



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101321872 B

(45) 授权公告日 2012.09.05

(21) 申请号 200680024359.6

(22) 申请日 2006.05.22

(30) 优先权数据

60/684,134 2005.05.23 US

60/735,984 2005.11.10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.01.09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/020047 2006.05.22

(87) PCT申请的公布数据

W02006/127789 EN 2006.11.30

(73) 专利权人 阿凯迪亚生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 维克·C·可耐福

克里斯廷·休梅克

弗兰克·J·弗利德

唐纳德·艾姆雷 埃里克·雷

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

31002

代理人 邓琪

(51) Int. Cl.

C12N 15/82(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

A01H 5/10(2006.01)

(56) 对比文件

US 6815579 B1, 2004.09.09,

US 5614393 A, 1997.03.25,

CN 1253588 A, 2005.05.17,

李明春等. 深黄被孢霉 $\Delta 6$ - 脂肪酸脱氢酶基因在转基因烟草中的表达. 《生物工程学报》. 2003, 第 19 卷 (第 2 期), 178-184.

李明春等. 深黄被孢霉 $\Delta 6$ - 脂肪酸脱氢酶基因在大豆中的表达. 《遗传学报》. 2004, 第 31 卷 (第 8 期), 858-863.

审查员 杨佳倩

权利要求书 1 页 说明书 34 页 附图 9 页

(54) 发明名称

高 γ - 亚麻酸红花

(57) 摘要

本发明涉及从红花植物中特别是红花种子中制备 γ - 亚麻酸的合成方法。编码一个或多个脂肪酸去饱和酶序列的核苷酸序列和构建序列用来产生含有表达一个或多个这种序列的转基因红花植物,在红花种子中产生高含量的 γ - 亚麻酸。本发明提供了高含量 γ - 亚麻酸的转基因红花植物和种子,还提供了和本发明的红花种子产生的油。本发明还涉及采用此本发明产生的油来治疗包括神经系统疾病,炎症,癌症,心血管病症等许多疾病的方法。

1. 红花植物的种子油,其中所述油含有为所述油的总脂肪酸含量的至少 40 重量百分含量的 γ -亚麻酸。

2. 一种在红花植物中生产 γ -亚麻酸的方法,所述方法包括含有在所述红花植物中作用的重组体种子特异启动子的红花植物的生长,其中所述的启动子可操作地连接一个编码 $\Delta 6$ 去饱和酶重组 DNA 序列,其中,所述的 $\Delta 6$ 去饱和酶是高山被孢霉 $\Delta 6$ 去饱和酶或异枝水霉 $\Delta 6$ 去饱和酶,所述的红花植物在 $\Delta 6$ 去饱和酶被表达的条件下生长,并且其中所述红花植物产生种子,并且所述种子含有为所述种子的总脂肪酸含量的至少 40 重量百分含量的 γ -亚麻酸。

3. 根据权利要求 2 所述的在红花植物中生产 γ -亚麻酸的方法,其中所述的 $\Delta 6$ 去饱和酶是高山被孢霉 $\Delta 6$ 去饱和酶。

4. 根据权利要求 2 所述的在红花植物中生产 γ -亚麻酸的方法,其中所述的 $\Delta 6$ 去饱和酶是异枝水霉 $\Delta 6$ 去饱和酶。

5. 根据权利要求 2 所述的在红花植物中生产 γ -亚麻酸的方法,其中所述的种子特异启动子选自由油脂蛋白启动子和核丝启动子组成的组。

6. 根据权利要求 2-5 中任一项所述的在红花植物中生产 γ -亚麻酸的方法,其中所述的方法还包括从所述红花植物中分离种子。

7. 根据权利要求 6 所述的在红花植物中生产 γ -亚麻酸的方法,其中所述的方法还包括从所述红花植物的种子提取油。

8. 权利要求 7 所述的油,其中所述油含有为所述油的总脂肪酸含量的至少 40 重量百分含量的 γ -亚麻酸。

高 γ -亚麻酸红花

[0001] 相关申请

[0002] 本申请参考 2005 年 5 月 23 日递交的 60/684,134 号和 2005 年 11 月 10 日递交的 60/735,984 号美国临时专利申请,这些临时申请并入本文作为参考。

背景技术

[0003] γ -亚麻酸 (GLA) 是 ω -6 族的一种必须脂肪酸,主要存在于基础植物油中。GLA 是亚油酸 (LA) 在 Δ 6 去饱和酶作用下合成的。GLA 的作用就在于它能作为许多其它必须脂肪酸的前体,如精氨琥珀酸,精氨琥珀酸是前列腺素和其它一些生理上重要分子的前体。

[0004] 不饱和脂肪酸,如 LA ($C_{18}\Delta 9,12$), α -亚麻酸 ($C_{18}\Delta 9,12,15$) 是基本的食物组成成分,脊椎动物本身并不能合成这些脂肪酸,这是因为,当脊椎动物细胞将双键引入脂肪酸 $\Delta 9$ 时,它不能额外在脂肪酸链的 $\Delta 9$ 和甲基末端之再引入一个双键。因为它们需要合成其它产物,亚油酸和 α -亚麻酸是必须脂肪酸,通常从植物中获得。哺乳动物可将 LA 转化成 GLA ($C_{18}\Delta 6,9,12$), GLA 又可转化为精氨琥珀酸 (20:4),精氨琥珀酸是一种重要的脂肪酸,因为它是大多数前列腺素的基础前体物质。

[0005] 由于 LA 要经由酶转化形成 GLA 然后再转化为精氨琥珀酸,通过食物供应的 LA 可以满足对 GLA 和精氨琥珀酸的需要。然而,这些非高不饱和的脂肪酸如 LA 的消耗与健康风险相互关联,如血胆固醇过多,动脉硬化等其它可增加冠心病冠状动脉硬化性心脏病患病可能性的临床疾病都与这些非高不饱和脂肪酸有关。相比之下,大多数高不饱和脂肪酸的消耗,与降低血胆固醇浓度和降低患动脉硬化的风险有关。不饱和脂肪酸 GLA 的消耗已显示出特别的益处。因此,更多的不饱和 GLA 的消耗比起 LA 的消耗更有益处。所以,产生另外的 GLA 的来源供人们的 GLA 消耗是我们所希望的。

[0006] GLA 是形成包括前列腺素等类花生酸类物质的一种前体物质。前列腺素是一种非常重要的类激素化合物,可以加固细胞膜,并作为一种细胞信号分子。已经发现 GLA 对人类和动物有益。GLA 可以调节血压,退烧,调节免疫。GLA 的补充给药法对于治疗许多疾病,包括狼疮,癌症,过敏,关节炎溃疡性结肠炎都是很有作用的。GLA 可以改善治疗癌症的药物的功效。GLA 可以帮助减少月经前期综合征和更年期的症状;改善皮肤健康,可以治疗湿疹,痤疮,红斑痤疮,牛皮癣,皮屑;改善治疗精神病和神经障碍等疾病,包括阿耳茨海默氏病,杭廷顿氏舞蹈病,多发性硬化症,注意缺陷障碍,抑郁症,雷诺氏现象疾病;可以防止糖尿病性神经病变,治疗肝硬化,改善治疗干眼病,包括口腔干燥-风湿性关节炎综合征等疾病,治疗心血管疾病,骨质疏松症,高脂血症等其它由衰老引起的症状。此外, GLA 还作为一种刺激剂来消耗人体内的褐色脂肪。褐色脂肪是人体内包围在重要器官周围的一种脂肪,充当一个脂肪燃烧的工厂,利用卡路里产热,而不是把它们作为白色脂肪储存起来。褐色脂肪的消耗对于维持理想体重是非常重要的。GLA 的消耗因此可以帮助加快褐色脂肪的代谢过程。

[0007] 目前 GLA 的补给一般来源于天然含有高 GLA 植物,如报春花油,黑加仑油,琉璃苣油。然而, GLA 只占这些天然来源中总脂肪酸中相对很小的一部分。这些来源中只有 7-10%

(报春花油), 14-19% (黑加仑油), 20-26% (琉璃苣油) 的脂肪酸可用作 GLA。尽管 GLA 的用途广泛, 但由于它的价格昂贵, 而且目前的 GLA 浓度较低, 所以, 它的应用目前还有一定局限性。一个成人需要消耗 10 个以上的 GLA 胶囊补给物来获得最佳的健康效益。所以, 获得一种价格不高, 容易获得, 且比起天然含有 GLA 的油, 含有更高含量 GLA 的油的来源是非常有用的。这种来源使得消费者花很少的钱在补充物上, 摄取少量的油和卡路里, 就可以获得 GLA 带来的最佳健康益处。

[0008] 红花是一种商业上重要的农业作物。红花第一次种植是在数千年以前的近东, 是作为染料和从植物衍生出的一些其它产物的一种来源。本世纪, 红花油被用作一种食用油的来源。20 世纪 30 年代的美国, 红花作为一种食用油的来源首次用于农业生产。从那以后, 多种多样改进这种油成分的研究开始发展起来。红花油最初由棕榈酸 (C16:0), 硬脂酸 (C18:0), 油酸 (C18:1), 亚油酸 (C18:2) 组成。棕榈酸, 硬脂酸是饱和脂肪酸, 油酸, 亚油酸是不饱和脂肪酸。然而, 红花植物天然产生的 GLA 含量很小可忽略不计。

[0009] 这样说, 转基因红花植物种子将有非常大的用处, 比天然产生的红花种子, 转基因红花植物种子含有更高含量 GLA。

发明内容

[0010] 本发明提供了产生 GLA 的红花植物。第一方面提供了一种红花植物, 该植物能产生重量百分含量至少 1% 的 GLA 的红花植物, 以及其的种子和油。在一个较佳实施例中, 这种油将含有重量百分含量约 1 ~ 5, 5 ~ 10, 10 ~ 15, 15 ~ 20, 20 ~ 25, 25 ~ 30, 30 ~ 35, 35 ~ 40, 40 ~ 45, 45 ~ 50, 50 ~ 55, 55 ~ 60% 或更高含量的 GLA。

[0011] 本发明的第二个方面, 提供了一种红花植物, 该植物含有能直接表达一个或多个去饱和酶核苷酸序列的遗传构建序列。本发明的第三个方面, $\Delta 6$ 去饱和酶是唯一能在产生原始 LA 的植物中产生 GLA 的酶。本发明的第四个方面, $\Delta 6$ 去饱和酶和 $\Delta 12$ 去饱和酶共同作用产生油酸 (OA) 而不是 LA。这个构建序列包括这些酶的编码序列, 启动子和终止序列。在一个优选实施例中, 启动子是一个种子特异启动子。

[0012] 在一个实施例中, 提供了一种转基因红花植物, 该植物含有作用于红花植物的重组启动子, 可连接编码 $\Delta 6$ 去饱和酶重组体 DNA 序列, 该植物产生的种子含有重量百分含量至少 1% 的 GLA。 $\Delta 6$ 去饱和酶编码序列可以从任何植物和真菌中获得。这些植物和真菌包括白霉, 水霉, 异枝水霉, 被孢霉属, 高山被孢霉, 耳霉, 腐霉, 疫酶, 青霉菌, 紫球藻, *Coidosporium*, 卷枝毛霉, 镰孢菌霉, 曲霉, 念珠菌, 红酵母, 虫霉, 破囊壶菌, 水霉, 琉璃苣, 樱草属, 樱草属, 芸苔, 稻, 苔藓等等。这个启动子可以是一个种子特异启动子, 如油质蛋白启动子或核丝启动子。这个实施例还提供了来源于这些转基因植物的种子, 种子中含有重量百分含量至少占总脂肪酸含量 1% 的 GLA。还提供了由这些转基因植物种子制备的油。这种油含有重量百分含量 1-60% 或更高含量的 GLA。

[0013] 在另一个实施例中, 提供了一种转基因红花植物, 包含第一个编码 $\Delta 6$ 去饱和酶重组体 DNA 序列和第二个编码 $\Delta 12$ 去饱和酶 DNA 重组体序列, 这序列可连接至少一个启动子, 该植物产生的种子含有重量百分含量至少 1% 的 GLA。在一些实施例中, 第一个和第二个 DNA 序列只能连接到唯一的启动子。在另外的一些实施例中, 第一个和第二个 DNA 序列可连接不同的启动子。 $\Delta 6$ 和 $\Delta 12$ 去饱和酶编码序列可来源于任何植物和真菌。这些植

物和真菌包括白霉,水霉,异枝水霉,被孢霉属,高山被孢霉,耳霉,腐霉,疫酶,青霉菌,紫球藻, *Coidosporium*, 卷枝毛霉,镰孢菌霉,曲霉,念珠菌,红酵母,虫霉,破囊壶菌,水霉,琉璃苣,樱草属,樱草属,芸苔,稻,苔藓等等。这个启动子可以是一个种子特异启动子,如油质蛋白启动子或核丝启动子。这个实施例还提供了来源于这些转基因植物的种子,种子中含有重量百分含量至少占总脂肪酸含量 1% 的 GLA。还提供了由这些转基因植物种子制备的油。这种油含有重量百分含量 1-60% 或更高含量的 GLA。

[0014] 在另一个实施例中,提供了一种在红花种子中产生 GLA 的方法。这个方法包括的步骤有,含有作用于转基因红花植物的重组体启动子的红花植物的生长,它可以连接到一个编码 $\Delta 6$ 去饱和酶重组体 DNA 序列;以及在 $\Delta 6$ 去饱和酶序列表达条件下红花植物的生长。 $\Delta 6$ 去饱和酶编码序列可以从任何植物和真菌中获得。这些植物和真菌包括白霉,水霉,异枝水霉,被孢霉属,高山被孢霉,耳霉,腐霉,疫酶,青霉菌,紫球藻, *Coidosporium*, 卷枝毛霉,镰孢菌霉,曲霉,念珠菌,红酵母,虫霉,破囊壶菌,水霉,琉璃苣,樱草属,樱草属,芸苔,稻,苔藓等等。这个启动子可以是一个种子特异启动子,如油质蛋白启动子或核丝启动子。这个实施例还提供了来源于这些转基因植物的种子,种子中含有重量百分含量至少占总脂肪酸含量 1% 的 GLA。还提供了由这些转基因植物种子制备的油。这种油含有重量百分含量 1-60% 或更高含量的 GLA。

[0015] 在另外一个实施例中,提供了一种在红花种子中产生 GLA 的方法。这个方法包括的步骤有,含有第一个编码 $\Delta 6$ 去饱和酶重组体 DNA 序列和第二个编码 $\Delta 12$ 去饱和酶重组体 DNA 序列红花植物的生长,这序列可连接到至少一个启动子;以及在 $\Delta 6$ 和 $\Delta 12$ 去饱和酶序列表达条件下红花植物的生长。在这个实施例中, $\Delta 6$ 和 $\Delta 12$ 去饱和酶编码序列可来源于任何植物和真菌。这些植物和真菌包括白霉,水霉,异枝水霉,被孢霉属,高山被孢霉,耳霉,腐霉,疫酶,青霉菌,紫球藻, *Coidosporium*, 卷枝毛霉,镰孢菌霉,曲霉,念珠菌,红酵母,虫霉,破囊壶菌,水霉,琉璃苣,樱草属,樱草属,芸苔,稻,苔藓等等。这个启动子可以是一个种子特异启动子,如油质蛋白启动子或核丝启动子。这个实施例还提供了来源于这些转基因植物的种子,种子中含有重量百分含量至少占总脂肪酸含量 1% 的 GLA。还提供了由这些转基因植物种子制备的油。这种油含有重量百分含量 1-60% 或更高含量的 GLA。

[0016] 在另一些实施例中,来源于转基因红花植物的红花油含有重量百分含量 1 ~ 5, 5 ~ 10, 10 ~ 15, 15 ~ 20, 20 ~ 25, 25 ~ 30, 30 ~ 5, 35 ~ 40, 40 ~ 45, 45 ~ 50, 50 ~ 55, 55 ~ 60% 或更高含量的 GLA。

[0017] 在另一些实施例中,提供了一些含有红花油的营养品和个人调理产品,这些产品含有重量百分含量 1 ~ 5, 5 ~ 10, 10 ~ 15, 15 ~ 20, 20 ~ 25, 25 ~ 30, 30 ~ 5, 35 ~ 40, 40 ~ 45, 45 ~ 50, 50 ~ 55, 55 ~ 60% 或更高含量的 GLA。

[0018] 在另一些实施例中,提供了一种通过给药有效量的红花油给这些倾向于或是已经受这些状况和疾病折磨的病人,治疗和预防精神病,神经病,或其它中枢或末梢神经系统状况或疾病的方法。

[0019] 在另一些实施例中,提供了一种通过给药有效量的红花油给这些倾向于或是已经受这些状况和疾病折磨的病人,治疗和预防免疫性状况或疾病的方法。

[0020] 在另一些实施例中,提供了一种通过给药有效量的红花油给这些倾向于或是已经受这些状况和疾病折磨的病人,治疗和预防炎症性状况或疾病的方法。

[0021] 在另一些实施例中,提供了一种通过给药有效量的红花油给这些倾向于或是已经受这些状况和疾病折磨的病人,治疗和预防癌症状况或疾病的方法。

[0022] 在另一些实施例中,提供了一种通过给药有效量的红花油给这些倾向于或是已经受这些状况和疾病折磨的病人,治疗和预防皮肤状况或疾病的方法。

[0023] 在另一些实施例中,提供了一种通过给药有效量的红花油给这些倾向于或是已经受这些状况和疾病折磨的病人,治疗和预防心血管的状况或疾病的方法。

[0024] 在另一些实施例中,提供了一种通过给药有效量的红花油给婴儿提供营养的方法。

附图说明

[0025] 图 1 显示的是 GLA 生物合成的途径,在 $\Delta 6$ 和 $\Delta 12$ 去饱和酶的连续作用下,OA 转化为 LA,然后再转化为 GLA,GLA 可转化为精氨琥珀酸,精氨琥珀酸是许多前列腺素,白细胞三烯和其它生理有效分子的前体物质;

[0026] 图 2 显示的是含有一致序列的不同植物 $\Delta 6$ 去饱和酶的序列对比 (SEQ ID NO: 4-6);

[0027] 图 3 显示的是含有一致序列的不同真菌的 $\Delta 6$ 去饱和酶的序列对比 (SEQ ID NO: 4-11);

[0028] 图 4 显示的是 $\Delta 6$ 去饱和酶保守区域的线性表示;

[0029] 图 5 显示的是包含有共有序列的不同植物 $\Delta 12$ 去饱和酶的序列对比 (SEQ ID NO: 12-15);

[0030] 图 6 显示的是含有一致序列的不同真菌的 $\Delta 12$ 去饱和酶的序列对比, (SEQ ID NO: 16-19);

[0031] 图 7 显示的是 $\Delta 12$ 去饱和酶的保守区域线性表示;

[0032] 图 8 显示的是来源于 *M. alpina* 生物体中表达 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶的 pSBS4766 质粒。如图所显示了表达构建序列的几个特征,包括启动子,终止序列,抗性基因和标记基因,植物质粒的可选标记是 pat, pat 来源于绿色产色链霉菌。细菌标记是 SpecR;

[0033] 图 9 显示的是来源于 *S. diclina* 生物体中表达 $\Delta 6$ 去饱和酶的 pSBS4119 质粒,如图所显示了表达构建序列的几个特征,包括启动子,终止序列,抗性基因和标记基因,植物质粒的可选标记是 pat, pat 来源于绿色产色链霉菌,细菌标记是 SpecR;

[0034] 图 10 显示的是从 *M. alpina* 生物体中表达 $\Delta 6$ 去饱和酶的 pSBS4763 质粒,如图所显示了表达构建序列的几个特征,包括启动子,终止序列,抗性基因和标记基因,植物质粒的可选标记是 pat, pat 来源于绿色产色链霉菌,细菌标记是 SpecR;

[0035] 为了确保能完整的理解本发明,提供下列非限制性定义。

[0036] $\Delta 6$ 去饱和酶是在脂肪酸分子羧基末端的碳 6 和碳 7 之间引入一个双键的酶。

[0037] $\Delta 12$ 去饱和酶是在脂肪酸分子羧基末端的碳 12 和碳 13 之间引入一个双键的酶。

[0038] 此处,缩写"GLA"指的是 γ -亚麻酸。

[0039] 重量百分数就是种子或是种子中的油中一特定脂肪酸基于重量的含量。因此,"GLA 的重量百分数"或"GLA 按重量计算"是以总脂肪酸重量含量为 100%,根据 GLA 的重量所占比例来计算的。例如,"按重量计算的 5%的 GLA"或"5%按重量计算的 GLA"指

的是种子或种子中的油 100 克的总脂肪酸含有 5 克的 GLA。

[0040] 如图 1 所示, GLA 是由生物化学途径产生的, 在这个过程中 OA 转化为 LA, 由能在脂肪酸碳链的特定位置引入一个双键的脂肪酸去饱和酶的连续作用下, LA 依次转化为 GLA。当这些酶转移到产生 OA 或 LA 的细胞中来时, GLA 就产生了。

[0041] 红花是一种商业上重要的农作物, 也是植物油的一种有价值的来源。因为红花植物不能天然产生一定量的 GLA, 所以, 它显然不是制备这种脂肪酸的候选植物。由于红花植物不能天然产生 GLA, 有人就会认为这种高含量非内源性脂肪酸的表达也许会对植物有害, 因为引入外源性 GLA 将会干扰内源性脂肪酸的功能。令人惊讶的发现, GLA 在红花种子中是可以表达的, 而且比起其它表达转基因的植物 (免于上述相关讨论), 这种表达产生了令人意想不到的高浓度。

[0042] 去饱和酶的特性:

[0043] 去饱和酶的催化反应

[0044] $R_1-CH_2-CH_2-R_2+O_2+2e^-+2H^+ \rightarrow R_1-CH=CH-R_2+2H_2O$.

[0045] 许多脂肪酸去饱和酶都是膜相连金属酶。大多数酶在它们的活性位点都含有两个铁原子。如图 2, 3, 5, 6 所示, $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶在其各自种类酶中有一定程度的序列相同或相似。如图 4 和 7 所示, 在去饱和酶的保守区域内, 有三个含丰富组氨酸的保守序列 (组氨酸盒子) 和一般序列 HXXXJH, HXXHH, HXXHH, QXXHH, 这些盒子对于酶的活力是必需的, 它们由跨膜域分隔开, 跨膜域对于它们在活性位点的正确定向是必需的。许多酶包括 $\Delta 5$, $\Delta 6$ 去饱和酶都含有一种类似细胞色素 b5 的氨基末端。这通常会伴随着第三个组氨酸盒子转变为 QXXHH。从 NADH 细胞色素 B5 还原酶中获得的电子转移到去饱和酶的细胞色素 b5 或细胞色素 b5 区域中, 再转移到去饱和酶的活性位点上。氧化还原反应由通过保守的组氨酸盒子相互作用来维持稳定的两个铁原子开始进行。正如下面所述, 这些结构特征, 特别是填补金属结合部位的保守残基是保守的交叉作用的, 主要负责这种酶的酶功能。

[0046] 去饱和酶的来源:

[0047] 对于 GLA 的制备, 一种或多种去饱和酶对于宿主细胞和底物的利用是必需的。例如, 在天然含有丰富 LA 的植物中, $\Delta 6$ 去饱和酶对于催化 LA 转化为 GLA 是必需的。

[0048] 选择一种特异的去饱和酶多肽需要考虑的因素包括正确的定位和细胞微粒体 / 内质网隔间中多肽的功能 (这些酶受膜约束的, 只有与细胞中生物合成的甘油酯结合才能发挥作用), 多肽是否是限速酶或是限速酶的组成部分, 采用去饱和酶对于目标多不饱和脂肪酸的合成和多肽所需的辅助因子是否是必需的。表达的多肽与宿主细胞的特定区域内的生物化学环境有较好的相容性。例如, 多肽和其它酶在宿主细胞中竞争底物。多肽的米氏常数和比活性的分析因此被考虑用于决定给定多肽是否适合来修饰宿主细胞里 GLA 的制备。在特定情况下采用的多肽能在目标宿主细胞里发挥功能, 但是, 另外一些多肽具有去饱和酶的活性, 能够修饰 GLA 的相关产物。

[0049] 许多 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶都是已知的, 包括下面文献中描述的: U. S. Patent No. 6, 635, 451, W002/081668, U. S. Patent No. 6, 635, 451, U. S. Patent App. No. 2003/0167525, U. S. Patent No. 6, 459, 018, U. S. Patent No. 5, 972, 644, U. S. Patent No. 6, 432, 684, U. S. Patent No. 5, 968, 809, U. S. Patent No. 5, 972, 664, U. S. Patent No. 6, 051, 754, U. S. Patent No. 6, 075, 183, U. S. Patent No. 6, 136, 574, U. S. Patent

No. 5, 552, 306, U. S. Patent No. 5, 614, 393, 5, 663, 068, U. S. Patent No. 5, 689, 050, U. S. Patent No. 5, 789, 220, U. S. Patent No. 6, 355, 861 and U. S. Patent No. 6, 492, 108。这些文献通过引用而被合并于此来说明这种特异序列。本发明实践所用的 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶来源于植物和真菌。例如, 来源于白霉, 异枝水霉, 高山被孢霉, *Conidiolus*, 腐霉, 疫酶, 青霉, 紫球藻, *Coidosporium*, 卷枝毛霉菌, 镰孢菌霉, 曲霉, 念珠菌, 大戟, *Dimorphoteca*, 红酵母, 虫霉, 破囊壶菌, 水霉, 玻璃苣, 樱草的 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶对于这个发明的实践是有用的, 来源于向日葵, 芸苔, 稻, 苔藓, *C. elegans* 的去饱和酶对于本发明的实践也是有用的。这个序列包括含有丰富组氨酸的盒子, 这些序列也可用作已知技术中基于不同排列方法的至少 80%, 85%, 90% 或 95% 一致的序列来应用。在高度或中度严格性条件下, 也可将以上序列杂交。允许与去饱和酶序列相应的附加序列一致的杂化洗涤条件在技术中也是已知的, 其中一部分下面会有讨论。

[0050] 序列比对方法中的编程和排列算法在技术中已知的, 在下面的文献中有描述: Smith and Waterman, *J Mol Biol* 1147:195, 1981; Needleman and Wunsch, *J Mol Biol* 48:443, 1970; Pearson and Lipman, *PNAS* 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins and Sharp, *Comput Appl Biosci* 5:151, 1989; Corpet, *Nucl Acids Res* 格性计算的条件可以参考下列文献。Sambrook et al. (*Molecular Cloning--A Laboratory Manual* 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) and Tijssen (*Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Elsevier Science Ltd., Amsterdam, 1993)。影响核酸杂交的因素包括: 温度, 盐的条件, 杂交混合物中有机溶剂的量, 杂交序列的长度和基本组成, 碱基错配的程度。例如, 将探针和滤波 DNA 杂交的高严格条件为: 5 X SSC, 2% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 100 μ g/ml 单链 DNA 在 55-65°C 条件下放置 20 分钟, 60-65°C 在含 0.1% SDS 的 0.1 X SSC 中洗涤 20 分钟。

[0051] 另外, 如果去饱和酶 cDNA 的序列是已知的, 可以设计 PCR 引物来放大特定的去饱和酶。此外, PCR 引物还可设计成去饱和酶的保守区域, 来分离另外的序列。进行 PCR 反应的实验设计在技术中是已知的, 在一些手册有详细描述, 如 *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* by M. Innes et al., Academic Press, 1989。

[0052] 一旦序列经由序列鉴定, 杂交, 保守组氨酸盒子鉴定, 或其它适合方法的鉴定后, 去饱和酶的活性就可采用一些不同测定方法来测试。例如酵母的应用, 在 U. S. Pat. No. 5, 968, 809 中 5 到 7 的例子中和 Knutzon, et al. *J. Biol. Chem.* 273(45):29360-29366 (1998) 的例子中有所描述。这些文献通过引用而被合并于此。这里的酵母可以是酒酿酵母或产油酵母。目的序列被克隆到酵母表达载体中并转化为酵母。这个重组酵母菌株在含有不同底物介质中生长, 油脂成分的脂肪酸含量用来分析估算去饱和酶的活性。 $\Delta 6$ 去饱和酶活性可采用由亚油酸作为底物探测 γ -亚麻酸来监测。 $\Delta 12$ 去饱和酶可采用通过探测内源性油酸到亚油酸的转化来监测。

[0053] 去饱和酶还可利用 *Arabidopsis* 来测试。目的序列克隆到适合载体中, 移入 *Arabidopsis*, 通过估算转基因植物的表现型来检测活性。16:10881, 1988; Huang, *Genomics* 14:18, 1992; and Pearson, *Methods Mol Biol* 124:307, 1994. Altschul et al., (*Nature Genetics* 6:119, 1994), 这些文献在序列比对和同源性计算方面, 均有细节上的考虑。

[0054] NCBI(美国国立生物技术信息中心)BLAST(一套在蛋白质数据库或DNA数据库中进行相似性比较的分析工具)分析工具对于一些包括国家生物技术中心(NCBI, Bethesda, MD), 互联网的序列分析是很有用的, 它是与序列分析程序blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx联合起来应用。可以进入NCBI主页, 在主页上有如何运用这个程序来确定序列相似性的说明。

[0055] Vector NTI(序列综合分析软件)软件中AlignX程序如图2,3,5,6所示。图2显示的是来源于不同植物种类的 $\Delta 6$ 去饱和酶的序列比对。图3显示的是来源于不同真菌种类的去饱和酶的序列比对。图5和图6分别显示的是来源于不同植物和真菌种类的 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶的序列比对。这些图显示的是在它们各自种类酶中, 不同 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶结构和功能的关系。任何在这些图中显示的 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶都可用于发明的实践中, 和其它酶一样, 这些酶也可采用本发明的方法或技术中其它与 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶相应的有效的方法来鉴定。本发明还包括仍然保留活性或通过随机或定向变异能提高强酶活的去饱和酶的修饰。

[0056] 熟练的技工都知道, 此处显示的任何序列以及技术中的其它已知序列, 和未知的去饱和酶序列都能采用传统克隆方法来分离, 如用于本发明的核酸杂交或PCR技术。

[0057] 用于分离去饱和酶序列的杂交条件的例子如下。序列依靠的严格条件根据采用的实验参数的不同而不同。一般来说, 对于在确定离子强度和PH条件下的特定序列来说, 选择的严格条件为低于热溶解点(T_m)的 $5 \sim 20^\circ\text{C}$ 。 T_m (在确定离子强度和PH条件下)是指50%的靶序列杂化与探针完全配对杂交时的温度。核酸杂交和严另外, 含有假去饱和酶序列的载体可在叶子中表达或使转基因植物中产生冠瘿生长。

[0058] 采用如上所述方法鉴定和分离产生的去饱和酶序列再被克隆到植物载体中表达, 采用的分子生物学上的已知方法, 如以下文献所述: Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (1989), Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds. (1987)。

[0059] 去饱和酶基因的表达:

[0060] 对于去饱和酶多肽的表达来说, 功能的转录和翻译的起始和终止区域可连接编码去饱和酶多肽的DNA。转录和翻译的起始和终止区域有许多种来源, 包括要表达的DNA, 已知基因, 目的体系下可能表达的基因, 表达型载体, 化学合成或来自宿主细胞的内源基因。在植物组织和器官中的表达具有一定优势, 特别是在容易获得组织和器官的地方, 如种子, 叶子, 果实, 花朵, 根等等。利用特异调节序列, 可在植物中定向表达, 可参考下列文献: U. S. Patent No. 5, 463, 174, U. S. Patent No. 4, 943, 674, U. S. Patent No. 5, 106, 739, U. S. Patent No. 5, 175, 095, U. S. Patent No. 5, 420, 034, U. S. Patent No. 5, 188, 958 and U. S. Patent No. 5, 589, 379。这些文献通过整体上引用而被合并于此, 针对此特异序列展示于此。本发明产生的GLA的一个特别有用的区域是在宿主植物细胞的种子组织中。为了在种子中直接表达, 种子特异启动子可用于适和去饱和酶的直接表达。这种种子特异启动子包括如下文献所述, U. S. Patent No. 5, 623, 067, U. S. Patent No. 6, 342, 657, U. S. Patent No. 6, 642, 437。这些文献通过整体上引用而被合并于此, 为此特异序列作参考。

[0061] 宿主细胞的表达可以是瞬时表达或稳定表达。瞬时表达可由引入构建序列实现, 该序列含有在宿主细胞内作用的表达信号, 这里的构建序列在宿主细胞中不能复制, 也不

能和宿主细胞整合到一起或者说宿主细胞在这里是不增殖的。瞬时表达也可通过诱导连接到目的基因调节启动子的活性来实现,但这种可诱导的系统经常会出现低水平的表达。稳定表达可由整合到宿主基因或在宿主细胞可自主复制的构建序列的引入来实现。在技术的其它已知基因中,适合的选择标记包括由 pat (phosphothricin acetyl transferase) 基因提供的除草剂抗性和由 nptII (neomycin phosphotransferase) 基因提供的卡那霉素抗性。目的基因的稳定表达可通过利用位于或转染表达构建序列的选择标记来选择,之后表达标记细胞的选择。当稳定表达由整合引起时,构建序列的整合就在宿主细胞基因中随机产生,还可以通过采用含有和宿主基因具有同源性区域的构建序列来定向产生,其中,构建序列是定位于内源性基因,全部或部分转录和翻译调节区域可由内源性基因提供。

[0062] 对于种子中去饱和酶多肽的表达,需要一个种子特异启动子。例如,这个启动子包括油质蛋白或核丝启动子。油质蛋白启动子在 U. S. Patent No. 5, 792, 922 中有描述,核丝启动子 U. S. Patent No. 6, 777, 591 中有描述。

[0063] 当要表达超过一个以上的不同基因时,基因必需包含在一个单独构建序列或基因必需在分离的载体上。例如,技术中的一个技能就是练习选调节区域,选择方法,引入构建序列的增殖方法的正确选择,来获得目标产物合成所需所有酶的最佳的表达水平。

[0064] 包含目的基因的构建序列可由标准技术操作引入宿主细胞。这些技术包括转染,传染,基因枪,电穿孔术,微注射,刮术和其它一些向宿主细胞中引入目的基因的方法。(参见 U. S. Patent No. 4, 743, 548, U. S. Patent No. 4, 795, 855, U. S. Patent No. 5, 068, 193, U. S. Patent No. 5, 188, 958, U. S. Patent No. 5, 463, 174, U. S. Patent No. 5, 565, 346, U. S. Patent No. 5, 565, 347)。简而言之,宿主细胞经由任何方法处理接受一个 DNA 序列或构建序列都涉及到此处的“转化”或“重组”。目的宿主需至少有一个表达构建序列的拷贝,或有两个以上,取决于基因是否能整合到基因中一个以上位点上,且在一个位点上有多个的拷贝,是否被放大或出现在有多个拷贝数的染色体外因子中。

[0065] 许多种植物转化方法都是已知的。 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶基因可通过叶盘转化再生过程 *Agrobacterium* 共培养引入植物。如文献 Horsch et al, *Science* 227 :1229, 1985 中所描述的。*Agrobacterium* 介导转化的其它方法还有如原生物的共培养 (Horsch et al., *Science* 223 :496, 1984 ; DeB iock et al, *EMBO J.* 2 :2143, 1984), 变异细胞的悬浮培养 (Barton et al., *Cell* 32 :1033, 1983), 花卉的真空侵入 (Bechtold et al., *CR Acad Scie III, Sci Vie* 316 :1194, 1993 ; Wang et al., *Plant Ceil Rep* 22 :274, 2003), 这些方法在本发明的范围中也可采用。首先来说,植物是由衍生 *Agrobacterium* 或固定化 *Agrobacterium* 载体转化而来,如文献 Klee et al., *Annu Rev Plant Physiol* 138 :467, 1987 中所描述的。然而,在植物细胞中插入本发明的 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶基因的其它方法也是有用的。这些可选的方法包括,基因枪法 (Klein et al., *Nature* 327 :70, 1987), 原生质体法 (Shillito and Potrykus, *Recombinant DNAMethodology* 687, 1989 ; Davey et al., *Plant Mol Biol* 13 : 273, 1989), 化学诱导 DNA 摄取法 (ToSpfer et al., *Plant Cell* 1 :133, 1989), 采用病毒或花粉 (Ohta, *PNAS* 83 :715, 1986) 作为载体的方法等。

[0066] 当需要采用转化方法时,本发明的 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶基因就可被插入植物转化载体中,如二元载体,在文献 Bevan (1984) *NucleicAcids Res.* 12, 8111 中有描述。植物转化载体可由 *Agrobacterium tumefaciens* 固有的基因转化系的修饰得到。这个固有的系统包

含有大片段 T-DNA 的 Ti (诱导肿瘤) 质粒, 这个 T-DNA 被转移到转化植物中。Ti 质粒的另一个片段, Vir 区, 主要负责 T-DNA 的转运。T-DNA 的边界含有末端重复序列。在修饰的双元载体中, Ti 基因被删除, 利用 Vir 区的功能转移以 T-DNA 边界序列为边界的外源 DNA 来。T 区域还包括一个抗菌素抗性的可选标记和转移的插入序列的多克隆位点。这种工程菌被称为 "disarmed" *A. tumefaciens* 菌株, 它允许以 T-区域作为边界的序列有效转化进入植物核基因。

[0067] 表面消毒的叶盘由含有 *A. tumefaciens* 的 "disarmed" 外源基因接种, 培养两天, 然后转移到含有抗生素的培养基中。在含有适量抗生素的培养基中植根后, 选择转化的芽并转移到土壤中生长。

[0068] 转化的宿主细胞可由含有引入构建序列的可选标记来鉴别。另外, 正如许多转化技术将许多 DNA 分子引入宿主细胞, 分离的标记构建序列可由目标构建序列引入。典型的, 具有在选择培养基生长能力的宿主被选择出来。选择培养基可加入一种抗生素或缺乏一种不转化宿主生长所需的必需因素, 例如, 营养因子和生长因子。当其在转化的宿主细胞中表达时, 引入的标记基因可以产生抗菌素抗性或编码必需生长因子或酶, 使其能在选择培养基中生长。卡那霉素抗性和氨基糖苷 G418 的抗性是我们期望获得的 (参见 U. S. Patent No. 5, 034, 322)。当表达的蛋白质标记直接或间接的被检测出时, 也可对转化的宿主进行选择。这个标记蛋白可以单独表达或和其它蛋白结合起来表达。标记蛋白可通过它的酶活性来检测。例如, 1, 3-半乳糖苷酶可将底物 X-gal 转化为颜色产物, 荧光酶可将萤光转化为发光产物。标记蛋白可由它的发光产物或修饰特性检测出来, 例如当有蓝光照射时, *Aequorea victoria* 绿色荧光蛋白会发荧光。抗体可用于检测标记蛋白或分子标记蛋白, 例如, 目的蛋白。可通过视觉上或采用如 FACS, 抗体淘洗等技术来选择表达标记蛋白或分子标记蛋白的细胞。

[0069] 红花的转化:

[0070] 至少有两种红花植物转化的基本方法:(1):由共培养的子叶诱导, 愈伤组织中芽的再生, (2) 由离体分生组织共培养直接产生的多芽再生。

[0071] 方法 1 包括接下来由 *Agrobacterium* 共培养的子叶外植体的愈伤组织的诱导 (Ying et al., *Plant Cell Rep* 11:581, 1992); Orlikowska et al., *PCTOC* 40:85, 1995)。这方法包括将离体子叶在愈伤诱导培养基 (MS 盐 B5 维他命) 中共培养 3 天。外植体转移到芽形成培养基中 (MS 盐, B5 维他命, 羧苄青霉素) 培养两天, 然后转移到含有卡那霉素的相同培养基中。2 到 3 周后, 再生的叶结构和下面的外植体组织一起转移到含有 Geneticin 的芽伸长培养基中。(1/2MS 盐和 MS 维他命)。再过 2 到 3 周, 延长的芽从原来的外植体组织中分离, 转移到相同的培养基中, 此处未转化芽或嵌合芽的切割末端迅速变成褐色, 而转基因芽仍然是健康的。健康的芽被转移到生根的培养基中 (MS 盐类和 MS 维他命), 长度至少为 10mm。一个外植体平均能再生 2 到 3 个芽。

[0072] 方法 2 中, 多个芽在 *Agrobacterium* 的共培养之前, 暂时由离体分生组织诱导 (Rao and Rohini, *Plant Biotechnol* 16:201, 1999); Rohini and Rao, *Annals Bot* 86:1043, 2000)。这包括用针来刺穿发芽种子的胚轴, 该发芽种子的子叶节中有一个子叶已被移除。在 28-30°C 下, 将这个胚胎浸渍在 Winans' AB 培养基的 *Agrobacterium* 的混悬液中并轻轻搅拌 10 分钟。接下来在半固体 MS 基本培养基中共培养 24 小时, 胚轴在含 500 μ g/ml 头孢

噻脞液体的 MS 基本培养基中轻轻搅拌 (80rpm) 充分清洗 1 小时, 放置在装有水的高压灭菌器 Soilrite (vermioulite equivalent) (Chowgule Industries Ltd. Bangalore, India.) 中灭菌, 使其在在生长室无菌条件下发芽生长。5 到 6 天后, 在幼体被转移到温室之前将其转移到植物盆罐的 Soilrite 中, 使其在生长室条件下至少生长 10 天。植物盆罐开始由聚乙烯袋覆盖来维持湿度。生长室维持在 26-28°C, 荧光周期为 14 小时的条件下。与方法 1 对比, 这个方法生长的大多数芽一般没有玻璃化现象。生长的植物可能是嵌合体的, 在这点上, 成功的转化基于 T-DNA 是否整合到产生生殖器官的分生细胞层中。这个方法大体上需要比方法 1 更多的原材料 (成熟的种子) 和生长室空间。

[0073] 本发明一个优先的方面是提供了能表达过量生产 GLA 的编码去饱和酶 DNA 的转基因植物或其后代。红花作为植物油的来源被广泛采用, 是一种有优势的宿主植物。红花植物细胞可通过上述任一种植物转化方法, 由编码 $\Delta 6$ 去饱和酶或编码 $\Delta 6$ 去饱和酶和 $\Delta 12$ 去饱和酶的分离 DNA 转化。通常在愈伤组织培养或叶盘中的转化红花植物细胞可通过已知方法再生到完整的转基因植物中 (例, Horsch et al., Science 227:1129, 1985)。因为转化红花植物的子代遗传编码去饱和酶基因的 DNA, 所以种子或转化植物的剪枝被用来维持转基因植物系。

[0074] 其中一个特别的方面, 这个方法包括将编码 $\Delta 6$ 去饱和酶的 DNA 引入无 GLA 或有少量 GLA 产生但有 LA 产生的红花植物的过程。另一方面, 这方法还包括将一个或多个表达型载体引入到 GLA 和 LA 缺乏的红花植物中, 该表达型载体是含有编码 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $\Delta 6$ 去饱和酶 DNA。相应的, 缺乏 GLA 和 LA 的红花植物通过 $\Delta 12$ 去饱和酶的表达诱导产生 LA, 然后由 $\Delta 6$ 去饱和酶的表达产生 GLA。包含编码 $\Delta 12$ 去饱和酶或 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $\Delta 6$ 去饱和酶 DNA 的表达载体可由所属技术领域的一般技术人员 (Sambrook et al., 1989) 已知的重组技术方法和公开的 $\Delta 12$ 去饱和酶的序列 (Wada et al., Nature (London) 347:200, 1990) 来构建。有关这个载体通过例子在此予以说明。

[0075] 含有 GLA 的油:

[0076] 红花植物中产生的 GLA 可利用如上所述的技术中已知方法从红花植物的不同器官特别是种子中获得。特别的是, 可收获种子并且通过压榨种子的方法从种子中提取油, 然后采用传统方法精炼。从红花植物种子中提取油的方法在技术领域是已知的, 可参考文献 Smith, J. R. Safflower, AOCS Press, pp. 185-212 (1996)。

[0077] 采用本发明和文献中的方法制备的 GLA 可作为游离脂肪酸或酯化形式, 如酰基甘油, 磷脂, 硫脂, 糖脂的形式存在于宿主植物组织和植物器官中, 并可通过技术中的多种已知方法从宿主细胞提取出来。这些方法包括有机溶剂提取法, 超声法, 利用二氧化碳或如压力以及它们相结合的物理方法的超临界流体提取法。可采用己烷, 丙烷, 丙酮或乙醇来提取。

[0078] 此处的 GLA 作为营养和个人护理品组分。有关营养组分发明的例子包括婴儿配方奶粉, 营养保健品, 饮食替代品, 补水成分等等。例如, 这些组分可以添加到任何类型的食物中, 包括人造奶油, 改性黄油, 乳酪, 牛奶, 酸奶, 巧克力, 糖果, 点心, 色拉油, 烹调油, 烹调用脂肪, 肉, 鱼和饮料等等。有关个人护理品组分的例子包括面霜, 香水, 保湿乳, 防晒和晒后修复乳, 洗发水, 护发素和唇膏等等。本发明的 GLA 的应用实例在如下专利中有描述 U. S. Patent Nos. 6, 635, 451 和 5, 709, 888, 这些例子通过整体上引用而被合并于此, 针对于

这些特殊的应用在此列举。

[0079] 在此引用的专利通过整体上引用而被合并于此。通过图解提供下面的例子，目的不是限制发明的范围。

[0080] 实施例 1 :质粒 pSBS4766 和表达这个质粒的转基因植物

[0081] 图 8 显示的是高山被孢霉中 $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶共同表达的构建序列图。这个构建序列的植物可选标记是 pat, pat 对应于绿色产色链霉菌中的 pat 基因。构建序列的细菌标记是 SpecR。该构建这个载体的基本双元载体为 pPZP200 的衍生物。参见 Hajdukiewicz et al. Plant Mol Biol 25 :989, 1994。含于 pPZP200 质粒边界序列中的插入序列如下所述。

[0082] 质粒 PSBS4766 (带有 pat 标记的 *M. alpina* $\Delta 6$, $\Delta 12$ 去饱和酶双表达盒子) (SEQ ID NO :1)

[0083] ctgcaggaattcgatctctattgattcaaattacgatctgatactgataacgtctagatTTTTAGGGT
[0084] taaagcaatcaatcacctgacgattcaaggtgggttgatcatgacgattccagaaaacatcaagcaagc
[0085] tctcaaagctacactctttgggatcactgaactctaacaacctcgttatgtcccgtagtccagtacag
[0086] acatcctcgtaactcggattgtgcacgatgccatgactataccaacctcggctcttggtcacaccagga
[0087] actctctggtaagctagctccactccccagaaacaaccggcgccaaattgcgcgaattgctgacctga
[0088] agacggaacatcatcgtcgggtccttggggcattgcggcggaagatgggtcagcttgggcttgagga
[0089] cgagaccgaatccgagctctgtgaaaaggttgttcattggggatttgtatacggagattggctcgtcga
[0090] aggtttgagggaaaggacaaatgggtttggctctggagaaagagagtgcggctttagagagagaatt
[0091] gagaggtttagagagagatgcggcggcgatgagcggaggagagacgcagaggacctgcattatca
[0092] aagcagtacgtggtgaaatttgaacttttaagaggcagatagatttattatttgtatccattttcttcattg
[0093] ttctagaatgtcgcggaacaaatTTTAAACTAAATCCTAAATTTTCTAATTTTGTGCCAATAGTGGATATG
[0094] TGGGCCGTATAGAAGGAATCTATTGAAGGCCAAACCCATACTGACGAGCCCAAAGGTTCTGTTTTGCGT
[0095] TTTATGTTTCGGTTCGATGCCAACGCCACATTCTGAGCTAGGCAAAAACAACGTGTCTTTGAATAGACT
[0096] CCTCTCGTTAACACATGCAGCGGCTGCATGGTGACGCCATTAAACGTGGCCTACAATTGCATGATGTCT
[0097] CCATTGACACGTGACTTCTCGTCTCCTTTCTTAATATATCTAACAAACTCCTACTCTTCCAAAATATATA
[0098] ACATTTTTGATCAATCTCTCATTCAAAATCTCATCTCTCTAGTAAACAAGAACAACCAATGGCTGCT
[0099] GCTCCAGTGTGAGGACGTTTACTCGGGCCGAGGTTTTGAATGCCGAGGCTCTGAATGAGGGCAAGAA
[0100] GGATGCCGAGGCACCCTTCTTGATGATCATCGACAACAAGGTGTACGATGTCCGCGAGTTCGTCCCTGA
[0101] TCATCCCGTGGAAAGTGTGATCTCACGCACGTTGGCAAGGACGGCACTGACGTCTTTGACACTTTTCA
[0102] CCCGAGGCTGCTTGGGAGACTCTTGCCAACCTTTACGTTGGTGATATTGACGAGAGCGACCCGATATC
[0103] AAGAAATGATGACTTTGCGCCGAGGTCGCAAGCTGCGTACCTTGTTCAGTCTCTTGGTTACTACGATTC
[0104] TTCCAAGGCATACTACGCTTCAAGGTCTCGTTCAACCTCTGCATCTGGGGTTGTGACGCGTCATTGTGG
[0105] CCAAGTGGGGCCAGACCTCGACCCTGCCAACGTGCTCTCGGCTGCGCTTTTGGGCTGTCTTGGCAG
[0106] CAGTGCAGGATGGTTGGCTCACGACTTTTTGCATCACCAGGTCTTCCAGGACCGTTTCTGGGGTGATCTTT
[0107] CGGCGCCTTCTTGGGAGGTGTCTGCCAGGGCTTCTCGTCTCTGTTGGTGGAAAGGACAAGCACAACACTC
[0108] ACCACGCCGCCCCAACGTCCACGGCGAGGATCCCACATTTGACACCCACCCTCTGTTGACCTGGAG
[0109] TGAGCATGCGTTGGAGATGTTCTCGGATGTCCCAGATGAGGAGCTGACCCGCAATGGTTCGCTTTTCA
[0110] GGTCTGAACCAGACCTGGTTTTACTTCCCCATTCTCTCGTTTGGCCGTCTCTCTGGTGCCTCCAGTCCATT
[0111] CTCTTTGTGCTGCCTAACGGTCAGGCCACAAGCCCTCGGGCGCGCGTGTGCCCATCTCGTTGGTCTGA

[0112] gcagctgtcgtttgcgatgcactggacctggtacctcgccaccatgttctctgttcatcaaggatcccgtc
[0113] aacatgctgggtgtactttttgggtgctgcaggcgggtgtgcggaaacttgttggcgatecgtgttctcgcgtcaa
[0114] ccacaacgggtatgcctgtgatctcgaaggaggaggcggctgatatggatttcttcacgaagcagatca
[0115] tcacgggtcgtgatgtccaccgggtctattttgccaactggttcacgggtggattgaactatcagatcga
[0116] gcaccacttgttcccttcgatgcctcgccacaacttttcaaagatccagcctgctgtcgagaccctgtgc
[0117] aaaaagtacaatgtccgataccacaccaccgggtatgatcgagggaactgcagaggctcttagccgtct
[0118] gaacgaggctctccaaggctgcctccaagatgggtaaggcgcagtaagcttgttaccctactgatgtca
[0119] tcgtcatagtccaataactccaatgtcggggagttagtttatgaggaataaagtgtttagaatttgatcag
[0120] ggggagataataaaagccgagttgaatctttttgttataagtaatgtttatgtgtgttctatatgttgtcaa
[0121] atgggtccatgttttcttctctctttttgtaacttgcaagtgttgtgtgtactttatttggctctttgtaaagt
[0122] ggtaacgggtggtctatataatggaaaaggcttgtttgttaaacttatgttagttaactggattcgtctttaac
[0123] cacaaaaagtttcaataagctacaaatttagacacgcaagccgatgcagtcatttagtacatataatttattg
[0124] caagtgattacatggcaacccaaacttcaaaaacagtaggttgcctcatttagtaacctgaattgcctcct
[0125] gattctagttgatcccgtaccgaattccaggaatcgatctctattgattcaaatcagatctgatactgat
[0126] aacgtctagatttttagggttaaagcaatcaatcacctgacgattcaaggtggttggatcatgacgattcc
[0127] agaaaacatcaagcaagctctcaaagctacactctttgggatcatactgaactctaacaacctcgttatgt
[0128] cccgtagtgccagtacagacatcctcgtaactcggattgtgcacgatgccaatgactataaccaacctcg
[0129] gtcttggtcacaccaggaactctctggtaagctagctccactccccagaaacaaccggcgccaaattg
[0130] cgcaattgctgacctgaagacggaacatcatcgtcgggtccttgggcgattgcggcggaagatggg
[0131] tcagcttgggcttgaggacgagaccgaatccgagctctgttgaaggttgttcaattggggatttgtata
[0132] cggagattggctcgtcgagaggtttgagggaaggacaaaatgggttggctctggagaaagagagtgc
[0133] ggctttagagagagaattgagaggtttagagagagatgcggcgcgatgagcggaggagagacga
[0134] cgaggacctgcattatcaaagcagtgacgtggtgaaatttggaaactttaaaggcagatagatttattat
[0135] ttgtatccatttcttctcattgttctagaatgtcgggaacaaattttaaactaaatcctaaatttctaat
[0136] ttgccaatagttgatatgtgggcccgtatagaaggaatctattgaaggcccaaacccatactgacgagc
[0137] ccaaaggttcgttttgcgttttatgtttcggttcgatgccaacgccacattctgagctaggcaaaaaacaa
[0138] acgtgtctttgaatagactcctctcgttaacacatgcagcggctgcatggtgacgccattaacacgtggc
[0139] ctacaattgcatgatgtctccattgacacgtgacttctcgtctcctttcttaatatatctacaacacactccta
[0140] cctcttccaaaatataacacatcttttgatcaatctctcattcaaaaatctcattctctctagtaacaagaa
[0141] caaaaaacctatggcaccctcccaacactatcgatgccgggttggaccagcgtcatalcagcaccctcgcc
[0142] cccaaactcggccaagcctgccttcgagcgaactaccagctccccgagttcaccatcaaggagatc
[0143] cgagagtgcacccctgcccactgctttgagcgcctccggctcctcctgacctgcccacgttgccatcgat
[0144] ctgacttgggctcgtctcttgttccctggctgcgaccagatcgacaagtttgagaatcccttgatccgct
[0145] atttggcctggcctgtttactggatcatgcagggtattgtctgcaccgggtcttgggtgctggctcacga
[0146] gtgtggtcaccagtccttctcgacctccaagacctcaacaacacagttggttggatcttgcactcgatg
[0147] ctcttggteccctaccactcctggagaatctcgcactcgaagcaccacaaggccactggccatatgac
[0148] caaggaccaggtctttgtgccaagaccgcctcccaggttggcttgcctcccaaggagaacgctgct
[0149] gctgccgttcaggaggaggacatgtccgtgcacctggatgaggaggctcccattgtgactttgttctgg
[0150] atggtgatccagttcttgttcggatggcccgcgtacctgattatgaacgccctcggccaagactacggc

[0190] actctgtgtagtttaagatcgagtgaaagtagattttgtctatatttattaggggtatttgatatgctaattggt

[0191] aaacatggtttatgacagcgtacttttttggttatggtgttgacgtttccttttaaacattatagtagcgtcctt

[0192] ggtctgtgttcattgggtgaacaaaggcacactcacttggagatgccgtctccactgatatttgaacaaa

[0193] 采用这个构建序列的红花的转化由 SemBioSys Genetics Inc. (Calgary, Canada) 公司完成。SemBioSys Genetics Inc. 公司采用的技术可参考 WO 2004/111244, 这个专利因为整体被引用而被合并于此。转基因植物是生长的, 是收获种子的。

[0194] 脂肪酸浓度的测量是在转基因植物的种子中完成的。从转基因植物中收集种子, 采用 "Official Methods and Recommended Practices of the AOCS", 5th Ed., Method Ce 1-62, American Oil Chemists Society: Champaign, Illinois (1997) 中所描述方法的改进方法, 由气相色谱法确定脂肪酸组分。在这个方法中, 油是由正己烷从种子中提取出来的, 再经盐酸水解, 与甲醇反应形成甲酯。甲酯由气相色谱内标法来定量。

[0195] 表达 pSBS4766 构建序列的转基因植物 T1 种子的 10 个种子库的脂肪酸组分由表 1 给出。Δ6 去饱和酶基因的活性由转基因植物系中 GLA 的存在来表明。在表 1 S317 对照系中 GLA 的浓度范围 0.03%~0.04% 时, 在 T1 种子库中的浓度范围 0.5%~30.8%。这里 GLA 的浓度增加了超过 50 倍。在 GLA 含量最高的系中, 可以看到 18:4 有小的但是很显著的增加。我们希望, Δ6 去饱和酶基因可作用于由 18:2 来产生 GLA 和作用于 18:3 (ALA) 来产生 18:3。Δ12 去饱和酶的活性可由 18:1 中脂肪酸的减少来表明。在表 1 中 S317 对照系中, OA 的浓度范围 73.76%~75.8%, 在转基因系的浓度范围 3.68%~73.51%。总之, 这个数据显示的是本发明获得的红花产生 GLA 的浓度的一个广泛的范围。

[0196] 表 1 :S317 中表达的 pSBS4766 构建序列的 T1 种子的 10 个种子库中的脂肪酸组成 (百分数表示)。由棕榈酸 (C16:0), 硬脂酸 (C18:0), 油酸 (C18:1), 亚油酸 (C18:2) 组成。

[0197] S317 对照系中单粒种子样品的脂肪酸组成由表 2 给出。其中有四个重复 (S0-1, S0-2, S0-3, S0-4)。单粒种子数据与 10 个种子库数据相似

[0198]

表 1 系号 1	C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:2	C18:2n6	C18:3n6	C18:3n3	C18:4n3
4766-24	7.40	1.87	3.68		53.00	30.80	0.66	0.17
4766-12	6.77	1.78	3.69		54.22	30.48	0.68	0.16
4766-27	6.71	1.78	18.73		46.82	23.18	0.60	0.13
4766-1	6.52	1.64	20.06		45.88	22.35	0.99	0.13
4766-30	6.44	1.63	17.51		56.99	15.16	0.34	0.02
4766-21	5.91	1.64	17.04		58.00	15.11	0.52	0.03
4766-11	6.06	1.56	14.38		60.75	14.99	0.44	0.04
4766-26	6.34	1.66	15.64		61.66	12.48	0.39	
4766-13	5.83	1.67	27.48		49.92	12.30	0.72	0.04
4766-19	5.94	1.74	23.34		55.54	11.08	0.44	0.02
4766-10	5.70	1.53	24.56		57.28	8.68	0.40	0.01
4766-5	5.31	1.73	33.82		48.63	8.24	0.38	0.01
4766-31	5.27	1.51	46.85		36.17	7.77	0.30	0.01
4766-4	4.50	1.34	73.51	1.89	11.14	5.08	0.32	0.01
4766-14	5.40	1.66	11.74		74.16	4.93	0.37	0.01
4766-41	4.74	1.58	54.76	0.66	33.36	2.66	0.16	
4766-22	5.13	1.5	58.60		31.92	0.50	0.21	
Centennial	6.94	1.88	11.31		76.74	0.07	0.38	
S317	4.92	2.25	73.76		16.34	0.04	0.28	
S317	4.72	2.31	74.73		15.76	0.04	0.07	
S317	4.57	2.25	75.80		14.96	0.03	0.07	

[0199] 表 2 :对照系 (S317, S0 表示) 中四个单粒种子样品中的脂肪酸组成。

表 2: 脂肪酸	S0-1	S0-2	S0-3	S0-4
C10:0	0.7%	0.3%	0.5%	0.5%
C11:0	0.3%	0.1%	0.3%	0.2%
C12:0	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%
C13:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C14:0	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%
C14:1w5	0.2%	0.0%	0.1%	0.1%
C15:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C15:1w5cis	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%
C16:0	6.0%	6.2%	5.7%	5.7%
C16:1w7c	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%
C17:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C17:1w7	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
C18:0	3.2%	1.8%	3.4%	1.7%
C18:1w9t	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C18:1w9c	73.0%	74.2%	74.3%	75.6%
INTERNAL STANDARD				
C18:2w6t	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%
C18:2w6c	13.6%	14.8%	12.9%	13.5%
C20:0	0.4%	0.5%	0.5%	0.5%
C18:3w6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:1w9	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
C18:3w3	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C21:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C20:2w6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:0	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
C20:3w6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:1w9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:3w3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:4w6 (AA)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C23:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:2w6	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%
C24:0	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
C20:5w3 (EPA)	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
C24:1w9c	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%
C22:6w3 (DHA)	0.3%	0.1%	0.1%	0.1%
脂肪酸总计	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
饱和脂肪酸	11.8%	9.8%	11.5%	9.6%
W7 和 W5 的总量	0.4%	0.3%	0.4%	0.4%
W9 的总量	73.4%	74.6%	74.6%	76.0%
W6 的总量	13.8%	14.9%	13.1%	13.7%

[0200]

[0201]

表 2: 脂肪酸	S0-1	S0-2	S0-3	S0-4
W3 的总量	0.5%	0.2%	0.2%	0.2%
单不饱和脂肪酸总量	73.7%	74.9%	75.0%	76.4%
反式脂肪酸总量	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%
多不饱和脂肪酸总量	14.2%	15.1%	13.3%	13.9%
比率:				
多不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸	1.2	1.5	1.2	1.5
W6/W3	30.1	72.5	61.6	60.8
AA / EPA	0.2	0.1	1.0	0.8
AA / DHA	0.0	0.1	0.4	0.4

[0202] 表达 pSBS4766 构建序列的转基因植物的 5 个系 (S1, S4, S5, S24, S27) 的单粒种子的脂肪酸组成由表 3 ~ 7 给出。提供了 8 ~ 9 个重复种子数据。若有需要,可提供每个转基因序列的 NULL 对照系的单粒种子来作对照。

脂肪酸	NULL	S1-1	S1-2	S1-3	S1-4	S1-5	S1-6	S1-7	S1-8
C10:0	0.6%	0.6%	0.4%	0.6%	0.5%	0.4%	0.4%	0.1%	0.6%
C11:0	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%
C12:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C13:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C14:0	0.1%	0.3%	0.3%	0.3%	0.2%	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%
C14:1w5	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C15:0	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C15:1w5cis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C16:0	5.4%	6.1%	8.7%	8.9%	8.5%	8.0%	8.6%	8.9%	8.2%
C16:1w7c	0.2%	0.3%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%
C17:0	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%
c17:1w7	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C18:0	2.2%	1.6%	3.2%	2.5%	1.4%	3.6%	2.9%	1.4%	2.1%
C18:1w9t	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C18:1w9c	74.9%	59.8%	0.7%	0.8%	0.8%	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%
C18:2w6t	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C18:2w6c (LA)	14.0%	27.3%	37.8%	33.7%	48.9%	47.7%	41.4%	39.3%	41.0%
C20:0	0.3%	0.3%	0.3%	0.4%	0.3%	0.3%	0.2%	0.3%	0.3%
C18:3w6 (GLA)	0.0%	1.4%	46.1%	49.7%	37.0%	36.7%	43.4%	46.8%	44.5%
C20:1w9	0.3%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%

[0203]

C18:3w3, (ALA)	0.1%	0.1%	0.5%	0.6%	0.5%	0.6%	0.5%	0.8%	0.6%
C21:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%
C20:2w6	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C22:0	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.1%
C20:3w6 (DGLA)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:1w9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:3w3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:4w6 (AA)	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C23:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:2w6	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C24:0	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C20:5w3 (EPA)	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C24:1w9c	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C22:6w3 (DHA)	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.0%
脂肪酸总计	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
饱和脂肪酸	9.6%	9.9%	13.9%	13.9%	11.8%	13.3%	13.1%	11.6%	12.3%
W7 和 W5 的总量	0.3%	0.5%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.2%	0.4%
W9 的总量	75.4%	60.3%	0.9%	1.1%	1.0%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%
W6 的总量	14.1%	28.8%	84.1%	83.7%	86.0%	84.6%	84.9%	86.3%	85.7%
W3 的总量	0.4%	0.4%	0.8%	0.8%	0.8%	0.8%	0.8%	1.0%	0.7%
单不饱和脂肪酸的总量	75.7%	60.7%	1.2%	1.4%	1.3%	1.1%	1.2%	1.1%	1.3%

[0204]

[0205]

反式脂肪酸的总量	0.1%	0.2%	0.0%	0.2%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
多不饱和脂肪酸	14.5%	29.2%	84.9%	84.5%	86.8%	85.5%	85.7%	87.3%	86.4%
							%		%
比率:									
多不饱和脂肪酸/ 饱和脂肪酸	1.5	3.0	6.1	6.1	7.3	6.4	6.6	7.5	7.0
W 6/W 3	35.3	75.7	109.0	99.3	108.2	100.1	105.3	83.6	127.4
AA / EPA	0.4	0.4	0.6	0.5	0.4	0.7	0.7	1.2	0.6
AA / DHA	0.1	0.1	0.3	0.5	0.3	0.3	0.3	0.4	4.2

[0206]

表 4		S4 对照系中单粒种子样品的脂肪酸组成								
脂肪酸	NULL	S4-1	S4-2	S4-3	S4-4	S4-5	S4-6	S4-7	S4-8	S4-9
C10:0	0.6%	0.7%	0.7%	0.6%	0.5%	0.8%	0.4%	0.5%	1.0%	0.6%
C11:0	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.3%	0.2%
C12:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%
C13:0	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%
C14:0	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%	0.4%	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%
C14:1w5	0.1%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%
C15:0	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C15:1w5cis	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C16:0	5.8%	5.4%	5.3%	6.0%	6.4%	6.5%	5.2%	5.5%	5.7%	5.9%
C16:1w7c	0.3%	0.3%	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%	0.2%	0.3%	0.3%
C17:0	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%
C17:1w7	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%
C18:0	2.6%	1.2%	1.5%	1.7%	4.9%	2.4%	1.5%	1.5%	1.1%	2.5%
C18:1w9t	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
C18:1w9c	75.0%	76.8%	63.0%	75.4%	72.2%	71.0%	74.5%	74.7%	73.7%	73.6%
INTERNAL STANDARD										
C18:2w6t	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%
C18:2w6c (LA)	12.8%	6.0%	12.5%	4.2%	3.6%	7.7%	5.4%	4.7%	7.4%	4.3%
C20:0	0.3%	0.3%	0.3%	0.4%	0.4%	0.4%	0.3%	0.4%	0.3%	0.4%
C18:3w6 (GLA)	0.0%	6.9%	13.7%	9.5%	8.9%	8.2%	10.4%	10.3%	8.0%	9.9%
C20:1w9	0.3%	0.3%	0.4%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
C18:3w3 (ALA)	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C21:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%
C20:2w6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%
C22:0	0.2%	0.2%	0.3%	0.2%	0.2%	0.3%	0.2%	0.3%	0.3%	0.3%
C20:3w6 (DGLA)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:1w9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:3w3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:4w6 (AA)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C23:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:2w6	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%
C24:0	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%
C20:5w3 (EPA)	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%
C24:1w9c	0.2%	0.2%	0.3%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
C22:6w3 (DHA)	0.2%	0.0%	0.1%	0.2%	0.4%	0.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.2%
脂肪酸总计	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
饱和脂肪酸	10.7%	8.8%	9.1%	9.7%	13.8%	11.6%	8.5%	9.1%	9.6%	10.8%

[0207]

W7 和 W5 的总量	0.5%	0.6%	0.5%	0.3%	0.3%	0.4%	0.4%	0.3%	0.5%	0.4%
W9 的含量	75.5%	77.2%	63.7%	75.9%	72.6%	71.5%	74.9%	75.2%	74.2%	74.1%
W6 的含量	12.9%	13.0%	26.2%	13.8%	12.7%	16.0%	15.9%	15.1%	15.5%	14.3%
W3 的含量	0.4%	0.2%	0.4%	0.3%	0.5%	0.4%	0.2%	0.1%	0.2%	0.3%
单不饱和脂肪酸的总量	75.9%	77.8%	64.2%	76.1%	72.9%	71.9%	75.3%	75.6%	74.7%	74.5%
反式脂肪酸总量	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%
多不饱和脂肪酸总量	13.3%	13.1%	26.6%	14.0%	13.1%	16.4%	16.1%	15.2%	15.7%	14.5%
比率:										
多不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸	1.2	1.5	2.9	1.4	1.0	1.4	1.9	1.7	1.6	1.3
W6/W 3	35.3	76.9	69.1	50.9	27.1	42.6	85.3	104.7	79.0	55.2
AA / EPA	0.3	0.3	0.3	0.5	0.6	0.3	0.5	0.1	0.1	0.1
AA / DHA	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0

表 5	S5 对照系中单粒种子样品的脂肪酸组成										
脂肪酸	NULL	S5-1	S5-2	S5-3	S5-4	S5-5	S5-6	S5-7	S5-8	S5-9	
C10:0	0.5%	0.3%	2.6%	0.6%	0.6%	0.4%	0.4%	0.5%	0.2%	0.6%	
C11:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.6%	0.2%	
C12:0	0.2%	0.1%	0.6%	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.3%	0.2%	
C13:0	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	
C14:0	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%	0.2%	0.3%	1.0%	0.2%	
C14:1w5	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	
C15:0	0.1%	0.1%	0.3%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.3%	0.1%	
C15:1w5cis	0.0%	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	
C16:0	5.5%	7.4%	8.3%	6.8%	7.4%	7.9%	7.2%	7.7%	12.9%	8.0%	
C16:1w7c	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.4%	0.3%	
C17:0	0.1%	0.1%	0.3%	0.1%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.7%	0.2%	
c17:1w7	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	
C18:0	1.6%	1.7%	2.8%	1.6%	1.6%	4.4%	1.5%	2.2%	10.5%	1.5%	
C18:1w9t	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
C18:1w9c	75.9%	0.7%	1.0%	0.7%	0.7%	0.8%	0.7%	0.7%	0.8%	0.9%	
INTERNAL STANDARD											
C18:2w6t	0.1%	0.0%	0.6%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	
C18:2w6c (LA)	13.5%	67.2%	69.9%	76.5%	67.2%	70.9%	67.1%	64.7%	52.0%	74.2%	
C20:0	0.4%	0.3%	0.4%	0.2%	0.3%	0.3%	0.2%	0.2%	0.5%	0.3%	
C18:3w6 (GLA)	0.0%	20.4%	10.6%	11.2%	19.9%	12.9%	21.1%	21.4%	16.3%	11.7%	
C20:1w9	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	
C18:3w3, (ALA)	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.7%	0.3%	

[0208]

表 5	S5 对照系中单粒种子样品的脂肪酸组成									
脂肪酸	NULL	S5-1	S5-2	S5-3	S5-4	S5-5	S5-6	S5-7	S5-8	S5-9
C21:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%
C20:2w6	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C22:0	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%
C20:3w6 (DGLA)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:1w9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:3w3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:4w6 (AA)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C23:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:2w6	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%
C24:0	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%
C20:5w3 (EPA)	0.0%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%
C24:1w9c	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%	0.3%	0.2%
C22:6w3 (DHA)	0.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.3%	0.1%	0.1%	0.7%	0.1%
脂肪酸总计	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
饱和脂肪酸	9.3%	10.6%	16.0%	10.4%	11.1%	14.1%	10.2%	12.0%	27.8%	11.8%
W7 和 W5 总量	0.3%	0.3%	0.7%	0.2%	0.3%	0.3%	0.2%	0.3%	0.8%	0.5%
W9 的总量	76.3%	1.0%	1.3%	1.1%	1.0%	1.1%	0.9%	1.0%	1.2%	1.3%
W6 的总量	13.6%	87.7%	81.0%	87.9%	87.2%	84.0%	88.3%	86.3%	68.6%	86.0%
W3 的总量	0.3%	0.3%	0.4%	0.3%	0.3%	0.5%	0.3%	0.3%	1.5%	0.4%
单不饱和脂肪酸	76.7%	1.3%	1.9%	1.3%	1.3%	1.4%	1.1%	1.3%	1.9%	1.7%
反式脂肪酸	0.1%	0.0%	0.6%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%
多不饱和脂肪酸	13.9%	88.1%	81.4%	88.2%	87.5%	84.4%	88.6%	86.6%	70.2%	86.4%
比率:										
多不饱和脂肪酸/ 饱和脂肪酸	1.5	8.3	5.1	8.5	7.9	6.0	8.7	7.2	2.5	7.3
W 6/W 3	44.5	260.6	180.6	293.7	299.0	183.9	258.7	276.3	44.4	207.7
AA / EPA	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4
AA / DHA	0.0	0.1	0.3	0.6	0.4	0.0	0.1	0.1	0.0	0.4

[0209]

表 6	S24 对照系中单粒种子样品的脂肪酸组成									
脂肪酸	S24-1	S24-2	S24-3	S24-4	S24-5	S24-6	S24-7	S24-8	S24-9	S24-10
C10:0	0.3%	0.5%	0.5%	0.7%	0.4%	0.5%	0.3%	0.4%	0.3%	0.5%
C11:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

[0210]

表 6	S24 对照系中单粒种子样品的脂肪酸组成									
脂肪酸	S24-1	S24-2	S24-3	S24-4	S24-5	S24-6	S24-7	S24-8	S24-9	S24-10
C12:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C13:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C14:0	0.3%	0.3%	0.2%	0.5%	0.3%	0.5%	0.3%	0.2%	0.3%	0.2%
C14:1w5	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
C15:0	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%
C15:1w5cis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C16:0	7.3%	6.7%	7.1%	8.4%	8.2%	9.8%	7.3%	6.5%	7.9%	5.4%
C16:1w7c	0.1%	0.1%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%
C17:0	0.2%	0.2%	0.1%	0.3%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%
c17:1w7	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.5%	0.5%
C18:0	3.0%	2.7%	2.9%	4.9%	3.9%	5.3%	3.4%	1.7%	3.6%	2.1%
C18:1w9t	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C18:1w9c	3.7%	4.2%	4.7%	2.5%	3.7%	2.0%	5.3%	3.3%	3.4%	73.9%
INTERNAL STANDARD										
C18:2w6t	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C18:2w6c (LA)	50.8%	53.1%	57.3%	35.3%	47.1%	35.6%	51.8%	54.9%	50.0%	8.4%
C20:0	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.2%	0.2%	0.3%
C18:3w6 (GLA)	32.1%	30.4%	25.3%	43.7%	34.0%	43.3%	29.3%	30.7%	31.7%	6.4%
C20:1w9	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.3%
C18:3w3 (ALA)	0.3%	0.3%	0.3%	0.5%	0.3%	0.5%	0.3%	0.4%	0.4%	0.1%
C21:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C20:2w6	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C22:0	0.2%	0.2%	0.1%	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.3%
C20:3w6 (DGLA)	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:1w9	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:3w3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:4w6 (AA)	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C23:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:2w6	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C24:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%
C20:5w3 (EPA)	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%
C24:1w9c	0.1%	0.1%	0.1%	0.3%	0.1%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%
C22:6w3 (DHA)	0.3%	0.1%	0.2%	0.4%	0.2%	0.2%	0.2%	0.0%	0.2%	0.3%
脂肪酸总计	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
饱和脂肪酸	11.9%	11.1%	11.5%	16.0%	13.9%	17.5%	12.1%	9.7%	13.0%	9.5%
W7 和 W5 总量	0.1%	0.2%	0.2%	0.4%	0.3%	0.2%	0.3%	0.2%	0.6%	0.8%
W9 的总量	4.0%	4.5%	4.9%	3.0%	4.0%	2.2%	5.6%	3.6%	3.6%	74.3%
W6 的总量	83.2%	83.7%	82.8%	79.4%	81.2%	79.2%	81.3%	85.8%	81.9%	14.9%

[0211]

脂肪酸	S24-1	S24-2	S24-3	S24-4	S24-5	S24-6	S24-7	S24-8	S24-9	S24-10
W3 的总量	0.7%	0.5%	0.5%	1.1%	0.6%	0.8%	0.5%	0.6%	0.7%	0.4%
单不饱和脂肪酸	4.2%	4.6%	5.2%	3.4%	4.2%	2.5%	6.0%	3.8%	4.3%	75.1%
反式不饱和脂肪酸	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
多不饱和脂肪酸	83.9%	84.2%	83.3%	80.5%	81.9%	79.9%	81.8%	86.4%	82.6%	15.3%
比率:										
多不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸	7.1	7.6	7.2	5.0	5.9	4.6	6.7	8.9	6.4	1.6
W6/W3	111.6	162.9	162.1	73.1	128.9	102.1	169.0	149.7	112.7	37.8
AA / EPA	0.5	0.4	0.6	0.6	0.7	1.0	0.7	0.4	0.4	0.3
AA / DHA	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.8	0.2	0.0

[0212]

	NULL	S27-1	S27-2	S27-3	S27-4	S27-5	S27-6	S27-7	S27-8
C10:0	0.6%	0.6%	0.4%	0.4%	0.6%	0.4%	0.5%	0.3%	0.4%
C11:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C12:0	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C13:0	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
C14:0	0.4%	0.4%	0.3%	0.3%	0.4%	0.2%	0.3%	0.3%	0.3%
C14:1w5	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%	0.1%
C15:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C15:1w5cis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C16:0	7.4%	8.0%	8.7%	10.6%	8.6%	7.6%	9.0%	8.9%	8.1%
C16:1w7c	0.3%	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%
C17:0	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.3%
c17:1w7	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.4%	0.6%	0.3%	0.1%
C18:0	5.0%	3.6%	3.6%	3.7%	5.1%	3.0%	4.1%	2.7%	3.7%
C18:1w9t	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C18:1w9c	66.9%	2.8%	1.8%	3.2%	3.4%	3.7%	3.4%	1.6%	3.4%
INTERNAL STANDARD									
C18:2w6t	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
C18:2w6c (LA)	16.2%	46.6%	31.5%	48.8%	45.4%	55.7%	50.8%	35.7%	53.3%
C20:0	0.5%	0.3%	0.4%	0.5%	0.4%	0.2%	0.5%	0.3%	0.3%
C18:3w6 (GLA)	0.0%	34.4%	50.7%	29.8%	33.1%	26.8%	28.1%	47.7%	27.8%
C20:1w9	0.3%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C18:3w3 (ALA)	0.2%	0.6%	0.6%	0.5%	0.5%	0.5%	0.7%	0.7%	0.4%
C21:0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%
C20:2w6	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C22:0	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%
C20:3w6 (DGLA)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

[0213]

表 7	S27 对照系中单粒种子样品的脂肪酸组成								
	NULL	S27-1	S27-2	S27-3	S27-4	S27-5	S27-6	S27-7	S27-8
C22:1w9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:3w3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:4w6 (AA)	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%
C23:0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C22:2w6	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C24:0	0.2%	0.2%	0.1%	0.3%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%
C20:5w3 (EPA)	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%
C24:1w9c	0.3%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%
C22:6w3 (DHA)	0.3%	0.3%	0.1%	0.3%	0.4%	0.1%	0.0%	0.0%	0.3%
脂肪酸总量	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
饱和脂肪酸	15.1%	14.0%	14.4%	16.6%	15.9%	12.2%	15.4%	13.2%	13.7%
W7 和 W5 的总量	0.4%	0.5%	0.3%	0.3%	0.7%	0.6%	1.0%	0.5%	0.3%
W9 的总量	67.4%	3.1%	2.1%	3.4%	3.6%	3.9%	3.7%	1.8%	3.7%
W6 的总量	16.4%	81.2%	82.5%	78.8%	78.7%	82.7%	79.0%	83.6%	81.3%
W3 的总量	0.6%	1.0%	0.7%	0.8%	0.9%	0.6%	0.8%	0.8%	0.8%
单不饱和脂肪酸总量	67.9%	3.6%	2.4%	3.7%	4.3%	4.5%	4.7%	2.3%	4.0%
反式脂肪酸总量	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.2%
多不饱和脂肪酸	17.0%	82.2%	83.2%	79.6%	79.6%	83.3%	79.8%	84.4%	82.1%
比率:									
多不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸	1.1	5.9	5.8	4.8	5.0	6.8	5.2	6.4	6.0
W 6/W3	29.3	78.7	113.9	95.8	83.3	139.2	102.0	109.9	107.0
AA / EPA	0.3	0.3	1.1	0.5	0.9	1.2	0.6	1.0	1.0
AA / DHA	0.1	0.1	0.8	0.2	0.1	0.7	2.6	1.3	0.2

[0214] 下面的单粒种子数据可在种子库数据中看到。因为 T1 系是分离的,所以由于无效的插入杂合型和插入纯合型,单粒种子样品中可出现一些差异。可以看出 GLA 的浓度范围是 1.4% (表 3:种子 1,1 系,S1-1) ~ 50.8% (表 7:种子 2,27 系,S27-2)。有种子油的系与从单粒种子数据或种子库数据获得的数据相似。这个系不能结实。能结实的系已被选择用于研究。

[0215] pSBS4766 构建序列表达系的 T1 和 T2 代种子的脂肪酸组成由下面表 8 给出。

[0216] 表 8:S317 中表达 pSBS4766 构建序列的 T1 和 T2 单系脂肪酸组成 (百分数表示)。

表 8 系号	代:	C18:3n6	C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:2n6
4766-12-4	T1	25.60	6.78	1.90	5.38	59.12
4766-12-4-6	T2	23.38	8.54	3.57	7.66	56.27
4766-21-25	T1	26.10	7.83	1.91	5.36	58.53
4766-21-25-2	T2	24.41	8.45	3.56	9.92	53.67
4766-21-10	T1	15.35	7.15	1.71	9.37	65.53
4766-21-10-7	T2	25.31	7.00	2.73	7.94	55.17
4766-70-43	T1	17.68	4.87	2.05	10.88	64.52
4766-70-43-9	T2	16.75	4.80	2.33	10.58	64.80
4766-110-10	T1	23.37	6.65	2.00	5.77	61.26
4766-110-10-25	T2	29.84	8.27	3.66	6.51	50.59
4766-110-11	T1	19.65	6.66	2.06	7.48	63.85
4766-110-11-32	T2	29.89	8.43	2.25	5.11	52.26
4766-95-4	T1	10.22	6.20	2.00	15.52	65.06
4766-95-4-1	T2	18.05	6.72	2.24	11.13	61.12
S317	VAR	0.00	5.29	2.72	74.81	16.10
S317	VAR	0.00	5.44	1.64	74.61	17.82

[0217]

[0218] T2 种子与测定的 T1 种子的脂肪酸组成一致。这些数据说明，转基因是稳定的，可遗传的，在 GLA 代际中 GLA 浓度产生了相同程度的提高。

[0219] 例 2：质粒 pSBS4119 和表达这个质粒的转基因植物

[0220] 图 9 显示的是 *Saprolegnia diclina* 中表达 $\Delta 6$ 去饱和酶的构建序列图。这个构建序列的植物可选标记是 pat, pat 对应于绿色产色链霉菌中的 pat 基因。构建序列的细菌标记是 SpecR。该构建这个载体的基本二元载体为 pPZP200 的衍生物。参见 Hajdukiewicz et al. *Plant Mol Biol* 25 :989, 1994。含于 pPZP200 质粒边界序列中的插入序列如下所述。

[0221] 质粒 PSBS4119 (带有 pat 标记的 *S. diclina* $\Delta 6$ 去饱和酶表达盒子) (SEQ ID NO :2)

[0222] ctgcaggaattcgatctctattgattcaaattacgatctgatactgataacgtctagatttttaggg

[0223] taaagcaatcaatcacctgacgattcaaggtgggttgatcatgacgattccagaaacatcaagcaagc

[0224] tctcaaagctacactcttgggatcactgaactctaacaacctggtatgtcccgtagtccagtagcag

[0225] acatctctgtaactcggattgtgacgatgccatgactataaccaacctcggctcttggtcacaccagga

[0226] actctctggtaagctagctccactccccagaaacaaccggcgccaaattgctgacactga

[0227] agacggaacatcatcgtcgggtccttgggcgattgcgggcgaagatgggtcagcttgggcttgagga

[0228] cgagaccgaatccgagctctgtgaaaaggttggtcattggggatttgatacggagattggctcgtcag

[0229] aggtttgagggaaaggacaaatgggtttggctctggagaaagagagtgcggcttagagagagaatt

[0230] gagaggttagagagagatgcggcgccgatgagcggaggagagacgacgaggacctgcattatca

[0231] aagcagtacgtggtgaaatttgaacttttaagaggcagatagatttattatttgtatccattttcttcattg

[0232] ttctagaatgtcgcggaacaaattttaaactaaatcctaaatttttctaatttggccaatagtgatgatg

[0233] tgggccgtatagaaggaatctattgaaggcccaaacccatactgacgagcccaagggttcgttttgcgt

[0234] tttatgtttcggttcgatgccaacgccacattctgagctaggcaaaaacaaacgtgtctttgaatagact

[0235] cctctcgttaacacatgcagcggctgcatggtgacgccattaacacgtggcctacaattgcatgatgtct

[0236] ccattgacacgtgacttctcgtctcctttcttaatatatacaaacactcctacctcttccaaaatatatac
[0237] acatctttttgatcaatctctcattcaaaatctcattctctctagtaaacaagaacaaaaacatggtccag
[0238] gggcaaaaggccgagaagatctcgtgggcgaccatccgtgagcacaaccgccaagacaacgcgtg
[0239] gatcgtgatccaccacaaggtgtacgacatctcggcctttgaggaccacccgggcggtcgtcatgt
[0240] tcacgcaggccggcgaagacgcgaccgatgcgttcgctgtcttccacccgagctcggcgctcaagct
[0241] cctcgagcagtactacgtcggcgacgtcgaccagtcgacggcggccgctcgacacgtcgatctcgga
[0242] cgaggtcaagaagagccagtcggacttcattgcgtcgtaccgcaagctgcgccttgaagtcaagcgc
[0243] ctcggttgtacgactcgagcaagctctactacctctacaagtgcgcctcgacgtgagcattgcgctt
[0244] gtgtcggcggccatttgcctccactttgactcgacggccatgtacatggtcggcgtgtcatccttggcc
[0245] tctttaccagcagtcggctggctcgcccatgactttctgcaccaccaagtgtttgagaaccacttgttt
[0246] ggcgacctcgtcggcgtcatggtcggcaacctctggcagggcttctcggcgcagtgggtggaagaaca
[0247] agcacaacacgcaccatgcgatcccaacctccacgcgacgcccagatcgcttccacggcgacc
[0248] cggacattgacacgatgccgattctcgcgtggtcgcctcaagatggcgcagcacgcggtcactcgcc
[0249] cgtcgggctcttcttcatgcgtaccaagcgtacctgtactttccatcttgccttttgcgcgtatctcgtg
[0250] ggtgatccagtcggccatgtacgccttctacaacgttgggcccggcggcacctttgacaaggtccagt
[0251] acccgctgctcgagcgcgcggcctctctctactacggctggaacctcggccttgtgtacgcagcc
[0252] aacatgtcgtcgtccaagcggctcgttctctttgtgagccaggcgtcgtcggcctcttctcgcg
[0253] atggtcttttagcgtcggccacaacggcatggaggtctttgacaaggacagcaagcccgatTTTTGGAA
[0254] gctgcaagtgtctcgcagcgcgaacgtgacgtcgtcgtcttgatcgactggttcatggcggcctca
[0255] actaccagatcgaccaccacttgttcccgatggtgccccggcacaacctcccggcgtcaacgtgctc
[0256] gtcaagtcgctctgcaagcagtagacatcccataccacgagacgggcttcatcgcgggcatggccg
[0257] aggtcgtcgtgcacctcgagcgcacatctcgatcgagttcttcaaggagtttcccgcgatgaagcttgtta
[0258] cccactgatgtcatcgtcatagtccaataactccaatgtcggggagttagtTTATGAGGAATAAAGTGT
[0259] tagaatttgatcagggggagataataaaagccgagtttgaaatcttttgttataagtaagtTTATGTGT
[0260] ctatatgtgtcaaatggtcccatgttttctctctcttttgttaacttgaagtggtgtgttactttatttgg
[0261] ctctttgttaagttggtaacggtggtctatatatggaaaaggtcttgtttgttaaacttatgttagttaaactgg
[0262] attcgtctttaaccacaaaaagtttcaataagctacaaatttagacacgcaagccgatgcagtcattagt
[0263] acatatatTTATTGCAAGTGATTACATGGCAACCCAAACTCAAAAACAGTAGGTGCTCCATTTAGTAACC
[0264] tgaattgcctctgattctagttgatcccgggtaccgaattcgaatccaaaaattacggatatgaatatagg
[0265] catatccgtatccgaattatccgtttgacagctagcaacgattgtacaattgcttctttaaaaaaggaaga
[0266] aagaaagaaagaaagaatcaacatcagcgttaacaaacggccccgttacggcccaaacggtcatat
[0267] agagtaacggcgttaagcgttgaaagactcctatcgaaatacgtaacggcaaacgtgtcatagtcagat
[0268] cccctcttcttaccgctcaaacacaaaaataatcttctacagctatatatacaaccccccttctatc
[0269] tctctttctcaaatteatctcttcttcttctaccccattttaaagaaatcctctcttctctctcttca
[0270] aggtaaatctctctctctctctctctctgttattccttgttttaattaggtatgtattattgctagtTTGTTAACT
[0271] gcttatcttatgtatgccttatgtgaatatctttatcttgttcatctcatccgTTAGAAGCTATAAATTTGTTGAT
[0272] ttgactgtgtatctacagtggttatgtttatatctaatcagatatgaatttcttcatattgttgcgtttgtgtgta
[0273] ccaatecgaaatcgttgatTTTTTCAATTAATCGTGTAGCTAATTGTACGTATACATATGGATCTACGTATCA
[0274] attgttcatctgtttgtgtttgtatgtatacagatctgaaaacatcacttctctcatctgattgtgtttgttacata

[0275] catagatatagatctgttatatcatttttttattaattgtgtatatatatatgtgcatagatctggattacatgatt
[0276] gtgattatttacatgattttgttatttacgtatgtatatatgtagatctggactttttggagttggtgacttgattg
[0277] tatttgtgtgtgtatatgtgtgttctgatcttgatatgttatgtatgtgcagccaaggctacgggcgatccac
[0278] catgtctccggagaggagaccagttgagattagggcagctacagcagctgatatggccgcggtttgtg
[0279] atatcgttaaccattacattgagacgtctacagtgaactttaggacagagccacaaacaccacaagagt
[0280] ggattgatgatctagagaggttgaagatagatacccttggttggtgctgaggttgagggtggttgtggc
[0281] tggatttgcttacgctgggccctggaaggctaggaacgcttacgattggacagttgagagtactgtttac
[0282] gtgtcacataggcatcaaaggttgggcttaggttccacattgtacacacatttgccttaagtctatggagg
[0283] cgcaaggttttaagtctgtggttgctgttataggccttccaaacgatccatctgttaggttgcatgaggctt
[0284] tgggatacacagcccgggttacattgcgcgcagctggatacaagcatggtggatggcatgatgttgg
[0285] tttttggcaaagggttttgagttgccagctcctccaaggccagttaggccagttaccagatctgagtc
[0286] gaccgaatgagttccaagatggtttgtgacgaagttagttggttggttttatggaactttgtttaagctagct
[0287] tgtaatgtggaagaacgtgtggctttgtggttttaaatgttggtgaataaagatgtttcctttggattaact
[0288] agtattttcctattggtttcatggttttagcacacaacatttaaatatgctgttagatgatatgctgctgctt
[0289] tattatttacttaccctcaccttcagtttcaaagttgttgaatgactctgtgtagtttaagatcgagtgaaa
[0290] gtagattttgtctatattttattaggggtatttgatgctaatggtaaacatggtttatgacagcgtactttttt
[0291] gttatggtgtgacgtttccttttaaacattatagtagcgtccttggtctgtgttcattggttgaacaaaggca
[0292] cactcacttggagatgcccgtctccactgatatttgaacaaa

[0293] 采用这个构建序列的紅花的转化由 SemBioSys Genetics Inc. (Calgary, Canada) 公司完成。SemBioSys Genetics Inc. 公司采用的技术可参考 WO 2004/111244, 这个专利因为整体被引用而被合并于此。转基因植物是生长的, 是收获种子的。

[0294] 从转基因植物中收集种子, 采用 " Official Methods and Recommended Practices of the AOCs " , 5th Ed. , Method Ce 1-62, American Oil Chemists Society :Champaign, Illinois (1997) 中所描述方法的改进方法, 由气相色谱法确定脂肪酸组分。

[0295] 如表 9 所示, *S. diclina* 中表达 $\Delta 6$ 去饱和酶的 pSBS4119 转基因系的 T1 种子中 GLA 浓度范围是 11.41% (4119-23-1) ~ 72.89% (4119-21-3)。在转基因系中可获得 60% 以上浓度的 GLA。因为 T1 系是分离的, 由于无效的插入杂合型和插入纯合型, 单粒种子样品的测量可出现一些差异。在 Centennialcontrols 和零控系中不存在 GLA。Centennial 中天然含有高浓度的 LA, Centennial 中的 GLA 浓度只能通过 $\Delta 6$ 去饱和酶的表达来提高

[0296] 表 9 :Centennial 中表达 pSBS4119 构建序列的 T1 种子的单粒种子脂肪酸组成 (百分数表示)。

[0297]

表9 系号	类型	C18:3n6	C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:2n6
4119-13-1	转基因	46.47	7.11	1.55	7.98	35.87
4119-13-11	转基因	51.73	7.07	1.57	6.66	32.00
4119-15-10	转基因	61.93	8.02	1.69	6.38	19.68
4119-15-7	转基因	69.59	8.03	1.43	5.70	13.33
4119-17-1	转基因	69.13	9.58	1.35	5.37	12.06
4119-17-3	转基因	67.13	9.33	1.54	6.76	12.29
4119-19-1	NULL	0.00	6.54	1.35	10.23	80.86
4119-19-10	转基因	69.85	8.13	1.35	5.42	13.70
4119-20-10	转基因	63.22	7.69	1.53	5.88	20.24
4119-21-1	转基因	71.06	8.94	1.43	5.02	11.44
4119-21-3	转基因	72.89	9.68	1.21	4.12	8.59
4119-2-29	转基因	52.33	7.46	1.59	7.00	30.46
4119-2-31	转基因	61.23	8.52	1.48	7.38	19.40
4119-23-1	转基因	11.41	6.34	1.41	9.28	71.57
4119-23-2	转基因	11.99	6.51	1.48	9.07	70.95
4119-24-1	NULL	0.00	6.62	1.35	10.12	80.69
4119-24-2	转基因	65.39	8.04	1.46	6.47	16.90
4119-29-2	转基因	62.91	7.68	1.30	6.82	19.44
4119-29-4	转基因	62.72	7.42	1.31	6.95	19.74
4119-30-1	转基因	66.46	7.75	1.41	6.53	16.16
4119-30-10	转基因	28.28	5.97	1.59	6.46	56.93
4119-33-15	转基因	72.85	8.33	1.32	4.92	10.17
4119-33-18	转基因	69.73	7.53	1.33	5.90	13.29
4119-35-1	转基因	59.55	7.63	1.56	10.82	17.91
4119-35-3	转基因	63.11	7.27	1.29	5.93	20.63
4119-36-14	转基因	64.90	8.19	1.41	5.85	17.98
4119-36-15	转基因	61.10	8.30	1.39	8.22	19.07
4119-39-17	转基因	63.54	7.72	1.65	5.79	19.38

[0298]

表9 系号	类型	C18:3n6	C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:2n6
4119-39-18	转基因	64.79	7.66	1.57	5.11	18.68
Centennial-4	Control	0.00	6.63	2.22	25.36	65.80
Centennial-6	Control	0.00	6.59	2.03	13.53	76.87

[0299] 实施例 3 :质粒 pSBS4763 和表达这个质粒的转基因植物

[0300] 图 10 显示的是 *Mortierella alpina* 中用于表达 $\Delta 6$ 去饱和酶的构建序列图。这个构建序列的植物可选标记是 pat, pat 对应于绿色产色链霉菌中的 pat 基因。构建序列的细菌标记是 SpecR。该构建这个载体的基本双元载体为 pPZP200 的衍生物。参见 Hajdukiewicz et al. Plant Mol Bio125 :989, 1994。含于 pPZP200 质粒边界序列中的插入序列如下所述。

[0301] 质粒 PSBS4763 (带有 pat 标记的 *M. dielina* $\Delta 6$ 去饱和酶表达盒子) (SEQ ID NO : 3)

[0302] ctgcaggaattcgatctctatttgattcaaattacgatctgatactgataacgtctagatttttaggg
[0303] taaagcaatcaatcacctgacgattcaaggtgggttgatcatgacgattccagaaaacatcaagcaagc
[0304] tctcaaagctacactctttgggatcatactgaactctaacaacctcgttatgtcccgtagtccagtacag
[0305] acatcctcgtaactcggattgtgcacgatgccatgactataaccaacctcggctcttggtcacaccagga
[0306] actctctggtaagctagctccactccccagaaacaaccggcgccaaattgcgcgaattgctgacctga
[0307] agacggaacatcatcgtcgggtccttggggcattgcgggcgaagatgggtcagcttgggcttgagga
[0308] cgagacccgaatccgagctcgttgaaaaggttgttcattggggatttgatacggagattggctcgtcag
[0309] aggtttgagggaaaggacaaatgggtttggctctggagaaagagagtgcggcttagagagagaatt
[0310] gagaggttagagagagatgcgggcggcgatgagcggaggagagacgacgaggacctgcattatca
[0311] aagcagtacgtggtgaaatttgaacttttaagaggcagatagatttattatttgtatccattttcttcattg
[0312] ttctagaatgtcgcggaacaaattttaaactaaatcctaaatttttctaattttgttgccaatagtggatatg
[0313] tgggccgtatagaaggaatctattgaaggccaaacccatactgacgagccaaagggttcgttttgcgt
[0314] tttatgtttcggttcgtgccaacgccacattctgagctaggcaaaaaacaaacgtgtctttgaatagact
[0315] cctctcgttaacacatgcagcggctgcatggtgacgccattaacacgtggcctacaattgcatgatgtct
[0316] ccattgacacgtgacttctcgtctcctttcttaatatatacacaacactcctacctcttccaaaatatac
[0317] acatcttttgatcaatctctcattcaaaatctcattctctctagtaaacagaacaaaaaacatggctgct
[0318] gctcccagtgtgaggacgtttactcggggcagggttttgaatgccgaggctctgaatgagggcaagaa
[0319] ggatgccgaggcacccttcttgatgatcatcgacaacaaggtgtacgatgtccgcgagttcgtccctga
[0320] tcatcccgtggaagtgtgattctcacgcacgttggaaggacggcactgacgtctttgacacttttca
[0321] cccgaggctgcttgggagactcttgccaacttttacgttgggtgatattgacgagagcgaccgcgatatac
[0322] aagaatgatgactttgcggccgaggtccgcaagctgcgtaccttgttccagctcttgggttactacgattc
[0323] ttccaaggcatactacgcctcaaggtctcgttcaacctctgcatctggggtttgtcgacggctcattgtgg
[0324] ccaagtggggccagacctcgacctcgccaacgtgctctcggctgcgcttttgggtctgttctggcag
[0325] cagtgcggatggttggctcacgactttttgcatcaccaggtcttccaggaccttctgggggtgatctttt
[0326] cggcgccttcttgggaggtgtctgccagggtctctcgtcctcgtggtggaaggacaagcacaacactc
[0327] accacgccgccccaacgtccacggcgaggatcccgcattgacacccacctctgttgacctggag
[0328] tgagcatgcgttggagatgtctcggatgtcccagatgaggagctgaccgcatgtggtcgcgtttcat
[0329] ggtcctgaaccagacctggttttacttccccattctctcgtttgcccgtctctcctgggtgctccagtcatt
[0330] ctctttgtgctgcctaacggteaggcccacaagccctcgggcgcgctgtgcccacatcgttggctga
[0331] gcagctgtcgttgcgatgactggacctggtacctcgccacctggtcctgttcatcaaggatcccgtc
[0332] aacatgctgggtgactttttgggtgctgcaggcgggtgtgcggaacttgttggcgatcgtgttctcgtcaa
[0333] ccacaacggtatgcctgtgatctcgaaggaggaggcggctcgatatggatttcttcacgaagcagatca
[0334] tcacgggtcgtgatgtccaccgggtctatttgccaactggttcacgggtggattgaactatcagatcga
[0335] gcaccacttgttccctcgatgcctcgccacaacttttcaaagatccagcctgctgtcgagacctgtgc
[0336] aaaaagtacaatgtccgataccacaccaccgggtatgatcgagggaactgcagaggcttttagccgtct
[0337] gaacgaggcttccaaggctgcctccaagatgggtaaggcgcagtaagcttgttaccacctgatgtca
[0338] tcgtcatagtccaataactccaatgtcggggagttagtttatgaggaataaagtgtttagaatttgatcag
[0339] ggggagataataaaagccgagtttgaatctttttgttataagtaatgtttatgtgtgtttctatatgttgc
[0340] atgggtcccatgtttttctctctctttttgtaacttgaaggtgtgtgtgtactttatttggcttctttgtaagtt

[0341] ggtaacggtggtctatatatggaaaaggtcttgttttgtaaacttatgtagttaactggattcgtctttaac
[0342] cacaaaaagtttcaataagctacaaatttagacacgcaagccgatgcagtcattagtagacatatatttattg
[0343] caagtgattacatggcaacccaaacttcaaaaacagtaggttgctccatttagtaacctgaattgcctcct
[0344] gattctagttgatcccggtaccgaattcgaatccaaaattacggatatgaatataggecatatccgtatcc
[0345] gaattatccgtttgacagctagcaacgattgtacaattgcttctttaaanaaggaagaaagaaagaaaga
[0346] aaagaatcaacatcageggttaacaaacggccccgttacggcccaaacggtcataatagagtaacggcg
[0347] ttaagcgttgaaagactcctatcgaaatacgtaacgcaaacgtgtcatagtcagatccccctcttcttca
[0348] ccgctcaaacacaaaaataatcttctacagcctatatatacaaccccccttctatctctctcttctcaca
[0349] attcatcatcttcttcttctaccccccaatttaagaaatcctctcttctctcttcttcttcttcaaggtaaactctc
[0350] tctctctctctctctctgttattcttgttttaattaggtatgtattattgctagtttgtaactctgcttatctatgta
[0351] tgccttatgtgaatatctttatcttgttcatctcatccgtttagaagctataaatttgttgattgactgtgtatct
[0352] acacgtggttatgtttatatcctaatcagatatgaatttcttcatattgttgcgtttggtgtaccaatccgaat
[0353] cgttgattttttcatttaactgtgtagctaatgtacgtatacatatggatctacgtatcaattgttcatctgtt
[0354] gtgtttgatgtatacagatctgaaacatcacttctctcatctgattgtgtgttacatacatagatatagat
[0355] ctgttatatcatttttttattaatgtgtatataatgtgcatagatctggattacatgattgtgattatttcat
[0356] gatgtttgtattttacgtatgtatataatgtagatctggacttttggagttgttgacttgattgtatttgtgtgtat
[0357] atgtgtgttctgatcttgatatgttatgtatgtgcagccaaggctacggcgatccaccatgtctccggag
[0358] aggagaccagttgagatttaggccagctacagcagctgatatggccgcggtttgtgataatcgtaacat
[0359] tacattgagacgtctacagtgaactttaggacagagccacaaacaccacaagagtggattgatgatcta
[0360] gagaggttgcaagatagatacccttgggttggttgctgaggttgagggtgtgtggctggatttgccttacg
[0361] ctgggccctggaaggctaggaacgcttacgattggacagttgagagtactgtttacgtgtcacatagge
[0362] atcaaaggttgggcttaggttccacattgtacacacatttgccttaagctatggaggcgcaaggttttaag
[0363] tctgtggttgcgttatagcccttccaaacgatccatctgttaggttgcatgaggcttgggatacacagc
[0364] ccggggtacattgctgcgcagctggatacaagcatggatggatggcatgatgttggtttttggcaaggg
[0365] attttgagttgccagctcctccaaggccagttaggccagttaccagatctgagtcgaccgaatgagttc
[0366] caagatggtttgtgacgaagttagttggttgttttatggaactttgtttaagctagcttgaatgtggaaag
[0367] aacgtgtggcttgggttttaaatgttgggaataaagatgttcttggattaactagatatttctctattg
[0368] gtttcatggttttagcacacaacatttaaatatgctgttagatgatatgctgcctgcttattatttacttacc
[0369] ctcacctcagtttcaaagttgttgcaatgactctgtgtagtttaagatcgagtgaagtagatatttgtctata
[0370] tttattaggggtatttgatatgctaatggtaaacatggtttatgacagcgtacttttttggttatgggtgtgac
[0371] gtttcttttaaacattatagtagccttggctctgtgttcttggttgaacaaaggcacactcacttggag
[0372] atgcegtctccactgatatttgaaca

[0373] 采用这个构建序列的红花的转化由 SemBioSys Genetics Inc. (Calgary, Canada) 公司完成。SemBioSys Genetics Inc. 公司采用的技术可参考 WO 2004/111244, 这个专利因为整体被引用而被合并于此。转基因植物是生长的, 且可以收获种子。

[0374] 从转基因植物中收集种子, 采用 "Official Methods and Recommended Practices of the AOCS", 5th Ed., Method Ce 1-62, American Oil Chemists Society; Champaign, Illinois (1997) 中所描述方法的改进方法, 由气相色谱法确定脂肪酸组分。

[0375] 如表 10 所示, M. dielina 中表达 $\Delta 6$ 去饱和酶的 pSBS4763 转基因系的 T1 种子中

GLA 浓度范围是 7.8% (4763-13-2) ~ 50.19% (4763-28-1)。因为 T1 重复片段是分离的, 由于无效的插入杂合型和插入纯合型, 单粒种子样品的测量可出现一些差异。在 Centennial controls 和零控系中, GLA 的浓度为 0.05 或更低。Centennial 中天然含有高浓度的 LA, Centennial 中的 GLA 浓度只能通过 $\Delta 6$ 去饱和酶的表达来提高。

[0376] 表 10 :Centennial 中表达的 pSBS4763 构建序列的 T1 种子的单粒种子的脂肪酸组成。

表 10 系号	类型	C18:3n6	C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:2n6
4763-1-1	转基因	8.36	6.41	1.50	7.70	74.82
4763-1-2	转基因	14.28	6.26	1.56	9.01	67.69
4763-2-1	转基因	16.29	6.56	1.53	8.19	66.38
4763-2-2	转基因	11.31	6.46	1.59	9.12	70.23
4763-13-2	转基因	7.80	6.54	1.53	8.69	74.06
4763-13-3	NULL	0.05	6.27	1.33	8.16	82.98
4763-15-1	转基因	11.22	6.24	1.26	7.91	70.36
4763-15-2	转基因	19.40	6.56	2.43	7.65	62.65
4763-16-1	转基因	17.94	6.22	1.42	7.29	66.36

[0377]

表 10 系号	类型	C18:3n6	C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:2n6
4763-16-2	转基因	11.79	6.08	1.86	7.97	70.78
4763-17-2	NULL	0.04	6.33	1.37	9.19	81.84
4763-17-3	转基因	8.43	6.52	1.53	9.56	72.75
4763-18-2	转基因	8.73	6.81	2.00	9.33	70.68
4763-18-3	NULL	0.00	6.68	1.88	9.38	80.91
4763-19-4	转基因	12.71	6.72	1.87	7.16	68.74
4763-19-15	转基因	14.55	6.46	1.75	7.41	67.84
4763-21-2	转基因	20.62	6.89	2.37	5.51	59.73
4763-21-11	转基因	20.99	6.93	1.77	6.12	61.40
4763-22-4	转基因	10.55	6.45	1.53	7.47	73.23
4763-22-5	转基因	16.32	6.71	1.47	8.05	66.28
4763-23-12	转基因	34.02	6.92	2.06	5.21	49.27
4763-23-14	转基因	36.92	7.58	1.60	7.20	45.69
4763-24-6	转基因	17.67	8.80	3.89	7.22	56.08
4763-24-7	转基因	14.42	8.78	5.30	9.12	57.06
4763-25-2	转基因	18.05	8.68	4.35	7.01	54.70
4763-25-3	转基因	26.62	10.06	7.29	6.10	38.93
4763-27-3	转基因	40.91	8.92	3.40	5.04	24.89
4763-27-9	转基因	19.61	14.67	15.70	3.95	19.56
4763-28-1	转基因	50.19	9.71	1.88	6.14	30.45
4763-28-2	转基因	37.35	7.78	1.61	6.18	46.12
4763-30-12	转基因	8.04	7.22	2.11	7.87	73.03
4763-30-13	转基因	9.08	7.55	2.17	9.44	69.75
Centennial-1	Control	0.00	6.33	2.18	15.74	74.86
Centennial-3	Control	0.00	6.97	2.13	13.92	76.18

[0378]

[0379] 这些数据表明多种来源的 $\Delta 6$ 去饱和酶可用于增加红花中 GLA 的产量。天然含有高含量 LA 的植物如 Centennial 中 $\Delta 6$ 去饱和酶的转基因表达对于增加 GLA 的含量是有效的。

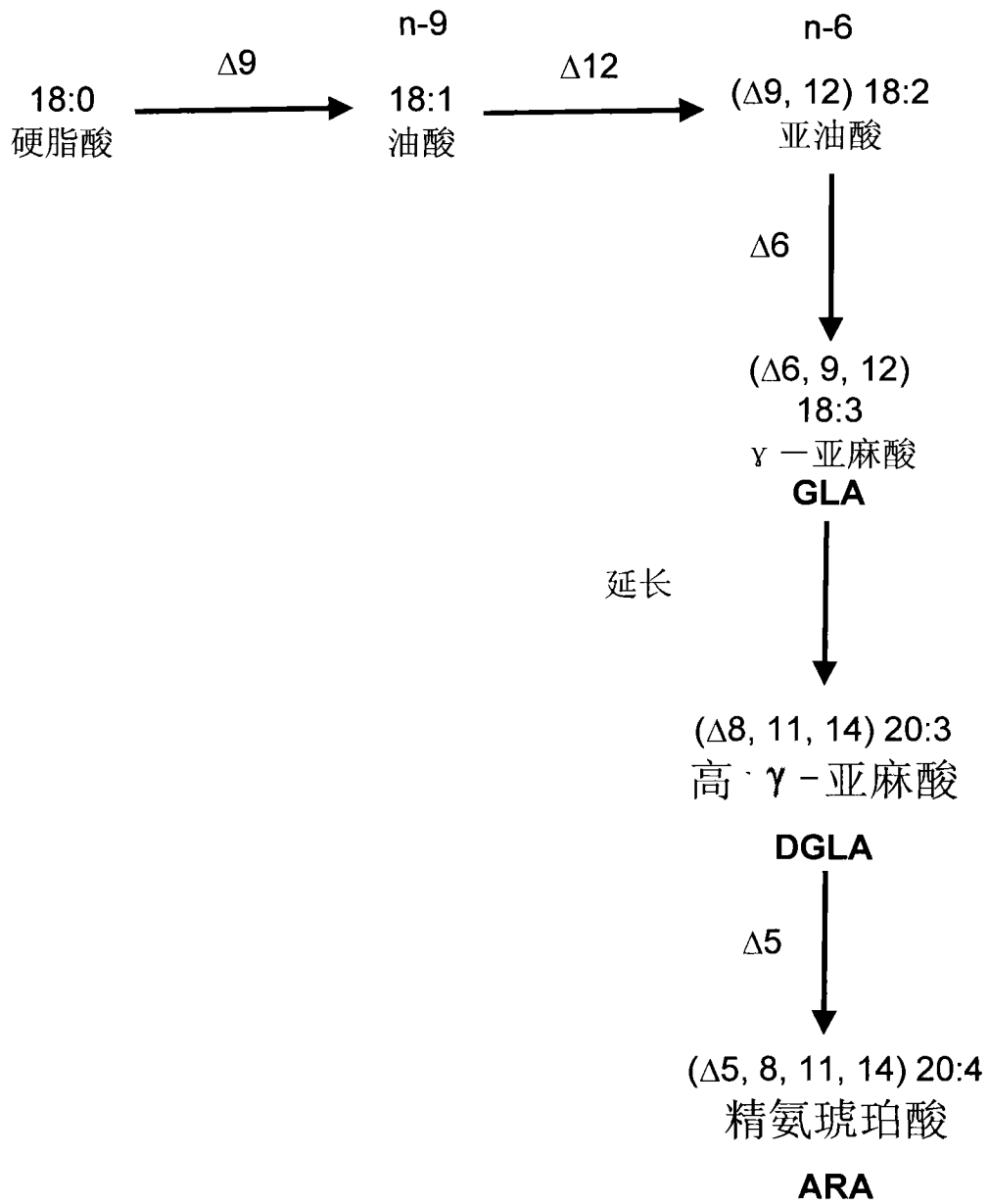


图 1

```

1
AAC49700 Borago officinalis D6 (1) ----MAAQIMKYITSDSLKHNHRKPGDLWISIQKAYIVVSTWVKDHPGSSPFLKSLAGQVETDAFLAHP
AAP23034 Primula farinosa D6 (1) MANKSPNPKTGYITSSDGLKSHNAGLLWISLHGGVYVWSSWAGLHPGGGAPIMMLAGHVDVDAFLAHP
AAP23036 Primula vialli D6 (1) MANKSPNPKTGYITSSDGLKSHNAGLLWISLHGGVYVWSSWAGLHPGGGAPIMMLAGHVDVDAFLAHP
Consensus (1) MANKSPNPKTGYITSSDGLKSHNAGLLWISLHGGVYVWSSWAGLHPGGGAPIMMLAGHVDVDAFLAHP
71 140
AAC49700 Borago officinalis D6 (66) ASTWKNLDKFFTYGYYLNDKNSVSEVSKDYRKLVPFEFSKMGIVDKKGHIMFATLCTIATMIFAMSVYVNLFCHE
AAP23034 Primula farinosa D6 (71) PSTARLLPPLSTNLLLNHVSSEPTSSDYRKLNDNFRHGLFRARGHTAYATFVFMIAKSLMSSKQVNLGSD
AAP23036 Primula vialli D6 (71) PSTARLLPPLSTNLLLNHVSSEPTSSDYRKLNDNFRHGLFRARGHTAYATFVFMIAKSLMSSKQVNLGSD
Consensus (71) PSTARLLPPLSTNLLLNHVSSEPTSSDYRKLNDNFRHGLFRARGHTAYATFVFMIAKSLMSSKQVNLGSD
141 210
AAC49700 Borago officinalis D6 (136) SVLVHFLSGCLMGFLMTIQSGWTGHDAGHMVVSFSLNKKFMGIEFANCLSSFSIGHWKNNHNAHHIACNS
AAP23034 Primula farinosa D6 (141) SAWVHLASGAAAGFAMIQCGWIGHDSGHYRIMSFRKWNFAQILSTNCLQGISIGHWKNNHNAHHIACNS
AAP23036 Primula vialli D6 (141) SAWVHLASGAAAGFAMIQCGWIGHDSGHYRIMSFRKWNFAQILSTNCLQGISIGHWKNNHNAHHIACNS
Consensus (141) SAWVHLASGAAAGFAMIQCGWIGHDSGHYRIMSFRKWNFAQILSTNCLQGISIGHWKNNHNAHHIACNS
211 280
AAC49700 Borago officinalis D6 (206) LDYDPDLQYIPLLVVSKEFGSITSHFYKRLTFPSLGFVVSVOHWTFYIIMCAARLDMMYVQSLTMLLIT
AAP23034 Primula farinosa D6 (211) LDYDPDLQYIPLLVVSKEFGSITSHFYKRLTFPSLGFVVSVOHWTFYIIMCAARLDMMYVQSLTMLLIT
AAP23036 Primula vialli D6 (211) LDYDPDLQYIPLLVVSKEFGSITSHFYKRLTFPSLGFVVSVOHWTFYIIMCAARLDMMYVQSLTMLLIT
Consensus (211) LDYDPDLQYIPLLVVSKEFGSITSHFYKRLTFPSLGFVVSVOHWTFYIIMCAARLDMMYVQSLTMLLIT
281 350
AAC49700 Borago officinalis D6 (276) KRNVSYCAHEDLGLCLVPSIHWPLLVSCLENWGEPLMFVTLASLVEPCMQQVQPSLNHFSSSVYVGGKPKGN
AAP23034 Primula farinosa D6 (281) SREVGHRAGQFREGAVVFWVFFLLSCLPNWSEFIMFLLASYSVTGIQHVQPSLNHFSSSVYVGGKPKGN
AAP23036 Primula vialli D6 (281) SREVGHRAGQFREGAVVFWVFFLLSCLPNWSEFIMFLLASYSVTGIQHVQPSLNHFSSSVYVGGKPKGN
Consensus (281) SREVGHRAGQFREGAVVFWVFFLLSCLPNWSEFIMFLLASYSVTGIQHVQPSLNHFSSSVYVGGKPKGN
351 420
AAC49700 Borago officinalis D6 (346) WFKKQTAGTLNISCAPAMDWFGGLQFQVEHHLFPRMFRKISPFVRDLCKKHNLPLYNASFTKANV
AAP23034 Primula farinosa D6 (351) WFKKQTAGTLNISCAPAMDWFGGLQFQVEHHLFPRMFRKISPFVRDLCKKHNLPLYNASFTKANV
AAP23036 Primula vialli D6 (351) WFKKQTAGTLNISCAPAMDWFGGLQFQVEHHLFPRMFRKISPFVRDLCKKHNLPLYNASFTKANV
Consensus (351) WFKKQTAGTLNISCAPAMDWFGGLQFQVEHHLFPRMFRKISPFVRDLCKKHNLPLYNASFTKANV
421 453
AAC49700 Borago officinalis D6 (416) LTLKTLRNTAIEARDLSNPLPKNMVWEALHTHG (SEQ ID NO: 4)
AAP23034 Primula farinosa D6 (421) LTLKTLRNTAIEARDLSNPLPKNMVWEALHTHG (SEQ ID NO: 5)
AAP23036 Primula vialli D6 (421) LTLKTLRNTAIEARDLSNPLPKNMVWEALHTHG (SEQ ID NO: 6)
Consensus (421) LTLKTLRNTAIEARDLSNPLPKNMVWEALHTHG

```

相似性: 99.1%; 同一性: 62.7%

AAC49700 玻璃苣 (448)

AAP23034? 453)粉报春

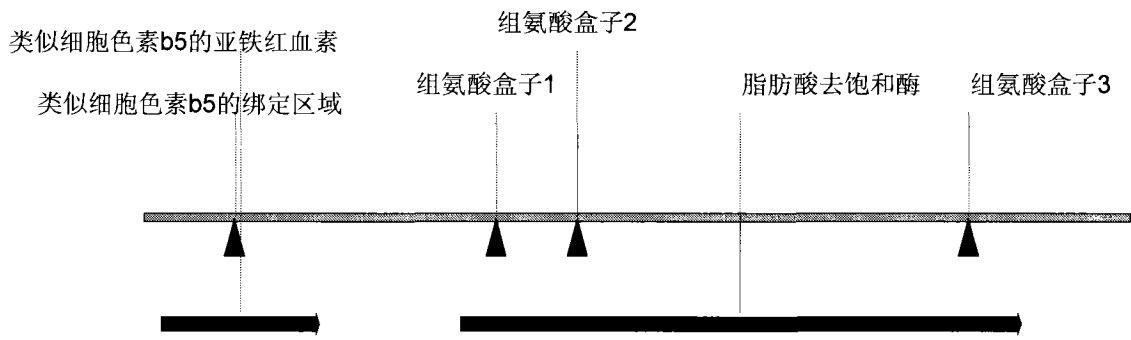
AAP23036 高穗花报春 (453)

图 2

		1	----	MAAAPSVRTFTTRAEVLNAEALNEGKK-DAEAPFLMTIDNKVYDVREFFVDPHPPGS-VLTHV--GK	70
AAF08685	Mortierella alpina D6	(1)	----	MSSDVGATVPHFYTRAEVLADLHQDVLDK--KPEARKLIVVENKVVYDITDFVDPHPPGERVLLTQE--GR	
BAB6905	Mucor circinelloides D6	(1)	----	MPPNTAADRLLSSTSTRSSNIYTEKFOEL- IKOGDSVFYEQKVVYRNNFMMAKHPGGEAAALRSAL--GR	
BAC57562	Mucor circinelloides D6	(1)	-----	MCRGGEKSEVDQVQPOKTEQLQAKAKWEDVVRINGVEYDVTDYERKHPGGSVLYKYLANTGA	
Thraustochytrium aureum D6	(1)	-----	-----	-----	
Saprolegnia diclina D6	(1)	-----	-----	-----	
Consensus	(1)	-----	A L TRAEV I A LIIENKVVYDVTDFV DHPGG VL T GR		
		71	-----	-----	140
AAF08685	Mortierella alpina D6	(63)	-----	DGTDVFDTFHPEAAWETLANEYVGDID-----	
BAB6905	Mucor circinelloides D6	(66)	-----	DATDVFHEMHPSSAYELLANCVGDCPEP---KLEI-----	
BAC57562	Mucor circinelloides D6	(68)	-----	DVTDELRMTMHPQVYKMINLYCIGDYMPDVIRPASMKQOHTFTKPKEDKPVLTATWEGGFVQAYDDAI	
Thraustochytrium aureum D6	(62)	-----	-----	DATSELEFAFHMRSKKACQMLKSLPKRAPVLEIQEN-----	
Saprolegnia diclina D6	(54)	-----	-----	DATDAFAVHPESSALKLEQYVYVGDVOSTAAVDT-----	
Consensus	(71)	-----	DATDVF FHP SAYE L N YVGD D P		
		141	-----	-----	210
AAF08685	Mortierella alpina D6	(90)	-----	ESDRDIKNDDFAAEVRKLRITLFSQSLGYDSSKAYYAFKVSFNLCLWGLSTVIVAK	
BAB6905	Mucor circinelloides D6	(98)	-----	DSTDKALNSAAFAOEIRDRLDKLEKOGYFDASTGFYIYKVVSTLLVCIVGLAILKA	
BAC57562	Mucor circinelloides D6	(138)	-----	QDLHKHSHDLIKADAVLQKLDNGDQIRNAYRKLAEALYAKGLKCNKYKYAREGCRVTLIFLSWFTLK	
Thraustochytrium aureum D6	(97)	-----	-----	QLPEEQTKEAELRDKKFFDEIRRDGLMPEFVHRRAYRLSESLVGMFTLGLYLFSL	
Saprolegnia diclina D6	(89)	-----	-----	SISDEVKKSQSDFIASRKLRLVKKRLGLYDSSKLYLYKCASTLSIALVSAATCLH	
Consensus	(141)	-----	-----	EK L ADF EYRKLRL EL R GLFDSS YYAYKVS L I LSL I	
		211	-----	-----	280
AAF08685	Mortierella alpina D6	(145)	-----	WGQTSSTLANVLSAALLGLFWQCCGWLADHFLHHQVRFQDRFVWGDLEFGAFLGGVCGGFSSSWVKDKHNTTHA	
BAB6905	Mucor circinelloides D6	(155)	-----	WGRESTLAVFTAASLVGLFWQCCGWLADHYAHYQVIKDPNVNLFVLTFFGNLVQGFSLSWWKNKHNTHA	
BAC57562	Mucor circinelloides D6	(208)	-----	GT--ETWHYMAGAAFMAMFWHLVETAHDAGHNETGKSEIDHVLIGVLIANFPGGLSGWKNKHNTHA	
Thraustochytrium aureum D6	(153)	-----	-----	PLSIAAGVLVHGLFGAPCGWCOHEAGHGSFEYSLWGGKRVQAMLIGFGLGTSGDMMNMMHNKHA	
Saprolegnia diclina D6	(146)	-----	-----	STAMYVAAVILGLFVYQCCGWLADHFLHHQVFENHLFGDLVGVVGNVWQGSYQWKNKHNTHA	
Consensus	(211)	-----	-----	STLA MIAAALLGLFWQCCGWLADHFGHHQVF WG LVGVMGLNL QGFSL WVK KHNTHA	
		281	-----	-----	350
AAF08685	Mortierella alpina D6	(215)	-----	APNVHG-----EDPDIDTTHPELITWSEHALEMFSQVDPDELT---RMWSREMLNQTWYFPIILSFARI	
BAB6905	Mucor circinelloides D6	(225)	-----	STNVSG-----EDPDIDTAPILLWDEFVANFYGSLKDNASGFDRFIAEHLIPYQTRYFFLILGFART	
BAC57562	Mucor circinelloides D6	(276)	-----	VTNHPEH-----DPDIQHVPPMAITKTFKFNNTYTYKRVLP-FDAASRFFVRRHQHYLYLILSFGRF	
Thraustochytrium aureum D6	(220)	-----	-----	DLIDITPPFVAFENTAFE-----KNRNKGFSKAWVRFOAFTFIPV	
Saprolegnia diclina D6	(214)	-----	-----	IPNLHATPEIAFHGDIDITMFLAVSLKMAQHAVDSPVGLFF-----MR-----YQAYLYFPILFLFARI	
Consensus	(281)	-----	-----	ATNV G DPDIDT PILAWS A S SRF V YQ WLYF ILSFARI	
		351	-----	-----	420
AAF08685	Mortierella alpina D6	(275)	-----	SWCLOSILFVLPNGQAHKPSGARVPVLSLVEQLSLAMHWTWYLATMFLRIKDPVNMVLYFLVSOAVCGNLL	
BAB6905	Mucor circinelloides D6	(288)	-----	SWAIQSIIYSFKNETLNKSK---LLSWCERIFLIVHVVFEETCTIANWISSIRNIAMFFVVSQITITGYLL	
BAC57562	Mucor circinelloides D6	(338)	-----	NLHRLSFAYLITCKNVRT---L-ELVGLTFFFVWEG--SLLSTLPTWNRIRLALMVSYMLTFPL	
Thraustochytrium aureum D6	(267)	-----	-----	TSGMIVMLFVFLHPRRVVQKNPEEGFWMLSSHIVRTYLFHLVTEGNSLAACYLVGYWACMWSGMYL	
Saprolegnia diclina D6	(274)	-----	-----	SWVIGSAMYAFYVNGPQGTDF-KVQYPLERAGLLVYGNLGLVYANMSLLCAAFLFVSOASCCLFL	
Consensus	(351)	-----	-----	SW IQSILY L N K K I E L L IHW WF V AW NI VFFIVS V G L	
		421	-----	-----	490
AAF08685	Mortierella alpina D6	(345)	-----	AIVFSLNHNMGMPVISKEEAVDMDFETKQITIGRDVHPG-LFANWFTGGLNYQIEHHLFSPMRRHNSKIQ	
BAB6905	Mucor circinelloides D6	(354)	-----	AIVFAMNHNMGMPVYSPKANHTFEYELCCTIGRDVNCT-VFGDWLGGGLNYQIEHHLFPEMRRHLSKVK	
BAC57562	Mucor circinelloides D6	(398)	-----	HVQITLSHFQMGVTEDEG--PDEFPKAKMLRTMDVDCP-EWLDWFHGGLOYQAVHHLFPRIPRHHNRQCV	
Thraustochytrium aureum D6	(337)	-----	-----	FGHESLSHTHMDIVEAD--VHKNVVRVAVDHTVDLSPSNPLVCVVMGYLNMQTIHHLNPAPOYHQVEVS	
Saprolegnia diclina D6	(343)	-----	-----	AMVFSVGHNGMEVFDKD--SKPDKLQVLESTRNVTS--LWIDWFMGGLNYQIEHHLFPMRPHNLPALN	
Consensus	(421)	-----	-----	AIVFSL HNGM V DKD DFF QVITTRDV S LFDIDWFMGGLNYQIEHHLFPP MPRHNL V	
		491	-----	-----	549
AAF08685	Mortierella alpina D6	(414)	-----	PAVETLCKKYNVRYHTFGMIETAEVFSRLNEVSKAASKMGKAQ----- (SEQ ID NO: 7)	
BAB6905	Mucor circinelloides D6	(423)	-----	SMVKPIAQKYNIPYHDTIVIGGTIEVLOTLDVQKISQKFSKMKL----- (SEQ ID NO: 11)	
BAC57562	Mucor circinelloides D6	(465)	-----	PLVKKFCDEVGLHYMYNFSITNGVYLGTLKSVADQVGFPMNEVAKSNAEIWANDKEHAH (SEQ ID NO: 8)	
Thraustochytrium aureum D6	(405)	-----	-----	RRFAIFAKKHGLNYRVVSYFEBWRLMSONLADVGSYHENGVKRAPKAKAQ----- (SEQ ID NO: 9)	
Saprolegnia diclina D6	(410)	-----	-----	VLVKSLCKQYDIPYHETGFIAGMAYMVHLERISIEFFKFFPAM----- (SEQ ID NO: 10)	
Consensus	(491)	-----	-----	LVK LCKKY I YH T FI G AEVL L VS K	

相似性: 53.7%; 同一性: 7.1%
 AAF08685 D6 (457)高山被孢霉
 BAB6905 D6 (467)卷枝毛霉
 BAC57562 D6 (523)卷枝毛霉
 (456) (SEQ ID NO: 33 from WO02081668)破囊弧菌D6
 D6 (453) (来源于美国专利 US 6,635,451中的SEQ ID NO: 14)异枝水霉

图 3



AAC49700BorageD6

448 aa

图 4

	1	60
AAT02411 Brassica napus D12	(1) NGAGGRMOVSPSSSP-----GNTLKRVCETPPF TVGLKKAIPPHCFKRSIPRSF	
AAC31698 Borago officinalis D12	(1) HGGGGRMPVETCKKKS-----KSDVFORVPEKPPF TVGDLKKVIPPHCFQRSVLHSF	
AAL68983 Helianthus annuus D12	(1) HGAGGRHSSENGKKEK-----GPKPLERALHEKPPF TVGDIKKVIPPHCFKRSVIRSF	
BAD12887 Oriza sativa D12	(1) NGAGGRHTEKEREEOQKLLGRAGNGAAVQRSPIDKPPFTGGQIKKAIIPPHCFQRSVIRSF	
Consensus	(1) HGAGGRHSVP K EK GS LQRVPEKPPF TVGDIRKVIPPHCFQRSVIRSF	
	61	120
AAT02411 Brassica napus D12	(54) SYVVYDLVIAALFFYYATTFPLLPPLSYFAWPLYWACQCGVLTGVVWIAHECGHHAFS	
AAC31698 Borago officinalis D12	(54) SYVVYDLVIAALFFYYATTFPLLPPLSYFAWPLYWACQCGVLTGVVWIAHECGHHAFS	
AAL68983 Helianthus annuus D12	(54) SYVVYDLVIAALFFYYATTFPLLPPLSYFAWPLYWACQCGVLTGVVWIAHECGHHAFS	
BAD12887 Oriza sativa D12	(61) SYVVYDLVIAALFFYYATTFPLLPPLSYFAWPLYWACQCGVLTGVVWIAHECGHHAFS	
Consensus	(61) SYVVYDLVIAALFFYYLAS YIPLLPPLSYFAWPLYWACQCGVLTGVVWIAHECGHHAFS	
	121	180
AAT02411 Brassica napus D12	(114) DYQQLDDTVGLIFHSFPLVPTFSWKYSHRRHESNTGSLERDEVFVPRKKSIDIKWYCKYLN	
AAC31698 Borago officinalis D12	(114) DYQQLDDTVGLILHSALLVPTFSWKYSHRRHESNTGSLERDEVFVPRKKSISUSSEYLN	
AAL68983 Helianthus annuus D12	(114) DYQQLDDTVGLILHSALLVPTFSWKYSHRRHESNTGSLERDEVFVPRKKSIVRSTAKYLN	
BAD12887 Oriza sativa D12	(121) DYSVLDDIVGLVLSHSLVPTFSWKYSHRRHESNTGSLERDEVFVPRKKSAAHWYTPYY	
Consensus	(121) DYQQLDDTVGLILHSALLVPTFSWKYSHRRHESNTGSLERDEVFVPRKKSARWYAKYLN	
	181	240
AAT02411 Brassica napus D12	(174) --NPLGRIVHLTVQFTLGVPLYLAFNVSGRPSYDGFACHFHPNAPIYNDRELRQIYISDAG	
AAC31698 Borago officinalis D12	(174) --NPPGRVLLVQLTVQFTLGVPLYLAFNVSGR--PYDRFACHFDPKSP IYNDRELRQIYISDAG	
AAL68983 Helianthus annuus D12	(174) --NPPGRILTLVTLTGWPLYLAFNVSGR--YYDRFACHFDPNSPIYNRERAQIYISDAG	
BAD12887 Oriza sativa D12	(181) HNPICRLVHIFVQFTLGVPLYLAFNVSGR--PYDRFACHFDPYGP IYNDRELRQIYISDVG	
Consensus	(181) NPPGRILHLVQLTVQFTLGVPLYLAFNVSGR YYDRFACHFDPNSPIYNDRELRQIYISDAG	
	241	300
AAT02411 Brassica napus D12	(233) VLSVCYGLYRYAGSRGVAASVYGVPLLVNGLVFLVITLQHTHPSLPHYDSEWDWLR	
AAC31698 Borago officinalis D12	(232) IVAVHYGLYRIVAAKGVAVVVYGVPLLVNGLVFLVITLQHTQPSLPHYDSEWDWLR	
AAL68983 Helianthus annuus D12	(232) ILTVFYILFRLASTKGLVWVLTNYGGPLLNVNGLVFLVITLQHTHPSLPHYDSEWDWLR	
BAD12887 Oriza sativa D12	(240) VYSAGLALFELSSAFGFVVVVVYGVPLLVNGLVFLVITLQHTHPSLPHYDSEWDWLR	
Consensus	(241) ILSV YGLFRLASAKGVAVVVYGVPLLVNGLVFLVITLQHTHPSLPHYDSEWDWLR	
	301	360
AAT02411 Brassica napus D12	(293) GALATVDRDYGILSKVFNHITDTHVAHHLFSTMPHYHAEATKAIKP ILGYYQFDGTPV	
AAC31698 Borago officinalis D12	(292) GALATVDRDYGFLNKLHNLITDTHVAHHLFSTMPHYHAEATKAIKP ILGYYQCDRTFV	
AAL68983 Helianthus annuus D12	(292) GALATVDRDYGILNKLHNLITDTHVTHLHFLSTMPHYHAEATKAIKP ILGYYQFDGTSI	
BAD12887 Oriza sativa D12	(300) GALATVDRDYGILNKLHNLITDTHVAHHLFSTMPHYHAEATKAIKP ILGYYQFDPTFV	
Consensus	(301) GALATVDRDYGILNKLHNLITDTHVAHHLFSTMPHYHAEATKAIKP ILGYYQFDGTPV	
	361	392
AAT02411 Brassica napus D12	(353) VKAWREAKEKCIYVEPDRQCEKKGVEWYNNKL (SEQ ID NO: 14)	
AAC31698 Borago officinalis D12	(352) FKAWREVKEKCIYVEADEGKNGKGVWYNNKL (SEQ ID NO: 12)	
AAL68983 Helianthus annuus D12	(352) FKAWRETKEKCIYVEKDE--DVKDGVTWYNNKI (SEQ ID NO: 13)	
BAD12887 Oriza sativa D12	(360) AKATWREAKEKCIYVEPEE---NRGVFWYNNKI (SEQ ID NO: 15)	
Consensus	(361) FKAWREAKEKCIYVEPEE D KKGVTWYNNKL	

相似性: 95.4%; 同一性: 57.7%

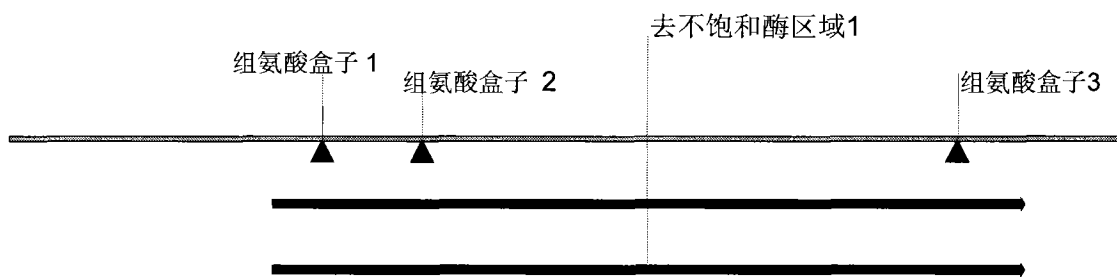
- AAT02411? 384)甘蓝型油菜
- AAC31698? 383)玻璃苣
- AAL68983? 382)向日葵
- BAD12887? 388)水稻

图 5

		1		60
CAE47978 <i>Aspergillus fumigatus</i> D12	(1)	-----M-----MASDAEKTSK-----M-----IDTYGNEE		
EAK94955 <i>Candida albicans</i> D12	(1)	MSVVEASSSSVVEDS-----FASNVVQRGNISSFASTTASS-----NLTTIDNGKVE		
EAL03493 <i>Candida albicans</i> D12	(1)	MAAATTSFSSGFNNNNADQSTDBSATISKSGNVASFKTTSTSTSYQTNLTAIDTYGNEE		
AAF08684 <i>Mortierella alpina</i> D12	(1)	-----MAPPNTIDAGLTORHISTGAPN-----SAKPAERNY		
Consensus	(1)	MA S SS SAANII AGNIASFASSTASS NLTAIDTYGNEF		
		61		120
CAE47978 <i>Aspergillus fumigatus</i> D12	(21)	KIPDYTIKQIRDAIPAHCYORSAAATSLYYVFRDMAILASVYVVFHNYVTPETVP-----S		
EAK94955 <i>Candida albicans</i> D12	(49)	KVPDYSIKBILQAI PKHCYERSLIRSLGYVVRDITMMVLIQYVGHTEIPMVQIFPEYPSLA		
EAL03493 <i>Candida albicans</i> D12	(61)	KVPDYTIKIDILSAI PTHCYERRLLQSLSYVERDIFCMVVLGFIANNYIHLIPN-----		
AAF08684 <i>Mortierella alpina</i> D12	(33)	QLPEFTIKETRECI PAHCYERSGLRGLCHVAIDL TWASLFLAATQIDKFENP-----		
Consensus	(61)	KVPDYTIKIRDAIPAHCYERSLLRSL YVFRDITIMVILGYVAHNYI LENIP A		
		121		180
CAE47978 <i>Aspergillus fumigatus</i> D12	(76)	MPVRVVEWVITTYVVOGLVGTGVWVLAHECGHQAFASTSKVLNDTVGWICHSLLLVVPYFSWK		
EAK94955 <i>Candida albicans</i> D12	(109)	YGERGALWVQSYCI GLFGFGLWELAHCECGHGFSDYQNI NDFI GWVLSHYLLVVPYFSWK		
EAL03493 <i>Candida albicans</i> D12	(114)	QFTRFAAWTGYVWCOGLFGTGIWVLAHECGHQAFASTSKVLNDTVGWVLSHYLLVVPYFSWK		
AAF08684 <i>Mortierella alpina</i> D12	(86)	-LIRYLAWPYVWIMQGLVCTGVWVLAHECGHQAFASTSKVLNDTVGWVLSHYLLVVPYFSWR		
Consensus	(121)	IRFALWTVYSWCQGLVGTGVWVLAHECGHQAFASTYKSLNDTVGWVLSHYLLVVPYFSWK		
		181		240
CAE47978 <i>Aspergillus fumigatus</i> D12	(136)	ISHGKHHKATGNIARDMVFPKTRDEYATR-----IGRAAHELSLMEETPILFATNL		
EAK94955 <i>Candida albicans</i> D12	(169)	FSHAKHHKATGHLTKDMVFPYTRKEEYLE-----KKNVKKVADLNEESPISYFLVL		
EAL03493 <i>Candida albicans</i> D12	(174)	FSHGKHHKATGHLTRDMVFPKTRKEEELQ-----NRGVKDDDDLGDSFMYSLLEL		
AAF08684 <i>Mortierella alpina</i> D12	(145)	ISHGKHHKATGHMFKDQVFPKTRSOVGLPKENAAAQVEEDMSVHLDEEAPVTLFWM		
Consensus	(181)	ISHGKHHKATGHMFKDMVFPKTRKEEYL RAVDDDLADLMEESPISYLL L		
		241		300
CAE47978 <i>Aspergillus fumigatus</i> D12	(189)	VLOQLGWPNYLITNVTGHNNHERQPEGRGKGRNGYFGGVNHNENSSPLYEAKDAKLIY		
EAK94955 <i>Candida albicans</i> D12	(220)	VFQQLGGLQLYLAATNATGQ-----VYEGYSKI AKS-----HYTPTSEVFDKHOYWIY		
EAL03493 <i>Candida albicans</i> D12	(225)	IFQOTEGHISYLVANVSGQ-----KYEGVSFLKLN-----HFNPNLSLIDPKKDYWIY		
AAF08684 <i>Mortierella alpina</i> D12	(205)	VIQFLGWRAYLIMNASGQ-----DYGRTS-----HFHTYSPIEPFRNPEEDII		
Consensus	(241)	VFQQLGWPNYLITNVSQ YPG SKGKKN HFNPNSSPIFDKDYWIY		
		301		360
CAE47978 <i>Aspergillus fumigatus</i> D12	(249)	LSDLGLFLVGSLEYYIGSTYEWLNLLVWYGI PLYLVNHWLVAITFLQHTDPTLPHYQPEA		
EAK94955 <i>Candida albicans</i> D12	(268)	LSDLGLILAEITTYQWYKNEGLFNMMINWVFPWLWNHWLVEVTFLOQHTDPTMPHYTSKE		
EAL03493 <i>Candida albicans</i> D12	(273)	LSDLGILLQEFNLYVWYQSEGGFNLLVNVILPYFLVNHWLVEITFLQHS DPMPHYEASQ		
AAF08684 <i>Mortierella alpina</i> D12	(249)	LSDLGVLAALGALITYASMLSLITVTKYIIVPYLVNFWLVLITFLQHTDPPKPHYREGA		
Consensus	(301)	LSDLGILLAFS LYYIY SFGLNLLVNYIVPYLVNHWLVEITFLQHTDPTLPHY A A		
		361		420
CAE47978 <i>Aspergillus fumigatus</i> D12	(309)	WDFTRGAAATIDRDFGVEGRHIFHGI IETHVLHHYVSTIPFYHAEASEAIAKVMGPHYR		
EAK94955 <i>Candida albicans</i> D12	(328)	WTFARGAAATIDRNFGEVQHFHDIIETHVLHHYVSRIPFYNAREASEAIAKVMGPHYR		
EAL03493 <i>Candida albicans</i> D12	(333)	WTFARGAAATIDREFGVEGRHIFHDI IETHVLHHYVSRIPFYNAREASEAIAKVMGIHQ		
AAF08684 <i>Mortierella alpina</i> D12	(309)	WNFQRCALCTVDRSFGKFLDHFHGI IETHVAHHLFSQMPFYHAEASEAIAKVMGPHYR		
Consensus	(361)	WTFARGAAATIDRDFGVEGRHIFHGI IETHVLHHYVSRIPFYNAREASEAIAKVMGPHYR		
		421		476
CAE47978 <i>Aspergillus fumigatus</i> D12	(369)	SEAHTCWTGFLKALWTSARTCQWVEPTEGAKGESQYVLFYRNINGIGVFPAPKIPAK (SEQ ID NO: 17)		
EAK94955 <i>Candida albicans</i> D12	(388)	YEGESMWY----SLWKCMRMCQFVDDKED---AKGVMMFRNVNCGVPVKPKD--- (SEQ ID NO: 18)		
EAL03493 <i>Candida albicans</i> D12	(393)	HSDENMWY----SLWKSARWCQFVDDN-----N-GVLMFRNNTNGEGVDPKKQTH- (SEQ ID NO: 19)		
AAF08684 <i>Mortierella alpina</i> D12	(369)	YBPSPEVY----AVWRSFRRCREVEDG-----DVVFKK----- (SEQ ID NO: 16)		
Consensus	(421)	YEAESMWV ALWKSAR CQFVDDN A GVLMFRNNGFGV P K		

相似性: 83.2%; 同一性: 23.9%
 CAE47978? 424)烟色曲霉
 EAK94955? 436)白色念珠菌
 EAL03493? 433)白色念珠菌
 AAF08684? 399)高山被孢霉

图 6



AAF08684MalpinaD12

399 aa

图 7

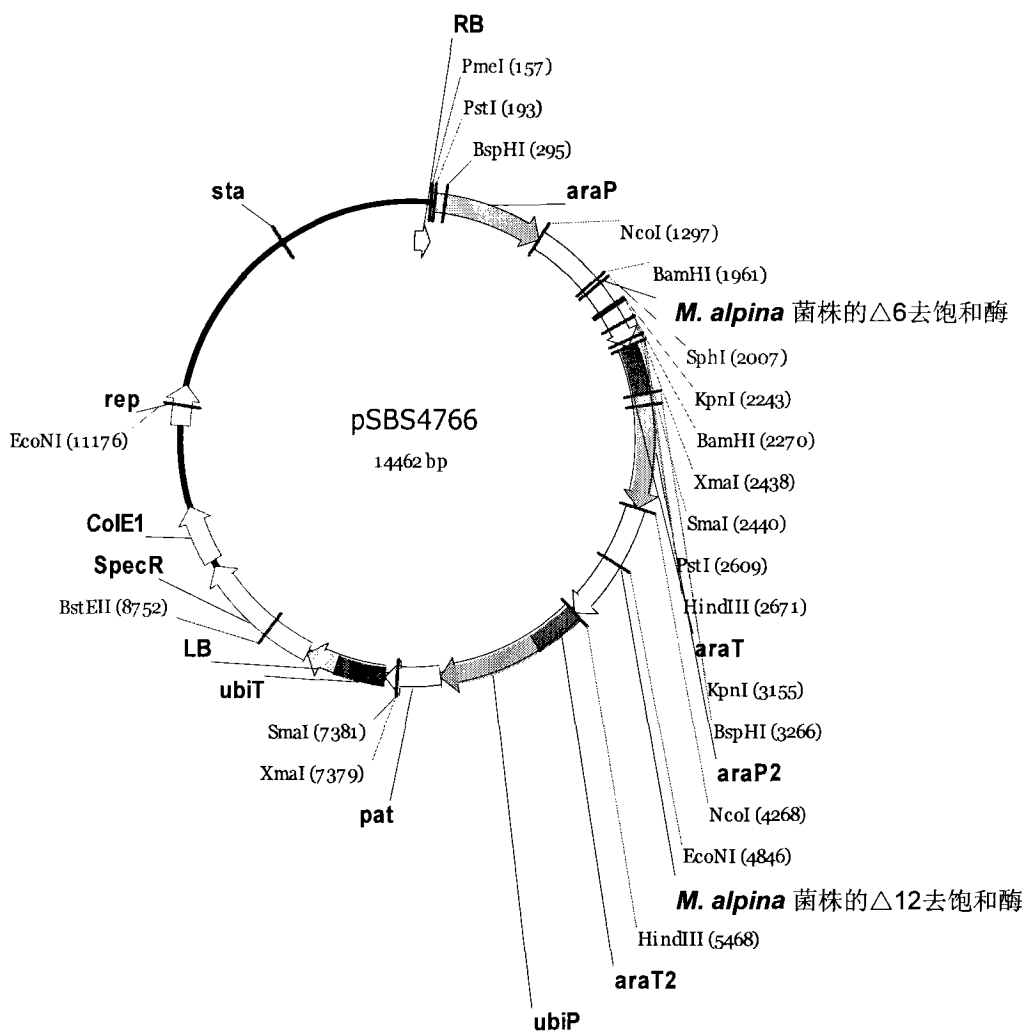


图 8

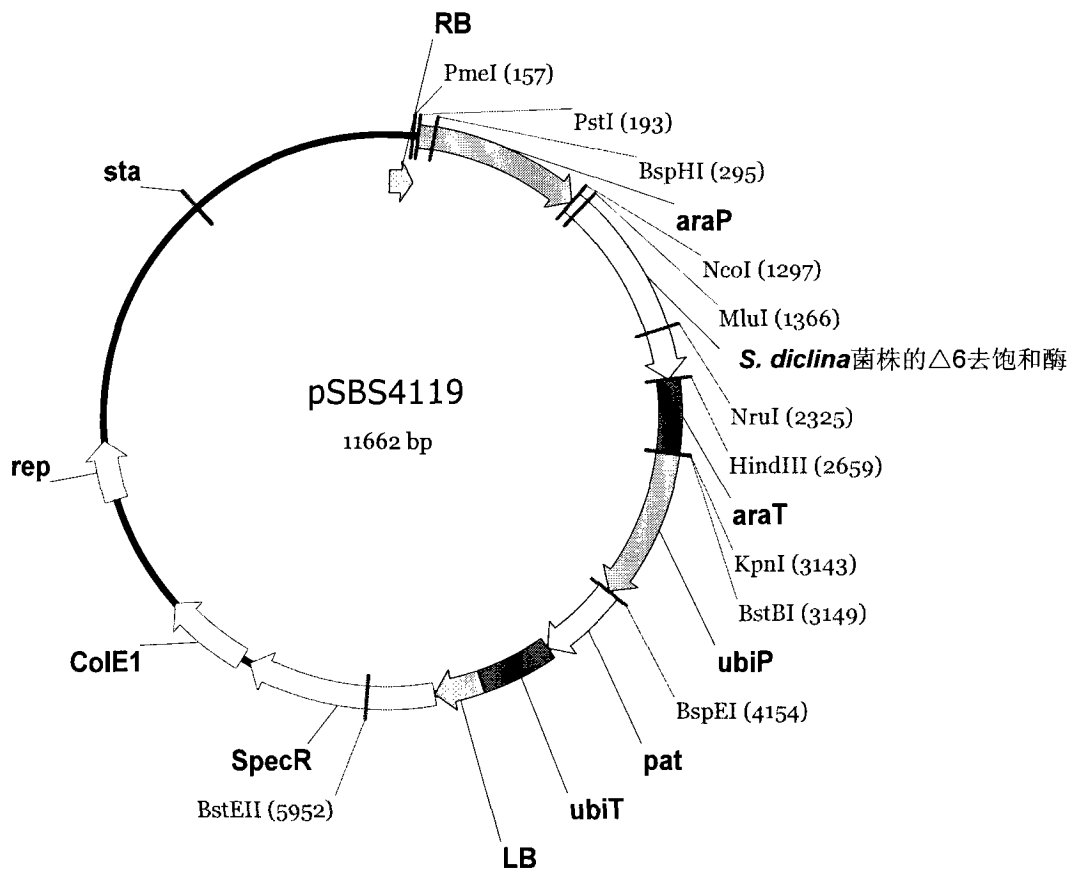


图 9

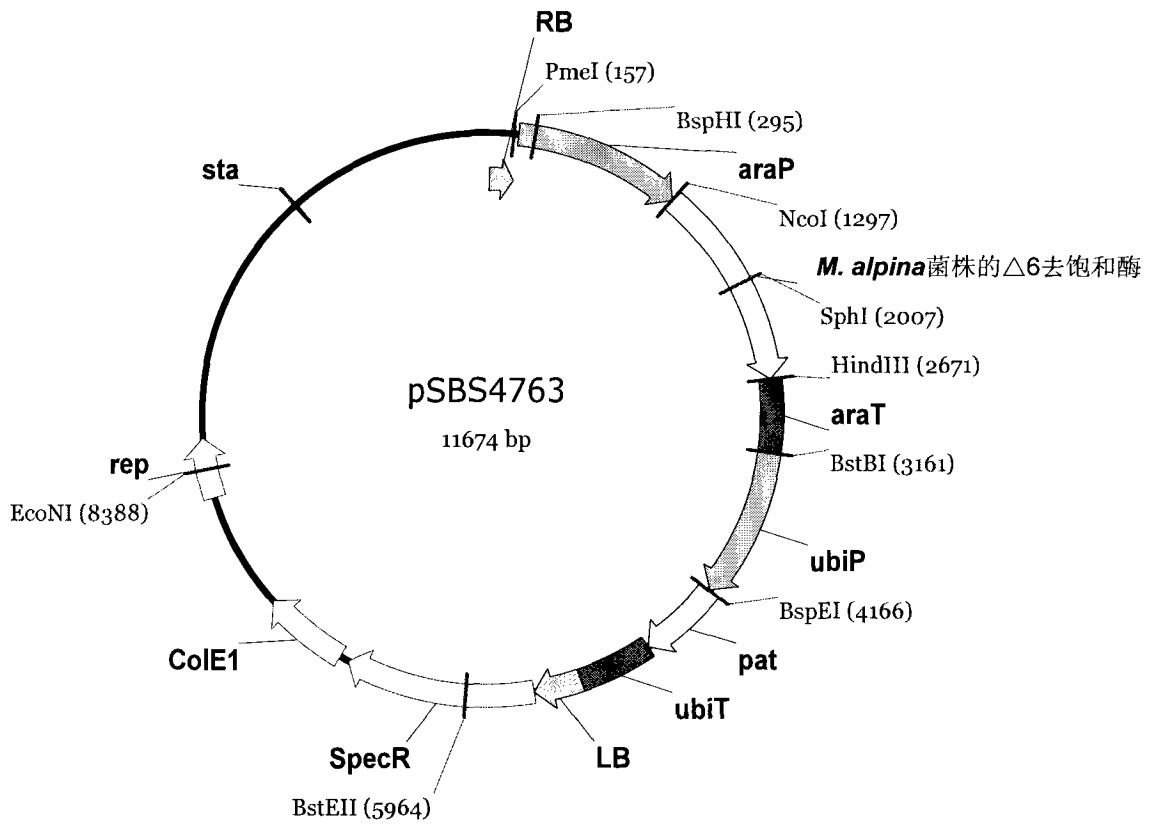


图 10