



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115094081 A

(43) 申请公布日 2022.09.23

(21) 申请号 202210113594.1

(22) 申请日 2015.11.13

(30) 优先权数据

62/079,622 2014.11.14 US

62/234,373 2015.09.29 US

(62) 分案原申请数据

201580073433.2 2015.11.13

(83) 生物保藏信息

PTA-121703 2014.11.04

PTA-121704 2014.11.04

PTA-122340 2015.07.31

(71) 申请人 巴斯夫植物科学有限公司

地址 德国莱茵河畔路德维希港

(72) 发明人 C·安德烈

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 胡志君 黄革生

(51) Int.Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

A01H 5/10 (2018.01)

A01H 6/20 (2018.01)

权利要求书2页 说明书49页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

增加种子油中生育酚含量的材料和方法

(57) 摘要

本发明一般地涉及分子生物学领域,并且涉及相对于对照植物增加植物的生育酚含量,包括在植物中表达至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸和至少一种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸。本发明还涉及用于制备油、含有脂肪酸或脂类的组合物的方法,且涉及这类油和脂类本身。

1. 用于产生油(或者包含所述油的饲料、食品、化妆品或药物组合物)的方法,包括:培育植物,所述植物包含相对于对照植物增加的生育酚含量,其中所述植物的特征在于,相对于对照植物,在植物中增加了至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸和至少一种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸的表达。

2. 根据权利要求1所述的方法,还包括从所述植物的种子分离油,并测试油中DHA、EPA和/或生育酚的水平。

3. 根据权利要求1所述的方法,还包括在植物中表达至少一种编码 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,还包含在植物中表达至少一种编码 Δ -5-延伸酶的多核苷酸。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,还包括在植物中表达至少一种编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中表达至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸、至少两种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸、至少两种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸和任选地至少三种编码 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸,和至少一种编码 Δ -5-延伸酶的多核苷酸和至少两种编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中表达至少一种编码来自展叶剑叶藓的 Δ -6延伸酶的多核苷酸、至少一种编码来自假微型海链藻的 Δ -6延伸酶的多核苷酸、至少一种编码来自大豆疫霉的 Δ -12去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码来自托瑞蚝球藻的 Δ -6去饱和酶的多核苷酸和至少一种编码来自破囊壶菌属物种的 Δ -5去饱和酶的多核苷酸(尤其至少两种编码来自破囊壶菌属物种的 Δ -5去饱和酶的多核苷酸),和任选至少一种编码来自畸雌腐霉的 Ω -3去饱和酶的多核苷酸(尤其至少两种编码来自畸雌腐霉的 Ω -3去饱和酶的多核苷酸)、至少一种编码来自致病疫霉的 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码来自托瑞蚝球藻的 Δ -5延伸酶的多核苷酸、至少一种编码来自破囊壶菌属物种的 Δ -4去饱和酶的多核苷酸和至少一种编码来自路氏巴夫藻的 Δ -4去饱和酶的多核苷酸。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中多核苷酸是重组多核苷酸。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中多核苷酸存在于在植物基因组中稳定整合的一个T-DNA或构建体上。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中多核苷酸在植物种子中表达。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中生育酚含量是总生育酚含量、 α -生育酚含量、 β -生育酚含量、 γ 生育酚含量和/或 δ -生育酚含量,尤其其中生育酚含量是总生育酚含量、 γ 生育酚含量和/或 δ -生育酚含量。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中植物是油籽植物,尤其其中植物是十字花科(Brassicaceae)植物,优选是芸苔属(Brassica)植物并且最优选是下述物种的植物,所述物种包含甘蓝(Brassica oleracea)、黑芥(Brassica nigra)和芜菁(Brassica rapa)物种中一个或两个成员的基因组,因此所述物种优选包含欧洲油菜(Brassica napus)、埃塞俄比亚芥(Brassica carinata)、芥菜(Brassica juncea)、甘蓝、黑芥或芜菁

物种中一个或两个成员的基因组。

增加种子油中生育酚含量的材料和方法

[0001] 本申请是中国专利申请201580073433.2的分案申请,原申请的申请日是2015年11月13日,发明名称是“增加种子油中生育酚含量的材料和方法”。

技术领域

[0002] 本申请要求2014年11月14日提交的美国临时专利申请62/079622号和2015年9月29日提交的美国临时专利申请62/234373号的优先权,该专利申请通过引用方式完整并入本文。

[0003] 作为本公开的组成部分,序列列表作为文本文件与本说明书同时提交。序列列表的主题通过引用的方式完整并入本文。

[0004] 本发明一般地涉及分子生物学领域并且涉及相对于对照植物增加植物的生育酚含量,包括在植物中表达至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-延伸酶(elongase)的多核苷酸和至少一种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸。本发明还涉及用于制备油、含有脂肪酸或脂类的组合物的方法,以及这类油和脂类(lipid)本身。

背景技术

[0005] 脂肪酸是具有在众多生物学过程中发挥基础作用的长链烃侧基团的羧酸。脂肪酸在自然界中罕以游离形式存在,而是以酯化形式作为脂类的主要组分出现。因此,脂类/脂肪酸是能量的来源(例如, β -氧化)。此外,脂类/脂肪酸是细胞膜的不可分割部分,并且因此对于处理生物学或生物化学信息是不可替代的。

[0006] 极长链多不饱和脂肪酸(VLC-PUFA)如二十二碳六烯酸(DHA、22:6(4,7,10,13,16,19))是哺乳动物中多种组织和细胞器(例如,神经、视网膜、脑和免疫细胞)的细胞膜的必需组分。临床研究已经显示,DHA对婴儿的脑生长与发育和成人正常脑功能的维持是必需的(Martinetz,M.(1992)J. Pediatr.120:S129-S138)。DHA还显著地影响参与信号转导过程的光受体功能、视紫红质激活,和视杆细胞与视锥细胞发育(Giusto,N.M.等人(2000)Prog.Lipid Res.39:315-391)。此外,还发现DHA对如高血压、关节炎、动脉粥样硬化、抑郁、血栓形成和癌症的疾病的某些积极影响(Horrocks、L.A.和Yeo、Y.K.(1999)Pharmacol.Res.40:211-215)。因此,适宜的膳食供应DHA对人体健康重要。人体能够将二十碳五烯酸(EPA、20:5(5,8,11,14,17))转化成DHA。EPA通常存在于海鲜中并且在来自北大西洋的多油鱼类中丰富。除充当DHA的前体之外,EPA也可以在人体中转化成类花生酸(eicosanoid)。从EPA产生的类花生酸具有抗炎和抗血小板聚集特性。DHA或EPA和DHA的混合物已经显示多种有益的健康作用。

[0007] 维生素E(生育酚)是植物和动物两者中对预防氧化性损伤重要的脂溶性抗氧化物质,并且已知其具有预防心血管疾病方面的有益作用。维生素E天然存在于植物油中,其中它发挥防止氧化性损伤的作用。植物油因此代表了人膳食中一种有用维生素E源。另外,使用从植物油提取的维生素E作为其他食品、健康补充产品和化妆产品中的添加物。

[0008] 截止目前,尚不可能使维生素E浓度与油的任何n-3VLC-PUFA(即, EPA或DHA)组分相关。维生素E在植物中作为多种形式的生育酚(包括 α -、 β -、 γ -和 δ)出现。一项含有52个欧洲油菜(*Brassica napus*)地方品种及15个繁育系的研究揭示了 α -生育酚和18:1+18:2之间的显著正相关,但是在 γ -生育酚和任何脂肪酸组分之间无相关性(Li等人(2013) *J Agric Food Chem* 61:34-40)。生育酚浓度尚未与脂肪酸组成经遗传方式改变的多种欧洲油菜种子中的不饱和度相关(Abidi等人(1999) *J Am Oil Chem Soc* 76, 463-467和Dolde等人(1999) *J Am Oil Chem Soc* 76,349-355)。

[0009] 因此需要提供以优选高的浓度包含生育酚的可靠植物源,尤其种子源。

[0010] 发明简述

[0011] 本发明因此涉及一种相对于对照植物增加植物的生育酚含量的方法,所述方法包括在植物中表达至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸和至少一种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸。

[0012] 在一个实施方案中,该方法还包括在植物中表达至少一种编码 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸。

[0013] 在一个实施方案中,该方法还包括在植物中表达至少一种编码 Δ -5-延伸酶的多核苷酸。

[0014] 在一个实施方案中,该方法还包括在植物中表达至少一种编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸。优选地,表达两个或更多个编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸。更优选地,表达至少一种编码辅酶A依赖性 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸和至少一种编码磷脂依赖性 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸。

[0015] 优选地,表达至少两种其他多核苷酸。另外,本发明构思表达全部三种其他多核苷酸。因此,该方法还可以包括表达至少一种编码 Δ -5-延伸酶的多核苷酸,至少一种编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸(优选地辅酶A依赖性 Δ -4去饱和酶的至少一种多核苷酸和磷脂依赖性 Δ -4去饱和酶的至少一个多核苷酸)和至少一种编码 Ω -3去饱和酶的多核苷酸。

[0016] 另外,本发明的方法还可以包括在植物中表达至少一种编码 Δ -15-去饱和酶的多核苷酸。

[0017] 在一个实施方案中,表达至少一种编码来自展叶剑叶藓(*Physcomitrella patens*)的 Δ -6延伸酶的多核苷酸,至少一种编码来自大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)的 Δ -12去饱和酶的多核苷酸,至少一种编码来自托瑞蚝球藻(*Ostreococcus tauri*)的 Δ -6去饱和酶的多核苷酸,至少一个来自假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)的编码 Δ -6延伸酶的多核苷酸,至少一种编码来自破囊壶菌属物种(*Thraustochytrium* sp.) (优选地来自破囊壶菌属物种ATCC21685)的 Δ -5去饱和酶的多核苷酸(优选地至少两个多核苷酸),和任选地至少一种编码来自畸雌腐霉(*Pythium irregulare*)的 Ω -3去饱和酶的多核苷酸(优选地,至少两个多核苷酸),至少一种编码来自致病疫霉(*Phytophthora infestans*)的 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸,至少一个来自托瑞蚝球藻(*Ostreococcus tauri*)的 Δ -5延伸酶的多核苷酸、至少一种编码来自破囊壶菌属物种的 Δ -4去饱和酶的多核苷酸和至少一种编码来自路氏巴夫藻(*Pavlova lutheri*)的 Δ -4去饱和酶的多核苷酸。优选地,表达至少两种编码来自破囊壶菌属物种(优选地来自破囊壶

菌属物种 ATCC21685)的 Δ -5去饱和酶的多核苷酸。另外,构思了表达至少两种编码来自畸雌腐霉的 Ω -3去饱和酶的多核苷酸。如本文其他地方所述,还可以表达前述多核苷酸的变体。

[0018] 根据本发明的方法,构思了表达至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸,至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸,至少两种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸,至少两种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸和任选地至少三种编码 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸,和至少一种编码 Δ -5-延伸酶的多核苷酸和至少两种编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸。优选地,表达至少一种编码辅酶A依赖性 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸和至少一种编码磷脂依赖性 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸。

[0019] 在一个实施方案中,多核苷酸在植物的种子中表达。

[0020] 根据本发明,如与对照植物的种子中的生育酚含量相比,生育酚含量应当优选地在植物的种子中增加,尤其如与对照植物的种子油相比,植物的种子油中生育酚含量增加。

[0021] 优选地,编码上文所提及的延伸酶和去饱和酶的多核苷酸是重组多核苷酸。可以通过将它们借助重组手段(如农杆菌介导转化法)引入植物,在植物中表达它们。因此,该方法可以包括引入并表达上文所提及的多核苷酸的步骤。

[0022] 在一个实施方案中,该方法还可以包括步骤:选择(与对照植物相比)具有增加的生育酚含量的植物。

[0023] 根据本发明,上文中提到的多核苷酸存在于一个T-DNA或构建体上(并且因此存在于相同的T-DNA或构建体上)。所述构建体或T-DNA应当在植物的基因组中稳定整合。在一个实施方案中,植物对T-DNA纯合。在另一个实施方案中,植物对T-DNA为半合子的。如果植物在一个基因座对一个T-DNA纯合,则本文中将此视为单拷贝,即视为一个拷贝。如本文所用,双拷贝指其中两个T-DNA已经在一个或两个基因座插入并处于半合子态或纯合态的植物。

[0024] 本发明还涉及构建体或T-DNA,所述构建体或T-DNA包含如本发明方法的背景下所述的多核苷酸的表达盒以增加生育酚含量。

[0025] 优选地,构建体或T-DNA应当包含至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸和至少一种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸的表达盒,和任选地至少一种其他编码上文所提及的去饱和酶或延伸酶的多核苷酸。

[0026] 本发明进一步涉及如本发明背景下所述的多核苷酸或包含所述多核苷酸的表达盒的构建体或T-DNA的用途,用于相对于对照植物增加植物的生育酚含量。

[0027] 本发明还涉及植物,所述植物包含如本发明方法的背景下提到的多核苷酸的表达盒以增加生育酚含量,或包含本发明的T-DNA或构建体。

[0028] 本发明还涉及本发明植物的种子。所述种子应当包含如本发明方法的背景下提到的多核苷酸的表达盒以增加生育酚含量,或包含本发明的T-DNA或构建体。在一个实施方案中,种子应当包含本发明的油。下文描述油。

[0029] 优选地,用于增加生育酚含量的方法包括从植物,尤其从植物的种子获得油的其他步骤。所述油应当具有如本文中他处所述的增加的生育酚含量。此外,油应当具有增加

的VLC-PUFA含量。根据本发明,油应当在维持生育酚含量的条件下从植物获得。这类方法是本领域熟知的。

[0030] 本发明也提供产生油的方法,其中油具有高生育酚含量。此外,油可以具有高VLC-PUFA含量,尤其高EPA和/或DHA含量。在特别优选的方面,这些方法用于产生相应的植物油。因此,本发明还提供产生油的方法。

[0031] 本发明也提供产生植物的方法,从而植物或其后代可以用作具有高生育酚含量的油的来源。优选地,油还具有高VLC-PUFA含量,尤其高EPA和/或DHA含量。因此,本发明还有益地提供用于产生植物的方法,所述植物具有可遗传的种子油中高生育酚含量表型。另外,植物可以在其一种或多种组织或组分中具有高VLC-PUFA含量,优选地在种子油中具有高EPA和/或DHA含量。

[0032] 发明详述

[0033] 下文更详细地描述本发明的多个方面。先前部分中给出的定义和解释因此适用。应当理解,详细描述不意在限制权利要求书的范围。

[0034] 生育酚是本领域熟知的。术语“生育酚含量”优选地指总生育酚含量,即指在植物,其植物部分(优选地种子中)或油(尤其种子油中)中存在的生育酚的量的总和。特别地,该术语指 α -生育酚, β -生育酚, γ -生育酚和 δ -生育酚的量的总和。但是,还构思该术语指 α -生育酚的量, β -生育酚的量和 γ -生育酚的量或 δ -生育酚的量。在一个优选实施方案中,该术语指 γ -生育酚的量。在另一个优选实施方案中,该术语指 δ -生育酚的量。还优选地,该术语至总生育酚, γ -生育酚和/或 δ -生育酚的量。

[0035] 因此在本发明的上下文中,“生育酚”优选地指总生育酚, α -生育酚, β -生育酚, γ -生育酚和/或 δ -生育酚。特别地,该术语指总生育酚, γ -生育酚或 δ -生育酚。

[0036] 术语“量”或“含量”优选地指(优选地,植物中,更优选地种子中和最优选地种子油中)绝对量或浓度。在一个实施方案中,如与对照植物的种子油相比,植物的种子油中生育酚含量增加。

[0037] 增加生育酚含量指与对照植物相比,生育酚含量在植物或其部分,组织或器官中,优选地在种子中,尤其在油中增加至少1%,至少5%,至少10%,至少12%或至少15%。

[0038] 如本文提到的“增加的生育酚含量”或“高生育酚含量”优选地指种子油中的总生育酚含量多于97mg/100g种子油,尤其多于100mg/100g种子油;种子油中的 α 生育酚含量多于31mg/100g种子油,尤其多于33mg/100g种子油;种子油中的 β 生育酚含量多于0.6mg/100g种子油;种子油中的 γ 生育酚含量多于65mg/100g种子油,尤其多于70mg/100g种子油或种子油中的 δ 生育酚含量多于1.4mg/100g种子油,尤其多于1.5mg/100g种子油。

[0039] 另外,如本文提到的“增加的生育酚含量”或“高生育酚含量”优选地指种子总生育酚含量多于35mg/100g种子,尤其多于39mg/100g种子;种子 α 生育酚含量多于12mg/100g种子,尤其多于13mg/100g种子;种子 β 生育酚含量多于0.22mg/100g种子;种子 γ 生育酚含量多于25mg/100g种子,尤其多于26mg/100g种子或种子 δ 生育酚含量多于0.45mg/100g种子,尤其多于0.48mg/100g种子。

[0040] 种子,尤其油,还可以包含高VLC-PUFA(极长链多不饱和脂肪酸)含量。

[0041] 选择合适的对照植物是实验设计的例行部分,并且可以包括相应的野生型植物或无编码如本文提到的去饱和酶和延伸酶的多核苷酸的相应植物。对照植物一般是相同

的植物物种或甚至是与待评估植物相同的品种。对照植物也可以是待评估植物的失效合子。失效合子(或失效对照植物)是因分离而丢失转基因的个体。另外,将对照植物在与本发明植物的培育条件相同或基本上相同的培育条件下培育,即在本发明植物附近并与之同时培育。如本文中所述的“对照植物”优选地不仅指完整植物,也指植物部分,包括种子和种子部分。对照还可能是来自对照植物的油。

[0042] 优选地,对照植物是同基因的对照植物(因此,对照油例如应当来自同基因的对照植物)。

[0043] 本文所用的术语“多不饱和脂肪酸(PUFA)”指包含至少2个,优选地3,4,5或6个双键的脂肪酸。另外,应当理解此类脂肪酸在脂肪酸链中优选地包含18至24个碳原子。更优选地,该术语涉及在脂肪酸链中具有20至24个碳原子的长链PUFA(VLC-PUFA)。特别地,在本发明意义范围内的多不饱和脂肪酸是DHGLA 20:3(8,11,14)、ARA 20:4(5,8,11,14)、ETA 20:4(8,11,14,17)、EPA 20:5(5,8,11,14,17)、DPA 22:5(4,7,10,13,16)、DPA n-3(7,10,13,16,19)、DHA 22:6(4,7,10,13,16,19),更优选地,二十碳五烯酸(EPA) 20:5(5,8,11,14,17)和二十二碳六烯酸(DHA) 22:6(4,7,10,13,16,19)。因而,应当理解最优选地,本发明提供的方法涉及生产EPA和/或DHA和/或生育酚。另外,本发明还涵盖合成期间出现的VLC-PUFA的中间体。此类中间体优选地从底物由本发明多肽的去饱和酶、酮酰基辅酶A-合酶、酮酰基辅酶A-还原酶、脱水酶和烯酰辅酶A还原酶多肽活性形成。优选地,底物涵盖LA 18:2(9,12)、GLA 18:3(6,9,12)、DHGLA 20:3(8,11,14)、ARA 20:4(5,8,11,14)、二十碳二烯酸20:2(11,14)、二十碳四烯酸20:4(8,11,14,17)、二十碳五烯酸20:5(5,8,11,14,17)。下表中给出根据本发明使用的脂肪酸(包括多不饱和脂肪酸)的系统名称,其相应俗名和简化符号:

系统名称:	俗名	简化符号 1	简化符号 2
十六烷酸	棕榈酸	16:0	
(Z)-7-十六碳烯酸		16:1n-9	
(Z,Z,Z)-7,10,13-十六碳三烯酸		16:3n-3	
十八烷酸	硬脂酸	18:0	
(Z)-9-十八烯酸 (Octadecenoic acid)	油酸	18:1n-9	OA
(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸	亚油酸	18:2n-6	LA
(Z,Z)-6,9-十八碳二烯酸		18:2n-9	
(Z,Z,Z)-9,12,15-十八碳三烯酸 (Octadecatrienoic acid)	α -亚麻酸	18:3n-3	ALA
(Z,Z,Z)-6,9,12-十八碳三烯酸	γ -亚麻酸	18:3n-6	GLA
(Z,Z,Z,Z)-6,9,12,15-十八碳四烯酸 (Octadecatetraenoic acid)	硬脂艾杜糖酸	18:4n-3	SDA
二十烷酸	花生酸	20:0	
(Z)-11-二十碳烯酸	巨头鲸鱼酸	20:1n-9	
(Z,Z)-11,14-二十碳二烯酸		20:2n-6	
(Z,Z,Z)-11,14,17-二十碳三烯酸		20:3n-3	
(Z,Z,Z)-8,11,14-二十碳三烯酸	二高- γ -亚麻酸	20:3n-6	DHGLA
(Z,Z,Z)-5,8,11-二十碳三烯酸	米德酸 (mead acid)	20:3n-9	
(Z,Z,Z,Z)-8,11,14,17-二十碳四烯酸		20:4n-3	ETA
(Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14-二十碳四烯酸	花生四烯酸	20:4n-6	ARA
(Z,Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸	花生五烯酸	20:5n-3	EPA
二十二烷酸	山嵛酸	22:0	
(Z)-13-二十二烯酸	芥酸	22:1n-9	
(Z,Z,Z,Z)-7,10,13,16-二十二碳四烯酸	肾上腺酸	22:4n-6	DTA
(Z,Z,Z,Z,Z)-7,10,13,16,19-二十二碳五烯酸	鳕鱼酸	22:5n-3	DPAn-3
(Z,Z,Z,Z,Z)-4,7,10,13,16-二十二碳五烯酸	Osbond 酸	22:5n-6	DPAn-6
(Z,Z,Z,Z,Z,Z)-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸		22:6n-3	DHA

[0044] 本文所用的术语“培育”指在这样的培养条件下维持并培育转基因植物,所述的培养条件允许细胞在植物中产生生育酚,产生包含增加的生育酚含量的种子或产生包含增加的生育酚含量的油(如与对照相比)。这提示如本文与本发明方法相关而提到的多核苷酸存在于植物中。在下文更详细地描述用于培育宿主细胞的合适培养条件。

[0045] 优选地,编码如本文提到的酶的多核苷酸稳定整合至植物的基因组中。更优选地,多核苷酸在稳定整合入植物基因组的一个T-DNA或构建体上存在。因此,它们优选地存在于单一即相同的T-DNA(或构建体)上。这同样适用于如本文提到的表达盒。因此,多核苷酸或表达盒优选地由相同的T-DNA组成。

[0046] 应当理解,多于一个拷贝的T-DNA(或构建体)可以存在于植物中(例如,对该T-DNA(或构建体)纯合的植物中),或存在于农杆菌介导的转化产生多于一个整合事件的植物中。

[0047] 本文所用的术语“获得”涵盖提供细胞培养物,包括宿主细胞和培养基、或本发明的植物或植物部分,尤其种子,以及提供其包含生育酚的纯化或部分纯化的制备物。植物,植物部分或纯化的或部分纯化的制备物还可以包含游离形式或CoA结合形式(如膜磷脂或如三酰甘油酯)的多不饱和脂肪酸,优选地,ARA,EPA,DHA。更优选地,PUFA和VLC-PUFA将作为甘油三酯形式(例如以油形式)获得。可以在本文其他地方找到关于纯化技术的更多细

节。

[0049] 根据本发明,术语“多核苷酸”指脱氧核糖核酸和/或核糖核酸。除非另外声明,否则本文中“多核苷酸”指单链DNA多核苷酸或指双链DNA多核苷酸。多核苷酸的长度根据本发明通过规定碱基对(“bp”)或核苷酸(“nt”)的数目指定。根据本发明,两种规定互换使用,无论相应的核酸是否为单链或双链核酸。另外,由于多核苷酸依据其相应的核苷酸序列确定,术语“核苷酸/多核苷酸”和“核苷酸序列/多核苷酸序列”互换使用,因此对核酸序列的提及还意在确定包含其序列与核酸序列相同的核酸片段或由该核酸片段组成的核酸。

[0050] 具体而言,如根据本发明使用的术语“多核苷酸”,只要它涉及去饱和酶或延伸酶基因,则涉及包含下述核酸序列的多核苷酸,所述核酸序列编码具有去饱和酶或延伸酶活性的多肽。优选如实施例部分的表2中所示的编码具有去饱和酶或延伸酶活性的多肽的多核苷酸(在最后二列给出核酸序列和多肽序列的SEQ ID NO)。

[0051] 优选地,由本发明多核苷酸编码的在植物中联合表达时具有去饱和酶或延伸酶活性的多肽应当能够增加植物中,尤其种子,种子油或整个植物或其部分中生育酚的含量及因此生育酚的量。可以通过本领域熟知的统计检验(包括例如置信水平为至少90%,优选地至少95%和甚至更优选地至少98%的Student t-检验),确定某种增加是否具有统计显著性。更优选地,增加是与对照相比,尤其与来自对照的种子,种子油,粗制油或精制油中的含量相比,生育酚的量增加至少1%,至少5%,至少10%,至少12%或至少15%(优选地,以重量计)。

[0052] 此外,在植物中联合表达具有去饱和酶或延伸酶活性的多肽应当能够增加例如种子油或整个植物或其部分中PUFA的量和尤其VLC-PUFA的量。更优选地,增加是与野生型对照相比,来自野生型对照的种子,种子油,粗制油或精制油中含有VLC-PUFA的甘油三酯的量增加至少5%,至少10%,至少15%,至少20%或至少30%(优选地,以重量计)。

[0053] 因此,本发明允许产生这样的油,如与对照植物的油的生育酚含量相比,所述油不仅具有增加的生育酚含量,还具有增加的PUFA含量,尤其增加的VLC-PUFA含量。

[0054] 优选地,前文所指的LCPUFA是具有C20,C22或C24脂肪酸主体的多不饱和脂肪酸,更优选地是EPA和/或DHA。在后续实施例中显示油样品的脂类分析。

[0055] 具有多不饱和C20-和/或C22-脂肪酸分子的脂肪酸酯可以从用于制备脂肪酸酯的生物,按油或脂类的形式分离,例如按包含具有至少2,3,4,5或6个双键,优选地5或6个双键的多不饱和脂肪酸的化合物如鞘脂,磷酸甘油酯,脂类,糖脂如糖鞘脂,磷脂如磷脂酰乙醇胺,磷脂酰胆碱,磷脂酰丝氨酸,磷脂酰甘油,磷脂酰肌醇或二磷脂酰甘油,单酰甘油酯,二酰甘油酯,三酰甘油酯或其他脂肪酸酯如乙酰辅酶A酯的形式分离。优选地,它们按其二酰甘油酯,三酰甘油酯的形式和/或按磷脂酰胆碱的形式,特别优选地按三酰甘油酯的形式分离。除这些酯之外,多不饱和脂肪酸还在非人类转基因生物或宿主细胞,优选地在植物中作为游离脂肪酸存在或结合在其他化合物中。脂肪酸优选地以结合形式产生。借助本发明的多核苷酸和多肽,这些不饱和脂肪酸有可能定位于优选产生的甘油三酯的sn1, sn2和/或sn3位置处。

[0056] 本文提及的去饱和酶和延伸酶是本领域熟知的。

[0057] 术语“去饱和酶”涵盖了催化长度和不饱和碳原子双键数不同的脂肪酸去饱和的

全部酶活性和酶。具体而言,这包括优选地催化第4和第5碳原子脱氢的 $\Delta 4(d4)$ -去饱和酶;催化第5和第6碳原子脱氢的 $\Delta 5(d5)$ -去饱和酶;催化第6和第7碳原子脱氢的 $\Delta 6(d6)$ -去饱和酶;催化第15和第16碳原子脱氢的 $\Delta 15(d15)$ -去饱和酶。 $\omega 3(o3)$ 去饱和酶优选地催化n-3碳原子和n-2碳原子的脱氢。

[0058] 术语“延伸酶”涵盖了催化长度和不饱和碳原子双键数不同的脂肪酸延伸的全部酶活性和酶。优选地,本文所用的术语“延伸酶”指向脂肪酸碳链中引入,优选地在脂肪酸的位置1,5,6,9,12和/或15中引入两个碳分子的延伸酶活性。

[0059] 在一个优选实施方案中,术语“延伸酶”应当指将两个碳分子向饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的羧基末端(即位置1)引入的延伸酶活性。

[0060] 在奠定本发明的研究中,已经提供了用于增加生育酚含量的优越去饱和酶和延伸酶催化活性的酶。实施例部分中的表2列出了优选的多核苷酸,所述多核苷酸编码待用于本发明中的优选的去饱和酶或延伸酶。因此,在表2中显示了可以在本发明背景下使用的去饱和酶或延伸酶的多核苷酸。如本文中他处所述,还可以使用所述多核苷酸的变体。

[0061] 已经在W02001/059128,W02004/087902和W02005/012316中描述了编码显示出 Δ -6-延伸酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自展叶剑叶藓的这种酶)完整并入本文。

[0062] 已经在W02002026946和W02003/093482中描述了编码显示出 Δ -5-去饱和酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自破囊壶菌属物种的这种酶)完整并入本文。

[0063] 已经在W02005/012316,W02005/083093,W02006/008099和W02006/069710中描述了编码显示出 Δ -6-去饱和酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自托瑞蚝球藻的这种酶)完整并入本文。

[0064] 在一个实施方案中, Δ -6-去饱和酶是CoA(辅酶A)依赖性 Δ -6-去饱和酶。

[0065] 已经在W02005/012316,W02005/007845和W02006/069710中描述了编码显示出 Δ -6-延伸酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自假微型海链藻的这种酶)完整并入本文。

[0066] 已经例如在W02006100241中描述了编码显示出 Δ -12-去饱和酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自大豆疫霉的这种酶)完整并入本文。

[0067] 已经例如在W02004/090123中描述了编码显示出 Δ -4-去饱和酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自纤细裸藻(*Euglena gracilis*)的这种酶)完整并入本文。

[0068] 已经在W02005/012316和W02007/096387中描述了编码显示出 Δ -5-延伸酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自托瑞蚝球藻的这种酶)完整并入本文。

[0069] 已经例如在W02008/022963中描述了编码显示出 $\omega 3$ -去饱和酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自畸雌腐霉的这种酶)完整并入本文。

[0070] 已经例如在W02005012316和W02005083053中描述了编码显示出 $\omega 3$ -去饱和酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自致病疫霉的这种酶)完整并入本文。

[0071] 已经例如在W02002026946中描述了编码显示出 Δ -4-去饱和酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自破囊壶菌属物种的这种酶)完整并入本文。

[0072] W02003078639和W02005007845中描述了编码来自路氏巴夫藻的 Δ -4去饱和酶的多核苷酸。这些文件完整并入本文,尤其在这样的情况下,这些文件涉及 Δ -4去饱和酶

“P1DES 1”并分别涉及W02003078639的图3a- 图3d和W02005007845的图3a,图3b。

[0073] 已经例如在W02010/066703中描述了编码显示出 Δ -15-去饱和酶活性的多肽的多核苷酸,所述文件(描述来自异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*) C5的这种酶)完整并入本文。

[0074] 本文中编码前述多肽的多核苷酸也称作“靶基因”或“目的核酸”。这些多核苷酸是本领域熟知的。所述多核苷酸的序列可以在实施例部分中公开的T-DNA的序列中找到(参见,例如,具有如SEQ ID NO:3中所示序列的VC-LTM593-1qcz的序列,还参见表1)。实施例部分的表2中还给出了多核苷酸序列和多肽序列。

[0075] 下文显示本文中与本发明相关而提到的去饱和酶和延伸酶的优选多核苷酸的序列。如本文中他处所述,还可以使用这些多核苷酸的变体。编码根据本发明待使用的去饱和酶和延伸酶的多核苷酸可以衍生自某些生物。优选地,衍生自某生物(例如,衍生自展叶剑叶藓)的多核苷酸经密码子优化。特别地,多核苷酸应当为在植物中表达而密码子优化。

[0076] 术语“密码子优化”是技术人员充分理解的。优选地,密码子优化的多核苷酸是这样的多核苷酸,其中与该序列所来自的生物中的核酸序列比较,所述多核苷酸被修饰,由此它适应于一个或多个植物物种中的密码子选择。一般,通过将至少一个或多个密码子替换为一个或多个在该生物(尤其植物)的基因中更频繁使用的密码子,多核苷酸,尤其编码区适应于在给定的生物中(尤其在植物中)表达。根据本发明,“来自某生物”(或“衍生自某生物”)的特定多核苷酸的密码子优化变体优选地应当视为衍生自所述生物的多核苷酸。

[0077] 优选地,密码子优化的多核苷酸应当编码与非密码子优化的多核苷酸(即野生型序列)编码的多肽具有相同序列的相同多肽。在奠定本发明的研究中,使用(去饱和酶)的密码子优化的多核苷酸。密码子优化的多核苷酸由具有如SEQ ID NO:3中所示序列的T-DNA载体组成(参见表1)。

[0078] 下文描述本文中与本发明相关而提到的去饱和酶和延伸酶的优选多核苷酸的序列和相应多肽的序列。当然,多核苷酸的变体和多核苷酸可以与本发明组合(尤其与方法, T-DNA,构建体,植物,种子等组合)使用。

[0079] 优选地,根据本发明待使用的 Δ -6-延伸酶衍生自展叶剑叶藓。所述 Δ -6-延伸酶的优选序列在SEQ ID NO:258中显示。优选地,所述 Δ -6-延伸酶由衍生自展叶剑叶藓的多核苷酸编码,具体地,所述 Δ -6-延伸酶由其密码子优化的变体编码。优选地,衍生自展叶剑叶藓的编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:3的核苷酸1267至2139中所示序列的多核苷酸。该多核苷酸的序列还在SEQ ID NO:257中显示。

[0080] 优选地,根据本发明待使用的 Δ -5-去饱和酶衍生自破囊壶菌属物种。在本发明的上下文中,破囊壶菌属物种优选地意指破囊壶菌属物种 ATCC21685。所述 Δ -5-去饱和酶的优选序列在SEQ ID NO:260中显示。优选地,所述 Δ -5-去饱和酶由衍生自破囊壶菌属物种的多核苷酸编码;具体地,所述 Δ -5-去饱和酶由所述多核苷酸的密码子优化变体编码。优选地,衍生自破囊壶菌属物种的编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:3的核苷酸3892至5211中所示序列的多核苷酸。该多核苷酸的序列还在SEQ ID NO:259中显示。根据本发明,构思了表达两个或更多个衍生自破囊壶菌属物种的编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸(即两个或更多个拷贝的多核苷酸)(优选地两个多核苷酸)。因此,本发明的T-

DNA、构建体，植物，种子等应当包含两个(或更多个)拷贝的衍生自破囊壶菌属物种的编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸。

[0081] 优选地，根据本发明待使用的 Δ -6-去饱和酶衍生自托瑞蚝球藻。所述 Δ -6-去饱和酶的优选序列在SEQ ID NO:262中显示。优选地，所述 Δ -6-去饱和酶由衍生自托瑞蚝球藻的多核苷酸编码；具体地，所述 Δ -6-去饱和酶由所述多核苷酸的密码子优化变体编码。优选地，衍生自托瑞蚝球藻的编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:3的核苷酸7802至9172中所示序列的多核苷酸。该多核苷酸的序列还在SEQ ID NO:261中显示。

[0082] 优选地，根据本发明待使用的 Δ -6-延伸酶衍生自假微型海链藻。所述 Δ -6-延伸酶的优选序列在SEQ ID NO:264中显示。优选地，所述 Δ -6-延伸酶由衍生自假微型海链藻的多核苷酸编码；具体地，所述 Δ -6-延伸酶由所述多核苷酸的密码子优化变体编码。优选地，衍生自假微型海链藻的编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:3的核苷酸12099至12917中所示序列的多核苷酸。该多核苷酸的序列还在SEQ ID NO:263中显示。(因此，衍生自假微型海链藻的编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸优选地具有如SEQ ID NO:263中所示的序列)

[0083] 优选地，根据本发明待使用的 Δ -12-延伸酶衍生自大豆疫霉。所述 Δ -12-延伸酶的优选序列在SEQ ID NO:266中显示。优选地，所述 Δ -12-延伸酶由衍生自大豆疫霉的多核苷酸编码；具体地，所述 Δ -12-延伸酶由所述多核苷酸的密码子优化变体编码。优选地，衍生自大豆疫霉的编码 Δ -12-延伸酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:3的核苷酸14589至15785中所示序列的多核苷酸。该多核苷酸的序列还在SEQ ID NO:265中显示。

[0084] 优选地，根据本发明待使用的 Δ -5-延伸酶衍生自托瑞蚝球藻。所述 Δ -5-延伸酶的优选序列在SEQ ID NO:276中显示。优选地，所述 Δ -5-延伸酶由衍生自托瑞蚝球藻的多核苷酸编码；具体地，所述 Δ -5-延伸酶由所述多核苷酸的密码子优化变体编码。优选地，衍生自托瑞蚝球藻的编码 Δ -5-延伸酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:3的核苷酸38388至39290中所示序列的多核苷酸。该多核苷酸的序列还在SEQ ID NO:275中显示。

[0085] 优选地，根据本发明待使用的 ω 3-去饱和酶衍生自畸雌腐霉。所述 ω 3-去饱和酶的优选序列在SEQ ID NO:268中显示。优选地，所述 ω 3-去饱和酶由衍生自畸雌腐霉的多核苷酸编码；具体地，所述 ω 3-去饱和酶由所述多核苷酸的密码子优化变体编码。优选地，衍生自畸雌腐霉的编码 ω 3-去饱和酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:3的核苷酸17690至18781中所示序列的多核苷酸。该多核苷酸的序列还在SEQ ID NO:267中显示。根据本发明，构思了表达衍生自畸雌腐霉的两个或更多个编码 ω 3-去饱和酶的多核苷酸(即两个或更多个拷贝的多核苷酸)(优选地两个多核苷酸)。因此，本发明的T-DNA、构建体，植物，种子等应当包含衍生自畸雌腐霉的两个(或更多个)拷贝的编码 ω 3-去饱和酶的多核苷酸。

[0086] 优选地，根据本发明待使用的 ω 3-去饱和酶衍生自致病疫霉。所述 ω 3-去饱和酶的优选序列在SEQ ID NO:270中显示。优选地，所述 ω 3-去饱和酶由衍生自致病疫霉的多核苷酸编码；具体地，所述 ω 3-去饱和酶由所述多核苷酸的密码子优化变体编码。优选地，衍生自致病疫霉的编码 ω 3-去饱和酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:3的核苷酸20441至21526中所示序列的多核苷酸。该多核苷酸的序列还在SEQ ID NO:269中显示。

[0087] 根据本发明的方法，尤其构思在植物中表达优选地编码不相同的 ω 3-去饱和酶的两个或更多个不相同的多核苷酸。优选地，表达来自致病疫霉的至少一种编码 ω 3-去饱

和酶的多核苷酸和来自畸雌腐霉的至少一种编码 ω 3-去饱和酶的多核苷酸(尤其两个多核苷酸,即二个拷贝的多核苷酸)。

[0088] 优选地,根据本发明待使用的 Δ -4-去饱和酶衍生自破囊壶菌属物种。所述 Δ -4-去饱和酶的优选序列在SEQ ID NO:272中显示。优选地,所述 Δ -4-去饱和酶由衍生自破囊壶菌属物种的多核苷酸编码;具体地,所述 Δ -4-去饱和酶由所述多核苷酸的密码子优化变体编码。优选地,衍生自破囊壶菌属物种的编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:3的核苷酸 26384至27943中所示序列的多核苷酸。该多核苷酸的序列还在SEQ ID NO:271中显示。

[0089] 优选地,根据本发明待使用的 Δ -4-去饱和酶衍生自路氏巴夫藻。所述 Δ -4-去饱和酶的优选序列在SEQ ID NO:274中显示。优选地,所述 Δ -4-去饱和酶由衍生自路氏巴夫藻的多核苷酸编码;具体地,所述 Δ -4-去饱和酶由所述多核苷酸的密码子优化变体编码。优选地,衍生自路氏巴夫藻的编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:3的核苷酸34360至 35697中所示序列的多核苷酸。该多核苷酸的序列还在SEQ ID NO:273 中显示。

[0090] 根据本发明的方法,还构思在植物中表达优选地编码不相同的 Δ -4-去饱和酶的两个不相同的多核苷酸。优选地,表达来自破囊壶菌属物种的至少一种编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸和来自路氏巴夫藻的至少一种编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸(尤其两个多核苷酸)。

[0091] 优选地,根据本发明待使用的 Δ -15-去饱和酶衍生自异旋孢腔菌。优选地,所述 Δ -15-去饱和酶由衍生自异旋孢腔菌的多核苷酸编码;具体地,所述 Δ -15-去饱和酶由所述多核苷酸的密码子优化变体编码。优选地,衍生自异旋孢腔菌的编码 Δ -15-去饱和酶的多核苷酸是具有如SEQ ID NO:9 的核苷酸2151至3654中所示序列的多核苷酸。

[0092] 如上述的,编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸可以衍生自展叶剑叶藓。另外,编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸可以衍生自假微型海链藻。特别地,在本发明方法的背景下构思在植物中表达至少一种编码来自展叶剑叶藓的 Δ -6-延伸酶的多核苷酸和至少一种编码来自假微型海链藻的 Δ -6-延伸酶的多核苷酸。

[0093] 根据本发明,编码具有如上所述的去饱和酶或延伸酶活性的多肽的多核苷酸例如从下述属的生物可获得或获得:蚝球藻属(*Ostreococcus*),破囊壶菌属(*Thraustochytrium*),裸藻属(*Euglena*),海链藻(*Thalassiosira*),疫霉属(*Phytophthora*),腐霉属(*Pythium*),旋孢腔菌属(*Cochliobolus*),剑叶藓属(*Physcomitrella*)。然而,可以鉴定来自其他物种的直向同源物,旁系同源物或其他同源物。优选地,它们从植物如藻类例如等鞭金藻(*Isochrysis*),*Mantoniella*,隐甲藻(*Cryptocodinium*),藻类/硅藻如褐指藻(*Phaeodactylum*),藓类如角齿藓(*Ceratodon*)或高等植物如报春花科(*Primulaceae*)植物如粉报春组(*Aleuritia*)植物,*Calendula stellata*,刺状骨籽菊(*Osteospermum spinescens*)或*Osteospermum hyoseroides*,微生物如真菌如曲霉(*Aspergillus*),虫霉(*Entomophthora*),毛霉(*Mucor*)或被孢霉(*Mortierella*),细菌如希瓦氏菌(*Shewanella*),酵母或动物获得。优选的动物是线虫如隐杆线虫(*Caenorhabditis*),昆虫或脊椎动物。在脊椎动物当中,该核酸分子可以优选地源自真骨类(*Euteleostomi*),辐鳍亚纲(*Actinopterygii*);新鳍亚纲(*Neopterygii*);真骨鱼

次亚纲 (Teleostei); 真骨 鱼亚派 (Euteleostei), 原棘鳍总目 (Protacanthopterygii), 鲑形目 (Salmoniformes); 鲑科 (Salmonidae) 或太平洋鲑属 (Oncorhynchus), 更优选地来自鲑形目, 最优选地, 鲑科科, 如鲑属 (Salmo), 例如来自下述属和 物种: 虹鳟 (Oncorhynchus mykiss), 澳鳟 (Trutta trutta) 或河鳟 (Salmo trutta fario)。另外, 核酸分子可以是获得的硅藻如海链藻属 (Thalassiosira) 或 褐指藻属 (Phaeodactylum)。

[0094] 因而, 如根据本发明所用的术语“多核苷酸”还涵盖了代表本发明多核 苷酸的直向同源物, 旁系同源物或其他同源物的前述具体多核苷酸的变体 或衍生物。另外, 本发明多核苷酸的变体或衍生物还包括人工产生的突变 蛋白。所述突变蛋白包括例如通过诱变技术产生并且显示出改进或改变的 底物专一性的酶是或密码子优化的多核苷酸。

[0095] 本发明的核酸变体或衍生物是与给定的参考多核苷酸差异至少一个核 苷酸置换, 添加和/或缺失的多核苷酸。如果参考多核苷酸编码蛋白质, 则 这种蛋白质的功能在多核苷酸的变体或衍生物中保守, 从而变体核酸序列 应当仍编码具有如上所述的去饱和酶或延伸酶活性的多肽。变体或衍生物 还涵盖这样的多核苷酸, 所述多核苷酸包含能够与前述具体核酸序列杂交, 优选地在严格杂交条件下与之杂交的核酸序列。这些严格条件是本领域技 术人员已知的并且可以在Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6中找到。严格杂交条件的优选实例 是在大约45°C于6x氯化钠/柠檬酸钠(=SSC)中杂交, 随后在50°C至65°C (尤其在65°C)于0.2x SSC, 0.1% SDS中的一个或多个洗涤步骤的条件。技术人员知道这些杂交条件取决于核酸的类型而不同, 并且例如有机溶剂 存在时在温度和缓冲液浓度方面不同。例如, 在“标准杂交条件”下, 温度 范围根据核酸的类型在42°C和58°C之间, 在浓度0.1至5X SSC (pH 7.2) 的含水缓冲液中不同。若上文提及的缓冲液中存在有机溶剂, 例如50%甲 酰胺, 则标准条件下的温度是大约42°C。DNA:DNA杂交分子的杂交条件 优选地是0.1X SSC和20°C至45°C, 优选地在30°C和45°C之间。DNA:RNA 杂交分子的杂交条件优选地是0.1X SSC和30°C至55°C, 优选地在45°C和 55°C之间。以上提及的杂交温度是例如在甲酰胺不存在下对长度大约 100bp (=碱基对) 及G+C含量50%的核酸所确定的。通过参考教科书如 上文提到的教材或以下教材: Sambrook等人, “Molecular Cloning”, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames和Higgins (编著) 1985, “Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach”, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (编著) 1991, “Essential Molecular Biology: A Practical Approach”, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 技术人员知道如何确定所要求的杂交条件。在一个实施方案中, 严格杂交条件包括在65°C于1×SSC中或在42°C于1×SSC和50%甲酰胺 中杂交, 随后在65°C于0.3×SSC中洗涤。在另一个实施方案中, 严格杂 交条件包括在65°C于1×SSC中或在42°C于1×SSC和50%甲酰胺中 杂交, 随后在65°C于0.1×SSC中洗涤。

[0096] 备选地, 多核苷酸变体通过基于PCR的技术如基于混合寡核苷酸引 物(即, 使用针对本发明多肽保守结构域的简并引物)的DNA扩增法可获 得。可以通过本发明多核苷酸的核酸序列或本发明多肽的氨基酸序列的序 列比较鉴定本发明多肽的保守结构域。作为模板, 可以使用来自细菌, 真 菌植物或动物的DNA或cDNA。另外, 变体包括了包含下述核酸序列 的多核苷酸, 所述核酸序列与编码实施例的表1中所给出的任一个T-DNA 序列中所示序列的核酸并且尤其与编码上文所提及的去饱和酶或延伸酶, 尤其表2中给出的延伸酶和去

饱和酶的多核苷酸至少50%，至少55%，至少60%，至少65%，至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%相同。例如，构思了与编码来自破囊壶菌物种的 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸(并且因此与具有如SEQ ID NO: 3的核苷酸26384至27943中所示序列的多核苷酸)至少50%，至少55%，至少60%，至少65%，至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%相同的多核苷酸。当然，如本文提到的变体必须保留相应酶的功能，例如， Δ -4-去饱和酶的变体必须保留 Δ -4-去饱和酶活性，或 Δ -12-去饱和酶的变体必须保留 Δ -12-去饱和酶活性。

[0097] 优选地在整个氨基酸或核酸序列区域内计算同一性百分数值。对于技术人员，一系列基于多种算法的程序可用于比较不同的序列。在优选的实施方案中，使用已经并入EMBOSS软件包(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice, P., Longden, I. 和 Bleasby, A, Trends in Genetics 16 (6), 276-277, 2000)的Needle程序中的Needleman 和 Wunsch算法(Needleman 1970, J. Mol. Biol. (48): 444-453), BLOSUM62评分矩阵以及空位开口罚分10和空位延伸罚分0.5, 确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。可以在<http://emboss.sourceforge.net>找到用于本地安装EMBOSS软件包的指南以及与WEB-Services的连接。使用Needle程序, 用于比对两个氨基酸序列的参数的优选非限制性实例是默认参数, 包括EBLOSUM62评分矩阵, 空位开口罚分10和空位延伸罚分0.5。在又一个优选的实施方案中, 使用EMBOSS软件包(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice, P., Longden, I. 和 Bleasby, A, Trends in Genetics 16 (6), 276-277, 2000)中的Needle程序, 使用EDNAFULL评分矩阵和空位开口罚分10和空位延伸罚分0.5, 确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数。使用Needle程序, 联合用于比对两个核酸序列的参数的优选非限制性例子是默认参数, 包括EDNAFULL评分矩阵, 空位开口罚分10和空位延伸罚分0.5。可以进一步使用本发明的核酸序列和蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库进行检索, 以例如鉴定其他家族成员或相关序列。可以使用Altschul等人的BLAST系列程序(2.2版)(Altschul 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-10)执行此类检索。可以使用默认参数, 以BLASTn, BLASTx或tBLASTx程序执行使用本发明的去饱和酶核酸序列及延伸酶核酸序列作为查询序列的BLAST, 以获得与本发明的去饱和酶序列和延伸酶序列同源的核苷酸序列(BLASTn, tBLASTx)或氨基酸序列(BLASTx)。可以使用默认参数, 以BLASTp或tBLASTn程序执行使用本发明的去饱和酶蛋白质序列及延伸酶蛋白质序列作为查询序列的BLAST, 以获得与本发明的去饱和酶序列和延伸酶序列同源的氨基酸序列(BLASTp)或核酸序列(tBLASTn)。为了出于比较目的获得空位比对结果, 可以如Altschul等人(Altschul 1997, Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402)中所述, 利用具有默认参数的空位BLAST。

[0098] 下文描述了具有SEQ ID NO: 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273或275中所示序列的多核苷酸的优选变体。

[0099] 优选地, 编码如本文提到的去饱和酶或延伸酶的多核苷酸的变体优选地是包含选自以下的核酸序列的多核苷酸:

[0100] a) 核酸序列, 其与具有如SEQ ID NO: 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273或275中所示核苷酸序列的核酸序列至少70%, 80%或90%相同,

[0101] b) 编码多肽的核酸序列, 所述多肽与具有如SEQ ID NO: 258, 260, 262, 264, 266,

268,270,272,274或276中所示氨基酸序列的多肽至少70%,80%或90%相同,和

[0102] c) 核酸序列,其能够在严格条件下与i)具有如SEQ ID NO:257,259,261,263,265,267,269,271,273或275中所示核苷酸序列的核酸序列,或ii)编码具有如SEQ ID NO:258,260,262,264,266,268,270,272,274或276中所示氨基酸序列的多肽的核酸序列杂交。

[0103] 如上述,由所述核酸编码的多肽必须保留相应酶的功能并且因此保留其活性。例如,具有如SEQ ID NO:270中所示序列的多肽具有 Ω -3-去饱和酶活性。因此,这种多肽的变体也应当具有 Ω -3-去饱和酶活性。

[0104] 因此,编码如本文提到的去饱和酶或延伸酶的多核苷酸优选地是包含选自以下的核酸序列的多核苷酸:

[0105] a) 核酸序列,其具有如SEQ ID NO:257,259,261,263,265,267,269,271,273或275中所示的核苷酸序列;

[0106] b) 编码多肽的核酸序列,所述多肽具有如SEQ ID NO:258,260,262,264,266,268,270,272,274或276中所示的氨基酸序列,

[0107] c) 核酸序列,其与具有如SEQ ID NO:257,259,261,263,265,267,269,271,273或275中所示核苷酸序列的核酸序列至少70%,80%或90%相同,

[0108] d) 编码多肽的核酸序列,所述多肽与具有如SEQ ID NO:258,260,262,264,266,268,270,272,274或276中所示氨基酸序列的多肽至少70%,80%或90%相同,和

[0109] e) 核酸序列,其能够在严格条件下与i)具有如SEQ ID NO:257,259,261,263,265,267,269,271,273或275中所示核苷酸序列的核酸序列,或ii)编码具有如SEQ ID NO:258,260,262,264,266,268,270,272,274或276中所示氨基酸序列的多肽的核酸序列杂交。

[0110] 事件LBFLFK包含两个T-DNA插入,这些插入命名为LBFLFK基因座1和LBFLFK基因座2。通过用具有如SEQ ID NO:3中所示序列的T-DNA载体转化,产生包含这种插入的植物。对植物中存在的插入测序揭示,每个基因座在编码性序列中含有导致单个氨基酸交换的点突变。这些突变不影响基因的功能。基因座1在大豆疫霉 Δ -12去饱和酶(d12Des(Ps))的编码性序列中具有点突变。所产生的多核苷酸具有如SEQ ID NO:324中所示的序列。所述多核苷酸编码的多肽具有如SEQ ID NO:325中所示的序列。基因座2在路氏巴夫藻 Δ -4去饱和酶(d4Des(P1))的编码性序列中具有点突变。所产生的多核苷酸具有如SEQ ID NO:326中所示的序列。所述多核苷酸编码的多肽具有如SEQ ID NO:327中所示的序列。前述多核苷酸被视为编码来自大豆疫霉的 Δ -12去饱和酶的多核苷酸和编码来自路氏巴夫藻的 Δ -4去饱和酶的多核苷酸的变体。这些多核苷酸被视为变体并且可以在本发明的上下文中使用。

[0111] 还涵盖包含前述任何核酸的片段,尤其前述任何核酸序列的片段的多核苷酸作为本发明的多核苷酸。这些片段应当编码仍具有如上所述的去饱和酶或延伸酶活性的多肽。因而,所述多肽可以包含或由赋予所述生物学活性的本发明多肽的结构域组成。如本文中所意指的片段优选地包含任一前述核酸序列的至少50个,至少100个,至少250个或至少500个连续核苷酸或编码这样的氨基酸序列,其包含任一前述氨基酸序列的至少20个,至少30个,至少50个,至少80个,至少100个或至少150个连续氨基酸。

[0112] 上文所提及的变体多核苷酸或片段,优选地编码这样的多肽,所述多肽保留去饱和和酶活性或延伸酶活性至明显的程度,优选地保留至少10%,至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%由后续实施例中给出的T-DNA编码的任何多肽(尤其表1和表2中列出的去饱和酶或延伸酶)所显示的去饱和酶活性或延伸酶活性。

[0113] 为了表达编码如涉及本发明所述的去饱和酶或延伸酶的多核苷酸,多核苷酸应当与表达控制序列有效连接。优选地,表达控制序列相对于与之有效连接的多核苷酸是异源的。应当理解每个多核苷酸与表达控制序列有效连接。

[0114] 本文所用的术语“表达控制序列”指能够掌控即启动并控制目的核酸序列(在本文情况下,上文提及的序列)转录的核酸序列。这种序列通常包含启动子或启动子与增强子序列的组合或其组成。多核苷酸的表达包括核酸分子的转录,优选地,转录成可翻译的mRNA。额外的调节元件可以包括转录增强子以及翻译增强子。以下启动子和表达控制序列可以优选地在本发明的表达载体中使用。cos,tac,trp,tet,trp-tet,lpplac,lpplac-lac,lacIq,T7,T5,T3,gal,trc,ara,SP6, λ -PR或 λ -PL启动子优选地在革兰氏阴性细菌中使用。对于革兰氏阳性细菌,可以使用启动子amy和SPO2。优选地使用来自酵母的启动子或真菌启动子ADC1,AOX1r,GAL1,MFA,AC,P-60,CYC1,GAPDH,TEF,rp28,ADH。对于动物性细胞或生物表达,优选地使用启动子CMV-,SV40-,RSV-启动子(罗氏肉瘤病毒),CMV-增强子,SV40-增强子。来自植物的启动子CaMV/35S (Franck 1980,Cell 21:285-294],PRP1 (Ward 1993,Plant.Mol.Biol.22),SSU,0CS,lib4,usp,STLS1,B33,nos或遍在蛋白或菜豆蛋白启动子。另外,在这种情况下优选诱导型启动子,如EP 0388186 A1(即,苜蓿黄酮诱导型),Gatz 1992,Plant J.2:397-404(即,四环素诱导型),EP 0335528 A1(脱落酸诱导型)或WO 93/21334(即,乙醇诱导型或环己醇诱导型)中描述的启动子。其他合适的植物启动子是来自马铃薯的胞质FBP酶启动子或ST-LSI启动子(Stockhaus 1989,EMBO J.8,2445),来自大豆(Glycine max)的磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶启动子(Genebank登录号U87999)或EP 0249676 A1中所述的节特异性启动子。特别优选能够在参与脂肪酸生物合成的组织中引起表达的启动子。另外,根据实践,特别优选种子特异性启动子,如USP启动子,及其他启动子如LeB4,DC3,菜豆蛋白或油菜籽蛋白启动子。进一步特别优选的启动子是可以用于单子叶或双子叶植物并且在US 5,608,152(来自菜籽油菜的油菜籽蛋白启动子),WO 98/45461(来自拟南芥属植物的油质蛋白启动子),US 5,504,200(来自菜豆(Phaseolus vulgaris)的菜豆蛋白启动子),WO 91/13980(来自芸苔属(Brassica)植物的Bce4启动子)中,由Baeumlein等人,Plant J.,2,2,1992:233-239(来自豆科植物的LEB4启动子)描述的种子特异性启动子,这些启动子适用于双子叶植物。以下启动子适用于单子叶植物:来自大麦的Ipt2-或Ipt1-启动子(WO 95/15389和WO 95/23230),来自大麦的大麦醇溶蛋白启动子和适用且在WO 99/16890中描述的其他启动子。原则上,可以将全部天然启动子连同它们的调节序列一起用于所述新方法。同样,额外或单独地使用合成性启动子是可能和有利的,尤其当它们介导种子特异性表达时,例如,如WO 99/16890中所述。优选地,编码如本文提到的去饱和酶和延伸酶的多核苷酸在植物的种子中表达。在一个具体实施方案中,根据本发明,利用种子特异性启动子。在一个具体的优选实施方案中,编码去饱和酶或延伸酶的多核苷酸与实施例部分中用于表达去饱和酶和延伸酶的表达控制序列有效连接(参见,

例如,VC-LTM593-1qcz rc中用于表达延伸酶和去饱和酶 的启动子)。这种载体的序列在 SEQ ID NO:3中显示,还参见实施例部 分中的表1。

[0115] 本文所用的术语“有效连接”意指将表达控制序列和目的核酸连接,从 而所述目的核酸的表达可以由所述表达控制序列掌控,即,表达控制序列 应当与所述待表达的核酸序列功能性连接。因而,所述表达控制序列和待 表达的核酸序列可以彼此物理地连接,例如,通过将表达控制序列插在待 表达核酸序列的5'末端。备选地,表达控制序列和待表达核酸可以是仅物 理地接近,从而表达控制序列能够掌控至少一个目的核酸序列的表达。表 达控制序列和待表达的核酸优选地相隔不多于500bp,300bp,100bp, 80bp,60bp,40bp, 20bp,10bp或5bp。

[0116] 除启动子之外,本发明的优选多核苷酸还包含与目的核酸序列有效连 接的终止子序列。因而,形成表达盒。

[0117] 本文所用的术语“终止子”指能够终止转录的核酸序列。这些序列将导 致转录装置从待转录的核酸序列解离。优选地,终止子应当在植物中并且 尤其在植物种子中有效。合适的终止子是本领域已知的,并且优选地包括 在待表达核酸序列下游的多聚腺苷化信号如SV40多聚腺苷化位点或tk多 聚腺苷化位点或在Loke等人(Loke(1992) Plant Physiol 138,第1457-1468 页)中所示的植物特异性信号之一。

[0118] 在一个优选实施方案中,编码本文提及的去饱和酶或延伸酶的多核苷 酸是重组的。

[0119] 本发明另外涉及重组核酸分子,所述重组核酸分子包含至少一种编码 具有去饱和酶和/或延伸酶活性的多肽的核酸序列,所述核酸序列与该序列 起源的生物中的核酸序列相比,受到修饰,因为它适应于一个或多个植物 物种中的密码子选择。

[0120] 出于本发明的目的,例如就核酸序列,表达盒(=基因构建体)或包含本 发明方法中所用核酸的载体或经本发明方法中所用核酸序列,表达盒或载 体转化的宿主细胞而言,“重组”意指通过重组方法产生的全部那些结构, 其中核酸序列或与该核酸序列有效连接的遗传控制序列(例如启动子)不位 于其天然遗传环境或已经通过重组方法修饰。

[0121] 本文以上给出的定义优选地适用于以下情况:

[0122] 如上述,本发明涉及相对于对照植物增加植物的生育酚含量的方法,所述方法包 括在植物中表达至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸,至 少一种编码 Δ -6-去饱和酶 的多核苷酸,至少一种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷 酸和至少一种编码 Δ -5-去饱和酶的多 核苷酸。在一个实施方案中,该方法 还包括表达至少一种编码 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸, 至少一种编码 Δ -5- 延伸酶的多核苷酸,和/或至少一种编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸 (关于本 发明方法的更多细节,参见“发明简述”部分,这些定义和解释因此适用)。优选 地,多核苷酸从表达盒表达。

[0123] 本发明还涉及提供如涉及本发明方法所述的多核苷酸,构建体或 T-DNA,旨在植 物或其部分中,尤其在植物油中实现高生育酚含量。

[0124] 构建体或T-DNA应当包含如本发明方法的背景下所述的多核苷酸的 表达盒以增加生育酚含量。构建体或T-DNA可以与本发明的方法组合使 用。在一个实施方案中,将所述 构建体或T-DNA引入植物以表达所述多 核苷酸(用于增加生育酚含量)。

[0125] 因此,本发明涉及包含至少一个 Δ -12-去饱和酶表达盒,至少一个 Δ -6-去饱和

酶表达盒,至少一个 Δ -6-延伸酶表达盒和至少一个 Δ -5-去饱和酶表达盒的构建体或T-DNA。

[0126] 用于表达基因(本文中称作靶基因)的表达盒应当包含与启动子(表达控制序列)有效连接的编码相应酶(即去饱和酶或延伸酶)的多核苷酸。优选地,表达盒还包含终止子。优选地,终止子在编码去饱和酶或延伸酶的多核苷酸的下游。

[0127] 在一个实施方案中,构建体或T-DNA还包含至少一个 Ω -3-去饱和酶表达盒。

[0128] 在一个实施方案中,构建体或T-DNA还包含至少一个 Δ -5-延伸酶表达盒。

[0129] 在一个实施方案中,构建体或T-DNA还包含至少一个 Δ -4-去饱和酶表达盒。

[0130] 在一个实施方案中,构建体或T-DNA还包含至少一个表达盒 Δ -15-去饱和酶。

[0131] 在一个优选实施方案中,构建体或T-DNA还包含至少一个 Ω -3-去饱和酶表达盒,至少一个 Δ -5-延伸酶表达盒和至少一个 Δ -4-去饱和酶表达盒(优选地至少一个辅酶A依赖性 Δ -4去饱和酶表达盒和至少一个磷脂依赖性 Δ -4去饱和酶表达盒)。

[0132] 在一个特别优选的实施方案中,T-DNA或构建体包含至少一个 Δ -12-去饱和酶表达盒,至少一个 Δ -6-去饱和酶表达盒,至少两个 Δ -6-延伸酶表达盒,至少两个 Δ -5-去饱和酶表达盒和任选地至少三个 Ω -3-去饱和酶表达盒及至少一个 Δ -5-延伸酶表达盒,以及至少两个 Δ -4-去饱和酶表达盒(优选地一个CoA(辅酶A)依赖性D4Des表达盒和一个磷脂依赖性d4Des表达盒)。

[0133] 在另一个优选实施方案中,T-DNA或构建体包含至少一个来自展叶剑叶藓的 Δ -6延伸酶的表达盒,至少一个来自大豆疫霉的 Δ -12去饱和酶的表达盒,至少一个来自托瑞蚝球藻的 Δ -6去饱和酶的表达盒,至少一个来自假微型海链藻的 Δ -6延伸酶的表达盒,至少一个来自破囊壶菌属物种的 Δ -5去饱和酶的表达盒(尤其至少两个表达盒),和任选地至少一个来自畸雌腐霉的 Ω -3去饱和酶的表达盒(尤其至少两个表达盒),至少一个来自致病疫霉的 Ω -3-去饱和酶的表达盒,至少一个来自托瑞蚝球藻的 Δ -5延伸酶的表达盒和至少一个来自破囊壶菌属物种的 Δ -4去饱和酶的表达盒和至少一个来自路氏巴夫藻的 Δ -4去饱和酶的表达盒。

[0134] 还优选地,T-DNA或构建体包含实施例部分中所述的T-DNA载体VC-LTM593-1qcz中的T-DNA的序列。这种载体包含SEQ ID NO:3中所示的序列。

[0135] 因此,本发明提供用于植物中表达靶基因的T-DNA,其中T-DNA包含左边界元件和右边界元件和至少一个包含与靶基因有效连接的启动子及其下游终止子的表达盒(并且因此至少上文所提及的表达盒),其中从左边界元件至右边界元件测量并包含靶基因的T-DNA的长度具有至少30000 bp长度。在一个实施方案中,表达盒借助至少500bp长度的分隔区与T-DNA的最近边界分隔。

[0136] 在一个实施方案中,本发明的T-DNA或构建体可以在编码上文所提及的去饱和酶或延伸酶的表达盒之间包含分隔区。优选地,表达盒彼此借助至少100碱基对,优选地100至200碱基对的分隔区分隔。因此,每个表达盒之间存在分隔区。

[0137] 本发明因此提供核酸,即多核苷酸。本发明的多核苷酸是或包含本发明的T-DNA或构建体。因此,本发明的T-DNA是多核苷酸,优选地是DNA,并且最优选地是双链DNA。本发明的“T-DNA”是能够最终整合入植物遗传物质(基因组)的核酸。本领域技术人员理解对于这类整合,要求转化相应的植物材料,本文中描述了优选的转化方法和植物生成方法。

[0138] 还根据本发明提供了包含如根据本发明定义的T-DNA或构建体的核酸。例如,本发明的T-DNA可以包含于环状核酸(例如,质粒)中,从而额外的核酸部分存在于左边界元件和右边界元件之间,即存在于本发明表达盒的“对面”。例如使用任意起点,这种环状核酸可以标定成线性形式,从而定义“左边界元件-表达盒-右边界元件-表达盒对面的额外核酸部分”将相同的环状核酸限定为定义“表达盒-右边界元件-表达盒对面的额外核酸部分-左边界元件”。额外的核酸部分优选地包含在一种或多种宿主微生物中,优选地在埃希氏菌属(*Escherichia*)微生物,优选地大肠杆菌和/或农杆菌中复制总核酸的一个或多个遗传元件,即核酸分子包含T-DNA和额外的核酸部分。下文以更多细节描述优选的宿主微生物。包含本发明T-DNA的这类环状核酸特别可用作转化载体;下文以更多细节描述这类载体。

[0139] 如本文提到的多核苷酸优选地在其引入植物后在植物中表达。因此,本发明的方法还可以包括将多核苷酸引入植物的步骤。优选地,通过转化,尤其通过农杆菌介导的转化法,将多核苷酸引入植物。在一个实施方案中,植物用包含如涉及本发明所述的多核苷酸和/或表达盒的构建体或T-DNA转化。因此,构思植物(已经)用本发明的T-DNA或构建体转化。用于引入的构建体或T-DNA优选地包含待表达的全部多核苷酸。因此,单个构建体或T-DNA应当用于转化。

[0140] T-DNA或构建体长度因此优选巨大,即可以具有至少15000bp,优选地多于30000bp,更优选地至少40000bp,甚至更优选地至少50000bp和最优选地至少60000bp的最小长度。优选地,T-DNA的长度处于任何前述最小长度至120000bp的范围内,更优选地处于任何前述最小长度至100000bp的范围内,甚至更优选地处于任何前述最小长度至90000bp的范围内,甚至更优选地处于任何前述最小长度至80000bp的范围内。在这类最小长度情况下,可以按表达盒形式引入多个基因,从而每个独立基因与至少一个启动子和至少一个终止子有效链接。

[0141] 在一个实施方案中,在T-DNA左边界元件的3'方向或在T-DNA右边界元件的5'方向,存在设定除包含靶基因的表达盒之外的相应边界元件的分隔区。在T-DNA左边界元件3'方向的分隔区不必然地具有与T-DNA右边界元件5'方向的分隔区相同的长度和/或序列,只要两个分隔区满足下文给出的其他要求即可。

[0142] 在另一个实施方案中,表达盒彼此借助至少100碱基对,优选地100至200碱基对的分隔区分隔。因此,在表达盒之间存在分隔区。

[0143] 分隔区或间隔区是主要由其长度限定的DNA部分。其功能是将靶基因分别与T-DNA的左边界或右边界分隔。引入分隔区有效地将目的基因与T-DNA插入基因组DNA后相邻基因组位置产生的重大影响分隔。例如,通常认为并非全部基因组位点同等地适于靶基因的表达,并且处于相同启动子和终止子控制下的相同基因可能在植物中以不同强度表达,这取决于靶基因(和其相应启动子和终止子)在植物基因组中整合的区域。通常认为,转录因子和/或聚合酶以不同的难易程度接近植物基因组的区域,例如归因于这些区域紧密缠绕在组蛋白周围和/或连接至染色体主链(参见,例如Deal等人,Curr Opin Plant Biol. Apr 2011;14(2):116-122)或其他支架物质(参见,例如,Fukuda Y., Plant Mol Biol. 1999Mar;39(5):1051-62)。不易理解通过本发明的T-DNA实现上文所提到益处的机制,因此便利地是,将间隔区视为物理上提供缓冲的手段以抵消因相邻组蛋白或染色体主

链或其他支架接合的区域缠绕DNA所形成的应变。作为模型,可以认为,为了转录靶基因,DNA不得不部分解开。如果靶基因的相邻区域抵抗这种解开,例如因为它们紧密缠绕在组蛋白周围或否则接合至支架或主链,从而核酸链的转动有限,则间隔区允许分散因较长的核酸片段上尝试解开产生的应变,因而减少在靶基因解开所需要的力。

[0144] 在一个实施方案中,分隔区具有至少500bp的长度。因此,分隔区可以长于500bp,并且优选地长至少800bp,更优选地至少1000bp。较长的间隔区允许靶基因和最近的基因组侧翼区之间甚至更充分的物理分隔。

[0145] 在另一个实施方案中,间隔区具有至少100bp的长度。优选地,间隔区具有100至200碱基对的长度。

[0146] 分隔区优选地具有缺少基质接合信号或支架接合信号的序列。优选地,分隔区或间隔区对500bp长度而言不包含多于一个,优选地对1000bp长度而言不包含多于一个在间隔区中出现20次或更多次的5元组,所述5元组在全部间隔区范围内以实例总结。这些5元组按递增频率处于间隔区内的实例是:AGCCT,CGTAA,CTAAC,CTAGG,GTGAC,TAGGC,TAGGT,AAAAA,AACGC,TTAGC,ACGCT,GCTGA,ACGTT,AGGCT,CGTAG,CTACG,GACGT,GCTTA,AGCTT,CGCTA,TGACG,ACGTG,AGCTG,CACGT,CGTGA,CGTTA,AGCGT,TCACG,CAGCT,CGTCA,CTAGC,GCGTC,TTACG,GTAGC,TAGCG,TCAGC,TAGCT,AGCTA,GCTAG,ACGTA,TACGT。与分隔区或间隔区相比,通过降低一种或多种前文所列5元组的出现频率,可以实现T-DNA中靶基因的表达进一步增加。

[0147] 分隔区可以含有选择标记。选择标记是在不必等待植物发芽或完全长成的情况下可以优选地在种子中验证其存在的核酸部分。优选地,选择标记向种子或向正在生长的植物传递表型特性,例如除草剂耐受性,着色,种子表面特性(例如,起皱),发光蛋白或荧光蛋白,例如绿色荧光蛋白或萤光素酶。如果需要标记基因的表达以显示表型特征,则分隔区相应地包含标记基因作为选择标记,优选地以表达盒形式包含。分隔区中包含选择标记是特别有利的,因为该标记允许便利地抛弃非转化的植物材料。另外,在下述的这种意料之外情况下,即T-DNA整合于其中间隔区的长度和/或核碱基组成不足以克服因相邻基因组DNA所致基因沉默效应的植物基因组位置中,则选择标记允许便利地抛弃这类不巧表现不佳的特殊转化体。因此,分隔区优选地包含表达除草剂耐受性基因的表达盒。这种分隔区大大减少不得不栽培下述转化体的几率,在所述转化体中沉默效应如此之强,甚至选择标记基因的表达大大减少或完全被抑制。根据本发明,分隔区优选地不包含去饱和酶基因或延伸酶基因,并且还优选地不包含与去饱和酶基因或延伸酶基因有效连接的启动子。因此在优选的实施方案中,本发明的T-DNA可用于将对于产生VLC-PUFA必需的去饱和酶基因和延伸酶基因与因相邻基因组植物DNA所致的效应的任何影响有效分隔。

[0148] 为了增加植物中的生育酚含量(和用于产生VLC-PUFA),本发明还提供构建体或T-DNA,所述的构建体或T-DNA包含如实施例的表1和表2中给出的编码性序列(尤其去饱和酶和延伸酶),优选地包含如实施例的表1中给出的编码性序列(尤其去饱和酶和延伸酶)和启动子,更优选地包含如实施例的表1中给出的编码性序列(尤其去饱和酶和延伸酶)和启动子及终止子,并且最优选地包含如本发明方法背景下提到的如存在于VC-LTM593-1qcz rc中的去饱和酶表达盒和延伸酶表达盒(参见实施例部分,SEQ ID NO:3)。

[0149] 本发明另外涉及植物,所述植物包含如本文中在本发明方法背景下提到的用于

增加生育酚含量的多核苷酸或本发明的T-DNA或构建体。另外，本发明涉及种子植物。所述种子应当包含所述多核苷酸。在一个实施方案中，所述多核苷酸由相同的T-DNA组成。

[0150] 此外，本发明涉及芸苔属植物或其种子，其中与对照植物相比，所述芸苔属植物或其种子具有增加的生育酚含量，尤其如与对照植物的种子相比，具有生育酚含量增加的种子。在一个实施方案中，所述植物是欧洲油菜植物。所述植物应当是转基因的。

[0151] 在一个优选实施方案中，本发明的种子应当包含如下文以更多细节所述的油。

[0152] 本发明的植物应当包含本发明的一个或多个T-DNA或构建体。因此，植物应当至少包含本发明的T-DNA或构建体。另外，构思本发明的植物包含了如本发明所述增加生育酚含量的方法背景下，编码去饱和酶的多核苷酸。

[0153] 优选地，由植物包含的T-DNA或构建体包含了编码一种或多种 $\Delta 6$ Des ($\Delta 6$ 去饱和酶)，一种或多种 $d6E1o$ ($\Delta 6$ 延伸酶)，一种或多种 $d5Des$ ($\Delta 5$ 去饱和酶)或一种或多种 $d12Des$ ($\Delta 12$ 去饱和酶)的一个或多个表达盒。在一种实施方案中，由本发明植物包含的T-DNA或构建体还包含一种或多种 $\omega 3Des$ ($\omega 3$ 去饱和酶)，一种或多种 $d5E1o$ ($\Delta 5$ 延伸酶)和/或一种或多种 $d4Des$ ($\Delta 4$ 去饱和酶)，优选地至少一种CoA(辅酶A)依赖性 $D4Des$ 和一种磷脂依赖性 $d4Des$ 的表达盒。

[0154] 三个去饱和酶基因特别地易受基因剂量效应(也称作“拷贝数效应”)影响，从而相比增加其他基因的表达盒数目，增加包含这些相应基因的表达盒数目导致植物油中更强的VLC-PUFA水平增长。这些基因是编码 $\Delta -12-$ 去饱和酶活性， $\Delta -6-$ 去饱和酶活性和 $\Omega -3-$ 去饱和酶活性的基因。应当理解在本发明的T-DNA包含多于一个包含相同功能的基因的表达盒情况下，这些基因就其核酸序列或由其编码的多肽序列而言不需要是相同的，但应当是功能性同源物。因此，例如，为了利用本文所述的基因剂量效应，任选地除编码 $\Delta -6-$ 去饱和酶和/或 $\Omega -3-$ 去饱和酶的多重基因之外，本发明的T-DNA还可以包含二，三，四个或更多个表达盒，所述表达盒各自包含编码 $\Delta -12-$ 去饱和酶的基因，其中由相应基因编码的 $\Delta -12-$ 去饱和酶多肽在其氨基酸序列上相异。同样地，任选地除编码 $\Delta -12-$ 去饱和酶和/或 $\Omega -3-$ 去饱和酶的多重基因之外，本发明的T-DNA还可以包含二，三，四或更多个表达盒，所述表达盒各自包含编码 $\Delta -6-$ 去饱和酶的基因，其中由相应基因编码的 $\Delta -6-$ 去饱和酶多肽在其氨基酸序列上相异，或任选地除编码 $\Delta -12-$ 去饱和酶和/或 $\Delta -6-$ 去饱和酶的多重基因之外，本发明的T-DNA还可以包含二，三，四或更多个表达盒，所述表达盒各自包含编码 $\Omega -3-$ 去饱和酶的基因，其中由相应基因编码的 $\Omega -3-$ 去饱和酶多肽在其氨基酸序列上相异。

[0155] 根据本发明，代之一个或多个前述编码性序列，T-DNA、构建体或植物还可以包含其功能性同源物。编码性序列的功能性同源物是编码与替换的编码性序列具有相同代谢功能的多肽的序列。例如， $\Delta -5-$ 去饱和酶的功能性同源物将是另一种 $\Delta -5-$ 去饱和酶，并且 $\Delta -5-$ 延伸酶的功能性同源物将是另一种 $\Delta -5-$ 延伸酶。编码性序列的功能性同源物优选地编码这样的多肽，所述多肽与实施例的表1中给出的相应编码性序列编码的多肽具有至少40%序列同一性，更优选地至少41%，更优选地至少46%，更优选地至少48%，更优选地至少56%，更优选地至少58%，更优选地至少59%，更优选地至少62%，更优选地至少66%，更优选地至少69%，更优选地至少73%，更优选地至少75%，更优选地至少77%，更优选地至少81%，更优选地至少84%，更优选地至少87%，更优选地至少90%，更优选地

至少92%，更优选地至少95%，更优选地至少96%，更优选地至少97%，更优选地至少98%和甚至更优选地至少99%序列同一性。同样地，启动子的功能性同源物是启动下述编码性序列转录的序列，对于近端启动子，所述编码性序列位于距离最靠近该编码性序列的启动子TATA框的500bp范围内，或对于远端启动子，位于其3000bp范围内。再次，植物种子特异性启动子的功能性同源物是另一种植物种子特异性启动子。相应地，终止子的功能性同源物是终结核酸序列转录的序列。

[0156] 实施例描述了特别优选的T-DNA序列。本领域技术人员理解，本文中所述的编码性序列，启动子和终止子可以由其功能性同源物替换。但是，实施例还描述了根据本发明，启动子和编码性序列的某些组合，或驱动其相应编码性序列表达的各启动子的某些组合，或某些编码性序列或其组合是特别有利的；根据本发明，这类组合或独立的编码性序列不应当由相应元件（此处：编码性序列或启动子）的功能性同源物替换。表1中显示优选的启动子-编码性序列-终止子组合。

[0157] 本发明的T-DNA或构建体可以包含易受基因剂量效应影响的两个或更多个基因，优选地全部基因。如本文所述，为了实现某些酶活性（例如， Δ -12-去饱和酶， Δ -6-去饱和酶和/或 Ω -3-去饱和酶活性）的高转化效率，向植物细胞中引入多于一种编码具有所需活性的酶的基因是有利的。当T-DNA引入植物细胞时，例如，如本文所述，通常采用涉及植物细胞暴露于微生物的转化方法。由于每个微生物可以包含多于一个包含本发明T-DNA的核酸，频繁地获得包含两个或更多个独立整合入细胞遗传物质的本发明T-DNA的重组植物细胞。因此，在一个转化用构建体上组合易受基因剂量效应影响的基因，允许轻易利用转化的独立性来实现更高频率的这类T-DNA多重插入。这特别可用于下述转化方法，所述转化方法依赖共转化以保持每个待转化构建体的尺寸。

[0158] 本发明因此还提供包含本发明T-DNA的构建体，其中构建体优选地是通过微生物介导的转化法，优选地通过农杆菌介导的转化法转化植物细胞的载体。相应地，本发明还提供转化用微生物，所述微生物包含本发明的一个T-DNA，优选地作为包含所述T-DNA的构建体包含。优选地，微生物是农杆菌属微生物，优选地是其卸甲菌株，并且优选地是物种根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）或，甚至更优选地，是物种发根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）。例如在W006024509A2中描述了相应菌株，并且例如在W013014585A1中描述使用这类微生物转化植物的方法。这些WO出版物完整并入本文，因为它们含有关于产生、选择和使用这类微生物的有价值信息。

[0159] 术语“载体”优选地包括噬菌体，质粒，病毒载体以及人工染色体，如细菌或酵母人工染色体。另外，该术语还涉及允许寻靶构建体随机或位点定向整合入基因组DNA的寻靶构建体。此类定向构建体优选地包含足够长度的用于如下文详述的同源或异源重组的DNA。包含本发明多核苷酸的载体优选地还包含用于宿主中增殖和/或选择的选择标记。载体可以通过本领域熟知的多项技术并入宿主细胞中。如果引入宿主细胞，载体可以停留在细胞质中或可以并入基因组中。在后一种情况下，可以理解载体可以进一步包含允许同源重组或异源插入的核酸序列。载体可以通过常规转化或转染技术引入原核或真核细胞中。如本上下文中所用，术语“转化”和“转染”，接合和转导，意图包括用于将外来核酸分子（例如DNA）引入宿主细胞的多种现有技术方法，包括磷酸钙，氯化铷或氯化钙共沉淀法，DEAE-葡聚糖介导转染法，脂类体转染法，天然感受态法，碳基团簇法（carbon-based

cluster), 化学介导转移法, 电穿孔法或粒子轰击法。可以在 Sambrook 等人 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) 和在其他实验室手册如 Methods in Molecular Biology, 1995, 第44卷, Agrobacterium protocols, 编者 Gartland 和 Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey 中找到用于转化或转染宿主细胞(包括植物细胞)的合适方法。备选地, 可以通过热休克或电穿孔技术引入质粒载体。如果载体是病毒, 则在施加至宿主细胞之前, 可以使用适宜包装细胞系在体外包装该载体。

[0160] 优选地, 本文提到的载体适合用作克隆载体, 即, 在微生物系统中可复制。此类载体确保在细菌并且优选地在酵母或真菌中高效克隆, 并且使得植物的稳定转化成为可能。那些必须提到的载体尤其是多种双元和共整合载体系统, 它们适用于 T-DNA 介导的转化。通常, 此类载体系统的特征在于, 它们至少含有为农杆菌介导转化所需要的 vir 基因和界定 T-DNA 的序列 (T-DNA 边界)。这些载体系统优选地也包含其他顺式调节区如启动子和终止子和/或可以借以鉴定适宜的已转化宿主细胞或生物的选择标记。共整合载体系统使得 vir 基因和 T-DNA 序列安置在同一个载体上, 而二元系统基于至少两个载体, 其中之一携带 vir 基因, 但无 T-DNA, 同时第二个载体携带 T-DNA, 但无 vir 基因。因而, 最后提到的载体相对小, 易于操作并且可以在大肠杆菌和农杆菌中均复制。这些二元载体包括来自 pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen 系列的载体。根据本发明, 优选地使用 Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV 和 pCAMBIA。可以在 Hellens 等人, Trends in Plant Science (2000) 5, 446-451 中找到对二元载体及其用途的综述。另外, 可以通过使用适宜的克隆载体, 将所述多核苷酸引入宿主细胞或生物(如植物或动物), 并且因而可以用于转化植物, 如 Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), 第6/7章, 第71-119页 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; 引自: Transgenic Plants, 第1卷, Engineering and Utilization, Kung 和 R. Wu 编著, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes 等人, Techniques for Gene Transfer, 引自: Transgenic Plants, 第1卷, Engineering and Utilization, Kung 和 R. Wu 编著, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus 1991, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 205-225 中发表和引用的那些载体。

[0161] 更优选地, 本发明的载体是表达载体。在这种表达载体中, 即, 包含本发明多核苷酸的载体使得所述核酸序列与允许在植物细胞或其分离的级分中表达的表达控制序列(还称作“表达盒”)有效连接。

[0162] 最重要的, 本发明还提供植物或其种子, 所述植物或其种子包含在其基因组中整合的本发明构建体或 T-DNA。

[0163] 因此, 构建体或 T-DNA 应当稳定整合入植物或植物细胞的基因组。因此, 本发明涉及包含本发明 T-DNA 或构建体的植物。

[0164] 这类 T-DNA 或构建体优选地允许下述全部基因表达, 所述全部基因是在植物中和尤其在其种子中, 尤其在油籽植物中和最有益地在十字花科 (Brassicaceae), 优选地芸苔属和最优选地下述物种的植物或种子中增加生育酚含量所要求的, 所述物种包含甘蓝 (Brassica oleracea), 黑芥 (Brassica nigra) 和芜菁 (Brassica rapa) 物种, 因此优选欧洲油菜, 埃塞俄比亚芥 (Brassica carinata), 芥菜 (Brassica juncea), 甘蓝 (Brassica

oleracea), 黑芥 (*Brassica nigra*) 或芜菁 (*Brassica rapa*) 物种中一个或两个成员的基因组。根据本发明特别优选欧洲油菜和埃塞俄比亚芥物种的植物和种子。

[0165] 本发明的植物必然地是转基因的, 即它们包含在相应野生型植物中不存在或在相应野生型植物中布置不同 (例如遗传元件数目不同) 的遗传物质。例如, 本发明的植物包含还存在于野生型植物中的启动子, 但是, 本发明的植物包含与编码性序列有效连接的这类启动子, 从而启动子和编码性序列的这种组合不存在于相应的野生型植物中。因此, 编码去饱和酶或延伸酶的多核苷酸应当是重组多核苷酸。

[0166] 本发明的植物和种子在其产生高生育酚含量 (和优选地 VLC-PUFA) 方面不同于迄今产生的植物, 参见实施例。特别地, 编码如涉及本发明方法所述的延伸酶或去饱和酶的多核苷酸、本发明构建体和 T-DNA 的组合允许产生具有下述特征的转化体植物 (也称作“重组植物”) 及其种子: 转化频率高, T-DNA 插入历经自体受精植物的多个世代而稳定性高, 表型特征和农艺学特征未改变或未受损, 在这类转化的植物及其相应后代的群体的油中生育酚数量及浓度高, 以及 VLC-PUFA, 尤其 EPA 和/或 DHA 数量及浓度高。

[0167] 除非另外声明, 否则包含本发明 T-DNA 或构建体的本发明植物也可以是包含本发明 T-DNA 或构建体之部分的植物, 其中这种部分足以产生在相应完整的本发明 T-DNA 或构建体编码的去饱和酶和/或延伸酶。除了如前句中所限定的本发明 T-DNA 之部分以外, 这类植物最优选地还包含至少一个完整的本发明 T-DNA。这类植物以下称也称作“部分双拷贝”植物。事件 LBFDAU 是包含本发明 T-DNA 之部分并且仍属本发明植物的植物的实例。在一个实施方案中, T-DNA 是完整 T-DNA。

[0168] 优选的本发明植物包含一个或多个包含表达盒的本发明 T-DNA 或构建体, 所述表达盒包含编码一种或多种 d5Des, 一种或多种 d6E1o, 一种或多种 d6Des 和一种或多种 d12Des 的一个或多个基因。在一个实施方案中, 至少一个 T-DNA 或载体还包含表达盒, 所述表达盒包含编码一种或多种 d5E1o, 一种或多种 o3Des, 一种或多种 d15Des 和/或一种或多种 D4Des, 优选地至少一种 CoA-依赖性 D4Des 和一种磷脂依赖性 d4Des 的一个或多个基因。在一个实施方案中, T-DNA 或多个 T-DNA 包含一个或多个编码 d6E1o (Tp_GA) 和/或 d6E1o (Pp_GA) 的表达盒。d6E1o (Tp_GA) 是来自假微型海链藻的 Δ -6 延伸酶, d6E1o (Pp_GA) 是来自展叶剑叶藓的 Δ -6 延伸酶。

[0169] 优选地, 本发明的植物 (或植物细胞) 是油料作物植物 (或油料作物植物细胞)。更优选地, 所述油料作物选自亚麻 (亚麻属物种 (*Linum sp.*)), 油菜 (芸苔属物种 (*Brassica sp.*)), 大豆 (大豆属 (*Glycine*) 和野大豆亚属物种 (*Soja sp.*)), 向日葵 (向日葵属物种 (*Helianthus sp.*)), 棉花 (棉属物种 (*Gossypium sp.*)), 玉米 (玉蜀黍), 橄榄 (木犀榄属物种 (*Olea sp.*)), 红花 (红花属物种 (*Carthamus sp.*)), 可可 (可可树 (*Theobroma cacao*)), 花生 (花生属物种 (*Arachis sp.*)), 亚麻荠属植物, 两节芥属植物, 油棕榈, 椰子, 落花生, 芝麻, 蓖麻, 雷斯克勒 (*lesquerella*), 乌柏, 牛油树, 油桐, 木棉果, 罂粟籽, 霍霍巴籽和紫苏。待用于引入本发明多核苷酸或 T-DNA 的优选植物是能够合成脂肪酸的植物, 如全部双子叶或单子叶植物, 藻类或藓类。优选的植物选自以下植物科: Adolotheciaceae, 漆树科 (Anacardiaceae), 棕榈科 (Arecaceae), 菊科 (Asteraceae), 伞形科 (Apiaceae), 桦木科 (Betulaceae), 紫草科 (Boraginaceae), 十字花科, 凤梨科 (Bromeliaceae), 番木瓜科 (Caricaceae), 旋花科 (Convolvulaceae), 藜科 (Chenopodiaceae), 菊科 (Compositae)、十

字花科、Crypthecodiniaceae, 葫芦科 (Cucurbitaceae), 牛毛藓科 (Ditrichaceae), 胡颓子科 (Elaeagnaceae), 杜鹃花科 (Ericaceae), 大戟科 (Euphorbiaceae), 豆科 (Fabaceae), 牻牛儿苗科 (Geraniaceae), 禾本科 (Gramineae), 胡桃科 (Juglandaceae), 樟科 (Lauraceae), 豆科 (Leguminosae), 亚麻科 (Linaceae), 锦葵科, 辣木科 (Moringaceae), 地钱科 (Marchantiaceae), 柳叶菜科 (Onagraceae), 铁青树科 (Olacaceae), 木犀科 (Oleaceae), 罂粟科 (Papaveraceae), 胡椒科 (Piperaceae), 胡麻科 (Pedaliaceae), 禾本科 (Poaceae), 茄科 (Solanaceae), 绿枝藻纲 (Prasinophyceae), 蔬菜植物和观赏植物如万寿菊 (Tagetes)。可以提到的例子是选自以下的植物: Adelotheceaceae 如剑叶藓属 (Physcomitrella), 如展叶剑叶藓 (Physcomitrella patens), 漆树科 (Anacardiaceae) 如黄连木属 (Pistacia), 芒果属 (Mangifera), 腰果属 (Anacardium), 例如阿月浑子 (Pistacia vera) [阿月浑子], Mangifer indica [芒果] 或腰果 (Anacardium occidentale) [腰果], 菊科 (Asteraceae), 如金盏花 (Calendula), 红蓝花属 (Carthamus), 矢车菊属 (Centaurea), 菊苣属 (Cichorium), 菜蓟属 (Cynara), 向日葵属 (Helianthus), 莴苣属 (Lactuca), 新缬草属 (Locusta), 万寿菊属 (Tagetes), 缬草属 (Valeriana), 例如金盏花 [普通万寿菊 (common marigold)], 红花 [红花], 矢车菊 [矢车菊], 菊苣 (Cichorium intybus) [菊苣], 洋蓟 (Cynara scolymus) [球蓟 (artichoke)], 向日葵 (Helianthus annuus) [向日葵], 莴苣 (Lactuca sativa), 皱叶莴苣 (Lactuca crispata), Lactuca esculenta, 毒莴苣栽培种 (Lactuca scariola L. ssp. sativa), Lactuca scariola L. var. integrata, 毒莴苣全缘叶变种 (Lactuca scariola L. var. integrifolia), 生菜 (Lactuca sativa subsp. romana), Locusta communis, 莴苣缬草 (Valeriana locusta) [沙拉蔬菜], 香叶万寿菊 (Tagetes lucida), 万寿菊 (Tagetes erecta) 或细叶万寿菊 (Tagetes tenuifolia) [非洲或法国万寿菊], 伞形科 (Apiaceae), 如胡萝卜属 (Daucus), 例如胡萝卜 (Daucus carota) [胡萝卜], 桦木科 (Betulaceae), 如榛属 (Corylus), 例如以下属和物种: 欧洲榛 (Corylus avellana) 或土耳其榛 (Corylus colurna) [榛], 紫草科 (Boraginaceae), 如玻璃苣属 (Borago), 例如以下属和物种: 玻璃苣 (Borago officinalis) [玻璃苣], 十字花科, 如芸苔属 (Brassica), 黑芥属 (Melanosinapis), 白芥属 (Sinapis), 拟南芥属 (Arabidopsis), 例如以下属和物种: 欧洲油菜 (Brassica napus), 芜菁某些物种 (Brassica rapa ssp.) [菜籽油菜], 野欧白芥 (Sinapis arvensis) 芥菜 (Brassica juncea), 芥菜原变种 (Brassica juncea var. juncea), 皱叶芥菜 (Brassica juncea var. crispifolia), 大叶芥菜 (Brassica juncea var. foliosa), 黑芥, 黑芥 (Brassica sinapioides), 黑芥 (Melanosinapis communis) [芥菜], 甘蓝 (Brassica oleracea) [饲用甜菜 (fodder beet)] 或拟南芥 (Arabidopsis thaliana), 凤梨科 (Bromeliaceae), 如凤梨属 (Anana), Bromelia (菠萝), 例如凤梨 (Anana comosus), Ananas ananas 或 Bromelia comosa [菠萝], 番木瓜科 (Caricaceae), 如 Carica, 如番木瓜 (Carica papaya) [番木瓜], 旋花科 (Convolvulaceae), 如番薯属 (Ipomea), 旋花属 (Convolvulus), 例如甘薯 (Ipomoea batatas), 提琴叶牵牛花 (Ipomoea pandurata), Convolvulus batatas, Convolvulus tiliaceus, 甘薯 (Ipomoea fastigiata), Ipomoea tiliacea, Ipomoea triloba 或旋花属 (Convolvulus panduratus) [甘薯 (sweet potato), 甘薯], 藜科 (Chenopodiaceae), 如甜菜属 Beta, 如甜菜 (Beta vulgaris), 甜萝卜 (Beta vulgaris)

var. altissima), 甜菜原变种 (*Beta vulgaris* var. *Vulgaris*), 沿海甜菜 (*Beta maritima*), *Beta vulgaris* var. *perennis*, 红甜菜 (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) 或 *Beta vulgaris* var. *esculenta* [糖用甜菜 (sugarbeet)], *Crypthecodiniaceae*, 如隐甲藻属 (*Crypthecodinium*), 例如 寇氏隐甲藻 (*Crypthecodinium cohnii*), 葫芦科 (*Cucurbitaceae*), 如南瓜属 (*Cucurbita*), 例如笋瓜 (*Cucurbita maxima*), 灰籽南瓜 (*Cucurbita mixta*), 西葫芦 (*Cucurbita pepo*) 或南瓜 (*Cucurbita moschata*) [南瓜/南瓜], 桥弯藻目 (*Cymbellaceae*) 如双眉藻属 (*Amphora*), 桥弯藻属 (*Cymbella*), *Okedenia*, 褐指藻属 (*Phaeodactylum*), 瑞氏藻属 (*Reimeria*), 例如以下属和物种: 三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*); 牛毛藓科 (*Ditrichaceae*), 如牛毛藓科、高地藓属 (*Astomiopsis*)、角齿藓属 (*Ceratodon*)、*Chrysoblastella*、牛毛藓属 (*Ditrichum*)、牛毛藓属、*Eccremidium*、*Lophidion*、泽藓属 (*Philibertiella*)、丛毛藓属 (*Pleuridium*), 石缝藓属 (*Saelania*)、毛齿藓属 (*Trichodon*)、*Skottsbergia*, 例如以下属和物种: *Ceratodon antarcticus*、*Ceratodon columbiae*、*Ceratodon heterophyllus*、角齿藓 (*Ceratodon purpureus*)、角齿藓、*Ceratodon purpureus* ssp. *convolutus*、*Ceratodon purpureus* spp. *stenocarpus*、圆叶角齿藓 (*Ceratodon purpureus* var. *rotundifolius*)、*Ceratodon ratodon*、疣蒴角齿藓 (*Ceratodon stenocarpus*)、*Chrysoblastella chilensis*、*Ditrichum ambiguum*、短齿牛毛藓 (*Ditrichum brevisetum*)、扭叶牛毛藓 (*Ditrichum crispatisimum*)、卷叶牛毛藓 (*Ditrichum difficile*)、*Ditrichum falcifolium*、细牛毛藓 (*Ditrichum flexicaule*)、*Ditrichum giganteum*、牛毛藓 (*Ditrichum heteromallum*)、*Ditrichum lineare*、*Ditrichum lineare*、*Ditrichum montanum*、*Ditrichum montanum*、黄牛毛藓 (*Ditrichum pallidum*)、*Ditrichum punctulatum*、细叶牛毛藓 (*Ditrichum pusillum*)、*Ditrichum pusillum* var. *tortile*、*Ditrichum rhynchostegium*、*Ditrichum schimperi*、*Ditrichum tortile*、对叶藓 (*Distichium capillaceum*)、小对叶藓 (*Distichium hagenii*)、斜蒴对叶藓 (*Distichium inclinatum*)、*Distichium macounii*、*Eccremidium floridanum*、*Eccremidium whiteleggei*、*Lophidion strictus*、尖叶丛毛藓 (*Pleuridium acuminatum*)、*Pleuridium alternifolium*、*Pleuridium holdridgei*、*Pleuridium mexicanum*、*Pleuridium ravenelii*、丛毛藓 (*Pleuridium subulatum*)、石缝藓 (*Saelania glaucescens*)、*Trichodon borealis*、*Trichodon cylindricus* 或 *Trichodon cylindricus* var. *oblongus*; 胡颓子科 (*Elaeagnaceae*), 如胡颓子属 (*Elaeagnus*), 例如以下属和物种: 油橄榄 (*Olea europaea*) [橄榄]; 杜鹃花科 (*Ericaceae*), 如山月桂属 (*Kalmia*), 例如以下属和物种: 宽叶山月桂 (*Kalmia latifolia*)、窄叶山月桂 (*Kalmia angustifolia*)、小叶山月桂 (*Kalmia microphylla*)、沼泽山月桂 (*Kalmia polifolia*)、*Kalmia occidentalis*、*Cistus chamaerhodendros* 或 *Kalmia lucida* [山月桂 (mountain laurel)]; 大戟科 (*Euphorbiaceae*), 如木薯属 (*Manihot*)、*Janipha*、麻疯树属 (*Jatropha*)、蓖麻属 (*Ricinus*), 例如以下属和物种: 苦木薯 (*Manihot utilissima*)、*Janipha manihot*、*Jatropha manihot*、*Manihot aipil*、*manihot dulcis*、*Manihot manihot*、*Manihot melanobasis*、甜木薯 (*Manihot esculenta*) [manihot] 或蓖麻 [蓖麻]; 豆科 (*Fabaceae*), 如豌豆属 (*Pisum*)、合欢属 (*Albizia*)、*Cathormion*、*Feuillea*、因加属 (*Inga*)、围涎树属 (*Pithecolobium*)、金合欢属 (*Acacia*)、含羞草属 (*Mimosa*)、苜蓿属 (*Medicago*)、大豆属

(*Glycine*)、扁豆属(*Dolichos*)、菜豆属(*Phaseolus*)、野大豆亚属(*Soja*)，例如以下属和物种：豌豆(*Pisum sativum*)、饲料豌豆(*Pisum arvense*)、早生矮豌豆(*Pisum humile*) [豌豆]、*Albizia berteriana*、合欢(*Albizia julibrissin*)、大叶合欢(*Albizia lebbeck*)、*Acacia berteriana*、*Acacia littoralis*、*Albizia berteriana*、*Albizzia berteriana*、*Cathormion berteriana*、*Feuillea berteriana*、*Inga fragrans*、*Pithecellobium berterianum*、*Pithecellobium fragrans*、*Pithecolobium berterianum*、*Pseudalbizzia berteriana*、*Acacia julibrissin*、*Acacia nemu*、*Albizia nemu*、*Feuillea julibrissin*、*Mimosa julibrissin*、*Mimosa speciosa*、*Sericanrda julibrissin*、*Acacia lebbeck*、*Acacia macrohylla*、*Albizia lebbek*、*Feuillea lebbeck*、*Mimosa lebbeck*、*Mimosa speciosa* [丝绸树]、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、野苜蓿(*Medicago falcata*)、杂交苜蓿(*Medicago varia*) [苜蓿]、大豆(*Glycine max*)、*Dolichos soja*、宽叶蔓豆(*Glycine gracilis*)、*Glycine hispida*、*Phaseolus max*、*Soja hispida*或*Soja max* [大豆]；葫芦藓科(*Funariaceae*)，如以下属：*Aphanorrhagma*、尖叶梨蒴藓属(*Entosthodon*)、葫芦藓属(*Funaria*)、剑叶藓属(*Physcomitrella*)、立碗藓属(*Physcomitrium*)，例如以下属和物种：*Aphanorrhagma serratum*、*Entosthodon attenuatus*、*Entosthodon bolanderi*、*Entosthodon bonplandii*、*Entosthodon californicus*、*Entosthodon drummondii*、*Entosthodon jamesonii*、*Entosthodon leibergii*、*Entosthodon neoscoticus*、*Entosthodon rubrisetus*、*Entosthodon spathulifolius*、*Entosthodon tucsoni*、*Funaria americana*、*Funaria bolanderi*、齿叶葫芦藓(*Funaria calcarea*)、*Funaria californica*、*Funaria calvescens*、*Funaria convoluta*、*Funaria flavicans*、*Funaria groutiana*、葫芦藓(*Funaria hygrometrica*)、*Funaria hygrometrica* var. *arctica*、*Funaria hygrometrica* var. *calvescens*、*Funaria hygrometrica* var. *convoluta*、*Funaria hygrometrica* var. *muralis*、*Funaria hygrometrica* var. *utahensis*、*Funaria microstoma*、*Funaria microstoma* var. *obtusifolia*、刺边葫芦藓(*Funaria muhlenbergii*)、*Funaria orcuttii*、*Funaria plano-convexa*、*Funaria polaris*、*Funaria ravenelii*、*Funaria rubriseta*、*Funaria serrata*、*Funaria sonora*、*Funaria sublimbatus*、*Funaria tucsoni*、小立碗藓加利福尼亚亚种(*Physcomitrella californica*)、展叶剑叶藓、*Physcomitrella readeri*、*Physcomitrium australe*、*Physcomitrium californicum*、*Physcomitrium collenchymatum*、*Physcomitrium coloradense*、*Physcomitrium cupuliferum*、*Physcomitrium drummondii*、*Physcomitrium eurystomum*、*Physcomitrium flexifolium*、*Physcomitrium hookeri*、*Physcomitrium hookeri* var. *serratum*、*Physcomitrium immersum*、*Physcomitrium kellermanii*、*Physcomitrium megalocarpum*、*Physcomitrium pyriforme*、*Physcomitrium pyriforme* var. *serratum*、*Physcomitrium rufipes*、*Physcomitrium sandbergii*、*Physcomitrium subsphaericum*、*Physcomitrium washingtoniense*，牻牛儿苗科，如天竺葵属(*Pelargonium*)、椰子属(*Cocos*)、*Oleum*，例如以下属和物种：椰子(*Cocos nucifera*)、椰香天竺葵(*Pelargonium grossularioides*)或*Oleum cocois* [椰子]；禾本科(*Gramineae*)，如例如以下属：甘蔗属(*Saccharum*)，例如以下属和物种：甘蔗(*Saccharum officinarum*)；核桃科(*Juglandaceae*)，如核桃属(*Juglans*)、*Wallia*，例如以下属和物种：核桃(*Juglans*)

regia)、*Juglans ailanthifolia*、山核桃(*Juglans sieboldiana*)、灰核桃(*Juglans cinerea*)、*Wallia cinerea*、*Juglans bixbyi*、加州黑核桃(*Juglans californica*)、印度黑核桃(*Juglans hindsii*)、*Juglans intermedia*、*Juglans jamaicensis*、大核桃(*Juglans major*)、*Juglans microcarpa*、黑核桃(*Juglans nigra*)或*Wallia nigra*[walnut];樟科(Lauraceae),如鳄梨属(*Persea*)、月桂属(*Laurus*),例如下述属和物种:月桂(*Laurus nobilis*) [bay]、鳄梨(*Persea americana*、*Persea gratissima*或*Persea persea*) [鳄梨 (avocado)];豆科(Leguminosae),如落花生属(*Arachis*),例如下述属和物种:落花生(*Arachis hypogaea*) [花生];亚麻科(Linaceae),如亚麻属(*Linum*)、*Adenolinum*,例如下述属和物种:亚麻(*linum usitatissimum*)、*linum humile*、奥地利亚麻(*linum austriacum*)、*linum bienne*、窄叶亚麻(*linum angustifolium*)、泻亚麻(*linum catharticum*)、金黄亚麻(*linum flavum*)、大花亚麻(*linum grandiflorum*、*Adenolinum grandiflorum*)、刘易斯亚麻(*linum lewisii*)、那旁亚麻(*linum narbonense*)、宿根亚麻(*linum perenne*)、刘易斯宿根亚麻(*linum perenne var. lewisii*)、*linum pratense*、*linum trigynum*[亚麻];千屈菜科(Lythrarieae),如石榴属(*Punica*),例如下述属和物种:石榴(*Punica granatum*) [pomegranate];锦葵科(Malvaceae),如棉属(*Gossypium*),例如下述属和物种:陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、树棉(*Gossypium arboreum*)、海岛棉(*Gossypium barbadense*)、草棉(*Gossypium herbaceum*)或瑟伯氏棉(*Gossypium thurberi*) [棉花];地钱科(Marchantiaceae),如地钱属(*Marchantia*),例如下述属和物种:*Marchantia berteroana*、*Marchantia foliacea*、*Marchantia macropora*;芭蕉科(Musaceae),如芭蕉属(*Musa*),例如下述属和物种:香蕉(*Musa nana*)、小果野蕉(*Musa acuminata*)、大蕉(*Musa acuminata*)、芭蕉属某些物种(*Musa spp.*) [香蕉];柳叶菜科(Onagraceae),如*Camissonia*、月见草属(*Oenothera*),例如下述属和物种:月见草(*Oenothera biennis*或*Camissonia brevipes*) [晚樱草(evening primose)];棕榈科(Palmae),如油棕属(*Elaeis*),例如下述属和物种:油棕(*Elaeis guineensis*) [油棕榈];罂粟科(Papaveraceae),如罂粟属(*Papaver*),例如下述属和物种:东方罂粟(*Papaver orientale*)、虞美人(*Papaver rhoeas*)、长果罂粟(*Papaver dubium*) [罂粟];胡麻科(Pedaliaceae),如胡麻属(*Sesamum*),例如下述属和物种:芝麻(*Sesamum indicum*) [芝麻];胡椒科(Piperaceae),如胡椒属(*Piper*)、*Artanthe*、草胡椒属(*Peperomia*)、*Steffensia*,例如下述属和物种:树胡椒(*Piper aduncum*)、*Piper amalago*、狭叶胡椒(*Piper angustifolium*)、*Piper auritum*、萎叶(*Piper betel*)、毕澄茄(*Piper cubeba*)、荜菴(*Piper longum*)、胡椒(*Piper nigrum*)、假荜菴(*Piper retrofractum*)、*Artanthe adunca*、*Artanthe elongata*、*Peperomia elongata*、*Piper elongatum*、*Steffensia elongata* [Cayenne pepper];禾本科(Poaceae),如大麦属(*Hordeum*)、黑麦属(*Secale*)、燕麦属(*Avena*)、高粱属(*Sorghum*)、须芒草属(*Andropogon*)、绒毛草属(*Holcus*)、黍属(*Panicum*)、稻属(*Oryza*)、玉蜀黍属(*Zea*)、小麦属(*Triticum*),例如下述属和物种:大麦(*Hordeum vulgare*)、芒颖大麦草(*Hordeum jubatum*)、鼠大麦(*Hordeum murinum*)、黑麦状大麦草(*Hordeum secalinum*)、栽培二棱大麦(*Hordeum distichon*)、三叉大麦(*Hordeum aegiceras*)、栽培六棱大麦(*Hordeum hexastichon*)、栽培六棱大麦(*Hordeum hexastichum*)、不规则型大麦(*Hordeum irregulare*)、大麦(*Hordeum sativum*)、黑麦状大

麦草 (*Hordeum secalinum*) [大麦]、黑麦 (*Secale cereale*) [rye]、燕麦 (*Avena sativa*)、野燕麦 (*Avena fatua*)、比赞燕麦 (*Avena byzantina*)、野燕麦原变种 (*Avena fatua* var. *sativa*)、杂种野燕麦 (*Avena hybrida*) [燕麦]、两色蜀黍 (*Sorghum bicolor*)、石茅高粱 (*Sorghum halepense*)、甜高粱 (*Sorghum saccharatum*)、高粱 (*Sorghum vulgare*)、*Andropogon drummondii*、*Holcus bicolor*、*Holcus sorghum*、*Sorghum aethiopicum*、*Sorghum arundinaceum*、卡佛尔高粱 (*Sorghum caffrorum*)、垂穗高粱草 (*Sorghum cernuum*)、甜高粱 (*Sorghum dochna*)、*Sorghum drummondii*、硬高粱草 (*Sorghum durra*)、*Sorghum guineense*、*Sorghum lanceolatum*、多脉高粱草 (*Sorghum nervosum*)、甜高粱 (*Sorghum saccharatum*)、*Sorghum subglabrescens*、*Sorghum verticilliflorum*、高粱 (*Sorghum vulgare*)、石茅高粱 (*Holcus halepensis*)、黍 (*Sorghum miliaceum*)、稷 (*Panicum militaceum*) [谷子 (millet)]、稻 (*Oryza sativa*)、阔叶野生稻 (*Oryza latifolia*) [稻]、玉蜀黍 (*Zea mays*) [玉米]、普通小麦 (*Triticum aestivum*)、硬粒小麦 (*Triticum durum*)、圆柱小麦 (*Triticum turgidum*)、*Triticum hybernum*、马卡小麦 (*riticum macha*)、普通小麦 (*Triticum sativum* 或 *Triticum vulgare*) [小麦]；紫球藻科 (*Porphyridiaceae*)，如色盒藻属 (*Chrootheca*)、*Flintiella*、*Petrovanella*、紫球藻属 (*Porphyridium*)、小红藻属 (*Rhodella*)、红孢囊藻属 (*Rhodorus*)、*Vanhoeffenia*，例如下述属和物种：紫球藻 (*Porphyridium cruentum*)；山龙眼科 (*Proteaceae*)，如澳洲坚果属 (*Macadamia*)，例如下述属和物种：全缘叶澳洲坚果 (*Macadamia integrifolia*) [macadamia]；绿色鞭毛藻纲 (*Prasinophyceae*)，如肾藻属 (*Nephroselmis*)、*Prasinococcus*、*Scherffelia*、扁藻属 (*Tetraselmis*)、*Mantoniella*、*Ostreococcus*，例如下述属和物种：梨形肾藻 (*Nephroselmis olivacea*)、*Prasinococcus capsulatus*、*Scherffelia dubia*、周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*)、亚心形扁藻 (*Tetraselmis suecica*)、*Mantoniella squamata*、*Ostreococcus tauri*；茜草科 (*Rubiaceae*)，如例如下述属和物种：咖啡属某些物种 (*Cofea* spp.)、小果咖啡 (*Coffea arabica*)、中果咖啡 (*Coffea canephora*) 或大果咖啡 (*Coffea liberica*) [咖啡]；玄参科 (*Scrophulariaceae*)，如毛蕊花属 (*Verbascum*)，例如下述属和物种：毛瓣毛蕊花 (*Verbascum blattaria*)、南欧毛蕊花 (*Verbascum chaixii*)、密花毛蕊花 (*Verbascum densiflorum*)、*Verbascum lagurus*、长叶毛蕊花 (*Verbascum longifolium*)、*Verbascum lychnitis*、黑毛蕊花 (*Verbascum nigrum*)、奥林匹克毛蕊花 (*Verbascum olympicum*)、抱茎毛蕊花 (*Verbascum phlomoides*)、紫花毛蕊花 (*Verbascum phoenicum*)、*Verbascum pulverulentum* 或毛蕊花 (*Verbascum thapsus*) [mullein]；茄科 (*Solanaceae*)，如辣椒属 (*Capsicum*)、烟草属 (*Nicotiana*)、茄属 (*Solanum*)、番茄属 (*Lycopersicon*)，例如下述属和物种：红辣椒 (*Capsicum annuum*)、朝天椒 (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*)、小米椒 (*Capsicum frutescens*) [辣椒]；辣椒 [红辣椒 (paprika)]；普通烟草 (*Nicotiana tabacum*)、花烟草 (*Nicotiana alata*)、渐狭叶烟草 (*Nicotiana attenuate*)、光烟草 (*Nicotiana glauca*)、郎氏烟草 (*Nicotiana langsdorffii*)、*Nicotiana obtusifolia*、裂叶烟草 (*Nicotiana quadrivalvis*)、浅波烟草 (*Nicotiana repanda*)、黄花烟草 (*Nicotiana rustica*)、林烟草 (*Nicotiana sylvestris*) [烟草]；马铃薯 (*Solanum tuberosum*) [马铃薯]；茄子 (*Solanum melongena*) [茄子]；番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、番茄 (*Lycopersicon*

lycopersicum)、梨形番茄(*Lycopersicon pyriforme*)、红茄(*Solanum integrifolium*)或番茄(*Solanum lycopersicum*) [番茄]; 梧桐科 (*Sterculiaceae*), 如可可属(*Theobroma*), 例如下述属和物种: 可可树 (*Theobroma cacao*) [可可]或山茶科(*Theaceae*), 如山茶属(*Camellia*), 例如下述属和物种: 大叶茶(*Camellia sinensis*) [茶]。特别地, 根据本发明待作为转基因植物使用的优选植物是包含大量脂类化合物的油料作物, 如花生, 菜籽油, 卡诺拉油菜, 向日葵, 红花, 罂粟, 芥菜, 蓖麻, 橄榄, 芝麻, 金盏花(*Calendula*), 石榴(*Punica*), 月见草, 毛蕊花, 蓟, 野玫瑰, 榛, 扁桃, 澳洲坚果, 鳄梨, 月桂属植物, 南瓜, 亚麻, 大豆, 阿月浑子, 玻璃苣, 树(油棕榈, 椰子, 胡桃树)或作物如玉米, 小麦, 黑麦, 燕麦, 小黑麦, 稻, 大麦, 棉属植物, 木薯, 辣椒, 万寿菊, 茄科植物如马铃薯, 烟草, 茄子和番茄, 蚕豆属物种, 豌豆, 苜蓿或灌丛植物(咖啡, 可可, 茶), 柳属物种和多年生牧草和饲用作物。

[0170] 本发明的优选植物是油料作物植物如花生, 菜籽油, 卡诺拉油菜, 向日葵, 红花, 罂粟, 芥菜, 蓖麻, 橄榄, 金盏花, 石榴, 月见草, 南瓜, 亚麻, 大豆, 玻璃苣, 树(油棕榈, 椰子)。特别优选的是向日葵, 红花, 烟草, 毛蕊花, 芝麻, 棉属植物, 南瓜, 罂粟, 月见草, 胡桃, 亚麻, 蓟或红花。极特别优选的植物是植物如红花, 向日葵, 罂粟, 月见草, 胡桃, 亚麻, 或最优选地, 十字花科植物。

[0171] 最优选地, 本发明的植物是“禹氏三角(Triangle of U)”中存在的植物, 即芸苔属植物: 欧洲油菜(AA CC基因组; $n=19$)是双二倍体芸苔属植物, 但认为其因芜青(AA基因组; $n=10$)与甘蓝(CC基因组; $n=9$)杂交而产生。芥菜(AA BB基因组; $n=18$)是双二倍体芸苔属植物, 通常认为该植物因芜青与黑芥(BB基因组; $n=8$)杂交而产生。在某些生长条件下, 芥菜可以相对于欧洲油菜具有某些优越性状。这些优越性状可以包括更高的产量, 更好的耐旱及耐热性和更好的抗病性。埃塞俄比亚芥(BB CC基因组; $n=17$)是双二倍体芸苔属植物, 但认为其因黑芥与甘蓝杂交而产生。在某些生长条件下, 埃塞俄比亚芥可以相对于欧洲油菜具有优越的性状。特别地, 当用相同T-DNA转化时, 与欧洲油菜(*B.napus*)相比, 埃塞俄比亚芥允许 VLC-PUFA浓度增加至少20%。

[0172] 本发明的植物优选地是“卡诺拉油菜”植物。卡诺拉油菜是由加拿大植物育种者针对其油特性及饼粕特性, 特别是其低饱和脂肪水平而专门开发的油菜遗传性变异。卡诺拉油菜在本文中通常指具有种子油中以重量计小于2%芥酸($\Delta 13-22:1$)和小于30微摩尔芥子油苷/克无油饼粕的芸苔属植物物种。一般, 卡诺拉油菜油可以包含称作棕榈酸和硬脂酸的饱和脂肪酸, 称作油酸的单不饱和脂肪酸及称作亚油酸和亚麻酸的多不饱和脂肪酸。卡诺拉油菜可以含有小于约7% (w/w)的总饱和脂肪酸(大部分是棕榈酸和硬脂酸)和大于40% (w/w)的油酸(作为总脂肪酸的百分数)。传统上, 卡诺拉油菜作物包括欧洲油菜和芜青的变种。本发明的优选植物是卡诺拉春油菜(欧洲油菜油用亚种一年生变种(*Brassica napus* subsp. *oleifera* var. *annua*))和卡诺拉冬油菜(欧洲油菜油用亚种二年生变种(*Brassica napus* subsp. *oleifera* var. *biennis*))。另外, 具有与其他卡诺拉油菜类型相似的油质量和饼粕质量的卡诺拉品质芥菜品种已经加入卡诺拉油菜作物家族(2001年10月16日授予Potts等人的美国专利号6,303,849; Yao等人的美国专利号7,423,198; Potts和Males, 1999; 全部文献均通过引用方式并入本文)。同样地, 可以通过卡诺拉品质欧洲油菜变体与黑芥杂交并且适当地选择其后代, 任选地与埃塞俄比亚芥, 欧洲油菜和/或黑芥进一步回交后, 建立卡诺拉品质埃塞俄比亚芥变种。

[0173] 本发明也提供具有下述基因型的十字花科植物或其种子,优选地芸苔属植物或其种子,所述基因型向种子油VLC-PUFA含量赋予可遗传表型,所述植物或其种子从通过包括下述步骤的方法制备的后代系可获得或获得

[0174] i) 将十字花科植物,优选地芸苔属植物,最优选地欧洲油菜,甘蓝,黑芥或埃塞俄比亚芥植物(所述植物包含了如本发明方法背景下所述的编码去饱和酶或延伸酶的多核苷酸,本发明构建体或T-DNA和/或这种构建体或T-DNA之部分的组合)与十字花科亲本植物,优选地芸苔属亲本植物,最优选地欧洲油菜,甘蓝,黑芥或埃塞俄比亚芥亲本植物(所述亲本植物不包含所述T-DNA和/或其部份)杂交,以产生F1杂种,

[0175] ii) 自交F1杂种至少一个世代,并且

[0176] iii) 鉴定步骤(ii)的包含本发明多核苷酸,构建体,T-DNA之组合的后代,所述后代能够产生与对照植物相比包含增加的生育酚含量的种子。在一个实施方案中,增加的生育酚含量是如本文他处公开的生育酚含量。

[0177] 在一个实施方案中,产生的种子包含VLC-PUFA,从而在40%含油量(w/w)时,18:1n-9下游的全部VLC-PUFA的含量是总种子脂肪酸含量的至少40%(w/w),或者优选地在40%含油量(w/w)时,EPA的含量是总种子脂肪酸含量的至少8%,或至少12%(w/w)和/或DHA的含量是总种子脂肪酸含量的至少1%(w/w)。

[0178] 在一个实施方案中,产生的种子包含VLC-PUFA,从而EPA的含量是至少8%或至少12%(w/w)。

[0179] 在一个实施方案中,DHA的含量是至少1%(w/w)的总种子脂肪酸含量。

[0180] 这种方法允许将十字花科,优选地属芸苔属的其他成员的遗传物质有效并入包含如本发明方法背景下所述的多核苷酸,本发明T-DNA或构建体的植物的基因组。该方法特别可用于将多核苷酸,T-DNA和/或构建体与负责十字花科其他成员中所展示的有益性状的遗传物质组合。本文中示例地描述了十字花科其他成员的有益性状,可以在其他地方描述涉及有益性状表现的其他有益性状或基因和/或调节元件。

[0181] 不包含所述多核苷酸,本发明T-DNA或构建体或其部份的亲本植物优选地是农艺学优良的亲本。特别地,本发明教导了源自本发明植物或种子的异源物质转移至不同的基因组背景,例如不同的品种或物种。

[0182] 特别地,本发明教导了转移T-DNA或其部份(后者对本发明的那些植物特别有意义,其中除了完整的本发明T-DNA或构建体之外,所述植物还包含本发明T-DNA或构建体的部分,所述部分优选地包含至少一个表达盒,所述表达盒优选地包含编码去饱和酶或延伸酶,优选地 Δ -12-去饱和酶, Δ -6-去饱和酶和/或 Ω -3-去饱和酶的基因)至埃塞俄比亚芥物种中,或教导了将源自埃塞俄比亚芥或黑芥的遗传物质引入包含本发明T-DNA和/或其一个部分或两个或更多个部分的本发明植物。根据本发明,替换其在欧洲油菜中存在的同源物或除欧洲油菜中存在的同源物之外所附加的黑芥基因特别地有益于进一步增加植物种子及其油中VLC-PUFA的量。

[0183] 另外,本发明教导了新的植物变种,所述植物变种包含如本发明方法背景下所述的编码去饱和酶或延伸酶的多核苷酸,本发明构建体或T-DNA和/或其部份。通过选择适宜的交配配偶,这类变种可以特别地适应于例如选定的气候生长条件,除草剂耐受性,胁迫抗性,真菌抗性,草食动物抗性,增加或降低的含油量或其他有益特征。特别有益的是提供

这样的本发明植物,其中收获时其含油量低于相同品种的相应野生型植物,从而增加 所述本发明植物的油中的总生育酚含量(并且改善VLC-PUFA量)和/或所述油中的生育酚浓度(和VLC-PUFA浓度)。

[0184] 另外,本发明提供一种产生具有下述基因型的植物的方法,所述基因型向生育酚含量(尤其种子油中含量增加)赋予可遗传表型,所述植物从通过包括下述步骤的方法制备的后代系可获得或获得

[0185] i) 将本发明的转基因植物与不包含如本发明方法背景下所述的编码去饱和酶或延伸酶的多核苷酸,本发明构建体或T-DNA或其部份的亲本植物杂交,所述亲本植物属于十字花科,优选地属于芸苔属,最优选地属于欧洲油菜,甘蓝,黑芥或埃塞俄比亚芥,以产生F1杂种,

[0186] ii) 自交F1杂种至少一个世代,并且

[0187] iii) 鉴定步骤(ii)的包含所述多核苷酸,构建体或T-DNA的后代,所述后代能够产生与对照植物的种子相比包含增加的生育酚含量的种子。

[0188] 在一个实施方案中,所述种子可以包含VLC-PUFA,从而在40%含油量(w/w)时,18:1n-9下游的全部VLC-PUFA的含量是总种子脂肪酸含量的至少40%(w/w),或者优选地在30%(w/w)的含油量,优选地在35%(w/w)的含油量和更优选地在40%(w/w)的含油量时,EPA的含量是总种子脂肪酸含量的至少8%(w/w)和/或DHA的含量是总种子脂肪酸含量的至少1%(w/w)。

[0189] 该方法允许产生本发明植物的新变体和转基因物种及其种子。这类植物和种子显示出本发明的前述益处。优选地,按重量计,EPA的含量是油的总脂类含量的至少10%,甚至更优选地至少13%(w/w)。还优选地,按重量计,DHA的含量是油的总脂类含量的至少1.5%,甚至更优选地至少2%(w/w)。本发明首次允许在农艺学条件下可靠地在种子中实现这类高水平的生育酚和VLC-PUFA,即代表了从栽种本发明植物的至少1公顷商品田的种子中获得的真实产量,其中所述植物具有确定拷贝数的基因,以在所述植物中执行产生EPA和/或DHA的途径,并且拷贝数低,即单拷贝或部分双拷贝。

[0190] 本发明的植物还包括通过回交(杂交入非转基因的,同基因亲本系)和通过与其他禹氏三角种质杂交可获得或获得的植物。因此,本发明提供一种产生具有下述基因型的植物的方法,所述基因型向增加的种子油生育酚含量赋予可遗传表型,所述植物从通过包括下述步骤的方法制备的后代系可获得或获得

[0191] i) 将本发明的转基因植物(也称作“非回归亲本”)与不表达在本发明多核苷酸,T-DNA或构建体中所含的基因的亲本植物杂交,所述亲本植物属于十字花科,优选地属于芸苔属,最优选地属于欧洲油菜,甘蓝,黑芥或埃塞俄比亚芥,以产生杂交后代,

[0192] ii) 将杂交后代再次与亲本杂交以获得另一个杂交后代,

[0193] iii) 任选地重复步骤ii) 并且

[0194] iv) 选择杂交后代,所述杂交后代包含如涉及本发明方法中所述的编码去饱和酶或延伸酶的多核苷酸,本发明T-DNA或构建体。

[0195] 例如,如上文所述的回交方法可以与本发明一起使用以改善某特征或将其引入包含本发明多核苷酸,构建体或T-DNA的植物株系。在满足预定参数的步骤iv)中选择这种杂交后代。本发明的回交方法因而有益地促进采用来自非回归亲本的目的基因或优选地

本发明多核苷酸,构建体或 T-DNA改良回归亲本的遗传物质,同时基本上保留回归亲本的全部其他所需遗传物质,并且因此基本上保留亲本系的所需生理学和形态学构成。选择的杂交后代随后优选地繁殖并构成如本文所述的株系。可以通过使用基因组标记进一步方便地选择有用后代供重复步骤ii)。例如,选择这类后代供重复步骤ii),其中与先前杂交步骤中获得的其他后代相比,所述后代包含在亲本中也存在的最多标记于和/或在非回归亲本也存在的最少标记,所需的本发明多核苷酸,构建体或T-DNA或其T-DNA或构建体之部分例外。

[0196] 优选地,选择这样的杂交后代,所述杂交后代包含本发明的多核苷酸,构建体或T-DNA,并且例如,通过将本发明构建体或T-DNA的额外部分并入杂交植物的遗传物质,甚至更优选地还包含来自本发明非回归亲本的至少一个其他表达盒。

[0197] 进一步优选地,获得这样的杂交后代,其中除了来自非回归亲本的遗传物质之外,转化的植物中亲本的基本上全部所需形态特征和生理特征恢复,如相同环境条件下培育时在5%显著性水平测定。

[0198] 进一步优选地,选择这样的杂交后代,如与对照相比,所述的杂交后代产生了包含,尤其在种子的油中包含增加的生育酚含量的种子。还优选地,种子包含VLC-PUFA,从而在40%含油量(w/w)时,18:1n-9下游的全部VLC-PUFA的含量是总种子脂肪酸含量的至少40%(w/w),或者优选地在30%(w/w)的含油量,优选地在35%(w/w)的含油量和更优选地在40%(w/w)的含油量时,EPA的含量是总种子脂肪酸含量的至少8%(w/w)和/或DHA的含量是总种子脂肪酸含量的至少1%(w/w)。

[0199] 应当理解,这个种子VLC-PUFA或生育酚含量不从单个种子或从单株植物的种子测量,而指至少100株植物,甚至更优选地至少200株植物,甚至更优选地至少200株植物的种子VLC-PUFA含量的数字均值,所述植物之半数已经于不同年份在田间试验培育。

[0200] 特定非回归亲本的选择将取决于回交目的。主要目之一是向株系增加某种合乎商业需要的农艺学重要性状。

[0201] 术语“株系”指在共享这个命名的个体之间显示非常小的总体变异的植物群体。“株系”通常指对于至少一个性状显示个体间微小遗传性变异或不显示遗传性变异的植物群体。如本申请中所用的“DH(双单倍体)系”指通过以下方式产生的植物群体:培养单倍体组织并且随后在不伴以细胞分裂的情况下令染色体含量加倍,以产生具有二倍体数目染色体的植物,其中每个染色体对由二个重复的染色体组成。因此,DH系正常情况下对于诸性状显示个体间微小变异或不显示变异。包含一个或多个在非回归亲本中最初含于本发明T-DNA中的基因的株系也构成本发明的植物。

[0202] 本发明还涉及一种产生植物油和/或生育酚(尤其产生生育酚)的方法,所述方法包括步骤

[0203] i) 培育本发明的植物,从而获得其含油种子,

[0204] ii) 收获所述种子,并且

[0205] iii) 从步骤ii)中收获的所述种子提取油。

[0206] 优选地,油具有增加的生育酚含量,尤其是与提取自对照植物的种子的油相比。本文他处公开了优选的增加的生育酚含量。

[0207] 根据iii)的提取步骤优选地在维持油的生育酚含量的条件下实施。维持油的生

育酚含量的条件在本发明背景下应当是不减少生育酚含量的条件。这类条件是本领域熟知的并且例如在中描述Willner等人, Einfluß der Prozeßparameter auf die Tocopherolbilanz bei der Gewinnung von pflanzlichen **Ölen**. Lipid/Fett, 第99卷, 第4期, 第138-147页, 1997, 所述文献因而通过引用的方式完整并入。

[0208] 此外, 油可以具有基于总脂类含量以重量计至少1%的DHA含量和/或基于总脂类含量以重量计至少8%的EPA含量。

[0209] 在又一个步骤中, 该方法可以包括步骤iv): 从步骤iii) 中提取的油分离生育酚。

[0210] 在一个实施方案中, 术语“分离生育酚”意指“富集生育酚”。

[0211] 如何从油分离生育酚是本领域熟知的并且例如在“Commercial Extraction of Vitamin E from Food Sources” in The Encyclopedia of Vitamin E, Preedy, V.R. 和 Watson R.R. (编著), CABI Publishers, Oxford, U.K., 第140-152页和在US 5,627,289中描述。两份文件均完整并入本文。

[0212] 例如, 可以通过多种方法(如酯化油中的游离脂肪酸), 通过允许从油移除脂肪组分的皂化, 蒸馏, 通过色谱方法, 通过酶促方法(通过使用脂肪酶)等分离生育酚。在先前段落中提及的“The Encyclopedia of Vitamin E”的章节中详细描述了这些方法和其他方法。

[0213] 在一个实施方案中, 分离过程包括用甲醇酯化所述油中的游离脂肪酸; 通过碱催化的酯交换过程, 用甲醇使所述油中的甘油三酯发生酯交换; 酸化并且随后洗涤因所述酯交换产生的油; 并且通过蒸馏从油移除因所述酸化和洗涤产生的脂肪酸甲酯。在一个实施方案中, 油的蒸汽馏出物作为油使用。

[0214] 在一个实施方案中, 无机酸如盐酸用于酸化。

[0215] 在一个实施方案中, 使用以体积计1份的甲醇酯化以体积计1至1.5份的所述混合物。

[0216] 在一个实施方案中, 游离脂肪酸在60°C至100°C的温度(尤其在65°C至70°C的温度)酯化。优选地, 脂肪酸在强酸性离子交换剂存在下酯化。

[0217] 优选地, 油按下文描述的浓度包含EPA, DHA和/或DPA n-3。

[0218] 还优选地, 按重量计, EPA的含量是油的总脂类含量的至少8%, 甚至更优选地至少10% (w/w)。优选地, 按重量计, DHA的含量是油的总脂类含量的至少1%, 甚至更优选地至少1.5% (w/w)。如本文所述, 本发明的植物包含, 出于产生植物油的这种方法的目的, 优选地包含本发明的多核苷酸, 构建体或T-DNA和任选地还包含T-DNA或构建体的一个或多个额外部分, 其中所述部分或多个部分分别包含本发明T-DNA的至少一个表达盒。

[0219] 本发明还涉及包含增加的生育酚含量的油。优选地, 所述油通过前述方法可获得, 或由本发明的植物产生。优选地, 所述油还包含增加含量的 VLC-PUFA(术语“高含量”和“增加的含量”在本文中互换使用)。例如, 油可以按下文描述的浓度包含EPA, DHA和/或DPA n-3。

[0220] 术语“油”指包含了酯化成甘油三酯的不饱和/或饱和脂肪酸的脂肪酸混合物。优选地, 本发明油中的甘油三酯包含如上文所提及的PUFA部分或VLC-PUFA部分。酯化的PUFA和/或VLC-PUFA的量优选地是大约30%, 更优选50%的含量, 甚至更优选60%, 70%, 80%或更多的含量。油还可以包含游离脂肪酸, 优选包含上文所提及的PUFA和VLC-PUFA。为了

分析,可以通过酯交换,将脂肪酸转化成甲基酯后,例如通过GC分析测定脂肪酸含量。油或脂肪中多种脂肪酸的含量可以变动,尤其根据来源变动。然而,所述油应当在PUFA和/或VLC-PUFA组成和含量方面具有非天然存在的组成。已知植物油中的大部分脂肪酸酯化于三酰甘油酯中。因此,在本发明的油中,PUFA和VLC-PUFA,优选地,还以酯化形式出现在三酰甘油酯中。应当理解,在所述油的甘油三酯中PUFA和VLC-PUFA的这种独特油组成和独特酯化模式仅应当通过采用上文所述的本发明方法才可获得。另外,本发明的油也可以包含其他分子种类。具体而言,它可以包含微量的本发明多核苷酸或载体。然而,此类低量仅通过高度灵敏的技术如PCR才可以检出。

[0221] 如前所述,这些油,脂类或脂肪酸组合物,优选地包含(以重量计)6%至15%的棕榈酸,1%至6%的硬脂酸,7-85%的油酸,0.5%至8%的异油酸,0.1%至1%的花生酸,7%至25%的饱和脂肪酸,8%至85%的单不饱和脂肪酸以及60%至85%的多不饱和脂肪酸,在每种情况下均基于100%和基于生物的总脂肪酸含量(优选地以重量计)。基于总脂肪酸含量(优选地以重量计),脂肪酸酯或脂肪酸混合物中存在的优选VLC-PUFA优选地是1%至20%的DHA,或5.5%至20%的 α -DHA和/或9.5%至30%的EPA。

[0222] 基于生产宿主细胞,生物,有利地植物,尤其油料作物如大豆,油菜,椰子,油棕榈,红花,亚麻,蓖麻,金盏花,花生,可可豆,向日葵或上述其他单子叶或双子叶油料作物的总脂肪酸含量,本发明的油,脂类或脂肪酸优选地包含至少1%,2%,3%,4%,5.5%,6%,7%或7.5%,更优选地至少8%,9%,10%,11%或12%并且最优选地至少13%,14%,15%,16%,17%,18%,19%或20%的DHA,和/或至少9.5%,10%,11%或12%,更优选地至少13%,14%,14.5%,15%或16%并且最优选地至少17%,18%,19%,20%,21%,22%,23%,24%,25%,26%,27%,28%,29%或30%的EPA(优选地以重量计)。

[0223] 本发明的种子应当包含本发明的油或脂类。优选地,从植物,更优选地从一株植物或多株植物(尤其本发明的一株植物或多株植物)的种子提取,获得,可获得或产生油或脂类。油或脂类因此可以通过本发明的方法获得。特别地,植物油或植物脂类是提取的植物油或脂类。还优选地,从植物,更优选地从一株植物或多株植物(尤其本发明的一株植物或多株植物)的批次种子或整装种子提取,获得,可获得或产生所述油或脂类。

[0224] 优选地,与油或脂类相关的术语“提取”指油或脂类已经从植物,尤其从一株植物或多株植物的种子提取。更优选地,与油或脂类相关的术语“提取”指油或脂类已经从植物,尤其从一株植物或多株植物的批次种子或整装种子提取。这种油或脂类可以是粗制组合物。但是,它还可以是其中例如已经移除水的纯化油或脂类。在一个实施方案中,油或脂类不与来自其他来源的脂肪酸掺合。

[0225] 本发明的油或脂类还可以是植物种子中的油或脂类。优选地,所述植物是转基因植物。更优选地,所述植物是本发明的植物。在一个具体的优选实施方案中,植物是芸苔属植物。

[0226] 本发明的油或脂类应当包含脂肪酸。特别地,油或脂类应当包含酯化形式的脂肪酸。因此,脂肪酸应当酯化。优选地,本发明的油或脂类包含一种多种以下脂肪酸(处于酯化形式):二十碳五烯酸(花生五烯酸,EPA (20:5n-3),鱈鱼酸(DPA n-3)和DHA((Z,Z,Z,Z,Z,Z)-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸)。在一个实施方案中,油或脂类包含EPA和DHA。另外,构思油或脂类包含EPA,DHA和DPA n-3。

[0227] 下文进一步描述前述脂肪酸在本发明脂类或油的总脂肪酸含量中的优选含量。在下文,给出含量的范围。本文中给出的脂肪酸含量(水平)表述为(油或脂类中存在的)全部脂肪酸的总重量的百分数(特定脂肪酸的重量)。因此,含量优选地作为重量百分数给出(%w/w)。下文给出的含量视为高含量。

[0228] 优选地,脂肪酸以酯化形式存在。因此,脂肪酸应当是酯化的脂肪酸。

[0229] 如上述,油或脂类可以包含EPA(20:5n-3)。优选地,二十碳五烯酸(花生五烯酸,EPA,20:5n-3)的含量在总脂肪酸含量的0.1%和20%之间,更优选地2%和15%之间,最优选地5%和10%之间。另外,构思EPA的含量在总脂肪酸含量的5%和15%之间。

[0230] 如上述的,油或脂类可以包含鲱鱼酸(DPA n-3)。优选地,鲱鱼酸(DPA n-3)的含量在总脂肪酸含量的0.1%和10%之间,更优选地在1%和6%之间,最优选地在2%和4%之间。此外,DPA n-3的含量可以是总脂肪酸的至少2%。

[0231] 如上述的,油或脂类可以包含DHA。优选地,DHA的含量在总脂肪酸含量的1%和10%之间,更优选地在1%和4%之间,最优选地在1%和2%之间。另外,构思DHA的含量在总脂肪酸含量的1%和3%之间。

[0232] 本发明的又一个实施方案是油,脂类,脂肪酸和/或脂肪酸组合物在饲料原料,食品原料,膳食供应,化妆品或药物组合物中如下文详述的用途。本发明的油,脂类,脂肪酸或脂肪酸混合物可以用于与动物源的其他油,脂类,脂肪酸或脂肪酸混合物(例如,鱼油)混合。

[0233] 术语“组合物”指以固体,液体或气体形式配制的任何组合物。所述组合物包含例如本发明的化合物,任选地连同合适的辅助化合物如稀释剂或载体或其他成分。在这种情况下,对于本发明,在辅助化合物(即当施加组合物用于其所需目的时并不有助于本发明化合物所发出之作用的化合物)和其他成分(即有助于本发明化合物的又一种作用或调节其作用的化合物)之间可区分。合适的稀释剂和/或载体取决于组合物待使用的目的和其它成分。本领域技术人员可以在不另外费力的情况下确定这类合适的稀释剂和/或载体。合适的载体和/或稀释剂的例子是本领域熟知的并且包括盐水溶液,如缓冲剂,水,乳液如油/水乳液,各种类型润湿剂等。

[0234] 在含油,含脂肪酸或含脂类的组合物中的一个更优选的实施方案中,所述组合物进一步配制为药物组合物,化妆品组合物,食品原料,饲料原料,优选地鱼饲料或膳食供应。

[0235] 本文所用的术语“药物组合物”包含本发明的化合物和任选地一种或多种可药用载体。本发明的化合物可以配制为可药用盐。可接受的盐包括乙酸盐,甲酯,Hel,硫酸盐,氯化物等。药物组合物优选地局部或全身施用。常规用于药物施用的合适施途径是口服,静脉内或肠胃外施用以及吸入。但是,取决于化合物的性质和作用模式,药物组合物也可以通过其他途径施用。例如,多核苷酸化合物可以在基因治疗方法中通过使用病毒载体或病毒或脂类体施用。

[0236] 另外,化合物可以在常见的药物组合物中或作为分开的药物组合物与其他药物组合施用,其中所述分开的药物组合物可以按组分试剂盒形式提供。优选地在常规剂型中施用化合物,所述常规剂型通过将药物与标准药用载体根据常规程序合并而制备。这些程序可以涉及混合,造粒和压制或(如果适宜)溶解这些成分至所需的制品。将可以理解,可药用载体或稀释剂的形式和特征由与它待合并的有效成分的量,施途径和其他熟知变

量 决定。载体必须在兼容于制剂的其他成分的意义上是可接受的并且无损于 其接受者。药用载体使用可以例如是固体,凝胶或液体。示例性固态载体 是乳糖,石膏粉,蔗糖,滑石粉,明胶,琼脂,果胶,阿位伯树胶,硬脂 酸镁,硬脂酸等。液态载体的示例是磷酸盐缓冲盐水溶液,糖浆,油如花 生油和橄榄油,水,乳液,各种类型的润湿剂,无菌溶液等。类似地,载体或稀释剂可以包括本领域熟知的延时材料,如单独或连同蜡一起的甘油 基单硬脂酸酯或二硬脂酸甘油酯。所述合适的载体包括上文提到的那些和 本领域熟知的其他,参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。稀释剂如此选择,从 而不影响组合的生物学活性。这类稀释剂的例子是蒸馏水,生理盐水,林 格液,右旋糖溶液和Hank溶液。此外,药物组合物或制剂还可以包含其他载体,辅助剂或无毒,无治疗性,无免疫原性稳定剂等。治疗有效剂量 指在本发明药物组合物中待使用的化合物的量,所述量预防,改善或治疗 本说明书中提到的疾病或病状的症状。

[0237] 术语“化妆品组合物”指上文如对药物组合物描述那样配制的组合物。同样地,对于化妆品组合物,构思本发明的化合物还优选地以基本上纯的 形式使用。然而对于药物组合物,杂质可能相对较不重要。化妆品组合物 优选地待局部施加。

[0238] 可以将包含本发明化合物的优选的化妆品组合物配制为护发组合物, 生发组合物,洗发剂,粉剂,胶浆剂(jelly),发淋洗剂,软膏剂,发洗剂, 糊剂,发乳膏剂,发胶和/或发用气溶胶。

[0239] 下文实施例部分中详述的三个事件的种子已经依据国际承认用于专利 程序的微生物保藏布达佩斯条约的条款保藏在ATCC,即事件“LBFLFK” =ATCC名称“PTA-121703”的种子,事件“LBFDHG” =ATCC命名 “PTA-121704”的种子和事件“LBFDAU” =ATCC名称“PTA-122340”的种 子。申请人无权放弃法律对生物材料转让或其商业运输所施加的任何限制。申请人不放弃任何侵犯其以下权利之行为的起诉:根据本专利授予的权利 或根据植物品种保护法(7USC 2321et seq.)适用于已保藏事件的权利,禁 止未授权的种子繁殖。这种种子可以根据国家法律监管。种子的保藏仅出 于方便本领域技术人员而进行并且不构成或暗示以下的任何供认,承认, 声明或断言:要求保藏的种子以充分描述本发明,以充分能够实现本发明 或实施本发明或其任何部分或方面。另外,种子的保藏不构成或暗示将本发明 任何方法的应用限于应用该种子或该种子中所含任何材料(例如,核酸,蛋白质或这种核酸 或蛋白质的任何片段)的任何建议。

[0240] 保藏的种子衍生自经具有如SEQ ID NO:3中所示序列的T-DNA载体 转化的植物。

[0241] 本发明借助后附实施例进一步描述,然而,所述实施例不意在限制本 文所述的 的本发明范围。

实施例

[0242] 实施例1:材料和方法

[0243] A. 一般克隆方法

[0244] 如Sambrook等人(1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87965-309-6)中所述那样开展多种克隆方法,例如,使用限制性核 酸内切酶在特异性位点切割双链DNA,琼脂糖凝胶电泳,DNA片段的纯 化,转移核酸到硝酸纤维素膜和尼龙膜上,连

接DNA片段,转化大肠杆菌细胞和细菌的培养。使用Phusion™高保真DNA聚合酶(NEB,法兰克福,德国),根据生产商的说明,进行聚合酶链反应。通常,设计在PCR中使用的引物,从而该引物3'端的至少20个核苷酸与模板完美退火来扩增。通过连接识别位点的相应核苷酸至引物5'端,添加限制性位点。使用例如由K.Heckman和L.R.Pease,Nature Protocols (2207) 2,924-932描述的融合PCR作为备选方法以连接两个目的片段,例如,将启动子与基因连接或将基因与终止子连接。例如由Czar等人(Trends in Biotechnology, 2009, 27 (2): 63-72)描述,基因合成由Life Technologies使用其**Geneart®**服务执行。W02013049227中所述的**Geneart®**技术允许产生长度为数个碱基对(bp)的遗传元件并且在本发明中用来产生约60,000bp的完整质粒。对于短DNA片段,使用核苷酸至多核苷酸的化学合成法,其中使用如W02013049227中所述的常规克隆技术组合,所述短DNA片段随后按依次,模块化方式组合成大小尺寸渐增的片段。

[0245] B.不同类型的植物转化质粒适于将多个编码多种蛋白质的表达盒转移入植物基因组。

[0246] 对于基于农杆菌的植物转化,DNA构建体优选地符合多种标准:(1)构建体携带多种遗传元件,所述遗传元件意在插入植物基因组中'T-DNA左边界'(LB)和'T-DNA右边界'之间的所谓转移DNA(T-DNA)上。(2)构建体在大肠杆菌中复制,因为大部分克隆步骤要求在大肠杆菌中的DNA增殖步骤。(3)构建体在农杆菌(例如,根癌农杆菌或发根农杆菌)中复制,因为植物转化方法依赖于使用农杆菌将目的遗传元件插入至农杆菌感染的细胞的植物基因组中。(4)构建体含有编码蛋白质的支持性遗传元件,其中感染植物细胞及所需遗传元件转移并整合至农杆菌感染的植物细胞的植物基因组中要求所述蛋白质,或构建体与含有在相同农杆菌细胞中存在的这类支持性遗传元件的第二构建体组合使用。(5)构建体可以含有选择标记,所述选择标记便于选择或鉴定含有整个构建体的细菌细胞,并且植物细胞含有所需遗传元件。在Komori等人(2007)中给出了可用质粒的概述。

[0247] C.在含有F因子/pRI复制起点的BiBAC T-质粒内部装配合成EPA和DHA所需要的基因

[0248] 为在欧洲油菜种子中合成VLC-PUFA,将编码VLC-PUFA代谢途径的蛋白质的成组基因与表达元件(启动子,终止子和内含子)组合并且转移至用于农杆菌介导植物转化法的双元T-质粒中。全部表达盒已经组合到单个双元T-质粒上。DNA合成法的进步允许多家企业提供这样的服务:在没有初始模板的情况下,利用化学合成法和分子生物技术的组合从头合成直至微生物基因组大小的多核苷酸。构建本实施例中所述质粒时所使用的合成过程由Life Technologies使用其**Geneart®**服务执行。W02013049227中所述的**Geneart®**技术允许产生数个碱基对(bp)长度的遗传元件并且在本发明中用来产生具有总大小约61,000bp的植物转化用双元T-质粒VC-LTM593-1qcz rc。表1中给出质粒VC-LTM593-1qcz rc的结构。

[0249] 表1:质粒VC-LTM593-1qcz rc的遗传元件。列出了元件的名称,在VC-LTM593-1qcz rc中的位置(核苷酸编号,注意:对于VC-LTM593-1qcz rc的互补链编码的元件,起始位置大于终止位置),元件的功能和来源。转化过程期间整合至植物基因组中的T-DNA侧翼分布有右边界(VC-LTM593-1qcz rc的核苷酸59895至148)和左边界(VC-LTM593-1qcz rc

的核苷酸43830至43695)。该区域外部的元件(=载体 主链)是在大肠杆菌和/或农杆菌中克隆和稳定维持必需的。SEQ ID NO:3 中显示这个载体的序列。第二栏和第三栏中显示SEQ ID NO:3中(例如, 启动子,基因,内含子,终止子和分隔区)的位置。

[0250]

质粒 VC-LTM593-1qcz rc 的遗传元件	从	至	元件的描述, 功能和来源
p-VfUSP_684bp[LLL894]	329	1012	来自蚕豆(<i>Vicia faba</i>)未知种子蛋白基因 <i>USP</i> 的启动子(登录号: X56240)
i-Atss18_252[LJK36]	1013	1264	i-Atss18_252bp 功能性内含子区; 具有部分 5' UTR 的内含子, 拟南芥, 基因座 At1g01170, + 37 至+ 288 bp (相对于转录起点编号) (仅+ 72 至+ 282bp 5'UTR-内含子)
c-d6Elo(Pp_GA2)	1267	2139	来自展叶剑叶藓的 Δ -6 延伸酶
t-CaMV35S	2140	2355	来自花椰菜花叶病毒 35S 基因的终止子 CaMV35S
p-LuCnl (1064bp)	2448	3511	来自亚麻 <i>CONLININ</i> 基因的启动子
i-Atss14_377bp[LJK32]	3512	3888	i-Atss14_377bp[LJK32]功能性内含子区; 具有部分 5'UTR 的内含子, 拟南芥, 基因座 At5g63190, + 166 至+ 542 bp (相对于转录起点编号) (仅+ 201 至+ 542 bp 5'UTR-内含子)
c-d5Des(Tc_GA2)	3892	5211	来自破囊壶菌属物种 ATCC21685 的 Δ -5 去饱和酶
t-AgrOCS 192bp[LED12]	5212	5403	来自根癌农杆菌章鱼碱合酶基因 <i>OCS</i> 的终止子
p-SBP	5539	7337	来自蚕豆的蔗糖结合蛋白相关基因的启动子
i-Atss2_455bp[LJK20]	7338	7792	i-Atss2_455bp 功能性内含子区; 具有部分 5'UTR 的内含子, 拟南芥, 基因座 At1g65090, + 77 至+ 531bp (相对于转录起点编号) (仅+ 113 至+ 508bp 5'UTR-内含子)
c-d6Des(Ot_febit)	7802	9172	来自托瑞蚝球藻的 Δ -6 去饱和酶
t-StCATHD-pA	9200	9434	来自马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i>) 马铃薯 组织蛋白酶D抑制蛋白基因[CATHD]的终止子
p-LuPXR 1727bp[LLL823]	9513	11239	来自亚麻过氧化物氧化蛋白样蛋白 LIKE 蛋白基因 PXR 的启动子

[0251]

质粒 VC-LTM593-1qcz rc 的遗传元件	从	至	元件的描述, 功能和来源
i-Atss1_846bp[ltm593]	11240	12085	i-Atss1_847bp 功能性内含子区; 具有部分 5'UTR 的内含子, 拟南芥, 基因座 At1g62290(天冬氨酰蛋白酶家族蛋白), +1 至+847bp (相对于转录起点编号) (仅+19 至 +841bp 5'UTR- 内含子); 与原始 i-Atss1_847bp 相比, 在聚 T 片段处短 1 bp
c-d6Elo(Tp_GA2)	12099	12917	来自假微型海链藻的 Δ -6 延伸酶
t-AtPXR 400bp[LLL823]	12973	13372	来自拟南芥过氧化物氧化蛋白样蛋白基因 PXR (At1g48130)的终止子
p-油菜籽蛋白 A/B	13542	14205	来自欧洲油菜 <i>napA/B</i> 基因(油菜籽蛋白, 种子贮藏蛋白)的启动子
i-Atss14_377bp[LJK32]	14206	14582	i-Atss14_377bp[LJK32]功能性内含子区; 具有部分 5' UTR 的内含子, 拟南芥, 基因座 At5g63190, + 166 至+ 542 bp (相对于转录起点编号) (仅+ 201 至+ 542 bp 5'UTR-内含子)
c-d12Des(Ps_GA2)	14589	15785	来自大豆疫霉的 Δ -12 去饱和酶
t-E9	15804	16361	来自豌豆 RuBisCo <i>rbcS</i> 小亚基基因(E9)的终止子
p-BnSETL-v1[1234bp]	16454	17687	SETL-v1 欧洲油菜启动子
c-o3Des(Pir_GA)	17690	18781	来自畸雌腐霉的 Ω -3 去饱和酶
t-BnSETL	18803	19416	SETL-v1 欧洲油菜终止子
p-VfUSP_684bp[LLL894]	19495	20178	来自蚕豆未知种子蛋白基因 <i>USP</i> 的启动子 (登录号: X56240)
i-Atss18_252[LJK36]	20179	20430	i-Atss18_252bp 功能性内含子区; 具有部分 5' UTR 的内含子, 拟南芥, 基因座 At1g01170, + 37 至+ 288 bp (相对于转录起点编号) (仅+ 72 至+ 282bp 5'UTR-内含子)
c-o3Des(Pi_GA2)	20441	21526	来自致病疫霉的 Ω -3-去饱和酶
t-CaMV35S	21535	21750	来自花椰菜花叶病毒 35S 基因的终止子 CaMV35S
p-BnSETL-v1[1234bp]	21886	23119	SETL-v1 欧洲油菜启动子
c-d5Des(Tc_GA2)	23122	24441	来自破囊壶菌属物种 ATCC21685 的 Δ -5 去饱和酶
t-BnSETL	24463	25076	SETL-v1 欧洲油菜终止子
p-ARC5_perm1	25223	26373	从源自菜豆 <i>ARCILINE5</i> 基因的启动子衍生的启动子
c-d4Des(Tc_GA3)	26384	27943	来自破囊壶菌属物种的 Δ -4 去饱和酶
t-pvarc	27957	28556	来自菜豆的 <i>ARC5</i> 基因的终止子
p-LuPXR 1727bp[LLL823]	28649	30375	来自亚麻过氧化物氧化蛋白样蛋白 LIKE 蛋白基因 PXR 的启动子
i-Atss15_758bp[LJK33]	30376	31133	i-Atss15_758bp[LJK33]功能性内含子区; 具有部分 5'UTR 的内含子, 拟南芥, 基因座

[0252]

质粒 VC-LTM593-1qcz rc 的遗传元件	从	至	元件的描述, 功能和来源
			At2g27040, +93 bp 至+ 850 bp (相对于转录起点编号) (仅+ 128 至+ 847 bp 5'UTR-内含子)
c-o3Des(Pir_GA)	31149	32240	来自畸雌腐霉的 Ω -3 去饱和酶
t-AtPXR 400bp[LLL823]	32297	32696	来自拟南芥过氧化物氧化蛋白样蛋白基因 PXR (At1g48130)的终止子
p-LuCnl (1064bp)	32832	33895	来自亚麻 <i>CONLININ</i> 基因的启动子
i-Atss2_455bp[LJK20]	33896	34350	i-Atss2_455bp 功能性内含子区; 具有部分 5'UTR 的内含子, 拟南芥, 基因座 At1g65090, +77 至+ 531bp (相对于转录起点编号) (仅+ 113 至+ 508bp 5'UTR-内含子)
c-d4Des(PI_GA)2	34360	35697	来自路氏巴夫藻的 Δ -4 去饱和酶
t-AgrOCS 192bp[LED12]	35719	35910	来自根癌农杆菌章鱼碱合酶基因 <i>OCS</i> 的终止子
p-BnFae1	36104	37533	来自欧洲油菜 β -酮酰辅酶 A 合酶(<i>FAEI.1</i>)基因的启动子
i-Atss1_847bp[LJK19]	37534	38380	i-Atss1_847 bp 功能性内含子区; 具有部分 5'UTR 的内含子, 拟南芥, 基因座 At1g62290(天冬氨酰蛋白酶家族蛋白), +1 至+847 bp (相对于转录起点编号) (仅+19 至+841 bp5'UTR-内含子); 来自 QC1153-1/RTP6393。
c-d5Elo(Ot_GA3)	38388	39290	来自托瑞蚝球藻的 Δ -5 延伸酶
t-bnFae1	39307	39706	来自拟南芥脂肪酸延伸酶(<i>FAEI</i> , <i>At4g34520</i>)基因的终止子
p-YPC105906_PcUbi4-2[长]	39830	40806	具有内部内含子的 MTX 欧芹 <i>UBI4-2</i> 启动子
c-AtAHASL_A122T_S653N [负 RES]	40814	42826	来自拟南芥的乙酰羟酸合酶大亚基基因 /CDS, 具有 S653N (<i>csr1-2</i>)突变和 A122T SDM 突变负链限制性位点
t-AtAHAS-3'UTR[rtp4820]	42827	43606	拟南芥(双子叶) <i>AtAHASL</i> 3' 非翻译区[修整]乙酰羟酸合酶基因终止子
b-LLB	43830	43695	左 T-DNA 来自 pTi15955 [Genbank #AF242881]的左边界
c-KanR_Tn903	45777	44962	卡那霉素抗性选择基因/CDS
p-Kan[Im500]	45898	45778	卡那霉素抗性基因的启动子
o-ori-2	47051	47267	ori-2 复制起点
c-repE	47361	48116	<i>repE</i> 基因/CDS
c-sopA	48695	49870	<i>sopA</i> 基因/CDS
c-sopB	49870	50841	<i>sopB</i> 基因/CDS
c-sopC/incD	50914	51387	<i>incD/sopC</i> 部分基因/CDS
c-tral	51890	51949	<i>traI</i> 基因/CDS
mf-traI - repA 基因间区	51938	52300	<i>traR</i> 依赖性细胞密度感受调节子的调节区 -

质粒 VC-LTM593-1qcz rc 的遗传元件	从	至	元件的描述, 功能和来源
			含有 2 个 tra-框(参见 LI 和 FARRAND JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Jan. 2000, 第 179-188 页)
o-repA	52301	53518	来自 pTiC58 复制子的 <i>Rep-A</i> 基因(LI 和 FARRAND JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2000 年 1 月, 第 179..188 页)
rr-repB	53748	54758	来自 pTiC58 复制子的 <i>rep-B</i> 基因(LI 和 FARRAND JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2000 年 1 月, 第 179..188 页)
o-repC	54973	56292	来自 pTiC58 复制子的 <i>rep-C</i> 基因(LI 和 FARRAND JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2000 年 1 月, 第 179..188 页)
mf-y4cG	56771	56301	DNA 转化酶同源物的片段; 类似于根瘤菌物种 NGR234 pNGR234a Y4CG
tr-Tn5	58811	57250	转座子 Tn5 序列
o-oriT	59107	59275	来自 pRK310 genbank 文件的 oriT
b-RB[rtp4394]	148	59895	右 T-DNA 右边界

[0253] D. 使用BiBAC产生转基因植物的程序

[0255] 通常,根据DeBlock等人,1989,Plant Physiology,91:694-701的修改方案产生转基因油菜植物。在含抗生素(20mg/L氯霉素,5mg/L四环素,50mg/L卡那霉素)的YEB培养基中配制意在转化的菌株的过夜培养物并在28°C培育。在次日,在600nm波长检查培养物的光密度。它达到约1.0。延长光密度较低的培养物的培育时间。将光密度高于1.3的培养物用YEB培养基稀释至大约0.2的OD并且培养直至它们达到1.0的OD。将培养物以约4000g沉淀并重悬于含100mg/L乙酰丁香酮的液态MS培养基(Murashige和Skoog 1962),pH 5.8,3%蔗糖中以达到0.1的OD_{600nm}。农杆菌悬液用于接种从5日龄黄化籽苗制备的下胚轴段。

[0256] 使用来自Duchefa的MSB5培养基(Duchefa Biochemie,P0 Box 809 2003 RV Haarlem,荷兰),pH 5.8,3%蔗糖和0.8%Oxoid琼脂,使种子在低光照条件(<50μMol/m²s)下萌发五天。光照条件下的萌发产生外植体,所述外植体与黄化的下胚轴相比更稳定并更易操作。将4至7mm长度的下胚轴段在农杆菌细胞浴中温和振摇下接种直至4分钟并且在温育后筛分。将感染的外植体转移至含有其表面上携带一层Whatman滤纸的共培养培养基(MS培养基,pH 5.6,3%蔗糖,0.6g/L MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸),18g/L甘露糖醇,0.7%植物琼脂(Duchefa Biochemie,P0 Box 809 2003 RV Haarlem,荷兰,货品数目SKU:P1003),100mg/L乙酰丁香酮,200mg/L L-半胱氨酸,1mg/L 2,4D(2,4-二氯苯氧基乙酸))的培养皿。将培养皿用胶带密封并且在23°C于长日照条件(16小时光照/8小时黑暗)下温育三天。在三天共培养时间后,将植物转移至MS培养基,pH 5.6,3%蔗糖,0.6g/L MES,18g/L甘露糖醇,0.7%植物琼脂,1mg/L 2,4D和500mg/L羧苄青霉素防止农杆菌生长,并且对于恢复期,在与共培养相同的物理条件下温育7天。

[0257] 为了选择性再生,将外植体在恢复期后转移至MS培养基,pH 5.8,3%蔗糖,0.7%植物琼脂,2.5mg/L AgNO₃,3mg/L BAP(6-苄氨基嘌呤),0.1mg/L GA(赤霉素),0.1mg/L

NAA (1-萘乙酸), 500mg/L 羧苄青霉素, 100nM 咪草烟 (Pursuit), 并且在如上文所述的长日照条件下培养2周。每两周进行继代培养。激素如下逐步减少: BAP: 3至0.5至0.05mg/L; GA (赤霉素): 0.1至0.25至0.25mg/L; NAA: 0.1至0至0mg/L。

[0258] 可以在第二轮选择性再生后收获正在发育的小苗 (shootlet)。将小苗切下并转移至伸长/生根培养基 (MS培养基, pH 5.8, 2% 蔗糖, 100mg/L 肌-肌醇, 40mg/L 硫酸腺嘌呤, 500mg/L MES, 0.4% Sigma 琼脂, 150mg/L 特美汀, 0.1mg/L IBA (吲哚-3-丁酸)) 或转移至离体长日照条件下在覆盖的箱中以1/10体积无蔗糖的MS培养基, pH 5.8 浇灌的岩棉/石棉或泡沫垫 (Grodan, GRODAN Group P.O.Box 1160, 6040KD Roermond The Netherlands, 或 Oasis, 919 Marvin Street, Kent, OH 44240 USA) 上。

[0259] 苗 (shoot) 伸长并在体外培养基中生根并且直接转移至土壤。

[0260] 对体外苗或GH适应的苗采样供分子分析。

[0261] 使用高压灭菌 (以下组分例外: 抗生素, 激素, 添加物如L-半胱氨酸, 乙酰丁香酮, 咪唑啉酮) 或过滤消毒制备 (将琼脂组分高压灭菌, 允许冷却至42°C 并且随后使用) 的培养基。

[0262] E. 种子萌发和在温室和田间的植物生长

[0263] 在温室和田间栽培转化的植物供种子产生和表型评估。温室生长条件是16小时光照时间, 随后8小时黑暗时间。温度是光照时间 (也称作昼间时间) 期间20摄氏度, 光水平对应于200-300微摩尔光子 $m^{-2}s^{-1}$ (这是在植物顶部的入射光并且根据与植物的距离调整光以实现这个比率)。在昼间时间期间, 温室中的光范围在130和500微摩尔光子 $m^{-2}s^{-1}$ 之间变动。超出刚才提及的昼间范围则触发使用人工照明灯以引起光水平至200-300微摩尔光子 $m^{-2}s^{-1}$ 或遮蔽和/或关闭照明灯以引起光水平返回200-300微摩尔光子 $m^{-2}s^{-1}$ 。黑暗时间 (也称作夜晚时间) 温度是18°C。光照时间开始之前四小时, 降低温度至15°C 持续黑暗时间的剩余部分。灌溉植物并且如需要, 就昆虫进行处理。土壤类型是Floragard (Oldenburg, 德国) 提供的50% Floradur B Seed+50% Floradur B Cutting (包含细砂和珍珠岩)。通过补充养分增强植物生长。养分与每日浇灌组合。0.1% (w/v) 肥料液 (Hakaphos Blue 15 (N) -10 (P) -15 (K), Compo GmbH&Co KG, 明斯特, 德国) 用来浇灌植物。按需供水 (例如, 根据植物生长阶段, 水消耗量等)。为了避免交叉授粉, 植物在首花开放的时间套袋。每天检查植物以确保全部开放的花用袋子覆盖。恰当地移除未覆盖的开放花。

[0264] 对于田间培育的植物, 在气候上对应于USDA生长区3a-4b和5a的六个位置培育植物。在夏季培育在对应于USDA生长区3a-4b和5a的地区培育的植物。遵循卡诺拉油菜标准园艺惯例。如培育者认为必要, 使用保护免遭禽类和昆虫影响的架网和其他措施, 除草剂和肥料应用也是如此。全部位置的种植密度均是每平方米八十粒种子。

[0265] F. 脂类提取和植物油的脂类分析

[0266] 通过在例如上文所述的合适条件下培育植物并且对生长培养基和/或细胞组分分析所需分子 (例如脂类或某种脂肪酸) 的增强产生, 确定基因修饰在植物中的结果或对产生所需分子 (例如某种脂肪酸) 的影响。脂类如标准文献中所述那样抽取, 所述标准文献包括Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90和S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., 等人, (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" 引自: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm

等人(1993)Biotechnology,Bd.3,Kapitel III:“Product recovery and purification”, S.469-714,VCH:Weinheim;Belter,P.A., 等人(1988)Bioseparations:downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons;Kennedy,J.F.和Cabral,J.M.S. (1992)Recovery processes for biological Materials,John Wiley and Sons; Shaeiwitz,J.A. 和Henry,J.D. (1988)Biochemical Separations,引自:Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry,Bd.B3;第11章,S.1-27,VCH: Weinheim;和 Dechow,F.J. (1989)Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications.

[0267] 公认的是,可以使用不同于上文引用的其他方案,如Cahoon等人 (1999) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96(22):12935-12940和Browse等人 (1986)Analytic Biochemistry 152:141-145中所述,实施脂类和脂肪酸的提取。在Christie,William W., Christie,William W.,Advances in Lipid Methodology,Ayr/Scotland:Oily Press (Oily Press Lipid Library;2); Christie,William W.,Gas Chromatography and Lipids.A Practical Guide -Ayr,Scotland:Oily Press,1989,Repr.1992,IX,307S. (Oily Press Lipid Library;1);“Progress in Lipid Research”,Oxford:Pergamon Press,1 (1952)-16(1977)u.d.T.:Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN中描述了用于定量和定性分析脂类或脂肪酸的方案。

[0268] 为了产生含有实施例1C中描述的遗传元件的转基因植物以在种子中产生EPA和DHA,将油菜(欧洲油菜)如实施例1D中所述那样转化。培育选出的含有遗传元件的植物直至成熟的种子在实施例1E引用的条件下形成。如上文所述从收获的种子提取脂肪酸并且使用如上文所述的气相色谱法进行分析。脂肪酸含量(水平)在本发明自始至终表述为在种子的油中所含(全部脂肪酸的总重量)的百分数(特定脂肪酸的重量)。种子含油量在本发明自始至终表述为(种子的油总重量)的(油重量)百分数。

[0269] G.植物种子样品的组成分析

[0270] 通过在(例如,如上文所述的)合适条件下培育植物并且分析种子组织的特定组成参数,确定基因修饰对种子组成的影响。使用Foss Knifetec 1095样品磨,将成熟种子样品研磨成细粉末并提供给Eurofins营养分析中心(ENA)。具体而言,由ENA使用MET-VT-008法和MET-VT-030法测量在磨碎的种子样品中的维生素E(生育酚)含量,所述两种方法指美国分析化学家协会A0971.30法并且涉及HPLC分离和定量。

[0271] 实施例2:含有质粒VC-LTM593-1qcz rc的T-DNA以增强种子中生育酚、EPA和DHA产生的植物

[0272] 使用BiBAC质粒,将这个实施例中所述的全部遗传元件转移在单个T-DNA上,进入植物基因组。为此目的,将质粒VC-LTM593-1qcz rc克隆入农杆菌,并且将植物组织根据实施例1与这种农杆菌培养物温育。表1中列出了VC-LTM593-1qcz rc的遗传元件和每种元件的功能。出于方便,表2中额外列出在携带VC-LTM593-1qcz rc的两个T-DNA的植物的种子中表达的全部酶。在一个实施方案中,本发明的植物,植物部分(尤其种子,T-DNA或构建体包含如该表中公开的某些去饱和酶和/或延伸酶,或全部去饱和酶和/或延伸酶。

[0273] 表2:质粒VC-LTM593-1qcz rc的T-DNA携带的基因的列表。第4栏和第5栏中显示优选的多核苷酸序列和蛋白质序列。

编码合成 EPA 和 DHA 的酶的基因	长度 (bp)	所编码蛋白质的酶功能和来源	多核苷酸 SEQ ID NO:	蛋白质序列 SEQ ID NOD NO
[0274] c-d12Des(Ps_GA2)	1197	来自大豆疫霉的 Δ -12 去饱和酶	265	266
c-d6Des(Ot_febit)	1371	来自托瑞蚝球藻的 Δ -6 去饱和酶	261	262
c-d6Elo(Pp_GA2)	873	来自展叶剑叶藓的 Δ -6 延伸酶	257	258
c-d6Elo(Tp_GA2)	819	来自假微型海链藻的 Δ -6 延伸酶	263	264
2 个拷贝的 c-d5Des(Tc_GA2)	1320	来自破囊壶菌属物种 ATCC21685 的 Δ -5 去饱和酶	259	260

编码合成 EPA 和 DHA 的酶的基因	长度 (bp)	所编码蛋白质的酶功能和来源	多核苷酸 SEQ ID NO:	蛋白质序列 SEQ ID NOD NO
[0275]		饱和酶		
c-o3Des(Pi_GA2)	1086	来自致病疫霉的 Ω -3-去饱和酶	269	270
2 个拷贝的 c-o3Des(Pir_GA)	1092	来自畸雌腐霉的 Ω -3 去饱和酶	267	268
c-d5Elo(Ot_GA3)	903	来自托瑞蚝球藻的 Δ -5 延伸酶	275	276
c-d4Des(Pl_GA)2	1338	来自路氏巴夫藻的 Δ -4 去饱和酶	273	274
c-d4Des(Tc_GA3)	1560	来自破囊壶菌属物种的 Δ -4 去饱和酶	271	272

[0276] A. 夏季期间在USDA生长区带3a-4b和5a田间试验栽培的携带质粒 VC-LTM593-1qcz rc的T-DNA的T2植物的脂肪酸特征和维生素E含量

[0277] 在根据实施例1的田间位置培育来自含有VC-LTM593-1qcz rc的1-2 拷贝T-DNA的六个独立转基因事件的纯合T2植物。收获T3种子并提交 供如实施例1中所述的脂肪酸分析。表3含有每个事件来自全部位置的全部样品之间的脂肪酸特征数据。每个事件均能够在田间产生VLC-PUFA (ARA,EPA和DHA)。

[0278] 提交表3中描述的相同T3种子供如实施例1中所述的组成分析。为了分析数据,使用软件JMP11.0进行ANOVA。使用Tukey检验在95%置信度水平实施分析。为了抵消从田间试验所获得数据的不平衡(例如,归因于例如天气),统计分析中使用最小二乘均数替代均数。表3中的常见字母表示最小二乘均数无显著差异。基于这种统计分析,一个事件LBFDAU含有比未转化的Kumily对照更高的 γ 生育酚和总生育酚,而全部其他事件倾向于具有比Kumily更高的 γ -生育酚水平和总生育酚水平,事件 LBFIHE例外。

[0279] 相对于未转化的Kumily (18:1+18:2 \geq 93%),表3和表4中描述的转基因事件均具有降低的18:1+18:2含量。但是,我们未观察如基于Li等人 (2013) J Agric Food Chem 61: 34-40原本预测的任何显著的 α -生育酚含量降低。相反,我们观察到 γ -生育酚和总生育酚含量增长,其中最大增长出现在产生最多EPA+DHA组合的事件LBFDAU中。进行一项相关分析以揭示VLC-PUFA和生育酚之间的相关性(表5)。在ARA(n-6脂肪酸)和任何生育酚组分

之间不存在显著相关性。在另一方面,在多种生育酚和EPA 和DHA之间观察到显著的正相关。对长度为20碳或更长的全部n-3或全部n-6脂肪酸的总和测定相关系数。生育酚和VLC-PUFA含量之间的相关性是对n-3脂肪酸特异的。在长度为20碳或更长的n-3脂肪酸脂肪酸和γ-生育酚,δ-生育酚及总生育酚之间观察到最高相关性。因此,将合成20碳和22碳n-3VLC-PUFA EPA,DPA和DHA的生物合成途径引入植物中还导致维生素E含量增加。

[0280] 表3:含有质粒VC-LTM593-1qcz rc的T-DNA的卡诺拉油菜事件的田间试验中,从T2植物(在对应于USDA生长区3a-4b和5a的田间栽培)收获的T3种子的脂肪酸特征。第一列中显示事件,连同代表依照事件测量的地块的T3种子等分试样的数目。对于事件LBFGKN,测量36个小区和来自这些小区的60株单个植物。根据种子批次,按五次技术性重复测量随机选择的约15粒种子。值是最小二乘均数±标准偏差。

[0281]

事件	16:0	16:1n-7	16:3n-3	18:0	18:1n-9	18:2n-6	18:2n-1	18:3n-3	18:3n-6	18:4n-3	20:0	20:1n-9	20:2n-6	20:3n-3	20:3n-6	20:4n-3	20:4n-6	20:5n-3	22:0	22:1n-9	22:4n-6	22:5n-3	22:5n-6	22:6n-3	20:2n-9
LBFD	4.7			2.7	28.9	29.1		6.1	1.6						3.3	2.2		10.0				2.9	1.6	0.3	
AU (n=16)	±0.1	±0.2	±0.0	±0.1	±1.5	±0.7	±0.1	±0.3	±0.1	±0.3	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.3	±0.2	±0.2	±0.7	±0.3	±0.0	±0.3	±0.1	±0.2	±0.1	±0.3
LBFD	4.7			2.5	34.2	32.0		0.6	1.2						1.3	1.9	6.1				2.1	1.1	0.2		
GG (n=36)	±0.1	±0.2	±0.0	±0.2	±1.9	±1.2	±0.1	±0.5	±0.1	±0.2	±0.6	±0.8	±0.1	±0.1	±2.0	±0.2	±0.7	±0.3	±0.0	±0.3	±0.1	±0.2	±0.2	±0.1	±0.1
LBFG																									
KN (n=36+60)	±4.6	±0.2	±0.0	±2.6	±33.7	±32.8	±0.6	±7.5	±0.9	±0.2	±0.7	±0.2	±0.1	±0.1	±2.1	±1.2	±1.8	±6.0	±0.3	±0.0	±0.3	±2.1	±1.1	±0.2	±0.2
LBFIH	4.8			2.6	31.2	33.0		0.6	6.7	1.3		0.7			2.1	1.2	2.4	6.7			0.3	1.9	1.2	0.2	
E (n=36)	±0.2	±0.2	±0.0	±0.2	±1.7	±1.2	±0.1	±0.7	±0.2	±0.1	±0.1	±0.0	±0.0	±0.2	±0.1	±0.3	±0.6	±0.6	±0.0	±0.1	±0.2	±0.1	±0.2	±0.1	±0.0
LBFLF	4.7			2.6	30.1	30.0		0.9	6.2	1.5	0.3				3.3	1.9	1.9				3.2	1.4	0.5	0.3	
K (n=36)	±0.2	±0.2	±0.0	±0.2	±1.9	±1.1	±0.1	±0.4	±0.2	±0.1	±0.6	±0.8	±0.1	±0.1	±0.3	±0.2	±0.2	±1.0	±0.3	±0.0	±0.5	±0.1	±0.3	±0.1	±0.1
LBFP	4.8			2.6	28.2	32.0		0.8	5.7	1.6	0.3				2.3	1.2	3.8				2.4	1.1	0.2		
A (n=36)	±0.2	±0.2	±0.0	±0.2	±2.1	±1.4	±0.1	±0.4	±0.2	±0.1	±0.7	±0.8	±0.2	±0.1	±0.3	±0.2	±0.5	±9.6	±0.3	±0.0	±0.3	±0.1	±0.2	±0.1	±0.1

[0282] 表4:含有质粒VC-LTM593-1qcz rc的T-DNA的卡诺拉油菜事件的田间试验中,USDA生长区3a-4b和5a中栽培的T2植物的T3种子的组成分析。第一列中显示事件。已经对4个批量进行分析,而每个批量是从4个不同地理区域收获的全部种子的代表性样品。α-生育酚(mg/100g种子),β-生育酚(mg/100g种子),δ-生育酚(mg/100g种子),γ-生育酚(mg/100g种子),总生育酚(mg/100g种子)。所有结果已经对具有0%水分的种子的种子重量归一化。值是最小二乘均数。不共享某个字母的均数在95%置信度水平显著差异。

事件	α -生育酚		β -生育酚		δ -生育酚		γ -生育酚		生育酚 (VitE)		油(%)	
LBFDAU	13.3	ab	0.25	a	0.58	a	29.5	a	43.7	a	37.716	bcd
LBFDDG	14.1	ab	0.23	a	0.45	bcd	25.6	b	40.4	abc	38.612	abcd
LBFCKN	12.9	b	0.23	a	0.52	abc	26.9	ab	40.6	abc	39.400	abc
LBFIHE	13.2	ab	0.23	a	0.45	bcd	22.0	cd	35.9	cde	39.639	abc
LBFLLK	12.5	b	0.23	a	0.52	abc	25.7	b	38.9	abc	37.233	cd
LBFPPA	13.6	ab	0.22	a	0.47	bcd	24.9	bc	39.2	abc	39.189	abcd
Topas	14.7	ab	0.25	a	0.36	d	16.6	e	31.9	e	36.581	d
Kumily	12.3	b	0.23	a	0.54	ab	24.4	bc	37.5	bcd	38.722	abcd
对照 1*	16.6	a	0.25	a	0.43	cd	24.1	bc	41.4	ab	38.923	abcd
对照 2*	12.0	b	0.20	a	0.45	bcd	20.8	d	33.5	de	40.567	a

[0284] *对照1和对照2不是Kumily背景

[0285] 表5:含有质粒VC-LTM593-1qcz rc的T-DNA的卡诺拉油菜事件的田间试验中,来自USDA生长区3a-4b和5a中栽培的T2植物的T3种子的脂肪酸和生育酚之间的皮尔森相关系数。显著的相关性以*** ($p < 0.05$) 或以* ($p < 0.10$) 指示。

脂肪酸	生育酚 (VitE)				
	α -生育酚	β -生育酚	γ -生育酚	δ -生育酚	生育酚 (VitE)
ARA (20:4n-6)	0.059	-0.151	-0.162	-0.167	-0.129
EPA (20:5n-3)	0.030	0.102	0.372*	0.488***	0.389*
DPA (22:5n-3)	0.080	-0.035	0.001	0.147	0.056
DHA (22:6n-3)	0.222	0.449***	0.319	0.543***	0.447***
总 n-3(>20C)	0.029	0.159	0.416***	0.566***	0.432***
总 n-6(<20C)	-0.082	-0.119	0.143	0.218	0.096

[0288] 本发明的技术方案

[0289] 1. 相对于对照植物增加植物生育酚含量的方法,包括在植物中表达至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸和至少一种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸。

[0290] 2. 根据技术方案1所述的方法,还包括在植物中表达至少一种编码 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸。

[0291] 3. 根据技术方案1或2所述的方法,还包含在植物中表达至少一种编码 Δ -5-延伸酶的多核苷酸。

[0292] 4. 根据技术方案1至3中任一项所述的方法,还包括在植物中表达至少一种编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸。

[0293] 5. 根据技术方案1至4中任一项所述的方法,其中表达至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸、至少两种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸、至少两种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸和任选地至少三种编码 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸,和至少一种编码 Δ -5-延伸酶的多核苷酸和至少两种编码 Δ -4-去饱和酶的多核苷酸。

[0294] 6. 根据技术方案1至5中任一项所述的方法,其中表达至少一种编码来自展叶剑叶藓的 Δ -6延伸酶的多核苷酸、至少一种编码来自假微型海链藻的 Δ -6延伸酶的多核苷酸、至少一种编码来自大豆疫霉的 Δ -12去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码来自托瑞蚝球藻的 Δ -6去饱和酶的多核苷酸和至少一种编码来自破囊壶菌属物种的 Δ -5去饱和酶的多核苷酸(尤其至少两种编码来自破囊壶菌属物种的 Δ -5去饱和酶的多核苷酸),和任选至少一种编码来自畸雌腐霉的 Ω -3去饱和酶的多核苷酸(尤其至少两种编码来自畸雌腐霉的 Ω -3去饱和酶的多核苷酸)、至少一种编码来自致病疫霉的 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码来自托瑞蚝球藻的 Δ -5延伸酶的多核苷酸、至少一种编码来自破囊壶菌属物种的 Δ -4去饱和酶的多核苷酸和至少一种编码来自路氏巴夫藻的 Δ -4去饱和酶的多核苷酸。

[0295] 7. 根据技术方案1至6中任一项所述的方法,其中多核苷酸是重组多核苷酸。

[0296] 8. 根据技术方案1至7中任一项所述的方法,其中多核苷酸存在于在植物基因组中稳定整合的一个T-DNA或构建体上。

[0297] 9. 根据技术方案1至8中任一项所述的方法,其中多核苷酸在植物种子中表达。

[0298] 10. 根据技术方案1至9中任一项所述的方法,其中如与对照植物种子中的生育酚含量相比,种子中的生育酚含量增加。

[0299] 11. 根据技术方案1至10中任一项所述的方法,其中生育酚含量是总生育酚含量、 α -生育酚含量、 β -生育酚含量、 γ 生育酚含量和/或 δ -生育酚含量,尤其其中生育酚含量是总生育酚含量、 γ 生育酚含量和/或 δ -生育酚含量。

[0300] 12. 根据技术方案1至11中任一项所述的方法,其中植物是油籽植物,尤其其中植物是十字花科(Brassicaceae)植物,优选是芸苔属(Brassica)植物并且最优选是下述物种的植物,所述物种包含甘蓝(Brassica oleracea)、黑芥(Brassica nigra)和芜菁(Brassica rapa)物种中一个或两个成员的基因组,因此所述物种优选包含欧洲油菜(Brassica napus)、埃塞俄比亚芥(Brassica carinata)、芥菜(Brassica juncea)、甘蓝、黑芥或芜菁物种中一个或两个成员的基因组。

[0301] 13. 根据技术方案1至12中任一项所述的方法,还包括选择具有增加的生育酚含量的植物的步骤。

[0302] 14. 根据技术方案1至13中任一项所述的方法,还包括从植物获得油的步骤,所述油具有增加的生育酚含量,其中所述油优选在维持油的生育酚含量的条件下获得。

[0303] 15. 构建体或T-DNA,包含至少一个 Δ -12-去饱和酶表达盒、至少一个 Δ -6-去饱

和酶表达盒、至少一个 Δ -6-延伸酶表达盒和至少一个 Δ -5-去饱和酶表达盒。

[0304] 16. 根据技术方案15所述的构建体或T-DNA, 还包含至少一个 Ω -3-去饱和酶表达盒、至少一个 Δ -5-延伸酶表达盒和/或至少一个 Δ -4-去饱和酶表达盒。

[0305] 17. 根据技术方案15或16所述的构建体或T-DNA, 其中所述构建体或T-DNA包含至少一个来自展叶剑叶藓的 Δ -6延伸酶的表达盒、至少一个来自大豆疫霉的 Δ -12去饱和酶的表达盒、至少一个来自托瑞蚝球藻的 Δ -6去饱和酶的表达盒、至少一个来自假微型海链藻的 Δ -6延伸酶的表达盒、至少一个来自破囊壶菌属物种的 Δ -5去饱和酶的表达盒(尤其至少两个表达盒), 和任选至少一个来自畸雌腐霉的 Ω -3去饱和酶的表达盒(尤其至少两个表达盒)、至少一个来自致病疫霉的 Ω -3-去饱和酶的表达盒、至少一个来自托瑞蚝球藻的 Δ -5延伸酶的表达盒、至少一个来自破囊壶菌属物种的 Δ -4去饱和酶的表达盒和至少一个来自路氏巴夫藻的 Δ -4去饱和酶的表达盒。

[0306] 18. i) 根据技术方案15至17中任一项所述的构建体或T-DNA的用途, 或ii) 至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸和至少一种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸的用途, 用于相对于对照植物增加植物的生育酚含量。

[0307] 19. 植物、植物部分或植物细胞, 用根据技术方案15至17中任一项所述的构建体或T-DNA转化。

[0308] 20. 植物或植物细胞, 包含至少一种编码 Δ -12-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码 Δ -6-延伸酶的多核苷酸和至少一种编码 Δ -5-去饱和酶的多核苷酸。

[0309] 21. 根据技术方案20所述的植物, 其中所述植物包含至少一种编码来自展叶剑叶藓的 Δ -6延伸酶的多核苷酸、至少一种编码来自假微型海链藻的 Δ -6延伸酶的多核苷酸、至少一种编码来自大豆疫霉的 Δ -12去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码来自托瑞蚝球藻的 Δ -6去饱和酶的多核苷酸和至少一种编码来自破囊壶菌属物种的 Δ -5去饱和酶的多核苷酸(尤其至少两种编码来自破囊壶菌属物种的 Δ -5去饱和酶的多核苷酸), 和任选至少一种编码来自畸雌腐霉的 Ω -3去饱和酶的多核苷酸(尤其至少两种编码来自畸雌腐霉的 Ω -3去饱和酶的多核苷酸)、至少一种编码来自致病疫霉的 Ω -3-去饱和酶的多核苷酸、至少一种编码来自托瑞蚝球藻的 Δ -5延伸酶的多核苷酸、至少一种编码来自破囊壶菌属物种的 Δ -4去饱和酶的多核苷酸和至少一种编码来自路氏巴夫藻的 Δ -4去饱和酶的多核苷酸。

[0310] 22. 根据技术方案19至21中任一项所述的植物, 其中所述多核苷酸包含相同的T-DNA。

[0311] 23. 根据技术方案19至22中任一项所述的植物, 其中所述植物是芸苔属植物。

[0312] 24. 芸苔属植物, 与对照植物相比, 其具有增加的生育酚含量, 尤其在种子中具有增加的生育酚含量。

[0313] 25. 根据技术方案19至24中任一项所述的植物的种子。

[0314] 26. 从根据技术方案25所述的种子可获得或获得的油, 其中所述油具有增加的生育酚含量。

[0315] 27. 产生植物油或生育酚的方法, 包括步骤:

- [0316] i) 培育根据技术方案18至24中任一项所述的植物,以获得其含油种子,
- [0317] ii) 收获所述种子,和
- [0318] iii) 从步骤ii)中收获的所述种子提取油。
- [0319] 28. 根据技术方案27所述的方法,还包括步骤iv):从步骤iii)中提取的油分离生育酚。