(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 666 895**

(51) Int. CI.:

C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12P 7/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/IB2014/059687**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14141098**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14713925 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2970926**

(54) Título: **Modificación genética de microorganismos**

(30) Prioridad:

13.03.2013 US 201361779257 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2018

(73) Titular/es:

DSM NUTRITIONAL PRODUCTS AG (100.0%)
Wurmisweg 576
4303 Kaiseraugst, CH

(72) Inventor/es:

SCAIFE, MARK A. y
ARMENTA, ROBERTO E.

(74) Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modificación genética de microorganismos

Antecedentes

Se ha reconocido durante mucho tiempo que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) tienen efectos beneficiosos en la salud. La fuente primaria para complementos nutricionales es aceite de especies de pescado que tienen altas concentraciones de AGPI, tales como anchoa, sardina, salmón, lacha, arenque y atún. Sin embargo, la falta de fiabilidad de las fuentes y variabilidad en la calidad y/o cantidad de AGPI aislados de peces significan que sigue existiendo la necesidad de fuentes alternativas de AGPI.

Los traustoquítridos son microorganismos acuáticos, eucariotas, con la capacidad de producir productos útiles, incluyendo AGPI y antioxidantes (Carmona et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(4): 884-888, 2003). Estos organismos se encuentran en todo el mundo en los océanos y estuarios. Los traustoquítridos son capaces de usar una amplia serie de fuentes de carbono y nitrógeno para crecimiento, lo que indica un potencial para cultivo industrial con nutrientes económicos.

Resumen de la invención

La presente divulgación abarca composiciones, como se definen en las reivindicaciones, métodos y kits para proporcionar fuentes de AGPI y otros compuestos y agentes útiles. La presente divulgación abarca el reconocimiento de que los traustoquítridos alterados genéticamente, bien por mutagénesis clásica o de otro modo, pueden proporcionar fuentes útiles de AGPI y otros compuestos y agentes.

La presente divulgación proporciona sistemas para modificar por ingeniería genética traustoquítridos, así como traustoquítridos modificados por ingeniería genética que encuentran diversos usos (por ejemplo, producción de AGPI y/o producción de biocombustible).

Se proporcionan en el presente documento moléculas de ácido nucleico aisladas como se definen en las reivindicaciones incluyendo un gen o elemento génico de traustoquítrido o *Thraustochytrium*, tal como un promotor de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Los promotores ejemplares en moléculas de ácido nucleico aisladas proporcionadas incluyen, un promotor de Δ12 desaturasa (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad de secuencia con SEQ ID NO:69), y un promotor de Δ5 desaturasa (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad de secuencia con SEQ ID NO:71). Opcionalmente, la molécula de ácido nucleico aislada es una secuencia de Δ12 desaturasa que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad de secuencia con SEQ ID NO:70.

También se proporcionan moléculas polipeptídicas aisladas que tienen secuencias de aminoácidos codificadas en elementos génicos de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Opcionalmente, el polipéptido aislado es Δ12 desaturasa. Opcionalmente, el polipéptido aislado es una Δ12 desaturasa codificada por una secuencia de ácido nucleico que tienen al menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad de secuencia con SEQ ID NO:70.

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que incluyen una secuencia heteróloga unida operativamente a un promotor génico de traustoquítrido o *Thraustochytrium* y un terminador génico de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Opcionalmente, la secuencia heteróloga codifica un polipéptido. Opcionalmente, las moléculas de ácido nucleico aisladas proporcionadas incluyen además un gen de resistencia a zeocina.

Por lo tanto, Se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que incluyen un gen de traustoquítrido o *Thraustochytrium* unido operativamente a un promotor génico. Opcionalmente, el promotor génico es un promotor génico heterólogo. Opcionalmente, el promotor génico es un promotor génico heterólogo de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico aislada que comprende Δ5 elongasa de traustoquítrido o *Thraustochytrium*, Δ5 desaturasa o Δ4 desaturasa puede unirse operativamente a un promotor de Δ12 desaturasa de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Opcionalmente, el promotor génico es exógeno para el gen al que está unido operativamente. Opcionalmente, el promotor génico es endógeno para el gen al que está unido operativamente.

Se proporcionan células hospedadoras que incluyen uno o más ácidos nucleicos aislados proporcionados, ácidos nucleicos recombinantes o construcciones heterólogas como se describen en el presente documento. Opcionalmente, las células hospedadoras son microorganismos distintos de traustoquítrido o *Thraustochytrium*.

Se proporcionan métodos para mutar células de un microorganismo (por ejemplo, traustoquítrido o *Thraustochytrium*). Los métodos incluyen las etapas de cultivar células del microorganismo en un medio, comprendiendo el medio zeocina a una concentración a la que la zeocina destruye 60-80 % de las células y aislar

una subpoblación de células que sobreviven al cultivo, mutando de este modo células de un microorganismo. Se proporcionan además métodos para mutar células de un microorganismo (por ejemplo, traustoquítrido o *Thraustochytrium*) que incluyen las etapas de cultivar células del microorganismo en un medio, exponer las células a radiación ultravioleta o de microondas, o combinaciones de las mismas, de modo que se destruyen 60-80 % de las células, y aislar una subpoblación de células que sobreviven al cultivo, mutando de este modo células de un microorganismo. Opcionalmente, los métodos incluyen múltiples ciclos de mutación y aislamiento. La mutación puede dirigirse a genes específicos mediante recombinación homóloga, promotores inducibles, enfoques de inserción y atenuación, y otros medios moleculares en la técnica.

Se proporcionan células de traustoquítrido o *Thraustochytrium* que contienen una o más modificaciones para uno o más genes que codifican un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático implicado en la ruta biosintética de AGPI de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Opcionalmente, las modificaciones aumentan o reducen la producción de uno o más AGPI por la célula modificada en comparación con una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* de referencia cuando las células modificadas y de referencia se cultivan en condiciones comparables. Opcionalmente, el polipéptido enzimático o los complejos de polipéptido enzimático se seleccionan del grupo que consiste en ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS). Opcionalmente, los uno o más AGPI se seleccionan del grupo que consiste en ácido alfa linolénico («ALA»), ácido araquidónico («ARA»), ácido docosahexaenoico («DHA»), ácido docosapentaenoico («DPA»), ácido eicosapentaenoico («EPA»), ácido gamma-linolénico («GLA») y ácido linoleico («LA»). Opcionalmente, la enzima o los complejos enzimáticos se seleccionan del grupo que consiste en poliquétido AGPI sintasa (PKS), Δ9 desaturasa, elongasa y omega-3 desaturasa.

Se proporcionan métodos para transformar una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Los métodos incluyen las etapas de (a) proporcionar una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* competente; (b) suministrar un ácido nucleico recombinante en la célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* competente, en el que el ácido nucleico recombinante comprende un marcador seleccionable; y (c) cultivar la célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* competente en un medio de cultivo que contiene un agente de selección que reduce el crecimiento de células sin el marcador seleccionable. Opcionalmente, el marcador seleccionable es un gen de resistencia a antibióticos. Opcionalmente, el agente de selección es un antibiótico. Por ejemplo, el antibiótico puede ser zeocina. Opcionalmente, la zeocina está presente a una concentración mayor de 50 µg/ml (por ejemplo, aproximadamente 100-1000 µg/ml). Opcionalmente, la zeocina está presente a una concentración de aproximadamente 500 µg/ml. Opcionalmente, la cantidad de sal en el medio se reduce para evitar la degradación de la zeocina.

En los métodos proporcionados para transformar una célula de traustoquítrido o Thraustochytrium, el ácido nucleico recombinante incluye además un casete de expresión génica distinto del marcador seleccionable.

Opcionalmente, los métodos proporcionados para transformar una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* incluyen además una etapa de aislamiento de una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* competente que contiene el marcador seleccionable.

Opcionalmente, la etapa de suministro comprende suministro biolístico de partículas recubiertas con el ácido nucleico recombinante. Por ejemplo, pueden usarse partículas que comprenden oro, wolframio o partículas de perlas de vidrio en el suministro biolístico.

Opcionalmente, el medio de cultivo contiene un nivel de sal entre una concentración salina inferior y una concentración salina superior. Opcionalmente, la concentración inferior es aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 15, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20 g/l. Opcionalmente, la concentración salina superior es aproximadamente 20, aproximadamente 22, aproximadamente 25, aproximadamente 27, aproximadamente 30, aproximadamente 32, aproximadamente 35, aproximadamente 37, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65 o aproximadamente 70 g/l. Opcionalmente, la concentración salina es entre aproximadamente 3 g/l y aproximadamente 70 g/l; entre aproximadamente 5 g/l y aproximadamente 60 g/l; 10 g/l y aproximadamente 40 g/l de sal (por ejemplo, entre aproximadamente 15 g/l y aproximadamente 35 g/l de sal, o entre aproximadamente 18 g/l y aproximadamente 35 g/l de sal; o entre aproximadamente 9 g/l y aproximadamente 18 g/l). Opcionalmente, la sal es o comprende una sal seleccionada del grupo que consiste en sales de sodio (por ejemplo, sal marina, cloruro sódico, sal de mesa, sulfato sódico, etc), sales de potasio, y combinaciones de las mismas. Opcionalmente, la sal es o comprende una sal distinta de cloruro. Opcionalmente, la sal es o comprende una sal distinta de cloruro sódico.

Se proporcionan células de traustoquítrido o *Thraustochytrium* competentes para transformación genética.

Se proporcionan células de traustoquítrido o *Thraustochytrium* transformadas con un ácido nucleico recombinante.

Se proporcionan métodos para cultivar células de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Los métodos incluyen dejar crecer un cultivo que comprende células de traustoquítrido o *Thraustochytrium* en un primer conjunto de condiciones en las que la biomasa aumenta (y opcionalmente otras características también aumentan o disminuyen): desplazar el primer conjunto de condiciones de cultivo a un segundo conjunto de condiciones en el que la productividad aumenta, en el que el desplazamiento comprende uno o más de (a) reducir las concentraciones de oxígeno de una primera concentración de oxígeno a una segunda concentración de oxígeno; (b) aumentar la relación C:N de una primera relación C:N a una segunda relación C:N; (c) reducir la temperatura de una primera temperatura a una segunda temperatura; y combinaciones de los mismos.

Se proporcionan métodos para proporcionar un AGPI. Los métodos incluyen proporcionar una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* que está modificada en comparación con una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* de referencia porque la célula modificada contiene una o más modificaciones genéticas que aumentan la producción de uno o más AGPI por la célula modificada en comparación con la célula de referencia cuando las células modificadas y de referencia se cultivan en condiciones comparables; y cultivar la célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* modificada en condiciones y durante un tiempo suficientes para conseguir la producción del o los AGPI.

Opcionalmente, la etapa de aporte comprende proporcionar una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* que contiene al menos un promotor de traustoquítrido o *Thraustochytrium* modificado genéticamente.

Opcionalmente, la etapa de aporte comprende proporcionar una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* que contiene al menos un terminador de traustoquítrido o *Thraustochytrium* modificado genéticamente.

Opcionalmente, la etapa de aporte comprende proporcionar una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* que está modificada con respecto a una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* de referencia porque la célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* modificada contiene al menos un polipéptido heterólogo expresado. Opcionalmente, la al menos una proteína heteróloga se expresa a partir de un gen que está unido operativamente con un promotor de traustoquítrido o *Thraustochytrium* modificado genéticamente, un terminador de traustoquítrido o *Thraustochytrium* modificado genéticamente, o ambos. Opcionalmente, el al menos un polipéptido heterólogo comprende al menos un polipéptido de biosíntesis de AGPI heterólogo.

La modificación genética puede incluir al menos una mutación de nucleótidos que aumenta la expresión o actividad del polipéptido de biosíntesis de AGPI. Opcionalmente, el polipéptido de biosíntesis de AGPI cuya expresión o actividad aumenta es un polipéptido de producción de AGPI endógeno. Opcionalmente, el polipéptido de producción de AGPI cuya expresión o actividad aumenta es un polipéptido de biosíntesis de AGPI heterólogo.

Se proporcionan células de traustoquítrido o *Thraustochytrium* modificadas genéticamente que expresan un polipéptido de producción de AGPI heterólogo.

Se proporcionan células de traustoquítrido o *Thraustochytrium* que producen al menos un AGPI a un nivel al menos 36 % mayor que una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* no modificada genéticamente cuando las células modificadas genéticamente y no modificadas genéticamente se cultivan en condiciones comparables.

Se proporcionan composiciones que incluyen al menos un AGPI y uno o más componentes de una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* que contiene un gen de resistencia a antibióticos o es descendiente de una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* que contiene un gen de resistencia a antibióticos. Opcionalmente, el gen de resistencia a antibióticos es un gen de resistencia a zeocina.

Se proporcionan composiciones que incluyen al menos un AGPI y uno o más componentes de (a) una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* que se ha cultivado en o sobre un medio que comprende zeocina a una concentración a la que la zeocina destruye 60-80 % de las células, o (b) una descendencia de una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* que se ha cultivado en o sobre un medio que comprende zeocina a una concentración a la que la zeocina destruye 60-80 % de las células.

Se proporcionan polipéptidos de anticuerpo a uno o más de los polipéptidos aislados descritos en el presente documento. Opcionalmente, se proporcionan polipéptidos de anticuerpo a un polipéptido aislado que codifica una Δ12 desaturasa de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Opcionalmente, los polipéptidos de anticuerpo tienen constantes de afinidad de aproximadamente (K_A) de 10^9, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, o 10^4 M^{-1}. Opcionalmente, los anticuerpos tienen constantes de afinidad (K_A) en el intervalo de aproximadamente 10^{10}-10^9, 10^8-10^9, 10^7-10^8, 10^6-10^7, 10^5-10^6 o 10^4-10^5 M^{-1}. Opcionalmente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales, policlonales, monocatenarios o fragmentos de unión a antígeno.

Se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico aislada que incluye una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID

NO:7; (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que codifica un polipéptido, que tiene actividad Δ12 desaturasa; (c) una molécula de ácido nucleico que difiere de la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) en la secuencia codónica debido a la degeneración del código genético; (d) complementos de (a) o (b) o (c); y (e) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:70. Opcionalmente, la molécula de ácido nucleico aislada está unida operativamente a un promotor. Opcionalmente, el promotor es heterólogo para la molécula de ácido nucleico aislada. Opcionalmente, el ácido nucleico se obtiene de un microorganismo. Opcionalmente, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Schizochytrium, Oblongichytrium, Aurantiochytrium* y *Traustochytrium.* Opcionalmente, el microorganismo es ONC-T18.

Se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico aislada que incluye una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:72; (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ5 desaturasa; (c) una molécula de ácido nucleico que difiere de la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) en la secuencia codónica debido a la degeneración del código genético; (d) complementos de (a) o (b) o (c); y (e) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:72. Opcionalmente, la molécula de ácido nucleico está unida operativamente a un promotor. Opcionalmente, el promotor es heterólogo para la molécula de ácido nucleico aislada. Opcionalmente, el ácido nucleico se obtiene de un microorganismo. Opcionalmente, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Schizochytrium, Oblongichytrium, Aurantiochytrium* y *Traustochytrium.* Opcionalmente, el microorganismo es ONC-T18.

Se desvela una molécula de ácido nucleico aislada que incluye una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:69; (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que regula la transcripción de una Δ12 desaturasa; y (c) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:69. Opcionalmente, la molécula de ácido nucleico aislada está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la molécula de ácido nucleico está unida operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático con una actividad seleccionada del grupo que consiste en actividad desaturasa, actividad elongasa, actividad ácido graso sintasa y actividad poliquétido ácido graso poliinsaturado sintasa (PKS). Opcionalmente, la actividad es una actividad desaturasa. Opcionalmente, la actividad desaturasa es una actividad Δ5 desaturasa. Opcionalmente, el ácido nucleico se obtiene de un microorganismo. Opcionalmente, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Schizochytrium, Oblorrgichytrium, Aurantiochytrium* y *Traustochytrium.* Opcionalmente, el microorganismo es ONC-T18.

Se desvela en el presente documento una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:71; (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que regula la transcripción de una Δ5 desaturasa; y (c) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:71. Opcionalmente, la molécula de ácido nucleico aislada está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la molécula de ácido nucleico está unida operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático con una actividad seleccionada del grupo que consiste en actividad desaturasa, actividad elongasa, actividad ácido graso sintasa y actividad poliquétido ácido graso poliinsaturado sintasa (PKS). Opcionalmente, la actividad es una actividad desaturasa. Opcionalmente, la actividad desaturasa es una actividad Δ12 desaturasa. Opcionalmente, el ácido nucleico se obtiene de un microorganismo. Opcionalmente, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Schizochytrium, Oblongichytrium, Aurantiochytrium* y *Traustochytrium.* Opcionalmente, el microorganismo es ONC-T18.

Se desvelan polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 70 y 72.

Se desvelan vectores que comprenden todas o parte de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 69-72.

También se desvela un microorganismo modificado técnicamente, en el que el microorganismo expresa una secuencia de ácido nucleico heteróloga seleccionada del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:70; (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ12 desaturasa; (c) una molécula de ácido nucleico que difiere de la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) en la secuencia codónica debido a la degeneración del código genético; (d) complementos de (a) o (b) o (c): y (e) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:70. Opcionalmente, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en los géneros

Schizochytrium, Oblongichytrium, Aurantiochytrium y *Traustochytrium.* Opcionalmente, el microorganismo es ONC-T18. Opcionalmente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está unida operativamente a un promotor heterólogo. Opcionalmente, el promotor heterólogo es al menos 90 % idéntico a SEQ ID NO: 71. Opcionalmente, el promotor heterólogo se selecciona del grupo que consiste en promotores bacterianos, promotores de levadura, promotores víricos eucariotas o elementos promotores aislados de microalgas. Opcionalmente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está sobreexpresada. Opcionalmente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga se introduce en la célula por un vector de expresión. Opcionalmente, el vector de expresión se introduce en el microorganismo con al menos un polinucleótido heterólogo adicional que codifica un polipéptido enzimático o parte de un polipéptido enzimático implicado en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido heterólogo adicional codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS). Opcionalmente, el contenido graso total del microorganismo aumenta en al menos 10 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total del microorganismo aumenta en al menos 20 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total del microorganismo aumenta en al menos 50 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total del microorganismo aumenta en al menos 100 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 10 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 20 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 50 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 100 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga.

Se desvela un microorganismo modificado genéticamente, en el que el microorganismo expresa al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados unido operativamente a un promotor heterólogo seleccionado del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:69; (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que regula la transcripción de una Δ12 desaturasa; (c) una molécula de ácido nucleico que difiere de la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) en la secuencia codónica debido a la degeneración del código genético; y (d) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:69. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados es endógeno para el microorganismo. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados endógeno está unido operativamente al promotor heterólogo por recombinación homóloga. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados es exógeno para el microorganismo. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS). Opcionalmente, el microorganismo modificado genéticamente sobreexpresa una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:70; (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ12 desaturasa; (c) una molécula de ácido nucleico que difiere de la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) en la secuencia codónica debido a la degeneración del código genético; (d) complementos de (a) o (b) o (c); y (e) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:70.

Se desvelan métodos para producir ácidos grasos poliinsaturados. Los métodos incluyen proporcionar una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* modificada genéticamente, en la que la célula modificada genéticamente expresa una secuencia de ácido nucleico heteróloga seleccionada del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:70, (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ12 desaturasa, (c) una molécula de ácido nucleico que difiere de la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) en la secuencia codónica debido a la degeneración del código genético; y (d) complementos de (a) o (b) o (c); y (e) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:70, en el que la expresión heteróloga cambia la producción de uno o más ácidos grasos poliinsaturados por la célula modificada genéticamente en comparación con una célula de referencia cuando las células modificadas genéticamente y de referencia se cultivan en condiciones comparables; y cultivar la célula modificada genéticamente en condiciones y durante un tiempo suficientes para conseguir la producción del o los

ácidos grasos poliinsaturados. Opcionalmente, el o los ácidos grasos poliinsaturados se seleccionan del grupo que consiste en ácido alfa linolénico, ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido gamma-linolénico, ácido linoleico y/o ácido linolénico. Opcionalmente, los métodos comprenden además expresar al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS). Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 10 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 20 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 50 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 100 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la molécula de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 10 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la molécula de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 20 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la molécula de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 50 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la molécula de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 100 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la molécula de ácido nucleico heteróloga está sobreexpresada.

También se desvela un método para producir ácidos grasos poliinsaturados que incluye proporcionar una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* modificada genéticamente, en el que la célula modificada genéticamente expresa al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados unido operativamente a un promotor heterólogo seleccionado del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:69, (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que regula la transcripción de una Δ12 desaturasa, (c) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:69, en el que la unión operativa del promotor heterólogo con al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados cambia la producción de uno o más ácidos grasos poliinsaturados por la célula modificada genéticamente en comparación con una célula de referencia cuando las células modificadas genéticamente y de referencia se cultivan en condiciones comparables; y cultivar la célula modificada genéticamente en condiciones y durante un tiempo suficientes para conseguir la producción del o los ácidos grasos poliinsaturados. Opcionalmente, el o los ácidos grasos poliinsaturados se seleccionan del grupo que consiste en ácido alfa linolénico, ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido gamma-linoleico, ácido linoleico y/o ácido linolénico. Opcionalmente, los métodos comprenden además expresar al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS). Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 10 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 20 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 50 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 100 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la molécula de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 10 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la molécula de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 20 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la molécula de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 50 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la molécula de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 100 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático está sobreexpresado. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso sintasa (FΔS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS).

Se desvelan en el presente documento composiciones de ácidos grasos poliinsaturados producidas por los métodos

desvelados en el presente documento.

Se desvela un microorganismo modificado genéticamente, en el que el microorganismo expresa una secuencia de ácido nucleico heteróloga seleccionada del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:72; (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ5 desaturasa; (c) una molécula de ácido nucleico que difiere de la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) en la secuencia codónica debido a la degeneración del código genético; y (d) complementos de (a) o (b) o (c); y (e) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:72. Opcionalmente, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Schizochytrium*, *Oblongichytrium*, *Aurantiochytrium* y *Traustochytrium*. Opcionalmente, el microorganismo es ONC-T18. Opcionalmente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está unida operativamente a un promotor heterólogo. El promotor heterólogo puede ser al menos 90 % idéntico a SEQ ID NO: 71. Opcionalmente, el promotor heterólogo se selecciona del grupo que consiste en promotores bacterianos, promotores de levadura, promotores víricos eucariotas o elementos promotores aislados de microalgas. Opcionalmente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está sobreexpresada. Opcionalmente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga se introduce en la célula por un vector de expresión. Opcionalmente, el vector de expresión se introduce en el microorganismo con al menos un polinucleótido heterólogo adicional que codifica un polipéptido enzimático o parte de un polipéptido enzimático implicado en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido heterólogo adicional codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS). Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 10 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 20 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 50 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, el contenido graso total de la célula aumenta en al menos 100 % en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 10 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 20 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 50 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 100 % en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga.

Se desvela un microorganismo modificado genéticamente, en el que el microorganismo expresa al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados unido operativamente a un promotor heterólogo seleccionado del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:71; (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que regula la transcripción de una Δ5 desaturasa; (c) una molécula de ácido nucleico que difiere de la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) en la secuencia codónica debido a la degeneración del código genético; y (d) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:71. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados es endógeno para el microorganismo. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados endógeno está unido operativamente al promotor heterólogo por recombinación homóloga. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados es exógeno para el microorganismo. Opcionalmente, el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS). Opcionalmente, el microorganismo modificado genéticamente sobreexpresa una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEQ ID NO:70; (b) un complemento de dicho ácido nucleico de (a) que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ12 desaturasa; (c) una molécula de ácido nucleico que difiere de la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) en la secuencia codónica debido a la degeneración del código genético; y (d) complementos de (a) o (b) o (c); y (e) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:70.

Se exponen detalles de una o más realizaciones en los dibujos adjuntos y la descripción posterior. Otros elementos, objetos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra una representación de las rutas biosintéticas de AGPI en *Thraustochytrium sp.* ONC-T18 («ONC-T18», n.º de referencia de la ATCC: PTA-6245; Solicitud de patente internacional n.º PCT/IB2006/003977. AGS, ácido graso sintasa; EL, elongasa; Δ12, Δ12 desaturasa; Δ9, Δ9 desaturasa; Δ8, Δ8 desaturasa; Δ6, Δ6 desaturasa; Δ5, Δ5 desaturasa; Δ4, Δ4 desaturasa; ω3, omega-3 desaturasa; C14:0, ácido mirístico; C16:0, ácido palmítico; C16: ln-7, ácido palmitoleico; C18:0, ácido esteárico; C18:ln-7, ácido cis-vaccénico; C18:ln-9, ácido oleico; C18:2n-6 (LA), ácido linoleico; C18:3n-3 (ALA), ácido α-linolénico; C18:3n-6 (GLA), ácido y-linolénico; C18:4n-3 (STA), ácido estearidónico; C20:2n-6 (EDA), ácido eicosadienoico; C20:3n-6 (DGLA), ácido dihomo-γ-linolénico; C20:4n-3 (ETA), ácido eicosatetraenoico; C20:3n-3 (ETE), ácido eicosatetraenoico; C20:4n-6 (ARA), ácido araquidónico; C20:5n-3 (EPA), ácido eicosapentaenoico; C22:4n-6 (DTA), ácido docosatetraenoico; C22:5n-3 (DPA), ácido docosapentaenoico; C22:5n-6, ácido docosapentaenoico; C22:6n-3 (DHA), ácido docosahexaenoico; y PKS, poliquétido AGPI sintasa. n-6 indica la ruta biosintética de AGPI omega-6 y n-3 indica la ruta biosintética de AGPI omega-3.

La Fig. 2 es una representación esquemática de la generación del vector de expresión génica pd4DPZ 1.

La Fig. 3 es una representación esquemática de la generación del vector de expresión génica pd5EPZ1.

La Fig. 4 es una representación esquemática de la generación del vector de expresión génica pd5EPrsGFP1 así como las construcciones del plásmido intermedio producido por los procesos.

La Fig. 5 es una ilustración esquemática de la generación del vector de expresión génica p341PZ40T.

La Fig. 6 es una ilustración esquemática de la generación del vector de expresión génica p341PZ347T.

La Fig. 7 es una ilustración esquemática de la generación del vector de expresión génica p341PZ713T.

La Fig. 8 es una ilustración esquemática de la generación del vector de expresión génica p701PZ40T.

La Fig. 9 es una ilustración esquemática de la generación del vector de expresión génica p341PsmRsGFP40T.

La Fig. 10 es una ilustración esquemática de la generación del vector de expresión génica pD4DPZ18S así como las construcciones del plásmido intermedio producido por los procesos.

La Fig. 11 es una representación esquemática de la generación del vector de expresión génica p341PZ5EpEx así como las construcciones de los plásmidos intermedios producidos por los procesos.

La Fig. 12 ilustra efectos del antibiótico zeocina en el crecimiento y los números de colonias de ONC-T18 a diversas salinidades en las placas del medio de cultivo ONC-T18-GM0. Los resultados indican que ONC-T18 creció más rápido y produjo más colonias con mayor salinidad (por ejemplo 35 g/l de sal marina artificial) en medio ONC-T18-GM0 que con menor salinidad (por ejemplo, 8,5 g/l de sal marina artificial). A la mediana de la salinidad (por ejemplo, 18 g/l de sal marina artificial), zeocina, a la concentración de 30 µg/ml, podría inhibir completamente el crecimiento de ONC-T18 en placas de agar de ONC-T18-GM0.

La Fig. 13 ilustra la detección del transgén del gen de resistencia a zeocina en las cepas resistentes a zeocina transformadas. Los fragmentos de ADN específicos del gen de zeocina se amplificaron a partir del ADN genómico de cada cepa transformante con técnica de PCR usando cebadores específicos del gen resistente a zeocina.

Las Fig. 14A y 14B ilustran las tasas de crecimiento de cepas derivadas de células individuales transformadas. Se seleccionaron inóculos de cepas resistentes a zeocina que se habían transferido tres veces en placas de agar de zeocina ONC-T18-GM0 de cada colonia usando una punta de pipeta de 10 µl y se resuspendieron en 50 µl de agua esterilizada en un tubo de PCR de 200 µl. Se aplicó puntualmente un µl de la suspensión celular en placas de agar de ONC-T18-GM0 (15 g/l de agar) que contenían 18 g/l o 35 g/l de sal marina. Los diámetros de las colonias aplicadas puntualmente se midieron el día 1, día 3, día 5, día 7 y día 9 después de la inoculación.

La Fig. 15 ilustra las tasas de cultivo de las cepas de ONC-T18 de tipo silvestre y diversas transformadas en las placas de agar del medio de cultivo (ONC-T18-GM0) que contienen zeocina a concentraciones de 0 µg/ml a 5000 µg/ml. Un µl de las suspensiones celulares se aplicó puntualmente en las placas de agar de ONC-T18-GM0 y los diámetros de las colonias se midieron diariamente.

La Fig. 16 ilustra la productividad de biomasa de las cepas de ONC-T18 de tipo silvestre y diversas transformadas en medio de cultivo líquido (ONC-T18-GM0) que contiene sal marina artificial a la concentración de 18 g/l o 35 g/l. Los resultados muestran que a la menor salinidad, todas las cepas ensayadas produjeron más biomasa que a una mayor salinidad.

Las Fig. 17A, 17b, 17C y 17D ilustran los perfiles de ácidos grasos y productividades de lípidos totales de las cepas transformadas que crecieron en ONC-T18-GM0 líquido que tenía diversas salinidades.

Esta figura ilustra la estabilidad del transgén *ble* en cepas de ONC-T18 transformadas.

La Fig. 18 muestra una comparación de cepas de ONC-T18 de tipo silvestre y transformadas en placas de agar con o sin zeocina.

Definiciones

Afinidad: Como se conoce en la técnica, la «afinidad» es una medida de la firmeza con la que un ligando particular (por ejemplo anticuerpo) se une a (por ejemplo se asocia de forma no covalente con) y/o la velocidad o frecuencia con la que se disocia de, su compañero. Como se conoce en la técnica, puede utilizarse cualquiera de una diversidad de tecnologías para determinar la afinidad. La afinidad puede usarse para representar una medida de unión específica.

Anticuerpo: Tal como se usa en el presente documento, el término «anticuerpo» se refiere a un polipéptido que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como múltiples genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican típicamente como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican típicamente como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena «ligera» (aproximadamente 25 kD) y una «pesada» (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Las expresiones «cadena ligera variable» (VL) y «cadena pesada variable» (VH) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas respectivamente. Un anticuerpo puede ser específico para un antígeno particular. El anticuerpo o su antígeno puede ser un analito o un compañero de unión. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo debajo de los enlaces de disulfuro en la región bisagra para producir F(ab)'2, un dímero de Fab que es en sí mismo una cadena ligera unida a VH-CHI por un enlace disulfuro. El F(ab)'2 puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra convirtiendo de este modo el dímero (Fab')2 en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Aunque diversos fragmentos de anticuerpo se definen con respecto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto habitual en la materia apreciará que dichos fragmentos Fab' pueden sintetizarse de novo químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término «anticuerpo», como se usa en el presente documento también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante.

Aproximadamente: Tal como se usa en el presente documento, la expresión «aproximadamente» o «alrededor de», como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. La expresión «aproximadamente» o «alrededor de» se refiere a un intervalo de valores que quedan, como ejemplo, dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor de o menor de) del valor de referencia indicado a no ser que se indique de otro modo o sea evidente de otro modo a partir del contexto (excepto cuando dicho número supere 100 % de un valor posible).

Competente: El término «competente», tal como se usa en el presente documento en referencia a una célula, se refiere a la capacidad de la célula para captar material genético extracelular. Una célula puede ser competente de forma natural y/o inducirse de forma artificial (por ejemplo, en un laboratorio) para que sea competente. Las células competentes son capaces de captar material genético extracelular cuando el material genético extracelular se introduce por un método particular, por ejemplo, un método particular de transformación. Por ejemplo, una célula puede ser competente para un método de transformación, pero no para otro. Como alternativa o adicionalmente, una célula puede ser competente para más de un método de transformación. Pueden obtenerse células competentes de cualquiera de una diversidad de fuentes. Por ejemplo, pueden aislarse de la naturaleza, prepararse en el laboratorio y/u obtenerse comercialmente. La competencia de una célula puede ser transitoria o permanente.

Componente: El término «componente», cuando se usa en el presente documento en referencia a una célula, significa cualquier parte de una célula, tal como una estructura, parte de una estructura, complejo macromolecular y/o molécula contenida en la célula, incluyendo, pero sin limitación, membranas celulares, paredes celulares, núcleos celulares, citosol, material genético (por ejemplo, cromosomas), orgánulos celulares o cualquier parte de o biomolécula contenida en cualquiera de los componentes anteriormente mencionados. Los orgánulos contenidos típicamente en una célula pueden diferir dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, algunos orgánulos están presentes solamente en células eucariotas. Algunos orgánulos están solamente presentes en células vegetales y algunos están solamente presentes en células animales. Son ejemplos no limitantes de tipo se orgánulos son núcleos celulares, mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, lisosomas, vacuolas, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, ribosomas y centrosomas. Los ejemplos no limitantes de biomoléculas contenidas en una célula incluyen, pero sin limitación, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y/o ARN, polipéptidos (por ejemplo, proteínas), complejos nucleoproteicos, lípidos y fosfolípidos. Algunas células pueden contener material genético exógeno (por ejemplo, material que se ha introducido en la célula por la mano del hombre). Dicho material exógeno se incluye en esta definición. Algunas células pueden tener componentes extracelulares tales como cápsulas extracelulares, flagelos o fimbrias (pelos). Estos componentes extracelulares también se incluyen en esta definición.

Expresión simultánea: Tal como se usa en el presente documento, la expresión «expresión simultánea» o «combinada» se refiere a casos en los que dos o más polinucleótidos de biosíntesis de AGPI que codifican un polipéptido enzimático de biosíntesis de AGPI o parte de un complejo de polipéptido enzimático (por ejemplo, una Δ12 desaturasa y una Δ5 elongasa) se expresan juntos durante un intervalo temporal en no menos que cantidades mínimas, es decir, los polipéptidos que codifican están presentes juntos en cantidades no insignificantes. El intervalo

temporal puede ser minutos (por ejemplo, al menos 1 minuto, 1 -30 minutos, 30-60 minutos), horas (por ejemplo, al menos 1 hora, 1-2 horas, 2-6 horas, 6-12 horas, 12-24 horas), días (por ejemplo, al menos 1 día, 1-2 días, 2-4 días, 4-7 días, etc.), semanas (por ejemplo, al menos 1, 2 o 3 semanas), etc. En consecuencia, los dos o más polinucleótidos de biosíntesis de AGPI pueden, aunque no es necesario, administrarse simultáneamente o juntos como parte de un único casete de expresión (es decir, conducidos por el mismo promotor) o transformarse simultáneamente en una célula hospedadora en uno o más plásmidos. Además, los dos o más polinucleótidos de biosíntesis de AGPI pueden, aunque no es necesario, transformarse secuencialmente en células hospedadoras en un corto intervalo entre sí (por ejemplo, menos de 1 hora, menos de 30 minutos, menos de 10 minutos, aproximadamente 5 minutos de separación). Los dos o más polinucleótidos de biosíntesis de AGPI pueden administrarse dentro de intervalos temporales tales para considerarse administrados sustancialmente al mismo tiempo. Cuando se administran simultáneamente, las cantidades eficaces de los polipéptidos enzimáticos o parte de un complejo de polipéptido enzimático codificado por los dos o más polinucleótidos de biosíntesis de AGPI necesarias para inducir una respuesta biológica particular pueden ser menores que la concentración eficaz de cada uno cuando los polinucleótidos se administren solos. Los efectos de múltiples polinucleótidos de biosíntesis de AGPI pueden ser, aunque no es necesario, aditivos o sinérgicos. Los polinucleótidos de biosíntesis de AGPI pueden transformarse múltiples veces.

Expresión coordinada: La expresión «expresión coordinada», tal como se usa en el presente documento, se refiere a la expresión de al menos dos polinucleótidos de biosíntesis de AGPI que codifican un polipéptido enzimático de biosíntesis de AGPI o parte de un complejo de polipéptido enzimático (por ejemplo, una Δ12 desaturasa y una Δ5 elongasa) que se modifica genéticamente de modo que los polinucleótidos se expresan de forma simultánea, sustancialmente en el mismo momento, o progresivamente de modo que la expresión de un polinucleótido de biosíntesis de AGPI siga a otra en una manera temporal. Puede conseguirse expresión coordinada uniendo operativamente al menos dos polinucleótidos de biosíntesis de AGPI a la misma secuencia reguladora o el mismo promotor. Por ejemplo, el mismo promotor exógeno puede usarse para expresar al menos dos secuencias polinucleotídicas diferentes, o un promotor endógeno que controla de forma natural la expresión de un gen de biosíntesis de AGPI se une operativamente para controlar la expresión de otro gen de biosíntesis de AGPI. Como ejemplo, un promotor de Δ12 desaturasa se une operativamente con un polinucleótido (exógeno o endógeno) que codifica una Δ5 desaturasa, de modo que una célula hospedadora expresa de forma endógena su Δ12 desaturasa y expresa de forma heteróloga Δ5 desaturasa al mismo tiempo. Puede conseguirse expresión coordinada mediante sistemas promotores inducibles. La expresión coordinada también incluye sistemas modificados genéticamente en los que un aumento en la expresión de al menos un primer polinucleótido de biosíntesis de AGPI se combina con una reducción en la expresión de al menos un segundo polinucleótido de biosíntesis de AGPI. Puede producirse simultáneamente una reducción coordinada en la expresión, sustancialmente en el mismo momento, o progresivamente de modo que la reducción siga a la expresión aumentada de otro polinucleótido en una manera temporal.

Modificado genéticamente: En general, la expresión «modificado genéticamente» se refiere al aspecto de haber sido manipulado por la mano del hombre. Por ejemplo, un polinucleótido se considera «modificado genéticamente» cuando dos o más secuencias que no se unen entre sí en ese orden en la naturaleza son manipuladas por la mano del hombre para que se unan directamente entre sí en el polinucleótido modificado genéticamente. Por ejemplo, un polinucleótido modificado genéticamente puede incluir una secuencia reguladora que se encuentra en la naturaleza en asociación operativa con una primera secuencia codificante pero no en asociación operativa con una segunda secuencia codificante que es unida por la mano del hombre de modo que se asocie operativamente con la segunda secuencia codificante. Como ejemplo, un promotor de Δ4 o Δ5 desaturasa de *Thraustochytrium* se une con un ácido nucleico que codifica un polipéptido distinto de un polipéptido de Δ4 o Δ5 desaturasa *Thraustochytrium*. Comparablemente, se considera que una célula o un organismo se ha «modificado genéticamente» si se ha manipulado de modo que se altere su información genética (por ejemplo, se ha introducido nuevo material genético no presente previamente, por ejemplo por transformación, apareamiento, hibridación somática u otro mecanismo, o se altera o elimina material genético previamente presente, por ejemplo por mutación de sustitución o supresión, o por protocolos de apareamiento). Como ejemplo, se introduce un gen de Δ12 desaturasa de *Thraustochytrium* y se expresa en una célula hospedadora. Como es práctica habitual y entienden los expertos en la materia, la descendencia de un polinucleótido o una célula modificados genéticamente se denominan aún típicamente «modificados genéticamente» incluso aunque la manipulación real se realizó en una entidad previa.

Endógeno: El término «endógeno», tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es nativa de la célula hospedadora.

Exógeno: El término «exógeno», tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de ácido nucleico que no es nativa, es decir, de un organismo diferente, en una célula hospedadora.

Modificación genética: La expresión «modificación genética», tal como se usa en el presente documento, se refiere a la manipulación por la mano del hombre mediante el uso de ingeniería genética. La expresión «modificaciones genéticas» abarca cualquier tipo de cambio al material genético de una célula, incluyendo cambios a la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ADN o ARN) del material genético de la célula y modificaciones químicas al material

genético de la célula (por ejemplo, modificaciones tales como metilación que pueden afectar a la expresión de un locus genético). Se dice que las células o los organismos que se manipulan de dicha manera están «modificados genéticamente» o son «transgénicos». Por ejemplo, la expresión «célula transgénica», tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula cuyo ADN contiene un ácido nucleico exógeno no presente originalmente en la célula no transgénica. Una célula transgénica puede obtenerse o regenerarse a partir de una célula transformada y obtenerse de una célula transgénica. Las células transgénicas ejemplares incluyen, pero sin limitación, células transgénicas de traustoquítrido o *Thraustochytrium* y células transgénicas que no son de traustoquítrido o de *Thraustochytrium* que se han modificado genéticamente para expresar una o más secuencias polinucleotídicas de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Las células transgénicas típicamente expresan secuencias de ADN que confieren a las células características diferentes de las de células nativas, no transgénicas, de la misma cepa. La descendencia de células transgénicas también se considera típicamente trasgénica.

Heterólogo: El término «heterólogo», tal como se usa en el presente documento para hacer referencia a ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos que incluyen secuencias y/o genes reguladores) o polipéptidos, se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que se introduce artificialmente en una célula y/o no aparece de forma natural en la célula en la que está presente. Un ácido nucleico heterólogo puede tener una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la de un ácido nucleico presente de forma natural en la célula. Por ejemplo, una célula hospedadora de traustoquítrido se modifica genéticamente para incluir un ácido nucleico que tenga una secuencia reguladora de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. En un ejemplo particular, una secuencia reguladora endógena de traustoquítrido o *Thraustochytrium* se une operativamente a un gen con el que no está implicada la secuencia reguladora en condiciones naturales. Aunque la secuencia reguladora de traustoquítrido o *Thraustochytrium* puede aparecer de forma natural en la célula hospedadora, el ácido nucleico introducido es heterólogo de acuerdo con la presente divulgación. Un ácido nucleico heterólogo puede tener una secuencia de nucleótidos que es diferente de la de cualquier ácido nucleico que esté presente de forma natural en la célula. Un ácido nucleico que es heterólogo de una célula particular tiene una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la de un ácido nucleico que se encuentra de forma natural en un organismo fuente que es diferente de la célula en la que se introduce el ácido nucleico heterólogo. «Heterólogo», tal como se usa en el presente documento, también puede referirse a un gen, proteína, polinucleótido o polipéptido que aparece de forma natural en la célula hospedadora pero se provoca que se exprese en condiciones o en momentos (por ejemplo, condiciones de crecimiento, estadio del desarrollo, estadio del ciclo celular, etc.) durante los que el gen, proteína, polinucleótido o polipéptido no se expresa normalmente. Igualmente, «heterólogo», tal como se usa en el presente documento, también puede referirse a la regulación negativa o inhibición de la expresión de un gen, proteína, polinucleótido o polipéptido en momentos o en condiciones durante los que el gen, proteína, polinucleótido o polipéptido se expresa normalmente.

Célula hospedadora: Tal como se usa en el presente documento, la «célula hospedadora» es una célula que se manipula de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, una célula hospedadora se manipula de modo que su producción de uno o más AGPI aumente (por ejemplo, mediante modificación de aumento de AGPI). Una «célula hospedadora modificada», tal como se usa en el presente documento, es cualquier célula hospedadora que se haya modificado, obtenido genéticamente o manipulado de acuerdo con la presente divulgación en comparación con una célula parental por lo demás idéntica y/o en comparación con una célula de referencia particular (por ejemplo, una célula de tipo silvestre). La célula hospedadora modificada tiene al menos una (y opcionalmente más de una) modificación que da como resultado un aumento de la producción de AGPI u otros materiales celulares (por ejemplo, al menos una modificación de aumento de AGPI) por la célula hospedadora modificada en comparación con la célula parental o de referencia.

Introducir: Se pretende que el término «introducir», tal como se usa en el presente documento en referencia a la introducción de un ácido nucleico en una célula u organismo tenga su significado más amplio y abarque la introducción, por ejemplo por métodos de transformación (por ejemplo, transformación mediada por cloruro cálcico, electroporación, bombardeo de partículas) y también introducción por otros métodos incluyendo transducción, conjugación y apareamiento. Opcionalmente, un vector se utiliza para introducir un ácido nucleico en una célula u organismo.

Aislado: El término «aislado», tal como se usa en el presente documento, significa sustancialmente separado o purificado con respecto a secuencias o polipéptidos en la célula u organismo en el que el ácido nucleico está presente de forma natural e incluye ácidos nucleicos purificados por técnicas de purificación convencionales así como ácidos nucleicos preparados por técnicas recombinantes o síntesis química. El término incluye moléculas de ADNc derivadas de los ácidos nucleicos aislados y otros ácidos nucleicos producidos artificialmente derivados de los ácidos nucleicos aislados, o partes de los mismos, que codifican sustancialmente la misma información genética que los ácidos nucleicos aislados. La expresión «sustancialmente la misma información genética» se refiere a secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 80 % de identidad de secuencia con los ácidos nucleicos descritos en el presente documento y/o son variantes sustituidas de forma conservativa de los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento.

Microalgas: Se reconoce en el campo que las microalgas representan un grupo diverso de organismos. Para el fin de este documento, el término microalgas se usará para describir organismos unicelulares derivados de ambientes

acuáticos y/o terrestres (algunas cianobacterias son terrestres/habitan en el suelo). Los ambientes acuáticos se extienden desde ambientes oceánicos a lagos y ríos de agua dulce, y también incluyen ambientes salobres tales como estuarios y desembocaduras de ríos. Las microalgas pueden ser fotosintéticas; opcionalmente, las microalgas son heterótrofas. Las microalgas pueden ser de naturaleza eucariota o de naturaleza procariota. Las microalgas pueden ser inmóviles o móviles.

Unido operativamente: Las expresiones «unido operativamente» o «acoplado operativamente», que pueden usarse indistintamente, tal como se usan en el presente documento, se refieren a una relación entre dos secuencias de ácido nucleico en las que la expresión de una de las secuencias de ácido nucleico está controlada por, regulada por o modulada por la otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que está unida operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico está unida covalentemente, bien directa o bien indirectamente, a dicha segunda secuencia, aunque cualquier asociación tridimensional eficaz es aceptable. Una única secuencia de ácido nucleico puede unirse operativamente a múltiples otras secuencias. Por ejemplo, un único promotor puede dirigir la transcripción de múltiples especies de ARN.

Polipéptido: El término «polipéptido», tal como se usa en el presente documento, en general tiene su significado reconocido en la técnica de un polímero de al menos tres aminoácidos. Sin embargo, el término también se usa para hacer referencia a clases funcionales específicas de polipéptidos, tales como, por ejemplo, desaturasas, elongasas, etc. Para cada una de dichas clases, la presente divulgación proporciona varios ejemplos de secuencias conocidas de dichos polipéptidos. Los expertos habituales en la materia apreciarán, sin embargo, que se pretende que el término «polipéptido» sea suficientemente general para abarcar no solamente polipéptidos que tengan la secuencia completa enumerada en el presente documento (o en una referencia o base de datos mencionada específicamente en el presente documento), sino también para abarcar polipéptidos que representen fragmentos funcionales (es decir, fragmentos que conservan al menos una actividad) de dichos polipéptidos completos. Además, los expertos en la materia entienden que las secuencias proteicas toleran en general algo de sustitución sin destruir la actividad. Por lo tanto, cualquier polipéptido que conserve la actividad y comparta al menos aproximadamente 30-40 % de identidad de secuencia general, con frecuencia más de aproximadamente 50 %, 60 %, 70 % u 80 %, e incluyendo habitualmente además al menos una región de mucha mayor identidad, con frecuencia más del 90 % o incluso 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % en una o más regiones altamente conservadas, que abarcan habitualmente al menos 3-4 y con frecuencia hasta 20 o más aminoácidos, con otro polipéptido de la misma clase, está abarcado dentro del término relevante «polipéptido» como se usa en el presente documento. Los expertos en la materia pueden determinar otras regiones de similitud y/o identidad por análisis de las secuencias de diversos polipéptidos descritos en el presente documento. Como conocen los expertos en la técnica, se conocen una diversidad de estrategias, y están disponibles herramientas, para realizar comparaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos para evaluar grados de identidad y/o similitud. Estas estrategias incluyen, por ejemplo, alineamiento manual, alineamiento de secuencias asistido por ordenador y combinaciones de los mismos. Están ampliamente disponibles varios algoritmos (que se implementan en general por ordenador) para realizar alineamiento de secuencias, o pueden ser producidos por un experto en la materia. Los algoritmos representativos incluyen, por ejemplo, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1081, 2: 482); el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 1970, 48: 443); el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1988, 85: 2444); y/o por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.). Los programas informáticos fácilmente disponibles que incorporan dichos algoritmos incluyen, por ejemplo, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST, PILEUP, CLUSTALW, etc. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse parámetros por defecto de los programas respectivos. Como alternativa, el practicante puede usar parámetros distintos de los por defecto dependiendo de sus requisitos experimentales y/u otros requisitos (véase por ejemplo, el sitio web que tiene la URL www.ncbi..nlm..nih.gov).

Ruta biosintética de AGPI: Una «ruta biosintética de AGPI» es una ruta biosintética que produce AGPI y/o precursores de AGPI.

Gen de biosíntesis de AGPI: La expresión «gen de biosíntesis de AGPI» o «gen de biosíntesis de ácido graso poliinsaturado», tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido o ácido nucleico de ADN o ARN que codifica uno o más polipéptidos de biosíntesis de AGPI.

Polipéptido de biosíntesis de AGPI: La expresión «polipéptido de biosíntesis de AGPI» o «polipéptido de biosíntesis de ácido graso poliinsaturado», tal como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos implicados en la producción de un AGPI tales como, pero sin limitación, ácido alfa linolénico («ALA»), ácido araquidónico («ARA»), ácido docosahexaenoico («DHA»), ácido docosapentaenoico («DPA»), ácido eicosapentaenoico («EPA»), ácido gamma-linolénico («GLA»), ácido linoleico («LA») y/o ácido linolénico. Los polipéptidos de biosíntesis de AGPI incluyen enzimas que catalizan etapas particulares en una ruta de síntesis que en última instancia produce un AGPI. Un polipéptido de biosíntesis de AGPI puede ser una ácido graso sintasa. Los polipéptidos de biosíntesis de AGPI pueden catalizar la elongación de un ácido graso. Los polipéptidos de biosíntesis de AGPI pueden catalizar la desaturación de un ácido graso. La expresión «polipéptido de biosíntesis de AGPI» también puede abarcar

polipéptidos que en sí mismos no catalizan reacciones sintéticas, pero que regulan la expresión y/o actividad de otros polipéptidos que sí. Los polipéptidos de biosíntesis de AGPI incluyen, por ejemplo, polipéptidos de ácido graso sintasa, polipéptidos de elongasa, polipéptidos de Δ9 desaturasa, polipéptidos de Δ12 desaturasa, polipéptidos de Δ6 desaturasa, polipéptidos de Δ8 desaturasa, polipéptidos de Δ5 desaturasa, polipéptidos de Δ4 desaturasa y polipéptidos de ω3 desaturasa.

Modificación de AGPI: Una «modificación de AGPI», tal como se usa en el presente documento, se refiere a una modificación de una célula hospedadora que aumenta o reduce su producción de al menos un AGPI. Algunas modificaciones implican modificaciones de aumento de AGPI; es decir, el aumento de la producción da como resultado un nivel de uno o más AGPI que es al menos 1 %-1000 % mayor que el tipo silvestre, por ejemplo, aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 210 %, 220 %, 230 %, 240 %, 250 %, 260 %, 270 %, 280 %, 290 %, 300 %, 310 %, 320 %, 330 %, 340 %, 350 %, 360 %, 370 %, 380 %, 390 %, 400 %, 410 %, 420 %, 430 %, 440 %, 450 %, 460 %, 470 %, 480 %, 490 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 %, 700 %, 750 %, 800 %, 850 %, 900 %, 950, 1000 % mayor que el de la célula parental en la que se introdujo la modificación y/o que el de una célula de referencia particular (por ejemplo, una célula de tipo silvestre). Algunas modificaciones implican modificaciones de reducción de AGPI; es decir, la reducción de la producción da como resultado un nivel de uno o más AGPI que es al menos 1 %-1000 % mayor que el tipo silvestre, por ejemplo, aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 210 %, 220 %, 230 %, 240 %, 250 %, 260 %, 270 %, 280 %, 290 %, 300 %, 310 %, 320 %, 330 %, 340 %, 350 %, 360 %, 370 %, 380 %, 390 %, 400 %, 410 %, 420 %, 430 %, 440 %, 450 %, 460 %, 470 %, 480 %, 490 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 %, 700 %, 750 %, 800 %, 850 %, 900 %, 950, 1000 % menor que el de la célula parental en la que se introdujo la modificación y/o que el de una célula de referencia particular (por ejemplo, una célula de tipo silvestre). Como ejemplo, la producción de uno o más AGPI puede reducirse mientras que la producción de al menos otro AGPI se aumenta. Por lo tanto, una modificación de aumento de AGPI puede aumentar la expresión o actividad de uno o más polipéptidos de biosíntesis de AGPI. Como otro ejemplo, una modificación de aumento de AGPI puede reducir la expresión o actividad de uno o más polipéptidos que interfieran con la expresión o actividad de un polipéptido de biosíntesis de AGPI, incluyendo por ejemplo, compitiendo con el polipéptido de biosíntesis de AGPI por acceso a un sustrato. Opcionalmente, se realiza una modificación genética para que tenga lugar una combinación de aumento de la expresión de ciertos polipéptidos de biosíntesis de AGPI y reducción de la expresión de otros polipéptidos de biosíntesis de AGPI para adaptar un perfil de producción de AGPI de una célula hospedadora. Opcionalmente, una modificación de aumento de AGPI comprende la introducción de un ácido nucleico heterólogo en una célula hospedadora. La modificación de aumento de AGPI puede aumentar los niveles generales de ácido graso en una célula. Opcionalmente, una modificación de aumento de AGPI aumenta el nivel general de uno o más AGPI particulares en una célula, con o sin aumento de los niveles generales de ácido graso en la célula. Opcionalmente, una modificación de aumento de AGPI aumenta los niveles de AGPI incluyendo pero sin limitación ALA, ARA, DHA, DPA, EPA, GLA y/o LA. Opcionalmente, una modificación de aumento de AGPI aumenta el nivel de uno o más AGPI particulares en una célula en relación con uno o más AGPI adicionales en la célula reduciendo los niveles de los otros uno o más AGPI en relación con los uno o más AGPI particulares. Una modificación de AGPI puede abarcar el aumento y/o la reducción de los niveles de una pluralidad de AGPI.

Perfil de producción de AGPI: La expresión «perfil de producción de AGPI», cuando se usa en el presente documento, se refiere a la totalidad de ácidos grasos producidos por una célula hospedadora en un conjunto de condiciones dado. Un perfil de producción de AGPI puede consistir en cualquier combinación o serie de ácidos grasos poliinsaturados producidos por la célula. El perfil de producción de AGPI puede comprender o no ácidos grasos poliinsaturados producidos por una célula de referencia. Un perfil de producción de AGPI resulta de rutas biosintéticas de AGPI. En consecuencia, un perfil de producción de AGPI puede alterarse, reducirse o aumentarse por modificaciones de AGPI. Por ejemplo, un perfil de producción de AGPI puede modificarse genéticamente de modo que una célula hospedadora produzca AGPI específico hasta más del 0,5 %, 1,0 %, 2,0 %, 3,0 %, 4,0 %, 5,0 %, 10,0 %, 20 %, 40 % o más del contenido de ácidos grasos total. Se conocen en la técnica métodos generales de modificación de los perfiles de producción de AGPI (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 7.247.461).

Descendencia: El término «descendencia», cuando se usa en el presente documento en referencia a una célula, significa una célula que surge de otra célula (la «célula parental») (por ejemplo, por división celular o gemación) de modo que la «célula descendiente» contenga al menos algo del material genético de la célula parental. La célula descendiente puede contener todo el material genético de la célula parental. Opcionalmente, la célula descendiente no contiene todo el material genético de la célula parental. Opcionalmente, la célula descendiente contiene algún material genético además del material genético de la célula parental. El material genético adicional puede ser heterólogo para la cepa o especie de la célula. Se entiende que el término «descendencia» abarca no solamente la descendencia directa de una célula parental (por ejemplo células que resultan de una división o gemación de una célula parental), sino toda la descendencia indirecta de una célula parental (por ejemplo, células que resultan de más de un ciclo de división o gemación de una célula parental). Por lo tanto, una célula parental dada puede tener mucha descendencia celular, incluso aunque esa célula pueda generar solamente un número limitado de células (por

ejemplo, dos) en cada ciclo de división o gemación. También se entiende que el término «descendencia» abarca células que han experimentado una o más manipulaciones por la mano del hombre (por ejemplo, manipuladas genéticamente o modificadas por ingeniería genética). Por lo tanto, por ejemplo, cuando una línea celular parental se manipula genéticamente o se modifica por ingeniería genética, todas las células que surgen de la misma se consideran descendencia de la línea celular. Toda la descendencia de esa descendencia también se considera descendencia de la línea celular parental, y así sucesivamente.

Promotor o *elemento promotor:* Tal como se usa en el presente documento, los términos «promotor», «elemento promotor» y «secuencia reguladora» se refieren a un polinucleótido que regula la expresión de una secuencia polinucleotídica seleccionada unida operativamente con el promotor y que efectúa expresión de la secuencia polinucleotídica seleccionada en células. La expresión «promotor de *Thraustochytrium*», tal como se usa en el presente documento, se refiere a un promotor que actúa en una célula de *Thraustochytrium*. La expresión «promotor de traustoquítrido», tal como se usa en el presente documento, se refiere a un promotor que actúa en una célula de traustoquítrido. En algunas realizaciones, un elemento promotor es o comprende regiones no traducidas (UTR) 5' de secuencias codificantes. Las UTR 5' forman parte del transcrito de ARNm y por lo tanto son una parte integral de la expresión de proteínas en organismos eucariotas. Después de la transcripción, las UTR 5' pueden regular la expresión de proteínas en los niveles tanto de transcripción como de traducción. Las estructuras reguladoras de UTR 5' habituales incluyen riboswitches y fases abiertas de lectura cadena arriba (uORF). En riboswitches la estructura secundaria de ARNm forma un aptámero, capaz de unirse con un metabolito celular o proteína. En respuesta a la unión de un aptámero y/o ARNm relacionado la estructura secundaria cambia la confirmación estimulando, suprimiendo o provocando corte y empalme alternativo de una fase abierta de lectura relacionada. Los ejemplos conocidos presentes en microalgas incluyen el riboswitch METE sensible a metionina y el riboswitch Thi4 sensible a tiamina.

Célula de referencia: La expresión «célula de referencia», tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que es normal con respecto a al menos una característica para fines de comparación. Por ejemplo, una célula de referencia para comparar frente a una célula modificada por ingeniería genética puede ser una célula que no está modificada por ingeniería genética. Una célula de referencia puede no contener modificaciones genéticas o puede ser una célula de una cepa de tipo silvestre. Opcionalmente, una célula de referencia contiene algunas modificaciones genéticas características de una cepa particular con la que se compara, pero no contiene una o más modificaciones genéticas características de la cepa particular con la que se compara. Por ejemplo, dicha célula de referencia sería útil para evaluar el efecto de la o las modificaciones genéticas que no contiene. Por lo tanto, por ejemplo, la expresión «célula de *Thraustochytrium* de referencia» (o «célula de traustoquítrido de referencia») significa una célula de *Thraustochytrium* (o célula de traustoquítrido) de la misma cepa o una similar a la célula con la que se compara, excepto que la célula de *Thraustochytrium* de referencia (o célula de traustoquítrido de referencia) carece de una o más características (por ejemplo, una o más modificaciones genéticas) de una célula de *Thraustochytrium* (o célula de traustoquítrido) con la que se compara la célula de *Thraustochytrium* de referencia (o célula de traustoquítrido de referencia). Una célula de referencia también puede ser una célula hospedadora de cualquier especie, excepto que la célula hospedadora de referencia carece de una o más características de una célula hospedadora modificada genéticamente (por ejemplo un gen de traustoquítrido o *Thraustochytrium* particular que se transforma en la célula hospedadora).

Marcador seleccionable. La expresión «marcador seleccionable», tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, un gen, que codifica un producto (proteína) que permite la selección, o al producto génico (por ejemplo, proteína) en sí mismo. La expresión «marcador seleccionable» se usa en el presente documento como se entiende en general en la técnica y se refiere a un marcador cuya presencia dentro de una célula u organismo confiere una ventaja o desventaja significativa para el crecimiento o la supervivencia en la célula u organismo en ciertas condiciones de cultivo definidas (condiciones selectivas). Por ejemplo, las condiciones pueden ser la presencia o ausencia de un compuesto particular o una condición ambiental particular tal como aumento de la temperatura, aumento de la radiación, presencia de un compuesto que es tóxico en ausencia del marcador, etc. La presencia o ausencia de dichos compuesto o compuestos o condición o condiciones se denomina «condición selectiva» o «condiciones selectivas». Por «ventaja para el crecimiento» se entiende viabilidad potenciada (por ejemplo, células u organismos con la ventaja para el crecimiento tienen un tiempo de vida aumentado, en promedio, en relación con células por lo demás idénticas), aumento de la tasa de proliferación (también denominada en el presente documento «tasa de crecimiento») en relación con células u órganos, o ambos, por lo demás idénticos. En general, una población de células que tienen una ventaja para el crecimiento mostrará menos células muertas o no viables y/o mayor tasa de proliferación celular que una población de células por lo demás idénticas que carecen de la ventaja para el crecimiento. Aunque típicamente un marcador seleccionable conferirá una ventaja para el crecimiento a una célula, ciertos marcadores seleccionables confieren una desventaja para el crecimiento a una célula, por ejemplo, hacen a las células más susceptibles a los efectos deletéreos de ciertos compuestos o condiciones ambientales que células por lo demás idénticas que no expresan el marcador. Los marcadores de resistencia a antibióticos son un ejemplo no limitante de una clase de marcador seleccionable que puede usarse para seleccionar células que expresan el marcador. En presencia de una concentración apropiada de antibiótico (condiciones selectivas), dicho marcador confiere una ventaja para el crecimiento a una célula que expresa el marcador. Por lo tanto, las células que expresan el marcador de resistencia

a antibióticos son capaces de sobrevivir y/o proliferar en presencia del antibiótico mientras que las células que no expresan el marcador de resistencia a antibióticos no son capaces de sobrevivir y/o son incapaces de proliferar en presencia del antibiótico. Por ejemplo, un marcador seleccionable de este tipo que se usa habitualmente en células vegetales es la proteína NPTII, que codifica una proteína que proporciona resistencia contra el antibiótico kanamicina. Más en general, los marcadores seleccionables se clasifican como compuestos seleccionables, o antibióticos, y marcadores nutricionales, o auxótrofos.

Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen antibióticos bacterianos habituales, tales como pero sin limitación ampicilina, kanamicina y cloranfenicol, así como compuestos selectivos que se sabe que actúan en microalgas; los ejemplos incluyen rmS y AadA (aminoglucósido 3'-adeniltransferasa), que pueden aislarse del plásmido de *E. coli* R538-1, que confieren resistencia a espectinomicina y estreptomicina, respectivamente en *E. coli* y algunas microalgas (Hollingshead y Vapnek 1985; Meslet-Cladière y Vallon 2011). Otro ejemplo es la proteína de ARN 23S, rml, que confiere resistencia a eritromicina (Newman, Boynton et al. 1990; Roffey, Golbeck et al. 1991). Otro ejemplo es Ble, un gen rico en GC aislado de *Streptoalloteichus hindustanus* que confiere resistencia a zeocina (Stevens, Purton et al. 1996). Aph7 es otro ejemplo más, que es un gen de aminoglucósido transferasa derivado de *Streptomyces hygroscopicus* que confiere resistencia a higromicina B (Berthold, Schmitt et al. 2002). Los ejemplos adicionales incluyen: AphVIII, una aminoglucósido 3'-fosfotransferasa de tipo VIII derivada de *Streptomyces rimosus* que confiere resistencia a Paromicina en *E. coli* y algunas microalgas (Sizova, Lapina et al. 1996; Sizova, Fuhrmann et al. 2001); Nat y Sat-1, que codifican nourseotricina acetil transferasa, de *Streptomyces noursei* y estreptotricina acetil transferasa, de *E. coli*, que confieren resistencia a nourseotricina (Zaslavskaia, Lippmeier et al. 2000); Neo, una aminoglucósido 3'-fosfotransferasa, que confiere resistencia a los aminoglucósidos; kanamicina, neomicina, y el análogo G418 (Hasnain, Manavathu et al. 1985); y Cry1, una proteína ribosómica S14 que confiere resistencia a emetina (Nelson, Savereide et al. 1994). Otros marcadores seleccionables incluyen marcadores nutricionales, también denominados marcadores auto o auxotróficos. Estos incluyen marcadores de fotoautotrofia que imponen la selección basándose en la restauración de la actividad fotosintética dentro de un organismo fotosintético. Los marcadores fotoautotróficos incluyen: AtpB, TscA, PetB, NifH, psaA y psaB (Boynton, Gillham et al. 1988; Goldschmidt-Clermont 1991; Kindle, Richards et al. 1991; Redding, MacMillan et al. 1998; Cheng, Day et al. 2005). Los marcadores nutricionales alternativos o adicionales incluyen: ARG7, que codifica argininosuccinato liasa, una etapa crítica en la biosíntesis de arginina (Debuchy, Purton et al. 1989); NIT1, que codifica una nitrato reductasa esencial para el metabolismo del nitrógeno (Fernández, Schnell et al. 1989); THI10, que es esencial para la biosíntesis de tiamina (Ferris 1995); y NTC1, que cataliza una etapa esencial en la biosíntesis de nicotinamida (Ferris 1995). Dichos marcadores son en general enzimas que actúan en una ruta biosintética para producir un compuesto que es necesario para el crecimiento o la supervivencia celular. En general, en condiciones no selectivas el compuesto requerido está presente en el ambiente o se produce por una ruta alternativa en la célula. En condiciones selectivas, el funcionamiento de la ruta biosintética, en el que está implicado el marcador, es necesario para producir el compuesto.

Agente de selección: La expresión «agente de selección», tal como se usa en el presente documento se refiere a un agente que introduce una presión selectiva en una célula o poblaciones de células bien en favor o bien en contra de la célula o población de células que portan un marcador seleccionable. Por ejemplo, el agente de selección es un antibiótico y el marcador seleccionable es un gen de resistencia a antibióticos. Opcionalmente, se usa zeocina como el agente de selección.

Organismo fuente: Un «organismo fuente», tal como se usa en el presente documento, es un organismo que contiene o produce de forma natural un polinucleótido, polipéptido u otro compuesto (por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo) que se debe introducir de acuerdo con la presente divulgación en una célula receptora u hospedadora. Las consideraciones relevantes pueden incluir, por ejemplo, lo estrechamente relacionados que están en la evolución los organismos fuente y hospedador potenciales, o lo relacionado que está el organismo fuente con los otros organismos fuente de los que se han seleccionado secuencias de otros ácidos nucleicos y/o polipéptidos relevantes. Cuando va a introducirse y/o expresarse en una célula hospedadora una pluralidad de ácidos nucleicos heterólogos diferentes, diferentes secuencias pueden ser de diferentes organismos fuente o del mismo organismo fuente. Como ejemplo, los polipéptidos individuales pueden representar subunidades individuales de la actividad de una proteína compleja y/o pueden ser necesarios para actuar en concierto con otros polipéptidos para conseguir los objetivos de la presente divulgación. Opcionalmente, puede ser deseable que dichos polipéptidos sean del mismo organismo fuente y/o estén suficientemente relacionados para actuar de forma apropiada cuando se expresen juntos en una célula hospedadora. Dichos polipéptidos pueden ser de organismos fuente diferentes, incluso no relacionados. Se entenderá además que, cuando un polipéptido heterólogo se va a expresar en una célula hospedadora, puede ser deseable utilizar secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido que se han ajustado para acomodar preferencias codónicas de la célula hospedadora y/o para ligar las secuencias codificantes con elementos reguladores activos en la célula hospedadora. Por ejemplo, cuando la célula hospedadora es una célula de *Thraustochytrium*, será con frecuencia deseable alterar la secuencia génica que codifica un polipéptido dado de modo que se adapte más estrechamente a las preferencias codónicas de dicha célula. Opcionalmente, una secuencia génica que codifica un polipéptido se optimiza incluso cuando dicha secuencia génica se obtiene de la célula hospedadora en sí misma (y por lo tanto no es heteróloga). Por ejemplo, una secuencia génica que codifica un polipéptido de interés puede no tener codones optimizados para la expresión en una célula hospedadora dada

incluso aunque dicha secuencia génica se aísle de la cepa de célula hospedadora. La secuencia génica puede optimizarse adicionalmente para adaptarse a las preferencias codónicas de la célula hospedadora. Los expertos en la materia serán conscientes de las preferencias codónicas de la célula hospedadora y podrán emplear los métodos y las composiciones desvelados en el presente documento para optimizar la expresión de un polipéptido dado en la célula hospedadora.

Sustratos: Un «sustrato», tal como se usa en el presente documento para describir sustratos de una enzima, se refiere a cualquier entidad que pueda modificarse por actividad de la enzima.

Terminador: Tal como se usa en el presente documento, el término «terminador» se refiere a un polinucleótido que anula la expresión de, se dirige a la maduración (por ejemplo, añadiendo una cola de poliA) o transmite estabilidad de ARNm a una secuencia polinucleotídica seleccionada unida operativamente con el terminador en células. Una secuencia terminadora puede estar cadena abajo de un codón de terminación en un gen. La expresión «terminador de *Thraustochytrium*», tal como se usa en el presente documento, se refiere a un terminador que actúa en una célula de *Thraustochytrium*. La expresión «terminador de traustoquítrido», tal como se usa en el presente documento, se refiere a un terminador que actúa en una célula de traustoquítrido.

Traustoquítrido: El término «traustoquítrido», tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro del orden traustoquitriales, que incluye la familia traustoquitriáceos. Las cepas descritas como traustoquítridos incluyen los siguientes organismos: Orden: Traustoquitriales; Familia: Traustoquitriáceos; Géneros: *Thraustochytrium* (Especies: sp., *arudimentale, aureum, benthicola, globosum, kinnei, motivum, multirudimentale, pachydermum, proliferum, roseum, striatum), Ulkenia* (Especies: sp., *amoeboidea, kerguelensis, minuta, profunda, radiata, sailens, sarkariana, schizochytrops, visurgensis, yorkensis), Schizochytrium* (Especies: sp., *aggregatum, limnaceum, mangrovei, minutum, octosporuni), Japonochyrrium* (Especies: sp., marinuni), *Aplanochytrium* (Especies: sp., *haliotidis, kerguelensis, profunda, stocchinoi), Althornia* (Especies: sp., crouchii) o *Elina* (Especies: sp., *marisalba, sinorifica).* Las especies descritas dentro de *Ulkenia* se considerarán miembros del género *Thraustochytrium.* Las cepas descritas como pertenecientes al género *Thrautochytrium* pueden compartir rasgos comunes con y también se describen dentro del género *Schizochytrium.* Por ejemplo, en algunas clasificaciones taxonómicas ONC-T18 puede considerarse dentro del género *Thrautochytrium,* mientras que en otras clasificaciones se puede describir dentro del género *Schizochytrium* porque comprende rasgos indicativos de ambos géneros.

Transformación: El término «transformación», tal como se usa en el presente documento se refiere a un proceso por el que una molécula de ácido nucleico exógena o heteróloga (por ejemplo, un vector o una molécula de ácido nucleico recombinante) se introduce en una célula o un microorganismo receptor. La molécula de ácido nucleico exógena o heteróloga puede estar o no integrada en (es decir, unida covalentemente con) ADN cromosómico que compone el genoma de la célula o el microorganismo hospedador. Por ejemplo, el polinucleótido exógeno o heterólogo puede mantenerse en un elemento episómico, tal como un plásmido. Como alternativa o adicionalmente, el polinucleótido exógeno o heterólogo puede integrarse en un cromosoma de modo que sea heredado por las células descendientes a través de la replicación cromosómica. Los métodos para transformación incluyen, pero sin limitación, precipitación de fosfato cálcico; tratamiento con Ca^{2+}; fusión de células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ácido nucleico recombinante; tratamiento de las células receptoras con liposomas que contienen el ácido nucleico recombinante; DEAE dextrano; fusión usando polietilenglicol (PEG); electroporación; magnetoporación; suministro biolístico; infección retrovírica; lipofección; y microinyección de ADN directamente en células. Opcionalmente, un ácido nucleico exógeno o heterólogo se introduce en una célula apareando con otra célula. Por ejemplo, en *S. cerevisiae,* las células se aparean entre sí.

Transformado: El término «transformado», tal como se usa en referencia a células, se refiere a células que han experimentado «transformación» tal como se describe en el presente documento de modo que las células portan material genético exógeno o heterólogo (por ejemplo, un ácido nucleico recombinante). El término «transformado» puede usarse también o como alternativa para hacer referencia a microorganismos, cepas de microorganismos, tejidos, organismos, etc.

Descripción detallada

Tal como se describe en el presente documento, la presente divulgación proporciona una diversidad de reactivos y métodos relacionados con la producción de AGPI y/o con la modificación de traustoquítridos. En general, la divulgación se refiere a la modificación de células hospedadoras de traustoquítridos, y en particular a la modificación genética de traustoquítridos, particularmente a aumentar o adaptar su producción de compuestos de interés (por ejemplo, AGPI). La presente divulgación abarca la identificación de determinados elementos reguladores genéticos y genes de traustoquítrido y *Thraustochystrium* sp., así como el desarrollo de metodologías para mutagénesis de traustoquítrido o *Thraustochystrium*. La divulgación proporciona además cepas de traustoquítrido y *Thraustochystrium* modificadas genéticamente, y productos producidos a partir de y con ellas. La divulgación también proporciona modificación genética de células hospedadoras distintas de traustoquítridos con genes de traustoquítridos para iniciar, aumentar o adaptar la producción de AGPI en las células hospedadoras. Determinados detalles de aspectos particulares de estos y otros aspectos se analizan en más detalle a lo largo del documento.

Los traustoquítridos pueden producir y acumular grandes cantidades de AGPI omega-3 (n-3) y omega-6 (n-6) dentro de gotas de lípidos celulares. Algunos traustoquítridos producen AGPI mediante dos rutas, la ruta de tipo poliquétido sintasa (AGPI sintasa) (habitual en bacterias marinas) y una ruta de desaturasa/elongasa (denominada «convencional») también habitual en eucariotas. Se conocen muchos genes individuales y puntos de unión sintéticos críticos en estas rutas (véase, por ejemplo, Fig. 1). Sin embargo, las posibilidades reales de que la modificación metabólica implique a estas rutas para producir productos finales deseados, y composiciones de ácidos grasos totales con ciertos intervalos de AGPI particulares, siguen sin determinarse.

Células hospedadoras

Como se ha indicado, la presente divulgación proporciona reactivos y metodologías para la manipulación de células hospedadoras.

En general, los reactivos identificados (por ejemplo, elementos reguladores, vectores, marcadores seleccionables, agentes mutagénicos, etc.) y metodologías (incluyendo, por ejemplo, métodos para mutar) pueden utilizarse junto con cualquier célula hospedadora apropiada. Un experto habitual en la materia, que haya leído la presente divulgación y tenga dichos reactivos disponibles, será capaz de identificar fácilmente células hospedadoras apropiadas en las que dichos elementos están activos.

Las células hospedadoras que pueden usarse en los métodos, composiciones y kits proporcionados incluyen microalgas. Las microalgas que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, *Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis linea, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Anabaena variabilis, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococciis braunii, Botryococcus sudeticus, Bracteococcus minor, Bracteococcus medionucleatus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlamydomonas reinhardtii, Chlamydomonase moewusi, Chlamydomonas nivalis, Chlamydomonas caudate, Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella Candida, Chlorella capsulate, Chlorella desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella lobophora* (cepa SAG 37.88), *Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella ovalis, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella variabilis, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Coccomyxa subellipsoidea C-169, Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata, Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei, Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta, Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Haematococcus pluvialis, Hymenomonas sp., Isochrysis aff galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium, Micromonas, Micromonas pusilla, Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp., Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla, Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Nostoc sp., Nostoc Punctiforme, Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, Osterococcus, Osterococcus lucimarinus, Osterococcus tauri, Parachlorella kessleri, Pascheria acidophila, Pavlova sp., Phagus, Phaaodactylum tricornutum, Phormidium, Platymonas sp., Pleurochrysis carterae, Pleurochrysis dentate, Pleurochrysis sp., Prochlorococcus marinus, Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca monformis, Prototheca zopfii, Pseudochlorella aquatica, Pyramimonas sp., Pyrobotrys, Rhodococcus opacus, Sarcinoid chrysophyte, Scenedesmus armatus, Scynechocystis sp., Scynechococcus, Schizochytrium, Spirogyra, Spirulina platensis, Stichococcus sp., Synechococcus sp., Tetraedron, Thalassiosira pseudonana, Tetraselmis sp., Tetraselmis suecica, Thalassiosira weissflogii, Viridiella frideridana,* y *Volvox carteri.*

Las células hospedadoras pueden ser hongos. Los ejemplos no limitantes de células hospedadoras de hongos incluyen levadura susceptible de modificación metabólica (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* y levaduras oleaginosas (por ejemplo, *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis,*

Rhodotorula gracilis y *Yarrowia lipolytica*). Los hongos adicionales incluyen *Mortierella, Mortierella vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum, Hensenulo, Chaetomium, Cladosporium, Malbranchea, Rhizopus,* y *Pythium.*

Opcionalmente, son células hospedadoras para uso de acuerdo con la presente divulgación células de traustoquítridos. Opcionalmente, las células hospedadoras son miembros del orden traustoquitriales. Opcionalmente, las células hospedadoras son miembros de la subclase traustoquitriáceas. Opcionalmente, las células hospedadoras son miembros de un género seleccionado del grupo que consiste en *Thraustochytrium, Ulkenia, Schizochytrium, Aurantiochytrium, Aplanochytrium, Botryochytrium, Japonochytrium, Oblongichytrium, Parietichytrium* y *Sicyoidochytrium.* Opcionalmente, las células hospedadoras no son del género *Schizochytrium*.

Las células hospedadoras utilizadas de acuerdo con la presente divulgación incluyen miembros del género *Thraustochytrium*. Opcionalmente, una célula hospedadora es una célula de *Thraustochytrium* de una de las siguientes especies: *Thraustochytrium aggregatum, Thraustochytrium aureum, Thraustochytrium gaertnerium, Thraustochytrium kinnei, Thraustochytrium motivum, Thraustochytrium multirudimentale, Thraustochytrium pachydermum, Thraustochytrium roseum, Thraustochytrium* sp. 1.3A4.1, *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185, *Thraustochytrium* sp. BL13, *Thraustochytrium* sp. BL14, *Thraustochytrium* sp. BL2, *Thraustochytrium* sp. BL3, *Thraustochytrium* sp. BL4, *Thraustochytrium* sp. BL5, *Thraustochytrium* sp. BL6, *Thraustochytrium* sp. BL7, *Thraustochytrium* sp. BL8, *Thraustochytrium* sp. BL9, *Thraustochytrium* sp. BP3.2.2, *Thraustochytrium* sp. BP3.3.3, *Thraustochytrium* sp. caudivorum, *Thraustochytrium* sp. CHN-1, *Thraustochytrium* sp. FJN-10, *Thraustochytrium* sp. HK1, *Thraustochytrium* sp. HK10, *Thraustochytrium* sp. HK5, *Thraustochytrium* sp. HK8, *Thraustochytrium* sp. HK8a, *Thraustochytrium* sp. KK17-3, *Thraustochytrium* sp. KL1, *Thraustochytrium* sp. KL2, *Thraustochytrium* sp. KL2a, *Thraustochytrium* sp. ONC-T18, *Thraustochytrium* sp. PJA10.2, *Thraustochytrium* sp. TR1.4, *Thraustochytrium* sp. TRR2, *Thraustochytrium striatum* o *Thraustochytrium visurgense.*

Las células hospedadoras utilizadas de acuerdo con la presente divulgación también incluyen miembros del género *Schizochytrium*. Opcionalmente, una célula hospedadora es una célula de *Thraustochytrium* de una de las siguientes especies: *Schizochytrium limacinum, Schizochytrium mangrovei, Schizochytrium minutum, Schizochytrium* sp. (ATCC 20111), *Schizochytrium* sp. (ATCC 20888), *Schizochytrium* sp. BR2.1.2, *Schizochytrium* sp. BUCAAA 032, *Schizochytrium* sp. BUCAAA 093, *Schizochytrium* sp. BUCACD 152, *Schizochytrium* sp. BUCARA 021, *Schizochytrium* sp. BUCHAO 113, *Schizochytrium* sp. BURABQ 133, *Schizochytrium* sp. BURARM 801, *Schizochytrium* sp. BURARM 802, *Schizochytrium* sp. FJU-512, *Schizochytrium* sp. KH105, *Schizochytrium* sp. KR-5, *Schizochytrium* sp. PJ10.4, *Schizochytrium* sp. SEK 210, *Schizochytrium* sp. SEK 345, *Schizochytrium* sp. SEK 346, *Schizochytrium* sp. SR21 o *Schizochytrium* sp. TIO01.

Opcionalmente, la célula hospedadora es una célula de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18. ONC-T18 es una *Thraustochytrium* marina aislada originalmente de las hojas de hierbas de marismas salobres en Advocate Harbor, bahía de Fundy, Nueva Escocia, Canadá. ONC-T18 se describe en la publicación de patente de Estados Unidos 2009/0117194. Opcionalmente, una célula de *Thraustochytrium* tiene una secuencia de ARNr de 18s que es al menos 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o más (por ejemplo, incluyendo 100 %) idéntica a SEQ ID NO:68. Opcionalmente, una célula hospedadora es una célula de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 de las células depositadas con el número de referencia de la cepa de ATCC PTA-6245.

Modificación genética de microorganismos

La presente divulgación proporciona, entre otros, genes, elementos reguladores, construcciones de ácido nucleico, marcadores seleccionables, métodos para mutagénesis y métodos de transformación para manipulación de microorganismos tales como traustoquítridos. Las herramientas proporcionadas en el presente documento pueden usarse solas y en diversas combinaciones para implementar cualquier modificación genética deseada. Por ejemplo, se usan métodos de transformación proporcionados para introducir moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más genes. Las moléculas de ácido nucleico pueden incluir genes que codifican polipéptidos de biosíntesis de AGPI, así como secuencias de promotor, terminador o marcador seleccionable proporcionadas en el presente documento, o combinaciones de las mismas. Opcionalmente, se usan métodos de mutagénesis proporcionados para generar cepas (por ejemplo, cepas de traustoquítridos) que tienen propiedades deseadas. Dichas cepas también pueden transformarse (por ejemplo, ácidos nucleicos que incluyen uno o más elementos reguladores proporcionados en el presente documento).

Uno o más genes que codifican diversas enzimas en rutas de síntesis de AGPI pueden transformarse en una célula hospedadora para adaptar el perfil de producción de AGPI de la célula hospedadora y su descendencia. Seleccionando una combinación deseada de genes exógenos, genes endógenos se unieron operativamente con promotores heterólogos y genes exógenos se unieron operativamente con promotores endógenos. Las rutas sintéticas desveladas en el presente documento pueden manipularse para conseguir expresión específica o preferente de uno o más AGPI predeterminados. Por ejemplo, si se desea un perfil de producción de AGPI optimizado para biocombustible, entonces un experto en la materia podría usar los polinucleótidos, métodos y

células hospedadoras desvelados en el presente documento para unir operativamente un promotor heterólogo de un gen de Δ12 desaturasa para conducir la expresión de una Δ5 desaturasa endógena o exógena, adaptando de este modo la producción de AGPI a ARA y EPA.

Cualquier pluralidad de modificaciones genéticas puede modificarse genéticamente para conseguir una producción o un perfil de producción de AGPI deseado. Una o más secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento pueden sobreexpresarse, por ejemplo, para inhibir o prevenir la síntesis de AGPI con cadenas de carbono mayores de 18 y desaturación mayor de 1. Los elementos reguladores génicos desvelados en el presente documento pueden unirse operativamente con uno o más genes heterólogos o endógenos para adaptar la activación de los genes de una manera dependiente del tiempo o de la condición. Los ejemplos no limitantes de genes con capacidad de manipulación incluyen ácido graso sintasa para controlar el flujo de carbono a la ruta de AGPI, tioesterasas para catalizar la terminación de la biosíntesis de ácidos grasos de una manera específica de la longitud de cadena y elongación y/o desaturasa que controla la síntesis de etapa terminal de compuestos deseados.

En general, los polinucleótidos desvelados en el presente documento actúan como una serie de herramientas que permiten la modificación genética racional de rutas biosintéticas de AGPI para producir una diversidad de productos. Dicho de otro modo, los polinucleótidos desvelados en el presente documento pueden intercambiarse y su expresión controlarse o sincronizarse temporalmente en una cualquiera de varias combinaciones. Los expertos en la materia serán capaces de usar las herramientas desveladas en el presente documento en consecuencia, requiriendo solamente conocimiento adicional de la ruta biosintética para manipular (véase, por ejemplo, Fig. 1) y un medio para detectar, medir y/o aislar un producto final deseado. Por ejemplo, una desaturasa, promotor (por ejemplo, el promotor de Δ12 desaturasa de SEQ ID NO.69) o fragmento operativo del mismo puede unirse operativamente con un gen de ácido graso sintasa (AGS) de tipo 1 para aumentar la biosíntesis de ácidos grasos durante periodos tanto de crecimiento celular como de producción de ácidos grasos.

Opcionalmente, un perfil de producción de AGPI (que comprende todas las rutas de biosíntesis de ácidos grasos y los productos resultantes) puede adaptarse para producir composiciones predeterminadas que comprenden al menos dos productos de ácidos grasos dentro de un intervalo o intervalos específicos optimizados para una utilidad particular (por ejemplo producción de biocombustible). Por ejemplo, es deseable en general minimizar los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga («AGPICL»; por ejemplo, DHA) en biocombustibles. Mediante manipulación de los polipéptidos de biosíntesis de AGPI y sus secuencias de ácido nucleico correspondientes desveladas en el presente documento, opcionalmente junto con condiciones de cultivo particularizadas, es posible producir una composición oleosa de ácidos grasos en la que los niveles de AGPICL son menores de aproximadamente 25 % del contenido de ácidos grasos total. Opcionalmente, se producen composiciones oleosas de ácidos grasos con niveles de AGPICL menores de aproximadamente 20 %, 15 %, 10 %, 5 % y 1 % del contenido de ácidos grasos total. Opcionalmente, los AGPICL tienen al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 22, al menos aproximadamente 24, al menos aproximadamente 26, al menos aproximadamente 28 o al menos aproximadamente 30 átomos de carbono. Opcionalmente, los AGPICL son ácido docosatetraenoico, ácido docosapentaenoico y/o ácido docosahexaenoico.

Como se analiza a lo largo del documento, los organismos proporcionados pueden abarcar modificaciones genéticas en las que se expresa un gen. Opcionalmente, sin embargo, los microorganismos se modifican genéticamente para reducir la expresión de genes que codifican uno o más polipéptidos de biosíntesis de AGPI. Por ejemplo, un traustoquítrido o *Thraustochytrium* puede modificarse genéticamente para reducir la expresión de una elongasa o desaturasas. Opcionalmente, un traustoquítrido o *Thraustochytrium* se modifica genéticamente con expresión de Δ12 desaturasa reducida o anulada. Se conocen bien en la técnica métodos para reducir la expresión génica en microorganismos; por ejemplo, construcciones de inactivación o intercambio de alelos y ARN antisentido.

Opcionalmente, los elementos reguladores (por ejemplo, promotor o promotores) de un gen de biosíntesis de AGPI de traustoquítrido o *Thraustochytrium* se unen operativamente con un gen de biosíntesis de AGPI para adaptar la expresión de ese gen. Para expresión, la expresión puede adaptarse para coincidir con los niveles de expresión basal de un gen particular durante el crecimiento exponencial o para coordinar niveles aproximadamente equivalentes de expresión génica.

Opcionalmente, más de un gen de biosíntesis de AGPI se expresa de forma simultánea o concurrente dentro de microorganismos modificados genéticamente para adaptar el perfil de producción de AGPI. Los genes pueden expresarse a partir de cualquiera de varios vectores de expresión. Por ejemplo, cada gen puede comprender un vector de expresión, cada uno en un plásmido individual. Como alternativa, para reducir el número de plásmidos, los genes de biosíntesis de AGPI pueden colocarse en tres plásmidos, dos plásmidos o un único plásmido. Se conocen bien en la técnica vectores plasmídicos con múltiples casetes de expresión. Pueden colocarse genes que codifican cualquier combinación de ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ4 desaturasa, poliquétido AGPI sintasa (PKS), Δ5 desaturasa y Δ12 desaturasa en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete plásmidos. También pueden usarse construcciones de expresión policistrónicas y basadas en operón.

Por lo tanto, se proporcionan microorganismos modificados genéticamente, que pueden obtenerse o crearse a partir

de cualquiera de las especies hospedadoras anteriormente mencionadas, incluyendo *Schizochytrium, Oblongichytrium, Aurantiochytrium* y *Traustochytrium.* Los microorganismos modificados genéticamente expresan uno o más ácidos nucleicos heterólogos que cambian o adaptan la biosíntesis de AGPI en el microorganismo modificado genéticamente en relación con una célula hospedadora o especie de tipo silvestre. Opcionalmente, ONC-T18 se modifica genéticamente de una manera o maneras desveladas en el presente documento. Por ejemplo, un polinucleótido de biosíntesis de AGPI se expresa de forma heteróloga de modo que se cambie la producción de uno o más AGPI (es decir, se aumenta o se reduce en relación con los niveles en ausencia de polinucleótido heterólogo). Opcionalmente, la expresión heteróloga es sobreexpresión. Opcionalmente, una secuencia polinucleotídica endógena o exógena que codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo polipeptídico enzimático se expresa de forma heteróloga uniendo operativamente la secuencia polinucleotídica con un promotor. Opcionalmente, el promotor es exógeno para el microorganismo. Opcionalmente, el promotor es endógeno para el microorganismo, pero está unido operativamente a un polinucleótido de biosíntesis de AGPI heterólogo (es decir, diferente). Esto puede provocar la expresión del polipéptido enzimático o parte de un complejo polipeptídico enzimático codificado por el polinucleótido de biosíntesis de AGPI en un momento o en condiciones en las que el polipéptido enzimático o parte de un complejo polipeptídico enzimático no se expresa normalmente. Los promotores heterólogos pueden ser, por ejemplo, promotores establecidos, conocidos por los expertos en la técnica, tales como el promotor *Lac* del operón de lactosa de bacterias, el promotor inducible de arabinosa *pBAD* de bacterias o el promotor *Tet* regulado por tetraciclina de bacterias. Como alternativa o adicionalmente, los promotores utilizados pueden ser los hallados en un sistema eucariota, como conocen los expertos en la técnica, tales como TDH3, ADH1, TPI1, ACT1, GPD o PGI o los promotores inducibles por galactosa, *GAL1, GAL7* y *GAL10.* Los elementos reguladores que pueden emplear los expertos en la técnica; incluyen los hallados en microalgas, los ejemplos incluyen: *Rbcs2,* el promotor de ribulosa bisfosfato carboxilasa que proporciona expresión de alto nivel constitutiva (Stevens, Purton et al. 1996); *PsaD,* el promotor del fotosistema I subunidad D, que permite expresión constitutiva de alto nivel que puede ser regulada por la proteína nuclear *Nac2* (Fisher y Rochaix 2001); *PsbA,* el promotor del gen del fotosistema II, *PsbA,* y UTR 5'. Estos producen altos niveles de acumulación de proteína recombinante (Manuell, Beligni et al. 2007; Surzycki, Greenham et al. 2009). Como alternativa o adicionalmente, los elementos reguladores incluyen *Hsp70A*, el elemento potenciador de la proteína de choque térmico 70A, que reduce el silenciamiento génico en transformantes nucleares y se emplea típicamente en combinación con el promotor *Rbcs2* (Schroda, Blöcker et al. 2000). Como alternativa o adicionalmente, la secuencia reguladora de una proteína nativa puede emplearse para conducir la expresión de un gen heterólogo. Los ejemplos de este pueden incluir los promotores de proteínas de biosíntesis de ácidos grasos, incluyendo las que se inducen debido a tensión de nitrógeno. Los ejemplos específicos o promotores incluyen la secuencia reguladora de una Δ12 desaturasa (por ejemplo, SEQ ID NO: 69), la secuencia reguladora de una Δ5 desaturasa (por ejemplo, SEQ ID NO: 71), la secuencia reguladora de una Δ4 desaturasa, y la secuencia reguladora de una Δ5 elongasa. Los promotores alternativos o adicionales pueden incluir los que se inducen en respuesta a cambios económicamente viables en condiciones de bioproceso. Dichos cambios pueden incluir la inducción de una respuesta anóxica o anaeróbica por reducción de la velocidad de agitación, por ejemplo, los elementos reguladores asociados incluirían los que conducen la expresión de anhidrasas carbónicas, un cambio en o agotamiento de carbono y/o nitrógeno orgánico. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles.

Aunque las secuencias reguladoras de ácidos nucleicos o promotores pueden aumentar la expresión de polinucleótidos con los que se unen operativamente, una secuencia reguladora heteróloga o promotor pueden reducir también la expresión de polinucleótidos con los que se unen. Este efecto puede depender del estadio o las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, si una secuencia reguladora para una Δ5 desaturasa se une operativamente para controlar la expresión de un grupo de genes de PKS, la expresión del complejo de PKS se reducirá sustancialmente durante periodos de crecimiento exponencial y también durante periodos de producción de ácidos grasos cuando el microorganismo no crece o crece a una velocidad reducida.

Opcionalmente, solamente se usan elementos promotores particulares de las secuencias reguladoras desveladas en el presente documento. Por ejemplo, pueden identificarse elementos promotores polinucleotídicos particulares de la Δ12 desaturasa de SEQ ID NO:69 por ordenador usando herramientas de análisis conocidas por los expertos en la técnica. (véase, por ejemplo, D.J. Studholme y R. Dixon, 2003, Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators, J. Bacteriol, 185:1757-67; R. Münch et al, 2005, Bioinformatics 2005 21: 4187-4189; L. Gordon et al., 2003, Bioinformatics 19:1964-71; J.M. Carlson et al., 2007, Nucl. Acids Res. 35: W259-W264; la base de datos de elementos reguladores de la transcripción de Cold Spring Harbor Laboratory; la base de datos de promotores eucariotas del Instituto Suizo de Bioinformática). Estos elementos promotores pueden después aislarse y reordenarse, y la expresión optimizarse en consecuencia, usando técnicas de ingeniería genética convencionales (por ejemplo, PCR, digestión de restricción/ligamiento, y disposición de los elementos en una construcción indicadora para evaluar la influencia en la expresión del gen indicador en diversas condiciones, fase de crecimiento, etc.) Opcionalmente, pueden combinarse elementos promotores polinucleotídicos de diferentes secuencias reguladoras (por ejemplo, Δ5 y Δ12 desaturasas) en elementos promotores híbridos para conducir la expresión génica de formas inesperadas, pero determinables.

Algunos microorganismos modificados genéticamente pueden incluir múltiples combinaciones de promotores heterólogos unidos operativamente con diferentes polinucleótidos de biosíntesis de AGPI. Opcionalmente, al menos polinucleótidos heterólogos adicionales que codifican un polipéptido enzimático o parte de un complejo polipeptídico

enzimático implicados en la biosíntesis de AGPI se transforman en el microorganismo. Opcionalmente, los polinucleótidos heterólogos adicionales incluyen ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS).

Pueden introducirse secuencia de ácido nucleico heterólogo y promotores en células hospedadoras o microorganismos modificados genéticamente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Las secuencias pueden colocarse en uno o más casetes de expresión o vectores de expresión, e introducirse en las células en uno o más plásmidos. Las secuencias heterólogas pueden transformarse en las células usando técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación y técnicas basadas en lípidos catiónicos). Las técnicas adicionales de transformación de secuencias heterólogas en células hospedadoras incluyen transformación con acetato de litio, esferoplastos, fusión de protoplastos, lipofección, transfección, transducción, conjugación, infección y similares. Pueden construirse vectores de expresión como se desvela en los ejemplos en el presente documento.

Pueden introducirse secuencia o secuencias promotoras heterólogas (exógenas o endógenas) en células y unirse operativamente con un polinucleótido de biosíntesis de AGPI endógeno elegido por recombinación homóloga. El polinucleótido de biosíntesis de AGPI endógeno puede localizarse de forma extracromosómica en un plásmido o integrarse en (es decir, unirse covalentemente con) ADN cromosómico que compone el genoma de la célula hospedadora.

Como resultado de las modificaciones analizadas anteriormente, el perfil de producción de AGPI y el contenido de ácidos grasos total de un microorganismo modificado genéticamente se ve afectado de una manera predeterminada. Por lo tanto, los microorganismos modificados genéticamente pueden tener el contenido de ácidos grasos total de la célula aumentado en al menos 10 %, 20 %, 50 %, 100 % o más en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga o el promotor. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Los niveles de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados pueden reducirse en al menos 10 %, 20 %, 50 %, 100 % o más en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga o el promotor.

La expresión heteróloga de polinucleótido de biosíntesis de AGPI puede afectar al perfil de producción de AGPI general en una célula hospedadora modificada genéticamente. Por ejemplo, la expresión heteróloga de uno cualquiera de los polinucleótidos de biosíntesis de AGPI desvelados en el presente documento puede aumentar el contenido de ácidos grasos total de una célula hospedadora y aumentar particularmente el contenido de AGPI con cuatro o más dobles enlaces. Por ejemplo, la sobreexpresión, y opcionalmente expresión simultánea y coordinada, de los polinucleótidos desvelados en el presente documento puede aumentar la producción de AGPI con cuatro o más dobles enlaces (por ejemplo, DHA, DPA, ARA) de modo que una célula hospedadora produzca AGPI con más de cuatro dobles enlaces hasta más de 0,5 %, 1,0 %, 2,0 %, 3,0 %, 4,0 %, 5,0 %, 10,0 %, 20 %, 40 % o más del contenido de ácidos grasos total.

Expresión génica

La presente divulgación abarca composiciones y métodos para modificación genética de microorganismos. Opcionalmente, la presente divulgación abarca composiciones y métodos para modificación genética de traustoquítridos (por ejemplo, *Thraustochytrium*). Las células «modificadas genéticamente» incluyen células que se han modificado (por ejemplo, por introducción de un ácido nucleico exógeno) y descendencia de las mismas que conservan la modificación.

La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos que incluyen secuencias reguladoras de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. La expresión génica en eucariotas requiere con frecuencia secuencias reguladoras que son específicas de especie o que actúan en organismos que están estrechamente relacionados. La disponibilidad de secuencias reguladoras de traustoquítrido o *Thraustochytrium* permite que se expresen genes de interés en traustoquítridos. Opcionalmente, las secuencias reguladoras incluyen secuencias promotoras y secuencias terminadoras.

Los péptidos de biosíntesis de AGPI y sus polinucleótidos correspondientes pueden transformarse y expresarse en cualquier célula hospedadora. Por ejemplo, una desaturasa (por ejemplo, la Δ12 desaturasa de SEQ ID NO:70) y/o elongasa (por ejemplo, una Δ5 elongasa) de traustoquítrido o *Thraustochytrium* puede expresarse en *Saccharomyces cerevisiae* para aumentar la conversión de ácido oleico a ácido linoleico (véase, por ejemplo, Fig. 1) y/o de EPA a ácido docosapentaenoico, adaptando de este modo la producción de AGPI. Opcionalmente, una desaturasa de traustoquítrido o *Thraustochytrium* negativa dominante puede transformarse en una célula hospedadora distinta de traustoquítrido o *Thraustochytrium* para provocar acumulación de ácido oleico. Pueden generarse péptidos de biosíntesis de AGPI negativos dominantes mediante métodos de mutagénesis desvelados en el presente documento.

Se desvelan ácidos nucleicos aislados que incluyen un promotor de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Opcionalmente, un ácido nucleico proporcionado en el presente documento incluye un promotor del gen de Δ4 desaturasa de *Thraustochytrium*. Una secuencia de un promotor del gen de Δ4 desaturasa ejemplar se muestra en SEQ ID NO:24. Opcionalmente, un ácido nucleico proporcionado en el presente documento incluye un promotor del gen de Δ5 elongasa de *Thraustochytrium*. Una secuencia de un promotor del gen de Δ5 elongasa ejemplar se muestra en SEQ ID NO: 19. Un promotor del gen de Δ5 elongasa de *Thraustochytrium* es un promotor fuerte en traustoquítridos (por ejemplo, *Thraustochytrium*). Opcionalmente, un ácido nucleico proporcionado en el presente documento incluye un promotor del gen de tubulina de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Se muestran secuencias de promotores de genes de tubulina de *Thraustochytrium* ejemplares en SEQ ID NO:6 y 10. Opcionalmente, un ácido nucleico proporcionado en el presente documento incluye un promotor del gen de Δ12 desaturasa de *Thraustochytrium*. Una secuencia de un promotor del gen de Δ12 desaturasa ejemplar se muestra en SEQ ID NO:69. Opcionalmente, un ácido nucleico proporcionado en el presente documento incluye un promotor del gen de Δ5 desaturasa de *Thraustochytrium*. Una secuencia de un promotor del gen de Δ5 desaturasa ejemplar se muestra en SEQ ID NO:71. Los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento para su uso pueden tener al menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad de secuencia con las SEQ ID anteriores.

La presente solicitud también proporciona un ácido nucleico aislado que incluye un gen de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Opcionalmente, el gen proporcionado en el presente documento incluye un gen de Δ12 desaturasa de *Thraustochytrium*. Una secuencia de un gen de Δ12 desaturasa ejemplar se muestra en SEQ ID NO:70. Opcionalmente, un gen de Δ12 desaturasa puede tener al menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad de secuencia con SEQ ID NO:70. Opcionalmente, el gen de Δ12 desaturasa es una Δ12 desaturasa de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18. Opcionalmente, el gen proporcionado en el presente documento incluye un gen de Δ5 desaturasa de *Thraustochytrium*.

Una molécula de ácido nucleico aislada puede describirse por las condiciones en las que hibrida con una secuencia de ácido nucleico correspondiente. Por ejemplo, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida con una secuencia de ácido nucleico correspondiente a SEQ ID NO: 70 en condiciones rigurosas. La rigurosidad de hibridación se controla tanto por temperatura como por concentración salina de una o ambas de las etapas de hibridación y lavado. Por ejemplo, las condiciones de hibridación para conseguir hibridación selectiva pueden implicar la hibridación en solución de alta fuerza iónica (SSC 6X o SSPE 6x) a una temperatura que es aproximadamente 12-25 ºC por debajo de la Tm (la temperatura de fusión a la que la mitad de las moléculas se disocian de su compañeros de hibridación) seguido de lavado a una combinación de temperatura y concentración salina elegida para que la temperatura de lavado sea de aproximadamente 5 °C a 20 °C por debajo de la Tm. Las condiciones de temperatura y salinidad se determinan fácilmente de forma empírica en experimentos preliminares en los que se hibridan muestras de ADN de referencia inmovilizadas en filtros con un ácido nucleico marcado de interés y después se lavan en condiciones de diferentes rigurosidades. Las temperaturas de hibridación son típicamente mayores para hibridaciones de ADN-ARN y ARN-ARN. Las condiciones pueden usarse como se ha descrito anteriormente para conseguir rigurosidad, o como se conoce en la técnica. (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Kunkel et al. Methods Enzymol. 1987:154:367, 1987). Una condición de hibridación rigurosa preferible para una hibridación de ADN-ADN a aproximadamente 68 ºC (en solución acuosa) en SSC 6X o SSPE 6X seguido de lavado a 68 ºC. La rigurosidad de hibridación y lavado, si se desea, puede reducirse en consecuencia a medida que el grado de complementariedad deseado se reduce y, además, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier área en la que se busque variabilidad. Igualmente, la rigurosidad de hibridación y lavado, si se desea, puede aumentarse en consecuencia a medida que la homología aumente y, además, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier área en la que se desee alta homología, como se conoce en la técnica.

Opcionalmente, un ácido nucleico aislado que incluye un promotor de traustoquítrido o *Thraustochytrium* proporcionado en el presente documento es un casete, por ejemplo, un casete de expresión. Opcionalmente, un ácido nucleico aislado que incluye un promotor de traustoquítrido o *Thraustochytrium* proporcionado en el presente documento es un vector, por ejemplo, un vector de expresión.

Se proporcionan en el presente documento células modificadas genéticamente para incluir un gen o promotor génico de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Opcionalmente, una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* se modifica genéticamente para incluir un promotor de traustoquítrido o *Thraustochytrium*, por ejemplo, un promotor génico de Δ4 desaturasa de *Thraustochytrium*, un promotor génico de Δ5 elongasa de *Thraustochytrium*, un promotor génico de Δ12 desaturasa de *Thraustochytrium*, un promotor génico de Δ5 desaturasa de *Thraustochytrium* o un promotor génico de tubulina de *Thraustochytrium*.

Se proporcionan en el presente documento células hospedadoras modificadas genéticamente para expresar uno o más genes de traustoquítridos o *Thraustochytrium* que codifican polipéptidos de biosíntesis de AGPI. Opcionalmente, solamente se expresa un único gen para afectar a la biosíntesis de AGPI en una célula hospedadora. El gen puede ser un regulador maestro (por ejemplo, Δ12 desaturasa), cuya sobreexpresión aumenta los niveles de ácidos grasos totales y, en particular, niveles de ácidos grasos poliinsaturados. Opcionalmente, los genes que codifican uno o más péptidos de biosíntesis de AGPI se sobreexpresan aproximadamente 2 veces, 3

veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces o más en relación con los niveles de expresión en una célula de referencia. Los niveles de expresión pueden determinarse por métodos bien conocidos por los expertos en la materia, incluyendo transferencia de Western, transferencia de Northern, rtPCR y PCR en tiempo real. Opcionalmente, la expresión de una pluralidad de genes está coordinada para manipular el flujo de carbono a través de ruta o rutas de biosíntesis de AGPI. Las genes que pueden manipularse incluyen: Δ12-desaturasa, Δ9-desaturasa, Δ8-desaturasa, Δ5-desaturasa, Δ4-desaturasa, Δ9-elongasa, Δ6-elongasa, Δ5-elongasa, ácido graso sintasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS).

Como resultado de las modificaciones analizadas en el presente documento, el perfil de producción de AGPI y el contenido de ácidos grasos total de células hospedadoras o microorganismos modificados genéticamente se ve afectado de una manera predeterminada. Estos efectos pueden conseguirse mediante sobreexpresión de uno o más genes o polinucleótidos de biosíntesis de AGPI (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento). Opcionalmente, la producción de AGPI se adapta sobreexpresando al menos un polinucleótido que codifica una enzima o polipéptido enzimático de biosíntesis de AGPI (por ejemplo, Δ12 desaturasa) reduciendo al mismo tiempo de forma simultánea la expresión de un polinucleótido diferente que codifica una enzima o un polipéptido enzimático de biosíntesis de AGPI (por ejemplo, PKS). Tal como se analiza en el presente documento, estos efectos se consiguen en algunas realizaciones mediante sobreexpresión usando promotores endógenos o exógenos y/o expresando de forma coordinada o temporal un grupo de polinucleótidos de biosíntesis de AGPI para canalizar el flujo de carbono a través de la ruta de biosíntesis hasta un resultado deseado. Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento casetes de expresión y vectores capaces de aumentar el contenido de ácidos grasos total de una célula hospedadora en al menos 10 %, 20 %, 50 %, 100 % o más en relación con el contenido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico heteróloga o el promotor. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga reduce el contenido de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Por lo tanto, se proporcionan casetes de expresión y vectores capaces de reducir los niveles de ácidos grasos C12-C16 saturados y monoinsaturados en al menos 10 %, 20 %, 50 %, 100 % o más en relación con el contenido de dichos ácidos grasos en ausencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga o el promotor.

Se desvelan ácidos nucleicos aislados que incluyen un terminador génico de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Opcionalmente, un ácido nucleico proporcionado en el presente documento incluye un terminador de gen de tubulina de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Se muestran secuencias de terminadores de genes de tubulina de *Thraustochytrium* ejemplares en SEQ ID NO: 14 y 18.

Opcionalmente, un ácido nucleico aislado que incluye genes y secuencias reguladoras de traustoquítrido o *Thraustochytrium* proporcionado en el presente documento incluye un casete, por ejemplo, un casete de expresión. Opcionalmente, un ácido nucleico aislado que incluye un gen de traustoquítrido o *Thraustochytrium* proporcionado en el presente documento es un vector, por ejemplo, un vector de expresión. Los vectores de expresión recombinante para uso incluyen vectores con capacidad de expresión en células procariotas y eucariotas. Por ejemplo, los genes de traustoquítridos o *Thraustochytrium* desvelados en el presente documento pueden expresarse en células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*), células de insecto (por ejemplo, baculovirus) y levadura (véase, por ejemplo, Romanos, M. A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8:423-488; van den Hondel, C. A. M. J. J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", en: More Gene Manipulations in Fungi, J. W. Bennet y L. L. Lasure, Ed., pág. 396-428: Academic Press: San Diego; y van den Hondel, C. A. M. J. J., y Punt, P. J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, en: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J. F., et al., Ed., pág. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge). Se conocen en la técnica métodos de expresión génica en diversas células hospedadoras y vectores apropiados para dicha expresión. (véase, por ejemplo, Gene Expression Systems, Fernández, J. y Hoeffler, J.P. Ed., Academic Press: San Diego, 1ª Ed. (1998)) Múltiples casetes de expresión, que comprenden cada uno un gen diferente desvelado en el presente documento o el mismo gen bajo el control de elementos reguladores diferentes, pueden introducirse en una célula hospedadora por transformación simultánea de una pluralidad de vectores de expresión. Adicionalmente o como alternativa, pueden situarse múltiples casetes de expresión dentro de un único vector de expresión o vector.

Se proporcionan ácidos nucleicos aislados que incluyen uno o más elementos reguladores génicos. Opcionalmente, los elementos reguladores génicos incluidos facilitan la regulación génica inducible. Los ejemplos no limitantes de sistemas inducibles que pueden emplearse en combinación con ácidos nucleicos proporcionados incluyen sistemas inducibles por tetraciclina, sistemas inducibles por etanol y sistemas de expresión génica inducibles químicamente. (Véase, por ejemplo Park y Morschhäuser (2005), Li *et al.* (2005), y Jepson *et al.* (1998).

Los ácidos nucleicos que tienen secuencias reguladoras proporcionados en el presente documento pueden unirse operativamente a una secuencia heteróloga, tal como un gen que codifica un polipéptido heterólogo. Por ejemplo, se proporcionan casetes de expresión génica que comprenden típicamente un gen de traustoquítrido o *Thraustochytrium* unido operativamente con secuencia de ácido nucleico heteróloga, que está unida operativamente a un terminador génico de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. En un ejemplo no limitante, un casete génico

comprende un promotor génico de Δ12 desaturasa de *Thraustochytrium*, unido operativamente a un polinucleótido que codifica una Δ5 desaturasa de *Thraustochytrium*. Opcionalmente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga comprende al menos parte de una secuencia codificante en un gen, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica un producto génico tal como un polipéptido o ARN. Opcionalmente, los casetes de expresión génica proporcionados incluyen además un marcador de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a zeocina tal como *Sh ble,* o cualquier otro marcador de selección analizado en el presente documento). Opcionalmente, los casetes de expresión génica proporcionados incluyen además un gen indicador (por ejemplo, proteínas fluorescentes (GFP, YFP, RFP), luciferasa, mCherry, GUS (β-glucuronidasa y β-galactosidasa).

Las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento pueden unirse operativamente a secuencias promotoras distintas de traustoquítridos. Los ejemplos pueden incluir promotores hallados en bacterias, tales como *Lac*, *pBAD, Tet,* promotores de levadura tales como *TDH3, ADH1, TPI1, ACT1, GPD, PGI, GAL1, GAL7* y *GAL10.* Promotores víricos eucariotas tales como SV40 o, adicionalmente, elementos promotores pueden aislarse de microalgas, por ejemplo, *Rbcs2, PsaD, Nac2, PsbA, PspD, FcpA* y *Hsp70A* Muchos elementos de control reguladores, incluyendo diversos promotores, están activos en diversas especies. Por lo tanto, los promotores génicos desvelados en el presente documento pueden usarse para conducir la expresión de genes de biosíntesis de ácidos grasos de o en cualquiera de las células hospedadoras descritas en el presente documento. Igualmente, pueden usarse promotores específicos y constitutivamente activos aislados de células hospedadoras descritos en el presente documento para conducir la expresión de cualquiera de los genes de traustoquítridos o *Thraustochytrium* desvelados en el presente documento.

Tal como se describe en el presente documento, los promotores génicos de traustoquítridos o *Thraustochytrium* pueden unirse operativamente a secuencias de ácido nucleico heterólogas para conducir la expresión de las secuencias. Opcionalmente, los promotores génicos son operativos acoplados o unidos a secuencias de ácido nucleico dentro de un casete de expresión o vector de expresión génica. Opcionalmente, los promotores génicos se insertan (por ejemplo, por recombinación homóloga) en una localización apropiada dentro del genoma de una célula hospedadora para conducir la expresión de un gen de biosíntesis de AGPI dentro de la célula hospedadora. La recombinación homóloga se ha demostrado previamente en microalgas, por ejemplo, *Chlorella vulgaris* (Dawson, Burlingame et al. 1997) y *Nannochloropsis* sp., demuestran ambos recombinación homóloga eficaz (Kilian, Benemann et al. 2011). Opcionalmente, puede conseguirse acoplamiento operativo mediante recombinación no homóloga. La recombinación no homóloga es habitual entre microalgas y difiere de la recombinación homóloga porque esa integración en el ADN genómico de célula hospedadora es independiente de la similitud de secuencia de ADN. La recombinación no homóloga ofrece la ventaja de una serie de propiedades de expresión génica dentro de una población transformada de células, que permiten la expresión génica adaptada y optimizada. La recombinación no homóloga en microalgas se ha descrito previamente en, por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardiii* (Kindle 1990), *Volvox carteri* (Hallmann y Sumper 1994; Schiedlmeier, Schmitt et al. 1994), *Phaeodactylum tricornutum* (Apt, Grossman et al. 1996), *Thalassiosira pseudonana* (Poulsen, Chesley et al. 2006).

Opcionalmente, tanto el promotor génico como la secuencia de ácido nucleico se aíslan de traustoquítrido o *Thraustochytrium.* Opcionalmente, las secuencias de ácido nucleico codifican péptidos de biosíntesis de AGPI. Opcionalmente, los promotores génicos de traustoquítridos o *Thraustochytrium* y secuencias de ácido nucleico con las que se acoplan operativamente se transforman en una célula hospedadora de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. El promotor génico y/o las secuencias de ácido nucleico con las que se acopla o une operativamente pueden ser exógenos de una célula hospedadora. La expresión de un gen de desaturasa de traustoquítrido o *Thraustochytrium* puede verse afectada por la colocación del gen bajo el control de un promotor heterólogo. Los promotores heterólogos provocan que el gen se exprese diferencialmente con respecto a sus patrones de expresión temporal o secuencial normales dentro de las rutas de biosíntesis de AGPI. Por lo tanto, se puede optimizar o coordinar la expresión de cualquier polipéptido de biosíntesis de AGPI para manipular el flujo de carbono a través de las rutas de biosíntesis y dirigir el carbono a un producto final específico (por ejemplo, ARA, DHA o EPA).

Los promotores génicos de traustoquítrido o *Thraustochytrium* pueden unirse operativamente a genes de rutas biosintéticas de AGPI de traustoquítrido o *Thraustochytrium.* Los promotores génicos de biosíntesis de AGPI pueden verse influidos por el estadio de crecimiento, las condiciones de cultivo y la disponibilidad del sustrato. En general, cada promotor y/o gen puede actuar de forma independiente, permitiendo que cada uno se retire o incluya usando técnicas de biología molecular convencionales; proporcionando de este modo cepas de traustoquítrido o *Thraustochytrium* modificadas genéticamente optimizadas para producción de un AGPI particular o producción de ácidos grasos totales con intervalos de componentes optimizados. Por ejemplo, se proporcionan cepas modificadas genéticamente que producen composiciones oleosas que contienen menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 % y menos del 5 % de componentes de AGPI de cadena larga.

Opcionalmente, se usa un promotor de Δ12 desaturasa para conducir la expresión de una Δ5 desaturasa. Opcionalmente, se usa un promotor de Δ12 desaturasa para conducir la expresión de ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS). Opcionalmente, se usa un promotor de Δ5 desaturasa para conducir la expresión de un gen o grupo de genes responsable de la producción de DHA. Por ejemplo, se usa un promotor de Δ5 desaturasa para conducir la expresión de ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ4

desaturasa, Δ12 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS).

Opcionalmente, la modificación genética reduce la expresión de uno o más polipéptidos de biosíntesis de AGPI. Esta reducción en la expresión puede conseguirse por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo reducción de la transcripción, traducción, activación o disponibilidad de polipéptidos de AGPI deseados. Por ejemplo, colocar el gen bajo el control de promotores heterólogos reduce la expresión de un gen de desaturasa de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Tal como se analiza en el presente documento, los promotores heterólogos provocan que el gen se exprese diferencialmente con respecto a sus patrones de expresión temporal o secuencial normales dentro de las rutas de biosíntesis de AGPI. Cuando una modificación genética reduce la expresión de uno o más péptidos de biosíntesis de AGPI, la expresión reducida puede detener o ralentizar el flujo de carbono para productos finales indeseados. Por ejemplo, la expresión de un gen de desaturasa de traustoquítrido o *Thraustochytrium* se reduce para evitar o inhibir la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Opcionalmente, la expresión de un gen de Δ12 desaturasa de traustoquítrido o *Thraustochytrium* (por ejemplo, SEQ ID NO:70) se reduce para inhibir la síntesis de ácidos grasos con una cadena de carbono mayor de 18 (C18) y un nivel de desaturación mayor 1 (C18:1) en la ruta de elongación/desaturación convencional. El efecto de esta modificación es un perfil de producción de AGPI en el que se reducen AGPI C18:2 y C:22. Dichas modificaciones pueden ser útiles para la producción de biocombustibles en los que se desee un bajo porcentaje de AGPI C18:2 y C:22.

Cualquiera de las manipulaciones genéticas desveladas en el presente documento pueden combinarse también con modificación genética de efectores secundarios de síntesis de AGPI. Por ejemplo, genes reguladores tales como genes para inductores, represores, factores de transcripción, estabilizadores, transportadores o cualquier gen que regule la expresión de uno o más genes de la ruta de biosíntesis de AGPI pueden introducirse en una célula hospedadora para afectar a la síntesis de AGPI de una manera predeterminada.

Cualquiera de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento puede combinarse con cualquier otra modificación conocida ahora o desarrollada posteriormente. Por ejemplo, la sobreexpresión o expresión reducida de un gen de desaturasa de traustoquítrido o *Thraustochytrium* (por ejemplo, Δ12 desaturasa) puede combinarse con modificaciones de las ortioesterasas de la ruta de PKS. Los ejemplos no limitantes de modificaciones genéticas adicionales incluyen: acil-CoA deshidrogenasa(s), acil-ACP (proteína transportadora de acilo) desaturasa(s), acil-ACP tioesterasa(s), ácido graso aciltransferasa(s), acil-CoA:lisofosfolípido aciltransferasas, ácido graso sintasa(s), ácido graso hidroxilasa(s), acetil-coenzima A carboxilasa(s), acil-coenzima A oxidasa(s), ácido graso desaturasa(s), ácido graso acetilenasa(s), lipoxigenasa(s), triacilglicerol lipasa(s), óxido de aleno sintasa(s), hidroperóxido liasa(s) o ácido graso elongasa(s) o combinaciones de los mismos.

Los procedimientos de biología molecular y manipulación de ADN pueden realizarse en general de acuerdo con Sambrook et al. o Ausubel et al. (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (eds). 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nueva York; Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K (eds). 1998. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley: Nueva York).

Mutagénesis

La presente descripción desvela agentes y/o métodos para mutar microorganismos, así como cepas y/o células producidas por mutagénesis. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, se ha descubierto que antibióticos tales como bleomicinas, fleomicinas y/o talisomicinas pueden usarse para mutar microorganismos. La disponibilidad de dichos mutágenos eficaces para microorganismos tales como traustoquítridos (por ejemplo, *Thraustochytrium*) permite el desarrollo de cepas que tienen características deseadas. En particular, la presente divulgación demuestra que puede usarse zeocina (fleomicina D1) para mutar microorganismos tales como traustoquítridos (por ejemplo, *Thraustochytrium*).

El antibiótico zeocina es un glicopéptido quelado con cobre, soluble en agua, básico, de caldo de cultivo de un mutante de *Streptomyces verticillus* (InvivoGen, San Diego, CA, EE.UU.). La zeocina es un miembro del grupo de fleomicina de antibióticos, que son glucopéptidos que se han usado ampliamente como agentes antitumorales potentes contra linfomas, cánceres de cabeza y cuello y cáncer testicular (Umezawa et al., New antibiotics, bleomycin A and B, Journal of Antibiot., (1966)19:200-209; Sikic et al., Bleomycin Chemotherapy, Academic Press, Orlando, Florida, (1985)). Se cree en general que el modo de acción molecular de estos antibióticos está relacionado con su capacidad para unirse a ADN por intercalación de su resto que contiene bitiazol planar y escindir ADN dando como resultado rotura de una cadena o rotura de doble cadena que provoca muerte celular (Povirk et al., Nucleic Acids Research, (1977) 4:3573-3580). Debido a su toxicidad para un amplio espectro de tipos celulares, este grupo de antibióticos se emplea como fármacos para selección positiva. La presente divulgación abarca el descubrimiento de que la zeocina es un mutágeno útil para mejora de cepas microbianas industriales. Adicionalmente, se muestra en el presente documento que a determinadas concentraciones a las que la zeocina destruye la mayoría de células tratadas, las células supervivientes tienen frecuencia de mutación aumentada. La capacidad de producir células con frecuencia de mutación aumentada permite selección y aislamiento más fáciles de cepas mutadas.

También se desvelan sistemas y/o métodos para mutar células de traustoquítridos. Opcionalmente, se desvelan

sistemas y métodos para mutar células seleccionadas del grupo que consiste en células de *Thraustochytrium*, células de *Ulkenia*, células de *Schizochytrium*, células de *Aurantiochytrium*, células de *Aplanochytrium*, células de *Botryochytrium,* células de *Japanochytrium,* células de *Oblongichytrium*, células de *Parietichytrium*, células de *Sicyoidochytrium*, hongos de *Mortierella,* algas de crecimiento heterotrófico (por ejemplo, una especie del género *Crypthecodinium*). Opcionalmente, se proporcionan sistemas y/o reactivos para mutagénesis de ONC-T18.

Opcionalmente, un microorganismo se muta mediante la aplicación a un medio sólido adecuado (por ejemplo, medio de agar) que comprende un antibiótico relevante (por ejemplo, zeocina), en el que el antibiótico está presente a una concentración por debajo de la concentración a la que muestra inhibición completa o casi completa del crecimiento celular. Los microorganismos usados para estos métodos no portan un gen de resistencia a zeocina (por ejemplo, *Sh ble*). Opcionalmente, el antibiótico (por ejemplo, zeocina) se usa para mutagénesis a una concentración por debajo de la concentración a la que destruye al menos 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de células de ese tipo. Opcionalmente, el antibiótico (por ejemplo, zeocina) se usa para mutagénesis a una concentración por encima de la concentración a la que destruye al menos 30 %, 40 %, 50 % o 60 % de células de ese tipo. Opcionalmente, el antibiótico (por ejemplo, zeocina) se usa para mutación. Opcionalmente, el antibiótico se usa a una concentración y en condiciones en las que aumenta la frecuencia de mutación en células expuestas a él por encima de la de mutación espontánea observada para las células. Opcionalmente, el antibiótico se usa a una concentración y en condiciones en las que inhibe el crecimiento o destruye 60-80 % de células de ese tipo.

Las células ONC-T18 son altamente sensibles a zeocina a una concentración de 100 ug/ml (véase Ejemplo 3). Por lo tanto, la zeocina puede usarse para mutagénesis a una concentración por debajo de 100 g/ml (por ejemplo, a 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35 o 30 g/ml). Opcionalmente, la zeocina se usa para mutagénesis a una concentración de aproximadamente 50 g/ml. Opcionalmente, el medio en el que las células se mutan con zeocina tiene una concentración salina de 18 g/l o menos. Las células mutadas pueden mostrar cambios de morfología en relación con células cultivadas a concentraciones menores o en ausencia del mutágeno. Como ejemplo, las células mutadas pueden mostrar velocidad de crecimiento, color y/o cantidad de lípidos específicos alterados.

Opcionalmente, las células (por ejemplo, células de traustoquítrido o *Thraustochytrium*) se siembran en extensión en un medio sólido que contiene antibiótico (por ejemplo, zeocina) a una concentración de 1-1000 µg/ml. Opcionalmente, las células se siembran en extensión en un medio sólido que comprende antibiótico (por ejemplo, zeocina) a una concentración de aproximadamente 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 1 g/ml, 5 g/ml o más. Las colonias que surgen en estas condiciones después de al menos 4 días (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días) se aíslan. Las células aisladas pueden ensayarse con respecto a una característica deseada resultante de mutagénesis. Por ejemplo, las células de colonias mutadas pueden compararse con células de referencia (por ejemplo, células parentales) para detectar un cambio en una característica, tal como productividad de biomasa y/o lípidos.

Se proporcionan microorganismos (por ejemplo, traustoquítrido o *Thraustochytrium*) aislados por mutagénesis de antibiótico (por ejemplo, zeocina). Opcionalmente, una cepa microbiana (por ejemplo una cepa de *Thraustochytrium*) aislada por mutagénesis de antibiótico (por ejemplo, zeocina) produce al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % más lípidos totales que una cepa parental o de referencia. Opcionalmente, una cepa de traustoquítrido aislada por mutagénesis de zeocina produce al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % más ALA, ARA, DHA, DPA, EPA, GLA y/o LA, o una combinación de los mismos, que una cepa parental. Opcionalmente, una cepa de traustoquítrido aislada por mutagénesis de zeocina produce al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % más ARA, DHA, EPA, o una combinación de los mismos, que una cepa parental.

Una cepa particular de ONC-T18 aislada por mutagénesis de zeocina produce aproximadamente 36 % más DHA que su cepa parental.

Selección

Se desvelan métodos para seleccionar microorganismos tales como traustoquítridos (por ejemplo, *Thraustochytrium*). Dichos métodos pueden usarse junto con y/o como parte de, por ejemplo, métodos de transformación como se describen en el presente documento para manipular genéticamente los microorganismos.

En general, en los métodos de selección desvelados, se usa un agente de selección para favorecer el crecimiento de microorganismos que porten un marcador seleccionable adecuado para el agente de selección por encima de microorganismos que no porten el marcador seleccionable. Típicamente el agente de selección inhibe, reduce y/o ralentiza el crecimiento de microorganismos que no portan el marcador de selección. Durante la selección, los microorganismos se cultivan típicamente en medio de cultivo tal como se describe en el presente documento, excepto que el medio de cultivo se complementa con el agente de selección («medio de selección»).

Opcionalmente, los microorganismos se cultivan en medio de selección durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el cultivo llegue a consistir predominantemente en células que porten el marcador de selección. Es decir, durante el periodo de crecimiento en medio de selección, las células que no portan el marcador de selección

no crecen y son alcanzadas en el cultivo por células que no portan el marcador de selección. Opcionalmente, los microorganismos se cultivan en medio de selección durante entre 1 y 15 días, 1 y 12 días o 1 y 9 días. Opcionalmente, los microorganismos se cultivan en medio de selección durante un periodo de tiempo mayor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días y/o menor de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 días. Opcionalmente, los microorganismos se cultivan en medio de selección durante entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 días, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 días. Opcionalmente, los microorganismos se mantienen en medio de selección después de la selección. Opcionalmente, los microorganismos se transfieren a un medio sin un agente de selección durante al menos un periodo de tiempo, por ejemplo, durante una fase de recuperación.

Opcionalmente, el marcador seleccionable se retira después de que las células se hayan cultivado durante un periodo de tiempo en medio de selección. La retirada del marcador seleccionable puede realizarse inmediatamente después del periodo de tiempo en el que las células se cultivan en medio de selección, después de un «periodo de recuperación» durante el que las células se cultivan en medio sin un agente de selección, o posteriormente (por ejemplo, después de que las células se hayan almacenado durante un periodo de tiempo, después de que las células se hayan congelado y después descongelado). Se conocen bien en la técnica métodos para modificar por ingeniería genética células de modo que los elementos genéticos introducidos (por ejemplo, marcadores seleccionables) puedan después retirarse. Dichos métodos emplean típicamente el uso de polipéptidos de recombinasa, que reconocen típicamente secuencias de nucleótidos particulares («sitios de reconocimiento» o «secuencias de reconocimiento»). Por ejemplo, un marcador seleccionable puede introducirse mediante manipulación genética en una célula de traustoquítrido o *Thraustochytrium* con sitios de reconocimiento para una recombinasa particular que flanquea el marcador seleccionable. Cuando se desea suprimir el marcador seleccionable, las células pueden exponerse a una recombinasa apropiada (es decir, una recombinasa que reconoce los sitios de reconocimiento que flanquean el marcador seleccionable), que realiza una reacción de recombinación homóloga en los sitios de reconocimiento, dando como resultado la supresión o inversión de la secuencia de ácido nucleico entre los sitios de reconocimiento.

Opcionalmente, el agente de selección es o comprende un antibiótico y el marcador de selección es o comprende un gen de resistencia para el antibiótico.

Opcionalmente, se usa una combinación de agentes de selección y/o una combinación de marcadores de selección.

Opcionalmente, un microorganismo experimenta selección por aplicación a un medio adecuado que comprende zeocina, en el que la zeocina está presente a una concentración por encima de una concentración umbral.

La concentración umbral puede corresponder aproximadamente a una concentración a la que zeocina muestra inhibición completa o casi completa del crecimiento de células que no contienen un gen de resistencia a zeocina. Opcionalmente, la concentración umbral está a o por encima de la concentración a la que la zeocina destruye al menos 85 %, 90 % o 100 % de células de ese tipo que no contienen un gen de resistencia a zeocina. Opcionalmente, la concentración umbral puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo (por ejemplo, concentración salina, tipo de medio de cultivo, temperatura de cultivo, cultivo líquido o sólido, etc.). Opcionalmente, la concentración umbral está por encima de 50 µg/ml. Opcionalmente, la concentración umbral está a o por encima de 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 µg/ml. Opcionalmente, la concentración umbral está a o por encima de 100 µg/ml.

El gen de resistencia a antibióticos puede ser o puede incluir un gen de resistencia a fleomicina, bleomicina y/o talisomicina. Opcionalmente, el gen de resistencia a antibióticos es o comprende un gen (por ejemplo, el gen *ble*) de *S. hidustanus*.

La concentración salina del medio usado durante la selección puede diferir de una concentración salina típicamente usada en medio usado para cultivo del microorganismo sin selección. Opcionalmente, la concentración salina en el medio usado durante la selección es aproximadamente la misma que una concentración salina típicamente usada en medio usado para cultivo del microorganismo sin selección. Opcionalmente, la concentración salina es entre aproximadamente 10 g/l y aproximadamente 40 g/l, entre aproximadamente 15 g/l y aproximadamente 35 g/l y/o entre aproximadamente 18 g/l y aproximadamente 35 g/l. Opcionalmente, la concentración salina es aproximadamente 18 g/l. Opcionalmente, la concentración salina es aproximadamente 35 g/l.

Opcionalmente, se usa una concentración de zeocina a o por encima de 30 µg/ml cuando el medio de cultivo tiene una concentración salina de aproximadamente 18 g/l. Opcionalmente, se usa una concentración de zeocina a o por encima de 100 µg/ml cuando el medio de cultivo tiene una concentración salina de aproximadamente 35 g/l.

El medio adecuado usado durante la selección puede ser un medio sólido. Cuando se usa un medio sólido, los microorganismos pueden esparcirse (por ejemplo, usando una asa de inoculación, un esparcidor de células, perlas u otro mecanismo para esparcir) en una superficie plana del medio sólido de modo que se puedan dejar crecer colonias de células individuales.

Las colonias de células individuales pueden seleccionarse y cultivarse para obtener cantidades mayores y/o suficientes para análisis (por ejemplo, análisis transgénico, análisis de características de crecimiento, análisis de perfil lipídico, etc.) y/o producción de compuestos tal como se describen en el presente documento. Como alternativa o adicionalmente, pueden almacenarse colonias de células individuales y/o cultivos obtenidos de las mismas (por ejemplo, congelando en un medio de congelación apropiado) para su uso posterior.

Transformación

Se desvelan métodos para transformar células de traustoquítrido (por ejemplo, *Thraustochytrium*). Dichos métodos incluyen en general etapas de proporcionar una célula de traustoquítrido competente; suministrar un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, recombinante o modificado genéticamente) a la célula competente, en el que el ácido nucleico recombinante comprende un marcador seleccionable; y cultivar la célula competente en un medio de cultivo que contiene un agente de selección que reduce el crecimiento de células sin el marcador seleccionable.

La presente divulgación proporciona células de traustoquítridos competentes para transformación genética. Opcionalmente, las células competentes son de la cepa ONC-T18. Dichas células competentes pueden proporcionarse por cualquiera de una diversidad de métodos, un ejemplo no limitante de los cuales se describe en más detalle en el Ejemplo 5. En métodos de preparación de células competentes tales como el descrito en el Ejemplo 5, se obtienen células competentes inoculando medio sólido o líquido con inóculo de una cepa deseada de traustoquítrido o *Thraustochytrium* y permitiendo que las células crezcan, aportando medio de cultivo nuevo según sea necesario. La preparación de células competentes típicamente implica una o más fases de crecimiento en un medio líquido seguido de centrifugación de las células y resuspensión de las células en líquido estéril hasta una densidad celular deseada. Pueden prepararse células competentes nuevas según sea necesario para experimentos y/o pueden prepararse y después almacenarse (por ejemplo, congeladas) para uso futuro.

Opcionalmente, las células se cultivan en matraces (por ejemplo, de volúmenes de 250 ml, 500 ml o 1 l).

Opcionalmente, las células se cultivan en un medio rico en fuente de nitrógeno. Como ejemplo, las células se cultivan en un medio con altos niveles de peptona. Opcionalmente, las células se cultivan en un medio que comprende al menos 5-25 g/l de peptona (u otra fuente de nitrógeno).

Opcionalmente, las células se cultivan en altos niveles de oxígeno disuelto. Opcionalmente, las células se agitan durante el crecimiento, por ejemplo, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500, o de aproximadamente 125 a aproximadamente 400, o de aproximadamente 150 a aproximadamente 300 rpm.

Opcionalmente, las células se mutan durante la propagación vegetativa o durante la propagación vegetativa vigorosa. Opcionalmente, las células no se mutan durante los estadios de zoospora.

El ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, recombinante, sintetizado (bien química o bien biológicamente) y/o modificado genéticamente por su secuencia de ácido nucleico fue seleccionada por la mano del hombre) puede ser un ADN, un ARN, un híbrido de ARN:ADN, o cualquier derivado adecuado de los mismos. Opcionalmente, el ácido nucleico recombinante se suministra como parte de un vector. Cualquiera de una diversidad de vectores puede ser adecuado para su uso de acuerdo con métodos de la divulgación incluyendo, pero sin limitación, plásmidos, cósmidos, BAC (cromosomas artificiales bacterianos), YAC (cromosomas artificiales de levadura) y vectores víricos. El ADN heterólogo puede ser o puede incluir polinucleótidos sintetizados químicamente. Opcionalmente, el ADN heterólogo puede comprender polinucleótidos sintetizados enzimáticamente. Opcionalmente, el ADN heterólogo es o comprende un productor de reacción en cadena de la polimerasa («PCR»).

Los ácidos nucleicos recombinantes o modificados genéticamente comprenden típicamente un marcador de selección para su uso en métodos de selección como se describen en el presente documento. Normalmente, el marcador de selección comprende un casete de expresión génica que permite la expresión de un producto génico que, cuando está presente en una célula, permite el crecimiento de la célula en medio de selección que contiene un agente de selección en o por encima de una concentración umbral tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, cuando se usa un antibiótico como un agente de selección, el marcador de selección puede incluir un casete de expresión génica para expresar un gen de resistencia a antibióticos correspondiente.

Los ácidos nucleicos recombinantes o modificados genéticamente pueden incluir además uno o más casetes de expresión génica para expresión de uno o más productos génicos deseables. Uno o más productos génicos deseables representativos pueden incluir, por ejemplo, un polipéptido que tiene valor comercial, y/o puede ser un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido enzimático u otro componente de ruta biosintética) que es importante para la síntesis de uno o más productos corriente abajo (por ejemplo, compuestos tales como AGPI) que tienen valor comercial. Como alternativa o adicionalmente, un producto génico deseable puede conferir determinadas características deseables al microorganismo (por ejemplo, idoneidad para crecimiento un conjunto de condiciones particular; idoneidad para crecimiento en métodos de producción a gran escala, etc.). Como alternativa o adicionalmente, un producto génico deseable puede ser uno que permita el marcaje de células que se han

transformado. Como alternativa o adicionalmente, las células se modifican genéticamente para producir niveles elevados de uno o más biocombustibles, fármacos, vacunas, anticuerpos, lípidos, resolvinas, neuroprotectinas, compuestos farmacéuticos, polipéptidos, etc.

Se han descrito en el presente documento elementos que están contenidos típicamente en un casete de expresión génica, por ejemplo, un promotor u otro elemento regulador génico que conduce la expresión del gen, el gen para expresar y una secuencia terminadora que actúa en el microorganismo para transformar. El gen para expresar puede denominarse «transgén». El transgén puede ser un gen heterólogo, por ejemplo, uno que normalmente no está presente en el microorganismo. Uno o ambos del marcador de selección y el casete de expresión génica adicional pueden incluir dicho gen heterólogo.

Por consiguiente, los vectores adecuados para uso de acuerdo con métodos de la divulgación incluyen vectores de expresión génica.

Opcionalmente, un ácido nucleico recombinante se suministra a un microorganismo. Por ejemplo, un microorganismo puede transformarse con una construcción plasmídica que comprende un ácido nucleico recombinante.

Opcionalmente, más de un ácido nucleico recombinante se suministra a un microorganismo. Por ejemplo, una combinación de construcciones plasmídicas (comprendiendo cada construcción plasmídica un ácido nucleico recombinante) puede suministrarse a un microorganismo. Opcionalmente, se usa una combinación de agentes de selección y marcadores de selección para seleccionar con respecto a la presencia de la combinación de ácidos nucleicos recombinantes deseados.

Cualquiera de una diversidad de métodos para introducir material genético (por ejemplo, material genético que comprende un ácido nucleico recombinante) en una célula puede ser adecuado para su uso de acuerdo con métodos de transformación de la presente divulgación. Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, precipitación de fosfato cálcico; tratamiento con Ca^{2+}; fusión de células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ácido nucleico recombinante; tratamiento de las células receptoras con liposomas que contienen el ácido nucleico recombinante; DEAE dextrano; fusión usando polietilenglicol (PEG); electroporación; magnetoporación; suministro biolístico; infección retrovírica; lipofección; y microinyección de ADN directamente en células.

Puede usarse un método de suministro biolístico (también conocido como método de «cañón génico», «bombardeo de partículas» y «microproyectiles»). Un dispositivo biolístico acelera partículas recubiertas con el ácido nucleico recombinante hasta velocidades suficientes para penetrar membranas celulares (y/o paredes celulares, si están presentes). Opcionalmente, las partículas comprenden o consisten en partículas de oro. Se conocen en la técnica métodos para suministro biolístico de material genético y están disponibles en el mercado equipamiento y reactivos para realizar dichos suministros biolísticos. Véanse, por ejemplo, Sanford et al., Part. Sci. Technol. 5:27 (1987), Sanford, J. C., Trends Biotech. 6:299 (1988), Sanford, J. C., Physiol. Plant 79:206 (1990) y Klein et al., Biotechnology 10:268 (1992).

Opcionalmente, se suministran ácidos nucleicos usando un método tal como transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación de protoplastos, etc, como conocerían y entenderían los expertos habituales en la materia.

Después del suministro de un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, recombinante o modificado genéticamente), las células se cultivan en un medio que contiene un agente de selección que reduce el crecimiento de células sin el marcador seleccionable, tal como se describe en el presente documento en la sección de «selección». Las células que se seleccionan (por ejemplo, muestran presencia del marcador seleccionable y por lo tanto del ácido nucleico recombinante) pueden almacenarse, analizarse y/o cultivarse en mayores cantidades según se desee.

Opcionalmente, las células transformadas se someten a uno o más análisis para confirmar la presencia del ácido nucleico recombinante. Por ejemplo, puede usarse un análisis de PCR para confirmar la presencia de un elemento genético, por ejemplo, un transgén y/o un marcador seleccionable, que es parte del ácido nucleico recombinante.

Cepas modificadas genéticamente

La presente divulgación proporciona, entre otros, genes, secuencias reguladoras, construcciones de ácido nucleico, métodos de transformación, métodos de mutagénesis y métodos de selección genética que permiten la manipulación de determinados microorganismos tales como traustoquítridos. Las composiciones y los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para modificar genéticamente microorganismos (por ejemplo, traustoquítridos) para cualquiera de varias aplicaciones. Tal como se indica en el presente documento, genes, secuencias reguladoras, construcciones de ácido nucleico y marcadores seleccionables proporcionados en el presente documento pueden usarse para expresar cualquier polipéptido de interés en un organismo en el que las

secuencias y/o marcadores seleccionables son operativos (por ejemplo, en traustoquítridos). Opcionalmente, se expresa un polipéptido de un organismo diferente. Opcionalmente, se expresa un polipéptido de la célula hospedadora (por ejemplo, se sobreexpresa).

Los microorganismos pueden modificarse genéticamente para tener producción aumentada de un compuesto de interés. Opcionalmente, los microorganismos se modifican genéticamente para tener producción aumentada de un ácido graso, un antioxidante, resolvinas y/o protectinas. Como alternativa o adicionalmente, las células se modifican genéticamente para producir niveles elevados de uno o más biocombustibles, fármacos, vacunas, anticuerpos, lípidos, resolvinas, neuroprotectinas, compuestos farmacéuticos, polipéptidos, etc.

La presente divulgación proporciona microorganismos traustoquítridos (por ejemplo, *Thraustochytrium*) que se modifican genétiicamente para tener perfiles de producción de AGPI adaptados. Es decir, se proporcionan células de traustoquítridos modificadas genéticamente que incluyen al menos una modificación de aumento de AGPI y/o al menos una modificación de reducción de AGPI, combinaciones de las mismas y composiciones de AGPI con intervalos específicos de ácidos grasos particulares. Opcionalmente, dichos microorganismos se modifican genéticamente para tener expresión alterada (por ejemplo, aumentada o reducida) de al menos un polipéptido de biosíntesis de AGPI.

Como se representa en la Fig. 1, la biosíntesis de AGPI en ONC-T18 implica la generación de ácidos grasos tales como ácido mirístico (C14:0) y ácido esteárico (C18:0) por el complejo enzimático de ácido graso sintasa (AGS), seguido de una serie de reacciones enzimáticas sobre dichos ácidos grasos. Cada una de estas reacciones se cataliza típicamente por una desaturasa (que retira átomos de hidrógeno para crear un doble enlace carbono-carbono) o una elongasa (que alarga los ácidos grasos añadiendo dos átomos de carbono al extremo de ácido carboxílico del ácido graso). El complejo de poliquétido AGPI sintasa (PKS) también genera DHA en ONC-T18. La biosíntesis de AGPI en ONC-T18 parece tener al menos dos rutas biosintéticas que interseccionan: las rutas biosintéticas de AGPI omega-6 y omega-3. La conversión de ácidos grasos omega-6 a ácidos grasos omega-3 3 puede catalizarse por omega-3 desaturasa. Por lo tanto, como se representa en la Fig. 1, se produce una diversidad de ácidos grasos en diversos puntos en la ruta. Todas y cada una de las combinaciones de estos puntos pueden manipularse mediante los genes, secuencias reguladoras y marcadores seleccionables proporcionados en el presente documento.

La expresión de uno o más genes que codifican polipéptidos enzimáticos en la ruta puede regularse para aumentar la producción de AGPI particulares y/u otros ácidos grasos según se desee. Por ejemplo, la expresión del gen de AGS puede regularse negativamente para aumentar la producción de AGPI. La regulación negativa de la expresión de la Δ5 elongasa, Δ4 desaturasa, Δ12 desaturasa y/o cualquiera de los genes de PKS puede aumentar la producción de EPA y/o la producción de AGPI. La regulación negativa de la expresión de uno cualquiera de los genes de PKS puede aumentar la producción de ARA. La regulación positiva de la expresión de cualquiera de los genes de PKS puede aumentar la producción de DHA. La regulación positiva de la expresión del gen de la Δ5 desaturasa puede aumentar la producción de ARA y EPA. La regulación positiva del gen de la Δ12 desaturasa puede reducir ácidos grasos C12-C18 saturados o monoinsaturados, (por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico), aumentando de este modo la grasa total. En consecuencia, la reducción o eliminación de la expresión aumentaría la concentración de ácidos grasos C12-C18 saturados y monoinsaturados, reduciendo al mismo tiempo de forma drástica los niveles de ácidos grasos C18-C22 multisaturados (por ejemplo, ácido linoleico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico) y AGPI n-3 y n-6 corriente abajo.

Opcionalmente, la expresión de uno o más genes que codifican polipéptidos enzimáticos en la ruta se regula para producir biocombustibles. Por ejemplo, la regulación negativa de la expresión de cualquiera de los genes de PKS, Δ9 desaturasa, Δ12 desaturasa, elongasa) y omega-3 desaturasa, y/o regulación positiva de la expresión de genes de AGS pueden aumentar la producción de lípidos de cadena corta para su uso como reservas de biocombustible. Si se desea un perfil de producción de AGPI optimizado para biocombustible, entonces un experto en la materia podría usar los polinucleótidos, métodos y células hospedadoras desvelados en el presente documento para unir operativamente un promotor heterólogo de un gen de Δ12 desaturasa para conducir la expresión de una Δ5 desaturasa endógena o exógena, adaptando de este modo la producción de AGPI a ARA y EPA. Opcionalmente, un perfil de producción de AGPI (que comprende todas las rutas de biosíntesis de ácidos grasos y los productos resultantes) puede adaptarse para producir composiciones predeterminadas que comprenden al menos dos productos de ácidos grasos dentro de un intervalo o intervalos específicos optimizados para una utilidad particular (por ejemplo producción de biocombustible). Por ejemplo, es deseable en general minimizar los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga («AGPICL»; por ejemplo, DHA) en biocombustibles. Mediante manipulación de los polipéptidos de biosíntesis de AGPI y sus secuencias de ácido nucleico correspondientes desveladas en el presente documento, opcionalmente junto con condiciones de cultivo particularizadas, es posible producir una composición oleosa de ácidos grasos en la que los niveles de AGPICL son menores de aproximadamente 25 % del contenido de ácidos grasos total. Opcionalmente, se producen composiciones oleosas de ácidos grasos con niveles de AGPICL menores de aproximadamente 20 %, 15 %, 10 %, 5 % y 1 % del contenido de ácidos grasos total. Opcionalmente, los AGPICL tienen al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 22, al menos aproximadamente 24, al menos aproximadamente 26, al menos aproximadamente 28 o al menos aproximadamente

30 átomos de carbono. Opcionalmente, los AGPICL son ácido docosatetraenoico, ácido docosapentaenoico y/o ácido docosahexaenoico.

La alteración (por ejemplo, regulación negativa o regulación positiva) de la expresión génica de un componente de la ruta puede realizarse generando una inactivación génica mediante, por ejemplo, recombinación homóloga o no homóloga. Normalmente, una construcción de ADN linealizada se introduce en células usando cualquiera de una diversidad de técnicas incluyendo, pero sin limitación, suministro de ADN por proyectil biolístico. Opcionalmente, la frecuencia de recombinación homóloga en ONC-T18 es mayor de aproximadamente 30 %, 40 %, 50 % o más.

Opcionalmente, la alteración (por ejemplo, regulación negativa o regulación positiva) de la expresión génica de un componente de la ruta se realiza mediante mutagénesis de una o más dianas génicas. Puede realizarse mutagénesis mediante tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con neomicina), irradiación de microondas o UV, mutagénesis dirigida, PCR propensa a errores, reemplazo génico (por ejemplo, mediante recombinación homóloga) u otros medios conocidos por los expertos en la materia.

Los microorganismos modificados genéticamente proporcionados en el presente documento pueden producir una fracción lipídica que comprende DHA n-3, EPA y DPA n-6 a más de aproximadamente 4,0 g/l de medio. Opcionalmente, los microorganismos proporcionados en el presente documento pueden producir una composición lipídica que comprende DHA n-3, EPA y DPA n-6 a más de aproximadamente 20,0 g/l de medio. Opcionalmente, los microorganismos pueden producir una composición lipídica que comprende DHA n-3, EPA y DPA n-6 a más de aproximadamente 14,0 g/l de medio. Opcionalmente, los microorganismos pueden producir de aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 5,0 g/l (por ejemplo, aproximadamente 4,6 g/l) del DHA n-3, de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 1,5 g/l (por ejemplo, aproximadamente 0,22 g/l) del EPA n-3, y de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 1,5 g/l del DPA n-6. Opcionalmente, los microorganismos modificados genéticamente proporcionados en el presente documento pueden producir una composición lipídica que comprende DHA n-3, EPA, DPA n-6 o ARA a un rendimiento de hasta aproximadamente 120 g/l, que corresponde a más de aproximadamente 75 % de lípidos totales. Opcionalmente, los microorganismos modificados genéticamente proporcionados en el presente documento pueden producir una composición lipídica que comprende ácidos grasos de cadena corta (típicamente ácidos grasos C12-C18) a un rendimiento de hasta aproximadamente 128 g/l, que corresponde a más de aproximadamente 80 % de lípidos totales. Además, el microorganismo puede producir una fracción lipídica que comprende ácidos mirístico, miristoleico, pentadecanoico, palmítico, palmitoleico, esteárico oleico, linoleico, alfa-linolénico, gamma-linolénico, eicosadienoico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico y docosapentaenoico mayor de 300 mg/g o incluso 800 mg/g de biomasa celular. Opcionalmente, el microorganismo también puede producir una fracción que comprende entre 44,3 y 57 mg/g de ácido mirístico (igual a 1134,5 a 1458,1 mg/l), 0,5 a 0,65 mg/g de ácido miristoleico (igual a 13,3 a 16,63 mg/l), 33,5 a 34,6 mg/g, ácido pentadecanoico (igual a 856,9 a 885,1 mg/l), 121,9 y 165,1 mg/g de ácido palmítico (igual a 3118,2 a 4923,3 mg/l), 7,9 a 28,5 mg/g de ácido palmitoleico (igual a 202,1 a 729 mg/l), 4,38 a 5,9 mg/g de ácido esteárico (igual a 112 a 151 mg/l), 6,94 a 9,9 mg/g de ácido oleico (igual a 177,5 a 253,2 mg/l), 0,4 a 1,3 mg/g de ácido linoleico (igual a 11,26 a 33,3 mg/l), 0,5 a 1,0 mg/g de ácido eicosadienoico (igual a 12,8 a 25,6 mg/l), 0,4 a 0,5 mg/g de ácido araquidónico (igual a 10,2 a 13 mg/l), 75 a 100 mg/g de ácido docosahexanoico (igual a 1918 a 2560 mg/l), 1,9 a 6 mg/g de ácido eicosapentaenoico (igual a 48,6 a 153,5 mg/l) y 17,1 a 33,7 mg/g de ácido docosapentaenoico (igual a 437,4 a 862,1 mg/l), que tienen un contenido de ácidos grasos total dentro de la biomasa celular de entre 301 y 800 mg/g (igual a 7700 a 20.209 mg/l).

Fermentación y producción

Los métodos proporcionados incluyen o pueden usarse junto con etapas de cultivo de un microorganismo (por ejemplo, un traustoquítrido, por ejemplo, un *Thraustochytrium* sp.). Se han descrito métodos de cultivo para traustoquítridos, por ejemplo, en la publicación de patente de EE.UU US2009/0117194A1. Normalmente, los microorganismos se cultivan en un medio de crecimiento (también conocido como «medio de cultivo»). Cualquiera de una diversidad de medios puede ser adecuado para su uso de acuerdo con métodos de selección proporcionados en el presente documento. Típicamente el medio aporta diversos componentes nutricionales, incluyendo una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, para el microorganismo.

Los microorganismos proporcionados en el presente documento pueden cultivarse en condiciones que aumentan la biomasa y/o producción de un compuesto de interés. Los traustoquítridos se cultivan típicamente en el mismo medio. Por ejemplo, los traustoquítridos pueden cultivarse en medio que tiene una concentración salina de entre aproximadamente 2,0-50,0 g/l. Opcionalmente, los traustoquítridos se cultivan en medios que tienen una concentración salina de entre aproximadamente 2-35 g/l. Opcionalmente, los traustoquítridos se cultivan en un medio que tiene una concentración salina de entre aproximadamente 18-35 g/l. Se ha descubierto en determinadas circunstancias que los traustoquítridos crecen bien en condiciones de baja salinidad. Opcionalmente, los traustoquítridos se cultivan en un medio que tiene una concentración salina de entre aproximadamente 5-20 g/l. Opcionalmente, los traustoquítridos se cultivan en un medio que tiene una concentración salina de entre aproximadamente 5-15 g/l. Los medios de cultivo pueden incluir o no NaCl. Los medios de cultivo pueden incluir o no adición de NaCl. Opcionalmente, un medio contiene sal marina artificial, por ejemplo, INSTANT OCEAN™, Aquaria,

Inc. El medio de cultivo puede incluir o no agua marina natural o artificial. Opcionalmente, un medio contiene agua marina natural o artificial, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a 100 % de agua marina.

Los iones de cloruro pueden provocar corrosión del fermentador u otro equipamiento de procesamiento corriente abajo. Opcionalmente, la concentración de cloruro en medios de cultivo se reduce. Opcionalmente, los medios de cultivo incluyen sales de sodio que no contienen cloruro (por ejemplo, sulfato sódico) como una fuente de sodio. Por ejemplo, una parte significativa del sodio total puede ser aportada por sales distintas de cloruro de modo que menos de aproximadamente 100 %, 75 %, 50 % o 25 % del sodio total en medios de cultivo sea aportado por cloruro sódico.

Opcionalmente, los medios de cultivo tienen concentraciones de cloruro de menos de aproximadamente 3 g/l, 500 mg/l, 250 mg/l o 120 mg/l. Opcionalmente, los medios de cultivo tienen concentraciones de cloruro de entre aproximadamente 60 mg/l y 120 mg/l.

Los ejemplos de sales de sodio distintas de cloruro adecuadas para su uso de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, soda ash (una mezcla de carbonato sódico y óxido sódico), carbonato sódico, bicarbonato sódico, sulfato sódico y mezclas de los mismos. Véanse, por ejemplo, patentes de EE.UU. N.º 5.340.742 y 6.607.900.

Los medios para cultivo de traustoquítridos pueden incluir cualquiera de una diversidad de fuentes de carbono. Los ejemplos de fuentes de carbono incluyen ácidos grasos; lípidos; gliceroles; trigliceroles; carbohidratos tales como glucosa, almidón, celulosas, hemicelulosas, fructosa, dextrosa, xilosa, lactulosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, lactosa, glucógeno, gelatina, almidón (de maíz o trigo), acetato, m-inositol (derivado de agua de macerado de maíz), ácido galacturónico (derivado de pectina), L-fucosa (derivado de galactosa), gentiobiosa, glucosamina, alfa-D-glucosa-1-fosfato (derivado de glucosa), celobiosa, dextrina y alfa-ciclodextrina (derivada de almidón); sacarosa (de melaza); polioles tales como maltitol, eritritol, adonitol y ácidos oleicos tales como glicerol y tween 80; azúcares de amino tales como N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-beta-D-manosamina; y cualquier tipo de biomasa o corriente de residuos.

Opcionalmente, los medios incluyen fuentes de carbono a una concentración de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 200 g/l. Opcionalmente, los medios tienen una relación C:N (relación de carbono con respecto a nitrógeno) entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 40:1. Si se usan cultivos de dos fases, los medios pueden tener una relación de C:N de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 5:1 para la primera fase, después de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:~0 (es decir, sin o casi sin nitrógeno) en la segunda fase.

Los medios para cultivo de traustoquítridos pueden incluir cualquiera de una diversidad de fuentes de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno ejemplares incluyen soluciones de amonio (por ejemplo, NH_4 en H_2O), sales de amonio o amina (por ejemplo, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_3PO_4$, NH_4NO_3, $NH_4OOCH_2CH_3$ (NH_4Ac), peptona, triptona, extracto de levadura, extracto de malta, harina de pescado, glutamato sódico, extracto de soja, casaminoácidos y residuos de destilería. Las concentraciones de fuentes de nitrógeno en medios adecuados varían típicamente entre aproximadamente 1 g/l y aproximadamente 25 g/l.

Opcionalmente, los medios incluyen un fosfato, tal como fosfato potásico o fosfato sódico. Las sales inorgánicas y oligonutrientes en medios pueden incluir sulfato de amonio, bicarbonato sódico, ortovanadato sódico, cromato potásico, molibdato sódico, ácido selenoso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso, cloruro de calcio y EDTA. Pueden incluirse vitaminas tales como clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato cálcico, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y vitamina B12.

Por ejemplo, un medio adecuado podría estar comprendido por entre aproximadamente 11 y aproximadamente 13 g/l (por ejemplo, aproximadamente 12 g/l) de sulfato sódico, entre aproximadamente 0,45 y aproximadamente 0,55 g/l (por ejemplo, aproximadamente 0,5 g/l) de KCl, entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 2,2 g/l (por ejemplo, aproximadamente 2 g/l) de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,4 g/l (por ejemplo, aproximadamente 0,35 g/l) de antiespumante Hodag K-60, entre aproximadamente 0,60 y aproximadamente 0,70 g/l (por ejemplo, aproximadamente 0,65 g/l) de K_2SO_4, entre aproximadamente 0,9 y aproximadamente 1,1 g/l (por ejemplo, aproximadamente 1,0 g/l) de KH_2PO_4, entre aproximadamente 0,95 y aproximadamente 1,1 g/l (por ejemplo, aproximadamente 1 g/l) de $(NH_4)_2SO_4$, entre aproximadamente 0,15 y aproximadamente 0,19 (por ejemplo, aproximadamente 0,17 g/l) de $CaCl_2 \cdot H_2O$, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 g/l (por ejemplo, aproximadamente 4,5 g/l) de jarabe de maíz 95 DE (base de sólidos), entre aproximadamente 2,7 y aproximadamente 3,3 g/l (por ejemplo, aproximadamente 3 mg/ml) de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, entre aproximadamente 2,7 y aproximadamente 3,3 g/l (por ejemplo, aproximadamente 3 mg/ml) de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, entre aproximadamente 0,035 y aproximadamente 0,045 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 0,04 mg/l) de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, entre aproximadamente 0 y aproximadamente 0,045 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 0,04 mg/l) de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 2,2 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 2 mg/l) de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 2,2 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 2 mg/l) de

$NiSO_4 \cdot 6H_2O$, entre aproximadamente 9 y aproximadamente 11 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 10 mg/l) de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 15 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 9,5 mg/l) de tiamina, entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,25 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 0,15 mg/l) de vitamina B_{12}, entre aproximadamente 1,3 y aproximadamente 5,1 (por ejemplo, aproximadamente 3,2 mg/l) de pantotenato cálcico y solución de NH_4OH aproximadamente 28 %.

El pH del medio se ajusta a entre 3,0 y 10,0 usando ácido o base cuando sea apropiado y/o usando la fuente de nitrógeno. Opcionalmente, el medio se ajusta para tener entre pH 4,0 y 6,5. El medio puede esterilizarse.

Opcionalmente, un medio usado para cultivo de un microorganismo es un medio líquido. Opcionalmente, un medio usado para cultivo de un microorganismo es un medio sólido. Además de fuentes de carbono y nitrógeno tal como se analiza en el presente documento, un medio sólido puede contener uno o más componentes (por ejemplo, agar o agarosa) que proporcionan soporte estructural y/o permiten que el medio esté en forma sólida.

Las células pueden cultivarse durante cualquier tiempo entre 1-60 días. Opcionalmente, El cultivo se lleva a cabo durante 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días, o menos. Opcionalmente, el cultivo se lleva a cabo a temperaturas entre 4 y 30 ºC, por ejemplo, de 18 a 28 ºC. Opcionalmente, el cultivo incluye cultivo de aireación-agitación, cultivo de agitación, cultivo estacionario, cultivo discontinuo, cultivo semicontinuo, cultivo continuo, cultivo en lote de laminación o cultivo en wave, o similares. El cultivo puede llevarse a cabo usando un fermentador de agitación convencional, un fermentador en columna de burbujas (cultivos discontinuo o continuo), un fermentador wave, etc.

Opcionalmente, los cultivos se airean por agitación. Opcionalmente, la agitación varía de 100 a 1000 rpm, por ejemplo, de 350 a 600 rpm, de 1000 a 450 rpm. Opcionalmente, los cultivos se airean de forma diferente (por ejemplo, usando diferentes velocidades de agitación) durante fases de producción de biomasa que durante fases de producción de lípidos. Por ejemplo, los cultivos se airean por agitación a una velocidad entre aproximadamente 150 y aproximadamente 350 rpm durante las fases de biomasa y a una velocidad entre aproximadamente 30 y aproximadamente 120 rpm durante fases de producción de lípidos. Como alternativa o adicionalmente, las velocidades de agitación pueden variar dependiendo del tipo de vaso de cultivo (por ejemplo, la forma o el tamaño del matraz).

Opcionalmente, el nivel de oxígeno disuelto (OD) es mayor durante la fase de producción de biomasa que durante la fase de producción de lípidos, por ejemplo, los niveles de OD se reducen durante la fase de producción de lípidos. Opcionalmente, el nivel de oxígeno disuelto se reduce por debajo de la saturación; por ejemplo, el nivel de oxígeno disuelto se reduce hasta un nivel muy bajo, o incluso indetectable.

Se ha descubierto que la producción de lípidos deseables puede potenciarse cultivando células de acuerdo con métodos que implican un desplazamiento de una o más condiciones de cultivo para obtener cantidades mayores de compuestos deseables. Opcionalmente, las células se cultivan primero en condiciones que maximizan la biomasa, seguido de un desplazamiento de una o más condiciones de cultivo a condiciones que favorecen la productividad de lípidos. Las condiciones que se desplazan pueden incluir concentración de oxígeno, relación C:N, temperatura y combinaciones de las mismas. Opcionalmente, se realiza un cultivo de dos estadios en el que un primer estadio favorece la producción de biomasa (por ejemplo, usando condiciones de alto oxígeno (por ejemplo, en general o en relación con el segundo estadio), baja relación C:N y temperatura ambiente), seguido de un segundo estadio que favorece la producción de lípidos (por ejemplo, en el que el oxígeno se reduce, la relación C:N aumenta y la temperatura se reduce). Es decir, los métodos proporcionados pueden implicar cultivar células en un primer conjunto de condiciones que incluye una o más condiciones seleccionadas del grupo que consiste en una primera concentración de oxígeno, una primera relación C:N, una primera temperatura y combinaciones de las mismas. El cultivo en este primer conjunto de condiciones continúa durante un primer periodo de tiempo, cuya duración puede variar. Al final del primer periodo de tiempo (que no es necesariamente un punto definido en el tiempo), se alteran una o más condiciones de modo que las células se cultiven en un segundo conjunto de condiciones que incluye una o más condiciones seleccionadas del grupo que consiste en una segunda concentración de oxígeno, una segunda relación C:N, una segunda temperatura y combinaciones de las mismas. Opcionalmente, algunas condiciones se cambian al final del primer periodo de tiempo y algunas se mantienen hasta el final de un segundo periodo de tiempo, momento en el cual una o más condiciones pueden cambiarse de nuevo y/o una o más condiciones pueden cambiarse durante un primer tiempo. Opcionalmente, la primera relación C:N está dentro del intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:1; y la primera temperatura está dentro del intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 ºC. Opcionalmente, la segunda relación C:N es aproximadamente 1:~0; y la segunda temperatura está dentro del intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 ºC.

Opcionalmente, se realiza un desplazamiento de una primera condición a una segunda condición y/o se produce gradualmente. Opcionalmente, se realiza el desplazamiento de una primera condición a una segunda condición y/o se produce de forma abrupta.

Opcionalmente, la concentración de oxígeno se desplaza (por ejemplo, se reduce) durante el cultivo de varias

maneras posibles incluyendo, por ejemplo, desplazando la intensidad de aireación.

Opcionalmente, la temperatura se desplaza (por ejemplo, se reduce) durante cultivo en al menos 2 ºC. Opcionalmente, la temperatura se desplaza en 3 ºC, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C o 10 °C. Opcionalmente, la temperatura se desplaza de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 20 °C.

La productividad de las células para compuestos de interés puede evaluarse por cualquier método o métodos disponibles.

Productos

Pueden utilizarse AGPI y otros compuestos producidos en cualquiera de una diversidad de aplicaciones, por ejemplo aprovechando sus propiedades biológicas o nutricionales. Por ejemplo, los compuestos pueden usarse en biocombustibles, productos farmacéuticos, complementos alimentarios, aditivos de piensos animales, cosméticos y similares. También pueden usarse compuestos producidos de acuerdo con la presente divulgación como intermedios en la producción de otros compuestos.

Se apreciará que AGPI y/u otros compuestos producidos por células manipuladas tal como se describe en el presente documento se incorporan en un producto final (por ejemplo, complemento alimentario o de pienso, fórmula infantil, producto farmacéutico, etc.) en el contexto de la célula hospedadora. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden liofilizarse, criodesecarse, congelarse, pasteurizarse o inactivarse de otro modo, y después pueden incorporarse células completas en o usarse como el producto final. Opcionalmente, una célula hospedadora (bien seca o no) puede procesarse adicionalmente antes de la incorporación en el producto (por ejemplo, mediante lisis, ultrasonidos, molienda por perlas, tratamiento por presión, congelación-descongelación, electroforesis en campo pulsado (PFE) para separar componentes y/o tratamiento por enzimas, o combinaciones de los mismos; opcionalmente, se utilizan al menos dos o más de dichos procesos). Las células lisadas pueden extraerse en un aceite usando un disolvente apropiado y refinarse usando procesos bien conocidos. Opcionalmente, un producto final incorpora solamente una parte de la célula hospedadora (por ejemplo, fraccionarse por tamaño, solubilidad), separada del total. Por ejemplo, los lípidos pueden aislarse de las células hospedadoras y se incorporan en o se usan como el producto final. Pueden extraerse lípidos que contienen AGPI usando extracción de fluido supercrítico o extracción con uno o más disolventes (por ejemplo, acetona, cloroformo, isopropanol, hexano, cloruro de metileno o metanol). Opcionalmente, los lípidos se concentran por cualquiera de una diversidad de métodos, tales como formación de complejo con urea, cromatografía en columna y/o fraccionamiento de fluido supercrítico. Las técnicas para concentración de lípidos extraídos en disolvente incluyen hidrólisis (por ejemplo, usando hidrólisis básica, ácida o enzimática), extracción adicional, acidificación, cristalización, filtración y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, publicación de patente de EE.UU. 2009/0117194).

Opcionalmente, uno o más AGPI producidos y/u otros compuestos se incorporan en un componente de alimento o pienso (por ejemplo, un complemento alimentario). Los tipos de productos alimentarios en los que pueden incorporarse compuestos de acuerdo con la presente divulgación no están particularmente limitados e incluyen bebidas tales como leche, agua, bebidas deportivas, bebidas energéticas, tés y zumos; confecciones tales como gelatinas y galletas; alimentos que contienen grasas y bebidas tales como productos lácteos; productos alimentarios procesados tales como arroz blando (o gachas); fórmulas infantiles; cereales de desayuno; o similares. Opcionalmente, se incorporan uno o más compuestos producidos en un complemento dietético, tal como por ejemplo una multivitamina. Opcionalmente, un compuesto de AGPI producido de acuerdo con los métodos proporcionados se incluye en un complemento dietético y puede incorporarse directamente en un componente de alimento o pienso (por ejemplo, un complemento alimentario).

Los ejemplos de piensos en los que pueden incorporarse compuestos producidos de acuerdo con los métodos proporcionados incluyen, por ejemplo, alimentos para mascotas tales como alimentos para gatos, alimentos para perros y similares, piensos para peces de acuario, peces o crustáceos criados, etc., pienso para animales criados en granja (incluyendo ganado y peces o crustáceos criados en piscifactoría). El material alimentario o de pienso en el que se incorporan el compuesto o los compuestos producidos de acuerdo con los métodos proporcionados es preferentemente apetitoso para el organismo que es el receptor pretendido. Este material alimentario o de pienso puede tener cualquier propiedad física conocida actualmente para un material alimentario (por ejemplo, sólido, líquido, blando).

Opcionalmente, uno o más compuestos producidos (por ejemplo, AGPI) se incorporan en un producto farmacéutico. Los ejemplos de dichos productos farmacéuticos incluyen, por ejemplo, diversos tipos de comprimidos, cápsulas, agentes bebibles, etc. Opcionalmente, el producto farmacéutico es adecuado para aplicación tópica. Las formas farmacéuticas no están particularmente limitadas e incluyen cápsulas, aceites, gránulos, gránulos pequeños, polvos, comprimidos, píldoras, trociscos o similares. Los aceites y cápsulas rellenas de aceite pueden proporcionar ventajas adicionales tanto debido a su falta de descomposición de ingredientes durante la fabricación como debido a que pueden incorporarse fácilmente gotas lipídicas que contienen AGPI en formulaciones basadas en aceite.

Los productos farmacéuticos de acuerdo con la presente divulgación pueden prepararse de acuerdo con técnicas establecidas en este campo, incluyendo, por ejemplo, el procedimiento común como se describe en la Farmacopea de Estados Unidos, por ejemplo.

Los compuestos producidos de acuerdo con la presente divulgación (bien aislados o bien en el contexto de células) pueden incorporarse en productos tal como se describe en el presente documento por combinaciones con cualquiera de una diversidad de agentes. Por ejemplo, dichos compuestos pueden combinarse con uno o más aglutinantes o cargas. Opcionalmente, los productos incluirán uno o más agentes quelantes, pigmentos, sales, tensioactivos, humectantes, modificadores de la viscosidad, espesantes, emolientes, fragancias, conservantes, etc. y combinaciones de los mismos.

Anticuerpos

También se proporcionan anticuerpos y polipéptidos de anticuerpos que se unen con los polipéptidos de traustoquítridos aislados desvelados en el presente documento. Pueden generarse polipéptidos de anticuerpos que se unen específicamente con los polipéptidos de traustoquítridos por métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden usarse polipéptidos aislados o fragmentos de los mismos para inducir la producción de anticuerpos en diversos hospedadores tales como cabras, conejos, ratas, ratones, etc. Los hospedadores pueden inmunizarse por inyección con cualquier parte o fragmento que posea propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie hospedadora, pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund, geles minerales tales como hidróxido de alúmina y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol.

Para generar anticuerpos policlonales, pueden conjugarse polipéptidos aislados con un vehículo convencional para aumentar su inmunogenicidad e inducirse un antisuero para el conjugado de polipéptido-vehículo aislado. Puede realizarse acoplamiento de un péptido con una proteína vehículo e inmunizaciones como se describe en Dymecki et al., 1992, J. Biol. Chem., 267:4815. El suero puede titularse frente a antígenos polipeptídicos aislados por métodos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, ELISA o como alternativa por transferencia puntual (Boersma y Van Leeuwen, 1994, j. Neurosci. Methods, 51:317)). Un suero útil reaccionará fuertemente con el polipéptido aislado por ELISA, por ejemplo, siguiendo los procedimientos de Green et al., 1982, Cell, 28:477.

Se conocen técnicas para preparar anticuerpos monoclonales y se describen, por ejemplo, en Arnheiter et al., 1981, Nature, 294:278. Los anticuerpos monoclonales se obtienen típicamente de cultivos de tejido de hibridoma o de líquido ascítico obtenido de animales en los que se introdujo el tejido de hibridoma. Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (o sueros policlonales) pueden explorarse con respecto a unión de anticuerpos con péptidos aislados según métodos conocidos en la técnica.

La divulgación se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de genes, secuencias promotoras y terminadoras

Este ejemplo describe la identificación y el aislamiento de determinadas secuencias de ácido nucleico promotoras y terminadoras de la expresión génica ejemplares de ONC-T18.

El solicitante ha secuenciado en gran medida el genoma de ONC-T18 usando técnicas tanto de secuenciación aleatoria como de pirosecuenciación (GS-20; 454). Entre otras cosas, la presente divulgación proporciona análisis de dicha información de secuencia, por ejemplo utilizando información de recogida de EST (marcador de secuencia expresado) públicamente disponible (Huang et al., 2008), la anotación funcional de y/o software de bioinformática (por ejemplo, paquete Kodon disponible de Applied Maths y/o uno o más algoritmos tales como BLAST). Para proporcionar herramientas para la expresión de genes homólogos y heterólogos (por ejemplo, genes implicados en la biosíntesis de lípidos y ácidos grasos dentro de microbios de traustoquítridos), se clonaron promotores y terminadores génicos de tubulina y genes y promotores de elongasa constitutivos a partir de ADN genómico de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La cepa ONC-T18 se cultivó en medio de agua marina complementado. Se extrajo ADN usando un protocolo FastPrep (MP Biomedicals) y se envió al The Centre for Applied Genomic (TCAG, The Hospital for Sick Children, Toronto) para una placa de secuenciación de 454 y un carril de secuenciación de pares apareados de 2,5 kb Illumina (lecturas de 76 bases). Se extrajo ARN de células muestreadas durante la fase de crecimiento rápido del cultivo celular y durante la producción de lípidos alta mediante el procedimiento RNeasy (Qiagen). Se envió ARN total a TCAG para análisis de RNA-Seq de un carril de Illumina (lecturas de 76 bases) para cada condición.

Se llevaron a cabo análisis bioinformáticos en los servidores de IMB Research Informatics usando software de

código abierto. El ensamblaje genómico se realizó con Mira (Chevreux et al., 1999) y se generaron armazones potenciales con Bambus (Pop et al., 2004). Se llevó a cabo anotación genómica con MAKER (Cantarel et al., 2008), usando modelos génicos de Snap (Korf, 2004) y Augustus (Stanke y Waack, 2003). Se identificaron genes codificantes de ARN mediante análisis Infernal (Eddy, 2006) de la base de datos Rfam (Griffiths-Jones et al., 2003). Se usaron PASA y Inchworm (Haas et al., 2003) para identificar regiones no traducidas 5' y 3'. Se analizaron genes que codificaban proteínas con AutoFact (Koski et al., 2005), que emplea Blast y rpsblast (Altschul et al., 1990) para consultar las bases de datos no redundantes, uniref90, Kegg (Ogata et al., 1999), COG (Tatusov et al., 2003) y pfam (Finn et al., 2008). El análisis de datos de RNA-Seq usó Tophat (Trapnell et al., 2009) y Cufflinks (Trapnell et al., 2010) para mapear lecturas en el borrador del genoma, estimar la abundancia del transcrito y determinar la expresión diferencial. Se usaron scripts de Perl adaptados para reformatear, ensamblar y analizar los datos.

El borrador del genoma de ONC-T18 se ensambló a partir de una placa de 454 lecturas (1.131.145 lecturas, 302 Mb en total), un carril de secuencias de pares apareados de Illumina (21.570.704 lecturas, 1,47 Gb en total) y secuencias de Sanger (34.261 lecturas, 30 Mb en total) que se habían generado previamente de bibliotecas de plásmidos y cósmidos. Mira fue el único ensamblador capaz de manejar esta mezcla de tipos de lecturas. La información sobre el ensamblaje se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Información de ensamblaje del genoma de ONC-T18

Número de contigs	2471
Consenso total	34.463,560 pb
Cobertura promedio	40,63x (8x 454, 32x Illumina, 0,63x Sanger)
Tamaño de contig medio	13.974,62 pb
Mediana del tamaño de contig	7555 pb
Mayor contig	164.938 pb
Menor contig	490 pb

Aunque el número de contigs en el ensamblaje fue bastante alto, esto es típico para borradores de genomas. El tamaño de contig de N50, que fue la longitud de contig por encima de la cual se representa la mitad del genoma, fue de 29.352 pb. Esto fue comparativamente mejor que muchos borradores de genomas, que tienen con frecuencia N50 < 10.000 pb. El N95 fue de 4931 lo que indica que 95 % del genoma estaba en contigs mayores de aproximadamente 5 kb.

Durante la fase de anotación, se observó que 12 contigs contenían genes mitocondriales. Estos se retiraron del ensamblaje y se reensamblaron por separado. Esto dio como resultado 5 contigs, siendo el mayor de 30965 pb, mientras que los otros cuatro eran todos de menos de 1800 pb y parecen ser variantes de regiones en el contig grande. El contig grande tiene regiones repetidas complejas en cada extremo que no se unen fácilmente en un genoma circular. Esta situación se ha observado previamente para genomas mitocondriales de traustoquítridos (Referencia de GenBank AF288091).

El hallazgo de genes en la secuencia de ONC-T18 no fue del todo sencillo. Aunque la mayoría de genes estaban codificados en un único exón, hubo un número sustancial de genes multiexónicos, que requerían el uso de software de modelización de genes para clasificar genes de un único exones frente a multiexónicos y, para estos últimos, identificar los límites de intrón/exón apropiados. MAKER coordina el análisis del genoma por varios métodos: aportes del software de modelización de genes (Snap y Augustus), alineamientos con lecturas de ARN y alineamientos con proteínas. Los genes predichos se analizaron adicionalmente mediante PASA que usa transcritos ensamblados (de Inchworm) para identificar regiones 5' y 3', varias de las cuales incluyen intrones. Se identificaron genes codificantes de ARN (ARNr, ARNt y otros ARN no codificantes tales como ADN nuclear pequeño (ARNnop/ARNnp)) mediante búsquedas de Infernal de la base de datos Rfam. Los datos de anotación se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Datos de anotación de ONC-T18b

Genes codificantes de proteínas	13.022
Exón individual	10.272
Dos exones	2.136
Tres exones	425
Más de tres exones	161

Sin coincidencias en Genbank	3258
Proteínas hipotéticas/conservadas	841
genes de ARNr	79
genes de ARNt	131
otros genes de ARN	8

El procesamiento de las proteínas predichas a través de AutoFACT analizó los genes codificantes de proteínas. Este software coordina búsquedas de blast frente a las bases de datos uniref90, no redundante, Kegg, COG y pfam y produce un consenso de la función de proteína esperada. Además, se identificaron las funciones de COG y rutas de KEGG y, si fue posible, los números de EC. También se identifican las clasificaciones de ontología génica cuando sea posible. Estos datos son esenciales para identificar las rutas bioquímicas presentes en ONC-T18b.

Se identificaron genes para todas las enzimas en la ruta de elongación/desaturación clásica de ácidos grasos 18:1 a DHA en el genoma. También se identificaron genes para las tres subunidades de la AGPI poliquétido sintasa, que sintetiza directamente DPA y DHA de malonil-CoA, aunque dos de ellos se dividieron entre contigs debido a la naturaleza repetitiva de las proteínas. Además, se identificaron varios genes para enzimas poco definidas, descritas en general como «proteína de elongación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga», lo que sugiere que estos genes son variantes divergentes de las enzimas en la ruta de C18 - C22 o están implicados en la síntesis de ácidos grasos con longitudes de cadena mayores que C22.

1. Aislamiento e identificación de un promotor del gen de tubulina n.º 701. (para referencia) Los cebadores oligonucleotídicos n.º 52 (SEQ ID NO: 1) y n.º 53 (SEQ ID NO: 2) se diseñaron basándose en los datos de secuencia genómica de *Thraustochytrium sp.* ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths). Los cebadores oligonucleotídicos se sintetizaron y obtuvieron de Invitrogen (California, EE.UU.).

Se extrajo ADN genómico de ONC-T18 de células cultivadas en el medio de cultivo (ONC-T18-GM0) a 25 °C durante 36 horas en un incubador agitador con agitación constante a 150 rpm. Se recogieron células de cultivos de 50 ml por centrifugación durante 5 min a temperatura ambiente a 4300 rpm en una centrífuga Sorvall Super T21 con el rotor ST-H750 con el adaptador Sorvall n.º 00436. El ADN genómico se aisló de las células usando el kit de aislamiento de ADN microbiano Ultraclean (MO BIO Laboratories, Inc, Solana Beach, California) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los componentes del medio de cultivo ONC-T18-GM0 son: extracto de levadura 5 g/l (RM668, HiMedia labs), peptona de soja 5 g/l (RM007, HiMedia labs), D(+)-glucosa 10 g/l (CERELOSE^{tm} Dextrosa 020010, Com Products International), sal marina artificial 35 g/l (INSTANT OCEAN™, Aquaria, Inc.), oligoelementos 1,25 mg/l ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 5 g/l, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 3,15 g/l, $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 4,36 g/l, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,6125 mg/l, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,0597g/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,022 g/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,01 g/l, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,18 g/l, H_2SeO_3 13 µg/l, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 2,7 mg/l, Na_3VO_4 1,84 mg/l y K_2CrO_4 1,94 mg/l) y vitaminas 1,25 mg/l (vitamina B12 1 mg/l, biotina 1 mg/l, tiamina HCl 0,20 g/l).

El promotor del gen de tubulina n.º 701 que incluye la secuencia de fase abierta de lectura parcial se amplificó a partir de ADN genómico de ONC-T18 usando las siguientes condiciones de PCR: 94 °C durante 1 minuto, 94 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 6 minutos y se repitió durante 30 ciclos, y 72 °C durante 10 minutos. Se llevó a cabo PCR en una mezcla de reacción de 50 µl que contenía 2,5 unidades de ADN polimerasa *TaKaRa LA Taq*™ (TAKARA BIO INC., Shiga, Japón), Tampón LA PCR II 1 X, mezcla de dNTP (0,40 mM cada uno), 225 ng del ADN genómico molde, cebador n.º 52 0,20 µM y cebador n.º 53 0,20 µM.

Los productos de PCR se resolvieron en gel de agarosa 0,8 % para electroforesis a 65 tensiones durante 60 minutos. Las bandas con los tamaños esperados se recortaron con una cuchilla y los ADN se extrajeron y se purificaron con kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) según el protocolo del fabricante.

Los fragmentos de ADN purificado se clonaron en vector pT7Blue-3 usando kits de clonación Perfectly Blunt® (Novagen, San Diego, California) según el protocolo del fabricante. Se exploraron clones positivos usando método de PCR de colonias directo. En resumen, se seleccionaron colonias de *Escherichia coli* transformadas con palillos y se rotaron en una mezcla de reacción de PCR de 20 µl que contenía los siguientes componentes: ADN polimerasa Taq (Sigma), Tampón de PCR 1 X, $MgCl_2$ 2,5 mM, mezcla de dNTP (0,20 mM cada uno), cebador n.º 62 0,25 µM (SEQ ID NO: 3) y cebador n.º 63 0,25 µM (SEQ ID NO:4) en un tubo de PCR de 200 µl, respectivamente. Al mismo tiempo también se sembraron en estrías colonias en una placa de referencia para el aislamiento de ADN plasmídicos.

La PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 94 °C durante 3 minutos durante un ciclo; 94 °C durante 1

minuto, 53 °C durante 2 minutos y 72 °C durante 4 minutos y se repitió durante 30 ciclos; y 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se diferenciaron en gel de agarosa 0,8 %. Las colonias de las que se amplificó un producto de PCR del tamaño esperado se consideraron colonias positivas.

El ADN plasmídico del clon positivo JZ2-17-10 se aisló de las células de *E. coli* bacterianas de 3 ml de cultivo usando kit de miniprep de plásmidos ZYPPY™ (Zymo Research Corp., Orange, California). Su inserto se secuenció usando el cebador directo n.º 62 (SEQ ID NO:**3**) y el cebador inverso n.º 63 (SEQ ID NO: **4**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y algoritmos BLAST. La secuencia de nucleótidos del inserto del clon JZ2-17-10 es de 724 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: **5**). Se determinó que los 498 nucleótidos cadena arriba del código de inicio de traducción potencial ATG de una fase abierta de lectura (ORF) del gen de tubulina potencial eran un promotor de expresión génica potencial (secuencia n.º 701; SEQ ID NO: **6**) basándose en análisis usando diversos softwares de bioinformática. Se identificaron elementos promotores génicos típicos dentro de esta secuencia. Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de esta secuencia promotora potencial n.º 701 (SEQ ID NO: **6**) en diversas bases de datos del Genbank incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST) (Altschul et al., 1990). No se descubrió ninguna secuencia homóloga de esta secuencia promotora única n.º 701. La secuencia parcial del extremo 5' de la ORF tiene la mayor homología con el gen de beta tubulina 2 (*TUB2*) de *Chlamydomonas reinhardtii* (n.º de referencia de GenBank: XM_001693945) en una búsqueda de BLAST.

La secuencia promotora identificada es de 498 nucleótidos de longitud y contiene una caja de Pribnow-Schaller -10 (AGGAAGACT) en la posición 444 y una caja -35 en la posición 424 (CTGACG), un sitio de inicio de la transcripción potencial en la posición 459 y un sitio de unión a factor de transcripción potencial AAGGTAGA en la posición 468.

[**00256**] **2. Aislamiento e identificación de un promotor del gen de tubulina n.º 341.** (para referencia) Los cebadores oligonucleotídicos n.º 54 (SEQ ID NO: 7) y n.º 55 (SEQ ID NO: 8) se diseñaron basándose en datos de secuencia genómica de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths). Los cebadores oligonucleotídicos se sintetizaron y obtuvieron de Invitrogen (California, EE.UU.).

El promotor del gen de tubulina n.º 341, incluyendo la secuencia abierta de lectura parcial cadena abajo, se amplificó a partir del ADN genómico de ONC-T18 mediante PCR usando las mismas condiciones que se han descrito para el aislamiento del promotor del gen de tubulina n.º 701. El fragmento de ADN purificado amplificado se clonó en vector pT7Blue-3 usando kits de clonación Perfectly Blunt® (Novagen, San Diego, California) según el protocolo del fabricante. El ADN plasmídico del clon positivo JZ2-17-14 se aisló de células de *E. coli* bacterianas de 3 ml de cultivo usando kit de miniprep de plásmidos ZYPPY™ (Zymo Research Corp., Orange, California).

El inserto del ADN plasmídico recombinante se secuenció usando el cebador directo n.º 62 (SEQ ID NO: **3**) y el cebador inverso n.º 63 (SEQ ID NO: **4**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y algoritmos BLAST. La secuencia de nucleótidos de inserto del clon JZ2-17-14 es de 1115 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: **9**). Se ha identificado una ORF parcial de un gen de tubulina localizado en la secuencia del extremo 3' del inserto. La secuencia cadena arriba del codón de inicio de la traducción potencial ATG de la ORF se considera el promotor potencial n.º 341 (SEQ ID NO: **10**).

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas del promotor del gen de tubulina n.º 341 (SEQ ID NO: **10**) en diversas bases de datos de Genbank incluyendo la base de datos de secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga de este promotor del gen de tubulina único n.º 341. La secuencia del extremo 5' de la ORF parcial potencial tiene la mayor homología con el gen de alfa tubulina 2 (*TUA2*) de *Chlamydomonas reinhardtii* (n.º de referencia de GenBank: 5728641) en una búsqueda de BLAST.

Esta secuencia promotora de 1004 nucleótidos de longitud contiene una caja -10 (CGCTAAAAT) en la posición 542 y caja -35 (TTCACG) en la posición 518, el sitio de inicio de la transcripción potencial en la posición 557 y el sitio de unión a factor de transcripción potencial GCTAAAAT en la posición 543 así como una caja -10 (TAGTAGATT) en la posición 143 y caja -35 (TTGCTC) en la posición 125, el sitio de inicio de la transcripción potencial en la posición 158 y los sitios de unión a factor de transcripción potencial ATTTTGTA en la posición 149 y TTTTGTAA en la posición 150.

3. Aislamiento e identificación de un terminador de gen de tubulina n.º 347 (para referencia) Los cebadores oligonucleotídicos n.º 58 (SEQ ID NO: 11) y n.º 59 (SEQ ID NO: 12) se diseñaron basándose en datos de secuencia genómica de ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths). Los cebadores oligonucleotídicos se sintetizaron y obtuvieron de la compañía Invitrogen (California, EE.UU.).

El terminador de gen de tubulina n.º 347 se amplificó a partir del ADN genómico de ONC-T18 con PCR usando las mismas condiciones que se han descrito para el aislamiento del promotor del gen de tubulina n.º 341. El fragmento

de ADN purificado se clonó en vector pT7Blue-3 usando kits de clonación Perfectly Blunt® (Novagen, San Diego, California) según el protocolo del fabricante. El ADN plasmídico del clon positivo JZ2-17-22 se aisló de las células de *E. coli* bacterianas de 3 ml de cultivo usando el kit de miniprep de plásmidos ZYPPY™ (Zymo Research Corp., Orange, California).

El inserto del ADN plasmídico recombinante se secuenció usando el cebador directo n.º 62 (SEQ ID NO: 3) y el cebador inverso n.º 63 (SEQ ID NO: 4). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y algoritmos BLAST. El inserto de la secuencia de nucleótidos del clon JZ2-17-22 es de 727 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: 13). La secuencia del extremo 5' del inserto se ha identificado como una ORF parcial potencial que contiene un codón de terminación de la traducción génica potencial TAA. La secuencia cadena abajo del codón de terminación TAA se considera el terminador de gen de tubulina potencial n.º 347 (SEQ ID NO: 14).

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de la secuencia de terminador de gen de tubulina n.º 347 (SEQ ID NO: **14**) en diversas bases de datos del Genbank incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga de este terminador de gen de tubulina único n.º 347. La secuencia parcial de la ORF parcial potencial tiene la mayor homología con el gen de alfa tubulina de *Ceratopteris richardii* (n.º de referencia de GenBank: XM_001691824) en una búsqueda de BLAST.

La secuencia terminadora de 590 nucleótidos de longitud contiene una secuencia señal de poliadenilación potencial AAAACAAAAA que actúa para la terminación de la transcripción por ARN polimerasa.

4. Aislamiento e identificación de un terminador de gen de tubulina n.º 713 (para referencia) Los cebadores oligonucleotídicos n.º 60 (SEQ ID NO: **15**) y n.º 61 (SEQ ID NO: **16**) se diseñaron basándose en datos de secuencia genómica de ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths). Los cebadores oligonucleotídicos se sintetizaron y obtuvieron de Invitrogen (California, EE.UU.).

El terminador de gen de tubulina n.º 713 se amplificó a partir del ADN genómico de ONC-T18 con PCR usando las mismas condiciones que se han descrito para el aislamiento del promotor del gen de tubulina n.º 341. El fragmento de ADN purificado se clonó en vector pT7Blue-3 usando kits de clonación Perfectly Blunt® (Novagen, San Diego, California) según el protocolo del fabricante. El ADN plasmídico del clon positivo JZ2-22-9 se aisló de las células de *E. coli* bacterianas de 3 ml de cultivo usando el kit de miniprep de plásmidos ZYPPY™ (Zymo Research Corp., Orange, California).

El inserto del ADN plasmídico recombinante se secuenció usando el cebador directo n.º 62 (SEQ ID NO: 3) y el cebador inverso n.º 63 (SEQ ID NO: **4**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y algoritmos BLAST. El inserto de la secuencia de nucleótidos del clon JZ2-22-9 es de 869 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: **17**). La secuencia del extremo 5' del inserto se ha identificado como una ORF parcial potencial que contiene un codón de terminación de la traducción génica potencial TAA. La secuencia cadena abajo del codón de terminación TAA se considera el terminador de gen de tubulina potencial n.º 347 (SEQ ID NO: **18**).

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de la secuencia de terminador de gen de tubulina n.º 713 (SEQ ID NO: **18**) en diversas bases de datos del Genbank incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga de este terminador de gen de tubulina único n.º 713. La secuencia parcial de la ORF parcial potencial tiene la mayor homología con el gen de beta tubulina 1 (*tubBl*) de *Cyonophora paradoxa* (n.º de referencia de GenBank: AF092952) en una búsqueda de BLAST.

La secuencia terminadora de 640 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 14) contiene una secuencia señal de poliadenilación potencial CATAAA
que actúa para la terminación de la transcripción por ARN mensajero polimerasas.

5. Aislamiento e identificación de un gen de Δ5 elongasa (PCT/IB2007/004553; WO/2009/010825) **secuencia promotora** (SEQ ID NO: **19**). Basándose en los datos de secuencia genómica de ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths), se diseñaron el cebador oligonucleotídico n.º 3 (SEQ ID NO: **20**) en el que se añadió un sitio de enzima de restricción *Xbal* en su extremo 5' por la conveniencia de clonación molecular cadena abajo, y el cebador n.º 4 (SEQ ID NO: **21**) en el que se añadió un sitio de enzima de restricción *NcoI* en su extremo 5'. Los cebadores oligonucleotídicos se sintetizaron y obtuvieron de Invitrogen (California, EE.UU.). El promotor del gen de Δ5 elongasa se amplificó a partir del ADN genómico de ONC-T18 con PCR, se precipitó, se digirió con las enzimas de restricción *XhoI* y *NcoI*, se purificó en gel de agarosa y se clonó en los sitios de restricción correspondientes del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen Corporation, California). El inserto del clon positivo JZ1-57-7 se secuenció usando el cebador n.º 14 (SEQ ID NO: **22**) y el cebador n.º 15 (SEQ ID NO:**23**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de

bioinformática Kodon (Applied Maths) y algoritmos BLAST. El inserto de la secuencia de nucleótidos del clon JZ1-57-7 es de 950 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: 19) y se ha identificado como el promotor del gen de Δ5 elongasa (SEQ ID NO: **19**) de ONC-T18.

Esta secuencia promotora de 950 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: **19**) contiene una caja -10 (TGCCAGACT) en la posición 113, caja -35 (TTTTCT) en la posición 91, un sitio de inicio de la transcripción potencial en la posición 128 y sitios de unión a factor de transcripción potencial CTCCTTTT, TTTCTTTT, TTCTTTTT y TTGCTCCT en la posición 87, 92, 93 y 131 así como una caja -10 (AGTTCTGAT) en la posición 444, una caja -35 (TTTTCT) en la posición 419, y un sitio de inicio de la transcripción potencial en la posición 459.

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de la secuencia promotora de gen de Δ5 elongasa (SEQ ID NO: **19**) en diversas bases de datos del Genbank incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga de la secuencia promotora de gen de Δ5 elongasa (SEQ ID NO: **19**).

6. Aislamiento e identificación de un gen de Δ4 desaturasa (PCT/IB 2007/004553; WO/2009/010825**) secuencia promotora** (SEQ ID NO: **24**). El cebador oligonucleotídico n.º 1 (SEQ ID NO: **25**) en el que se añadió un sitio de enzima de restricción *XhoI* en su extremo 5' por la conveniencia de clonación molecular cadena abajo y el cebador n.º 2 (SEQ ID NO: **26**) en el que se añadió un sitio de enzima de restricción *NcoI* en su extremo 5', se emplearon para el aislamiento de la secuencia promotora de gen de Δ4 desaturasa (SEQ ID NO: **24**). El fragmento de ADN de promotor del gen de Δ4 desaturasa se amplificó usando PCR, se precipitó, se digirió con las enzimas de restricción *XhoI* y *NcoI*, se purificó en gel de agarosa y se clonó en los sitios de restricción correspondientes del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen Corporation, California) digerido con las mismas enzimas de restricción y purificado en gel. El inserto de un clon positivo JZ1-57-1 se secuenció usando el cebador n.º 14 (SEQ ID NO: **22**) y cebador n.º 15 (SEQ ID NO: **23**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y algoritmos BLAST. El inserto de la secuencia de nucleótidos del clon JZ1-57-1 es de 1216 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: 24) y se ha identificado como el promotor del gen de Δ4 desaturasa (SEQ ID NO: 24) de ONC-T18.

Esta secuencia promotora de 1216 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: **24**) contiene una caja -10 (GCGTATTAT) en la posición 58, caja -35 (CTACAG) en la posición 34, el sitio de inicio de la transcripción potencial en la posición 73 y los sitios de unión a factor de transcripción potenciales TTATATTT y TTTTCGCA en las posiciones 63 y 69 así como una caja -10 (CGTCATCCT) en la posición 1038, caja -35 (TGGACG) en la posición 1014, y un sitio de inicio de la transcripción potencial en la posición 1053.

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de la secuencia promotora de gen de Δ4 desaturasa (SEQ ID NO: **24**) en diversas bases de datos del Genbank incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga del promotor del gen de Δ4 desaturasa (SEQ ID NO: 15).

7. Identificación y aislamiento de gen de Δ12 desaturasa (SEQ ID NO: **70).** El análisis de RNA-Seq de ARN de células de rápido crecimiento y células que producen altas cantidades de lípido proporcionó varias informaciones sobre la biología de ONC-T21. Se mapearon lecturas de ARN de ambas condiciones en 11.407 genes (87,6 %). Los 1613 genes sin expresión aparente no eran genes reales, se expresaban solo a niveles muy bajos o se expresaban solo en condiciones muy específicas (por ejemplo, esporulación). Las comparaciones entre las dos condiciones de crecimiento identificaron 1519 genes que se expresaban solo en la condición de rápido crecimiento mientras que 442 genes se expresaban solo en la condición de alta producción de lípidos (Tabla 3). El análisis permite la identificación de genes que están altamente expresados en una de las condiciones así como los que muestran el mayor cambio. Los datos de expresión identificaron claramente varios genes con promotores regulados y/o fuertes. Estas regiones promotoras pueden usarse para conducir la expresión de genes introducidos en UNC-T18.

Tabla 3. Genes más expresados en la condición de alta producción de lípidos, comparación del crecimiento exponencial (A expr) y biosíntesis de ácidos grasos (B expr).

Descripción	A expr.	B expr.	relación B/A
Delta 12 ácido graso desaturasa	1540,39	66133,1	42,9327
proteína ribosómica de 60S L40	20680,2	33016,5	1,596527
Fructosa-bisfosfato aldolasa	8584,79	26817,6	3,12385
Sin aciertos	23667,6	20419,4	0,862758
Sin aciertos	4648,85	18867	4,058423
Proteína portadora de energía flagelar del espermatozoide	15761	17993,1	1,141622

Descripción	A expr.	B expr.	relación B/A
Factor de elongación 1-alfa	31911,4	16981,2	0,531803
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, tipo I	4794,26	15752,3	3,285658
ATPasa 4, tipo membrana plasmática	5823,11	13852,5	2,378883
Sin aciertos	10563,6	12461,5	1,179664
Piruvato quinasa	2248,7	12195,4	5,423311
subunidad alfa de ATP sintasa	12958,5	11405,6	0,880164

Es particularmente notable el aumento mayor de 40 veces en la expresión en Δ12 desaturasa, una enzima clave temprano en la ruta de síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (desaturación de 18:1 a 18:2). El análisis bioinformático convencional confirmó el gen más regulado positivamente como una Δ12 desaturasa potencial. En resumen, el análisis de BLASTn reveló bajo nivel de homología con regiones del cromosoma 5 de Micromonas sp. PCC299 como un acierto superior. Los resultados de BLASTn también mostraron que una parte de la secuencia diana era 96,9 % similar a la Δ12 desaturasa de *Verticillium albo-atrum* VaMS.102. BLASTx identificó la secuencia diana como una proteína con una parte sustancial (46 %) que era 92 % similar a la Δ12 Desaturasa de *Pheodactylum tricomutum.* Un análisis BLASTp para identificar dominios conservados identificó dos motivos de Δ12 ácido graso desaturasa conservados. Una exploración de motivos de SIB:myhits (disponible en http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) para analizar la secuencia proteica con respecto a la presencia de motivos reveló dos motivos de ácido graso desaturasa dentro de la secuencia, lo que sugiere además la función como una ácido graso desaturasa. El análisis de confirmación con EMBL-EBI InterProScan (http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/) también reveló que la presencia de motivo es característica de proteínas de ácido graso desaturasa.

Entre otras cosas, este ejemplo demuestra que la expresión de Δ12 desaturasa de Thraustochytrium sp. ONC-T18 está regulada positivamente en más de 40 veces durante la producción de ácidos grasos. Este aumento inesperado y drástico de la expresión identifica la Δ12 desaturasa como un regulador maestro de la biosíntesis de AGPI en traustoquítridos o *Thraustochytrium*, particularmente en ONC-T18. Los niveles de manipulación de este regulador maestro mediante la sobreexpresión, regulación negativa o inhibición pueden adaptar la biosíntesis de AGPI a lo largo de rutas particulares como se muestra en la Figura 1. Los elementos reguladores próximos y distantes (por ejemplo, promotor o promotores, UTR 5', intrones, terminadores y UTR 3' de la Δ12 desaturasa pueden unirse operativamente a uno o más genes de biosíntesis de AGPI para aumentar los niveles de expresión de esos genes hasta ordenes de magnitud similares durante la producción de ácidos grasos. En esencia, los elementos reguladores de Δ12 desaturasa son interruptores para conducir rutas de biosíntesis de AGPI en una o más direcciones predeterminadas.

Para aislar este gen, el gen más regulado positivamente descrito anteriormente, se llevó a cabo amplificación por PCR en un volumen de 50 µl que contenía: 200 ng de ADN genómico de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18, 10 µl de betaína, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, gelatina 0,001 %, 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 1 µM de cada cebador y 0,2 unidades de polimerasa de alta fidelidad. Se llevó a cabo termociclación a una temperatura de hibridación de 55,7 ºC, la reacción de PCR se resolvió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión 0,8 % y la banda de aproximadamente 600 pb se purificó en gel. El producto de PCR se eluyó de agarosa con agua y después se purificó con kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, Calif.). Estos fragmentos de ADN se clonaron en el kit de clonación Perfectly Blunt pT7Blue-3 (Novagen, San Diego, Calif.) según las especificaciones del fabricante. Los plásmidos recombinantes se transformaron en células competentes NovaBlue (Novagen, San Diego, Calif.), y los clones se secuenciaron. Un clon se aisló y secuenció así.

El inserto de gen de Δ12 Desaturasa de longitud completa es de 1239 pb (SEQ ID NO:**70**) de longitud y, comenzando con el primer ATG, contiene una fase abierta de lectura de 1238 pb que codifica 412 aminoácidos.

Tabla 4: Δ12 Desaturasa de ONC-T18 (SEQ ID NO:70)

ATGTGCAAGGTGGAGCCCACGCGGCACGAGCAGACGGCTGCGGCCAAGCCGCAAGAGCAG
CAGCAGCAGCGTCAGAGTCCCATCATCCATGGCAAGCACAACCCGGACCTGCCGACGCTC
GGCGAGATTCGCGCCGTGGTGCCGAAGCACTGCTTTGAGCGCTCGCTCGTGACGAGCTCG
CTTTACCTGGGCCGCGACCTTCTCATGGCAGCCACCCTCTTCTTCCTCGCCAGACAATTC
CTTCCCGTTTACGACATGGGCCTCTCGGGCGCGCTCGCCTGGACTGTCTACGTCTGTGTG
CAGGGTACCGTCGGTGCCGGCCTTTGGGTGCTTGGGCATGAATGCGGTCACCAGGCCTTT
TCCAACTACAGGATCGTCAACGACGGCGTCGGCTTTCTGGTCCACACGAGCCTGTTGGTG
CCTTATTTCAGCTGGGCGTACACGCACGGCTTGCACCATGCCCGCGTCAACCACATGCTC
GACGGCGAGTCGCACACGCCGAACCTGAAGAAGAAGGTGGCCGCCAACTTTCAAAAGTTC
TGCGACATGATGGGCGATGAGGCGTTTGCCGTTCTTCACGTCTTCGTCTACCTTCTCCTG
GCCTGGCCGCTTTACATCATCAACGGGAGCGGCGCGTCCAAGCGCAACCACGAGGGAAAG
CGCTGGTCGAAGGATTTCTGGAAGCGCCCCAACCACTTTTTGCCCACCTCGGAGCTCTTT
CCGGACAAGATGCGCCTCAAGGCCGCCGTCTCCACGATCGGCGTCCTTACCGTCATTGCC
GGCCTCTGCTACTGGGGCTCTATCGAGGGCGGGCGCACCGTGCTGCTCCAGTACTTTCTG
CCCTACCTGGTGGTCAATGCCTATCTCATTGGGTTTACCTGGATGCAACACACCCACCCG
GACGTCCCGCACCTCGGCGAGGACGAGTGGTCCTGGGTCGCGGGCACTGTGCTCACCGTC
GATCGCCCCTACCCGCCTTTTATCGACGTTCTGACCCACCGCATCGGGTCTACGCACGTG
GCGCATCACCTCTTCTCCAAGATGCCGTGGTACCACGCGCGCGAGGCTACGACCCACATC
CGGACCCTCCTCGAGCCCAAGGGCGTCTACAACTATGACCCGATGCCCTTTTACAAGGCC
TTGTTTCACACTGCTAAGTACTGCCACTACATGGAGGGCGTCGACGGTATTCAGTTCTTC
AAACATGCCGCTGCCCAGCCCAAGGCCAAGGAGCTCTAA

8. Aislamiento y amplificación de Δ5 Desaturasa (SEQ ID NO: **72**). La secuencia de una Δ5 Desaturasa de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 se aisló e identificó de una manera similar a la de la Δ12 Desaturasa. La secuencia completa es:

Tabla 5: Δ5 Desaturasa de ONC-T18 (SEQ ID NO: 72)

ATGGGCAAGGGAAGCGAGGGCCGCAGCGCGGAGCGCGAGATGTCGGCCGAGGCGAGCGGC
GACAAGCGGAAAACAATTTTGATCGAGGGCGTCCTGTATGACGTGACGAACTTTAAGCAC
CCGGGCGGTTCGATCATCAACTTTTTGACCGAGGGCGAGGCCGGCGTGGACGCGACACAG
GCGTACCGCGAGTTCCATCAGCGGTCCGGCAAGGCTGACAAGTACCTCAAGTCGCTGCCG
AAACTGGATGCGTCCAAGGTGGAGTCGCGGTTCTCGGCCAAGGAGCAGGCGCGGCGCGAC
GCCATGACGCGCGACTATGCGGCCTTTCGCGAGGAGCTCATCGCCGAGGGGTACTTTGAC
CCGTCGATCCCACACATGATTTTCCGCGTCGTCGAGATTGTGGCGCTCTTTGCGCTCTCG
TTCTGGCTCATGAGCAAGGCCTCGCCCAGCTCGCTCGTGCTGGGCGTGGTGATGAACGGC
ATTGCGCAGGGCCGGTGCGGCTGGGTCATGCACGAGATGGGCCACGGGTCGTTCACGGGC
GTCATTTGGCTCGACGACCGGCTGTGCGAGTTCTTTTACGGAGCCGGCTGCGGCATGAGC
GGGCACTACTGGAAGAACCAGCACAGCAAGCACCACGCCGCGCCCAACCGCCTCGAGCAC
GATGTCGATCTCAACACGTTGCCCCTGGTCGCCTTTAACGAGCGCGTTGTGCGCAAGGTC
AAGCCGGGGTCTCTGCTTGCGCTCTGGCTGCGTGTGCAGGCGTACCTCTTTGCGCCCGTC
TCGTGCCTGCTCATTGGCCTCGGCTGGACGCTGTACCTGCACCCGCGCTACATGCTGCGC
ACCAAGCGGCACATGGAGTTTGTCTGGATCTTTGCGCGCTATCTTGGTTGGTTCTCGCTC
ATGGGCGCTCTCGGTTACACGCCGGGCCGCTCGATCGGGATGTACCTGTGCTCGTTTGGC
CTCGGCTGCATTTACATTTTCCTGCAGTTCGCCGTCAGCCACACGCACCTGCCGGTGACT
AACCCAGAGGACCAGCTGCACTGGCTCGAGTACGCGGCGGACCACACGGTGAACATTAGC
ACCAAGTCCTGGTTCGTCACATGGTGGATGTCGAACCTGAACTTTCAGATCGAGCACCAC
CTTTTCCCCACGGCGCCGCAGTTTCGCTTCATGGAAATCAGCCCTCGCGTCGAGGCCCTC
TTCAAGCGCCACAACCTCCCATACTACGACCTGCCCTACACGAGCGCGGTCTCGACCACC
TTTGCCAACCTTTATTCCGTCGGCCACTCGGTCGGCGACTCGGTCGGCGCCGACACCGAC
GCCAAGAAGCAAGACTAG

La secuencia de aminoácidos predicha es:

Tabla 6: Secuencia de aminoácidos predicha de Δ5 desaturasa de ONC-T18 (SEQ ID NO: 73)

MGKGSEGRSAEREMSAEASGDKRKTILIEGVLYDVTNFKHPGGSIINFLTEGEAGVDATQ
AYREFHQRSGKADKYLKSLPKLDASKVESRFSAKEQARRDAMTRDYAAFREELIAEGYFD
PSIPHMIFRVVEIVALFALSFWLMSKASPSSLVLGVVMNGIAQGRCGWVMHEMGHGSFTG
VIWLDDRLCEFFYGAGCGMSGHYWKNQHSKHHAAPNRLEHDVDLNTLPLVAFNERVVRKV
KPGSLLALWLRVQAYLFAPVSCLLIGLGWTLYLHPRYMLRTKRHMEFVWIFARYLGWFSL
MGALGYTPGRSIGMYLCSFGLGCIYIFLQFAVSHTHLPVTNPEDQLHWLEYAADHTVNIS
TKSWFVTWWMSNLNFQIEHHLFPTAPQFRFMEISPRVEALFKRHNLPYYDLPYTSAVSTT
FANLYSVGHSVGDSVGADTDAKKQD*

9. Aislamiento e identificación de una secuencia promotora de gen de Δ12 desaturasa (SEQ ID NO: **69**). Basándose en los datos de secuencia genómica de ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths), se diseñaron cebadores oligonucleotídicos para flanquear la región reguladora cadena arriba del gen de Δ12 desaturasa. Los cebadores se diseñaron para incluir sitios de enzimas de restricción por la conveniencia de la clonación molecular cadena abajo. Los cebadores oligonucleotídicos se sintetizaron y obtuvieron de Invitrogen (California, EE.UU.). El promotor del gen de Δ12 desaturasa se amplificó a partir del ADN genómico de ONC-T18 con PCR, se precipitó, se digirió con las enzimas de restricción apropiadas, se purificó en gel de agarosa y se clonó en los sitios de restricción correspondientes del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen Corporation, California). Después de la transformación en una célula hospedadora bacteriana adecuada y selección, se seleccionaron varias bacterias transformadas, se cultivaron en columnas de 3,5 ml y se extrajo ADN plasmídico usando el kit de extracción de ADN plasmídico Zyppy. El ADN plasmídico purificado se digirió con enzimas de restricción apropiadas para confirmar la presencia del fragmento de ADN deseado. El inserto de un clon positivo se secuenció usando cebadores apropiados de secuencias de 25 pb separadas por aproximadamente 500 pb, del extremo 5' (directo) y 3' (inverso). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y algoritmos BLAST. El inserto de la secuencia de nucleótidos del clon fue de 3247 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: **69**) y se ha identificado como el promotor del gen de Δ12 desaturasa (SEQ ID NO: 69) de ONC-T18.

Tabla 7: Promotor próximo de Δ12 Desaturasa de ONC-T18 (SEQ ID NO: 69)

CGGACGGCGTGCTTAGTAACTGAATGAATAATTATACCAGCTGGGGATTCTGCGAATGCGAA
CGACGCTTCCAGAGCCTCACCTTTTGCAGCGACAGCGTGCCGCGCGCGATACTTGCTTCTATT
CTAGCAAAGCCCAACGCAAGGCTTGCCTACTCCTTGTCGAGCTTGTACATGTCCTTGGAGGT
GTACCCATTCGCGATGAGGCTCTCGTACGCGGCTTCGACCTGCTCCTTGTAGGAGCGGTACT
CGCCGAGGCCGAGGCCGCCCTCGCTGGTCGGTTTGAGGGACTTTTCGACGTTGTAGCGAGTG
CGGTGTGGCGGCGGCGCCCCCGAGCCGGGTGCGGGAAGCTTCGGGTCCACCTCGGTAGGAA
GCTCTTTTTTTCCGGTCCTCAGAAACCTTGTTAGACTCGCGCAAAACCTGGACAATTTCTTCGC
GCATGGGGGCACCGCCAATAAGAAGGAAGCGCTCGCCCCAGCCCTTCCAGTCAAAGTCCAT
CTGTGCGGCGTTGACGTGGGCGCGCGCCACATCGCGCACGTCCGTGATGCAGGCGTTGGCCT
GTTGAACCTTGGAGGCGCCAAAGTATGCTAGCACGGAGACCGAGCTGGTGTTGAGCTCGGG
GAGGCCGGGAAGCATGGGGCCGTAGATGAAGCTCGGGTTGAGCGCAGCAAGCTTGAAAGAG
CTCTCCTTGGCGATCTCCCAGGCCGTTTTCTCGGCGAGGAGCTTGGAAAGGCCATAGTAGTT
CTTTTTCTCCTCGAGGACCTTGTCGTCGGTCCAGTCCTCTTCGCTGTAGACGTACTCGGGGGG
CTTCGCGCCGTACGTGATGTAGATGTTGGCGATCGAGGCGGTAAGCACGACCTTTTCCACAC
CGAGCTTCTCGCAGGACTCAAGCACGTTGCGCGTGCCCTTCACGGCCGGCTCGACGAGTTTC
TGGCGCGCCGACTCGTCGTTTATGCGGATAAAGGGCGACGCCGAGTGGATCACCGTGGGGC
ATCCCTTGATGGCCTCATCGAAGCTGCCCTGCTCCAGGAGATCGCAGCCAGTGAAAAGCTTG
AGCCGCTCCTGGGCGCCATCGAGCTTTTGCAGAAAGTCCACCTTTTTGCCGGACCGCGTCGTT
CCGTGCACCTCGAAGCCGGCCTCCAGCGCGTACTTGACTACCCACGAGCCCAGGAAACCGGT
ACACCCCGTCACGCACACGCGTTTCGCCTCCGGCACCGACATGCTGCTTGTTTGTCCACCTCC
TCGGCTCTTGCTCCGCTCGCGTATAGGCCAGGCGGCTGGCTAGCTGCTCGGGCTCGGGACCA
AAACGTTTCTGCAAGTTTCGAGACTGCGGCTTCAGCTGGGATTTTGTGGCGTTTGCCTCGGCC
TCACCGTCATCGCCTCATCCCGTGCGCGCAGATGACGACGATGCCGCCGACCTCGCACGACC
TCAAGCGGTTCAGGAGTCGTTCGCTGCGCCAAGAAATGGGCAGCGCAACGCACGCCGCTCG
AGGTGGGCTGTGAGCGCCTCGGGCACGCGACTAATAAGCCCCAGGGCGCTCGGGATGCCCT
CCTTCCGCCGCACGCGTTGCATTCTTGCTTGCTTGCTTGCTTGCTTGCTTGCTTGCTTGCTTGC
CTGCGCGGAGAAGTGTTGGTTTTTCCGATCGACGGCAAAGATAACGCGCGTGTACTAGCGTC
GATCGCGAGTCCCTTGACCTGCCTGCCTCCGTCAGCATGCTGCCAAGGGTTGATGCGAGTAG
CGCGGCGCCGCGTTGCTGCGAGATGCGCGCGCGGAGTGGTCCGCGTCCTTGCTGCCTGCGAT
CGACACGACGCTGATGAGGGTCGAGCTTCCTTCTTCCCTTCCGGCGCCGTTGAACCCGCCCA
CCCATGTTGGCGAGGTGAATCTGGAGCCCGTGCCGGCGGCCGGCGGCACCGTGGGCCACCC
GCACGCGGGCTACCAAGCACGCTTTGCGGCGGCGGGGCACCGCCCGCGAAACGCGTTGCGC
AGACACCCATTTCCAGCATTTCGAGGTACTGAGGCTAACCGACGACGCGACGCAGCGACGG
CGCCCCCGGCATGACGCGGCTCGGGAGCGTTTGTTTTGGCGTGCGTTGCTCGCGCGGCGGAC
GTTCACGAAACCCGTGTCGGGCCGGGATCCGCGCTGGTCCGGGCGCTCGACATCGATTTCCT
TTCGAGCGCGCTGCCGCGTCGAAGGGGCTCCGGGTCGCGCTAGGTCTTCTGGCCTAGGAAAG
GAAAGAAAACGGGAAGGAGGATCAAAGTCATACTATGCGTACACGCCGCGTTCGGAAACCC
TAGCTGGTTCAACCAGTTCCCTCTTCTGATTCCCTCGCTGGGTTCTGCGGGCCACGCTCAAGC
CGTCCGGGACGTCATGGACGTCGCGCTGCCCTGCGTCGTTCTTCTACGCGTACGCACAAGAA
GGCGTCACCGCCGCGCCCGCGCCGAAGACCTCCCTCCCGATCGAAGGTCCTGGTTCTCGGGA
GGCGCTGTGCGTGGTATGTCGACGCGCTCGGCTCTGCGCTGGAGAGCGCAAGGCGGCTTTTT
GACCAGGTTGCCTGCCTCCTACCACGTGCCCGTAGGGAGGGGGAATGTACCGCAGTGCGGTG
GTCCGCCAAGCAAGAAACCCCGCAGAGAAGGCGTAAAGTGGAAGAAAAACAGCGTCGTAT
GCCGCCGTCGTCGCAGGTGCTCGTCGTCGCCTCGTCGATGGGACCCATCATGCGCTGAGAGT
CTGCTGCAAAAGAGGTAGGGACTCGGGAAGGACCTGGTTCGCGCTGGCTGGGGAATCAGTA
ATCGCATTTCGGACATGGATGCGGAGACGCTCCCCGATGACGATGCTCCAGGAATCGCGCGG
CACGTTTTACGGCGGCGAGAGAGAAAGTCTCAGCTTCTTTTCGAGGGTATACTCCGTGGCGG
GTTATCATCATGTGAGAGATGTATCGACGCGATGGAGAAGCATCGGGTCTTCGTCGAACATC
CGGGGTCGCCGGTTCGTCACGAAGCCAGCTCATGCCTCCACATGTCTCACAAGACCACCGAA
AAACTGTCGAACTTGATTCTTTAGGTCTCTCGGACGCAAATAAAAAGCATCGGCGCGCTCGC
GTTCACCAGCAAGCAGACAAAACCAATATCAGCCTATTGGCCGACCAAAACCAAGCAGCAG
TTCCTCAACTCGGCTCTGCTCAACTCAGCAAACTGCCAACGCGTACTAGCAGACAAGGATTC
ACCCCAGCTTCGGTTGAAACTACAAGATC

El análisis de la secuencia de Δ12 desaturasa reveló la presencia de veinticuatro fases abiertas de lectura (ORF) potenciales, mayores de 100 pb de longitud, dentro de la región de 3247 pb. El análisis de BLASTP de estas identificó varias con relevancia potencial para mecanismos de control y esta solicitud. Los ejemplos incluyen los que

tienen homología con cinamil alcohol deshidrogenasas dependientes de NADPH (E= 2e -55), con dominios de NADB rossmann y Epimerasa conservados, proteínas bifuncionales de tipo proteasa/dUTPasa (E=2,2), monooxigenasa que contiene flavina (E=0,48), precursor de lipoproteína de biosíntesis de tiamina (E= 0,17), nucleotidil transferasa (E= 0,99) y proteína de unión a maltosa periplásmica potencial (0,5). Se sabe en el campo que las ORF cadena arriba (uORF) pueden influir en una función reguladora en la expresión de proteínas (Child, Miller et al. 1999), como también pueden mecanismos de corte y empalme alternativo y riboswitch (Epshtein, Mironov et al. 2003; Croft, Moulin et al. 2007). El análisis bioinformático de sitio promotor/de inicio de la transcripción en línea con mosca de la fruta (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) identificó los siguientes sitios promotores/de inicio de la transcripción potenciales:

Predicciones de promotor cadena directa

Comienzo	Final	Puntuación	Secuencia promotora	SEQ ID NO:
444	494	0,89	GCACCGCCAATAAGAAGGAAGCGCTCGC CCCAGCCCTTCCAGTCAAAGTC	74
947	997	0,95	GTTTATGCGGATAAAGGGCGACGCCGAGT GGATCACCGTGGGGCATCCCT	75
1509	1559	0,96	GGGCACGCGACTAATAAGCCCCAGGGCG CTCGGGATGCCCTCCTTCCGCC	76
2637	2687	0,83	AAAGTGGAAGAAAAACAGCGTCGTATGC CGCCGTCGTCGCAGGTGCTCGT	77
3060	3110	0,99	CTCTCGGACGCAAATAAAAAGCATCGGCG CGCTCGCGTTCACCAGCAAGC	78

Predicciones de promotor cadena inversa

Comienzo	Final	Puntuación	Secuencia promotora	SEQ ID NO:
2866	2816	0,98	CTCGCCGCCGTAAAACGTGCCGCGCGATT CCTGGAGCATCGTCATCGGGG	79
2551	2501	0,99	GCAACCTGGTCAAAAAGCCGCCTTGCGCT CTCCAGCGCAGAGCCGAGCGC	80
2410	2360	0,87	TGCGTACGCGTAGAAGAACGACGCAGGG CAGCGCGACGTCCATGACGTCC	81
1537	1487	0,88	GCGCCCTGGGGCTTATTAGTCGCGTGCCC GAGGCGCTCACAGCCCACCTC	82
305	255	0,93	CTACAACGTCGAAAAGTCCCTCAAACCGA CCAGCGAGGGCGGCCTCGGCC	83

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de la secuencia promotora de gen de Δ12 desaturasa (SEQ ID NO: **69**) en diversas bases de datos del Genbank incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia significativa homóloga de la secuencia promotora de gen de Δ12 desaturasa (SEQ ID NO: **69**).

10. Aislamiento e identificación de una secuencia promotora de gen de Δ5 desaturasa (SEQ ID NO:**71**). Se diseñaron cebadores oligonucleotídicos para flanquear la región reguladora cadena arriba del gen de Δ5 desaturasa. Los cebadores se diseñaron para incluir sitios de enzimas de restricción por la conveniencia de la clonación molecular cadena abajo. El fragmento de ADN de promotor del gen de Δ5 desaturasa se amplificó usando PCR, se precipitó, se digirió con las enzimas de restricción *XhoI* y *NcoI*, se purificó en gel de agarosa y se clonó en los sitios de restricción correspondientes del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen Corporation, California) digerido con las mismas enzimas de restricción y purificado en gel. El inserto de un clon positivo se secuenció usando cebadores apropiados. Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y algoritmos BLAST. El inserto de la secuencia de nucleótidos del clon es de 1066 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: **71**) y se ha identificado como el promotor de gen Δ5 desaturasa (SEQ ID NO:**71**) de ONC-T18.

Tabla 8: Promotor próximo de ASDesaturasa de ONC-T18 (SEQ ID NO: 71)

GATATGTATTTACGTGATCAACAACCAATCAGCCACGACGTTATCGTCGTTGTCGGCCTT
GTCGTCGTTGTCGAAGCAGAGGTTGGAGAACGACAGCAACAACGCGACGGGGAGAATGTT
GATTACGCCCCGTCAATCTCGGAAGGGCCGACCTAGCCCAGAAGTCCTCGGCAGCCTTTG
GTTAACTTCGGAGCCCGCAACGTTCTGGGACTGTCTTTGCTCTAATGTAATGCGATGCCG
CGCCTTGCGACCAAGGTTCTGCCCCGTCGGCGTTGAAGTCTTCGCTCGAGGGCTTCTGGA
TGTTGGAGAACTGATTGCACCCAATGCGATCGCCAATCGATCGATGCGCGCTCCGGGCGA
CCTTCTTCTCGCCGTGCCGCTTTTGCCTCCTTTGCAGCCAGGTACGTAGCCTCGCACCTG
GGGCTGTCCTCGACCATGGTCTCGTGGCCCATCTCGAAGCAAACGAAAAGCAGCGCACCA
CCTTCGTTTTCGGCCCTTTTCGCCGCATTCCCCCGGCATCGTGAAACTTGCGCGCCGGCC
CCGGCTAAAGTGCGCGTGACACATTGATCGCCCAGGACCAGGCTGCACATTGGGGGTAGA
AAACTTAGTGTCGGCGCGGCCCTGCGTGCGTCAGCAGCATACGTAAGCCAGCATCCTCGC
CCTAAGTGTGCACTGAAAACGCACACTCCTTGGTCATGTGTGGGGACACCCGACGGGGAC
TCAGCGAGGACGGTGTCCCCACCTCCGCGTACCGGCAACGTAGAGGGCAAGGCAAAATCG
TTGGATCCTCACGACAACAGGCCACGCCCAGGTCACCCTCCATTCCATTGTACCGTCCGT
TTCGACTGGCGGCTAACGAAAAGCCTATAGCCGTTCTCGTTTGCCATTTATTGACGACTC
TGCCCGGATGAATCCCAAACACGATTCATATGCGCGGTCTGCTCCGTCTTATGGATGACG
CTGGATGGATGGGAAAAGGTAAAATAGGCGTTCTTTACTGTCAGGGTCTTGCAGTCGTCT
TGTGTTGCTTGGCCGAGTAATCGTCACGCGCAAACGATCGGCGCCT

La herramienta de predicción de ORF en línea, ORF finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/) identificó 12 ORF potenciales de más de 100 bases, dentro del promotor de 1066 pb. De estas, se descubrió homología con la base de datos no redundante en el NCBI (como se identificó por análisis de BLASTP) para varias ORF; sin embargo la homología fue baja y por lo tanto no se consideró relevante para este trabajo. Independientemente, tal como se ha analizado previamente, uORF y riboswitch pueden influir en la función del promotor de maneras previamente indeterminadas. El análisis bioinformático de sitio promotor/de inicio de la transcripción en línea con mosca de la fruta (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) identificó los siguientes sitios promotores/de inicio de la transcripción potenciales.

Predicciones de promotor cadena directa				
Comienzo	**Final**	**Puntuación**	**Secuencia promotora**	**SEQ ID NO:**
534	584	0,83	GCCGGCCCCGGCTAAAGTGCGCGTGACACATTGATCG CCCAGGACCAGGC	84
973	1023	0,85	GAAAAGGTAAAATAGGCGTTCTTTACTGTCAGGGTCT TGCAGTCGTCTTG	85
Predicciones de promotor cadena inversa				
902	852	0,86	CAGAGTCGTCAATAAATGGCAAACGAGAACGGCTAT AGGCTTTTCGTTAG	86

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de la secuencia promotora de gen de Δ5 desaturasa (SEQ ID NO: **71**) en diversas bases de datos del Genbank incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga del promotor del gen de Δ5 desaturasa (SEQ ID NO:**71**).

Ejemplo 2: Identificación de un antibiótico que puede usarse para manipulación genética de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 (para referencia)

El presente ejemplo describe experimentos que identifican un antibiótico para el que puede usarse resistencia como un marcador seleccionable para manipulación genética de ONC-T18.

Se cultivó *Thraustochytrium sp.* ONC-T18 en placas de agar (20 g de agar por litro de ONC-T18-GM0). Se inoculó un asa de inóculo de ONC-T18 en 50 ml de ONC-T18-GM0 líquido, y el cultivo se incubó en un incubador agitador a 25 °C a 250 rpm durante 36 horas. Se transfirió medio mililitro del cultivo a un tubo de 1,5 ml y se agitó vorticialmente a máxima velocidad durante 30 segundos para romper los grupos de células, después se diluyó en 50 ml de agua esterilizada. Se sembraron en extensión cien microlitros de la solución resultante en cada placa de medio ONC-T18-GM0. Cada placa contenía uno de diversos antibióticos a una de diversas concentraciones. Las placas se incubaron

a 25 °C y se observaron diariamente la aparición y el desarrollo de colonias. Como puede verse en la Tabla 9, el crecimiento de ONC-T18 fue insensible a la mayoría de los antibióticos ensayados. Sin embargo, la zeocina inhibió significativamente el crecimiento de ONC-T18 en placas de agar de ONC-T18-GM0.

Por lo tanto, el presente ejemplo identifica la zeocina como un antibiótico que puede usarse para selección en experimentos de manipulación genética.

Tabla 9: Efectos de antibióticos en el crecimiento de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

	Concentración (µg/ml de medio)				
Antibióticos	0	1	10	50	100
Nourseotricina	++++	++++	++++	++++	++++
Bialofos	++++	++++	++++	++++	++++
	Concentración (µg/ml de medio)				
	0	100	200	500	
Kanamicina	++++	++++	++++	++++	
	Concentración (µg/ml de medio)				
	0	10	30	50	100
Zeocina	++++	+++	++	+	---

Ejemplo 3: Agente mutagénico (para referencia)

Este ejemplo describe, entre otras cosas, el descubrimiento de un agente mutagénico eficaz. Este agente en particularmente útil para mutagénesis en traustoquítridos.

La zeocina rompe el ADN cromosómico en células. Se ha planteado la hipótesis de que el antibiótico zeocina sería un agente mutagénico útil para cepas de traustoquítridos para mejora de cepas. A determinadas concentraciones, la zeocina puede destruir la mayoría de células tratadas, pero algunas células aún sobrevivieron. El tratamiento de células a alta concentración aumenta la frecuencia de mutación, lo que puede facilitar la selección y el aislamiento de cepas mutadas.

La cepa de tipo silvestre de protista marino de ONC-T18 se eligió como un sistema modelo para ensayar si la zeocina sería eficaz para inducir mutagénesis en esta cepa. Un asa llena de los inóculos de ONC-T18, que crecían en las placas de agar que contenían medio ONC-T18-GM0 [extracto de levadura 5 g/l, peptona 5 g/l, D(+)-glucosa 10 g/l, sal marina artificial 35 g/l, oligoelementos 1,25 mg/l ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 5 g/l, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 3,15 g/l, $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 4,36 g/l, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,6125 mg/l, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,0597g/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,022 g/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,01 g/l, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,18 g/l, H_2SeO_3 13 µg/l, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 2,7 mg/l, Na_3VO_4 1,84 mg/l y K_2CrO_4 1,94 mg/l), vitaminas 1,25 mg/l (vitamina B12 1 mg/l, biotina 1 mg/l, tiamina HCl 0,20 g/l) y 20 g de agar por litro], se inoculó en 50 ml de medio ONC-T18-GM0 líquido, y se incubó en un incubador agitador a 25 °C a 250 rpm durante 36 horas. Se transfirió medio mililitro del cultivo a un tubo de 1,5 ml y se agitó vorticialmente a máxima velocidad durante 30 segundos y después se diluyó en 50 ml de agua esterilizada. Se sembraron en extensión respectivamente cien microlitros de los inóculos diluidos en las placas de agar que contenían zeocina a diversas concentraciones (0, 10, 30, 50 y 100 µg/ml). Las placas se incubaron en un incubador a 25 °C. La aparición y el desarrollo de las colonias se observaron diariamente. Seis días después de la inoculación, los tamaños de las colonias que crecían a zeocina 10 µg/ml fueron similares a los de zeocina 0 µg/ml y gradualmente se redujeron a zeocina de 30 a 50 µg/ml. Los números de colonias por placa también se redujeron gradualmente a zeocina 10, 30 y 50 µg/ml. A zeocina 50 µg/ml solamente se vieron varias colonias. Notablemente, se observaron sectores de colonias con diversos cambios de la morfología de las colonias visibles en algunas de las colonias que crecían a zeocina 50 µg/ml, pero no se observaron en las colonias que crecían a menor concentración o sin zeocina, lo que indica que la zeocina es de hecho un agente mutágeno eficaz para cepas de traustoquítridos. En estas condiciones, la zeocina fue eficaz dentro del intervalo de al menos 10-200 µg/ml; también pueden ser eficaces concentraciones mayores. Por ejemplo, podrían funcionar concentraciones en el intervalo de 200-500 µg/ml. En algunos casos, se usan mayores concentraciones de zeocina cuando las concentraciones salinas también aumentan para contrarrestar la posible degradación de zeocina de sal. En las condiciones particulares utilizadas en el presente ejemplo, la zeocina funcionó mejor a 50 µg/ml.

Ejemplo 4: Construcciones de ácido nucleico

Este ejemplo describe la construcción de los vectores de expresión génica específicos de traustoquítridos. La presente divulgación proporciona por lo tanto, entre otras cosas, vectores que comprenden genes de

Thraustochytrium, promotores y/o terminadores unidos operativamente a un gen heterólogo (por ejemplo, de modo que el promotor esté cadena arriba del gen y el terminador esté cadena abajo). Dichos vectores incluyen, por ejemplo, uno o más orígenes de replicación, y uno o más marcadores seleccionables o detectables. La presente divulgación proporciona por lo tanto, entre otras cosas, vectores que comprenden un promotor de *Thraustochytrium* unido operativamente a un gen heterólogo. En algunas realizaciones, dichos vectores incluyen, por ejemplo, un terminador, uno o más orígenes de replicación, y uno o más marcadores seleccionables o detectables.

1. Generación de los vectores plasmídicos recombinante pD4DPZ1 (SEQ ID NO:**30**; Fig. **2**) y pE5PZ1 (SEQ ID NO:**31**; Fig. **3**). Se amplificaron fragmentos de ADN promotores de los genes de Δ4 desaturasa y Δ5 elongasa de ONC-T18 con PCR usando el ADN genómico de ONC-T18 como el molde y ADN polimerasa *TaKaRa LA Taq*™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japón). El cebador n.º 1 (SEQ ID NO: **25**) que porta el sitio de enzimas de restricción *Xho*I en su extremo 5', y el cebador n.º 2 (SEQ ID NO: **26**) que abarca el sitio de enzimas de restricción *NcoI* en su extremo 5' se utilizaron para la amplificación del promotor génico de Δ4 desaturasa (SEQ ID NO:**24**). El cebador n.º 3 (SEQ ID NO: **20**) que porta el sitio de enzimas de restricción *Xho*I en su extremo 5' y el cebador n.º 4 (SEQ ID NO: **21**) que contiene el sitio de enzimas de restricción *NcoI* en su extremo 5' se emplearon para la amplificación del promotor de Δ5 elongasa (SEQ ID NO:**19**). Se llevaron a cabo reacciones de PCR en un volumen de mezcla de reacción de 50 µl que contenía 2,5 unidades de ADN polimerasa *TaKaRa LA Taq*™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), Tampón LA PCR II 1 X, mezcla de dNTP (0,40 mM cada uno), 225 ng del molde de ADN genómico, cebadores 0,20 µM [pares de cebadores, n.º 1 (SEQ ID NO: **25**) y n.º 2 (SEQ ID NO: **26**) para amplificación del promotor de Δ4 desaturasa y n.º 3 (SEQ ID NO: **20**) y n.º 4 (SEQ ID NO: **21**) para amplificación del promotor de Δ5 elongasa] en las siguientes condiciones: 94 °C durante 30 segundos durante un ciclo, 98 °C durante 10 segundos y 55 °C durante 5 segundos, 72 °C durante 2 minutos durante 30 ciclos.

Los productos de PCR se precipitaron siguiendo estos procedimientos: se añadió ddH_2O sin nucleasa a un volumen total de 200 µl, después se añadieron 20 µl de NaAc 3 M (pH 5,2) y 440 µl de etanol 100 % y se mezclaron por agitación vorticial breve, se incubaron en hielo durante 1 hora, se centrifugaron a máxima velocidad con una centrífuga de sobremesa durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante, se añadieron 500 µl de etanol al 75 % y se centrifugaron durante 2 minutos a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y se secaron al vacío los sedimentos de ADN durante aproximadamente 10 minutos. Los productos de PCR del promotor del gen de Δ4 desaturasa se digirieron con enzimas de restricción *NcoI* (10 unidades) y *Xho*I (10 unidades) en un volumen de mezcla de reacción de 25 µl que contiene NEBuffer 2 1 X y BSA 1 X; (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) a 37 °C durante 2 horas. Los productos de PCR del promotor del gen de Δ5 elongasa se digirieron con enzimas de restricción *Nco*I (10 unidades) y *Xba*I (10 unidades) en las mismas condiciones. Los productos de PCR digeridos se resolvieron en gel de agarosa 0,8 % para electroforesis a 88 tensiones durante 45 minutos. Las bandas de ADN de los productos de PCR se recortaron con una cuchilla del gel de agarosa y los ADN se extrajeron y se purificaron con kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN de promotor del gen de Δ4 desaturasa resultante con los extremos adhesivos específicos de enzima se ligó en los sitios de restricción correspondientes *Nco*I y *Xho*I del vector pSV40/Zeo2 digerido con las mismas enzimas de restricción y se purificó en gel de agarosa, para producir el vector pD4DPZ1 (SEQ ID NO:**30**; Fig. **2**). El fragmento de ADN del promotor del gen de Δ5 elongasa resultante con los extremos adhesivos específicos de enzima, se ligó en los sitios de restricción del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen Corporation, California) digerido con enzimas de restricción *Nco*I y *Nhe*I y se purificó en gel de agarosa, para producir el vector pE5PZ1 (SEQ ID NO:**31**; Fig. **3**). Las reacciones de ligamiento se llevaron a cabo en un volumen de mezcla de reacción de 10 µl que contenía tampón de ligamiento 1X, los ADN de inserto y vector (relación molar 3:1) y 0,5 unidades de ADN ligasa T4 (Invitrogen, California) a temperatura ambiente durante 12 horas. Después los ADN ligados se transformaron en las células competentes de *E. coli* Top 10 (Invitrogen Corporation, California). Los ADN plasmídicos de tres colonias de los transformantes se aislaron de cultivos bacterianos de 3 ml usando kit de miniprep de plásmidos Zyppy™ (Zymo Research Corp., Orange, California). La integridad de los clones se ensayó preliminarmente con digestiones con enzimas de restricción usando enzimas *Xho*I y *NotI* para construcción del promotor del gen de Δ5 elongasa y enzimas *Nco*I y *Xho*I para construcción del promotor de Δ4 desaturasa. Los insertos de los clones positivos identificados preliminarmente JZ1-57-1 de vector del promotor del gen de Δ4 desaturasa, y JZ1-57-7 de vector del promotor del gen de Δ5 elongasa se secuenciaron exhaustivamente usando el cebador n.º 14 (SEQ ID NO:**22**) y cebador n.º 15 (SEQ ID NO:**23**). El vector resultante pD4DPZ1 (SEQ ID NO: **30**; Fig. **2**) contiene el gen *ble* de *Streptoalloteichus hidustanus,* flanqueado por el promotor del gen de Δ4 desaturasa de ONC-T18 y el terminador de SV40. El vector resultante pE5PZ1 (SEQ ID NO:**31**; Fig. **3**) también contiene el gen *ble* flanqueado por el promotor del gen de Δ5 elongasa de ONC-T18 y el terminador de SV40.

La presente divulgación proporciona por lo tanto, entre otras cosas, vectores que comprenden un promotor de *Thraustochytrium* unido operativamente a un gen heterólogo. Dichos vectores incluyen, por ejemplo, un terminador, uno o más orígenes de replicación, y uno o más marcadores seleccionables o detectables.

2. Generación del vector de expresión génica de marcador de proteína verde fluorescente (GFP) (SEQ ID NO:32; Fig. 4). Para preparar el ADN plasmídico molde del gen de GFP, la reserva bacteriana de *E. coli* que contenía el plásmido pCD3-327 [N.º de referencia de GenBank U70496; (Davis y Vierstra, 1998)] se obtuvo del centro de depósito de Arabidopsis (Ohio, EE.UU.). Las bacterias se sembraron en estrías en la placa de agar LB

que contenía ampicilina 100 µg/ml. Se inoculó una única colonia en 3 ml de medio LB que contenía ampicilina 100 µg/ml y se cultivó durante una noche. El ADN plasmídico de las bacterias cultivadas se aisló usando kit de aislamiento de ADN de miniprep bacteriano Ultraclean (MO BIO Laboratories, Inc, Solana Beach, California) según el protocolo del fabricante.

El fragmento de ADN del gen de GFP se amplificó con PCR usando ADN polimerasa *TaKaRa PrimeStar Taq*™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), el ADN del plásmido molde pCD3-327 y los pares de cebadores n.º 5 (SEQ ID NO:**33**) que porta el sitio de enzima de restricción *Xho*I en su extremo 5' y n.º 6 (SEQ ID NO:**34**). Después los productos de PCR se precipitaron con etanol y se digirieron con enzima de restricción *Xho*I y se purificaron en gel. El ADN purificado en gel se ligó en los sititos de enzimas de restricción *Xho*I y *Bsa*AI de la cadena principal del ADN plasmídico del vector pE5PZ1 (SEQ ID NO:**31**; Fig. **3**) digerido con enzimas *Xho*I y *Bsa*AI y se purificó en gel, para reemplazar el gen *ble* con el gen marcador de proteína verde fluorescente (GFP) y producir el vector de expresión pE5PRsGFP1 (SEQ ID NO:**32**; Fig. **4**) en el que el gen *GFP* está flanqueado por el promotor del gen de Δ5 elongasa de ONC-T18 y el terminador de SV40. Como se muestra en la Fig. 4, un gen de resistencia a AMP proporcionó selección positiva de clones transformados.

La presente divulgación proporciona por lo tanto, entre otras cosas, vectores que comprenden un promotor de *Thraustochytrium* unido operativamente a un gen heterólogo. En algunas realizaciones, dichos vectores incluyen, por ejemplo, un terminador, uno o más orígenes de replicación, y uno o más marcadores seleccionables o detectables. A la luz de la descripción proporcionada en el presente documento de una pluralidad de dichos vectores e información de secuencia con respecto a determinados elementos tales como promotores y/o terminadores suficientes para permitir el enlace de elementos (por ejemplo, promotores, terminadores) que tienen dichas secuencias a otros elementos, los expertos habituales en la materia, que lean la presente divulgación, serían capaces de preparar y usar una amplia serie de construcciones de vector individuales diferentes, por ejemplo combinando secuencias proporcionadas con cualquiera de una diversidad de elementos adicionales conocidos, con frecuencia de acuerdo con técnicas conocidas.

3. Generación de los vectores plasmídicos recombinantes p341PZ40T (SEQ ID NO:35; Fig. 5). Para construir el vector p341PZ40T (SEQ ID NO:35; Fig. 5) que contiene el gen *ble* de *Streptoalloteichus hidustanus,* flanqueado por el promotor del gen de tubulina n.º 341 de ONC-T18 y terminador de SV40, el fragmento de ADN del promotor del gen de tubulina n.º 341 se amplificó con PCR usando los pares de cebadores n.º 66 (SEQ ID NO:**36**) y n.º 67 (SEQ ID NO:**37**), y el ADN plasmídico molde del clon JZ2-17-14 descrito en el Ejemplo 1. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 66 (SEQ ID NO:**36**) es complementaria de una región pequeña de un vector intermedio derivado del vector pT7Blue-3 (Novagen, Gibbstown, NJ, EE.UU.), y su extremo 3' es complementario de la cadena menos del extremo 5' del promotor del gen de tubulina n.º 341 de ONC-T18. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 67 (SEQ ID NO:**37**) es complementaria de la cadena más de la secuencia del extremo 5' de la fase abierta de lectura del gen *ble* y su extremo 3' es complementario de la cadena más del extremo 3' del promotor del gen de tubulina n.º 341 de ONC-T18.

El fragmento de ADN de la ORF del gen *ble* que incluye el terminador de SV40 localizado en su extremo 3' también se amplificó con PCR usando los pares de cebadores n.º 68 (SEQ ID NO:**38**) y n.º 71 (SEQ ID NO:**39**), y el ADN molde plasmídico del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen, California). La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 68 (SEQ ID NO:**38**) es complementaria de la cadena más de la secuencia del extremo 3' del promotor del gen de tubulina n.º 341 de ONC-T18 y su extremo 3' es complementario de la cadena menos del extremo 5' del promotor de la ORF del gen *ble*. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 71 (SEQ ID NO:**39**) es complementaria de una región pequeña de un vector intermedio derivado del vector pT7Blue-3 y su secuencia del extremo 3' es complementaria de la cadena más de la secuencia del extremo 3' del terminador de SV40.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de mezcla de reacción de 50 µl que contenía 2,5 unidades de ADN polimerasa *TaKaRa PrimeStar Taq*™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), Tampón de PCR *PrimeStar* 1 X, mezcla de dNTP (0,40 mM cada uno), 1 ηg del ADN plasmídico molde, 0,20 µM de cada cebador de los pares de cebadores. Se emplearon las condiciones de PCR, 98 °C durante 10 segundos y 55 °C durante 5 segundos y 72 ºC durante 2 minutos, durante 30 ciclos. Los productos de PCR del promotor del gen de tubulina n.º 341 y ORF del gen *ble* se resolvieron en gel de agarosa 0,8 % para electroforesis a 65 tensiones durante 60 minutos. Las bandas con los tamaños correctos se recortaron con una cuchilla y sus ADN se extrajeron y se purificaron con kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) según el protocolo del fabricante. Después los productos de PCR purificados en gel se mezclaron en relaciones molares similares, que se usaron como los moldes de ADN para la PCR de extensión para fusionar el promotor del gen de tubulina n.º 341, la ORF del gen *ble* incluyendo terminador de SV40 entre sí (Higuchi, Krummel y Saiki, 1988; Zhang, Wege y Jeske, 2001). La PCR de extensión se llevó a cabo en un volumen de mezcla de reacción de 50 µl usando ADN polimerasa *TaKaRa PrimeStar Taq*™ ((Takara Bio Inc., Shiga, Japón), -100 ng del ADN molde de los productos de PCR mixtos y los pares de cebadores n.º 66 (SEQ ID NO:**36**) y n.º 71 (SEQ ID NO:**39**) (0,20 µM cada uno). Se emplearon las condiciones de PCR, 98 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 5 minutos y 72 °C durante 3 minutos durante 6 ciclos; y 98 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 3 minutos y medio durante 25 ciclos. El producto de PCR que contiene casete de expresión del gen *ble* específico de ONC-T18 se purificó en gel con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen,

Valencia, California) según el protocolo del fabricante y se clonó en un vector intermedio derivado del vector pT7Blue-3 (Novagen, Gibbstown, NJ, EE.UU.) usando PCR de extensión (Higuchi, Krummel y Saiki, 1988; Zhang, Wege y Jeske, 2001). La PCR de extensión se llevó a cabo en un volumen de mezcla de reacción de PCR de 50 µl que contenía 2,5 unidades de ADN polimerasa *TaKaRa PrimeStar Taq*™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), Tampón de PCR *PrimeStar* 1 X, mezcla de dNTP (0,40 mM cada uno), 200 ng de ADN del producto de PCR purificado en gel que contiene el casete de expresión del gen *ble* específico de ONC-T18 y 600 ng de ADN plasmídico de un vector intermedio linealizado con la enzima de restricción *Hind*III. Se emplearon las condiciones de PCR, 98 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 5 minutos y medio durante 30 ciclos. A continuación el ADN plasmídico molde fue destruido por la digestión con enzima de restricción de *Dpn*I que digería específicamente el ADN plasmídico metilado de algunas cepas bacterianas. Esta digestión se llevó a cabo en un volumen de reacción de 150 µl que contenía 50 µl de productos de PCR de extensión, 30 unidades de *Dpn*I y tampón de reacción 4 de enzima de restricción 1X (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) a 37 °C durante 2 horas. Después de digestión, la enzima *DpnI* se inactivó por incubación a 80 °C durante 20 minutos. Después se añadió agua esterilizada en la mezcla de digestión hasta 350 µl y se desaló y concentró adicionalmente el ADN hasta ~100 ng/µl usando la columna Microcon (YM-100, Millipore Corporate, Billerica, MA). Se usó un µl del ADN desalado para transformar las células competentes de *E. coli* Top 10 (Invitrogen, California, EE.UU) usando el electoporador (Eppendorf 5210) ajustado a 1890 tensiones así como las cubetas de electroporación de 1 mm de hueco (Eppendorf, NY, EE.UU.). Las colonias positivas se exploraron preliminarmente con la PCR de colonias directa como se describe en el ejemplo 1 usando los pares de cebadores n.º 64 (SEQ ID NO:**40**) y n.º 65 (SEQ ID NO:**41**). El inserto del clon positivo JZ2-53-10 se secuenció completamente usando cebadores directos e inversos así como cebadores internos n.º 15 (SEQ ID NO:**23**), n.º 16 (SEQ ID NO: **42**), n.º 54 (SEQ ID NO: **7**), n.º 64 (SEQ ID NO: **40**), n.º 65 (SEQ ID NO:**41**) y n.º 85 (SEQ ID NO:**43**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y se confirmó la integridad del inserto clonado. El vector de expresión del gen *ble* resultante se denominó p341PZST (SEQ ID NO:**35**; Fig. **5**), en el que el gen *ble* está flanqueado por el promotor del gen de tubulina n.º 341 de ONC-T18 y terminador de SV40.

4. Generación de los vectores plasmídicos recombinantes p341PZ347T (SEQ ID NO:**44**; **Fig. 6**). Para construir el vector p341PZ347T (SEQ ID NO:**44**; Fig. **6**) que contiene el gen *ble* de *Streptoalloteichus hidustanus,* flanqueado por el promotor del gen de tubulina n.º 341 y un terminador del gen de tubulina n.º 347 de ONC-T18, el fragmento de ADN del promotor del gen de tubulina n.º 341 se amplificó con PCR usando los pares de cebadores n.º 66 (SEQ ID NO:**36**) y n.º 67 (SEQ ID NO:**37**), y el ADN plasmídico molde del clon JZ2-17-14 descrito en el Ejemplo 1.

El fragmento de ADN de la ORF del gen *ble* también se amplificó con PCR usando los pares de cebadores n.º 68 (SEQ ID NO:**38**) y n.º 72 (SEQ ID NO:**45**), y el ADN molde plasmídico del vector pSV40/Ze02 (Invitrogen, California)). La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 72 (SEQ ID NO:**45**) es complementaria de la cadena más de la secuencia del extremo 5' del terminador del gen de tubulina n.º 347.

El fragmento de ADN del terminador del gen de tubulina n.º 347 se amplificó con PCR usando los pares de cebadores n.º 73 (SEQ ID NO:**46**) y n.º 74 (SEQ ID NO:**47**), y el ADN plasmídico molde del clon JZ2-17-22, descrito en el ejemplo 1. La secuencia del extremo del cebador n.º 73 (SEQ ID NO:**46**) es complementaria de la cadena menos de la secuencia del extremo de la fase abierta de lectura del gen *ble* y su extremo 3' es complementario de la cadena menos del extremo 5' del terminador del gen de tubulina n.º 347 de ONC-T18. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 74 (SEQ ID NO:**47**) es complementaria de una región pequeña de un vector intermedio derivado del vector pT7Blue-3 y su extremo 3' es complementario de la cadena más del extremo 3' del terminador del gen de tubulina n.º 347 de *Thraustochytrium*.

Las PCR se llevaron a cabo exactamente tal como se describe en el ejemplo 2, sección 3. Los productos de PCR se purificaron en gel con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) según el protocolo del fabricante. Los productos de PCR purificados en gel del promotor del gen de tubulina n.º 341, ORF del gen *ble* y terminador del gen de tubulina n.º 347, se mezclaron en relaciones molares similares, que se usaron como moldes de ADN para la PCR de extensión para fusionar el promotor del gen de tubulina n.º 341, ORF del gen *ble* y terminador del gen de tubulina n.º 347 entre sí. La PCR de extensión se llevó a cabo usando los pares de cebadores n.º 66 (SEQ ID NO: **36**) y n.º 74 (SEQ ID NO: **47**), 0,20 µM cada uno, tal como se describe en el ejemplo 2, sección 3. El producto de PCR de fusión se purificó en gel con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) según el protocolo del fabricante y se clonó en un vector intermedio derivado del vector pT7blue-3 usando PCR de extensión como se describe en el ejemplo 2, sección 3. Los productos de PCR de extensión se transformaron en células competentes de *E. coli* Top 10 (Invitrogen, California, EE.UU.) con electroporación. Las colonias positivas se exploraron inicialmente con método de PCR de colonias usando los pares de cebadores n.º 64 (SEQ ID NO: **40**) y n.º 65 (SEQ ID NO:**41**) pares de cebadores n.º 16 (SEQ ID NO:**42**) y n.º 59 (SEQ ID NO:**12**), y pares de cebadores n.º 54 (SEQ ID NO:**7**) y n.º 15 (SEQ ID NO:**23**). El inserto del clon positivo JZ2-69-2a se secuenció completamente usando cebadores directos e inversos así como cebadores internos n.º 15 (SEQ ID NO:23), n.º 16 (SEQ ID NO: **42**), n.º 54 (SEQ ID NO: **7**), n.º 59 (SEQ ID NO: **12**), n.º 63 (SEQ ID NO: **4**), n.º 64 (SEQ ID NO: **40**), n.º 65 (SEQ ID NO:**41**) y n.º 85 (SEQ ID NO: **43**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y se confirmó la integridad del

inserto clonado. El vector de expresión del gen *ble* resultante se denominó p341PZ347T (SEQ ID NO:**44**; Fig. **6**) en el que el gen *ble* está flanqueado por el promotor del gen de tubulina n.º 341 de ONC-T18 y terminador n.º 347.

La presente divulgación proporciona por lo tanto, entre otras cosas, vectores que comprenden promotores y terminadores de *Thraustochytrium* unidos operativamente a un gen heterólogo (por ejemplo, de modo que el promotor esté cadena arriba del gen y el terminador esté cadena abajo). En algunas realizaciones, dichos vectores incluyen, por ejemplo, uno o más orígenes de replicación, y uno o más marcadores seleccionables o detectables. La presente divulgación proporciona por lo tanto, entre otras cosas, vectores que comprenden un promotor de *Thraustochytrium* unido operativamente a un gen heterólogo. En algunas realizaciones, dichos vectores incluyen, por ejemplo, un terminador, uno o más orígenes de replicación, y uno o más marcadores seleccionables o detectables.

5. Generación del vector plasmídico recombinante p341P713T (SEQ ID NO:**48**; Fig. **7**). Para construir el vector p341PZ713T (SEQ ID NO:**48**; Fig. **7**) que contiene el gen *ble* de *S. hidustanus,* flanqueado por el promotor del gen de tubulina n.º 341 y terminadores del gen de tubulina n.º 713 de ONC-T18, el fragmento de ADN del promotor del gen de tubulina n.º 341 se amplificó con PCR usando el par de cebadores n.º 66 (SEQ ID NO:**36**) y n.º 67 (SEQ ID NO:**37**), y el ADN plasmídico molde del clon JZ2-17-14 descrito en el Ejemplo 1.

El fragmento de ADN de la ORF del gen *ble* también se amplificó con PCR usando el par de cebadores n.º 68 (SEQ ID NO:**38**) y n.º 75 (SEQ ID NO:**49**), y el ADN molde plasmídico del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen, California). La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 75 (SEQ ID NO:**49**) es complementaria de la cadena más de la secuencia del extremo 5' del terminador del gen de tubulina n.º 713.

El fragmento de ADN del terminador del gen de tubulina n.º 713 se amplificó con PCR, usando el par de cebadores n.º 76 (SEQ ID NO:**50**) y n.º 77 (SEQ ID NO:**51**), y el ADN plasmídico molde del clon JZ2-22-9 descrito en el Ejemplo 1. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 76 (SEQ ID NO:**50**) es complementaria de la cadena menos de la secuencia del extremo 3' de la ORF del gen *ble* y su extremo 3' complementario de la cadena menos del extremo 5' del terminador del gen de tubulina n.º 713 de ONC-T18. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 77 (SEQ ID NO:**51**) es complementaria de una región pequeña de un vector intermedio derivado del vector pT7blue-3 y su extremo 3' complementario de la cadena más del extremo 3' del terminador del gen de tubulina n.º 713 de ONC-T18.

Los productos de PCR del promotor del gen de tubulina n.º 341, ORF del gen *ble* y terminador del gen de tubulina n.º 713, se purificaron en gel, se mezclaron en relaciones molares similares y se usaron como el molde de ADN para PCR de extensión usando los pares de cebadores n.º 66 (SEQ ID NO:**36**) y n.º 77 ((SEQ ID NO:**51**) para fusionar el promotor del gen de tubulina n.º 341, el ORF del gen *ble* y terminador del gen de tubulina n.º 713 entre sí. El producto de PCR fusionado se purificó en gel con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California), y se clonó en un vector intermedio linealizado por *Hind*III derivado del vector pT7blue-3 usando una segunda PCR de extensión. Se usaron ADN de productos de PCR de extensión de un microlitro (~100 ηg) para transformar células competentes de *E. coli* Top 10 (Invitrogen, California, EE.UU.) con electroporación. Las colonias positivas se exploraron inicialmente con la PCR de colonias usando el par de cebadores n.º 64 (SEQ ID NO:**40**) y n.º 65 (SEQ ID NO:**41**), par de cebadores n.º 16 (SEQ ID NO:**42**) y n.º 77 (SEQ ID NO:**51**), y par de cebadores n.º 54 (SEQ ID NO:**7**) y n.º 15 (SEQ ID NO:**23**). El inserto del clon positivo JZ2-69-2b se secuenció completamente usando cebadores directos e inversos así como cebadores internos n.º 15 (SEQ ID NO:**23**), n.º 16 (SEQ ID NO: **42**), n.º 54 (SEQ ID NO: **7**), n.º 63 (SEQ ID NO: **4**), n.º 64 (SEQ ID NO: **40**), n.º 65 (SEQ ID NO:**41**) y n.º 85 (SEQ ID NO:**43**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y se confirmó la integridad del inserto clonado. El vector de expresión del gen *ble* resultante se denominó p341PZ713T (SEQ ID NO: **48**; Fig. **7**), en el que el gen *ble* está flanqueado por el promotor del gen de tubulina n.º 341 y el terminador n.º 713 de ONC-T18.

La presente divulgación proporciona por lo tanto, entre otras cosas, vectores que comprenden promotores y terminadores de *Thraustochytrium* unidos operativamente a un gen heterólogo (por ejemplo, de modo que el promotor esté cadena arriba del gen y el terminador esté cadena abajo). En algunas realizaciones, dichos vectores incluyen, por ejemplo, uno o más orígenes de replicación, y uno o más marcadores seleccionables o detectables. La presente divulgación proporciona por lo tanto, entre otras cosas, vectores que comprenden un promotor de *Thraustochytrium* unido operativamente a un gen heterólogo. En algunas realizaciones, dichos vectores incluyen, por ejemplo, un terminador, uno o más orígenes de replicación, y uno o más marcadores seleccionables o detectables. A la luz de la descripción proporcionada en el presente documento de una pluralidad de dichos vectores e información de secuencia con respecto a determinados elementos tales como promotores y/o terminadores suficientes para permitir el enlace de elementos (por ejemplo, promotores, terminador) que tienen dichas secuencias a otros elementos, los expertos habituales en la materia, que lean la presente divulgación, serían capaces de preparar y usar una amplia serie de construcciones de vector individuales diferentes, por ejemplo combinando secuencias proporcionadas con cualquiera de una diversidad de elementos adicionales conocidos, con frecuencia de acuerdo con técnicas conocidas.

6. Generación de los vectores plasmídicos recombinantes p711PZ40T (SEQ ID NO:52; Fig. 8). Para construir el vector p701PZ40T (SEQ ID NO:**52**; Fig. **8**) que contiene el gen *ble* de *S. hidustanus,* flanqueado por

el promotor del gen de tubulina n.º 701 de ONC-T18 y terminador de SV40, el fragmento de ADN del promotor del gen de tubulina n.º 701 se amplificó con PCR usando el par de cebadores n.º 87 (SEQ ID NO:**53**) y n.º 88 (SEQ ID NO:**54**), y el ADN plasmídico molde del clon JZ2-17-10 descrito en el Ejemplo 1. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 87 (SEQ ID NO: **48**) es complementaria de una región pequeña del vector p341PZ40T y sus complementos del extremo 3'de la cadena menos de la secuencia del extremo 5' del promotor del gen de tubulina n.º 701. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 88 (SEQ ID NO: **54**), es complementaria de la cadena más de la secuencia del extremo 5' de la ORF del gen *ble* y su extremo 3' coincide con la cadena más del extremo 3' del terminador del gen de tubulina n.º 701. El producto de PCR se purificó en gel y se clonó en el vector de p341PZ40T para reemplazar el promotor del gen de tubulina n.º 341 usando PCR de extensión (Higuchi et al., 1988; Zhang et al., 2001). ADN polimerasa *TaKaRa PrimeStar Taq*™, 200 ng de ADN de los productos de PCR purificados en gel y 600 ng de ADN plasmídico linealizado por *Bgl*II del vector p341PZ40T, se usaron en la PCR de extensión. Se usaron ADN de productos de PCR de extensión de un microlitro (~100 ηg) para transformar células competentes de *E. coli* Top 10 (Invitrogen, California, EE.UU.) con electroporación. Las colonias positivas se exploraron inicialmente con método de PCR de colonias usando el par de cebadores n.º 52 (SEQ ID NO: **51**) y n.º 53 (SEQ ID NO: **52**). El inserto del clon positivo se secuenció completamente usando cebadores directos e inversos así como cebadores internos n.º 52 (SEQ ID NO: **1**) y n.º 53 (SEQ ID NO: **2**), n.º 15 (SEQ ID NO: **23**), n.º 16 (SEQ ID NO: **42**), n.º 63 (SEQ ID NO: **4**), n.º 64 (SEQ ID NO: **40**), n.º 65 (SEQ ID NO: **41**) y n.º 85 (SEQ ID NO: **43**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y se confirmó la integridad del inserto clonado. El vector de expresión del gen *ble* resultante se denominó p701PZ40T (SEQ ID NO: **52**; Figura **7**), en el que el gen *ble* está flanqueado por el promotor del gen de tubulina n.º 701 de ONC-T18 y terminador de SV40.

7. Generación del vector plasmídico recombinante p341PRsGP40T (SEQ ID NO: **55**; Fig. **9**). Para construir el vector p341PRsGFP40T (SEQ ID NO:**55**; Fig. **9**) que contiene el gen *GFP* de *Aequorea victoria,* flanqueado por el promotor del gen de tubulina n.º 341 de ONC-T18 y terminador de SV40, el fragmento de ADN del promotor del gen de tubulina n.º 341 se amplificó con PCR usando el par de cebadores n.º 66 (SEQ ID NO: **36**) y n.º 78 (SEQ ID NO: **56**), y el ADN plasmídico molde del clon JZ2-17-14 descrito en el ejemplo 1. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 78 (SEQ ID NO: **56**) es complementaria de la cadena más de la secuencia del extremo 5' de la ORF del gen *GFP* y su extremo 3' coincide con la cadena más del extremo 3' del promotor del gen de tubulina n.º 341 de ONC-T18.

El fragmento de ADN de la ORF del gen *GFP* también se amplificó con PCR usando el par de cebadores n.º 79 (SEQ ID NO: **57**) y n.º 80 (SEQ ID NO: **58**), y el ADN plasmídico molde del vector pCD3-327. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 79 (SEQ ID NO: **57**) es complementaria de la cadena más de la secuencia del extremo 3' del promotor del gen de tubulina n.º 341 de ONC-T18 y su extremo 3' coincide con la cadena menos del extremo 5' de la ORF del gen *GFP*. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 80 (SEQ ID NO: **58**) es complementaria de la cadena más de la secuencia del extremo 5' del terminador de SV40 y su extremo 3' coincide con la cadena menos de la secuencia del extremo 3' de la ORF del gen *GFP*.

El fragmento de ADN del terminador de SV40 también se amplificó con PCR usando el par de cebadores n.º 81 (SEQ ID NO: **59**) y n.º 71 (SEQ ID NO: **39**), y el ADN plasmídico molde del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen, California). La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 81 (SEQ ID NO: **59**) es complementaria de la cadena menos de la secuencia del extremo 3' de la ORG del gen *GFP* y su secuencia del extremo 3' coincide con el extremo 5' del terminador de SV40.

Los tres productos de PCR anteriores se purificaron en gel, se mezclaron en relaciones molares similares y se usaron como el molde de ADN para PCR de extensión usando los pares de cebadores n.º 66 (SEQ ID NO:**36**) y n.º 71 (SEQ ID NO:39) para fusionar el promotor del gen de tubulina n.º 341, la ORF del gen *GFP* y terminador de SV40 entre sí (Higuchi, Krummel y Saiki, 1988). El producto de PCR de extensión que contenía el casete de expresión génica de *GFP* específico de ONC-T18 se purificó en gel, se clonó en el vector p341PZ40T linealizado con la enzima de restricción *Hind*III en un segundo ciclo de PCR de extensión. Los productos de segundo ciclo de PCR se limpiaron, se desalaron y se transformaron en células competentes *E. coli* Top 10 con electroporación. Las colonias positivas se exploraron usando PCR de colonias y el par de cebadores n.º 54 (SEQ ID NO:**7**) y n.º 86 (SEQ ID NO:**60**). El inserto del clon positivo JZ2-53-20 se secuenció completamente usando cebadores directos e inversos así como cebadores internos n.º 15 (SEQ ID NO:**23**), n.º 16 (SEQ ID NO: **42**), n.º 54 (SEQ ID NO: **7**), n.º 63 (SEQ ID NO: **4**), n.º 64 (SEQ ID NO: **40**), n.º 65 (SEQ ID NO: **41**), n.º 85 (SEQ ID NO:**43**) y n.º 86 (SEQ ID NO:**60**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y se confirmó la integridad del inserto clonado. El vector de expresión del gen *GFP* resultante se denominó p341PRsGFP40T (SEQ ID NO:**55**; Fig. **8**) en el que el gen *GFP* está flanqueado por el promotor del gen de tubulina n.º 341 de ONC-T18 y terminador de SV40.

[8. Generación del vector plasmídico recombinante pD4DPZ118S (SEQ ID NO:**61**; Fig. **10**). Para construir el vector pD4DPZ18S (SEQ ID NO:**61**; Fig. **10**), el ADN plasmídico del vector pD4DPZ1 se digirió con enzimas de restricción *Sal*I y *Sph*I para linealizar el vector y después se purificó en gel con kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADNr de 18S (SEQ ID NO: **29**)

que se amplificó del ADN genómico de ONC-T18 con PCR usando el par de cebadores 18SrRNAf (SEQ ID NO: **27**) y 18SrRNAr (SEQ ID NO: **28**) y se clonó en el vector pT7Blue-3, se liberó del ADN plasmídico del clon JZ2-3-1 por digestión de restricción con enzimas *Xho*I y *Sph*I, después se purificó en gel y se ligó en los sitios de restricción *Sal*I y *Sph*I del vector linealizado de pD4DPZ1, para producir el pD4DPZ18S (SEQ ID NO: **61**; Fig. **10**) que porta un fragmento de ADN del gen de ARN de ribosoma 18S.

9. Generación del vector plasmídico recombinante p341PZ5pEx (SEQ ID NO:**62**; Fig. **11**). Para construir el vector p341PZ5pEx para la sobreexpresión de genes homólogos y heterogéneos (por ejemplo, Δ12 desaturasa), el vector de expresión génica de resistencia a zeocina pd5EPPZ1 se modificó con PCR usando los cebadores LinkerF (SEQ ID NO:**63**) y LinkerR (SEQ ID NO:**64**) para reemplazar la ORF del gen de resistencia a zeocina con múltiples sitios de clonación incluyendo sitios de restricción de endonucleasa *(NcoI, spe*I, *Kpn*I, *Mlu*I, *Nde*I, *Sph*I, *Nru*I, *Bst*BI y *Bam*HI). Después de PCR, el ADN plasmídico molde se destruyó usando la enzima de restricción endonucleasa *Dpn*I. El producto de PCR se precipitó y digirió con la enzima de restricción endonucleasa *Mlu*I, se purificó en gel, se volvió a ligar con ADN ligasa T4 (Invitrogen, California) y después se transformó en células *E. coli* Top 10. La exploración preliminar de los clones positivos se llevó a cabo usando digestiones de restricción. La integridad de clones positivos se confirmó con secuenciación de ADN y se denominó el plásmido p5eEP40T (SEQ ID NO: **65**). El ADN plasmídico del clon positivo se digirió con las enzimas de restricción endonucleasas *Hind*III y *EcoRI* y el ADN plasmídico de cadena principal se purificó en gel. El casete de expresión génica de resistencia a zeocina en el que la ORF del gen de zeocina está flanqueada por el promotor del gen de tubulina n.º 341P y el terminador de SV40, también se aisló y se purificó en gel a partir del vector p18S341PZ40t digerido con las mismas enzimas de restricción endonucleasas *Hind*III y *EcoRI.* El casete de expresión génica de resistencia a zeocina se ligó después en los sitios de restricción de endonucleasa correspondientes *Hind*III y *EcoRI* del plásmido p5eEP40T, dando como resultado el vector de expresión génica p341PZ5pEx.

10. Generación de los vectores plasmídicos recombinantes pD12DPZ1 y pD5DPZ1. Se amplifican fragmentos de ADN promotores (aproximadamente 2 kilobases 5' de las ORF de los genes) de los genes de Δ12 y Δ5 desaturasas de ONC-T18 con PCR usando el ADN genómico de ONC-T18 como el molde y ADN polimerasa *TaKaRa LA Taq*™ (TAKARA BIO INC., Shiga, Japón). Se utilizan un cebador de PCR directo diseñado de forma apropiada que porta el sitio de enzima de restricción *XhoI* en su extremo 5' y un cebador inverso que abarca el sitio de enzima de restricción *NcoI* en su extremo 5' para la amplificación del promotor del gen de Δ12 desaturasa. Igualmente, se utilizan un cebador de PCR directo diseñado de forma apropiada que porta el sitio de enzima de restricción *XhoI* en su extremo 5' y un cebador inverso que comprende el sitio de enzima de restricción *NcoI* en su extremo 5' para la amplificación del promotor del gen de Δ5 desaturasa. Se llevan a cabo reacciones de PCR en un volumen de mezcla de reacción de 50 µl que contiene 2,5 unidades de ADN polimerasa *TaKaRa LA Taq*™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), Tampón LA PCR II 1 X, mezcla de dNTP (0,40 mM cada uno), 225 ng del molde de ADN genómico, cebadores 0,20 µM, en la siguientes condiciones: 94 °C durante 3 minutos durante un ciclo, 98 °C durante 30 segundos y 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 2 minutos durante 30 ciclos.

Los productos de PCR se precipitan siguiendo estos procedimientos: añadir ddH_2O sin nucleasa a un volumen total de 200 µl, después se añaden 20 µl de NaAc 3 M (pH 5,2) y 440 µl de etanol 100 % y se mezclan por agitación vorticial breve, se incuban en hielo durante 1 hora, se centrifugan a máxima velocidad con una centrífuga de sobremesa durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante, se añaden 500 µl de etanol al 75 % y se centrifugan durante 2 minutos a máxima velocidad, se descarta el sobrenadante y se secan al vacío los sedimentos de ADN durante aproximadamente 10 minutos. Los productos de PCR del promotor del gen de Δ12 desaturasa se digieren con enzimas de restricción *NcoI* (10 unidades) y *Xho*I (10 unidades), y los productos de PCR del promotor del gen de Δ5 desaturasa se digieren con enzimas de restricción *NcoI* (10 unidades) y *Xho*I (10 unidades), en un volumen de mezcla de reacción de 25 µl que contiene NEBuffer 2 1X y BSA 1 X; (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) a 37 °C durante 2 horas. Los productos de PCR digeridos se resuelven en gel de agarosa 0,8 % para electroforesis a 88 tensiones durante 45 minutos. Las bandas de ADN de los productos de PCR se recortan con una cuchilla del gel de agarosa y los ADN se extraen y se purifican con kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN de promotor del gen de Δ12 desaturasa resultante con los extremos adhesivos específicos de enzima se liga en los sitios de restricción correspondientes *Nco*I y *Xho*I del vector pSV40/Zeo2 digerido con las mismas enzimas de restricción y se purifica en gel de agarosa, para producir el vector pD12DPZ1. Igualmente, el fragmento de ADN de promotor del gen de Δ5 desaturasa resultante con los extremos adhesivos específicos de enzima se liga en los sitios de restricción correspondientes *Nco*I y *Xho*I del vector pSV40/Zeo2 digerido con las mismas enzimas de restricción y se purifica en gel de agarosa, para producir el vector pD5DPZ1. Las reacciones de ligamiento se llevan a cabo en un volumen de mezcla de reacción de 10 µl que contenía tampón de ligamiento 1X, los ADN de inserto y vector (relación molar 3:1) y 0,5 unidades de ADN ligasa T4 (Invitrogen, California) a temperatura ambiente durante 12 horas. Después los ADN ligados se transforman en las células competentes de *E. coli* Top10 (Invitrogen Corporation, California). Los ADN plasmídicos de 1 -10 colonias de los transformantes se aíslan de cultivos bacterianos de 3 ml usando kit de miniprep de plásmidos Zyppy™ (Zymo Research Corp., Orange, California). La integridad de los clones se ensaya preliminarmente con digestiones de enzimas de restricción usando enzimas apropiadamente correspondientes. Los vectores resultantes, pD12DPZ1 y pD5DPZ1, contienen el gen *ble* de *Streptoalloteichus hidustanus,* flanqueado por el promotor del gen de Δ12 o Δ5

desaturasa, respectivamente, de ONC-T18 y el terminador de SV40.

La presente divulgación proporciona por lo tanto, entre otras cosas, vectores que comprenden los promotores de Δ12 y/o Δ5 desaturasa unidos operativamente con un gen heterólogo (por ejemplo, ácido graso sintasa (AGS) de tipo 1). En algunas realizaciones, dichos vectores incluyen, por ejemplo, un terminador, uno o más orígenes de replicación, y uno o más marcadores seleccionables o detectables.

11. Generación de vector plasmídico recombinante con Δ12 desaturasa, promotor génico para conducir la expresión génica de Δ5 desaturasa. Las primeras 2 kilobases del gen de Δ5 desaturasa de ONC-T18 más la región promotora (aproximadamente 2 kilobases 5' de la ORF del gen) se amplifican mediante PCR usando cebadores apropiadamente seleccionados y diseñados tanto para amplificar la secuencia como para insertar sitios de digestión de restricción en el extremo de las secuencia amplificada. El producto de PCR resultante se aísla, y se purifica, después se realiza un segundo ciclo de PCR con cebadores apropiadamente diseñados para insertar un sitio de restricción entre el inicio de la ORF y el promotor. La construcción resultante se cierra en un vector de expresión bacteriana usando técnicas convencionales.

La secuencia aislada del promotor del gen de Δ12 desaturasa (SEQ ID NO: 69) se clona después 5' de la ORF del gen de Δ5 desaturasa usando los sitios de restricción modificados genéticamente y técnicas de biología molecular convencionales. Después los ADN ligados se transforman en las células competentes de *E. coli* Top10 (Invitrogen Corporation, California). Los ADN plasmídicos de 1-10 colonias de los transformantes se aíslan de cultivos bacterianos de 3 ml usando kit de miniprep de plásmidos Zyppy™ (Zymo Research Corp, Orange, California). La integridad de los clones se ensaya preliminarmente con digestiones de enzimas de restricción usando enzimas específicas de los sitios de restricción modificados genéticamente.

12. Generación de vector de expresión de levadura de Δ12 desaturasa recombinante. Se purificó ADN plasmídico del Ejemplo 1.7 usando kit de miniprep de plásmidos de 6 minutos UltraClean (MO, BIO Laboratories, Inc, Solana Beach, Calif). El plásmido obtenido de este modo se digiere con BamHI/NotI y se clona en el vector de expresión de levadura pYES2 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) para generar el clon pYΔ12Desat que se usó después para estudios de expresión en levadura.

13. Generación de un vector de desactivación de Δ12 desaturasa pT7-ΔΔ12desat. Para demostrar la función del gen de Δ12 desaturasa dentro del organismo hospedador, se prepara el vector pT7-ΔΔ12desat. Se amplifican 1000 pb de la secuencia 5' que flanquean inmediatamente la ORF de Δ12 desaturasa junto con la ORF de Δ12 desaturasa y parte de la secuencia de UTR 3' mediante PCR. Esto proporciona una secuencia tanto 5' como 3' para recombinación homóloga. Son cebadores usados Δ12RegF1 - GGATCAAAGTCATACTATGCGTACACG (SEQ ID NO: 87) y Δ12RegR1 - GGTACCGTGAATACAGTCGAGGTAGC (SEQ ID NO: 88), produciendo un fragmento de ADN de 2368 pb. Este fragmento de ADN se clona en el plásmido pT7-Blue3 (Novagen) mediante métodos de clonación de TA convencionales, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los clones positivos se identifican mediante análisis de digestión de ADN plasmídico extraído y se secuencian para confirmar la fidelidad de construcción, produciendo el plásmido pT7-Δ12desat. El fragmento de ADN de Ble-SV40 se aísla y se amplifica mediante PCR de un ADN molde adecuado. Los cebadores Δ12delMW-F - **GACAAGGATTCACCCCAGCTTCGGTTGAAACTACAAGATC**ATGGCCAAGTTG ACCAGTGC (SEQ ID no: 89) y Δ12de1MW_R-**CGAATCTCGCCGAGCGTCGGCAGGTCCGGGTTGTGCTTGCCATG**CAGACAT GATAAGATACATTG (SEQ ID no: 90) se emplean para esto. Se diseñan cebadores para incluir extensiones 5' que introdujeron homología en el fragmento de ADN de Δ12 desaturasa (en negrita y subrayado en cebadores D12delMW F y D12delMW R). Se realiza PCR con ADN polimerasa Phusion usando condiciones de reacción convencionales. Para aumentar la eficacia de inserción, el plásmido pT7-D12desat se digiere con una enzima de restricción que escinde en un sitio único entre la base 1 y la base 95 de la ORF de Δ12 desaturasa, tal como *Nco*I. El ADN plasmídico lineal se purifica en gel y se emplea junto con el producto purificado en gel de la PCR de Ble-SV40 generado, a partir de los cebadores D12DelMW F y D12delMW R, en una segunda reacción de PCR que se diseñó para insertar el fragmento de ADN de Ble-SV40 en pT7-D12desat de una manera específica de sitio, generando el plásmido pT7-Δ12desat. Este método de PCR se denomina PCR MEGAWHOMP y se ha descrito previamente (Miyazaki 2011), y se completa de acuerdo con protocolos convencionales con ADN polimerasa Phusion. Después de la amplificación la reacción de PCR se digiere con *Dpn*I mediante la adición de 5 µl de tampón NEB 4 10 x y 2 µl de endonucleasa de restricción *DpnI.* Las reacciones se digieren a 37 ºC durante 16 horas. Después de la digestión las muestras de ADN se precipitan mediante reactivo SureClean (Bioline), según las instrucciones del fabricante, se resuspenden en 10 µl de agua sin nucleasa y se usaron 3 µl para transformar células de *E. coli* electrocompetentes. Se consigue transformación de acuerdo con protocolos convencionales y las células se resuspenden inmediatamente en 750 µl de medio SOC y se incuben a 37 ºC durante 1 hora. La selección se consigue posteriormente sembrando en extensión células en placas de agar LB que contenían ampicilina e incubando a 37 ºC durante >16 horas. Se seleccionan varias colonias resultantes, se cultivan en 3,5 ml de caldo de cultivo LB, complementado con ampicilina y se extrae ADN plasmídico mediante el kit de extracción de ADN plasmídico de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La digestión se completa para confirmar la presencia del fragmento de ADN de Ble-SV40 dentro de pT7-D12desaturasa, y se secuencian los plásmidos positivos para confirmar la fidelidad y precisión de la inserción. De este modo se crea el plásmido pT7-ΔΔ12desat.

Ejemplo 5: Un nuevo procedimiento de fermentación

Este ejemplo describe un método de fermentación de dos estadios para obtener alta producción de biomasa, lípidos totales y AGPI en cepas de traustoquítridos.

El ciclo vital de la cepa ONC-T18 se estudió en detalle mediante observaciones microscópicas de las células de cultivos que crecen en diversas condiciones tales como relaciones de fuentes X:N, nivel de oxígeno disuelto y temperaturas. Se ha descubierto que a baja concentración de oxígeno con una alta relación de carbono con respecto a nitrógeno (C:N) (por ejemplo, dentro del intervalo de 40:1 a 1:~0 y específicamente de 1:1 a 1:~0 y a temperatura ambiente, la cepa ONC-T18 creció vigorosamente y se propagó principalmente mediante producción de zoosporas, dando como resultado grandes números de células vegetativas pequeñas que contienen menos cuerpos oleosos subcelulares y relativamente pequeños. Por el contrario, a alta relación C:N, bajo nivel de oxígeno y temperatura relativamente baja (por ejemplo, dentro del intervalo de 10-30 ºC, y específicamente a 20-25 ºC), la cepa ONC-T18 se propagó principalmente mediante división directa de células vegetativas, dando como resultado una gran población de células gigantes que contienen cuerpos oleosos subcelulares notablemente voluminosos. Por lo tanto, se desarrolló un método de fermentación de dos estadios para maximizar la productividad de biomasa, lípido total y AGPI. Este es un método óptimo para cultivar y explorar cepas de traustoquítridos de alto lípido y AGPI. Se realizaron los siguientes tres ensayos:

Ensayo I: La cepa de tipo ONC-T18 de tipo silvestre se inoculó en 10 ml de medio ONC-T18-GM0 líquido. Los cultivos se dejaron crecer a 25 °C en un incubador agitador ajustado a 2,50 rpm durante 2 días. Después los inóculos (DO_{660} = 12) se inocularon en 100 ml de medio ONC-T18-GM0 en matraces de 250 ml. Se inocularon tres cultivos para cada cepa. Los cultivos se dejaron crecer en un incubador agitador ajustado a 250 rpm a 25 ºC durante 2 días, después se cambiaron a 150 rpm y 20 ºC y se dejaron crecer durante otros 4 días. Las biomasas de los cultivos se recogieron transfiriendo los cultivos celulares en un tubo falcon de 50 ml y centrifugando a 4000 rpm usando una centrífuga SORVALL LEGEND RT+ (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EE.UU.). La biomasa flotó en la superficie del medio líquido como una capa compactada. El medio líquido se liberó perforando un agujero muy pequeño en el fondo del tubo falcon usando una aguja de jeringa 18G 1 1/2. El sedimento de la biomasa en el tubo se congeló en un congelador a -80 ºC durante una noche y después se liofilizó usando un liofilizador durante tres días. Se pesó la biomasa de cada muestra.

Ensayo II: Los inóculos se prepararon como se describe en el Ensayo I. A continuación, los inóculos (DO_{660} = 6) se inocularon en 50 ml de medio ONC-T18-GM0 en matraces de 250 ml. Se inocularon tres cultivos para cada cepa. Los cultivos se dejaron crecer en un incubador agitador ajustado a 250 rpm a 25 ºC durante 2 días, después se cambiaron a 150 rpm y 20 ºC. A los 2 días después de la inoculación, se añadieron 5 ml de glucosa 50 % esterilizada por autoclave a cada matraz de cultivo, después a los 4 días después de la inoculación, se añadieron 6 ml de glucosa. Después de 6 días después de la inoculación, las biomasas de los cultivos se recogieron como se ha descrito en el Ensayo I.

Ensayo III: Los inóculos se prepararon como se ha descrito en el Ensayo I. Después los inóculos (OD_{660}=6) se inocularon en 50 ml de medio ONC-T18-GM0 en matraces con tabiques de 250 ml. Los cultivos se dejaron crecer en un incubador agitador ajustado a 250 rpm a 25 ºC. A los 2 y 4 días después de la inoculación, se añadieron 5 y 6 ml de glucosa 50 % esterilizada por autoclave a cada matraz de cultivo, respectivamente, como se realizó en el Ensayo II. El día 6 después de la inoculación, las biomasas de los cultivos se recogieron como se ha descrito en el Ensayo I.

Los contenidos de lípidos totales y DHA de cada muestra se analizaron usando el método de transesterificación directo. Se mezclaron aproximadamente 20 mg de biomasa de células liofilizadas y 3 ml de tampón de reacción de transesterificación (metanol:ácido clorhídrico:cloroformo) agitando vorticialmente durante 10 segundos y se incubaron después en un baño de agua a 90 ºC durante dos horas. Después de completarse la transesterificación, las muestras se retiraron y se enfriaron hasta temperatura ambiente. Se añadió un ml de agua y se mezcló mediante agitación vorticial durante 10 segundos. Después se extrajeron ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) añadiendo 3 X 2 ml del disolvente de hexano: cloroformo (v/v, 4:1) y agitando vorticialmente durante 10 segundos, y se dejó reposar hasta que se completaron las separaciones de fases.

Se llevó a cabo análisis cromatográfico de gases (GC) de los EMAG usando dos patrones internos (200 µl). Se añadió un ácido hexacosaenoico (C23:0) antes de la transesterificación y el otro, ácido nonadecaenoico (C19:0) se añadió directamente antes del análisis. Se realizaron análisis en un Agilent 6890 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) con una columna capilar de sílice fusionado OMEGAWAX 320 de 30 m X 0,32 mm de diámetro interno (0,25 µm de grosor de película) instalada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y un detector de ionización de llama ajustado a 250 °C, relación de división 50:1 para detector DIL a 275 ºC. El volumen de inyección fue de 1 µl. El gas vehículo fue H_2 con un flujo constante de 5,0 ml por minuto. La confirmación de la identidad de EMAG se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas Trace GC-DSQ (Thermo Electron, Boston, EE.UU.) y comparación de los tiempos de retención para patrones de laboratorio.

Los resultados (Tabla 10) indicaron que las condiciones de fermentación usadas en el Ensayo II fueron las mejores para alta producción de lípidos y DHA en ONC-T18: se observaron niveles dentro del intervalo de aproximadamente

50 a aproximadamente 70 % de biomasa seca; pueden esperarse niveles tan altos como aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 % basándose en estos hallazgos. Los rendimientos de DHA observados estuvieron dentro del intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 7,5 g/l de cultivo. Basándose en estos hallazgos, pueden esperarse rendimientos de DHA tan altos como aproximadamente 45 a aproximadamente 95 g/l.

Tabla 10: Productividades de biomasa, lípidos totales y DHA de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 en diversas condiciones de fermentación

Ensayo	Biomasa (g/l)	Lípido total (mg/g)	Lípido total (g/l)	DHA (g/l)	DHA %
I	7,10	211,20	1,499	0,45	30,02
II	41,32	671,09	27,729	5,94	21,42
III	46,50	661,07	30,740	3,06	9,96

El aumento del oxígeno disuelto por ejemplo usando matraz con tabiques y alta velocidad de agitación en el Ensayo III puede potenciar significativamente la productividad de biomasa, pero la productividad de DHA fue considerablemente menor que la del Ensayo II. Por lo tanto, la optimización de parámetros de fermentación tales como relación C:N, concentración de glucosa, oxígeno disuelto y temperatura así como las dinámicas de estos parámetros durante los procesos de fermentación, iinfluyen en la producción rentable de lípidos y AGPI en cepas de traustoquítridos. Sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, los inventores proponen que los rendimientos aumentados observados en el Ensayo II en comparación con el Ensayo I pueden atribuirse al menos en parte a la mayor concentración de glucosa y/o menores niveles de oxígeno disuelto en el Ensayo II.

Ejemplo 6: Optimización de la salinidad en medio ONC-T18-GM0 para selección eficaz de transformantes de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

Como se conoce en la técnica, la zeocina es inestable a altas concentraciones salinas (Invitrogen, CA, EE.UU.). También se ha mostrado que ONC-T18 prefiere crecer en condiciones de salinidad relativamente alta debido a sus ambientes de vida naturales (PCT/IB2006/003977). El presente ejemplo describe la determinación de concentraciones de zeocina y salinidades óptimas para la selección eficaz de transformantes de ONC-T18 usando un gen de resistencia a zeocina como el marcador seleccionable.

Se sembraron en extensión cien µl de suspensión celular de ONC-T18 diluida a 1:500 de un cultivo de 2 días en placas ONC-T18-GM0 que contienen diversas concentraciones de antibiótico zeocina y sal marina. Las placas inoculadas se incubaron en un incubador a 25 °C durante 10 días. Se contaron los números de las colonias en cada placa. Las medias de los números de colonias de dos placas duplicadas se presentan en la Tabla 2. Después de 10 días después de la inoculación, no se observaron colonias en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían sal marina 5 g/l y diversas concentraciones de zeocina. En placas que contenían sal marina 8,5 g/l sin zeocina, solamente se observó una colonia. En placas que contenían sal marina 18 g/l sin zeocina, los números de colonias fueron similares al de placas que contenían sal marina 35 g/l sin zeocina. Sin embargo, la zeocina a una concentración de 30 µg/ml inhibió completamente el crecimiento de ONC-T 18 en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían sal marina 18 g/l, mientras que fue necesaria zeocina 100 µg/ml para la inhibición completa de ONC-T18 en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían sal marina 35 g/l. Se midieron los diámetros de colonias individuales en dos placas duplicadas y se muestran sus medias en la Tabla 3. Las salinidades entre 18 g/l y 35 g/l no afectaron a los tamaños de las colonias significativamente (Fig. 12). El presente ejemplo demuestra por lo tanto, entre otras cosas, que se observa mejor crecimiento en presencia de sal marina a una concentración por encima de aproximadamente 8,5 g/l. Concentraciones en el intervalo de 8,5 g/l a más de 35 g/l (por ejemplo, hasta aproximadamente 36 g/l, 37 g/l, 38 g/l, 39 g/l, 40 g/l, 41 g/l, 42 g/l, 43 g/l, 44 g/l, 45 g/l, 46 g/l, 47 g/l, 48 g/l, 49 g/l, 50 g/l o más, incluso posiblemente hasta 55 g/l, 60 g/l, 65 g/l, 70 g/l, 75 g/l, 80 g/l, 85 g/l, 90 g/l, 95 g/l, 100 g/l o más pueden ser adecuadas para el crecimiento. Para selección de transformantes usando zeocina, por supuesto, es deseable conseguir crecimiento robusto con sensibilidad mantenida a zeocina. Por lo tanto, para este trabajo, se usó sal marina 18 g/l para preparar ONC-T18-GM0 para la selección de transformantes de ONC-T18 transformados con construcciones que portaban un casete de expresión génica resistente a zeocina.

Tabla 11: Efectos de la zeocina y la salinidad en los números de colonias de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

	Concentración de zeocina (µg/ml)				
Concentración salina (g/l)	**0**	**10**	**30**	**50**	**100**
5	0	0	0	0	0
8,5	1	0	0	0	0

	Concentración de zeocina (µg/ml)				
Concentración salina (g/l)	**0**	**10**	**30**	**50**	**100**
18	33	11	0	0	0
35	39	22,5	11	5	0

Tabla 12: Efectos de la zeocina y la salinidad en las tasas de crecimiento de las colonias (diámetro en mm) de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

	Concentración de zeocina (µg/ml)				
Concentración salina (g/l)	**0**	**10**	**30**	**50**	**100**
5	0	0	0	0	0
8,5	3	0	0	0	0
18	4,3	4,1	0	0	0
35	5,2	4,1	1,9	0,6	0

Las eficacias de transformación se ensayaron a diversas condiciones de presión. En el presente ejemplo, se descubrió que una condición de presión de aproximadamente 1100 psi daba como resultado una mejor eficacia que otras condiciones de presión ensayadas.

Ejemplo 7: Transformación de *Thraustochytrium sp.* ONC-T18

Este ejemplo describe un método de transformación biolística de ONC-T18.

Materiales y métodos.

Generación de células competentes. ONC-T18 se mantuvo en placas de agar ONC-T18-GM0 en un incubador a 25 °C y se transfirió a placas nuevas cada 3-4 semanas. Se inoculó un asa de inóculo de ONC-T18 tomado de células con crecimiento vigoroso en 50 ml de ONC-T18-GM0 en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml, y después se cultivó en un incubador agitador a 25 °C a 150 rpm durante aproximadamente 46 horas. Se transfirió medio mililitro del cultivo a un tubo de centrífuga de 1,5 ml esterilizado en una campana de flujo laminar en condiciones estériles, después se centrifugó en una centrífuga de sobremesa a 3000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se descartó, el sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml de agua esterilizada y se sembraron en extensión 100 µl de la suspensión celular en el área central (aproximadamente 28 cm^2) de una placa de agar ONG-T18-GM0. Las placas de Petri se dejaron abiertas en una campana de flujo laminar en condiciones estériles durante 10 a 15 minutos para dejar que las células se sedimentaran y para evaporar agua líquida.

Transformación biolística. Los plásmidos pd5EPZ1, p341PZ40T, p341PZ347T, p341PZ713T y pD4DPZ18S (construidos tal como se describe en el Ejemplo 2; véase también Figs. 3, 5, 6, 7 y 10) se aislaron de cultivos bacterianos de cepas que contenían los plásmidos respectivos usando el kit de maxiprep de plásmidos ZYPPY™ (Zymo Research Corp., Orange, California) según el protocolo del fabricante. Tal como se analiza en el Ejemplo 2, cada uno de estos plásmidos contiene un transgén *ble*, que confiere resistencia a zeocina, fleomicina y bleomicina. (Véase, por ejemplo, Gatignol *et al.* (1988) y Dumas *et al.* (1994). En el presente ejemplo, se empleó un transgén *Sh ble (Streptoalloteichus hindustahus)*. También son adecuados otros transgenes *ble*, tales como los transgenes *Tn5 ble* y *Sa ble (Staphylococcus aureus)*.

Para cada plásmido, se mezclaron cinco µl (~1 µg/µl) de ADN plasmídico cono 25 µl de suspensión de partículas de oro (60 mg/ml en glicerol 50 %) agitando vorticialmente durante 3 minutos e incubando en hielo durante 10 minutos. Se añadieron diez µl de espermidina 0,1 M y 25 µl de $CaCl_2$ 2,5 M en la mezcla y se agitó vorticialmente inmediatamente durante 4 minutos, después se centrifugaron durante 10 segundos a máxima velocidad en una centrífuga de sobremesa. El sobrenadante se descartó. Las partículas de oro recubiertas de ADN plasmídico se lavaron dos veces con etanol 70 % y se resuspendieron en 36 µl de etanol 98 %. Se sembraron en extensión seis µl de la suspensión de partículas de oro en cada disco macrovehículo y los discos se secaron al aire (Zhang *et al.* 2001).

El sistema de suministro de partículas de PSD-1000/He (Bio-Rad Laboratories, Inc., California) se usó para suministro de ADN plasmídicos que portan casetes de expresión génica resistentes a zeocina en células competentes ONC-T18 en condiciones estériles en una campana de flujo laminar de acuerdo con el protocolo del fabricante. Partes del sistema de suministro de partículas, incluyendo portadores de macrovehículos, macrovehículo, pantallas de detención, se esterilizaron por autoclave. La cámara del sistema de suministro de partículas se

desinfectó frotando con etanol al 70 %. Después de bombardeo, las placas de petri que contenían células transformadas se incubaron en incubador a 25 °C en oscuridad durante 6 a 16 horas. Las células transformadas se retiraron después por lavado de las placas usan 1 ml de medio de cultivo esterilizado, se transfirieron a un tubo de microcentrífuga esterilizado por autoclave de 1,5 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 0,5 ml de medio de cultivo esterilizado por autoclave. Se sembraron en extensión ciento cincuenta µl de la suspensión celular en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían ~50-500 µg/ml de zeocina. Después de haberse evaporado el líquido en las placas, las placas se sellaron con PARAFILM® M y se incubaron en incubador a 25 °C durante 6-10 días. Se seleccionaron colonias resistentes a zeocina usando puntas de pipeta de 10 µl y se suspendieron en 50 µl de agua esterilizada en un tubo de PCR de 200 µl. Se aplicó puntualmente un µl de la suspensión celular en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían 150-200 µg/ml de zeocina. Después de 3-5 días de incubación a 25 ºC, se seleccionaron colonias de crecimiento vigoroso para análisis adicional.

Se cultivaron colonias resistentes a zeocina en placas de agar ONC-T18-GM0 que contienen 50-500 µg/ml de zeocina 4-6 días después de transformación biolística. Las cepas resistentes a zeocina se generaron con diversas construcciones derivadas de combinaciones de diversos promotores y terminadores aislados de ONC-T18. Los números de los transformantes generados por transformación usando diferentes construcciones fueron variables. (Véase, por ejemplo, Tabla 13). En algunas realizaciones, el número de transformación es de aproximadamente 10-500 por cada 5 µg de ADN plasmídico.

Tabla 13: Número de transformantes por transformación

Construcciones	Número de transformantes/5 µg de ADN plasmídicos
pd5EPZ1	11
p341PZ4OT	9
p341PZ347T	4
p341PZ713T	7
pD4DPZ18S	5

Ejemplo 8: Análisis de PCR de transformantes de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

Este ejemplo describe la confirmación de la presencia del transgén en ONC-T18 transformado. Se usó un ensayo de PCR para evaluar la presencia del transgén *ble*, que está presente en cada una de las construcciones plasmídicas usadas para transformar ONC-T18.

Se inoculó un asa de inóculo de cada cepa transformada potencialmente que crecía en placas de agar de zeocina-ONC-T18-GM0 en 10 ml de medio ONC-T18-GM0 líquido en un matraz de 50 ml y se cultivó en un incubador agitador a 25 °C y a 250 rpm durante 2 días. Se usaron dos ml para aislamiento del ADN genómico de cada cepa usando un kit de aislamiento de ADN de miniprep microbiana Ultraclean (MO BIO Laboratories, Inc, Solana Beach, California) siguiendo el protocolo del fabricante. Se midieron las concentraciones de ADN genómico usando el espectrofotómetro Spectro 2000RSP (Lebomed, Inc., Culver City, CA, EE.UU.). Se usó medio µl de ADN genómico para una reacción de PCR de 20 µl que contenía los siguientes componentes: ADN polimerasa *Taq* (Sigma), tampón de PCR 1 X, $MgCl_2$ 2,5 mM, mezcla de dNTP (0,20 mM cada uno), cebador n.º **64** 0,25 µM (SEQ ID NO:**66**) y cebador n.º **65** 0,25 µM (SEQ ID NO:**67**) en un tubo de PCR de 200 µl. Se llevaron a cabo reacciones de PCR usando el siguiente programa de termociclado: 94 °C durante 3 minutos, 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 2 minutos y 72 °C durante 2 minutos durante 30 ciclos. El cebador n.º 64 hibrida con el extremo 5' y el cebador n.º 65 hibrida con el extremo 3' del gen *ble* de cada plásmido usado para transformar ONC-T18. Se amplificó un fragmento de ADN de ~350 pares de bases de los ADN genómicos de transformantes positivos y de ADN plasmídico del control positivo, pero no de ADN genómico del control negativo aislado de las células del ONC-T18 de tipo silvestre. Estos resultados confirman que la mayoría de cepas resistentes a zeocina son transformantes verdaderos (Fig. 13).

Ejemplo 9: Tasas de crecimiento de transformantes

Este ejemplo describe la determinación de tasas de crecimiento de cepas derivadas de células individuales transformadas. Se seleccionaron inóculos de cepas resistentes a zeocina que se habían transferido tres veces en placas de agar de zeocina ONC-T18-GM0 de cada colonia usando una punta de pipeta de 10 µl y se resuspendieron en 50 µl de agua esterilizada en un tubo de PCR de 200 µl. Se aplicó puntualmente un µl de la suspensión celular en placas de agar de ONC-T18-GM0 (15 g/l de agar) que contenían 18 g/l o 35 g/l de sal marina. Los diámetros de las colonias aplicadas puntualmente se midieron el día 1, día 3, día 5, día 7 y día 9 después de la inoculación.

La mayoría de cepas ensayadas crecieron más rápido que la cepa de tipo silvestre ONC-T18 en placas de agar

ONC-T18-GM0, si se dejaron crecer en placas que contenían sal marina 18 g/l o 35 g/l. Entre las cepas ensayadas, la mayoría creció más rápido en placas que contenían sal marina 18 g/l que en placas que contenían 35 g/l. Algunas cepas que crecían más rápido en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían sal marina 18 g/l (tal como cepa 5-3) crecieron más lento que otras cepas en placas que contenían sal marina 35 g/l. Parece que la mayoría de cepas transformadas prefieren crecer en medios que contienen menor salinidad, por ejemplo sal marina 18 g/l (Fig. 14).

Ejemplo 10: Sensibilidad a zeocina de cepas transformadas

Este ejemplo describe ensayos de la sensibilidad de zeocina de cepas transformadas derivadas de células individuales.

Se seleccionó una cantidad muy pequeña de inóculo de cepas resistentes a zeocina que se había transferido tres veces mediante pases de colonia en placas de agar de zeocina/ONC-T18-GM0 (así como su cepa parental o la cepa de tipo silvestre) de colonias usando una punta de pipeta de 10 µl y se resuspendió en 50 µl de agua esterilizada en un tubo de PCR de 200 µl. Se aplicó puntualmente un µl de la suspensión celular en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían sal marina 18 g/l (agar 15 g/l) y zeocina a una concentración que varía de 0 a 5000 µg/ml (Invitrogen, CA, EE.UU.). Los diámetros de las colonias aplicadas puntualmente se midieron el día 1, día 3, día 5, día 7 y día 8.

Todas las cepas ensayadas crecieron bien en placas de agar ONC-T18-GM0 en ausencia de zeocina, pero sus tasas de crecimiento difirieron. La cepa parental (la cepa de tipo silvestre) ONC-T18 solamente creció en placas de agar ONC-T18-GM0 que tenían zeocina 30 µg/ml o menos. Para las cinco construcciones plasmídicas diferentes, todas las cepas transformadas que portaban el casete de expresión del gen de resistencia a zeocina (de *S. hidustanus*) crecieron bien en placas de agar ONC-T18-GM0 que tenían zeocina a concentraciones que variaban de 30 a 1000 µg/ml (Fig. 15). Sin embargo, a una concentración de zeocina de 5000 µg/ml, la mayoría de las cepas crecieron notablemente más lento que en medio con 1000 µg/ml o menos de zeocina, y algunas de las cepas no pudieron crecer en absoluto en 5000 µg/ml de zeocina (Fig. 15). Varias cepas, especialmente las transformadas con una construcción plasmídica que porta casete de expresión génica de resistencia a zeocina conducido por el promotor génico de Δ5 elongasa, sin embargo crecieron muy bien (Fig. 15), lo que sugiere que la expresión del gen de resistencia a zeocina estaba elevada en estas cepas en comparación con otras, las razones para esto podrían incluir, (i) el promotor de Δ5 elongasa que permite la acumulación de más proteína recombinante en la célula, debido a fuerte expresión, ARNm estable, supresión de silenciamiento génico, por ejemplo, (ii) la inserción de transgén fue dentro de una región transcrita activamente del genoma, aumentando de nuevo el nivel de proteína recombinante en la célula, o (iii) la construcción de Δ5 elongasa podría inducir preferentemente múltiples acontecimientos de inserción de una única transformación, aumentando el nivel de expresión y el nivel de proteína recombinante en la célula.

Estos resultados son coherentes con que DHA sea el principal ácido graso de almacenamiento de energía en el grupo de microalgas traustoquítridas (Jain *et al.* 2007) y siendo la etapa de elongación de Δ5 elongasa la etapa limitante de velocidad durante la biosíntesis de DHA en microbios productores de ácido graso omega-3 DHA (Leonard et al. 2004). La variabilidad de la tasa de crecimiento entre cepas transformadas con la misma construcción plasmídica refleja la variabilidad en el nivel de expresión debido a la variabilidad en la localización de inserción (tal como se ha analizado previamente) o variación en el número de copias del transgén *ble* (tal como se ha analizado previamente) dentro de los cromosomas de la cepa hospedadora ONC-T18.

Estos resultados demuestran que diversas secuencias promotoras y terminadoras aisladas de ONC-T18 pueden conducir eficazmente la expresión de transgenes en microorganismos productores de AGPI. Además, estos resultados indican que el transgén *ble* de *S. hidustanus* es un gen marcador de selección muy eficaz para programas de mejora de cepas industriales y manipulación genética de cepas de *Thraustochytrium* sp., como se ha descrito previamente (Hou y Shaw 2010; Sakaguchi, Matsuda et al. 2012).

Ejemplo 11: Comparaciones de productividades de biomasa entre cepas transformadas y cepa de tipo silvestre *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

El presente ejemplo describe comparaciones de productividades de biomasa de transformantes con la de la cepa de tipo silvestre *Thraustochytrium* sp.

ONC-T18, se inocularon cultivos de 10 ml de ONC-T18-GM0 (sal marina 18 g/l) cada uno con una cepa transformada (es decir, que porta un gen de resistencia a zeocina) o con la cepa de tipo silvestre ONC-T18. Los cultivos inoculados con una cepa transformada contenían 200 µg/ml de zeocina en el medio. Los cultivos inoculados con una cepa de tipo silvestre ONC-T18 se cultivaron en medios sin zeocina. Los cultivos se dejaron crecer a 25 °C en un incubador agitador ajustado a 250 rpm durante 3 días hasta que la DO_{600} alcanzó aproximadamente 1,979-2,369 gramos. Después se inocularon cultivos de 50 ml de ONC-T18-GM0 que contenían sal marina 18 g/l o 35 g/l en matraces de 250 ml con 6 DO_{600} de los inóculos de cada cepa, incluyendo la cepa de tipo silvestre (se midió DO_{600} para 1 ml de cultivo y después el volumen de cultivo se aumentó de escala a un valor de DO_{600} de 6; por ejemplo, si la medición de DO_{600} fue de 2, entonces se usó (1 ml x (6/2,0)) = 3 ml como inoculado). Los cultivos se dejaron crecer en un incubador agitador ajustado a 250 rpm a 25 ºC durante 2 días. Se añadieron después cinco ml

de glucosa 50 % esterilizada por autoclave a cada matraz de cultivo. Los cultivos se dejaron crecer continuamente en un incubador agitador ajustado a 150 rpm y a 20 ºC durante otros 2 días. Después se añadieron seis ml de glucosa 50 % a cada matraz de cultivo y los cultivos se dejaron crecer constantemente en un incubador agitador ajustado a 150 rpm y a 20 ºC durante 3 días más. Las biomasas de cultivos de cada cepa en los dos tipos de medios ONC-T18-GM0 (con sal marina 18 g/l o 35 g/l) se recogieron transfiriendo cultivos celulares a un tubo falcon de 50 ml y centrifugando a 4000 rpm usando la centrífuga SORVALL LEGEND RT+ (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EE.UU.). La biomasa flotó en la superficie del medio líquido como una capa compactada. El medio líquido se liberó perforando un agujero muy pequeño en el fondo del tubo falcon usando una aguja de jeringa 18G 1 1/2. El sedimento de la biomasa en el tubo se congeló en un congelador a -80 ºC durante una noche y después se liofilizó usando un liofilizador durante tres días. Se pesó la biomasa de cada muestra. Se ensayaron nueve cepas incluyendo el tipo silvestre.

Como se esperaba, la mayoría de los transformantes produjeron cantidades similares de biomasa de células secas a la de la cepa de tipo silvestre ONC-T18 cuando se cultivaron en ONC-T18-GM0 que contenía sal marina artificial 35 g/l. Sin embargo, una de 8 cepas transformadas produjo aproximadamente 22 % más biomasa de células secas que la de la cepa de tipo silvestre ONC-T18 (Fig. **16**) cuando se cultivó en las mismas condiciones. De forma análoga, en el ONC-T18-GM0 que contenía sal marina 18 g/l, 7 de 8 cepas transformadas produjeron cantidades similares o más biomasa que la de la cepa de tipo silvestre ONC-T18. Una de 8 cepas ensayadas produjo 19,5 % más biomasa que la de la cepa de tipo silvestre ONC-T18 (Fig. **16**). Esto demuestra que la transformación y la expresión de transgenes no influye negativamente en la producción de biomasa por ONC-T18. Por lo tanto se supone que la biología de ONC-T18 es suficientemente robusta para soportar la tensión asociada con transformación y biosíntesis de proteínas heterólogas.

Ejemplo 12: Comparaciones de productividad de DHA entre cepas transformadas y la cepa de tipo silvestre de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

El presente ejemplo describe la productividad de DHA en las diversas cepas transformadas con vectores de expresión que comprenden Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa, Δ5 elongasa, y combinaciones de las mismas en sistemas de expresión multiplasmídicos o policistrónicos. Se observan niveles elevados de DHA cuando se comparan con la cepa de tipo silvestre y cepas transformadas con controles de vector vacíos. El presente ejemplo demuestra, entre otras cosas, que pueden conseguirse niveles dentro del intervalo de al menos 1 %-36 % mayores que el tipo silvestre (por ejemplo, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, etc.). Basándose en estos hallazgos, un experto habitual en la materia apreciará que puede conseguirse mayor elevación (por ejemplo, hasta niveles dentro del intervalo de 1 %-1000 % mayores que el tipo silvestre, por ejemplo, aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 210 %, 220 %, 230 %, 240 %, 250 %, 260 %, 270 %, 280 %, 290 %, 300 %, 310 %, 320 %, 330 %, 340 %, 350 %, 360 %, 370 %, 380 %, 390 %, 400 %, 410 %, 420 %, 430 %, 440 %, 450 %, 460 %, 470 %, 480 %, 490 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 %, 700 %, 750 %, 800 %, 850 %, 900 %, 950, 1000 % o más mayor que el tipo silvestre). El presente ejemplo demuestra además la consecución de relaciones de DHA:biomasa dentro del intervalo de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:2, al menos aproximadamente 40 % mayores que las típicamente observadas con cepas de tipo silvestre. (Véase, por ejemplo, la Tabla 2 en Raghukumar (2008).) Basándose en estos hallazgos, los expertos en la materia apreciarían que pueden conseguirse al menos relaciones de aproximadamente 1:5. Se han conseguido relaciones de DHA con respecto a biomasa (DHA:biomasa) de aproximadamente 1:8 a 1:4; y se espera conseguir relaciones de aproximadamente 1:3. Los ejemplos en la bibliografía (tal como la revisión publicada por Raghukumar, 2008) indican logros que no han reducido esta relación por debajo de 1:5.

Se transforman cultivos de 256 cepas (transformadas con cada combinación de vectores de expresión que comprenden Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa, Δ5 elongasa) individualmente con su cepa parental (tipo silvestre), se cultivan y la biomasa se recoge y se liofiliza en las mismas condiciones descritas. Se realiza extracción de éster metílico de ácido graso (EMAG) mediante el método de transesterificación directa. Se mezclan aproximadamente 20 mg de biomasa de células liofilizadas y 3 ml de tampón de reacción de transesterificación (metanol:ácido clorhídrico:cloroformo) agitando vorticialmente durante 10 segundos y se incuban después en un baño de agua a 90 ºC durante dos horas. Después de completarse la transesterificación, las muestras se retiran y se enfrían hasta temperatura ambiente. Se añade un ml de agua y se mezcla mediante agitación vorticial durante 10 segundos. Después se extraen EMAG añadiendo 3 X 2 ml de un disolvente de hexano:cloroformo (v/v, 4:1) y agitando vorticialmente durante 10 segundos: después se permite que las muestras reposen hasta que se completen las separaciones de fases.

Se lleva a cabo análisis cromatográfico de gases (GC) de los EMAG usando dos patrones internos (200 µl). Se añade un ácido hexacosaenoico (C23:0) antes de la transesterificación y el otro, ácido nonadecaenoico (C19:0) se añade directamente antes del análisis. Se realizan análisis en un Agilent 6890 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) con una columna capilar de sílice fusionado OMEGAWAX 320 de 30 m X 0,32 mm de diámetro interno

(0,25 µm de grosor de película) instalada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y un detector de ionización de llama ajustado a 250 °C, relación de división 50:1 para detector DIL a 275 ºC. El volumen de inyección es de 1 µl. El gas vehículo es H_2 con un flujo constante de 5,0 ml por minuto. La confirmación de la identidad de EMAG se lleva a cabo usando un espectrómetro de masas Trace GC-DSQ (Thermo Electron, Boston, EE.UU.) y comparación de los tiempos de retención para patrones de laboratorio.

Muchas de las cepas transformadas producen aproximadamente 6,337 g/l de DHA. Este rendimiento es aproximadamente 16 % mayor que el de la cepa de tipo silvestre ONC-T18 cuando se cultiva en ONC-T18-GM0 que contiene sal marina artificial 35 g/l. Algunas cepas transformadas producen DHA, que varía de 1 a 13 % más, que la de la cepa de tipo silvestre ONC-T18 cuando se cultivan en ONC-T18-GM0 que contiene sal marina artificial 18 g/l en las mismas condiciones.

Algunas de las cepas transformadas producen 7,445 g/l y 7,871 g/l de DHA, que representan 25 % y 36 %, respectivamente, más que su cepa parental (5,935 g/l) cultivada en ONC-T18-GM0 que contiene sal marina artificial 35 g/l. El uso de ONC-T18-GM0 de menor salinidad no solamente reduce directamente los costes de producción de DHA, sino que también ralentiza la erosión de los fermentadores provocada por altas concentraciones de sal de cloruro sódico en medio de cultivo para cultivar microbios traustoquítridos.

La relación de DHA con respecto a lípidos totales de cepas transformadas productoras de alto nivel de DHA es mayor que la de su cepa parental. El factor de DHA con respecto a lípidos totales puede influir en el procesamiento corriente abajo de DHA extraído de las células de cepas transformadas. Las relaciones de DHA:lípidos totales conseguidas con cepas y métodos proporcionados en el presente documento pueden variar de acuerdo con las condiciones de fermentación. Por ejemplo, para cultivos que se han dejado crecer en matraces, puede conseguirse típicamente un porcentaje de DHA de aproximadamente 15 % a aproximadamente 50 % de lípidos totales (correspondiente a relaciones de DHA:lípidos totales de aproximadamente 0,15:1 a aproximadamente 0,50:1) con cepas transformadas. Para cultivos que se han dejado crecer en un fermentador, puede conseguirse típicamente un porcentaje de DHA de aproximadamente 30 % a aproximadamente 75 % de lípidos totales (correspondiente a relaciones de DHA:lípidos totales de aproximadamente 0,3:1 a aproximadamente 0,75:1) con cepas transformadas. Se obtienen rendimientos de DHA mucho mayores de cepas transformadas desveladas en el presente documento que lo que puede obtenerse con cepas de tipo silvestre. Por ejemplo, los rendimientos de DHA de cepas transformadas varían típicamente de aproximadamente 7 (basándose en datos anteriores) a aproximadamente 50 g/l (gramos de DHA por litro de medio), mientras que los rendimientos de DHA de cepas de ONC-T18 de tipo silvestre varían típicamente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 6 g/l. (Véase, por ejemplo, Tabla 2 en Raghukumar, (2008)). La relación de DHA con respecto a biomasa de cepas transformadas con producción de alto nivel de DHA también es mayor que la de su cepa parental. Esta mayor relación de DHA con respecto a biomasa se beneficia de la extracción corriente abajo de DHA de la biomasa celular de las cepas transformadas.

Todos los cultivos en este ejemplo se dejan crecer en las mismas condiciones (se cultivó ONC-T18 de tipo silvestre en ausencia de zeocina). El mayor nivel de producción de DHA por las cepas transformadas indica que esas cepas tienen una mayor eficacia de conversión de fuentes de carbono en DHA, lo que puede reducir el coste de producción de DHA de esas cepas transformadas.

Ejemplo 13: Comparación de productividad de lípidos totales entre cepas transformadas y la cepa de tipo silvestre *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

Como se ha descrito y demostrado ampliamente en el presente documento, ONC-T18 tiene gran potencial para su uso como una fábrica biológica no solamente para AGPI y sus derivados de producciones biomoleculares farmacéuticas y nutracéuticas, sino también para producción de biocombustible. Para evaluar y caracterizar la capacidad de ONC-T18 para poder emplearse para la producción de biocombustible, las productividades de lípidos totales y los perfiles de ácidos grasos de cepas transformadas de ONC-T18 se analizaron para su uso potencial en métodos para cambiar los perfiles de ácidos grasos para aplicaciones en productos especializados. Por ejemplo, puede ser deseable aumentar la producción de ácidos grasos de cadena corta (es decir, ácidos grasos con menos de 16 carbonos) o de AGPI particulares, como se menciona en el presente documento en el análisis de la ruta biosintética de AGPI. Puede, por ejemplo, ser deseable aumentar la producción de EPA (por ejemplo mutando o desactivando los genes de PKS y genes de Δ5 elongasa) o de ARA (por ejemplo, regulando negativamente cualquiera de los genes de PKS y/o por regulación positiva del gen de Δ12 desaturasa).

Cultivos de 8 cepas de ONC-T18 transformadas con vectores que comprenden transgén de resistencia a zeocina y comparadas con una cepa parental de control negativo (tipo silvestre; T18A30). Las células se cultivaron y la biomasa se recogió y se liofilizó en las mismas condiciones que se han descrito en el ejemplo 9. Se llevaron a cabo extracción de EMAG y análisis de GC como se ha descrito anteriormente.

Los inventores han descubierto que los perfiles de ácidos grasos, es decir la composición del extracto de ácidos grasos con respecto a DHA, EPA, ARA, por ejemplo, de las cepas transformadas fue muy similar al de sus cepas parentales cuando se cultivan en ONC-T18-GM0 que contiene sal marina artificial 35 g/l. Cuatro de ocho cepas

transformadas produjeron más lípidos totales que su cepa parental, lo que demuestra adicionalmente que el proceso de transformación en sí mismo y la presencia y/o expresión del transgén no afectaron significativamente a los perfiles de ácidos grasos en estas cepas, ni interrumpieron genes potencialmente implicados en rutas metabólicas de lípidos de la mayoría de cepas derivadas. Por lo tanto, parece que las cepas conservan la integridad genética de las cepas parentales después del proceso de transformación (Fig. **17A**).

La capacidad de transformar cepas de *Thraustochytrium* proporciona una enorme oportunidad para modificar genéticamente estos microbios y canalizar rutas metabólicas. Notablemente, cuando las cepas transformadas se cultivaron en ONC-T18-GM0 que contenía sal marina 18 g/l, dos cepas mostraron un nivel significativamente mayor de producción de ácidos grasos C16 que el de su cepa parental. Estos resultados son útiles en el desarrollo de esta cepa ONC-T18 en una plataforma para producción de biocombustible de ácidos grasos de cadena corta. Estos resultados demuestran que durante el proceso de selección de transformantes resistentes a zeocina, se produjo mutagénesis en las células con frecuencia relativamente alta. Esta alta frecuencia de mutagénesis puede usarse en programas de mejora de cepas (Fig. **17B**).

Las relaciones de lípido total con respecto a biomasa fueron mayores en cepas que producen altos niveles de ácidos grasos de cadena corta que en cepas de producción de bajo nivel (Fig. **17C**); dichas relaciones mayores pueden ser beneficiosas para extracción de aceite corriente abajo y la reducción de los costes de procesamiento.

El crecimiento en ONC-T18-GM0 de sal marina baja (18 g/l) potenció la productividad de lípidos totales general para la mayoría de las cepas ensayadas (Fig. **17D**).

Ejemplo 14: Estabilidad del trasngén *ble* en las cepas transformadas de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

El presente ejemplo confirma la estabilidad del transgén en cepas de *Thraustochytrium* sp. transformadas tal como se describe en el presente documento.

La estabilidad del transgén es importante para determinadas aplicaciones de ingeniería genética en programas de mejora de cepas microbianas cuando se usen microorganismos en procesos farmacéuticos o industriales y cuando la cantidad y calidad del producto sean fundamentales. Los inventores llevaron a cabo por lo tanto ensayos de estimación de la estabilidad del transgén de cepas de ONC-T18 transformadas. Con respecto a los ensayos de tasa de crecimiento descritos anteriormente, se aplicaron puntualmente inóculos de cuatro cepas de cada transformación así como sus cepas de tipo silvestre antecesoras en placas de agar ONG-T18-GM0 en ausencia de zeocina y se incubaron a 25 °C durante siete días. (Cada transformación se había realizado usando una de las cinco construcciones plasmídicas diferentes, cada una de las cuales porta diversos casetes de expresión génica resistentes a zeocina conducidos por una combinación de diferentes promotores y terminadores). Después, usando el mismo método, las cepas se transfirieron a una nueva placa de agar ONC-T18-GM0 recién preparada y se incubaron a 25 °C durante 7 días; se llevaron a cabo pases de colonias 6 veces. Finalmente, las cepas se transfirieron de vuelta a placas de agar ONC-T18-GM0 sin o con zeocina a una concentración de 200 µg/ml de medio.

Los resultados indican que después de seis pases de colonias, todas las cepas pueden crecer bien en placas de agar ONC-T18-GM0 con o sin zeocina (Fig. **18**). Sin embargo, en placas de agar ONC-T18-GM0 que tienen zeocina a una concentración a 200 µg/ml de medio, solamente las cepas transformadas crecieron bien, mientras que ninguna de las cepas de tipo silvestre fue capaz de crecer.

Estos resultados demuestran que no hubo pérdidas observadas del transgén en las cepas examinadas. Además, no se observó resistencia en cepas de tipo silvestre, lo que indica que no hubo ninguna mutación espontánea para estos rasgos y no hubo ninguna contaminación detectable. La presencia del transgén *ble* en las cepas transformadas después de pases de colonias seis veces se confirmó adicionalmente usando la PCR como se describe en el presente documento. Todas las cepas transformadas conservaron el transgén *ble* incluso después de 6 pases de colonias. Por lo tanto, el transgén *ble* mostró estabilidad en cepas de ONC-T18 transformadas.

Ejemplo 15: Aplicación de un agente mutagénico

Este ejemplo describe la aplicación del agente mutagénico, zeocina, para mejora de cepas de traustoquítridos.

Se transfirieron inóculos de sectores de colonias a nuevas placas recién preparadas y se desarrollaron a nuevas cepas. Se eligieron cuatro nuevas cepas, 1a, 1b, 3a y 3b para estudio adicional (los resultados se muestran en la tabla 2). Estas cuatro cepas y su cepa parental de tipo silvestre ONC-T18 se inocularon en 10 ml de medio líquido de ONC-T18-GM0. Los cultivos se dejaron crecer a 25 °C en un incubador agitador ajustado a 250 rpm durante 3 días hasta que la DO_{660} fue mayor de 2. Después los inóculos (DO_{660} = 6) de cada cepa, incluyendo la cepa de tipo silvestre, se inocularon respectivamente en 50 ml de medio ONC-T18-GM0 en matraces de 250 ml. Las siguientes condiciones experimentales y procedimientos usados fueron iguales que en el Ejemplo 14, ensayo II.

Tabla 14: Productividades de biomasa, lípidos totales y DHA de cuatro cepas seleccionadas y su cepa parental de tipo silvestre *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

Cepas	Biomasa (g/l)	Lípido total (mg/g)	DHA (g/l)
ONC-T18 (cepa parental)	**37,78**	**648,03**	**4,904**
1a	**36,29**	**592,06**	**3,774**
1b	**36,33**	**574,74**	**3,330**
3a	**43,91**	**670,38**	**5,135**
3b	**32,58**	**612,60**	**3,988**

Los resultados experimentales indicaron que tres de cuatro cepas seleccionadas produjeron significativamente menos biomasa, lípidos totales y DHA en comparación con los de su cepa parental de tipo silvestre (Tabla 6). Sin embargo, la cepa 3a produjo más biomasa, más lípidos y DHA que los de su cepa de tipo silvestre. La alta productividad de DHA de la cepa 3a no se debe solamente a su alta productividad de biomasa, sino a la alta relación de DHA con respecto a biomasa. Este resultado indicó que el agente mutagénico descubierto puede usarse para mejorar la aptitud de una cepa microbiana (tal como, por ejemplo, la capacidad de usar fuentes de carbono más baratas tales como corriente de residuos, glicerol, almidón, celulosa y hemicelulosa), la calidad y cantidad de productos tales como ARA, DHA y/o EPA, productividad de AGPI y perfiles de ácidos grasos y/o lípidos favorables para aplicaciones de biocombustible.

Los materiales producidos pueden separarse de cepas de producción y/o componentes de medios por cualquiera de una diversidad de medios. La extracción de materiales producidos se facilita, por ejemplo, tomando una o más etapas que alteran la secreción de ácidos grasos y/o que debilitan la pared celular.

Ejemplo 16: Una nueva cepa de *Thraustochystrium* sp.

Este ejemplo describe el descubrimiento de una nueva cepa de *Thraustochytrium* sp. con altos niveles de productividad de lípidos y DHA.

Se sembraron en extensión células individuales de ONC-T18 en las placas de agar que contenían medio ONC-T18-GM0 y zeocina 50 µg/ml. De diez a 15 días después de la inoculación, las colonias se exploraron visualmente. Se aislaron aleatoriamente colonias grandes sin cambios de morfología visibles y se desarrollaron en nuevas cepas. Se comparó la productividad de biomasa, lípidos totales y AGPI de nuevas cepas. Se descubrió inicialmente que una cepa ONC-T18/35/Z50 era capaz de producir significativamente más biomasa, lípidos totales y DHA, lo que se ha confirmado repetidas veces con condiciones de fermentación, métodos y procedimientos optimizados descritos en el Ejemplo 5, Ensayo II. En los ensayos de fermentación de dos estadios usando medio ONC-T18-GM0 que contenía sal marina 35 g/l, la nueva cepa ONC-T18/35/Z50 produjo 5 % más biomasa, 7 % más lípidos totales y 14 % más DHA que los de su cepa parental ONC-T18. Usando el mismo medio, pero que contenía sal marina 18 g/l, la nueva cepa ONC-T18/35/Z50 produjo aproximadamente 10 % más biomasa, 20 % más lípidos totales y 36 % más DHA que los de su cepa parental ONC-T18. Además, las relaciones de DHA y lípido total con respecto a biomasa, en la nueva cepa ONC-T18/35/Z50 que produce alto nivel de DHA, son mayores que la de su cepa parental, lo que demuestra que la nueva cepa tiene una capacidad más robusta para convertir fuentes de carbono tales como glucosa en lípidos y DHA. Esta nueva cepa es útil no solamente en la mejora de los rendimientos, sino también en la reducción de la fermentación y los costes de procesamiento corriente abajo para producción biológica de lípidos y AGPI tal como DHA de microalgas.

Ejemplo 17: Expresión de Δ12 desaturasa de *Thraustochytrium* ONC-T18 en levadura

El clon pYΔ12desat, que consiste en la Δ12 desaturasa de longitud completa en pYES2 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), tal como se describe en el ejemplo 4. pYΔ12desat, se transforma en *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 competente. La transformación de levadura se lleva a cabo usando el kit de transformación S. c. EasyComp (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) de acuerdo con condiciones especificadas por el fabricante. Los transformantes se seleccionan para auxotrofia de uracilo en medio que carece de uracilo (SC-Ura). Para detectar la actividad desaturasa específica de estos clones, los transformantes se cultivan en condiciones que conducen a biosíntesis de ácidos grasos. La cepa de control negativo es INVSc1 que contiene el vector pYES2 inalterado, que se cultiva simultáneamente. Los cultivos se agitan vigorosamente (150 rpm) y se dejan crecer durante 96 horas a 30 °C. Las células se sedimentan y se lavan en tampón fosfato 100 mM, pH 7,0, los sedimentos celulares se liofilizaron. Después los lípidos se extraen y se derivatizan a ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) para análisis de cromatografía de gases (GC). Se realizan transesterificación y extracción usando 100 mg de células liofilizadas, con C19:0 como patrón interno, añadiendo mezcla de reacción de transesterificación (metanol: ácido clorhídrico: cloroformo, 10:1:1), mezclando y calentando a 90 °C durante 2 horas, enfriando después a temperatura ambiente. Se extraen EMAG añadiendo 1 ml de agua y 2

ml de hexano: cloroformo (4:1) y se permite que las fases orgánicas y acuosas se separen. La capa orgánica se extrae y se trata con 0,5 g de sulfato sódico anhídrido para retirar partículas y agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporan en una corriente de argón. Los EMAG se resuspenden en isooctano y se analizan por GC-FID. La comparación de perfiles de EMAG para mutantes que sobreexpresan D12 desaturasa y la cepa de control demostró una acumulación potenciada de ácido linoleico y contenido de ácido oleico reducido.

Para investigar la especificidad de sustrato de la Δ12 desaturasa, las células de levadura transformadas para expresar el gen de Δ12 desaturasa, mediante el plásmido pYΔ12desat, se comparan con un control de levadura de tipo silvestre transformado con un vector vacío, y por lo tanto no contienen la Δ12 desaturasa experimental. Las composiciones de ácidos grasos de estos transformantes se analizan por GC usando sus EMAG correspondientes. El pico correspondiente al patrón de éster metílico C18:$2^{9,12}$ se encuentra en los espectros de GC de transformantes de Δ12 desaturasa, pero no en los de transformantes simulados. El análisis de GC-MS del pico de nueva generación de los transformantes de Δ12 desaturasa confirma posteriormente que el pico correspondiente a C18:$2^{9,12}$ es de hecho ácido linoleico, basándose en espectros de fragmentación iónica, lo que demuestra que el ácido oleico endógeno se convierte en ácido linoleico por la cepa de levadura transformada para Δ12 desaturasa. Se convirtió entre 1 y 50 % de ácido oleico a ácido linoleico. Este resultado demuestra que la Δ12 desaturasa derivada de ONC-T18 es una desaturasa de 12 ácidos grasos. El análisis posterior demuestra que la Δ12 desaturasa no es capaz de introducir dobles enlaces en ácido miristoleico (14:1^{9}), ácido palmitoleico (16:1^{9}), ácido heptadecanoico (17:1^{10}), ácido elaídico (18:1^{9} trans), ácido linolénico (C18:$3^{6,9,12}$), ácido dihomo-γ-linolénico (C20:$3^{8,11,14}$), ácido araquidónico (C20:$4^{5,8,11,14}$) o ácido docosatetraenoico (C22:$4^{7,10,13,16}$) cuando se añadieron ácidos grasos al medio de cultivo de forma externa. Tomados juntos, estos datos demuestran además que la Δ12 desaturasa identificada codifica una desaturasa de 12 ácidos grasos.

Ejemplo 18: Expresión heteróloga de Δ12 desaturasa de *Thraustochytrium* ONC-T18 en ONC-T18

La Δ12 desaturasa aislada de ONC-T18 (SEQ ID NO:70) se clona en los vectores p341PZ5pEx como se describe en el Ejemplo 4,9 para la sobreexpresión constitutiva, dando como resultado vector p341PZ5pD12Ex. El vector de sobreexpresión heterólogo se transforma en ONC-T18 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7. El perfil de producción de AGPI de transformantes puede después evaluarse como anteriormente y compararse con controles negativos (transformantes de vectores vacíos). Los cambios en el número de copias y el nivel de expresión de genes de biosíntesis de AGPI se confirman por PCR en tiempo real cuantitativa.

El presente ejemplo describe productividad de AGPI en las diversas cepas transformadas y demuestra niveles elevados en comparación con el tipo silvestre. El presente ejemplo demuestra, entre otras cosas, que la sobreexpresión de Δ12 desaturasa de ONC-T18 aumenta el contenido de ácido graso total, pero reduce los niveles de ácidos grasos C12 y C16 saturados y monoinsaturados. Pueden conseguirse niveles de ácidos grasos totales dentro del intervalo de al menos 1 %-50 % mayores que el tipo silvestre (por ejemplo, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %... 30 %, 31 %, 32 %... 41 %, 42 %, 43 %, etc.). Basándose en estos hallazgos, un experto en la materia apreciará que puede conseguirse mayor elevación (por ejemplo, hasta niveles dentro del intervalo de 1 %-1000 % mayores que los tipos silvestres, por ejemplo, aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 210 %, 220 %, 230 %, 240 %, 250 %, 260 %, 270 %, 280 %, 290 %, 300 %, 310 %, 320 %, 330 %, 340 %, 350 %, 360 %, 370 %, 380 %, 390 %, 400 %, 410 %, 420 %, 430 %, 440 %, 450 %, 460 %, 470 %, 480 %, 490 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 %, 700 %, 750 %, 800 %, 850 %, 900 %, 950 %, 1000 % o más mayor que el tipo silvestre), particularmente cuando la manipulación de los niveles de Δ12 desaturasa se combina con condiciones de cultivo ideales y/o comanipulación de otros genes de biosíntesis de AGPI. Los ácidos grasos C12 y C16 saturados y monoinsaturados pueden reducirse en niveles de aproximadamente 1 % a 50 % en comparación con el tipo silvestre (por ejemplo, aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, etc).

El presente ejemplo demuestra además consecución de perfiles de producción de AGPI de contenido de ácidos grasos especificado. La sobreexpresión de Δ12 desaturasa aumenta los niveles de ARA, EPA y/o DHA en relación con los controles. El presente ejemplo demuestra además la consecución de relaciones de DHA:biomasa dentro del intervalo de aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:2, al menos aproximadamente 40 % mayores que las típicamente observadas con cepas de tipo silvestre.

Ejemplo 19: Supresión de la Δ12 desaturasa dentro de ONC-T18

Para demostrar adicionalmente la función de la proteína de Δ12 desaturasa de ONC-T18 y la influencia de su supresión, esta región codificante se trunca y reemplaza mediante el uso del plásmido pT7-ΔΔ12desat. Este plásmido contiene 1000 bases de 5' inmediatamente cadena arriba de la ORF de Δ12 desaturasa y 1000 pb de homología de secuencia 3' que corresponde a parte de la ORF de Δ12 desaturasa y continúa a la UTR 3'. Esto proporciona homología sustancial con el genoma de ONC-T18 en los loci de Δ12 desaturasa, permitiendo la inserción del casete de Ble-SV40 mediante recombinación homóloga. La inserción mediante recombinación homóloga coloca el gen de resistencia a zeocina y terminador de SV40 en la ORF de Δ12 desaturasa y en fase con

el codón de inicio de Δ12 desaturasa (ATG). Como resultado la expresión de Ble está bajo el control del promotor de Δ12 desaturasa y el terminador de SV40 evita la transcripción del gen de la Δ12 desaturasa. Además, la inserción de la construcción de Ble-SV40 produce un truncamiento 5' de 87 pb de la ORF de Δ12 desaturasa y también introduce una mutación de desplazamiento de fase en la ORF. Por lo tanto, la inserción de la construcción de pT7-ΔΔ12 desaturasa mediante recombinación homóloga en los loci de Δ12 desaturasa elimina la expresión de la Δ12 desaturasa nativa. Se preparan y realizan células ONC-T18 competentes y transformación como se describe en la sección de materiales y métodos del Ejemplo 7. Se realiza selección en placas de agar-GMO con sal 18 y 35 g/l, por separado. Debido a la influencia desconocida del promotor de Δ12 desaturasa en expresión de Ble y posterior resistencia a zeocina, se realiza selección con complementación de zeocina de las placas de agar a 20-2000 µg/l. Después de incubación a 25 °C durante 7 días, se seleccionan colonias, se replican en placas de agar que contienen zeocina y se usan para inocular 10 ml de medios de caldos de cultivo. Se incuban cultivos a 25 °C, 150 rpm durante 3 días, se recogen mediante centrifugación y se extrae ADN genómico usando el kit de extracción de ADN MoBio según las instrucciones del fabricante. Para confirmar la presencia de la construcción de Ble-SV40 dentro de los loci genómicos de Δ12 desaturasa se emplea PCR con cebadores que flanquean el sitio de inserción. Los cebadores de PCR 5'FlankRegionF - CCTCCACATGTCTCACAAGACCACCG (SEQ ID NO: 91) y 3'FlankRegionR - GCAAGCAATGCTCGATTTCCTACC (SEQ ID NO: 92) se diseñaron y emplearon para este fin. En la cepa de tipo silvestre, la amplificación produjo un fragmento de ADN de 1587 pb; mientras que en la cepa mutante, en la que la ORF de D12 desaturasa se suprimió, se produjo un producto de PCR de 2185 pb. Las cepas positivas se marcaron con ONC-T18-ΔΔ12desaturasa.

Las composiciones de los ácidos grasos en las cepas de ONC-T18 de tipo silvestre y ΔΔ12 desaturasa se analizan mediante GC-MS usando sus EMAG. A diferencia del tipo silvestre, los mutantes de ONC-T18-ΔΔ12 desaturasa no tienen ácido linoleico (C18:$2^{\Delta 9,12}$), el producto principal de la Δ12 desaturasa; en su lugar acumulan una cantidad significativa de OA (C18:$1^{\Delta 9}$), el sustrato principal para la Δ12 desaturasa. Resulta importante que los derivados corriente abajo de ácido linoleico en la ruta de elongación/desaturación convencional también reducen drásticamente en mutantes de ONC-T18-ΔΔ12 desaturasa, excepto para DHA. DHA aumenta de hecho en mutantes de ONC-T18-ΔΔ12 desaturasa en aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o más en relación con cepas de tipo silvestre. Esto aumenta DHA dentro del contenido de ácidos grasos total de la célula de aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o más en relación con el tipo silvestre.

Además, los contenidos de C17:$1^{\Delta 9}$ y C19:$1^{\Delta 9}$ también aumentan en los mutantes de ONC-T18-ΔΔ12 desaturasa, lo que sugiere que estos ácidos grasos de cadenas impares pueden ser sustratos para la Δ12 desaturasa. La acumulación de OA y la reducción de LA y sus AGPI corriente abajo en la ruta convencional se observan no solamente en la fracción de ácidos grasos total sino también en cada clase de lípido (es decir, lípidos neutros, fosfolípidos y glucolípidos) de los mutantes de ONC-T18-ΔΔ12 desaturasa. A pesar de los cambios significativos en los perfiles de ácidos grasos en las fracciones de ácidos grasos totales y lípidos complejos, no se observa ninguna diferencia en el crecimiento celular entre la cepa de tipo silvestre y mutantes de alteración de ONC-T18-ΔΔ12 desaturasa, ni en ácidos grasos totales, en condiciones experimentales empleadas.

Ejemplo 20: La aplicación del promotor génico de Δ12 desaturasa de ONC-T18 para conducir la expresión génica de Δ5 desaturasa

El promotor de Δ12 desaturasa heterólogo y gen de Δ5 desaturasa, descrito anteriormente, se combinan para expresión heteróloga del gen de Δ5 desaturasa después de la transformación de ONC-T18 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7. En resumen, el plásmido pP Δ12-Δ 5Desat-Δ 12UTR-Zeo se crea mediante aislamiento y amplificación, y extensión 3' de la secuencia flanqueante 5' de Δ12 desaturasa, que abarca la región promotora potencial, usando los cebadores de PCR 5' Δ12FlankF: GGATCAAAGTCATACTATGCGTACACG (SEQ ID NO: 93) y 5' Δ 12FlankR: ATCTATGTTAACCGAATGCAATTGCGTCCGAGAGACCTAAAGAATCAAGTTCG (SEQ ID NO: 94). El cebador 5' Δ12FlankR extiende la secuencia promotora e introduce un sitio de enzima de restricción *MfeI* único en el fragmento de PCR producido. La PCR produce un fragmento de ADN de 845 pb. La secuencia de UTR 3' de Δ12 desaturasa se aísla, amplifica y extiende en el extremo 5' mediante PCR de una manera similar, que se consigue mediante PCR con los cebadores 3' Δ12FlankF: TATCATCAATTGATGTAGGTTAACGCCATTTCTAGCTCGAGCTGC (SEQ ID NO: 95) y 3' Δ12FlankR: ATGTGCCAATTTGGT2CCGTGAATACAGTCG (SEQ ID NO: 96). La amplificación por PCR del fragmento de ADN de Δ12 desaturasa 3' produce un producto de 165 pb. El cebador 3' Δ12FlankF introduce un sitio de enzima de restricción de *MfeI* único en el extremo 5' del producto de PCR de Δ12 desaturasa 3'. Los productos de PCR se purifican mediante precipitación, se digieren con enzima de restricción *MfeI* y se purifican en gel. Después se emplean fragmentos de ADN digeridos en una reacción de ligamiento durante una noche. Se realiza ligamiento con 200 ng de cada fragmento de ADN, 10 U de ADN ligasa T4 y 4 µl de tampón de ADN ligasa T4 5x, en un volumen de reacción de 20 µl. El ligamiento se realiza a 16 °C. El ligamiento de los fragmentos de ADN de Δ12 desaturasa 5' y 3' se confirma mediante electroforesis en gel de agarosa, basándose en la distancia de migración en comparación con un patrón de tamaño, y el producto deseado se extrae del gel de agarosa usando el kit de extracción en gel Qiagen Minielute, según las instrucciones del fabricante. Los productos de ADN se adenilan en 3' posteriormente mediante la adición de 2 U de ADN polimerasa Taq, 2 µl de tampón de PCR 10X, 0,5 µl de dATP 10 mM, 0,4 µl de cloruro de

magnesio 50 mM y agua sin nucleasa hasta 20 µl. La adenilación 3' se completa a 68 °C durante 10 minutos. Los productos de ADN de esta reacción se clonan después en el plásmido pT7-Blue3 mediante protocolos convencionales, produciendo el plásmido pT7-5-3 ∆12desat.

La Δ5 desaturasa se amplifica mediante PCR usando los cebadores Δ5 desatF: ATGGGCAAGGGAAGCGAGGG (SEQ ID NO: 97) y Δ5 desat R: CTAGTCTTGCTTC TTGGCGTC (SEQ ID NO: 98). La PCR produce un producto del tamaño y la secuencia de SEQ ID: 72. El plásmido pT7-5-3 Δ 12deat se digiere con enzima de restricción *HpaI* y se desfosforila. El plásmido pT7-5-3 Δ 12desat desfosforilado y lineal se emplea posteriormente en una reacción de ligamiento durante una noche junto con las condiciones de reacción de producto de PCR de Δ5 desaturasa que son idénticas a las descritas previamente, con la excepción de que se emplea un vector para insertar una relación molar de 6:1. La digestión con enzima de restricción *HpaI* y ligamiento del producto de PCR de Δ5 desaturasa descrito conserva la separación exacta en el nivel de nucleótidos para el promotor de Δ12 desaturasa. Por lo tanto, no se incorporan nucleótidos adicionales o secuencia de reserva en la construcción final entre el promotor de Δ12 desaturasa y el gen de Δ5 desaturasa. Los productos de ligamiento se transforman en *E. coli*. La biblioteca producida se explora con respecto a la construcción deseada mediante métodos de digestión y PCR convencional. Los plásmidos con la ORF de Δ5 desaturasa ligada en el plásmido pT7-5-3 Δ 12desat se secuencian para confirmar la fidelidad y pP Δ 12-Δ 5Desat-Δ 12UTR marcado. El casete de expresión del plásmido pP Δ 12-Δ 5Desat-Δ 12UTR se retira de este vector y se liga en el plásmido pD4DPZ 1 usando sitios de restricción respectivos, que permite la transformación y selección de resistencia a zeocina, tal como se ha descrito previamente. El plásmido producido fue pP Δ 12-Δ 5Desat-Δ 12UTR-Zeo marcado.

Después de la transformación del plásmido pPΔ12-Δ5Desat-Δ12UTR-Zeo en ONC-T18 la presencia del transgén se confirma usando PCR, con combinaciones apropiadas de los cebadores previamente descritos. El perfil de producción de AGPI de transformantes puede después evaluarse como anteriormente y compararse con controles negativos (transformantes de vectores vacíos). Los cambios en la expresión de genes de biosíntesis de AGPI se confirman por PCR en tiempo real cuantitativa.

Δ5 desaturasa cataliza la etapa final en la síntesis de ARA y EPA. La aplicación del promotor de Δ12 desaturasa para conducir la expresión del gen de Δ5 desaturasa aumenta significativamente la producción de proteína de Δ5 desaturasa; aproximadamente 20 veces durante el crecimiento exponencial y aproximadamente 40-100 veces en biosíntesis de ácidos grasos. Siempre que estén disponibles precursores de ácidos grasos, la proteína de Δ5 desaturasa sobreexpresada influye drásticamente en la biosíntesis de ARA y/o EPA mediante la ruta de elongación/desaturación.

Ejemplo 21: Aplicación del promotor génico de Δ5 desaturasa de ONC-T18 para conducir el grupo de genes de PKSA

El grupo de genes de PKSA es responsable de la producción de DHA en ONC-T18. La secuencia de PKSA y parte de su región promotora se muestran posteriormente en la Tabla 15:

Tabla 15: Secuencia de PKSA (SEQ ID NO: 99)

GCCGTGCGGCACGACGGTCCGTGAGTCGTGGGAGACAATCCGTGCTGGCATCGAC
TGCCTGTCGGACCTCCCCGAGGACCGCGTCGACGTGACGGCCTACTTTGACCCGG
TCAAGACGACCAAGGACAAGATCTACTGCAAGCGCGGCGGCTTCATCCCCGACTA
CGACTTTGACGCTCGGGAGTTCGGCCTTAACATGTTCCAGATGGAGGACTCGGAC
GCAAACCAGACCATTTCGCTCCTCAAGGTCAAGGAGGCCCTCCAGGATGCCGGCA
TCGACGCCCTCTCCAAGGAGAAGAAGAACATCGGCTGCGTCCTCGGCATTGGCGG
CGGCCAGAAGTCGAGCCACGAGTTCTATTCGCGCCTTAATTATGTTGTCGTCGAG
AAGGTCCTCCGCAAAATGGGCATGCCCGAGAAGGACGTGAAGGTGGCCGTCGAAA
AGTACAAGGCCAACTTTCCCGAGTGGCGCCTCGACTCCTTCCCCGGCTTCCTCGG
CAATGTTACCGCCGGACGCTGCACCAACACCTTTAACCTCGACGGC**ATG**AACTGC
GTCGTCGACGCCGCCTGCGCCTCGTCACTCATCGCCGTCAAGGTCGCCATCGACG
AGCTCCTACACGGCGACTGCGACATGATGGTGACTGGCGCCACCTGCACGGACAA
CTCCATCGGCATGTACATGGCCTTCTCCAAGACGCCGGTGTTCTCCACCGACCCC
AGCGTCCGCGCCTACGACGAGAAGACAAAGGGTATGCTTATCGGCGAGGGCTCGG
CCATGCTCGTCCTCAAGCGCTACGCCGACGCCGTACGCGACGGCGACGAGATCCA
CGCCGTCATCCGTGGCTGCGCCTCCTCGAGCGATGGTAAGGCCGCCGGCATCTAC
ACGCCCACCATCTCGGGGCAGGAGGAGGCCCTCCGCCGCGCCTACAACC

La unión operativa del control de este grupo de genes al promotor de Δ5 desaturasa reduce la expresión del complejo proteico PKS de 1189 unidades a 71 unidades durante el crecimiento exponencial, y de 5102 unidades a 62 durante la producción de ácidos grasos. Para conseguir esto, la secuencia flanqueante 5' de PKSA se aísla y se amplifica mediante PCR, usando los cebadores *Xho*I-PPKSA F: *ATACTCGAGCCGTGCGGCACGACGGTCCGTGAGT* (SEQ ID NO: 100) y PPKSA-NcoI: TATCCATGGCCGTCGAGGTTAAAGGTGTTGGTGCAG (SEQ ID NO: 101). Los motivos de enzimas de restricción están en cursiva y subrayados. El producto de PCR producido se digiere con enzimas de restricción *XhoI* y *NcoI.* El plásmido pD4DPZ1 se digiere de forma similar con enzimas de restricción *XhoI* y *NcoI.* Ambos fragmentos de ADN se extraen en gel y se combinan en un ligamiento de una noche, tal como se ha descrito previamente. La digestión del plásmido pD4DPZ1 da como resultado la retirada de la secuencia promotora de Δ4 desaturasa, mientras que el ligamiento da como resultado la inserción de la secuencia flanqueante 5' de PKSA en lugar de la Δ4 desaturasa. Esto proporciona 541 pb de homología con la secuencia 5' del gen de PKSA dentro de ONC-T18, plásmido productor pPKSA-PZ1. La secuencia promotora de Δ5 desaturasa (SEQ ID: 71) se amplifica mediante PCR usando los cebadores EcoRI-Δ5desatF: *ATAGAATTCGATATGTATT*TACGTGATCAAC (SEQ ID NO: 102) y Δ5desat-PKSA R: GGCGGCGTCGACGACGCAGTTCATAGGCGCCGATCGTTTGCGCGT (SEQ ID NO: 103). El sitio *EcoRI* está subrayado y en cursiva en el cebador directo, mientras que la homología para PCR de fusión posterior está destacada en negrita en el cebador inverso. La PCR da como resultado la introducción de homología hacia los primeros 24 pb del gen de PKSA. Los primeros 388 pb del gen de PKSA se aíslan y amplifican mediante PCR usando los cebadores PKSA F: ACGCGCAAACGATCGGCGCCTATGAACTGCGTCGTCGACGCCGCC (SEQ ID NO: 104) y PKSA-PstI R: TATCTGCAGGTTGTAGGCGCGGCGGAGGGCCTCCTCCT (SEQ ID NO: 105). El sitio de *PstiI* está destacado en cursiva y subrayado en el cebador inverso, mientras que la homología para PCR de fusión posterior está destacada en negrita en el cebador inverso. Los productos de ADN se precipitan después mediante protocolos convencionales y se emplean en una PCR de fusión posterior usando protocolos convencionales. El ADN molde para esta PCR de fusión es de 100 ng de cada uno del producto de PCR del promotor de Δ5 desaturasa y el producto de PCR de los primeros 388 pb de PKSA. Los cebadores usados son EcoRI-Δ5desatF y PKSA-PstI R. Después de la amplificación, se separa ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y el producto de ADN correspondiente a la fusión del promotor de Δ5 desaturasa y el fragmento de ADN de PKSA, basándose en el tamaño, se purifica usando el kit de extracción en gel QIAGEN minielute. El fragmento de ADN resultante se digiere con *EcoRI* y *PstI* durante una noche y se liga en el plásmido pPPKS-PZ1, previamente digerido, con *EcoRI* y *PstI* durante una noche y se purifica en gel, para producir pPPKS-PZ1-PΔ5desatPKSA. El plásmido pPPKS-PZ1-PΔ5desatPKSA contiene por lo tanto un marcador seleccionable de zeocina, que después de la integración correcta se expresa a partir del promotor de PKSA y un promotor de Δ5, que después de la integración correcta conducirá la expresión del PKSA, dentro del genoma de ONC-T18. Solamente la integración correcta puede conseguir selección basándose en la selección de zeocina. La integración correcta se confirma mediante extracción de ADN genómico y análisis de PCR usando cebadores descritos previamente.

El cambio en la expresión del complejo proteico PKS reduce la composición de DHA del aceite producido en aproximadamente 1 % a 50 % o más en comparación con controles de tipo silvestre y negativos (por ejemplo, aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %), etc.). Los promotores génicos de traustoquítrido o *Thraustochytrium* pueden unirse operativamente a genes de rutas biosintéticas de AGPI de traustoquítrido o *Thraustochytrium*. Los promotores génicos de biosíntesis de AGPI se activan por el estadio de crecimiento, las condiciones de cultivo y la disponibilidad del sustrato. En general, cada promotor y/o gen puede actuar de forma independiente, permitiendo que cada uno se retire o incluya usando técnicas de biología molecular convencionales; proporcionando de este modo cepas de traustoquítrido o Thraustochytrium modificadas genéticamente optimizadas para producción de un AGPI particular o producción de ácidos grasos totales con intervalos de componentes optimizados. La presente divulgación proporciona por lo tanto cepas modificadas genéticamente que producen composiciones oleosas que contienen menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 % y menos del 5 % de componentes de AGPI de cadena larga.

Referencias

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215(3), 403-10.

Apt, K., A. Grossman, et al. (1996). "Stable nuclear transformation of the diatom<i>Phaeodactylum tricornutum</i&gt." Molecular and General Genetics MGG 252(5): 572-579.

Berthold, P., R. Schmitt, et al. (2002). "An Engineered Streptomyces hygroscopicus aph 7" Gene Mediates Dominant Resistance against Hygromycin B in Chlamydomonas reinhardtii." Protist 153(4): 401-412.

Boynton, J., N. Gillham, et al. (1988). "Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles." Science 240(4858): 1534-1538.

Cheng, Q., A. Day, et al. (2005). "The Klebsiella pneumoniae nitrogenase Fe protein gene (nifH) functionally substitutes for the chlL gene in Chlamydomonas reinhardtii." Biochemical and Biophysical Research Communications 329(3): 966-975.

Child, S. J., M. K. Miller, et al. (1999). "Translational Control by an Upstream Open Reading Frame in the HER-2/neu Transcript." Journal of Biological Chemistry 274(34): 24335-24341.

Croft, M. T., M. Moulin, et al. (2007). "Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches." Proceedings of the National Academy of Sciences 104(52): 20770-20775.

Davis, S. J. y Vierstra, R. D. (1998). Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. Plant Mol Biol 36(4), 521-8.

Dawson, H. N., R Burlingame, et al. (1997). "Stable Transformation of <i>Chlorella</i> : Rescue of Nitrate Reductase-Deficient Mutants with the Nitrate Reductase Gene." Current Microbiology 35(6): 356-362.

Debuchy, R., S. Purton, et al. (1989). "The argininosuccinate lyase gene of Chlamydomonas reinhardtii: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus." EMBO J 8(10): 2803-2809.

Dumas et al. (1994) The three-dimensional structure of a bleomycin resistance protein. EMBO J. 242(5), 595-601.

Epshtein, V., A. S. Mironov, et al. (2003). "The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria." Proceedings of the National Academy of Sciences 100(9): 5052-5056.

Fernández, E., R Schnell, et al. (1989). "Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of Chlamydomonas reinhardtii." Proceedings of the National Academy of Sciences 86(17): 6449-6453.

Ferris, P. J. (1995). "Localization of the nic-7, ac-29 and thi-10 Genes Within the Mating-Type Locus of Chlamydomonas reinhardtii." Genetics 141(2): 543-549.

Fischer, N. F. y J. D. R. Rochaix (2001). "The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga Chlamydomonas reinhardtii." Molecular Genetics and Genomics 265(5): 888-894.

Gatignol et al. (1988) Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. FEBS Letters, 230:171-175.

Goldschmidt-Clermont, M. (1991). "Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of Chlamydomonas." Nucleic Acids Research 19(15): 4083-4089.

Hallmann, A. y M. Sumper (1994). "Reporter genes and highly regulated promoters as tools for transformation experiments in Volvox carteri." Proceedings of the National Academy of Sciences 91(24): 11562-11566.

Hasnain, S. E., E. K. Manavathu, et al. (1985). "DNA-mediated transformation of Chlamydomonas reinhardtii cells: use of aminoglycoside 3'-phosphotransferase as a selectable marker." Molecular and Cellular Biology 5(12): 3647-3650.

Higuchi, R., Krummel, B. y Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucleic Acids Res 16(15), 7351-67.

Hollingshead, S. y D. Vapnek (1985). "Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase." Plasmid 13(1): 17-30.

Hou, C. T. y J.-F. Shaw (2010). Biocatalysis and Biomolecular Engineering. Hoboken, Nueva Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

Huang, J., Jiang, X., Zhang, X., Chen, W., Tian, B., Shu, Z. y Hu, S. (2008). Expressed sequence tag analysis of marine fungus Schizochytrium producing docosahexaenoic acid. J Biotechnol 138(1-2), 9-16.

Jain, R., Raghukumar, S., Sambaiah, K., Kumon, Y. y Nakahara, T. (2007). Docosahexaenoic acid accumulation in thraustochytrids: search for the rationale. Mar Biol 151, 1657-1664.

Jepson et al. (1998) Pesticide Science, 54(4), 360-367.
Kilian, O., C. S. E. Benemann, et al. (2011). "High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga Nannochloropsis sp." Proceedings of the National Academy of Sciences.
Kindle, K. L. (1990). "High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii." Proceedings of the National Academy of Sciences 87(3): 1228-1232.
Kindle, K. L., K. L. Richards, et al. (1991). "Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in Chlamydomonas reinhardtii." Proceedings of the National Academy of Sciences 88(5): 1721-1725.
Leonard, A., Pereira, S., Sprecher, H. y Huang, Y.-S. (2004). Elongation of long-chain fatty acids. Progress in Lipid Research 43, 36-54.
Li et al. (2005) Plant Sciences, 169(3), 463-469.
Manuell, A. L., M. V. Beligni, et al. (2007). "Robust expression of a bioactive mammalian protein in Chlamydomonas chloroplast." Plant Biotechnology Journal 5(3): 402-412.
Meslet-Cladière, L. y O. Vallon (2011). "Novel Shuttle Markers for Nuclear Transformation of the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii." Eukaryotic Cell 10(12): 1670-1678.
Miyazaki, K. (2011). MEGAWHOP cloning: a method of creating random mutagenesis libraries via megaprimer PCR of whole plasmids. Methods in Enzymology. 498: 399-406.
Nelson, J. a., P. B. Savereide, et al. (1994). "The CRY1 gene in Chlamydomonas reinhardtii: structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation." Molecular and Cellular Biology 14(6): 4011-4019.
Newman, S. M., j. E. Boynton, et al. (1990). "Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in Chlamydomonas: molecular and genetic characterization of integration events." Genetics 126(4): 875-888.
Park y Morschhauser (2005) Eukaryotic cell 4(8), 1328-1342.
Poulsen, N., P. M. Chesley, et al. (2006). "MOLECULAR GENETIC MANIPULATION OF THE DIATOM THALASSIOSIRA PSEUDONANA (BACILLARIOPHYCEAE)I." Journal of Phycology 42(5): 1059-1065.
Raghukumar S. (2008) Thraustochytrid Marine Protists: Production of PUFAs and Other Emerging Technologies. Mar. Biotech. 10:631-640.
Redding, K., F. MacMillan, et al. (1998). "A systematic survey of conserved histidines in the core subunits of Photosystem I by site-directed mutagenesis reveals the likely axial ligands of P700." EMBO J 17(1): 50-60.
Roffey, R. A., J. H. Golbeck, et al. (1991). "Photosynthetic electron transport in genetically altered photosystem II reaction centers of chloroplasts." Proceedings of the National Academy of Sciences 88(20): 9122-9126.
Sakaguchi, K., T. Matsuda, et al. (2012). "Versatile Transformation System That is Applicable to both Multiple Transgene Expression and Gene Targeting for Thraustochytrids." Applied and Environmental Microbiology 78(9): 3193-3202.
Schiedlmeier, B., R. Schmitt, et al. (1994). "Nuclear transformation of Volvox carteri." Proceedings of the National Academy of Sciences 91(11): 5080-5084.
Schroda, M., D. Blöcker, et al. (2000). "The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in Chlamydomonas." The Plant Journal 21(2): 121-131.
Sizova, I., M. Fuhrmann, et al. (2001). "A Streptomyces rimosus AphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to Chlamydomonas reinhardtii." Gene 277(1-2): 221-229.
Sizova, I. A., T. V. Lapina, et al. (1996). "Stable nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii with a Streptomyces rimosus gene as the selective marker." Gene 181(1-2): 13-18.
Stevens, D., S. Purton, et al. (1996). "The bacterial phleomycin resistance gene ble as a dominant selectable marker in Chlamydomonas." Molecular and General Genetics 251(1): 23-30.
Surzycki, R., K. Greenham, et al. (2009). "Factors effecting expression of vaccines in microalgae." Biologicals 37(3): 133-138.
Zaslavskaia, L. A., J. C. Lippmeier, et al. (2000). "Transformation of the diatom Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes." Journal of Phycology 36(2): 379-386.
Zhang, S. C., Wege, C. y Jeske, H. (2001). Movement proteins (BC1 and BV1) of Abutilon mosaic geminivirus are cotransported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. Virology 290(2), 249-60.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ocean Nutrition Canada Limited <120> Modificación genética de microorganismos <130> 2009613-0003 <160> 105

<160> 105

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético
<400> 1
cgcggcttcc cgtctccaag c 21

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2
ccgagtccat ggtgcccggc 20

<210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 3
gaccatgatt acgccaagct ct 22

<210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 4
gttttcccag tcacgacgt 19

<210> 5
<211> 724
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 5

cgcggcttcc cgtctccaag cttcgtctcg gtagagattc tatcttcgcc cggcagcccg 60

ccgccgtccg gcaagtgtag aacggcagaa agcccacttg cacggaacgc ccgacaagtt 120

gacgaaagcg gcccgcaagt gcggcagccc ggctggtttt tcctcgcggc gaggccaaac 180

cgccaacgcc accaagccag acaccaggta tgtgccgcac gcgccgccgc acgcgagccc 240

cgaggatgcc ccgtacgcgc tgacgccttt ctccgccccg cccgcgagaa gacgcgctcc 300

ggcaacggcg ggagccgagc gaacgggcga ggattgatcg agtagctgca ggttgagaaa 360

aaaggaaaac cgccgagatg gacaacggct ggatggacga gaagacgcac gaggacgcga 420

ggactgacga tgatcacgtg cgcaggaaga cttgaaaaga agcaaggaag gtagaaaaaa 480

aagaagaaat caagcaagat gcgcgagatc gttcacattc agggcggcca gtgcggcaac 540

caggtcggcg ccaagttctg ggaggtcatc tccgatgagc acggtgtgga tcccaccggc 600

tcgtaccatg gcgactcgga cctccagctc gagcgcatca acgtctactt caacgaggcc 660

accggcggtc gctacgtgcc ccgcgccatc ctcatggacc tcgagccggg caccatggac 720

tcgg 724

<210> 6
<211> 490
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 6

cgcggcttcc cgtctccaag cttcgtctcg gtagagattc tatcttcgcc cggcagcccg 60

ccgccgtccg gcaagtgtag aacggcagaa agcccacttg cacggaacgc ccgacaagtt 120

gacgaaagcg gcccgcaagt gcggcagccc ggctggtttt tcctcgcggc gaggccaaac 180

cgccaacgcc accaagccag acaccaggta tgtgccgcac gcgccgccgc acgcgagccc 240

cgaggatgcc ccgtacgcgc tgacgccttt ctccgccccg cccgcgagaa gacgcgctcc 300

ggcaacggcg ggagccgagc gaacgggcga ggattgatcg agtagctgca ggttgagaaa 360

aaaggaaaac cgccgagatg gacaacggct ggatggacga gaagacgcac gaggacgcga 420

ggactgacga tgatcacgtg cgcaggaaga cttgaaaaga agcaaggaag gtagaaaaaa 480

aagaagaaat 490

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 7
ggcctgtctc ccttggccat cc 22

<210> 8
<211> 19

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 8
gggcatctgg ccgtccggc 19

<210> 9
<211> 1115
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 9

ggcctgtctc ccttggccat ccattgcgct gcggaagcat tggattgcga actgcgtcgg 60

ccagatcgct tggtttccca acatgagacg cgctctgtcg gcaagaccat ttccgccccc 120

ggctttgctc acaaccaact cgtagtagat tttgtaaaga acactgcacg tctgactgct 180

cccagcccgc acgcattgcg cttggcagcc tcggtcccaa accgtcacgg tcgctgcccg 240

gtccacggga aaaaataact tttgtccgcg agcggccgtt caaggcgcag ccgcgagcgt 300

gccaaccgtc cgtcccgcat tcttttccca atgttggatt cattcattct tgccaggcca 360

gatcatctgt gcctccctcg cgtgcccttc cttagcgtgc gcagatctct tcttcccaga 420

gcccgcgcgg cgcttcgtgg agtcggcgtc catgtcatgc gcgcgcggcg tcttgacccc 480

ctcggccccc ttggttcgcg gctgcgcaac gagccgtttc acgccattgc gaccaaccgc 540

gcgctaaaat cggattggcc gttgcacgcc gattttgcag cacctctggg ctgtgaggga 600

cgaccgtcca cttttacccg cacagagtgg actttcaccc cctcactcca ctgaagccaa 660

cttttcgccg tcttcccaac ccaaagttta tgctagccct catgccgcaa cggacgtcac 720

ccccatttcc actggcgacg tggggacctg ggcgcaataa ggcgcgagaa ggaaattacg 780

acggcacact ggggccagaa gagggcacta ggagcggcaa cccactggcg cggcacagcg 840

gtttggcgcg gggatcaaag caaaacccgg ctcatccaga gcaaacccga atcagccttc 900

agacggtcgt gcctaacaac acgccgttct accccgcctt ccttgcgtcc ctcgcctccc 960

ccgagcccaa gtcttccgcc cgctcctaac gccaaccaag caagatgcgt gaggtcatct 1020

ccatccacat cggccaggcc ggtgtccagg tcggtaacgc ctgctgggag ctctactgcc 1080

tcgagcatgg catccagccg gacggccaga tgccc 1115

<210> 10
<211> 1004
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 10

ggcctgtctc ccttggccat ccattgcgct gcggaagcat tggattgcga actgcgtcgg 60

ccagatcgct tggtttccca acatgagacg cgctctgtcg gcaagaccat ttccgccccc 120

ggctttgctc acaaccaact cgtagtagat tttgtaaaga acactgcacg tctgactgct 180

cccagcccgc acgcattgcg cttggcagcc tcggtcccaa accgtcacgg tcgctgcccg 240

gtccacggga aaaaataact tttgtccgcg agcggccgtt caaggcgcag ccgcgagcgt 300

gccaaccgtc cgtcccgcat tcttttccca atgttggatt cattcattct tgccaggcca 360

gatcatctgt gcctccctcg cgtgcccttc cttagcgtgc gcagatctct tcttcccaga 420

gcccgcgcgg cgcttcgtgg agtcggcgtc catgtcatgc gcgcgcggcg tcttgacccc 480

ctcggcccct ttggttcgcg gctgcgcaac gagccgtttc acgccattgc gaccaaccgc 540

gcgctaaaat cggattggcc gttgcacgcc gattttgcag cacctctggg ctgtgaggga 600

cgaccgtcca cttttacccg cacagagtgg actttcaccc cctcactcca ctgaagccaa 660

cttttcgccg tcttcccaac ccaaagttta tgctagccct catgccgcaa cggacgtcac 720

ccccatttcc actggcgacg tggggacctg ggcgcaataa ggcgcgagaa ggaaattacg 780

acggcacact ggggccagaa gagggcacta ggagcggcaa cccactggcg cggcacagcg 840

gtttggcgcg gggatcaaag caaaacccgg ctcatccaga gcaaacccga atcagccttc 900

agacggtcgt gcctaacaac acgccgttct accccgcctt ccttgcgtcc ctcgcctccc 960

ccgagcccaa gtcttccgcc cgctcctaac gccaaccaag caag 1004

<210> 11
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 11
ggtacgtcgg tgagggtatg gag 23

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 12
gccgctaaac cgcagactgg 20

<210> 13
<211> 727
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 13

ggtacgtcgg tgagggtatg gagagggtga gttctccgag gccccgtgag gatctcgccg 60

ccctcgagaa ggattacgag gaggtcggcg ccgagaccgc cgagggcgag gacgaggagg 120

agggcgagga gttctaaatg cattcgcatg gctccgcacc accacacacc accgcccctc 180

ttctttcctt gctcactcga tccatagcca cttacctgcc ccttccctct accactgcca 240

cgtgcggcgt atgagcgcgc ttgcacccgc aaccttctct ctagttgttc acaattacac 300

ccgctatcaa tactcacgca ttcatcttcc ccttttttc tactttacgt accggtgctc 360

acttacttac acctgcccgc cttgttcatt cattcttctc gatgacaacg gcaggctctg 420

cttgcggcgc gcgcacgcat cccttactcc gccgcgcacc gacaagcctg cgcaaaaaac 480

aaaaaaaact tatcttcgct cgcggctccg atgtcgcggc ggcgtacgag accgcgccga 540

gttccgcccg ccatgcgatc gagagtctct ctcgtaggag cgggaccgcg agcgacctcg 600

gtgcctccga tagccagctg ggcttctaga ccggctgggg gaccgcccgc ggcgtacctc 660

tgcgcttcgg tggcccttaa aaggctgatc gtggaaaagg tcgctctcca gtctgcggtt 720

tagcggc 727

<210> 14
<211> 590
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 14

atgcattcgc atggctccgc accaccacac accaccgccc ctcttctttc cttgctcact 60

cgatccatag ccacttacct gccccttccc tctaccactg ccacgtgcgg cgtatgagcg 120

cgcttgcacc cgcaaccttc tctctagttg ttcacaatta cacccgctat caatactcac 180

gcattcatct tccccttttt ttctacttta cgtaccggtg ctcacttact tacacctgcc 240

cgccttgttc attcattctt ctcgatgaca acggcaggct ctgcttgcgg cgcgcgcacg 300

catcccttac tccgccgcgc accgacaagc ctgcgcaaaa aacaaaaaaa acttatcttc 360

gctcgcggct ccgatgtcgc ggcggcgtac gagaccgcgc cgagttccgc ccgccatgcg 420

atcgagagtc tctctcgtag gagcgggacc gcgagcgacc tcggtgcctc cgatagccag 480

ctgggcttct agaccggctg ggggaccgcc cgcggcgtac ctctgcgctt cggtggccct 540

taaaaggctg atcgtggaaa aggtcgctct ccagtctgcg gtttagcggc 590

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 15
cggcaacacc accgccgtcc 20

<210> 16
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 16
cggagaccaa gccgcccatc acc 23

<210> 17
<211> 869
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 17

cggcaacacc accgccgtcc aggagatgtt caagcgcgtc tcggagcagt tcaccagcat 60

gttccgccgc aaggccttcc ttcactggta caccggcgag ggcatggacg agatggagtt 120

caccgaggcc gagtcgaaca tgaacgacct tgtctccgag taccagcagt accaggacgc 180

caccgccgag gaggaaggcg agttcgacga ggacgaggag gagtactaag cgccttcagg 240

caggctgatc cctactgtgg gggctctgac ggacggccgg tctttgtacg taaacaggcg 300

cttcttcgcg gcccgccgag gggggcggca acgagccggg tggcgtggca cggacaaggc 360

aagagccttt ccatcccgca taaagtgatg caccattttg accttgttga tcgtttttgt 420

gtgtttagag cggccccgtg cgggtaggcg aagtgcgctt ctgagcaagg aagagagagg 480

tgcagcttct tcttgatcag tgtggtaatc ttcaacggcc acgctcgctt attcgatacc 540

tgtaaagcta ccggtgcacc cgtgcaagtt gggcaccacg tagttgtact ggtgaatcca 600

aatgttagcc gctagcttgg tgccctttc gacaggaagg gcttggtgaa aagccatgct 660

gtcgatctcc cttgggtcct cgttcgtgac gctaggccag agaatagctg tgtgccgcgc 720

agtcgaagcc agcgcgcgcg cgtcggggcc gagcatagag ttagcaattc agttgtttcg 780

ggctcttgat gaggccgcca gagagcgaag aaggatgaac ttaccagatc cgcgctccgg 840

tgtattggtg atgggcggct tggtctccg 869

<210> 18
<211> 640
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 18

gcgccttcag gcaggctgat ccctactgtg ggggctctga cggacggccg gtctttgtac 60

gtaaacaggc gcttcttcgc ggcccgccga ggggggcggc aacgagccgg gtggcgtggc 120

acggacaagg caagagcctt tccatcccgc ataaagtgat gcaccatttt gaccttgttg 180

atcgtttttg tgtgtttaga gcggccccgt gcgggtaggc gaagtgcgct tctgagcaag 240

gaagagagag gtgcagcttc ttcttgatca gtgtggtaat cttcaacggc cacgctcgct 300

tattcgatac ctgtaaagct accggtgcac ccgtgcaagt tgggcaccac gtagttgtac 360

tggtgaatcc aaatgttagc cgctagcttg gtgccctttt cgacaggaag ggcttggtga 420

aaagccatgc tgtcgatctc ccttgggtcc tcgttcgtga cgctaggcca gagaatagct 480

gtgtgccgcg cagtcgaagc cagcgcgcgc gcgtcggggc cgagcataga gttagcaatt 540

cagttgtttc gggctcttga tgaggccgcc agagagcgaa gaaggatgaa cttaccagat 600

ccgcgctccg gtgtattggt gatgggcggc ttggtctccg 640

<210> 19
<211> 950
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 19

caacgccatc ctcgaccaca gcaaggacac gcaccgcttc ggctacggta tccagatcgg 60

ataaatatta taccgcccct tccgctctcc ttttcttttt tgctcgtctg gatgccagac 120

taaggagtcc ttgctcctct gcgcaaggct gctcacccag agtctctgcc tgtggttgag 180

cgcccaccaa caggttaaag cgaaccaggg ccgccccgtt gccgctgcga tgtcgctgct 240

cttgcgagac tcttcattag atcggcggaa tgctgccgca ggactgaccg cctcttcgtt 300

cgttcgtttg tacgcgagcg gtgcgagcgg cttcgttgtt ggcagatagg cagaacgcga 360

gcagttcacg tttctttgca gctttatcta tccgcaaatt cgcctcagcg tctgcaactt 420

tccggtgagg acagcagagc tgcagttctg atcgtctcca tcttttggag cgcatgtcga 480

cgtcccccag ctcgtctccg tctcccctgg agtggacggt ctctttcaca gtgcctgggt 540

gcggccattt ccctaaatag gttgcgcagc cgagtttcct taaacgtgcc tggtccgcgt 600

gcttccgcct tactacctga acgcgcagta gctcggcgcg tgccgcttta aggcgggcgg 660

ggtggctgct cttgcttacg ccaggcgcgt acgtcagcag cgccggcgcc atgctgccca 720

tagcggccac agaatcgtag gcgctgcaat cgggaactgc caagatggca atcgagacga 780

tcccccaaaa gtggacaagc accgtcaaag taacctggct gatgatggcc gggaccgcct 840

ggtgacggcc agccggcaaa accggaatct atcacgagga ctgggcagat caagggccta 900

gtgctagcga gcagctcgag cgaaagaagc gcgccagcag cgcaggcacg 950

<210> 20
<211> 33

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 20
tatatatcta gacaacgcca tcctcgacca cag 33

<210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 21
tatataccat ggcgtgcctg cgctgctggc 30

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 22
gatgctcgtc agggggggcgg 20

<210> 23
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 23
cccggaccac accggcg 17

<210> 24
<211> 1216
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 24

gtgaccaaaa gccgtgaacg ggcgtggccg aggctacagc acgcagcggt gttctctgcg 60

tattatattt ttcgcaaggt ttcccgacgg ctggtccgcg tgcccgcgcc gcgcgcacgc 120

tctcactaga cgttggtcat gagtgtttcg agtcaagacc tcggagaaga attggggcgc 180

acaccttccg tgcgcgcacc cctgccactg tataccgtgc gtaccccacc agacagaagg 240

tcaccacccg tgctctcttc gtcagctata ccgtgtgctg tagatcgtcg caggattcgg 300

gttgtgcaca ccgcgctccg tgggctgggg gccctggcgc ggcggcttcc taggatatag 360

tctataaaac ccagcgaatt ttacacacag agcggttcat ttgcgctggg tccggtgcgc 420

aatttcgggg cacagcctgc acgtttacat cgacgtaaca gccacagtca tcgtcgccag 480

cctcttcggc cttcccaccg acccggctgc tgcccgcctt cctggctggc tgatgaacta 540

tcgcggcctg cctggcacgt acgtgcccct cccatttctc cccggtcctc cagaaatgcg 600

cctccggccc caatgaaagc aggcgttggc catgcggcgc ccgacatctg ggtcctcgcg 660

ccttctttga tgacatcgtc ctcatcgtcg tcggcgacct ggtcttcgtg atcgcttgtt 720

gatcacgcgc ttggcatctt gcgaggagaa ccgtctgcac tcttttggcg cggccgaggt 780

gccttccggg gtgcaggcca gtcgccagac cagacctgct gcaaagcccg aacatcgccg 840

tcgaggtaga ccattaggta cgtacgtacg cacgtcttca tgatcgacgc caacgtcatg 900

cggtcgatgc cccgccacgc gatggcgcta gcagccagga gcgcgtgtgt acgggcgcgg 960

agcttcgctc gcaagcaaag ctgggcgctt gggccgggga tcgggccact acttggacga 1020

acgaacgaaa cgcatgacgt catccttggc agtaaatctt gccggagcgc gcaaaaccca 1080

ggctggacgc gctgggtgcg attgagaacc gcaagctttg gagcctttca ctgagcaggg 1140

ggaactgacg ctggagcgcg cgaccgtagg cgaaggaatt tgatcgaagt aggcaggact 1200

gcccgcaggg gtcagg 1216

<210> 25
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 25
tatatactcg aggtgaccaa aagccgtgaa cgg 33

<210> 26
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 26
tatataccat ggcctgaccc ctgcgggcag 30

<210> 27
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 27
caacctggtt gatcctgcca gta 23

<210> 28
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 28
caacctggtt gatcctgcca gtagccc 27

<210> 29
<211> 1764
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 29

tcactacgga aaccttgtta cgacttcacc ttcctctaaa caataagatt cacccgagtt 60

ctgacccccc tcgcgaacaa acgctcaaaa ggtcatccca tggtttcatc ggaccgttca 120

atcggtaggt gcgacgggcg gtgtgtacaa agggcaggga cgtattcaat gcaagctgat 180

gacttgcgtt tactaggaat tcctcgttgg agattaataa ttgcaaaaat ctagccccag 240

cacgatgggc gttgaaagga tttgccatgc cttccggcaa agcacctcgc tgcgaacaac 300

gatgaccacc cgttgaaccc atcagtgtag cgcgcgtgcg gcccagaaca tctaagggca 360

tcacagacct gttattgcct cgaacttcct gctcgtatac cgaacatgtc cctctaagaa 420

gcgtacgcaa gtatgtcgcc atacccaccg ctatttagta ggccgaggtc tcgttcgtta 480

acggaattaa ccagacaaat cactccacca actaagaacg gccatgcacc accacccata 540

gaatcaagaa agagctctca atctgtcaat cctacctatg tctggacctg gtaagtttc 600

ccgtgttgag tcaaattaag ccgcaggctc cactcctggt ggtgcccttc cgtcaattcc 660

tttaagtttc agccttgcga ccatactccc cccggaaccc aaagactttg atttctcatg 720

tgctgctgcg agggtccaat acaaacaccc cgcaatcgca agtcggcatc gtttacggtc 780

tagactacga tggtatctaa tcatcttcga tccccagact ttcgttcttg attaatgaaa 840

acatgcttgg taaatgcctt cgctgtagtt cgtctttcgg aaatccaaga atttcacctc 900

tagctcctaa atacgaatac ccccaactgt tcctattcat cattactcag atgtgcaaac 960

caacaaaata gcacccgagc cctatctgat catcccataa taaacatcca ggtcatacga 1020

cctgcttgga acactctgct ttaattacag tgaacgacgc cactaaaaaa agaggcgagg 1080

atggcagagg agccgctcgg caaacagagc gcagtcgcgc aaagaccggg gctcccgccc 1140

cagaaattca actacgagct ttttaactgc aacaacttta gcatacgctt ctggagctgg 1200

aattaccgcg gctgctggca ccagacttgc cctccagttg atcctcgatg agggttttac 1260

attgctctca ttccaatagc aagacgcgaa gcgccccgca ttgatatttc tcgtcactac 1320

ctcgtggagt ccacattggg taatttacgc gcctgctgcc ttccttggat gtggtagccg 1380

tctctcaggc tccctctccg gagtcgagcc ctaactcccc gtcacccgtt atagtcaccg 1440

tagtccaata cactaccgtc gacaactgat ggggcagaaa ctcaaacgat tcatcgctcc 1500

aaacaagcga tctgctcaat tatcatgact caccatctta cttggcttca actctaataa 1560

gtgcggccct cccgaacagt cgggccctct cagcatgtat taattccaga attactgcag 1620

gtatccatat aaagaaaata ccgaagaaat cataactgat ataatgagcc gttcgcagtc 1680

tcacagtata atcgcttata cttacacatg catggcttaa tctttgagac gagcgtaggg 1740

ctactggcag gatcaaccag gttg 1764

<210> 30

<211> 4235
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 30

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600

acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020

agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200

cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260

gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380

ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500

ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560

cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620

agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680

gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740

atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800

gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860

gctggccttt tgctcacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcgcggccgc 1920

gatatcgcta gctcgaggtg accaaaagcc gtgaacgggc gtggccgagg ctacagcacg 1980

cagcggtgtt ctctgcgtat tatatttttc gcaaggtttc ccgacggctg gtccgcgtgc 2040

ccgcgccgcg cgcacgctct cactagacgt tggtcatgag tgtttcgagt caagacctcg 2100

gagaagaatt ggggcgcaca ccttccgtgc gcgcacccct gccactgtat accgtgcgta 2160

ccccaccaga cagaaggtca ccacccgtgc tctcttcgtc agctataccg tgtgctgtag 2220

atcgtcgcag gattcgggtt gtgcacaccg cgctccgtgg gctgggggcc ctggcgcggc 2280

ggcttcctag gatatagtct ataaaaccca gcgaatttta cacacagagc ggttcatttg 2340

cgctgggtcc ggtgcgcaat ttcggggcac agcctgcacg tttacatcga cgtaacagcc 2400

acagtcatcg tcgccagcct cttcggcctt cccaccgacc cggctgctgc ccgccttcct 2460

ggctggctga tgaactatcg cggcctgcct ggcacgtacg tgcccctccc atttctcccc 2520

ggtcctccag aaatgcgcct ccggccccaa tgaaagcagg cgttggccat gcggcgcccg 2580

acatctgggt cctcgcgcct tctttgatga catcgtcctc atcgtcgtcg gcgacctggt 2640

cttcgtgatc gcttgttgat cacgcgcttg gcatcttgcg aggagaaccg tctgcactct 2700

tttggcgcgg ccgaggtgcc ttccggggtg caggccagtc gccagaccag acctgctgca 2760

aagcccgaac atcgccgtcg aggtagacca ttaggtacgt acgtacgcac gtcttcatga 2820

tcgacgccaa cgtcatgcgg tcgatgcccc gccacgcgat ggcgctagca gccaggagcg 2880

cgtgtgtacg ggcgcggagc ttcgctcgca agcaaagctg ggcgcttggg ccggggatcg 2940

ggccactact tggacgaacg aacgaaacgc atgacgtcat ccttggcagt aaatcttgcc 3000

ggagcgcgca aaacccaggc tggacgcgct gggtgcgatt gagaaccgca agctttggag 3060

cctttcactg agcaggggga actgacgctg gagcgcgcga ccgtaggcga aggaatttga 3120

tcgaagtagg caggactgcc cgcaggggtc aggccatggc caagttgacc agtgccgttc 3180

cggtgctcac cgcgcgcgac gtcgccggag cggtcgagtt ctggaccgac cggctcgggt 3240

tctcccggga cttcgtggag gacgacttcg ccggtgtggt ccgggacgac gtgaccctgt 3300

tcatcagcgc ggtccaggac caggtggtgc cggacaacac cctggcctgg gtgtgggtgc 3360

gcggcctgga cgagctgtac gccgagtggt cggaggtcgt gtccacgaac ttccgggacg 3420

cctccgggcc ggccatgacc gagatcggcg agcagccgtg ggggcgggag ttcgccctgc 3480

gcgacccggc cggcaactgc gtgcacttcg tggccgagga gcaggactga cacgtgctac 3540

gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg 3600

acgccggctg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gcccacccca 3660

acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa 3720

ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt 3780

atcatgtctg aattcccggg gatcctctag agtcgacctg caggcatgca agcttggcac 3840

tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc 3900

ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc 3960

cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcct gatgcggtat tttctcctta 4020

cgcatctgtg cggtatttca caccgcatat atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga 4080

tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc 4140

ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg 4200

tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcga 4235

<210> 31
<211> 3964
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 31

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt ataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcccct attccctttt 240

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600

acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020

agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200

cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct 1260

gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380

ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500

ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560

cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620

agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680

gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740

atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800

gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860

gctggccttt tgctcacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcgcggccgc 1920

gatatcgcta gacaacgcca tcctcgacca cagcaaggac acgcaccgct tcggctacgg 1980

tatccagatc ggataaatat tataccgccc cttccgctct ccttttcttt tttgctcgtc 2040

tggatgccag actaaggagt ccttgctcct ctgcgcaagg ctgctcaccc agagtctctg 2100

cctgtggttg agcgcccacc aacaggttaa agcgaaccag ggccgccccg ttgccgctgc 2160

gatgtcgctg ctcttgcgag actcttcatt agatcggcgg aatgctgccg caggactgac 2220

cgcctcttcg ttcgttcgtt tgtacgcgag cggtgcgagc ggcttcgttg ttggcagata 2280

ggcagaacgc gagcagttca cgtttctttg cagctttatc tatccgcaaa ttcgcctcag 2340

cgtctgcaac tttccggtga ggacagcaga gctgcagttc tgatcgtctc catcttttgg 2400

agcgcatgtc gacgtccccc agctcgtctc cgtctcccct ggagtggacg gtctctttca 2460

cagtgcctgg gtgcggccat ttccctaaat aggttgcgca gccgagtttc cttaaacgtg 2520

cctggtccgc gtgcttccgc cttactacct gaacgcgcag tagctcggcg cgtgccgctt 2580

taaggcgggc ggggtggctg ctcttgctta cgccaggcgc gtacgtcagc agcgccggcg 2640

ccatgctgcc catagcggcc acagaatcgt aggcgctgca atcgggaact gccaagatgg 2700

caatcgagac gatcccccaa aagtggacaa gcaccgtcaa agtaacctgg ctgatgatgg 2760

ccgggaccgc ctggtgacgg ccagccggca aaaccggaat ctatcacgag gactgggcag 2820

atcaagggcc tagtgctagc gagcagctcg agcgaaagaa gcgcgccagc agcgcaggca 2880

cgccatggcc aagttgacca gtgccgttcc ggtgctcacc gcgcgcgacg tcgccggagc 2940

ggtcgagttc tggaccgacc ggctcgggtt ctcccgggac ttcgtggagg acgacttcgc 3000

cggtgtggtc cgggacgacg tgaccctgtt catcagcgcg gtccaggacc aggtggtgcc 3060

ggacaacacc ctggcctggg tgtgggtgcg cggcctggac gagctgtacg ccgagtggtc 3120

ggaggtcgtg tccacgaact tccgggacgc ctccgggccg gccatgaccg agatcggcga 3180

gcagccgtgg gggcgggagt tcgccctgcg cgacccggcc ggcaactgcg tgcacttcgt 3240

ggccgaggag caggactgac acgtgctacg agatttcgat tccaccgccg ccttctatga 3300

aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg atgatcctcc agcgcgggga 3360

tctcatgctg gagttcttcg cccaccccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa 3420

ataaagcaat agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc attctagttg 3480

tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctga attcccgggg atcctctaga 3540

gtcgacctgc aggcatgcaa gcttggcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga 3600

aaaccctggc gttacccaac ttaatcgcct tgcagcacat ccccctttcg ccagctggcg 3660

taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga 3720

atggcgcctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatata 3780

tggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg 3840

ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacaa 3900

gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc 3960

gcga 3964

<210> 32

<211> 4319
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 32

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600

acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020

agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200

cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260

gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380

ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500

ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560

cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620

agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680

gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740

atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800

ggggggcgag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860

gctggccttt tgctcacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcgcggccgc 1920

gatatcgcta gacaacgcca tcctcgacca cagcaaggac acgcaccgct tcggctacgg 1980

tatccagatc ggataaatat tataccgccc cttccgctct ccttttcttt tttgctcgtc 2040

tggatgccag actaaggagt ccttgctcct ctgcgcaagg ctgctcaccc agagtctctg 2100

cctgtggttg agcgcccacc aacaggttaa agcgaaccag ggccgccccg ttgccgctgc 2160

gatgtcgctg ctcttgcgag actcttcatt agatcggcgg aatgctgccg caggactgac 2220

cgcctcttcg ttcgttcgtt tgtacgcgag cggtgcgagc ggcttcgttg ttggcagata 2280

ggcagaacgc gagcagttca cgtttctttg cagctttatc tatccgcaaa ttcgcctcag 2340

cgtctgcaac tttccggtga ggacagcaga gctgcagttc tgatcgtctc catcttttgg 2400

agcgcatgtc gacgtccccc agctcgtctc cgtctcccct ggagtggacg gtctctttca 2460

cagtgcctgg gtgcggccat ttccctaaat aggttgcgca gccgagtttc cttaaacgtg 2520

cctggtccgc gtgcttccgc cttactacct gaacgcgcag tagctcggcg cgtgccgctt 2580

taaggcgggc ggggtggctg ctcttgctta cgccaggcgc gtacgtcagc agcgccggcg 2640

ccatgctgcc catagcggcc acagaatcgt aggcgctgca atcgggaact gccaagatgg 2700

caatcgagac gatcccccaa aagtggacaa gcaccgtcaa agtaacctgg ctgatgatgg 2760

ccgggaccgc ctggtgacgg ccagccggca aaaccggaat ctatcacgag gactgggcag 2820

atcaagggcc tagtgctagc gagcagctcg agcgaaagaa gcgcgccagc agcgcaggca 2880

cgatgagtaa aggagaagaa cttttcactg gagttgtccc aattcttgtt gaattagatg 2940

gtgatgttaa tgggcacaaa ttttctgtca gtggagaggg tgaaggtgat gcaacatacg 3000

gaaaacttac ccttaaattt atttgcacta ctggaaaact acctgttcca tggccaacac 3060

ttgtcactac tttcacttat ggtgttcaat gcttttcaag atacccagat catatgaagc 3120

ggcacgactt cttcaagagc gccatgcctg agggatacgt gcaggagagg accatctctt 3180

tcaaggacga cgggaactac aagacacgtg ctgaagtcaa gtttgaggga gacaccctcg 3240

tcaacaggat cgagcttaag ggaatcgatt tcaaggagga cggaaacatc ctcggccaca 3300

agttggaata caactacaac tcccacaacg tatacatcac ggcagacaaa caaaagaatg 3360

gaatcaaagc taacttcaaa attagacaca acattgaaga tggaagcgtt caactagcag 3420

accattatca acaaaatact ccaattggcg atggccctgt ccttttacca gacaaccatt 3480

acctgtccac acaatctgcc ctttcgaaag atcccaacga aaagagagac cacatggtcc 3540

ttcttgagtt tgtaacagct gctgggatta cacatggcat ggatgaacta tacaaataag 3600

gtacctctac gcgtcacgtg ctacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt 3660

tgggcttcgg aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca 3720

tgctggagtt cttcgcccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa 3780

gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catttttttc actgcattct agttgtggtt 3840

tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctgaattcc cggggatcct ctagagtcga 3900

cctgcaggca tgcaagcttg gcactggccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc 3960

ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag cacatccccc tttcgccagc tggcgtaata 4020

gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc 4080

gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc atatatggtg 4140

cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac 4200

acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt 4260

gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcga 4319

<210> 33
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 33

gagcagctcg agcgaaagaa gcgcgccagc agcgcaggca cgatgagtaa aggagaagaa 60

cttttcactg gagttgtc 78

<210> 34
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 34
gtgacgcgta gaggtacctt atttgtatag ttcatccatg ccatgtgtaa tccc 54

<210> 35
<211> 7032
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp. ONC-T18

<400> 35

agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa 60

gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta attgcgttgc 120

gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc 180

aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact 240

cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac 300

ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 360

aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgcccccctg 420

acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa 480

gataccaggc gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc 540

ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac 600

gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 660

cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg 720

taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt 780

atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 840

cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 900

cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga 960

ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg 1020

ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gaattaattc ttagaaaaac 1080

tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt 1140

tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca 1200

agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 1260

ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt 1320

gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc 1380

tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 1440

agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 1500

cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaat 1560

acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc atcaggagta 1620

cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 1680

atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 1740

gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac attatcgcga 1800

gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg cctagagcaa 1860

gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgtat tactgtttat gtaagcagac 1920

agttttattg ttcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 1980

atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gttaccaatg 2040

cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg 2100

actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgctgc 2160

aatgataccg cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 2220

cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 2280

ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc 2340

cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg 2400

ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 2460

cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 2520

ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 2580

tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 2640

ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 2700

aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat 2760

gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 2820

gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg 2880

ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 2940

catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 3000

atttccccga aaagtgccac ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt 3060

ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccg ctcctttcgc 3120

tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg 3180

gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 3240

gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt 3300

ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat 3360

ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa 3420

tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc 3480

cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta 3540

ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 3600

ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tgtgcggccg cgagctcggg 3660

cccccacacg tgtggtctag agctagccta ggctcgagaa gcttggcctg tctcccttgg 3720

ccatccattg cgctgcggaa gcattggatt gcgaactgcg tcggccagat cgcttggttt 3780

cccaacatga gacgcgctct gtcggcaaga ccatttccgc ccccggcttt gctcacaacc 3840

aactcgtagt agattttgta aagaacactg cacgtctgac tgctcccagc ccgcacgcat 3900

tgcgcttggc agcctcggtc ccaaaccgtc acggtcgctg cccggtccac gggaaaaaat 3960

aacttttgtc cgcgagcggc cgttcaaggc gcagccgcga gcgtgccaac cgtccgtccc 4020

gcattctttt cccaatgttg gattcattca ttcttgccag gccagatcat ctgtgcctcc 4080

ctcgcgtgcc cttccttagc gtgcgcagat ctcttcttcc cagagcccgc gcggcgcttc 4140

gtggagtcgg cgtccatgtc atgcgcgcgc ggcgtcttga ccccctcggc cctttggttt 4200

cgcggctgcg caacgagccg tttcacgcca ttgcgaccaa ccgcgcgcta aaatcggatt 4260

ggccgttgca cgccgatttt gcagcacctc tgggctgtga gggacgaccg tccactttta 4320

cccgcacaga gtggactttc acccccctcac tccactgaag ccaacttttc gccgtcttcc 4380

caacccaaag tttatgctag ccctcatgcc gcaacggacg tcacccccat ttccactggc 4440

gacgtgggga cctgggcgca ataaggcgcg agaaggaaat tacgacggca cactggggcc 4500

agaagagggc actaggagcg gcaacccact ggcgcggcac agcggtttgg cgcggggatc 4560

aaagcaaaac ccggctcatc cagagcaaac ccgaatcagc cttcagacgg tcgtgcctaa 4620

caacacgccg ttctaccccg ccttccttgc gtccctcgcc tcccccgagc ccaagtcttc 4680

cgcccgctcc taacgccaac caagcaagat ggccaagttg accagtgccg ttccggtgct 4740

caccgcgcgc gacgtcgccg gagcggtcga gttctggacc gaccggctcg ggttctcccg 4800

ggacttcgtg gaggacgact tcgccggtgt ggtccgggac gacgtgaccc tgttcatcag 4860

cgcggtccag gaccaggtgg tgccggacaa caccctggcc tgggtgtggg tgcgcggcct 4920

ggacgagctg tacgccgagt ggtcggaggt cgtgtccacg aacttccggg acgcctccgg 4980

gccggccatg accgagatcg gcgagcagcc gtgggggcgg gagttcgccc tgcgcgaccc 5040

ggccggcaac tgcgtgcact tcgtggccga ggagcaggac taacacgtgc tacgagattt 5100

cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg 5160

ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttcgcccacc ccaacttgtt 5220

tattgcagct tataatggtt acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc 5280

atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt 5340

ctgagggccc gactgttcgg gagggccgca cttattagag ttgaagccaa gtaagatggt 5400

gagtcatgat aattgagcag atcgcttgtt tggagcgatg aatcgtttga gtttctgccc 5460

catcagttgt cgacggtagt gtattggact acggtgacta taacgggtga cggggagtta 5520

gggctcgact ccggagaggg agcctgagag acggctacca catccaagga aggcagcagg 5580

cgcgtaaatt acccaatgtg gactccacga ggtagtgacg agaaatatca atgcggggcg 5640

cttcgcgtct tgctattgga atgagagcaa tgtaaaaccc tcatcgagga tcaactggag 5700

ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca gaagcgtatg ctaaagttgt 5760

tgcagttaaa aagctcgtag ttgaatttct ggggcgggag ccccggtctt tgcgcgactg 5820

cgctctgttt gccgagcggc tcctctgcca tcctcgcctc tttttttagt ggcgtcgttc 5880

actgtaatta aagcagagtg ttccaagcag gtcgtatgac ctggatgttt attatgggat 5940

gatcagatag ggctcgggtg ctattttgtt ggtttgcaca tctgagtaat gatgaatagg 6000

aacagttggg ggtattcgta tttaggagct agaggtgaaa ttcttggatt tccgaaagac 6060

gaactacagc gaaggcattt accaagcatg ttttcattaa tcaagaacga aagtctgggg 6120

atcgaagatg attagatacc atcgtagtct agaccgtaaa cgatgccgac ttgcgattgc 6180

ggggtgtttg tattggaccc tcgcagcagc acatgagaaa tcaaagtctt tgggttccgg 6240

ggggagtatg gtcgcaaggc tgaaacttaa aggaattgac ggaagggcac caccaggagt 6300

ggagcctgcg gcttaatttg actcaacacg ggaaaactta ccaggtccag acataggtag 6360

gattgacaga ttgagagctc tttcttgatt ctatgggtgg tggtgcatgg ccgttcttag 6420

ttggtggagt gatttgtctg gttaattccg ttaacgaacg agacctcggc ctactaaata 6480

gcggtgggta tggcgacata cttgcgtacg cttcttagag ggacatgttc ggtatacgag 6540

caggaagttc gaggcaataa caggtctgtg atgcccttag atgttctggg ccgcacgcgc 6600

gctacactga tgggttcaac gggtggtcat cgttgttcgc agcgaggtgc tttgccggaa 6660

ggcatggcaa atcctttcaa cgcccatcgt gctggggcta gatttttgca attattaatc 6720

tccaacgagg aattcctagt aaacgcaagt catcagcttg cattgaatac gtccctgccc 6780

tttgtacaca ccgcccgtcg cacctaccga ttgaacggtc cgatgaaacc atgggatgac 6840

cttttgagcg tttgttcgcg agggggggtca gaactcgggt gaatcttatt gtttagagga 6900

aggtgaagtc gtaacaaggt ttccgtagtg aatcacgaat tctggatccg atacgtaacg 6960

cgtctgcagc atgcgtggta ccgagctttc cctatagtga gtcgtattag agcttggcgt 7020

aatcatggtc at 7032

<210> 36
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 36
ggtctagagc tagcctaggc tcgagaagct tggcctgtct cccttggcca tcc 53

<210> 37
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 37
ggaacggcac tggtcaactt ggccatcttg cttggttggc gttaggagcg g 51

<210> 38
<211> 51
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 38
ccgctcctaa cgccaaccaa gcaagatggc caagttgacc agtgccgttc c 51

<210> 39
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 39
ggccctcccg aacagtcggg ccctcagaca tgataagata cattgatgag tttgg 55

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 40
ggccaagttg accagtgccg 20

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 41
cagtcctgct cctcggccac 20

<210> 42
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 42
catgaccgag atcggcgag 19

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 43
ccgtcgacaa ctgatggggc 20

<210> 44
<211> 7360

<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp. ONC-T18

<400> 44

agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa 60

gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta attgcgttgc 120

gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc 180

aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact 240

cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac 300

ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 360

aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgcccccctg 420

acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa 480

gataccaggc gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc 540

ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac 600

gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 660

ccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg 720

taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt 780

atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 840

cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 900

cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga 960

ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg 1020

ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gaattaattc ttagaaaaac 1080

tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt 1140

tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca 1200

agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 1260

ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt 1320

gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc 1380

tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 1440

agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 1500

cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaat 1560

acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc atcaggagta 1620

cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 1680

atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 1740

gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac attatcgcga 1800

gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg cctagagcaa 1860

gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgtat tactgtttat gtaagcagac 1920

agttttattg ttcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 1980

atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gttaccaatg 2040

cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg 2100

actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgctgc 2160

aatgataccg cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 2220

cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 2280

ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc 2340

cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg 2400

ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 2460

cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 2520

ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 2580

tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 2640

ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 2700

aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat 2760

gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 2820

gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg 2880

ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 2940

catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 3000

atttccccga aaagtgccac ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt 3060

ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccg ctcctttcgc 3120

tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg 3180

gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 3240

gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt 3300

ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat 3360

ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa 3420

tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc 3480

cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta 3540

ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 3600

ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tgtgcggccg cgagctcggg 3660

cccccacacg tgtggtctag agctagccta ggctcgagaa gcttggcctg tctcccttgg 3720

ccatccattg cgctgcggaa gcattggatt gcgaactgcg tcggccagat cgcttggttt 3780

cccaacatga gacgcgctct gtcggcaaga ccatttccgc ccccggcttt gctcacaacc 3840

aactcgtagt agattttgta aagaacactg cacgtctgac tgctcccagc ccgcacgcat 3900

tgcgcttggc agcctcggtc ccaaaccgtc acggtcgctg cccggtccac gggaaaaaat 3960

aacttttgtc cgcgagcggc cgttcaaggc gcagccgcga gcgtgccaac cgtccgtccc 4020

gcattctttt cccaatgttg gattcattca ttcttgccag gccagatcat ctgtgcctcc 4080

ctcgcgtgcc cttccttagc gtgcgcagat ctcttcttcc cagagcccgc gcggcgcttc 4140

gtggagtcgg cgtccatgtc atgcgcgcgc ggcgtcttga ccccctcggc ccctttggtt 4200

cgcggctgcg caacgagccg tttcacgcca ttgcgaccaa ccgcgcgcta aaatcggatt 4260

ggccgttgca cgccgatttt gcagcacctc tgggctgtga gggacgaccg tccactttta 4320

cccgcacaga gtggactttc acccccctcac tccactgaag ccaacttttc gccgtcttcc 4380

caacccaaag tttatgctag ccctcatgcc gcaacggacg tcacccccat ttccactggc 4440

gacgtgggga cctgggcgca ataaggcgcg agaaggaaat tacgacggca cactggggcc 4500

agaagagggc actaggagcg gcaacccact ggcgcggcac agcggtttgg cgcggggatc 4560

aaagcaaaac ccggctcatc cagagcaaac ccgaatcagc cttcagacgg tcgtgcctaa 4620

caacacgccg ttctaccccg ccttccttgc gtccctcgcc tcccccgagc ccaagtcttc 4680

cgcccgctcc taacgccaac caagcaagat ggccaagttg accagtgccg ttccggtgct 4740

caccgcgcgc gacgtcgccg gagcggtcga gttctggacc gaccggctcg ggttctcccg 4800

ggacttcgtg gaggacgact tcgccggtgt ggtccgggac gacgtgaccc tgttcatcag 4860

cgcggtccag gaccaggtgg tgccggacaa caccctggcc tgggtgtggg tgcgcggcct 4920

ggacgagctg tacgccgagt ggtcggaggt cgtgtccacg aacttccggg acgcctccgg 4980

gccggccatg accgagatcg gcgagcagcc gtgggggcgg gagttcgccc tgcgcgaccc 5040

ggccggcaac tgcgtgcact tcgtggccga ggagcaggac taaatgcatt cgcatggctc 5100

cgcaccacca cacaccaccg cccctcttct ttccttgctc actcgatcca tagccactta 5160

cctgcccctt ccctctacca ctgccacgtg cggcgtatga gcgcgcttgc acccgcaacc 5220

ttctctctag ttgttcacaa ttacacccgc tatcaatact cacgcattca tcttcccctt 5280

tttttctact ttacgtaccg gtgctcactt acttacacct gcccgccttg ttcattcatt 5340

cttctcgatg acaacggcag gctctgcttg cggcgcgcgc acgcatccct tactccgccg 5400

cgcaccgaca agcctgcgca aaaaacaaaa aaaacttatc ttcgctcgcg gctccgatgt 5460

cgcggcggcg tgcgagaccg cgccgagttc cgcccgccat gcgatcgaga gtctctctcg 5520

taggagcggg accgcgagcg acttcggtgc ctccgatagc cagctgggct tctagaccgg 5580

ctgggggacc gcccgcggcg tacctctgcg cttcggtggc ccttaaaagg ctgatcgtgg 5640

aaaaggtcgc tctccagtct gcggtttagc ggagggcccg actgttcggg agggccgcac 5700

ttattagagt tgaagccaag taagatggtg agtcatgata attgagcaga tcgcttgttt 5760

ggagcgatga atcgtttgag tttctgcccc atcagttgtc gacggtagtg tattggacta 5820

cggtgactat aacgggtgac ggggagttag ggctcgactc cggagaggga gcctgagaga 5880

cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc gcgtaaatta cccaatgtgg actccacgag 5940

gtagtgacga gaaatatcaa tgcggggcgc ttcgcgtctt gctattggaa tgagagcaat 6000

gtaaaaccct catcgaggat caactggagg gcaagtctgg tgccagcagc cgcggtaatt 6060

ccagctccag aagcgtatgc taaagttgtt gcagttaaaa agctcgtagt tgaatttctg 6120

gggcgggagc cccggtcttt gcgcgactgc gctctgtttg ccgagcggct cctctgccat 6180

cctcgcctct ttttttagtg gcgtcgttca ctgtaattaa agcagagtgt tccaagcagg 6240

tcgtatgacc tggatgttta ttatgggatg atcagatagg gctcgggtgc tattttgttg 6300

gtttgcacat ctgagtaatg atgaatagga acagttgggg gtattcgtat ttaggagcta 6360

gaggtgaaat tcttggattt ccgaaagacg aactacagcg aaggcattta ccaagcatgt 6420

tttcattaat caagaacgaa agtctgggga tcgaagatga ttagatacca tcgtagtcta 6480

gaccgtaaac gatgccgact tgcgattgcg gggtgtttgt attggaccct cgcagcagca 6540

catgagaaat caaagtcttt gggttccggg gggagtatgg tcgcaaggct gaaacttaaa 6600

ggaattgacg gaagggcacc accaggagtg gagcctgcgg cttaatttga ctcaacacgg 6660

gaaaacttac caggtccaga cataggtagg attgacagat tgagagctct ttcttgattc 6720

tatgggtggt ggtgcatggc cgttcttagt tggtggagtg atttgtctgg ttaattccgt 6780

taacgaacga gacctcggcc tactaaatag cggtgggtat ggcgacatac ttgcgtacgc 6840

ttcttagagg gacatgttcg gtatacgagc aggaagttcg aggcaataac aggtctgtga 6900

tgcccttaga tgttctgggc cgcacgcgcg ctacactgat gggttcaacg ggtggtcatc 6960

gttgttcgca gcgaggtgct ttgccggaag gcatggcaaa tcctttcaac gcccatcgtg 7020

ctggggctag atttttgcaa ttattaatct ccaacgagga attcctagta aacgcaagtc 7080

atcagcttgc attgaatacg tccctgccct ttgtacacac cgcccgtcgc acctaccgat 7140

tgaacggtcc gatgaaacca tgggatgacc ttttgagcgt ttgttcgcga ggggggtcag 7200

aactcgggtg aatcttattg tttagaggaa ggtgaagtcg taacaaggtt tccgtagtga 7260

atcacgaatt ctggatccga tacgtaacgc gtctgcagca tgcgtggtac cgagctttcc 7320

ctatagtgag tcgtattaga gcttggcgta atcatggtca 7360

<210> 45
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 45
ggtgcggagc catgcgaatg catttagtcc tgctcctcgg ccacgaag 48

<210> 46
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 46
cttcgtggcc gaggagcagg actaaatgca ttcgcatggc tccgcacc 48

<210> 47
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 47
ggccctcccg aacagtcggg ccctccgcta aaccgcagac tggagagcg 49

<210> 48
<211> 7199
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp. ONC-T18

<400> 48

agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa 60

gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta attgcgttgc 120

gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc 180

aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact 240

cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac 300

ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 360

aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgcccccctg 420

acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa 480

gataccaggc gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc 540

ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac 600

gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 660

cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg 720

taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt 780

atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 840

cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 900

cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga 960

ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg 1020

ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gaattaattc ttagaaaaac 1080

tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt 1140

tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca 1200

agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 1260

ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt 1320

gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc 1380

tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 1440

agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 1500

cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaat 1560

acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc atcaggagta 1620

cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 1680

atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 1740

gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac attatcgcga 1800

gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg cctagagcaa 1860

gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgtat tactgtttat gtaagcagac 1920

agttttattg ttcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 1980

atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gttaccaatg 2040

cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg 2100

actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgctgc 2160

aatgataccg cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 2220

cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 2280

ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc 2340

cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg 2400

ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 2460

cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 2520

ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 2580

tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 2640

ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 2700

aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat 2760

gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 2820

gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg 2880

ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 2940

catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 3000

atttccccga aaagtgccac ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt 3060

ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccg ctcctttcgc 3120

tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg 3180

gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 3240

gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt 3300

ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat 3360

ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa 3420

tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc 3480

cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta 3540

ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 3600

ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tgtgcggccg cgagctcggg 3660

cccccacacg tgtggtctag agctagccta ggctcgagaa gcttggcctg tctcccttgg 3720

ccatccattg cgctgcggaa gcattggatt gcgaactgcg tcggccagat cgcttggttt 3780

cccaacatga gacgcgctct gtcggcaaga ccatttccgc ccccggcttt gctcacaacc 3840

aactcgtagt agattttgta aagaacactg cacgtctgac tgctcccagc ccgcacgcat 3900

tgcgcttggc agcctcggtc ccaaaccgtc acggtcgctg cccggtccac gggaaaaaat 3960

aacttttgtc cgcgagcggc cgttcaaggc gcagccgcga gcgtgccaac cgtccgtccc 4020

gcattctttt cccaatgttg gattcattca ttcttgccag gccagatcat ctgtgcctcc 4080

ctcgcgtgcc cttccttagc gtgcgcagat ctcttcttcc cagagcccgc gcggcgcttc 4140

gtggagtcgg cgtccatgtc atgcgcgcgc ggcgtcttga ccccctcggc ccctttggtt 4200

cgcggctgcg caacgagccg tttcacgcca ttgcgaccaa ccgcgcgcta aaatcggatt 4260

ggccgttgca cgccgatttt gcagcacctc tgggctgtga gggacgaccg tccactttta 4320

cccgcacaga gtggactttc acccccctcac tccactgaag ccaacttttc gccgtcttcc 4380

caacccaaag tttatgctag ccctcatgcc gcaacggacg tcacccccat ttccactggc 4440

gacgtgggga cctgggcgca ataaggcgcg agaaggaaat tacgacggca cactggggcc 4500

agaagagggc actaggagcg gcaacccact ggcgcggcac agcggtttgg cgcggggatc 4560

aaagcaaaac ccggctcatc cagagcaaac ccgaatcagc cttcagacgg tcgtgcctaa 4620

caacacgccg ttctaccccg ccttccttgc gtccctcgcc tcccccgagc ccaagtcttc 4680

cgcccgctcc taacgccaac caagcaagat ggccaagttg accagtgccg ttccggtgct 4740

caccgcgcgc gacgtcgccg gagcggtcga gttctggacc gaccggctcg ggttctcccg 4800

ggacttcgtg gaggacgact tcgccggtgt ggtccgggac gacgtgaccc tgttcatcag 4860

cgcggtccag gaccaggtgg tgccggacaa caccctggcc tgggtgtggg tgcgcggcct 4920

ggacgagctg tacgccgagt ggtcggaggt cgtgtccacg aacttccggg acgcctccgg 4980

gccggccatg accgagatcg gcgagcagcc gtgggggcgg gagttcgccc tgcgcgaccc 5040

ggccggcaac tgcgtgcact tcgtggccga ggagcaggac taagcgcctt caggcaggct 5100

gatccctact gtgggggctc tgacggacgg ccggtctttg tacgtaaaca ggcgcttctt 5160

cgcggcccgc cgaggggggc ggcaacgagc cgggtggcgt ggcacggaca aggcaagagc 5220

ctttccatcc cgcataaagt gatgcaccat tttgaccttg ttgatcgttt ttgtgtgttt 5280

agagcggccc cgtgcgggta ggcgaagtgc gcttctgagc aaggaagaga gaggtgcagc 5340

ttcttcttga tcagtgtggt aatcttcaac ggccacgctc gcttattcga tacctgtaaa 5400

gctaccggtg cacccgtgca agttgggcac cacgtagttg tactggtgaa tccaaatgtt 5460

agccgctagc ttggtgccct tttcgacagg aagggcttgg tgaaaagccg agggcccgac 5520

tgttcgggag ggccgcactt attagagttg aagccaagta agatggtgag tcatgataat 5580

tgagcagatc gcttgtttgg agcgatgaat cgtttgagtt tctgccccat cagttgtcga 5640

cggtagtgta ttggactacg gtgactataa cgggtgacgg ggagttaggg ctcgactccg 5700

gagagggagc ctgagagacg gctaccacat ccaaggaagg cagcaggcgc gtaaattacc 5760

caatgtggac tccacgaggt agtgacgaga aatatcaatg cggggcgctt cgcgtcttgc 5820

tattggaatg agagcaatgt aaaaccctca tcgaggatca actggagggc aagtctggtg 5880

ccagcagccg cggtaattcc agctccagaa gcgtatgcta aagttgttgc agttaaaaag 5940

ctcgtagttg aatttctggg gcgggagccc cggtctttgc gcgactgcgc tctgtttgcc 6000

gagcggctcc tctgccatcc tcgcctcttt ttttagtggc gtcgttcact gtaattaaag 6060

cagagtgttc caagcaggtc gtatgacctg gatgtttatt atgggatgat cagatagggc 6120

tcgggtgcta ttttgttggt ttgcacatct gagtaatgat gaataggaac agttgggggt 6180

attcgtattt aggagctaga ggtgaaattc ttggatttcc gaaagacgaa ctacagcgaa 6240

ggcatttacc aagcatgttt tcattaatca agaacgaaag tctggggatc gaagatgatt 6300

agataccatc gtagtctaga ccgtaaacga tgccgacttg cgattgcggg gtgtttgtat 6360

tggaccctcg cagcagcaca tgagaaatca aagtctttgg gttccggggg gagtatggtc 6420

gcaaggctga aacttaaagg aattgacgga agggcaccac caggagtgga gcctgcggct 6480

taatttgact caacacggga aaacttacca ggtccagaca taggtaggat tgacagattg 6540

agagctcttt cttgattcta tgggtggtgg tgcatggccg ttcttagttg gtggagtgat 6600

ttgtctggtt aattccgtta acgaacgaga cctcggccta ctaaatagcg gtgggtatgg 6660

cgacatactt gcgtacgctt cttagaggga catgttcggt atacgagcag gaagttcgag 6720

gcaataacag gtctgtgatg cccttagatg ttctgggccg cacgcgcgct acactgatgg 6780

gttcaacggg tggtcatcgt tgttcgcagc gaggtgcttt gccggaaggc atggcaaatc 6840

ctttcaacgc ccatcgtgct ggggctagat ttttgcaatt attaatctcc aacgaggaat 6900

tcctagtaaa cgcaagtcat cagcttgcat tgaatacgtc cctgcccttt gtacacaccg 6960

cccgtcgcac ctaccgattg aacggtccga tgaaaccatg ggatgacctt ttgagcgttt 7020

gttcgcgagg ggggtcagaa ctcgggtgaa tcttattgtt tagaggaagg tgaagtcgta 7080

acaaggtttc cgtagtgaat cacgaattct ggatccgata cgtaacgcgt ctgcagcatg 7140

cgtggtaccg agctttccct atagtgagtc gtattagagc ttggcgtaat catggtcat 7199

<210> 49
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 49
gggatcagcc tgcctgaagg cgcttagtcc tgctcctcgg ccacgaag 48

<210> 50
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 50
cttcgtggcc gaggagcagg actaagcgcc ttcaggcagg ctgatccc 48

<210> 51

<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 51
ggccctcccg aacagtcggg ccctcggctt ttcaccaagc ccttcctg 48

<210> 52
<211> 6526
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp. ONC-T18

<400> 52

agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa 60

gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta attgcgttgc 120

gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc 180

aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact 240

cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac 300

ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 360

aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgcccccctg 420

acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa 480

gataccaggc gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc 540

ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac 600

gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 660

ccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg 720

taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt 780

atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 840

cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 900

cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga 960

ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg 1020

ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gaattaattc ttagaaaaac 1080

tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt 1140

tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca 1200

agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 1260

ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt 1320

gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc 1380

tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 1440

agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 1500

cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaat 1560

acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc atcaggagta 1620

cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 1680

atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 1740

gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac attatcgcga 1800

gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg cctagagcaa 1860

gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgtat tactgtttat gtaagcagac 1920

agttttattg ttcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 1980

atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gttaccaatg 2040

cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg 2100

actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgctgc 2160

aatgataccg cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 2220

cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 2280

ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc 2340

cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg 2400

ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 2460

cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 2520

ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 2580

tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 2640

ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 2700

aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat 2760

gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 2820

gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg 2880

ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 2940

catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 3000

atttccccga aaagtgccac ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt 3060

ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccg ctcctttcgc 3120

tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg 3180

gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 3240

gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt 3300

ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat 3360

ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa 3420

tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc 3480

cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta 3540

ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 3600

ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tgtgcggccg cgagctcggg 3660

cccccacacg tgtggtctag agctagccta ggctcgagaa gcttcgcggc ttcccgtctc 3720

caagcttcgt ctcggtagag attctatctt cgcccggcag cccgccgccg tccggcaagt 3780

gtagaacggc agaaagccca cttgcacgga acgcccgaca agttgacgaa agcggcccgc 3840

aagtgcggca gcccggctgg tttttcctcg cggcgaggcc aaaccgccaa cgccaccaag 3900

ccagacacca ggtatgtgcc gcacgcgccg ccgcacgcga gccccgagga tgccccgtac 3960

gcgctgacgc ctttctccgc cccgcccgcg agaagacgcg ctccggcaac ggcgggagcc 4020

gagcgaacgg gcgaggattg atcgagtagc tgcaggttga gaaaaaagga aaaccgccga 4080

gatggacaac ggctggatgg acgagaagac gcacgaggac gcgaggactg acgatgatca 4140

cgtgcgcagg aagacttgaa aagaagcaag gaaggtagaa aaaaaagaag aaatcaagca 4200

agatggccaa gttgaccagt gccgttccgg tgctcaccgc gcgcgacgtc gccggagcgg 4260

tcgagttctg gaccgaccgg ctcgggttct cccgggactt cgtggaggac gacttcgccg 4320

gtgtggtccg ggacgacgtg accctgttca tcagcgcggt ccaggaccag gtggtgccgg 4380

acaacaccct ggcctgggtg tgggtgcgcg gcctggacga gctgtacgcc gagtggtcgg 4440

aggtcgtgtc cacgaacttc cgggacgcct ccgggccggc catgaccgag atcggcgagc 4500

agccgtgggg gcgggagttc gccctgcgcg acccggccgg caactgcgtg cacttcgtgg 4560

ccgaggagca ggactaacac gtgctacgag atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa 4620

ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc 4680

tcatgctgga gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat 4740

aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg 4800

gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatc atgtctgagg gcccgactgt tcgggagggc 4860

cgcacttatt agagttgaag ccaagtaaga tggtgagtca tgataattga gcagatcgct 4920

tgtttggagc gatgaatcgt ttgagtttct gccccatcag ttgtcgacgg tagtgtattg 4980

gactacggtg actataacgg gtgacgggga gttagggctc gactccggag agggagcctg 5040

agagacggct accacatcca aggaaggcag caggcgcgta aattacccaa tgtggactcc 5100

acgaggtagt gacgagaaat atcaatgcgg ggcgcttcgc gtcttgctat tggaatgaga 5160

gcaatgtaaa accctcatcg aggatcaact ggagggcaag tctggtgcca gcagccgcgg 5220

taattccagc tccagaagcg tatgctaaag ttgttgcagt taaaaagctc gtagttgaat 5280

ttctggggcg ggagccccgg tctttgcgcg actgcgctct gtttgccgag cggctcctct 5340

gccatcctcg cctcttttt tagtggcgtc gttcactgta attaaagcag agtgttccaa 5400

gcaggtcgta tgacctggat gtttattatg ggatgatcag atagggctcg ggtgctattt 5460

tgttggtttg cacatctgag taatgatgaa taggaacagt tgggggtatt cgtatttagg 5520

agctagaggt gaaattcttg gatttccgaa agacgaacta cagcgaaggc atttaccaag 5580

catgttttca ttaatcaaga acgaaagtct ggggatcgaa gatgattaga taccatcgta 5640

gtctagaccg taaacgatgc cgacttgcga ttgcggggtg tttgtattgg accctcgcag 5700

cagcacatga gaaatcaaag tctttgggtt ccgggggggag tatggtcgca aggctgaaac 5760

ttaaaggaat tgacggaagg gcaccaccag gagtggagcc tgcggcttaa tttgactcaa 5820

cacgggaaaa cttaccaggt ccagacatag gtaggattga cagattgaga gctctttctt 5880

gattctatgg gtggtggtgc atggccgttc ttagttggtg gagtgatttg tctggttaat 5940

tccgttaacg aacgagacct cggcctacta aatagcggtg ggtatggcga catacttgcg 6000

tacgcttctt agagggacat gttcggtata cgagcaggaa gttcgaggca ataacaggtc 6060

tgtgatgccc ttagatgttc tgggccgcac gcgcgctaca ctgatgggtt caacgggtgg 6120

tcatcgttgt tcgcagcgag gtgctttgcc ggaaggcatg gcaaatcctt tcaacgccca 6180

tcgtgctggg gctagatttt tgcaattatt aatctccaac gaggaattcc tagtaaacgc 6240

aagtcatcag cttgcattga atacgtccct gcccttttgta cacaccgccc gtcgcaccta 6300

ccgattgaac ggtccgatga aaccatggga tgacctttg agcgtttgtt cgcgaggggg 6360

gtcagaactc gggtgaatct tattgtttag aggaaggtga agtcgtaaca aggtttccgt 6420

agtgaatcac gaattctgga tccgatacgt aacgcgtctg cagcatgcgt ggtaccgagc 6480

tttccctata gtgagtcgta ttagagcttg gcgtaatcat ggtcat 6526

<210> 53
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 53
ggtctagagc tagcctaggc tcgagaagct tcgcggcttc ccgtctc 47

<210> 54
<211> 59

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 54
ggaacggcac tggtcaactt ggccatcttg cttgatttct tctttttttt ctaccttcc 59

<210> 55
<211> 7374
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 55

agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa 60

gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta attgcgttgc 120

gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc 180

aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact 240

cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac 300

ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 360

aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg 420

acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa 480

gataccaggc gtttcccccc ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc 540

ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac 600

gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 660

ccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg 720

taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt 780

atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 840

cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 900

cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga 960

ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg 1020

ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gaattaattc ttagaaaaac 1080

tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt 1140

tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca 1200

agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 1260

ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt 1320

gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc 1380

tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 1440

agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 1500

cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaat 1560

acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc atcaggagta 1620

cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 1680

atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 1740

gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac attatcgcga 1800

gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg cctagagcaa 1860

gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgtat tactgtttat gtaagcagac 1920

agttttattg ttcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 1980

atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gttaccaatg 2040

cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg 2100

actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgctgc 2160

aatgataccg cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 2220

cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 2280

ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc 2340

cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg 2400

ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 2460

cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 2520

ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 2580

tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 2640

ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 2700

aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat 2760

gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 2820

gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg 2880

ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 2940

catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 3000

atttccccga aaagtgccac ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt 3060

ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccg ctcctttcgc 3120

tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg 3180

gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 3240

gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt 3300

ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat 3360

ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa 3420

tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc 3480

cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta 3540

ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 3600

ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tgtgcggccg cgagctcggg 3660

cccccacacg tgtggtctag agctagccta ggctcgagaa gcttggcctg tctcccttgg 3720

ccatccattg cgctgcggaa gcattggatt gcgaactgcg tcggccagat cgcttggttt 3780

cccaacatga gacgcgctct gtcggcaaga ccatttccgc ccccggcttt gctcacaacc 3840

aactcgtagt agattttgta aagaacactg cacgtctgac tgctcccagc ccgcacgcat 3900

tgcgcttggc agcctcggtc ccaaaccgtc acggtcgctg cccggtccac gggaaaaaat 3960

aacttttgtc cgcgagcggc cgttcaaggc gcagccgcga gcgtgccaac cgtccgtccc 4020

gcattctttt cccaatgttg gattcattca ttcttgccag gccagatcat ctgtgcctcc 4080

ctcgcgtgcc cttccttagc gtgcgcagat ctcttcttcc cagagcccgc gcggcgcttc 4140

gtggagtcgg cgtccatgtc atgcgcgcgc ggcgtcttga ccccctcggc ccctttggtt 4200

cgcggctgcg caacgagccg tttcacgcca ttgcgaccaa ccgcgcgcta aaatcggatt 4260

ggccgttgca cgccgatttt gcagcacctc tgggctgtga gggacgaccg tccactttta 4320

cccgcacaga gtggactttc acccccctcac tccactgaag ccaacttttc gccgtcttcc 4380

caacccaaag tttatgctag ccctcatgcc gcaacggacg tcacccccat ttccactggc 4440

gacgtgggga cctgggcgca ataaggcgcg agaaggaaat tacgacggca cactggggcc 4500

agaagagggc actaggagcg gcaacccact ggcgcggcac agcggtttgg cgcggggatc 4560

aaagcaaaac ccggctcatc cagagcaaac ccgaatcagc cttcagacgg tcgtgcctaa 4620

caacacgccg ttctaccccg ccttccttgc gtccctcgcc tcccccgagc ccaagtcttc 4680

cgcccgctcc taacgccaac caagcaagat gagtaaagga gaagaacttt tcactggagt 4740

tgtcccaatt cttgttgaat tagatggtga tgttaatggg cacaaatttt ctgtcagtgg 4800

agagggtgaa ggtgatgcaa catacggaaa acttaccctt aaatttattt gcactactgg 4860

aaaactacct gttccatggc caacacttgt cactactttc acttatggtg ttcaatgctt 4920

ttcaagatac ccagatcata tgaagcggca cgacttcttc aagagcgcca tgcctgaggg 4980

atacgtgcag gagaggacca tctctttcaa ggacgacggg aactacaaga cacgtgctga 5040

agtcaagttt gagggagaca ccctcgtcaa caggatcgag cttaagggaa tcgatttcaa 5100

ggaggacgga aacatcctcg gccacaagtt ggaatacaac tacaactccc acaacgtata 5160

catcacggca gacaaacaaa agaatggaat caaagctaac ttcaaaatta gacacaacat 5220

tgaagatgga agcgttcaac tagcagacca ttatcaacaa aatactccaa ttggcgatgg 5280

ccctgtcctt ttaccagaca accattacct gtccacacaa tctgcccttt cgaaagatcc 5340

caacgaaaag agagaccaca tggtccttct tgagtttgta acagctgctg ggattacaca 5400

tggcatggat gaactataca aataacacgt gctacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 5460

ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 5520

cggggatctc atgctggagt tcttcgccca ccccaacttg tttattgcag cttataatgg 5580

ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcatttttt cactgcattc 5640

tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgagggc ccgactgttc 5700

gggagggccg cacttattag agttgaagcc aagtaagatg gtgagtcatg ataattgagc 5760

agatcgcttg tttggagcga tgaatcgttt gagtttctgc cccatcagtt gtcgacggta 5820

gtgtattgga ctacggtgac tataacgggt gacggggagt tagggctcga ctccggagag 5880

ggagcctgag agacggctac cacatccaag gaaggcagca ggcgcgtaaa ttacccaatg 5940

tggactccac gaggtagtga cgagaaatat caatgcgggg cgcttcgcgt cttgctattg 6000

gaatgagagc aatgtaaaac cctcatcgag gatcaactgg agggcaagtc tggtgccagc 6060

agccgcggta attccagctc cagaagcgta tgctaaagtt gttgcagtta aaaagctcgt 6120

agttgaattt ctggggcggg agccccggtc tttgcgcgac tgcgctctgt ttgccgagcg 6180

gctcctctgc catcctcgcc tctttttta gtggcgtcgt tcactgtaat taaagcagag 6240

tgttccaagc aggtcgtatg acctggatgt ttattatggg atgatcagat agggctcggg 6300

tgctattttg ttggtttgca catctgagta atgatgaata ggaacagttg ggggtattcg 6360

tatttaggag ctagaggtga aattcttgga tttccgaaag acgaactaca gcgaaggcat 6420

ttaccaagca tgttttcatt aatcaagaac gaaagtctgg ggatcgaaga tgattagata 6480

ccatcgtagt ctagaccgta aacgatgccg acttgcgatt gcggggtgtt tgtattggac 6540

cctcgcagca gcacatgaga aatcaaagtc tttgggttcc ggggggagta tggtcgcaag 6600

gctgaaactt aaaggaattg acggaagggc accaccagga gtggagcctg cggcttaatt 6660

tgactcaaca cgggaaaact taccaggtcc agacataggt aggattgaca gattgagagc 6720

tctttcttga ttctatgggt ggtggtgcat ggccgttctt agttggtgga gtgatttgtc 6780

tggttaattc cgttaacgaa cgagacctcg gcctactaaa tagcggtggg tatggcgaca 6840

tacttgcgta cgcttcttag agggacatgt tcggtatacg agcaggaagt tcgaggcaat 6900

aacaggtctg tgatgccctt agatgttctg ggccgcacgc gcgctacact gatgggttca 6960

acgggtggtc atcgttgttc gcagcgaggt gctttgccgg aaggcatggc aaatcctttc 7020

aacgcccatc gtgctggggc tagatttttg caattattaa tctccaacga ggaattccta 7080

gtaaacgcaa gtcatcagct tgcattgaat acgtccctgc cctttgtaca caccgcccgt 7140

cgcacctacc gattgaacgg tccgatgaaa ccatgggatg acctttttgag cgtttgttcg 7200

cgaggggggt cagaactcgg gtgaatctta ttgtttagag gaaggtgaag tcgtaacaag 7260

gtttccgtag tgaatcacga attctggatc cgatacgtaa cgcgtctgca gcatgcgtgg 7320

taccgagctt tccctatagt gagtcgtatt agagcttggc gtaatcatgg tcat 7374

<210> 56
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 56
ccagtgaaaa gttcttctcc tttactcatc ttgcttggtt ggcgttagga gcgg 54

<210> 57
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 57
ccgctcctaa cgccaaccaa gcaagatgag taaaggagaa gaacttttca ctgg 54

<210> 58
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 58
ggtggaatcg aaatctcgta gcacgtgtta tttgtatagt tcatccatgc catg 54

<210> 59
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 59
catggcatgg atgaactata caaataacac gtgctacgag atttcgattc cacc 54

<210> 60
<211> 23

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 60
cgtcctcctt gaaatcgatt ccc 23

<210> 61
<211> 6011
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 61

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600

acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020

agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tccttttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200

cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct 1260

gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380

ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500

ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggttt 1560

cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620

agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680

gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740

atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800

gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860

gctggccttt tgctcacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcgcggccgc 1920

gatatcgcta gctcgaggtg accaaaagcc gtgaacgggc gtggccgagg ctacagcacg 1980

cagcggtgtt ctctgcgtat tatatttttc gcaaggtttc ccgacggctg gtccgcgtgc 2040

ccgcgccgcg cgcacgctct cactagacgt tggtcatgag tgtttcgagt caagacctcg 2100

gagaagaatt ggggcgcaca ccttccgtgc gcgcacccct gccactgtat accgtgcgta 2160

ccccaccaga cagaaggtca ccacccgtgc tctcttcgtc agctataccg tgtgctgtag 2220

atcgtcgcag gattcgggtt gtgcacaccg cgctccgtgg gctgggggcc ctggcgcggc 2280

ggcttcctag gatatagtct ataaaaccca gcgaatttta cacacagagc ggttcatttg 2340

cgctgggtcc ggtgcgcaat ttcggggcac agcctgcacg tttacatcga cgtaacagcc 2400

acagtcatcg tcgccagcct cttcggcctt cccaccgacc cggctgctgc ccgccttcct 2460

ggctggctga tgaactatcg cggcctgcct ggcacgtacg tgcccctccc atttctcccc 2520

ggtcctccag aaatgcgcct ccggccccaa tgaaagcagg cgttggccat gcggcgcccg 2580

acatctgggt cctcgcgcct tctttgatga catcgtcctc atcgtcgtcg gcgacctggt 2640

cttcgtgatc gcttgttgat cacgcgcttg gcatcttgcg aggagaaccg tctgcactct 2700

tttggcgcgg ccgaggtgcc ttccggggtg caggccagtc gccagaccag acctgctgca 2760

aagcccgaac atcgccgtcg aggtagacca ttaggtacgt acgtacgcac gtcttcatga 2820

tcgacgccaa cgtcatgcgg tcgatgcccc gccacgcgat ggcgctagca gccaggagcg 2880

cgtgtgtacg ggcgcggagc ttcgctcgca agcaaagctg ggcgcttggg ccggggatcg 2940

ggccactact tggacgaacg aacgaaacgc atgacgtcat ccttggcagt aaatcttgcc 3000

ggagcgcgca aaacccaggc tggacgcgct gggtgcgatt gagaaccgca agctttggag 3060

cctttcactg agcaggggga actgacgctg gagcgcgcga ccgtaggcga aggaatttga 3120

tcgaagtagg caggactgcc cgcaggggtc aggccatggc caagttgacc agtgccgttc 3180

cggtgctcac cgcgcgcgac gtcgccggag cggtcgagtt ctggaccgac cggctcgggt 3240

tctcccggga cttcgtggag gacgacttcg ccggtgtggt ccgggacgac gtgaccctgt 3300

tcatcagcgc ggtccaggac caggtggtgc cggacaacac cctggcctgg gtgtgggtgc 3360

gcggcctgga cgagctgtac gccgagtggt cggaggtcgt gtccacgaac ttccgggacg 3420

cctccgggcc ggccatgacc gagatcggcg agcagccgtg ggggcgggag ttcgccctgc 3480

gcgacccggc cggcaactgc gtgcacttcg tggccgagga gcaggactga cacgtgctac 3540

gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg 3600

acgccggctg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gcccacccca 3660

acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa 3720

ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt 3780

atcatgtctg aattcccggg gatcctctag agtcgagaag cttgtcgacg aattcagatg 3840

tagtcatacg ctcgtctcaa agattaagcc atgcatgtgt aagtataagc gattatactg 3900

tgagactgcg aacggctcat tatatcagtt atgatttctt cggtattttc tttatatgga 3960

tacctgcagt aattctggaa ttaatacatg ctgagagggc ccgactgttc gggagggccg 4020

cacttattag agttgaagcc aagtaagatg gtgagtcatg ataattgagc agatcgcttg 4080

tttggagcga tgaatcgttt gagtttctgc cccatcagtt gtcgacggta gtgtattgga 4140

ctacggtgac tataacgggt gacggggagt tagggctcga ctccggagag ggagcctgag 4200

agacggctac cacatccaag gaaggcagca ggcgcgtaaa ttacccaatg tggactccac 4260

gaggtagtga cgagaaatat caatgcgggg cgcttcgcgt cttgctattg gaatgagagc 4320

aatgtaaaac cctcatcgag gatcaactgg agggcaagtc tggtgccagc agccgcggta 4380

attccagctc cagaagcgta tgctaaagtt gttgcagtta aaaagctcgt agttgaattt 4440

ctggggcggg agccccggtc tttgcgcgac tgcgctctgt ttgccgagcg gctcctctgc 4500

catcctcgcc tctttttttа gtggcgtcgt tcactgtaat taaagcagag tgttccaagc 4560

aggtcgtatg acctggatgt ttattatggg atgatcagat agggctcggg tgctattttg 4620

ttggtttgca catctgagta atgatgaata ggaacagttg ggggtattcg tatttaggag 4680

ctagaggtga aattcttgga tttccgaaag acgaactaca gcgaaggcat ttaccaagca 4740

tgttttcatt aatcaagaac gaaagtctgg ggatcgaaga tgattagata ccatcgtagt 4800

ctagaccgta aacgatgccg acttgcgatt gcggggtgtt tgtattggac cctcgcagca 4860

gcacatgaga aatcaaagtc tttgggttcc ggggggagta tggtcgcaag gctgaaactt 4920

aaaggaattg acggaagggc accaccagga gtggagcctg cggcttaatt tgactcaaca 4980

cgggaaaact taccaggtcc agacataggt aggattgaca gattgagagc tctttcttga 5040

ttctatgggt ggtggtgcat ggccgttctt agttggtgga gtgatttgtc tggttaattc 5100

cgttaacgaa cgagacctcg gcctactaaa tagcggtggg tatggcgaca tacttgcgta 5160

cgcttcttag agggacatgt tcggtatacg agcaggaagt tcgaggcaat aacaggtctg 5220

tgatgccctt agatgttctg ggccgcacgc gcgctacact gatgggttca acgggtggtc 5280

atcgttgttc gcagcgaggt gctttgccgg aaggcatggc aaatcctttc aacgcccatc 5340

gtgctggggc tagatttttg caattattaa tctccaacga ggaattccta gtaaacgcaa 5400

gtcatcagct tgcattgaat acgtccctgc cctttgtaca caccgcccgt cgcacctacc 5460

gattgaacgg tccgatgaaa ccatgggatg acctttttgag cgtttgttcg cgaggggggt 5520

cagaactcgg gtgaatctta ttgtttagag gaaggtgaag tcatcacgaa ttctggatcc 5580

gatacgtaac gcgtctgcag catgcaagct tggcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg 5640

actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca 5700

gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga 5760

atggcgaatg gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc 5820

gcatatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg 5880

acacccgcca acacccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta 5940

cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc 6000

gaaacgcgcg a 6011

<210> 62
<211> 6661
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 62

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600

acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020

agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200

cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct 1260

gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380

ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500

ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggttt 1560

cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620

agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680

gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740

atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800

gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860

gctggccttt tgctcacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcgcggccgc 1920

gatatcgcta gacaacgcca tcctcgacca cagcaaggac acgcaccgct tcggctacgg 1980

tatccagatc ggataaatat tataccgccc cttccgctct ccttttcttt tttgctcgtc 2040

tggatgccag actaaggagt ccttgctcct ctgcgcaagg ctgctcaccc agagtctctg 2100

cctgtggttg agcgcccacc aacaggttaa agcgaaccag ggccgccccg ttgccgctgc 2160

gatgtcgctg ctcttgcgag actcttcatt agatcggcgg aatgctgccg caggactgac 2220

cgcctcttcg ttcgttcgtt tgtacgcgag cggtgcgagc ggcttcgttg ttggcagata 2280

ggcagaacgc gagcagttca cgtttctttg cagctttatc tatccgcaaa ttcgcctcag 2340

cgtctgcaac tttccggtga ggacagcaga gctgcagttc tgatcgtctc catcttttgg 2400

agcgcatgtc gacgtccccc agctcgtctc cgtctcccct ggagtggacg gtctctttca 2460

cagtgcctgg gtgcggccat ttccctaaat aggttgcgca gccgagtttc cttaaacgtg 2520

cctggtccgc gtgcttccgc cttactacct gaacgcgcag tagctcggcg cgtgccgctt 2580

taaggcgggc ggggtggctg ctcttgctta cgccaggcgc gtacgtcagc agcgccggcg 2640

ccatgctgcc catagcggcc acagaatcgt aggcgctgca atcgggaact gccaagatgg 2700

caatcgagac gatcccccaa aagtggacaa gcaccgtcaa agtaacctgg ctgatgatgg 2760

ccgggaccgc ctggtgacgg ccagccggca aaaccggaat ctatcacgag gactgggcag 2820

atcaagggcc tagtgctagc gagcagctcg agcgaaagaa gcgcgccagc agcgcaggca 2880

cgccatggcc aagactagtg gcggtaccgg tacgcgtgga catatggcag catgcgcttc 2940

gcgagttttc gaaggggat cctaacacgt gctacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 3000

ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 3060

cggggatctc atgctggagt tcttcgccca ccccaacttg tttattgcag cttataatgg 3120

ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcatttttt cactgcattc 3180

tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgaattc ctcgttggag 3240

attaataatt gcaaaaatct agccccagca cgatgggcgt tgaaaggatt tgccatgcct 3300

tccggcaaag cacctcgctg cgaacaacga tgaccacccg ttgaacccat cagtgtagcg 3360

cgcgtgcggc ccagaacatc taagggcatc acagacctgt tattgcctcg aacttcctgc 3420

tcgtataccg aacatgtccc tctaagaagc gtacgcaagt atgtcgccat acccaccgct 3480

atttagtagg ccgaggtctc gttcgttaac ggaattaacc agacaaatca ctccaccaac 3540

taagaacggc catgcaccac cacccataga atcaagaaag agctctcaat ctgtcaatcc 3600

tacctatgtc tggacctggt aagttttccc gtgttgagtc aaattaagcc gcaggctcca 3660

ctcctggtgg tgcccttccg tcaattcctt taagtttcag ccttgcgacc atactccccc 3720

cggaacccaa agactttgat ttctcatgtg ctgctgcgag ggtccaatac aaacaccccg 3780

caatcgcaag tcggcatcgt ttacggtcta gactacgatg gtatctaatc atcttcgatc 3840

cccagacttt cgttcttgat taatgaaaac atgcttggta aatgccttcg ctgtagttcg 3900

tctttcggaa atccaagaat ttcacctcta gctcctaaat acgaataccc ccaactgttc 3960

ctattcatca ttactcagat gtgcaaacca acaaaatagc acccgagccc tatctgatca 4020

tcccataata aacatccagg tcatacgacc tgcttggaac actctgcttt aattacagtg 4080

aacgacgcca ctaaaaaaag aggcgaggat ggcagaggag ccgctcggca aacagagcgc 4140

agtcgcgcaa agaccggggc tcccgcccca gaaattcaac tacgagcttt ttaactgcaa 4200

caactttagc atacgcttct ggagctggaa ttaccgcggc tgctggcacc agacttgccc 4260

tccagttgat cctcgatgag ggttttacat tgctctcatt ccaatagcaa gacgcgaagc 4320

gccccgcatt gatatttctc gtcactacct cgtggagtcc acattgggta atttacgcgc 4380

ctgctgcctt ccttggatgt ggtagccgtc tctcaggctc cctctccgga gtcgagccct 4440

aactccccgt cacccgttat agtcaccgta gtccaataca ctaccgtcga caactgatgg 4500

ggcagaaact caaacgattc atcgctccaa acaagcgatc tgctcaatta tcatgactca 4560

ccatcttact tggcttcaac tctaataagt gcggccctcc cgaacagtcg ggccctcaga 4620

catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaaatg 4680

ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta accattataa gctgcaataa 4740

acaagttggg gtgggcgaag aactccagca tgagatcccc gcgctggagg atcatccagc 4800

cggcgtcccg gaaaacgatt ccgaagccca acctttcata gaaggcggcg gtggaatcga 4860

aatctcgtag cacgtgttag tcctgctcct cggccacgaa gtgcacgcag ttgccggccg 4920

ggtcgcgcag ggcgaactcc cgcccccacg gctgctcgcc gatctcggtc atggccggcc 4980

cggaggcgtc ccggaagttc gtggacacga cctccgacca ctcggcgtac agctcgtcca 5040

ggccgcgcac ccacacccag gccagggtgt tgtccggcac cacctggtcc tggaccgcgc 5100

tgatgaacag ggtcacgtcg tcccggacca caccggcgaa gtcgtcctcc acgaagtccc 5160

gggagaaccc gagccggtcg gtccagaact cgaccgctcc ggcgacgtcg cgcgcggtga 5220

gcaccggaac ggcactggtc aacttggcca tcttgcttgg ttggcgttag gagcgggcgg 5280

aagacttggg ctcgggggag gcgagggacg caaggaaggc ggggtagaac ggcgtgttgt 5340

taggcacgac cgtctgaagg ctgattcggg tttgctctgg atgagccggg ttttgctttg 5400

atccccgcgc caaaccgctg tgccgcgcca gtgggttgcc gctcctagtg ccctcttctg 5460

gccccagtgt gccgtcgtaa tttccttctc gcgccttatt gcgcccaggt ccccacgtcg 5520

ccagtggaaa tgggggtgac gtccgttgcg gcatgagggc tagcataaac tttgggttgg 5580

gaagacggcg aaaagttggc ttcagtggag tgaggggtg aaagtccact ctgtgcgggt 5640

aaaagtggac ggtcgtccct cacagcccag aggtgctgca aaatcggcgt gcaacggcca 5700

atccgatttt agcgcgcggt tggtcgcaat ggcgtgaaac ggctcgttgc gcagccgcga 5760

accaaagggg ccgaggggt caagacgccg cgcgcgcatg acatggacgc cgactccacg 5820

aagcgccgcg cgggctctgg gaagaagaga tctgcgcacg ctaaggaagg gcacgcgagg 5880

gaggcacaga tgatctggcc tggcaagaat gaatgaatcc aacattggga aaagaatgcg 5940

ggacggacgg ttggcacgct cgcggctgcg ccttgaacgg ccgctcgcgg acaaaagtta 6000

ttttttcccg tggaccgggc agcgaccgtg acggtttggg accgaggctg ccaagcgcaa 6060

tgcgtgcggg ctgggagcag tcagacgtgc agtgttcttt acaaaatcta ctacgagttg 6120

gttgtgagca aagccggggg cggaaatggt cttgccgaca gagcgcgtct catgttggga 6180

aaccaagcga tctggccgac gcagttcgca atccaatgct tccgcagcgc aatggatggc 6240

caagggagac aggccaagct tggcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa 6300

ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa 6360

tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg 6420

gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg 6480

tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgcca 6540

acacccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct 6600

gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg 6660

a 6661

<210> 63
<211> 85
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 63

ttatacgcgt ggacatatgg cagcatgcgc ttcgcgagtt ttcgaagggg gatcctaaca 60

cgtgctacga gatttcgatt ccacc 85

<210> 64
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 64
atatccacgc gtaccggtac cgccactagt cttggccatg gcgtgcctgc gctgctggc 59

<210> 65
<211> 3670
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 65

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600

acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020

agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200

cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct 1260

gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380

ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500

ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560

cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620

agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680

gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740

atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800

gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860

gctggccttt tgctcacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcgcggccgc 1920

gatatcgcta gacaacgcca tcctcgacca cagcaaggac acgcaccgct tcggctacgg 1980

tatccagatc ggataaatat tataccgccc cttccgctct ccttttcttt tttgctcgtc 2040

tggatgccag actaaggagt ccttgctcct ctgcgcaagg ctgctcaccc agagtctctg 2100

cctgtggttg agcgcccacc aacaggttaa agcgaaccag ggccgccccg ttgccgctgc 2160

gatgtcgctg ctcttgcgag actcttcatt agatcggcgg aatgctgccg caggactgac 2220

cgcctcttcg ttcgttcgtt tgtacgcgag cggtgcgagc ggcttcgttg ttggcagata 2280

ggcagaacgc gagcagttca cgtttctttg cagctttatc tatccgcaaa ttcgcctcag 2340

cgtctgcaac tttccggtga ggacagcaga gctgcagttc tgatcgtctc catcttttgg 2400

agcgcatgtc gacgtccccc agctcgtctc cgtctcccct ggagtggacg gtctctttca 2460

cagtgcctgg gtgcggccat ttccctaaat aggttgcgca gccgagtttc cttaaacgtg 2520

cctggtccgc gtgcttccgc cttactacct gaacgcgcag tagctcggcg cgtgccgctt 2580

taaggcgggc ggggtggctg ctcttgctta cgccaggcgc gtacgtcagc agcgccggcg 2640

ccatgctgcc catagcggcc acagaatcgt aggcgctgca atcgggaact gccaagatgg 2700

caatcgagac gatcccccaa aagtggacaa gcaccgtcaa agtaacctgg ctgatgatgg 2760

ccgggaccgc ctggtgacgg ccagccggca aaaccggaat ctatcacgag gactgggcag 2820

atcaagggcc tagtgctagc gagcagctcg agcgaaagaa gcgcgccagc agcgcaggca 2880

cgccatggcc aagactagtg gcggtaccgg tacgcgtgga catatggcag catgcgcttc 2940

gcgagtttc gaaggggat cctaacacgt gctacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 3000

ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 3060

cggggatctc atgctggagt tcttcgccca ccccaacttg tttattgcag cttataatgg 3120

ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcatttttt cactgcattc 3180

tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgaattc ccggggatcc 3240

tctagagtcg acctgcaggc atgcaagctt ggcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga 3300

ctgggaaaac cctggcgtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag 3360

ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa 3420

tggcgaatgg cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg 3480

catatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagccccga 3540

cacccgccaa cacccgctga cgcgccctga cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac 3600

agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcatcaccg 3660

aaacgcgcga 3670

<210> 66
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 66
ggccaagttg accagtgccg 20

<210> 67
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 67
cagtcctgct cctcggccac 20

<210> 68
<211> 1724
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 68

dgtagtcata cgctcgtctc aaagattaag ccatgcatgt gtaagtataa gcgattatac 60

tgtgagactg cgaacggctc attatatcag ttatgatttc ttcggtattt tctttatatg 120

gatacctgca gtaattctgg aattaataca tgctgagagg gcccgactgt tcgggagggc 180

cgcacttatt agagttgaag ccaagtaaga tggtgagtca tgataattga gcagatcgct 240

tgtttggagc gatgaatcgt ttgagtttct gccccatcag ttgtcgacgg tagtgtattg 300

gactacggtg actataacgg gtgacgggga gttagggctc gactccggag agggagcctg 360

agagacggct accacatcca aggaaggcag caggcgcgta aattacccaa tgtggactcc 420

acgaggtagt gacgagaaat atcaatgcgg ggcgcttcgc gtcttgctat tggaatgaga 480

gcaatgtaaa accctcatcg aggatcaact ggagggcaag tctggtgcca gcagccgcgg 540

taattccagc tccagaagcg tatgctaaag ttgttgcagt taaaaagctc gtagttgaat 600

ttctggggcg ggagccccgg tctttgcgcg actgcgctct gtttgccgag cggctcctct 660

gccatcctcg cctctttttt tagtggcgtc gttcactgta attaaagcag agtgttccaa 720

gcaggtcgta tgacctggat gtttattatg ggatgatcag atagggctcg ggtgctattt 780

tgttggtttg cacatctgag taatgatgaa taggaacagt tgggggtatt cgtatttagg 840

agctagaggt gaaattcttg gatttccgaa agacgaacta cagcgaaggc atttaccaag 900

catgttttca ttaatcaaga acgaaagtct ggggatcgaa gatgattaga taccatcgta 960

gtctagaccg taaacgatgc cgacttgcga ttgcggggtg tttgtattgg accctcgcag 1020

cagcacatga gaaatcaaag tctttgggtt ccgggggggag tatggtcgca aggctgaaac 1080

ttaaaggaat tgacggaagg gcaccaccag gagtggagcc tgcggcttaa tttgactcaa 1140

cacgggaaaa cttaccaggt ccagacatag gtaggattga cagattgaga gctctttctt 1200

gattctatgg gtggtggtgc atggccgttc ttagttggtg gagtgatttg tctggttaat 1260

tccgttaacg aacgagacct cggcctacta aatagcggtg ggtatggcga catacttgcg 1320

tacgcttctt agagggacat gttcggtata cgagcaggaa gttcgaggca ataacaggtc 1380

tgtgatgccc ttagatgttc tgggccgcac gcgcgctaca ctgatgggtt caacgggtgg 1440

tcatcgttgt tcgcagcgag gtgctttgcc ggaaggcatg gcaaatcctt tcaacgccca 1500

tcgtgctggg gctagatttt tgcaattatt aatctccaac gaggaattcc tagtaaacgc 1560

aagtcatcag cttgcattga atacgtccct gccctttgta cacaccgccc gtcgcaccta 1620
ccgattgaac ggtccgatga aaccatggga tgacctttg agcgtttgtt cgcgaggggg 1680

gtcagaactc gggtgaatct tattgtttag aggaaggtga agtc 1724

<210> 69
<211> 3247

<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 69

cggacggcgt gcttagtaac tgaatgaata attataccag ctggggattc tgcgaatgcg 60

aacgacgctt ccagagcctc acctttgca gcgacagcgt gccgcgcgcg atacttgctt 120

ctattctagc aaagcccaac gcaaggcttg cctactcctt gtcgagcttg tacatgtcct 180

tggaggtgta cccattcgcg atgaggctct cgtacgcggc ttcgacctgc tccttgtagg 240

agcggtactc gccgaggccg aggccgccct cgctggtcgg tttgagggac ttttcgacgt 300

tgtagcgagt gcggtgtggc ggcggcgccc ccgagccggg tgcgggaagc ttcgggtcca 360

cctcggtagg aagctctttt ttccggtcct cagaaacctt gttagactcg cgcaaaacct 420

ggacaatttc ttcgcgcatg ggggcaccgc caataagaag gaagcgctcg ccccagccct 480

tccagtcaaa gtccatctgt gcggcgttga cgtgggcgcg cgccacatcg cgcacgtccg 540

tgatgcaggc gttggcctgt tgaaccttgg aggcgccaaa gtatgctagc acggagaccg 600

agctggtgtt gagctcgggg aggccgggaa gcatggggcc gtagatgaag ctcgggttga 660

gcgcagcaag cttgaaagag ctctccttgg cgatctccca ggccgttttc tcggcgagga 720

gcttggaaag gccatagtag ttctttttct cctcgaggac cttgtcgtcg gtccagtcct 780

cttcgctgta gacgtactcg gggggcttcg cgccgtacgt gatgtagatg ttggcgatcg 840

aggcggtaag cacgaccttt tccacaccga gcttctcgca ggactcaagc acgttgcgcg 900

tgcccttcac ggccggctcg acgagtttct ggcgcgccga ctcgtcgttt atgcggataa 960

agggcgacgc cgagtggatc accgtggggc atcccttgat ggcctcatcg aagctgccct 1020

gctccaggag atcgcagcca gtgaaaagct tgagccgctc ctgggcgcca tcgagctttt 1080

gcagaaagtc cacctttttg ccggaccgcg tcgttccgtg cacctcgaag ccggcctcca 1140

gcgcgtactt gactacccac gagcccagga aaccggtaca ccccgtcacg cacacgcgtt 1200

tcgcctccgg caccgacatg ctgcttgttt gtccacctcc tcggctcttg ctccgctcgc 1260

gtataggcca ggcggctggc tagctgctcg ggctcgggac caaaacgttt ctgcaagttt 1320

cgagactgcg gcttcagctg ggattttgtg gcgtttgcct cggcctcacc gtcatcgcct 1380

catcccgtgc gcgcagatga cgacgatgcc gccgacctcg cacgacctca agcggttcag 1440

gagtcgttcg ctgcgccaag aaatgggcag cgcaacgcac gccgctcgag gtgggctgtg 1500

agcgcctcgg gcacgcgact aataagcccc agggcgctcg ggatgccctc cttccgccgc 1560

acgcgttgca ttcttgcttg cttgcttgct tgcttgcttg cttgcttgct tgcctgcgcg 1620

gagaagtgtt ggtttttccg atcgacggca aagataacgc gcgtgtacta gcgtcgatcg 1680

cgagtccctt gacctgcctg cctccgtcag catgctgcca agggttgatg cgagtagcgc 1740

ggcgccgcgt tgctgcgaga tgcgcgcgcg gagtggtccg cgtccttgct gcctgcgatc 1800

gacacgacgc tgatgagggt cgagcttcct tcttcccttc cggcgccgtt gaacccgccc 1860

acccatgttg gcgaggtgaa tctggagccc gtgccggcgg ccggcggcac cgtgggccac 1920

ccgcacgcgg gctaccaagc acgctttgcg gcggcggggc accgcccgcg aaacgcgttg 1980

cgcagacacc catttccagc atttcgaggt actgaggcta accgacgacg cgacgcagcg 2040

acggcgcccc cggcatgacg cggctcggga gcgtttgttt tggcgtgcgt tgctcgcgcg 2100

gcggacgttc acgaaacccg tgtcgggccg ggatccgcgc tggtccgggc gctcgacatc 2160

gatttccttt cgagcgcgct gccgcgtcga aggggctccg ggtcgcgcta ggtcttctgg 2220

cctaggaaag gaaagaaaac gggaaggagg atcaaagtca tactatgcgt acacgccgcg 2280

ttcggaaacc ctagctggtt caaccagttc cctcttctga ttccctcgct gggttctgcg 2340

ggccacgctc aagccgtccg ggacgtcatg gacgtcgcgc tgccctgcgt cgttcttcta 2400

cgcgtacgca caagaaggcg tcaccgccgc gcccgcgccg aagacctccc tcccgatcga 2460

aggtcctggt tctcgggagg cgctgtgcgt ggtatgtcga cgcgctcggc tctgcgctgg 2520

agagcgcaag gcggcttttt gaccaggttg cctgcctcct accacgtgcc cgtagggagg 2580

gggaatgtac cgcagtgcgg tggtccgcca agcaagaaac cccgcagaga aggcgtaaag 2640

tggaagaaaa acagcgtcgt atgccgccgt cgtcgcaggt gctcgtcgtc gcctcgtcga 2700

tgggacccat catgcgctga gagtctgctg caaaagaggt agggactcgg gaaggacctg 2760

gttcgcgctg gctggggaat cagtaatcgc atttcggaca tggatgcgga gacgctcccc 2820

gatgacgatg ctccaggaat cgcgcggcac gttttacggc ggcgagagag aaagtctcag 2880

cttcttttcg agggtatact ccgtggcggg ttatcatcat gtgagagatg tatcgacgcg 2940

atggagaagc atcgggtctt cgtcgaacat ccggggtcgc cggttcgtca cgaagccagc 3000

tcatgcctcc acatgtctca caagaccacc gaaaaactgt cgaacttgat tctttaggtc 3060

tctcggacgc aaataaaaag catcggcgcg ctcgcgttca ccagcaagca gacaaaacca 3120

atatcagcct attggccgac caaaaccaag cagcagttcc tcaactcggc tctgctcaac 3180

tcagcaaact gccaacgcgt actagcagac aaggattcac cccagcttcg gttgaaacta 3240

caagatc 3247

<210> 70
<211> 1239
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 70

atgtgcaagg tggagcccac gcggcacgag cagacggctg cggccaagcc gcaagagcag 60

cagcagcagc gtcagagtcc catcatccat ggcaagcaca acccggacct gccgacgctc 120

ggcgagattc gcgccgtggt gccgaagcac tgctttgagc gctcgctcgt gacgagctcg 180

ctttacctgg gccgcgacct tctcatggca gccaccctct tcttcctcgc cagacaattc 240

cttcccgttt acgacatggg cctctcgggc gcgctcgcct ggactgtcta cgtctgtgtg 300

cagggtaccg tcggtgccgg cctttgggtg cttgggcatg aatgcggtca ccaggccttt 360

tccaactaca ggatcgtcaa cgacggcgtc ggctttctgg tccacacgag cctgttggtg 420

ccttatttca gctgggcgta cacgcacggc ttgcaccatg cccgcgtcaa ccacatgctc 480

gacggcgagt cgcacacgcc gaacctgaag aagaaggtgg ccgccaactt tcaaaagttc 540

tgcgacatga tgggcgatga ggcgtttgcc gttcttcacg tcttcgtcta ccttctcctg 600

gcctggccgc tttacatcat caacgggagc ggcgcgtcca agcgcaacca cgagggaaag 660

cgctggtcga aggatttctg gaagcgcccc aaccactttt tgcccacctc ggagctcttt 720

ccggacaaga tgcgcctcaa ggccgccgtc tccacgatcg gcgtccttac cgtcattgcc 780

ggcctctgct actggggctc tatcgagggc gggcgcaccg tgctgctcca gtactttctg 840

ccctacctgg tggtcaatgc ctatctcatt gggtttacct ggatgcaaca cacccacccg 900

gacgtcccgc acctcggcga ggacgagtgg tcctgggtcg cgggcactgt gctcaccgtc 960

gatcgccccc acccgccttt tatcgacgtt ctgacccacc gcatcgggtc tacgcacgtg 1020

gcgcatcacc tcttctccaa gatgccgtgg taccacgcgc gcgaggctac gacccacatc 1080

cggaccctcc tcgagcccaa gggcgtctac aactatgacc cgatgccctt ttacaaggcc 1140

ttgtttcaca ctgctaagta ctgccactac atggagggcg tcgacggtat tcagttcttc 1200

aaacatgccg ctgcccagcc caaggccaag gagctctaa 1239

<210> 71
<211> 1066
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 71

gatatgtatt tacgtgatca acaaccaatc agccacgacg ttatcgtcgt tgtcggcctt 60

gtcgtcgttg tcgaagcaga ggttggagaa cgacagcaac aacgcgacgg ggagaatgtt 120

gattacgccc cgtcaatctc ggaagggccg acctagccca gaagtcctcg gcagcctttg 180

gttaacttcg gagcccgcaa cgttctggga ctgtctttgc tctaatgtaa tgcgatgccg 240

cgccttgcga ccaaggttct gccccgtcgg cgttgaagtc ttcgctcgag ggcttctgga 300

tgttggagaa ctgattgcac ccaatgcgat cgccaatcga tcgatgcgcg ctccgggcga 360

ccttcttctc gccgtgccgc ttttgcctcc tttgcagcca ggtacgtagc ctcgcacctg 420

gggctgtcct cgaccatggt ctcgtggccc atctcgaagc aaacgaaaag cagcgcacca 480

ccttcgtttt cggccctttt cgccgcattc ccccggcatc gtgaaacttg cgcgccggcc 540

ccggctaaag tgcgcgtgac acattgatcg cccaggacca ggctgcacat tgggggtaga 600

aaacttagtg tcggcgcggc cctgcgtgcg tcagcagcat acgtaagcca gcatcctcgc 660

cctaagtgtg cactgaaaac gcacactcct tggtcatgtg tggggacacc cgacggggac 720

tcagcgagga cggtgtcccc acctccgcgt accggcaacg tagagggcaa ggcaaaatcg 780

ttggatcctc acgacaacag gccacgccca ggtcaccctc cattccattg taccgtccgt 840

ttcgactggc ggctaacgaa aagcctatag ccgttctcgt ttgccattta ttgacgactc 900

tgcccggatg aatcccaaac acgattcata tgcgcggtct gctccgtctt atggatgacg 960

ctggatggat gggaaaaggt aaaataggcg ttctttactg tcagggtctt gcagtcgtct 1020

tgtgttgctt ggccgagtaa tcgtcacgcg caaacgatcg gcgcct 1066

<210> 72
<211> 1338
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 72

atgggcaagg gaagcgaggg ccgcagcgcg gagcgcgaga tgtcggccga ggcgagcggc 60

gacaagcgga aaacaatttt gatcgagggc gtcctgtatg acgtgacgaa ctttaagcac 120

ccgggcggtt cgatcatcaa ctttttgacc gagggcgagg ccggcgtgga cgcgacacag 180

gcgtaccgcg agttccatca gcggtccggc aaggctgaca agtacctcaa gtcgctgccg 240

aaactggatg cgtccaaggt ggagtcgcgg ttctcggcca aggagcaggc gcggcgcgac 300

gccatgacgc gcgactatgc ggcctttcgc gaggagctca tcgccgaggg gtactttgac 360

ccgtcgatcc cacacatgat tttccgcgtc gtcgagattg tggcgctctt tgcgctctcg 420

ttctggctca tgagcaaggc ctcgcccagc tcgctcgtgc tgggcgtggt gatgaacggc 480

attgcgcagg gccggtgcgg ctgggtcatg cacgagatgg gccacgggtc gttcacgggc 540

gtcatttggc tcgacgaccg gctgtgcgag ttcttttacg gagccggctg cggcatgagc 600

gggcactact ggaagaacca gcacagcaag caccacgccg cgcccaaccg cctcgagcac 660

gatgtcgatc tcaacacgtt gcccctggtc gcctttaacg agcgcgttgt gcgcaaggtc 720

aagccggggt ctctgcttgc gctctggctg cgtgtgcagg cgtacctctt tgcgcccgtc 780

tcgtgcctgc tcattggcct cggctggacg ctgtacctgc acccgcgcta catgctgcgc 840

accaagcggc acatggagtt tgtctggatc tttgcgcgct atcttggttg gttctcgctc 900

atgggcgctc tcggttacac gccgggccgc tcgatcggga tgtacctgtg ctcgtttggc 960

ctcggctgca tttacatttt cctgcagttc gccgtcagcc acacgcacct gccggtgact 1020

aacccagagg accagctgca ctggctcgag tacgcggcgg accacacggt gaacattagc 1080

accaagtcct ggttcgtcac atggtggatg tcgaacctga actttcagat cgagcaccac 1140

cttttcccca cggcgccgca gtttcgcttc atggaaatca gccctcgcgt cgaggccctc 1200

ttcaagcgcc acaacctccc atactacgac ctgccctaca cgagcgcggt ctcgaccacc 1260

tttgccaacc tttattccgt cggccactcg gtcggcgact cggtcggcgc cgacaccgac 1320

gccaagaagc aagactag 1338

<210> 73
<211> 445
<212> PRT
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 73

Met Gly Lys Gly Ser Glu Gly Arg Ser Ala Glu Arg Glu Met Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Ser Gly Asp Lys Arg Lys Thr Ile Leu Ile Glu Gly Val Leu
20 25 30

Tyr Asp Val Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Ile Ile Asn Phe
35 40 45

Leu Thr Glu Gly Glu Ala Gly Val Asp Ala Thr Gln Ala Tyr Arg Glu
50 55 60

Phe His Gln Arg Ser Gly Lys Ala Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Leu Pro
65 70 75 80

Lys Leu Asp Ala Ser Lys Val Glu Ser Arg Phe Ser Ala Lys Glu Gln
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Ala Met Thr Arg Asp Tyr Ala Ala Phe Arg Glu Glu
100 105 110

Leu Ile Ala Glu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Pro His Met Ile Phe
115 120 125

Arg Val Val Glu Ile Val Ala Leu Phe Ala Leu Ser Phe Trp Leu Met
130 135 140

Ser Lys Ala Ser Pro Ser Ser Leu Val Leu Gly Val Val Met Asn Gly
145 150 155 160

```
Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Val Met His Glu Met Gly His Gly
                165                 170                 175

Ser Phe Thr Gly Val Ile Trp Leu Asp Asp Arg Leu Cys Glu Phe Phe
            180                 185                 190

Tyr Gly Ala Gly Cys Gly Met Ser Gly His Tyr Trp Lys Asn Gln His
        195                 200                 205

Ser Lys His His Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu His Asp Val Asp Leu
    210                 215                 220

Asn Thr Leu Pro Leu Val Ala Phe Asn Glu Arg Val Val Arg Lys Val
225                 230                 235                 240

Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ala Leu Trp Leu Arg Val Gln Ala Tyr Leu
                245                 250                 255

Phe Ala Pro Val Ser Cys Leu Leu Ile Gly Leu Gly Trp Thr Leu Tyr
            260                 265                 270

Leu His Pro Arg Tyr Met Leu Arg Thr Lys Arg His Met Glu Phe Val
        275                 280                 285

Trp Ile Phe Ala Arg Tyr Leu Gly Trp Phe Ser Leu Met Gly Ala Leu
    290                 295                 300

Gly Tyr Thr Pro Gly Arg Ser Ile Gly Met Tyr Leu Cys Ser Phe Gly
305                 310                 315                 320

Leu Gly Cys Ile Tyr Ile Phe Leu Gln Phe Ala Val Ser His Thr His
                325                 330                 335

Leu Pro Val Thr Asn Pro Glu Asp Gln Leu His Trp Leu Glu Tyr Ala
            340                 345                 350

Ala Asp His Thr Val Asn Ile Ser Thr Lys Ser Trp Phe Val Thr Trp
        355                 360                 365

Trp Met Ser Asn Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr
    370                 375                 380

Ala Pro Gln Phe Arg Phe Met Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu
385                 390                 395                 400

Phe Lys Arg His Asn Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Pro Tyr Thr Ser Ala
                405                 410                 415
```

Val Ser Thr Thr Phe Ala Asn Leu Tyr Ser Val Gly His Ser Val Gly
420 425 430

Asp Ser Val Gly Ala Asp Thr Asp Ala Lys Lys Gln Asp
435 440 445

<210> 74
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 74
gcaccgccaa taagaaggaa gcgctcgccc cagcccttcc agtcaaagtc 50

<210> 75
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 75
gtttatgcgg ataaagggcg acgccgagtg gatcaccgtg gggcatccct 50

<210> 76
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 76
gggcacgcga ctaataagcc ccagggcgct cgggatgccc tccttccgcc 50

<210> 77
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 77
aaagtggaag aaaaacagcg tcgtatgccg ccgtcgtcgc aggtgctcgt 50

<210> 78
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 78
ctctcggacg caaataaaaa gcatcggcgc gctcgcgttc accagcaagc 50

<210> 79
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 79
ctcgccgccg taaaacgtgc cgcgcgattc ctggagcatc gtcatcgggg 50

<210> 80
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 80
gcaacctggt caaaaagccg ccttgcgctc tccagcgcag agccgagcgc 50

<210> 81
<211> 50

<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 81
tgcgtacgcg tagaagaacg acgcagggca gcgcgacgtc catgacgtcc 50

<210> 82
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 82
gcgccctggg gcttattagt cgcgtgcccg aggcgctcac agcccacctc 50

<210> 83
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 83
ctacaacgtc gaaaagtccc tcaaaccgac cagcgagggc ggcctcggcc 50

<210> 84
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 84
gccggccccg gctaaagtgc gcgtgacaca ttgatcgccc aggaccaggc 50

<210> 85
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 85
gaaaaggtaa aataggcgtt ctttactgtc agggtcttgc agtcgtcttg 50

<210> 86
<211> 50
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 86
cagagtcgtc aataaatggc aaacgagaac ggctataggc ttttcgttag 50

<210> 87
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 87
ggatcaaagt catactatgc gtacacg 27

<210> 88
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 88
ggtaccgtga atacagtcga ggtagc 26

<210> 89
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 89
gacaaggatt caccccagct tcggttgaaa ctacaagatc atggccaagt tgaccagtgc 60

<210> 90
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 90

cgaatctcgc cgagcgtcgg caggtccggg ttgtgcttgc catgcagaca tgataagata 60

cattg 65

<210> 91
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 91
cctccacatg tctcacaaga ccaccg 26

<210> 92
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 92
gcaagcaatg ctcgatttcc tacc 24

<210> 93
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 93
ggatcaaagt catactatgc gtacacg 27

<210> 94
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 94
atctatgtta accgaatgca attgcgtccg agagacctaa agaatcaagt tcg 53

<210> 95
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 95
tatcatcaat tgatgtaggt taacgccatt tctagctcga gctgc 45

<210> 96
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 96
atgtgccaat ttggtaccgt gaatacagtc g 31

<210> 97
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 97
atgggcaagg gaagcgaggg 20

<210> 98
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 98
ctagtcttgc ttcttggcgt c 21

<210> 99
<211> 929
<212> ADN
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 99

gccgtgcggc acgacggtcc gtgagtcgtg ggagacaatc cgtgctggca tcgactgcct 60

gtcggacctc cccgaggacc gcgtcgacgt gacggcctac tttgacccgg tcaagacgac 120

caaggacaag atctactgca agcgcggcgg cttcatcccc gactacgact ttgacgctcg 180

ggagttcggc cttaacatgt tccagatgga ggactcggac gcaaaccaga ccatttcgct 240

cctcaaggtc aaggaggccc tccaggatgc cggcatcgac gccctctcca aggagaagaa 300

gaacatcggc tgcgtcctcg gcattggcgg cggccagaag tcgagccacg agttctattc 360

gcgccttaat tatgttgtcg tcgagaaggt cctccgcaaa atgggcatgc ccgagaagga 420

cgtgaaggtg gccgtcgaaa agtacaaggc caactttccc gagtggcgcc tcgactcctt 480

ccccggcttc ctcggcaatg ttaccgccgg acgctgcacc aacaccttta acctcgacgg 540

catgaactgc gtcgtcgacg ccgcctgcgc ctcgtcactc atcgccgtca aggtcgccat 600

cgacgagctc ctacacggcg actgcgacat gatggtgact ggcgccacct gcacggacaa 660

ctccatcggc atgtacatgg ccttctccaa gacgccggtg ttctccaccg accccagcgt 720

ccgcgcctac gacgagaaga caaagggtat gcttatcggc gagggctcgg ccatgctcgt 780

cctcaagcgc tacgccgacg ccgtacgcga cggcgacgag atccacgccg tcatccgtgg 840

ctgcgcctcc tcgagcgatg gtaaggccgc cggcatctac acgcccacca tctcggggca 900

ggaggaggcc ctccgccgcg cctacaacc 929

<210> 100
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 100
atactcgagc cgtgcggcac gacggtccgt gagt 34

<210> 101
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 101
tatccatggc cgtcgaggtt aaaggtgttg gtgcag 36

<210> 102
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 102

atagaattcg atatgtattt acgtgatcaa c 31

<210> 103
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 103
ggcggcgtcg acgacgcagt tcataggcgc cgatcgtttg cgcgt 45

<210> 104
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 104
acgcgcaaac gatcggcgcc tatgaactgc gtcgtcgacg ccgcc 45

<210> 105
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 105
tatctgcagg ttgtaggcgc ggcggagggc ctcctcct 38

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:70, que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ12 desaturasa;
(b) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:69, en la que la molécula de ácido nucleico regula la transcripción de una Δ12 desaturasa; y
(c) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:71, en la que la molécula de ácido nucleico regula la transcripción de una Δ5 desaturasa.

2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 (a), en la que la molécula de ácido nucleico está unida operativamente a un promotor, en el que opcionalmente el promotor es heterólogo para la molécula de ácido nucleico aislada.

3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico se obtiene de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en los géneros *Schizochytrium, Oblongichytrium, Aurantiochytrium* y *Thraustochytrium,* o en la que el microorganismo es ONC-T18.

4. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 (b) o 1 (c), en la que la molécula de ácido nucleico aislada está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico, en la que la molécula de ácido nucleico aislada opcionalmente está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga, en la que preferentemente la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático con una actividad seleccionada del grupo que consiste en actividad desaturasa, actividad elongasa, actividad ácido graso sintasa y actividad poliquétido ácido graso poliinsaturado sintasa (PKS), en la que más preferentemente la actividad es una actividad desaturasa y en la que la actividad desaturasa es actividad Δ5 desaturasa o actividad Δ12 desaturasa.

5. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1(a), 1(b) o 1(c).

6. Un microorganismo modificado genéticamente , en el que el microorganismo expresa una secuencia de ácido nucleico heteróloga que comprende:

(a) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:70, que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ12 desaturasa; o
en la que el microorganismo expresa al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácido graso poliinsaturado unido operativamente a un promotor heterólogo que comprende
(b) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:69; o
(c) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:71.

7. El microorganismo modificado genéticamente de la reivindicación 6, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Schizochytrium*, *Oblongichytrium, Aurantiochytrium* y *Thraustochytrium,* o en el que el microorganismo es ONC-T18.

8. El microorganismo modificado genéticamente de la reivindicación 6, en el que la secuencia de ácido nucleico heteróloga está unida operativamente a un promotor heterólogo; o en el que la secuencia de ácido nucleico heteróloga está introducida en el microorganismo por un vector de expresión.

9. El microorganismo modificado genéticamente de la reivindicación 8, en el que el vector de expresión se introduce en el microorganismo con al menos un polinucleótido heterólogo adicional que codifica un polipéptido enzimático o parte de un polipéptido enzimático implicado en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados, en el que opcionalmente el al menos un polinucleótido heterólogo adicional codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ12 desaturasa, Δ5 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS).

10. El microorganismo modificado genéticamente de la reivindicación 6, en el que el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados es endógeno para el microorganismo o en el que el al menos polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados es exógeno para el microorganismo, en el que opcionalmente el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso

sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ12 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS).

11. Un método para producir ácidos grasos poliinsaturados, comprendiendo el método:

proporcionar una célula de *Thraustochytrium* modificada genéticamente, en el que la célula de *Thraustochytrium* modificada genéticamente expresa una molécula de ácido nucleico heteróloga que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:70 que codifica un polipéptido que tiene actividad Δ12 desaturasa;
en el que la expresión heteróloga cambia la producción de uno o más ácidos grasos poliinsaturados por la célula modificada genéticamente en comparación con una célula de referencia cuando las células modificadas genéticamente y de referencia se cultivan en condiciones comparables; y
cultivar la célula de *Thraustochytrium* modificada genéticamente en condiciones y durante un tiempo suficientes para conseguir la producción del o de los ácidos grasos poliinsaturados.

12. El método de la reivindicación 11, que comprende además expresar al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS).

13. Un método para producir ácidos grasos poliinsaturados, comprendiendo el método:

proporcionar una célula de *Thraustochytrium* modificada genéticamente, en el que la célula de *Thraustochytrium* modificada genéticamente expresa al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados unido operativamente a un promotor heterólogo que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:69 o que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:71;
en el que la unión operativa del promotor heterólogo con al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados cambia la producción de uno o más ácidos grasos poliinsaturados por la célula modificada genéticamente en comparación con una célula de referencia cuando las células modificadas genéticamente y de referencia se cultivan en condiciones comparables; y
cultivar la célula de *Thraustochytrium* modificada genéticamente en condiciones y durante un tiempo suficientes para conseguir la producción del o los ácidos grasos poliinsaturados.

14. El método de la reivindicación 11 ó 13, en el que el o los ácidos grasos poliinsaturados se seleccionan del grupo que consiste en ácido alfa linolénico, ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido gamma-linolénico, ácido linoleico y/o ácido linolénico.

15. El método de la reivindicación 14, en el que el al menos un polinucleótido de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados codifica un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptido enzimático seleccionado del grupo que consiste en ácido graso sintasa (AGS), Δ5 elongasa, Δ5 desaturasa, Δ4 desaturasa y poliquétido AGPI sintasa (PKS).

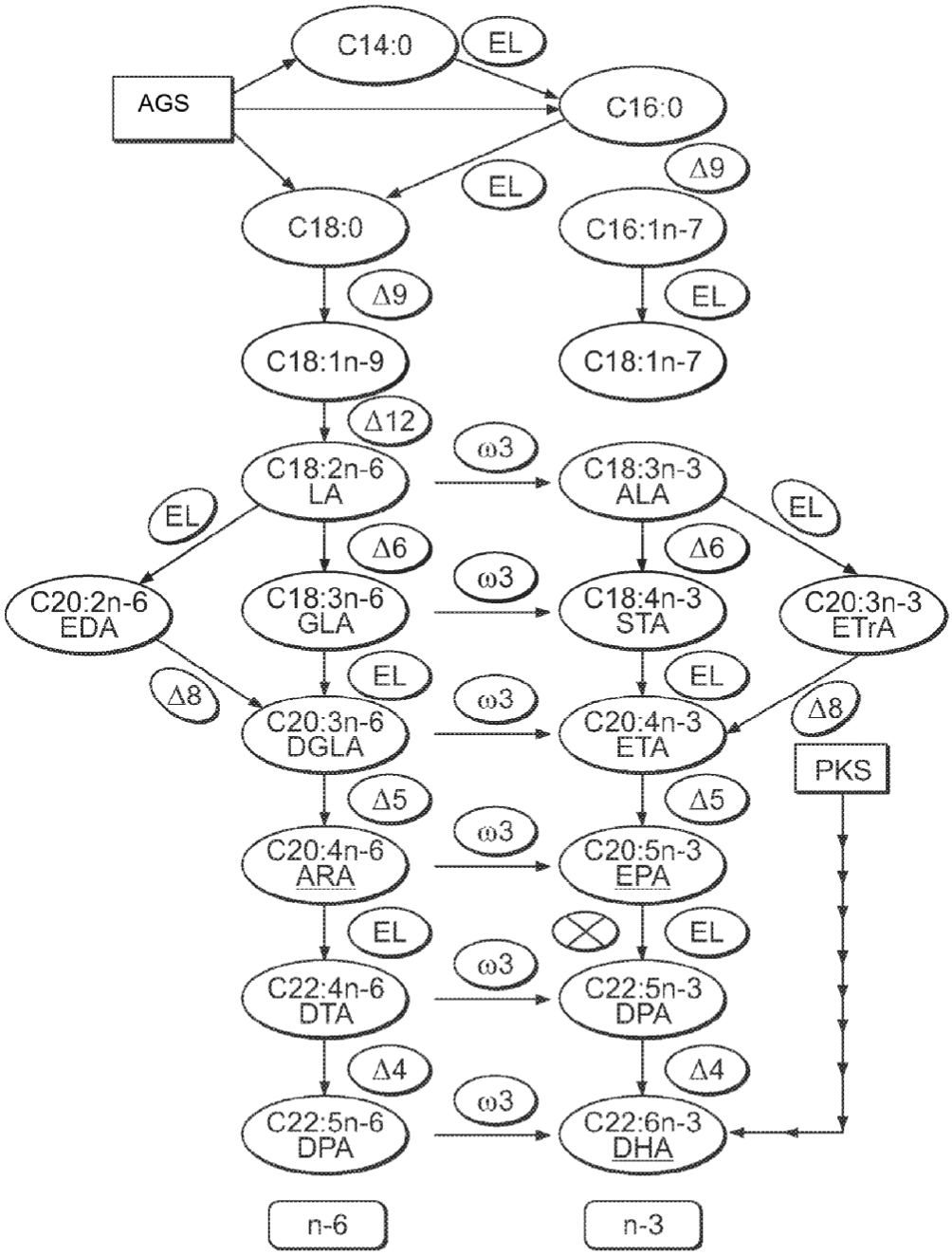

AGS
C14:0
EL
C16:0
Δ9
EL
C18:0
C16:1n-7
Δ9
EL
C18:1n-9
C18:1n-7
Δ12
ω3
C18:2n-6
LA
C18:3n-3
ALA
EL
EL
Δ6
Δ6
ω3
C20:2n-6
EDA
C18:3n-6
GLA
C18:4n-3
STA
C20:3n-3
ETrA
EL
EL
Δ8
ω3
Δ8
C20:3n-6
DGLA
C20:4n-3
ETA
PKS
Δ5
Δ5
ω3
C20:4n-6
ARA
C20:5n-3
EPA
EL
EL
ω3
C22:4n-6
DTA
C22:5n-3
DPA
Δ4
Δ4
ω3
C22:5n-6
DPA
C22:6n-3
DHA
n-6
n-3

FIG. 1

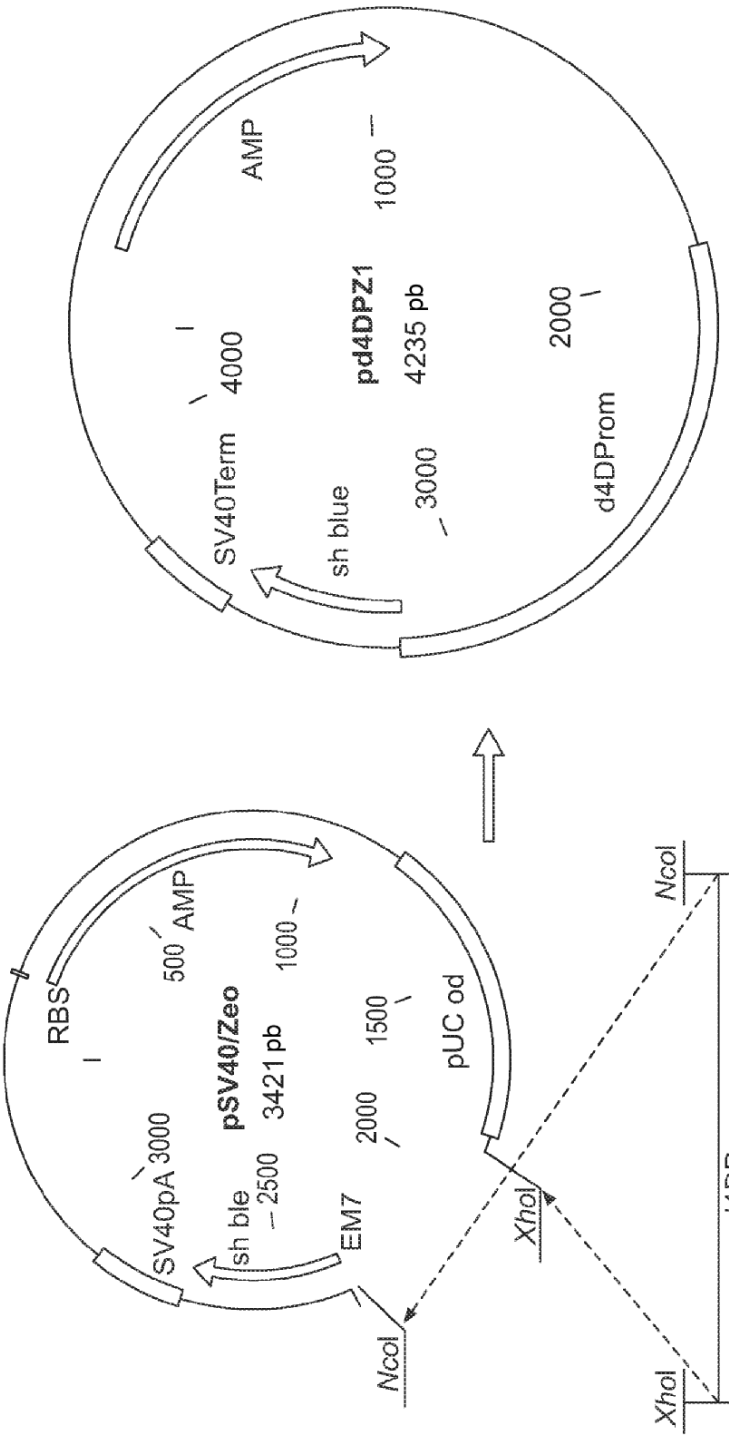

AMP
1000
pd4DPZ1
4235 pb
2000
d4DProm
3000
sh blue
SV40Term
4000
RBS
500
AMP
1000
pSV40/Zeo
3421 pb
1500
pUC od
2000
EM7
2500
sh ble
SV40pA
3000
NcoI
XhoI
NcoI
XhoI
d4DProm

FIG. 2

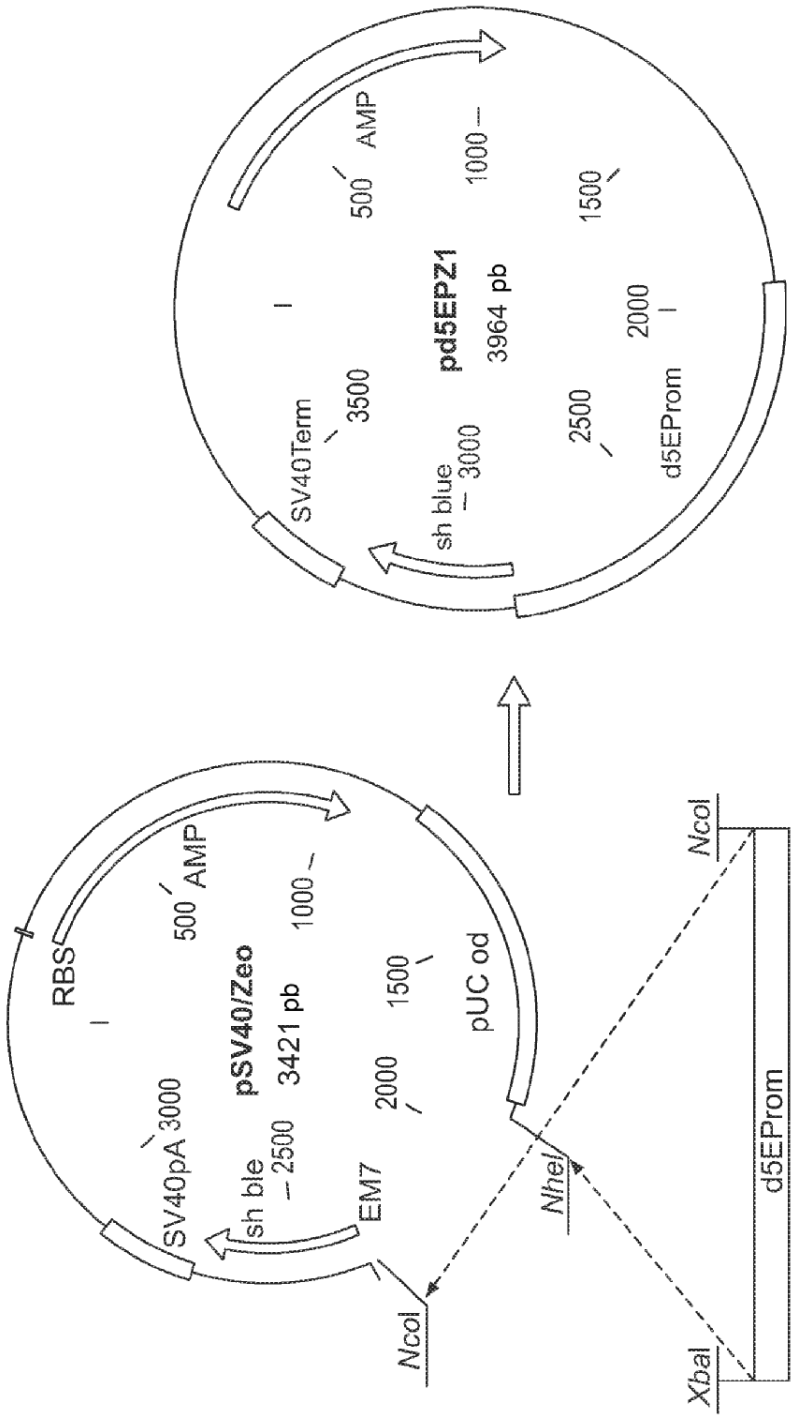
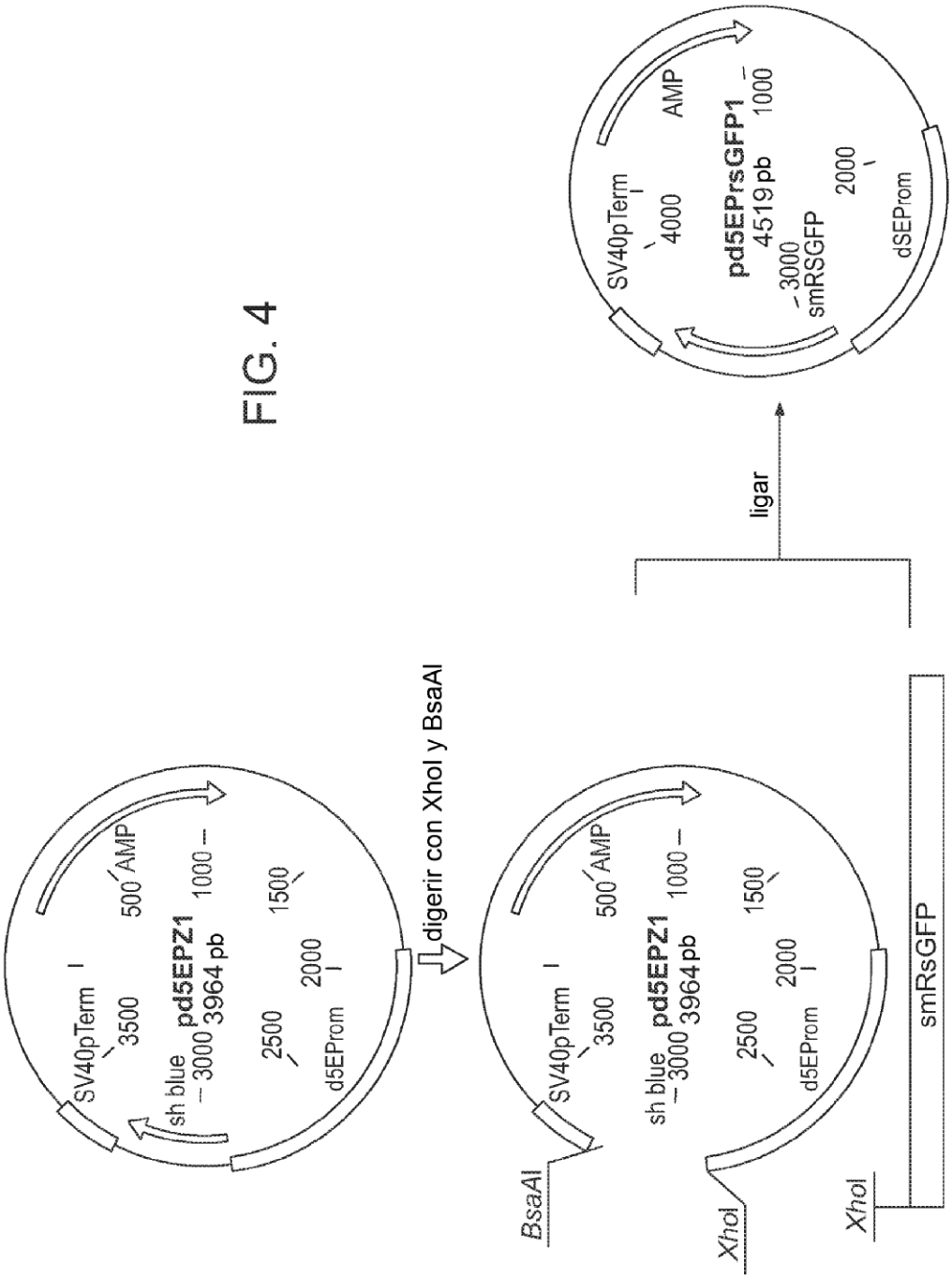

pd5EPZ1
3964 pb
AMP
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
SV40Term
sh blue
d5EProm
pSV40/Zeo
3421 pb
RBS
SV40pA
sh ble
EM7
pUC od
NcoI
NheI
XbaI
NcoI
d5EProm

FIG. 3

FIG. 4


SV40pTerm
3500
500
AMP
sh blue
3000
pd5EPZ1
3964 pb
1000
2500
1500
d5EProm
2000
digerir con XhoI y BsaAI
BsaAI
XhoI
XhoI
smRsGFP
ligar
SV40pTerm
4000
AMP
pd5EPrsGFP1
4519 pb
1000
3000
smRSGFP
2000
dSEProm

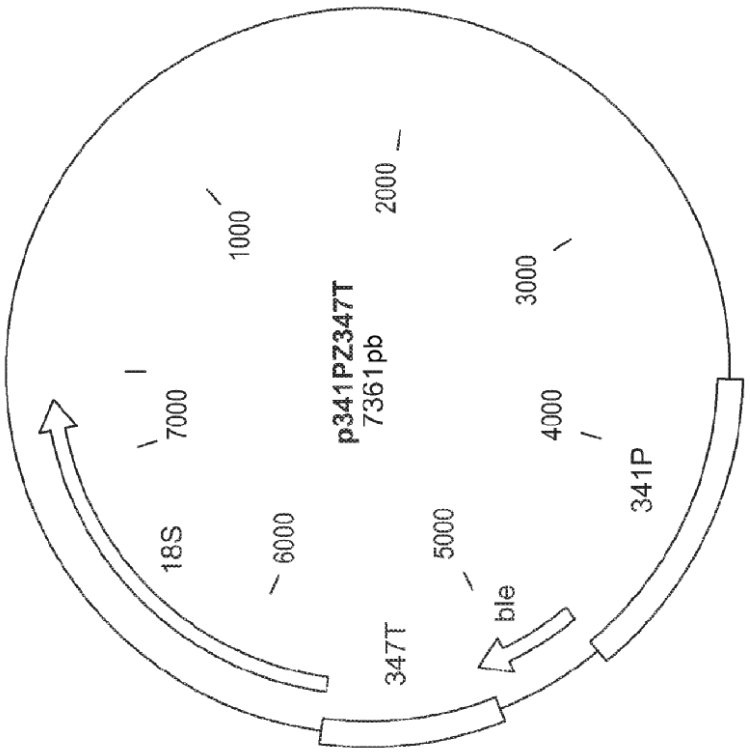

p341PZ347T
7361pb
1000
2000
3000
4000
341P
5000
ble
347T
6000
18S
7000
I

FIG. 6

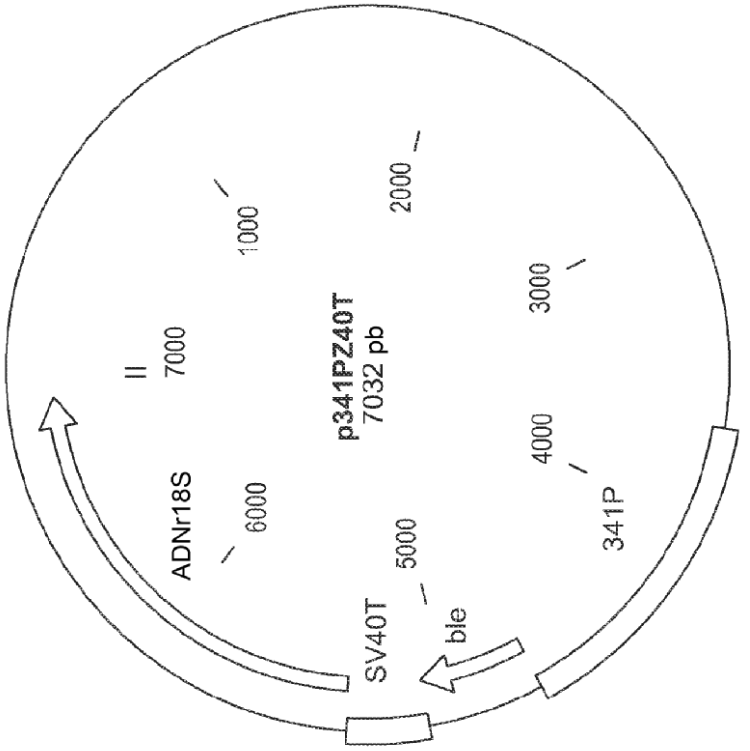

p341PZ40T
7032 pb
1000
2000
3000
4000
341P
5000
ble
SV40T
6000
ADNr18S
7000
II

FIG. 5

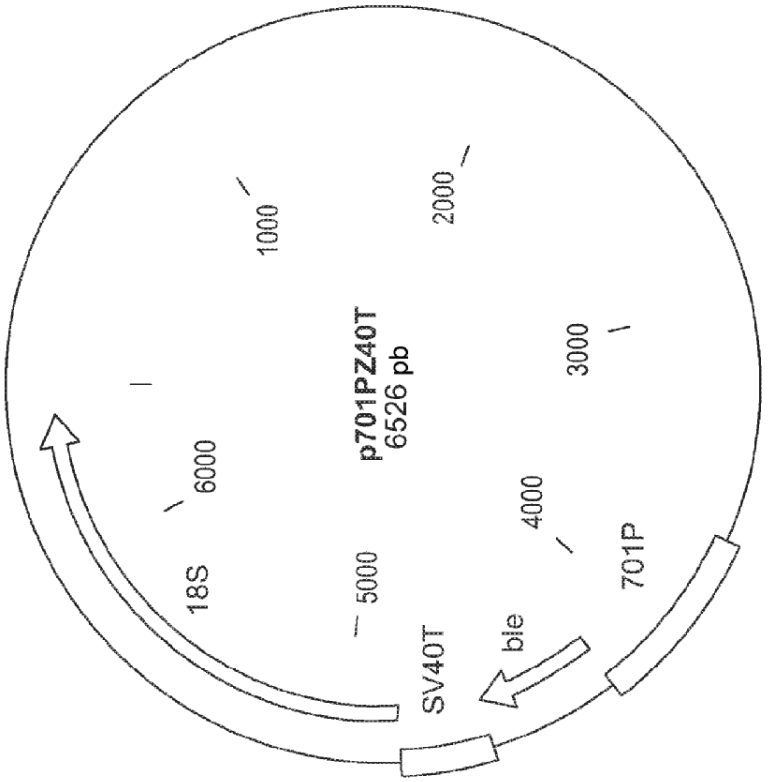

p701PZ40T
6526 pb
1000
2000
3000
4000
5000
6000
18S
SV40T
bie
701P

FIG. 8

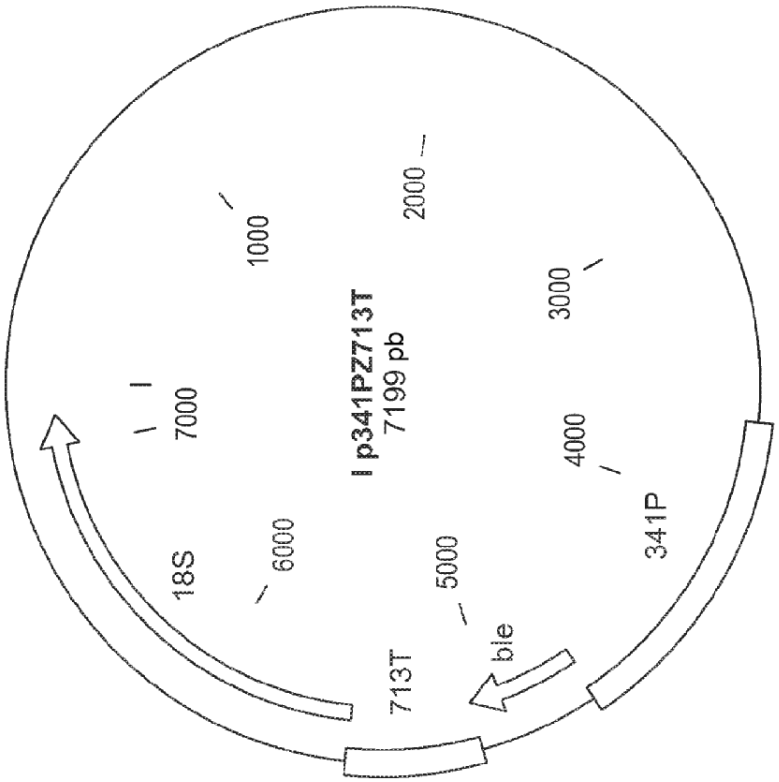

l p341PZ713T
7199 pb
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
18S
713T
bie
341P

FIG. 7

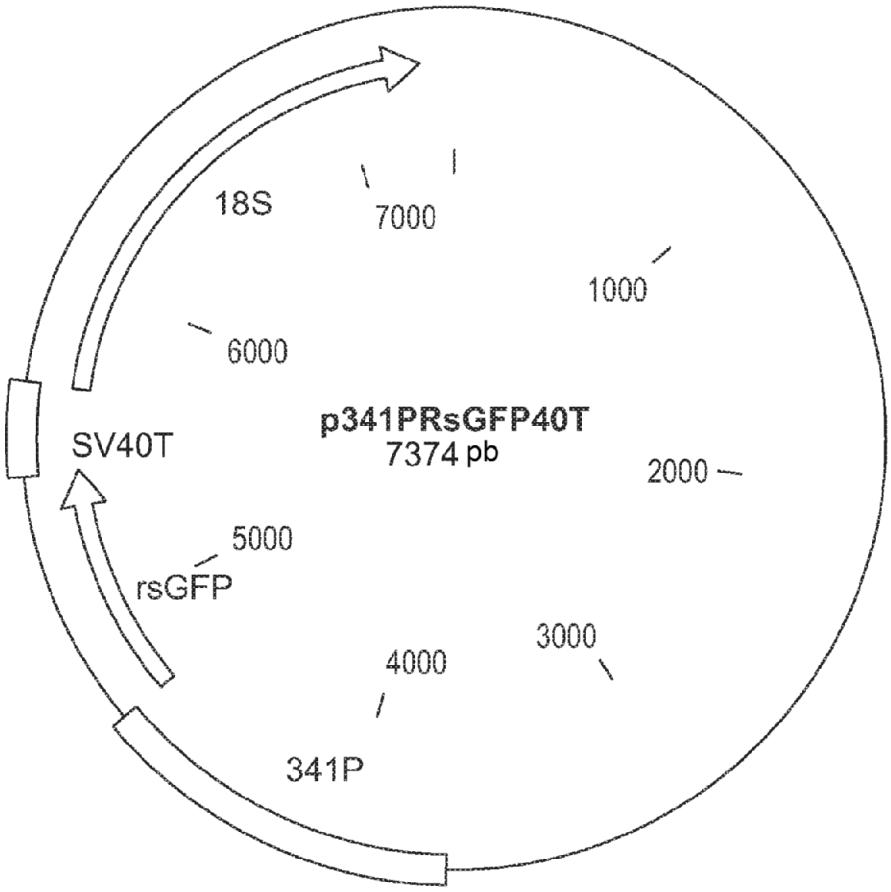
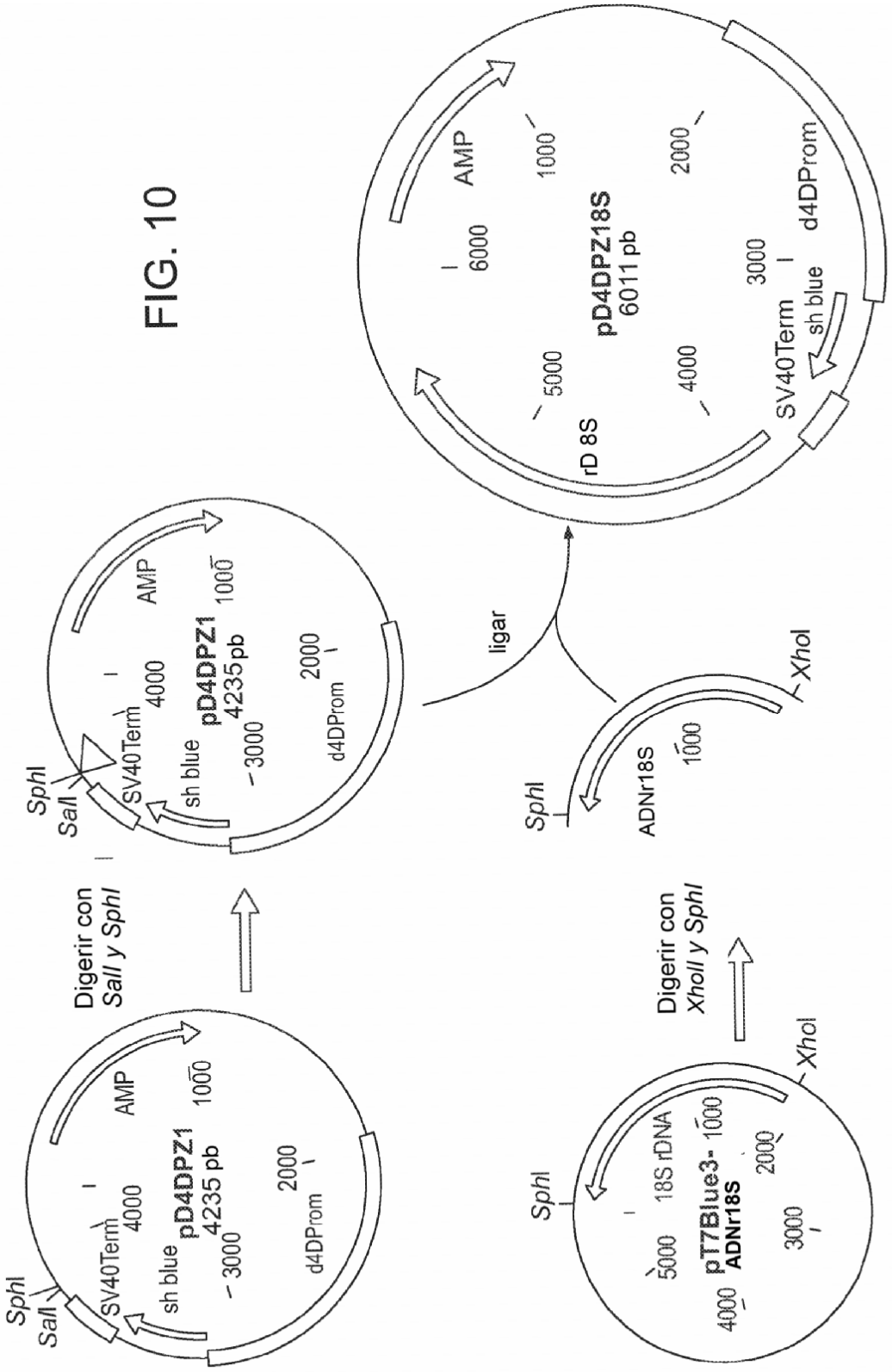

18S
7000
1000
6000
p341PRsGFP40T
7374 pb
SV40T
2000
5000
rsGFP
3000
4000
341P

FIG. 9

FIG. 10


SphI
SalI
SV40Term
4000
AMP
1000
pD4DPZ1
4235 pb
3000
sh blue
2000
d4DProm
Digerir con
SalI y SphI
SphI
SalI
SV40Term
4000
AMP
1000
pD4DPZ1
4235pb
3000
sh blue
2000
d4DProm
ligar
SphI
ADNr18S
1000
XhoI
Digerir con
XhoI y SphI
SphI
5000
18S rDNA
pT7Blue3-
ADNr18S
4000
1000
2000
3000
XhoI
6000
AMP
1000
2000
pD4DPZ18S
6011 pb
5000
rD 8S
4000
3000
SV40Term
sh blue
d4DProm

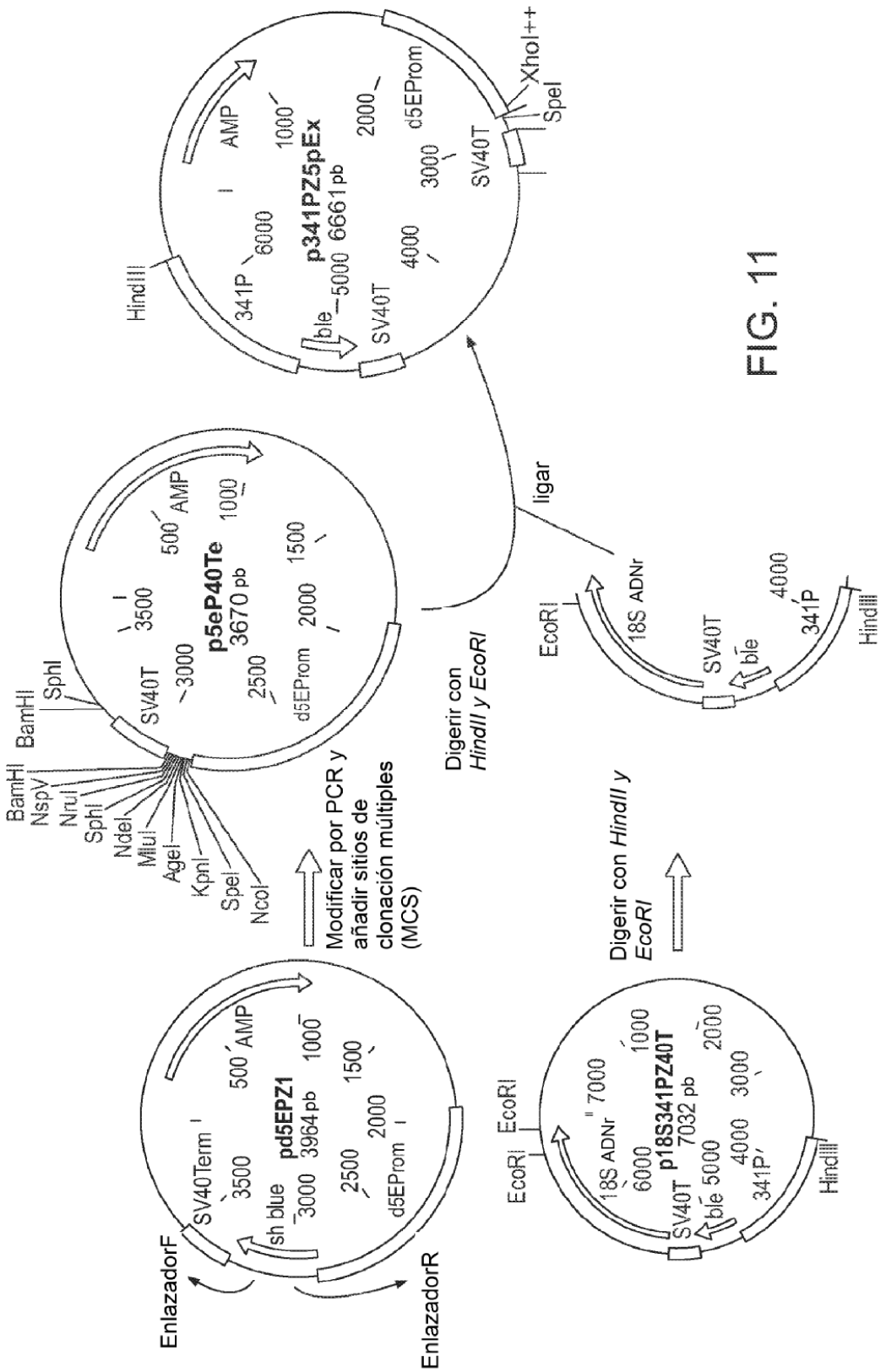

EnlazadorF
SV40Term
sh blue
pd5EPZ1
3964 pb
d5EProm
EnlazadorR
Modificar por PCR y añadir sitios de clonación múltiples (MCS)
BamHI
NspV
NruI
SphI
NdeI
MluI
AgeI
KpnI
SpeI
NcoI
p5eP40Te
3670 pb
SV40T
d5EProm
AMP
Digerir con HindII y EcoRI
ligar
HindIII
p341PZ5pEx
6661 pb
341P
ble
SV40T
d5EProm
AMP
XhoI++
SpeI
Digerir con HindII y EcoRI
EcoRI
18S ADNr
SV40T
ble
341P
HindIII
p18S341PZ40T
7032 pb

FIG. 11

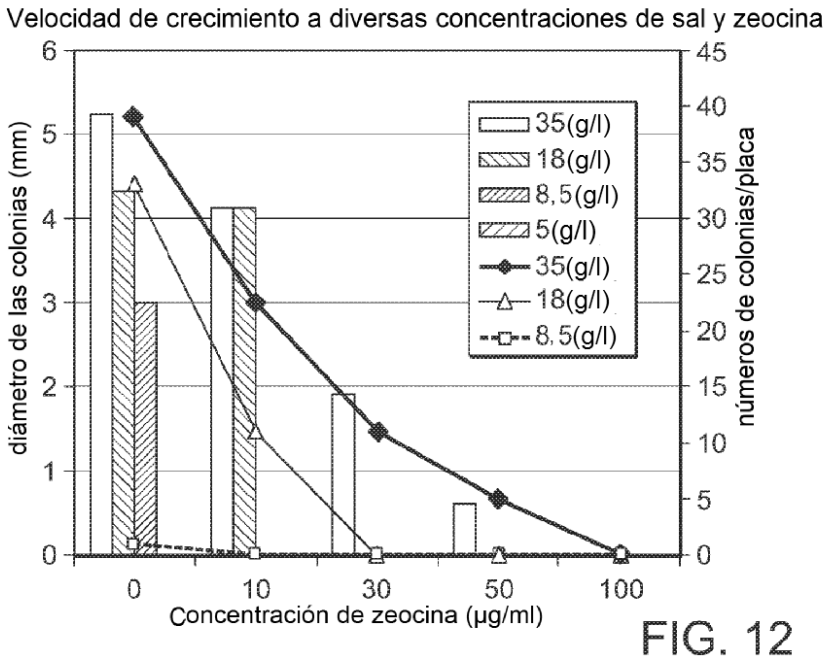


FIG. 12

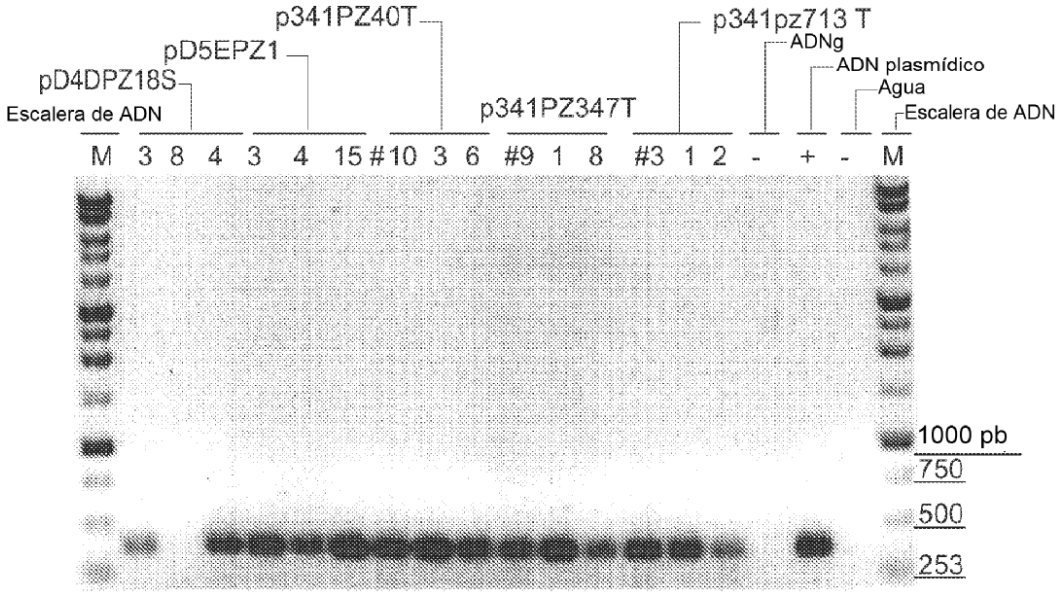


FIG. 13

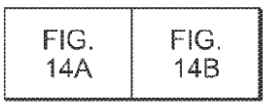


FIG. 14

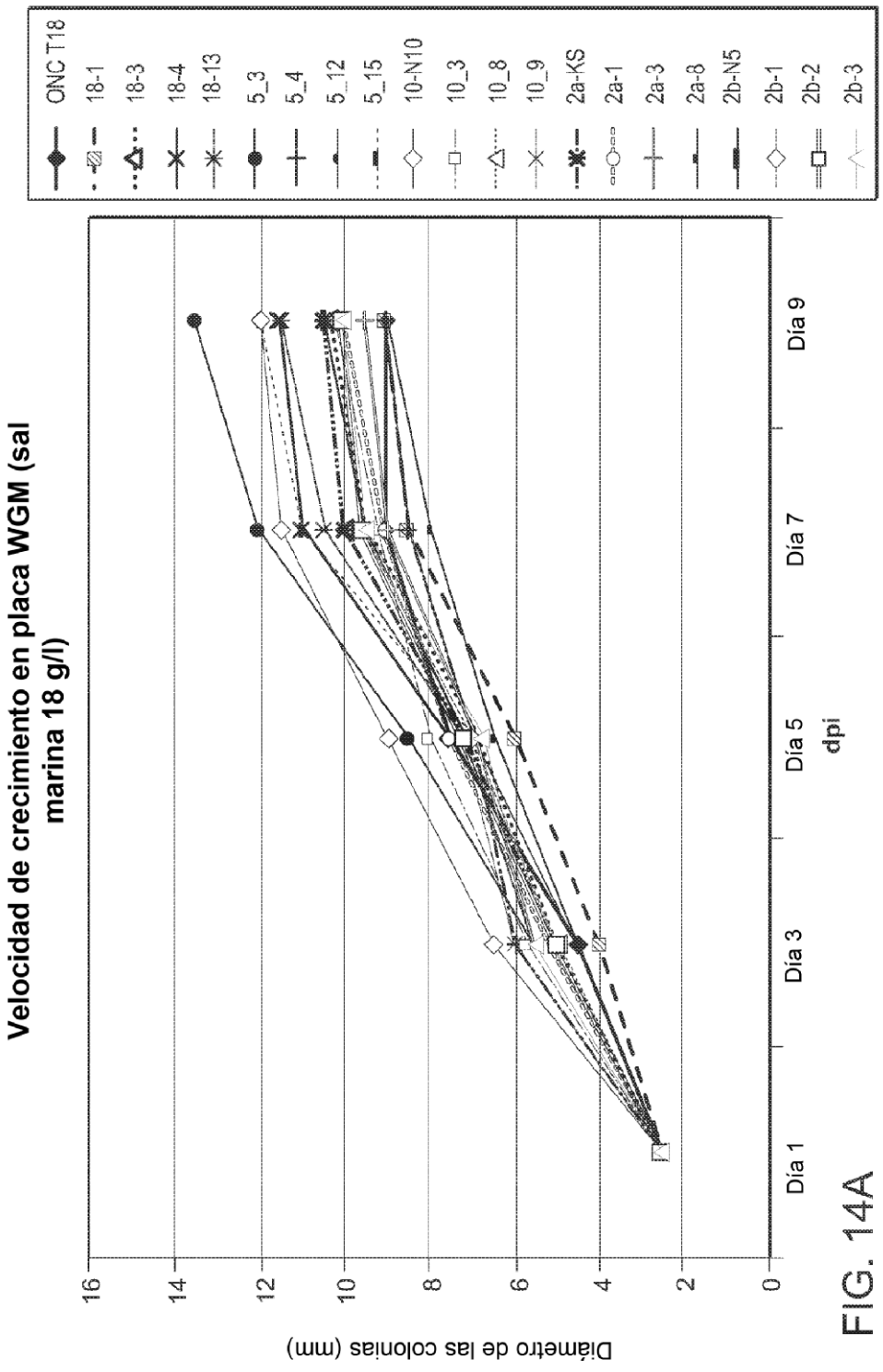

Velocidad de crecimiento en placa WGM (sal marina 18 g/l)
Diámetro de las colonias (mm)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Día 1
Día 3
Día 5
Día 7
Día 9
dpi
ONC T18
18-1
18-3
18-4
18-13
5_3
5_4
5_12
5_15
10-N10
10_3
10_8
10_9
2a-KS
2a-1
2a-3
2a-8
2b-N5
2b-1
2b-2
2b-3

FIG. 14A

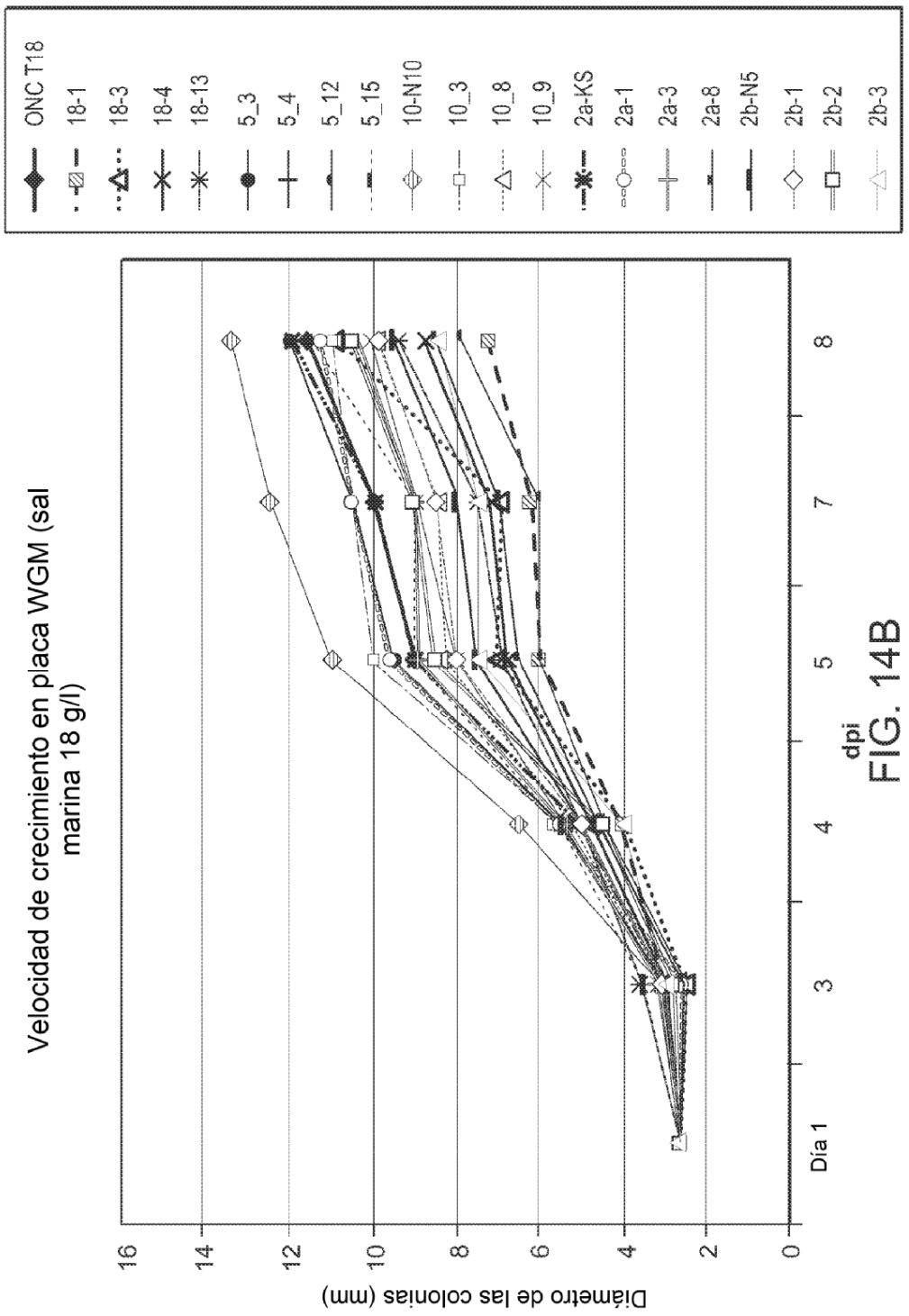

Velocidad de crecimiento en placa WGM (sal marina 18 g/l)
Diámetro de las colonias (mm)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Día 1
3
4
5
7
8
dpi
ONC T18
18-1
18-3
18-4
18-13
5_3
5_4
5_12
5_15
10-N10
10_3
10_8
10_9
2a-KS
2a-1
2a-3
2a-8
2b-N5
2b-1
2b-2
2b-3

FIG. 14B

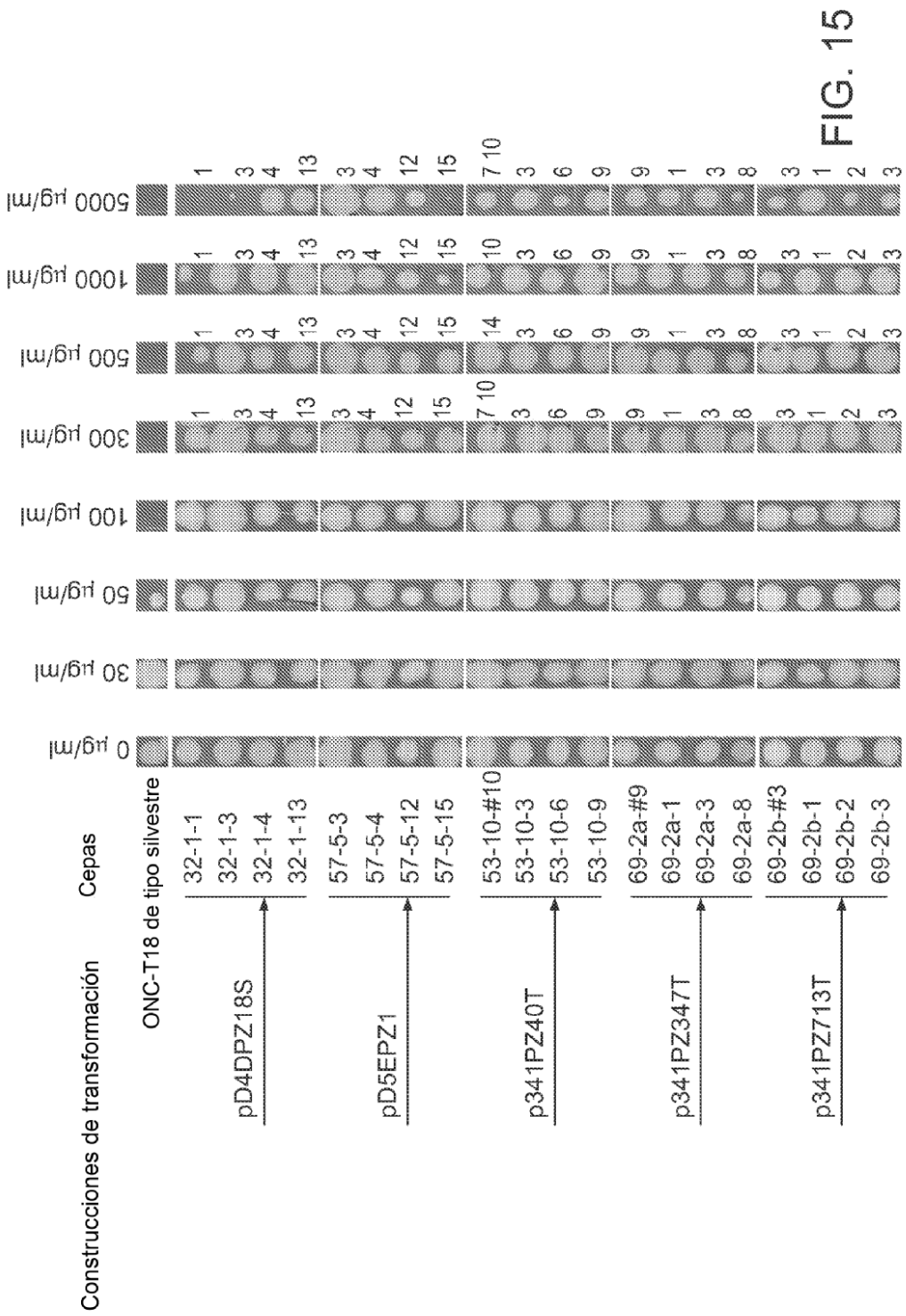

Construcciones de transformación
Cepas
ONC-T18 de tipo silvestre
pD4DPZ18S
32-1-1
32-1-3
32-1-4
32-1-13
pD5EPZ1
57-5-3
57-5-4
57-5-12
57-5-15
p341PZ40T
53-10-#10
53-10-3
53-10-6
53-10-9
p341PZ347T
69-2a-#9
69-2a-1
69-2a-3
69-2a-8
p341PZ713T
69-2b-#3
69-2b-1
69-2b-2
69-2b-3
0 µg/ml
30 µg/ml
50 µg/ml
100 µg/ml
300 µg/ml
500 µg/ml
1000 µg/ml
5000 µg/ml

FIG. 15

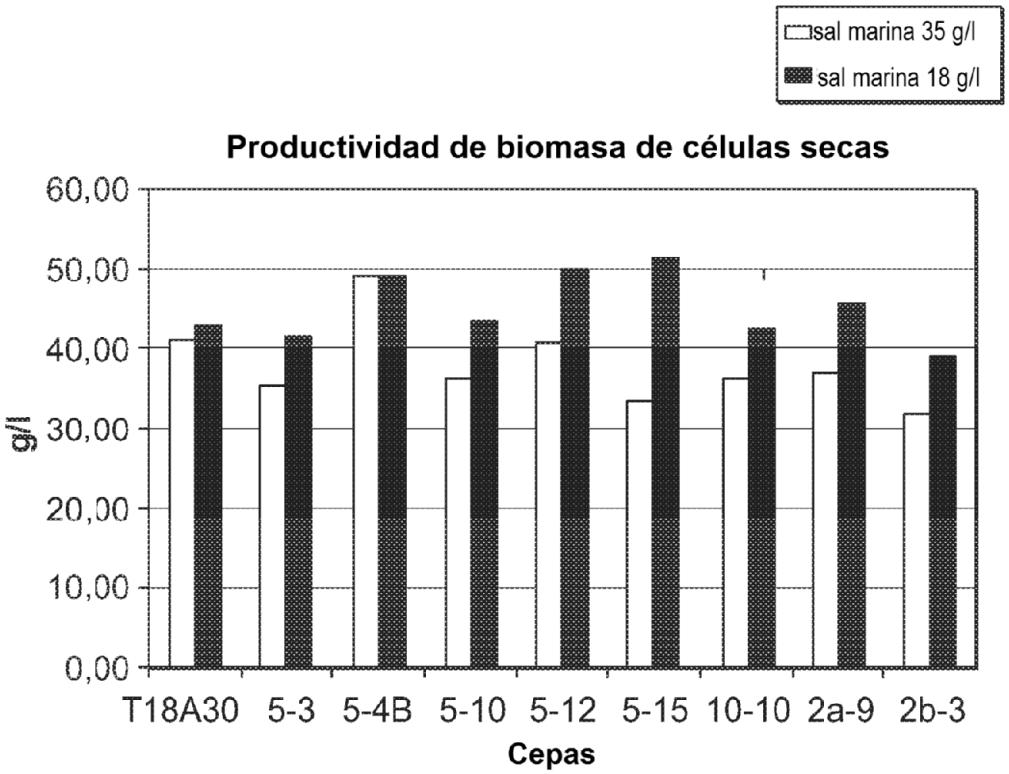

sal marina 35 g/l
sal marina 18 g/l
Productividad de biomasa de células secas
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
g/l
T18A30
5-3
5-4B
5-10
5-12
5-15
10-10
2a-9
2b-3
Cepas

FIG. 16

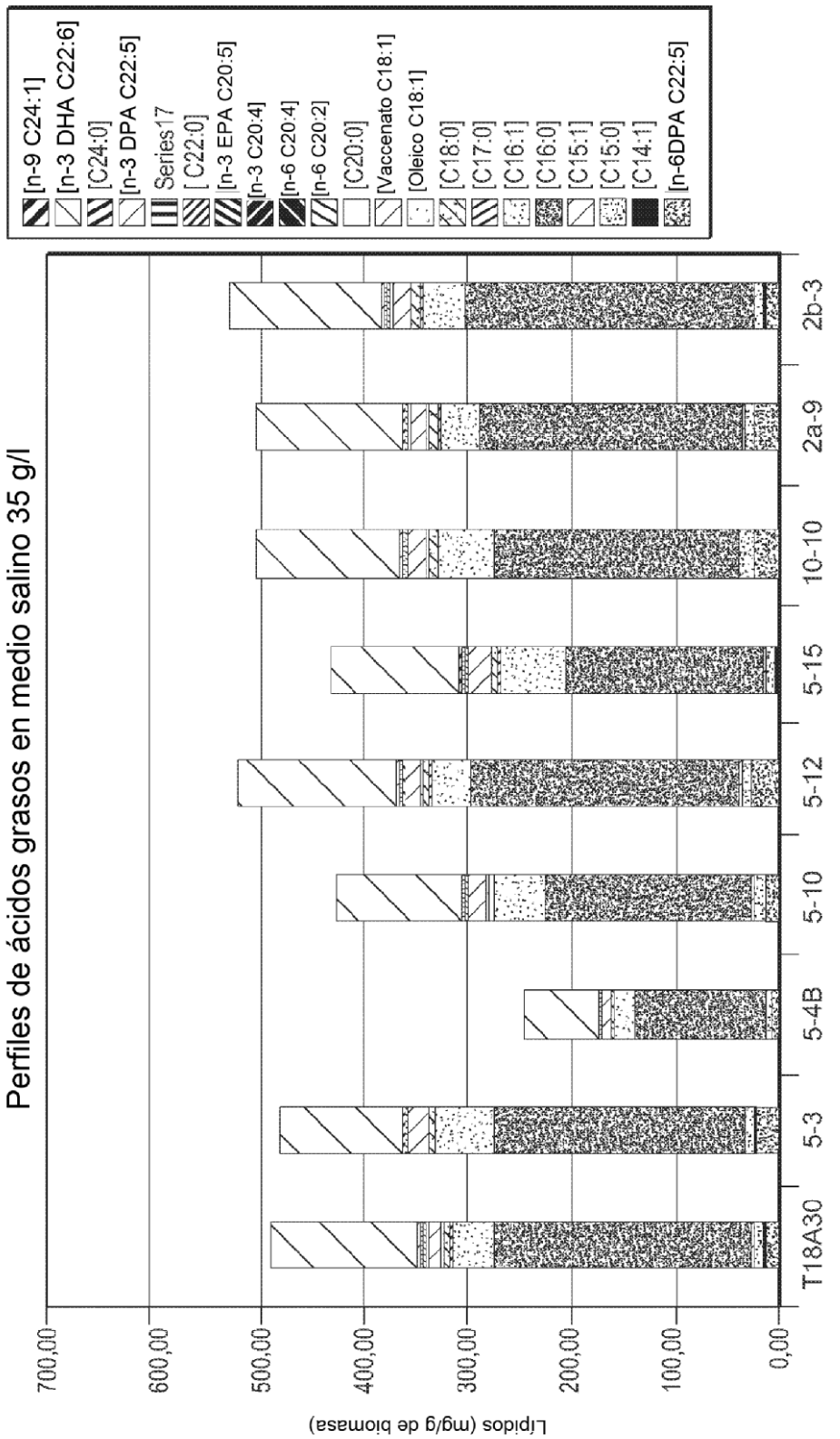

Perfiles de ácidos grasos en medio salino 35 g/l
Lípidos (mg/g de biomasa)
700,00
600,00
500,00
400,00
300,00
200,00
100,00
0,00
T18A30
5-3
5-4B
5-10
5-12
5-15
10-10
2a-9
2b-3
Cepas
[n-9 C24:1]
[n-3 DHA C22:6]
[C24:0]
[n-3 DPA C22:5]
Series17
[C22:0]
[n-3 EPA C20:5]
[n-3 C20:4]
[n-6 C20:4]
[n-6 C20:2]
[C20:0]
[Vaccenato C18:1]
[Oleico C18:1]
[C18:0]
[C17:0]
[C16:1]
[C16:0]
[C15:1]
[C15:0]
[C14:1]
[n-6DPA C22:5]

FIG. 17A

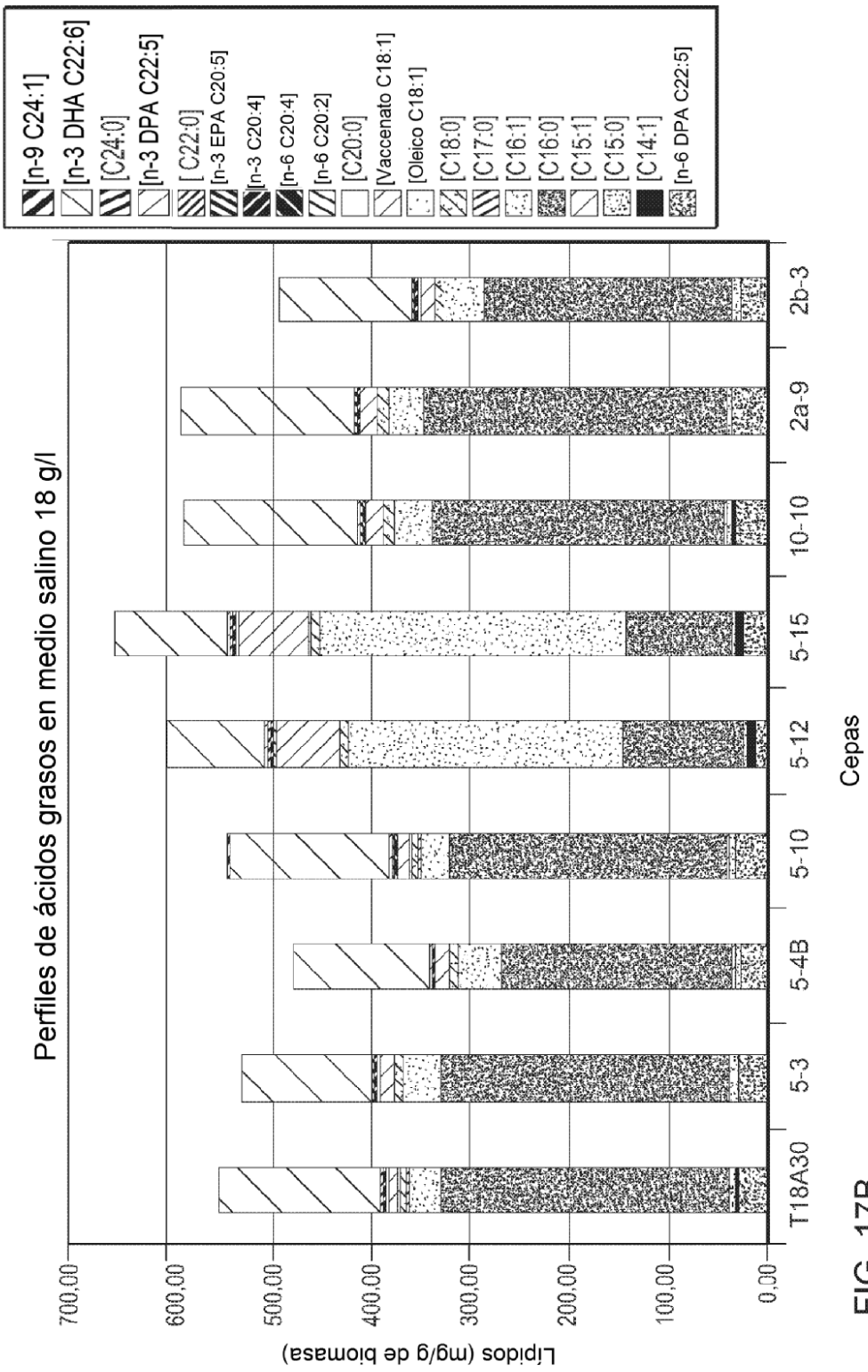

Perfiles de ácidos grasos en medio salino 18 g/l
Lípidos (mg/g de biomasa)
700,00
600,00
500,00
400,00
300,00
200,00
100,00
0,00
T18A30
5-3
5-4B
5-10
5-12
5-15
10-10
2a-9
2b-3
Cepas
[n-9 C24:1]
[n-3 DHA C22:6]
[C24:0]
[n-3 DPA C22:5]
[C22:0]
[n-3 EPA C20:5]
[n-3 C20:4]
[n-6 C20:4]
[n-6 C20:2]
[C20:0]
[Vaccenato C18:1]
[Oleico C18:1]
[C18:0]
[C17:0]
[C16:1]
[C16:0]
[C15:1]
[C15:0]
[C14:1]
[n-6 DPA C22:5]

FIG. 17B

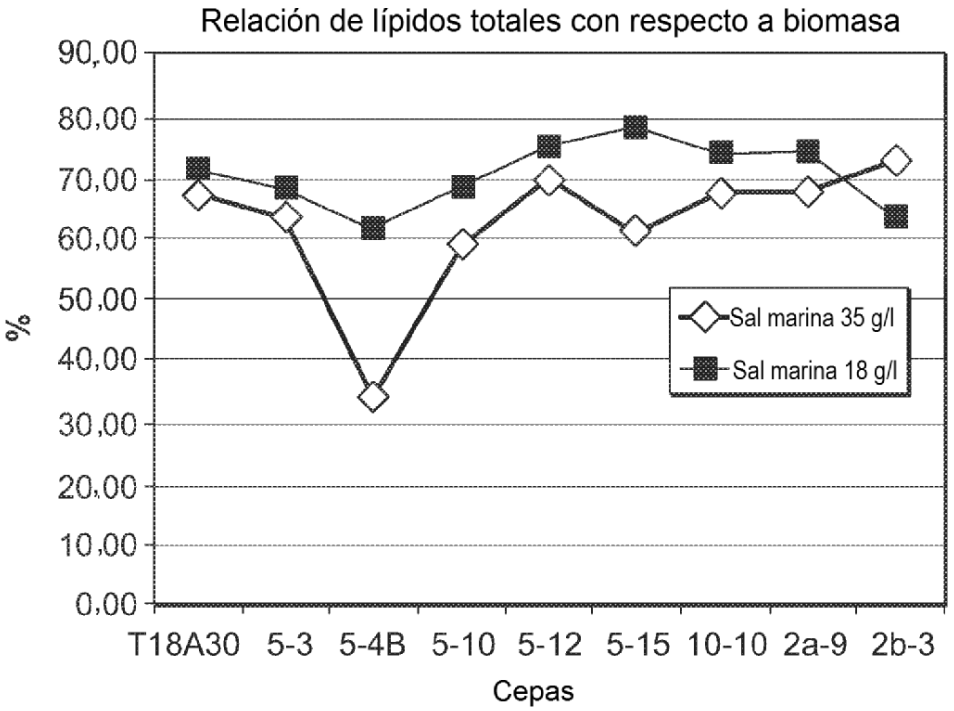


FIG. 17C

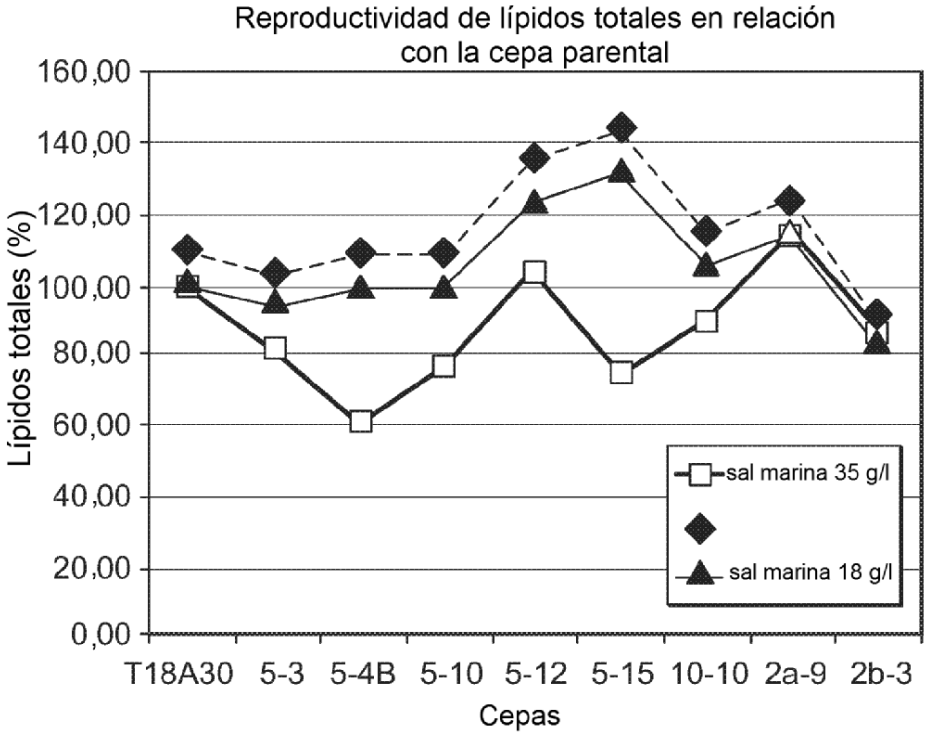


FIG. 17D

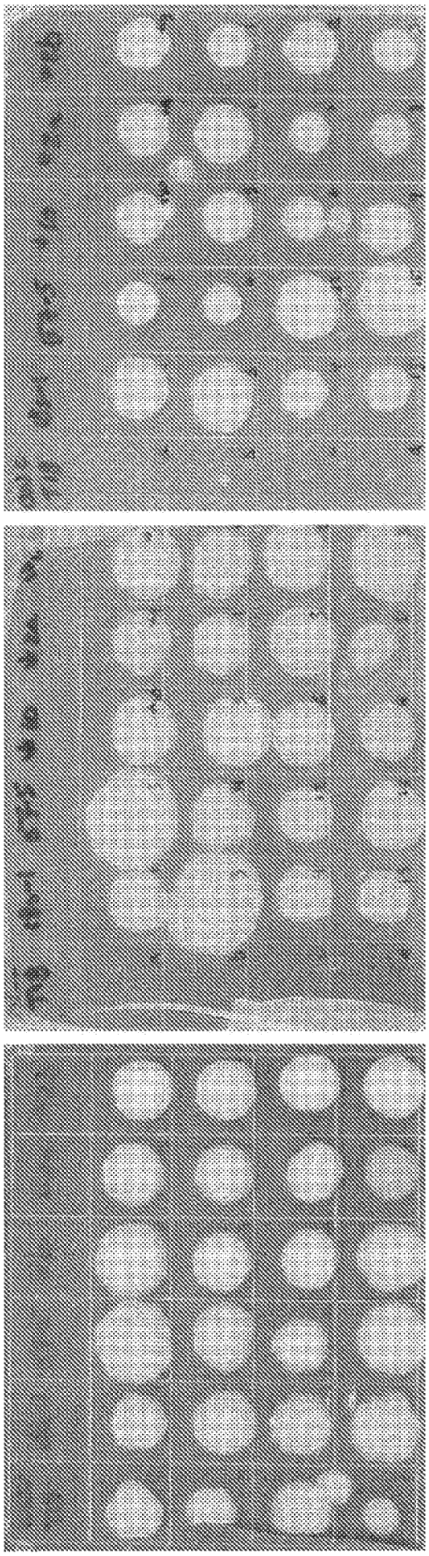


FIG. 18

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

• WO 2006003977 PCT **[0044]**
• US 7247461 A **[0067]**
• US 20090117194 A **[0089] [0198]**
• US 20090117194 A1 **[0177]**
• US 5340742 A **[0181]**
• US 6607900 B **[0181]**
• WO 2009010825 A **[0237] [0239]**
• WO 2007004553 PCT **[0239]**

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

• **CARMONA.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 2003, vol. 67 (4), 884-888 **[0002]**
• Fundamental Immunology. Raven Press, 1993 **[0046]**
• **SMITH; WATERMAN.** *Adv. Appl. Math.,* vol. 1081 (2), 482 **[0062]**
• **NEEDLEMAN ; WUNSCH.** *J. Mol. Biol.,* 1970, vol. 48, 443 **[0062]**
• **PEARSON ; LIPMAN.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA),* 1988, vol. 85, 2444 **[0062]**
• **D.J. STUDHOLME ; R. DIXON.** Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J. Bacteriol,* 2003, vol. 185, 1757-67 **[0100]**
• **R. MÜNCH et al.** *Bioinformatics,* 2005, vol. 21, 4187-4189 **[0100]**
• **L. GORDON et al.** *Bioinformatics,* 2003, vol. 19, 1964-71 **[0100]**
• **J.M. CARLSON et al.** *Nucl. Acids Res.,* 2007, vol. 35, W259-W264 **[0100]**
• **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 **[0111]**
• **KUNKEL et al.** *Methods Enzymol.,* 1987, vol. 154, 367 **[0111]**
• **ROMANOS, M. A. et al.** Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast,* 1992, vol. 8, 423-488 **[0117]**
• Heterologous gene expression in filamentous fungi. **VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. et al.** More Gene Manipulations in Fungi. Academic Press, 1991, 396-428 **[0117]**
• Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. **VAN DEN HONDEL, C. A M. J. J. ; PUNT, P. J et al.** Applied Molecular Genetics of Fungi. Cambridge University Press, 1991, 1-28 **[0117]**
• Gene Expression Systems, Fernandez. Academic Press, 1998 **[0117]**
• Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 **[0128]**
• Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, 1998 **[0128]**
• **UMEZAWA et al.** New antibiotics, bleomycin A and B. *Journal of Antibiot.,* 1966, vol. 19, 200-209 **[0130]**
• **SIKIC et al.** Bleomycin Chemotherapy. Academic Press, 1985 **[0130]**
• **POVIRK et al.** *Nucleic Acids Research,* 1977, vol. 4, 3573-3580 **[0130]**
• **SANFORD et al.** *Part. Sci. Technol.,* 1987, vol. 5, 27 **[0164]**
• **SANFORD, J. C.** *Trends Biotech.,* 1988, vol. 6, 299 **[0164]**
• **SANFORD, J. C.** *Physiol. Plant,* 1990, vol. 79, 206 **[0164]**
• **KLEIN et al.** *Biotechnology,* 1992, vol. 10, 268 **[0164]**
• **DYMECKI et al.** *J. Biol. Chem.,* 1992, vol. 267, 4815 **[0205]**
• **BOERSMA; VAN LEEUWEN.** *J. Neurosci. Methods,* 1994, vol. 51, 317 **[0205]**
• **GREEN et al.** *Cell,* 1982, vol. 28, 477 **[0205]**
• **ARNHEITER et al.** *Nature,* 1981, vol. 294, 278 **[0206]**
• **ALTSCHUL, S. F. ; GISH, W. ; MILLER, W. ; MYERS, E. W. ; LIPMAN, D. J.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol,* 1990, vol. 215 (3), 403-10 **[0343]**
• **APT, K.; A. GROSSMAN et al.** Stable nuclear transformation of the diatom<i>Phaeodactylum tricornutum</i&gt. *Molecular and General Genetics MGG,* 1996, vol. 252 (5), 572-579 **[0343]**
• **BERTHOLD, P. ; R. SCHMITT et al.** An Engineered Streptomyces hygroscopicus aph 7'' Gene Mediates Dominant Resistance against Hygromycin B in Chlamydomonas reinhardtii. *Protist,* 2002, vol. 153 (4), 401-412 **[0343]**
• **BOYNTON, J. ; N. GILLHAM et al.** Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles. *Science,* 1988, vol. 240 (4858), 1534-1538 **[0343]**
• **CHENG, Q. ; A. DAY et al.** The Klebsiella pneumoniae nitrogenase Fe protein gene (nifH) functionally substitutes for the chlL gene in Chlamydomonas reinhardtii. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 2005, vol. 329 (3), 966-975 **[0343]**
• **CHILD, S. J. ; M. K. MILLER et al.** Translational Control by an Upstream Open Reading Frame in the HER-2/neu Transcript. *Journal of Biological Chemistry,* 1999, vol. 274 (34), 24335-24341 **[0343]**
• **CROFT, M. T. ; M. MOULIN et al.** Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 2007, vol. 104 (52), 20770-20775 **[0343]**

• **DAVIS, S. J. ; VIERSTRA, R. D.** Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol,* 1998, vol. 36 (4), 521-8 **[0343]**
• **DAWSON, H. N. ; R BURLINGAME et al.** Stable Transformation of <i>Chlorella</i> : Rescue of Nitrate Reductase-Deficient Mutants with the Nitrate Reductase Gene. *Current Microbiology,* 1997, vol. 35 (6), 356-362 **[0343]**
• **DEBUCHY, R. ; S. PURTON et al.** The argininosuccinate lyase gene of Chlamydomonas reinhardtii: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J,* 1989, vol. 8 (10), 2803-2809 **[0343]**
• **DUMAS et al.** The three-dimensional structure of a bleomycin resistance protein. *EMBO J.,* 1994, vol. 242 (5), 595-601 **[0343]**
• **EPSHTEIN, V. ; A. S. MIRONOV et al.** The riboswitch- mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 2003, vol. 100 (9), 5052-5056 **[0343]**
• **FERNÁNDEZ, E. ; R SCHNELL et al.** Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of Chlamydomonas reinhardtii. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 1989, vol. 86 (17), 6449-6453 **[0343]**
• **FERRIS, P. J.** Localization of the nic-7, ac-29 and thi-10 Genes Within the Mating-Type Locus of Chlamydomonas reinhardtii. *Genetics,* 1995, vol. 141 (2), 543-549 **[0343]**
• **FISCHER, N. F. ; J. D. R. ROCHAIX.** The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga Chlamydomonas reinhardtii. *Molecular Genetics and Genomics,* 2001, vol. 265 (5), 888-894 **[0343]**
• **GATIGNOL et al.** Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Letters,* 1988, vol. 230, 171-175 **[0343]**
• **GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M.** Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of Chlamydomonas. *Nucleic Acids Research,* 1991, vol. 19 (15), 4083-4089 **[0343]**
• **HALLMANN, A. ; M. SUMPER.** Reporter genes and highly regulated promoters as tools for transformation experiments in Volvox carteri. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 1994, vol. 91 (24), 11562-11566 **[0343]**
• **HASNAIN, S. E. ; E. K. MANAVATHU et al.** DNA-mediated transformation of Chlamydomonas reinhardtii cells: use of aminoglycoside 3'-phosphotransferase as a selectable marker. *Molecular and Cellular Biology,* 1985, vol. 5 (12), 3647-3650 **[0343]**
• **HIGUCHI, R. ; KRUMMEL, B. ; SAIKI, R. K.** A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res,* 1988, vol. 16 (15), 7351-67 **[0343]**
• **HOLLINGSHEAD, S. ; D. VAPNEK.** Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/ spectinomycin adenyltransferase. *Plasmid,* 1985, vol. 13 (1), 17-30 **[0343]**
• **HOU, C. T.; J.-F. SHAW.** Biocatalysis and Biomolecular Engineering. John Wiley & Sons, Inc, 2010 **[0343]**
• **HUANG, J. ; JIANG, X. ; ZHANG, X. ; CHEN, W. ; TIAN, B. ; SHU, Z. ; HU, S.** Expressed sequence tag analysis of marine fungus Schizochytrium producing docosahexaenoic acid. *J Biotechnol,* 2008, vol. 138 (1-2), 9-16 **[0343]**
• **JAIN, R. ; RAGHUKUMAR, S. ; SAMBAIAH, K. ; KUMON, Y. ; NAKAHARA, T.** Docosahexaenoic acid accumulation in thraustochytrids: search for the rationale. *Mar Biol,* 2007, vol. 151, 1657-1664 **[0343]**
• **JEPSON et al.** *Pesticide Science,* 1998, vol. 54 (4), 360-367 **[0343]**
• **KILIAN, O. ; C. S. E. BENEMANN et al.** High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga Nannochloropsis sp. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 2011 **[0343]**
• **KINDLE, K. L.** High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 1990, vol. 87 (3), 1228-1232 **[0343]**
• **KINDLE, K. L. ; K. L. RICHARDS et al.** Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in Chlamydomonas reinhardtii. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 1991, vol. 88 (5), 1721-1725 **[0343]**
• **LEONARD, A. ; PEREIRA, S. ; SPRECHER, H. ; HUANG, Y.-S.** Elongation of long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research,* 2004, vol. 43, 36-54 **[0343]**
• **LI et al.** *Plant Sciences,* 2005, vol. 169 (3), 463-469 **[0343]**
• **MANUELL, A. L. ; M. V. BELIGNI et al.** Robust expression of a bioactive mammalian protein in Chlamydomonas chloroplast. *Plant Biotechnology Journal,* 2007, vol. 5 (3), 402-412 **[0343]**
• **MESLET-CLADIÈRE, L. ; O. VALLON.** Novel Shuttle Markers for Nuclear Transformation of the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii. *Eukaryotic Cell,* 2011, vol. 10 (12), 1670-1678 **[0343]**