất axyl C22 béo không bão

hòa đa-CoA, tốt hơn là DPA-CoA, chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 41, 42 và 44, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 40% đồng nhất với một hoặc nhiều trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 41, 42 và 44. Theo một phương án được ưu tiên, LPAAT có thể được sử dụng theo sáng chế có thể sử dụng cơ chất axyl C22 béo không bão hòa đa-CoA, tốt hơn là DHA-CoA và/hoặc DPA-CoA, chứa các axit amin có trình tự như được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NOs: 41 hoặc 42, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 40% đồng nhất với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 41 và 42. Theo một phương án, tốt hơn nếu LPAAT là LPAAT *Mortierella alpina* có trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 44 hoặc LPAAT khác có khả năng sử dụng DPA-CoA làm cơ chất để chuyển DPA thành LPA, tạo ra PA có DPA ở vị trí *sn*-2.

Các gen chuyển được đưa vào tế bào tái tổ hợp, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây cũng có thể mã hóa DGAT. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "diaxylglyxerol axyltransferaza" (EC 2.3,1.20; DGAT) được dùng để chỉ protein có tác dụng chuyển nhóm axyl béo từ axyl-CoA vào cơ chất diaxylglyxerol tạo ra triaxylglyxerol. Do đó, thuật ngữ "hoạt tính diaxylglyxerol axyltransferaza" được dùng để chỉ sự chuyển của axyl-CoA vào diaxylglyxerol để tạo ra triaxylglyxerol. Có ba dạng đã biết của DGAT tương ứng là DGAT1, DGAT2 và DGAT3. Polypeptit DGAT1 thường có 10 vùng qua màng, DGAT2 thường có 2 vùng qua màng, trong khi đó DGAT3 thường tan. Ví dụ về polypeptit DGAT1 bao gồm các polypeptit được mã hóa bằng gen DGAT1 từ *Aspergillus fumigatus* (Số hiệu lưu trữ 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), cũng như các thể biến

dị và đột biến của chúng. Ví dụ về polypeptit DGAT2 bao gồm các polypeptit được mã hóa bằng gen DGAT2 từ *Arabidopsis thaliana* (Số hiệu lưu trữ NP_566952), *Ricinus communis* (AAY16324), *Vernicia fordii* (ABC94474), *Mortierella ramanniana* (AAK84179), *Homo sapiens* (Q96PD7, Q58HT5), *Bos taurus* (Q70VD8), *Mus musculus* (AAK84175), *Micromonas* CCMP1545, cũng như các thể biến dị và đột biến của chúng. Ví dụ về polypeptit DGAT3 bao gồm các polypeptit được mã hóa bằng gen DGAT3 từ cây lạc (*Arachis hypogaea*, Saha, et al., 2006), cũng như các thể biến dị và đột biến của chúng.

Polypeptit/Peptit

Thuật ngữ "polypeptit" và "protein" thường được sử dụng thay cho nhau.

Polypeptit hoặc nhóm polypeptit có thể được xác định bởi độ đồng nhất (% độ đồng nhất) của trình tự axit amin của nó với trình tự axit amin đối chứng, hoặc có % độ đồng nhất với một trình tự axit amin đối chứng cao hơn so với với trình tự khác. % độ đồng nhất của polypeptit với trình tự axit amin đối chứng thường được xác định bằng phân tích GAP (Needleman và Wunsch, 1970; GCG progam) với các thông số của điểm phạt tạo GAP=5, và điểm phạt mở rộng GAP=0,3. Trình tự truy vấn có chiều dài ít nhất 15 axit amin, và phân tích GAP sắp thẳng hàng hai trình tự trên một vùng có ít nhất 15 axit amin. Tốt hơn nữa là, trình tự truy vấn có chiều dài ít nhất 50 axit amin, và phân tích GAP sắp thẳng hàng hai trình tự trên một vùng có chiều dài ít nhất 50 axit amin. Tốt hơn nữa là, trình tự truy vấn có chiều dài ít nhất 100 axit amin và phân tích GAP sắp thẳng hàng hai trình tự trên vùng có chiều dài ít nhất 100 axit amin. Còn tốt hơn nữa là, trình tự truy vấn có chiều dài ít nhất 250 axit amin và phân tích GAP sắp thẳng hàng hai trình tự trên vùng có chiều dài ít nhất 250 axit amin. Còn tốt hơn nữa là, phân tích GAP

sắp thẳng hàng hai trình tự trên toàn bộ chiều dài của chúng. Polypeptit hoặc nhóm các polypeptit có thể có cùng hoạt tính enzym, hoặc hoạt tính khác so với polypeptit đối chứng, hoặc không có hoạt tính. Tốt hơn là, polypeptit có hoạt tính enzym bằng ít nhất 10%, ít nhất 50%, ít nhất 75% hoặc ít nhất 90% hoạt tính của polypeptit đối chứng.

Như được sử dụng ở đây, đoạn có "hoạt tính sinh học" là phần của polypeptit được xác định ở đây có tác dùng duy trì hoạt tính xác định của polypeptit đối chứng có chiều dài đầy đủ, ví dụ có hoạt tính desaturaza và/hoặc elongaza hoặc hoạt tính enzym khác. Đoạn có hoạt tính sinh học như được sử dụng ở đây không phải là polypeptit có chiều dài đầy đủ. Đoạn có hoạt tính sinh học có thể là đoạn có kích thước bất kỳ miễn sao chúng duy trì được hoạt tính xác định. Tốt hơn là, đoạn có hoạt tính sinh học duy trì được ít nhất 10%, ít nhất 50%, ít nhất 75% hoặc ít nhất 90%, hoạt tính của protein chiều dài đầy đủ.

Liên quan đến polypeptit hoặc enzym đã xác định, biết được rằng các hệ số độ đồng nhất % cao hơn hệ số được nêu ở đây sẽ là các phương án được ưu tiên. Do đó, khi có thể áp dụng, khi nói đến hệ số độ đồng nhất % tối thiểu, được ưu tiên là polypeptit/enzym chứa trình tự axit amin ít nhất 60%, tốt hơn nữa là ít nhất 65%, tốt hơn nữa là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 76%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 91%, tốt hơn nữa là ít nhất 92%, tốt hơn nữa là ít nhất 93%, tốt hơn nữa là ít nhất 94%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 96%, tốt hơn nữa là ít nhất 97%, tốt hơn nữa là ít nhất 98%, tốt hơn nữa là ít nhất 99%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,1%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,2%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,3%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,4%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,5%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,6%, tốt

hơn nữa là ít nhất 99,7%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,8%, và tốt hơn nữa là ít nhất 99,9% đồng nhất với SEQ ID NO có liên quan được lựa chọn.

Thể biến dị/thể đột biến trình tự axit amin của polypeptit được nêu ở đây có thể được điều chế bằng cách đưa các thay đổi nucleotit thích hợp vào axit nucleic nêu ở đây, hoặc bằng cách tổng hợp *in vitro* polypeptit mong muốn. Thể biến dị/thể đột biến này bao gồm, ví dụ, đoạn xóa, đoạn xen hoặc đoạn thế chứa các gốc nằm trong trình tự axit amin. Có thể kết hợp đoạn xóa, đoạn xen và đoạn thế để tạo ra cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là sản phẩm peptit cuối cùng có hoạt tính enzym mong muốn.

Peptit đột biến (biến đổi) có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, polynucleotit nêu ở đây có thể được đưa vào kỹ thuật đột biến gen *in vitro* hoặc kỹ thuật xáo trộn ADN như đã được mô tả rộng rãi bởi Harayama (1998). Các sản phẩm được tạo ra từ ADN đột biến/biến đổi có thể được sàng lọc dễ dàng bởi các kỹ thuật đã được mô tả ở đây để xác định, ví dụ, liệu chúng có hoạt tính desaturaza hoặc elongaza hay không.

Khi thiết kế thể đột biến trình tự axit amin, việc định vị vị trí đột biến và bản chất của đột biến sẽ phụ thuộc vào các đặc điểm cần được điều chỉnh. Các vị trí đột biến có thể được điều chỉnh riêng biệt hoặc hàng loạt, ví dụ, bằng cách (1) đầu tiên thế bằng các lựa chọn axit amin bảo tồn và sau đó bằng nhiều lựa chọn cơ bản hơn phụ thuộc vào kết quả thu được, (2) xóa các gốc đích, hoặc (3) xen các gốc khác vào gần kề với vị trí đã được định vị.

Đoạn xóa trình tự axit amin thường nằm trong khoảng từ 1 đến 15 gốc, tốt hơn nữa là từ 1 đến 10 gốc và thường là từ khoảng 1 đến 5 gốc liền kề.

Các đột biến đoạn thế có ít nhất một gốc axit amin trong phân tử polypeptit bị loại và gốc khác được xen vào vị trí này. Các vị trí được quan tâm nhất trong kỹ thuật đột biến đoạn thế bao gồm các vị trí không được bảo

tồn trong số các desaturaza hoặc elongaza có trong tự nhiên. Tốt hơn là, các vị trí này được thế theo cách bảo tồn tương đối để giữ được hoạt tính enzym. Các đoạn thế bảo tồn như vậy được thể hiện trong Bảng 3 dưới tiêu đề "các đoạn thế làm ví dụ".

Theo một phương án được ưu tiên, polypeptit đột biến/biến thể chỉ có, hoặc không có quá, một hoặc hai hoặc ba hoặc bốn thay đổi axit amin bảo tồn so với polypeptit có trong tự nhiên. Chi tiết về các thay đổi axit amin bảo tồn được cung cấp trong Bảng 3. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ, các thay đổi nhỏ như vậy có thể được dự đoán hợp lý là không làm thay đổi hoạt tính của polypeptit khi được biểu hiện trong các tế bào tái tổ hợp.

Bảng 3. Đoạn thế axit amin lấy làm ví dụ

Gốc ban đầu	Đoạn thế lấy làm ví dụ
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)	pro, 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

Polynucleotit

Sáng chế cũng mô tả ở đây việc sử dụng polynucleotit, ví dụ, có thể là gen, polynucleotit phân tách, cấu trúc gen khảm như phân tử T-ADN, hoặc ADN khảm. Nó có thể là ADN hoặc ARN của dòng gốc của hệ gen hoặc dòng gốc tổng hợp, sợi kép hoặc sợi đơn, và kết hợp với carbohydrat, lipit, protein hoặc nguyên liệu khác để thực hiện hoạt động cụ thể được xác định ở đây. Ở đây, thuật ngữ "polynucleotit" được sử dụng thay thế với thuật ngữ "phân tử axit nucleic".

Theo một phương án, polynucleotit không có sẵn trong tự nhiên. Ví dụ về polynucleotit không có sẵn trong tự nhiên bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các polynucleotit đã được đột biến (như bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây), và polynucleotit trong đó khung đọc mở mã hóa protein được liên kết hoạt động với gen khởi đầu mà nó không được liên kết trong tự nhiên (như trong các cấu trúc được mô tả ở đây).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gen" được đưa vào với ý nghĩa rộng nhất của nó và bao gồm các trình tự deoxyribonucleotit chứa vùng được phiên mã và, nếu được dịch mã, vùng mã hóa protein, của gen cấu trúc và bao gồm các trình tự được đặt sát với vùng mã hóa trên cả đầu 5' và 3' với khoảng cách ít nhất là khoảng 2kb trên cả đầu này hoặc đầu kia và liên quan đến sự biểu hiện gen. Về vấn đề này, gen này bao gồm các trình tự tín hiệu kiểm soát như trình tự khởi đầu, trình tự tăng cường, trình tự tín hiệu kết thúc và/hoặc trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thường đi cùng với gen đã cho, hoặc các trình tự tín hiệu kiểm soát khác loại, trong trường hợp này gen sẽ được

gọi là "gen khảm". Các trình tự này được đặt ở đầu 5' của vùng mã hóa protein và có mặt trên mARN được gọi là các trình tự 5' không dịch mã. Trình tự được đặt ở đầu 3' hoặc xuôi dòng của vùng mã hóa protein và có mặt trên mARN được gọi là trình tự 3' không dịch mã. Thuật ngữ "gen" bao gồm cả cADN và dạng hệ gen của gen. Dạng hệ gen hoặc dòng vô tính của gen chứa vùng mã hóa có thể bị ngắt quãng bởi các trình tự không mã hóa có tên là "intron" hoặc "vùng xen" hoặc "trình tự xen". Các intron là các đoạn gen được phiên mã vào trong ARN nhân (hnARN). Intron có thể chứa các yếu tố điều hòa như gen tăng cường. Intron được tách riêng ra hoặc "cắt ra" khỏi bản sao trong nhân hoặc bản sao sơ bộ; do đó các intron là không có trong bản sao ARN thông tin (mARN). mARN hoạt động trong quá trình dịch mã để xác định rõ trình tự hoặc thứ tự của axit amin trong polypeptit mới sinh. Thuật ngữ "gen" bao gồm phân tử tổng hợp hoặc dung hợp mã hóa tất cả hoặc một phần các protein được mô tả ở đây và trình tự nucleotit bổ trợ với trình tự bất kỳ nêu trên.

Như được sử dụng ở đây, "ADN khảm" hoặc "cấu trúc gen khảm" được dùng để chỉ phân tử ADN bất kỳ không phải là phân tử ADN tự nhiên ở vị trí tự nhiên của nó, ở đây cũng được gọi là "cấu trúc ADN". Thông thường, ADN khảm hoặc gen khảm chứa các trình tự điều hòa và phiên mã hoặc trình tự mã hóa protein mà không được thấy là được liên kết hoạt động cùng nhau trong tự nhiên, tức là chúng là khác loại với nhau. Theo đó, ADN khảm hoặc gen khảm có thể chứa các trình tự điều hòa và trình tự mã hóa được tạo ra từ các nguồn khác nhau, hoặc trình tự điều hòa và trình tự mã hóa được tạo ra từ cùng một nguồn, nhưng sắp xếp theo cách khác như được tìm thấy trong tự nhiên.

"Gen nội sinh" được dùng để chỉ một gen tự nhiên ở vị trí tự nhiên của chúng trong hệ gen của một sinh vật. Như được sử dụng ở đây, "phân tử axit

nucleic tái tổ hợp", "polynucleotit tái tổ hợp" hoặc cách diễn đạt khác của chúng được dùng để chỉ phân tử axit nucleic đã được xây dựng cấu trúc hoặc biến đổi bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Thuật ngữ "polynucleotit ngoại lai" hoặc "polynucleotit ngoại sinh" hoặc "polynucleotit khác loại" và các thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ axit nucleic bất kỳ được đưa vào trong hệ gen của tế bào bằng phương pháp thí nghiệm. Gen ngoại lai hoặc ngoại sinh có thể là các gen được xen vào trong sinh vật không nguyên thể, gen nguyên thể đưa vào một vị trí mới trong vật chủ nguyên thể, hoặc gen khảm. "Gen chuyển" là gen đã được đưa vào trong hệ gen bằng quy trình biến nạp. Thuật ngữ "biến đổi di truyền", "chuyển gen" và cách diễn đạt khác của chúng bao gồm việc đưa các gen vào trong tế bào bằng cách biến nạp hoặc tải nạp, gây đột biến gen trong các tế bào và biến đổi hoặc điều biến quá trình điều hòa gen trong tế bào hoặc sinh vật mà các tác động này được thực hiện hoặc trong thế hệ con của chúng. "Vùng hệ gen" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ vị trí nằm trong hệ gen trong đó gen chuyển, hoặc nhóm các gen chuyển (cũng được gọi là cụm gen), đã được xen vào trong tế bào, hoặc dạng tiền thân của nó. Các vùng này chỉ chứa các nucleotit đã được đưa vào bởi sự can thiệp của con người như bằng các phương pháp được mô tả ở đây.

Thuật ngữ "ngoại sinh" trong ngữ cảnh của polynucleotit được dùng để chỉ polynucleotit khi có mặt trong tế bào với lượng biến đổi so với trạng thái nguyên thể của nó. Theo một phương án, tế bào này là tế bào không phải tự nhiên chứa polynucleotit này. Tuy nhiên, tế bào này có thể là tế bào chứa polynucleotit không phải là nội sinh gây ra biến đổi lượng sản sinh polypeptit đã mã hóa. Polynucleotit ngoại sinh bao gồm polynucleotit chưa được tách khỏi các thành phần khác của tế bào chuyển gen (tái tổ hợp), hoặc hệ biểu hiện không chứa tế bào, trong đó nó có mặt, và polynucleotit được tạo ra trong các tế bào này hoặc hệ không chứa tế bào này mà sau đó được tinh chế ra khỏi ít nhất một số thành phần khác. Polynucleotit ngoại sinh (axit nucleic)

có thể là sợi duỗi kế tiếp của các nucleotit có trong tự nhiên, hoặc chứa hai hoặc nhiều sợi duỗi kế tiếp của các nucleotit từ các nguồn khác nhau (có trong tự nhiên và/hoặc tổng hợp) được liên kết để tạo ra polynucleotit đơn lẻ. Thông thường, polynucleotit khảm như vậy chứa ít nhất một khung đọc mở mã hóa polypeptit được liên kết hoạt động với gen khởi đầu thích hợp để điều khiển sự phiên mã của khung đọc mở này trong tế bào quan tâm.

Đối với polynucleotit đã xác định, biết được rằng độ đồng nhất tính theo % cao hơn những hệ số đã nêu trên sẽ là phương án được ưu tiên. Do đó, khi có thể áp dụng, khi nói đến độ đồng nhất tính theo % tối thiểu, thì được ưu tiên là polynucleotit chứa trình tự polynucleotit ít nhất 60%, tốt hơn nữa là ít nhất 65%, tốt hơn nữa là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 91%, tốt hơn nữa là ít nhất 92%, tốt hơn nữa là ít nhất 93%, tốt hơn nữa là ít nhất 94%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 96%, tốt hơn nữa là ít nhất 97%, tốt hơn nữa là ít nhất 98%, tốt hơn nữa là ít nhất 99%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,1%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,2%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,3%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,4%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,5%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,6%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,7%, tốt hơn nữa là ít nhất 99,8%, và tốt hơn nữa là ít nhất 99,9% đồng nhất với SEQ ID NO có liên quan được chọn.

Polynucleotit có thể có, khi được so sánh với các phân tử có trong tự nhiên, một hoặc nhiều đột biến là đoạn xóa, đoạn xen, hoặc đoạn thế của gốc nucleotit. Polynucleotit có các đột biến so với trình tự đối chứng hoặc là có trong tự nhiên (nghĩa là được phân tách từ nguồn tự nhiên) hoặc tổng hợp (ví dụ, bằng cách thực hiện phép đột biến gen trực tiếp tại vị trí hoặc kỹ thuật xáo trộn ADN trên axit nucleic như mô tả ở trên). Do đó, rõ ràng là polynucleotit theo sáng chế hoặc là có thể từ nguồn gốc có trong tự nhiên hoặc có thể là tái

tổ hợp. Polynucleotit được ưu tiên là các polynucleotit có các vùng mã hóa được tối ưu hóa theo codon để dịch mã trong tế bào thực vật, như đã biết trong lĩnh vực này.

Vectơ tái tổ hợp

Sự biểu hiện tái tổ hợp có thể được sử dụng để tạo ra tế bào tái tổ hợp, hoặc cây hoặc các bộ phận của cây theo sáng chế. Vectơ tái tổ hợp chứa trình tự polynucleotit khác loại, đó là, trình tự polynucleotit không có trong tự nhiên bên cạnh phân tử polynucleotit được xác định ở đây, mà tốt hơn là chúng có nguồn gốc từ loài khác với loài có (các) phân tử polynucleotit này bắt nguồn từ đó. Vectơ có thể hoặc là ARN hoặc là ADN và thông thường là plasmit. Vectơ plasmit thường chứa các trình tự axit nucleic bổ sung để lựa chọn, khuếch đại, và biến nạp dễ dàng cátxét biểu hiện trong tế bào chưa có nhân chuẩn, ví dụ, vectơ có nguồn gốc từ pUC, vectơ có nguồn gốc từ pSK, vectơ có nguồn gốc từ pGEM, vectơ có nguồn gốc từ pSP, vectơ có nguồn gốc từ pBS, hoặc tốt hơn là vectơ kép chứa một hoặc nhiều vùng T-ADN. Trình tự axit nucleic bổ sung bao gồm các dòng gốc sao chép để tự sao chép vectơ, gen đánh dấu chọn lọc, tốt hơn là mã hóa tính kháng kháng sinh hoặc thuốc diệt cỏ, các vị trí đa tách dòng đơn nhất mang lại nhiều vị trí để xen trình tự axit nucleic hoặc gen được mã hóa vào trong cấu trúc axit nucleic, và các trình tự tăng cường biến nạp của tế bào nhân sơ và nhân chuẩn (đặc biệt là thực vật). Vectơ tái tổ hợp có thể chứa nhiều hơn một polynucleotit đã được xác định ở đây, ví dụ ba, bốn, năm hoặc sáu polynucleotit đã được xác định ở đây kết hợp, tốt hơn là cấu trúc gen khảm được mô tả ở đây, mỗi polynucleotit được liên kết hoạt động với trình tự điều khiển biểu hiện có thể hoạt động trong tế bào quan tâm. Tốt hơn là, các trình tự điều khiển biểu hiện bao gồm, hoặc là tất cả, các gen khởi đầu khác loại, nghĩa là khác loại về vùng mã hóa chúng điều khiển. Nhiều hơn một polynucleotit đã được xác

định ở đây, ví dụ 3, 4, 5 hoặc 6 polynucleotit, tốt hơn là 7 hoặc 8 polynucleotit, mỗi polynucleotit mã hóa một polypeptit khác, được liên kết đồng hóa trị với nhau trong vectơ tái tổ hợp duy nhất, tốt hơn là trong một phân tử T-ADN duy nhất, phân tử này sau đó có thể được đưa dưới dạng phân tử duy nhất vào trong tế bào để tạo ra tế bào tái tổ hợp theo sáng chế, và tốt hơn là được hợp nhất vào hệ gen của tế bào tái tổ hợp, ví dụ ở cây biến đổi gen. Việc hợp nhất vào hệ gen có thể là vào hệ gen của nhân hoặc vào hệ gen lạp thể trong cây chuyển gen. Bằng cách đó, polynucleotit được nối như vậy sẽ cùng nhau được thừa hưởng locut gen duy nhất trong thế hệ con của tế bào hoặc cây tái tổ hợp. Vectơ hoặc cây tái tổ hợp có thể chứa hai hoặc nhiều vectơ tái tổ hợp, mỗi vectơ chứa nhiều polynucleotit, ví dụ trong đó mỗi vectơ tái tổ hợp chứa 3, 4, 5 hoặc 6 polynucleotit.

"Liên kết hoạt động" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ mối liên hệ chức năng giữa hai hoặc nhiều đoạn axit nucleic (ví dụ, ADN). Thông thường, nó được dùng để chỉ mối liên hệ chức năng của yếu tố điều hòa phiên mã (gen khởi đầu) với trình tự được phiên mã. Ví dụ, gen khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa, như polynucleotit đã được xác định ở đây, nếu nó kích thích hoặc điều hòa sự phiên mã của trình tự mã hóa trong tế bào thích hợp. Nói chung, các yếu tố điều hòa phiên mã gen khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự được phiên mã liền kề về mặt vật lý với trình tự được phiên mã, nghĩa là, chúng hoạt động *cis*. Tuy nhiên, một số yếu tố điều hòa phiên mã, như gen tăng cường, cần phải không liền kề về mặt vật lý hoặc không đặt gần với trình tự mã hóa có sự phiên mã mà chúng gia tăng.

Khi có mặt nhiều gen khởi đầu, mỗi gen khởi đầu có thể giống hoặc khác nhau một cách độc lập. Tốt hơn là, ít nhất 3 và tới tối đa 6 trình tự gen khởi đầu khác nhau được sử dụng trong vectơ tái tổ hợp để điều khiển sự biểu hiện của polynucleotit ngoại sinh.

Các phân tử tái tổ hợp như ADN khảm hoặc cấu trúc gen cũng có thể chứa (a) một hoặc nhiều trình tự tín hiệu tiết mã hóa trình tự peptit tín hiệu, cho phép polypeptit biểu hiện như được xác định ở đây được tiết ra từ tế bào sinh ra polypeptit này hoặc chúng cung cấp cho việc định vị của polypeptit biểu hiện, ví dụ để giữ polypeptit trong lưới nội bào (ER: endoplasmic reticulum) trong tế bào hoặc chuyển vào lạp thể, và/hoặc (b) chứa trình tự dung hợp dẫn đến sự biểu hiện phân tử axit nucleic dưới dạng protein dung hợp. Ví dụ về các đoạn trình tự tín hiệu thích hợp bao gồm đoạn trình tự tín hiệu bất kỳ có khả năng điều khiển sự tiết hoặc định vị của polypeptit đã được xác định ở đây. Các phân tử tái tổ hợp cũng có thể bao gồm các trình tự can thiệp và/hoặc trình tự không được dịch mã xung quanh và/hoặc nằm trong trình tự axit nucleic của phân tử axit nucleic đã được xác định ở đây.

Để tạo điều kiện thuật lợi xác định thể biến nạp, cấu trúc axit nucleic mong muốn bao gồm gen đánh dấu có thể chọn được hoặc sàng lọc được, hoặc ngoài chúng ra, là polynucleotit ngoại lai hoặc ngoại sinh. "Gen đánh dấu" có nghĩa là gen truyền phenotip khác biệt cho tế bào biểu hiện gen đánh dấu này và do đó cho phép các tế bào đã biến nạp được phân biệt với các tế bào không có gen đánh dấu này. Gen đánh dấu có thể chọn được có đặc điểm là có thể "lựa chọn" dựa trên tính kháng với tác nhân chọn lọc (ví dụ, thuốc diệt cỏ, kháng sinh, tia xạ, nhiệt, hoặc các phương thức xử lý khác có hại cho tế bào không được gây biến nạp). Gen đánh dấu có thể sàng lọc được (hoặc là gen thông báo) có đặc điểm là có thể nhận dạng thông qua việc quan sát hoặc kiểm tra, nghĩa là, bằng cách "sàng lọc" (ví dụ, β-glucuronidaza, luxiferaza, GFP hoặc enzym hoạt tính khác không có trong tế bào không được gây biến nạp). Gen đánh dấu và trình tự nucleotit quan tâm không cần phải được liên kết. Việc lựa chọn thực tế gen đánh dấu là không bắt buộc miễn sao nó có chức năng (tức là, có tính chọn lọc) phối hợp với các tế bào được chọn như tế bào thực vật.

Ví dụ về gen đánh dấu có thể chọn được là các gen đánh dấu mang tính kháng kháng sinh như kháng ampixilin, erythromyxin, cloramphenicol hoặc tetraxyclin, tốt hơn là kháng kanamyxin. Các gen đánh dấu có thể chọn được lấy làm ví dụ để lựa chọn thể biến nạp thực vật bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, gen *hyg* mã hóa tính kháng B hygromyxin; gen neomyxin phosphotransferaza (*nptII*) mang tính kháng kanamyxin, paromomyxin, G418; gen glutathion-S-transferaza từ gan chuột đồng mang tính kháng glutathion có nguồn gốc từ thuốc diệt cỏ, ví dụ, được mô tả trong EP 256223; gen glutamin synthetaza, khi quá biểu hiện, mang tính kháng chất ức chế glutamin synthetaza như phosphinothrixin, ví dụ, như được mô tả trong WO 87/05327, gen axetyltransferaza từ *Streptomyces viridochromogenes* mang tính kháng tác nhân chọn lọc phosphinothrixin, ví dụ, như được mô tả trong EP 275957, gen mã hóa 5-enolshikimat-3-phosphat synthaza (EPSPS) mang tính dung nạp N-phosphonometylglyxin, ví dụ, như được mô tả bởi Hinchee et al. (1988), hoặc tốt hơn là gen *bar* mang tính kháng bialaphos, ví dụ, như được mô tả trong WO91/02071.

Tốt hơn là, cấu trúc axit nucleic được sát nhập ổn định vào trong hệ gen của tế bào, như tế bào thực vật. Do đó, axit nucleic có thể chứa các yếu tố thích hợp cho phép phân tử này được hợp nhất vào hệ gen, tốt hơn là trình tự biên phải và biên trái của phân tử T-ADN, hoặc cấu trúc này được đặt vào trong vectơ thích hợp mà có thể được hợp nhất vào nhiễm sắc thể của tế bào.

Biểu hiện

Như được sử dụng ở đây, vectơ biểu hiện là vectơ ADN có khả năng gây biến nạp tế bào chủ và biểu hiện hiệu quả một hoặc nhiều phân tử polynucleotit xác định. Vectơ biểu hiện được ưu tiên của sáng chế có thể điều khiển quá trình biểu hiện gen ở nấm men và/hoặc tế bào thực vật. Vectơ biểu hiện có thể được sử dụng theo sáng chế chứa các trình tự điều hòa như trình

tự kiểm soát phiên mã, trình tự kiểm soát dịch mã, dòng gốc sao chép, và các trình tự điều hòa khác tương thích với tế bào tái tổ hợp và kiểm soát sự biểu hiện của các phân tử polynucleotit theo sáng chế. Cụ thể, polynucleotit hoặc vectơ có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm trình tự kiểm soát phiên mã. Trình tự kiểm soát phiên mã là các trình tự kiểm soát quá trình khởi đầu, kéo dài mạch, và kết thúc phiên mã. Trình tự kiểm soát phiên mã đặc biệt quan trọng là các trình tự kiểm soát quá trình khởi đầu phiên mã, như trình gen khởi đầu và trình tự gen tăng cường. Trình tự kiểm soát phiên mã thích hợp bao gồm trình tự kiểm soát phiên mã bất kỳ có thể hoạt động trong ít nhất một trong số các tế bào tái tổ hợp theo sáng chế. Việc lựa chọn trình tự điều hòa được sử dụng phụ thuộc vào sinh vật đích như cây và/hoặc cơ quan đích hoặc mô đích được quan tâm. Các trình tự điều hòa như vậy có thể thu được từ sinh vật nhân chuẩn như thực vật hoặc virut thực vật, hoặc có thể được tổng hợp hóa học. Nhiều trình tự kiểm soát phiên mã như vậy là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Trình tự kiểm soát phiên mã được ưu tiên đặc biệt là gen khởi đầu hoạt động trong việc điều khiển sự phiên mã ở thực vật, đặc hiệu cấu trúc hoặc đặc hiệu giai đoạn và/hoặc đặc hiệu mô, phụ thuộc vào việc sử dụng thực vật hoặc các phần của nó.

Một số vectơ thích hợp để biến nạp ổn định tế bào thực vật hoặc để tạo ra cây chuyển gen đã được mô tả, ví dụ, trong Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987; Weissbach và Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; và Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990. Thông thường, vectơ biểu hiện của thực vật bao gồm, ví dụ, một hoặc nhiều gen thực vật được tách dòng dưới sự kiểm soát phiên mã của trình tự điều hòa 5' và 3' và gen đánh dấu chọn lọc tính trội. Vectơ biểu hiện của thực vật cũng chứa vùng điều hòa gen khởi đầu (ví dụ, vùng điều hòa kiểm soát quá trình

biểu hiện cảm ứng hoặc quá trình biểu hiện cấu trúc, được điều hòa bởi môi trường hoặc bởi phát triển, hoặc đặc hiệu tế bào hoặc đặc hiệu mô), vị trí bắt đầu khởi đầu phiên mã, vị trí gắn kết ribosom, trình tự tín hiệu xử lý ARN, vị trí kết thúc phiên mã, và/hoặc tín hiệu polyadenyl hóa.

Một số gen khởi đầu cấu trúc hoạt động trong tế bào thực vật đã được mô tả. Gen khởi đầu thích hợp để biểu hiện cấu trúc ở thực vật bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, gen khởi đầu 35S virut gây bệnh khảm trên súp lơ (CaMV), 35S của virut gây bệnh khảm Figwort (FMV), gen khởi đầu cảm ứng với ánh sáng từ tiểu đơn vị nhỏ của ribuloza-1,5-bis-phosphat carboxylaza.

Với mục đích biểu hiện trong các nguồn mô của thực vật, như là lá, hạt, rễ hoặc thân, được ưu tiên là gen khởi đầu sử dụng theo sáng chế có mức biểu hiện tương đối cao trong các mô cụ thể này. Nhiều ví dụ đã được biết đến trong lĩnh vực này. Nhiều gen khởi đầu thực vật được điều hòa đáp ứng với các tín hiệu môi trường, hormon, hóa học, và/hoặc phát triển, cũng có thể được sử dụng để biểu hiện gen ở tế bào thực vật hoặc cũng có thể là có lợi khi sử dụng các gen khởi đầu đặc hiệu cơ quan

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gen khởi đầu đặc hiệu hạt" hoặc cách diễn đạt khác được dùng để chỉ gen khởi đầu, so với các mô cây khác, ưu tiên điều khiển sự phiên mã gen ở các hạt đang phát triển của cây, tốt hơn là cây *Brassica sp.*, *Camelina sativa* hoặc *G. max*. Theo một phương án, gen khởi đầu đặc hiệu hạt được biểu hiện mạnh hơn ít nhất là 5 lần trong hạt đang phát triển của cây so với lá và/hoặc thân cây, và tốt hơn là được biểu hiện mạnh hơn trong phôi của hạt đang phát triển so với các mô cây khác. Tốt hơn là, gen khởi đầu chỉ điều khiển quá trình biểu hiện của gen quan tâm trong hạt đang phát triển, và/hoặc biểu hiện gen quan tâm ở các bộ phận khác của cây như lá sẽ không phát hiện được bởi phân tích thẩm tách Northern blot và/hoặc

RT-PCR. Thông thường, gen khởi đầu điều khiển quá trình biểu hiện gen trong quá trình phát triển và tăng trưởng của hạt, cụ thể là trong pha tổng hợp và tích lũy của các hợp chất được trữ trong hạt. Gen khởi đầu này có thể điều khiển quá trình biểu hiện gen trong toàn bộ cơ quan trữ của thực vật hoặc chỉ bộ phận của nó như vỏ hạt, hoặc lá mầm, tốt hơn là trong phôi, trong hạt của cây hai lá mầm hoặc nội nhũ hoặc lớp hạt aloron của hạt cây một lá mầm.

Gen khởi đầu được ưu tiên để biểu hiện đặc hiệu hạt bao gồm i) gen khởi đầu từ gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp axit béo và tích lũy trong hạt, như desaturaza và elongaza của axit béo, ii) gen khởi đầu từ gen mã hóa protein lưu trữ trong hạt, và iii) gen khởi đầu từ gen mã hóa enzym có vai trò trong sinh tổng hợp carbohydrat và tích lũy trong hạt. Gen khởi đầu đặc hiệu hạt thích hợp là gen khởi đầu napin của cây cải dầu (US5,608,152), gen khởi đầu *Vicia faba* USP (Baumlein et al., 1991), gen khởi đầu *Arabidopsis* oleosin (WO98/45461), gen khởi đầu *Phaseolus vulgaris* phaseolin (US5,504,200), gen khởi đầu *Brassica* Bce4 (WO91/13980) hoặc gen khởi đầu Legumin LeB4 từ *Vicia faba* (Baumlein et al., 1992), và gen khởi đầu dẫn đến sự biểu hiện đặc hiệu hạt trong các cây một lá mầm như ngô, lúa mạch, lúa mỳ, lúa mạch đen, lúa và các cây tương tự. Gen khởi đầu đáng chú ý thích hợp là gen khởi đầu (lpt2 hoặc lpt1 của cây lúa mạch WO95/15389 và WO95/23230) hoặc gen khởi đầu được mô tả trong WO99/16890 (gen khởi đầu từ gen hordein của cây lúa mạch, gen glutelin của cây lúa, gen oryzin của cây lúa, gen prolamin của cây lúa, gen gliadin của cây lúa mỳ, gen glutelin của cây lúa mỳ, gen zein của cây ngô, gen glutelin của cây yến mạch, gen kasirin của cây lúa miến, gen secalin của cây lúa mạch đen). Các gen khởi đầu khác bao gồm các gen khởi đầu được mô tả bởi Broun et al. (1998), Potenza et al. (2004), US20070192902 và US20030159173. Theo một phương án, gen khởi đầu đặc hiệu hạt được biểu hiện ưu tiên trong các phần xác định của hạt như phôi, (các) lá mầm hoặc nội nhũ. Ví dụ về các

gen khởi đầu đặc hiệu như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen khởi đầu FP1 (Ellerstrom et al., 1996), gen khởi đầu legumin của cây đậu hà lan (Perrin et al., 2000), gen khởi đầu ngưng kết tố hồng cầu thực vật của cây đậu (Perrin et al., 2000), gen khởi đầu conlinin 1 và conlinin 2 của các gen mã hóa protein sự trữ 2S của cây lanh (Cheng et al., 2010), gen khởi đầu của gen FAE1 từ *Arabidopsis thaliana*, gen khởi đầu BnGLP của gen protein giống globulin của *Brassica napus*, gen khởi đầu LPXR của gen peroxiredoxin từ *Linum usitatissimum*.

Trình tự dẫn không được dịch mã 5' có thể được tạo ra từ gen khởi đầu được lựa chọn để biểu hiện trình tự gen khác loại của polynucleotit theo sáng chế, hoặc tốt hơn là khác loại với vùng mã hóa của enzym được tạo ra, và có thể được biến đổi theo cách cụ thể nếu muốn miễn sao làm tăng sự dịch mã mARN. Về việc tối ưu hóa sự biểu hiện của các gen chuyển, xem Koziel et al. (1996). Cũng có thể thu được các vùng không được dịch mã 5' từ ARN của virut thực vật (virut khảm thuốc lá, virut gây bệnh kỵ axit thuốc lá, virut gây bệnh khảm lùn ở ngô, virut khảm cỏ linh lăng, trong số các virut khác) từ gen của nhân chuẩn thích hợp, gen thực vật (gen dẫn đầu protein gắn kết diệp lục a/b của lúa mỳ và ngô), hoặc từ trình tự gen tổng hợp. Sáng chế không giới hạn ở các cấu trúc trong đó vùng không được dịch mã có nguồn gốc từ trình tự không được dịch mã 5' đi cùng với trình tự gen khởi đầu. Trình tự dẫn đầu cũng có thể có nguồn gốc từ trình tự gen khởi đầu không liên quan hoặc trình tự mã hóa. Trình tự dẫn đầu có thể được sử dụng trong phạm vi sáng chế bao gồm gen dẫn đầu Hsp70 (US5,362,865 và US5,859,347), và yếu tố TMV omega.

Việc kết thúc phiên mã được thực hiện bởi trình tự ADN không được dịch mã 3' được liên kết hoạt động trong vectơ khảm của polynucleotit quan tâm. Vùng tín hiệu không được dịch mã 3' của phân tử ADN tái tổ hợp chứa

trình tự polyadenyl hóa có chức năng ở thực vật gây bổ sung các adenylat nucleotit vào đầu 3' của ARN. Có thể thu được vùng không được dịch mã 3' từ các gen khác nhau được biểu hiện trong tế bào thực vật. Vùng không được dịch mã 3' của nopalin synthaza, vùng không được dịch mã 3' từ gen Rubisco tiểu đơn vị nhỏ của cây đậu hà lan, vùng không được dịch mã 3' từ gen protein lưu trữ trong hạt đậu nành 7S hoặc gen conlinin của cây lanh thường được sử dụng trong khả năng này. Vùng được phiên mã, không được dịch mã 3', chứa trình tự tín hiệu polyadenylat của gen plasmit *Agrobacterium* gây khối u (Ti: Turmor-inducing) cũng là thích hợp.

Các kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể được sử dụng để cải thiện mức biểu hiện của phân tử polynucleotit đã được biến nạp bằng cách điều khiển, ví dụ, số lượng bản sao của phân tử polynucleotit trong tế bào chủ, hiệu suất mà các phân tử polynucleotit này được phiên mã, hiệu suất mà các sản phẩm phiên mã tạo ra được dịch mã, và hiệu suất của các sửa đổi sau dịch mã. Các kỹ thuật tái tổ hợp có thể được sử dụng để làm tăng sự biểu hiện của các phân tử polynucleotit ở đây bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sự hợp nhất của phân tử polynucleotit vào trong một hoặc nhiều nhiễm sắc thể của tế bào chủ, bổ sung trình tự ổn định vào mARN, thay thế hoặc sửa đổi trình tự tín hiệu kiểm soát phiên mã (ví dụ, gen khởi đầu, gen chỉ huy, gen tăng cường), thay thế hoặc sửa đổi trình tự tín hiệu kiểm soát dịch mã (ví dụ, vị trí gắn kết ribosom, trình tự Shine-Dalgarno), sửa đổi phân tử polynucleotit để tương ứng với việc sử dụng codon của tế bào chủ, và xóa trình tự làm mất ổn định sản phẩm phiên mã.

<u>Cây chuyển gen</u>

Thuật ngữ "cây" như được sử dụng ở đây là một danh từ chỉ toàn bộ cây, nhưng khi sử dụng như một tính từ được dùng để chỉ một dạng vật chất có trong, thu được từ, có nguồn gốc từ, hoặc có liên quan đến cây, ví dụ như,

một bộ phận của cây (ví dụ lá, thân, rễ, hoa), tế bào riêng lẻ (ví dụ phấn hoa), hạt, tế bào thực vật và tương tự. Thuật ngữ "bộ phận của cây" được dùng để chỉ tất cả các phần của cây bao gồm ADN của cây, kể cả các cấu trúc sinh dưỡng, ví dụ, như lá hoặc thân, rễ, bộ phận hoặc cấu trúc hoa, phấn hoa, hạt, các phần của hạt như phôi, nội nhũ, vảy hoặc vỏ hạt, mô của cây ví dụ, như mô mạch, tế bào và thế hệ con của chúng, miễn sao bộ phận của cây này tổng hợp lipit theo sáng chế.

"Cây chuyển gen", "cây biến đổi di truyền" hoặc cách diễn đạt khác của chúng được dùng để chỉ cây chứa cấu trúc gen ("gen chuyển") không tìm thấy được ở cây kiểu dại cùng loài, giống hoặc cây trồng. Cây chuyển gen như được xác định trong phạm vi sáng chế bao gồm cây và thế hệ con của chúng đã được biến đổi di truyền bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp để tạo ra lipit hoặc ít nhất một polypeptit được xác định ở đây trong cây hoặc bộ phận của cây mong muốn. Tế bào thực vật chuyển gen và bộ phận của cây chuyển gen có ý nghĩa tương đương. "Gen chuyển" như được nhắc đến ở đây có ý nghĩa thông thường trong lĩnh vực công nghệ sinh học và bao gồm trình tự gen đã được tạo ra hoặc biến đổi bởi kỹ thuật ADN hoặc ARN tái tổ hợp và được đưa vào trong tế bào của cây. Gen chuyển có thể bao gồm các trình tự gen có nguồn gốc từ tế bào của cây mà có thể là cùng loài, giống hoặc cây trồng như tế bào của cây mà gen chuyển được đưa vào đó hoặc khác loài, giống hoặc cây trồng, hoặc từ tế bào không phải tế bào của cây. Thông thường, gen chuyển đã đưa vào tế bào, như tế bào của cây, bằng các thao tác do con người thực hiện, ví dụ, như bằng cách biến nạp nhưng có thể sử dụng phương pháp bất kỳ mà các người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Thuật ngữ "hạt" và "hột" được sử dụng thay thế cho nhau. "Hạt" được dùng để chỉ hạt già như hạt đã được thu hoạch hoặc hạt vẫn còn trên cây

nhưng đã sẵn sàng để thu hoạch, nhưng cũng có thể được dùng để chỉ hạt sau khi hút ẩm hoặc nảy mầm, theo bản mô tả. Hạt hoặc hột già thường có hàm lượng ẩm thấp hơn khoảng 18-20%, tốt hơn là thấp hơn 10%. Hạt cải Brassica như hạt canola thường có hàm lượng ẩm khoảng 4-8% hoặc 6-8% khi già, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4 đến 6%. "Hạt đang phát triển" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ hạt trước khi già, thường được phát hiện trong các cấu trúc sinh sản của cây sau khi thụ phấn hoặc nở hoa, nhưng cũng có thể được dùng để chỉ các hạt trước khi già được tách ra từ cây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thu nhận bộ phận của cây" hoặc "thu nhận hạt" được dùng để chỉ cách thức bất kỳ để thu được bộ phận của cây hoặc hạt, lần lượt, bao gồm thu hoạch bộ phận của cây hoặc hạt từ cây trên cánh đồng hoặc trong nơi chứa như nhà kính hoặc buồng phát triển, hoặc bằng cách mua hoặc nhận từ nhà cung cấp các bộ phận của cây hoặc hạt. Các điều kiện phát triển chuẩn trong nhà kính bao gồm nhiệt độ ban ngày nằm trong khoảng từ 22 đến 24°C và nhiệt độ ban đêm nằm trong khoảng từ 16 đến 18°C với ánh sáng mặt trời tự nhiên. Hạt có thể thích hợp để trồng, nghĩa là có thể nảy mầm và sinh ra các cây con, hoặc, theo cách khác, đã được xử lý theo cách mà không thể nảy mần nữa, ví dụ làm vỡ, xát hoặc nghiền hạt mà có thể được sử dụng để làm thức ăn hoặc thực phẩm, hoặc để chiết lipit theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "cơ quan tích trữ của cây" được dùng để chỉ một bộ phận của cây chuyên để trữ năng lượng, ví dụ, ở dạng protein, carbohydrat, axit béo và/hoặc dầu. Ví dụ về cơ quan tích trữ của cây là hạt, quả, rễ củ, và củ. Cơ quan tích trữ của cây được ưu tiên là hạt.

Tốt hơn, nếu cây hoặc các bộ phận của cây theo sáng chế hoặc được sử dụng theo sáng chế là bình thường về kiểu hình. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bình thường về kiểu hình" được dùng để chỉ cây hoặc cơ quan của

cây đã được biến đổi di truyền, cụ thể là cơ quan tích trữ như hạt, củ hoặc quả không có khả năng phát triển và sinh sản bị giảm đáng kể so với cây hoặc cơ quan của cây không bị biến đổi. Theo một phương án, cây hoặc cơ quan của cây biến đổi di truyền bình thường về phenotip có khả năng sinh trưởng và sinh sản mà về cơ bản giống như cây hoặc cơ quan đẳng gen không chứa polynucleotit ngoại sinh này. Tốt hơn là, sinh khối, tốc độ sinh trưởng, tốc độ nảy mầm, kích thước cơ quan tích trữ, khả năng sống của phấn hoa, độ hữu thụ đực và cái, kích thước hạt và/hoặc số lượng hạt sống tạo ra là không thấp hơn 90% so với các chỉ số này ở cây không có polynucleotit ngoại sinh này khi sinh trưởng trong các điều kiện giống nhau. Tốt hơn, nếu khả năng sống của phấn hoa của cây theo sáng chế, hoặc cây sinh ra từ hạt theo sáng chế là khoảng 100% so với khả năng sống của phấn hoa của cây kiểu dại tương ứng. Thuật ngữ này không bao gồm các đặc điểm của cây có thể khác với cây kiểu dại nhưng chúng không ảnh hưởng đến sự hữu ích của cây đối với mục đích thương mại, ví dụ, như phenotip kiểu *ballerina* của lá cây con.

Cây được đề xuất hoặc được dự tính để sử dụng trong thực hành sáng chế bao gồm cây một lá mầm và cây hai lá mầm. Theo các phương án được ưu tiên, cây theo sáng chế là cây hoa màu (ví dụ, ngũ cốc và đậu, ngô, lúa mỳ, khoai tây, cây sắn hột, lúa, lúa miến, kê, sắn, lúa mạch, hoặc đậu Hà lan), hoặc các cây họ đậu khác. Cây cũng có thể được phát triển để tạo ra rễ, củ, lá, thân, hoặc hoa hoặc quả ăn được. Cây có thể là cây rau hoặc cây cảnh. Cây theo sáng chế có thể là: cây ngô (*Zea mays*), cây canola (*Brassica napus, Brassica rapa* ssp.), cây mù tạc (*Brassica juncea*), cây lanh (*Linum usitatissimum*), cỏ linh lăng (*Medicago sativa*), cây lúa (*Oryza sativa*), cây lúa mạch đen (*Secale cerale*), cây lúa miến (*Sorghum bicolour, Sorghum vulgare*), cây hướng dương (*Helianthus annus*), cây lúa mỳ (*Tritium aestivum*), cây đậu nành (*Glyxin max*), cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), cây khoai tây (*Solanum tuberosum*), cây lạc (*Arachis hypogaea*), cây bông

(*Gossypium hirsutum*), cây khoai lang (*Lopmoea batatus*), cây sắn (*Manihot esculenta*), cây cà phê (*Cofea* spp.), cây dừa (*Cocos nucifera*), cây dứa (*Anana comosus*), cây họ cam (*Citrus* spp.), cây cacao (*Theobroma cacao*), cây chè (*Camellia senensis*), cây chuối (*Musa* spp.), cây bơ (*Persea americana*), cây sung (*Ficus casica*), cây ổi (*Psidium guajava*), cây xoài (*Mangifer indica*), cây ôliu (*Olea europaea*), cây đu đủ (*Carica papaya*), cây đào lộn hột (*Anacardium occidentale*), cây mác ca (*Macadamia intergrifolia*), cây hạnh nhân (*Prunus amygdalus*), cây củ cải đường (*Beta vulgaris*), cây yến mạch, hoặc lúa mạch.

Theo một phương án được ưu tiên, cây là cây hạt kín.

Theo một phương án, cây là cây có hạt chứa dầu, tốt hơn là cây hoa màu có hạt chứa dầu. Như được sử dụng ở đây, "cây có hạt chứa dầu" là loài cây được sử dụng để sản xuất dầu thương mại từ hạt của cây. Cây có hạt chứa dầu có thể là cây cải dầu (như canola), ngô, hướng dương, đậu nành, lúa miến, lanh (hạt lanh) hoặc củ cải đường. Hơn nữa, cây có hạt chứa dầu có thể là các cây thuộc chi cải *Brassica* khác, bông, lạc, anh túc, mù tạc, cây thầu dầu, vừng, hướng dương, rum, *Camelina, Crambe*, hoặc cây tạo ra quả hạch khác. Các cây này có thể tạo ra các mức dầu cao trong quả của nó, như ôliu, cọ dầu hoặc dừa. Các cây trồng trong vườn mà sáng chế có thể áp dụng là rau diếp, rau diếp quăn, hoặc các cây họ cải khác bao gồm bắp cải, bông cải xanh, hoặc súp lơ. Sáng chế cũng có thể áp dụng cho cây thuốc lá, cây bầu bí, cà rốt, dâu tây, khoai tây, hoặc hạt tiêu.

Theo một phương án được ưu tiên hơn, cây không chuyển gen được sử dụng để tạo ra cây chuyển gen theo sáng chế tạo ra dầu, đặc biệt là trong hạt, sẽ có i) các axit béo 18:2 với lượng thấp hơn 20%, thấp hơn 10% hoặc thấp hơn 5% và/hoặc ii) các axit béo 18:3 với lượng thấp hơn 10% hoặc thấp hơn 5%.

Theo một phương án được ưu tiên, cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó là đồng hợp tử đối với mỗi và mọi gen (polynucleotit ngoại sinh) đã được đưa vào (gen chuyển) sao cho cây con của nó không được phân ly với kiểu hình mong muốn. Cây chuyển gen cũng có thể là dị hợp tử đối với (các) gen chuyển được đưa vào, tốt hơn là dị hợp tử đều đối với gen chuyển, ví dụ, như trong thế hệ F1 được trồng từ hạt lai. Cây như vậy có thể mang lại các ích lợi như ưu thế lai, đã biết trong lĩnh vực này, hoặc có thể được sử dụng ở trong quá trình nhân giống hoặc lai ngược của cây.

Khi thích hợp, cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó cũng có thể chứa thêm các gen chuyển mã hóa enzym có vai trò trong quá trình sản xuất LC-PUFA như, nhưng không giới hạn ở, Δ6-desaturaza, Δ9-elongaza, Δ8-desaturaza, Δ6-elongaza, Δ5-desaturaza, ω3-desaturaza, Δ5-elongaza, diaxylglyxerol axyltransferaza, LPAAT, Δ17-desaturaza, Δ15-desaturaza và/hoặc Δ12 desaturaza. Ví dụ về các enzym này có một trong số nhiều hoạt tính đã biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm các enzym được mô tả ở đây. Trong các ví dụ cụ thể, cây biến đổi gen ít nhất bao gồm một nhóm các polynucleotit ngoại sinh mã hóa;

a) Δ5-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-elongaza và Δ6-elongaza,

b) Δ5-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-elongaza và Δ9-elongaza,

c) Δ5-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-elongaza, Δ6-elongaza, và Δ15-desaturaza,

d) Δ5-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-elongaza, Δ9-elongaza, và Δ15-desaturaza,

e) Δ5-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-elongaza, Δ6-elongaza, và Δ17-desaturaza,

f) Δ5-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-elongaza, Δ9-elongaza, và Δ17-desaturaza,

g) ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

h) ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

i) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

j) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

k) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), ω3-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

l) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

m) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

n) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

o) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), ω3-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

p) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

q) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza, hoặc

r) 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT), Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza.

Theo một phương án, polynucleotit ngoại sinh mã hóa bộ polypeptit là Δ6-desaturaza của *Pythium irregulare*, Δ5-desaturaza của *Thraustochytrid* hoặc Δ5-desaturaza của *Emiliana huxleyi*, Δ6-elongaza của *Physcomitrella patens*, Δ5-elongaza của *Thraustochytrid* hoặc Δ5-elongaza của *Ostreocccus taurii* và ω3-desaturaza của *Phytophthora infestans* hoặc ω3-desaturaza của *Pythium irregulare*.

Theo một phương án, cây theo sáng chế được trồng trên cánh đồng, tốt hơn là một quần thể ít nhất 1000, 1000000 hoặc 2000000 cây về cơ bản là giống nhau, hoặc trên một diện tích ít nhất 1 hécta hoặc 2 hécta. Mật độ trồng cây khác nhau theo loài cây, giống cây, khí hậu, điều kiện đất, tỷ lệ phân bón và các yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, cây cải dầu đặc trưng được trồng với mật độ trồng là 1,2-1,5 triệu cây trên một hécta. Cây được thu hoạch như đã biết trong lĩnh vực này, có thể bao gồm xén, vun thành luống và/hoặc gặt cây, sau đó đập và/hoặc sàng sẩy nguyên liệu cây để tách hạt ra khỏi phần còn lại của bộ phận của cây thường là ở dạng rơm rạ. Theo cách khác, hạt có thể được thu hoạch từ cây trên cánh đồng trong một quy trình duy nhất, cụ thể là thu gom lại.

Biến nạp thực vật

Cây chuyển gen có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, như các kỹ thuật được mô tả chung trong A. Slater et al., Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003), và P. Christou và H. Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley và Sons (2004).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gây biến nạp ổn định", "được gây biến nạp ổn định" và cách diễn đạt khác của chúng được dùng để chỉ sự hợp nhất của phân tử axit nucleic ngoại sinh vào trong hệ gen của tế bào sao cho chúng được chuyển vào tế bào của thế hệ con trong quá trình phân chia tế bào mà không cần chủ động lựa chọn sự có mặt của chúng. Thể biến nạp ổn định, hoặc thế hệ con của chúng, có thể được lựa chọn bởi phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực như phương pháp thẩm tách Southern blots trên ADN nhiễm sắc thể hoặc lai hóa *in situ* ADN của hệ gen. Tốt hơn, nếu quá trình biến nạp cây được thực hiện như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Sự chuyển gián tiếp qua *Agrobacterium* là một hệ có thể ứng dụng rộng rãi để đưa gen vào trong tế bào thực vật do ADN có thể được đưa vào tế bào trong mô nguyên vẹn của cây hoặc bộ phận của cây hoặc mảnh cấy trong môi trường nuôi cấy mô, để hoặc là biểu hiện tạm thời hoặc để sát nhập ổn định ADN vào trong hệ gen của tế bào thực vật. Việc sử dụng vectơ hợp nhất thực vật qua trung gian *Agrobacterium* để đưa ADN vào trong tế bào thực vật đã được biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, xem US 5177010, US 5104310, US 5004863 hoặc US 5159135) kể cả phương pháp nhúng chìm hoa bằng *Agrobacterium* hoặc các vi khuẩn khác có thể chuyển ADN vào trong tế bào thực vật. Vùng ADN được chuyển được xác định bằng trình tự biên, và ADN xen vào (T-DNA) thường được lồng vào trong hệ gen của cây. Hơn nữa, sự sát nhập của T-ADN là một quy trình tương đối chính xác tạo ra một vài sự sắp xếp lại. Trong các loại thực vật mà sự biến nạp qua *Agrobacterium* có hiệu quả, có một phương pháp lựa chọn do sự thuận tiện và bản chất đã xác định của sự chuyển gen. Véc tơ biến nạp *Agrobacterium* được ưu tiên có khả năng sao chép trong *E. coli* cũng như *Agrobacterium*, cho phép thao tác thuận tiện như đã được mô tả (Klee et al., In: Plant ADN Infectious Agents, Hohn và Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 179-203 (1985).

Các phương pháp gia tốc có thể được sử dụng, ví dụ, bao gồm phương pháp chuyển gen bằng súng bắn gen vi đạn và phương pháp tương tự. Một ví dụ về phương pháp để phân phối phân tử axit nucleic gây biến nạp vào tế bào thực vật là phương pháp chuyển gen bằng súng bắn gen vi đạn. Phương pháp này đã được nêu bởi Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994). Các hạt không phải sinh học (vi đạn) có thể được bao bằng axit nucleic và phân phối vào trong tế bào bằng lực đẩy. Các hạt lấy ví dụ bao gồm các hạt là vonfram, vàng, platin, và các kim loại tương tự. Một lợi ích cụ thể của phương pháp chuyển gen bằng súng bắn gen vi đạn, ngoài việc nó là phương pháp hiệu quả để gây biến nạp có thể lặp lại ở cây một lá mầm, là phương pháp này không đòi hỏi phân tách thể nguyên sinh, cũng như không đòi hỏi tính nhạy cảm gây nhiễm *Agrobacterium*.

Theo phương án khác nữa, các lạp thể có thể được biến nạp ổn định. Các phương pháp đã được bộc lộ để biến nạp lạp thể ở các thực vật cao hơn bao gồm phương pháp bắn hạt ADN chứa gen đánh dấu chọn lọc được và hướng đích ADN đến hệ gen lạp thể thông qua kỹ thuật tái tổ hợp cùng loài (US5, 451,513, US5,545,818, US5,877,402, US5,932479, và WO99/05265).

Phương pháp khác để biến nạp tế bào cũng có thể được sử dụng và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp đưa ADN vào cây bằng cách chuyển ADN trực tiếp vào phấn hoa, bằng cách tiêm trực tiếp ADN vào trong cơ quan sinh sản của cây, hoặc bằng cách tiêm trực tiếp ADN vào tế bào của mầm phôi trưởng thành, tiếp đó hydrat hóa lại các mầm đã khử nước.

Việc tái tạo, phát triển, và nuôi trồng cây từ thể biến nạp nguyên sinh thực vật đơn hoặc từ nhiều mảnh cấy được gây biến nạp khác nhau đã được biết rõ trong lĩnh vực này (Weissbach et al., In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988). Quy trình tái tạo và phát

triển thường bao gồm các bước lựa chọn tế bào gây biến nạp, nuôi cấy các tế bào đã biệt hóa này qua các giai đoạn phát triển phôi thông thường trong suốt giai đoạn cây non mọc rễ. Phôi và hạt chuyển gen được tái tạo một cách tương tự. Sau đó, các chồi chuyển gen đã mọc rễ tạo ra được trồng trong môi trường phát triển cây thích hợp như đất.

Việc phát triển hoặc tái tạo cây chứa gen ngoại lai, ngoại sinh là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Tốt hơn là, các cây đã được tái tạo là tự thụ phấn để sinh ra cây chuyển gen đồng hợp tử. Mặt khác, phấn hoa thu được từ cây được tái tạo được lai chéo với cây trồng từ hạt của dòng quan trọng trong nông nghiệp. Ngược lại, phấn hoa từ cây của các dòng quan trọng này được sử dụng để thụ phấn cho cây được tái tạo. Cây chuyển gen theo sáng chế chứa axit nucleic ngoại sinh mong muốn được trồng bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Để khẳng định sự có mặt của gen chuyển trong tế bào và cây chuyển gen, phương pháp khuếch đại phản ứng chuỗi polymeraza (PCR: polymerase chain reaction) hoặc phép phân tích thẩm tách Southern Blot có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với các người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các sản phẩm biểu hiện của gen chuyển có thể được phát hiện bởi cách bất kỳ trong số nhiều cách, phụ thuộc vào bản chất của sản phẩm, và bao gồm phép phân tích thẩm tách Western Blot và thử nghiệm enzym. Khi đã thu được cây chuyển gen, chúng có thể được trồng để tạo ra mô cây hoặc các bộ phận của cây có phenotip mong muốn. Mô cây hoặc bộ phận của cây, có thể được thu hoạch, và/hoặc thu lấy hạt. Hạt có thể được sử dụng làm nguồn để trồng thêm cây có mô hoặc bộ phận có đặc điểm mong muốn.

Cây chuyển gen tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp biến nạp *Agrobacterium* hoặc phương pháp khác thường chứa một locus gen đơn trên

một nhiễm sắc thể. Cây chuyển gen này có thể được coi là bán hợp tử đối với (các) gen được thêm vào. Được ưu tiên hơn là cây chuyển gen đồng hợp tử với (các) gen được thêm vào; tức là, cây chuyển gen chứa hai gen được thêm vào, một gen trên cùng locus trên mỗi nhiễm sắc thể của cặp nhiễm sắc thể. Cây chuyển gen đồng hợp tử có thể thu được bằng cách tự thụ phấn cây chuyển gen bán hợp tử, nẩy mầm một số hạt tạo ra và phân tích cây thu được về gen được quan tâm.

Cũng hiểu rằng hai cây chuyển gen khác nhau chứa hai gen ngoại sinh được phân ly độc lập hoặc locus cũng có thể được lai chéo (thụ phấn) để tạo ra cây con chứa cả các bộ gen hoặc các locus. Việc tự thụ phấn của cây con F1 thích hợp có thể tạo ra các cây đồng hợp tử đối với cả gen hoặc locus ngoại sinh. Sự lai ngược lại với cây mẹ và lai tiếp với cây không chuyển gen cũng được dự tính, vì là sự nhân giống sinh dưỡng. Các mô tả về các phương pháp sinh sản khác thường được sử dụng đối với các tính trạng và cây khác nhau có thể được tìm thấy trong Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

<u>Tăng mức ARN ngoại sinh và biểu hiện ổn định ARN ngoại sinh</u>

Gen ức chế làm câm

Theo một phương án, tế bào thực vật, cây hoặc bộ phận của cây chứa các polynucleotit ngoại sinh mã hóa protein ức chế làm câm.

Sự làm câm gen sau phiên mã (PTGS: port-transcriptional gene silencing) là một cơ chế bảo vệ đặc hiệu trình tự nucleotit có thể hướng đích ở cả mARN tế bào và mARN virut để làm giảm sự PTGS xảy ra ở thực vật hoặc nấm một cách ổn định hoặc được gây biến nạp tạm thời bằng ADN ngoại lai (khác loại) hoặc ADN nội sinh và gây ra sự tích lũy phân tử ARN giảm có độ tương đồng trình tự với axit nucleic được đưa vào.

Đã được xem xét một cách rộng rãi là sự đồng biểu hiện gen ức chế làm câm với gen chuyển được quan tâm sẽ làm tăng mức ARN có trong tế bào được phiên mã từ gen chuyển. Trong khi điều này đã được chứng minh là đúng với các tế bào *in vitro*, thì quan sát thấy các tác dụng phụ đáng kể ở nhiều nghiên cứu đồng hiểu hiện ở cây nguyên vẹn. Cụ thể hơn, như mô tả trong Mallory et al. (2002), Chapman et al. (2004), Chen et al. (2004), Dunoyer et al. (2004), Zhang et al. (2006), Lewsey et al. (2007) và Meng et al. (2008) cây biểu hiện gen ức chế làm câm, thường là theo gen khởi đầu cấu trúc, thường có phenotip bất thường đến mức không thể sử dụng chúng để sản xuất thương mại.

Gần đây, đã phát hiện ra rằng mức phân tử ARN có thể tăng lên, và/hoặc mức phân tử ARN ổn định qua nhiều thế hệ, bằng cách hạn chế sự biểu hiện của gen ức chế làm câm ở hạt của cây hoặc bộ phận của nó (WO2010/057246). Như được sử dụng ở đây, "protein ức chế làm câm" hoặc SSP là polypeptit bất kỳ có thể được biểu hiện trong tế bào thực vật làm tăng mức biểu hiện sản phẩm từ gen chuyển khác trong tế bào thực vật, đặc biệt là các thế hệ lặp lại quá nhiều lần từ cây được biến nạp đầu tiên. Theo một phương án, SSP là gen ức chế làm câm của virut hoặc thể đột biến của nó. Một số lượng lớn gen ức chế làm câm của virut là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, P19, V2, P38, Pe-Po và RPV-P0. Theo một phương án, gen ức chế làm câm của virut bao gồm các axit amin có trình tự như được nêu trong trình tự SEQ ID NO:38, đoạn có hoạt tính sinh học của nó, hoặc trình tự axit amin ít nhất 50% đồng nhất với SEQ ID NO: 38 và có hoạt tính dưới dạng gen ức chế làm câm.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "biểu hiện ổn định", "được biểu hiện ổn định", "sự biểu hiện được làm ổn định" và cách diễn đạt khác của chúng được dùng để chỉ mức phân tử ARN về cơ bản giống hoặc cao hơn

trong các cây thế hệ con so với các thế hệ lặp lại quá nhiều, ví dụ ít nhất ba, ít nhất năm hoặc ít nhất 10 thế hệ, khi được so với cây đẳng gen không có polynucleotit ngoại sinh mã hóa gen ức chế làm câm . Tuy nhiên, thuật ngữ này không loại trừ khả năng các thế hệ lặp lại quá nhiều sẽ có sự giảm mức phân tử ARN khi được so sánh với thế hệ trước đó, ví dụ giảm không dưới hơn 10% trong mỗi thế hệ.

Gen ức chế có thể được chọn từ nguồn bất kỳ ví dụ cây, virut, động vật có vú v.v., xem WO2010/057246 về danh sách các virut mà có thể thu được gen ức chế từ đó và protein (ví dụ B2, P14, v.v.) hoặc thiết kế vùng mã hóa gen ức chế từ mỗi virut cụ thể. Nhiều bản sao của gen ức chế có thể được sử dụng. Các gen ức chế khác nhau có thể được sử dụng cùng nhau (ví dụ, theo kiểu liên tiếp).

Phân tử ARN

Về cơ bản, phân tử ARN bất kỳ mong muốn được biểu hiện ở hạt cây có thể được đồng hiểu hiện với gen ức chế làm câm. Polypeptit đã được mã hóa có thể liên quan đến cơ chế chuyển hóa dầu, tinh bột, carbohydrat, chất dinh dưỡng, v.v., hoặc có thể có vai trò trong quá trình tổng hợp protein, peptit, axit béo, lipit, sáp, dầu, tinh bột, đường, carbohydrat, hương vị, mùi, độc tố, carotenoit. hormon, polyme, flavonoit, protein tích trữ, axit phenolic, alkaloit, lignin, tanin, xenluloza, glycoprotein, glycolipit, v.v., tốt hơn là quá trình sinh tổng hợp hoặc lắp ráp TAG.

Trong một ví dụ cụ thể, cây tạo ra các mức enzym gia tăng để sinh ra dầu ở cây như Brassicas (họ cải), ví dụ cây canola hoặc hướng dương, rum, lanh, bông, đậu nành, *Camelina* hoặc ngô.

<u>Mức LC-PUFA tạo ra</u>

Mức LC-PUFA hoặc hỗn hợp các LC-PUFA được tạo ra trong các tế bào tái tổ hợp hoặc bộ phận của cây như hạt là rất quan trọng. Mức này có thể được thể hiện dưới dạng thành phần (phần trăm) của tổng lượng axit béo là một LC-PUFA cụ thể hoặc nhóm bao gồm các LC-PUFA có liên quan, ví dụ ω3 LC-PUFA hoặc ω6 LC-PUFA, hoặc VLC-PUFA, hoặc axit béo khác có thể được xác định bởi các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Mức này cũng có thể được biểu hiện dưới dạng hàm lượng LC-PUFA, ví dụ, như phần trăm của LC-PUFA trong nguyên liệu chứa tế bào tái tổ hợp tính theo trọng lượng khô, ví dụ phần trăm trọng lượng hạt đó là LC-PUFA. Biết rõ rằng LC-PUFA được tạo ra trong hạt chứa dầu có thể cao hơn nhiều hàm lượng LC-PUFA trong cây hoặc hạt không được trồng để sản xuất dầu, mà cả hai có thể có thành phần LC-PUFA giống nhau, và cả hai có thể được sử dụng làm nguồn LC-PUFA cho nhu cầu tiêu thụ của người hoặc động vật.

Các mức LC-PUFA có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án được ưu tiên, toàn bộ lipit được chiết từ tế bào, mô hoặc sinh vật và axit béo chuyển hóa thành este metyl trước khi phân tích bằng sắc ký khí (GC: gas chromatography). Các kỹ thuật này được mô tả trong Ví dụ 1. Vị trí đỉnh trong sắc ký đồ có thể được sử dụng để xác định mỗi axit béo cụ thể, và diện tích dưới mỗi đỉnh được tích phân để định lượng. Như được sử dụng ở đây, trừ khi có quy định khác, phần trăm của axit béo cụ thể trong mẫu được xác định là diện tích dưới đỉnh của axit béo dưới dạng phần trăm của tổng diện tích của các axit béo trong sắc ký đồ. Về cơ bản, phần trăm này tương ứng với phần trăm trọng lượng (trọng lượng). Độ đồng nhất của các axit béo có thể được xác nhận bằng phương pháp GC-MS. Toàn bộ lipit có thể được tách ra bởi các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này để tinh chế các phân đoạn như phân đoạn TAG. Ví dụ, sắc ký lớp mỏng (TLC) có thể được thực hiện ở quy mô phân tích để tách TAG ra khỏi các

phân đoạn lipit khác như DAG, axyl-CoA hoặc phospholipit để xác định thành phần axit béo cụ thể của TAG.

Theo một phương án, toàn bộ tổng của ARA, EPA, DPA và DHA trong axit béo trong lipit chiết tách nằm trong khoảng từ 21% đến 40% của tổng lượng axit béo trong tế bào. Theo một phương án khác, tổng lượng axit béo trong tế bào chứa C20:1 với lượng ít hơn 1%. Theo các phương án được ưu tiên, TAG có thể chiết được trong tế bào bao gồm các axit béo ở mức được đề cập ở đây. Cũng được bao hàm là mỗi cách kết hợp có thể của các đặc điểm xác định lipit như được mô tả ở đây.

Mức sản sinh LC-PUFA trong các tế bào tái tổ hợp, cây hoặc bộ phận của cây như hạt cũng có thể được thể hiện dưới dạng phần trăm chuyển hóa của cơ chất axit béo cụ thể thành một hoặc nhiều sản phẩm axit béo, ở đây còn được gọi là "hiệu suất chuyển hóa" hoặc "hiệu suất enzym". Thông số này được dựa trên thành phần axit béo trong lipit chiết tách từ tế bào, cây, bộ phận của cây hoặc hạt, nghĩa là, lượng LC-PUFA tạo thành (bao gồm LC-PUFA khác được tạo ra từ đó) dưới dạng phần trăm của một hoặc nhiều cơ chất axit béo (bao gồm tất cả các axit béo được tạo ra từ đó). Công thức chung cho phần trăm chuyển hóa là: 100 x (tổng các phần trăm của sản phẩm LC-PUFA và tất cả sản phẩm được tạo ra từ đó)/(tổng các phần trăm của cơ chất axit béo và tất cả các sản phẩm được tạo ra từ đó). Về DPA, ví dụ, nó có thể được thể hiện dưới dạng tỷ lệ của mức DPA (là phần trăm trong tổng hàm lượng axit béo trong lipit) với mức cơ chất axit béo (ví dụ OA, LA, ALA, SDA, ETA hoặc EPA) và tất cả các sản phẩm kể cả DPA có nguồn gốc từ cơ chất này. Phần trăm chuyển hóa hoặc hiệu suất chuyển hóa có thể được thể hiện cho bước enzym riêng lẻ trong con đường chuyển hóa, hoặc một phần hoặc toàn bộ con đường chuyển hóa.

Hiệu suất chuyển hóa cụ thể được tính toán ở đây theo công thức:

1. OA thành DPA = 100 x (%DHA+%DPA)/(tổng % của OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA).
2. LA thành DPA = 100 x (%DHA+DPA)/(tổng % của LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA).
3. ALA thành DPA = 100 x (%DHA+%DPA)/(tổng % của ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA).
4. EPA thành DPA = 100 x (%DHA+DPA)/(tổng % của EPA, DPA và DHA).
5. DPA thành DHA (hiệu suất Δ4-desaturaza) = 100 x (%DHA)/(tổng % của DPA và DHA).
6. Hiệu suất Δ12-desaturaza = 100 x (tổng % của LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA)/ (tổng % của OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA).
7. Hiệu suất ω3-desaturaza = 100 x (tổng % của ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA)/(tổng % của LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA).
8. OA thành ALA = 100 x (tổng % của ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA)/(tổng % của OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA).
9. Hiệu suất Δ6-desaturaza (trên cơ chất ω3 ALA) = 100 x (tổng % của SDA, ETA, EPA, DPA và DHA)/ (%ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA và DHA).

10. Hiệu suất Δ6-elongaza (trên cơ chất ω3 SDA) = 100 x (tổng % của ETA, EPA, DPA và DHA)/ (tổng % của SDA, ETA, EPA, DPA và DHA).

11. Hiệu suất Δ5-desaturaza (trên cơ chất ω3 ETA) = 100 x (tổng % của EPA, DPA và DHA)/ (tổng % của ETA, EPA, DPA và DHA).

12. Hiệu suất Δ5-elongaza (trên cơ chất ω3 EPA) = 100 x (tổng % của DPA và DHA)/ (tổng % của EPA, DPA và DHA).

Thành phần axit béo của lipit, tốt hơn là dầu hạt, theo sáng chế, còn được đặc trưng bởi tỷ lệ của axit béo ω6:axit béo ω3 trong tổng hàm lượng axit béo, hoặc là tỷ lệ của tổng lượng axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3 hoặc tỷ lệ của axit béo ω6 mới:axit béo ω3 mới. Thuật ngữ tổng lượng axit béo ω6, tổng lượng axit béo ω3, axit béo ω6 mới và axit béo ω3 mới có ý nghĩa như được nêu ở đây. Các tỷ lệ này được tính toán từ thành phần axit béo trong lipit được chiết tách ra khỏi tế bào, cây, bộ phận của cây hoặc hạt, theo cách được minh họa ở đây. Mong muốn có hàm lượng axit béo ω3 cao hơn axit béo ω6 trong lipit, và do đó tỷ lệ ω6:ω3 thấp hơn 1,0 là được ưu tiên. Tỷ lệ 0,0 chỉ ra rằng hoàn toàn không có axit béo ω6 xác định; đã đạt được tỷ lệ 0,03. Các tỷ lệ thấp này có thể đạt được bằng cách sử dụng kết hợp Δ6-desaturaza mà có sự ưu tiên cơ chất ω3 cùng với ω3-desaturaza, đặc biệt là ω3-desaturaza của nấm như ω3-desaturaza của *Pichia pastoris* như được minh họa ở đây.

Hiệu suất của LC-PUFA trên trọng lượng hạt cũng có thể tính trên tổng hàm lượng dầu trong hạt và % DPA trong dầu. Ví dụ, nếu hàm lượng dầu của hạt canola là khoảng 40% (trọng lượng) đến 12% tổng hàm lượng axit béo của dầu là DPA, hàm lượng DPA của hạt bằng khoảng 4,8% hoặc khoảng 48mg trong mỗi gam hạt. Ở hàm lượng DPA khoảng 21%, hạt canola hoặc

hạt *Camelina sativa* có hàm lượng DPA bằng khoảng 84mg trong mỗi gam hạt. Do đó, sáng chế đề xuất cây *Brassica napus, B. juncea* và *Camelina sativa*, và hạt thu được từ cây này, chứa ít nhất khoảng 80mg hoặc ít nhất khoảng 84mg DPA trong mỗi gam hạt. Hạt có hàm lượng ẩm theo tiêu chuẩn đối với hạt già thu hoạch được sau khi làm khô (độ ẩm 4-15%). Sáng chế cũng đề xuất quy trình để thu được dầu, trong đó quy trình này bao gồm bước thu nhận hạt và chiết dầu ra khỏi hạt, và sử dụng dầu và phương pháp thu được hạt bao gồm bước thu hoạch hạt từ cây theo sáng chế.

Lượng DPA tạo ra trên mỗi hécta cũng có thể được tính nếu hiệu suất hạt trên mỗi hécta được biết hoặc có thể được ước tính. Ví dụ, canola ở Úc thường có hiệu suất khoảng 2,5 tấn hạt trên mỗi hécta, với hàm lượng dầu 40% sẽ cho khoảng 1000kg dầu. Với hàm lượng DPA bằng 20,1% trong toàn bộ dầu, nó sẽ cho khoảng 200kg DPA trên mỗi hécta. Nếu hàm lượng dầu giảm 50%, nó vẫn cung cấp khoảng 100kg DPA/ha.

Bằng chứng cho đến nay gợi ý rằng một số desaturaza được biểu hiện khác loại trong nấm men hoặc cây có hoạt tính tương đối thấp khi kết hợp với một số elongaza. Điều này có thể được giảm thiểu bằng cách làm cho desaturaza có khả năng sử dụng dạng axyl-CoA của axit béo làm cơ chất trong quá trình tổng hợp LC-PUFA, và điều này được cho là thuận lợi trong các tế bào tái tổ hợp đặc biệt là trong tế bào thực vật. Một cách kết hợp có lợi cụ thể để tổng hợp DPA hiệu quả là ω3-desaturaza của nấm, ví dụ như ω3-desaturaza của *Pichia pastoris* (SEQ ID NO:6), với Δ6-desaturaza có sự ưu tiên cho cơ chất ω3 axyl, ví dụ, như Δ6-desaturaza của *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 9), hoặc biến thể của nó có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 95%.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "về cơ bản không chứa" có nghĩa là chế phẩm (ví dụ lipit hoặc dầu) chứa ít (ví dụ, thấp hơn khoảng 0,5%, thấp

hơn khoảng 0,25%, thấp hơn khoảng 0,1%, hoặc thấp hơn khoảng 0,01%) hoặc không có thành phần được nêu. Theo một phương án, "về cơ bản không chứa" có nghĩa là thành phần này không thể phát hiện được bằng kỹ thuật phân tích thông thường, ví dụ axit béo cụ thể (như axit ω6-docosapentaenoic) không thể được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký khí như được thể hiện trong Ví dụ 1.

Theo một phương án, lipit chiết tách, dầu chiết tách hoặc cây hoặc bộ phận của nó như hạt (theo sáng chế hoặc được sử dụng trong quy trình/phương pháp theo sáng chế), sản phẩm dinh dưỡng, hoặc chế phẩm theo sáng chế không chứa axit *all-cis*-6,9,12,15,18-heneicosapentaenoic (n-3 HPA).

Sản xuất dầu

Các kỹ thuật được thực hành thông thường trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để chiết, xử lý, và phân tích dầu được tạo ra bởi tế bào, cây, hạt, v.v. theo sáng chế. Thông thường, hạt cây được đun, ép, và chiết để tạo ra dầu thô, sau đó dầu thô được loại gôm, tinh lọc, tẩy màu, và khử mùi. Thông thường, các kỹ thuật ép hạt đã được biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, hạt chứa dầu có thể được gia nhiệt bằng cách phun nước vào chúng để tăng hàm lượng ẩm đến, ví dụ, 8,5%, và cán thành tấm bằng máy cán láng với độ hở được đặt là từ 0,23 đến 0,27mm. Phụ thuộc vào kiểu hạt, có thể không bổ sung nước trước khi ép. Sử dụng nhiệt để bất hoạt enzym, thúc đẩy làm vỡ tế bào, đông tụ các giọt dầu, và kết tụ các hạt protein, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chiết.

Theo một phương án, phần lớn dầu hạt được giải phóng bằng cách đi qua một máy ép kiểu vít. Các bánh được đùn từ máy ép kiểu vít sau đó được chiết bằng dung môi, ví dụ, bằng hexan, có sử dụng cột có dây cáp gia nhiệt. Theo cách khác, dầu thô tạo ra bằng quy trình ép có thể được cho đi qua bể

lắng phía trên có hệ thoát nước bằng dây kim loại có rãnh để loại chất rắn được ép ra cùng với dầu trong quá trình ép. Dầu đã làm trong có thể được đi qua đĩa và bộ lọc khung để loại bỏ các hạt rắn mịn còn lại bất kỳ. Nếu muốn, dầu thu hồi được từ quy trình chiết có thể được kết hợp với dầu đã được làm trong để tạo ra dầu thô hỗn hợp.

Khi dung môi được tách ra khỏi dầu thô, các phần đã ép và chiết được gộp lại và trải qua quá trình xử lý dầu bình thường. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tinh khiết/đã tinh chế" khi được sử dụng với lipit hoặc dầu theo sáng chế thường có nghĩa là lipit chiết tách hoặc dầu đã trải qua một hoặc nhiều bước xử lý để làm tăng độ tinh khiết của thành phần lipit/dầu. Ví dụ, bước tinh chế có thể bao gồm một hoặc nhiều hoặc tất cả các bước sau: loại gôm, khử mùi, tẩy màu, sấy và/hoặc cất phân đoạn dầu chiết được. Tuy nhiên, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tinh khiết/đã tinh chế" không bao gồm quy trình chuyển hóa este hoặc quy trình khác làm thay đổi thành phần axit béo của lipit hoặc dầu theo sáng chế sao cho làm tăng hàm lượng DPA dưới dạng phần trăm tổng hàm lượng axit béo. Nói cách khác, thành phần axit béo của lipit hoặc dầu tinh chế về cơ bản giống như thành phần axit béo của lipit hoặc dầu không được tinh chế.

Loại gôm

Loại gôm là bước đầu trong quá trình tinh lọc dầu và mục đích chính của bước này là loại phần lớn phospholipit ra khỏi dầu, mà có thể có mặt với lượng xấp xỉ 1-2% của toàn bộ lipit chiết tách. Bổ sung ~2% nước, thường chứa axit phosphoric, ở 70–80°C vào dầu thô sẽ gây tách phần lớn phospholipit đi kèm theo các kim loại và thuốc nhuộm với lượng vết. Nguyên liệu không tan được được loại đi phần lớn là hỗn hợp bao gồm phospholipit và triaxylglyxerol và cũng được biết là lexithin. Bước loại gôm có thể được thực hiện bằng cách bổ sung axit phosphoric đậm đặc vào dầu hạt thô để

chuyển hóa các phosphatit không hydrat hóa được thành dạng hydrat hóa được, và để chelat hóa các kim loại vi lượng có trong đó. Gôm được tách khỏi dầu hạt bằng cách ly tâm.

Tinh lọc bằng kiềm

Tinh lọc bằng kiềm là một trong số các quy trình tinh lọc để xử lý dầu thô, đôi khi cũng được gọi là quy trình tinh cất dầu. Bước này thường được thực hiện sau bước loại gôm và trước bước tẩy màu. Sau khi loại gôm, dầu hạt có thể được xử lý bằng cách bổ sung một lượng vừa đủ dung dịch kiềm để chuẩn độ tất cả các axit béo và axit phosphoric, và loại bỏ xà phòng được tạo ra theo cách như vậy. Nguyên liệu kiềm thích hợp bao gồm natri hydroxit, kali hydroxit, natri cacbonat, liti hydroxit, canxi hydroxit, canxi cacbonat và amoni hydroxit. Quy trình này thường được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng và loại phân đoạn axit béo tự do. Xà phòng được loại bỏ bằng cách ly tâm hoặc bằng cách chiết bằng dung môi đối với xà phòng, và dầu trung hòa được rửa bằng nước. Nếu cần, lượng kiềm dư bất kỳ trong dầu có thể được trung hòa bằng axit thích hợp như axit clohydric hoặc axit sulfuric.

Tẩy màu

Tẩy màu là một quy trình lọc trong đó dầu được gia nhiệt đến nhiệt độ 90–120°C trong 10–30 phút với sự có mặt của đất tẩy màu (0,2–2,0%) và không không có mặt oxy bằng cách xử lý bằng nitơ hoặc hơi nước hoặc trong chân không. Bước này trong quá trình xử lý dầu được thiết kế để loại các chất màu không mong muốn (carotenoit, diệp lục, gossypol, v.v.), và quy trình này cũng loại các sản phẩm oxy hóa, kim loại vết, hợp chất lưu huỳnh và vết xà phòng.

Khử mùi

Khử mùi là quá trình xử lý dầu và mỡ ở nhiệt độ cao (200–260°C) và áp suất thấp (0,1–1mm Hg). Quá trình này thường đạt được bằng cách đưa hơi nước vào trong dầu hạt ở tốc độ khoảng 0,1ml/phút/100ml dầu hạt. Sau khoảng 30 phút rảy nước, dầu hạt được để lạnh trong điều kiện chân không. Thông thường, dầu hạt được chuyển vào đồ chứa thủy tinh và sục argon trước khi được bảo quản trong điều kiện làm lạnh. Việc xử lý này cải thiện màu của dầu hạt và loại đi phần lớn chất dễ bay hơi hoặc các hợp chất có mùi bao gồm các axit béo tự do còn lại bất kỳ, monoaxylglyxerol và sản phẩm oxy hóa.

Đông hóa

Đông hóa là quy trình đôi khi được sử dụng trong sản xuất dầu thương mại để tách dầu và mỡ thành các phân đoạn rắn (stearin) và lỏng (olein) bằng cách kết tinh ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ môi trường. Nó được áp dụng đầu tiên với dầu hạt bông để tạo ra sản phẩm không chứa chất rắn. Thông thường, nó được sử dụng để làm giảm hàm lượng axit béo bão hòa của dầu.

Chuyển hóa este

Như được sử dụng ở đây, "chuyển hóa este" là quy trình trao đổi các axit béo trong và giữa các TAG hoặc chuyển axit béo vào rượu khác để tạo ra este. Ban đầu, quy trình này có thể bao gồm bước giải phóng axit béo ra khỏi TAG dưới dạng axit béo tự do hoặc nó có thể trực tiếp tạo ra este của axit béo, thường là metyl este hoặc etyl este của axit béo. Trong phản ứng chuyển hóa este của TAG với rượu như metanol hoặc etanol, nhóm alkyl của rượu tạo ra liên kết este với nhóm axyl (kể cả DPA) của TAG. Khi được phối hợp với quy trình cất phân đoạn, quá trình chuyển hóa este có thể được sử dụng để biến đổi thành phần axit béo của lipit (Marangoni et al., 1995). Quy trình chuyển hóa este có thể sử dụng hoặc phương pháp hóa học (ví dụ xúc tác bằng axit hoặc bazơ mạnh) hoặc phương pháp enzym, phương pháp enzym sử dụng lipaza có thể đặc hiệu vị trí (đặc hiệu *sn*-1/3 hoặc *sn*-2) đối với axit béo

trên TAG, hoặc có sự ưu tiên với một số axit béo hơn so với các axit béo khác (Speranza et al, 2012). Việc cất phân đoạn axit béo để làm tăng nồng độ của LC-PUFA trong dầu có thể đạt được bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, như phương pháp kết tinh đông lạnh, tạo phức bằng cách sử dụng ure, chưng cất phân tử, chiết lỏng siêu tới hạn, sắc ký dòng đối (countercurrent chromatography), và tạo phức ion bạc. Phương pháp tạo phức bằng urê là phương pháp được ưu tiên vì sự đơn giản của nó và có hiệu quả trong việc làm giảm hàm lượng axit béo bão hòa và không bão hòa đơn trong dầu (Gamez et al., 2003). Ban đầu, TAG của dầu được chia thành các axit béo cấu trúc của chúng, thường là ở dạng este của axit béo, bằng cách thủy phân trong điều kiện phản ứng được xúc tác bởi axit hoặc bazơ, bằng cách đó 1mol TAG được cho phản ứng với ít nhất 3mol rượu (ví dụ, etanol đối với etyl este hoặc metanol đối với metyl este) với rượu dư được sử dụng để có thể tách alkyl este đã tạo ra và glyxerol cũng được tạo ra, hoặc bởi lipaza. Các axit béo tự do hoặc este của axit béo, là những thành phần thường không bị biến đổi trong thành phần axit béo bằng cách xử lý, sau đó có thể được phối hợp với dung dịch etanol chứa urê để tạo phức. Các axit béo bão hòa và không bão hòa đơn tạo phức dễ dàng với urê và kết tinh khi làm lạnh và sau đó có thể được loại bỏ bằng cách lọc. Bằng cách này, phân đoạn được tạo phức không sử dụng urê được làm giàu bằng LC-PUFA.

Sản phẩm dinh dưỡng

Sáng chế bao gồm chế phẩm có thể sử dụng làm sản phẩm dinh dưỡng. Theo mục đích của sáng chế, "sản phẩm dinh dưỡng" bao gồm thức ăn hoặc chế phẩm bất kỳ cho người hoặc động vật sử dụng khi được đưa vào cơ thể (a) dùng để nuôi dưỡng hoặc xây dựng mô hoặc cung cấp năng lượng; và/hoặc (b) duy trì, phục hồi hoặc hỗ trợ trạng thái dinh dưỡng hoặc chức năng chuyển hóa thích hợp. Sản phẩm dinh dưỡng theo sáng chế bao gồm các

chế phẩm dinh dưỡng cho trẻ em và/hoặc trẻ em ví dụ, như chế phẩm công thức cho trẻ em, và bột hạt theo sáng chế.

Sản phẩm dinh dưỡng theo sáng chế, ví dụ, chứa tế bào theo sáng chế, cây theo sáng chế, bộ phận của cây theo sáng chế, hạt theo sáng chế, sản phẩm chiết theo sáng chế, sản phẩm của phương pháp theo sáng chế, sản phẩm của quy trình lên men theo sáng chế, hoặc chế phẩm cùng với (các) chất mang thích hợp. Thuật ngữ "chất mang" được sử dụng theo nghĩa rộng nhất của nó để bao gồm thành phần bất kỳ có thể có hoặc không có giá trị dinh dưỡng. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ, chất mang này phải thích hợp để sử dụng (hoặc được sử dụng với nồng độ thấp vừa đủ) trong sản phẩm dinh dưỡng sao cho nó không có ảnh hưởng bất lợi lên sinh vật sử dụng sản phẩm dinh dưỡng này.

Sản phẩm dinh dưỡng theo sáng chế bao gồm dầu, este của axit béo, hoặc axit béo được tạo ra trực tiếp hoặc gián tiếp bằng cách sử dụng phương pháp, tế bào hoặc cây được bộc lộ ở đây. Chế phẩm này có thể ở dạng lỏng hoặc rắn. Ngoài ra, sản phẩm này có thể chứa các nguyên tố dinh dưỡng đa lượng ăn được, protein, carbohydrat, vitamin, và/hoặc khoáng chất với lượng cần thiết cho mục đích sử dụng cụ thể. Lượng của các thành phần này sẽ thay đổi phụ thuộc vào việc liệu chế phẩm này được dự tính để sử dụng cho cá thể bình thường hay sử dụng cho cá thể có nhu cầu đặc biệt, như cá thể mắc rối loạn chuyển hóa và các bệnh tương tự.

Ví dụ về các chất mang thích hợp có giá trị dinh dưỡng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, nguyên tố dinh dưỡng đa lượng như các chất béo ăn được, carbohydrat và protein. Ví dụ về chất béo ăn được bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, dầu dừa, dầu lưu ly, dầu nấm, dầu phúc bồn đen, dầu đậu nành, và mono- và diglyxerit. Ví dụ về carbohydrat như vậy bao gồm (nhưng không bị giới hạn ở): glucoza, lactoza ăn được, và tinh bột hydro hóa. Ngoài

ra, ví dụ về protein có thể được sử dụng trong chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế bao gồm (nhưng không bị giới hạn ở) protein đậu nành, nước sữa được điện thẩm tách, váng sữa được điện thẩm tách, nước sữa, hoặc các sản phẩm thủy phân chứa các protein này.

Về vitamin và khoáng chất, những chất sau có thể được bổ sung vào chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế: canxi, photpho, kali, natri, clorua, magie, mangan, sắt, đồng, kẽm, selen, iod, và vitamin A, E, D, C, và phức vitamin B. Các vitamin và khoáng chất khác cũng có thể được thêm vào.

Các thành phần sử dụng trong sản phẩm dinh dưỡng theo sáng chế có thể có nguồn gốc bán tinh khiết hoặc tinh khiết. Bán tinh khiết hoặc tinh khiết có nghĩa là nguyên liệu đã được điều chế bằng cách tinh chế nguyên liệu tự nhiên hoặc bằng cách tổng hợp *de novo*.

Chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế cũng có thể được thêm vào thức ăn thậm chí khi không đòi hỏi bổ sung vào chế độ ăn. Ví dụ, chế phẩm này có thể được cho vào thức ăn có dạng bất kỳ, bao gồm (nhưng không giới hạn ở): bơ thực vật, bơ chế biến, pho mát, sữa, sữa chua, sôcôla, kẹo, đồ ăn nhẹ, dầu salat, dầu nấu ăn, mỡ nấu ăn, thịt lợn, cá và đồ uống.

Ngoài ra, các axit béo được tạo ra theo sáng chế hoặc tế bào chủ được gây biến nạp để chứa và biểu hiện gen đích cũng có thể được sử dụng làm thực phẩm bổ sung cho động vật để thay đổi thành phần axit béo của mô, trứng hoặc sữa của động vật đến mức mong muốn cao hơn để tiêu thụ ở người hoặc động vật. Ví dụ về động vật này bao gồm cừu, gia súc, ngựa, gia cầm như gà và động vật tương tự.

Hơn nữa, sản phẩm dinh dưỡng theo sáng chế có thể được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản để làm tăng hàm lượng axit béo trong cá hoặc động vật giáp xác ví dụ, như tôm để tiêu thụ ở người hoặc động vật. Cá được ưu tiên là cá hồi.

Sản phẩm dinh dưỡng được ưu tiên theo sáng chế là cây, hạt và các bộ phận khác của cây như lá và thân có thể được sử dụng trực tiếp làm thức ăn cho người hoặc động vật khác. Ví dụ, động vật có thể ăn trực tiếp trên cây đang trồng trên cánh đồng hoặc được cho ăn thêm các lượng xác định khi chăn nuôi kiểm soát. Sáng chế bao gồm việc sử dụng các cây này và bộ phận của cây như vậy làm thức ăn để làm tăng hàm lượng LC-PUFA ở người và động vật khác.

Theo một phương án, sản phẩm dinh dưỡng là sữa công thức dành cho trẻ nhỏ chứa lipit hoặc dầu theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, "sữa công thức dành cho trẻ nhỏ" có nghĩa là chế phẩm không xuất hiện một cách tự nhiên nhưng lại thỏa mãn ít nhất một phần nhu cầu dinh dưỡng của trẻ nhỏ. "Trẻ nhỏ" có nghĩa là trẻ dưới 1 năm tuổi và bao gồm trẻ từ 0 đến 12 tháng tuổi chính xác. Cụ từ "tuổi chính xác" có nghĩa là tuổi theo thứ tự thời gian của trẻ trừ đi khoảng thời gian trẻ sinh non. Do đó, tuổi chính xác là tuổi của trẻ em khi được mang thai tháng đủ. Như được sử dụng ở đây, "không xuất hiện một cách tự nhiên" có nghĩa là sản phẩm này không được tìm thấy trong tự nhiên mà được tạo ra nhờ sự can thiệp của con người. Như được sử dụng ở đây, sữa công thức dành cho trẻ nhỏ theo sáng chế không phải là sữa nguyên chất từ người mẹ (Koletzko et al., 1988) và sữa nguyên chất được tạo ra bởi động vật không phải là người, mặc dù sữa công thức dành cho trẻ nhỏ theo sáng chế có thể chứa các thành phần có nguồn gốc từ sữa như protein sữa hoặc carbohydrat sữa, ví dụ protein hoặc lactoza nước sữa. Sữa công thức dành cho trẻ nhỏ theo sáng chế không chứa các loại thịt có trong tự nhiên như thịt bò, thịt hải cẩu, thịt cá voi hoặc cá, mặc dù sữa công thức dành cho trẻ nhỏ theo sáng chế có thể chứa các thành phần như protein từ các nguồn này. Sữa công thức dành cho trẻ nhỏ theo sáng chế thường chứa lipit chứa DPA theo sáng chế, tốt hơn là ở mức nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,5% trọng lượng của tổng lượng axit béo. DPA óc thể có mặt dưới dạng TAG, dưới

dạng phospholipit hoặc dưới dạng axit béo không được este hóa, hoặc hỗn hợp của chúng.

Lipit hoặc dầu theo sáng chế có thể được đưa vào sữa công thức dành cho trẻ nhỏ bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng tạo ra sữa công thức dành cho trẻ nhỏ theo sáng chế thường bằng cách sử dụng các quy trình được mô tả trong WO 2008/027991, US20150157048, US2015094382 và US20150148316, trong đó DPA được thêm vào ngoài, hoặc thay cho, một hoặc nhiều axit béo không bão hòa đa được mô tả ở đây.

Trong một ví dụ, sữa công thức dành cho trẻ nhỏ chứa DPA (nghĩa là, omega-3 DPA như được mô tả ở đây), tùy ý cùng với các prebiotic, đặc biệt là polydextroza (PDX) và galacto-oligosacarit (GOS), lactoferin không có nguồn gốc từ người, và các axit béo không bão hòa đa mạch dài khác (LC-PUFA). Theo một số phương án, chế phẩm dinh dưỡng còn chứa SDA và/hoặc axit gama-linolenic (GLA). Theo một số phương án, sữa công thức dành cho trẻ nhỏ chứa nguồn chất béo hoặc lipit với lượng tối đa khoảng 7g/100kcal, tốt hơn nữa là nguồn chất béo hoặc lipit với lượng nằm trong khoảng từ 3g/100kcal đến 7g/100kcal, trong đó nguồn chất béo hoặc lipit chứa nguồn protein hoặc nguồn tương đương protein với lượng ít nhất khoảng 0,5g/100kcal, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1,5g/100kcal đến 7g/100kcal; tối đa tới khoảng 7g/100kcal, tốt hơn nữa là nguồn protein hoặc nguồn tương đương protein với lượng nằm trong khoảng từ 1g/100kcal đến 7g/100kcal; và carbohydrat với lượng ít nhất khoảng 5g/100kcal, tốt hơn nữa là carbohydrat với lượng nằm trong khoảng từ 5g đến 25g/100kcal. Sữa công thức dành cho trẻ nhỏ có thể chứa thêm một hoặc nhiều hoặc toàn bộ: 1) lactoferin với lượng ít nhất khoảng 10mg/100kcal, tốt hơn nữa là lactoferin với lượng nằm trong khoảng từ 10mg/100kcal đến 200mg/100kcal; 2) chế

phẩm prebiotic chứa PDX và GOS với lượng khoảng 0,1g/100kcal đến 1g/100kcal; và 3) LC-PUFA bổ sung (nghĩa là, LC-PUFA khác ngoài DPA) chứa DHA với lượng ít nhất khoảng 5mg/100kcal, tốt hơn nữa là LC-PUFA bổ sung chứa DHA với lượng nằm trong khoảng từ 5mg/100kcal đến 75mg/100kcal.

Theo một phương án, tỷ lệ của DPA:DHA trong tổng lượng axit béo của sữa công thức dành cho trẻ nhỏ nằm trong khoảng từ 1:3 đến 2:1. EPA cũng có thể có mặt nhưng tốt hơn là không có mặt. Nếu có mặt, tỷ lệ của EPA:DPA trong tổng lượng axit béo, tốt hơn là, nhỏ hơn 1:2, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 1:5. ARA cũng có thể không có mặt nhưng tốt hơn là có mặt, tốt hơn là tỷ lệ của ARA:DPA trong tổng lượng axit béo nằm trong khoảng từ 1:3 đến 2:1. Tốt nhất là, hàm lượng của mỗi LC-PUFA trong sữa công thức dành cho trẻ nhỏ tương tự như hàm lượng được tìm thấy trong sữa mẹ, trong đó hàm lượng này thay đổi một cách tự nhiên dựa trên tuổi của người mẹ, các yếu tố di truyền, sự hấp thu thức ăn và trạng thái dinh dưỡng. Ví dụ, xem Koletzko và các đồng tác giả (1988). Theo phương án được ưu tiên, sữa công thức dành cho trẻ nhỏ không chứa axit heneicosapentaenoic (HPA, 21:5ω3) ở các mức có thể phát hiện được.

Sữa công thức dành cho trẻ nhỏ có thể ở dạng, ví dụ như lỏng, bột, gel, bột nhão, rắn, thể cô đặc, hỗn dịch hoặc dạng ăn liền của sữa công thức dùng qua đường ruột, sữa công thức dùng qua đường miệng, sữa công thức dành cho trẻ em.

Prebiotic có thể được sử dụng trong bản mô tả này có thể bao gồm polydextroza, bột polydextroza, lactuloza, lactosucroza, raffinoza, gluco-oligosacarit, inulin, fructo-oligosacarit, isomalto-oligosacarit, oligosacarit đậu tương, lactosucroza, xylo-oligosacarit, chito-oligosacarit, manno-oligosacarit,

aribino-oligosacarit, siallyl-oligosacarit, fuco-oligosacarit, galacto-oligosacarit và gentio-oligosacarit.

Lactoferin cũng có thể có mặt trong chế phẩm dinh dưỡng theo bản mô tả này. Lactoferin là polypeptit mạch đơn khoảng 80kD chứa 1-4 glycan, phụ thuộc vào loài. Cấu trúc 3-D của lactoferin của các loài khác nhau là tương tự nhưng không phải giống hệt. Mỗi lactoferin chứa hai thùy tương đồng, gọi là thùy N và thùy C tương ứng dựa vào phần tận cùng N và tận cùng C của phân tử.

Nguồn protein hoặc nguồn protein tương đương có thể là nguồn bất kỳ được sử dụng trong lĩnh vực này, ví dụ sữa không béo, protein nước sữa, casein, protein đậu nành, protein được hydro hóa, axit amin, và các nguồn tương tự. Nguồn protein sữa bò có thể được sử dụng trong thực hành sáng chế này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bột protein sữa, thể cô đặc protein sữa, thể phân lập từ protein sữa, thể rắn của sữa không béo, sữa không béo, sữa khô không béo, protein nước sữa, thể phân tách protein nước sữa, thể cô đặc protein nước sữa, nước sữa ngọt, nước sữa axit, casein, axit casein, caseinat (ví dụ, natri caseinat, natri canxi caseinat, canxi caseinat) và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Nguồn carbohydrat thích hợp có thể là nguồn bất kỳ được sử dụng trong lĩnh vực này, ví dụ, lactoza, glucoza, fructoza, siro ngô khô, maltodextrin, sucroza, tinh bột, siro gạo khô, và các chất tương tự. Lượng thành phần carbohydrat trong chế phẩm dinh dưỡng bằng ít nhất khoảng 5g/100kcal và thông thường có thể thay đổi trong khoảng từ 5g đến 25g/100kcal. Theo một số phương án, lượng carbohydrat nằm trong khoảng từ 6g đến 22g/100kcal. Theo các phương án khác, lượng carbohydrat nằm trong khoảng từ khoảng 12g đến 14g/100kcal. Theo một số phương án, siro ngô khô là được ưu tiên. Hơn nữa, các carbohydrat thủy phân, thủy phân một

phần và/hoặc thủy phân hoàn toàn có thể là cần thiết có mặt trong chế phẩm dinh dưỡng do tính dễ tiêu hóa của chúng. Cụ thể là, carbohydrat thủy phân dường như ít chứa các epitop dị ứng hơn. Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế về carbohydrat thích hợp để sử dụng ở đây bao gồm các loại tinh bột thủy phân hoặc nguyên vẹn, tự nhiên hoặc được biến đổi hóa học, trong đó tinh bột này có nguồn gốc từ ngô, bột sắn hột, gạo hoặc khoai tây, ở dạng sáp hoặc dạng không phải là sáp. Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế về carbohydrat thích hợp bao gồm các loại tinh bột thủy phân khác nhau là tinh bột ngô thủy phân, maltodextrin, maltoza, siro ngô, dextroza, siro ngô khô, glucoza, và các polyme glucoza khác và hỗn hợp của chúng. Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế về carbohydrat thích hợp bao gồm các carbohydrat thường được gọi là sucroza, lactoza, fructoza, siro ngô có hàm lượng fructoza cao, oligosacarit không tiêu hóa được như fructooligosacarit và hỗn hợp của chúng.

Tốt hơn, nếu một hoặc nhiều vitamin và/hoặc chất khoáng cũng có thể được thêm vào sữa công thức dành cho trẻ nhỏ với các lượng đủ để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng hằng ngày của trẻ. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này hiểu được rằng các nhu cầu về vitamin và chất khoáng sẽ thay đổi, ví dụ, dựa trên tuổi của trẻ. Chế phẩm dinh dưỡng có thể tùy ý chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều vitamin sau đây hoặc dẫn xuất của chúng: vitamin B1 (thiamin, thiamin pyrophosphat, TPP, thiamin triphosphat, TTP, thiamin hydroclorua, thiamin mononitrat), vitamin B2 (riboflavin, flavin mononucleotit, FMN, flavin adenin dinucleotit, FAD, lactoflavin, ovoflavin), vitamin B3 (niaxin, axit nicotinic, nicotinamit, niaxinamit, nicotinamit adenin dinucleotit, NAD, axit nicotinic mononucleotit, NicMN, axit pyridin-3-carboxylic), tiền chất vitamin B3 tryptophan, vitamin B6 (pyridoxin, pyridoxal, pyridoxamin, pyridoxin

hydroclorua), axit pantothenic (pantothenat, panthenol), folat (axit folic, folaxin, axit pteroylglutamic), vitamin B12 (cobalamin, metylcobalamin, deoxyadenosylcobalamin, xyanocobalamin, hydroxycobalamin, adenosylcobalamin), biotin, vitamin C (axit ascorbic), vitamin A (retinol, retinyl acxtat, retinyl palmitat, retinyl este với các axit béo mạch dài khác, retinal, axit retinoic, retinol este), vitamin D (calxiferol, cholecalxiferol, vitamin3, 1,25,-dihydroxyvitamin D), vitamin E (α-tocopherol, α-tocopherol axetat, α-tocopherol sucxinat, α-tocopherol nicotinat, α-tocopherol), vitamin K (vitamin K1, phylloquinon, naphtoquinon, vitamin K2, menaquinon-7, vitamin K3, menaquinon-4, menadion, menaquinon-8, menaquinon-8H, menaquinon-9, menaquinon-9H, menaquinon-10, menaquinon-11, menaquinon-12, menaquinon-13), cholin, inositol, β-caroten và hỗn hợp bất kỳ của chúng. Ngoài ra, chế phẩm dinh dưỡng còn thể tùy ý chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều chất khoáng sau đây hoặc dẫn xuất của chúng: boron, canxi, canxi axetat, canxi gluconat, canxi clorua, canxi lactat, canxi phosphat, canxi sulfat, clorua, crom, crom clorua, crom picolonat, đồng, đồng sulfat, đồng gluconat, đồng (II) sulfat, florua, sắt, cacbonyl sắt, sắt (III), sắt (II) fumarat, sắt (III) orthophosphat, bột sắt, polysacarit sắt, iodua, iot, magie, magie cacbonat, magie hydroxit, magie oxit, magie stearat, magie sulfat, mangan, molypden, phospho, kali, kali phosphat, kali iodua, kali clorua, kali axetat, selen, lưu huỳnh, natri, docusat natri, natri clorua, natri selenat, natri molypdat, kẽm, kẽm oxit, kẽm sulfat và hỗn hợp của chúng. Các dẫn xuất lấy làm ví dụ mà không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế bao gồm muối, muối kiềm, este và chelat của hợp chất vô cơ bất kỳ. Chất khoáng có thể được thêm vào chế phẩm dinh dưỡng ở dạng muối như canxi phosphat, canxi glyxerol phosphat, natri xitrat, kali clorua, kali phosphat, magie phosphat, sắt (II) sulfat, kẽm sulfat, đồng (II) sulfat, mangan

sulfat, và natri selenit. Vitamin và chất khoáng bổ sung có thể được thêm vào như đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, sữa công thức dành cho trẻ nhỏ, hoặc được sản xuất bằng cách sử dụng sáng chế, không chứa sữa của người hoặc của động vật hoặc các phần chiết của chúng có chứa DPA.

Theo phương án khác, hàm lượng omega-6 DPA trong tổng lượng axit béo của sữa công thức dành cho trẻ nhỏ nhỏ hơn 2%, tốt hơn là nhỏ hơn 1%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,1% đến 2%, tốt hơn nữa là không có mặt.

Chế phẩm

Sáng chế cũng bao hàm các chế phẩm, đặc biệt là dược phẩm, chứa một hoặc nhiều axit béo và/hoặc các dầu tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế, tốt hơn là ở dạng etyl este của axit béo.

Dược phẩm có thể chứa một hoặc nhiều axit béo và/hoặc dầu, phối hợp với chất mang, tá dược hoặc chất dẫn dược dụng không độc, chuẩn, đã biết rõ như nước muối đệm phosphat, nước, etanol, polyol, dầu thực vật, chất thấm ướt hoặc nhũ tương như nhũ tương dầu/nước. Dược phẩm này có thể là ở dạng rắn hoặc dạng lỏng. Ví dụ, dược phẩm có thể là dạng viên nén, viên nang, chất lỏng hoặc bột tiêu hóa được, tiêm được, pomat đặc hoặc kem dùng tại chỗ. Có thể duy trì độ lỏng chính xác, ví dụ, bằng cách duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp là hệ phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Cũng có thể mong muốn đưa các chất đẳng trương vào, ví dụ, đường, natri clorua, và các chất tương tự. Bên cạnh các chất làm loãng trơ như vậy, dược phẩm cũng có thể bao gồm các chất phụ trợ, như chất thấm ướt, chất nhũ hóa và tạo huyền phù, chất làm ngọt, chất tạo hương vị và chất tạo mùi.

Huyền phù, ngoài các hoạt chất, có thể bao gồm chất tạo huyền phù như rượu isostearylic etoxyl hóa, polyoxyetylen sorbitol và sorbitan este, xenluloza vi tinh thể, nhôm metahydroxit, bentonit, aga-aga, và tragacan hoặc hỗn hợp của các chất này.

Dạng phân liều rắn như viên nén và viên nang có thể được bào chế bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các axit béo được sản xuất theo sáng chế có thể được tạo viên nén với các chất nền dùng cho viên nén thông dụng như lactoza, sucroza, và tinh bột ngô phối hợp với chất kết dính như acaxia, tinh bột ngô hoặc gelatin, chất làm rã như tinh bột khoai tây hoặc axit alginic, và chất làm trơn như axit stearic hoặc magie stearat. Viên nang có thể được bào chế bằng cách đưa các tá dược này vào nang gelatin cùng với chất chống oxy hóa và (các) axit béo thích hợp.

Để sử dụng trong tĩnh mạch, các axit béo được tạo ra theo sáng chế hoặc dẫn xuất của chúng có thể được đưa vào các chế phẩm thương mại.

Liều lượng thông thường của axit béo cụ thể nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 20g, dùng từ 1 đến 5 lần mỗi ngày (lên đến 100g hằng ngày) và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10mg đến 1, 2, 5, hoặc 10g hằng ngày (dùng một hoặc nhiều liều). Như đã biết trong lĩnh vực này, cần tối thiểu khoảng 300mg axit béo/ngày, đặc biệt là LC-PUFA. Tuy nhiên, biết rõ rằng lượng axit béo bất kỳ đều có lợi cho đối tượng sử dụng.

Đường dùng có thể của dược phẩm theo sáng chế, ví dụ, bao gồm đường dùng trong ruột (ví dụ, đường miệng và trực tràng) và ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, chế phẩm lỏng có thể được sử dụng qua đường miệng hoặc qua đường trực tràng. Ngoài ra, hỗn hợp đồng nhất có thể được phân tán hoàn toàn trong nước, trộn trong điều kiện vô khuẩn với chất làm loãng, chất bảo quản, chất đệm hoặc chất đẩy sinh lý để tạo ra thuốc phun mù hoặc thuốc xông hít.

Liều lượng dược phẩm được sử dụng cho bệnh nhân có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và phụ thuộc các yếu tố khác nhau như trọng lượng của bệnh nhân, tuổi của bệnh nhân, sức khỏe chung của bệnh nhân, bệnh sử của bệnh nhân, trạng thái miễn dịch của bệnh nhân, v.v..

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho các mục đích mỹ phẩm. Nó có thể được bổ sung vào các chế phẩm mỹ phẩm đã có sao cho tạo thành hỗn hợp hoặc axit béo tạo ra theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng thành phần "hoạt tính" duy nhất trong mỹ phẩm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Nguyên liệu và phương pháp

Biểu hiện gen ở tế bào thực vật trong hệ biểu hiện tạm thời

Các cấu trúc gen ngoại sinh được biểu hiện trong các tế bào thực vật trong hệ biểu hiện tạm thời như được mô tả về cơ bản bởi Voinnet et al. (2003) và Wood et al. (2009).

<u>Phân tích sắc ký khí (GC) các axit béo</u>

FAME được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí có sử dụng thiết bị Agilent Technologies 7890A GC (Palo Alto, California, USA) được trang bị cột 30m SGE-BPX70 (70% xyanopropyl polysilphenylen-siloxan, đường kính trong 0,25mm, độ dầy màng 0,25mm), FID, bộ phận bơm tách/không tách và bộ phận lấy mẫu và bơm tự động Agilent Technologies 7693 Series. Heli được sử dụng làm khí mang. Mẫu được bơm theo kiểu tách (tỷ lệ 50:1) ở nhiệt độ lò là 150°C. Sau khi bơm, nhiệt độ lò được giữ ở 150°C trong 1 phút sau đó nâng lên 210°C với tốc độ 3°C/phút, nâng tiếp đến 240°C với tốc độ 50°C/phút và cuối cùng giữ trong 1,4 phút ở 240°C. Các đỉnh được định lượng bằng phần mềm Agilent Technologies ChemStation (Rev B,04,03 (16),

Palo Alto, California, USA) dựa trên đáp ứng của lượng đã biết của chất chuẩn ngoại GLC-411 (Nucheck) và chất chuẩn nội C17:0-ME.

Phân tích sắc ký lỏng-phổ khối (LC-MS) lipit

Toàn bộ lipit được chiết ra khỏi hạt đang phát triển đã được làm đông khô, mười hai ngày sau khi ra hoa (daf), và các hạt già sau khi bổ sung một lượng đã biết tri-C17:0-TAG làm chất chuẩn nội định lượng. Lipit chiết tách được hòa tan vào trong 1ml hydroxytoluen butyl hóa 10mM trong butanol:metanol (tỷ lệ 1:1, thể tích) trên mỗi 5mg nguyên liệu khô và phân tích bằng cách sử dụng thiết bị phổ LC-MS ba tứ cực ion hóa phun điện tử Agilent 1200 series LC và 6410b. Các lipit được phân tách sắc ký bằng cách sử dụng cột Ascentis Express RP-Amide (50mm x 2,1mm, 2,7μm, Supelco) hoạt động ở gradien nhị nguyên với tốc độ dòng là 0,2ml/phút. Pha động là: A. Amoni format 10mM trong H_2O:metanol:tetrahydrofuran (50:20:30, thể tích); B. Amoni format 10mM trong H_2O:metanol:tetrahydrofuran (5:20:75, thể tích). Danh sách điều kiện giám sát đa phản ứng (MRM: multiple reaction monitoring) dựa trên các axit béo chính sau đây: 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 có sử dụng năng lượng va chạm bằng 30V và năng lượng phân mảnh bằng 60V. MRM TAG riêng rẽ được xác định dựa trên tiền ion amoniac hóa và ion sản phẩm từ sự mất phân tử trung hòa là 22:6. TAG được định lượng bằng cách sử dụng chất chuẩn ngoại tristearin 10μM.

Xác định profin của lipit bằng LC-MS

Toàn bộ lipit chiết tách được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị Agilent 1200 series LC kết hợp với thiết bị QQQ-MS ion hóa phun điện tử Agilent 6410B (Agilent, Palo Alto, California, USA). 5μl mỗi dịch chiết lipit toàn phần được tách sắc ký bằng cột HPLC Ascentis Express RP-Amide 50mm x 2,1mm, 2,7μm (Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia) bằng cách sử

dụng gradien nhị phân với tốc độ dòng 0,2ml/phút. Pha động là: A. amoni format 10mM trong H_2O:metanol:tetrahydrofuran (50:20:30, thể tích); B. amoni format 10mM trong H_2O:metanol:tetrahydrofuran (5:20:75, thể tích.). Lipit trung hòa trung gian đã chọn (TAG và DAG) và phospholipit (PL, kể cả PC, PE, PI, PS, PA, PG) được phân tích bằng phương pháp theo dõi đa phản ứng (MRM) bằng cách sử dụng năng lượng va chạm bằng 30V và năng lượng phân mảnh bằng 60V. Các lipit trung hòa được hướng đích trên các axit béo chủ yếu sau đây: 16:0 (axit palmitic), 18:0 (axit stearic), 18:1ω9 (axit oleic, OA), 18:2ω6 (axit linoleic, LA), 18:3ω3 (axit α-linolenic, ALA), 18:4ω3 (axit stearidonic, SDA), 20:1, 20:2, 20:3, 20:4ω3, 20:5ω3, 22:4ω3, 22:5ω3, 22:6ω3, trong lúc đó phospholipit được quét chứa các loại C_{16}, C_{18}, C_{20} và C_{22} tương ứng có các liên kết đôi 0-3, 0-4, 0-5, 4-6.

MRM TAG riêng rẽ được xác định dựa trên tiền ion được amoniac hóa và ion sản phẩm từ sự mất phân tử trung hòa là 20:1, SDA, EPA và DHA. TAG và DAG được định lượng bằng cách sử dụng tristearin 50μM và distearin làm chuẩn ngoại. PL được định lượng bằng di-18:0-PC, di-17:0-PA, di-17:0-PE, 17:0-17:1-PG, di-18:1-PI và di-17:0-PS 10uM làm chuẩn ngoại (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA). Các loại TAG, DAG và PL đã chọn được xác nhận tiếp bằng Agilent 6520 Q-TOF MS/MS.

Xác định profin axit béo của hạt và hàm lượng dầu

Để xác định hàm lượng dầu trong hạt, hạt được làm khô trong bình hút ẩm trong 24 giờ đến 4mg hạt được chuyển vào lọ thủy tinh dung tích 2ml với nắp có ren được bọc bằng Teflon. 0,05mg triheptadecanoin hòa tan trong 0,1ml toluen được cho vào lọ làm chất chuẩn nội.

FAME trong hạt được điều chế bằng cách bổ sung 0,7ml HCl 1N trong metanol (Supelco) vào lọ chứa nguyên liệu hạt, khuấy nhanh và ủ ở 80°C trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, 0,3ml NaCl 0,9%

(trọng lượng/thể tích) và 0,1ml hexan được thêm vào lọ và trộn kỹ trong 10 phút trên thiết bị Heidolph Vibramax 110. FAME được thu hồi vào trong ống lồng thủy tinh 0,3ml và phân tích GC bằng bộ phát hiện ion hóa ngọn lửa (FID: flame ionization detector) như đã nêu trên.

Diện tích đỉnh của FAME riêng lẻ đầu tiên được hiệu chỉnh trên cơ sở kết quả diện tích đỉnh của lượng đã biết của các FAME tương tự có trong chất chuẩn GLC-411 thương mại (NU-CHEK PREP, INC., USA). GLC-411 chứa các lượng bằng nhau của 31 axit béo (% trọng lượng), nằm trong khoảng từ C8:0 đến C22:6. Trong trường hợp axit béo không có trong chất chuẩn, các tác giả lấy kết quả diện tích đỉnh của FAME giống nhất. Ví dụ, kết quả diện tích đỉnh của các FAME là 16:1d9 được sử dụng cho 16:1d7 và kết quả FAME của C22:6 được sử dụng cho C22:5. Các diện tích đã hiệu chỉnh được sử dụng để tính khối lượng của mỗi FAME trong mẫu bằng cách so sánh với khối lượng chất chuẩn nội. Dầu được lưu trữ chủ yếu ở dạng TAG và khối lượng của nó được tính toán dựa trên khối lượng FAME. Số mol tổng cộng của glyxerol được xác định bằng cách tính số mol của mỗi FAME và chia tổng số mol của FAME cho ba. TAG được tính là tổng của glyxerol và các gốc axyl béo bằng hệ thức: % dầu theo trọng lượng= 100x ((41x tổng số mol FAME/3)+(tổng số g FAME- (15x tổng số mol FAME)))/g hạt, trong đó 41 và 15 lần lượt là trọng lượng phân tử của gốc glyxerol và nhóm metyl.

<u>Phân tích hàm lượng sterol trong mẫu dầu</u>

Các mẫu chứa xấp xỉ 10mg dầu cùng với phần phân ước C24:0 monol bổ sung làm chất chuẩn nội được xà phòng hóa bằng 4ml KOH 5% trong MeOH 80% và gia nhiệt trong 2 giờ ở 80°C trong ống thủy tinh có nắp xoáy được bọc bằng Teflon. Sau khi hỗn hợp phản ứng được làm mát, 2ml nước Milli-Q được bổ sung vào và sterol được chiết vào trong 2ml hexan:diclometan (4:1, thể tích) bằng cách lắc và lắc xoáy. Hỗn hợp này được

ly tâm và phần chiết sterol được lấy ra và rửa bằng 2ml nước Milli-Q. Sau đó, phần chiết sterol được lấy ra sau khi lắc và ly tâm. Phần chiết này được làm bay hơi bằng cách sử dụng dòng khí nitơ và sterol silyl hóa bằng 200ml BSTFA và gia nhiệt trong 2 giờ ở 80°C.

Để phân tích GC/GC-MS các sterol, dẫn xuất sterol-OTMSi được làm khô trong trong điều kiện dòng khí nitơ trên khối nhiệt ở 40°C và sau đó hòa tan lại trong cloform hoặc hexan ngay trước khi phân tích GC/GC-MS. Các dẫn xuất sterol-OTMS được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí (GC) có sử dụng thiết bị Agilent Technologies 6890A GC (Palo Alto, California, USA) được lắp với cột mao dẫn được nhồi silic oxit Supelco Equity™-1 (đường kính bên trong 15m x 0,1mm, độ dầy màng 0,1μm), FID, bơm tách/không tách và thiết bị lấy mẫu và bơm tự động Agilent Technologies 7683B Series. Heli là khí mang. Mẫu được bơm theo kiểu không tách ở nhiệt độ lò là 120°C. Sau khi bơm, nhiệt độ lò được nâng lên 270°C ở tốc độ 10°C/phút và cuối cùng là đến 300°C ở tốc độ 5°C/phút. Các đỉnh được định lượng bằng phần mềm Agilent Technologies ChemStation (Palo Alto, California, USA). Kết quả GC có sai số ±5% diện tích từng thành phần riêng biệt.

Phân tích GC-phổ khối (GC-MS) được thực hiện trên hệ thống GC-MS Finnigan Thermoquest GCQ và GC-MS Finnigan Thermo Electron Corporation; cả hai hệ thống đều được lắp với bơm trên cột và phần mềm Thermoquest Xcalibur (Austin, Texas, USA). Mỗi thiết bị GC được lắp với cột mao dẫn có độ phân cực tương đương với độ phân cực được mô tả trên đây. Các thành phần riêng biệt được xác định bằng cách sử dụng số liệu phổ khối và bằng cách so sánh số liệu thời gian lưu với số liệu thu được của các chất chuẩn đáng tin cậy và chất chuẩn phòng thí nghiệm. Việc phân tích mẫu trống trong quy trình đầy đủ được thực hiện đồng thời với mẻ mẫu.

Điều kiện RT-PCR

Thông thường, sự khuếch đại phiên mã ngược-PCR (RT-PCR: Reverse transcription-PCR) được thực hiện bằng cách sử dụng hệ RT-PCR Superscript III One-Step (Invitrogen) trong thể tích 25µl có sử dụng 10pmol đoạn mồi xuôi và 30pmol đoạn mồi ngược, $MgSO_4$ đến nồng độ cuối là 2,5mM, 400ng toàn bộ ARN với chất đệm và các thành phần nucleotit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chế độ nhiệt độ thông thường là: 1 chu kỳ 45°C trong 30 phút để xảy ra phiên mã ngược; sau đó 1 chu kỳ 94°C trong 2 phút, tiếp đó là 40 chu kỳ 94°C trong 30 giây, 52°C trong 30 giây, 70°C trong 1 phút; sau đó 1 chu kỳ 72°C trong 2 phút trước khi làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến 5°C.

Xác định số lượng bản sao của gen chuyển bằng phương pháp PCR số

Để xác định số lượng bản sao của gen chuyển trong cây chuyển gen, phương pháp PCR số được sử dụng như sau. Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để xác định liệu cây có là chuyển gen đối với các trúc di truyền được mô tả ở đây hay không. Khoảng một cm^2 mô lá được thu hoạch từ mỗi cây riêng rẽ và đặt trong ống microtube (Qiagen) thu gom. Sau đó, mẫu được làm đông khô trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ. Để phá vỡ mẫu để chiết ADN, các ổ bi bằng thép không gỉ được cho vào mỗi mẫu khô và ống được lắc trên máy phân giải mô Qiagen Tissue. 375µl dung dịch đệm chiết (Tris-HCl 0,1M, pH=8, EDTA 0,05M, pH=8 và SDS 1,25%) được cho vào mỗi ống, hỗn hợp này được ủ ở 65°C trong 1 giờ, và sau đó làm nguội trước khi 187µl amoni axetat 6M (4°C) được cho vào mỗi ống cùng với việc trộn kỹ. Sau đó, mẫu được ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 3000 vòng/phút. Phần nổi lên trên từ mỗi ống được cho vào các ống microtube mới, mỗi ống chứa 220µl isopropanol để kết tủa ADN ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. ADN được thu hồi bằng cách ly tâm ống ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 30 phút,

hạt ADN được rửa bằng 320µl etanol 70% và làm khô trước khi ADN được tạo huyền phù lại trong 225µl nước. Chất không hòa tan được tạo hạt bằng cách ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 20 phút, và 150µl mỗi dịch nổi lên trên được chuyển vào đĩa 96 lỗ để bảo quản trong thời gian dài.

Đối với phương pháp PCR số định lượng và có hiệu quả (ddPCR), ADN được tiêu hóa bằng enzym giới hạn trước phản ứng khuếch đại, để đảm bảo rằng nhiều bản sao của các gen chuyển hoặc nhiều mảnh ghép được tách ra về mặt vật lý. Do đó, các phần phân ước của chế phẩm ADN được tiêu hóa bằng *Eco*RI và *Bam*HI, cùng với nhau, trong các thể tích 20µl bằng cách sử dụng dung dịch đệm 10x *Eco*RI, 5µl ADN khoảng 4 đơn vị của mỗi enzym mỗi mẫu, ủ qua đêm ở 37°C.

Các đoạn mồi được sử dụng trong phản ứng PCR này được thiết kế bằng cách sử dụng phần mềm Primer3 để xác nhận rằng các đoạn mồi đối với gen tham chiếu và gen đích không được phỏng đoán để tương tác, hoặc tương tác này sẽ không phải là vấn đề trong các điều kiện được sử dụng. Gen tham chiếu được sử dụng trong thử nghiệm này là gen *Hmg* canola (nhóm có độ linh động cao), có mặt ở mỗi hệ gen canola (Weng et al., 2004). Do canola là alotetraploit, có 4 bản sao của gen *Hmg*, nghĩa là 2 alen của mỗi trong số hai gen, trong *Brassica napus*. Các phản ứng của gen tham chiếu sử dụng cặp đoạn mồi và đoạn dò được đánh dấu kép, như sau: Đoạn mồi có nghĩa, Can11 GCGAAGCACATCGAGTCA (SEQ ID NO:50); Đoạn mồi đối nghĩa, Can12 GGTTGAGGTGGTAGCTGAGG (SEQ ID NO:51); đoạn dò, Hmg-P3 5'-Hex/TCTCTAC/zen/CCGTCTCACATGACGC/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO:52). Kích thước của sản phẩm khuếch đại là 73bp.

Trong một phản ứng khuếch đại gen đích phát hiện vùng gen đánh dấu chọn lọc được *PPT* để sàng lọc tất cả các cây chuyển gen, đoạn mồi có nghĩa là Can17, ATACAAGCACGGTGGATGG (SEQ ID NO:53); đoạn mồi đối

nghĩa là Can18 TGGTCTAACAGGTCTAGGAGGA (SEQ ID NO:54); đoạn dò là PPT-P3 5'-/FAM/TGGCAAAGA/zen/GATTTCGAGCTTCCTGC/ 3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO:55). Kích thước của sản phẩm khuếch đại gen đích là 82bp. Trong một số trường hợp, thử nghiệm gen đích thứ hai được thực hiện song song để phát hiện các mảnh ghép một phần của T-DNA. Thử nghiệm thứ hai này phát hiện vùng của gen Δ6-desaturaza bằng cách sử dụng đoạn mồi có nghĩa Can23 CAAGCACCGTAGTAAGAGAGCA (SEQ ID NO:56), đoạn mồi đối nghĩa Can24 CAGACAGCCTGAGGTTAGCA (SEQ ID NO:57); đoạn dò D6des-P3 5'-/FAM/TCCCCACTT/zen/ CTTAGCGAAAGGAACGA/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO:58). Kích thước của sản phẩm khuếch đại gen đích này là 89bp. Các phản ứng thường sử dụng 2µl chế phẩm ADN đã tiêu hóa enzym. Chế phẩm phản ứng đối với mỗi mẫu: đoạn mồi có nghĩa tham chiếu (10pM), 1µl; đoạn mồi đối nghĩa tham chiếu (10pM), 1µl; đoạn dò của gen tham chiếu (10pM), 0,5µl; đoạn mồi có nghĩa của gen đích (10pM), 1µl; đoạn mồi đối nghĩa của gen đích (10pM), 1µl; đoạn dò gen đích (10pM), 0,5µl; hỗn hợp chất phản ứng ddPCR, 12,5µl; nước 5,5µl trong toàn bộ thể tích 25µl.

Sau đó, hỗn hợp này được cho vào máy tạo giọt nhỏ QX100, phân bố mỗi mẫu thành 20000 hạt nhỏ có kích thước nanolit. Việc này được thực hiện trong hộp có 8 lỗ cho đến khi tất cả các mẫu đều được xử lý và chuyển vào đĩa PCR có 96 lỗ. Sau đó, đĩa này được hàn bằng nhiệt có sử dụng lá kim loại có thể đục lỗ được bằng cách sử dụng máy hàn đĩa. Sau đó, mẫu được xử lý trong các điều kiện sau: 95°C, 10 phút, ram ở 2,5°C/giây; sau đó 39 chu kỳ 94°C, 30 giây ram ở 2,5°C/giây; 61°C, 1 phút, ram ở 2,5°C/giây; 98°C, 10 phút, tiếp đó làm lạnh đến 12°C. Sau phản ứng khuếch đại ADN ở trong các giọt nhỏ, đĩa được cho vào trong máy đọc giọt QX100 phân tích mỗi giọt riêng rẽ bằng cách sử dụng hệ phát hiện hai màu (được đặt để phát hiệu FAM

hoặc Hex). Số liệu PCR số của giọt được hiển thị dưới dạng hoặc đồ thị 1-D với mỗi giọt từ mẫu được vẽ trên biểu đồ cường độ phát huỳnh quang, hoặc đồ thị 2-D plot trong đó sự phát huỳnh quang (FAM) được vẽ dựa vào sự phát huỳnh quang (Hex) đối với mỗi giọt. Phần mềm đó số giọt dương tính và âm tính đối với mỗi sự phát huỳnh quang (FAM hoặc Hex) trong mỗi mẫu. Sau đó, phần mềm này được làm khớp phân đoạn chứa các giọt dương tính với thuật toán Poisson để xác định nồng độ của phân tử ADN đích theo đơn vị bản sao/µl đầu vào. Mức thay đổi số lượng bản sao được tính bằng cách sử dụng công thức: CNV= (A/B)* Nb, trong đó A= nồng độ của gen đích, B= nồng độ của gen tham chiếu, và Nb = 4, số lượng bản sao của gen tham chiếu trong hệ gen.

Đánh giá khả năng sống của phấn hoa

Fluoresxein diaxetat (FDA) được hòa tan trong axeton ở nồng độ 2mg/ml để tạo ra dung dịch gốc. Các dịch loãng FDA được điều chế ngay trước khi sử dụng bằng cách bổ sung các giọt dung dịch gốc FDA vào 2ml dung dịch sucroza (0,5M) cho tới khi đạt được sự bão hòa như được thể hiện bởi sự có mặt của sự mờ đục ổn định.

Propidi iodua (PI) được hòa tan trong nước chưng cất vô khuẩn ở nồng độ 1mg/ml để tạo ra dung dịch gốc. Ngay trước khi sử dụng, 100µl dung dịch gốc được cho vào 10ml nước chưng cất vô khuẩn để tạo ra dung dịch làm việc. Để kiểm tra tỷ lệ của phấn hoa sống sót không sống sót, các dung dịch gốc PI và FDA được trộn theo tỷ lệ 2:3.

Cây canola và mù tạc chuyển gen và kiểu dại được trồng trong các điều kiện chuẩn trong nhà kính ở 22±2°C với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ mỗi ngày. Các nụ hoa trưởng thành nở vào ngày hôm sau được đánh dấu và thu hồi vào buổi sáng tiếp theo lúc 9-10 giờ sáng. Phấn hoa từ các bông hoa đã nở được nhuộm màu bằng hỗn hợp FDA/PI và được hiển thị bằng cách sử dụng kính

hiển vi huỳnh quang Leica MZFLIII. Bộ lọc phát xạ chuyển tiếp dài GFP-2 510nm (phát ánh sáng đỏ và xanh lá) với bộ lọc kích thích 480/40nm được sử dụng để phát hiện phấn hoa sống sót và không sống sót. Phấn hoa không sống sót mà đã hấp thụ thuốc nhuộm PI hiệm màu đỏ dưới kính hiển vi huỳnh quang trong khi phấn hoa sống sót hiện màu xanh lá tươi khi nhuộm bằng PI và FDA.

Ví dụ 2. Biểu hiện ổn định của con đường tổng hợp DHA chuyển gen ở hạt *Camelina sativa*

Vectơ kép pJP3416-GA7 (xem Fig.2 và SEQ ID NO: 1) được đưa vào chủng *A. tumefaciens* AGL1 và các tế bào từ môi trường nuôi cấy chứa *Agrobacterium* biến nạp được sử dụng để xử lý *C. sativa* đang ra hoa bằng cách sử dụng phương pháp nhúng chìm hoa để biến nạp (Lu and Kang, 2008). Sau khi cây phát triển và trưởng thành, hạt T_1 từ cây đã xử lý được thu hoạch, gieo lên trên đất và cây thu được được xử lý bằng cách phun thuốc diệt cỏ BASTA để lựa chọn cây chuyển gen và biểu hiện gen đánh dấu chọn lọc được *bar* có mặt trên T-ADN của pJP3416-GA7. Cây T_1 sống sót sẽ có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ được trồng đến khi trưởng thành sau khi để chúng tự thụ phấn, và hạt T_2 tạo ra được thu hoạch. Năm cây chuyển gen được thu gom, chỉ ba trong số chúng chứa T-ADN nguyên vẹn.

Lipit được chiết từ nhóm khoảng hai mươi hạt từ mỗi trong số ba cây chứa T-ADN nguyên vẹn. Hai trong số ba mẫu được lấy nhóm chứa hàm lượng DHA rất thấp, khó phát hiện được, nhưng nhóm thứ ba chứa khoảng 4,7% DHA. Do đó, lipit được chiết từ 10 hạt T_2 riêng biệt từ cây này và chế phẩm axit béo được phân tích bởi GC. Số liệu thành phần axit béo của các hạt riêng biệt của dòng biến nạp này cũng được thể hiện trong Bảng 4. Số liệu thu thập từ profin toàn bộ lipit hạt (Bảng 4) được thể hiện trong Bảng 5.

DHA có mặt trong 6 trong số 10 hạt riêng rẽ. 4 hạt còn lại không chứa DHA và được giả định là thể phân ly không mà không có T-DNA, dựa trên độ bán hợp tử của đoạn xen T-DNA trong cây bố mẹ. Lipit chiết tách từ hạt đơn có hàm lượng DHA cao nhất có 9,0% DHA trong lúc đó tổng của các phần trăm EPA, DPA và DHA bằng 11,4%.

Bảng 4. Thành phần axit béo của toàn bộ lipit hạt từ hạt T_2 *Camelina sativa* chuyển gen được biến nạp bởi T-ADN từ pJP3416-GA7. Thành phần axit béo được thể hiện theo mẻ hạt được phân nhóm (FD5.46) và với 10 hạt riêng lẻ được xếp loại (trái sang phải) từ mức DHA cao nhất đến thấp nhất.

Axit béo	**Nhóm 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

Bảng 5. Số liệu thu thập từ profin toàn bộ lipit hạt từ hạt chuyển gen như được thể hiện trong Bảng 4. Kết quả tính toán không bao gồm 'các axit béo thứ yếu' trong Bảng 4.

Thông số	Nhóm FD5.46	# 2	# 4	# 8	# 7	# 9	# 1	# 3	# 5	# 6	# 10
Tổng ω3 (% của toàn bộ FA)	36,1	46	45,4	45	48,2	44,2	40,1	28,9	29,9	30,2	28,9
Tổng ω6 (% của toàn bộ FA)	25,8	20,4	20,7	20,3	19,5	21,1	25	33,7	32,6	31,8	33,8
Tỷ lệ ω3/ω6	1,40	2,25	2,19	2,22	2,47	2,09	1,60	0,86	0,92	0,95	0,86
Tỷ lệ ω6/ω3	0,71	0,44	0,46	0,45	0,40	0,48	0,62	1,17	1,09	1,05	1,17
Tổng ω3 mới (% của toàn bộ FA)	8,1	18,5	18	16,9	18,6	15,2	12	0	0	0	0,1
Tổng ω6 mới (% của toàn bộ FA)	1,1	2,2	1,2	1,1	1	1	1,2	1,5	2,3	2	2,2
Tỷ lệ ω3/ω6 mới	7,36	8,41	15,00	15,36	18,60	15,20	10,00				0,05
Tỷ lệ ω6/ω3 mới	0,14	0,12	0,07	0,07	0,05	0,07	0,10				22,00
Hiệu suất OA thành EPA	8,2%	15,6%	15,5%	15,1%	15,1%	12,8%	10,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
Hiệu suất OA thành DHA	6,7%	12,3%	11,6%	11,5%	11,4%	10,0%	7,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Hiệu suất LA thành EPA	9,2%	17,2%	17,1%	16,7%	16,2%	13,9%	11,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%
Hiệu suất LA thành DHA	7,6%	13,6%	12,9%	12,7%	12,3%	10,9%	7,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Hiệu suất ALA thành EPA	15,8%	24,8%	24,9%	24,2%	22,8%	20,6%	18,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%
Hiệu suất ALA thành DHA	13,0%	19,6%	18,7%	18,4%	17,2%	16,1%	12,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Toàn bộ a xit bão hòa	17,6	17,8	17,8	17,6	18	17,8	18,1	18,2	17,7	17,8	18,1
Toàn bộ axit không bão hòa đơn	19,8	15,5	16	16,6	14,3	16,6	16,8	18,7	19,3	19,6	18,6
Tổng lượng axit béo không bão hòa đa	62,5	66,6	66,4	65,6	67,7	65,6	65,1	63	63,1	62,5	63,2
Toàn bộ C20	9,6	9,3	9,8	9,9	8,1	8,9	8,5	8,6	11	10,3	10,1
Toàn bộ C22	5,4	10,3	10	9,7	9,4	8,3	5,7	0,6	0,9	0,7	0,7
Tỷ lệ C20/C22	1,78	0,90	0,98	1,02	0,86	1,07	1,49	14,33	12,22	14,71	14,43

Thu được hạt đồng hợp tử từ dòng này ở thế hệ T4. Lên đến 10,3% DHA được tạo ra ở trường hợp FD5-46-18-110 với mức trung bình 7,3% DHA quan sát được trong toàn bộ thế hệ T4. Thế hệ tiếp theo (T5) được thiết lập để thử nghiệm tiếp độ ổn định của quá trình sản sinh PUFA qua nhiều thế hệ, cụ thể là DHA. Hàm lượng DHA tối đa quan sát được được nhận ra là ổn định ở thế hệ thứ năm, mặc dù hàm lượng DHA trong hạt đã phân nhóm không ổn định cho tới thế hệ T_4 do sự có mặt của nhiều locut gen chuyển. Các mẻ hạt T_5 cũng được nảy mầm trên môi trường MS *in vitro* sát cạnh hạt *C. sativa* bố mẹ mà không có sự khác biệt rõ rệt về hiệu quả nảy mầm hoặc tốc độ nảy mầm quan sát được. Các thế hệ tiếp theo của dòng chuyển gen (thế hệ T6, T7, v.v.) không thể hiện sự giảm DHA bất kỳ trong hạt. Các cây chuyển gen là hữu thụ đực và cái đầy đủ, và hạt phấn thể hiện độ sống sót khoảng 100% như đối với cây kiểu dại. Việc phân tích hàm lượng dầu trong hạt có hàm lượng DHA khác nhau không xác định sự tương quan giữa hàm lượng DHA và hàm lượng dầu, ngược lại với tương quan được nhận thấy ở *Arabidopsis thaliana.*

Trong một số dòng chuyển gen khác, hàm lượng DHA của hạt đơn từ các sự kiện độc lập vượt quá 12%. Tỷ lệ chuyển gen:vô hiệu của các dòng này được phát hiện là nằm trong khoảng từ 3:1 đến 15:1. Việc phân tích profin axit béo đại diện từ các mẫu có DHA cao nhất từ mỗi cấu trúc chỉ phát hiện được 1,2-1,4% GLA mà không phát hiện thấy ω6 PUFA mới khác. Ngược lại, ω3 PUFA (SDA), ω3 LC-PUFA (ETA, EPA, DPA, DHA) mới được phát hiện là tích tụ tới 18,5% với hàm lượng DHA bằng 9,6% trong tổng lượng axit béo. Hiệu suất khử bão hòa Δ6 là 32% và EPA là 0,8% trong tổng lượng axit béo. Hiệu suất kéo dài mạch Δ5 là 93% và hiệu suất kéo dài mạch Δ6 là 60%. DHA được phát hiện trong phân đoạn lipit hạt phân cực của dòng GA7.

Lưu ý rằng tỷ lệ phân ly quan sát được (~3:1 đến ~15:1) cho biết rằng một hoặc tối đa hai locut gen chuyển cần tạo ra hàm lượng DHA trong *C. sativa* giống như hàm lượng DHA trong dầu cá. Điều này có ý nghĩa quan trọng vì cùng với nó tính trạng chuyển gen có thể được tạo ra cũng như đối với độ ổn định của gen chuyển.

Hạt đồng hợp tử được trồng trong một vài nhà kính để thu được tổng cộng hơn 600 cây riêng rẽ. Dầu được chiết ra khỏi hạt bằng nhiều phương pháp bao gồm chiết Soxhlet, axeton và hexan.

Phép phân tích độ đặc hiệu vùng ^{13}C NMR được thực hiện trên hạt chứa dầu *C. sativa* chuyển gen để xác định sự phân bố vị trí của ω3 LC-PUFA trên TAG. Sự kiện có EPA và DHA gần bằng nhau được chọn để tối ưu hóa đáp ứng đối với các axit béo này và tỷ lệ của *sn*-1,3 và *sn*-2 được phát hiện bằng 0,75:0,25 đối với EPA và 0,86:0,14 đối với DHA, trong đó sự phân bố khách quan là 0,66:0,33. Đó là, 75% EPA và 86% DHA có mặt ở vị trí *sn*-1,3 của TAG. Điều này chỉ ra rằng cả hai axit béo này có mặt ưu tiên ở vị trí *sn*-1,3 trong TAG *C. sativa* mặc dù sự ưu tiên đối với EPA yếu hơn đối với DHA. Phát hiện trong đó DHA được tìm thấy nhiều hơn trên *sn*-1,3 là tương tự với các kết quả trước đây đã được báo cáo trong hạt *A. thaliana* (Petrie et al., 2012).

Do chỉ nhận được một số lượng nhỏ các dòng chuyển gen độc lập trong thử nghiệm biến nạp được mô tả trên đây, các quá trình biến nạp *C. sativa* khác được thực hiện bằng cách sử dụng cấu trúc GA7-modB (Ví dụ 4). Thu được nhiều thể biến nạp hơn và các dòng đồng hợp tử tạo ra với lượng dư 20,1% DHA được xác định.

Ví dụ 3. Sửa đổi T-ADN mã hóa con đường tổng hợp DHA ở hạt cây

Để cải thiện mức tạo ra DHA trong *B. napus* tăng hơn so với mức được mô tả trong WO2013/185184, các vectơ kép pJP3416-GA7-modA, pJP3416-

GA7-modB, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416-GA7-modE và pJP3416-GA7-modF được xây dựng như được mô tả trong WO2013/185184 và được thử nghiệm trên cây chuyển gen. Các vectơ kép này là biến thể của cấu trúc pJP3416-GA7 và được thiết kế để làm tăng hơn nữa khả năng tổng hợp DHA ở hạt cây, cụ thể là bằng cách cải thiện chức năng Δ6-desaturaza và Δ6-elongaza. SDA đã được quan sát thấy là tích lũy trong một số hạt được gây biến nạp bằng cấu trúc GA7 do hiệu suất kéo dài mạch Δ6 tương đối thấp so với Δ5-elongaza, vì vậy trong số các biến đổi khác, hai vị trí gen elongaza được chuyển vào trong T-ADN.

Hai trình tự mã hóa elongaza trong pJP3416-GA7 được chuyển vào trong các vị trí của chúng trên T-ADN để thu được pJP3416-GA7-modA bằng cách đầu tiên là tách dòng cátxét Δ6-elongaza *P. cordata* mới nằm giữa các vị trí *Sbf*I của pJP3416-GA7 để thay thế cátxét Δ5-elongaza *P. cordata*. Cấu trúc này được sửa đổi tiếp bằng cách trao đổi gen khởi đầu FP1 điều khiển Δ6-desaturaza *M. pusilla* với gen khởi đầu conlinin Cnl2 (pLuCnl2) để tạo ra pJP3416-GA7-modB. Sự biến đổi này được thực hiện nhằm cố gắng làm tăng mức biểu hiện Δ6-desaturaza và do đó làm tăng hiệu suất enzym. Cho rằng gen khởi đầu Cnl2 có thể gây ra mức biểu hiện gen chuyển cao hơn ở *B. napus* so với gen khởi đầu napin bị cắt ngang.

Tám cây *A. thaliana* pJP3416-GA7-modB chuyển gen và 15 cây *A. thaliana* pJP3416-GA7-modG chuyển gen được tạo ra. Quan sát thấy mức DHA trong nhóm hạt pJP3416-GA7-modB nằm trong khoảng từ 3,4% đến 7,2% và mức DHA trong nhóm hạt T2 pJP3416-GA7-modG nằm trong khoảng từ 0,6 đến 4,1%. Một vài sự kiện pJP3416-GA7-modB có mức DHA cao nhất được gieo trên môi trường lựa chọn và cây giống con sống sót được sử dụng cho thế hệ tiếp theo. Hạt được phân tích hàm lượng DHA. Do hạt T1 thu gom được là quần thể đang phân ly đối với gen chuyển và bao gồm các thể phân ly vô hiệu bất kỳ, hy vọng là các hạt đồng hợp tử từ cây thế hệ con

sẽ có mức DHA gia tăng, lên đến 30% tổng hàm lượng axit béo trong dầu hạt. Các cấu trúc được sửa đổi khác được sử dụng để gây biến nạp *A. thaliana*. Mặc dù chỉ thu được một số lượng nhỏ dòng biến nạp, không thu được các mức DHA nào cao hơn so với cấu trúc modB.

Cấu trúc pJP3416-GA7-modB cũng được sử dụng để tạo ra cây *B. napus* biến nạp của giống nuôi cấy Oscar và của các nhóm dòng nhân giống được ký hiệu là NX002, NX003, NX005, NX050, NX052 và NX054. Toàn bộ 1558 cây biến nạp thu được bao gồm 77 cây biến nạp độc lập (T0) đối với sự biến nạp Oscar, và 1480 cây độc lập đối với các dòng nhân giống kể cả 189 đối với NX005 là dòng có hàm lượng axit oleic cao trong dầu ép hạt của nó do các đột biến trong gen FAD2. Các dòng nhân giống khác có hàm lượng LA và ALA cao hơn. Cây chuyển gen có nhiều hơn 4 bản sao T-DNA như được xác định bằng phương pháp PCR số (Ví dụ 1) được loại bỏ; khoảng 25% cây T0 được loại bỏ bởi tiêu chí này. Khoảng 53% cây chuyển gen T0 có 1 hoặc 2 bản sao T-DNA như được xác định bởi phương pháp PCR số, 12% cây chuyển gen T0 có khoảng 3 bản sao và 24% cây chuyển gen T0 có nhiều hơn 4 bản sao. Hạt (hạt T1) được thu hoạch từ khoảng 450 dòng chuyển gen sau khi tự thụ phấn, đạt được bằng cách bọc cây trong quá trình ra hoa để tránh thụ phấn chéo. Hạt T1 được thu hoạch từ phần còn lại của cây chuyển gen khi trưởng thành. Khoảng 1-2% dòng thực vật hoặc là bất thụ đực hoặc cái và không tạo ra hạt sống được, các cây T0 này được loại bỏ.

Các nhóm hạt (20 hạt T1 trong mỗi nhóm) được thử nghiệm về hàm lượng DHA trong hạt chứa dầu đã được phân nhóm, và các dòng có hàm lượng cao nhất được lựa chọn. Cụ thể là, các dòng có hàm lượng DHA bằng ít nhất 2% của tổng lượng axit béo trong hạt T1 đã được phân nhóm được lựa chọn. Khoảng 15% dòng chuyển gen được lựa chọn theo cách này; 85% còn lại được bỏ đi. Một số dòng trong số chúng được gọi là các dòng CT132-5 (trong giống nuôi cấy Oscar), CT133-15, -24, -63, -77, -103, -129 và -130

(trong NX005). Các dòng đã chọn trong NX050 bao gồm CT136-4, -8, -12, -17, -19, -25, -27, -49 và -51. Hai mươi hạt từ CT132.5 và 11 hạt từ CT133.15 được để hút ẩm, sau hai ngày, dầu được chiết từ một nửa lá phôi từ mỗi hạt riêng lẻ. Một nửa lá phôi còn lại với trục phôi được giữ lại và nuôi cấy trên môi trường để duy trì dòng cây con đặc hiệu. Thành phần axit béo trong dầu được xác định; số liệu được thể hiện trong Bảng 6 đối với CT132.5. Hàm lượng DHA của mười trong số 20 hạt được phân tích là nằm trong khoảng từ 7-20% tổng lượng axit béo như được xác định bằng phép phân tích GC. Các hạt khác có hàm lượng DHA thấp hơn 7% và có thể chứa bản sao một phần (không hoàn toàn) của T-ADN từ pJP3416-GA7-modB. Dòng chuyển gen dường như chứa nhiều đoạn xen gen chuyển không được liên kết về di truyền. Hạt của dòng chuyển gen CT133.15 có hàm lượng DHA nằm trong khoảng từ 0-5%. Hạt không có DHA có khả năng là của cây phân ly vô hiệu. Số liệu này khẳng định rằng cấu trúc modB có thể hiện tốt sự sản sinh DHA trong hạt canola.

20 hoặc 40 hạt riêng rẽ (T2 hạt) thu được từ mỗi trong số nhiều cây T1, sau khi tự thụ phấn, từ các dòng biến nạp đã chọn được thử nghiệm riêng rẽ về thành phần axit béo. Hạt chứa DHA ở hàm lượng lớn hơn 20% được xác định (Bảng 7). Hai mẫu đại diện, CT136-27-18-2 và CT136-27-18-19 tương ứng có hàm lượng DHA là 21,2% và 22,7%. Toàn bộ lượng axit béo ω3 trong các hạt này bằng khoảng 60% dưới dạng phần trăm trong tổng lượng axit béo, và lượng ω6 là thấp hơn 10%. Các nhóm khác nữa bao gồm 20 hoặc 40 hạt T2 từ mỗi cây T1 được thử nghiệm về thành phần axit béo. Hạt chứa tới 34,3% DHA được xác định, ví dụ trong hạt CT136-27-47-25 (Bảng 9). Thành phần axit béo của dầu ép hạt thu được từ CT136-27-47-25 được thể hiện trong Bảng 9. Thành phần axit béo bao gồm 34,3% DHA cùng với khoảng 1,5% DPA, 0,6% EPA và 0,5% ETA. Hàm lượng SDA bằng khoảng 7,5%, ALA khoảng 21,9% và LA khoảng 6,9%. ω6 PUFA mới có 1,1% GLA

nhưng không phát hiện được ω6-C20 hoặc -C22 LC-PUFA. Tổng lượng axit béo bão hòa: 9,6%; axit béo không bão hòa đơn: 12,5%; toàn bộ PUFA: 75,2%; toàn bộ ω6-PUFA (kể cả LA): 7,2%; toàn bộ ω3-PUFA: 66,9%; tỷ lệ của tổng lượng axit béo ω6:ω3 = 9,3:1; axit béo ω6 mới:ω3 mới = 37:1. Hiệu suất của mỗi bước enzym từ axit oleic thành DHA là như sau: Δ12-desaturaza 90%; Δ15/ω3-desaturaza 89%; Δ6-desaturaza 67%; Δ6-elongaza 83%; Δ5-desaturaza 99%; Δ5-elongaza 98%; Δ4-desaturaza 96%. Hiệu suất toàn phần của quá trình chuyển hóa axit oleic thành DHA bằng khoảng 50%. Do đó, rõ ràng rằng hạt tạo ra DHA với hàm lượng nằm trong khoảng từ 20,1 đến 35% trong tổng lượng axit béo của dầu ép hạt có thể được xác định và chọn lọc, kể cả hạt có hàm lượng DHA nằm trong khoảng từ 20,1% đến 30% hoặc nằm trong khoảng từ 30% và 35% trong tổng lượng axit béo.

Hàm lượng dầu trong một số hạt bị giảm từ khoảng 44% trong hạt kiểu dại đến khoảng 31-39% ở một số hạt sản sinh DHA, như tương tự với hàm lượng kiểu dại ở các hạt khác sản sinh DHA.

Các dòng cây chuyển gen khác sản sinh DHA ở hàm lượng ít nhất 10% trong hạt T2 được lai chéo và thế hệ con F1 được tự thụ phấn để tạo ra thế hệ con F2 đồng hợp tử đối với nhiều đoạn xen T-DNA. Dầu ép ạt từ hạt đồng hợp tử được phân tích và DHA trong hạt chứa dầu chiếm tới 30% hoặc 35% trong tổng lượng axit béo.

TAG trong dầu thu được từ CT136-27-18-2 và CT136-27-18-19 được phân tích bằng thử nghiệm đặc hiệu miền ^{13}C NMR đối với sự phân bố vị trí của DHA trên trục chính glyxerol của phân tử TAG. DHA được liên kết ưu tiên ở vị trí *sn*-1,3. Trên 70%, thực ra là trên 90% DHA ở vị trí *sn*-1,3.

Trong một số dòng chuyển gen khác nữa, hàm lượng DHA của hạt đơn từ các cây độc lập vượt quá 12%. Tỷ lệ chuyển gen:vô hiệu của các dòng này được phát hiện bằng khoảng 3:1, tương ứng với locut chuyển gen duy nhất,

hoặc 15:1, tương ứng với hai locut chuyển gen. Phân tích profin axit béo đại diện từ các mẫu từ mỗi cấu trúc có hàm lượng DHA cao nhất tìm thấy chỉ 1,2-1,4% GLA mà không phát hiện được ω6 PUFA mới khác. Ngược lại, ω3 PUFA mới (SDA) và ω3 LC-PUFA (ETA, EPA, DPA, DHA) tích tụ đến giá trị tổng cộng bằng 25,8% đối với cấu trúc modF và 21,9% đối với cấu trúc modG so với 18,5% đối với hạt biến nạp GA7. Hàm lượng DHA trong dầu từ các hạt này tương ứng bằng 9,6%, 12,4% và 11,5%. Sự khử bão hòa Δ6 được phát hiện ở hạt biến nạp GA7 thấp hơn ở hạt biến nạp modF và modG (32% so với 47% và 43%) và điều này gây ra sự giảm hàm lượng ALA ở hạt modF và modG so với GA7. Sự khác biệt đáng chú ý khác là sự tích tụ của EPA ở hạt modF (3,3% so với 0,8% ở hai hạt chuyển gen khác) và điều này được phản ánh ở việc giảm sự kéo dài mạch Δ5 quan sát được ở hạt modF (80%)so với hạt GA7 và modG (93% và 94%). Có sự tăng nhẹ sự kéo dài mạch Δ6 ở các hạt này (66% so với 60% và 61%) mặc dù lượng SDA thực tế lại giảm do sự khử bão hòa phần nào có hoạt tính mạnh hơn. DHA được phát hiện trong phân đoạn lipit hạt phân cực của dòng GA7.

Thành phần axit béo được phân tích của lipit trong hạt T1 của 70 cây chuyển gen độc lập của dòng nhân giống NX54 *B. napus* được biến nạp bằng T-DNA của cấu trúc modB. Nhận thấy rằng một trong số các cây chuyển gen này sinh ra hạt có DPA nhưng không có DHA trong dầu ép hạt. Hạt T1 của dòng này (CT-137-2) sinh ra khoảng 4% DPA mà không phát hiện thấy có DHA trong hạt được phân nhóm T1. Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm xem có phải là do sự làm bất hoạt gen Δ4-desaturaza ở T-DNA, cụ thể được xen vào, do sự đột biến tự phát. Phép phân tích PCR và đọc trình tự DNA cho thấy sự có mặt của đoạn xóa, mà được xác định là có các nucleotit đã bị loại bỏ 12988-15317 của T-DNA của GA7-modB (SEQ ID NO: 2). Các nucleotit đã loại bỏ này tương ứng với phần gen khởi đầu Linus Cnl2 dẫn đến sự biểu hiện của vùng mã hóa Δ4-desaturaza cũng như bản thân vùng mã hóa Δ4-

desaturasza, giải thích vì sao hạt được chuyển gen bằng T-DNA chứa đoạn xóa không tạo ra DHA.

Khoảng 50 hạt T1 từ dòng chuyển gen này được làm nảy mầm và một lá mầm nhú lên từ mỗi hạt được phân tích về thành phần axit béo trong dầu còn lại. Sau đó, các cây con chọn lọc có trên 5% DPA được phát triển đến trưởng thành và hạt T2 được thu hoạch. Thành phần axit béo của các hạt đã phân nhóm được thể hiện trong Bảng 8, hàm lượng DPA lớn hơn 7% được quan sát thấy ở các dòng này. Hạt T4 được tạo ra ở dòng CT-137-2 chứa DPA của *B. napus* và được phân tích profin axit béo. Nhận được tối đa tới 13% DPA ở các mẫu hạt già đã được phân nhóm.

Dầu từ hạt chứa khoảng 10% DPA được xử lý bằng kiềm nhẹ để thủy phân axit béo.

Một dòng chuyển gen khác được ký hiệu là B0003-514 thể hiện khoảng 10-16% DPA trong hạt T2. Hạt chứa 15,8% DPA, 0,2-0,9% DHA và 0,1-2,5% EPA được lựa chọn. Tập hợp hạt T2 cho thấy tỷ lệ phân tách 1:2:1 đối với DPA cao:trung bình:không có, cho biết sự có mặt của locut di truyền duy nhất để sản sinh DPA trong dòng chuyển gen này.

Dầu được chiết bằng máy ép kiểu vít ra khỏi mẫu hạt tạo ra LC-PUFA, bằng cách đó tạo ra bột hạt.

<u>Xây dựng cấu trúc</u>

Trong khi trọng tâm của thử nghiệm này là chứng minh sự tạo ra DHA và DPA ở loài cây có hạt chứa dầu, các kết quả nêu trên cũng được quan tâm xuất phát từ triển vọng thiết kế cấu trúc. Đầu tiên, chuyển vùng mã hóa Δ6- và Δ5-elongaza định vị trong cấu trúc modF tạo ra sự thay đổi profin dự định với nhiều EPA hơn được tích tụ do sự kéo dài mạch Δ5 ít hơn. Sự tăng kéo dài mạch Δ6 kéo theo được quan sát thấy nhưng điều này không làm cho hàm lượng SDA thấp hơn. Điều này là do việc tăng sự khử bão hòa Δ6 ở hạt biến

nạp modF, gây ra bởi việc bổ sung cátxét biểu hiện Δ6-desaturaza *M. pusilla* bổ sung cũng như bởi việc thay thế gen khởi đầu napin bị cắt cụt (FP1) bằng gen khởi đầu conlinin2 của cây lanh. Sự tăng thấp hơn một chút sự khử bão hòa Δ6 ghi nhận được với cấu trúc modG được gây ra bằng cách lợi dụng cátxét Δ5-elongaza được biểu hiện ở mức cao trong GA7. Sự chuyển các vị trí của vùng mã hóa Δ6-desaturaza và Δ5-elongaza làm khử bão hòa Δ6 nhiều hơn. Hoạt tính Δ5-elongaza không bị giảm trong trường hợp này do sự thay thế của gen khởi đầu FP1 bằng gen khởi đầu Cnl2.

Số liệu này xác nhận rằng các cấu trúc modB, modF và modG thực hiện tốt quá trình sản sinh DHA trong hạt *Camelina*, như đối với *Arabidopsis* và canola.

Các tác giả sáng chế cho rằng, nói chung, hiệu lực của enzym giới hạn tốc độ hoạt động trong con đường tổng hợp DHA có thể lớn hơn ở các thể biến nạp nhiều bản sao so với các thể biến nạp T-DNA một bản sao, hoặc có thể được gia tăng bằng cách xen vào nhiều gen T-DNA mã hóa enzym mà có thể làm hạn chế con đường này. Chứng cứ đối với tầm quan trọng có thể của thể biến nạp nhiều bản sao được nhận thấy trong hạt *Arabidopsis* được biến nạp bằng cấu trúc GA7, ở đó sự kiện có hiệu suất DHA cao nhất có ba T-DNA được xen vào hệ gen chủ. Các gen này có thể là các thể biến dị giống nhau, hoặc tốt hơn là khác nhau mã hóa cùng một polypeptit, hoặc dưới sự kiểm soát của các gen khởi đầu khác nhau mà có kiểu biểu hiện chồng lặp. Ví dụ, sự biểu hiện gia tăng có thể đạt được bằng cách biểu hiện nhiều vùng mã hóa Δ6-desaturaza, thậm chí ở nơi mà cùng một protein được tạo ra. Trong pJP3416-GA7-modF và pJP3416-GA7-modC, ví dụ, hai biến thể của Δ6-desaturaza *M. pusilla* có mặt và được biểu hiện bằng các gen khởi đầu khác nhau. Các trình tự mã hóa có sự sử dụng codon khác nhau và do đó trình tự nucleotit khác nhau, để làm giảm sự làm câm gen tiềm năng hoặc các tác động đồng ức chế nhưng tạo ra sự sản sinh của cùng một protein.

Bảng 6. Thành phần axit béo của lipit trong hạt *B. napus* chuyển gen T1 đang nảy mầm chứa T-DNA từ cấu trúc GA7-modB. Lipit cũng chứa từ 0,1-0.3% mỗi axit béo C16:1, C16:3, C24:0 và C24:1, và không chứa C20:1Δ11.

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

Bảng 7. Thành phần axit béo của lipit trong hạt *B. napus* chuyển gen T2 chứa T-DNA từ cấu trúc GA7-modB.

Mẫu (hạt T2)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:5ω3	C22:6ω3	Total ω3 (%)	Tổng ω6 (%)	Tỷ lệ ω6:ω3	Tổng lượng PUFA (%)
CT136-27-18-1	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
CT136-27-18-2	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
CT136-27-18-3	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
CT136-27-18-4	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
CT136-27-18-5	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
CT136-27-18-6	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
CT136-27-18-7	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
CT136-27-18-8	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
CT136-27-18-9	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
CT136-27-18-10	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
CT136-27-18-11	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
CT136-27-18-12	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
CT136-27-18-13	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
CT136-27-18-14	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
CT136-27-18-15	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
CT136-27-18-18	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
CT136-27-18-19	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
CT136-27-18-20	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

ARA (C20:4ω6) và DPAω6 không được phát hiện trong bất kỳ mẫu nào. Các mẫu này cũng chứa khoảng 0,2% hoặc 0,3% C16:1, khoảng từ 0,1 đến 0,3% C16:3, khoảng từ 0,7% đến 1,0% C20:0, khoảng 0,3% C22:0, và một số mẫu chứa các lượng vết (<0,1%) của C20:1Δ13, C22:3ω3, C24:0 và C24:1

Bảng 8. Thành phần axit béo của lipit trong hạt *B. napus* chuyển gen T2 được biến nạp bằng T-DNA có cấu trúc modB, có sự đột biến ở gen Δ4-desaturaza. Các lipit này cũng chứa khoảng 0,1% 14:0, 0,2% 16:3, 0,2-0,4% GLA, 0,1% 20:1Δ13, 0,3-0,4% 22:0, và ARA, DPAω6 (22:5ω6), 16:2 và 22:1 không phát hiện được.

	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
CT-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
CT-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
CT-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
CT-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
CT-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

Bảng 9. Thành phần axit béo của dầu ép hạt từ hạt T2 của *B. napus* được biến nạp bằng T-DNA từ 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	C22:5ω6	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	1,5	34,3

Mẫu dầu ép hạt cũng chứa 0,1% C14:0; 0,2% C16:1; 0,1% C20:3ω6; no C22:1 và C22:2ω6; 0,1% C24:0 và 0,2% C24:1, 2.6% các axit béo khác.

Ví dụ 4. Phân tích TAG từ hạt *A. thaliana* chuyển gen tạo ra DHA

Sự phân bố vị trí của DHA trên TAG từ hạt *A. thaliana* biến nạp được xác định bằng phương pháp NMR. Toàn bộ lipit được chiết ra từ khoảng 200mg hạt bằng cách đầu tiên nghiền chúng trong hexan trước khi chuyển hạt đã nghiền vào ống thủy tinh chứa 10ml hexan. Ống này được gia nhiệt ở khoảng 55°C trong chậu nước và sau đó quay và ly tâm. Dung dịch hexan được loại bỏ và quy trình được lặp lại 4 x 10ml nữa. Dịch chiết được thu gom, cô bằng cách làm bay hơi quay và TAG trong lipit chiết tách được tinh chế ra khỏi các lipit phân cực bằng cách cho đi qua cột silic oxit ngắn có sử dụng 20ml dietyl ete 7% trong hexan. Sự phân bố vị trí của nhóm axyl trên TAG tinh khiết được xác định định lượng như đã được mô tả trước đây (Petrie et al., 2010a và b).

Phân tích này chỉ ra rằng phần lớn DHA trong toàn bộ dầu của hạt nằm ở vị trí *sn*-1/3 của TAG và một phần nhỏ được tìm thấy ở vị trí *sn-2*. Điều này là trái ngược với TAG từ các hạt sinh ARA chứng minh rằng 50% ARA ($20:4^{\Delta 5,8,11,14}$) nằm ở vị trí *sn-2* của dầu canola chuyển gen, trong khi chỉ 33% được hy vọng là sự phân bố ngẫu nhiên (Petrie et al., 2012).

Toàn bộ lipit từ hạt *A. thaliana* chuyển gen cũng được phân tích bởi LC-MS ba tứ cực để xác định kiểu triaxylglyxerol (TAG) chứa DHA chủ yếu. Kiểu TAG chứa DHA nhiều nhất được thấy là DHA-18:3-18:3 (TAG 58:12; danh pháp này không có tính chất mô tả sự phân bố vị trí) có mức cao thứ hai là DHA-18:3-18:2 (TAG 58:11). Quan sát thấy Tri-DHA TAG (TAG 66:18) trong toàn bộ dầu hạt, mặc dù thấp nhưng vẫn ở mức có thể phát hiện được. Các kiểu TAG chứa DHA chủ yếu khác bao gồm DHA-34:3 (TAG 56:9), DHA-36:3 (TAG 58:9), DHA-36:4 (TAG 58:10), DHA-36:7 (TAG 58:13) và DHA-38:4 (TAG 60:10). Sự giống nhau của hai kiểu TAG chứa DHA chủ yếu được khẳng định thêm bởi Q-TOF MS/MS.

Ví dụ 5. Phân tích hàm lượng sterol và thành phần trong dầu

Sterol thực vật từ 12 mẫu dầu thực vật mua được từ các nguồn thương mại tại Úc được xác định tính chất bằng phép phân tích GC và MS là các dẫn xuất O-trimetylsilyl ete (OTMSi-ete) như mô tả trong Ví dụ 1. Sterol được xác định bởi số liệu lưu, số liệu phổ khối và so sánh với số liệu phổ khối chuẩn lý thuyết và thực hành. Sterol được định lượng bằng cách sử dụng chất chuẩn nội 5β(H)-cholan-24-ol. Cấu trúc sterol thực vật cơ bản và cấu trúc hóa học của một số sterol đã xác định được thể hiện trên Fig.3 và Bảng 10.

Dầu thực vật được phân tích là từ: vừng (*Sesamum indicum*), ôliu (*Olea europaea*), hướng dương (*Helianthus annus*), thầu dầu (*Ricinus communis*), canola (*Brassica napus*), rum (*Carthamus tinctorius*), lạc (*Arachis hypogaea*), lanh (*Linum usitatissimum*) và đậu nành (*Glyxin max*). Với hàm lượng tương đối giảm dần qua tất cả các mẫu dầu, sterol thực vật chủ yếu là: β-sitosterol (nằm trong khoảng từ 28 đến 55% của toàn bộ lượng sterol), Δ5-avenasterol (isofucosterol) (3-24%), campesterol (2-33%), Δ5-stigmasterol (0.7-18%), Δ7-stigmasterol (1-18%) và Δ7-avenasterol (0,1-5%). Một vài sterol thứ yếu khác được xác định, chúng là: cholesterol, brassicasterol, chalinasterol, campestanol và eburicol. Bốn sterol C29:2 và hai C30:2 sterol cũng được phát hiện, nhưng nghiên cứu tiếp theo là cần thiết để hoàn thành việc xác định các thành phần thứ yếu này. Ngoài ra, một vài sterol chưa được xác định khác có mặt trong một số dầu nhưng do hàm lượng của chúng rất thấp, phổ khối không đủ mạnh để có thể xác định cấu trúc của chúng.

Bảng 10. Tên IUPAC/hệ thống của sterol đã xác định.

Sterol số	Tên thông thường	Tên IUPAC/hệ thống
1	cholesterol	cholest-5-en-3β-ol
2	brassicasterol	24-metylcholesta-5,22E-dien-3β-ol
3	chalinasterol/24-metylen cholesterol	24-metylcholesta-5,24(28)E-dien-3β-ol
4	campesterol/24-metylcholesterol	24-metylcholest-5-en-3β-ol
5	campestanol/24-metylcholestanol	24-metylcholestan-3β-ol
7	Δ5-stigmasterol	24-etylcholesta-5,22E-dien-3β-o l
9	ergost-7-en-3β-ol	24-metylcholest-7-en-3β-ol
11	Eburicol	4,4,14-trimthylergosta-8,24(28)-dien-3β-ol
12	β-sitosterol/24-etylcholesterol	24-etylcholest-5-en-3β-ol
13	D5-avenasterol/isofucosterol	24-etylcholesta-5,24(28)Z-dien-3β-ol
19	D7-stigmasterol/stigmast-7-en-3b-ol	24-etylcholest-7-en-3β-ol
20	D7-avenasterol	24-etylcholesta 7,24(28)-dien-3β-ol

Hàm lượng sterol được biểu hiện dưới dạng mg/g dầu với lượng giảm dần là: dầu canola (6,8mg/g), dầu vừng (5,8mg/g), dầu lanh (4,8-5,2mg/g), dầu hướng dương (3,7-4,1mg/g), dầu lạc (3,2mg/g), dầu hoa rum (3,0mg/g), dầu đậu nành (3,0mg/g), dầu oliu (2,4mg/g), dầu thầu dầu (1,9mg/g). Thành phần của sterol tính theo % và tổng lượng sterol được thể hiện trong Bảng 11.

Trong số tất cả các mẫu dầu hạt, sterol thực vật chủ yếu thường là β-sitosterol (nằm trong khoảng từ 30-57% của tổng hàm lượng sterol). Có khá nhiều dầu có tỷ lệ của sterol chính khác: campesterol (2-17%), Δ5-stigmasterol (0.7-18%), Δ5-avenasterol (4-23%), Δ7-stigmasterol (1-18%). Dầu từ các loài khác nhau có profin sterol khác nhau với một số dầu có profin hoàn toàn khác biệt. Trong trường hợp của dầu canola, nó có tỷ lệ campesterol cao nhất (33,6%), trong khi các loài khác thường có hàm lượng thấp hơn, ví dụ lên đến 17% trong dầu lạc. Dầu rum có tỷ lệ tương đối cao

của Δ7-stigmasterol (18%), trong khi sterol thường thấp trong dầu của các loài khác, lên đến 9% trong dầu hướng dương. Do chúng khác biệt ở mỗi loài, do đó profin sterol có thể được sử dụng để hỗ trợ việc xác định đặc điểm của dầu thực vật cụ thể và để kiểm tra tính xác thực của chúng hoặc sự pha trộn chúng với các dầu khác.

Hai mẫu của mỗi dầu hướng dương và dầu rum được so sánh, trong mỗi trường hợp một mẫu được tạo ra bằng cách ép lạnh hạt và không tinh chế, trong khi đó mẫu còn lại không được ép lạnh và được tinh chế. Mặc dù, đã nhận thấy một số khác biệt, hai nguồn dầu có thành phần sterol và tổng lượng sterol tương tự, đề xuất rằng quá trình xử lý và tinh chế có ảnh hưởng ít đến hai thông số này. Hàm lượng sterol trong các mẫu thay đổi gấp 3 lần và nằm trong khoảng từ 1,9mg/g đến 6,8mg/g. Dầu canola có hàm lượng sterol cao nhất và dầu thầu dầu có hàm lượng sterol thấp nhất.

Ví dụ 6. Tăng sự tích tụ DHA và DPA ở vị trí *sn*-2 trong TAG

Các tác giả sáng chế cho rằng sự tích tụ DHA và/hoặc DPA ở vị trí *sn*-2 trong TAG có thể được gia tăng bằng cách đồng biểu hiện 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT) cùng với con đường sinh tổng hợp DHA hoặc DPA như đạt được bởi cấu trúc GA7 hoặc các thể biến dị của nó. LPAAT được ưu tiên là LPAAT có thể tác động lên axyl C22 béo không bão hòa đa-CoA dưới dạng cơ chất, tốt hơn là DHA-CoA và/hoặc DPA-CoA, đặc biệt là các cách có thể sử dụng cả DHA-CoA và DPA-CoA làm cơ chất, làm gia tăng sự xen vào của mạch C22 không bão hòa đa ở vị trí *sn*-2 của LPA để tạo ra PA, so với LPAAT nội sinh. Enzym LPAAT bào tương thường thể hiện các ưu tiên cơ chất thay đổi, đặc biệt là khi loài này tổng hợp và tích thụ axit béo bất thường trong TAG. LPAAT2 từ *Limnanthes douglasii* thể hiện là sử dụng erucoyl-CoA (C22:1-CoA) dưới dạng cơ chất đối với sự tổng hợp

PA, ngược lại với LPAAT1 từ cùng một loài mà không thể sử dụng cơ chất C22 (Brown et al., 2002).

Bảng 11. Hàm lượng sterol và thành phần dầu thực vật được phân tích.

Tên thông thường của sterol	Vừng	Oliu	Hướng dương	Thầu dầu	Canola	Cây rum	Lạc	Cây lanh	Đậu tương
cholesterol	0,2	0,8	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2
brassicasterol	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0
chalinasterol/24-metylen cholesterol	1,5	0,1	0,3	1,1	2,4	0,2	0,9	1,5	0,8
campesterol/24-methylcholesterol	16,2	2,4	7,4	8,4	33,6	12,1	17,4	15,7	16,9
campestanol/24-methylcholestanol	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-stigmasterol	6,4	1,2	7,4	18,6	0,7	7,0	6,9	5,1	17,6
chưa biết	0,5	1,3	0,7	0,8	0,7	0,7	0,4	0,7	1,3
ergost-7-en-3β-ol	0,1	0,1	1,9	0,2	0,4	2,7	1,4	1,4	1,0
chưa biết	0,0	1,3	0,9	1,2	0,9	1,8	1,2	0,7	0,7
eburicol	1,6	1,8	4,1	1,5	1,0	1,9	1,2	3,5	0,9
β-sitosterol/24-ethylcholesterol	55,3	45,6	43,9	37,7	50,8	40,2	57,2	29,9	40,2
Δ5-avenasterol/ isofucosterol	8,6	16,9	7,2	19,3	4,4	7,3	5,3	23,0	3,3
Rượu triterpenoit	0,0	2,4	0,9	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,9
Rượu triterpenoit	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0
Δ7-stigmasterol/stigmast-7-en-3β-ol	2,2	7,1	9,3	2,3	0,9	10,5	1,1	7,9	5,6
Δ7-avenasterol	1,3	0,1	4,0	0,6	0,2	2,0	0,7	0,4	0,6
Tổng lượng sterol (mg/g dầu)	5,8	2,4	4,1	1,9	6,8	3,2	3,2	4,8	3,0

C29:2* là sterol C29 với hai liên kết đôi

Các LPAAT đã biết được xem xét và một số được chọn để thử nghiệm, bao gồm một số chất không được dự tính là làm tăng sự hợp nhất DHA ở vị trí *sn-2*, làm đối chứng. Các LPAAT đã biết bao gồm: LPAAT2 từ *Arabidopsis thaliana*: (SEQ ID NO: 40, Số hiệu lưu trữ: ABG48392, Kim et al., 2005), LPAAT từ *Limnanthes alba* (SEQ ID NO: 41, Số hiệu lưu trữ: AAC49185, Lassner et al., 1995), Slc1p từ *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 42, Số hiệu lưu trữ: NP_010231, Zou et al., 1997), LPAAT1 từ *Mortierella alpina* (SEQ ID NO: 44, Số hiệu lưu trữ: AED33305; Patent Mỹ số 7879591) và LPAAT từ *Brassica napus* (SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO:46, Số hiệu lưu trữ lần lượt là: ADC97479 và ADC97478).

LPAAT2 từ *Arabidopsis* (cũng ký hiệu là LPAT2) là enzym vị trí ở lưới nội bào thể hiện là có hoạt tính trên cơ chất C16 và C18, tuy nhiên hoạt tính trên cơ chất C20 hoặc C22 chưa được kiểm tra (Kim et al., 2005). LPAAT2 từ *Limnanthes alba* được chứng minh là xen chuỗi axyl C22:1 vào vị trí *sn-2* của PA, mặc dù khả năng sử dụng DHA hoặc DPA làm cơ chất không được kiểm tra (Lassner et al., 1995). LPAAT Slc1p từ *S. cerevisiae* đã chọn thể hiện là có hoạt tính bằng cách sử dụng 22:1-CoA ngoài 18:1-CoA làm cơ chất, cho biết rằng tính đặc hiệu cơ chất là lớn đối với chiều dài mạch (Zou et al., 1997). Một lần nữa, DHA-CoA và các LC-PUFA khác không được thử nghiệm làm cơ chất. Trước đây, LPAAT từ *Mortierella* được thể hiện là có hoạt tính trên cơ chất axit béo EPA và DHA trong *Yarrowia lipolytica* chuyển gen (US 7879591) nhưng hoạt tính của nó trong tế bào thực vật là chưa được biết đến.

Các LPAAT khác được xác định bởi các tác giả sáng chế. *Micromonas pusilla* là một vi tảo sản sinh và tích tụ DHA trong dầu của nó, mặc dù sự phân bố vị trí của DHA trên TAG trong loài này chưa được khẳng định.

LPAAT *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 43, Số hiệu lưu trữ: XP_002501997) được xác định bằng cách tìm kiếm trình tự hệ gen *Micromonas pusilla* bằng LPAAT2 *Arabidopsis* làm trình tự truy vấn BLAST. Một số trình tự dự phòng xuất hiện và trình tự XP_002501997 được tổng hợp để thử nghiệm trên trên C22 LC-PUFA. LPAAT từ *Ricinus communis* được chú thích là LPAAT giả định trong trình tự hệ gen thầu dầu (Chan et al., 2010). Bốn LPAAT dự phòng từ hệ gen thầu dầu được tổng hợp và thử nghiệm trong dịch phân giải lá thô chứa mô lá *N. benthamiana* đã thấm lọc. Trình tự dự phòng được mô tả ở đây thể hiện hoạt tính LPAAT.

Một số LPAAT dự phòng được sắp hàng với các LPAAT đã biết trên cây hệ thống sinh học. Chú ý rằng LPAAT từ *Micromonas* giả định không cụm lại với C22 LPAAT giả định mà là trình tự phân hướng.

Dưới dạng thử nghiệm ban đầu của các LPAAT khác nhau về khả năng của chúng trong việc sử dụng DHA-CoA và/hoặc DPA-CoA làm cơ chất, các cấu trúc gen khảm được tạo ra để biểu hiện cơ bản LPAAT ngoại sinh trong lá *N. benthamiana*, mỗi cấu trúc dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu 35S, như sau: 35S:Arath-LPAAT2 (*Arabidopsis* ER LPAAT); 35S:Limal-LPAAT (*Limnanthes alba* LPAAT); 35S:Sacce-Slc1p (*S. cerevisiae* LPAAT); 35S:Micpu-LPAAT (*Micromonas pusilla* LPAAT); 35S:Moral-LPAAT1 (*Mortierella alpina* LPAAT); 35S:Brana-LPAAT1,13 (*Brassica napus* LPAAT1,13); 35S:Brana-LPAAT1,5 (*Brassica napus* LPAAT1,5). Cấu trúc 35S:p19 không có LPAAT ngoại sinh được sử dụng làm đối chứng trong thử nghiệm này, nó được đưa vào trong mỗi lần cấy truyền *N. benthamiana*. Mỗi cấu trúc trong số các cấu trúc này được đưa qua *Agrobacterium* vào trong lá *N. benthamiana* như mô tả trong Ví dụ 1, và 5 ngày sau khi thấm lọc, vùng lá đã được xử lý này được cắt và nghiền để làm dịch phân giải lá. Mỗi dịch phân giải chứa LPAAT ngoại sinh cũng như enzym nội sinh để tổng hợp LPA. Các

phản ứng *in vitro* được thiết lập bằng cách bổ sung riêng rẽ OA được đánh dấu ^{14}C và DHA được đánh dấu ^{14}C vào dịch phân giải. Các hỗn hợp phản ứng được ủ ở 25°C và mức hợp nhất của axit béo được đánh dấu ^{14}C vào trong PA được xác định bởi phương pháp TLC. Khả năng của mỗi LPAAT để sử dụng DHA tương ứng với ARA và các axit béo C18 được đánh giá. LPAAT của Meadowfoam (*Limnanthes alba*), *Mortierella* và *Saccharomyces* được phát hiện là có hoạt tính trên cơ chất DHA, với PA được đánh dấu phóng xạ có ở các LPAAT này nhưng không có ở các LPAAT khác. Tất cả LPAAT được khẳng định là có hoạt tính bởi nguồn kiểm soát axit oleic.

Để thử nghiệm hoạt tính LPAAT trong hạt, nhiều trình tự mã hóa protein hoặc LPAAT được xen vào vectơ kép dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu conlinin (pLuCnl2). Các cấu trúc gen thu được lần lượt chứa gen khảm, Cnl2:Arath-LPAAT (đối chứng âm), Cnl2:Limal-LPAAT, Cn2:Sacce-Slc1p, và Cnl2:Moral-LPAAT, sau đó được sử dụng để biến nạp cây *A. thaliana* sản sinh DHA để tạo ra thể biến nạp ổn định biểu hiện LPAAT và con đường tổng hợp DHA chuyển gen theo cách đặc hiệu với hạt để kiểm tra liệu việc đó sẽ có làm tăng sự hợp nhất của DHA ở vị trí *sn-2* của TAG. Các cấu trúc này cũng được sử dụng để gây biến nạp cây *B. napus* và *C. sativa* đã chứa cấu trúc GA7 và thể biến dị của nó (Ví dụ 2 và 3) để tạo ra cây con mang cả cấu trúc gen bố mẹ và LPAAT. Sự hợp nhất DHA và/hoặc DPA ở vị trí *sn-2* của TAG tăng lên được hy vọng là có liên quan đến sự hợp nhất DHA ở thực vật không có các gen chuyển mã hóa LPAAT. Hàm lượng dầu cũng được cải thiện trong hạt, cụ thể đối với hạt tạo ra hàm lượng DHA cao hơn.

Cấu trúc pCnl2 đặc hiệu hạt:Moral-LPAAT1 được sử dụng để biến nạp dòng *Arabidopsis thaliana* đã được chuyển gen đồng hợp tử đối với T-DNA từ cấu trúc GA7 và có hạt chứa khoảng 15% DHA trong lipit hạt (Petrie et al., 2012). Đối với việc này, sử dụng gen đánh dấu chọn lọc được kanamyxin

trong cấu trúc pCnl2:Moral-LPAAT1 mà khác biệt với gen đánh dấu chọn lọc được *bar* đã có mặt trong dòng chuyển gen. Các cây giống con chuyển gen được lựa chọn kháng với kanamyxin và trồng đến trưởng thành trong nhà kính. Hạt T2 được thu hoạch và thành phần axit béo của toàn bộ lipit hạt của chúng được phân tích bằng phương pháp GC (Bảng 12). Ba kiểu hình được quan sát trong số dòng biến nạp độc lập 33. Trong nhóm đầu tiên (6/33 dòng), DPA tăng đáng kể đến mức gần như lớn hơn hàm lượng của DHA, lên đến khoảng 10,6% của toàn bộ lipit hạt. Đạt được việc sử dụng DHA giảm mạnh trong nhóm này của dòng. Trong hai dòng trong số các dòng trong nhóm đầu tiên này, tổng DPA + DHA bị giảm, nhưng sự giảm này không xảy ra ở 4 dòng khác. Trong nhóm thứ hai (5/33), hàm lượng của DPA và DHA bằng nhau, với tổng DPA + DHA là tương tự như trong hạt bố mẹ. Trong nhóm thứ ba, hàm lượng của DPA và DHA là tương tự với hàm lượng của chúng trong hạt bố mẹ. Một giải thích có thể đối với sự tăng hàm lượng DPA trong nhóm thứ nhất và nhóm thứ hai là LPAAT cạnh tranh hơn Δ4-desaturaza về cơ chất DPA-CoA và ưu tiên hợp nhất DPA vào PA và từ đó vào TAG, so với sự khử bão hòa Δ4. Một giải thích có có thể thứ hai là sự khử bão hòa được ức chế một phần.

Hạt từ cây *Arabidopsis* được biến nạp bằng T-DNA có cấu trúc GA7 đã được biến nạp tiếp bằng vectơ pCnl2::Moral-LPAAT được thu hoạch và dầu được chiết ra khỏi hạt. Sau đó, phân đoạn TAG được phân lập ra khỏi dầu chiết tách bằng phương pháp TLC và thu hồi từ đĩa TLC. Các mẫu TAG này và mẫu của dầu ép hạt trước khi sự cất phân đoạn được phân tích bằng cách tiêu hóa bằng *Rhizopus* lipaza để xác định sự phân bố vị trí của DHA. Lipaza là đặc hiệu đối với nhóm axyl được este hóa ở vị trí *sn-1* hoặc *sn-3* của TAG. Việc này được thực hiện bằng cách nhũ hóa mỗi mẫu lipit trong gôm arabic 5% bằng cách sử dụng máy siêu âm, bổ sung dung dịch *Rhizopus* trong dung dịch Tris-HCl 0,1M có độ pH=7,7 chứa dung dịch $CaCl_2$ 5mM và ủ hỗn hợp

ở 30°C kết hợp lắc liên tục. Mỗi phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung cloroform:metanol (2/1, thể tích) và một thể tích KCl 0,1M vào mỗi hỗn hợp. Lipit được chiết vào phân đoạn cloroform và các lượng tương đối được xác định của các thành phần *sn*-2 MAG, *sn*-1/3 FFA, DAG và TAG của lipit tạo ra bằng cách phân tách trên đĩa TLC được tẩm dung dịch axit boric 2,3% có sử dụng hexan/dietylete/axit axetic (50/50/1, thể tích). Các dải lipit được hiển thị bằng cách phun primulin 0,01% trong axeton/nước (80/20, thể tích) lên đĩa TLC và hiển thị dưới ánh sáng tử ngoại (UV: ultra violet). Các dải lipit riêng rẽ được xác định trên cơ sở vết lipit chuẩn, phân giải trên cùng một đĩa TLC. Các dải lipit TLC được thu hồi vào lọ thủy tinh và metyl este của axit béo được điều chế bằng cách sử dụng dung dịch HCl 1N trong metanol (Supelco) và ủ ở 80°C trong 2 giờ. Thành phần axit béo được phân tích bằng phương pháp GC.

Thử nghiệm này chứng minh rằng DHA trong hạt bố mẹ được biến nạp bằng GA7 (dòng 22-2-1-1 và 22-2-38-7) được ưu tiên este hóa ở vị trí *sn*-1 hoặc *sn*-3 của TAG. Ngược lại, DHA trong hạt NY11 và NY15 biến nạp bằng cả cấu trúc GA7 và gen chuyển mã hóa LPAAT được làm giàu ở vị trí *sn*-2, với 35% DHA trong một trong số các dòng và 48% DHA trong dòng còn lại được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG nghĩa là sau khi tiêu hóa lipaza, DHA có mặt dưới dạng *sn*-2-MAG (Bảng 13). Các kết quả tương tự nhận được đối với hạt *B. napus* và *B. juncea* biến nạp bằng cả T-DNA từ cấu trúc GA7-modB và gen mã hóa LPAAT và tạo ra DHA, và với hạt *B. napus* và *B. juncea* tạo ra DPA.

Để xác định liệu LPAAT từ *Mortierella* hoặc LPAAT khác có ưu tiên đối với hoặc DPA-CoA hoặc DHA-CoA, các phản ứng *in vitro* được thực hiện bằng cách bổ sung riêng rẽ DPA-CoA hoặc DHA-CoA được đánh dấu bằng ^{14}C để phân giải lá *N. benthamiana* biểu hiện thoáng qua LPAAT dự

phòng trong điều kiện kiểm soát gen khởi đầu cơ định như được mô tả trên đây. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 25°C và mức hợp nhất của axit béo được đánh dấu bằng ^{14}C vào PA được xác định bằng phép phân tích TLC của lipit. Khả năng của mỗi LPAAT sử dụng DHA-CoA so với DPA-CoA được đánh giá. Gen mã hóa LPAAT được xác nhận là có hoạt tính LPAAT hợp nhất DHA tốt được sử dụng để tạo ra cây và hạt canola sản sinh DHA biến nạp.

Gen mã hóa LPAAT có hoạt tính mạnh bằng cách sử dụng DPA-CoA được sử dụng để biến nạp thực vật và hạt sản sinh DPA, để tăng lượng DPA được este hóa ở vị trí *sn*-2 của TAG.

Bảng 15. Thành phần axit béo (% tổng lượng axit béo) của hạt *A. thaliana* chuyển gen biến nạp bằng cấu trúc LPAAT1 cũng như T-ADN từ cấu trúc GA7 để sản sinh DHA. Không phát hiện được C20:4ω6 trong hạt. Các hạt này còn chứa 0,3-0,9% C22:0 và 0,4-1,5% C22:1

	C16:0	C18:0	C18:1	18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	18:4ω3	20:1Δ11	20:1Δ13	C20:2ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	22:5ω3	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

Bảng 13. Sự có mặt của DHA ở vị trí *sn*-2 của TAG trong toàn bộ dầu từ hạt *A. thaliana* chuyển gen được biến nạp bằng gen Cnl2::Moral-LPAAT cũng như T-DNA của cấu trúc GA7, thể hiện sự phân bố theo vị trí của DHA trong TAG. Thành phần axit béo của TAG và *sn*-2 MAG cũng chứa 0-0,4% mỗi axit béo trong số 14:0, 1ω13t, 16:2, 16:3, 22:0, và 24:0. Không phát hiện được hạt chứa C20:3ω6, C20:4ω6.

Mẫu	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 TAG	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-MAG	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
																					DHA ở vị trí *sn*-2 = 30%
Dầu 22-2-38-7	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-MAG	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
																					DHA ở vị trí *sn*-2 = 19%
Được biến nạp bổ sung bằng gen mã hóa *Mortierella alpina* LPAAT:																					
NY11-TAG	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-MAG	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
																					DHA ở vị trí sn-2 = 48%
Dầu NY-15	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-MAG	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
																					DHA ở vị trí sn-2 = 37%

Ví dụ 7. Phân tích tiếp theo hạt *Camelina sativa* chuyển gen

Hàm lượng lipit toàn phần

Hạt *C. sativa* là đồng hợp tử đối với T-DNA từ cấu trúc GA7 và chứa DHA trong tổng lượng axit béo của nó được phân tích lượng và thành phần lipit toàn phần của nó như sau. Hai bước chiết dung môi liên tiếp được thực hiện trên hạt, đầu tiên bằng cách sử dụng hexan và sau đó bằng cách sử dụng cloroform/metanol. Chất kháng oxy hóa không được thêm vào trong qua trình chiết hoặc phân tích. Phương pháp chiết Soxhlet thường được sử dụng để chiết lipit hạt bằng cách gia nhiệt và hồi lưu kéo dài mạch hỗn hợp lipit/dung môi không được sử dụng ở đây do khả năng làm thoái biến hoặc oxy hóa ω3 PUFA như DHA.

Hexan được sử dụng làm dung môi trong quy trình chiết đầu tiên do nó là chuẩn công nghiệp đối với hạt chứa dầu. Ngoài ra, ưu tiên chiết dầu chứa TAG do các tính chất hòa tan của nó và độ tan tương đối kém của nó trong lipit phân cực, cụ thể là ở nhiệt độ trong phòng. Hạt *Camelina* chuyển gen và đối chứng (tương ứng 130g và 30g) được tẩm ướt bằng hexan và nghiền bằng cách sử dụng chày và cối mã não điện (Retsch Muhle, Germany). Hỗn hợp này được chuyển vào phễu tách và chiết 4 lần bằng cách sử dụng toàn bộ 800ml hexan, bao gồm cả chiết tĩnh qua đêm cho lần chiết thứ ba. Đối với mỗi quá trình, dịch chiết được lọc để loại bỏ mảnh vụn qua bộ lọc thủy tinh GFC trong môi trường chân không, và sau đó làm bay hơi quay ở 40°C trong chân không. Phần chiết được gộp lại và tạo ra phần chiết hexan giàu TAG.

Bước chiết tiếp theo bằng hexan, bột hạt còn lại được chiết tiếp bằng cách sử dụng cloroform-metanol (CM, 1:1, thể tích) bằng cách sử dụng quy trình như đối với quá trình chiết hexan. Sau đó, bột được loại bỏ bằng cách lọc và phần chiết thu gom được làm bay hơi quay. Sau đó, toàn bộ phần chiết lipit thô thu gom bằng cách sử dụng CM được hòa tan bằng cách sử dụng hỗn

hợp một pha metanol-cloroform-nước (2:1:0,8, thể tích). Các pha được tách ra bằng cách bổ sung cloroform-nước (tỷ lệ dung môi cuối cùng, 1:1:0,9 thể tích, metanol-cloroform-nước). Lipit tinh chế trong mỗi phần chiết được phân bố trong pha cloroform thấp, cô đặc bằng cách sử dụng phương pháp làm bay hơi quay và tạo ra phần chiết CM giàu lipit phân cực. Hàm lượng lipit trong mỗi phần chiết này được xác định theo phép phân tích trọng trường.

Đối với phép phân tích thành phần axit béo, các phần phân ước của phần chiết hexan và CM được *trans*-metyl hóa theo phương pháp của Christie và các đồng tác giả (1982) tạo ra metyl este của axit béo (FAME: fatty acid methyl ester) bằng cách sử dụng metanol–cloroform–axit clohydric đậm đặc (3ml, 10:1:1, 80°C, 2 giờ). FAME được chiết trong hexan–cloroform (4:1, 3×1,8ml). Mẫu của bột hạt còn lại (1-2g) sau khi chiết bằng hexan và CM cũng được *trans*-metyl hóa để đo lipit còn lại bất kỳ dưới dạng FAME bằng phép phân tích trọng trường. Toàn bộ lượng lipit của hạt được tính bằng cách bổ sung các lượng lipit của phần chiết hexan và CM và hàm lượng FAME của bột đã được transmetyl hóa sau khi chiết bằng dung môi.

Hạt chuyển gen chứa hơi ít lipit toàn phần ở hàm lượng 36,2% trọng lượng hạt so với hạt *Camelina sativa* kiểu dại ở hàm lượng 40,9% trọng lượng hạt. Đối với hạt kể cả hạt chứa dầu, lipit toàn phần được xác định dưới dạng tổng của lipit có thể chiết được bằng dung môi nhận được bằng các bước chiết liên tiếp bằng hexan, sau đó bằng cloroform-metanol, cộng với lipit còn lại được giải phóng bằng cách chuyển metyl hóa bột đã chiết tách sau khi chiết dung môi, như được minh họa ở đây. Lipit toàn phần này chủ yếu bao gồm lipit chứa axit béo như triaxylglyxerol và lipit phân cực và các lượng nhỏ lipit không phải axit béo, ví dụ phytosterol và rượu béo mà có thể có mặt ở dạng tự do không được este hóa hoặc được este hóa bằng axit béo. Ngoài ra, sterol este hoặc este sáp và hydrocacbon bất kỳ như carotenoit, ví

dụ β-caroten, cũng được tính đến trong lipit có thể chiết được bằng dung môi, nếu có mặt. Chúng được tính đến trong quá trình xác định trọng lượng toàn phần và được thể hiện trong phép phân tích TLC-FID (Bảng 14).

Trong lipit toàn phần, 31%–38% lipit mỗi trọng lượng hạt được chiết tương ứng bằng hexan đối với hạt chuyển gen và đối chứng tương ứng giải thích cho 86% và 92% lipit toàn phần trong hạt. Bước chiết CM thu hồi thêm 4,8% và 2,4% (trọng lượng hạt) phần lớn phần chiết giàu lipit phân cực từ hạt chuyển gen và đối chứng tương ứng. Lipit còn lại được giải phóng bằng cách chuyển metyl hóa bột hạt chứa dầu đã được chiết bằng dung môi còn lại là 0,3% và 0,4% trọng lượng hạt tương ứng. Đó là, các bước chiết bằng dung môi thứ nhất và thứ hai cùng với 99% chiết tách được của lượng lipit toàn phần của hạt (nghĩa là 36,2% hoặc 40,9% trọng lượng hạt, mà là chủ yếu lipit chứa axit béo như triglyxerit và lipit phân cực chứa glyco- và phospholipit (xem phần tiếp theo – Phân tích nhóm lipit)).

Phân tích nhóm lipit

Các nhóm lipit trong phần chiết hexan và CM được phân tích bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng với việc phát hiện ion hóa ngọn lửa (TLC-FID (flame-ionization detection); Iatroscan Mark V, Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) bằng cách sử dụng hexan/dietyl ete/axit axetic băng (70:10:0,1, thể tích) làm hệ dung môi phát triển phối hợp với silic oxit Chromarod S-III trên que thạch anh. Đường cong hiệu chỉnh thích hợp được tạo ra bằng cách sử dụng các chuẩn đại diện nhận được từ Nu-Chek Prep, Inc. (Elysian, MN, USA). Số liệu được xử lý bằng cách sử dụng phần mềm SIC-480II (SISC Version: 7,0-E). Các loại phospholipit được tách ra bằng cách sử dụng phân đoạn phospholipit đã tinh chế thu được từ sắc ký cột silic oxit và phát triển que thạch anh trong cloroform/metanol/axit axetic băng/nước (85:17:5:2, thể tích) trước khi phát hiện FID.

Để tách TAG, các phân đoạn glycolipit và phospholipit từ phần chiết CM, gel silic oxit 60 (qua rây 100–200) (0,3–1g) trong cột thủy tinh ngắn hoặc pipet Pasteur được bít lại bằng len thủy tinh được sử dụng để tinh chế 10mg phần chiết lipit CM đã được tinh chế. Phân đoạn TAG còn lại trong phần chiết CM được rửa giải bằng cách sử dụng 20ml 10% dietyl ete trong hexan, glycolipit đã rửa giải bằng 20ml axeton và phospholipit được rửa giải qua hai bước, đầu tiên bằng 10ml metanol, sau đó bằng 10ml metanol-cloroform-nước (5:3:2). Dịch rửa giải thứ hai này làm tăng mức thu hồi phospholipit. Hiệu suất của mỗi phân đoạn được xác định theo trọng lượng và độ tinh khiết được kiểm tra bằng TLC-FID. Tất cả các phần chiết và phân đoạn được bảo quản trong diclometan ở -20°C cho tới phân tích tiếp theo bằng phương pháp GC và GC-MS.

Phần chiết hexan giàu TAG từ mỗi hạt chuyển gen và đối chứng chứa khoảng 96% TAG. Phần chiết CM chứa lượng TAG còn lại ở mức tương ứng là 44% và 13% trọng lượng của phần chiết CM đối với hạt chuyển gen và kiểu dại. Ngược lại với phần chiết hexan, phần chiết CM giàu lipit phân cực, đó là phospholipit và glycolipit, với lượng tương ứng là 50% và 76% trọng lượng của phần chiết CM đối với hạt chuyển gen và đối chứng (Bảng 14). Phospholipit chủ yếu là phosphatidyl cholin (PC) và chiếm 70%–79% toàn bộ phospholipit, tiếp đó là phosphatidyl etanolamin (PE, 7%–13%) với hàm lượng tương đối thấp của axit phosphatidic (PA, 2%–5%) và nhựa phosphatidyl (PS, <2%).

Thành phần axit béo

Nói chung, đối với hạt sản sinh DHA và/hoặc DPA, các tác giả sáng chế nhận thấy rằng thành phần axit béo của lipit toàn phần trong hạt như được xác định bởi phương pháp chuyển metyl hóa trực tiếp của lipit toàn

phần trong hạt là tương tự với thành phần của phân đoạn TAG. Điều này là do trên 90% lipit toàn phần có mặt trong hạt xuất hiện ở dạng TAG.

Thành phần axit béo của các nhóm lipit khác nhau trong các phần chiết hexan và CM là như được xác định bởi phép phân tích sắc ký khí (GC) và GC-MS bằng cách sử dụng thiết bị Agilent Technologies 6890A GC (Palo Alto, CA, USA) được lắp với cột mao dẫn silic oxit ngưng tụ Supelco Equity™-1 (15m × 0,1mm (đường kính trong), độ dày màng 0,1μm, Bellefont, PA, USA), FID, bộ bơm khe/không phân khe và bộ mấy mẫu và bơm tự động Agilent Technologies 7683B. Heli là khí mang. Mẫu được bơm theo phương phương thức không phân khe ở nhiệt độ lò bằng 120°C. Sau khi bơm, nhiệt độ lò được tăng đến 270°C ở tốc độ 10°C/phút và cuối cùng đến 300°C ở tốc độ 5°C/phút. Hợp chất rửa giải được được định lượng bằng phần mềm Agilent Technologies ChemStation (Palo Alto, CA, USA). Kết quả GC có sai số không lớn hơn ±5% của các diện tích thành phần riêng rẽ.

Bảng 14. Thành phần nhóm lipit (% lipit toàn phần thu được đối với mỗi bước chiết) của phần chiết hexan và CM từ hạt *Camelina sativa* chuyển gen và đối chứng. SE, WE và HC không được tách ra khỏi nhau.

Nhóm lipit	**Hạt chuyển gen**		**Hạt đối chứng**	
	Hexan	**CM**	**Hexan**	**CM**
SE/WE/HC*	1,0	1,4	1,0	1,4
TAG	95,6	44,2	96,0	13,1
FFA	0,9	1,3	0,8	1,4
UN**	0,9	1,1	0,8	1,2
ST	0,5	0,7	0,4	0,4
MAG	0,7	1,1	0,8	6,2
PL	0,3	50,3	0,3	76,3
Tổng	100,0	100,0	100,0	100,0

Viết tắt: sterol este (SE), este sáp (WE), hydrocacbon (HC), triaxylglyxerol (TAG), axit béo tự do (FFA), chất chưa được xác định (UN), sterol (ST), monoaxylglyxerol (MAG), lipit phân cực

(PL) bao gồm glycolipit và phospholipit; * SE, WE và HC đồng rửa giải cùng với hệ này; ** Có thể chứa rượu béo và diaxylglyxerol (DAG).

Phân tích GC-phổ khối (GC-MS) được thực hiện trên thiết bị Finnigan Trace ultra Quadrupole GC-MS (model: ThermoQuest Trace DSQ, Thermo Electron Corporation). Số liệu được xử lý bằng phần mềm ThermoQuest Xcalibur (Austin, TX, USA). Thiết bị GC được lắp với bộ phận bơm đặt trên cột và cột mao dẫn HP-5 Ultra Agilient J & W (50m × 0,32mm (đường kính trong), độ dày màng 0,17μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) có độ phân cực tương tự với độ phân cực đã được mô tả trên đây. Các thành phần riêng rẽ được xác định bằng cách sử dụng số liệu phổ khối và bằng cách so sánh số liệu thời gian lưu với số liệu thu được từ các chất chuẩn nguyên bản và phòng thí nghiệm. Phép phân tích trống được xử lý đầy đủ được thực hiện đồng thời với các mẻ mẫu.

Số liệu đối với thành phần axit béo trong các nhóm lipit khác nhau trong phần chiết được thể hiện trong Bảng 15. Ở hạt *Camelina* sản sinh DHA, DHA được phân bố trong các phân đoạn lipit chính (TAG, phospholipit và glycolipit) ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1,6% đến 6,8% với mối tương quan nghịch đảo giữa tỷ lệ của DHA và ALA. Phần chiết hexan giàu TAG từ hạt chuyển gen chứa 6,8% DHA và 41% ALA (Bảng 15). Phần chiết CM giàu lipit phân cực chứa 4,2% DHA và 50% ALA nghĩa là tương đối ít DHA hơn và nhiều ALA hơn. TAG còn lại từ phần chiết CM giàu lipit phân cực chứa 6% DHA và 40% ALA. Phân đoạn glycolipit được phân tách từ phần chiết CM chứa 3% DHA và 39% ALA và phân đoạn phospholipit chứa hàm lượng DHA thấp nhất (1,6%) và hàm lượng ALA cao nhất (54%). Hạt *Camelina* chuyển gen chứa hàm lượng ALA cao hơn và hàm lượng LA thấp hơn (axit linoleic, 18:2ω6) so với hạt đối chứng trong các nhóm lipit chính (TAG, glycolipit và phospholipit). Tỷ lệ phần trăm của ALA và LA là: ALA 39%–54% và LA 4%–9% đối với hạt chuyển gen và ALA 12%–32%

và LA 20%–29% đối với hạt đối chứng. Hàm lượng tương đối của axit erucic (22:1ω9) là thấp hơn trong tất cả các phân đoạn trong hạt chuyển gen so với trong hạt đối chứng, ví dụ, trong phần chiết hexan là 1,3% so với 2,7% (Bảng 15).

Thành phần sterol trong hạt

Để xác định hàm lượng và thành phần của sterol trong lipit chiết tách, mẫu với trọng lượng 10mg lipit toàn phần từ phần chiết hexan giàu TAG và phần chiết CM giàu lipit phân cực được xà phòng hóa bằng cách sử dụng 4ml 5% KOH trong 80% MeOH và gia nhiệt trong 2 giờ ở 80°C trong ống nghiệm thủy tinh có nắp xoáy được bọc Teflon. Sau khi hỗn hợp phản ứng được làm nguội, 2ml nước Milli-Q được thêm vào và sterol và rượu được chiết ba lần vào 2ml hexan:diclometan (4:1, thể tích) bằng cách lắc và xoáy trộn. Hỗn hợp này được ly tâm và mỗi phần chiết trong pha hữu cơ được rửa bằng 2ml nước Milli-Q bằng cách lắc và ly tâm. Sau khi lấy ra lớp hữu cơ chứa sterol nằm phía trên, dung môi được làm bay hơi bằng cách sử dụng dòng khí nitơ và sterol và rượu được silyl hóa bằng cách sử dụng 200µl Bis(trimetylsilyl)-trifloaxetamit (BSTFA, Sigma-Aldrich) bằng cách gia nhiệt trong 2 giờ ở 80°C trong lọ GC đã được đóng kín. Bằng phương pháp này, nhóm hydroxyl tự do được chuyển hóa thành trimetylsilyl ete của nó. Dẫn xuất sterol- và rượu-OTMSi được làm khô trong dòng khí nitơ trên khối nhiệt (40°C) và hòa tan lại trong diclometan (DCM) ngay trước khi phân tích GC/GC-MS như được mô tả trên đây.

Bảng 15. Thành phần axit béo (% tổng lượng axit béo) của phần chiết và phân đoạn lipit của hạt *C. sativa* chuyển gen và đối chứng.

	Hạt chuyển gen						Hạt đối chứng					
	Hexan	CM				Bột	Hexan	CM				Bột
Axit béo	TAG	Total	TAG	GL	PL	Phần dư	TAG	Total	TAG	GL	PL	Phần dư
16:1ω7	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	-	-	0,3
16:0	6,2	12,8	6,8	21,3	19,4	10,4	6,7	12,8	7,8	29,6	13,	10,3
18:4ω3	3,7	3,3	3,4	2,1	2,9	3,6	-	-	-	-	-	-
18:2ω6	7,1	3,9	8,8	7,2	3,7	8,8	22,2	28,4	29,4	20,8	29,	27,9
18:3ω3	41,9	50,3	39,9	38,6	54,1	38,9	32,0	20,6	19,7	13,0	12,	20,0
18:1ω9	11,1	4,7	9,6	7,2	2,8	8,1	14,0	25,4	13,3	14,7	35,	14,3
18:1ω7	1,4	2,3	2,1	3,7	3,4	2,8	1,0	1,5	2,2	4,0	2,8	2,2
18:0	3,2	4,0	3,0	4,5	5,7	3,1	3,0	2,7	2,9	5,7	3,6	2,7
20:5ω3	0,4	0,2	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-
20:4ω3	0,4	0,4	0,4	-	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-
20:2ω6	0,7	0,7	0,8	0,6	0,4	0,7	1,8	0,8	2,1	1,2	-	1,8

20:3ω3	0,8	1,2	0,9	0,6	1,3	0,5	0,9	0,3	-	-	-	0,4
20:1ω9/1	11.6	6,1	10.9	5,1	1,3	8,4	12,5	3,0	11,1	4,2	1.7	9,4
20:1ω7	0.6	0,8	1,4	0.6	0,2	1,1	0.6	0.6	2,0	1,3	-	1,8
20:0	1,3	0,8	1,4	0.6	0,1	1,4	1,5	0.7	2,0	1,4	-	1,8
22:6ω3	6,8	4,2	6,1	3,0	1.6	5,4	-	-	-	-	-	-
22:5ω3	0,3	1,1	0,4	0.6	1,4	0,3	-	-	-	-	-	-
22:1ω9	1,3	1,0	1,8	0.6	0,1	1,5	2.7	0.7	3.6	0.9	-	2.9
22:0	0,3	0,2	0,3	0.6	0,1	0.7	0,3	0,2	0.7	0,8	-	0,8
24:1ω9	0,3	0,4	0,4	0.6	0,3	0.6	0,3	0.6	0.7	0.9	0,5	1,0
24:0	0,1	0,4	0,2	0.9	0,4	1,1	0,1	0,4	0,5	1,4	0,4	1,3
Khác *	0,4	1,0	1,0	1,4	0,5	1,8	0,3	1,1	0.9	0,1	-	1,1
Tổng	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Viết tắt: triaxylglyxerol (TAG), glycolipit (GL), phospholipit (PL); Tổng: phần chiết giàu lipit phân cực chứa GL và PL từ bước chiết bằng CM; TAG, GL và PL được tách ra bằng phương pháp sắc ký cột silic oxit phần chiết CM; * Tổng của axit béo thứ yếu

Sterol chủ yếu trong cả hạt chuyển gen và đối chứng là 24-etylcholesterol (sitosterol, 43%–54% của toàn bộ sterol), 24-metylcholesterol (campesterol, 20%–26%) với hàm lượng của cholesterol thấp hơn (5%–8%), brassicasterol (2%–7%), isofucosterol (Δ5-avenasterol, 4%–6%), stigmasterol (0,5%–3%), cholest-7-en-3β-ol, (0,2%–0,5%), 24-metylcholestanol (campestanol, 0,4%–1%) và 24-dehydrocholesterol (0,5%–2%) (Bảng 16). Chín sterol này chiếm 86%–95% toàn bộ sterol, với các thành phần còn lại là sterol chỉ được xác định một phần về số lượng nguyên tử cacbon và liên kết đôi. Profin sterol toàn phần là tương tự giữa hạt chuyển gen và đối chứng đối với cả phần chiết hexan và CM.

Phân tích rượu béo

Rượu béo trong hạt được tạo dẫn xuất và phân tích như đối với sterol. Một nhóm các rượu béo từ C16–C22, với rượu béo có mạch nhánh iso đi kèm, được xác định trong cả phần chiết hexan và CM. Các profin tương tự được quan sát đối với hạt chuyển gen và đối chứng, với một vài biến thiên về tỷ lệ phần trăm của các thành phần riêng rẽ quan sát được. Phytol, được tạo ra từ clorophyl, là rượu béo chủ yếu và chiếm 47% và 37% của toàn bộ rượu béo trong các phân đoạn hexan trong hạt chuyển gen và đối chứng, tương ứng. Rượu mạch lẻ có mặt ở hàm lượng cao hơn trong phần chiết CM (37%–38% của tổng lượng rượu béo) so với trong phần chiết hexan (16%–23%). Iso-17:0 (16%–38%) cao hơn 17:0 (0,3%–5.7%). Một rượu mạch lẻ khác có mặt là 19:0 (4,5%–6,5%). Các rượu khác bao gồm iso-16:0, 16:0, iso-18:0, 18:1, 18:0, có hàm lượng iso-20:0, 20:1, 20:0, iso-22:0, 22:1 và 22:0 thứ yếu cũng có mặt.

Thảo luận

Các kết quả cho thấy rằng việc nghiền bằng cách sử dụng cối và chày được lắp động cơ với nhiều bước chiết bằng hexan ở nhiệt độ trong phòng là

hữu hiệu trong việc thu hồi phần lớn dầu chứa TAG từ hạt chuyển gen. Ngoài dầu từ hạt chuyển gen chứa hàm lượng DHA vừa phải, hạt chuyển gen cũng có hàm lượng ALA cao hơn rõ rệt trong các nhóm lipit chính (triaxylglyxerol, glycolipit và phospholipit) so với hạt đối chứng. Điều này cho thấy rằng hoạt tính Δ15-desaturaza tăng đáng kể trong hạt chuyển gen trong quá trình phát triển hạt. Thú vị là, có một số khác biệt nhỏ về thành phần axit béo và tỷ lệ phần trăm của DHA trong các phần chiết và phân đoạn khác nhau với hàm lượng DHA cao hơn trong phần chiết hexan giàu TAG và TAG từ bước chiết CM (6%–6,8%) và thấp hơn trong các phân đoạn lipit phân cực (3% trong glycolipit và 1,6% trong phospholipit). Hàm lượng của 16:0 là cao hơn trong các phân đoạn lipit phân cực chứa glycolipit và phospholipit trong phần chiết CM (19%–21%) so với phần chiết hexan giàu TAG và TAG từ bước chiết CM (6%–7%).

Bảng 16. Thành phần sterol (% tổng lượng sterol) của hạt *Camelina* chuyển gen và đối chứng.

	Hạt chuyển gen		**Hạt đối chứng**	
Sterol	**Hexan**	**CM**	**Hexan**	**CM**
24-dehydrocholesterol	0,8	1,8	0,5	1,4
cholesterol	5,7	7,6	4.7	7,2
brassicasterol	4,4	6,5	1.9	4,2
cholest-7-en-3β-ol	0,2	0,5	0,3	0,4
campesterol	24,5	20,8	25.7	21.7
campestanol	0,4	1,1	0,4	0.9
stigmasterol	1,0	2,6	0,5	1.6
sitosterol	54,3	43,7	53,8	42.9
Δ5-avenasterol (isofucosterol)	4,2	5,2	4.7	5,5
Tổng	95,5	89,6	92.6	85.9
Các chất khác				

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
Tổng của các chất khác	4,5	10,4	7,4	14,1
Tổng	100	100	100	100

Viết tắt: UN là sterol chưa được xác định, con số sau C cho biết số nguyên tử cacbon và db là số liên kết đôi

Thành phần sterol của hạt chuyển gen và hạt đối chứng là tương tự với thành phần được tìm thấy trong dầu Camelina tinh luyện (Shukla et al., 2002) với sự có mặt của cùng các sterol chủ yếu, cho thấy rằng các gen được thêm vào không ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp sterol trong hạt. Hàm lượng của cholesterol trong dầu Camelina cao hơn so với trong hầu hết các dầu thực vật. Brassicasterol có mặt, là sterol đặc trưng được tìm thấy trong họ Brassicaceae mà bao gồm *Camelina sativa.*

Ví dụ 8. Sự sản sinh LC-PUFA trong hạt *Brassica juncea*

Cây *Brassica juncea* chuyển gen được tạo ra bằng cách sử dụng cấu trúc GA7-modB (Ví dụ 3) để sản sinh DHA, như sau. Hạt *B. juncea* của giống nhạy với độ dài dài ngày được khử trùng bằng cách sử dụng khí clo như được mô tả bởi Kereszt et al. (2007). Hạt vô trùng được làm nảy mầm trong môi trường MS nồng độ 1/2 (Murashige và Skoog, 1962) hóa rắn bằng 0,8% aga, được điều chỉnh đến độ pH=5,8 và sinh trưởng ở 24°C trong điều kiện ánh sáng huỳnh quang (50μE/m^{2}s) với chu kỳ chiếu sáng 16/8 giờ (sáng/tối) trong 6-7 ngày. Cuống lá mầm với thân từ 2-4mm được tách trong điều kiện vô khuẩn ra khỏi các cây con và được sử dụng làm mô cấy bên

ngoài. Chủng *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 được biến nạp bằng cấu trúc GA7 kép. Giống nuôi cấy *Agrobacterium* được khơi mào và xử lý gây nhiễm như được mô tả bởi Belide et al. (2013). Đối với tất cả các phép biến nạp, khoảng 50 cuống lá mầm vừa mới được tách ra được gây nhiễm bằng 10ml giống nuôi cấy *A. tumefaciens* trong 6 phút. Cuống lá đã gây nhiễm được thẩm tích trên giấy lọc vô khuẩn để loại bỏ *A. tumefaciens* dư và biến nạp vào môi trường đồng nuôi cấy (MS chứa BA 1,5mg/l, NAA 0,01mg/l và axetosyringon 100µM, còn được bổ sung L-xystein (50mg/l), axit ascorbic (15mg/l) và MES (250mg/l). Tất cả các đĩa được đậy kín bằng băng dính có lỗ xốp nhỏ và được ủ trong bóng tối ở 24°C trong quá trình đồng nuôi cấy kèo dài 48 giờ. Sau đó, mô cấy bên ngoài được chuyển vào môi trường đã chọn trước (MS-aga chứa BA 1,5mg/l, NAA 0,01mg/l, $AgNO_3$3mg/l, xefotaxim 250mg/l và timentin 50mg/l) và được nuôi cấy trong 4-5 ngày ở 24°C với chu kỳ ánh sáng 16/8 giờ trước khi mô cấy bên ngoài được chuyển vào môi trường chọn lọc (MS-aga chứa BA 1,5mg/l, NAA 0,01mg/l, $AgNO_3$3mg/l, xefotaxim 250mg/l, timentin 50mg/l và PPT 5mg/l) và nuôi cấy trong 4 tuần ở 24°C với chu kỳ ánh sáng 16/8 giờ. Mô cấy bên ngoài thể chai màu xanh lá được chuyển vào môi trường tái sinh chồi (MS-aga chứa BA 2,0mg/l, $AgNO_3$3mg/l, xefotaxim 250mg/l, timentin 50mg/l và PPT 5mg/l) và nuôi cấy trong trong 2 tuần nữa. Các chồi tái sinh nhỏ được chuyển vào môi trường MS không chứa hocmon (MS-aga chứa $AgNO_3$3mg/l, xefotaxim 250mg/l, timentin 50mg/l và PPT 5mg/l) và nuôi cấy trong 2-3 tuần nữa.

Các chồi chuyển gen tiềm năng có kích thước ít nhất bằng 1,5cm được tách ra và chuyển vào môi trường cảm ứng rễ (MS-aga chứa NAA 0,5mg/l, $AgNO_3$3mg/l, xefotaxim 250mg/l và timentin 50mg/l) và nuôi cấy trong 2-3 tuần. Chồi chuyển gen được xác nhận bằng PCR và có nhiều rễ được chuyển vào đất trong nhà kính và sinh trưởng trong điều kiện chu kỳ ánh

sáng 16/8 giờ (sáng/tối) ở 22°C. Thu được ba cây chuyển gen đã được xác nhận. Cây biến nạp được sinh trưởng trong nhà kính, để tự thụ phấn, và thu hoạch hạt T1. Thành phần axit béo được phân tích lipit từ các nhóm hạt T1 từ mỗi cây biến nạp T0, thể hiện sự có mặt của 2,8% DPA và 7,2% DHA trong một dòng JT1-4 đã thiết kế, trong khi đó dòng JT1-6 được thiết kế khác thể hiện 2,6% DPA.

Dầu ép hạt từ hạt T1 riêng rẽ được phân tích thành phần axit béo; một số số liệu được thể hiện trong Bảng 17. Một vài hạt T1 sản sinh DHA ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 21% trong tổng lượng axit béo, kể cả JT1-4-A-13, JT1-4-A -5, và JT1-4-B-13. Ngạc nhiên và bất ngờ là, một số hạt T1 chứa DPA ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 18% trong tổng lượng axit béo và không phát hiện thấy DHA (<0,1%). Các tác giả sáng chế kết luận rằng gen Δ4-desaturaza trong T-DNA được xen vào trong các cây này bị bất hoạt do sự đột biến tự phát, tương tự như đã được mô tả trong Ví dụ 2 . Hạt T1 được làm nảy mầm và một lá mầm mọc lên từ mỗi hạt được phân tích thành phần axit béo trong dầu còn lại. Phần còn lại của mỗi cây con được duy trì và sinh trưởng đến khi trưởng thành để tạo ra hạt T2.

Cây chuyển gen đồng hợp tử đối với các đoạn xen T-DNA đơn được xác định và chọn lọc. Cây của một dòng JT1-4-17 thiết kế đã chọn có đoạn xen T-DNA đơn và sản sinh DHA chỉ với hàm lượng DPA thấp, trong khi đó cây của dòng JT1-4-34 thiết kế đã chọn khác cũng có đoạn xen T-DNA đơn nhưng lại sản sinh DPA mà không sản sinh DHA. Các tác giả sáng chế kết luận rằng thể biến nạp nguyên thủy chứa hai T-DNA riêng biệt, một T-DNA sinh ra DHA và T-DNA còn lại sinh ra DPA mà không sinh ra DHA. Cây *B. juncea* sản sinh DHA trong hạt của chúng được lai chéo với cây sản sinh DPA trong hạt của chúng. Thế hệ F1 bao gồm cây dị hợp tử đối với cả hai đoạn xen T-DNA. Hạt từ các cây thế hệ con này được thấy là tạo ra khoảng 20% DHA đến 6% DPA, đối với tổng hàm lượng DHA + DPA bằng

26%. Cây F1 được tự thụ phấn và cây thế hệ con đồng hợp tử đối với cả các đoạn xen T-DNA được mong đợi là tạo ra đến 35% DHA và DPA.

Khoảng 18% DPA được quan sát thấy trong lipit của hạt đã được phân nhóm của cây thế hệ con T3 JT1-4-34-11 được thiết kế. Tương tự , khoảng 17,5% DHA được quan sát thấy trong lipit thu được từ hạt đã được phân nhóm trong cây thế hệ con của T3 JT1-4-17-20. Thành phần axit béo của hạt đã được phân nhóm JT1-4 T1, hạt T1 đơn, hạt T2 đã được phân nhóm, hạt T2 đơn, và hạt T3 đã được phân nhóm, hạt T3 đơn được thể hiện trong các Bảng từ 18 đến 21. Thể phân ly JT1-4 T3 JT-1-4-34-11, có hàm lượng DPA trong hạt T3 đã được phân nhóm bằng 18% và hạt đơn từ thể phân ly cụ thể này có hàm lượng DPA bằng khoảng 26%, mỗi tỷ lệ phần trăm là tỷ lệ phần trăm của tổng lượng axit béo.

Các thông số sau được tính đối với dầu thu được từ hạt có 17,9% DPA:tổng lượng axit béo bão hòa: 6,8%; tổng lượng axit béo không bão hòa đơn: 36,7%; tổng lượng axit béo không bão hòa đa: 56,6%, tổng lượng axit béo ω6: 7,1%; axit béo ω6 mới: 0,4% đều là GLA; tổng lượng axit béo ω3: 46,5%; axit béo ω3 mới: 24,0%; tỷ lệ của tổng lượng axit béo ω6:tổng lượng axit béo ω3: 6,5; tỷ lệ của axit béo ω6 mới:ω3 mới: 60; hiệu suất chuyển hóa của axit oleic thành LA bởi Δ12-desaturaza: 61%; hiệu suất chuyển hóa của ALA thành SDA bởi Δ6-desaturaza: 51%; hiệu suất chuyển hóa của SDA thành axit ETA bởi Δ6-elongaza: 90%; hiệu suất chuyển hóa của ETA thành EPA bởi Δ5-desaturaza: 87%; hiệu suất chuyển hóa của EPA thành DPA bởi Δ5-elongaza: 98%.

Để tạo ra nhiều cây chuyển gen hơn ở *B. juncea* bằng cấu trúc modB, sự biến nạp được lặp lại 5 lần và 16 chồi/cây con chuyển gen giả định được tái sinh. Bước phân tích hạt T1 được thực hiện để xác định hàm lượng DPA và DHA.

Để tạo ra hạt khác chứa DPA và không chứa DHA, cấu trúc gen là biến thể của cấu trúc modB được tạo ra, thiếu gen Δ4-desaturaza, như sau. Hai đoạn ADN, đoạn EPA-DPA 1 và đoạn EPA-DPA 2, được tổng hợp (Geneart, Germany) có các vị trí giới hạn thích hợp. Vectơ tách dòng trung gian, pJP3660, được tạo ra bằng cách tách dòng đoạn *Aat*II-*Mlu*I của đoạn EPA-DPA 1 vào vị trí *Asc*I-*Aat*II trong vectơ được ký hiệu là 11ABHZHC_GA7-frag_d6D_pMS, một vectơ được sử dụng sớm hơn trong quá trình xây dựng cấu trúc GA7-modB mà chứa caset Δ6 desaturaza. Sau đó, pJP3661 được tạo ra bằng cách tách dòng đoạn *Pme*I-*Psp*OMI của pJP3660 vào vị trí *Pme*I-*Psp*OMI của modB. Vectơ DPA, pJP3662 (Fig.4), sau đó, được kết hợp bằng cách tách dòng đoạn *Bsi*WI-*Psp*OMI của đoạn EPA-DPA 2 vào vị trí *Bsi*WI-*Psp*OMI của pJP3661. Vectơ này chứa các axit béo sinh tổng hợp gen mã hóa enzym mà chuyển hóa axit oleic thành DPAω3 và axit béo ω6 tương ứng. Cấu trúc tạo ra được sử dụng để biến nạp *B. juncea* và *B. napus*. Hạt của cây thế hệ con chứa DPA với hàm lượng lên tới 35% trong tổng lượng axit béo của lipit hạt được tạo ra.

Khi dầu chiết tách từ hạt của cây sản sinh DHA được kiểm tra bằng phương pháp NMR, ít nhất 95% DHA được quan sát thấy là có mặt ở vị trí *sn*-1,3 của phân tử TAG.

Bảng 17. Thành phần axit béo của dầu ép hạt từ hạt T1 của *B. juncea* được biến nạp bằng T-DNA từ GA7.

Hạt T1 số	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1	18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:5ω3	C22:6ω3
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

Mẫu dầu ép hạt còn chứa 0,1% C14:0; 0,1-0,2% C16:3; 0,0-0,1% của mỗi axit béo trong số C20:1Δ13, C20:3ω6 và C20:4ω6; 0,3-0,4% C22:0; không chứa C22:1 và C22:2ω6; 0,2% C24:0 và 0,2-0,4% C24:1.

Bảng 18. Thành phần axit béo của lipit từ hạt T1 (đã được phân nhóm) của *B. juncea* được biến nạp bằng T-DNA từ GA7-modB. TCÁc lipit này còn chứa khoảng 0,1% mỗi axit béo trong số 14:0, 16:3, 20:1d13, and không phát hiện được các axit béo 16:2, 22:1.

Hạt	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω6	C20:4ω6	C20:3ω3	C22:0	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:2ω6	C22:3ω3	C24:0	C24:1	C22:5ω3	C22:6ω3
JT1-2	4,2	0,3	2,5	42,4	3,2	27,7	0,1	16,4	0,6	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-3	4,5	0,3	2,7	44,6	3,1	26,8	0,1	14,8	0,7	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-4	5,1	0,3	3,2	26,8	3,5	17,4	0,5	22,8	0,7	2,5	1,1	0,2	0,0	0,0	1,2	0,3	2,9	0,7	0,0	0,1	0,2	0,3	**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

Bảng 19. Thành phần axit béo của dầu ép hạt từ hạt T1 (đơn) của *B. juncea* được biến nạp bằng T-DNA từ GA7-modB.

Hạt T1 số	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1	18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:5ω3	C22:6ω3
JT1-4-A-1	5,0	0,2	2,7	23,5	3,4	17,0	0,7	24,8	0,7	2,0	1,1	0,2	0,8	4,0	0,6	2,4	9,9
JT1-4-A-2	4,3	0,3	2,6	37,2	3,2	11,0	0,3	22,1	0,7	0,9	1,3	0,2	1,4	3,2	0,3	9,4	0,0
JT1-4-A-3	5,6	0,3	2,7	20,8	3,7	16,0	0,6	24,4	0,7	2,0	0,9	0,2	1,1	4,5	0,7	3,1	11,4
JT1-4-A-4	4,6	0,4	2,8	36,2	3,4	10,6	0,3	24,5	0,8	9,9	1,7	0,2	0,3	0,5	0,0	2,5	0,0
JT1-4-A-5	5,0	0,2	3,2	20,3	3,6	13,7	0,7	25,9	0,7	2,0	0,9	0,2	1,3	4,4	1,5	1,6	13,5
JT1-4-A-6	4,8	0,4	3,4	37,9	3,7	7,4	0,4	19,9	0,9	1,4	1,4	0,1	0,8	1,9	0,4	13,9	0,0
JT1-4-A-7	5,6	0,3	3,0	26,2	4,0	8,9	0,3	26,6	0,6	1,8	1,0	0,1	1,8	3,7	1,3	2,2	11,3
JT1-4-A-8	4,8	0,4	2,9	40,3	3,4	7,8	0,3	22,2	0,8	1,4	1,3	0,1	0,8	2,4	0,4	9,6	0,0
JT1-4-A-9	7,1	0,3	3,6	17,7	4,3	17,9	0,7	23,1	1,0	2,1	0,8	0,2	1,5	3,6	0,8	2,0	11,9
JT1-4-A-10	5,1	0,2	4,2	22,3	3,4	19,5	0,7	21,7	0,8	1,5	0,9	0,2	1,7	7,8	0,9	1,0	6,5
JT1-4-A-11	5,0	0,5	2,8	37,6	4,0	7,1	0,4	19,2	0,7	1,9	1,4	0,2	0,5	1,6	0,3	15,5	0,0
JT1-4-A-12	5,2	0,3	3,0	28,2	4,0	9,2	0,3	27,4	0,6	1,9	0,9	0,1	1,5	3,2	1,1	1,8	10,2
JT1-4-A-13	5,4	0,2	3,0	16,7	4,1	9,9	0,6	29,9	0,7	2,2	1,0	0,2	1,7	2,0	1,1	2,0	17,9
JT1-4-A-14	5,1	0,4	3,1	30,0	4,0	11,5	0,3	27,7	0,7	2,2	1,0	0,1	0,6	2,4	0,8	1,3	7,8
JT1-4-A-15	5,1	0,4	2,5	34,2	3,6	6,9	0,6	20,4	0,7	1,6	1,1	0,2	0,6	4,7	0,9	15,2	0,0
JT1-4-B-1	5,5	0,2	2,7	18,9	4,0	17,6	0,8	24,1	0,8	2,2	1,0	0,2	1,2	4,6	0,9	2,2	11,5
JT1-4-B-2	5,5	0,2	2,7	20,2	4,0	14,3	0,5	25,5	0,7	1,7	0,9	0,2	1,6	8,7	1,3	2,2	8,5
JT1-4-B-3	5,3	0,3	3,6	34,1	3,5	35,0	0,6	9,3	0,8	0,2	1,4	0,4	0,6	0,9	0,1	0,3	2,1
JT1-4-B-4	5,3	0,3	3,1	25,2	3,6	17,0	0,7	24,1	0,7	1,9	1,0	0,2	0,8	4,3	0,5	2,3	7,8
JT1-4-B-5	5,5	0,5	2,2	30,1	4,6	10,2	0,5	21,7	0,6	1,4	1,1	0,2	0,9	2,4	0,5	16,1	0,0

JT1-4-B-6	5,6	0,3	2,5	19,5	3,8	15,2	0,5	27,7	0,6	2,1	0,9	0,2	1,1	3,7	0,6	3,3	11,1
JT1-4-B-7	5,9	0,5	2,0	29,9	4,0	11,2	0,3	26,2	0,6	11,5	1,4	0,2	0,3	0,4	0,0	4,1	0,1
JT1-4-B-8	6,2	0,5	1,9	33,1	4,0	30,0	0,5	12,7	0,6	0,3	1,3	0,4	1,4	0,9	0,1	4,4	0,0
JT1-4-B-9	4,9	0,2	3,4	24,6	3,0	18,5	0,3	26,2	0,8	1,3	1,1	0,2	2,0	5,5	0,6	0,8	5,2
JT1-4-B-10	5,2	0,3	2,7	19,0	4,0	12,0	0,6	30,5	0,7	1,6	1,0	0,2	1,7	4,9	1,1	3,0	10,2
JT1-4-B-11	4,8	0,2	3,0	23,7	3,1	18,1	0,6	23,5	0,7	1,6	1,2	0,2	1,5	4,5	0,8	1,6	9,6
JT1-4-B-12	5,0	0,2	2,6	19,6	3,4	12,5	0,6	26,9	0,8	3,1	1,1	0,2	0,9	5,6	0,9	3,5	11,7
JT1-4-B-13	5,6	0,3	2,8	20,9	3,9	11,9	0,4	27,0	0,7	2,0	1,0	0,2	1,7	2,3	0,7	4,1	13,5
JT1-4-B-14	5,1	0,3	3,1	25,5	3,3	16,7	0,7	23,9	0,8	1,8	1,2	0,2	0,9	2,6	0,4	2,9	9,2
JT1-4-B-15	5,6	0,3	2,7	19,5	4,1	14,0	0,8	24,6	0,7	2,7	0,9	0,2	0,7	9,4	1,3	2,5	8,5

Các mẫu dầu ép hạt này còn chứa 0,1% C14:0; 0,1-0,2% C16:3; 0,0-0,1% mỗi axit béo trong số C20:1Δ13, C20:3ω6 và C20:4ω6; 0,3-0,4% C22:0; không có C22:1 và C22:2ω6; 0,2% C24:0 và 0,2-0,4% C24:1.

Bảng 20. Thành phần axit béo của dầu ép hạt từ hạt T2 đơn của *B. juncea* được biến nạp bằng T-DNA từ GA7-modB. Các lipit này còn chứa 0,1-0,2% C16:1Δ9, C16:3 và C20:2ω6, 0,5-0,6% C20:0, không chứa C20:3ω6, C20:4ω6 và C22:2ω6

Hạt số	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C18:4	C20:1Δ11	C20:3ω3	C22:0	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:3ω3	C24:0	C22:5ω6	C22:4ω3	C24:1	22:5ω3	C22:6ω3
1	4,4	1,7	36,3	2,9	8,3	0,5	22,0	1,4	1,2	0,4	0,3	4,2	0,6	0,1	0,1	0,0	1,8	0,3	**12,1**	0,0
2	5,6	1,9	39,1	3,1	8,4	0,4	18,9	1,2	1,3	0,5	0,3	2,5	0,4	0,1	0,2	0,0	1,5	0,4	**12,6**	0,0
3	5,5	1,8	42,3	3,2	9,9	0,3	24,0	5,9	1,5	0,2	0,4	0,5	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,4	**1,5**	0,0
4	5,6	1,5	36,8	3,7	9,4	0,3	19,6	0,6	1,4	1,4	0,3	1,9	0,3	0,2	0,2	0,0	1,6	0,4	**13,1**	0,0
5	4,6	1,7	36,3	2,7	7,2	0,3	22,6	1,0	1,5	0,7	0,3	2,1	0,3	0,1	0,2	0,0	2,2	0,3	**14,4**	0,0
6	4,9	1,8	38,3	3,1	7,4	0,3	20,2	0,8	1,3	0,8	0,3	2,7	0,5	0,2	0,2	0,0	1,7	0,3	**13,7**	0,0
7	4,7	1,7	36,2	3,0	8,2	0,4	20,9	0,7	1,3	0,9	0,3	2,9	0,5	0,2	0,2	0,0	2,0	0,3	**14,2**	0,0
8	4,8	2,2	41,0	3,0	9,8	0,2	27,0	4,2	1,8	0,3	0,3	0,5	0,0	0,1	0,2	0,0	0,7	0,3	**2,2**	0,0
9	5,8	1,7	36,6	3,7	9,1	0,3	21,3	0,9	1,4	0,8	0,3	1,5	0,3	0,1	0,2	0,0	1,2	0,4	**12,7**	0,0
10	4,8	2,1	47,1	2,9	7,4	0,2	23,9	4,8	1,7	0,2	0,3	0,5	0,0	0,0	0,2	0,0	0,5	0,3	**1,5**	0,0
11	5,1	1,7	37,4	3,3	7,7	0,3	20,7	0,9	1,4	0,8	0,3	2,5	0,4	0,1	0,2	0,0	1,6	0,4	**13,6**	0,0
12	4,7	1,8	37,3	2,7	7,9	0,4	20,6	1,1	1,3	0,5	0,3	4,3	0,6	0,1	0,1	0,0	2,2	0,3	**12,3**	0,0
13	4,9	2,0	37,9	3,0	7,1	0,4	20,1	1,1	1,3	0,6	0,3	4,1	0,5	0,1	0,1	0,0	2,1	0,3	**12,6**	0,0
14	4,7	1,6	35,7	3,2	6,9	0,3	22,4	0,7	1,4	1,3	0,3	3,0	0,5	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	**14,0**	0,0
15	4,7	1,8	37,6	3,4	7,8	0,3	23,7	0,6	1,5	1,2	0,2	1,7	0,3	0,2	0,1	0,0	1,8	0,3	**11,4**	0,0
16	5,3	1,6	35,3	3,5	8,1	0,5	21,1	0,8	1,2	0,7	0,3	3,1	0,5	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	**13,9**	0,0
17	4,9	1,7	39,4	3,3	7,7	0,3	21,1	0,7	1,4	0,8	0,3	2,0	0,3	0,2	0,1	0,0	1,7	0,3	**12,3**	0,0
18	5,0	1,8	38,5	3,1	7,8	0,4	20,5	0,8	1,3	0,8	0,2	2,3	0,3	0,2	0,1	0,0	2,0	0,3	**13,1**	0,0
19	5,1	1,8	39,5	2,9	9,0	0,2	22,2	0,6	1,5	1,0	0,3	1,7	0,2	0,1	0,2	0,0	1,6	0,3	**10,2**	0,0

20	4,8	1,8	38,2	3,2	7,8	0,4	21,1	0,7	1,4	0,7	0,3	2,1	0,4	0,2	0,1	0,0	1,7	0,3	**13,3**	0,0
21	5,0	2,0	39,7	2,9	7,9	0,4	20,2	0,7	1,3	0,7	0,3	2,3	0,3	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	**12,2**	0,0
22	4,7	1,6	36,0	3,3	8,3	0,3	23,7	0,6	1,5	1,2	0,3	1,7	0,3	0,2	0,1	0,0	1,8	0,3	**12,7**	0,0
23	6,2	2,1	32,0	4,4	7,2	0,6	19,4	1,2	1,2	0,6	0,4	2,2	0,5	0,3	0,2	0,0	1,6	0,4	**17,6**	0,0

Bảng 21. Thành phần axit béo của dầu ép hạt từ hạt T3 đơn của *B, juncea* được biến nạp bằng T-DNA từ GA7-modB. Các hạt này còn chứa 0,1-0,2% mỗi axit béo trong số C16:3, C20:1Δ13, C20:2ω6, không chứa C20:3ω6, C20:4ω6, C22:2ω6, C22:5ω6 và C22:6ω3 được phát hiện

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

Ví dụ 9. Phân tích tiếp theo về cây biến nạp và thử nghiệm trên cánh đồng

Phép phân tích lai thấm tách Southern được thực hiện trên cây *B. napus* T2 chọn lọc được biến nạp bằng T-DNA từ cấu trúc GA7-modB. DNA được chiết tách ra khỏi mẫu của mô cây được phân hủy bằng một số enzym giới hạn để tiến hành phân tích lại thấm tách Southern. Đoạn dò có hoạt tính phóng xạ tương ứng với một phần của T-DNA được lai với các vết, mà được rửa trong các điều kiện nghiêm ngặt, và các vết được bộc lộ trên màng để phát hiện dải lai hóa. Một số mẫu thể hiện dải lai hóa đơn đối với mỗi phân hủy giới hạn, tương ứng với các đoạn xen T-DNA đơn trong cây, trong lúc đó các mẫu khác thể hiện hai dải và các mẫu khác nữa lại thể hiện các dải T-DNA đa, tương ứng với từ 4 đến 6 đoạn xen. Số lượng dải lai hóa nhận được bằng phép phân tích thấm tách Southern Blot tương quan tốt với số lượng bản sao T-DNA trong cây chuyển gen như được xác định bởi phương pháp PCR số, lên tới số lượng bản sao khoảng 3 hoặc 4. Ở số lượng bản sao cao hơn khoảng 5, phương pháp PCR số trở nên kém tin cậy.

Một số dòng đã chọn được sử dụng làm dòng cho phấn hoa trong quá trình lai chéo với một nhóm khoảng 30 loại *B. napus* khác nhau có cơ sở di truyền khác nhau. Sự lai chéo ngược tiếp theo được thực hiện để chứng minh liệu các đoạn xen T-DNA đa có liên kết gen hay không, và cho phép phân ly locut chuyển gen không liên kết gen. Bằng cách đó, dòng chứa locut chuyển gen đơn được chọn lọc.

Các phản ứng PCR đoạn mồi đơn được thực hiện trên các dòng chuyển gen, bằng cách sử dụng đoạn mồi liền kề với biên trái và phải của T-DNA, và dòng bất kỳ thể hiện sự có mặt của các đoạn lặp đảo ngược của T-DNA bị bỏ đi.

Một vài dòng chuyển gen có sự ra hoa chậm, trong lúc các dòng khác có nhóm hạt giảm do đó hiệu suất hạt mỗi cây giảm sau khi sinh trưởng trong

nhà kính phù hợp với độ hữu thụ đực và cái giảm. Hình thái học của hoa được kiểm tra ở các cây này và nhận thấy rằng trong một số trường hợp, sự tách và giải phóng phấn hoa ra khỏi bao phấn bị chậm lại cho nên xảy ra sự kéo dài các vòi nhụy trước khi tách, bằng cách đó làm cho bao phấn cách xa ra khỏi núm nhụy. Độ hữu thụ toàn phần có thể được khôi phục bằng cách thụ tinh nhân tạo. Hơn nữa, khả năng sống của phấn hoa khi tách ra được xác định bằng cách nhuộm màu bằng các thuốc nhuộm sống FDA và PI (Ví dụ 1) và thể hiện là bị giảm trong một số dòng, trong khi đó trong hầu hết các dòng chuyển gen, khả năng sống của phấn hoa là khoảng 100% như trong đối chứng kiểu dại. Dưới dạng một thử nghiệm khác về nguyên nhân có thể gây ra sự giảm hiệu suất ở một số cây, hàm lượng và thành phần axit béo của nụ hoa, kể cả bao phấn và núm nhụy/vòi nhụy của một số cây T3 và T4 được thử nghiệm. Không phát hiện được DHA trong lipit chiết tách, cho thấy rằng các gen trong cấu trúc gen không được biểu hiện trong nụ hoa trong quá trình phát triển của cây, và bác bỏ điều này là nguyên nhân làm giảm hiệu suất hạt.

Hàm lượng dầu được đo bằng NMR và hàm lượng DHA trong tổng lượng axit béo được xác định đối với hạt T2. Các dòng chuyển gen có dưới 6% DHA được bỏ đi. Số lượng bản sao T-DNA trong mẫu lá từ cây của các thế hệ T1, T2 và T3 được xác định bằng phương pháp PCR số (Ví dụ 1).

Lô hạt T3 và T4 chọn lọc được gieo trên cánh đồng ở hai nơi thuộc Victoria, Australia, mỗi nơi thành các hàng có chiều dài 10m với mật độ gieo khoảng 10 hạt/m. Lô hạt chọn lọc bao gồm dòng được tạo ra từ B003-5-14 có hạt đã được phân nhóm với hàm lượng DHA hàm lượng khoảng 8-11% và hạt T2 riêng rẽ có hàm lượng DHA lên đến khoảng 19%, với số lượng bản sao T-DNA của cây T0 bằng 3. Lô hạt chọn lọc cũng bao gồm dòng được tạo ra từ B0050-27 có hạt T2 với hạt hàm lượng DHA lớn hơn 20%, và số lượng bản sao T-DNA của cây T2 bằng 1 hoặc 2. Hạt gieo trên cánh đồng nảy mầm và cây non mọc ở cùng một tốc độ như hạt kiểu dại. Cây mọc từ hầu hết,

nhưng không phải toàn bộ, lô hạt đã được gieo có kiểu hình bình thường, ví dụ có hình thái học, tốc độ sinh trưởng, chiều cao cây, độ hữu thụ đực và cái, khả năng sống của phấn hoa (100%), bộ hạt, kích thước quả giác dài và hình thái học gần giống như cây đối chứng kiểu dại sinh trưởng trong cùng điều kiện. Hiệu suất hạt mỗi cây là tương tự với hiệu suất hạt của mỗi cây thuộc nhóm đối chứng kiểu dại trong vùng điều kiện. Các mẫu hạt khác được gieo trên các diện tích lớn để tạo ra các dòng chuyển gen chọn lọc. Toàn bộ hàm lượng DHA trong hạt được thu hoạch ít nhất bằng 30mg/g hạt.

Chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ rằng có thể thực hiện các biến đổi và/hoặc điều chỉnh với sáng chế được nêu trong các phương án cụ thể mà không vượt quá tinh thần hoặc phạm sáng chế được mô tả. Do đó, các phương án theo sáng chế chỉ nhằm mục đích minh họa mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Thảo luận bất kỳ về tài liệu, tác dụng, vật liệu, thiết bị, sản phẩm hoặc tương tự được nêu trong đơn này chỉ dành cho mục đích tạo ra nội dung của sáng chế. Không cho rằng một vấn đề bất kỳ hoặc toàn bộ các vấn đề tạo nên một phần của nền tảng lĩnh vực kỹ thuật đã biết hoặc là kiến thức chung thông thường trong lĩnh vực có liên quan với sáng chế vì nó tồn tại trước ngày ưu tiên của mỗi điểm yêu cầu bảo hộ của đơn này.

Tài liệu tham khảo

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. (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. Lipit Res. 23:1072-1075.
Damude et al. (2006). Proc Natl Acad Sci USA 103: 9446-9451.
Denic và 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.
Gamèz 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) Genomic Res. 13:455-466.
Lu và 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) Lipit Res 45:1899-1909.
Michaelson et al. (1998a) J. Biol. Chem. 273:19055-19059.
Michaelson et al. (1998b) FEBS Lett. 439:215-218.
Murashige và Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15:473-497.
Napier et al. (1998) Biochem. J. 330:611-614.
Needleman và 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 và 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. dầu 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. Lipit 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. Lipit Sci. và Tech. 103:45-55.
Tvrdik (2000) J. Cell Biol. 149:707-718.
Venegas-Caleron et al. (2010) Prog. Lipit Res. 49:108-119.
Voinnet et al. (2003) Plant J. 33:949-956.
Wallis và Browse (1999) Arch. Biochem. Biophys. 365:307-316.
Watts và 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.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Lipit chiết tách được từ cây, bao gồm các axit béo ở dạng được este hóa, các axit béo này bao gồm axit oleic, axit palmitic, các axit béo ω6 mà bao gồm axit linoleic (LA), các axit béo ω3 mà bao gồm axit α-linolenic (ALA) và axit docosapentaenoic (DPA), và tùy ý một hoặc nhiều trong số axit stearidonic (SDA), axit eicosapentaenoic (EPA), và axit eicosatetraenoic (ETA), trong đó mức DPA trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách này nằm trong khoảng từ 7% đến 35%.

2. Lipit theo điểm 1 có một hoặc nhiều trong số các đặc tính sau:

i) mức axit palmitic trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ khoảng 2% đến 15%, hoặc từ khoảng 3% đến khoảng 10%,

ii) mức axit myristic (C14:0) trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được vào khoảng 0,1%,

iii) mức axit oleic trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ khoảng 1% đến khoảng 30%, từ khoảng 3% đến khoảng 30%, từ khoảng 6% đến khoảng 30%, từ 1% đến khoảng 20%, từ khoảng 30% đến khoảng 60%, khoảng 45% đến khoảng 60%, khoảng 30%, hoặc từ khoảng 15% đến khoảng 30%,

iv) mức axit linoleic (LA) trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ khoảng 4% đến khoảng 35%, từ khoảng 4% đến khoảng 20%, từ khoảng 4% đến khoảng 17%, hoặc từ khoảng 5% đến khoảng 10%,

v) mức axit α-linolenic (ALA) trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ khoảng 4% đến khoảng 40%, từ khoảng 7% đến khoảng 40%, từ khoảng 10% đến khoảng 35%, từ khoảng 20% đến khoảng 35%, từ khoảng 4% đến 16%, hoặc từ khoảng 2% đến 16%,

vi) mức axit γ-linolenic (GLA) trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được ít hơn 4%, ít hơn khoảng 3%, ít hơn khoảng 2%, ít hơn khoảng 1%, ít hơn khoảng 0,5%, từ 0,05% đến 7%, từ 0,05% đến 4%, từ 0,05% đến khoảng 3%, hoặc từ 0,05% đến khoảng 2%,

vii) mức axit stearidonic (SDA) trong tổng hàm lượng axit béo của lipit

chiết tách được ít hơn khoảng 10%, ít hơn khoảng 8%, ít hơn khoảng 7%, ít hơn khoảng 6%, ít hơn khoảng 4%, ít hơn khoảng 3%, từ khoảng 0,05% đến khoảng 7%, từ khoảng 0,05% đến khoảng 6%, từ khoảng 0,05% đến khoảng 4%, từ khoảng 0,05% đến khoảng 3%, từ khoảng 0,05% đến khoảng 10%, hoặc từ 0,05% đến khoảng 2%,

viii) mức axit eicosatetraenoic (ETA) trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được ít hơn khoảng 6%, ít hơn khoảng 5%, ít hơn khoảng 4%, ít hơn khoảng 1%, ít hơn khoảng 0,5%, từ 0,05% đến khoảng 6%, từ 0,05% đến khoảng 5%, từ 0,05% đến khoảng 4%, từ 0,05% đến khoảng 3%, hoặc từ 0,05% đến khoảng 2%,

ix) mức axit eicosatrienoic (ETrA) trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được ít hơn 4%, ít hơn khoảng 2%, ít hơn khoảng 1%, từ 0,05% đến 4%, từ 0,05% đến 3%, hoặc từ 0,05% đến khoảng 2%, hoặc từ 0,05% đến khoảng 1%,

x) mức axit eicosapentaenoic (EPA) trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ 4% đến 15%, ít hơn 4%, ít hơn khoảng 3%, ít hơn khoảng 2%, từ 0,05% đến 10%, từ 0,05% đến 5%, từ 0,05% đến khoảng 3%, hoặc từ 0,05% đến khoảng 2%,

xi) mức DHA trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được ít hơn 2%, hoặc từ 0,05% đến khoảng 2%,

xii) lipit này bao gồm axit ω6-docosapentaenoic ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) trong hàm lượng axit béo của nó,

xiii) lipit này bao gồm ít hơn 0,1% axit ω6-docosapentaenoic ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) trong hàm lượng axit béo của nó,

xiv) lipit này bao gồm ít hơn 0,1% một hoặc nhiều trong số hoặc tất cả SDA, EPA và ETA trong hàm lượng axit béo của nó,

xv) tổng mức axit béo bão hòa trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ khoảng 4% đến khoảng 25%, từ khoảng 4% đến khoảng 20%, từ khoảng 6% đến khoảng 20%, hoặc từ khoảng 6% đến khoảng 12%,

xvi) tổng mức axit béo có một vị trí chưa bão hòa trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ khoảng 4% đến khoảng 40%, từ khoảng 4% đến khoảng 35%, từ khoảng 8% đến khoảng 25%, từ 8% đến khoảng

22%, từ khoảng 15% đến khoảng 40% hoặc từ khoảng 15% đến khoảng 35%,

xvii) tổng mức axit béo có nhiều vị trí chưa bão hòa trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ khoảng 20% đến khoảng 75%, từ 30% đến 75%, từ khoảng 50% đến khoảng 75%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, hoặc từ khoảng 60% đến khoảng 75%,

xviii) tổng mức các axit béo ω6 trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ khoảng 35% đến khoảng 50%, từ khoảng 20% đến khoảng 35%, từ khoảng 6% đến 20%, ít hơn 20%, ít hơn khoảng 16%, ít hơn khoảng 10%, từ khoảng 1% đến khoảng 16%, từ khoảng 2% đến khoảng 10%, hoặc từ khoảng 4% đến khoảng 10%,

xix) mức các axit béo ω6 mới trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được ít hơn khoảng 10%, ít hơn khoảng 8%, ít hơn khoảng 6%, ít hơn 4%, từ khoảng 1% đến khoảng 20%, từ khoảng 1% đến khoảng 10%, từ 0,5% đến khoảng 8%, hoặc từ 0,5% đến 4%,

xx) tổng mức các axit béo ω3 trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ 36% đến khoảng 65%, từ 36% đến khoảng 70%, từ 40% đến khoảng 60%, từ khoảng 30% đến khoảng 60%, từ khoảng 35% đến khoảng 60%, từ 40% đến khoảng 65%, từ khoảng 30% đến khoảng 65%, từ khoảng 35% đến khoảng 65%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65% hoặc khoảng 70%,

xxi) mức các axit béo ω3 mới trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ 21% đến khoảng 45%, từ 21% đến khoảng 35%, từ khoảng 23% đến khoảng 35%, từ khoảng 25% đến khoảng 35%, từ khoảng 27% đến khoảng 35%, khoảng 23%, khoảng 25%, khoảng 27%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40% hoặc khoảng 45%,

xxii) tỷ lệ của tổng các axit béo ω6: tổng các axit béo ω3 trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ khoảng 1,0 đến khoảng 3,0, từ khoảng 0,1 đến khoảng 1, từ khoảng 0,1 đến khoảng 0,5, ít hơn khoảng 0,50, ít hơn khoảng 0,40, ít hơn khoảng 0,30, ít hơn khoảng 0,20, ít hơn khoảng 0,15, khoảng 1,0, khoảng 0,1, khoảng 0,10 đến khoảng 0,4, hoặc khoảng 0,2,

xxiii) tỷ lệ của các axit béo ω6 mới: các axit béo ω3 mới trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ khoảng 1,0 đến khoảng

3,0, từ khoảng 0,02 đến khoảng 0,1, từ khoảng 0,1 đến khoảng 1, từ khoảng 0,1 đến khoảng 0,5, ít hơn khoảng 0,50, ít hơn khoảng 0,40, ít hơn khoảng 0,30, ít hơn khoảng 0,20, ít hơn khoảng 0,15, khoảng 0,02, khoảng 0,05, khoảng 0,1, khoảng 0,2 hoặc khoảng 1,0,

xxiv) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu quả chuyển hóa của axit oleic thành LA bởi Δ12-desaturaza ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, từ khoảng 60% đến khoảng 98%, từ khoảng 70% đến khoảng 95%, hoặc từ khoảng 75% đến khoảng 90%,

xxv) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu quả chuyển hóa của ALA thành SDA bởi Δ6-desaturaza ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, từ khoảng 30% đến khoảng 70%, từ khoảng 35% đến khoảng 60%, hoặc từ khoảng 50% đến khoảng 70%,

xxvi) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu quả chuyển hóa của SDA thành axit ETA bởi Δ6-elongaza ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, từ khoảng 60% đến khoảng 95%, từ khoảng 70% đến khoảng 88%, hoặc từ khoảng 75% đến khoảng 85%,

xxvii) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu quả chuyển hóa của ETA thành EPA bởi Δ5-desaturaza ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, từ khoảng 60% đến khoảng 99%, từ khoảng 70% đến khoảng 99%, hoặc từ khoảng 75% đến khoảng 98%,

xxviii) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu quả chuyển hóa của EPA thành DPA bởi Δ5-elongaza ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, từ khoảng 50% đến khoảng 99%, từ khoảng 85% đến khoảng 99%, từ khoảng 50% đến khoảng 95%, hoặc từ khoảng 85% đến khoảng 95%,

xxix) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu quả chuyển hóa của axit oleic thành DPA ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, từ khoảng 10% đến khoảng 50%, từ khoảng 10% đến khoảng 30%, từ khoảng 10% đến khoảng 25% hoặc từ khoảng 20% đến khoảng 30%,

xxx) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu quả chuyển hóa của LA thành DPA ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 22%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, khoảng 25%, khoảng 30%,

khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, từ khoảng 15% đến khoảng 50%, từ khoảng 20% đến khoảng 40%, hoặc từ khoảng 20% đến khoảng 30%,

xxxi) thành phần axit béo của lipit dựa trên hiệu quả chuyển hóa của ALA thành DPA ít nhất khoảng 17%, ít nhất khoảng 22%, ít nhất khoảng 24%, ít nhất khoảng 30%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, từ khoảng 22% đến khoảng 70%, từ khoảng 17% đến khoảng 55%, từ khoảng 22% đến khoảng 40%, hoặc từ khoảng 24% đến khoảng 40%,

xxxii) tổng axit béo trong lipit chiết tách được có ít hơn 1,5% C20:1, ít hơn 1% C20:1 hoặc khoảng 1% C20:1,

xxxiii) hàm lượng triaxylglyxerol (TAG) của lipit này ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất 95%, từ khoảng 70% đến khoảng 99%, hoặc từ khoảng 90% đến khoảng 99%,

xxxiv) lipit này bao gồm diaxylglyxerol (DAG), DAG này tốt hơn bao gồm DPA,

xxxv) lipit này bao gồm ít hơn khoảng 10%, ít hơn khoảng 5%, ít hơn khoảng 1%, hoặc từ khoảng 0,001% đến khoảng 5%, các axit béo tự do (không được este hóa) và/hoặc phospholipit, hoặc gần như không chứa chúng,

xxxvi) ít nhất 70%, ít nhất 72% hoặc ít nhất 80%, DPA được este hóa ở dạng TAG là ở vị trí *sn*-1 hoặc *sn*-3 của TAG,

xxxvii) các loại DPA phổ biến nhất chứa TAG trong lipit là DPA/18:3/18:3 (TAG 56:12),

xxxviii) lipit này bao gồm tri-DPA TAG (TAG 66:18), và

xxxix) mức DPA trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được vào khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, khoảng 10%, khoảng 12%, khoảng 15%, khoảng 18%, khoảng 20%, khoảng 22%, khoảng 24%, khoảng 26%, khoảng 28%, khoảng 31%, từ khoảng 7% đến khoảng 31%, từ khoảng 7% đến khoảng 28%, từ khoảng 10% đến 35%, từ khoảng 10% đến khoảng 30%, từ khoảng 10% đến khoảng 25%, từ khoảng 10% đến khoảng 22%, từ khoảng 14% đến 35%, từ khoảng 16% đến 35%, từ khoảng 16% đến khoảng 30%, từ khoảng 16% đến khoảng 25%, hoặc từ khoảng 16% đến khoảng 22%, tùy ý trong đó mức DHA ít hơn 0,5% tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được.

3. Lipit theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó lipit này là dầu, tốt hơn là dầu từ hạt chứa dầu, tốt hơn nữa là trong đó lipit này bao gồm hoặc là dầu *Brassica sp.* (chi cải) như dầu *Brassica napus* (cây cải dầu) hoặc *Brassica juncea* (cây cải bẹ xanh), dầu *Gossypium hirsutum* (cây bông vùng cao), dầu *Linum usitatissimum* (cây lanh), dầu *Helianthus sp.*(chi hướng dương), dầu *Carthamus tinctorius* (hồng hoa), dầu *Glycine max* (đậu nành), dầu *Zea mays* (ngô), dầu *Elaesis guineenis* (cọ dầu), dầu *Nicotiana benthamiana* (chi thuốc lá), dầu *Lupinus angustifolius* (cây đậu lá hẹp), dầu *Camelina sativa* (cây gai dầu), dầu *Crambe abyssinica* (thuộc họ cải), dầu *Miscanthus x giganteus* (cỏ ngựa vằn khổng lồ) hoặc dầu *Miscanthus sinensis* (cỏ bạc Trung Quốc.

4. Quy trình sản xuất lipit chiết tách được từ cây, bao gồm các bước sau:

i) thu lấy bộ phận của cây bao gồm lipit, lipit này bao gồm các axit béo ở dạng được este hóa, các axit béo này bao gồm axit oleic, axit palmitic, các axit béo ω6 mà bao gồm axit linoleic (LA), các axit béo ω3 mà bao gồm axit α-linolenic (ALA), axit stearidonic (SDA), axit docosapentaenoic (DPA), và tùy ý một hoặc nhiều trong số axit eicosapentaenoic (EPA) và axit eicosatetraenoic (ETA), trong đó mức DPA trong tổng hàm lượng axit béo của lipit có thể chiết tách được trong bộ phận của cây nằm trong khoảng từ 7% đến 35%, và

ii) chiết tách lipit từ bộ phận của cây,

trong đó mức DPA trong tổng hàm lượng axit béo của lipit chiết tách được nằm trong khoảng từ 7% đến 35%.

5. Quy trình theo điểm 4, trong đó lipit chiết tách được có một hoặc nhiều trong số đặc tính được định nghĩa trong điểm 2 hoặc điểm 3.

6. Quy trình theo điểm 4 hoặc điểm 5, trong đó bộ phận của cây là hạt, tốt hơn là hạt chứa dầu như hạt của *Brassica sp.* như *Brassica napus* hoặc *Brassica juncea, Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus sp.*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Elaesis guineenis*, *Nicotiana benthamiana*, *Lupinus angustifolius*, *Camelina sativa*, hoặc *Crambe abyssinica*, tốt hơn là hạt của *Brassica*

napus, B. juncea hoặc *C. sativa*.

7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6, trong đó bộ phận của cây bao gồm các polynucleotit ngoại sinh mã hóa một trong số bộ enzym sau đây:

i) ω3-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

ii) Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iii) Δ12-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iv) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

v) ω3-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vi) Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vii) Δ12-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

viii) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

ix) ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza, hoặc

x) ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

và trong đó mỗi polynucleotit liên kết có điều khiển với một hoặc nhiều đoạn khởi điểm có khả năng định hướng sự biểu hiện của các polynucleotit nêu trên trong tế bào của bộ phận của cây.

8. Quy trình theo điểm 7, trong đó bộ phận của cây có một hoặc nhiều trong số hoặc tất cả các đặc tính sau

i) Δ12-desaturaza chuyển hóa axit oleic thành axit linoleic trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây với hiệu quả ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, từ khoảng 60% đến khoảng 95%, từ khoảng 70% đến khoảng 90%, hoặc từ khoảng 75% đến khoảng 85%,

ii) ω3-desaturaza chuyển hóa các axit béo ω6 thành các axit béo ω3 trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây với hiệu quả ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 85%, từ khoảng 65% đến khoảng 95%, từ khoảng 75% đến khoảng 91%, hoặc từ khoảng 80% đến khoảng 91%,

iii) Δ6-desaturaza chuyển hóa ALA thành SDA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây với hiệu quả ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, từ khoảng 30% đến khoảng 70%, từ khoảng 35% đến khoảng 60%, hoặc từ khoảng 50% đến khoảng 70%,

iv) Δ6-desaturaza chuyển hóa axit linoleic thành axit γ-linolenic trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây với hiệu quả ít hơn khoảng 5%, ít hơn khoảng 2,5%, ít hơn khoảng 1%, từ khoảng 0,1% đến khoảng 5%, từ khoảng 0,5% đến khoảng 2,5%, hoặc từ khoảng 0,5% đến khoảng 1%,

v) Δ6-elongaza chuyển hóa SDA thành ETA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây với hiệu quả ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, từ khoảng 60% đến khoảng 95%, từ khoảng 70% đến khoảng 80%, hoặc từ khoảng 75% đến khoảng 80%,

vi) Δ5-desaturaza chuyển hóa ETA thành EPA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây với hiệu quả ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, từ khoảng 60% đến khoảng 95%, từ khoảng 70% đến khoảng 95%, hoặc từ khoảng 75% đến khoảng 95%,

vii) Δ5-elongaza chuyển hóa EPA thành DPA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây với hiệu quả ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, từ khoảng 50% đến khoảng 90%, hoặc từ khoảng 85% đến khoảng 95%,

viii) hiệu quả chuyển hóa axit oleic thành DPA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, từ khoảng 10% đến khoảng 50%, từ khoảng 10% đến khoảng 30%, từ khoảng 10% đến khoảng 25%, hoặc từ khoảng 20% đến khoảng 30%,

ix) hiệu quả chuyển hóa LA thành DPA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 22%, ít nhất

khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, từ khoảng 15% đến khoảng 50%, từ khoảng 20% đến khoảng 40%, hoặc từ khoảng 20% đến khoảng 30%,

x) hiệu quả chuyển hóa ALA thành DPA trong một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây ít nhất khoảng 17%, ít nhất khoảng 22%, ít nhất khoảng 24%, ít nhất khoảng 30%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, từ khoảng 17% đến khoảng 55%, từ khoảng 22% đến khoảng 35%, hoặc từ khoảng 24% đến khoảng 35%,

xi) một hoặc nhiều tế bào của bộ phận của cây bao gồm lượng axit béo ω3 nhiều hơn so với các tế bào tương ứng thiếu các polynucleotit ngoại sinh ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, từ khoảng 25% đến khoảng 40%, hoặc từ khoảng 27,5% đến khoảng 37,5%,

xii) Δ6-desaturaza ưu tiên khử bão hòa axit α-linolenic (ALA) hơn so với axit linoleic (LA),

xiii) Δ6-elongaza cũng có hoạt tính Δ9-elongaza,

xiv) Δ12-desaturaza cũng có hoạt tính Δ15-desaturaza,

xv) Δ6-desaturaza cũng có hoạt tính Δ8-desaturaza,

xvi) Δ8-desaturaza cũng có hoạt tính Δ6-desaturaza hoặc không có hoạt tính Δ6-desaturaza,

xvii) Δ15-desaturaza cũng có hoạt tính ω3-desaturaza trên GLA,

xviii) ω3-desaturaza cũng có hoạt tính Δ15-desaturaza trên LA,

xix) ω3-desaturaza khử bão hòa cả LA và/hoặc GLA,

xx) ω3-desaturaza ưu tiên khử bão hòa GLA hơn so với LA,

xxi) một hoặc nhiều trong số hoặc tất cả các desaturaza có hoạt tính lớn hơn trên cơ chất axyl-CoA so với cơ chất axyl-PC tương ứng,

xxii) Δ6-desaturaza có hoạt tính Δ6-desaturaza trên ALA lớn hơn so với LA dưới dạng cơ chất axit béo,

xxiii) Δ6-desaturaza có hoạt tính Δ6-desaturaza trên ALA-CoA dưới dạng cơ chất axit béo lớn hơn so với trên ALA được liên kết với vị trí *sn*-2 của PC dưới dạng cơ chất axit béo,

xxiv) Δ6-desaturaza có hoạt tính Δ6-desaturaza lớn hơn ít nhất khoảng 2 lần, lớn hơn ít nhất khoảng 3 lần, lớn hơn ít nhất khoảng 4 lần, hoặc lớn hơn ít nhất khoảng 5 lần, trên ALA dưới dạng cơ chất so với LA,

xxv) Δ6-desaturaza có hoạt tính trên ALA-CoA dưới dạng cơ chất axit béo lớn hơn so với trên ALA được liên kết với vị trí *sn*-2 của PC dưới dạng cơ chất axit béo,

xxvi) Δ6-desaturaza có hoạt tính Δ6-desaturaza lớn hơn ít nhất khoảng 5 lần hoặc lớn hơn ít nhất khoảng 10 lần, trên ALA-CoA dưới dạng cơ chất axit béo so với trên ALA được liên kết với vị trí *sn*-2 của PC dưới dạng cơ chất axit béo,

xxvii) desaturaza là desaturaza đầu trước, và

xxviii) Δ6-desaturaza có hoạt tính Δ5-desaturaza trên ETA ở mức không phát hiện được.

9. Quy trình theo điểm 7 hoặc điểm 8, trong đó bộ phận của cây còn bao gồm polynucleotit ngoại sinh mã hóa diaxylglyxerol axyltransferaza (DGAT), monoaxylglyxerol axyltransferaza (MGAT), glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (GPAT), 1-axyl-glyxerol-3-phosphat axyltransferaza (LPAAT) tốt hơn là LPAAT mà có thể sử dụng cơ chất axyl béo C22 nhiều vị trí chưa bão hòa-CoA như DPA-CoA, axyl-CoA:lysophosphatidylcholin axyltransferaza (LPCAT), phospholipaza A_2 (PLA_2), phospholipaza C (PLC), phospholipaza D (PLD), CDP-cholin diaxylglyxerol cholin phosphotransferaza (CPT), phoshatidylcholin diaxylglyxerol axyltransferaza (PDAT), phosphatidylcholin:diaxylglyxerol cholin phosphotransferaza (PDCT), axyl-CoA synthaza (ACS), hoặc tổ hợp của hai hoặc nhiều trong số chúng.

10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 9, trong đó các polynucleotit ngoại sinh được liên kết đồng hóa trị trong phân tử ADN, tốt hơn là phân tử T-ADN, được tích hợp vào trong hệ gen của các tế bào của bộ phận của cây và tốt hơn là trong đó số lượng các phân tử ADN được được tích hợp vào trong hệ gen của các tế bào của bộ phận của cây không lớn hơn một, không lớn hơn hai hoặc ba, hoặc là hai hoặc ba.

11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 10, trong đó tổng hàm lượng dầu của bộ phận của cây bao gồm các polynucleotit ngoại sinh ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, từ khoảng 50% đến khoảng 80%, hoặc từ khoảng 80% đến khoảng 100% tổng hàm lượng dầu của bộ

phận của cây tương ứng thiếu các polynucleotit ngoại sinh.

12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 11, trong đó quy trình này bao gồm thêm bước xử lý lipit để làm tăng mức DPA dưới dạng phần trăm của tổng hàm lượng axit béo, trong đó bước xử lý này bao gồm một hoặc nhiều xử lý trong số phân đoạn, chưng cất hoặc chuyển hóa este như tạo ra metyl- hoặc etyl-este của DPA.

13. Cây có hạt chứa dầu bao gồm lipit trong hạt của nó, hoặc bộ phận của cây này, bao gồm:

a) lipit bao gồm các axit béo ở dạng được este hóa, và

b) các polynucleotit ngoại sinh mã hóa một trong số bộ enzym sau đây:

i) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

ii) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

iii) ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza, hoặc

iv) ω3-desaturaza và/hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

trong đó mỗi polynucleotit liên kết có điều khiển với một hoặc nhiều đoạn khởi điểm đặc hiệu hạt có khả năng định hướng sự biểu hiện của các polynucleotit nêu trên trong khi phát triển các hạt của cây, trong đó các axit béo này bao gồm axit oleic, axit palmitic, các axit béo ω6 mà bao gồm axit linoleic (LA), các axit béo ω3 mà bao gồm axit α-linolenic (ALA), axit stearidonic (SDA), và axit docosapentaenoic (DPA), và tùy ý axit eicosapentaenoic (EPA) và/hoặc axit eicosatetraenoic (ETA), và trong đó mức DPA trong tổng hàm lượng axit béo của lipit trong hạt nằm trong khoảng từ 7% và 35%.

14. Cây *Brassica napus* có khả năng tạo ra hạt bao gồm DPA, trong đó hạt trưởng thành, đã thu hoạch của cây có hàm lượng DPA ít nhất khoảng 28mg trong 1g hạt, tốt hơn là ít nhất khoảng 32mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 36mg trong 1g hạt, ít

nhất khoảng 40mg trong 1g hạt, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 44mg trong 1g hạt hoặc ít nhất khoảng 48mg trong 1g hạt, khoảng 80 mg trong 1g hạt, hoặc từ khoảng 30mg đến khoảng 80mg trong 1g hạt.

15. Cây *Brassica juncea* có khả năng tạo ra hạt bao gồm DPA, trong đó hạt trưởng thành, đã thu hoạch của cây có hàm lượng DPA ít nhất khoảng 28mg trong 1g hạt, tốt hơn là ít nhất khoảng 32mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 36mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 40mg trong 1g hạt, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 44mg trong 1g hạt hoặc ít nhất khoảng 48mg trong 1g hạt, khoảng 80 mg trong 1g hạt, hoặc từ khoảng 30mg đến khoảng 80mg trong 1g hạt.

16. Cây *Camelina sativa* có khả năng tạo ra hạt bao gồm DPA, trong đó hạt trưởng thành, đã thu hoạch của cây có hàm lượng DPA ít nhất khoảng 28mg trong 1g hạt, tốt hơn là ít nhất khoảng 32mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 36mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 40mg trong 1g hạt, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 44mg trong 1g hạt hoặc ít nhất khoảng 48mg trong 1g hạt, khoảng 80 mg trong 1g hạt, hoặc từ khoảng 30mg đến khoảng 80mg trong 1g hạt.

17. Tế bào của cây theo điểm 13 bao gồm các polynucleotit ngoại sinh.

18. Bộ phận của cây, tốt hơn là hạt, có một hoặc nhiều trong số các đặc tính sau

i) thu được từ cây theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 16,

ii) bao gồm lipit như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, hoặc

iii) có thể được sử dụng trong quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 12.

19. Hạt trưởng thành, đã thu hoạch của cây *Brassica napus* bao gồm DPA và hàm lượng ẩm từ khoảng 4% đến khoảng 15% trọng lượng, tốt hơn là từ khoảng 6% đến khoảng 8% trọng lượng hoặc từ khoảng 4% đến khoảng 8% trọng lượng, trong đó hàm lượng DPA của hạt ít nhất khoảng 28mg trong 1g hạt, tốt hơn là ít nhất khoảng 32mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 36mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 40mg trong 1g

hạt, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 44mg trong 1g hạt hoặc ít nhất khoảng 48mg trong 1g hạt, khoảng 80 mg trong 1g hạt, hoặc từ khoảng 30mg đến khoảng 80mg trong 1g hạt.

20. Hạt trưởng thành, đã thu hoạch của cây *Brassica juncea* bao gồm DPA và hàm lượng ẩm từ khoảng 4% đến khoảng 15% trọng lượng, tốt hơn là từ khoảng 6% đến khoảng 8% trọng lượng hoặc từ khoảng 4% đến khoảng 8% trọng lượng, trong đó hàm lượng DPA của hạt ít nhất khoảng 28mg trong 1g hạt, tốt hơn là ít nhất khoảng 32mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 36mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 40mg trong 1g hạt, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 44mg trong 1g hạt hoặc ít nhất khoảng 48mg trong 1g hạt, khoảng 80 mg trong 1g hạt, hoặc từ khoảng 30mg đến khoảng 80mg trong 1g hạt.

21. Hạt trưởng thành, đã thu hoạch của cây *Camelina sativa* bao gồm DPA và hàm lượng ẩm từ khoảng 4% đến khoảng 15% trọng lượng, tốt hơn là từ khoảng 6% đến khoảng 8% trọng lượng hoặc từ khoảng 4% đến khoảng 8% trọng lượng, trong đó hàm lượng DPA của hạt ít nhất khoảng 28mg trong 1g hạt, tốt hơn là ít nhất khoảng 32mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 36mg trong 1g hạt, ít nhất khoảng 40mg trong 1g hạt, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 44mg trong 1g hạt hoặc ít nhất khoảng 48mg trong 1g hạt, khoảng 80 mg trong 1g hạt, hoặc từ khoảng 30mg đến khoảng 80mg trong 1g hạt.

22. Phương pháp tạo ra cây có thể được sử dụng để sản xuất lipit chiết tách được từ cây theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) thử nghiệm mức DPA trong lipit được tạo ra bởi một hoặc nhiều bộ phận của cây từ nhiều cây, mỗi cây bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit ngoại sinh mã hóa một trong số bộ enzym sau đây:

i) ω3-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

ii) Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iii) Δ12-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

iv) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza,

v) ω3-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

vi) Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elngase và Δ5-elongaza,

vii) Δ12-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

viii) Δ12-desaturaza, ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

ix) ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ6-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ6-elongaza và Δ5-elongaza, hoặc

x) ω3-desaturaza hoặc Δ15-desaturaza, Δ8-desaturaza, Δ5-desaturaza, Δ9-elongaza và Δ5-elongaza,

trong đó mỗi polynucleotit liên kết có điều khiển với một hoặc nhiều đoạn khởi điểm có khả năng định hướng sự biểu hiện của các polynucleotit nêu trên trong tế bào của bộ phận của cây, và

b) xác định cây, từ nhiều cây, mà có thể được sử dụng để sản xuất lipit chiết tách được từ cây theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 trong một hoặc nhiều bộ phận của nó, và

c) tùy ý, tạo ra cây tổ tiên cho cây đã xác định hoặc hạt của chúng.

23. Phương pháp tạo ra hạt bao gồm các bước sau:

a) gieo trồng cây theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 16, hoặc cây tạo ra bộ phận của cây theo điểm 18, hoặc tạo ra hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 21, tốt hơn là trên cánh đồng dưới dạng một phần của quần thể gồm ít nhất là 1000 hoặc 2000 hoặc 3000 cây hoặc ở diện tích ít nhất là 1 héc ta hoặc 2 héc ta hoặc 3 héc ta được trồng với mật độ trồng tiêu chuẩn,

b) thu hoạch hạt từ cây hoặc các cây, và

c) tùy ý, chiết tách lipit từ hạt, tốt hơn là để sản xuất dầu có tổng sản lượng

DPA ít nhất là 60kg hoặc 70kg hoặc 80kg DPA/héc ta.

24. Cây, tế bào cây, bộ phận của cây hoặc hạt của cây, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 21, có một hoặc nhiều trong số các đặc tính sau đây:

i) bao gồm dầu như được xác định trong điểm 2 hoặc 3, và

ii) bộ phận của cây hoặc hạt có khả năng được sử dụng trong quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 12.

25. Lipit, hoặc dầu, được sản xuất bởi, hoặc thu được bằng cách sử dụng quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 12, tế bào theo điểm 17, cây có hạt chứa dầu theo điểm 13, cây *Brassica napus* theo điểm 14, cây *Brassica junce* theo điểm 15, cây *Camelina sativa* theo điểm 16, bộ phận của cây theo điểm 18, hoặc hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 21.

26. Bột từ hạt thu được từ hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 21, hoặc thu được từ cây theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 16.

27. Chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều trong số: lipit hoặc dầu theo điểm 25, tế bào theo điểm 17, tế bào cây theo điểm 24, hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 21, hoặc bột từ hạt điểm 26.

28. Thức ăn chăn nuôi bao gồm một hoặc nhiều trong số: lipit hoặc dầu theo điểm 25, tế bào theo điểm 17, cây có hạt chứa dầu theo điểm 13, tế bào cây theo điểm 24, cây *Brassica napus* theo điểm 14, cây *Brassica junce* theo điểm 15, cây *Camelina sativa* theo điểm 16, bộ phận của cây theo điểm 24, hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 21, bột từ hạt theo điểm 26, hoặc chế phẩm theo điểm 27.

29. Phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi bao gồm bước trộn một hoặc nhiều trong số: lipit hoặc dầu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, tế bào theo điểm 17, cây có hạt chứa dầu theo điểm 13, tế bào cây theo điểm 24, cây *Brassica napus* theo điểm 14, cây *B. junce* theo điểm 15, cây *Camelina sativa* theo điểm 16, bộ phận của cây theo điểm 24, hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 21,

bột từ hạt điểm 26, hoặc chế phẩm theo điểm 27, với ít nhất một thành phần thực phẩm khác.

LIỆT KÊ TRÌNH TỰ

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

<120> Lipit chiết tách được từ cây, và quy trình sản xuất lipit này

<130> 517416

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

<150> US 14/575,756
<151> 2014-12-18

<150> AR 20140104761
<151> 2014-12-18

<150> PCT/AU2014/050433
<151> 2014-12-18

<160> 58

<170> Phiên bản PatentIn 3.5

<210> 1
<211> 21527
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit pJP3416-GA7.

<400> 1
tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttca cgccctttta 60
aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120
tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180
tcacgacgtt gtaaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcccgat ctagtaacat 240
agatgacacc gcgcgcgata atttatccta gtttgcgcgc tatattttgt tttctatcgc 300
gtattaaatg tataattgcg ggactctaat cataaaaacc catctcataa ataacgtcat 360
gcattacatg ttaattatta cgtgcttaac gtaattcaac agaaattata tgataatcat 420
cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt ttgaacgatc 480
ggcgcgcctc attagtgagc cttctcagcc tttccgttaa cgtagtagtg ctgtcccacc 540
ttatcaaggt tagagaaagt agccttccaa gcaccgtagt aagagagcac cttgtagttg 600
agtccccact tcttagcgaa aggaacgaat cttctgctaa cctcaggctg tctgaattga 660
ggcatatcag ggaagaggtg gtggataacc tgacagttaa ggtatcccat aagccagttc 720
acgtatcctc tagaaggatc gatatcaacg gtgtgatcaa cagcgtagtt aacccaagaa 780
aggtgcttat cagatggaac aacagggagg tgagtatgag aagtagagaa gtgagcgaaa 840
aggtacatgt aagcgatcca gtttccgaaa gtgaaccacc agtaagcaac aggccaagag 900
tatccagtag caagcttgat aacagcggtt ctaacaacat gagaaacgag catccaagaa 960
gcctcttcgt agttcttctt acggagaact tgtctagggt ggagaacgta gatccagaaa 1020
gcttgaacaa gaagtccaga ggtaacagga acgaaagtcc aagcttgaag tctagcccaa 1080

gctctagaga atcctctagg tctgttatcc tcaacagcag tgttgaagaa agccacagca 1140
ggagtggtat caagatccat atcgtgtcta accttttgag gggtagcatg gtgcttgtta 1200
tgcatctggt tccacatctc accagaagta gaaagtccga atccacaagt catagcctga 1260
agtctcttgt ccacgtaaac agatccggta agagagttat gtccaccctc atgttgaacc 1320
catccacatc tagctccgaa gaaagcaccg taaacaacag aagcaatgat agggtatcca 1380
gcgtacataa gagcagttcc aagagcgaat gtagcaagaa gctcgagaag tctgtaagcc 1440
acatgggtga tagaaggctt gaagaatcca tctctctcaa gctcagcacg ccatctagcg 1500
aaatcctcaa gcataggagc atcctcagac tcagatctct tgatctcagc aggtctagaa 1560
ggcaaagctc taagcatctt ccaagccttg agagaacgca tgtggaattc tttgaaagcc 1620
tcagtagcat cagcaccagt gttagcaagc atgtagaaga tcacagatcc accagggtgc 1680
ttgaagttag tcacatcgta ctcaacgtcc tcaactctaa cccatctagt ctcgaaagta 1740
gcagcaagct catgaggctc aagagtctta agatcaacag gagcagtaga agcatcctta 1800
gcatcaagag cctcagcaga agatttagac ctggtaagtg gagatctagg agaagatctt 1860
ccatcagtct taggagggca catggtatgg taattgtaaa tgtaattgta atgttgtttg 1920
ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa agatcctcgt gtatgttttt aatcttgttt 1980
gtatcgatga gttttggttt gagtaaagag tgaagcggat gagttaattt ataggctata 2040
aaggagattt gcatggcgat cacgtgtaat aatgcatgca cgcatgtgat tgtatgtgtg 2100
tgctgtgaga gagaagctct taggtgtttg aagggagtga caagtggcga agaaaaacaa 2160
ttctccgcgg ctgcatgcta tgtgtaacgt gtagctaatg ttctggcatg gcatcttatg 2220
aacgattctt tttaaaaaca aggtaaaaac ttaacttcat aaaattaaaa aaaaaaacgt 2280
ttactaagtt ggtttaaaag gggatgagac tagtagattg gttggttggt ttccatgtac 2340
cagaaggctt accctattag ttgaaagttg aaactttgtt ccctactcaa ttcctagttg 2400
tgtaaatgta tgtatatgta atgtgtataa aacgtagtac ttaaatgact aggagtggtt 2460
cttgagaccg atgagagatg ggagcagaac taaagatgat gacataatta agaacgaatt 2520
tgaaaggctc ttaggtttga atcctattcg agaatgtttt tgtcaaagat agtggcgatt 2580
ttgaaccaaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccggtta cgttcatgca aatagaaagt 2640
ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca atcctggctg 2700
tgtacaaaac tacaaataat atattttaga ctatttggcc ttaactaaac ttccactcat 2760
tatttactga ggttagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccgagaa atactcatga 2820
tcccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc cctcaaattt 2880
taatgcacat gtaatcatag tttagcacaa ttcaaaaata atgtagtatt aaagacagaa 2940
atttgtagac tttttttgg cgttaaaaga agactaagtt tatacgtaca ttttatttta 3000
agtggaaaac cgaaattttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat ttctgcaatg 3060
tactattttg ctattttggc aactttcagt ggactactac tttattacaa tgtgtatgga 3120
tgcatgagtt tgagtataca catgtctaaa tgcatgcttt gtaaaacgta acggaccaca 3180
aaagaggatc catacaaata catctcatag cttcctccat tattttccga cacaaacaga 3240

gcattttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca acattacaat tacatttaca 3300
attaccatac catggaattc gcccagcctc ttgttgctat ggctcaagag caatacgctg 3360
ctatcgatgc tgttgttgct cctgctatct tctctgctac tgattctatc ggatggggac 3420
ttaagcctat ctcttctgct actaaggact tgcctcttgt tgagtctcct acacctctca 3480
tcctttcttt gcttgcttac ttcgctatcg ttggatctgg actcgtttac agaaaggttt 3540
tccctagaac cgtgaaggga caagatccat tccttttgaa ggctcttatg cttgctcaca 3600
acgtgttcct tatcggactt tctctttaca tgtgcctcaa gcttgtgtac gaggcttacg 3660
ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaaccctgc tcaaactgag atggctaagg 3720
ttatctggat cttctacgtg agcaagatct acgagttcat ggataccttc atcatgctcc 3780
tcaagggaaa tgttaaccag gttagcttcc ttcacgttta ccatcacgga tctatctctg 3840
gaatctggtg gatgattact tacgctgctc ctggtggtga tgcttacttc tctgctgctc 3900
ttaactcttg ggttcacgtg tgtatgtaca cctactattt tatggctgcc gtgcttccta 3960
aggacgagaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact caaatgcaga 4020
tgttccagtt cttcatgaac cttctccagg ctgtttacct tctctactct tcatctcctt 4080
accctaagtt tatcgctcag ctcctcgtgg tgtacatggt tactcttctc atgcttttcg 4140
gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgccg ggccgccgcc 4200
atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg atcgctagtg 4260
attgtcattg ttatatataa taatgttatc tttcacaact tatcgtaatg catgtgaaac 4320
tataacacat taatcctact tgtcatatga taacactctc cccatttaaa actcttgtca 4380
atttaaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaaata tattataaat tcaatcactc 4440
ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac taatttagtc 4500
tgaatagaat aattagattc tagtctcatc ccctttttaaa ccaacttagt aaacgttttt 4560
ttttttaatt ttatgaagtt aagtttttac cttgttttta aaaagaatcg ttcataagat 4620
gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag aattgttttt 4680
cttcgccact tgtcactccc ttcaaacacc taagagcttc tctctcacag cacacacata 4740
caatcacatg cgtgcatgca ttattacacg tgatcgccat gcaaatctcc tttatagcct 4800
ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat acaaacaaga 4860
ttaaaaacat acacgaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac 4920
attacaatta catttacaat taccatacca tgcctccaag ggactcttac tcttatgctg 4980
ctcctccttc tgctcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac aagaaagagc 5040
ttgttatcgg agatagggct tacgatgtta ccaacttcgt taagagacac cctggtggaa 5100
agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag ttccatgtta 5160
gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctcttccttc tcgtcctgtt cacaagggat 5220
actctccaag aagggctgat cttatcgctg atttccaaga gttcaccaag caacttgagg 5280
ctgagggaat gttcgagcct tctcttcctc atgttgctta cagacttgct gaggttatcg 5340
ctatgcatgt tgctggtgct gctcttatct ggcatggata cactttcgct ggaatcgcta 5400

tgcttggagt tgttcaggga agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga cattactctc 5460
tcactggaaa cattgctttc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga cttggatgtg 5520
gaatgtctgg tgcttggtgg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact cctcaaaagc 5580
ttcagcacga tgttgatctt gatacccttc ctctcgttgc tttccatgag agaatcgctg 5640
ctaaggttaa gtctcctgct atgaaggctt ggctttctat gcaagctaag cttttcgctc 5700
ctgttaccac tcttcttgtt gctcttggat ggcagcttta ccttcatcct agacacatgc 5760
tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgctcggaat cagatacgga cttgttggat 5820
accttgctgc taactacggt gctggatacg ttctcgcttg ttaccttctt tacgttcagc 5880
ttggagctat gtacatcttc tgcaacttcg ctgtttctca tactcacctc cctgttgttg 5940
agcctaacga gcatgctact tgggttgagt acgctgctaa ccacactact aactgttctc 6000
catcttggtg gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag caccaccttt 6060
acccttctat gcctcaattc agacacccta agatcgctcc tagagttaag cagcttttcg 6120
agaagcacgg acttcactac gatgttagag gatacttcga ggctatggct gatactttcg 6180
ctaaccttga taacgttgcc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga gatcgttcaa 6240
acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggtcttgcg atgattatca 6300
tataatttct gttgaattac gttaagcacg taataattaa catgtaatgc atgacgttat 6360
ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa 6420
acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag 6480
atcggtcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat tgagtaaaac 6540
aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct ttaagacttt 6600
ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat 6660
ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattggttg tacgatcact 6720
ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt catatgtcaa 6780
aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaaatttcg ataatttaaa 6840
attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta attactaaat 6900
ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa 6960
tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta 7020
aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat 7080
taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc ggcaaaaccg 7140
aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccg aaccaactcg 7200
gtccatttgc acccctaatc ataatagctt taatatttca agatattatt aagttaacgt 7260
tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt 7320
aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa atatcccaag 7380
tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa 7440
agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaaata 7500
cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tattttttgt tcttaaacaa gcatcccctc 7560

taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatttt 7620
ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtgatagaa cccacacgag catgtgcttt 7680
ccatttaatt ttaaaaacca agaaacatac atacataaca ttccatcagc ctctctctct 7740
ttttattacg gttaatgact taaaacacat cttattatcc catccttaac acctagcagt 7800
gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg ctgcccctgg 7860
agctggcatc ggctaggctg ggtgccgcac tgtcccggaa ggtccctagc gacttgttta 7920
gattgatggg accacctctc aacttcctgc tgctgtccct gctgctggat gtcctgcctc 7980
atctggccga ttgcacgctc cagtcccctg catgtgcact cgctcctcaa ttgcttaaga 8040
tcatcgcagc agctatcgaa gtgctggctc tgttgccctc ctccacggcc ttggttgtag 8100
tagtagctgc cgccgccctt ctggactttt tcccacagga accgccgaat aattcgatag 8160
aaccacacga gcatgtgctt tcatttattt taaaaaccaa gaaacataca taacatttca 8220
tcagcctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctcttta 8280
ttacagctgt tacactaact taaaacacat tcatctcatt attattatta ttatccatcc 8340
ttaacaccta gcagtgtctt tgtacgatct cataatcgat cacccccttca tcaggtatcc 8400
ttaggcttca ctccaacgtt gttgcagtta cggaacatgt acacaccatc atggttctca 8460
acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaaccc acatgttctc atcggtgtgt 8520
ctgtagtgct ctcccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc atggtagaat 8580
gggatccttg aaacgtagtg atggagcaca tgagtctcga tgatgtcatg gaagatgatt 8640
ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa agtccactct 8700
tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac gaaaacaagc 8760
cagtggttaa caaggatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca gaatccgaaa 8820
accttgtaag cggtgtaaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc agaaagaacg 8880
atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg agacttgaag 8940
aacttagaaa caccagggta aggttgtcca gtagcgttag tagcaaggta aagagaaagt 9000
cctccaagct gttggaacaa gagagcgaaa acagagtaga taggagtttc ctcagcgata 9060
tcgtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcggtgta aggaacgaaa 9120
accatatctc tggtcatgtg tccagtagcc ttatggtgct tagcatgaga gaacttccag 9180
ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaacccatc caacggtatc gttaacccat 9240
ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat tccgaatccg 9300
aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa ttcgttaggg 9360
agaagaggga tgtaggtaag tccaacgtaa gcgatagcag agatagccac gatatctctc 9420
accacgtaag acatagactt cacgagagat ctctcgtaac agtgcttagg gatagcgtca 9480
aggatatcct tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt ttccgaaggt atcgatagcg 9540
gtcttttgct gcttgaaaga tgcaacgttt ccagaacgcc taacggtctt agtagatccc 9600
tcaaggatct cagatccaga cacggtaacc ttagacatgg tatggtaatt gtaaatgtaa 9660
ttgtaatgtt gtttgttgtt tgttgttgtt ggtaattgtt gtaaaatttt tggtggtgat 9720

tggttcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggtttggt gagattgggg 9780
atggtgggtt tatatagtgg agactgagga atggggtcgt gagtgttaac tttgcatggg 9840
ctacacgtgg gttcttttgg gcttacacgt agtattattc atgcaaatgc agccaataca 9900
tatacggtat tttaataatg tgtgggaata caatatgccg agtattttac taattttggc 9960
aatgacaagt gtacatttgg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat ttggattatt 10020
tttattctct taccttggcc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca gaattgaatg 10080
gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat taacgtcgaa 10140
ggaaaatact gattctctca agcatacgga caagggtaaa taacatagtc accagaacat 10200
aataaacaaa aagtgcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt caggttcata 10260
ttggaaacat cattatccta gtcttgtgac catccttcct cctgctctag ttgagaggcc 10320
ttgggactaa cgagaggtca gttgggatag cagatcctta tcctggacta gcctttctgg 10380
tgtttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga agatgactct 10440
tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc tggcttgcaa 10500
tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgttt gctgatttag 10560
agctcccggt tgggtgattt gacttcgatt tcagtttagg cttgttgaaa tttttcaggt 10620
tccattgtga agcctttaga gcttgagctt ccttccatgt taatgccttg atcgaatact 10680
cctagagaaa agggaagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat tttttttcaa 10740
cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatac ttatactgac 10800
aagtaatagt cttaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg ggttttccga 10860
catccataac gacccgaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg ttcttcttgt 10920
catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc tccgcaaaat 10980
attcgaacgg caagttatgg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc aggacctatt 11040
gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtggttgtca gcaaaccaat gaccgaaatc 11100
catcacatga cggacgtcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc tatctttcag 11160
agtcgtgagc tccacaccgg attccggcaa ctacgtgttg ggcaggcttc gccgtattag 11220
agatatgttg aggcagaccc atctgtgcca ctcgtacaat tacgagagtt gtttttttg 11280
tgattttcct agtttctcgt tgatggtgag ctcatattct acatcgtatg gtctctcaac 11340
gtcgtttcct gtcatctgat atcccgtcat ttgcatccac gtgcgccgcc tcccgtgcca 11400
agtccctagg tgtcatgcac gccaaattgg tggtggtgcg ggctgccctg tgcttcttac 11460
cgatgggtgg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt gacggtttgg 11520
tgtgggttga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attctttggc agaaaacaat 11580
tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat tccaacagag 11640
ttacatctct taagaaataa tgtaacccct ttagacttta tatatttgca attaaaaaaa 11700
taatttaact tttagacttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca ctctattatt 11760
tatatcgaaa ctatttgtat gtctcccctc taaataaact tggtattgtg tttacagaac 11820
ctataatcaa ataatcaata ctcaactgaa gtttgtgcag ttaattgaag ggattaacgg 11880

ccaaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat ttccatcaat 11940
atcatcgccg ttcttcttct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga cacctgcact 12000
tcattgtcct tattacgtgt tacaaaatga aacccatgca tccatgcaaa ctgaagaatg 12060
gcgcaagaac ccttcccctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac catctcccgc 12120
tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat ccatccaaaa 12180
gatacccact tttacaacaa ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat tacaattaca 12240
tttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct tctactggtg 12300
ttcatgctgg tgttactgac tcttctgctt tcaccagaaa ggatgttgct gatagacctg 12360
atctcaccat cgttggagat tctgtttacg atgctaaggc tttcagatct gagcatcctg 12420
gtggtgctca tttcgtttct ttgttcggag gaagagatgc tactgaggct ttcatggaat 12480
accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttgga tctcttgctt 12540
ctactgagga acctgttgct gctgatgagg gataccttca actttgtgct aggatcgcta 12600
agatggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctcctgcttc ttactgggtt aaggctggac 12660
ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgctgga aagagacttc 12720
tcccttctat cgttcttgga tggcttttcg ctcttatcgg tcttaacatc cagcatgatg 12780
ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgctt ctgttaacct tgctcttgga ctttgtcagg 12840
attggatcgg aggatctatg atcctttggc ttcaagagca tgttgttatg caccacctcc 12900
acactaacga tgttgataag gatcctgatc aaaaggctca cggtgctctt agactcaagc 12960
ctactgatgc ttggtcacct atgcattggc ttcagcatct ttaccttttg cctggtgaga 13020
ctatgtacgc tttcaagctt ttgttcctcg acatctctga gcttgttatg tggcgttggg 13080
agggtgagcc tatctctaag cttgctggat acctctttat gccttctttg cttctcaagc 13140
ttaccttctg ggctagattc gttgctttgc ctctttacct tgctccttct gttcatactg 13200
ctgtgtgtat cgctgctact gttatgactg gatctttcta cctcgctttc ttcttcttca 13260
tctcccacaa cttcgagggt gttgcttctg ttggacctga tggatctatc acttctatga 13320
ctagaggtgc tagcttcctt aagagacaag ctgagacttc ttctaacgtt ggaggacctc 13380
ttcttgctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcacttg ttccctagag 13440
ttcaccatgg attctaccct agacttgctc ctcttgttaa ggctgagctt gaggctagag 13500
gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtctaacct tgcttctacc ctcagacata 13560
tgtacgctct tggaagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct tatgtgacgt 13620
gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa agtgagaatg 13680
aggggaaggg gaaatgtgta atgagccagt agccggtggt gctaattttg tatcgtattg 13740
tcaataaatc atgaattttg tggtttttat gtgtttttt aaatcatgaa ttttaaattt 13800
tataaaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatatc catgcatgga tgtttcttta 13860
cccaaatcta gttcttgaga ggatgaagca tcaccgaaca gttctgcaac tatccctcaa 13920
aagctttaaa atgaacaaca aggaacagag caacgttcca aagatcccaa acgaaacata 13980
ttatctatac taatactata ttattaatta ctactgcccg gaatcacaat ccctgaatga 14040

ttcctattaa ctacaagcct tgttggcggc ggagaagtga tcggcgcggc gagaagcagc 14100
ggactcggag acgaggcctt ggaagatctg agtcgaacgg gcagaatcag tattttcctt 14160
cgacgttaat tgatcctaca ctatgtaggt catatccatc gttttaattt ttggccacca 14220
ttcaattctg tcttgccttt agggatgtga atatgaacgg ccaaggtaag agaataaaaa 14280
taatccaaat taaagcaaga gaggccaagt aagataatcc aaatgtacac ttgtcattgc 14340
caaaattagt aaaatactcg gcatattgta ttcccacaca ttattaaaat accgtatatg 14400
tattggctgc atttgcatga ataatactac gtgtaagccc aaaagaaccc acgtgtagcc 14460
catgcaaagt taacactcac gaccccattc ctcagtctcc actatataaa cccaccatcc 14520
ccaatctcac caaacccacc acacaactca caactcactc tcacacctta aagaaccaat 14580
caccaccaaa aattttacaa caattaccaa caacaacaaa caacaaacaa cattacaatt 14640
acatttacaa ttaccatacc atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca 14700
gaggatcttc tagcaacacc gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa 14760
acgtgttctc tgttcctgat ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt 14820
gttacgagag aagattggct acctctctct actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc 14880
ttaccaccgg ataccttacc cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacacctcta 14940
acagcatcat caagttcact ttctgggccc tttacactta cgttcaagga cttttcggaa 15000
ccggaatctg ggttctcgct catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg 15060
tgaacgattt cgttggatgg acccttcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga 15120
agtactctca tggaaagcac cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg 15180
ttcctgccac caaagaggaa ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctcgctgagt 15240
actctgagga ttctccactt agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat 15300
ggatcgctta cctcttcgtt aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt ccttcttgga 15360
aatggaacca cttctggctt acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct 15420
tcctttctga tcttggaatc ctcacccagg gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat 15480
tcggaggatg gtccctttc atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aaccactggc 15540
tcgttttcat cacattcctt cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg 15600
aatggacttt cgctaagggt gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcatcggac 15660
ctcacatctt ccatgatatc atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc 15720
cattctacaa cgctagacct gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca 15780
ggtctagcga cgagaacatg tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg 15840
ttgacggtga taacggtgtt ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg 15900
ctgagaagta atgaaggggt gatcgattat gagatcgtac aaagacactg ctaggtgtta 15960
aggatggata ataataataa taatgagatg aatgtgtttt aagttagtgt aacagctgta 16020
ataaagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagaggctg 16080
atgaaatgtt atgtatgttt cttggttttt aaaataaatg aaagcacatg ctcgtgtggt 16140
tctatcgaat tattcggcgg ttcctgtggg aaaaagtcca gaagggccgc cgcagctact 16200

actacaacca aggccgtgga ggagggcaac agagccagca cttcgatagc tgctgcgatg 16260
atcttaagca attgaggagc gagtgcacat gcaggggact ggagcgtgca atcggccaga 16320
tgaggcagga catccagcag cagggacagc agcaggaagt tgagaggtgg tcccatcaat 16380
ctaaacaagt cgctagggac cttccgggac agtgcggcac ccagcctagc cgatgccagc 16440
tccaggggca gcagcagtct gcatggtttt gaagtggtga tcgatgagat cgtataaaga 16500
cactgctagg tgttaaggat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa ccgtaataaa 16560
aagagagaga ggctgatgga atgttatgta tgtatgtttc ttggttttta aaattaaatg 16620
gaaagcacat gctcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata tttggtctaa 16680
tttagtttgg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aaatataaat atatagtttt 16740
tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct agaaatattt 16800
gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt tattaacttt 16860
aaataattgg ttgtacgatc actttcttat caagtgttac taaaatgcgt caatctcttt 16920
gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt ttcgaatttg 16980
aagtgaaatt tcgataattt aaaattaaat agaacatatc attatttagg tatcatattg 17040
atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa cgaaaaatta 17100
gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc tataagaata 17160
ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaa ttaattttta ctaacacata tatttactta 17220
tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaa aaaccagaaa 17280
atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt tggtttgatt 17340
ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcaccccta atcataatag ctttaatatt 17400
tcaagatatt attaagttaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa tgaatcaagc 17460
ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat gtaatttact 17520
tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg ttagctacga 17580
tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa atatacgaag 17640
gaacaaatat ttttaaaaaa atacgcaatg acttggaaca aaagaaagtg atatattttt 17700
tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg taactattat 17760
gctcccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa aatagtcctg 17820
caggctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct attagttgaa 17880
agttgaaact ttgttcccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat atgtaatgtg 17940
tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc 18000
agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg tttgaatcct 18060
attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa 18120
atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggtct aggatctgat tgtaatttta 18180
gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt 18240
ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcattattt actgaggtta gagaatagac 18300
ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca gagggtatgc 18360

caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag 18420
cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt tttggcgtta 18480
aaagaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa ttttccatcg 18540
aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt 18600
tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt 18660
ctaaatgcat gctttgtaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct 18720
catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcatt ttacaacaat taccaacaac 18780
aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcgc 18840
tatccctgct gctcttgctg gaactcttgg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga 18900
tatcccagct tctgagaaag ttcctgctta cttcatgcag gttgagtact ggggacctac 18960
tatcggaact attggatacc tcctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag 19020
atctcaacct ttcggactca agaacgctat gctcgtttac aacttctacc agaccttctt 19080
caacagctac tgcatctacc ttttcgttac ttctcatagg gctcagggac ttaaggtttg 19140
gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggtta tctggcttca 19200
ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga caccttcttc atggtgatga ggaagaagtt 19260
cgaccagctt tctttccttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catggttcgt 19320
tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgtta acaccttcgt 19380
gcacgtgatc atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagttaact gtttctggaa 19440
gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta 19500
caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttccttac cttcaactct gggttatggt 19560
gaacatgttc gttctcttcg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta agggtgctaa 19620
gaagcagtga taagggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagtg taataagacg 19680
actctcacta ctcgatcgct agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac 19740
aacttatcgt aatgcatgtg aaactataac acattaatcc tacttgtcat atgataacac 19800
tctccccatt taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttctttaaat gattaaaaaa 19860
aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa 19920
aaaaatactt atactaattt agtctgaata gaataattag attctagcct gcagggcggc 19980
cgcggatccc atggagtcaa agattcaaat agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac 20040
tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa 20100
catggtggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatatc aaagatacag tctcagaaga 20160
ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca 20220
ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaggtg gctcctacaa 20280
atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtggtcc 20340
caaagatgga cccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc 20400
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca 20460
ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg agagaacacg 20520

ggggactgaa ttaaatatga gccctgagag gcgtcctgtt gaaatcagac ctgctactgc 20580
tgctgatatg gctgctgttt gtgatatcgt gaaccactac atcgagactt ctaccgttaa 20640
cttcagaact gagcctcaaa ctcctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga 20700
tagataccct tggcttgttg ctgaggttga gggtgttgtt gctggaatcg cttacgctgg 20760
accttggaag gctagaaacg cttacgattg gactgttgag tctaccgttt acgtttcaca 20820
cagacatcag agacttggac ttggatctac cctttacact caccttctca agtctatgga 20880
agctcaggga ttcaagtctg ttgttgctgt tatcggactc cctaacgatc cttctgttag 20940
acttcatgag gctcttggat acactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca 21000
cggtggatgg catgatgttg gattctggca aagagatttc gagcttcctg ctcctcctag 21060
acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgatc gttcaaacat ttggcaataa 21120
agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 21180
aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 21240
tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 21300
gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatca ctagtgatgt 21360
acggttaaaa ccaccccagt acattaaaaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 21420
cgtcaatttg tttacaccac aatatatcct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 21480
gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagtcc 21527

<210> 2
<211> 23512
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit pGA7- mod_B

<400> 2
tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aaccttttca cgccctttta 60
aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120
tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180
tcacgacgtt gtaaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcggtac cgcccgttcg 240
actcagatct tccaaggcct cgtctccgag tccgctgctt ctcgccgcgc cgatcacttc 300
tccgccgcca acaaggcttg tagttaatag gaatcattca gggattgtga ttccgggcag 360
tagtaattaa taatatagta ttagtataga taatatgttt cgtttgggat ctttggaacg 420
ttgctctgtt ccttgttgtt cattttaaag cttttgaggg atagttgcag aactgttcgg 480
tgatgcttca tcctctcaag aactagattt gggtaaagaa acatccatgc atggatatgg 540
aatgttgttc ttccgattgg agattatttt ataaaattta aaattcatga tttaaaaaaa 600
cacataaaaa ccacaaaatt catgatttat tgacaatacg atacaaaatt agcaccaccg 660
gctactggct cattacacat ttccccttcc cctcattctc actttgtggc tttattatta 720
ttattattac atatatttta ccgttattat ttcacgtcac ataagcttgt taattaatca 780
ttagtgagcc ttctcagcct ttccgttaac gtagtagtgc tgtcccacct tatcaaggtt 840

agagaaagta gccttccaag caccgtagta agagagcacc ttgtagttga gtccccactt 900
cttagcgaaa ggaacgaatc ttctgctaac ctcaggctgt ctgaattgag gcatatcagg 960
gaagaggtgg tggataacct gacagttaag gtatcccata agccagttca cgtatcctct 1020
agaaggatcg atatcaacgg tgtgatcaac agcgtagtta acccaagaaa ggtgcttatc 1080
agatggaaca acagggaggt gagtatgaga agtagagaag tgagcgaaaa ggtacatgta 1140
agcgatccag tttccgaaag tgaaccacca gtaagcaaca ggccaagagt atccagtagc 1200
aagcttgata acagcggttc taacaacatg agaaacgagc atccaagaag cctcttcgta 1260
gttcttctta cggagaactt gtctagggtg gagaacgtag atccagaaag cttgaacaag 1320
aagtccagag gtaacaggaa cgaaagtcca agcttgaagt ctagcccaag ctctagagaa 1380
tcctctaggt ctgttatcct caacagcagt gttgaagaaa gccacagcag gagtggtatc 1440
aagatccata tcgtgtctaa ccttttgagg ggtagcatgg tgcttgttat gcatctggtt 1500
ccacatctca ccagaagtag aaagtccgaa tccacaagtc atagcctgaa gtctcttgtc 1560
cacgtaaaca gatccggtaa gagagttatg tccaccctca tgttgaaccc atccacatct 1620
agctccgaag aaagcaccgt aaacaacaga agcaatgata gggtatccag cgtacataag 1680
agcagttcca agagcgaatg tagcaagaag ctcgagaagt ctgtaagcca catgggtgat 1740
agaaggcttg aagaatccat ctctctcaag ctcagcacgc catctagcga aatcctcaag 1800
cataggagca tcctcagact cagatctctt gatctcagca ggtctagaag gcaaagctct 1860
aagcatcttc caagccttga gagaacgcat gtggaattct ttgaaagcct cagtagcatc 1920
agcaccagtg ttagcaagca tgtagaagat cacagatcca ccagggtgct tgaagttagt 1980
cacatcgtac tcaacgtcct caactctaac ccatctagtc tcgaaagtag cagcaagctc 2040
atgaggctca agagtcttaa gatcaacagg agcagtagaa gcatccttag catcaagagc 2100
ctcagcagaa gatttagacc tggtaagtgg agatctagga gaagatcttc catcagtctt 2160
aggagggcac atggtatggt aattgtaaat gtaattgtaa tgttgtttgt tgtttgttgt 2220
tgttggtaat tgttgtaaaa ttaattaagt gggtatcttt tggatggata agcaagtagt 2280
gatgatgttc taggtgaagt gatgggggtg ttttatagcg ggagatggtg aaatggatgg 2340
tcgccacata agaaatggag gggaagggtt cttgcgccat tcttcagttt gcatggatgc 2400
atgggtttca ttttgtaaca cgtaataagg acaatgaagt gcaggtgtct ctcaagtttc 2460
agaggggata tgtggacaga agaagaacgg cgatgatatt gatggaaatg gccatctagt 2520
gtgaatctat tcggttgata atactagtgc attttggccg ttaatccctt caattaactg 2580
cacaaacttc agttgagtat tgattatttg attataggtt ctgtaaacac aataccaagt 2640
ttatttagag gggagacata caaatagttt cgatataaat aatagagtgg ttaaacttag 2700
ttattaaaac tatatataaa gtctaaaagt taaattattt ttttaattgc aaatatataa 2760
agtctaaagg ggttacatta tttcttaaga gatgtaactc tgttggaatc tgacttaatc 2820
cgtctcatca ctctggtttc cagttctaat ctaatgaatt gttttctgcc aaagaatttg 2880
aagcaagaag taaattgatc aatgccgtca acccacacca aaccgtcaac ccactaccat 2940
cgccgcggag acccccaaac tcaacctcca cccatcggta agaagcacag ggcagcccgc 3000

accaccacca atttggcgtg catgacacct agggacttgg cacgggaggc ggcgcacgtg 3060
gatgcaaatg acgggatatc agatgacagg aaacgacgtt gagagaccat acgatgtaga 3120
atatgagctc accatcaacg agaaactagg aaaatcacaa aaaaaacaac tctcgtaatt 3180
gtacgagtgg cacagatggg tctgcctcaa catatctcta atacggcgaa gcctgcccaa 3240
cacgtagttg ccggaatccg gtgtggagct cacgactctg aaagataggc gcttcctgtt 3300
tcgtttcgct cacccactgg acgtccgtca tgtgatggat ttcggtcatt ggtttgctga 3360
caaccacatt ctgaagctcc atgagatgag tcttcacaat aggtcctgct caataccgtg 3420
gagttatggt tgcaagtcca taacttgccg ttcgaatatt ttgcggagcc agtcggacgg 3480
gaattggcga gctcggctga cacctataaa ggccatgaca agaagaacca aaagttcttc 3540
cctaatgctt tcatgaggct tcgggtcgtt atggatgtcg gaaaacccct cttgaaggaa 3600
cgagacgtta ttatgcatga cggtaagact attacttgtc agtataagta tgaaagatta 3660
cctgtcttct gctttgtttg tggattgatt ggacacgttg aaaaaaaatg tgcacttcga 3720
tttcaatact cagagatcga cttccctttt ctctaggagt attcgatcaa ggcattaaca 3780
tggaaggaag ctcaagctct aaaggcttca caatggaacc tgaaaaattt caacaagcct 3840
aaactgaaat cgaagtcaaa tcacccaacc gggagctcta aatcagcaaa cactcctcct 3900
ccacagtatc caatcatcgt gcacgatgct ccaggtattg caagccaggt attgcaagct 3960
aggagtagga tagagacctt aaacgtcgtt ggtgtgaaga gtcatcttca gacctaatgg 4020
agatagatgt agacggcggc acgaagactc tgaaacacca gaaaggctag tccaggataa 4080
ggatctgcta tcccaactga cctctcgtta gtcccaaggc ctctcaacta gagcaggagg 4140
aaggatggtc acaagactag gataatgatg tttccaatat gaacctgaat gtccatagct 4200
aatttttta gtcttgcttc tgcacttttt gtttattatg ttctggtgac tatgttattt 4260
acccttgtcc gtatgcttga gggtacccta gtagattggt tggttggttt ccatgtacca 4320
gaaggcttac cctattagtt gaaagttgaa actttgttcc ctactcaatt cctagttgtg 4380
taaatgtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aaatgactag gagtggttct 4440
tgagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag aacgaatttg 4500
aaaggctctt aggtttgaat cctattcgag aatgtttttg tcaaagatag tggcgatttt 4560
gaaccaaaga aaacatttaa aaaatcagta tccggttacg ttcatgcaaa tagaaagtgg 4620
tctaggatct gattgtaatt ttagacttaa agagtctctt aagattcaat cctggctgtg 4680
tacaaaacta caaataatat attttagact atttggcctt aactaaactt ccactcatta 4740
tttactgagg ttagagaata gacttgcgaa taaacacatt cccgagaaat actcatgatc 4800
ccataattag tcagagggta tgccaatcag atctaagaac acacattccc tcaaatttta 4860
atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa agacagaaat 4920
ttgtagactt ttttttggcg ttaaaagaag actaagttta tacgtacatt ttattttaag 4980
tggaaaaccg aaattttcca tcgaaatata tgaatttagt atatatattt ctgcaatgta 5040
ctattttgct attttggcaa ctttcagtgg actactactt tattacaatg tgtatggatg 5100
catgagtttg agtatacaca tgtctaaatg catgctttgt aaaacgtaac ggaccacaaa 5160

agaggatcca tacaaataca tctcatagct tcctccatta ttttccgaca caaacagagc 5220
attttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta catttacaat 5280
taccatacca tggcctctat cgctatccct gctgctcttg ctggaactct tggatacgtt 5340
acctacaatg tggctaaccc tgatatccca gcttctgaga aagttcctgc ttacttcatg 5400
caggttgagt actggggacc tactatcgga actattggat acctcctctt catctacttc 5460
ggaaagcgta tcatgcagaa cagatctcaa cctttcggac tcaagaacgc tatgctcgtt 5520
tacaacttct accagacctt cttcaacagc tactgcatct accttttcgt tacttctcat 5580
agggctcagg gacttaaggt ttggggaaac atccctgata tgactgctaa ctcttgggga 5640
atctctcagg ttatctggct tcactacaac aacaagtacg ttgagcttct cgacaccttc 5700
ttcatggtga tgaggaagaa gttcgaccag ctttctttcc ttcacatcta ccaccacact 5760
cttctcatct ggtcatggtt cgttgttatg aagcttgagc ctgttggaga ttgctacttc 5820
ggatcttctg ttaacacctt cgtgcacgtg atcatgtact cttactacgg acttgctgct 5880
cttggagtta actgtttctg gaagaagtac atcacccaga tccagatgct tcagttctgt 5940
atctgtgctt ctcactctat ctacaccgct tacgttcaga ataccgcttt ctggcttcct 6000
taccttcaac tctgggttat ggtgaacatg ttcgttctct tcgccaactt ctaccgtaag 6060
aggtacaagt ctaagggtgc taagaagcag tgataaggcg cgcggcgcgc cgggccgccg 6120
ccatgtgaca gatcgaagga agaaagtgta ataagacgac tctcactact cgatcgctag 6180
tgattgtcat tgttatatat aataatgtta tctttcacaa cttatcgtaa tgcatgtgaa 6240
actataacac attaatccta cttgtcatat gataacactc tccccattta aaactcttgt 6300
caatttaaag atataagatt ctttaaatga ttaaaaaaaa tatattataa attcaatcac 6360
tcctactaat aaattattaa ttattattta ttgattaaaa aaatacttat actaatttag 6420
tctgaataga ataattagat tctagtctca tccccttta aaccaactta gtaaacgttt 6480
tttttttaa ttttatgaag ttaagttttt accttgtttt taaaaagaat cgttcataag 6540
atgccatgcc agaacattag ctacacgtta cacatagcat gcagccgcgg agaattgttt 6600
ttcttcgcca cttgtcactc ccttcaaaca cctaagagct tctctctcac agcacacaca 6660
tacaatcaca tgcgtgcatg cattattaca cgtgatcgcc atgcaaatct cctttatagc 6720
ctataaatta actcatccgc ttcactcttt actcaaacca aaactcatcg atacaaacaa 6780
gattaaaaac atacacgagg atcttttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca 6840
acattacaat tacatttaca attaccatac catgcctcca agggactctt actcttatgc 6900
tgctcctcct tctgctcaac ttcacgaagt tgatactcct caagagcacg acaagaaaga 6960
gcttgttatc ggagataggg cttacgatgt taccaacttc gttaagagac accctggtgg 7020
aaagatcatt gcttaccaag ttggaactga tgctaccgat gcttacaagc agttccatgt 7080
tagatctgct aaggctgaca agatgcttaa gtctcttcct tctcgtcctg ttcacaaggg 7140
atactctcca agaagggctg atcttatcgc tgatttccaa gagttcacca agcaacttga 7200
ggctgaggga atgttcgagc cttctcttcc tcatgttgct tacagacttg ctgaggttat 7260
cgctatgcat gttgctggtg ctgctcttat ctggcatgga tacactttcg ctggaatcgc 7320

tatgcttgga gttgttcagg gaagatgtgg atggcttatg catgagggtg gacattactc 7380
tctcactgga aacattgctt tcgacagagc tatccaagtt gcttgttacg gacttggatg 7440
tggaatgtct ggtgcttggt ggcgtaacca gcataacaag caccatgcta ctcctcaaaa 7500
gcttcagcac gatgttgatc ttgataccct tcctctcgtt gctttccatg agagaatcgc 7560
tgctaaggtt aagtctcctg ctatgaaggc ttggctttct atgcaagcta agcttttcgc 7620
tcctgttacc actcttcttg ttgctcttgg atggcagctt taccttcatc ctagacacat 7680
gctcaggact aagcactacg atgagcttgc tatgctcgga atcagatacg gacttgttgg 7740
ataccttgct gctaactacg gtgctggata cgttctcgct tgttaccttc tttacgttca 7800
gcttggagct atgtacatct tctgcaactt cgctgtttct catactcacc tccctgttgt 7860
tgagcctaac gagcatgcta cttgggttga gtacgctgct aaccacacta ctaactgttc 7920
tccatcttgg tggtgtgatt ggtggatgtc ttaccttaac taccagatcg agcaccacct 7980
ttacccttct atgcctcaat tcagacaccc taagatcgct cctagagtta agcagctttt 8040
cgagaagcac ggacttcact acgatgttag aggatacttc gaggctatgg ctgatacttt 8100
cgctaacctt gataacgttg cccatgctcc tgagaagaaa atgcagtaat gagatcgttc 8160
aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggtcttg cgatgattat 8220
catataattt ctgttgaatt acgttaagca cgtaataatt aacatgtaat gcatgacgtt 8280
atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcgataga 8340
aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gcggtgtcat ctatgttact 8400
agatcggtcg attaaaaatc ccaattatat ttggtctaat ttagtttggt attgagtaaa 8460
acaaattcga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact 8520
ttttatagaa ttttctttaa aaaatatcta gaaatatttg cgactcttct ggcatgtaat 8580
atttcgttaa atatgaagtg ctccattttt attaacttta aataattggt tgtacgatca 8640
ctttcttatc aagtgttact aaaatgcgtc aatctctttg ttcttccata ttcatatgtc 8700
aaaatctatc aaaattctta tatatctttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta 8760
aaattaaata gaacatatca ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa 8820
atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata 8880
aatatcatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg 8940
taaaaaaaat taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag 9000
attaaaataa tattcatcta acaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaac ccggcaaaac 9060
cgaaccaatc caaaccgata tagttggttt ggtttgattt tgatataaac cgaaccaact 9120
cggtccattt gcacccctaa tcataatagc tttaatattt caagatatta ttaagttaac 9180
gttgtcaata tcctggaaat tttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat 9240
ttaaaagcag ctcgatgtgg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca 9300
agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac 9360
aaagaaccat aaagtgattg aagctcgaaa tatacgaagg aacaaatatt tttaaaaaaa 9420
tacgcaatga cttggaacaa aagaaagtga tatatttttt gttcttaaac aagcatcccc 9480

tctaaagaat ggcagttttc ctttgcatgt aactattatg ctcccttcgt tacaaaaatt 9540
ttggactact attgggaact tcttctgaaa atagtgatag aacccacacg agcatgtgct 9600
ttccatttaa ttttaaaaac caagaaacat acatacataa cattccatca gcctctctct 9660
ctttttatta cggttaatga cttaaaacac atcttattat cccatcctta acacctagca 9720
gtgtctttat acgatctcat cgatcaccac ttcaaaacca tgcagactgc tgctgcccct 9780
ggagctggca tcggctaggc tgggtgccgc actgtcccgg aaggtcccta gcgacttgtt 9840
tagattgatg ggaccacctc tcaacttcct gctgctgtcc ctgctgctgg atgtcctgcc 9900
tcatctggcc gattgcacgc tccagtcccc tgcatgtgca ctcgctcctc aattgcttaa 9960
gatcatcgca gcagctatcg aagtgctggc tctgttgccc tcctccacgg ccttggttgt 10020
agtagtagct gccgccgccc ttctggactt tttcccacag gaaccgccga ataattcgat 10080
agaaccacac gagcatgtgc tttcatttat tttaaaaacc aagaaacata cataacattt 10140
catcagcctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctt 10200
tattacagct gttacactaa cttaaaacac attcatctca ttattattat tattatccat 10260
ccttaacacc tagcagtgtc tttgtacgat ctcataatcg atcacccctt catcaggtat 10320
ccttaggctt cactccaacg ttgttgcagt tacggaacat gtacacacca tcatggttct 10380
caacgaactg gcaagatctc caagttttcc aaaggctaac ccacatgttc tcatcggtgt 10440
gtctgtagtg ctctcccata actttcttga tgcactcggt agcttctcta gcatggtaga 10500
atgggatcct tgaaacgtag tgatggagca catgagtctc gatgatgtca tggaagatga 10560
ttccgaggat tccgaactct ctatcgatag tagcagcagc acccttagcg aaagtccact 10620
cttgagcatc gtaatgaggc atagaagaat cggtgtgctg aaggaaggta acgaaaacaa 10680
gccagtggtt aacaaggatc caaggacaga accatgtgat gaaagtaggc cagaatccga 10740
aaaccttgta agcggtgtaa acagaagtga gggtagcaag gattccaaga tcagaaagaa 10800
cgatgtacca gtagtccttc ttatcgaaaa cagggctaga aggccagtag tgagacttga 10860
agaacttaga aacaccaggg taaggttgtc cagtagcgtt agtagcaagg taaagagaaa 10920
gtcctccaag ctgttggaac aagagagcga aaacagagta gataggagtt tcctcagcga 10980
tatcgtgaag gctggtaact tggtgcttct ctttgaattc ctcggcggtg taaggaacga 11040
aaaccatatc tctggtcatg tgtccagtag ccttatggtg cttagcatga gagaacttcc 11100
agctgaagta aggaaccata acaagagagt ggagaaccca tccaacggta tcgttaaccc 11160
atccgtagtt agagaaagca gaatgtccac actcatgtcc aaggatccag attccgaatc 11220
cgaaacaaga gatagagaac acgtaagcag accaagcagc gaatctaagg aattcgttag 11280
ggagaagagg gatgtaggta agtccaacgt aagcgatagc agagatagcc acgatatctc 11340
tcaccacgta agacatagac ttcacgagag atctctcgta acagtgctta gggatagcgt 11400
caaggatatc cttgatggtg taatctggca ccttgaaaac gtttccgaag gtatcgatag 11460
cggtcttttg ctgcttgaaa gatgcaacgt ttccagaacg cctaacggtc ttagtagatc 11520
cctcaaggat ctcagatcca gacacggtaa ccttagacat ggtatggtaa ttgtaaatgt 11580
aattgtaatg ttgtttgttg tttgttgttg ttggtaattg ttgtaaaatt tttggtggtg 11640

attggttctt taaggtgtga gagtgagttg tgagttgtgt ggtgggtttg gtgagattgg 11700
ggatggtggg tttatatagt ggagactgag gaatggggtc gtgagtgtta actttgcatg 11760
ggctacacgt gggttctttt gggcttacac gtagtattat tcatgcaaat gcagccaata 11820
catatacggt attttaataa tgtgtgggaa tacaatatgc cgagtatttt actaattttg 11880
gcaatgacaa gtgtacattt ggattatctt acttggcctc tcttgcttta atttggatta 11940
tttttattct cttaccttgg ccgttcatat tcacatccct aaaggcaaga cagaattgaa 12000
tggtggccaa aaattaaaac gatggatatg acctacatag tgtaggatca attaacgtcg 12060
aaggaaaata ctgattctct caagcatacg gacaagggta aataacatag tcaccagaac 12120
ataataaaca aaaagtgcag aagcaagact aaaaaaatta gctatggaca ttcaggttca 12180
tattggaaac atcattatcc tagtcttgtg accatccttc ctcctgctct agttgagagg 12240
ccttgggact aacgagaggt cagttgggat agcagatcct tatcctggac tagcctttct 12300
ggtgtttcag agtcttcgtg ccgccgtcta catctatctc cattaggtct gaagatgact 12360
cttcacacca acgacgttta aggtctctat cctactccta gcttgcaata cctggcttgc 12420
aatacctgga gcatcgtgca cgatgattgg atactgtgga ggaggagtgt ttgctgattt 12480
agagctcccg gttgggtgat ttgacttcga tttcagttta ggcttgttga aatttttcag 12540
gttccattgt gaagccttta gagcttgagc ttccttccat gttaatgcct tgatcgaata 12600
ctcctagaga aaagggaagt cgatctctga gtattgaaat cgaagtgcac attttttttc 12660
aacgtgtcca atcaatccac aaacaaagca gaagacaggt aatctttcat acttatactg 12720
acaagtaata gtcttaccgt catgcataat aacgtctcgt tccttcaaga ggggttttcc 12780
gacatccata acgacccgaa gcctcatgaa agcattaggg aagaactttt ggttcttctt 12840
gtcatggcct ttataggtgt cagccgagct cgccaattcc cgtccgactg gctccgcaaa 12900
atattcgaac ggcaagttat ggacttgcaa ccataactcc acggtattga gcaggaccta 12960
ttgtgaagac tcatctcatg gagcttcaga atgtggttgt cagcaaacca atgaccgaaa 13020
tccatcacat gacggacgtc cagtgggtga gcgaaacgaa acaggaagcg cctatctttc 13080
agagtcgtga gctccacacc ggattccggc aactacgtgt tgggcaggct tcgccgtatt 13140
agagatatgt tgaggcagac ccatctgtgc cactcgtaca attacgagag ttgtttttt 13200
tgtgattttc ctagtttctc gttgatggtg agctcatatt ctacatcgta tggtctctca 13260
acgtcgtttc ctgtcatctg atatcccgtc atttgcatcc acgtgcgccg cctcccgtgc 13320
caagtcccta ggtgtcatgc acgccaaatt ggtggtggtg cgggctgccc tgtgcttctt 13380
accgatgggt ggaggttgag tttgggggtc tccgcggcga tggtagtggg ttgacggttt 13440
ggtgtgggtt gacggcattg atcaatttac ttcttgcttc aaattctttg gcagaaaaca 13500
attcattaga ttagaactgg aaaccagagt gatgagacgg attaagtcag attccaacag 13560
agttacatct cttaagaaat aatgtaaccc ctttagactt tatatatttg caattaaaaa 13620
aataatttaa cttttagact ttatatatag ttttaataac taagtttaac cactctatta 13680
tttatatcga aactatttgt atgtctcccc tctaaataaa cttggtattg tgtttacaga 13740
acctataatc aaataatcaa tactcaactg aagtttgtgc agttaattga agggattaac 13800

ggccaaaatg cactagtatt atcaaccgaa tagattcaca ctagatggcc atttccatca 13860
atatcatcgc cgttcttctt ctgtccacat atcccctctg aaacttgaga gacacctgca 13920
cttcattgtc cttattacgt gttacaaaat gaaacccatg catccatgca aactgaagaa 13980
tggcgcaaga acccttcccc tccatttctt atgtggcgac catccatttc accatctccc 14040
gctataaaac acccccatca cttcacctag aacatcatca ctacttgctt atccatccaa 14100
aagataccca cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta 14160
catttacaat taccatacca tgccacctag cgctgctaag caaatgggag cttctactgg 14220
tgttcatgct ggtgttactg actcttctgc tttcaccaga aaggatgttg ctgatagacc 14280
tgatctcacc atcgttggag attctgttta cgatgctaag gctttcagat ctgagcatcc 14340
tggtggtgct catttcgttt ctttgttcgg aggaagagat gctactgagg ctttcatgga 14400
ataccataga agggcttggc ctaagtctag aatgtctaga ttccacgttg gatctcttgc 14460
ttctactgag gaacctgttg ctgctgatga gggatacctt caactttgtg ctaggatcgc 14520
taagatggtg ccttctgttt cttctggatt cgctcctgct tcttactggg ttaaggctgg 14580
acttatcctt ggatctgcta tcgctcttga ggcttacatg ctttacgctg gaaagagact 14640
tctcccttct atcgttcttg gatggctttt cgctcttatc ggtcttaaca tccagcatga 14700
tgctaaccat ggtgctttgt ctaagtctgc ttctgttaac cttgctcttg gactttgtca 14760
ggattggatc ggaggatcta tgatcctttg gcttcaagag catgttgtta tgcaccacct 14820
ccacactaac gatgttgata aggatcctga tcaaaaggct cacggtgctc ttagactcaa 14880
gcctactgat gcttggtcac ctatgcattg gcttcagcat ctttaccttt tgcctggtga 14940
gactatgtac gctttcaagc ttttgttcct cgacatctct gagcttgtta tgtggcgttg 15000
ggagggtgag cctatctcta agcttgctgg atacctcttt atgccttctt tgcttctcaa 15060
gcttaccttc tgggctagat tcgttgcttt gcctctttac cttgctcctt ctgttcatac 15120
tgctgtgtgt atcgctgcta ctgttatgac tggatctttc tacctcgctt tcttcttctt 15180
catctcccac aacttcgagg gtgttgcttc tgttggacct gatggatcta tcacttctat 15240
gactagaggt gctagcttcc ttaagagaca agctgagact tcttctaacg ttggaggacc 15300
tcttcttgct actcttaacg gtggactcaa ctaccaaatt gagcatcact tgttccctag 15360
agttcaccat ggattctacc ctagacttgc tcctcttgtt aaggctgagc ttgaggctag 15420
aggaatcgag tacaagcact accctactat ctggtctaac cttgcttcta ccctcagaca 15480
tatgtacgct cttggaagaa ggcctagatc taaggctgag taatgacaag cttatgtgac 15540
gtgaaataat aacggtaaaa tatatgtaat aataataata ataaagccac aaagtgagaa 15600
tgaggggaag gggaaatgtg taatgagcca gtagccggtg gtgctaattt tgtatcgtat 15660
tgtcaataaa tcatgaattt tgtggttttt atgtgttttt ttaaatcatg aattttaaat 15720
tttataaaat aatctccaat cggaagaaca acattccata tccatgcatg gatgtttctt 15780
tacccaaatc tagttcttga gaggatgaag catcaccgaa cagttctgca actatccctc 15840
aaaagcttta aaatgaacaa caaggaacag agcaacgttc caaagatccc aaacgaaaca 15900
tattatctat actaatacta tattattaat tactactgcc cggaatcaca atccctgaat 15960

gattcctatt aactacaagc cttgttggcg gcggagaagt gatcggcgcg gcgagaagca 16020
gcggactcgg agacgaggcc ttggaagatc tgagtcgaac gggcagaatc agtattttcc 16080
ttcgacgtta attgatccta cactatgtag gtcatatcca tcgttttaat ttttggccac 16140
cattcaattc tgtcttgcct ttagggatgt gaatatgaac ggccaaggta agagaataaa 16200
aataatccaa attaaagcaa gagaggccaa gtaagataat ccaaatgtac acttgtcatt 16260
gccaaaatta gtaaaatact cggcatattg tattcccaca cattattaaa ataccgtata 16320
tgtattggct gcatttgcat gaataatact acgtgtaagc ccaaaagaac ccacgtgtag 16380
cccatgcaaa gttaacactc acgaccccat tcctcagtct ccactatata aacccaccat 16440
ccccaatctc accaaaccca ccacacaact cacaactcac tctcacacct taaagaacca 16500
atcaccacca aaaattttac aacaattacc aacaacaaca aacaacaaac aacattacaa 16560
ttacatttac aattaccata ccatgagcgc tgttaccgtt actggatctg atcctaagaa 16620
cagaggatct tctagcaaca ccgagcaaga ggttccaaaa gttgctatcg ataccaacgg 16680
aaacgtgttc tctgttcctg atttcaccat caaggacatc cttggagcta tccctcatga 16740
gtgttacgag agaagattgg ctacctctct ctactacgtg ttcagagata tcttctgcat 16800
gcttaccacc ggatacctta cccataagat cctttaccct ctcctcatct cttacacctc 16860
taacagcatc atcaagttca ctttctgggc cctttacact tacgttcaag gacttttcgg 16920
aaccggaatc tgggttctcg ctcatgagtg tggacatcaa gctttctctg attacggaat 16980
cgtgaacgat ttcgttggat ggacccttca ctcttacctt atggttcctt acttcagctg 17040
gaagtactct catggaaagc accataaggc tactggacac atgaccagag atatggtttt 17100
cgttcctgcc accaaagagg aattcaagaa gtctaggaac ttcttcggta acctcgctga 17160
gtactctgag gattctccac ttagaaccct ttacgagctt cttgttcaac aacttggagg 17220
atggatcgct tacctcttcg ttaacgttac aggacaacct taccctgatg ttccttcttg 17280
gaaatggaac cacttctggc ttacctctcc acttttcgag caaagagatg ctctctacat 17340
cttcctttct gatcttggaa tcctcaccca gggaatcgtt cttactcttt ggtacaagaa 17400
attcggagga tggtcccttt tcatcaactg gttcgttcct tacatctggg ttaaccactg 17460
gctcgttttc atcacattcc ttcagcacac tgatcctact atgcctcatt acaacgctga 17520
ggaatggact ttcgctaagg gtgctgctgc tactatcgat agaaagttcg gattcatcgg 17580
acctcacatc ttccatgata tcatcgagac tcatgtgctt caccactact gttctaggat 17640
cccattctac aacgctagac ctgcttctga ggctatcaag aaagttatgg gaaagcacta 17700
caggtctagc gacgagaaca tgtggaagtc actttggaag tctttcaggt cttgccaata 17760
cgttgacggt gataacggtg ttctcatgtt ccgtaacatc aacaactgcg gagttggagc 17820
tgctgagaag taatgaaggg gtgatcgatt atgagatcgt acaaagacac tgctaggtgt 17880
taaggatgga taataataat aataatgaga tgaatgtgtt ttaagttagt gtaacagctg 17940
taataaagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagaggc 18000
tgatgaaatg ttatgtatgt ttcttggttt ttaaaataaa tgaaagcaca tgctcgtgtg 18060
gttctatcga attattcggc ggttcctgtg ggaaaaagtc cagaagggcc gccgcagcta 18120

ctactacaac caaggccgtg gaggagggca acagagccag cacttcgata gctgctgcga 18180
tgatcttaag caattgagga gcgagtgcac atgcagggga ctggagcgtg caatcggcca 18240
gatgaggcag gacatccagc agcagggaca gcagcaggaa gttgagaggt ggtcccatca 18300
atctaaacaa gtcgctaggg accttccggg acagtgcggc acccagccta gccgatgcca 18360
gctccagggg cagcagcagt ctgcatggtt ttgaagtggt gatcgatgag atcgtataaa 18420
gacactgcta ggtgttaagg atgggataat aagatgtgtt ttaagtcatt aaccgtaata 18480
aaaagagaga gaggctgatg gaatgttatg tatgtatgtt tcttggtttt taaaattaaa 18540
tggaaagcac atgctcgtgt gggttctatc tcgattaaaa atcccaatta tatttggtct 18600
aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt cgaaccaaac caaaatataa atatatagtt 18660
tttatatata tgcctttaag actttttata gaattttctt taaaaaatat ctagaaatat 18720
ttgcgactct tctggcatgt aatatttcgt taaatatgaa gtgctccatt tttattaact 18780
ttaaataatt ggttgtacga tcactttctt atcaagtgtt actaaaatgc gtcaatctct 18840
ttgttcttcc atattcatat gtcaaaatct atcaaaattc ttatatatct ttttcgaatt 18900
tgaagtgaaa tttcgataat ttaaaattaa atagaacata tcattattta ggtatcatat 18960
tgatttttat acttaattac taaatttggt taactttgaa agtgtacatc aacgaaaaat 19020
tagtcaaacg actaaaataa ataaatatca tgtgttatta agaaaattct cctataagaa 19080
tattttaata gatcatatgt ttgtaaaaaa aattaatttt tactaacaca tatatttact 19140
tatcaaaaat ttgacaaagt aagattaaaa taatattcat ctaacaaaaa aaaaaccaga 19200
aaatgctgaa aacccggcaa aaccgaacca atccaaaccg atatagttgg tttggtttga 19260
ttttgatata aaccgaacca actcggtcca tttgcacccc taatcataat agctttaata 19320
tttcaagata ttattaagtt aacgttgtca atatcctgga aattttgcaa aatgaatcaa 19380
gcctatatgg ctgtaatatg aatttaaaag cagctcgatg tggtggtaat atgtaattta 19440
cttgattcta aaaaaatatc ccaagtatta ataatttctg ctaggaagaa ggttagctac 19500
gatttacagc aaagccagaa tacaaagaac cataaagtga ttgaagctcg aaatatacga 19560
aggaacaaat atttttaaaa aaatacgcaa tgacttggaa caaaagaaag tgatatattt 19620
tttgttctta aacaagcatc ccctctaaag aatggcagtt ttcctttgca tgtaactatt 19680
atgctccctt cgttacaaaa attttggact actattggga acttcttctg aaaatagtcc 19740
tgcaggctag tagattggtt ggttggtttc catgtaccag aaggcttacc ctattagttg 19800
aaagttgaaa ctttgttccc tactcaattc ctagttgtgt aaatgtatgt atatgtaatg 19860
tgtataaaac gtagtactta aatgactagg agtggttctt gagaccgatg agagatggga 19920
gcagaactaa agatgatgac ataattaaga acgaatttga aaggctctta ggtttgaatc 19980
ctattcgaga atgtttttgt caaagatagt ggcgattttg aaccaaagaa aacatttaaa 20040
aaatcagtat ccggttacgt tcatgcaaat agaaagtggt ctaggatctg attgtaattt 20100
tagacttaaa gagtctctta agattcaatc ctggctgtgt acaaaactac aaataatata 20160
ttttagacta tttggcctta actaaacttc cactcattat ttactgaggt tagagaatag 20220
acttgcgaat aaacacattc ccgagaaata ctcatgatcc cataattagt cagagggtat 20280

gccaatcaga tctaagaaca cacattccct caaattttaa tgcacatgta atcatagttt 20340
agcacaattc aaaaataatg tagtattaaa gacagaaatt tgtagacttt tttttggcgt 20400
taaaagaaga ctaagtttat acgtacattt tattttaagt ggaaaaccga aattttccat 20460
cgaaatatat gaatttagta tatatatttc tgcaatgtac tattttgcta ttttggcaac 20520
tttcagtgga ctactacttt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtatacacat 20580
gtctaaatgc atgctttgta aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaaatacat 20640
ctcatagctt cctccattat tttccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca 20700
acaacaaaca acaaacaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaatttgct 20760
caacctctcg ttgctatggc tcaagagcag tacgctgcta tcgatgctgt tgttgctcct 20820
gctatcttct ctgctaccga ctctattgga tggggactca agcctatctc ttctgctact 20880
aaggatctcc ctctcgttga atctcctacc cctcttatcc tttctctcct cgcttacttc 20940
gctatcgttg gttctggact cgtttaccgt aaagtgttcc ctagaaccgt taagggacag 21000
gatcctttcc ttctcaaggc tcttatgctc gctcacaacg ttttccttat cggactcagc 21060
ctttacatgt gcctcaagct cgtttacgag gcttacgtga acaagtactc cttctgggga 21120
aacgcttaca accctgctca aaccgagatg gctaaggtga tctggatctt ctacgtgtcc 21180
aagatctacg agttcatgga caccttcatc atgcttctca agggaaacgt taaccaggtt 21240
tccttcctcc atgtttacca ccacggatct atctctggaa tctggtggat gatcacttat 21300
gctgctccag gtggagatgc ttacttctct gctgctctca actcttgggt tcatgtgtgc 21360
atgtacacct actacttcat ggctgctgtt cttcctaagg acgaaaagac caagagaaag 21420
tacctttggt ggggaagata ccttacccag atgcaaatgt tccagttctt catgaacctt 21480
ctccaggctg tttacctcct ctactcttct tctccttacc ctaagttcat tgctcaactc 21540
ctcgttgttt acatggttac cctcctcatg cttttcggaa acttctacta catgaagcac 21600
cacgcttcta agtgataagg gccgccgcca tgtgacagat cgaaggaaga aagtgtaata 21660
agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tatatataat aatgttatct 21720
ttcacaactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt gtcatatgat 21780
aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtcaa tttaaagata taagattctt taaatgatta 21840
aaaaaaatat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta ttatttattg 21900
attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct agcctgcagg 21960
gcggccgcgg atcccatgga gtcaaagatt caaatagagg acctaacaga actcgccgta 22020
aagactggcg aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc 22080
gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 22140
gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 22200
ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 22260
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 22320
ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 22380
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa 22440

tcccactatc cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca tttggagaga 22500
acacggggga ctgaattaaa tatgagccct gagaggcgtc ctgttgaaat cagacctgct 22560
actgctgctg atatggctgc tgtttgtgat atcgtgaacc actacatcga gacttctacc 22620
gttaacttca gaactgagcc tcaaactcct caagagtgga tcgatgatct tgagagactc 22680
caagatagat acccttggct tgttgctgag gttgagggtg ttgttgctgg aatcgcttac 22740
gctggacctt ggaaggctag aaacgcttac gattggactg ttgagtctac cgtttacgtt 22800
tcacacagac atcagagact tggacttgga tctacccttt acactcacct tctcaagtct 22860
atggaagctc agggattcaa gtctgttgtt gctgttatcg gactccctaa cgatccttct 22920
gttagacttc atgaggctct tggatacact gctagaggaa ctcttagagc tgctggatac 22980
aagcacggtg gatggcatga tgttggattc tggcaaagag atttcgagct tcctgctcct 23040
cctagacctg ttagaccagt tactcagatc tgaatttgcg tgatcgttca aacatttggc 23100
aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc 23160
tgttgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat 23220
gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat 23280
agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cggtgtcatc tatgttacta gatcactagt 23340
gatgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt 23400
ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca acagctcccc 23460
gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccatcagt cc 23512

<210> 3
<211> 1254
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Khung đọc mở được tối ưu hóa bởi codon để biểu hiện 12 desaturaza của Lachancea kluyveri ở thực vật

<400> 3
atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc 60
gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa acgtgttctc tgttcctgat 120
ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt gttacgagag aagattggct 180
acctctctct actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc ttaccaccgg ataccttacc 240
cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacacctcta acagcatcat caagttcact 300
ttctgggccc tttacactta cgttcaagga cttttcggaa ccggaatctg ggttctcgct 360
catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg tgaacgattt cgttggatgg 420
acccttcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga agtactctca tggaaagcac 480
cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg ttcctgccac caaagaggaa 540
ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctcgctgagt actctgagga ttctccactt 600
agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat ggatcgctta cctcttcgtt 660
aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt ccttcttgga aatggaacca cttctggctt 720

acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct tcctttctga tcttggaatc 780
ctcacccagg gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat tcggaggatg gtccctttc 840
atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aaccactggc tcgttttcat cacattcctt 900
cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt 960
gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcatcggac ctcacatctt ccatgatatc 1020
atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc cattctacaa cgctagacct 1080
gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg 1140
tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg ttgacggtga taacggtgtt 1200
ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg ctgagaagta atga 1254

<210> 4
<211> 416
<212> PRT
<213> Lachancea kluyveri

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Glu Glu Phe Lys Lys Ser Arg Asn Phe Phe Gly Asn Leu Ala
180 185 190

Glu Tyr Ser Glu Asp Ser Pro Leu Arg Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Val
195 200 205

Gln Gln Leu Gly Gly Trp Ile Ala Tyr Leu Phe Val Asn Val Thr Gly
210 215 220

Gln Pro Tyr Pro Asp Val Pro Ser Trp Lys Trp Asn His Phe Trp Leu
225 230 235 240

Thr Ser Pro Leu Phe Glu Gln Arg Asp Ala Leu Tyr Ile Phe Leu Ser

245 250 255

Asp Leu Gly Ile Leu Thr Gln Gly Ile Val Leu Thr Leu Trp Tyr Lys
260 265 270

Lys Phe Gly Gly Trp Ser Leu Phe Ile Asn Trp Phe Val Pro Tyr Ile
275 280 285

Trp Val Asn His Trp Leu Val Phe Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
290 295 300

Pro Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Glu Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
305 310 315 320

Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Lys Phe Gly Phe Ile Gly Pro His Ile
325 330 335

Phe His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Cys Ser Arg
340 345 350

Ile Pro Phe Tyr Asn Ala Arg Pro Ala Ser Glu Ala Ile Lys Lys Val
355 360 365

Met Gly Lys His Tyr Arg Ser Ser Asp Glu Asn Met Trp Lys Ser Leu
370 375 380

Trp Lys Ser Phe Arg Ser Cys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Asn Gly Val
385 390 395 400

Leu Met Phe Arg Asn Ile Asn Asn Cys Gly Val Gly Ala Ala Glu Lys
405 410 415

<210> 5
<211> 1251
<212> ADN
<213> Pichia pastoris

<400> 5
atgtctaagg ttaccgtgtc tggatctgag atccttgagg gatctactaa gaccgttagg 60

cgttctggaa acgttgcatc tttcaagcag caaaagaccg ctatcgatac cttcggaaac 120

gttttcaagg tgccagatta caccatcaag gatatccttg acgctatccc taagcactgt 180

tacgagagat ctctcgtgaa gtctatgtct tacgtggtga gagatatcgt ggctatctct 240

gctatcgctt acgttggact tacctacatc cctcttctcc ctaacgaatt ccttagattc 300

gctgcttggt ctgcttacgt gttctctatc tcttgtttcg gattcggaat ctggatcctt 360

ggacatgagt gtggacattc tgctttctct aactacggat gggttaacga taccgttgga 420

tgggttctcc actctcttgt tatggttcct tacttcagct ggaagttctc tcatgctaag 480

caccataagg ctactggaca catgaccaga gatatggttt tcgttcctta caccgccgag 540

gaattcaaag agaagcacca agttaccagc cttcacgata tcgctgagga aactcctatc 600

tactctgttt tcgctctctt gttccaacag cttggaggac tttctcttta ccttgctact 660

aacgctactg gacaacctta ccctggtgtt tctaagttct tcaagtctca ctactggcct 720

tctagccctg ttttcgataa gaaggactac tggtacatcg ttctttctga tcttggaatc 780

cttgctaccc tcacttctgt ttacaccgct tacaaggttt tcggattctg gcctactttc 840

atcacatggt tctgtccttg gatccttgtt aaccactggc ttgttttcgt taccttcctt 900

cagcacaccg attcttctat gcctcattac gatgctcaag agtggacttt cgctaagggt 960

gctgctgcta ctatcgatag agagttcgga atcctcggaa tcatcttcca tgacatcatc 1020

gagactcatg tgctccatca ctacgtttca aggatcccat tctaccatgc tagagaagct 1080

accgagtgca tcaagaaagt tatgggagag cactacagac acaccgatga gaacatgtgg 1140

gttagccttt ggaaaacttg gagatcttgc cagttcgttg agaaccatga tggtgtgtac 1200

atgttccgta actgcaacaa cgttggagtg aagcctaagg atacctgatg a 1251

<210> 6
<211> 415
<212> PRT
<213> Pichia pastoris

<400> 6

Met Ser Lys Val Thr Val Ser Gly Ser Glu Ile Leu Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Thr Val Arg Arg Ser Gly Asn Val Ala Ser Phe Lys Gln Gln Lys
20 25 30

Thr Ala Ile Asp Thr Phe Gly Asn Val Phe Lys Val Pro Asp Tyr Thr
35 40 45

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

Leu Val Lys Ser Met Ser Tyr Val Val Arg Asp Ile Val Ala Ile Ser
65 70 75 80

Ala Ile Ala Tyr Val Gly Leu Thr Tyr Ile Pro Leu Leu Pro Asn Glu
85 90 95

Phe Leu Arg Phe Ala Ala Trp Ser Ala Tyr Val Phe Ser Ile Ser Cys
100 105 110

Phe Gly Phe Gly Ile Trp Ile Leu Gly His Glu Cys Gly His Ser Ala
115 120 125

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

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

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

Tyr Thr Ala Glu Glu Phe Lys Glu Lys His Gln Val Thr Ser Leu His
180 185 190

Asp Ile Ala Glu Glu Thr Pro Ile Tyr Ser Val Phe Ala Leu Leu Phe
195 200 205

Gln Gln Leu Gly Gly Leu Ser Leu Tyr Leu Ala Thr Asn Ala Thr Gly
210 215 220

Gln Pro Tyr Pro Gly Val Ser Lys Phe Phe Lys Ser His Tyr Trp Pro
225 230 235 240

Ser Ser Pro Val Phe Asp Lys Lys Asp Tyr Trp Tyr Ile Val Leu Ser
245 250 255

Asp Leu Gly Ile Leu Ala Thr Leu Thr Ser Val Tyr Thr Ala Tyr Lys
260 265 270

Val Phe Gly Phe Trp Pro Thr Phe Ile Thr Trp Phe Cys Pro Trp Ile
275 280 285

Leu Val Asn His Trp Leu Val Phe Val Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
290 295 300

Ser Ser Met Pro His Tyr Asp Ala Gln Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
305 310 315 320

Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Glu Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ile Phe
325 330 335

His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Val Ser Arg Ile
340 345 350

Pro Phe Tyr His Ala Arg Glu Ala Thr Glu Cys Ile Lys Lys Val Met
355 360 365

Gly Glu His Tyr Arg His Thr Asp Glu Asn Met Trp Val Ser Leu Trp
370 375 380

Lys Thr Trp Arg Ser Cys Gln Phe Val Glu Asn His Asp Gly Val Tyr
385 390 395 400

Met Phe Arg Asn Cys Asn Asn Val Gly Val Lys Pro Lys Asp Thr
405 410 415

<210> 7
<211> 1392
<212> ADN
<213> Micromonas pusilla

<400> 7
atgtgcccgc cgaagacgga cggccgatcg tccccgcgat cgccgctgac gcgcagcaaa 60

tcctccgcgg aggcgctcga cgccaaggac gcgtcgaccg cgcccgtcga tctcaaaacg 120

ctcgagccgc acgagctcgc ggcgacgttc gagacgcgat gggtgcgcgt ggaggacgtc 180

gagtacgacg tcacaaactt caaacacccg ggaggcagcg tgatattcta catgctcgcg 240

aacacgggcg cggacgccac ggaggcgttc aaggagttcc acatgcgatc gcttaaggcg 300

tggaagatgc tcagagcgct gccgtcgcgc cccgcggaga tcaaacgcag cgagagcgag 360

gacgcgccga tgttggagga tttcgcgcgg tggcgcgcgg agctcgaacg cgacgggttc 420

tttaagccct cgataacgca cgtcgcgtat cggttactcg agctcctcgc gaccttcgcc 480

ctcggcaccg ccctcatgta cgccgggtac ccgatcatcg cgtccgtcgt gtacggcgcg 540

ttcttcggcg ctcggtgcgg ttgggtccag cacgagggcg ggcacaactc gctcacgggg 600

tccgtctacg tcgacaagcg cctccaagcg atgacgtgcg ggttcgggct gtccacgagc 660

ggggagatgt ggaaccagat gcacaataag caccacgcga cgccgcagaa agtgaggcac 720

gacatggacc tggacacgac ccccgcggtg gcgtttttta acaccgccgt ggaggacaac 780

cggccgaggg ggttctcccg cgcgtgggct cggcttcagg cgtggacgtt cgtcccggtg 840

acctccgggc tgctcgtcca ggcgttctgg atctacgtcc tgcacccgcg gcaggtgttg 900

cgaaagaaga actacgagga ggcgtcgtgg atgctcgtct ctcacgtcgt caggaccgcg 960

gtgattaaac tcgcgacggg gtactcgtgg cccgtcgcgt actggtggtt caccttcggc 1020

aactggatcg cgtacatgta cctcttcgcg cacttctcca cgagccacac gcacctcccg 1080

gtcgtgccct cggataagca cctgagctgg gtgaactacg cggtcgatca caccgtggac 1140

atcgacccgt cgcgcgggta cgtgaactgg ttgatgggat atctgaactg ccaggtcatt 1200

catcacctgt tcccggacat gccgcagttt cgccagccgg aggtgagccg gcggttcgtc 1260

ccgttcgcga agaagtgggg gctgaactac aaggtgctgt cctattacgg cgcctggaag 1320

gcgacgttct cgaacttgga taaggtcggg cagcactact acgtcaacgg caaggcggag 1380

aaggcgcact ga 1392

<210> 8
<211> 1395
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Khung đọc mở được tối ưu hóa bởi codon để biểu hiện 6 desaturaza của Micromonas pusilla ở thực vật (phiên bản 1)

<400> 8
atgtgccctc ctaagactga tggaagatct tctcctagat ctccacttac caggtctaaa 60

tcttctgctg aggctcttga tgctaaggat gcttctactg ctcctgttga tcttaagact 120

cttgagcctc atgagcttgc tgctactttc gagactagat gggttagagt tgaggacgtt 180

gagtacgatg tgactaactt caagcaccct ggtggatctg tgatcttcta catgcttgct 240

aacactggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaattcc acatgcgttc tctcaaggct 300

tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360

gatgctccta tgcttgagga tttcgctaga tggcgtgctg agcttgagag agatggattc 420

ttcaagcctt ctatcaccca tgtggcttac agacttctcg agcttcttgc tacattcgct 480

cttggaactg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg cttctgttgt ttacggtgct 540

ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacataactc tcttaccgga 600

tctgtttacg tggacaagag acttcaggct atgacttgtg gattcggact ttctacttct 660

ggtgagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcaaaa ggttagacac 720

gatatggatc ttgataccac tcctgctgtg gctttcttca acactgctgt tgaggataac 780

agacctagag gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacttt cgttcctgtt 840

acctctggac ttcttgttca agctttctgg atctacgttc tccaccctag acaagttctc 900

cgtaagaaga actacgaaga ggcttcttgg atgctcgttt ctcatgttgt tagaaccgct 960

gttatcaagc ttgctactgg atactcttgg cctgttgctt actggtggtt cactttcgga 1020

aactggatcg cttacatgta ccttttcgct cacttctcta cttctcatac tcacctccct 1080

gttgttccat ctgataagca cctttcttgg gttaactacg ctgttgatca caccgttgat 1140

atcgatcctt ctagaggata cgtgaactgg cttatgggat accttaactg tcaggttatc 1200

caccacctct tccctgatat gcctcaattc agacagcctg aggttagcag aagattcgtt 1260

cctttcgcta agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttggaag 1320

gctactttct ctaaccttga taaggtggga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag 1380

aaggctcact aatga 1395

<210> 9
<211> 463
<212> PRT
<213> Micromonas pusilla

<400> 9

Met Cys Pro Pro Lys Thr Asp Gly Arg Ser Ser Pro Arg Ser Pro Leu
1 5 10 15

Thr Arg Ser Lys Ser Ser Ala Glu Ala Leu Asp Ala Lys Asp Ala Ser
20 25 30

Thr Ala Pro Val Asp Leu Lys Thr Leu Glu Pro His Glu Leu Ala Ala
35 40 45

Thr Phe Glu Thr Arg Trp Val Arg Val Glu Asp Val Glu Tyr Asp Val
50 55 60

Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Phe Tyr Met Leu Ala
65 70 75 80

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Met Arg
85 90 95

Ser Leu Lys Ala Trp Lys Met Leu Arg Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala
100 105 110

Glu Ile Lys Arg Ser Glu Ser Glu Asp Ala Pro Met Leu Glu Asp Phe
115 120 125

Ala Arg Trp Arg Ala Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser
130 135 140

Ile Thr His Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Leu Ala Thr Phe Ala
145 150 155 160

Leu Gly Thr Ala Leu Met Tyr Ala Gly Tyr Pro Ile Ile Ala Ser Val
165 170 175

Val Tyr Gly Ala Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu
180 185 190

Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Ser Val Tyr Val Asp Lys Arg Leu
195 200 205

Gln Ala Met Thr Cys Gly Phe Gly Leu Ser Thr Ser Gly Glu Met Trp
210 215 220

Asn Gln Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His
225 230 235 240

Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala
245 250 255

Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Arg Ala Trp Ala Arg Leu
260 265 270

Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Leu Leu Val Gln Ala
275 280 285

Phe Trp Ile Tyr Val Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Lys Lys Asn
290 295 300

Tyr Glu Glu Ala Ser Trp Met Leu Val Ser His Val Val Arg Thr Ala
305 310 315 320

Val Ile Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Trp Pro Val Ala Tyr Trp Trp
325 330 335

Phe Thr Phe Gly Asn Trp Ile Ala Tyr Met Tyr Leu Phe Ala His Phe
340 345 350

Ser Thr Ser His Thr His Leu Pro Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
355 360 365

Ser Trp Val Asn Tyr Ala Val Asp His Thr Val Asp Ile Asp Pro Ser
370 375 380

Arg Gly Tyr Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
405 410 415

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Gly Leu Asn Tyr Lys Val
420 425 430

Leu Ser Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Ser Asn Leu Asp Lys
435 440 445

Val Gly Gln His Tyr Tyr Val Asn Gly Lys Ala Glu Lys Ala His
450 455 460

<210> 10
<211> 1449
<212> ADN
<213> Ostreococcus lucimarinus

<400> 10
atgtgcgtcg aaacgaccga aggcacatcg cgaacgatgg cgaacgaacg cacgagctcg 60

tcgtcgtcgc tgagcgaagg cggaacgccg acggtgacgg tcgggatggg aagcgaagac 120

gcggggaaga agactcgaaa cgcgagcgtc acggcgtgga cgaaagagtt ggagccgcac 180

gcgatcgcga agacgttcga acggcggtac gtgacgatcg aaggcgtgga atacgatgtg 240

acggatttta agcatcccgg aggatcggtt atttattaca tgctgtcgaa cacgggagcg 300

gacgcgacgg aggcttttaa agagtttcat tatcggtcga aaaaggcgcg caaggcgttg 360

gcggcgttgc cgcataagcc agtggacgcg gcgacgcggg aaccgatcga agatgaggcg 420

atgctgaagg atttcgcgca gtggcgcaag gaattggagc gtgagggatt ttttaagccc 480

tcgccggcgc acgtggcgta tcgattcgcc gagctcgcgg cgatgttcgc gctcggcacg 540

gcgttgatgc acgcgcgttg gcacgtcgct tccgtgatcg tgtactcgtg tttcttcggc 600

gcgcgatgcg gttgggtgca gcacgagggt gggcacaatt cgttgactgg aaacatttgg 660

tgggacaagc gaatccaagc cttcgccgcg gggttcggct tggcgtcgag tggcgacatg 720

tggaacaaca tgcacaacaa gcatcacgcg acgccccaaa aggtgcgaca cgatatggat 780

ctcgacacca ctcccacggt ggcgttcttc aactccgcgg ttgaagaaaa tcgcccgcgg 840

ggattcagta agttgtggtt gcgccttcaa gcgtggacct tcgtgcccgt gacgtccggt 900

atggttttgt tcttctggat gttcgtcttg cacccgcgta acgcgctgcg acgcaaaagc 960

ttcgaagaag cggcttggat gttttccgcg cacgtcattc gcacggcggt tatcaaagcc 1020

gtcaccggct actcctggat cgcctcgtac ggcttgttcg cggcgacgat gtgggcgagc 1080

ggatgttact tgttcgcgca cttttccacg tctcacacgc acttggatgt cgtgccgagc 1140

gataaacacc tctcgtgggt gcgatacgcc gtcgatcaca cgatcgacat caatccgaac 1200

aacagcgtcg tcaactggtt gatgggctac ttgaactgcc aagtcatcca tcacctgttc 1260

ccggatatgc ctcagttccg ccaacccgaa gtctcccgcc gattcgtccc gtttgcgaag 1320

aagtggaact taaactacaa ggtcttgacg tattatgggg cctggaaggc gacgttcggc 1380

aacttgaacg acgtcgggaa gcactattac gtgcacggat ctcagcgcgt caaatcaaag 1440

tcggcgtga 1449

<210> 11
<211> 1449
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Khung đọc mở được tối ưu hóa bởi codon để biểu hiện 6-desaturaza của Ostreococcus lucimarinus ở thực vật

<400> 11
atgtgtgttg agactactga gggaacctct agaactatgg ctaacgagag gacctcttct 60
tcttcttcac tctctgaggg tggaactcct actgttactg tgggaatggg atctgaggat 120
gctggaaaga aaaccagaaa cgcttctgtt actgcttgga ccaaagagct tgagcctcac 180
gctatcgcta agaccttcga gagaagatac gttaccatcg agggtgttga gtacgatgtg 240
accgatttca aacaccctgg tggatctgtg atctactaca tgctctctaa cactggtgct 300
gatgctactg aggctttcaa agagttccac taccgttcta agaaggctag aaaggctctt 360
gctgctcttc ctcacaagcc tgttgatgct gctactagag agcctattga ggacgaggct 420
atgcttaagg atttcgctca gtggagaaaa gagttggaga gagagggatt cttcaagcct 480
tctcctgctc atgttgctta ccgtttcgct gaactcgctg ctatgttcgc tcttggaacc 540
gctcttatgc atgctagatg gcacgttgct agcgttatcg tgtactcctg tttcttcgga 600
gctagatgtg gatgggttca acatgagggt ggacacaact ctcttaccgg aaacatctgg 660
tgggataaga gaatccaagc tttcgctgct ggattcggac ttgcttcttc tggtgacatg 720
tggaacaaca tgcacaacaa gcaccatgct actcctcaga aagtgagaca cgatatggat 780
cttgatacca cccctaccgt tgctttcttc aactctgctg tggaggaaaa cagacctagg 840
ggattctcta agctttggct cagacttcaa gcttggacct tcgttcctgt tacctctgga 900
atggtgctct tcttctggat gttcgttctc catcctagaa acgctctccg tcgtaagtct 960
ttcgaagagg ctgcttggat gttctctgct cacgttatca gaaccgctgt tatcaaggct 1020
gttaccggat actcttggat cgctagctac ggacttttcg ctgctactat gtgggcttct 1080
ggatgctacc ttttcgctca cttctctact tctcacaccc acctcgatgt tgttccatct 1140
gataagcacc ttagctgggt taggtacgct gttgatcaca ccatcgacat caaccctaac 1200
aactctgttg tgaactggct tatgggatac cttaactgcc aggttatcca ccatctcttc 1260
cctgatatgc ctcaattcag acagcctgag gtgtcaagaa gattcgtccc tttcgctaag 1320
aagtggaacc tcaactacaa ggtgctcact tactacggtg cttggaaggc tactttcgga 1380
aacctcaacg atgttggaaa gcactactac gttcacggat ctcagagagt gaagagcaag 1440
agcgcttga 1449

<210> 12
<211> 482
<212> PRT
<213> Ostreococcus lucimarinus

<400> 12

Met Cys Val Glu Thr Thr Glu Gly Thr Ser Arg Thr Met Ala Asn Glu
1 5 10 15

Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Glu Gly Gly Thr Pro Thr Val
20 25 30

Thr Val Gly Met Gly Ser Glu Asp Ala Gly Lys Lys Thr Arg Asn Ala
35 40 45

Ser Val Thr Ala Trp Thr Lys Glu Leu Glu Pro His Ala Ile Ala Lys
50 55 60

Thr Phe Glu Arg Arg Tyr Val Thr Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val
65 70 75 80

Thr Asp Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Tyr Tyr Met Leu Ser
85 90 95

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Tyr Arg
100 105 110

Ser Lys Lys Ala Arg Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro His Lys Pro Val
115 120 125

Asp Ala Ala Thr Arg Glu Pro Ile Glu Asp Glu Ala Met Leu Lys Asp
130 135 140

Phe Ala Gln Trp Arg Lys Glu Leu Glu Arg Glu Gly Phe Phe Lys Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Phe
165 170 175

Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met His Ala Arg Trp His Val Ala Ser Val
180 185 190

Ile Val Tyr Ser Cys Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His
195 200 205

Glu Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg
210 215 220

Ile Gln Ala Phe Ala Ala Gly Phe Gly Leu Ala Ser Ser Gly Asp Met
225 230 235 240

Trp Asn Asn Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg
245 250 255

His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Thr Val Ala Phe Phe Asn Ser
260 265 270

Ala Val Glu Glu Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Lys Leu Trp Leu Arg
275 280 285

Leu Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Met Val Leu Phe
290 295 300

Phe Trp Met Phe Val Leu His Pro Arg Asn Ala Leu Arg Arg Lys Ser
305 310 315 320

Phe Glu Glu Ala Ala Trp Met Phe Ser Ala His Val Ile Arg Thr Ala
325 330 335

Val Ile Lys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Trp Ile Ala Ser Tyr Gly Leu
340 345 350

Phe Ala Ala Thr Met Trp Ala Ser Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe
355 360 365

Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
370 375 380

Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp His Thr Ile Asp Ile Asn Pro Asn
385 390 395 400

Asn Ser Val Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
405 410 415

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
420 425 430

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val
435 440 445

Leu Thr Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Gly Asn Leu Asn Asp
450 455 460

Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His Gly Ser Gln Arg Val Lys Ser Lys
465 470 475 480

Ser Ala

<210> 13
<211> 456
<212> PRT
<213> Ostreococcus tauri

<400> 13

Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile
1 5 10 15

Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser
20 25 30

Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
35 40 45

Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His
50 55 60

Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp
65 70 75 80

Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg
85 90 95

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val
100 105 110

Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu
115 120 125

Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg
130 135 140

Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr
145 150 155 160

Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly
165 170 175

Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr
180 185 190

Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe
195 200 205

Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His
210 215 220

His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr
225 230 235 240

Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg
245 250 255

Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro
260 265 270

Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro
275 280 285

Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu
290 295 300

Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe
305 310 315 320

Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser
325 330 335

Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp
340 345 350

Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp
355 360 365

His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met
370 375 380

Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro
385 390 395 400

Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys
405 410 415

Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys
420 425 430

Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His
435 440 445

Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala
450 455

<210> 14
<211> 894
<212> ADN
<213> Pyramimonas cordata

<400> 14
atggagttcg ctcagcctct tgtggctatg gcacaggagc agtatgccgc aattgacgcg 60

gtggtagccc ctgcaatttt ctcagctacc gacagcatcg gttggggtct taagcccatt 120

agcagcgcga caaaggatct tcctctcgtt gagagtccga cgccgctcat actgagcctg 180

ttggcctatt ttgcgatcgt cggctctggg ctggtgtacc gcaaagtatt ccctcgcaca 240

gtaaaggggc aagacccctt cctgctgaag gcgctcatgc ttgcgcacaa cgtgttcctc 300

attggcctca gtctatacat gtgcttgaag cttgtctacg aggcttacgt caacaagtac 360

tccttctggg gaaacgccta caaccccgca cagaccgaga tggcgaaggt catctggatt 420

ttctacgtct ccaagatcta tgagttcatg gacacgttca tcatgctctt gaagggcaac 480

gtcaaccagg tctctttcct gcatgtgtac catcatggct ccatctctgg tatctggtgg 540

atgatcacct acgctgcccc tggcggtgac gcgtacttct cggcggcgct caactcgtgg 600

gtgcacgtgt gcatgtacac gtactacttc atggcggcgg tgctgcccaa ggacgagaag 660

accaagcgca agtacctctg gtggggccgc tacctgaccc agatgcagat gttccagttc 720

ttcatgaacc tgctccaggc ggtctacctc ctctactcct ctagccccta ccccaagttc 780

atcgcccagc tgctggtggt gtacatggtc acgctgctga tgctcttcgg caacttctac 840

tacatgaagc accacgcgag caagaagcag aagctggcca gcaagaagca gtag 894

<210> 15
<211> 870
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Khung đọc mở được tối ưu hóa bởi codon để biểu hiện 6 elongaza của Pyramimonas cordata ở thực vật (được cắt ngắn ở đầu 3' và mã hóa elongaza chức năng) (phiên bản 1)

<400> 15
atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgctgc tatcgatgct 60

gttgttgctc ctgctatctt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc 120

tcttctgcta ctaaggactt gcctcttgtt gagtctccta cacctctcat cctttctttg 180

cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctcgtttaca gaaaggtttt ccctagaacc 240

gtgaagggac aagatccatt ccttttgaag gctcttatgc ttgctcacaa cgtgttcctt 300

atcggacttt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggcttacgt taacaagtac 360

tctttctggg gaaacgctta caaccctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc 420

ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaaat 480

gttaaccagg ttagcttcct tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctggtgg 540

atgattactt acgctgctcc tggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg 600

gttcacgtgt gtatgtacac ctactatttt atggctgccg tgcttcctaa ggacgagaaa 660

actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aaatgcagat gttccagttc 720

ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctt ctctactctt catctcctta ccctaagttt 780

atcgctcagc tcctcgtggt gtacatggtt actcttctca tgcttttcgg aaacttctac 840

tacatgaagc accacgctag caagtgatga 870

<210> 16
<211> 297
<212> PRT
<213> Pyramimonas cordata

<400> 16

Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
1 5 10 15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
20 25 30

Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro
35 40 45

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
50 55 60

Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
85 90 95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
100 105 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
115 120 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
130 135 140

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145 150 155 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
165 170 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
180 185 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
195 200 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
210 215 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225 230 235 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
245 250 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
260 265 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
275 280 285

Lys Gln Lys Leu Ala Ser Lys Lys Gln
290 295

<210> 17
<211> 288
<212> PRT
<213> Pyramimonas cordata

<400> 17

Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
1 5 10 15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
20 25 30

Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro
35 40 45

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
50 55 60

Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
85 90 95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
100 105 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn

115 120 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
130 135 140

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145 150 155 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
165 170 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
180 185 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
195 200 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
210 215 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225 230 235 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
245 250 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
260 265 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
275 280 285

<210> 18
<211> 1278
<212> ADN
<213> Pavlova salina

<400> 18
atgccgccgc gcgatagcta ctcgtacgcc gccccgccgt cggcccagct gcacgaggtc 60

gataccccgc aggagcatga taagaaggag ctcgtcatcg gtgaccgcgc gtacgacgtg 120

accaactttg tgaagcgcca cccgggtggc aagatcatcg cataccaggt tggcacagat 180

gcgacggacg cgtacaagca gttccatgtg cggtctgcca aggcggacaa gatgctcaag 240

tcgctgcctt cgcgcccggt gcacaagggc tactcgcccc gccgcgctga cctcattgcc 300

gacttccagg agttcaccaa gcagctggag gcggagggca tgtttgagcc gtcgctgccg 360

cacgtggcat accgcctggc ggaggtgatc gcgatgcacg tggccggcgc cgcgctcatc 420

tggcacgggt acaccttcgc gggcattgcc atgctcggcg ttgtgcaggg ccgctgcggc 480

tggctcatgc acgagggcgg ccactactcg ctcacgggca acattgcttt tgaccgtgcc 540

atccaagtcg cgtgctacgg ccttggctgc ggcatgtcgg gcgcgtggtg gcgcaaccag 600

cacaacaagc accacgcgac gccgcagaag ttgcagcacg acgtcgacct cgacaccctc 660

ccgctcgtcg ccttccacga gcggatagcc gccaaggtga agagccccgc gatgaaggcg 720

tggcttagta tgcaggcgaa gctcttcgcg ccagtgacca cgctgctggt cgcgctgggc 780

tggcagctgt acctgcaccc gcgccatatg ctgcgcacca agcactacga cgagctcgcg 840

atgctcggca ttcgctacgg ccttgtcggc tacctcgcgg cgaactacgg cgcggggtac 900

gtgctcgcgt gctacctgct gtacgtgcag ctcggcgcca tgtacatctt ctgcaacttt 960

gccgtgtcgc acacacacct gccggttgtc gagcctaacg agcacgcaac gtgggtggag 1020

tacgccgcga accacacgac caactgctcg ccctcgtggt ggtgcgactg gtggatgtcg 1080

tacctcaact accagatcga gcaccacctc tacccgtcca tgccgcagtt ccgccacccg 1140

aagattgcgc cgcgggtgaa gcagctcttc gagaagcacg gcctgcacta cgacgtgcgt 1200

ggctacttcg aggccatggc ggacacgttt gccaaccttg acaacgtcgc gcacgcgccg 1260

gagaagaaga tgcagtga 1278

<210> 19
<211> 1281
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Khung đọc mở được tối ưu hóa bởi codon để biểu hiện 5 desaturaza của Pavlova salina ở thực vật (phiên bản 1)

<400> 19
atgcctccaa gggactctta ctcttatgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaagtt 60

gatactcctc aagagcacga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtt 120

accaacttcg ttaagagaca ccctggtgga aagatcattg cttaccaagt tggaactgat 180

gctaccgatg cttacaagca gttccatgtt agatctgcta aggctgacaa gatgcttaag 240

tctcttcctt ctcgtcctgt tcacaaggga tactctccaa gaagggctga tcttatcgct 300

gatttccaag agttcaccaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgagcc ttctcttcct 360

catgttgctt acagacttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctggtgc tgctcttatc 420

tggcatggat acactttcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgtgga 480

tggcttatgc atgagggtgg acattactct ctcactggaa acattgcttt cgacagagct 540

atccaagttg cttgttacgg acttggatgt ggaatgtctg gtgcttggtg gcgtaaccag 600

cataacaagc accatgctac tcctcaaaag cttcagcacg atgttgatct tgataccctt 660

cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaaggtta agtctcctgc tatgaaggct 720

tggctttcta tgcaagctaa gcttttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttgga 780

tggcagcttt accttcatcc tagacacatg ctcaggacta agcactacga tgagcttgct 840

atgctcggaa tcagatacgg acttgttgga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac 900

gttctcgctt gttaccttct ttacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc 960

gctgtttctc atactcacct ccctgttgtt gagcctaacg agcatgctac ttgggttgag 1020

tacgctgcta accacactac taactgttct ccatcttggt ggtgtgattg gtggatgtct 1080

taccttaact accagatcga gcaccacctt taccccttcta tgcctcaatt cagacaccct 1140

aagatcgctc ctagagttaa gcagcttttc gagaagcacg gacttcacta cgatgttaga 1200

ggatacttcg aggctatggc tgatactttc gctaaccttg ataacgttgc ccatgctcct 1260

gagaagaaaa tgcagtaatg a 1281

<210> 20
<211> 425
<212> PRT
<213> Pavlova salina

<400> 20

Met Pro Pro Arg Asp Ser Tyr Ser Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gln
1 5 10 15

Leu His Glu Val Asp Thr Pro Gln Glu His Asp Lys Lys Glu Leu Val
20 25 30

Ile Gly Asp Arg Ala Tyr Asp Val Thr Asn Phe Val Lys Arg His Pro
35 40 45

Gly Gly Lys Ile Ile Ala Tyr Gln Val Gly Thr Asp Ala Thr Asp Ala
50 55 60

Tyr Lys Gln Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Met Leu Lys
65 70 75 80

Ser Leu Pro Ser Arg Pro Val His Lys Gly Tyr Ser Pro Arg Arg Ala
85 90 95

Asp Leu Ile Ala Asp Phe Gln Glu Phe Thr Lys Gln Leu Glu Ala Glu
100 105 110

Gly Met Phe Glu Pro Ser Leu Pro His Val Ala Tyr Arg Leu Ala Glu
115 120 125

Val Ile Ala Met His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Trp His Gly Tyr
130 135 140

Thr Phe Ala Gly Ile Ala Met Leu Gly Val Val Gln Gly Arg Cys Gly
145 150 155 160

Trp Leu Met His Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Asn Ile Ala
165 170 175

Phe Asp Arg Ala Ile Gln Val Ala Cys Tyr Gly Leu Gly Cys Gly Met
180 185 190

Ser Gly Ala Trp Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro
195 200 205

Gln Lys Leu Gln His Asp Val Asp Leu Asp Thr Leu Pro Leu Val Ala
210 215 220

Phe His Glu Arg Ile Ala Ala Lys Val Lys Ser Pro Ala Met Lys Ala
225 230 235 240

Trp Leu Ser Met Gln Ala Lys Leu Phe Ala Pro Val Thr Thr Leu Leu
245 250 255

Val Ala Leu Gly Trp Gln Leu Tyr Leu His Pro Arg His Met Leu Arg
260 265 270

Thr Lys His Tyr Asp Glu Leu Ala Met Leu Gly Ile Arg Tyr Gly Leu
275 280 285

Val Gly Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Val Leu Ala Cys
290 295 300

Tyr Leu Leu Tyr Val Gln Leu Gly Ala Met Tyr Ile Phe Cys Asn Phe
305 310 315 320

Ala Val Ser His Thr His Leu Pro Val Val Glu Pro Asn Glu His Ala
325 330 335

Thr Trp Val Glu Tyr Ala Ala Asn His Thr Thr Asn Cys Ser Pro Ser
340 345 350

Trp Trp Cys Asp Trp Trp Met Ser Tyr Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His
355 360 365

His Leu Tyr Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Pro Lys Ile Ala Pro
370 375 380

Arg Val Lys Gln Leu Phe Glu Lys His Gly Leu His Tyr Asp Val Arg
385 390 395 400

Gly Tyr Phe Glu Ala Met Ala Asp Thr Phe Ala Asn Leu Asp Asn Val
405 410 415

Ala His Ala Pro Glu Lys Lys Met Gln
420 425

<210> 21
<211> 1329
<212> ADN
<213> Pyramimonas cordata

<400> 21
atgggaaagg gaggcaatgc tagcgctcct actgcgaaga aggaggtgtt gatcgagggg 60

aagttttacg atgtcaccga cttcaggcac cccggtggtt cgatcatcaa gtttctctcg 120

ggttctggtg ctgacgccac cgcttcctac cgcgagttcc acgttaggtc agcgaaggca 180

gacaagttct tgaagacgct gccctcccgc gaagccactc cccaggagct gaagcaggcg 240

gttgagttct ccaagctcaa cccgccctcc gcggagagtg cctctgctcc cctgaccgac 300

cttgccaagg tggaagcgct gaacaaggac ttcgaggctt tccgtgagca gctcattcag 360

gagggcttct ttaagcccaa tatcccgcat gtggtcaagc gcatcacgga agtcgtggcg 420

atgatggccg tagcctcctg gatgatggtg cagaccaacg ctcttgttgt gaccctcgga 480

gttctgatcc gcggcattgc acagggccgg tgcggttggc ttatgcacga gggcggccac 540

tatagtctta ctgggaagat ctccattgat aggcgtctgc aggagtcaat ttacggattc 600

ggctgtggaa tgtccggcgc ctggtggcgc aaccagcaca acaagcacca cgcaacccca 660

cagaagctgc agcatgacgt cgacctggag acccttcctc tgatggcttt caacaacgct 720

gttaccgata gacgcaaggt gaagcctggt agtctccagg ctctgtggct caagtaccag 780

gccttcctct tcttccccgt gacctccctt ctggtcggcc tcggttggac caccgtcctc 840

caccccaggc acagcttgcg caccaagcac tatttcgagc tgctctgcat ggctgctcgt 900

tacgcgagtt tcgctgctct tttcgctccc aagtacggac ttgcaggagc tgccgggctc 960

tacctcgcca ccttcgctgt cgggtgcaac tatattttca tcaacttctc ggtctctcac 1020

actcacctgc ccgtgagcgg tgcgagcgag tacctgcatt gggtcgtgta ttcggccatc 1080

cacaccacta acatcaaatc cagcatgctg tgcgattggt ggatgtcatt cctcaacttc 1140

cagatcgagc atcacctgtt cccttcaatg ccccagttcc gccacaagat tatctccccg 1200

cgtgtaaagg ccttgtttga gaagcacggt cttgtgtatg atgtgcgccc ctattggggg 1260

gccatggctg acaccttcaa gaacttgaat gacgttggca ctcacgcatc tcactccaag 1320

gcgcactag 1329

<210> 22
<211> 442
<212> PRT
<213> Pyramimonas cordata

<400> 22

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

Leu Ile Glu Gly Lys Phe Tyr Asp Val Thr Asp Phe Arg His Pro Gly
20 25 30

Gly Ser Ile Ile Lys Phe Leu Ser Gly Ser Gly Ala Asp Ala Thr Ala
35 40 45

Ser Tyr Arg Glu Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Phe Leu
50 55 60

Lys Thr Leu Pro Ser Arg Glu Ala Thr Pro Gln Glu Leu Lys Gln Ala
65 70 75 80

Val Glu Phe Ser Lys Leu Asn Pro Pro Ser Ala Glu Ser Ala Ser Ala
85 90 95

Pro Leu Thr Asp Leu Ala Lys Val Glu Ala Leu Asn Lys Asp Phe Glu
100 105 110

Ala Phe Arg Glu Gln Leu Ile Gln Glu Gly Phe Phe Lys Pro Asn Ile
115 120 125

Pro His Val Val Lys Arg Ile Thr Glu Val Val Ala Met Met Ala Val
130 135 140

Ala Ser Trp Met Met Val Gln Thr Asn Ala Leu Val Val Thr Leu Gly
145 150 155 160

Val Leu Ile Arg Gly Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Leu Met His
165 170 175

Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Lys Ile Ser Ile Asp Arg Arg
180 185 190

Leu Gln Glu Ser Ile Tyr Gly Phe Gly Cys Gly Met Ser Gly Ala Trp
195 200 205

Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Leu Gln
210 215 220

His Asp Val Asp Leu Glu Thr Leu Pro Leu Met Ala Phe Asn Asn Ala
225 230 235 240

Val Thr Asp Arg Arg Lys Val Lys Pro Gly Ser Leu Gln Ala Leu Trp
245 250 255

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

Gly Leu Gly Trp Thr Thr Val Leu His Pro Arg His Ser Leu Arg Thr
275 280 285

Lys His Tyr Phe Glu Leu Leu Cys Met Ala Ala Arg Tyr Ala Ser Phe
290 295 300

Ala Ala Leu Phe Ala Pro Lys Tyr Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu
305 310 315 320

Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Val Gly Cys Asn Tyr Ile Phe Ile Asn Phe
325 330 335

Ser Val Ser His Thr His Leu Pro Val Ser Gly Ala Ser Glu Tyr Leu
340 345 350

His Trp Val Val Tyr Ser Ala Ile His Thr Thr Asn Ile Lys Ser Ser
355 360 365

Met Leu Cys Asp Trp Trp Met Ser Phe Leu Asn Phe Gln Ile Glu His
370 375 380

His Leu Phe Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Lys Ile Ile Ser Pro
385 390 395 400

Arg Val Lys Ala Leu Phe Glu Lys His Gly Leu Val Tyr Asp Val Arg
405 410 415

Pro Tyr Trp Gly Ala Met Ala Asp Thr Phe Lys Asn Leu Asn Asp Val
420 425 430

Gly Thr His Ala Ser His Ser Lys Ala His
435 440

<210> 23
<211> 804
<212> ADN
<213> Pyramimonas cordata

<400> 23
atggcgtcta ttgcgattcc ggctgcgctg gcagggactc ttggttatgt gacgtacaat 60

gtcgcaaacc cagatattcc tgcatccgag aaggtgcctg cttactttat gcaggtcgag 120

tattgggggc caacgattgg gaccatcggt tatcttctgt tcatctactt tggtaaacgg 180

attatgcaaa acaggagcca gccgtttggc ctgaagaacg ctatgctggt gtacaacttc 240

tatcagactt tcttcaactc gtactgcata tacctttttg tcacgtcgca ccgcgctcag 300

gggctgaaag tttggggaaa catccccgat atgactgcca acagctgggg gatctcacag 360

gtgatctggc tgcactacaa caacaagtac gttgagctgc tggacacgtt cttcatggtc 420

atgcgcaaga agtttgacca gctttcgttc ctgcacattt accatcatac cctgttgatc 480

tggtcttggt tcgtggtgat gaaattggag cccgttgggg actgctactt tggctctagc 540

gtcaacacgt ttgtgcacgt cattatgtac tcgtactatg gccttgccgc gctcggggtg 600

aattgcttct ggaagaagta cattacgcag attcagatgc tgcagttctg tatctgcgct 660

tcgcactcga tttataccgc ctatgtgcag aacaccgcgt tctggttgcc ttacttgcag 720

ctgtgggtga tggtgaacat gttcgtgttg ttcgccaact tctatcgcaa gcgctacaag 780

agcaagggtg ccaagaagca gtaa 804

<210> 24
<211> 807
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Khung đọc mở được tối ưu hóa bởi codon để biểu hiện 5 elongaza của Pyramimonas cordata ở thực vật (phiên bản 1)

<400> 24
atggcctcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat 60

gtggctaacc ctgatatccc agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcaggttgag 120

tactggggac ctactatcgg aactattgga tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt 180

atcatgcaga acagatctca acctttcgga ctcaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc 240

taccagacct tcttcaacag ctactgcatc tacctttcg ttacttctca tagggctcag 300

ggacttaagg tttggggaaa catccctgat atgactgcta actcttgggg aatctctcag 360

gttatctggc ttcactacaa caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatggtg 420

atgaggaaga agttcgacca gctttctttc cttcacatct accaccacac tcttctcatc 480

tggtcatggt tcgttgttat gaagcttgag cctgttggag attgctactt cggatcttct 540

gttaacacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt 600

aactgtttct ggaagaagta catcacccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct 660

tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aataccgctt tctggcttcc ttaccttcaa 720

ctctgggtta tggtgaacat gttcgttctc ttcgccaact tctaccgtaa gaggtacaag 780

tctaagggtg ctaagaagca gtgataa 807

<210> 25
<211> 267
<212> PRT
<213> Pyramimonas cordata

<400> 25

Met Ala Ser Ile Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu Gly Tyr
1 5 10 15

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

Pro Ala Tyr Phe Met Gln Val Glu Tyr Trp Gly Pro Thr Ile Gly Thr
35 40 45

Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Ile Tyr Phe Gly Lys Arg Ile Met Gln Asn
50 55 60

Arg Ser Gln Pro Phe Gly Leu Lys Asn Ala Met Leu Val Tyr Asn Phe
65 70 75 80

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Ser Tyr Cys Ile Tyr Leu Phe Val Thr Ser
85 90 95

His Arg Ala Gln Gly Leu Lys Val Trp Gly Asn Ile Pro Asp Met Thr
100 105 110

Ala Asn Ser Trp Gly Ile Ser Gln Val Ile Trp Leu His Tyr Asn Asn
115 120 125

Lys Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Phe Phe Met Val Met Arg Lys Lys
130 135 140

Phe Asp Gln Leu Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Leu Leu Ile
145 150 155 160

Trp Ser Trp Phe Val Val Met Lys Leu Glu Pro Val Gly Asp Cys Tyr
165 170 175

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

Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val Asn Cys Phe Trp Lys Lys Tyr Ile
195 200 205

Thr Gln Ile Gln Met Leu Gln Phe Cys Ile Cys Ala Ser His Ser Ile
210 215 220

Tyr Thr Ala Tyr Val Gln Asn Thr Ala Phe Trp Leu Pro Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Leu Trp Val Met Val Asn Met Phe Val Leu Phe Ala Asn Phe Tyr Arg
245 250 255

Lys Arg Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Lys Lys Gln
260 265

<210> 26
<211> 1344
<212> ADN
<213> Pavlova salina

<400> 26
atgcctccga gcgcggcgaa gcagatgggc gcgagcacgg gcgtgcatgc gggcgtcaca 60

gattcgtcgg ccttcacgcg caaggatgtc gccgacaggc cggacctcac gatcgtgggt 120

gacagcgtgt acgatgcgaa ggcgttccgc tccgagcatc cgggtggcgc gcactttgtg 180

tcgctgttcg gcgggcgcga tgccacggag gcgttcatgg agtaccaccg gcgcgcctgg 240

cccaagtcgc gcatgtcgcg cttccacgtc ggctctctgg catcgaccga ggagcccgtc 300

gccgccgatg agggctacct ccagctgtgc gctcgcatcg ccaagatggt gccgtcggtc 360

agcagcgggt tcgcgccggc gtcgtactgg gtgaaggccg ggctgatcct cggctccgcg 420

atcgcgctcg aggcgtacat gctgtacgcg ggcaagcgcc tgctcccgtc gatcgtgctc 480

gggtggctgt ttgcgctgat tggcctgaac atccagcacg atgccaacca cggcgcgctc 540

tccaagtcgg cctcggtcaa cctggcgctc gggttgtgcc aggactggat cggcgggagc 600

atgatcctct ggctgcagga gcacgttgtc atgcaccact tgcacaccaa cgacgttgac 660

aaggacccgg accagaaggc gcacggcgcc ctgcggctca agccgaccga cgcgtggagc 720

ccgatgcact ggctgcagca cctctacctg ctgcctgggg agacgatgta cgccttcaag 780

ctgctgtttc tcgacatcag cgagctggtg atgtggcggt gggagggcga gcccatcagc 840

aagctggccg ggtacctctt catgccctcg ctgctcctca agctcacctt ctgggcgcgc 900

tttgtcgcgc tgccgctgta cctcgcgccc agcgtgcaca cggcggtgtg catcgcggcg 960

acggtaatga cggggagctt ctacctcgcc ttcttcttct tcatctcgca caacttcgag 1020

ggcgtggcga gcgtcggacc ggacggcagc atcaccagca tgacgcgcgg cgcatccttc 1080

ctcaagcggc aggccgagac ctcgtccaac gtgggcggcc cgctgctcgc cacgctcaac 1140

ggcggcctca actaccaaat cgagcaccac ctcttcccca gggtgcacca cggcttctac 1200

cctcgcctcg cgccgttggt caaggcggag ctcgaggcgc gcggcattga gtacaagcac 1260

taccccacca tatggagcaa cctggcatcc acgctgaggc acatgtacgc gctcggccgc 1320

aggccgcgca gcaaggcgga gtga 1344

<210> 27
<211> 1347
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Khung đọc mở được tối ưu hóa bởi codon để biểu hiện 4 desaturaza của Pavlova salina ở thực vật (phiên bản 1)

<400> 27
atgccaccta gcgctgctaa gcaaatggga gcttctactg gtgttcatgc tggtgttact 60

gactcttctg ctttcaccag aaaggatgtt gctgatagac ctgatctcac catcgttgga 120

gattctgttt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctggtggtgc tcatttcgtt 180

tctttgttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccatag aagggcttgg 240
cctaagtcta gaatgtctag attccacgtt ggatctcttg cttctactga ggaacctgtt 300
gctgctgatg agggatacct tcaactttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtt 360
tcttctggat tcgctcctgc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct tggatctgct 420
atcgctcttg aggcttacat gctttacgct ggaaagagac ttctcccttc tatcgttctt 480
ggatggcttt tcgctcttat cggtcttaac atccagcatg atgctaacca tggtgctttg 540
tctaagtctg cttctgttaa ccttgctctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct 600
atgatccttt ggcttcaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacactaa cgatgttgat 660
aaggatcctg atcaaaaggc tcacggtgct cttagactca agcctactga tgcttggtca 720
cctatgcatt ggcttcagca tctttacctt ttgcctggtg agactatgta cgctttcaag 780
cttttgttcc tcgacatctc tgagcttgtt atgtggcgtt gggagggtga gcctatctct 840
aagcttgctg gatacctctt tatgccttct ttgcttctca agcttacctt ctgggctaga 900
ttcgttgctt tgcctcttta ccttgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgctgct 960
actgttatga ctggatcttt ctacctcgct ttcttcttct tcatctccca caacttcgag 1020
ggtgttgctt ctgttggacc tgatggatct atcacttcta tgactagagg tgctagcttc 1080
cttaagagac aagctgagac ttcttctaac gttggaggac ctcttcttgc tactcttaac 1140
ggtggactca actaccaaat tgagcatcac ttgttcccta gagttcacca tggattctac 1200
cctagacttg ctcctcttgt taaggctgag cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac 1260
taccctacta tctggtctaa ccttgcttct accctcagac atatgtacgc tcttggaaga 1320
aggcctagat ctaaggctga gtaatga 1347

<210> 28
<211> 447
<212> PRT
<213> Pavlova salina

<400> 28

Met Pro Pro Ser Ala Ala Lys Gln Met Gly Ala Ser Thr Gly Val His
1 5 10 15

Ala Gly Val Thr Asp Ser Ser Ala Phe Thr Arg Lys Asp Val Ala Asp
20 25 30

Arg Pro Asp Leu Thr Ile Val Gly Asp Ser Val Tyr Asp Ala Lys Ala
35 40 45

Phe Arg Ser Glu His Pro Gly Gly Ala His Phe Val Ser Leu Phe Gly
50 55 60

Gly Arg Asp Ala Thr Glu Ala Phe Met Glu Tyr His Arg Arg Ala Trp
65 70 75 80

Pro Lys Ser Arg Met Ser Arg Phe His Val Gly Ser Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Glu Glu Pro Val Ala Ala Asp Glu Gly Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Arg
100 105 110

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

Tyr Trp Val Lys Ala Gly Leu Ile Leu Gly Ser Ala Ile Ala Leu Glu
130 135 140

Ala Tyr Met Leu Tyr Ala Gly Lys Arg Leu Leu Pro Ser Ile Val Leu
145 150 155 160

Gly Trp Leu Phe Ala Leu Ile Gly Leu Asn Ile Gln His Asp Ala Asn
165 170 175

His Gly Ala Leu Ser Lys Ser Ala Ser Val Asn Leu Ala Leu Gly Leu
180 185 190

Cys Gln Asp Trp Ile Gly Gly Ser Met Ile Leu Trp Leu Gln Glu His
195 200 205

Val Val Met His His Leu His Thr Asn Asp Val Asp Lys Asp Pro Asp
210 215 220

Gln Lys Ala His Gly Ala Leu Arg Leu Lys Pro Thr Asp Ala Trp Ser
225 230 235 240

Pro Met His Trp Leu Gln His Leu Tyr Leu Leu Pro Gly Glu Thr Met
245 250 255

Tyr Ala Phe Lys Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ser Glu Leu Val Met Trp
260 265 270

Arg Trp Glu Gly Glu Pro Ile Ser Lys Leu Ala Gly Tyr Leu Phe Met
275 280 285

Pro Ser Leu Leu Leu Lys Leu Thr Phe Trp Ala Arg Phe Val Ala Leu
290 295 300

Pro Leu Tyr Leu Ala Pro Ser Val His Thr Ala Val Cys Ile Ala Ala
305 310 315 320

Thr Val Met Thr Gly Ser Phe Tyr Leu Ala Phe Phe Phe Phe Ile Ser
325 330 335

His Asn Phe Glu Gly Val Ala Ser Val Gly Pro Asp Gly Ser Ile Thr
340 345 350

Ser Met Thr Arg Gly Ala Ser Phe Leu Lys Arg Gln Ala Glu Thr Ser
355 360 365

Ser Asn Val Gly Gly Pro Leu Leu Ala Thr Leu Asn Gly Gly Leu Asn
370 375 380

Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Arg Val His His Gly Phe Tyr
385 390 395 400

Pro Arg Leu Ala Pro Leu Val Lys Ala Glu Leu Glu Ala Arg Gly Ile
405 410 415

Glu Tyr Lys His Tyr Pro Thr Ile Trp Ser Asn Leu Ala Ser Thr Leu
420 425 430

Arg His Met Tyr Ala Leu Gly Arg Arg Pro Arg Ser Lys Ala Glu
435 440 445

<210> 29
<211> 263
<212> PRT
<213> Isochrysis galbana

<400> 29

Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
65 70 75 80

Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe
130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly
145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr
165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro
180 185 190

Leu Ile Thr Ala Met Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu
195 200 205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys
210 215 220

Leu Phe Ser Trp Ala Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser
245 250 255

Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
260

<210> 30
<211> 801
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Khung đọc mở được tối ưu hóa bởi codon để biểu hiện 9 elongaza của Emiliania huxleyi ở thực vật

<400> 30
atgcttgata gagcttcatc tgatgctgct atttggagcg ctgtttctga tcctgagatc 60

cttatcggaa ccttctctta ccttttgctt aagcctctcc tcagaaactc tggacttgtg 120

gatgagagaa agggagctta ccgtacttct atgatctggt acaacgttgt tcttgctctt 180

ttctctgcta cctctttcta cgttactgct actgctcttg gatgggataa gggaactggt 240

gagtggctta gatctcttac tggtgattct cctcaacaac tttggcagtg cccttctaga 300

gtttgggaca gcaaactctt cttgtggact gctaaagcct tctactactc caagtacgtt 360

gagtaccttg atactgcttg gcttgttctc aagggaaaga aggtttcatt cctccaggga 420

ttccatcatt tcggtgctcc atgggatgtt taccttggaa tcaggcttaa gaacgaggga 480

gtttggatct tcatgttctt caacagcttc atccacactg ttatgtacac ttactacgga 540

cttactgctg ctggatacaa gatcagagga aagcctatca tcaccgctat gcaaatctct 600

caattcgttg gtggattcgt tcttgtgtgg gactacatca acgttccttg tttccatgct 660

gatgctggac aagttttctc ttgggtgttc aactacgctt atgtgggatc tgttttcctt 720

cttttctgcc acttcttcta catggacaac attgctaagg ctaaggctaa aaaggctgtt 780

gctaccagaa aggctctttg a 801

<210> 31
<211> 266
<212> PRT
<213> Emiliania huxleyi

<400> 31

Met Leu Asp Arg Ala Ser Ser Asp Ala Ala Ile Trp Ser Ala Val Ser
1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Arg Lys Gly Ala Tyr Arg
35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Val Leu Ala Leu Phe Ser Ala Thr
50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Lys Gly Thr Gly
65 70 75 80

Glu Trp Leu Arg Ser Leu Thr Gly Asp Ser Pro Gln Gln Leu Trp Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Arg Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Leu Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Lys Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe
130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu Lys Asn Glu Gly
145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Val Met Tyr
165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Lys Pro
180 185 190

Ile Ile Thr Ala Met Gln Ile Ser Gln Phe Val Gly Gly Phe Val Leu
195 200 205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe His Ala Asp Ala Gly Gln
210 215 220

Val Phe Ser Trp Val Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Met Asp Asn Ile Ala Lys Ala Lys Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Val Ala Thr Arg Lys Ala Leu
260 265

<210> 32
<211> 819
<212> ADN
<213> Pavlova pinguis

<400> 32
atggttgcgc cacccatcac gctcgagtgg ctgctttcgc cgaagctcaa ggatgcagtg 60

ttcggtgggg aggtgctcta cttctccatt gcctacctgt ttcttgcgcc cattttgaag 120

cgcaccccgt tggtggacac gcggaagggc gcgtataaga gtggtatgat cgcgtacaac 180

gtgatcatgt gcgtgttctc gctggtgtgc ttcatctgcc agctcgcagc cctgggctat 240

gacatgggct acttgcagtg ggtgcgtgac ctcacagggg acgagattgt ccccctctac 300

caggacgtgt ccccgtcccc cgccttctcc aacaagctct tcaagtattc gtctattgcc 360

ttccactact ccaagtatgt tgagtacatg gacaccgcat ggctggtgat gaagggcaag 420

cccgtgtcct tgctccaggg cttccaccac tttggcgccg cctgggacac ctactttggc 480

atcaccttcc agaacgaggg catctacgtg ttcgtggtgc tcaacgcctt catccacacg 540

atcatgtacg catactacgc ggccactgcg gcgggtctca agttctcact gaagttcgtc 600

atcacgctca tgcagatcac ccaattcaac gtgggcttcg taatggtgta tcactacatc 660

accctggagt acttccgcaa ctcaccggag ctcgtcttct cctacctttt caactatgcg 720

tacgtctgca cggttctcct cctcttcatg cagttcttct acatggacaa ctttggcaag 780

aagaaggccg ctgccgccgc gggcaagaag aagaagtag 819

<210> 33
<211> 272
<212> PRT
<213> Pavlova pinguis

<400> 33

Met Val Ala Pro Pro Ile Thr Leu Glu Trp Leu Leu Ser Pro Lys Leu
1 5 10 15

Lys Asp Ala Val Phe Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser Ile Ala Tyr
20 25 30

Leu Phe Leu Ala Pro Ile Leu Lys Arg Thr Pro Leu Val Asp Thr Arg
35 40 45

Lys Gly Ala Tyr Lys Ser Gly Met Ile Ala Tyr Asn Val Ile Met Cys
50 55 60

Val Phe Ser Leu Val Cys Phe Ile Cys Gln Leu Ala Ala Leu Gly Tyr
65 70 75 80

Asp Met Gly Tyr Leu Gln Trp Val Arg Asp Leu Thr Gly Asp Glu Ile
85 90 95

Val Pro Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe Ser Asn Lys
100 105 110

Leu Phe Lys Tyr Ser Ser Ile Ala Phe His Tyr Ser Lys Tyr Val Glu
115 120 125

Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Met Lys Gly Lys Pro Val Ser Leu
130 135 140

Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr Tyr Phe Gly
145 150 155 160

Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Ile Tyr Val Phe Val Val Leu Asn Ala
165 170 175

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

Leu Lys Phe Ser Leu Lys Phe Val Ile Thr Leu Met Gln Ile Thr Gln
195 200 205

Phe Asn Val Gly Phe Val Met Val Tyr His Tyr Ile Thr Leu Glu Tyr
210 215 220

Phe Arg Asn Ser Pro Glu Leu Val Phe Ser Tyr Leu Phe Asn Tyr Ala
225 230 235 240

Tyr Val Cys Thr Val Leu Leu Leu Phe Met Gln Phe Phe Tyr Met Asp
245 250 255

Asn Phe Gly Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Lys Lys Lys Lys
260 265 270

<210> 34
<211> 840
<212> ADN
<213> Pavlova salina

<400> 34
atggcgactg aagggatgcc ggcgataacg ctggactggc tgctctcgcc cgggctgaag 60

gatgccgtaa ttggcgggga ggtgctctac ttttcgcttg ggtatctgct gctcgagccc 120

atcctcaagc gctcaccgtt tgtggacaag cgcaagggcg cataccgcaa cggcatgatc 180

gcgtacaaca tcctcatgtg cggtttctcg ctggtatgct tcgtgtgcca gatggcggcg 240

ctcggccttg atcgcggcca cctgcagttt gtccgcgacc tcacgggcga cagcgtggtg 300

cagctctacc aggacgtgag cccatcccct gcattcgcga acaagctctt ccggtactca 360

gcggtggcgt tccactactc aaagtacgtg gagtacatgg acacagcgtg gcttgtgctg 420

aagggcaagc ccgtctcgtt cctgcagggc ttccaccact tcggcgccgc gtgggacacc 480

tactttggca tcacgtttca gaacgagggc acctacgtct ttgtgctgct caacgcattc 540

atccacacaa tcatgtacac ctactacggc gcgacggcag cgggcatcaa aatctcgatg 600

aagccgctga tcaccctcat gcagatcacg cagttcctgc tgggcttcgc gctcgtctac 660

ccgtacattg acctcggcta cttccgtgcg tcgcccgagc tcgtgtggag ctacctgttc 720

aactatgcgt acgtactcat ggtgctcttc ctcttcatgc gcttcttcta ccacgacaac 780

tttagcaagc acaagccaat ctcgcgcatc gactccagca accgcatgaa aaccgagtag 840

<210> 35
<211> 279
<212> PRT
<213> Pavlova salina

<400> 35

Met Ala Thr Glu Gly Met Pro Ala Ile Thr Leu Asp Trp Leu Leu Ser
1 5 10 15

Pro Gly Leu Lys Asp Ala Val Ile Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser
20 25 30

Leu Gly Tyr Leu Leu Leu Glu Pro Ile Leu Lys Arg Ser Pro Phe Val

35 40 45

Asp Lys Arg Lys Gly Ala Tyr Arg Asn Gly Met Ile Ala Tyr Asn Ile
50 55 60

Leu Met Cys Gly Phe Ser Leu Val Cys Phe Val Cys Gln Met Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gly Leu Asp Arg Gly His Leu Gln Phe Val Arg Asp Leu Thr Gly
85 90 95

Asp Ser Val Val Gln Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe
100 105 110

Ala Asn Lys Leu Phe Arg Tyr Ser Ala Val Ala Phe His Tyr Ser Lys
115 120 125

Tyr Val Glu Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Leu Lys Gly Lys Pro
130 135 140

Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr
145 150 155 160

Tyr Phe Gly Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Thr Tyr Val Phe Val Leu
165 170 175

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

Ala Ala Gly Ile Lys Ile Ser Met Lys Pro Leu Ile Thr Leu Met Gln
195 200 205

Ile Thr Gln Phe Leu Leu Gly Phe Ala Leu Val Tyr Pro Tyr Ile Asp
210 215 220

Leu Gly Tyr Phe Arg Ala Ser Pro Glu Leu Val Trp Ser Tyr Leu Phe
225 230 235 240

Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Met Val Leu Phe Leu Phe Met Arg Phe Phe
245 250 255

Tyr His Asp Asn Phe Ser Lys His Lys Pro Ile Ser Arg Ile Asp Ser
260 265 270

Ser Asn Arg Met Lys Thr Glu
275

<210> 36
<211> 1284
<212> ADN
<213> Pavlova salina

<400> 36
atgggacgcg gcggagacag cagtgggcag gcgcatccgg cggcggagct ggcggtcccg 60

agcgaccgcg cggaggtgag caacgctgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc 120

aagcgcgtgg atgtgaccaa gttccaacgc acgcacccgg gtggtagcaa ggtcttccgg 180

atcttccagg accgcgatgc gacggagcag ttcgagtcct accactcgaa gcgcgcgatc 240

aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgctc ccgccgacac gcccttgccc 300

tcccagtcac cgatggggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt 360

tactacgatc catgcccgct cgatgagctg ttcaagctca gcctcgtgct cctcccgacc 420

tttgcgggca tgtacatgct caaggcgggc gtcggctccc cgctctgcgg cgccctcatg 480

gtgagctttg gctggtacct cgatggctgg ctcgcgcacg actatctgca ccactccgtc 540

ttcaaggggt ccgtcgcacg caccgtcggg tggaacaacg cggcgggcta cttcctcggc 600
ttcgtgcagg ggtatgcggt cgagtggtgg cgcgcgcggc ataacacgca ccacgtgtgc 660
accaatgagg acggctcgga ccccgacatc aaaacggcgc cgctgctcat atacgtgcgc 720
aacaagccga gcatcgccaa gcgcctgaac gccttccagc gctaccagca gtactactat 780
gtgccggtga tggcaatcct cgacctgtac tggcggctcg agtcgatcgc ctacgtcgcg 840
atgcgcctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctcgcactcg tcgcgcacta cgccatcgtc 900
gcgtgggtct ttgcgggcaa ctaccacctg ctcccgctcg tgacggttct gcgcgggttt 960
ggcactggga tcaccgtttt cgcgacgcac tacggtgagg acattctcga cgcggaccag 1020
gtgcgtcaca tgacgctcgt cgagcagacg gcactcacct cgcgcaacat ctcgggcggc 1080
tggctcgtga acgtgctcac cggcttcatc tcactgcaga cggagcacca cctgttcccg 1140
atgatgccaa ccggcaacct catgactatc cagcccgagg tgcgcgcctt cttcaagaag 1200
cacggacttg agtaccgcga gggcaacctc attgagtgcg tgcggcagaa catccgtgcg 1260
cttgcattcg agcacctgct ttga 1284

<210> 37
<211> 427
<212> PRT
<213> Pavlova salina

<400> 37

Met Gly Arg Gly Gly Asp Ser Ser Gly Gln Ala His Pro Ala Ala Glu
1 5 10 15

Leu Ala Val Pro Ser Asp Arg Ala Glu Val Ser Asn Ala Asp Ser Lys
20 25 30

Ala Leu His Ile Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe
35 40 45

Gln Arg Thr His Pro Gly Gly Ser Lys Val Phe Arg Ile Phe Gln Asp
50 55 60

Arg Asp Ala Thr Glu Gln Phe Glu Ser Tyr His Ser Lys Arg Ala Ile
65 70 75 80

Lys Met Met Glu Gly Met Leu Lys Lys Ser Glu Asp Ala Pro Ala Asp
85 90 95

Thr Pro Leu Pro Ser Gln Ser Pro Met Gly Lys Asp Phe Lys Ala Met
100 105 110

Ile Glu Arg His Val Ala Ala Gly Tyr Tyr Asp Pro Cys Pro Leu Asp
115 120 125

Glu Leu Phe Lys Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Thr Phe Ala Gly Met
130 135 140

Tyr Met Leu Lys Ala Gly Val Gly Ser Pro Leu Cys Gly Ala Leu Met
145 150 155 160

Val Ser Phe Gly Trp Tyr Leu Asp Gly Trp Leu Ala His Asp Tyr Leu
165 170 175

His His Ser Val Phe Lys Gly Ser Val Ala Arg Thr Val Gly Trp Asn
180 185 190

Asn Ala Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Phe Val Gln Gly Tyr Ala Val Glu
195 200 205

Trp Trp Arg Ala Arg His Asn Thr His His Val Cys Thr Asn Glu Asp
210 215 220

Gly Ser Asp Pro Asp Ile Lys Thr Ala Pro Leu Leu Ile Tyr Val Arg
225 230 235 240

Asn Lys Pro Ser Ile Ala Lys Arg Leu Asn Ala Phe Gln Arg Tyr Gln
245 250 255

Gln Tyr Tyr Tyr Val Pro Val Met Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Trp Arg
260 265 270

Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Val Ala Met Arg Leu Pro Lys Met Leu Pro
275 280 285

Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Val Ala Trp Val Phe
290 295 300

Ala Gly Asn Tyr His Leu Leu Pro Leu Val Thr Val Leu Arg Gly Phe
305 310 315 320

Gly Thr Gly Ile Thr Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu Asp Ile Leu
325 330 335

Asp Ala Asp Gln Val Arg His Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Leu
340 345 350

Thr Ser Arg Asn Ile Ser Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly
355 360 365

Phe Ile Ser Leu Gln Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr
370 375 380

Gly Asn Leu Met Thr Ile Gln Pro Glu Val Arg Ala Phe Phe Lys Lys
385 390 395 400

His Gly Leu Glu Tyr Arg Glu Gly Asn Leu Ile Glu Cys Val Arg Gln
405 410 415

Asn Ile Arg Ala Leu Ala Phe Glu His Leu Leu
420 425

<210> 38
<211> 116
<212> PRT
<213> Virut xoăn vàng lá cà chua

<400> 38

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ser Val Glu Glu Thr Tyr
20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
35 40 45

Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
65 70 75 80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr
85 90 95

Ile Met Asp Val Gln Ala His Val Pro Glu Ala Gln Asn Ile Gln Asn
100 105 110

Val Ser Lys Pro

115

<210> 39
<211> 351
<212> ADN
<213> Virut xoăn vàng lá cà chua

<400> 39
atgtgggatc cacttctaaa tgaatttcct gaatctgttc acggatttcg ttgtatgtta 60

gctattaaat atttgcagtc cgttgaggaa acttacgagc ccaatacatt gggccacgat 120

ttaattaggg atcttatatc tgttgtaagg gcccgtgact atgtcgaagc gaccaggcga 180

tataatcatt tccacgcccg cctcgaaggt tcgccgaagg ctgaacttcg acagcccata 240

cagcagccgt gctgctgtcc ccattgtcca aggcacaaac aagcgacgat catggacgta 300

caggcccatg taccggaagc ccagaatata cagaatgtat cgaagccctg a 351

<210> 40
<211> 389
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 40

Met Val Ile Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Leu Leu Phe Phe
1 5 10 15

Ile Ser Gly Leu Ala Val Asn Leu Phe Gln Ala Val Cys Tyr Val Leu
20 25 30

Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val Val
35 40 45

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
50 55 60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
65 70 75 80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
85 90 95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
100 105 110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
115 120 125

Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
130 135 140

Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Ser Asp Phe
145 150 155 160

Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
165 170 175

Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
180 185 190

Pro Ile Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
195 200 205

Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
210 215 220

Val Thr Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
225 230 235 240

Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
245 250 255

Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
260 265 270

Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
275 280 285

Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
290 295 300

Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ala Cys Val Leu Thr Leu Gly Ala Ile
305 310 315 320

Lys Phe Leu His Trp Ala Gln Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Thr
325 330 335

Ile Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
340 345 350

Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
355 360 365

Ala Lys Pro Lys Asp Asn His His Pro Glu Ser Ser Ser Gln Thr Glu
370 375 380

Thr Glu Lys Glu Lys
385

<210> 41
<211> 281
<212> PRT
<213> Limnanthes alba

<400> 41

Met Ala Lys Thr Arg Thr Ser Ser Leu Arg Asn Arg Arg Gln Leu Lys
1 5 10 15

Thr Ala Val Ala Ala Thr Ala Asp Asp Asp Lys Asp Gly Ile Phe Met
20 25 30

Val Leu Leu Ser Cys Phe Lys Ile Phe Val Cys Phe Ala Ile Val Leu
35 40 45

Ile Thr Ala Val Ala Trp Gly Leu Ile Met Val Leu Leu Leu Pro Trp
50 55 60

Pro Tyr Met Arg Ile Arg Leu Gly Asn Leu Tyr Gly His Ile Ile Gly
65 70 75 80

Gly Leu Val Ile Trp Leu Tyr Gly Ile Pro Ile Glu Ile Gln Gly Ser
85 90 95

Glu His Thr Lys Lys Arg Ala Ile Tyr Ile Ser Asn His Ala Ser Pro
100 105 110

Ile Asp Ala Phe Phe Val Met Trp Leu Ala Pro Ile Gly Thr Val Gly
115 120 125

Val Ala Lys Lys Glu Val Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Leu Tyr
130 135 140

Thr Leu Ala His His Ile Arg Ile Asp Arg Ser Asn Pro Ala Ala Ala
145 150 155 160

Ile Gln Ser Met Lys Glu Ala Val Arg Val Ile Thr Glu Lys Asn Leu
165 170 175

Ser Leu Ile Met Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Gly Asp Gly Arg Leu

180 185 190

Leu Pro Phe Lys Lys Gly Phe Val His Leu Ala Leu Gln Ser His Leu
195 200 205

Pro Ile Val Pro Met Ile Leu Thr Gly Thr His Leu Ala Trp Arg Lys
210 215 220

Gly Thr Phe Arg Val Arg Pro Val Pro Ile Thr Val Lys Tyr Leu Pro
225 230 235 240

Pro Ile Asn Thr Asp Asp Trp Thr Val Asp Lys Ile Asp Asp Tyr Val
245 250 255

Lys Met Ile His Asp Ile Tyr Val Arg Asn Leu Pro Ala Ser Gln Lys
260 265 270

Pro Leu Gly Ser Thr Asn Arg Ser Lys
275 280

<210> 42
<211> 303
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 42

Met Ser Val Ile Gly Arg Phe Leu Tyr Tyr Leu Arg Ser Val Leu Val
1 5 10 15

Val Leu Ala Leu Ala Gly Cys Gly Phe Tyr Gly Val Ile Ala Ser Ile
20 25 30

Leu Cys Thr Leu Ile Gly Lys Gln His Leu Ala Gln Trp Ile Thr Ala
35 40 45

Arg Cys Phe Tyr His Val Met Lys Leu Met Leu Gly Leu Asp Val Lys
50 55 60

Val Val Gly Glu Glu Asn Leu Ala Lys Lys Pro Tyr Ile Met Ile Ala
65 70 75 80

Asn His Gln Ser Thr Leu Asp Ile Phe Met Leu Gly Arg Ile Phe Pro
85 90 95

Pro Gly Cys Thr Val Thr Ala Lys Lys Ser Leu Lys Tyr Val Pro Phe
100 105 110

Leu Gly Trp Phe Met Ala Leu Ser Gly Thr Tyr Phe Leu Asp Arg Ser
115 120 125

Lys Arg Gln Glu Ala Ile Asp Thr Leu Asn Lys Gly Leu Glu Asn Val
130 135 140

Lys Lys Asn Lys Arg Ala Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Thr Ser Glu Leu Thr Met Leu Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe His
165 170 175

Leu Ala Gln Gln Gly Lys Ile Pro Ile Val Pro Val Val Val Ser Asn
180 185 190

Thr Ser Thr Leu Val Ser Pro Lys Tyr Gly Val Phe Asn Arg Gly Cys
195 200 205

Met Ile Val Arg Ile Leu Lys Pro Ile Ser Thr Glu Asn Leu Thr Lys
210 215 220

Asp Lys Ile Gly Glu Phe Ala Glu Lys Val Arg Asp Gln Met Val Asp
225 230 235 240

Thr Leu Lys Glu Ile Gly Tyr Ser Pro Ala Ile Asn Asp Thr Thr Leu
245 250 255

Pro Pro Gln Ala Ile Glu Tyr Ala Ala Leu Gln His Asp Lys Lys Val
260 265 270

Asn Lys Lys Ile Lys Asn Glu Pro Val Pro Ser Val Ser Ile Ser Asn
275 280 285

Asp Val Asn Thr His Asn Glu Gly Ser Ser Val Lys Lys Met His
290 295 300

<210> 43
<211> 373
<212> PRT
<213> Micromonas pusilla

<400> 43

Met Thr Pro Tyr Gln Trp Phe Asn Val Val Ser Ser Leu Gly Tyr Val
1 5 10 15

Leu Phe Thr Ala Thr Thr Ser Thr Val Thr Met Leu Val Pro Ala Ile
20 25 30

Ile Leu Leu Arg Pro Val Ser Ala Asn Leu Tyr Ala Arg Cys Thr Ser
35 40 45

Trp Ile Phe Ala Cys Trp Trp Thr Ser Cys Leu Phe Ile Thr Glu Arg
50 55 60

Leu Asn Gly Val Lys Val Arg Val Thr Gly Asp Ala Leu Pro Leu Asn
65 70 75 80

Ala Pro Leu Leu Ile Met Ser Asn His Lys Cys Asn Leu Asp Trp Met
85 90 95

Phe Leu Trp Ser Ser Ala Ile Arg Thr Gly Ser Met Phe His Val Gly
100 105 110

Val Phe Lys Ala Val Ala Lys Ser Glu Ile Arg Val Ile Pro Ile Phe
115 120 125

Gly Trp Gly Cys Lys Leu Asn Gly Phe Ala Tyr Val Arg Arg Arg Trp
130 135 140

Ser Ser Asp Ala Ser His Leu Thr Ser Trp Ile Gln Ser Gln Ile Arg
145 150 155 160

Arg Arg Leu Asn Ala Asn Trp Thr Leu Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg
165 170 175

Tyr Thr Asp Arg Asn Lys Glu Arg Ser Asp Leu Ser Cys Ala Lys Asp
180 185 190

Gly Leu Glu Pro Met Ala Gly Glu Ile Leu Arg Pro Arg Thr Lys Gly
195 200 205

Leu Ala Leu Leu Leu Arg Glu Ser Ala Lys Gly Gly Gly Tyr Tyr Arg
210 215 220

Lys Ile Val Asp Met Thr Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Asp Gly Lys Pro
225 230 235 240

Leu Lys Gly Ala Ala Leu Gly Thr Arg Cys Phe Gly Gln Leu Ala Lys
245 250 255

Gly Gln Leu Pro Val Ala Thr Cys His Val His Phe Asp Val Phe Ser
260 265 270

His Lys Asp Val Pro Ala Gly Glu Asp Glu Asp Glu Val Glu Ala Trp
275 280 285

Val Trp Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ala Asn Met Leu Glu Ala Cys Ala
290 295 300

Ser Ala Gly Gln Phe Glu Gly Val Arg Glu Trp Ser Thr Ser Gly Thr
305 310 315 320

Ala Val Pro Leu Lys Thr Gln Thr Ala Leu Arg Cys Phe Phe Val Leu
325 330 335

Gln Gly Leu Val Cys Val Gly Val Ala Cys Ser Ser Thr Ala Phe Leu
340 345 350

Ala Tyr Val Ala Cys Ala Ala Val Gly Ala Ala Val Ile Ala Gln Thr
355 360 365

Asp Pro Ala Trp Trp
370

<210> 44
<211> 314
<212> PRT
<213> Mortierella alpina

<400> 44

Met Ser Ile Gly Ser Ser Asn Pro Val Leu Leu Ala Ala Ile Pro Phe
1 5 10 15

Val Tyr Leu Phe Val Leu Pro Arg Val Leu Ala Phe Leu Pro Gln Lys
20 25 30

Ala Gln Phe Leu Ala Lys Cys Ile Val Val Leu Ile Ala Thr Leu Ile
35 40 45

Met Ser Val Ala Gly Cys Phe Ile Ser Ile Val Cys Ala Leu Leu Asp
50 55 60

Lys Arg Tyr Val Ile Asn Tyr Val Val Ser Arg Leu Phe Ser Phe Leu
65 70 75 80

Ala Ala Arg Pro Cys Gly Val Thr Tyr Lys Ile Val Gly Glu Glu His
85 90 95

Leu Asp Lys Tyr Pro Ala Ile Val Val Cys Asn His Gln Ser Ser Met
100 105 110

Asp Met Met Val Leu Gly Arg Val Phe Pro Lys His Cys Val Val Met
115 120 125

Ala Lys Lys Glu Leu Leu Tyr Phe Pro Phe Leu Gly Met Phe Met Lys
130 135 140

Leu Ser Asn Ala Ile Phe Ile Asp Arg Lys Asn His Lys Lys Ala Ile
145 150 155 160

Glu Ser Thr Thr Gln Ala Val Ala Asp Met Lys Lys His Asn Ser Gly
165 170 175

Ile Trp Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Leu Asp Lys Ala Asp
180 185 190

Leu Leu Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe His Leu Ala Ile Gln Ala Gln
195 200 205

Leu Pro Ile Leu Pro Ile Ile Ser Gln Gly Tyr Ser His Ile Tyr Asp
210 215 220

Ser Ser Lys Arg Tyr Phe Pro Gly Gly Glu Leu Glu Ile Arg Val Leu
225 230 235 240

Glu Pro Ile Pro Thr Thr Gly Leu Thr Thr Asp Asp Val Asn Asp Leu
245 250 255

Met Asp Lys Thr Arg Asn Leu Met Leu Lys His Leu Lys Glu Met Asp
260 265 270

Ser Gln Tyr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Asn Gly Ser Thr His Ile Asp
275 280 285

Ala Asp Ile Ala Lys Ser Thr Ala Thr Ser Ile Gly Asn Thr Asp Asp
290 295 300

Ala Ile Thr Lys Arg Arg Thr Pro Lys Glu
305 310

<210> 45
<211> 391
<212> PRT
<213> Braccisa napus

<400> 45

Met Ala Met Ala Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe
1 5 10 15

Phe Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Cys Tyr Val
20 25 30

Leu Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val
35 40 45

Val Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp
50 55 60

Ala Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asp Glu Thr Phe Asn Arg
65 70 75 80

Met Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile
85 90 95

Asp Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly
100 105 110

Ser Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile
115 120 125

Gly Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp
130 135 140

Ala Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp
145 150 155 160

Phe Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe
165 170 175

Thr Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Gln
180 185 190

Leu Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val
195 200 205

Ser Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met
210 215 220

Thr Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu
225 230 235 240

Phe Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser
245 250 255

Met Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg

260 265 270

Asp Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala
275 280 285

Asp Thr Phe Pro Gly Gln Lys Glu His Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys
290 295 300

Ser Leu Ala Val Val Val Ser Trp Ala Cys Leu Leu Thr Leu Gly Ala
305 310 315 320

Met Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Leu Lys Gly Ile
325 330 335

Ala Leu Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile
340 345 350

Leu Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Ala
355 360 365

Pro Ala Lys Pro Lys Asp Lys His Gln Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
370 375 380

Glu Val Glu Glu Lys Gln Lys
385 390

<210> 46
<211> 390
<212> PRT
<213> Braccisa napus

<400> 46

Met Ala Met Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe Phe
1 5 10 15

Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Ile Cys Tyr Val Leu
20 25 30

Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val Val
35 40 45

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
50 55 60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
65 70 75 80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
85 90 95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
100 105 110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
115 120 125

Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
130 135 140

Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp Phe
145 150 155 160

Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
165 170 175

Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
180 185 190

Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
195 200 205

Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
210 215 220

Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
225 230 235 240

Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
245 250 255

Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
260 265 270

Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
275 280 285

Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
290 295 300

Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ser Cys Leu Leu Ile Leu Gly Ala Met
305 310 315 320

Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Ala
325 330 335

Phe Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
340 345 350

Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
355 360 365

Ala Lys Pro Lys Asp Asn His Asn Asp Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
370 375 380

Glu Val Glu Lys Gln Lys
385 390

<210> 47
<211> 361
<212> PRT
<213> Phytophthora infestans

<400> 47

Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Lys Asp Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Phe Gly
35 40 45

Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu
50 55 60

Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gln Gly Ile Val Phe
65 70 75 80

Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser
85 90 95

Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Val Gly Thr Phe Met His Ser Leu
100 105 110

Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His
115 120 125

Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg
130 135 140

Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly

145 150 155 160

Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val
165 170 175

Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala
180 185 190

Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile
195 200 205

Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr
210 215 220

Gly Pro Val Phe Val Phe Gly Ser Met Leu Val Ile Thr Thr Phe Leu
225 230 235 240

His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr
245 250 255

Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu
260 265 270

Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu
275 280 285

Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe
290 295 300

His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile
305 310 315 320

Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val
325 330 335

Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr
340 345 350

Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr
355 360

<210> 48
<211> 418
<212> PRT
<213> Thalassiosira pseudonana

<400> 48

Met Tyr Arg Leu Thr Ser Thr Phe Leu Ile Ala Leu Ala Phe Ser Ser
1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Phe Ser Pro Gln Arg Pro Pro Arg Thr Ile Thr Lys
20 25 30

Ser Lys Val Gln Ser Thr Val Leu Pro Ile Pro Thr Lys Asp Asp Leu
35 40 45

Asn Phe Leu Gln Pro Gln Leu Asp Glu Asn Asp Leu Tyr Leu Asp Asp
50 55 60

Val Asn Thr Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ile Met Lys Met Leu Pro Lys
65 70 75 80

Glu Thr Phe Asn Ile Asp Thr Ala Thr Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Met
85 90 95

Asp Met Ala Ala Val Val Ser Ser Met Thr Leu Leu Asn Ala Ile Val
100 105 110

Thr Ser Asp Gln Tyr His Ala Leu Pro Leu Pro Leu Gln Ala Ala Thr
115 120 125

Val Ile Pro Phe Gln Leu Leu Ala Gly Phe Ala Met Trp Cys Met Trp
130 135 140

Cys Ile Gly His Asp Ala Gly His Ser Thr Val Ser Lys Thr Lys Trp
145 150 155 160

Ile Asn Arg Val Val Gly Glu Val Ala His Ser Val Val Cys Leu Thr
165 170 175

Pro Phe Val Pro Trp Gln Met Ser His Arg Lys His His Leu Asn His
180 185 190

Asn His Ile Glu Lys Asp Tyr Ser His Lys Trp Tyr Ser Arg Asp Glu
195 200 205

Phe Asp Asp Ile Pro Gln Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Tyr Asn Pro Arg
210 215 220

Met Met Gln Leu Pro Phe Leu Tyr Phe Met Tyr Leu Ala Leu Gly Ile
225 230 235 240

Pro Asp Gly Gly His Val Val Phe Tyr Gly Arg Met Trp Glu Gly Val
245 250 255

Ser Leu Gln Lys Lys Phe Asp Ala Ala Ile Ser Val Ala Val Ser Cys
260 265 270

Ala Thr Ala Gly Ser Leu Trp Met Asn Met Gly Thr Ala Asp Phe Thr
275 280 285

Val Val Cys Met Val Pro Trp Leu Val Leu Ser Trp Trp Leu Phe Met
290 295 300

Val Thr Tyr Leu Gln His His Ser Glu Asp Gly Lys Leu Tyr Thr Asp
305 310 315 320

Glu Thr Phe Thr Phe Glu Lys Gly Ala Phe Glu Thr Val Asp Arg Ser
325 330 335

Tyr Gly Lys Leu Ile Asn Arg Met Ser His His Met Met Asp Gly His
340 345 350

Val Val His His Leu Phe Phe Glu Arg Val Pro His Tyr Arg Leu Glu
355 360 365

Ala Ala Thr Glu Ala Leu Val Lys Gly Met Asp Glu Thr Gly Gln Lys
370 375 380

His Leu Tyr Lys Tyr Ile Asp Thr Pro Asp Phe Asn Ala Glu Ile Val
385 390 395 400

Asn Gly Phe Arg Asp Asn Trp Phe Leu Val Glu Glu Glu Asn Ile Lys
405 410 415

Arg Glu

<210> 49
<211> 363
<212> PRT
<213> Pythium irregulare

<400> 49

Met Ala Ser Thr Ser Ala Ala Gln Asp Ala Ala Pro Tyr Glu Phe Pro
1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Ile Lys Arg Ala Leu Pro Ser Glu Cys Phe Glu Ala
20 25 30

Ser Val Pro Leu Ser Leu Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser Leu Ala Leu Ala

35 40 45

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

Gln Ala Asn Ala Leu Leu Asp Ala Thr Leu Cys Thr Gly Tyr Val Leu
65 70 75 80

Leu Gln Gly Ile Val Phe Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Cys
85 90 95

Gly His Gly Ala Phe Ser Arg Ser His Val Leu Asn Phe Ser Val Gly
100 105 110

Thr Leu Met His Ser Ile Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu
115 120 125

Ser His Arg His His His Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Lys Asp Glu
130 135 140

Ile Phe Tyr Pro Gln Arg Glu Ala Asp Ser His Pro Val Ser Arg His
145 150 155 160

Leu Val Met Ser Leu Gly Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Leu Phe Ala Gly
165 170 175

Phe Pro Pro Arg Thr Met Asn His Phe Asn Pro Trp Glu Ala Met Tyr
180 185 190

Val Arg Arg Val Ala Ala Val Ile Ile Ser Leu Gly Val Leu Phe Ala
195 200 205

Phe Ala Gly Leu Tyr Ser Tyr Leu Thr Phe Val Leu Gly Phe Thr Thr
210 215 220

Met Ala Ile Tyr Tyr Phe Gly Pro Leu Phe Ile Phe Ala Thr Met Leu
225 230 235 240

Val Val Thr Thr Phe Leu His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr
245 250 255

Ala Asp Ser Glu Trp Thr Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp
260 265 270

Arg Ser Tyr Gly Ala Leu Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr
275 280 285

His Gln Ile His His Leu Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Asn
290 295 300

Asp Ala Thr Ala Ala Phe Ala Lys Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys
305 310 315 320

Asn Ala Ala Pro Ile Ile Pro Thr Phe Phe Arg Met Ala Ala Met Tyr
325 330 335

Ala Lys Tyr Gly Val Val Asp Thr Asp Ala Lys Thr Phe Thr Leu Lys
340 345 350

Glu Ala Lys Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Ser
355 360

<210> 50
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<400> 50
gcgaagcaca tcgagtca 18

<210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<400> 51
ggttgaggtg gtagctgagg 20

<210> 52
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = Hex

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> N = Zen

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> N = 3IABkFQ

<400> 52
ntctctacnc cgtctcacat gacgcn 26

<210> 53
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<400> 53
atacaagcac ggtggatgg 19

<210> 54
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<400> 54
tggtctaaca ggtctaggag ga 22

<210> 55
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = FAM

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> N = Zen

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> N = 3IABkFQ

<400> 55
ntggcaaaga ngatttcgag cttcctgcn 29

<210> 56
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<400> 56
caagcaccgt agtaagagag ca 22

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<400> 57
cagacagcct gaggttagca 20

<210> 58
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = FAM

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> N = Zen

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> N = 3IABkFQ

<400> 58
ntccccactt ncttagcgaa aggaacgan 29

1/4

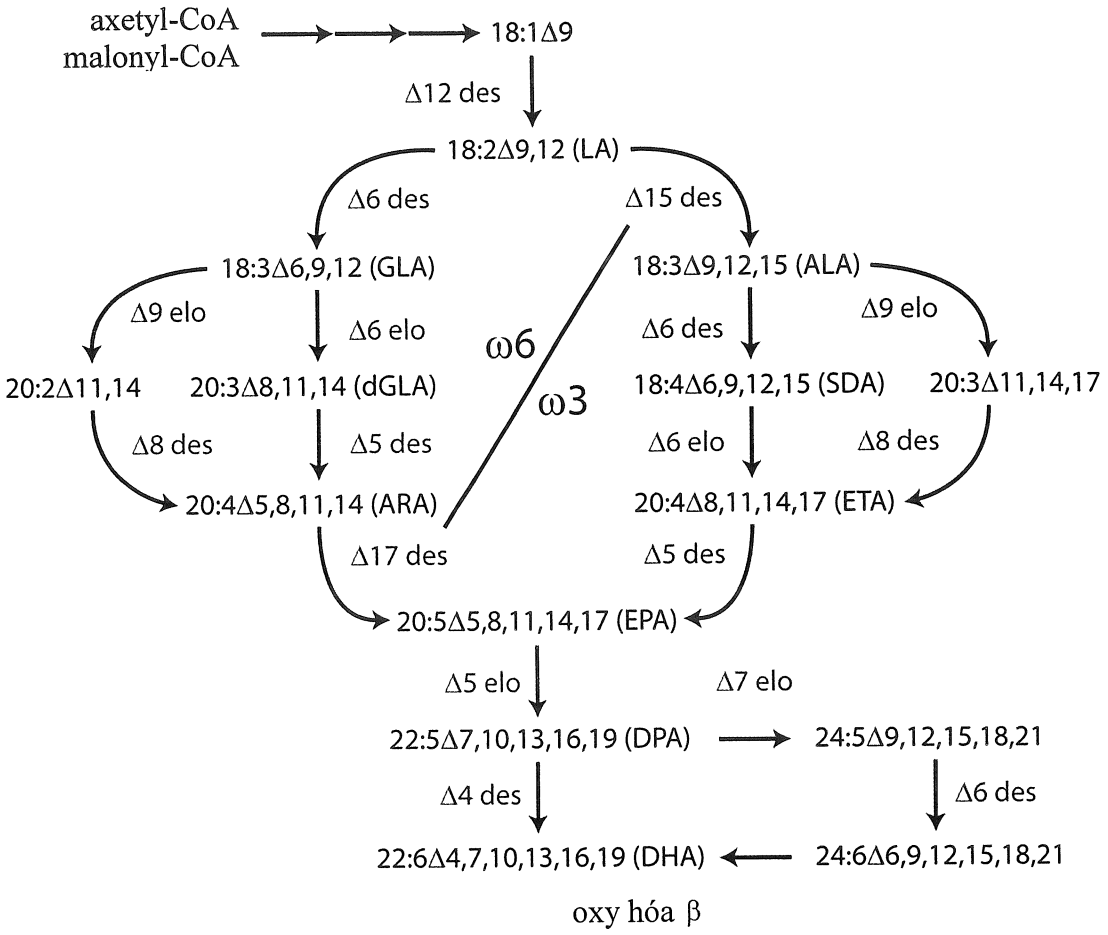

axetyl-CoA
malonyl-CoA
18:1Δ9
Δ12 des
18:2Δ9,12 (LA)
Δ6 des
Δ15 des
18:3Δ6,9,12 (GLA)
18:3Δ9,12,15 (ALA)
Δ9 elo
Δ6 elo
Δ6 des
Δ9 elo
ω6
ω3
20:2Δ11,14
20:3Δ8,11,14 (dGLA)
18:4Δ6,9,12,15 (SDA)
20:3Δ11,14,17
Δ8 des
Δ5 des
Δ6 elo
Δ8 des
20:4Δ5,8,11,14 (ARA)
20:4Δ8,11,14,17 (ETA)
Δ17 des
Δ5 des
20:5Δ5,8,11,14,17 (EPA)
Δ5 elo
Δ7 elo
22:5Δ7,10,13,16,19 (DPA)
24:5Δ9,12,15,18,21
Δ4 des
Δ6 des
22:6Δ4,7,10,13,16,19 (DHA)
24:6Δ6,9,12,15,18,21
oxy hóa β

Fig.1

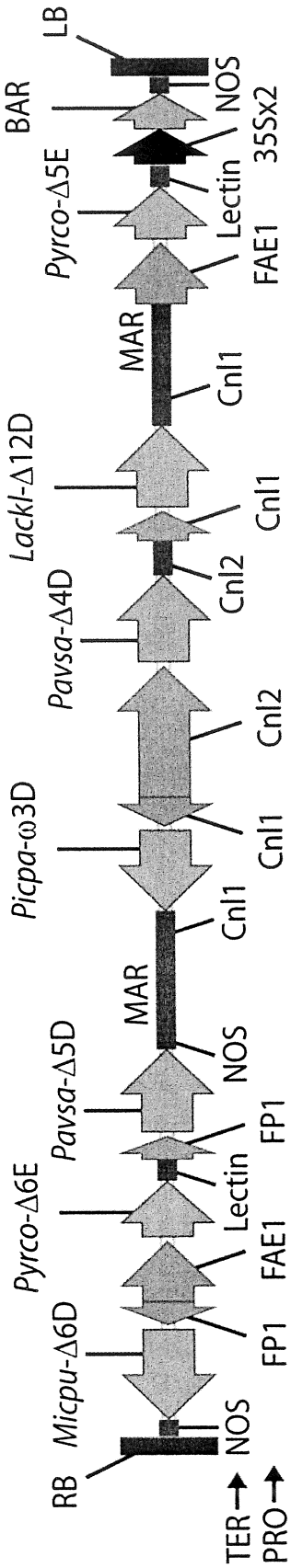
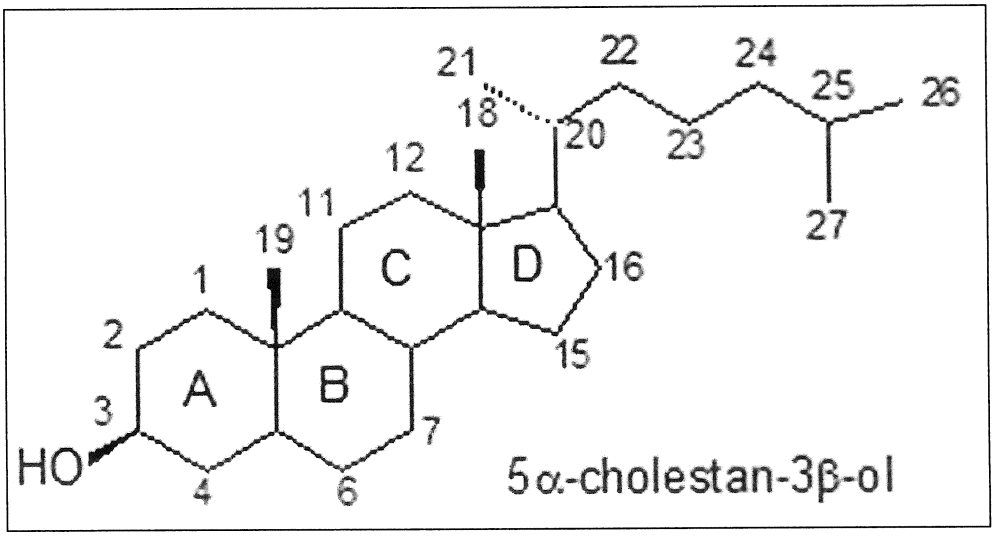

RB
Micpu-Δ6D
NOS
Pyrco-Δ6E
FP1
FAE1
Lectin
Pavsa-Δ5D
FP1
NOS
MAR
Picpa-ω3D
Cnl1
Cnl1
Pavsa-Δ4D
Cnl2
Cnl2
Lackl-Δ12D
Cnl1
Cnl1
MAR
Pyrco-Δ5E
FAE1
Lectin
BAR
35Sx2
NOS
LB
TER
PRO

Fig.2

A)


21
22
24
25
26
18
20
23
12
11
19
C
D
16
27
1
2
A
B
15
3
7
HO
4
6
5α-cholestan-3β-ol

B)

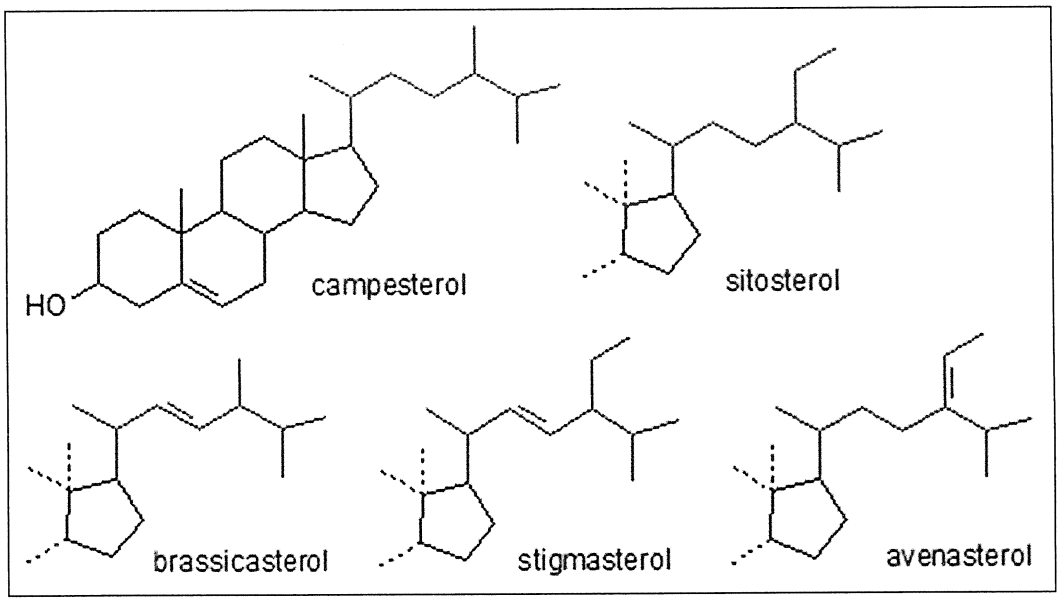

HO
campesterol
sitosterol
brassicasterol
stigmasterol
avenasterol

Fig.3

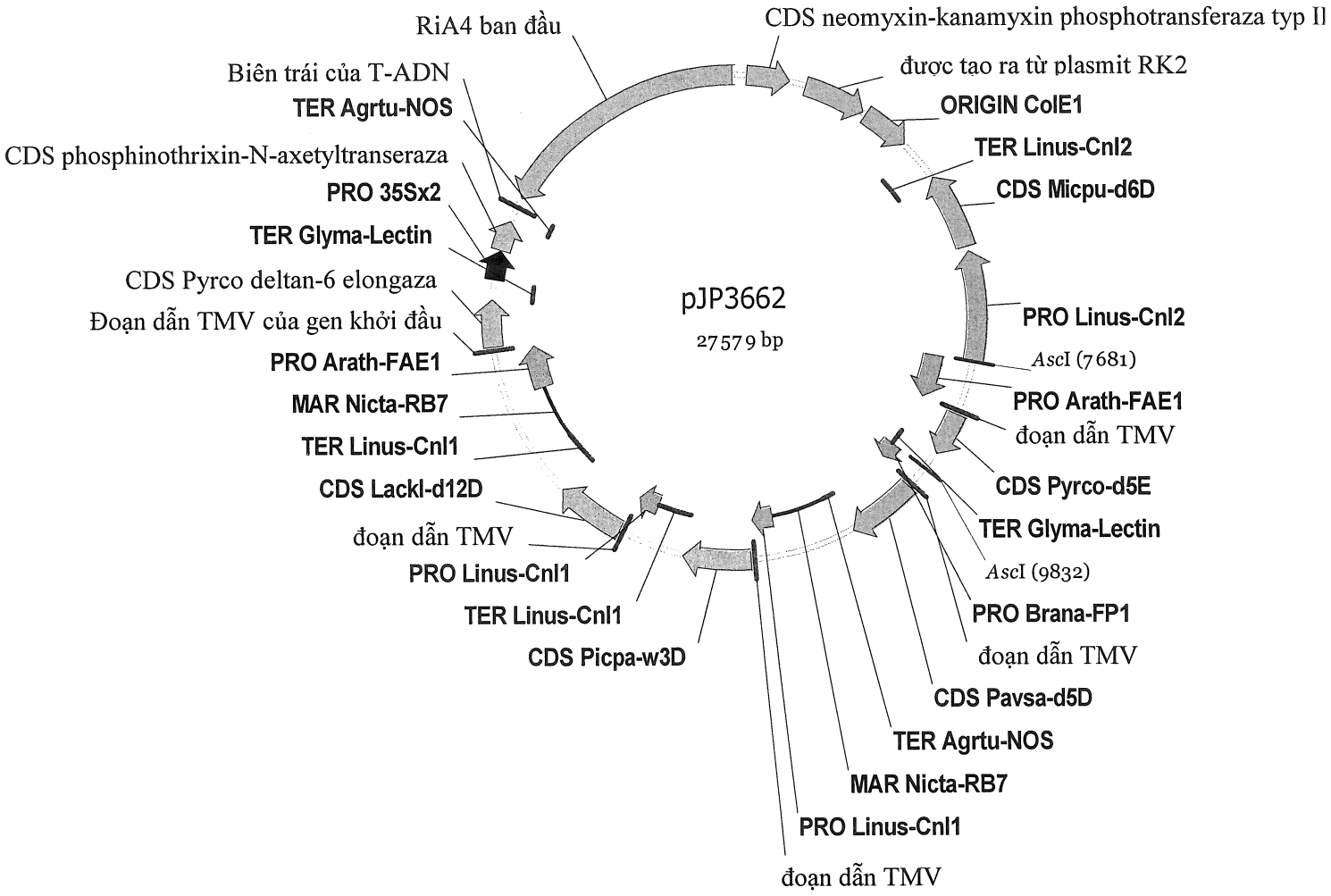

RiA4 ban đầu
CDS neomyxin-kanamyxin phosphotransferaza typ II
được tạo ra từ plasmit RK2
Biên trái của T-ADN
TER Agrtu-NOS
ORIGIN ColE1
TER Linus-Cnl2
CDS phosphinothrixin-N-axetyltranseraza
CDS Micpu-d6D
PRO 35Sx2
TER Glyma-Lectin
CDS Pyrco deltan-6 elongaza
pJP3662
27579 bp
PRO Linus-Cnl2
Đoạn dẫn TMV của gen khởi đầu
AscI (7681)
PRO Arath-FAE1
PRO Arath-FAE1
MAR Nicta-RB7
đoạn dẫn TMV
TER Linus-Cnl1
CDS Pyrco-d5E
CDS Lackl-d12D
TER Glyma-Lectin
đoạn dẫn TMV
AscI (9832)
PRO Linus-Cnl1
PRO Brana-FP1
TER Linus-Cnl1
đoạn dẫn TMV
CDS Picpa-w3D
CDS Pavsa-d5D
TER Agrtu-NOS
MAR Nicta-RB7
PRO Linus-Cnl1
đoạn dẫn TMV

Fig.4