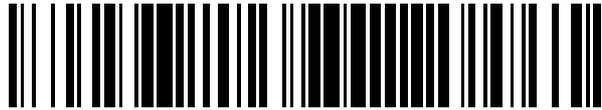


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 997**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2012 PCT/IB2012/000528**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12120375**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2012 E 12755051 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2683824**

54 Título: **Microorganismos traustoquitrídios modificados genéticamente**

30 Prioridad:

07.03.2011 US 201161449848 P

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

21.08.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZHANG, SHUOCHENG y
ARMENTA, ROBERTO**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 678 997 T3

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

Microorganismos traustoquitridios modificados genéticamente

5 LISTADO DE SECUENCIAS

La presente memoria descriptiva hace referencia a un Listado de Secuencias (titulado "Sequence_Listing.txt," creado el 7 de marzo de 2012 y de 108 kilobytes) como se desvela en la solicitud internacional presentada. Todo el contenido del Listado de Secuencias se incorpora en el presente documento por referencia.

10

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se refiere a Traustoquitridios alterados genéticamente que pueden proporcionar fuentes útiles de compuestos y agentes.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

Se ha reconocido que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) tienen efectos beneficiosos sobre la salud. La fuente principal de los suplementos nutricionales es el aceite de las especies de peces que tienen altas concentraciones de AGPI, tales como la anchoa, la sardina, el salmón, la lacha, el arenque y el atún. Sin embargo, la falta de fiabilidad de las fuentes y la variabilidad en la calidad y/o cantidad del AGPI aislado de peces significa que sigue habiendo una necesidad de fuentes de AGPI alternativas.

Los traustoquitridios 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 traustoquitridios son capaces de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono y nitrógeno para su crecimiento, lo que indica un potencial para el cultivo industrial con nutrientes de bajo coste.

30 Sigue habiendo una necesidad de fuentes mejoradas de AGPI y otros compuestos útiles.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención abarca la apreciación de ciertos problemas con las fuentes disponibles de AGPI y otros compuestos y agentes útiles. La presente invención abarca el reconocimiento de que los Traustoquitridios genéticamente alterados, ya sea por mutagénesis clásica o de otro modo, pueden proporcionar fuentes útiles de AGPI y otros compuestos y agentes.

La presente invención proporciona, en diversas realizaciones, sistemas para modificar por ingeniería genética los Traustoquitridios, así como Traustoquitridios modificados por ingeniería genética que encuentran diversos usos (por ejemplo, la producción de AGPI y/o la producción de biocombustibles).

En ciertas realizaciones, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas como se definen en las reivindicaciones que comprende el promotor y el terminador de un gen de *Thraustochytrium*. El promotor en las moléculas de ácido nucleico aisladas proporcionadas es un promotor de tubulina que comprende secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 10). Los terminadores de ejemplo en las moléculas de ácido nucleico aisladas proporcionadas incluyen, pero no se limitan a, un terminador de tubulina (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 18).

En algunas realizaciones, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una secuencia heteróloga unida operativamente al promotor de un gen de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* como se define en las reivindicaciones y el terminador de un gen de Traustoquitridio o *Thraustochytrium*. En algunas realizaciones, la secuencia heteróloga codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas proporcionadas comprenden además un gen de resistencia a la zeocina.

En ciertas realizaciones, se proporcionan células hospedadoras que comprenden uno o más ácidos nucleicos aislados proporcionados como se definen en las reivindicaciones.

60

Se desvelan métodos de mutagénesis de células de un microorganismo (por ejemplo, Traustoquitridio o *Thraustochytrium*) que comprenden las etapas de: cultivar células del microorganismo en un medio, comprendiendo el medio zeocina a una concentración a la que la zeocina destruye el 60-80 % de las células y aislar una subpoblación de células que sobreviven al cultivo, mutando de ese modo células de un microorganismo.

65

En ciertas realizaciones, se proporcionan células de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* que contienen una o más modificaciones en uno o más genes que codifican un polipéptido enzimático o parte de un complejo polipeptídico enzimático implicado en la vía biosintética de AGPI del Traustoquitridio o *Thraustochytrium*. En algunas realizaciones, la modificación o modificaciones aumentan la producción de uno o más AGPI por la célula modificada
 5 en comparación con una célula de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* de referencia cuando las células modificadas y de referencia se cultivan en condiciones comparables. En algunas realizaciones, el polipéptido enzimático o los complejos de polipéptido enzimático se seleccionan entre el grupo que consiste en la ácido graso sintasa (FAS), $\Delta 5$ elongasa, $\Delta 12$ elongasa, $\Delta 4$ desaturasa y policétido AGPI sintasa (PKS). En algunas realizaciones, el uno o más AGPI se seleccionan entre el grupo que consiste en ácido alfa-linolénico ("ALA"), ácido araquidónico ("ARA"), ácido
 10 docosahexaenoico ("DHA"), ácido docosapentaenoico ("DPA"), ácido eicosapentaenoico ("EPA"), ácido gamma-linolénico ("GLA") y ácido linoleico ("LA"). En algunas realizaciones, la enzima o complejos enzimáticos se seleccionan entre el grupo que consiste en policétido AGPI sintasa (PKS), $\Delta 9$ desaturasa, elongasa y omega-3 desaturasa.

15 Se desvelan métodos para la transformación de una célula de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* que comprende las etapas de: (a) proporcionar una célula de *Thraustochytrium* o *Thraustochytrium* competente; (b) entregar un ácido nucleico recombinante en la célula de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* competente, en la que el ácido nucleico recombinante comprende un marcador seleccionable; y (c) cultivar la célula de Traustoquitridio o
 20 *Thraustochytrium* competente en un medio de cultivo que contiene un agente de selección que reduce el crecimiento de las células sin el marcador seleccionable. El marcador seleccionable puede ser un gen de resistencia a antibiótico. El agente de selección puede ser un antibiótico. Por ejemplo, el antibiótico puede ser zeocina. La zeocina puede estar presente a una concentración superior a 50 $\mu\text{g/ml}$ (por ejemplo, aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$).

En algunos métodos desvelados para la transformación de una célula de Traustoquitridio o *Thraustochytrium*, el
 25 ácido nucleico recombinante comprende adicionalmente un casete de expresión génica distinto del marcador seleccionable.

Los métodos desvelados para transformar una célula de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* puede comprender
 30 adicionalmente una etapa de aislar una célula de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* competente que contiene el marcador seleccionable.

La etapa de entrega puede comprender la entrega biolística de partículas recubiertas con el ácido nucleico recombinante. Por ejemplo, pueden usarse partículas que comprenden oro en la entrega biolística.

35 El medio de cultivo puede contener un nivel de sal entre una concentración de sal inferior y una concentración de sal superior. La concentración inferior puede ser de 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. La concentración de sal superior puede ser
 40 de 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. La concentración de sal puede ser de 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
 45 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). La sal puede ser o puede comprender una sal seleccionada entre el grupo que consiste en sales de sodio (por ejemplo, sal de mar, cloruro de sodio, sal de mesa, sulfato de sodio, etc.), sales de potasio y combinaciones de los mismos. La sal puede ser o puede comprender una
 50 sal no de cloruro. La sal puede ser o puede comprender una sal de sodio no de cloruro.

Se desvelan células de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* competentes para la transformación genética.

Se desvelan células de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* transformadas con un ácido nucleico recombinante.

55 Se desvelan métodos de cultivo de células de Traustoquitridio o *Thraustochytrium*, comprendiendo el método: hacer crecer un cultivo que comprende células de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* en un primer conjunto de condiciones en las que la biomasa aumenta (y opcionalmente otras características aumentan o disminuyen también); cambiar el primer conjunto de condiciones de cultivo a un segundo conjunto de condiciones en el que la productividad de lípidos aumenta, en el que el cambio comprende uno o más de: (a) reducir las concentraciones de
 60 oxígeno desde una primera concentración de oxígeno a una segunda concentración de oxígeno; (b) aumentar la relación C:N desde una primera relación C:N a una segunda relación C:N; (c) reducir la temperatura desde una primera temperatura a una segunda temperatura; y combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos como se definen en las reivindicaciones de proporcionar un
 65 AGPI, comprendiendo el método: proporcionar una célula de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* que está

modificada en comparación con una célula de Traustozitridio o *Thraustochytrium* de referencia en que 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 Traustozitridio o *Thraustochytrium* modificada en las 5 condiciones y durante un tiempo suficiente para conseguir la producción del uno o más AGPI.

La etapa de proporcionar comprende proporcionar una célula de Traustozitridio o *Thraustochytrium* que contiene al menos un promotor de Traustozitridio o *Thraustochytrium* modificado por ingeniería genética.

10 La etapa de proporcionar comprende proporcionar una célula de Traustozitridio o *Thraustochytrium* que contiene al menos un terminador de Traustozitridio o *Thraustochytrium* modificado por ingeniería genética.

La etapa de proporcionar comprende proporcionar una célula de Traustozitridio o *Thraustochytrium* que está modificada con respecto a una célula de Traustozitridio o *Thraustochytrium* de referencia en que la célula de 15 Traustozitridio o *Thraustochytrium* modificada contiene al menos un polipéptido heterólogo expresado. En algunas realizaciones, la al menos una proteína heteróloga se expresa a partir de un gen que está unido operativamente a un promotor de Traustozitridio o *Thraustochytrium* modificado por ingeniería genética, un terminador de Traustozitridio o *Thraustochytrium* modificado por ingeniería genética o ambos. En algunas realizaciones, el al menos un polipéptido heterólogo comprende al menos un polipéptido de biosíntesis de AGPI heterólogo.

20 En algunas realizaciones, la modificación genética comprende al menos una mutación de nucleótidos que aumenta la expresión o actividad de polipéptido de biosíntesis de AGPI. En algunas realizaciones, el polipéptido de biosíntesis de AGPI cuya expresión o actividad aumenta es un polipéptido de producción de AGPI endógeno. En algunas realizaciones, el polipéptido de producción de AGPI cuya expresión o actividad aumenta es un polipéptido de 25 biosíntesis de AGPI heterólogo.

En ciertas realizaciones, se proporcionan células de Traustozitridio o *Thraustochytrium* modificadas por ingeniería genética que expresan un polipéptido de producción de AGPI heterólogo.

30 En ciertas realizaciones, se proporcionan células de Traustozitridio o *Thraustochytrium* modificadas por ingeniería genética que producen al menos un AGPI a un nivel al menos un 36 % superior al de una célula de Traustozitridio o *Thraustochytrium* no modificada por ingeniería genética cuando las células modificadas por ingeniería genética y no modificadas por ingeniería genética se cultivan en condiciones comparables.

35 Se desvelan composiciones que comprenden: al menos un AGPI; y uno o más componentes de una célula de Traustozitridio o *Thraustochytrium* que contiene un gen de resistencia a antibiótico o es progenie de una célula de Traustozitridio o *Thraustochytrium* que contiene un gen de resistencia a antibiótico. El gen de resistencia a antibiótico puede ser un gen de resistencia a zeocina.

40 Se desvelan composiciones que comprenden: al menos un AGPI; y uno o más componentes de (a) una célula de Traustozitridio o *Thraustochytrium* que se ha cultivado en o sobre un medio que comprende zeocina a una concentración a la que la zeocina destruye el 60-80 % de las células o (b) una progenie de una célula de Traustozitridio o *Thraustochytrium* que se ha cultivado en o sobre un medio que comprende zeocina a una 45 concentración a la que zeocina destruye el 60-80 % de las células.

Se exponen detalles de una o más realizaciones de la invención en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos y a partir de las reivindicaciones.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra una representación de las posibles vías biosintéticas de AGPI en *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 ("ONC-T18", n° de acceso ATCC: PTA-6245; Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/IB2006/003977). FAS, ácido graso sintasa; EL, elongasa; $\Delta 8$, $\Delta 8$ desaturasa; $\Delta 5$, $\Delta 5$ desaturasa; $\Delta 4$, $\Delta 4$ desaturasa; $\omega 3$, omega-3 55 desaturasa; C14:0, ácido mirístico; C16:0, ácido palmítico; C16:1n-7, ácido palmitoleico; C18:0, ácido esteárico; C18:1n-7, ácido cis-vaccénico; C18:1n-9, ácido oleico; C18:2n-6 (LA), ácido linoleico; C18:3n-3 (ALA), ácido α -linolénico; C18:3n-6 (GLA), γ -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; 60 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, policétido AGPI sintasa. n-6 denota la vía biosintética de AGPI omega-6 y n-3 denota la vía biosintética de AGPI omega-3.

La Fig. 2 es una representación esquemática de la generación del vector de expresión génica pd4DPZ1.

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 pd5EPsGFP1, así como las construcciones del plásmido intermedio producido mediante 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.

5 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 mediante los procesos.

10 La Fig. 11 es una representación esquemática de la generación del vector de expresión génica p341PZ5EpEx y las construcciones de los plásmidos intermedios producidos mediante los procesos.

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

15 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 la zeocina se amplificaron a partir del ADN genómico de cada cepa transformante con la técnica de PCR usando cebadores específicos del gen resistente a la zeocina.

La Fig. 14A y 14B ilustran las tasas de crecimiento de cepas de ONC-T18 de tipo silvestre y diversas cepas de ONC-T18 transformadas en las placas de agar del medio de crecimiento (ONC-T18-GM0) que contiene sal marina a la concentración de 18 g/l o 35 g/l. Se observó un µl de las suspensiones celulares en las placas de agar ONC-T18-GM0 y los diámetros de las colonias se midieron a diario.

25 La Fig. 15 ilustra la resistencia a zeocina de cepas ONC-T18 transformadas con los ADN plasmídicos en los que el gen de resistencia a zeocina es accionado por diversos promotores y terminadores del gen de ONC-T18, en las placas de agar de medio de crecimiento (ONC-T18-GM0). Los resultados muestran que todas las cepas transformantes de ONC-T18 son resistentes al antibiótico zeocina, pero no las cepas de ONC-T18 de tipo silvestre. Algunas cepas transformantes son altamente resistentes a zeocina (por ejemplo, 5,000 mg/ml).

La Fig. 16 ilustra la productividad de biomasa de la de tipo silvestre y diversas cepas ONC-T18 transformadas en medio de crecimiento 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 salinidad inferior, todas las cepas sometidas a ensayo produjeron más biomasa que a una salinidad más alta.

35 La Fig. 17 ilustra las productividades de DHA de las cepas de ONC-T18 de tipo silvestre y diversas cepas de ONC-T18 transformadas en el medio de crecimiento líquido (ONC-T18-GM0) que contiene sal marina artificial a la concentración de 18 g/l o 35 g/l. Los resultados muestran que las productividades de DHA de las cepas transformadas se diferenciaron en una amplia gama; la mayoría de las cepas produjo un alto rendimiento de DHA a menor salinidad que a mayor salinidad y las cepas de producción de alto rendimiento de DHA pueden aislarse a partir de la selección de cultivos de colonias individuales.

40 La Fig. 18 ilustra los perfiles de ácidos grasos y las productividades de lípido total de las cepas transformadas que crecieron en medios ONC-T18-GM0 líquidos con diferentes salinidades. Esta figura ilustra la estabilidad del transgén *ble* en cepas ONC-T18 transformadas.

45 La Fig. 19 ilustra una comparación de la biomasa, los lípidos y las productividades de DHA de una cepa de ONC-T18 mutada y una cepa parental.

DEFINICIONES

50 **Competente:** El término "competente", 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 puede inducirse artificialmente (por ejemplo, en un laboratorio) para que sea competente. En algunas realizaciones, 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

55 adicionalmente, una célula puede ser competente para más de un método de transformación. Las células competentes pueden obtenerse a partir de cualquiera de una diversidad de fuentes. Por ejemplo, pueden aislarse de la naturaleza, prepararse en el laboratorio, y/o comprarse en el mercado. En algunas realizaciones, la competencia de una célula es transitoria. En algunas realizaciones, la competencia de una célula es permanente.

60 **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 no limitada a, 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 normalmente

65 contenidos en una célula pueden diferir dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, algunos orgánulos están

presentes solo en las células eucariotas. Algunos orgánulos solo están presentes en las células vegetales y algunos solo están presentes en las células animales. Son ejemplos no limitantes de tipos de orgánulos el núcleo celular, la mitocondria, los cloroplastos, los peroxisomas, los lisosomas, las vacuolas, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, los ribosomas y los centrosomas. Los ejemplos no limitantes de biomoléculas contenidas en una célula incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y/o ARN), polipéptidos (por ejemplo, proteínas), complejos de núcleo-proteínas, 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 (pili). Estos componentes extracelulares también se incluyen en esta definición.

10

Modificado por ingeniería genética: En general, la expresión "modificado por ingeniería genética" se refiere al aspecto de haber sido manipulado por la mano del hombre. Por ejemplo, se considera que un polinucleótido se "modifica por ingeniería genética" cuando dos o más secuencias, que no están unidas 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 por ingeniería genética. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, un polinucleótido modificado por ingeniería genética comprende una secuencia reguladora que se encuentra en la naturaleza en asociación operativa con una primera secuencia de codificación, pero no en asociación operativa con una segunda secuencia de codificación, se une por la mano del hombre de manera que se asocie operativamente con la segunda secuencia de codificación. Para proporcionar solo un ejemplo específico que se describe en el presente documento, en algunas realizaciones de la presente invención, un promotor de $\Delta 4$ desaturasa de *Thraustochytrium* se une a un ácido nucleico que codifica un polipéptido distinto de un polipéptido de $\Delta 4$ desaturasa de *Thraustochytrium*. Comparativamente, se considera que una célula u organismo está "modificado por ingeniería genética" si se ha manipulado de manera que su información genética esté alterada (por ejemplo, se ha introducido nuevo material genético no presente anteriormente, por ejemplo, mediante transformación, emparejamiento u otro mecanismo, o el material genético previamente presente se altera o se elimina, por ejemplo, por sustitución o delección de mutación). Como es práctica común y se entiende por los expertos en la materia, la progenie de un polinucleótido o célula modificada por ingeniería genética normalmente todavía se denominan "modificada por ingeniería genética" aunque la manipulación real se realizara en una entidad anterior.

15

20

25

30

Modificación genética: La expresión "modificación genética", como se usa en el presente documento, se refiere a una manipulación por la mano del hombre a través del uso de la ingeniería genética. La expresión "modificaciones genéticas" abarca cualquier tipo de cambio en el material genético de una célula, incluyendo cambios en la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ADN o ARN) del material genético de las células y modificaciones químicas del material genético de la célula (por ejemplo, modificaciones tales como la metilación que pueden afectar a la expresión de un locus genético). Las células u organismos que son manipulados de una manera de este tipo se dice que están "genéticamente modificados" o "transgénicos". Por ejemplo, la expresión "célula transgénica", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula cuyo ADN contiene un ácido nucleico exógeno no originalmente presente en la célula no transgénica. Una célula transgénica puede derivarse o regenerarse a partir de una célula transformada o derivada de una célula transgénica. Las células transgénicas de ejemplo en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de *Traustochytrium* o *Thraustochytrium* transgénicas. Las células transgénicas normalmente expresan secuencias de ADN que confieren a las células características diferentes de la de las células no transgénicas, nativas, de la misma cepa. La progenie de células transgénicas normalmente se considera transgénica también.

35

40

45

Heterólogo: El término "heterólogo", como se usa en el presente documento para referirse a ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos que incluyen secuencias reguladoras y/o genes) o polipéptidos, se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que se introduce artificialmente en una célula y/o que no se origina naturalmente en la célula en la que está presente. En algunas realizaciones, un ácido nucleico heterólogo tiene una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la de un ácido nucleico presente de forma natural en la célula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula hospedadora de *Thraustochytrium* se modifica por ingeniería genética para incluir un ácido nucleico que tiene una secuencia reguladora de *Traustochytrium* o *Thraustochytrium*. Aunque la secuencia reguladora de *Traustochytrium* o *Thraustochytrium* se puede producir de forma natural en la célula hospedadora, el ácido nucleico introducido es heterólogo de acuerdo con la presente divulgación. En muchas realizaciones, un ácido nucleico heterólogo tiene una secuencia de nucleótidos que es diferente de la de cualquier ácido nucleico que está naturalmente presente en la célula. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que es heterólogo para una célula en 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 de origen que es diferente de la célula en la que se introduce el ácido nucleico heterólogo.

50

55

60

Célula hospedadora: Como se usa en el presente documento, la "célula hospedadora" es una célula que se manipula de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula hospedadora se manipula de manera que aumente su producción de uno o más AGPI (por ejemplo, a través modificación de aumento de AGPI). Una "célula hospedadora modificada", como se usa en el presente documento, es cualquier célula hospedadora que haya sido modificada, modificada por ingeniería genética o manipulada de acuerdo con la presente divulgación en comparación con una célula parental por lo demás idéntica y/o en comparación con una

65

célula de referencia particular (por ejemplo, una célula de tipo silvestre). En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada tiene al menos una modificación (y opcionalmente más de una) que da como resultado una mayor producción de AGPI o de 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.

5

Introducir: El término "introducir", como se usa en el presente documento con referencia a la introducción de un ácido nucleico en una célula u organismo tiene por objeto tener su significado más amplio y abarcar la introducción, por ejemplo, mediante métodos de transformación (por ejemplo, transformación mediada por cloruro de calcio, electroporación, bombardeo de partículas) y también la introducción por otros métodos, incluyendo la transducción, la conjugación y el emparejamiento. En algunas realizaciones, un vector se utiliza para introducir un ácido nucleico en una célula u organismo.

10

Aislado: El término "aislado", como se usa en el presente documento, significa que la entidad aislado se ha separado de al menos un componente con el que se había asociado anteriormente. Cuando se ha retirado la mayoría de otros componentes, la entidad aislada se "purifica" o se "concentra". El aislamiento y/o la purificación y/o la concentración pueden realizarse usando cualquier técnica conocida en la técnica incluyendo, por ejemplo, el fraccionamiento, la extracción, la precipitación u otra separación.

15

Unido operativamente: La expresión "unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a una relación entre dos secuencias de ácido nucleico en la que la expresión de una de las secuencias de ácido nucleico se controla, se regula o se modula por la otra secuencia de ácido nucleico. En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que está unido operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico está unido covalentemente, ya sea directa o indirectamente, a dicha segunda secuencia, aunque es aceptable cualquier asociación tridimensional eficaz. Una secuencia de ácido nucleico individual puede unirse operativamente a múltiples otras secuencias. Por ejemplo, un único promotor puede dirigir la transcripción de múltiples especies de ARN.

20

Polipéptido: El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, por lo general tiene su significado reconocido en la técnica de un polímero de al menos tres aminoácidos. Sin embargo, el término también se utiliza para referirse a clases funcionales específicas de polipéptidos, tales como, por ejemplo, desaturasas, elongasas, etc. Para cada una de dichas clases, la presente memoria descriptiva proporciona varios ejemplos de secuencias conocidas de dichos polipéptidos. Los expertos habituales en la materia apreciarán, sin embargo, se pretende que el término "polipéptido" sea suficientemente general como para abarcar no solo 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), pero también para abarcar polipéptidos que representan fragmentos funcionales (es decir, fragmentos que conservan al menos una actividad) de dichos polipéptidos completos. Además, los expertos habituales en la materia entienden que las secuencias proteicas generalmente toleran cierta sustitución sin destruir la actividad. Por tanto, cualquier polipéptido que conserve la actividad y comparta al menos aproximadamente un 30-40 % de identidad de secuencia global, con frecuencia superior a aproximadamente el 50 %, el 60 %, el 70 % o el 80 % e incluyendo por lo general adicionalmente al menos una región de identidad mucho más alta, con frecuencia superior al 90 % o incluso al 95 %, al 96 %, al 97 %, al 98 % o al 99 % en una o más regiones altamente conservadas, que por lo general abarca al menos 3-4 y, con frecuencia, hasta 20 o más aminoácidos, con otro polipéptido de la misma clase, se abarca dentro del término pertinente "polipéptido" como se usa en el presente documento. Pueden determinarse otras regiones de similitud y/o identidad por los expertos habituales en la materia mediante el análisis de las secuencias de diversos polipéptidos descritos en el presente documento. Como es sabido por los expertos habituales en la materia, se conoce una diversidad de estrategias y hay herramientas disponibles, para realizar comparaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos con el fin de evaluar los grados de identidad y/o similitud. Estas estrategias incluyen, por ejemplo, la alineación manual, la alineación de secuencias asistida por ordenador y combinaciones de las mismas. Una serie de algoritmos (que generalmente se implementan por ordenador) para realizar la alineación de secuencias están ampliamente disponibles o pueden producirse por un experto en la materia. Los algoritmos representativos incluyen, por ejemplo, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman; (*Adv Appl Math*, 1981, 2: 482); el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.*, 1970, 48: 443); la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman; (*Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)*, 1988, 85: 2444); y/o mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en la versión de paquete de software 7.0 Wisconsin Genetics, 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 usan los programas BLAST y Gapped BLAST, puede usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos. Como alternativa, el médico puede usar parámetros no predeterminados en función de sus requisitos experimentales y/u otros (véase, por ejemplo, el sitio web que tiene la URL www.ncbi.nlm.nih.gov).

30

35

40

45

50

55

60

Vía biosintética de AGPI: Una "vía biosintética de AGPI" es una vía biosintética que produce AGPI y/o precursores de AGPI.

Polipéptido de biosíntesis de AGPI: La expresión "polipéptido de biosíntesis de AGPI" como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos implicados en la producción de un AGPI tal como, pero no limitado a, 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. En algunas realizaciones, los polipéptidos de biosíntesis de AGPI son enzimas que catalizan etapas particulares en una vía de síntesis que en última instancia produce un AGPI. En algunas realizaciones, un polipéptido de biosíntesis de AGPI es una ácido graso sintasa. En algunas realizaciones, los polipéptidos de biosíntesis de AGPI catalizan la elongación de un ácido graso. En algunas realizaciones, los polipéptidos de biosíntesis de AGPI catalizan la desaturación de un ácido graso. En algunas realizaciones, la expresión "polipéptido de biosíntesis de AGPI" también puede abarcar polipéptidos que no catalizan por sí mismos reacciones de síntesis, pero que regulan la expresión y/o actividad de otros polipéptidos que sí lo hacen. Los polipéptidos de la biosíntesis de AGPI incluyen, por ejemplo, polipéptidos de ácido graso sintasa, polipéptidos de elongasa, polipéptidos de $\Delta 9$ desaturasa, polipéptidos de $\Delta 12$ desaturasa, polipéptidos de $\Delta 6$ desaturasa, polipéptidos de $\Delta 8$ desaturasa, polipéptidos de $\Delta 5$ desaturasa, polipéptidos de $\Delta 4$ desaturasa y polipéptidos de $\omega 3$ desaturasa.

Modificación de aumento de AGPI: Una "modificación de aumento de AGPI", como se usa en el presente documento, se refiere a una modificación de una célula hospedadora que aumenta su producción de al menos un AGPI. En algunas realizaciones, dicha producción aumentada da como resultado un nivel de AGPI que es al menos un 1 %-1000 % superior al de tipo silvestre, por ejemplo, aproximadamente un 1 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 100 %, un 110 %, un 120 %, un 130 %, un 140 %, un 150 %, un 160 %, un 170 %, un 180 %, un 190 %, un 200 %, un 210 %, un 220 %, un 230 %, un 240 %, un 250 %, un 260 %, un 270 %, un 280 %, un 290 %, un 300 %, un 310 %, un 320 %, un 330 %, un 340 %, un 350 %, un 360 %, un 370 %, un 380 %, un 390 %, un 400 %, un 410 %, un 420 %, un 430 %, un 440 %, un 450 %, un 460 %, un 470 %, un 480 %, un 490 %, un 500 %, un 550 %, un 600 %, un 650 %, un 700 %, un 750 %, un 800 %, un 850 %, un 900 %, un 950, un 1000 % superior al de la célula parental en la que se introdujo la modificación y/o al de una célula de referencia particular (por ejemplo, una célula de tipo silvestre). En algunas realizaciones, una modificación de aumento de AGPI aumenta la expresión o actividad de uno o más polipéptidos de biosíntesis de AGPI. En algunas realizaciones, una modificación de aumento de AGPI disminuye la expresión o actividad de uno o más polipéptidos que interfiere con la expresión o actividad de un polipéptido de biosíntesis de AGPI, incluyendo, por ejemplo, mediante competencia con el polipéptido de biosíntesis de AGPI para el acceso a un sustrato. En algunas realizaciones, una modificación de aumento de AGPI comprende la introducción de un ácido nucleico heterólogo en una célula hospedadora. En algunas realizaciones, una modificación de aumento de AGPI aumenta los niveles totales de ácidos grasos en una célula. En algunas realizaciones, una modificación de aumento de AGPI aumenta el nivel global de uno o más AGPI particular en una célula, con o sin aumento de los niveles totales de ácidos grasos en la célula. En algunas realizaciones, una modificación de aumento de AGPI aumenta los niveles de AGPI incluyendo, pero no limitado a, ALA, ARA, DHA, DPA, EPA, GLA y/o LA.

Progenie: El término "progenie", 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, mediante división celular o gemación) de manera que la "célula de progenie" contiene al menos algo del material genético de la célula parental. En algunas realizaciones, la célula de progenie contiene todo el material genético de la célula parental. En algunas realizaciones, la célula de progenie no contiene todo el material genético de la célula parental. En algunas realizaciones, la célula de progenie contiene algo de material genético además del material genético de la célula parental. En algunas de dichas realizaciones, el material genético adicional es heterólogo a la cepa o especie de la célula. El término "progenie" tiene por objeto abarcar la progenie no solo directa de una célula parental (por ejemplo, células que son resultado de una división o gemación a partir de una célula parental) sino toda la progenie indirecta de una célula parental (por ejemplo, células que dan como resultado más de un ciclo de división o de gemación de una célula parental). Por tanto, una célula parental dada puede tener mucha progenie celular, a pesar de que la célula puede generar solo un número limitado de células (por ejemplo, dos) en cada ciclo de división o gemación. El término "progenie" también tiene por objeto abarcar células que han experimentado una o más manipulaciones por la mano del hombre (por ejemplo, manipuladas genéticamente o modificadas por ingeniería genética). Por tanto, por ejemplo, cuando una estirpe celular parental se manipula genéticamente o se modifica por ingeniería genética, todas las células que surgen de las mismas se consideran progenie de la estirpe celular. Toda la progenie de esa progenie también se considera descendiente de la estirpe celular parental y así sucesivamente.

Promotor o elemento promotor: Como se usan en el presente documento, las expresiones "promotor" y "elemento promotor" se refieren a un polinucleótido que regula la expresión de una secuencia polinucleotídica seleccionada operativamente unida al promotor y que afecta a la expresión de la secuencia polinucleotídica seleccionada en las células. La expresión "*promotor de Thraustochytrium*", como se usa en el presente documento, se refiere a un promotor que funciona en una célula de *Thraustochytrium*. La expresión "*promotor de Thraustochytrium*", como se usa en el presente documento, se refiere a un promotor que funciona en una célula de *Thraustochytrium*.

Celda de referencia: La frase "célula de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que es normal con respecto a al menos una característica con fines comparativos. Por ejemplo, una célula de

referencia para la comparación frente a una célula modificada por ingeniería genética puede ser una célula que no esté modificada por ingeniería genética. En algunas realizaciones, una célula de referencia no contiene modificaciones genéticas. En algunas realizaciones, una célula de referencia es una célula de una cepa de tipo silvestre. En algunas realizaciones, 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, una célula de referencia de este tipo sería útil para evaluar el efecto de la una o más modificaciones genéticas que *no* contiene. Por tanto, por ejemplo, la expresión "célula de *Thraustochytrium* de referencia" (o "célula de Traustoquitridio de referencia") significa una de célula de *Thraustochytrium* (o célula de Traustoquitridio) de la misma o similar cepa que la célula con la que se compara, excepto porque la célula de *Thraustochytrium* de referencia (o célula de Traustoquitridio de referencia) carece de una o más características (por ejemplo, una o más modificaciones genéticas) de una célula de *Thraustochytrium* (o célula de Traustoquitridio) con la que se compara la célula de *Thraustochytrium* de referencia (o célula de Traustoquitridio de referencia).

15 **Marcador seleccionable:** La frase "marcador seleccionable", como se usa en el presente documento, se refiere ya sea 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. La expresión "marcador seleccionable" se usa en el presente documento como se entiende generalmente en la técnica y se refiere a un marcador cuya presencia dentro de una célula u organismo confiere un crecimiento significativo o ventaja o desventaja de 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 de una condición ambiental particular, tal como el aumento de la temperatura, el aumento de la radiación, la presencia de un compuesto que es tóxico en ausencia del marcador, etc. La presencia o ausencia de dicho compuesto o compuestos o condición o condiciones del medio ambiente se denomina una "condición selectiva" o "condiciones selectivas." Por "ventaja de crecimiento" se entiende ya sea la viabilidad potenciada (por ejemplo, células u organismos con la ventaja de crecimiento tienen una mayor esperanza de vida, en promedio, con respecto a las células por lo demás idénticas), el aumento de la tasa de proliferación (también denominado en el presente documento como "tasa de crecimiento") con respecto a células u organismos por lo demás idénticas o ambos. En general, una población de células que tienen una ventaja de crecimiento presentará menos células muertas o no viables y/o una mayor tasa de proliferación celular que una población de células por lo demás idénticas que carecen de la ventaja de crecimiento. Aunque normalmente un marcador seleccionable confiere una ventaja de crecimiento en una célula, ciertos marcadores seleccionables confieren una desventaja de crecimiento en una célula, por ejemplo, hacen que la célula sea más susceptible a los efectos nocivos de ciertos compuestos o condiciones ambientales que las 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 las células que expresan el marcador. En presencia de una concentración apropiada de antibióticos (condiciones selectivas), dicho marcador confiere una ventaja de crecimiento en una célula que expresa el marcador. De este modo, las células que expresan el marcador de resistencia a antibiótico son capaces de sobrevivir y/o proliferar en presencia del antibiótico mientras que las células que no expresan el marcador de resistencia a antibiótico no son capaces de sobrevivir y/o no son capaces 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. Los marcadores seleccionables adicionales incluyen proteínas que confieren resistencia contra carbenicilina (por ejemplo, β -lactamasas), proteínas que confieren resistencia contra la gentamicina, higromicina, etc.). Una segunda clase no limitante de marcadores seleccionables son marcadores nutricionales. Dichos marcadores son generalmente enzimas que funcionan en una vía biosintética para producir un compuesto que se necesita para el crecimiento o la supervivencia celulares. En general, en condiciones no selectivas el compuesto requerido está presente en el medio ambiente o se produce por una vía alternativa en la célula. En condiciones selectivas, el funcionamiento de la vía biosintética, en la que está involucrado el marcador, se necesita para producir el compuesto.

50 **Agente de selección:** La frase "agente de selección", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que introduce una presión selectiva sobre una célula o población de células ya sea a favor o en contra de la célula o población de células que lleva un marcador seleccionable. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el agente de selección es un antibiótico y el marcador seleccionable es un gen de resistencia a antibiótico. En ciertas realizaciones de ejemplo, se usa zeocina como agente de selección.

Organismo original: Un "organismo original", como se usa en el presente documento, es un organismo que contiene naturalmente o produce un polinucleótido, polipéptido, u otro compuesto (por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo) que se ha de introducir de acuerdo con la presente invención en una célula receptora u hospedadora. En algunas realizaciones, el organismo original particular que se ha de seleccionar no es esencial para la práctica de la presente divulgación. Las consideraciones pertinentes pueden incluir, por ejemplo, qué tan estrechamente están relacionados los organismos originales y hospedadores potenciales en la evolución o qué tan relacionado está el organismo original con otros organismos originales entre los que se han seleccionado secuencias de otros ácidos nucleicos y/o polipéptidos pertinentes. Cuando se ha de introducir y/o expresar una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos heterólogos por una célula hospedadora, diferentes secuencias pueden ser de diferentes organismos originales o del

mismo organismo original. Para proporcionar un solo ejemplo, en algunos casos, los polipéptidos individuales pueden representar subunidades individuales de una actividad proteica compleja y/o pueden requerirse para trabajar en concierto con otros polipéptidos con el fin de conseguir los objetivos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, con frecuencia será deseable que dichos polipéptidos sean del mismo organismo original y/o que estén suficientemente relacionados para funcionar adecuadamente cuando se expresen conjuntamente en una célula hospedadora. En algunas realizaciones, dichos polipéptidos pueden ser de diferentes organismos originales, incluso no relacionados. Se entenderá adicionalmente que, cuando un polipéptido heterólogo se ha de expresar en una célula hospedadora, con frecuencia será deseable usar secuencias de ácido nucleico que codifiquen el polipéptido que se han ajustado para adaptarse a las preferencias de codones de la célula hospedadora y/o para unir las secuencias de codificación con elementos reguladores activos en la célula hospedadora. Por ejemplo, cuando la célula hospedadora es una célula de *Thraustochytrium*, con frecuencia será deseable alterar la secuencia del gen que codifica un polipéptido dado de manera que se ajuste más estrechamente a las preferencias de codones de una célula de este tipo. En ciertas realizaciones, una secuencia génica que codifica un polipéptido dado se optimiza incluso cuando una secuencia génica de este tipo deriva de la propia célula hospedadora (y, por tanto, no es heteróloga). Por ejemplo, una secuencia génica que codifica un polipéptido de interés puede no estar optimizada por codones para la expresión en una célula hospedadora dada a pesar de que una secuencia génica de este tipo se aísle de la cepa de célula hospedadora. En dichas realizaciones, la secuencia génica puede optimizarse adicionalmente para que tenga en cuenta las preferencias de codones de la célula hospedadora. Los expertos habituales en la materia serán conscientes de las preferencias de codones de la célula hospedadora y serán capaces de emplear los métodos y composiciones desvelados en el presente documento para optimizar la expresión de un polipéptido dado en la célula hospedadora.

Sustrato: Un "sustrato", como se usa en el presente documento para describir sustratos de una enzima, se refiere a cualquier entidad que pueda ser modificada por la actividad de la enzima.

Terminador: Como se usa en el presente documento, el término "terminador" se refiere a un polinucleótido que anula la expresión de una secuencia polinucleotídica seleccionada unida operativamente al terminador en las células. En algunas realizaciones, una secuencia terminadora está corriente abajo de un codón de parada en un gen. La expresión "terminador de *Thraustochytrium*", como se usa en el presente documento, se refiere a un terminador que funciona en una célula de *Thraustochytrium*. La expresión "terminador de *Traustochytridium*", como se usa en el presente documento, se refiere a un terminador que funciona en una célula de *Traustochytridium*.

Transformación: El término "transformación", como se usa en el presente documento se refiere a un proceso por el que una molécula de ácido nucleico exógeno (por ejemplo, un vector o molécula de ácido nucleico recombinante) se introduce en una célula o un microorganismo receptores. La molécula de ácido nucleico exógeno puede o puede no estar integrada (es decir, unida covalentemente) en ADN cromosómico constituyendo el genoma de la célula o el microorganismo hospedadores. Por ejemplo, el polinucleótido exógeno puede mantenerse en un elemento episómico, tal como un plásmido. Como alternativa o adicionalmente, el polinucleótido exógeno puede integrarse en un cromosoma de manera que sea heredado por las células hijas a través de la replicación cromosómica. Los métodos de transformación incluyen, pero no se limitan a, precipitación con fosfato de calcio; 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; dextrano DEAE; fusión usando polietilenglicol (PEG); electroporación; magnetoporación; entrega biolística; infección retroviral; lipofección; y microinyección de ADN directamente en las células. En algunas circunstancias, un ácido nucleico exógeno se introduce en una célula por apareamiento con otra célula. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, las células se aparean entre sí.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se describe en el presente documento, la presente descripción desvela una diversidad de reactivos y métodos relacionados con la producción de AGPI y/o a la modificación de *Traustochytridium*. En general, la invención se refiere a la modificación de células hospedadoras de *Traustochytridium* y, en particular, a *Traustochytridium* modificados por ingeniería genética, en particular para aumentar su producción de compuestos de interés (por ejemplo, AGPI). La presente invención abarca la identificación de ciertos elementos reguladores genéticos de *Thraustochytrium* sp., así como el desarrollo de metodologías para la mutagénesis de *Traustochytridium* o *Thraustochytrium*. En ciertas realizaciones, la invención proporciona adicionalmente cepas de *Thraustochytrium* sp. modificadas por ingeniería genética y productos producidos a partir de y con ellas. Ciertos detalles de realizaciones particulares de estos y otros aspectos de la presente invención se analizan con más detalle a continuación.

65

Células hospedadoras

Como se ha señalado, la presente descripción desvela reactivos y metodologías para la manipulación de células hospedadoras.

5 En general, pueden usarse reactivos identificados (por ejemplo, elementos reguladores, vectores, marcadores seleccionables, agentes mutagénicos, etc.) y metodologías (incluyendo, por ejemplo, métodos de mutagénesis) junto con cualquier célula hospedadora apropiada. Los expertos habituales en la materia, después de leer la presente divulgación y, por tanto, teniendo dichos reactivos en mano, serán fácilmente capaces de identificar las células
10 hospedadoras adecuadas en las que dichos elementos están activos.

En algunas realizaciones, las células hospedadoras para su uso de acuerdo con la presente invención son células de *Traustochytrium*. En algunas realizaciones, las células hospedadoras son miembros de la orden *Thraustochytriales*. En algunas realizaciones, las células hospedadoras son miembros de la subclase
15 *Thraustochytriaceae*. En algunas realizaciones, las células hospedadoras son miembros de un género seleccionado entre el grupo que consiste en *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Aplanochytrium*, *Botryochytrium*, *Japonochytrium*, *Oblongichytrium*, *Parietichytrium* y *Sicyoidochytrium*. En algunas realizaciones, las células hospedadoras no son del género *Schizochytrium*.

20 En algunas realizaciones, las células hospedadoras utilizadas de acuerdo con la presente invención son miembros del género *Thraustochytrium*. En algunas realizaciones, 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*,
25 *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,
30 *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*.

En algunas realizaciones, las células hospedadoras utilizadas de acuerdo con la presente invención son miembros del género *Schizochytrium*. En algunas realizaciones, 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,
40 *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. 345 SEK, *Schizochytrium* sp. SEK 346, *Schizochytrium* sp. SR21 o *Schizochytrium* sp. TIO01.

En ciertas realizaciones, una célula hospedadora es una célula de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18. ONC-T18 es un
45 *Thraustochytrium* marino originalmente aislado de las hojas de las hierbas del pantano salado en Advocate Harbour, bahía de Fundy, Nueva Escocia, Canadá. ONC-T18 se describe en la Publicación de Patente de los EE.UU. 2009/0117194. En algunas realizaciones, una célula de *Thraustochytrium* tiene una secuencia de ARNr 18S que es al menos un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,1 %, un 99,2 %, un 99,3 %, un 99,4 %, un 99,5 %, un 99,6 %, un 99,7 %, un 99,8 %, un 99,9 % o más (por ejemplo, incluyendo un 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 68. En algunas
50 realizaciones, una célula hospedadora es una célula de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 de células depositadas con número de acceso de cepa de ATCC PTA-6245.

Microorganismos modificados por ingeniería genética

55 La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, elementos reguladores, marcadores de selección, métodos para la mutagénesis y métodos de transformación para la manipulación de microorganismos tales como *Traustochytrium*. Como se apreciará por los expertos habituales en la materia después de la consideración de la presente divulgación, las herramientas proporcionadas en el presente documento pueden usarse solas y en diversas combinaciones para implementar cualquier modificación genética deseada. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se
60 usan métodos de transformación proporcionados para introducir moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más genes. Las moléculas de ácido nucleico pueden incluir promotor, terminador o secuencias marcadoras seleccionables proporcionados en el presente documento o una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, se usan métodos de mutagénesis proporcionados para generar cepas (por ejemplo, cepas de *Traustochytrium*) que tienen propiedades deseadas. Dichas cepas también pueden transformarse (por ejemplo, con
65 ácidos nucleicos que incluyen uno o más elementos reguladores proporcionados en el presente documento).

Expresión génica

La presente divulgación abarca composiciones y métodos para microorganismos modificados por ingeniería genética. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones y métodos para

5 Traustoquitridios modificados por ingeniería genética (por ejemplo, *Thraustochytrium*). Las células "modificadas por ingeniería genética" incluyen células que han sido modificadas (por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno) y progenie de las mismas que conservan la modificación.

La presente divulgación proporciona ácidos nucleicos que incluyen secuencias reguladoras de Traustoquitridio o

10 *Thraustochytrium*. La expresión génica en eucariotas con frecuencia requiere secuencias reguladoras que son específicas de especie o que funcionan en organismos que están estrechamente relacionados. La disponibilidad de secuencias reguladoras de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* permite que los genes de interés se expresen en Traustoquitridios. Las secuencias reguladoras incluyen secuencias promotoras y secuencias terminadoras.

15 La presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que incluye un promotor de Traustoquitridio o *Thraustochytrium*. El ácido nucleico proporcionado en el presente documento incluye un promotor de un gen de la tubulina de Traustoquitridio o *Thraustochytrium*. Se muestran secuencias de promotores del gen de la tubulina de *Thraustochytrium* de ejemplo en las SEQ ID NO: 6 y 10.

20 En algunas realizaciones, un ácido nucleico aislado que incluye un promotor de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* proporcionado en el presente documento es un casete, por ejemplo, un casete de expresión. En algunas realizaciones, un ácido nucleico aislado que incluye un promotor de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* proporcionado en el presente documento es un vector, por ejemplo, un vector de expresión.

25 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una célula modificada por ingeniería genética para incluir un promotor génico de Traustoquitridio o *Thraustochytrium*. En algunas realizaciones, una célula de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* se modifica por ingeniería genética para incluir un promotor del gen de la tubulina de *Thraustochytrium*.

30 La presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que incluye un terminador génico de Traustoquitridio o *Thraustochytrium*. En algunas realizaciones, un ácido nucleico proporcionado en el presente documento incluye un terminador del gen de la tubulina de Traustoquitridio o *Thraustochytrium*. Se muestran secuencias de terminadores del gen de la tubulina de *Thraustochytrium* de ejemplo en las SEQ ID NO: 14 y 18.

35 En algunas realizaciones, un ácido nucleico aislado que incluye un terminador génico de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* proporcionado en el presente documento es un casete, por ejemplo, un casete de expresión. En algunas realizaciones, un ácido nucleico aislado que incluye un terminador génico de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* proporcionado en el presente documento es un vector, por ejemplo, un vector de expresión.

40 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados proporcionados incluyen uno o más elementos reguladores de genes. En algunas de dichas realizaciones, los elementos reguladores de genes 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 Morschhauser (2005), Li *et al.*

45 (2005) y Jepson *et al.* (1998).

Los ácidos nucleicos que tienen secuencias reguladoras proporcionadas en el presente documento pueden estar unidos operativamente a una secuencia heteróloga, tal como un gen que codifica un polipéptido heterólogo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporcionan casetes de expresión génica que comprenden normalmente un

50 promotor génico de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga, que está unida operativamente a un terminador génico de Traustoquitridio o *Thraustochytrium*. En algunas realizaciones, 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. En algunas realizaciones, los casetes de expresión génica proporcionados comprenden

55 adicionalmente 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).

Generalmente pueden realizarse procedimientos de biología molecular y de manipulación de ADN de acuerdo con Sambrook *et al.* o Ausubel *et al.* (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (editores) 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 (editores) 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: Nueva York).

60

Mutagénesis

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

El antibiótico zeocina es un glicopéptido básico hidrosoluble quelado con cobre de caldo de cultivo de un mutante de *Streptomyces verticillus* (InvivoGen, San Diego, CA, EE.UU.). La zeocina es un miembro del grupo de antibióticos de la fleomicina, que son glicopéptidos que se han utilizado 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)). En general se cree que el modo de acción molecular de estos antibióticos está relacionado con su capacidad de unirse al ADN por intercalación de su resto que contiene bitiazol planar y escinde ADN dando como resultado una rotura de la hebra simple o una rotura de la cadena doble que provoca la muerte celular (Povirk et al., *Nucleic Acids Research*, (1977) 4: 3573-3580). Debido a su toxicidad hacia un amplio espectro de tipos celulares, este grupo de antibióticos se emplea como fármacos para la selección positiva. La presente divulgación abarca el descubrimiento de que la zeocina es un mutágeno útil para la mejora de la cepa microbiana industrial. Adicionalmente, se demuestra en el presente documento que en ciertas concentraciones a las que la zeocina destruye las células más tratadas, las células supervivientes tienen una frecuencia de mutación aumentado. La capacidad de producir células con una mayor frecuencia de mutación permite la selección y el aislamiento fáciles de cepas mutagenizadas.

La presente divulgación proporciona sistemas y/o métodos para la mutagénesis de células de Traustochytridio. La presente divulgación proporciona sistemas y métodos para la mutagénesis de células seleccionadas entre el grupo que consiste en células de *Thraustochytrium*, células de *Ulkenia*, células de *Schizochytrium*, células de *Aurantiochytrium*, células de *Aplanochytrium*, células de *Botryochytrium*cells, células de *Japanochytrium*, células de *Oblongichytrium*cells, células de *Parietichytrium*, células de *Sicyoidochytrium*, hongos de *Mortierella*, algas cultivadas heterotróficamente (por ejemplo, una especie del género *Cryptocodium*). La presente divulgación proporciona sistemas y/o reactivos para la mutagénesis de ONC-T18.

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

Las células ONC-T18 son muy sensibles a la zeocina a una concentración de 100 g/ml (véase el Ejemplo 3). Por tanto, la zeocina puede usarse para la 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). La zeocina puede usarse para la mutagénesis en una concentración de aproximadamente 50 g/ml. El medio en el que las células se mutagenizan con zeocina puede tener una concentración de sal de 18 g/l o menos. Las células mutagenizadas pueden mostrar cambios en la morfología en relación con las células cultivadas en concentraciones más bajas o en ausencia del mutágeno. Para proporcionar solo unos pocos ejemplos, las células mutagenizadas pueden mostrar una alteración en la velocidad de crecimiento, el color y/o la cantidad total o específica de lípidos.

En ciertos métodos de ejemplo de mutagénesis, las células (por ejemplo, células de Traustochytridio o *Thraustochytrium*) se extienden sobre un medio sólido que contiene antibiótico (por ejemplo, zeocina) a una concentración de 40-60 g/ml. Se aíslan colonias que emergen en estas condiciones después de al menos 4 días (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días). Pueden someterse a ensayo células aisladas para una característica deseada resultante de la mutagénesis. Por ejemplo, pueden compararse células de colonias mutagenizadas con células de referencia (por ejemplo, células parentales) para detectar un cambio en una característica, tal como la biomasa y/o la productividad de lípidos.

La presente divulgación proporciona microorganismos (por ejemplo, Traustoquitridio o *Thraustochytrium* aislado mediante mutagénesis por antibiótico (por ejemplo, zeocina). Una cepa microbiana (por ejemplo, una cepa de *Thraustochytrium*) aislada mediante mutagénesis por antibiótico (por ejemplo, zeocina) puede producir al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 % más de lípido total que una cepa parental o de referencia. Una cepa de

5 Traustoquitridio aislada mediante mutagénesis por zeocina puede producir al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 % más de ALA, ARA, DHA, DPA, EPA, GLA y/o LA o una combinación de los mismos, que una cepa parental. Una cepa de Traustoquitridio aislada mediante mutagénesis por zeocina puede producir al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 % más de ARA, DHA, EPA o una combinación de los mismos, que una cepa parental.

10

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

Selección

15

La presente divulgación proporciona métodos para seleccionar microorganismos tales como Traustoquitridios (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 con el fin de manipular genéticamente los microorganismos.

20

Generalmente, en métodos de selección proporcionados, un agente de selección se usa para favorecer el crecimiento de microorganismos que llevan un marcador seleccionable adecuado para el agente de selección sobre microorganismos que no llevan el marcador seleccionable. Normalmente, el agente de selección inhibe, reduce y/o retrasa el crecimiento de microorganismos que no llevan el marcador de selección. Durante la selección, los

25 microorganismos se cultivan normalmente en medio de crecimiento como se describe en el presente documento, excepto porque el medio de crecimiento se complementa con el agente de selección ("medio de selección").

En ciertos métodos de selección de la presente divulgación, los microorganismos se cultivan en medio de selección durante un período de tiempo suficiente para permitir que el cultivo esté compuesto principalmente de células que

30 llevan el marcador de selección. Es decir, durante el período de crecimiento en medio de selección, las células que no llevan el marcador de selección no crecen y son superadas en el cultivo por las células que sí llevan el marcador de selección. Los microorganismos pueden cultivarse en medio de selección durante entre 1 a 15 días, de 1 a 12 días o de 1 a 9 días. Los microorganismos pueden cultivarse e en medio de selección durante un período de tiempo más largo que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días y/o más corto que 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13,

35

11 o 10 días. Los microorganismos pueden cultivarse en medio de selección durante entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 días o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 días, etc. Los microorganismos pueden mantenerse en medio de selección después de la selección. Los microorganismos pueden transferirse a un medio sin un agente de selección durante al menos un período de tiempo, por ejemplo, durante una fase de recuperación.

40

El marcador seleccionable puede retirarse después de que las células se hayan cultivado durante un período de tiempo en medio de selección. La retirada del marcador seleccionable puede realizarse inmediatamente después del período de tiempo durante el cual las células se cultivan en medio de selección, después de un "período de recuperación" durante el cual se cultivan las células en medio sin un agente de selección o más tarde (por ejemplo,

45 después de que las células se han almacenado durante un período de tiempo, después de que las células se han congelado y después descongelado). Se conocen bien en la técnica métodos de células modificadas por ingeniería genética de manera que los elementos genéticos introducidos (por ejemplo, marcadores de selección) puedan retirarse más tarde. Dichos métodos emplean normalmente el uso de polipéptidos de recombinasa, que normalmente reconocen secuencias de nucleótidos particulares ("sitios de reconocimiento" o "secuencias de reconocimiento"). Por ejemplo, un marcador seleccionable puede modificarse por ingeniería genética en una célula de Traustoquitridio o *Thraustochytrium* con sitios de reconocimiento para una recombinasa particular, flanqueando el

50 marcador seleccionable. Cuando se desea la retirada del marcador seleccionable, las células pueden exponerse a una recombinasa apropiada (es decir, una recombinasa que reconozca los sitios de reconocimiento que flanquean el marcador seleccionable), que realiza una reacción de recombinación homóloga en los sitios de reconocimiento, lo

55 que da como resultado la delección o inversión de la secuencia de ácido nucleico entre los sitios de reconocimiento.

El agente de selección puede ser o puede comprender un antibiótico y el marcador de selección es o comprende un gen de resistencia para el antibiótico.

60 Puede usarse una combinación de agentes de selección y/o puede usarse una combinación de marcadores de selección.

Un microorganismo puede experimentar selección mediante la aplicación a un medio adecuado que comprende zeocina, en el que la zeocina está presente a una concentración por encima de una concentración umbral.

65

- La concentración umbral puede corresponder aproximadamente a una concentración a la que la zeocina presente la inhibición completa o casi completa del crecimiento de células que no contienen un gen de resistencia a la zeocina. La concentración umbral puede ser o estar por encima de la concentración a la que la zeocina destruye al menos el 85 %, el 90 % o el 100 % de las células de ese tipo que no contienen un gen de resistencia a la zeocina. La concentración umbral puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo (por ejemplo, concentración de sal, tipo de medio de cultivo, temperatura de cultivo, cultivo líquido o sólido, etc.). La concentración umbral puede estar por encima de 50 µg/ml. La concentración umbral puede ser igual o superior a 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 µg/ml. La concentración umbral puede ser exactamente o aproximadamente 100 µg/ml.
- 10 El gen de resistencia a los antibióticos puede ser o puede comprender un gen de resistencia a fleomicina, bleomicina y/o talisomicina. El gen de resistencia a antibiótico puede ser o puede comprender un gen (por ejemplo, el gen *b/e*) de *S. hidustanus*.
- 15 La concentración de sal del medio utilizado durante la selección puede diferir de una concentración de sal utilizada normalmente en medio utilizado para el cultivo del microorganismo sin selección. La concentración de sal en el medio utilizado durante la selección puede ser aproximadamente la misma que una concentración de sal utilizada normalmente en el medio utilizado para el cultivo del microorganismo sin selección. La concentración de sal puede ser de entre aproximadamente 10 g/l y aproximadamente 40 g/l, entre aproximadamente 15 g/l y aproximadamente 20 35 g/l y/o entre aproximadamente 18 g/l y aproximadamente 35 g/l. La concentración de sal puede ser de aproximadamente 18 g/l. La concentración de sal puede ser de aproximadamente 35 g/l.
- Puede usarse una concentración de zeocina igual o superior a 30 µg/ml cuando el medio de cultivo tiene una concentración de sal de aproximadamente 18 g/l. Puede usarse una concentración de zeocina igual o superior a 25 100 µg/ml cuando el medio de cultivo tiene una concentración de sal de aproximadamente 35 g/l.

El medio adecuado utilizado durante la selección puede ser un medio sólido. Cuando se usa un medio sólido, los microorganismos pueden extenderse (por ejemplo, usando un asa de siembra, un extendedor de células, perlas u otros mecanismos de extensión) en una superficie plana del medio sólido de manera que puedan permitirse crecer 30 colonias de una sola célula.

Las colonias de una sola célula pueden recogerse y cultivarse para obtener cantidades más grandes y/o suficientes para el análisis (por ejemplo, el análisis del transgén, el análisis de las características de crecimiento, el análisis de perfil de lípidos, etc.) y/o la producción de compuestos como se describen en el presente documento. Como 35 alternativa o adicionalmente, pueden almacenarse colonias de una sola célula y/o cultivos obtenidos de las mismas (por ejemplo, por congelación en un medio de congelación apropiado) para su uso posterior.

Transformación

40 La presente divulgación proporciona métodos para la transformación de células de *Traustochytrium* (por ejemplo, *Traustochytrium*). Dichos métodos comprenden generalmente etapas de proporcionar una célula de *Traustochytrium* competente; entregar un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, recombinante o modificado por ingeniería genética) en 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 45 reduce el crecimiento de las células sin el marcador seleccionable.

Se proporcionan células de *Traustochytrium* competentes para la transformación genética por la presente divulgación. Las células competentes pueden ser de la cepa ONC-T18. Dichas células competentes pueden proporcionarse por cualquiera de una diversidad de métodos, un ejemplo no limitante de las cuales se describe en mayor detalle en el Ejemplo 5. En los métodos de preparación de células competentes, tales como el descrito en el 50 Ejemplo 5, las células competentes se obtienen por la inoculación de un medio sólido o líquido con inóculo de una cepa deseada de *Traustochytrium* o *Traustochytrium* y permitiendo que las células crezcan, entregando medios de cultivo fresco según sea necesario. La preparación de células competentes normalmente implica una o más fases de crecimiento en un medio líquido seguido de centrifugación de las células y resuspensión de las células en líquido 55 estéril a una densidad celular deseada. Las células competentes pueden prepararse nuevas como sea necesario para los experimentos y/o pueden prepararse y después almacenarse (por ejemplo, congelarse) para su uso futuro.

Las células pueden cultivarse en matraces (por ejemplo, de volúmenes de 250 ml, 500 ml o 1 l).

60 Las células pueden cultivarse en un medio rico fuente de nitrógeno. Para proporcionar un solo ejemplo, las células pueden cultivarse en un medio con altos niveles de peptona. Las células pueden cultivarse en un medio que comprende al menos 5-25 g/l de peptona (u otra fuente de nitrógeno).

Las células pueden cultivarse en altos niveles de oxígeno disuelto. Las células pueden agitarse 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.

- 5 Las células pueden mutagenizarse durante la propagación vegetativa. Las células pueden mutagenizarse durante la propagación vegetativa vigorosa. Las células pueden no mutagenizarse durante las etapas de zoosporas.

- El ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, recombinante, sintetizado (ya sea química o biológicamente) y/o modificado por ingeniería genética en que su secuencia de ácido nucleico se seleccionó por la mano del hombre) puede ser un ADN, un ARN, un híbrido de ARN:ADN o cualquier derivado adecuado de los mismo. El ácido nucleico recombinante puede entregarse 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 no limitados a, plásmidos, cósmidos, BAC (cromosomas artificiales bacterianos, por sus siglas en inglés), YAC (cromosomas artificiales de levadura, por sus siglas en inglés) y vectores víricos. El ADN heterólogo puede ser o comprender polinucleótidos sintetizados químicamente. El ADN heterólogo puede comprender polinucleótidos sintetizados enzimáticamente. El ADN heterólogo puede ser o comprender un producto de la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR").

- Los ácidos nucleicos recombinantes o modificados por ingeniería genética comprenden normalmente un marcador de selección para su uso en métodos de selección tales 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 como se describe en el presente documento. Por ejemplo, cuando se usa un antibiótico como un agente de selección, el marcador de selección puede comprender un casete de expresión génica para expresar un gen de resistencia a antibiótico correspondiente.

- Los ácidos nucleicos recombinantes o modificados por ingeniería genética pueden comprender adicionalmente uno o más casetes de expresión génica adicionales para la expresión de uno o más productos génicos deseables. Los uno o más productos génicos representativos deseables 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 la vía 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 ciertas características deseables para el microorganismo (por ejemplo, la idoneidad para el crecimiento en un conjunto particular de condiciones; la idoneidad para el crecimiento en los métodos de producción a gran escala, etc.). Como alternativa o adicionalmente, un producto génico deseable puede ser uno que permite el marcaje de las células que se han transformado. Como alternativa o adicionalmente, las células pueden modificarse por ingeniería genética para producir niveles elevados de uno o más biocombustibles, fármacos, vacunas, anticuerpos, lípidos, resolívinas, neuroprotectinas, compuestos farmacéuticos, polipéptidos, etc.

- Se han descrito elementos que normalmente están contenidos en un casete de expresión génica en el presente documento, por ejemplo, un promotor u otro elemento regulador génico que dirige la expresión génica, el gen que se ha de expresar y una secuencia terminadora que trabaja en el microorganismo que se ha de transformar. El gen que se ha de expresar puede denominarse un "transgén". El transgén puede ser en algunas realizaciones un gen heterólogo, por ejemplo, uno que normalmente no está presente en el microorganismo. Cualquiera o los dos de entre el marcador de selección y el casete de expresión génica adicional pueden incluir un gen heterólogo de este tipo.

En consecuencia, los vectores adecuados para su uso de acuerdo con métodos de la divulgación incluyen vectores de expresión génica.

- 50 Puede entregarse un ácido nucleico recombinante en un microorganismo. Por ejemplo, un microorganismo puede transformarse con una construcción de plásmido que comprende un ácido nucleico recombinante.

- Puede entregarse más de un ácido nucleico recombinante en un microorganismo. Por ejemplo, puede entregarse una combinación de construcciones de plásmidos (cada construcción de plásmido que comprende un ácido nucleico recombinante) en un microorganismo. Puede usarse una combinación de agentes de selección y marcadores de selección para seleccionar 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 no se limitan a, precipitación con fosfato de calcio; 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; dextrano DEAE; fusión usando polietilenglicol (PEG); electroporación; magnetoporación; entrega biolística; infección retroviral; lipofección; y microinyección de ADN directamente en las células.

Puede usarse un método de entrega biolística (también conocido como método de "cañón de genes", "bombardeo de partículas" y "microproyectil"). Un dispositivo biolístico acelera partículas recubiertas con el ácido nucleico recombinante a velocidades suficientes para penetrar las membranas celulares (y/o paredes celulares, si están presentes). Las partículas pueden comprender o pueden consistir en partículas de oro. Se conocen en la técnica
5 métodos para la entrega biolística de material genético y hay disponibles en el mercado equipo y reactivos para la realización de dichas entregas biolísticas. Véase, 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).

10 Pueden entregarse ácidos nucleicos usando un método tal como transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación por protoplastos, etc., como es sabido y entendido por los expertos habituales en la materia.

Después de la entrega de un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, recombinante o modificado por ingeniería genética), las células se cultivan en un medio que contiene un agente de selección que reduce el crecimiento de células sin el marcador seleccionable, como se describe en el presente documento en la sección "Selección".
15 Pueden almacenarse, analizarse y/o cultivarse células que se seleccionan (por ejemplo, presentan la presencia del marcador seleccionable y, por tanto, del ácido nucleico recombinante) en cantidades más grandes según se desee.

Las células transformadas pueden someterse 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,
20 por ejemplo, un transgén y/o un marcador seleccionable, que es parte del ácido nucleico recombinante.

Cepas modificadas por ingeniería genética

25 La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, secuencias reguladoras, métodos de transformación, métodos de mutagénesis y métodos de selección genética que permiten la manipulación de ciertos microorganismos tales como *Traustochytrids*. Las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para modificar microorganismos por ingeniería genética (por ejemplo, *Traustochytrids*) para cualquiera de una serie de aplicaciones. Como se ha señalado anteriormente, pueden usarse secuencias reguladoras y
30 marcadores seleccionables proporcionados en el presente documento para expresar cualquier polipéptido de interés en un organismo en el que las secuencias y/o marcadores seleccionables son operables (por ejemplo, en *Traustochytrids*). En algunas realizaciones se expresa un polipéptido de un organismo diferente. En algunas realizaciones, se expresa un polipéptido de la célula hospedadora (por ejemplo, se sobreexpresa).

35 En algunas realizaciones, los microorganismos se modifican por ingeniería genética para tener una mayor producción de un compuesto de interés.

En algunas realizaciones, los microorganismos se modifican por ingeniería genética para tener una mayor producción de un ácido graso, un antioxidante, resolvinas y/o protectinas. Como alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, las células se diseñan para producir niveles elevados de uno o más biocombustibles,
40 fármacos, vacunas, anticuerpos, lípidos, resolvinas, neuroprotectinas, compuestos farmacéuticos, polipéptidos, etc.

La presente divulgación proporciona microorganismos *Traustochytrids* (por ejemplo, *Thraustochytrium*) que se diseñan por ingeniería genética para tener una mayor producción de AGPI. Es decir, la presente divulgación proporciona células de *Traustochytrium* modificadas por ingeniería genética incluyendo una modificación de aumento
45 de AGPI. En algunas realizaciones, dichos microorganismos se modifican por ingeniería genética para tener una expresión alterada (por ejemplo, aumentada o disminuida) de 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 el ácido mirístico (C14:0) y el ácido esteárico (C18:0) por el complejo enzimático ácido graso sintasa (FAS),
50 seguido de una serie de reacciones enzimáticas en dichos ácidos grasos. Cada una de estas reacciones normalmente se cataliza mediante cualquiera de entre una desaturasa (que elimina átomos de hidrógeno para crear un doble enlace carbono-carbono) o una elongasa (que alarga ácidos grasos mediante la adición de dos átomos de carbono al extremo ácido carboxílico del ácido graso). El complejo policétido AGPI sintasa (PKS) también genera DHA en ONC-T18. La biosíntesis de AGPI en ONC-T18 parece tener al menos dos vías biosintéticas cruzadas: las
55 vías biosintéticas de AGPI omega-6 y omega-3. La conversión de ácidos grasos omega-6 en ácidos grasos omega-3 puede catalizarse por omega-3 desaturasa. Por tanto, como se representa en la Fig. 1, se produce una diversidad de ácidos grasos en diversos puntos de la vía.

En algunas realizaciones, la expresión de uno o más genes que codifican polipéptidos enzimáticos en la vía se regula para aumentar la producción de AGPI particular y/u otros ácidos grasos según se desee. Por ejemplo, la
60 expresión del gen FAS puede regularse negativamente para aumentar la producción de AGPI. La regulación negativa de la expresión de la $\Delta 5$ elongasa, la $\Delta 4$ 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 de

los genes de PKS puede aumentar la producción de DHA. La regulación positiva de la expresión del gen de la $\Delta 12$ elongasa puede aumentar la producción de ARA y EPA.

En algunas realizaciones, la expresión de uno o más genes que codifican polipéptidos enzimáticos en la vía se regula para producir biocombustibles. Por ejemplo, la regulación negativa de la expresión de cualquiera de los genes de PKS, $\Delta 9$ desaturasa, elongasa y omega-3 desaturasa y/o la regulación positiva de la expresión del gen FAS puede aumentar la producción de lípidos de cadena corta para su uso como materias primas de biocombustibles.

En algunas realizaciones, la alteración (por ejemplo, la regulación negativa o la regulación positiva) de la expresión génica de un componente de la vía se consigue mediante la generación de una inactivación de genes mediante, por ejemplo, recombinación homóloga. Normalmente, una construcción de ADN linealizada se introduce en las células usando cualquiera de una diversidad de técnicas incluyendo, pero no limitadas a, la entrega de ADN por proyectil biolístico. En algunas realizaciones, la frecuencia de recombinación homóloga en ONC-T18 es superior a aproximadamente el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 % o el 90 %.

En algunas realizaciones, la alteración (por ejemplo, la regulación negativa o la regulación positiva) de la expresión génica de un componente de la vía se consigue por mutagénesis de una o más dianas génicas.

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

Fermentación y producción

Ciertos métodos de la invención incluyen o pueden usarse en combinación con etapas de cultivo de un microorganismo (por ejemplo, un Traustochytridio, por ejemplo, un *Thraustochytrium* sp.). Se han descrito métodos de cultivo para Traustochytridios, por ejemplo, en la publicación de patente de los 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 los métodos de selección de la presente invención. Normalmente el medio entrega 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 la producción de un compuesto de interés. Los Traustochytridios normalmente se cultivan en medio salino. Por ejemplo, los Traustochytridios pueden cultivarse en un medio que tenga una concentración de sal entre aproximadamente 2,0 - 50,0 g/l. En algunas realizaciones, los Traustochytridios se cultivan en medios que tienen una concentración de sal entre aproximadamente 2-35 g/l. En algunas realizaciones, los Traustochytridios se cultivan en un medio que tiene una concentración de sal entre aproximadamente 18-35 g/l. Se ha descubierto que en ciertas circunstancias los Traustochytridios crecen bien en condiciones de poca sal. En algunas realizaciones, los

- Traustoquitridios se cultivan en un medio que tiene una concentración de sal entre aproximadamente 5-20 g/l. En algunas realizaciones, los Traustoquitridios se cultivan en un medio que tiene una concentración de sal entre aproximadamente 5-15 g/l. Los medios de cultivo pueden o no pueden incluir NaCl. Los medios de cultivo pueden o pueden no incluir la adición de NaCl. En algunas realizaciones, un medio contiene sal marina artificial, por ejemplo,
- 5 INSTANT OCEAN™, Aquaria, Inc. El medio de cultivo puede o puede no incluir agua de mar natural o artificial. En algunas realizaciones, un medio contiene agua de mar natural o artificial, por ejemplo, de aproximadamente el 2 % al 100 % de agua de mar.
- Los iones cloruro pueden provocar la corrosión del fermentador u otros equipos de procesamiento corriente abajo.
- 10 En algunas realizaciones, la concentración de cloruro en el medio de cultivo se reduce. En algunas realizaciones, los medios de cultivo incluyen sales de sodio que no contiene cloruro (por ejemplo, sulfato de sodio) como una fuente de sodio. Por ejemplo, una parte significativa del sodio total puede ser suministrada por sales no de cloruro de manera que menos de aproximadamente el 100 %, el 75 %, el 50 % o el 25 % del sodio total en medios de cultivo es suministrado por cloruro de sodio.
- 15 En algunas realizaciones, 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. En algunas realizaciones, los medios de cultivo tienen concentraciones de cloruro de entre aproximadamente 60 mg/l y 120 mg/l.
- 20 Los ejemplos de sales de sodio no de cloruro adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, carbonato de sodio (una mezcla de carbonato de sodio y óxido de sodio), carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, sulfato de sodio y mezclas de los mismos. Véanse, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. N.º 5.340.742 y 6.607.900.
- 25 Los medios para el cultivo de Traustoquitridio puede incluir cualquiera de una diversidad de fuentes de carbono. Los ejemplos de fuentes de carbono incluyen ácidos grasos; lípidos; glicerinas; triglicéridos; hidratos de carbono tales como glucosa, almidón, celulosas, hemicelulosas, fructosa, dextrosa, xilosa, lactulosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, lactosa, glucógeno, gelatina, almidón (de maíz o de trigo), acetato, m-inositol (derivados de licor de maíz fermentado), 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 (derivado de almidón);
- 30 sacarosa (a partir de melaza); polioles tales como maltitol, eritritol, adonitol y ácidos oleicos tales como glicerol y Tween 80; amino azúcares tales como N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-beta-D-manosamina; y cualquier tipo de biomasa o flujo de residuos.
- 35 En algunas realizaciones, los medios incluyen fuentes de carbono en una concentración de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 200 g/l. En algunas realizaciones, los medios tienen una relación de C:N (relación de carbono a nitrógeno) de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 40:1. En algunas realizaciones en las que se usan cultivos de dos fases, los medios tienen 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, nada o casi nada de
- 40 nitrógeno) en la segunda fase.
- Los medios para el cultivo de Traustoquitridios puede incluir cualquiera de una diversidad de fuentes de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno de ejemplo incluyen soluciones de amonio (por ejemplo, NH₄ en H₂O), sales de amonio o de amina (por ejemplo, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₃PO₄, NH₄NO₃, NH₄OOCH₂CH₃ (NH₄Ac), peptona, triptona, extracto de
- 45 levadura, extracto de malta, harina de pescado, glutamato de sodio, extracto de soja, casaminoácidos y granos de destilador. Las concentraciones de fuentes de nitrógeno en medios adecuados suelen oscilar entre aproximadamente 1 g/l y aproximadamente 25 g/l.
- En algunas realizaciones, los medios incluyen un fosfato, tal como fosfato de potasio o fosfato de sodio. Las sales
- 50 inorgánicas y nutrientes traza en los medios pueden incluir sulfato de amonio, bicarbonato de sodio, ortovanadato de sodio, cromato de potasio, molibdato de sodio, ácido selenioso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de calcio, cloruro de manganeso y EDTA. Pueden incluirse vitaminas tales como clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato de calcio, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y vitamina B12.
- 55 Por ejemplo, un medio adecuado puede estar compuesto de entre aproximadamente 11 y aproximadamente 13 g/l (por ejemplo, aproximadamente 12 g/l) de sulfato de sodio, 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 MgSO₄·7H₂O, entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,4 g/l (por ejemplo,
- 60 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 K₂SO₄, entre aproximadamente 0,9 y aproximadamente 1,1 g/l (por ejemplo, aproximadamente 1 g/l) de KH₂PO₄, entre aproximadamente 0,95 y aproximadamente 1,1 g/l (por ejemplo, aproximadamente 1 g/l) de (NH₄)₂SO₄, entre aproximadamente 0,15 y aproximadamente 0,19 (por ejemplo, aproximadamente 0,17 g/l) de CaCl₂·H₂O, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 g/l (por ejemplo,
- 65 aproximadamente 4,5 g/l) de jarabe de maíz 95 DE (basado en sólidos), entre aproximadamente 2,7 y

aproximadamente 3,3 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 3 mg/ml) de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, entre aproximadamente 2,7 y aproximadamente 3,3 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 3 mg/ml) de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, entre aproximadamente 0,035 y aproximadamente 0,045 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 0,04 mg/l) de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, entre aproximadamente 0 y aproximadamente 0,045 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 0,04 mg/l) de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, entre 5 aproximadamente 1,8 y aproximadamente 2,2 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 2 mg/l) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 2,2 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 2 mg/l) de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, entre aproximadamente 9 y aproximadamente 11 mg/l (por ejemplo, aproximadamente 10 mg/l) de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 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} , 10 entre aproximadamente 1,3 y aproximadamente 5,1 (por ejemplo, aproximadamente 3,2 mg/l) de pantotenato de calcio y solución de NH_4OH aproximadamente al 28 %.

El pH del medio se ajusta a entre 3,0 y 10,0 usando ácido o base en su caso y/o usando la fuente de nitrógeno. En algunas realizaciones, el medio se ajusta para que tenga un pH entre 4,0 y 6,5. El medio puede esterilizarse.

15 En algunas realizaciones, un medio utilizado para el cultivo de un microorganismo es un medio líquido. En algunas realizaciones, un medio utilizado para el cultivo de un microorganismo es un medio sólido. Además de las fuentes de carbono y nitrógeno como se analizan 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 20 forma sólida.

Las células pueden cultivarse durante cualquier período entre 1-60 días. En algunas realizaciones, el cultivo se realiza durante 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día o menos. En algunas realizaciones, el cultivo se realiza a temperaturas de entre 4 a 30 °C, por ejemplo, de 18 a 28 °C. En algunas realizaciones, el cultivo incluye cultivo 25 con aireación-agitación, cultivo con agitación, cultivo estacionario, cultivo discontinuo, cultivo continuo, cultivo discontinuo de laminación o cultivo de onda o similares. El cultivo puede realizarse usando una agitador-fermentador convencional, un fermentador en columna de burbujas (continuos por lotes o cultivos), un fermentador de onda, etc.

En algunas realizaciones, los cultivos se airearon mediante agitación. En algunas realizaciones, la agitación varía de 30 100 a 1000 rpm, por ejemplo, de 350 a 600 rpm, de 1000 a 450 rpm. En algunas realizaciones, los cultivos se airean de forma diferente (por ejemplo, usando diferentes velocidades de agitación) durante fases de producción de biomasa, como lo son durante las fases productoras de lípidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los cultivos se airean mediante agitación a una velocidad de entre aproximadamente 150 y aproximadamente 350 rpm durante las fases de biomasa y a una velocidad entre aproximadamente 30 y aproximadamente 120 rpm durante las fases 35 productoras de lípidos. Como alternativa o adicionalmente, las velocidades de agitación pueden variar en función del tipo de vaso de cultivo (por ejemplo, la forma o el tamaño del matraz).

En algunas realizaciones, el nivel de oxígeno disuelto (OD) es más alto durante la fase de producción de biomasa de lo que es durante la fase de producción de lípidos, por ejemplo, los niveles de OD se reducen durante la fase de 40 producción de lípidos. En algunas realizaciones, el nivel de oxígeno disuelto se reduce por debajo de la saturación; en algunas realizaciones, el nivel de oxígeno disuelto se reduce a un nivel muy bajo o incluso indetectable.

Se ha descubierto que la producción de los lípidos deseables puede potenciarse mediante el cultivo de células de acuerdo con los métodos que implican un cambio de una o más condiciones de cultivo con el fin de obtener mayores 45 cantidades de compuestos deseables. En algunas realizaciones, las células se cultivan en primer lugar en condiciones que maximizan la biomasa, seguido de un cambio de una o más condiciones de cultivo a condiciones que favorecieran la productividad de lípidos. Las condiciones que cambian puede incluir la concentración de oxígeno, la relación de C:N, la temperatura y combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, se realiza un cultivo en dos etapas en el que una primera etapa favorece la producción de biomasa (por ejemplo, usando 50 condiciones de oxígeno altas (por ejemplo, en general o en relación con la segunda etapa), baja relación C:N y temperatura ambiente), seguido de una segunda etapa que favorece la producción de lípidos (por ejemplo, en la que el oxígeno disminuye, la relación de C:N aumenta y la temperatura disminuye). Es decir, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos que implican el cultivo de células en un primer conjunto de condiciones que incluye una o más condiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en una primera concentración de oxígeno, 55 una primera relación de C:N, una primera temperatura y combinaciones de las mismas. El cultivo en este primer conjunto de condiciones continúa durante un primer período de tiempo, durante el cual pueden variar. Al final del primer período de tiempo (que no es necesariamente un punto discreto en el tiempo), se alteran una o más condiciones para que las células se cultiven en un segundo conjunto de condiciones que incluye una o más condiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en una segunda concentración de oxígeno, una segunda 60 relación de C:N, una segunda temperatura y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, algunas condiciones se cambian al final del primer período de tiempo y algunas se mantienen hasta el final de un segundo período de tiempo, en el que una o más condiciones pueden cambiar de nuevo y/o una o más condiciones pueden cambiarse por primera vez. En algunas realizaciones, la primera relación de C:N está dentro del intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:1; y la primera temperatura está dentro del intervalo de 65 aproximadamente 10 a aproximadamente 30 °C. En algunas realizaciones, la segunda relación de C:N es de

aproximadamente 1:~0; y la segunda temperatura está dentro del intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 °C.

En algunas realizaciones, un cambio de una primera condición a una segunda condición se realiza y/o se produce gradualmente; en algunas realizaciones, el cambio de una primera condición a una segunda condición se realiza y/o se produce bruscamente.

En algunas realizaciones de métodos de cultivo proporcionados en el presente documento, la concentración de oxígeno cambia (por ejemplo, disminuye) durante el cultivo en una serie de formas posibles, incluyendo, por ejemplo, mediante el cambio de la intensidad de aireación.

En algunas realizaciones de los métodos de cultivo proporcionados en el presente documento, la temperatura cambia (por ejemplo, disminuye) durante el cultivo por lo menos 2 °C. En algunas realizaciones, la temperatura cambia en 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C o 10 °C. En algunas realizaciones, la temperatura cambia de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 20 °C.

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

20 *Productos*

Pueden usarse AGPI y otros compuestos producidos de acuerdo con la presente divulgación en cualquiera de una diversidad de aplicaciones, por ejemplo, el aprovechamiento de sus propiedades biológicas o nutricionales. Los compuestos pueden usarse en productos farmacéuticos, complementos alimenticios, aditivos para piensos, cosméticos, etc. Los compuestos producidos de acuerdo con la presente divulgación también pueden usarse como intermedios en la producción de otros compuestos.

Se apreciará que pueden incorporarse AGPI y/u otros compuestos producidos por las células manipuladas como se describe en el presente documento en un producto final (por ejemplo, complemento de alimentos o piensos, fórmula infantil, productos farmacéuticos, etc.) en el contexto de la célula hospedadora. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden liofilizarse, secarse por congelación, congelarse, pasteurizarse o inactivarse de otra manera y, después, las células enteras pueden incorporarse en o usarse como producto final. Una célula hospedadora (ya sea secada o no) puede procesarse adicionalmente antes de la incorporación en el producto (por ejemplo, a través de la lisis, tratamiento por ultrasonidos, molienda con perlas, tratamiento por presión, congelación-descongelación, electroforesis en campo pulsado (PFE) para separar los componentes y/o tratamiento enzimático o combinaciones de los mismos; en algunos casos, pueden usarse 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. Un producto final puede incorporar solo una parte de la célula hospedadora (por ejemplo, fraccionada por tamaño, solubilidad), separada de la totalidad. Por ejemplo, los lípidos pueden aislarse de las células hospedadoras y pueden incorporarse o usarse como el producto final. Los lípidos que contienen AGPI pueden extraerse usando la extracción con fluidos supercríticos o la extracción con uno o más disolventes (por ejemplo, acetona, cloroformo, isopropanol, hexano, cloruro de metileno o metanol). Los lípidos pueden concentrarse mediante cualquiera de una diversidad de métodos, tales como la formación de complejos urea, la cromatografía en columna y/o el fraccionamiento con fluido supercrítico. Las técnicas para la concentración de lípidos extraídos con disolventes incluyen la hidrólisis (por ejemplo, usando una base, ácido o hidrólisis enzimática), la extracción adicional, la acidificación, la cristalización, la filtración y combinaciones de las mismas (véase, por ejemplo, la publicación de patente de los EE.UU. 2009/0117194).

Pueden incorporarse uno o más AGPI y/u otros compuestos producidos en un componente de alimentos o piensos (por ejemplo, un complemento alimenticio). Los tipos de productos alimenticios en los que los compuestos pueden incorporarse de acuerdo con la presente divulgación no están particularmente limitados e incluyen bebidas tales como leche, agua, bebidas deportivas, bebidas energéticas, té y zumos; productos de confitería tales como gelatinas y galletas; alimentos y bebidas que contienen grasa tales como productos lácteos; productos alimenticios procesados tales como arroz blando (o avena); fórmulas para lactantes; cereales de desayuno; o similares. Pueden incorporarse uno o más compuestos producidos en un complemento dietético, tal como por ejemplo una multivitamina. Un compuesto de AGPI producido de acuerdo con la presente divulgación puede incluirse en un complemento dietético y puede incorporarse directamente en un componente de alimentos o piensos (por ejemplo, un complemento alimenticio).

Los ejemplos de alimentos en los que los compuestos producidos de acuerdo con la presente divulgación pueden incorporarse incluyen, por ejemplo, alimentos para mascotas, tales como alimentos para gatos, alimentos para perros y similares, piensos para peces de acuario, peces cultivados o crustáceos, etc., piensos para animales criados en granja (incluyendo ganado y pescado o crustáceos criados en acuicultura). El alimento o material de alimentación en el que se incorpora el compuesto o compuestos producidos de acuerdo con la presente divulgación es preferentemente palatable para el organismo que es el destinatario deseado. Este alimento o material de

alimentación puede tener propiedades físicas conocidas en la actualidad para un material de alimentación (por ejemplo, sólido, líquido, blando).

Pueden incorporarse uno o más compuestos producidos (por ejemplo, AGPI) en un producto farmacéutico. Los ejemplos de dichos productos farmacéuticos incluyen, por ejemplo, diversos tipos de comprimidos, cápsulas, agentes bebibles, etc. El farmacéutico puede ser adecuado para la aplicación tópica. Las formas de dosificación no están particularmente limitadas, e incluyen cápsulas, aceites, gránulos, microgránulos, polvos, comprimidos, pildoras, 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 y debido a que pueden incorporarse fácilmente gotitas de lípidos que contienen AGPI en formulaciones a base de aceite.

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

Pueden incorporarse compuestos producidos de acuerdo con la presente divulgación (ya sea aislados o en el contexto de células) en productos como se describen 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. Los productos de la invención pueden incluir uno o más agentes quelantes, pigmentos, sales, agentes tensioactivos, humectantes, modificadores de viscosidad, espesantes, emolientes, fragancias, conservantes, etc. y combinaciones de los mismos.

EJEMPLOS

25 Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de las secuencias promotoras y terminadoras

Este ejemplo describe la identificación y el aislamiento de ciertas secuencias de ácidos nucleicos promotoras y terminadoras de la expresión génica de ejemplo de ONC-T18.

Ocean Nutrition Canada Limited ha secuenciado en gran medida el genoma de ONC-T18 usando tanto técnicas de secuenciación por disparo y pirosecuenciación (GS-20; 454). Entre otras cosas, la presente divulgación proporciona el análisis de dicha información de la secuencia, por ejemplo, utilizando la información de la colección EST (marcador de secuencia expresado, por sus siglas en inglés) a disposición del público (Huang et al., 2008), la anotación funcional y/o software bioinformático (por ejemplo, el 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 Traustochytridios), se clonaron promotores y terminadores del gen constitutivo de la tubulina y promotores de desaturasa y elongasa a partir de ADN genómico de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

40

1. Aislamiento e identificación de un promotor del gen de la tubulina n.º 701.

Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos n.º 52 (SEQ ID NO: 1) y n.º 53 (SEQ ID NO: 2) basándose en datos de la secuencia genómica de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Matemáticas Aplicadas). Los cebadores de oligonucleótidos se sintetizaron y se adquirieron de Invitrogen (California, EE.UU.).

El ADN genómico de ONC-T18 se extrajo de células cultivadas en el medio de crecimiento (ONC-T18-GM0) a 25 °C durante 36 horas en una incubadora con agitador con agitación constante a 150 rpm. Las células de cultivos de 50 ml se recogieron por centrifugación durante 5 min a temperatura ambiente a 4300 rpm en una centrífuga Sorvall de 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 Ultraclean Microbial (MO BIO Laboratories, Inc, Solana Beach, California) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los componentes del medio de crecimiento ONC-T18-GM0 son: 5 g/l de extracto de levadura (RM668, laboratorios HiMedia), 5 g/l de peptona de soja (RM007, laboratorios HiMedia), D (+)-glucosa 10 g/l (CERELOSA™ dextrosa 020010, Corn Products International), 35 g/l de sal marina artificial (INSTANT OCEAN™, Aquaria, Inc.), 1,25 mg/l de elementos traza (5 g/l de NaH₂PO₄·H₂O, 3,15 g/l de FeCl₃·6H₂O, 4,36 g/l de Na₂EDTA·2H₂O, 0,6125 mg/l de CuSO₄·5H₂O, 0,0597 g/l de Na₂MoO₄·2H₂O, 0,022 g/l de ZnSO₄·7H₂O, 0,01 g/l de CoCl₂·6H₂O, 0,18 g/l de MnCl₂·4H₂O, 13 mg/l de H₂SeO₃, 2,7 mg/l de NiSO₄·6H₂O, 1,84 mg/l de Na₃VO₄ y 1,94 mg/l de K₂CrO₄) y 1,25 mg/l de vitaminas (1 mg/l de vitamina B12, 1 mg/l de biotina, 0,20 g/l de HCl de tiamina).

El promotor del gen de la tubulina n.º 701 incluyendo la secuencia de marco de lectura abierta 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 repetidas durante 30 ciclos y 72 °C durante 10 minutos. La PCR

se realizó en una mezcla de reacción de 50 µl que contenía 2,5 unidades de ADN polimerasa *TaKaRa LA Taq™* (TAKARA BIO INC., Shiga, Japón), 1 X LA PCR Tampón II, mezcla de dNTP (0,40 mM cada uno), 225 ng del molde de ADN genómico, 0,20 µM del cebador n.º 52 y 0,20 µM del cebador n.º 53.

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

- Los fragmentos de ADN purificados se clonaron en vector pT7Blue-3 usando Kits de Clonación Perfectly Blunt® (Novagen, San Diego, California) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los clones positivos se seleccionaron usando el método de PCR directo de colonias. Brevemente, se recogieron colonias transformadas de *Escherichia coli* con palillos de dientes y se agitaron con formación de vórtice en una mezcla de reacción de PCR de 20 µl que contenía los siguientes componentes: ADN polimerasa Taq (Sigma), tampón 1 X PRC, 2,5 Mm de MgCl₂, mezcla de dNTP (0,20 mM cada uno), 0,25 µM de cebador n.º 62 (SEQ ID NO: 3) y 0,25 µM de cebador n.º 63 (SEQ ID NO: 4)
- 10
- 15 en un tubo de PCR de 200 µl, respectivamente. Mientras tanto, también se sembraron en estrías colonias sobre una placa de referencia para el aislamiento de ADN plasmídicos.

- La PCR se realizaron en las siguientes condiciones: 94 °C durante 3 minutos para 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
- 20 productos de PCR se diferenciaron en gel de agarosa al 0,8 %. Las colonias a partir de las cuales 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 bacterianas de *E. coli* de 3 ml de cultivo usando Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo (Zymo Research Corp., Orange, California). Su inserto se secuenció
- 25 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 se 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 tiene 724 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: 5). Los 498 nucleótidos corriente arriba del código de inicio de traducción putativo ATG de un marco de lectura abierto (ORF) del gen de la tubulina putativo parcial se determinó que eran un promotor de la
- 30 expresión del gen putativo (secuencia n.º 701; SEQ ID NO: 6) en base a análisis usando diversos softwares de bioinformática. Se identificaron elementos promotores génicos típicos dentro de esta secuencia. Una búsqueda de secuencias homólogas a esta secuencia promotora putativa n.º 701 (SEQ ID NO: 6) se realizó en diversas bases de datos del GenBank, incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna
- 35 secuencia homóloga a esta secuencia promotora única n.º 701. La secuencia parcial del extremo 5' del ORF tiene la mayor homología con el gen de la *beta tubulina 2 de Chlamydomonas reinhardtii (TUB2)* (Nº de acceso de GenBank N.º: XM_001693945) en una búsqueda BLAST.

- La secuencia del promotor identificado es tiene 498 nucleótidos de longitud y contiene una caja -10 Pribnow-Schaller
- 40 (AGGAAGACT) en la posición 444 y una caja -35 en la posición 424 (CTGACG), un sitio de inicio de la transcripción putativo en la posición 459 y un sitio de unión del factor de transcripción putativo AAGGTAGA en la posición 468.

2. Aislamiento e identificación de un promotor del gen de la tubulina n.º 341.

- 45 Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos n.º 54 (SEQ ID NO: 7) y n.º 55 (SEQ ID NO: 8) basándose en datos de la secuencia genómica de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths). Los cebadores de oligonucleótidos se sintetizaron y se adquirieron de Invitrogen (California, EE.UU.).

- 50 El promotor del gen de la tubulina n.º 341, incluyendo la secuencia de lectura abierta parcial corriente abajo, se amplificó a partir del ADN genómico de ONC-T18 por PCR usando las mismas condiciones que se han descrito para el aislamiento del promotor del gen de la 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) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN plasmídico del clon positivo JZ2-17-14 se aisló de células de *E. coli* de cultivo de
- 55 3 ml usando Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (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 se analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y los algoritmos BLAST. La secuencia de nucleótidos
- 60 del inserto del clon JZ2-17-14 tiene 1115 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: 9). Se ha identificado un ORF parcial de un gen de tubulina situado en la secuencia del extremo 3' del inserto. La secuencia corriente arriba del código de inicio de la traducción putativo ATG del ORF se considera como el promotor putativo n.º 341 (SEQ ID NO: 10).

Una búsqueda de secuencias homólogas al promotor del gen de tubulina n.º 341 (SEQ ID NO: **10**) se realizó en diversas bases de datos GenBank, incluyendo la base de datos de secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga para esta secuencia única del promotor del gen de la tubulina n.º 341. La secuencia del extremo 5' del ORF parcial putativo tiene la mayor homología con el gen de *la tubulina alfa 2 de Chlamydomonas reinhardtii* (TUA2) (Nº de acceso de GenBank: 5728641) en una búsqueda BLAST.

Esta secuencia de promotor de 1104 nucleótidos de longitud contiene una caja -10 (CGCTAAAAT) en la posición 542 y una caja -35 (TTCACG) en la posición 518, el sitio de inicio de la transcripción putativo en la posición 557 y el sitio de unión del factor de transcripción putativo GCTAAAAT en la posición 543, así como una caja -10 (TAGTAGATT) en la posición 143 y una caja -35 (TTGCTC) en la posición 125, el sitio de inicio de la transcripción putativo en la posición 158 y los sitios de unión ATTTTGTA del factor de transcripción putativo en la posición 149 y TTTTGTA en la posición 150.

15 3. Aislamiento e identificación de un terminador del gen de la tubulina n.º 347.

Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos n.º 58 (SEQ ID NO: **11**) y n.º 59 (SEQ ID NO: **12**) basándose en datos de la secuencia genómica de ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths). Los cebadores de oligonucleótidos se sintetizaron y se adquirieron de la empresa Invitrogen (California, EE.UU.).

El terminador del gen de la tubulina n.º 347 se amplificó a partir de ADN genómico de ONC-T18 con PCR usando las mismas condiciones como se han descrito para el aislamiento del promotor del gen de la 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) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN plasmídico del clon positivo JZ2-17-22 se aisló de las células bacterianas de *E. coli* de cultivo de 3 ml usando el Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (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 se analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y los algoritmos BLAST. El inserto de la secuencia de nucleótidos del clon JZ2-17-22 tiene 727 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: **13**). La secuencia del extremo 5' del inserto se ha identificado como un ORF parcial putativo que contiene un codón de parada traslacional del gen putativo TAA. La secuencia corriente abajo del codón de parada TAA se considera como el terminador del gen de la tubulina putativo n.º 347 (SEQ ID NO: **14**).

Una búsqueda de secuencias homólogas a la secuencia n.º 347 terminadora del gen de la tubulina (SEQ ID NO: **14**) se realizó en diversas bases de datos del GenBank, incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga de esta única secuencia n.º 347 terminadora del gen de la tubulina. La secuencia parcial del ORF putativo tiene el mayor homólogo al *gen de la tubulina alfa de Ceratopteris richardii* (N.º de acceso de GenBank: XM_001691824) en una búsqueda BLAST.

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

45 4. Aislamiento e identificación de un terminador del gen de la tubulina n.º 713.

Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos n.º 60 (SEQ ID NO: **15**) y n.º 61 (SEQ ID NO: **16**) basándose en datos de secuencias genómicas de ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths). Los cebadores de oligonucleótidos se sintetizaron y se adquirieron de Invitrogen (California, EE.UU.).

El terminador del gen de la tubulina n.º 713 se amplificó a partir del ADN genómico de ONC-T18 con PCR usando las mismas condiciones como se han descrito para el aislamiento del promotor del gen de la 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) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN de plásmido del clon positivo JZ2-22-9 se aisló de las células bacterianas de *E. coli* de cultivo de 3 ml usando Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research Corp., Orange, California).

El inserto de 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 se analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y los algoritmos BLAST. El inserto de la secuencia de nucleótidos del clon JZ2-22-9 tiene 869 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: **17**). La secuencia del extremo 5' del inserto se ha identificado como un ORF parcial putativo que contiene un codón de parada de traducción del gen putativo TAA. La secuencia corriente abajo del codón de parada TAA se considera como el terminador del gen de la tubulina putativo n.º 347 (SEQ ID NO: **18**).

Una búsqueda de una secuencia homóloga a la secuencia terminadora del gen de la tubulina n.º 713 (SEQ ID NO: **18**) se realizó en diversas bases de datos del GenBank, incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga de esta única secuencia n.º 713 terminadora del gen de la tubulina. La secuencia parcial del ORF putativo tiene la mayor homología con el *gen de la tubulina beta 1 de Cyanophora paradoxa (tubB1)* (N.º de acceso de GenBank: AF092952) en una búsqueda BLAST.

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

5. Aislamiento e identificación de una secuencia promotora (SEQ ID NO: **19) del gen de $\Delta 5$ elongasa** (documento PCT/1B2007/004,553). Basándose en los datos de la secuencia genómica de ONC-T18 usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths), se diseñaron el cebador de oligonucleótido n.º 3 (SEQ ID NO: **20**) en el que un sitio de enzima de restricción *XbaI* se añadió a su extremo 5' para la conveniencia de la clonación molecular corriente abajo y cebador n.º 4 (SEQ ID NO: **21**) en el que un sitio enzimático de restricción *NcoI* se añadió a su extremo 5'. Los cebadores de oligonucleótidos se sintetizaron y se adquirieron de Invitrogen (California, EE.UU.). El promotor del gen de $\Delta 5$ 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 se analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y los algoritmos BLAST. El inserto de la secuencia de nucleótidos del clon JZ1-57-7 tiene 950 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: **19**) y se ha identificado como el promotor del gen de la $\Delta 5$ elongasa (SEQ ID NO: **19**) de ONC-T18. Esta secuencia promotora de 950 nucleótidos (SEQ ID NO: **19**) de longitud contiene una caja -10 (TGCCAGACT) en la posición 113, una caja -35 (TTTTCT) en la posición 91, un sitio de inicio de transcripción putativo en la posición 128 y sitios de unión del factor de transcripción putativo 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 (TTTCCG) en la posición 419 y un sitio de inicio de transcripción putativo en la posición 459.

Una búsqueda de secuencias homólogas a la secuencia promotora del gen de la $\Delta 5$ elongasa (SEQ ID NO: **19**) se realizó en diversas bases de datos del GenBank, incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga a la secuencia promotora del gen de la $\Delta 5$ elongasa (SEQ ID NO: **19**).

6. Aislamiento e identificación de una secuencia promotora (SEQ ID NO: **24) del gen de la $\Delta 4$ saturasa** (documento PCT/1B2007/004,553). Se emplearon 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' para la conveniencia de la clonación molecular corriente 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', para el aislamiento de la secuencia promotora del gen de la $\Delta 4$ desaturasa (SEQ ID NO: **24**). El fragmento de ADN de promotor del gen de la $\Delta 4$ 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 el cebador n.º 15 (SEQ ID NO: **23**). Las secuencias resultantes se ensamblaron y se analizaron usando el paquete de software de bioinformática Kodon (Applied Maths) y los algoritmos BLAST. El inserto de la secuencia nucleotídica del clon JZ1-57-1 tiene 1216 pares de bases de longitud (SEQ ID NO: **24**) y se ha identificado como el promotor del gen de la $\Delta 4$ 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, una caja -35 (CTACAG) en la posición 34, el sitio de inicio de la transcripción putativo en la posición 73 y sitios de unión de un factor de transcripción putativo TTATATTT y TTTTCGCA en las posiciones 63 y 69, así como una caja -10 (CGTCATCCT) en la posición 1038, una caja -35 (TGGACG) en la posición 1014 y un sitio de inicio de la transcripción putativo en la posición 1053.

Una búsqueda de secuencias homólogas a la secuencia promotora del gen de la $\Delta 4$ desaturasa (SEQ ID NO: **24**) se realizó en diversas bases de datos del GenBank, incluyendo la base de datos de las secuencias de patentes usando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul et al., 1990). No se encontró ninguna secuencia homóloga al promotor del gen de la $\Delta 4$ desaturasa (SEQ ID NO: **15**).

Ejemplo 2: construcciones de ácido nucleico

Este ejemplo describe la construcción de los vectores de expresión génica específicos de Traustouquitrídios.

1. Generación de los vectores plasmídicos recombinantes 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 la $\Delta 4$ desaturasa y la $\Delta 5$ elongasa de ONC-T18 con PCR usando el ADN genómico de ONC-T18 como molde y ADN polimerasa *TaKaRa LA Taq*TM (TAKARA BIO INC., Shiga, Japón). Se utilizaron el cebador n.º 1 (SEQ ID NO: **25**) que lleva el sitio de la enzima de restricción *XhoI* en su extremo 5' y el cebador n.º 2 (SEQ ID NO: **26**) que abarca el sitio de la enzima de restricción *NcoI* en su extremo 5' para la amplificación del promotor del gen de la $\Delta 4$ desaturasa (SEQ ID NO: **24**). Se emplearon cebador n.º 3 (SEQ ID NO: **20**) que lleva el sitio de la enzima de restricción *XbaI* en su extremo 5' y el cebador n.º 4 (SEQ ID NO: **21**) que contiene el sitio de la enzima de restricción *NcoI* en su extremo 5' para la amplificación del promotor de la $\Delta 5$ elongasa (SEQ ID NO: **19**). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 μ l de mezcla de reacción que contenía 2,5 unidades de ADN polimerasa *TaKaRa LA Taq*TM (TAKARA BIO INC., Shiga, Japón), 1 X LA PCR Tampón II, mezcla de dNTP (0,40 mM cada uno), 22 ng del molde de ADN genómico, cebadores 0,20 μ M [pares de cebadores, n.º 1 (SEQ ID NO: **25**) y n.º 2 (SEQ ID NO: **26**) para la amplificación del gen del promotor de la $\Delta 4$ saturasa y n.º 3 (SEQ ID NO: **20**) y n.º 4 (SEQ ID NO: **21**) para la amplificación del promotor de la $\Delta 5$ elongasa] en las siguientes condiciones: 94 °C durante 30 segundos para 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 ddH₂O libre de nucleasa hasta un volumen total de 200 μ l, después se añadieron 20 μ l de 3M de NaAc (pH 5,2) y 440 μ l de etanol al 100 % y se mezclaron mediante agitación con formación de vórtice brevemente, se incubaron en hielo durante 1 hora, se centrifugaron a toda velocidad con una centrifuga de sobremesa durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante, añadieron 500 μ l de etanol al 75 % y se centrifugaron durante 2 minutos a toda velocidad, se desechó el sobrenadante y se secaron al vacío los sedimentos de ADN durante aproximadamente 10 minutos. Los productos de la PCR del promotor del gen de la $\Delta 4$ saturasa se digirieron con las enzimas de restricción *NcoI* (10 unidades) y *XhoI* (10 unidades) en un volumen de mezcla de reacción de 25 μ l que contenía IX NE Tampón 2 y 1 X BSA; (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) a 37 °C durante 2 horas. Los productos de la PCR del promotor del gen de la $\Delta 5$ elongasa se digirieron con las enzimas de restricción *NcoI* (10 unidades) y *XbaI* (10 unidades) en las mismas condiciones. Los productos de PCR digeridos se resolvieron en gel de agarosa al 0,8 % para electroforesis a 88 voltajes durante 45 minutos. Las bandas de ADN de los productos de PCR se cortaron con una cuchilla de afeitar a partir del gel de agarosa y los ADN se extrajeron y se purificaron con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN del promotor del gen de la $\Delta 4$ saturasa resultante con los extremos cohesivos específicos de enzima se ligó en los sitios de restricción correspondientes *NcoI* y *XhoI* 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 la $\Delta 5$ elongasa resultante con los extremos cohesivos específicos de enzima se ligó en los sitios de restricción del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen Corporation, California) digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *NheI* y purificado en gel de agarosa, para producir el vector pE5PZ1 (SEQ ID NO: **31**; Fig. 3). Las reacciones de ligadura se realizaron en un volumen de 10 μ l de mezcla de reacción que contenía tampón de ligadura IX, el inserto y el vector de ADN (relación molar 3:1) y 0,5 unidades de ADN ligasa T4 (Invitrogen, California) a la temperatura ambiente durante 12 horas. Después, los ADN ligados se transformaron en las células competentes Top10 de *E. coli* (Invitrogen Corporation, California). Los ADN plasmídicos de tres colonias de los transformantes se aislaron a partir de 3 ml de cultivos bacterianos usando ZippyTM Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research Corp., Orange, California). La integridad de los clones se sometió a ensayo de manera preliminar con digestiones con enzimas de restricción usando las enzimas *XhoI* y *NotI* para la construcción del promotor del gen de la $\Delta 5$ elongasa y las enzimas *NcoI* y *XhoI* para la construcción del promotor del gen de la $\Delta 4$ desaturasa. Los insertos de los clones positivos identificados preliminarmente JZ1-57-1 del vector promotor del gen de la $\Delta 4$ desaturasa y JZ1-57-7 del vector promotor del gen de la $\Delta 5$ elongasa se secuenciaron completamente usando el cebador n.º 14 (SEQ ID NO: **22**) y el cebador n.º 15 (SEQ ID NO: **23**). El vector resultante pD4DPZ1 (SEQ ID NO: **30**; Figura 2) contiene el gen *ble* de *Streptoalloteichus hidustanus*, flanqueado por el promotor del gen de la $\Delta 4$ desaturasa de ONC-T18 y el terminador SV40. El vector resultante pE5PZ1 (SEQ ID NO: **31**; Fig. 3) también contiene el gen *ble* flanqueado por el promotor del gen de la $\Delta 5$ elongasa de ONC-T18 y el terminador SV40.

La presente invención proporciona, por 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 detectables o seleccionables.

2. Generación de vector de expresión (SEQ ID NO: **32; Fig. 4) del gen marcador de proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés).** Para la preparación del ADN plasmídico molde del gen GFP, la solución madre bacteriana de *E. coli* que contiene el plásmido pCD3-327 [nº de acceso de GenBank U70496; (Davis y Vierstra, 1998)] se adquirió del Arabidopsis Deposit Center (Ohio, EE.UU.). Las bacterias se sembraron en estrías en la placa de agar LB que contenía 100 μ g/ml de ampicilina. Se inoculó una sola colonia en 3 ml de medio LB que contenía 100 μ g/ml de ampicilina y se cultivó durante la noche. El ADN plasmídico de las bacterias cultivadas se aisló usando el kit de aislamiento Ultraclean Microbial Miniprep DNA Isolation kit (MO (MO BIO Laboratories, Inc, Solana Beach, California) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

El fragmento de ADN del gen GFP se amplificó con PCR usando la ADN polimerasa *TaKaRa PrimeStar Taq™* (TAKARA BIO INC, Shiga, Japón), el ADN pCD3-327 plasmídico molde y los pares de cebadores n.º 5 (SEQ ID NO: 33) que llevan el sitio de enzima de restricción *XhoI* 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 la enzima de restricción *XhoI* y se purificaron en gel. El ADN purificado en gel se ligó en los sitios de enzimas de restricción *XhoI* y *BsaAI* de la cadena principal del ADN plasmídico del vector pE5PZ1 (SEQ ID NO: 31; Fig 3) digerido con las enzimas *XhoI* y *BsaAI* y se purificó en gel, para reemplazar el gen *ble* con el gen marcador de proteína fluorescente verde (GFP) y proporcionar 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 la $\Delta 5$ elongasa de ONC-T18 y el terminador SV40.

La presente invención proporciona, por 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 detectables o seleccionables. A la luz de la descripción proporcionada en el presente documento de una pluralidad de dichos vectores y la información de secuencia con respecto a ciertos elementos tales como promotores y/o terminadores suficientes para permitir la unión de los elementos (por ejemplo, promotores, terminadores) que tienen dichas secuencias a otros elementos, los expertos habituales en la materia, leyendo la presente divulgación, estarían habilitados para fabricar y usar una amplia gama de diferentes construcciones de vectores individuales, por ejemplo, mediante la combinación de secuencias proporcionadas con cualquiera de una diversidad de otros elementos 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 la tubulina n.º 341 de ONC-T18 y el terminador SV40, el fragmento de ADN del promotor del gen de la 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 a una pequeña región de un vector intermedio derivado de vector pT7Blue-3 (Novagen, Gibbstown, NJ, EE.UU.) y su extremo 3' es complementario a la cadena negativa del extremo 5' del promotor del gen de la tubulina n.º 341 de ONC-T18. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 67 (SEQ ID NO: 37) es complementario a la cadena positiva de la secuencia del extremo 5' del marco de lectura abierto del gen *ble* y su extremo 3' es complementario a la de cadena positiva del extremo 3' del promotor del gen de la tubulina n.º 341 de ONC-T18.

El fragmento de ADN del ORF del gen *ble* que incluye el terminador SV40 situado 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 plasmídico molde del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen, California). La secuencia de extremo 5' del cebador n.º 68 (SEQ ID NO: 38) es complementario a la cadena negativa de la secuencia del extremo 3' del promotor del gen de la tubulina n.º 341 de ONC-T18 y su secuencia del extremo 3' es complementaria a la cadena negativa del extremo 5' del ORF del gen *ble*. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 71 (SEQ ID NO: 39) es complementaria a una pequeña región de un vector intermedio derivado de vector pT7Blue-3 y su secuencia del extremo 3' es complementaria a la cadena positiva de la secuencia del extremo 3' del terminador SV40.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de mezcla de reacción de 50 μ l que contenía 2,5 unidades de ADN polimerasa *TaKaRa PrimeStar Taq™* (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), 1 X Tampón de PCR *PrimerStar*, mezcla de dNTP (0,40 mM cada uno), 1 ng del ADN plasmídico molde, 0,20 μ M 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 °C durante 2 minutos, durante 30 ciclos. Los productos de PCR del promotor del gen de la tubulina n.º 341 y el ORF del gen *ble* se resolvieron en gel de agarosa al 0,8 % para electroforesis a 65 voltajes durante 60 minutos. Las bandas con los tamaños adecuados se cortaron con una cuchilla de afeitar y sus ADN se extrajeron y purificaron con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con 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 extensión por PCR para fusionar el promotor del gen de la tubulina n.º 341, el ORF del gen *ble* incluyendo el terminador SV40 juntos (Higuchi, Krummel y Saiki, 1988; Zhang, Wege y Jeske, 2001). La extensión por PCR se realizó en un volumen de mezcla de reacción de 50 μ l 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 μ M cada uno). Se emplearon las condiciones de PCR, 98 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 5 minutos y 72 °C durante 3 minutos para 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 contenía el casete de expresión del gen *ble* específico de ONC-T18 se purificó en gel con kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se clonó en un vector intermedio derivado de vector pT7Blue-3 (Novagen, Gibbstown, NJ, EE.UU.), usando la extensión por PCR (Higuchi, Krummel y Saiki, 1988; Zhang, Wege y Jeske, 2001). La extensión por PCR se realizó en un volumen de 50 μ l de mezcla de reacción de PCR que contenía 2,5 unidades de ADN polimerasa *TaKaRa PrimeStar Taq™* (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), 1 X Tampón de PCR *PrimerStar*, mezcla de dNTP (0,40 mM cada uno), 200 ng del ADN del producto de PCR purificado en gel que contenía 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 *HindIII*. 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. Después, el ADN plasmídico molde se destruyó por la digestión con enzimas de restricción de *DpnI* que digirieron específicamente el ADN plasmídico metilado aislado de algunas cepas bacterianas. Esta digestión se realizó en un volumen de reacción de 150 µl que contenía 50 µl de productos de PCR de extensión, 30 unidades de tampón de reacción 4 de enzima de restricción *DpnI* y IX 4 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) a 37 °C durante 2 horas. Después de la 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 ml y se desaló adicionalmente y el ADN se concentró a ~100 ng/ml usando la columna Microcon (YM-100, Millipore Corporate, Billerica, MA). Un µl del ADN desalado se usó para transformar las células competentes Top10 de *E. coli* (Invitrogen, California, EE.UU.) usando el electroporador (Eppendorf 5210), ajustado a 1890 voltajes, así como las cubetas de electroporación de 1 mm de hueco (Eppendorf, NY, EE.UU.). Se seleccionaron colonias positivas de manera preliminar con el PCR DE colonia 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 se 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 la tubulina n.º 341 de ONC-T18 y el terminador SV40.

La presente invención proporciona, por 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 detectables o seleccionables. A la luz de la descripción proporcionada en el presente documento de una pluralidad de dichos vectores y la información de secuencia con respecto a ciertos elementos tales como promotores y/o terminadores suficientes para permitir la unión de los elementos (por ejemplo, promotores, terminadores) que tienen dichas secuencias a otros elementos, los expertos habituales en la materia, leyendo la presente divulgación, estarían habilitados para fabricar y usar una amplia gama de diferentes construcciones de vectores individuales, por ejemplo, mediante la combinación de secuencias proporcionadas con cualquiera de una diversidad de otros elementos conocidos, con frecuencia de acuerdo con técnicas conocidas.

4. Generación del vector plasmídico recombinante 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 la 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 la 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 del 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 plasmídico molde del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen, California). La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 72 (SEQ ID NO: 45) es complementaria a la cadena positiva de la secuencia del extremo 5' del terminador del gen de la tubulina n.º 347.

El fragmento de ADN del terminador del gen de la 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 5' del cebador n.º 73 (SEQ ID NO: 46) es complementaria a la cadena negativa de la secuencia del extremo 3' del marco de lectura abierto del gen *ble* y su extremo 3' es complementario a la cadena negativa del extremo 5' del terminador del gen de la tubulina n.º 347 de ONC-T18.

La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 74 (SEQ ID NO: 47) es complementaria a una pequeña región de un vector intermedio derivado del vector pT7Blue-3 y su extremo 3' es complementario a la cadena positiva del extremo 3' del terminador del gen de la tubulina n.º 347 de *Thraustochytrium* sp..

Las PCR se realizaron exactamente como se describe en el Ejemplo 2, sección 3. Los productos de la PCR se purificaron en gel con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los productos de PCR purificados en gel del promotor del gen de la tubulina n.º 341, el ORF del gen *ble* y el terminador del gen de la 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 la tubulina n.º 341, el ORF del gen *ble* y el terminador del gen de la tubulina n.º 347 juntos. La PCR de extensión se realizó 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, 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) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se clonó en un vector intermedio derivado del vector de extensión pT7blue-3 usando PCR como se describe en el Ejemplo 2, sección 3. Los productos de la PCR de extensión se transformaron en células competentes Top10 de *E. coli* (Invitrogen, California, EE.UU.) con electroporación. Las colonias positivas se detectaron inicialmente con el método de PCR de colonia usando los pares de cebadores n.º 64 (SEQ ID NO: 40) y n.º 65 (SEQ ID NO: 41), los pares de cebadores n.º 16 (SEQ ID NO: 42) y n.º 59 (SEQ ID NO: 12) y los 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 directo e inverso, 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 se 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 la tubulina n.º 341 de ONC-T18 y el terminador n.º 347.

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

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 la tubulina n.º 341 y el terminador del gen de la tubulina n.º 713 de ONC-T18, el fragmento de ADN del promotor del gen de la 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 del ORF del gen *ble* 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 plasmídico molde del vector pSV40/Zeo2 (Invitrogen, California). La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 75 (SEQ ID NO: 49) es complementaria a la cadena positiva de la secuencia del extremo 5' del terminador del gen de la tubulina n.º 713.

El fragmento de ADN del terminador del gen de la 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 a la cadena negativa de la secuencia del extremo 3' del ORF del gen *ble* y su extremo 3' es complementario a la cadena negativa del extremo 5' del terminador del gen de la tubulina n.º 713 ONC-T18. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 77 (SEQ ID NO: 51) es complementaria a una pequeña región de un vector intermedio derivado del vector pT7blue-3 y su extremo 3' es complementario a la cadena positiva del extremo 3' del terminador del gen de la tubulina n.º 713 de ONC-T18.

Los productos de PCR del promotor del gen de la tubulina n.º 341, ORF del gen *ble* y el terminador del gen de la tubulina n.º 713, se purificaron en gel, se mezclaron en relaciones molares similares y se usaron como el molde de ADN para la 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 la tubulina n.º 341, el ORF del gen *ble* y el terminador del gen de la tubulina n.º 713 juntos. 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 con *HindIII* derivado del vector pT7blue-3 usando una segunda PCR de extensión. Un microlitro (~100 ng) de ADN de productos de PCR de extensión se usaron para transformar células competentes Top10 de *E. coli* (Invitrogen, California, EE.UU.) con electroporación. Las colonias positivas se detectaron inicialmente con PCR de colonia usando el par de cebadores n.º 64 (SEQ ID NO: 40) y n.º 65 (SEQ ID NO: 41), el par de cebadores n.º 16 (SEQ ID NO: 42) y n.º 77 (SEQ ID NO: 51) y el 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 se 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 la tubulina n.º 341 y el terminador n.º 713 de ONC-T18.

La presente invención proporciona, por tanto, entre otras cosas, vectores que comprenden promotores y terminadores de *Thraustochytrium* unidos operativamente a un gen heterólogo (por ejemplo, de manera que el promotor esté corriente arriba del gen y el terminador esté corriente abajo). En algunas realizaciones, dichos vectores incluyen, por ejemplo, uno o más orígenes de replicación y uno o más marcadores detectables o seleccionables. La presente invención proporciona, por 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 detectables o seleccionables. A la luz de la descripción proporcionada en el presente documento de una pluralidad de dichos vectores y la información de secuencia con respecto a ciertos elementos tales como promotores y/o terminadores suficientes para permitir la unión de los elementos (por ejemplo, promotores, terminadores) que tienen dichas secuencias a otros elementos, los expertos habituales en la materia, leyendo la presente divulgación, estarían bien habilitados para realizar y usar una amplia gama de diferentes construcciones de vectores individuales, por ejemplo mediante la combinación de secuencias proporcionadas con cualquiera de una diversidad de otros elementos conocidos, con frecuencia de acuerdo con técnicas conocidas.

6. Generación del vector plasmídico recombinante p701PZ40T (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 la tubulina n.º 701 de ONC-T18 y el terminador SV40, el fragmento de ADN del promotor del gen de la

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 a una pequeña región del vector p341PZ40T y su extremo 3' es complementario a la cadena negativa de la secuencia del extremo 5' del promotor del gen de la tubulina n.º 701. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 88 (SEQ ID NO: **54**), es complementaria a la cadena positiva de la secuencia del extremo 5' del ORF del gen *b1e* y su extremo 3' coincide con el de la cadena positiva del extremo 3' del terminador del gen de la 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 la tubulina n.º 341 usando PCR de (Higuchi et al., 1988; Zhang et al., 2001). Se usaron ADN polimerasa *TaKaRa PrimeStar Taq*[™], 200 ng de ADN de los productos de PCR purificados en gel y 600 ng de ADN plasmídico linealizado con Bg/II del vector p341PZ40T, en la PCR de extensión. Se usó un microlitro (~100 ng) de ADN productos de PCR de extensión para transformar células competentes Top10 de *E. coli* (Invitrogen, California, EE.UU.) con electroporación. Las colonias positivas se detectaron inicialmente con método de PCR de colonia 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 se 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 *b1e* resultante se denominó p701PZ40T (SEQ ID NO: **52**; Figura 7), en el que el gen *b1e* está flanqueada por el promotor del gen de la tubulina n.º 701 de ONC-T18 y el terminador SV40.

7. Generación del vector plasmídico recombinante p341PRsGP40T (SEQ ID NO: **55**; Fig. 9). Para construir el vector p341PRsGFP40T (SEQ ID NO: **55**; Figura 9) que contiene el gen *GFP* de *Aequorea victoria*, flanqueado por el promotor del gen de la tubulina n.º 341 de ONC-T18 y el terminador SV40, el fragmento de ADN del promotor del gen de la 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 a la cadena positiva de la secuencia del extremo 5' del ORF del gen *GFP* y su extremo 3' coincide con la cadena positiva del extremo 3' del promotor del gen de la tubulina n.º 341 de ONC-T18.

El fragmento de ADN del 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 a la cadena positiva de la secuencia del extremo 3' del promotor del gen de la tubulina n.º 341 de ONC-T18 y su secuencia del extremo 3' coincide con la cadena negativa del extremo 5' del ORF del gen *GFP*. La secuencia del extremo 5' del cebador n.º 80 (SEQ ID NO: **58**) es complementaria a la cadena positiva de la secuencia del extremo 5' del terminador SV40 y su extremo 3' coincide con el de cadena positiva de la secuencia del extremo 3' del ORF del gen *GFP*.

El fragmento de ADN del terminador 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 a la cadena negativa de la secuencia del extremo 3' del ORF del gen *GFP* y su secuencia del extremo 3' coincide con el extremo 5' del terminador SV40.

Los tres productos de PCR anteriores se purificaron en gel, se mezclaron en relaciones molares similares y se usaron como molde de ADN para la amplificación por PCR usando el par de cebadores n.º 66 (SEQ ID NO: **36**) y n.º 71 (SEQ ID NO: **39**) para fusionar el promotor del gen de la tubulina n.º 341, ORF del gen *GFP* y el terminador SV40 juntos (Higuchi, Krummel y Saiki, 1988). El producto de PCR de extensión que contenía el casete de expresión del gen *GFP* específico de ONC-T18 se purificó en gel y se clonó en vector p341PZ40T linealizado con la enzima de restricción *Hind*III en una segunda ronda de PCR de extensión. Los productos de la segunda ronda de PCR se limpiaron, se desalaron y se transformaron en células competentes Top10 de *E. coli* con electroporación. Las colonias positivas se seleccionaron usando PCR de colonia directa 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 se 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 la tubulina n.º 341 de ONC-T18 y el terminador SV40.

8. Generación del vector plasmídico recombinante pD4DPZ118S (SEQ ID NO: **61**; Fig. 10). Para construir el vector pD4DPZ118S (SEQ ID NO: **61**; Fig 10), el ADN plasmídico del vector pD4DPZ1 se digirió con las enzimas de restricción *Sall*I y *Sph*I para linealizar el vector y después se purificó en gel con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El fragmento de ADNr 18S (SEQ ID NO: **29**) que se amplificó a partir 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 que se clonó en el vector pT7Blue-3, se liberó del ADN plasmídico del clon JZ2-3-1 por digestión por restricción con las enzimas *Xho*I y *Sph*I y después se purificó

en gel y se ligó en los sitios de restricción *Sall* y *SphI* del vector linealizado de pD4DPZ1, para producir el pD4DPZ18S (SEQ ID NO: 61; Fig. 10) que lleva un fragmento de ADN del gen de ARN ribosómico 18S.

5 **9. Generación del vector plasmídico recombinante p341PZ5pEx** (SEQ ID NO: 62; Fig. 11). Para construir la construcción p341PZ5pEx para la sobreexpresión de genes homólogos y heterólogos, para inactivar o atenuar el gen homólogo en los microbios protistas Traustochytridios, el vector de expresión del gen de resistencia a zeocina pd5EPPZ1 se modificó con PCR usando cebadores LinkerF (SEQ ID NO: 63) y LinkerR (SEQ ID NO: 64) para reemplazar el ORF del gen de resistencia a zeocina con múltiples sitios de clonación, incluyendo sitios de restricción de endonucleasa (*NcoI*, *SpeI*, *KpnI*, *MluI*, *NdeI*, *SphI*, *NruI*, *BstBI* y *BamHI*). Después de la PCR, el ADN plasmídico molde se destruyó usando la enzima de restricción endonucleasa *DpnI*. El producto de PCR se precipitó y se digirió con la enzima de restricción por endonucleasa *MluI*, se purificó en gel, se reunió entre sí con ADN ligasa T4 (Invitrogen, California) y después se transformó en células Top10 de *E. coli*. La selección preliminar de los clones positivos se realizó mediante digestiones de restricción. La integridad de los clones positivos se confirmó con secuenciación de ADN y se denominaron como el plásmido p5eEP40T (SEQ ID NO: 65). El ADN plasmídico del clon positivo se digirió con las enzimas de restricción por endonucleasa *HindIII* y *EcoRI* y el ADN plasmídico de la cadena principal se purificó en gel. El casete de expresión del gen de resistencia a zeocina en el que el ORF del gen de zeocina está flanqueado por el promotor del gen de la tubulina n.º 341P y el terminador SV40, también se aisló y se purificó en gel a partir del vector p18S341PZ40t digerido con las mismas enzimas de restricción por endonucleasa *HindIII* y *EcoRI*. Después, el casete de expresión del gen de resistencia a zeocina se ligó en los sitios de restricción por endonucleasa correspondientes *HindIII* y *EcoRI* del plásmido p5eEP40T, dando como resultado el vector de expresión génica p341PZ5pEx.

Ejemplo 3: Identificación de un antibiótico que puede usarse para la manipulación genética de *Thraustochytrium sp.* ONC-T18

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

30 *Thraustochytrium sp.* Se cultivó 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 una incubadora agitadora a 25 °C a 250 rpm durante 36 horas. La mitad de un mililitro del cultivo se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se agitó con formación de vórtice a velocidad máxima durante 30 segundos para romper los grupos de células, después se diluyeron en 50 ml de agua esterilizada. Después, se extendieron cien microlitros de la solución resultante sobre cada placa de medio ONC-T18-GM0. Cada placa contenía uno de diversos antibióticos en una de diversas concentraciones. Las placas se incubaron a 25 °C y se observaron la aparición y el desarrollo de las colonias a diario. Como puede observarse en la Tabla 1, el crecimiento de ONC-T18 fue insensible a la mayor parte de los antibióticos sometidos a ensayo. Sin embargo, la zeocina inhibió significativamente el crecimiento de ONC-T18 en placas de agar ONC-T18-GM0.

40 De este modo, el presente Ejemplo identifica la zeocina como un antibiótico que puede usarse para la selección en experimentos de manipulación genética.

Tabla 1: Efectos de diferentes antibióticos sobre el crecimiento de *Thraustochytrium sp.* ONC-T18

antibióticos	Concentración (µg/ml de medio)				
	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	++++	+++	++	+	---

45 Ejemplo 4: Optimización de la salinidad en medio QNC-T18-GM0 para la selección eficaz de transformantes de *Thraustochytrium sp.* ONC-T18

50 Como se sabe en la técnica, la zeocina es inestable a altas concentraciones de sal (Invitrogen, CA, EE.UU.). También se ha demostrado que ONC-T18 prefiere crecer en condiciones de salinidad relativamente alta debido a sus entornos de poblamiento naturales (documento PCT/IB2006/003977). El presente Ejemplo describe la determinación de las concentraciones y salinidades de zeocina óptimas para la selección eficaz de transformantes de ONC-T18 usando un gen de resistencia a zeocina como el marcador seleccionable.

Se extendieron Cien μ l de suspensión de células ONC-T18 diluida a 1:500 de un cultivo de 2 días sobre placas de ONCT18-GM0 que contenían diversas concentraciones de antibiótico zeocina y sal marina. Las placas inoculadas se incubaron en una incubadora a 25 °C durante 10 días. Se contó el número de colonias en cada placa. Se presentan medias del número de colonias de dos placas duplicadas en la Tabla 2. Después de 10 días postinoculación, no se observaron colonias en las placas de agar ONCT18-GM0 que contenían 5 g/l de sal marina y diversas concentraciones de zeocina. En las placas que contenían 8,5 g/l de sal marina sin zeocina, se observó solo una colonia. En las placas que contenían 18 g/l de sal marina sin zeocina, los números de colonias fueron similares a los de las placas que contenían 35 g/l de sal marina sin zeocina. Sin embargo, la zeocina a una concentración de 30 μ g/ml inhibió completamente el crecimiento de ONC-T18 en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían 18 g/l de sal marina, mientras que se necesitaron 100 μ g/ml de zeocina para la inhibición completa de ONC-T18 en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían 35 g/l de sal marina. Se midieron los diámetros de las colonias individuales en dos placas duplicadas y sus medias se muestran en la Tabla 3. La salinidad entre 18 g/l y 35 g/l no afectó a los tamaños de las colonias significativamente (Fig. 12). Por tanto, el presente ejemplo demuestra, entre otras cosas, que se observó un mejor crecimiento en presencia de sal marina en una concentración superior a aproximadamente 8,5 g/l. De acuerdo con la presente invención, las concentraciones en el intervalo de 8,5 g/l a más de 35 g/l (por ejemplo, a 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 tanto como 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 la selección de transformantes usando zeocina, por supuesto, es deseable conseguir un crecimiento robusto con una sensibilidad mantenida a la zeocina. Por tanto, para este trabajo, se usaron 18 g/l de sal marina para fabricar ONC-T18-GM0 para la selección de transformantes de ONC-T18 transformados con construcciones que llevan un casete de expresión del gen resistente a zeocina.

Tabla 2: Efectos de la zeocina y la salinidad sobre el número de colonias de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

Concentración de sal (g/l)	Concentración de zeocina (μ g/ml)				
	0	10	30	50	100
5	0	0	0	0	0
8,5	1	0	0	0	0
18	33	11	0	0	0
35	39	22,5	11	5	0

Tabla 3: Efectos de la zeocina y la salinidad sobre las tasas de crecimiento de colonias (diámetro en mm) de ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

Concentración de sal (g/l)	Concentración de zeocina (μ g/ml)				
	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 sometieron a ensayo en diversas condiciones de presión. En el presente Ejemplo, se descubrió que una condición de presión de aproximadamente 1100 psi dio como resultado una mejor eficiencia de transformación que otras condiciones de presión sometidas a ensayo.

Ejemplo 5: Transformación de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

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

Materiales y métodos

Generación de células competentes. Se mantuvo ONC-T18 en placas de agar ONC-T18-GM0 en una incubadora de 25 °C y se transfirió a placas nuevas cada 3-4 semanas. Un asa de inóculo de ONC-T18, tomada entre células de crecimiento vigoroso, se inoculó en 50 ml de ONC-T18-GM0 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, después se cultivó en una incubadora agitadora a 25 °C a 150 rpm durante aproximadamente 46 horas. Se transfirió la mitad de un mililitro del cultivo a un tubo de centrifuga esterilizado de 1,5 ml en una campana de flujo laminar en condiciones estériles, después, se centrifugó en una centrifuga de sobremesa a 3.000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se desechó, el sedimento de células se resuspendió en 0,5 ml de agua esterilizada y se extendieron 100 μ l de la suspensión celular sobre la zona central (aproximadamente 28 cm²) de una placa de agar ONC-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 asentaran y para evaporar el agua líquida.

- Transformación biolística.* Se aislaron los plásmidos pd5EPZ1, p341PZ40T, p341PZ347T, p341PZ713T y pD4DPZ18S (construidos como se describe en el Ejemplo 2; véanse también las Fig. 3, 5, 6, 7 y 10) a partir de cultivos bacterianos de las cepas que contenían los plásmidos respectivos usando el ZYPHY™ Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research Corp., Orange, California) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Como se analiza en el
- 5 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 hindustanus*). Otros transgenes *ble* también son adecuados, tales como los transgenes *Tn5 ble* y *Sa ble* (*Staphylococcus aureus*).
- 10 Para cada plásmido, se mezclaron 5 µl (~1 µg/µl) del plásmido de ADN con 25 µl de suspensión de partículas de oro (60 mg/ml en glicerol al 50 %) agitando con formación de vórtice durante 3 minutos e incubación en hielo durante 10 minutos. Se añadieron diez µl de espermidina 0,1 M y 25 µl de CaCl₂ 2,5 M a la mezcla e inmediatamente se agitaron con formación de vórtice durante 4 minutos, después se centrifugaron durante 10 segundos a toda
- 15 plasmídico se lavaron dos veces con etanol al 70 % y resuspendieron en 36 µl de etanol al 98 %. Se extendieron seis µl de la suspensión de partículas de oro sobre cada disco macroportador y los discos se secaron al aire (Zhang *et al.* 2001).

- Se utilizó el sistema de entrega de partículas PSD-1000/He (Bio-Rad Laboratories, Inc., California) para la entrega
- 20 de ADN plasmídicos que llevaban casetes de expresión de genes resistentes a la zeocina en células competentes ONC-T18 en condiciones esterilizadas en una campana de flujo laminar de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las partes del sistema de entrega de partículas, incluidos los soportes de macroportador, los macroportadores, las pantallas de parada, se trataron en autoclave. La cámara del sistema de entrega de partícula se desinfectó limpiando con etanol al 70 %. Después del bombardeo, las placas de Petri que contenían células transformadas se
- 25 incubaron en incubadora a 25 °C en la oscuridad durante 6 horas. Después, las células transformadas se separaron por lavado de los platos usando 1 ml de agua esterilizada, se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml esterilizado por autoclave y se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 0,5 ml de agua esterilizada en autoclave. Se extendieron 150 µl de la suspensión celular sobre placas de agar que ONC-T18-GM0 contenían ~150-200 µg/ml de zeocina. Después de que se hubiera
- 30 evaporado el líquido de las placas, las placas se sellaron con PARAFILM® M y se incubaron en incubadora a 25 °C durante 6-10 días. Se recogieron las 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 sobre placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían 150-200 µg/ml de zeocina. Después de 3-5
- 35 días de incubación a 25 °C, las colonias de crecimiento vigoroso se eligieron para el análisis adicional.
- Se cultivaron colonias resistentes a zeocina en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían 150-200 µg/ml de zeocina 4-6 días después de la transformación biolística. Se generaron cepas resistentes a zeocina 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.
- 40 (Véase la Tabla 4.)

Tabla 4: Número de transformantes por transformación

Construcciones	número de transformantes/5 µg de ADN plasmídicos
pd5EPZ1	11
p341PZ40T	9
p341PZ347T	4
p341PZ713T	7
pD4DPZ18S	5

- Ejemplo 6: Análisis por PCR de transformantes de ONC-T18 de *Thraustochytrium sp.*
- 45 Este ejemplo describe la confirmación de la presencia de transgenes en ONC-T18 transformada. Un ensayo por PCR se usó para evaluar la presencia del transgén *ble*, que está presente en cada una de las construcciones plasmídicas utilizadas para transformar ONC-T18.
- 50 Se inoculó un asa de inóculo de cada cepa potencialmente transformada en crecimiento en placas de agar zeocina-ONC-T18-GM0 en 10 ml de medio ONC-T18-GM0 líquido en un matraz de 50 ml y se cultivó en una incubadora agitadora a 25 °C y a 250 rpm durante 2 días. Se usaron cultivos de dos ml para el aislamiento del ADN genómico de cada cepa usando un kit de aislamiento de ADN Ultraclean Microbial Mini-Prep (MO BIO Laboratories, Inc, Solana Beach, California) siguiendo el protocolo del fabricante. Las concentraciones de ADN genómico se midieron usando
- 55 el fotómetro de espectro 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), 1 x tampón de PRC, MgCl₂ 2,5 mM, mezcla de dNTP (0,20 mM cada uno), cebador n.º 64 0,25 mM (SEQ ID

NO: **66**) y cebador n.º **65** 0,25 mM (SEQ ID NO: **67**) en un tubo de PCR de 200 µl. Se realizaron reacciones de PCR usando el siguiente programa de ciclo térmico: 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 se hibrida con el extremo 5' y el cebador n.º 65 se hibrida con el extremo 3' del gen *ble* de cada plásmido utilizado para la transformación de ONC-T18. Un fragmento de ADN de ~350 pares de bases se amplificó a partir de los ADN genómicos de los transformantes positivos y a partir del ADN plasmídico de control positivo, pero no a partir del ADN genómico del control negativo aislado de las células ONC-T18 de tipo silvestre. Estos resultados confirman que la mayoría de las cepas resistentes a zeocina son transformantes verdaderos (Fig. **13**).

10 Ejemplo 7: Tasas de crecimiento de los transformantes

Este Ejemplo describe la determinación de tasas de crecimiento de cepas derivadas de células individuales transformadas. Se cogieron inóculos de las cepas resistentes a zeocina que se habían transferido tres veces en placas de agar 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 ONC-T18-GM0 (15 g/l de agar) que contenían ya sea 18 g/l o 35 g/l de sal marina. Los diámetros de las colonias aplicadas se midieron el día 1, el día 3, el día 5, el día 7 y el día 8 después de la inoculación.

La mayor parte de las cepas sometidas a ensayo crecieron más rápidamente que la cepa de ONC-T18 de tipo silvestre en placas de agar ONC-T18-GM0, ya sea que se hicieran crecer en placas que contenían 18 g/l o 35 g/l de sal marina. Entre las cepas sometidas a ensayo, la mayor parte creció más rápido en las placas que contenían 18 g/l de sal marina que en las placas que contenían 35 g/l de sal marina. Algunas cepas que crecían más rápido en placas de agar ONC-T18-GM0 que contenían 18 g/l de sal marina (tal como la cepa 5-3) crecieron más lentamente que otras cepas en placas que contenían 35 g/l de sal marina. Parece que las cepas más transformadas prefieren crecer en medios que contienen una salinidad inferior, por ejemplo, 18 g/l de sal marina (Fig. **14**).

Ejemplo 8: Sensibilidad a zeocina de las cepas transformadas

Este ejemplo describe ensayos de la sensibilidad a zeocina de cepas transformadas derivadas de una sola célula.

Se extrajo una cantidad muy pequeña de inóculo de cepas resistentes a la zeocina que se habían transferido tres veces a través de pases de colonias en placas de agar zeocina/ONC-T18-GM0 (así como su cepa parental o la cepa de tipo silvestre) de las colonias usando una punta de la 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 18 g/l de sal marina (15 g/l de agar) y zeocina a una concentración que variaba de 0 a 5000 µg/ml (Invitrogen, CA, EE.UU.). Los diámetros de las colonias aplicadas se midieron en el día 1, el día 3, el día 5, el día 7 y el día 8.

Todas las cepas crecieron bien en placas de agar ONC-T18-GM0 en ausencia de zeocina, pero sus tasas de crecimiento variaron. La cepa parental (la cepa de tipo silvestre) de ONC-T18 solo creció en placas de agar ONC-T18-GM0 que tenían 30 µg/ml o menos de zeocina. Para las cinco construcciones de plásmidos diferentes, todas las cepas transformadas que llevaban 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 5000 µg/ml de zeocina, la mayoría de las cepas crecieron notablemente más lentamente de lo que lo hicieron en los medios 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 aquellas transformadas con una construcción de plásmido que llevaba el casete de expresión del gen de resistencia a zeocina impulsado por el promotor del gen de la $\Delta 5$ elongasa, sin embargo, crecieron muy bien (Fig. **15**), demostrando que el promotor del gen de la $\Delta 5$ elongasa es un promotor de la expresión génica muy fuerte.

Estos resultados son coherentes con que el DHA es el principal ácido graso de almacenamiento de energía en el grupo de las microalgas Traustokuitridios (Jain *et al.* 2007) y siendo la etapa de elongación por $\Delta 5$ elongasa la etapa limitante de la velocidad durante la biosíntesis de DHA en microbios productores de ácidos grasos omega-3 DHA (Leonard *et al.*, 2004). La variabilidad de la tasa de crecimiento entre las cepas transformadas con la misma construcción plasmídica refleja la variabilidad en el número de copias del transgén *ble* o la variabilidad en la ubicación de la inserción del transgén *ble* en los cromosomas de la cepa hospedadora ONC-T18.

Estos resultados indican que diversas secuencias promotoras y terminadoras aisladas de ONC-T18 pueden impulsar eficazmente la expresión del transgén 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 los programas de mejora de cepas industriales y manipulación genética de cepas de *Thraustochytrium* sp.

Ejemplo 9: Comparaciones de productividades de biomasa entre las cepas transformadas y la cepa de tipo silvestre *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

El presente ejemplo describe comparaciones de las productividades de biomasa de los transformantes con respecto a la cepa de tipo silvestre *Thraustochytrium* sp. y demuestra, entre otras cosas, que ciertas cepas transformadas producen niveles de biomasa elevados (por ejemplo, elevados al menos al 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 % o más, en comparación con el tipo silvestre).

Se inocularon cultivos de ONC-T18, 10 ml de ONC-T18-GM0 (18 g/l de sal marina) cada uno con una cepa transformada 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 se cultivaron a 25 °C en una incubadora agitadora ajustada a 250 rpm durante 3 días hasta que la DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 1,979~2,369. Después, se inocularon cultivos de ONC-T18-GM0 de 50 ml que contenían 18 g/l o 35 g/l de sal marina en matraces de 250 ml con 6 DO₆₀₀ de los inóculos de cada cepa, incluyendo la cepa de tipo silvestre (la DO₆₀₀ se midió para 1 ml de cultivo y después el volumen de cultivo se aumentó a escala hasta corresponder a un valor de DO₆₀₀ de 6; por ejemplo, si la medición de DO₆₀₀ era de 2, entonces se usaron (1 ml x (6/2,0)) = 3 ml como inóculo). Los cultivos se desarrollaron en una incubadora agitadora ajustada a 250 rpm a 25 °C durante 2 días. Se añadieron cinco ml de glucosa al 50 % esterilizada autoclave después en cada matraz de cultivo. Los cultivos se desarrollaron continuamente en una incubadora agitadora ajustada a 150 rpm y a 20 °C durante otros 2 días. Se añadieron seis ml de glucosa al 50 % esterilizada autoclave después en cada matraz de cultivo y los cultivos se cultivaron constantemente en una incubadora agitadora ajustada a 150 rpm y a 2 °C durante 3 días más. Las biomásas de los cultivos de cada cepa en los dos tipos de medios ONC-T18-GM0 (con 18 g/l o con 35 g/l de sal marina) se recogieron mediante la transferencia de los cultivos celulares en un tubo Falcon de 50 ml y centrifugando a 4000 rpm usando el SORVALL LEGEND RT + centrífuga (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EE.UU.). La biomasa flotó sobre la superficie del medio líquido como una capa compactada. El medio líquido se liberó por la perforación de un agujero muy pequeño en la parte inferior 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 °C durante la noche y después se liofilizó usando un liofilizador durante tres días. Se pesó la biomasa de cada muestra. Se sometieron a ensayo nueve cepas, incluyendo la de tipo silvestre.

La mayor parte de los transformantes produjeron cantidades similares de biomasa celular seca que la cepa de tipo silvestre ONC-T18 cuando se cultiva en ONC-T18-GM0 que contiene 35 g/l de sal marina artificial. Una de las 8 cepas transformadas produjo aproximadamente un 22 % más de biomasa celular seca que la cepa de tipo silvestre ONC-T18 (Fig. 16) cuando se cultivó en las mismas condiciones. En el ONCT18-GM0 que contenía 18 g/l de sal marina, 7 de las 8 cepas transformadas produjeron cantidades similares o más biomasa que la cepa de tipo silvestre ONCT18. Una de las 8 cepas sometidas a ensayo produjo un 19,5 % más de biomasa que la cepa de tipo silvestre ONC-T18 (Fig. 16).

Ejemplo 10: Comparaciones de la productividad de DHA entre las cepas transformadas y cepa de tipo silvestre de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

El presente Ejemplo describe la productividad DHA en las diversas cepas transformadas y muestra niveles elevados en comparación con el tipo silvestre. El presente ejemplo demuestra, entre otras cosas, que se han alcanzado niveles en un intervalo al menos un 1 %-36 % superiores a los del tipo silvestre (por ejemplo, el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 11 %, el 12 %, el 13 %, el 14 %, el 15 %, el 16 %, el 17 %, el 18 %, el 19 %, el 20 %, el 21 %, el 22 %, el 23 %, el 24 %, el 25 %, el 26 %, el 27 %, el 28 %, el 29 %, el 30 %, el 31 %, el 32 %, el 33 %, el 34 %, el 35 %, el 36 %, etc.). Basándose en estos hallazgos, los expertos habituales en la materia apreciarán que puede conseguirse una mayor elevación (por ejemplo, a niveles en un intervalo un 1 %-1000 % superiores a los del tipo silvestre, por ejemplo, aproximadamente el 1 %, el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 100 %, el 110 %, el 120 %, el 130 %, el 140 %, el 150 %, el 160 %, el 170 %, el 180 %, el 190 %, el 200 %, el 210 %, el 220 %, el 230 %, el 240 %, el 250 %, el 260 %, el 270 %, el 280 %, el 290 %, el 300 %, el 310 %, el 320 %, el 330 %, el 340 %, el 350 %, el 360 %, el 370 %, el 380 %, el 390 %, el 400 %, el 410 %, el 420 %, el 430 %, el 440 %, el 450 %, el 460 %, el 470 %, el 480 %, el 490 %, el 500 %, el 550 %, el 600 %, el 650 %, el 700 %, el 750 %, el 800 %, el 850 %, el 900 %, el 950, el 1000 % o más altos que los del tipo silvestre). El presente ejemplo demuestra adicionalmente la consecución de relaciones DHA:biomasa dentro del intervalo de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:2, al menos aproximadamente un 40 % más altas que las normalmente observadas con cepas de tipo silvestre. (Véase, por ejemplo, la Tabla 2 en Raghukumar (2008)). Basándose en estos hallazgos, los expertos habituales en la materia apreciarán que al menos pueden conseguirse relaciones de aproximadamente 1:5. Se han conseguido relaciones de DHA a biomasa (DHA:biomasa) de aproximadamente 1:8 a 1:4; y se esperan conseguir relaciones de aproximadamente 1:3. Ejemplos en la bibliografía (por ejemplo, la revisión publicada por Raghukumar, 2008) indican logros que no han reducido esta relación por debajo de 1:5.

Se hicieron crecer cultivos de 8 cepas transformadas y su cepa parental (de tipo silvestre) y la biomasa se recogió y se liofilizó en las mismas condiciones que se describen en el Ejemplo 9. La extracción del éster metílico de ácido graso (FAME) fue a través del método de transesterificación directa. Se mezclaron aproximadamente 20 mg de

biomasa celular secada por congelación y 3 ml de tampón de reacción de transesterificación (metanol:ácido clorhídrico:cloroformo) mediante agitación con formación de vórtice durante 10 segundos y después se incubaron en un baño de agua a 90 °C durante dos horas. Después de la terminación de transesterificación, se retiraron las muestras y se enfriaron a temperatura ambiente. Se añadió un ml de agua y se mezclaron por agitación durante 10 segundos. Los FAME se extrajeron después mediante la adición de 2 ml, 3 veces, de un disolvente de hexano:cloroformo (v/v, 4:1) y agitando con formación de vórtice durante 10 segundos; después las muestras se dejaron en reposo hasta que se completaron las separaciones de fases.

El análisis cromatográfico de gases (CG) de los FAME se realizó usando dos patrones internos (200 µl). Uno, el ácido hexacosanoico (C23:0) se añadió antes de la transesterificación y el otro, el ácido nonadecanoico (C19:0) se añadió directamente antes del análisis. Los análisis se realizaron en un Agilent 6890 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) instalado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) con un diámetro interno de 30 m X 0,32 mm (espesor de la película 0,25 µm) y detector de ionización de llama fijado en 250 °C, relación de división 50:1 para detector FID a 275 °C. El volumen de inyección fue de 1 µl. El gas vehículo fue H₂ con un flujo constante de 5,0 ml por minuto. La confirmación de la identidad del FAME se realizó usando un espectrómetro de masas Trace GC-DSQ (Thermo Electron, Boston, EE.UU.) y la comparación de los tiempos de retención para los patrones del laboratorio.

Una de las ocho cepas transformadas produjo aproximadamente 6,337 g/l de DHA. Este rendimiento es aproximadamente un 16 % superior al de la cepa de tipo silvestre ONC-T18 cuando se cultivó en ONC-T18-GM0 que contenía 35 g/l de sal marina artificial. Tres de las ocho cepas transformadas produjeron más DHA, variando de un 1 a un 13 % más, que la de la cepa de tipo silvestre ONC-T18 cuando se cultivó en ONC-T18-GM0 que contenía 18 g/l de sal marina artificial en las mismas condiciones (Fig. **17A y B**).

Dos de las ocho cepas transformadas produjeron 7,445 g/l y 7,871 g/l de DHA, lo que representa un 25 % y un 36 %, respectivamente, más que su cepa parental (5,935 g/l) cultivada en ONC-T18-GM0 que contenía 35 g/l sal marina artificial (Fig. **17B**). El uso de ONC-T18-GM0 de menor salinidad no solo 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 de sodio en el medio de crecimiento para el cultivo de microbios Traustochytridios.

La relación de DHA a lípidos totales a partir de cepas transformadas productoras de alto nivel de DHA es superior a la de su cepa parental (Fig. **17C**). El factor DHA a lípidos totales puede influir en el procesamiento corriente abajo del DHA extraído de las células de cepas transformadas. Las relaciones DHA:lípidos totales obtenidas con cepas y métodos de la invención pueden variar de acuerdo con las condiciones de fermentación. Por ejemplo, para cultivos cultivados en matraces, un porcentaje de DHA de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 25 % de los lípidos totales (que corresponden a relaciones de DHA:lípidos totales de aproximadamente 0,15:1 a aproximadamente 0,25:1) por lo general puede conseguirse con las cepas transformadas. Para los cultivos cultivados en un fermentador, un porcentaje de DHA de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 60 % de los lípidos totales (que corresponden a relaciones de DHA:lípidos totales de aproximadamente 0,3:1 a aproximadamente 0,6:1) por lo general puede conseguirse con cepas transformadas. Se obtienen rendimientos de DHA mucho mayores a partir de cepas transformadas desveladas en el presente documento que pueden obtenerse con las cepas de tipo silvestre. Por ejemplo, los rendimientos de DHA a partir de cepas transformadas normalmente varían de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 g/l (gramos de DHA por litro de medio), mientras que los rendimientos de DHA a partir de cepas de tipo silvestre normalmente varían de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,6 g/l. (Véase, por ejemplo, la Tabla 2 en Raghukumar (2008)). La relación de DHA con respecto a la biomasa de cepas productoras de alto nivel de DHA transformadas es también superior a la de su cepa parental. Esta mayor relación de DHA con respecto a biomasa beneficia la extracción corriente abajo de DHA a partir de la biomasa celular de las cepas transformadas (Fig. **17D**).

Todos los cultivos en este Ejemplo se cultivaron en las mismas condiciones. El mayor nivel de producción de DHA por las cepas transformadas indica que las cepas tienen una mayor eficiencia de conversión de fuentes de carbono en DHA, lo que puede reducir el coste de producción de DHA a partir de las cepas transformadas.

Ejemplo 11: Comparación de la productividad total de lípidos entre las cepas transformadas y la cepa de tipo silvestre ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp.

Como se describe y demuestra en el presente documento ampliamente, ONC-T18 tiene un gran potencial para su uso como una biofactoría eficiente no solo para AGPI y sus derivados de producciones de biomoléculas farmacéuticas y nutracéuticas, sino también para la producción de biocombustible. Con el fin de evaluar y caracterizar la capacidad de ONC-T18 para emplearse en la producción de biocombustibles de acuerdo con la presente invención, las productividades de lípido total y los perfiles de ácidos grasos de las cepas transformadas de ONC-T18 se analizaron para su uso potencial en métodos para el cambio de perfiles de ácidos grasos para aplicaciones de productos especializados.

Se hicieron crecer cultivos de 8 cepas transformadas y su cepa parental (de tipo silvestre) y la biomasa se recogió y se liofilizó en las mismas condiciones que las descritas en el Ejemplo 9. La extracción de FAME y el análisis por GC se realizaron como se describe en el Ejemplo 10.

- 5 Se descubrió que los perfiles de ácidos grasos de las cepas transformadas fueron muy similares a los de su cepa parental cuando se cultivaron en ONC-T18-GM0 que contenía 35 g/l de sal marina artificial. Cuatro de las ocho cepas transformadas produjeron más lípidos totales que su cepa parental, lo que demuestra, además, que el proceso de transformación en sí y la presencia y/o expresión del transgén no afectaron significativamente a los perfiles de ácidos grasos, ni interrumpieron genes potencialmente implicados en vías metabólicas de lípidos de la mayor parte de las cepas derivadas. Por tanto, parece que las cepas conservan la integridad genética de las cepas parentales después del proceso de transformación (Fig. 18A).

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

Las relaciones de lípido total a la biomasa fueron mayores en las cepas que producen altos niveles de ácidos grasos de cadena corta que en las cepas de bajo nivel de producción (Fig. 18C); dichas relaciones más altas pueden ser beneficiosas para la extracción de petróleo corriente abajo y la reducción de los costes de procesamiento.

El cultivo en ONC-T18-GM0 de sal marina baja (18 g/l) potenció la productividad de lípido total general para la mayoría de las cepas sometidas a ensayo (Fig. 18D).

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 un AGPI particular, como se ha mencionado en el presente documento en el análisis de la vía biosintética de AGPI. Por ejemplo, puede ser deseable aumentar la producción de EPA (por ejemplo, mediante la mutación o la anulación de los genes de PKS y los genes de la $\Delta 5$ elongasa) o de ARA (por ejemplo, mediante la regulación negativa de cualquiera de los genes de PKS y/o la regulación positiva del gen de la $\Delta 12$ elongasa).

Ejemplo 12: Estabilidad del transgén *ble* en las cepas transformadas de *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

El presente ejemplo confirma la estabilidad de los transgenes en cepas de *Thraustochytrium* sp. transformadas como se describe en el presente documento.

La estabilidad de los transgenes es importante para ciertas aplicaciones de ingeniería genética en programas de mejora de cepas microbianas industriales donde los microorganismos se usan en procesos farmacéuticos o industriales y donde la cantidad y la calidad del producto son de suma importancia. Por tanto, se realizaron ensayos de estimación de la estabilidad de los transgenes de cepas ONC-T18 transformadas. En cuanto a los ensayos de tasa de crecimiento descritos en el Ejemplo 7, se aplicaron puntualmente inóculos de cuatro cepas de cada transformación, así como sus cepas de tipo silvestre parentales en placas de agar ONC-T18-GM0 en ausencia de zeocina y se incubaron a 25 °C durante siete días. (Cada transformación se había ejecutado usando una de las cinco construcciones diferentes de plásmidos, cada una de las cuales lleva diversos casetes de expresión del gen resistente a zeocina impulsados por una combinación de diferentes promotores y terminadores). Después, usando el mismo método, las cepas se transfirieron sobre una nueva placa de agar ONC-T18-GM0 recién preparado y se incubaron a 25 °C durante 7 días; se realizaron pases de colonias 6 veces. Por último, las cepas se transfirieron de nuevo en placas de agar ONC-T18-GM0 ya sea sin o con zeocina a una concentración media de 200 µg/ml.

Los resultados indican que después de seis pasajes de colonias, todas las cepas pueden crecer bien en placas de agar ONC-T18-GM0 con o sin zeocina (Fig. 19). Sin embargo, en placas de agar ONC-T18-GM0 que tienen zeocina a una concentración media de 200 µg/ml, solo las cepas transformadas crecieron bien, mientras que ninguna de las cepas de tipo silvestre fue capaz de crecer (Fig. 19).

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

Ejemplo 13: Agente mutagénico

Este Ejemplo describe, entre otras cosas, el descubrimiento de un agente mutagénico eficaz. Este agente es particularmente útil para la mutagénesis en Traustoquitridios.

5

La zeocina es un antibiótico que rompe el ADN cromosómico en las células. Se planteó la hipótesis de que el antibiótico zeocina sería un agente mutagénico útil para cepas de Traustoquitridios para la mejora de cepas. A determinadas concentraciones, la zeocina puede destruir las células más tratadas, pero algunas células todavía sobreviven. El tratamiento de células a una concentración elevada aumenta la frecuencia de mutación, lo que puede facilitar la selección y el aislamiento de cepas mutadas.

10

La cepa de tipo silvestre de protista marino de ONC-T 18 se escogió como sistema modelo para someter a ensayo si la zeocina sería eficaz para inducir la mutagénesis en esta cepa. Un asa completa de los inóculos de ONCT18, creciendo en las placas de agar que contenían medio ONCT18-GM0 [5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona, 15 10 g/l de D(+)-glucosa, 35 g/l de sal marina artificial, 1,25 mg/l de elementos traza (5 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,15 g/l de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4,36 g/l de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,6125 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0597 g/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,022 g/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,18 g/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 13 mg/l de H_2SeO_3 , 2,7 mg/l de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,84 mg/l de Na_3VO_4 y 1,94 mg/l de K_2CrO_4) y 1,25 mg/l de vitaminas (1 mg/l de vitamina B12, 1 mg/l de biotina, 0,20 g/l de HCl de tiamina) y 20 g de agar por litro], se inoculó en 50 ml de medio ONC-T18-GM0 líquido y se incubaron en una incubadora agitadora a 25 °C a 250 rpm durante 36 horas. Se transfirió la mitad de un mililitro de cultivo a un tubo de 1,5 ml y se agitó con formación de vórtice a velocidad máxima durante 30 segundos y después se diluyó en 50 ml de agua esterilizada. Se extendieron 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 incubadora a 25 °C. Se observaron la aparición y el desarrollo de las colonias a diario. Seis días después de la inoculación, los tamaños de las colonias que crecían con zeocina a 10 µg/ml fueron similares a los de la zeocina a 0 µg/ml y disminuyeron gradualmente a de 30 a 50 µg/ml de zeocina. Los números de colonias por placa también se redujeron gradualmente a 10, 30 y 50 µg/ml de zeocina. Solo se observaron unas pocas colonias a 50 µg/ml de zeocina. Sorprendentemente, se observaron sectores de colonias con diversos cambios de morfología de las colonias visibles en algunas de las colonias que crecían a 50 µg/ml de zeocina, pero no se observaron en las colonias que crecían en la concentración más baja o sin zeocina, lo que indica que la zeocina, de hecho, es un agente mutágeno eficaz para las cepas de Traustoquitridios. En estas condiciones, la zeocina fue eficaz dentro del intervalo de al menos 10-200 µg/ml; concentraciones más altas también pueden ser eficaces. Por ejemplo, podrían funcionar concentraciones en el intervalo de 200-500 µg/ml o superior. En algunos casos, se usan concentraciones más altas de zeocina cuando las concentraciones de sal también aumentan para contrarrestar la posible degradación de la zeocina debida a la sal. En las condiciones particulares utilizadas en el presente Ejemplo, la zeocina funcionó mejor a 50 µg/ml.

20

25

30

35

Ejemplo 14: Un nuevo procedimiento de fermentación

Este Ejemplo describe un método de fermentación en dos etapas para la obtención de biomasa alta, lípidos totales y producción de AGPI en cepas de Traustoquitridios.

El ciclo de vida de la cepa ONC-T18 se estudió en detalle a través de las observaciones microscópicas de las células de cultivos que crecían en diversas condiciones, tales como relaciones de fuentes de C:N, nivel de oxígeno disuelto y temperaturas. Se descubrió que a baja concentración de oxígeno con una alta relación de carbono a nitrógeno (C:N) (por ejemplo, dentro del intervalo de 40:1 a 1:~0 y específicamente a 1:1 a 1:~0 y temperatura ambiente, la cepa ONC-T18 creció vigorosamente y se propagó principalmente a través de la producción de zoosporas, dando como resultado un gran número de pequeñas células vegetativas que contenían cuerpos oleosos relativamente pequeños y menos subcelulares. Por el contrario, a una alta relación de C:N, nivel bajo de oxígeno y temperatura relativamente baja (por ejemplo, dentro del intervalo de 10-30 °C, y, específicamente, a 20-25 °C), la cepa ONC-T18 se propagó principalmente a través de división celular vegetativa directamente, dando como resultado una gran población de células gigantes que contenían cuerpos oleosos subcelulares notablemente voluminosos. Por tanto, se desarrolló un método de fermentación en dos etapas para maximizar la biomasa, el lípido total y la productividad de AGPI. Este es un método óptimo para el cultivo y la selección de cepas de Traustoquitridios de lípidos y AGPI altos. Se realizaron los tres ensayos siguientes:

45

50

55

Ensayo I: La cepa ONC-T18 de tipo silvestre se inoculó en 10 ml de medio ONC-T18-GM0 líquido. Los cultivos se cultivaron a 25 °C en una incubadora agitadora ajustada a 250 rpm durante 2 días. Después, el inóculo ($\text{DO}_{660} = 12$) se inoculó en 100 ml de medio ONC-T18-GM0 en matraces de 250 ml. Se inocularon tres cultivos para cada cepa. Los cultivos se cultivaron en una incubadora agitadora ajustado a 250 rpm a 25 °C durante 2 días, después se cambió a 150 rpm y 20 °C y se cultivaron durante otros 4 días. La biomasa de los cultivos se recogió mediante la transferencia de los cultivos celulares en un tubo Falcon de 50 ml y centrifugando a 4000 rpm usando un SORVALL LEGEND RT + centrífuga (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EE.UU.). La biomasa flotó sobre la superficie del medio líquido como una capa compactada. El medio líquido se liberó mediante la perforación de un agujero muy pequeño en la parte inferior del tubo Falcon usando una aguja de jeringa 18G 1

60

65

1/2. El sedimento de la biomasa en el tubo se congeló en un congelador a -80 °C durante la noche y después se liofilizó usando un liofilizador durante tres días. Se pesó la biomasa de cada muestra.

Ensayo II: El inóculo se preparó como se describe en el Ensayo I. Después, el inóculo (DO₆₆₀ = 6) se inoculó en 50 ml de medio ONC-T18-GM0 en matraces de 250 ml. Se inocularon tres cultivos para cada cepa. Los cultivos se cultivaron en una incubadora agitadora ajustada a 250 rpm a 25 °C durante 2 días, después se cambió a 150 rpm y 20 °C. 2 días después de la inoculación, se añadieron 5 ml de glucosa al 50 % esterilizada en autoclave en cada matraz de cultivo, después, 4 días después de la inoculación, se añadieron 6 ml de glucosa. Después de 6 días postinoculación, se recogieron las biomásas de los cultivos como se describe en el Ensayo I.

Ensayo III: Los inóculos se prepararon como se describe en el Ensayo I. Después, el inóculo (DO₆₆₀ = 6) se inoculó en 50 ml de medio ONC-T18-GM0 en matraces con deflectores de 250 ml. Los cultivos se desarrollaron en una incubadora agitadora ajustada a 250 rpm a 25 °C. 2 y 4 días después de la inoculación, se añadieron 5 y 6 ml de glucosa al 50 % esterilizada en autoclave en cada uno de los matraces de cultivo, respectivamente, como se hizo en el Ensayo III. El día 6 después de la inoculación, se recogieron las biomásas de cultivos como se describe en el Ensayo II.

Se analizaron los contenidos totales de lípidos y de DHA de cada muestra usando el método de transesterificación directa. Se mezclaron aproximadamente 20 mg de biomasa celular secada por congelación y se mezclaron 3 ml de tampón de reacción de transesterificación (metanol:ácido clorhídrico:cloroformo) mediante agitación con formación de vórtice durante 10 segundos y después se incubaron en un baño de agua a 90 °C durante dos horas. Después de la finalización de la transesterificación, las muestras se retiraron y se enfriaron a temperatura ambiente. Se añadió un ml de agua y se mezcló con formación de vórtice durante 10 segundos. Después se extrajeron los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) mediante la adición de 2 ml del disolvente de hexano:cloroformo (v/v, 4:1), 3 veces, y agitación con formación de vórtice durante 10 segundos y se dejó reposar hasta que se completaron las separaciones de fases.

El análisis cromatográfico de gases (CG) de los FAME se realizó usando dos patrones internos (200 µl). Uno, el ácido hexacosanoico (C23:0) se añadió antes de la transesterificación y el otro, el ácido nonadecanoico (C19:0) se añadió directamente antes del análisis. Los análisis se realizaron en un Agilent 6890 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) instalado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) con un diámetro interno de 30 m X 0,32 mm (espesor de la película 0,25 µm) y detector de ionización de llama fijado en 250 °C, relación de división 50:1 para detector FID a 275 °C. El volumen de inyección fue de 1 µl. El gas vehículo fue H₂ con un flujo constante de 5,0 ml por minuto. La confirmación de la identidad del FAME se realizó usando un espectrómetro de masas Trace GC-DSQ (Thermo Electron, Boston, EE.UU.) y la comparación de los tiempos de retención para los patrones del laboratorio.

Los resultados (Tabla 5) indicaron que las condiciones de fermentación utilizadas en el Ensayo II fueron las mejores para la producción alta de lípidos y DHA en ONC-T18; se observaron niveles dentro del intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente el 70 % de la biomasa seca; pueden esperarse niveles tan altos como de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 % en base a estos hallazgos. Los rendimientos de DHA observadas 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 de aproximadamente 45 a aproximadamente 95 g/l.

El aumento del oxígeno disuelto, por ejemplo, mediante el uso de un matraz con deflectores 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 en el Ensayo II. Por tanto, la optimización de los parámetros de la fermentación tales como la relación de C:N, la concentración de glucosa, el oxígeno disuelto y la temperatura, así como la dinámica de estos parámetros durante los procesos de fermentación, repercute en la producción rentable de lípidos y AGPI en cepas de *Traustochytridium*. Sin desear estar ligado por 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 a los menores niveles de oxígeno disuelto en el Ensayo II.

Tabla 5 Productividades de biomasa, lípidos totales y DHA de *Traustochytrium* sp. ONC-T18 en diversas condiciones de fermentación

Ensayo	Biomasa (g/l)	Lípidos totales (mg/g)	DHA (g/l)
I	7,10	211,20	0,45
II	41,32	671,09	5,94
III	46,50	661,07	3,06

Ejemplo 15: Aplicación de un agente mutagénico

Este Ejemplo describe la aplicación de un agente mutagénico, zeocina, para la mejora de cepas de *Traustochytridium*.

Los inóculos de sectores de colonias se transfirieron a nuevas placas recién preparadas y se desarrollaron en nuevas cepas. Se eligieron cuatro nuevas cepas, la, 1b, 3a y 3b para su 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 ONC-T18-GM0 líquido. Los cultivos se cultivaron a 25 °C en una incubadora agitadora ajustada a 250 rpm durante 3 días hasta que la DO₆₆₀ fue superior a 2. Después, los inóculos (DO₆₆₀ = 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 y procedimientos experimentales utilizados fueron los mismos que en el Ejemplo 14, ensayo II.

10 **Tabla 6 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)	Lípidos totales (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 su cepa parental de tipo silvestre (Tabla 6). Sin embargo, la cepa 3a produjo más biomasa, más lípidos y DHA que su cepa de tipo silvestre. La alta productividad de DHA de la cepa 3a es debida no solo a su alta productividad de biomasa, sino también a la alta relación de DHA 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 la corriente de residuos, glicerol, almidón, celulosa y hemicelulosa), calidad y cantidad de producto tal como ARA, DHA y/o EPA, productividad de AGPI y ácidos grasos y/o perfiles lipídicos favorables para aplicaciones de biocombustibles.

Los materiales producidos pueden separarse de cepas de producción y/o componentes de medios por cualquiera de una diversidad de medios. En algunas realizaciones, la extracción de los materiales producidos se facilita, por ejemplo, realizando una o más etapas que alteren la secreción de ácidos grasos y/o que debiliten la pared celular.

25 Ejemplo 16: Una nueva cepa de *Thraustochytrium* sp.

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

Se extendieron células individuales de ONC-T18 sobre las placas de agar que contenían medio ONC-T18-GM0 y 50 µg/ml de zeocina. De diez a 15 días después de la inoculación, las colonias se detectaron visualmente. Las colonias grandes sin cambios visibles en la morfología se aislaron aleatoriamente y se desarrollaron en nuevas cepas. La productividad de biomasa, lípidos totales y DHA de nuevas cepas se compararon. Se descubrió inicialmente que una cepa ONC-T18/35/Z50 era capaz de producir significativamente más biomasa, lípidos totales y DHA, los que se ha confirmado repetidamente con condiciones, métodos y procedimientos de fermentación optimizados descritos en el Ejemplo 14, Ensayo II. En los ensayos de fermentación de dos etapas usando medio ONC-T18-GM0 que contenía 35 g/l de sal marina, la nueva cepa ONC-T18/35/Z50 produjo un 5 % más biomasa, un 7 % más de lípido total y un 14 % más de DHA que su cepa parental ONC-T18. Usando el mismo medio, pero que contenía 18 g/l de sal marina, la nueva cepa ONC-T18/35/Z50 produjo aproximadamente un 10 % más de biomasa, un 20 % más de lípido total y un 36 % más de DHA que su cepa parental ONC-T18 (Fig. 19). Además, las relaciones de DHA y lípido total a biomasa, en la nueva cepa ONC-T18/35/Z50 de alto nivel de producción de DHA, son más altas que las de su cepa parental, lo que demuestra que la nueva cepa tiene una capacidad más robusta de convertir fuentes de carbono tales como la glucosa en lípidos y DHA. Esta nueva cepa es útil no solo en la mejora de los rendimientos, sino también en la reducción de los costes de fermentación y de procesamiento corriente abajo para la producción de lípidos biológicos y AGPI, tales como DHA de microalgas.

Referencias

50 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.

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.

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

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

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.

5

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.

10

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.

15

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.

20

Park y Morschhäuser (2005) *Eukaryotic cell* 4(8), 1328-1342.

Raghukumar S. (2008) *Thraustochytrid Marine Protists: Production of PUFAs and Other Emerging Technologies. Mar. Biotech.* 10: 631-640.

25

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.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ocean Nutrition Canada Limited

35

<120> Microorganismos modificados por ingeniería genética

<130> 2009163-0001

<160> 68

40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

50

<400> 1

cgcggtctcc cgtctccaag c 21

<210> 2

<211> 20

55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

60

<400> 2

ccgagtccat ggtgcccggc 20

<210> 3

65

<211> 22

ES 2 678 997 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 3
 gaccatgatt acgccaagct ct 22

10 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 4
 gttttcccag tcacgacgt 19

20 <210> 5
 <211> 724
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp.

25 <400> 5

cgcggttcc cgtotccaag cttcgtctcg gtagagattc tatcttcgcc cggcagcccg 60

ccgccgtccg gcaagtgtag aacggcagaa agcccacttg cacggaacgc ccgacaagtt 120

gacgaaagcg gcccgcaagt gcggcagccc ggctggtttt tcctcgcggc gaggccaaac 180

cgccaacgcc accaagccag acaccaggta tgtgcgcgac gcgcgcgccg acgcgagccc 240

cgaggatgcc ccgtacgcgc tgacgccttt ctccgccccg cccgcgagaa gacgcgctcc 300

ggcaacggcg ggagccgagc gaacgggoga 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 gaggcgcac caacgagggc 660

accggcggtc gctacgtgcc ccgcgccatc ctcatggacc togagccggg caccatggac 720

tcgg 724

30 <210> 6
 <211> 490
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp.

35 <400> 6

ES 2 678 997 T3

cgcggttcc cgtctccaag cttcgtctcg gtagagattc tatcttcgcc cggcagcccg 60
 cggccgtccg gcaagtgtag aacggcagaa agcccacttg cacggaacgc ccgacaagtt 120
 gacgaaagcg gcccgcaagt gggcgagccc ggctggtttt tcctcgcggc gaggccaaac 180
 cgccaacgcc accaagccag acaccaggta tgtgcgcac gcgcgcggc acgcgagccc 240
 cgaggatgcc ccgtacgggc tgacgccttt ctccgcccgc cccgcgagaa gacgcgctcc 300
 ggcaacggcg ggagccgagc gaacgggca ggattgatcg agtagctgca ggttgagaaa 360
 aaaggaaaac cgccgagatg gacaacggct ggatggacga gaagacgcac gaggacgcga 420
 ggactgacga tgatcacgtg cgcaggaaga cttgaaaaga agcaaggaag gtagaaaaaa 480
 aagaagaaat 490

5 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 7
 ggctgtctc cctggccat cc 22

 15 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 8
 gggcatctgg ccgtcggc 19

 25 <210> 9
 <211> 1115
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp.

 30 <400> 9

ES 2 678 997 T3

```

ggcctgtctc ccttgccat ccattgogct gcggaagcat tggattgcga actgcgtcgg      60
ccagatcgct tggtttccca acatgagacg cgctctgtcg gcaagaccat ttccgcccc      120
ggctttgctc acaaccaact cgtagtagat tttgtaaaga aactgcacg tctgactgct      180
cccagcccgc acgcattgcg cttggcagcc tcggtcccaa accgtcacgg tcgctgoccg      240
gtccacggga aaaaataact tttgtccgcg agcggccggt caaggcgcag ccgcgagcgt      300
gccaacggtc cgtcccgcat tcttttccca atgttggtt cattcattct tgccaggcca      360
gatcatctgt gcctccctcg cgtgcccttc cttagcgtgc gcagatctct tcttcccaga      420
gcccgcgcgg cgcttcgtgg agtcggcgtc catgtcatgc gcgcgcggcg tcttgacccc      480
ctcggccoct ttggttcgog gctgcgcaac gagccgtttc acgccattgc gaccaaccgc      540
gcgctaaat cggattggcc gttgcaagcc gattttgcag cacctctggg ctgtgaggga      600
cgaccgtcca cttttaccg cacagagtgg actttcacc cctcactcca ctgaagccaa      660
cttttcgccc tcttcccac ccaaagtta tgctagccct catgccgcaa cggacgtcac      720
ccccatttc actggcgacg tggggacctg ggcgcaataa ggcgcgagaa ggaaattacg      780
acggcacact ggggocagaa gagggcaacta ggagcggcaa cccactggcg cggcacagcg      840
gtttggcgcg gggatcaaag caaaaccogg ctcatccaga gcaaaccoga atcagccttc      900
agacggctgt gcctaacaac acgocgttct acccgcctt ccttgcgtcc ctogcctccc      960
ccgagcccaa gtcttcggcc cgctoctaac 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

5

ES 2 678 997 T3

ggctgtctc ccttgccat ccattgcgct gcggaagcat tggattgcga actgcgtcgg 60
 ccagatcgtc tggtttcca acatgagacg cgctctgtcg gcaagaccat ttccgcccc 120
 ggctttgctc acaaccaact cgtagtagat tttgtaaaga aactgcacg tctgactgct 180
 cccagcccgc acgcattgcg cttggcagcc tcggccccaa accgtcaagg tcgctgcccg 240
 gtccacggga aaaaataact tttgtccgcg agcggccggt caaggcgcag cgcgagcgt 300
 gccaacgctc cgtcccgcac tcttttcca atgttgatt cattcattct tgccaggcca 360
 gatcatctgt gcctccctcg cgtgcccttc cttagcgtgc gcagatctct tcttcccaga 420
 gcccgcgcg agcttcgtgg agtcggcgtc catgtcatgc gcgcgaggcg tcttgacccc 480
 ctgggcccct ttggttcgcg gctgcgcaac gagccgtttc accgcattgc gaccaaccgc 540
 gcgctaaaat cggattggcc gttgcacgcc gattttgcag cacctctggg ctgtgaggga 600
 cgaccgtcca cttttaccgc cacagagtgg actttcacc cctcactcca ctgaagccaa 660
 cttttcgcg tcttcccac ccaaagtta tgetagcct catgccgcaa cggacgtcac 720
 cccatttcc actggcgacg tggggacctg ggcgcaataa ggcgcgagaa ggaaattacg 780
 acggcacact ggggocagaa gagggcacta ggagcggcaa cccactggcg cggcacagcg 840
 gtttggcgcg gggatcaaag caaaaccgg ctcatccaga gcaaaccoga atcagccttc 900
 agacggctgt gcctaacaac acgocgttct accccgcctt ccttgogtcc ctgcctccc 960
 ccgagcccaa gtcttccgcc cgtcctaac gccaccaag caag 1004

5 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 10
 <400> 11
 ggtacgtcgg tgagggtatg gag 23

 15 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20
 <400> 12
 gcogctaaac cgcagactgg 20

 25 <210> 13
 <211> 727
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp.
 30 <400> 13

ES 2 678 997 T3

ggtacgtcgg tgagggtatg gagaggggtga gttctccgag gccccgtgag gatctcgccg 60
ccctcgagaa ggattacgag gaggtcggcg ccgagaccgc cgagggcgag gacgaggagg 120
agggcgagga gttctaaatg cattogcatg gctccgcacc accacacacc accgcccctc 180
ttctttcctt gctcactcga tccatagcca cttacctgcc ccttccctct accactgcca 240
cgtgcggcgt atgagcgcgc ttgcaccogc aaccttctct ctagttgttc acaattacac 300
ccgctatcaa tactcacgca ttcattctcc cctttttttc tactttacgt accggtgctc 360
acttacttac acctgcccgc cttgttcatt cattcttctc gatgacaacg gcaggctctg 420
cttgccggcgc ggcacgcac cccttactcc gccgcgcacc gacaagcctg cgcaaaaaac 480
aaaaaaaaact tatcttcgct cgcggctcog atgtcgcggc ggcgtaagag accgcgccga 540
gttccgcccc ccattgcgatc gagagtctct ctcgtaggag cgggaccgcg agcgacctcg 600
gtgcctccga tagccagctg ggcttctaga ccggctgggg gaccgcccgc ggcgtaacctc 660
tgcgcttcgg tggcccttaa aaggctgac gtggaaaagg tcgctctcca gtctgcggtt 720
tagcggc 727

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

5

<400> 14

atgcattcgc atggctcgc accaccacac accaccgccc ctcttctttc cttgctcact 60
cgatccatag ccacttaoct gcccttccc totaccactg ccacgtgcgg cgtatgagcg 120
cgcttgcacc cgcaaccttc tctctagttg ttcacaatta caccgctat caatactcac 180
gcattcatct tccccttttt ttctacttta cgtaccgggtg ctcaettact tacacctgcc 240
cgccttgctt attcattctt ctcgatgaca accgcaggct ctgcttgccg cgcgcgcacg 300
catcccttac tccgcgcgc accgacaagc ctgogcaaaa aacaaaaaaaa acttatcttc 360
gctcgcggct ccgatgtgc ggccggcgtac gagaccgcgc cgagttcgc ccgccatgcg 420
atcgagagtc tctctcgtag gagcgggacc gogagcgacc tcggtgctc cgatagccag 480
ctgggcttct agaccggctg ggggaccgcc cgcggcgtac ctctgcgctt cggtggccct 540
taaaaggctg atcgtggaaa aggtcgcctc ccagtctgcg gtttagcggc 590

10

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

15

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20

<400> 15

ES 2 678 997 T3

5 cggcaacacc accgccgtcc 20
 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 16
 cggagaccaa gccgccatc acc 23

 15 <210> 17
 <211> 869
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp.

 20 <400> 17
 cggcaacacc accgccgtcc aggagatggt caagcgcgtc tcggagcagt tcaccagcat 60
 gttcgcgcgc aaggccttcc ttcactggta caccggcgag gccatggacg agatggagtt 120
 caccgaggcc gagtccaaca tgaacgacct tgtctccgag taccagcagt accaggacgc 180
 caccgccgag gaggaaggcg agttcgacga ggacgaggag gactactaag cgccttcagg 240
 caggctgatc cctactgtgg gggctctgac ggacggccgg tctttgtacg taaacaggcg 300
 cttcttcgcy gccgccgag gggggcggca acgagccggg tggcgtggca cggacaaggc 360
 aagagccttt ccatcccgca taaagtgatg caccatthtg accttgttga tcgthtttgt 420
 gtgthtagag cggccccgtg cgggtagcgc aagtgcgctt ctgagcaagg aagagagagg 480
 tgcagcttct tcttgatcag tgtggtaatc ttcaacggcc acgctcgctt attcgatacc 540
 tgtaaagcta ccggtgcacc cgtgcaagtt gggcaccacg tagttgtact ggtgaatcca 600
 aatgthtagcc gctagcttgg tgccctthtc gacaggaagg gcttggtgaa aagccatgct 660
 gtcgatctcc cttgggtcct cgttcgtgac gctaggccag agaatagctg tgtgcccgcg 720
 agtcgaagcc agcgcgcgcg cgtcggggcc gagcatagag ttagcaattc agttgthtgcg 780
 ggctcttgat gaggccgcca gagagcgaag aaggatgaac ttaccagatc cgcgctccgg 840
 tgtattggtg atggggcgct tggctctccg 869

 25 <210> 18
 <211> 640
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp.

 <400> 18

ggccttcag gcaggctgat ccctactgtg ggggctctga cggacggcog gtctttgtac 60
 gtaaacaggc gcttcttcgc ggcccgccga ggggggcggc aacgagccgg gtggcggtggc 120
 acggacaagg caagagcctt tccatcccgc ataaagtgat gcaccatttt gaccttgttg 180
 atcgtttttg tgtgtttaga gcgccccgt gcgggtaggc gaagtgcgct tctgagcaag 240
 gaagagagag gtgcagcttc ttcttgatca gtgtggtaat cttcaacggc cacgctcgtc 300
 tattcgatac ctgtaaagct accggtgcac ccgtgcaagt tgggcaccac gtagttgtac 360
 tggagaatcc aaatgtagc cgctagcttg gtgccctttt cgacaggaag ggcttggtga 420
 aaagccatgc tgtcgatctc ccttggttc tctgtctgta cgctaggcca gagaatagct 480
 gtgtgccggc cagtcgaagc cagcgcgcgc gcgtcggggc cgagcataga gtttagcaatt 540
 cagttgttcc gggctcttga tgaggccgcc agagagcgaa gaaggatgaa cttaccagat 600
 ccgcgctccg gtgtattggt gatgggcggc ttggtctccg 640

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

5

<400> 19
 caacgccatc ctcgaccaca gcaaggacac gcaccgcttc ggctacggta tccagatcgg 60
 ataaatatta taccgcccct tccgctctcc ttttcttttt tgctcgtctg gatgccagac 120
 taaggagtcc ttgctcctct gcgcaaggct gctcaccag agtctctgcc tgtggttgag 180
 cgcccaccaa caggttaaag cgaaccaggc ccgcccogtt gccgctgcga tgtcgtcgtc 240
 cttgcgagac tottcattag atcggcggaa tgctgcccga ggactgaccg cctcttcggt 300
 cgttcgtttg tacgcgagcg gtgcgagcgc cttcgttggt ggcatagag cagaacgcga 360
 gcagttcacg tttctttgca gctttatcta tccgcaaatt cgcctcagcg tctgcaactt 420
 tccggtgagg acagcagagc tgcagttctg atcgtctcca tcttttgag cgcattgcca 480
 cgtccccag ctcgtctcog tctcccctgg agtggacggc ctctttcaca gtgcctgggt 540
 gcggccattt cctaaatag gttgcgcagc cgagtttctc taaacgtgcc tggctcgcgt 600
 gcttcgcct tactacctga acgcgcagta gctcggcgcg tgccgcttta aggcggggcg 660
 ggtggctgct cttgcttacg ccaggcgcgt acgtcagcag cgccggcgcc atgctgcca 720
 tagcggccac agaatcgtag gcgctgcaat cgggaactgc caagatggca atcgagacga 780
 tccccaaaa gtggacaagc accgtcaaag taacctggct gatgatggcc gggaccgct 840
 ggtgacggcc agccggcaaa accggaatct atcacagga ctgggcagat caagggccta 900
 gtgctagcga gcagctcgag cgaaagaagc gcgccagcag cgcaggcacg 950

10

<210> 20
 <211> 33
 <212> ADN

ES 2 678 997 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

5

<400> 20
 tatatatcta gacaacgccca tctcogacca cag 33

<210> 21

10 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 21
 tatataccat ggcgtgcctg cgctgctggc 30

<210> 22

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 22
 gatgctcgtc aggggggagg 20

30

<210> 23

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 23
 ccggaccac accggcg 17

40

<210> 24

<211> 1216

<212> ADN

45 <213> *Thraustochytrium* sp.

<400> 24

gtgacaaaaa gccgtgaacg ggcgtggcog aggctacagc acgcagcggg gttctctgcg 60

tattatattt ttcgcaaggc ttcccgacgg ctggctccgctg tgcccgcgcc ggcgcgacgc 120

tctcactaga cgttggtcat gagtgttctg agtcaagacc tcggagaaga attggggcgc 180

acaccttcgg tgcgcgcacc cctgccactg tataccgtgc gtaccccacc agacagaagg 240

tcaccaccgg tgctctcttc gtcagctata ccgtgtgctg tagatcgtcg caggattcgg 300

ES 2 678 997 T3

gttgtgcaca ccgcgctccg tgggctgggg gccctggcgc ggcggcttcc taggatatag 360
 tctataaaac ccagcgaatt ttacacacag agcggttcat ttgcgctggg tcoggtgcgc 420
 aatctcgggg cacagcctgc acgtttacat cgacgtaaca gccacagtca tcgtcgccag 480
 cctcttcggc ctccccaccg acccgctgc tgccccctt cctggctggc tgatgaacta 540
 tcgcggcctg cctggcaagt acgtgcccct cccatttctc cccggctctc cagaaatgcg 600
 cctccggccc caatgaaagc aggcgtggc catgcggcgc ccgacatctg ggtcctcgcg 660
 ccttctttga tgacatcgtc ctcatcgtcg tcggcgacct ggtcttcgtg atcgcttgtt 720
 gatcaocgoc ttggcatctt gcgaggagaa ccgtctgcac tottttggcg cggccgaggt 780
 gccttcgggg gtgcaggcca gtgccagac cagacctgct gcaaagcccg aacatcgccg 840
 tcgaggtaga ccattaggta cgtacgtacg cacgtcttca tgatcgacgc caacgtcatg 900
 cggctcgatgc cccgccacgc gatggcgcta gcagccagga gcgcgtgtgt acgggcgcgg 960
 agcttcgctc gcaagcaaag ctgggcgctt gggccgggga tcggggccact acttgacga 1020
 acgaaacgaaa cgcatgacgt catccttggc agtaaactct gccggagcgc gcaaaaacca 1080
 ggctggacgc gctgggtgog attgagaacc gcaagctttg gagcctttca ctgagcaggg 1140
 ggaactgacg ctggagcggc cgaccgtagg cgaaggaatt tgatcgaagt aggcaggact 1200
 gcccgcaggg gtcagg 1216

5 <210> 25
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 25
 tatatactcg aggtgaccaa aagccgtgaa cgg 33

15 <210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 26
 tatataccat ggctgaccc ctgcgggcag 30

25 <210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 27
 caacctggtt gatcctgcca gta 23

5 <210> 28
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 28
caacctggtt gatctgcca gtagccc 27

15 <210> 29
<211> 1764
<212> ADN
<213> *Thraustochytrium* sp.

<400> 29

ES 2 678 997 T3

tcactacgga aacottgtta cgacttcacc ttcctctaaa caataagatt caccocgagtt 60
 ctgaccccc tcgcgaacaa acgctcaaaa ggtcatccca tggtttccatc ggaccgttca 120
 atcggtaggt gcgacgggcg gtgtgtacaa agggcagga cgtattcaat gcaagctgat 180
 gacttgcggt tactaggaat tctcgttg agattaataa ttgcaaaaat ctagccccag 240
 cacgatgggc gttgaaagga tttgccatgc cttccggcaa agcacctcgc tgcaacaac 300
 gatgaccacc cgttgaacc atcagtgtag cgcgctgctg gcccagaaca tctaagggca 360
 tcacagacct gttattgcct cgaacttcct gctcgtatc cgaacatgct cctctaagaa 420
 gcgtacgcaa gtatgtcgc ataccaccg ctatttagta ggccgaggtc tcgttcgtta 480
 acggaattaa ccagacaaat cactccacca actaagaacg gccatgcacc accaccata 540
 gaatcaagaa agagctctca atctgtcaat cctacctatg tctggacctg gtaagttttc 600
 ccgtgttgag tcaaattaag ccgcaggctc cactcctggt ggtgcccttc cgtcaattcc 660
 tttagtttc agccttgca ccatactccc ccggaaccc aaagacttg atttctcatg 720
 tgctgctgog aggtccaat acaaacacc cgcaatcgca agtcggcatc gtttacggtc 780
 tagactacga tggatctaa tcatcttoga tcccagact ttctgttttg attaataaaa 840
 acatgcttgg taaatgcctt cgtctgtagt cgtctttcgg aaatccaaga atttcacctc 900
 tagctcctaa atacgaatac cccaactgt tctattcat cattaactcag atgtgcaaac 960
 caacaaaata gcacccgagc cctatctgat catcccataa taaacatcca ggtcatacga 1020
 cctgcttggg aactctgct ttaattacag tgaacgacgc cactaaaaaa agaggcgagg 1080
 atggcagagg agccgctcgg caaacagagc gcagtgcgc aaagaccggg gctcccggcc 1140

 cagaaattca actacgagct ttttaactgc aacaacttta gcatacgtt ctggagctgg 1200
 aattaccgcg gctgctggca ccagacttgc cctccagttg atcctogatg agggttttac 1260
 attgctctca ttccaatagc aagacgcgaa gcgccccgca ttgatatttc tcgtcactac 1320
 ctcgtggagt ccacattggg taatttacgc gctgctgccc ttccttggat gtggtagccg 1380
 tctctcaggc tccctctcgg gagtcgagcc ctaactcccc gtcacccggt atagtcaccg 1440
 tagtccaata cactaccgtc gacaactgat ggggcagaaa ctcaaacgat tcatcgtccc 1500
 aaacaagcga tctgctcaat tatcatgact caccatctta cttggcttca actctaataa 1560
 gtgcggccct ccggaacagt cgggccctct cagcatgtat taattccaga attactgcag 1620
 gtatccatat aaagaaaata ccgaagaaat cataactgat ataagagcc gttcgcagtc 1680
 tcacagtata atcgttata cttacacatg catggcttaa tctttgagac gagcgtaggg 1740
 ctactggcag gatcaaccag gttg 1764

<210> 30
 <211> 4235

ES 2 678 997 T3

<212> ADN

<213> *Thraustochytrium* sp.

<400> 30

5

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatfff tataggftaa tgcctatgata ataattggttt	60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatfff	120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat	180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgccttt attcctfff	240
ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg	300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga	360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gagcactfff aaagttctgc	420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgcgcatac	480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg	540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataacctt gagtgataac actgcgcca	600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg	660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg	720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg	780
gcgaactact tactctagct tcccgcaac aattaataga ctggatggag gcgataaag	840
ttgcaggacc acttctgcgc toggccttc oggctggctg gtttattgct gataaatctg	900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact gggccagat ggtaagcct	960
cccgatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac	1020

ES 2 678 997 T3

agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
 catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
 tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgctc cactgagcgt 1200
 cagaccccgt agaaaagatc aaaggatcct cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
 gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc 1320
 taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
 ttctagtgtg gccctagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc tgtcttaccg 1500
 ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt 1560
 cgtgcacaca gccacgcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
 agcattgaga aagcgcacg ctccccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc 1680
 gcagggctgg aacaggagag cgcaagaggg agcttcacag gggaaacgcc tggtatcttt 1740
 atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggctc ctggcctttt 1860
 gctggccttt tgctcacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcgcccgcgc 1920
 gatatcgcta gctcgaggtg accaaaagcc gtgaacgggc gtggccgagg ctacagcacg 1980
 cagcgggtgt ctctgcgtat tataatcttc gcaaggcttc ccgacggctg gtccgcgtgc 2040
 ccgcgccgcg cgcacgctct cactagacgt tggcatgag tgtttcgagt caagacctcg 2100
 gagaagaatt ggggcgcaca cctccgtgc gcgcaccct gccactgtat accgtgcgta 2160
 ccccaccaga cagaaggtca ccaccgctgc tctcttcgtc agctataccg tgtgctgtag 2220
 atcgtcgag gattcgggtt gtgcacaccg cgtccgtgg gctgggggcc ctggcgcggc 2280
 ggcttcctag gatatagtct ataaaacca gogaatttta cacacagagc ggttcatttg 2340
 cgctgggtcc ggtgcgcaat ttcggggcac agcctgcacg tttacatcga cgtaacagcc 2400
 acagtcatcg tcgccagcct ctccggcctt cccaccgacc cggctgctgc ccgccttctt 2460
 ggctggctga tgaactatcg cggcctgcct ggcacgtacg tgcccctccc atttctcccc 2520
 ggtcctccag aatgcgcct ccggcccca tgaagcagg cgttggccat ggggcgccg 2580
 acatctgggt cctcgcgctt tctttgatga catcgtctc atcgtcgtcg gcgacctggt 2640
 ctctgtgac gcttgtgat cacgcgctt gcaccttgc aggagaaccg tctgcactct 2700
 tttggcgcgg ccgaggtgcc ttccggggtg cagccagtc gccagaccag acctgctgca 2760
 aagcccgaac atcgcgctc aggtagacca ttaggtagct acgtacgcac gtcttcatga 2820
 tcgacgcaa cgtcatgccc tcgatgcccc gccacgcgat ggcgctagca gccaggagcg 2880
 cgtgtgtacg ggcgcggagc ttcgctcga agrcaagctg ggcgcttggg ccggggatcg 2940

ES 2 678 997 T3

ggccactact tggacgaacg aacgaaacgc atgacgtcat ccttggcagt aaatcttgcc 3000
 ggagcgcgca aaaccaggc tggacgcgct gggcgcgatt gagaaccgca agctttggag 3060
 cctttcactg agcaggggga actgacgctg gagcgcgca ccgtaggca aggaatttga 3120
 tcgaagtagg caggactgcc cgcaggggtc aggccatggc caagttgacc agtgccgttc 3180
 cgggtgctcac cgcgcgcgac gtgcgcggag cggctogagtt ctggaaccgac cggctcgggt 3240
 tctcccggga ctctgtggag gacgacttgc ccggtgtggt ccgggacgac gtgaccctgt 3300
 tcatcagcgc ggtccaggac caggtggtgc cggacaacac cctggcctgg gtgtgggtgc 3360
 gcggcctgga cgagctgtac gccgagtgtt cggaggtcgt gtccacgaac ttccgggacg 3420
 cctccgggcc ggccatgacc gagatcggcg agcagccgtg gggcgggag ttcgcctgc 3480
 gcgaccggc cggcaactgc gtgcacttgc tggccgagga gcaggactga cacgtgctac 3540
 gagatttoga ttocaccgcc gcttctatg aaagggtggg cttcggaatc gttttcggg 3600
 acgcccgtg gatgatcctc cagcgcggg atctcatgct ggagttcttc gccacocca 3660
 acttgttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa 3720
 ataaagcatt ttttctactg cattctagtt gtggtttgct caaactcacc aatgtatctt 3780
 atcatgtctg aattcccggg gatcctctag agtcgacctg caggcatgca agcttggcac 3840
 tggccgtgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttaccaa cttaatcgcc 3900
 ttgcagcaca tccccttctc gccagctggc gtaatagcga agaggccgc accgatogcc 3960
 cttccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcct gatgcggtat tttctcctta 4020
 cgcacgtgtg cggattttca caccgcatat atggtgacct ctcagtacaa tctgctctga 4080
 tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc 4140
 ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg 4200
 tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cggca 4235

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

<400> 31

gacgaaaggg cctcgtgata ogcctatctt tatagggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
 cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatctt 120
 tctaaatata ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
 aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgcgccctt attcctcttt 240
 ttgcggcatt ttgccttctc gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
 ctgaagatca gttgggtgca cgagtggttt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

5

10

ES 2 678 997 T3

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420
 tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg cggggcaaga gcaactcggg cgccgcatac 480
 actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
 gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataacatc gagtgataac actgcggccca 600
 acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660
 gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
 acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa 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 cgaatatagac 1020
 agatcgcetga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
 catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
 tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
 cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
 gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc 1320
 taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
 ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
 ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560
 cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
 agcattgaga aagcggccag cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc 1680
 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740
 atagtctgt cgggtttcgc caoctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgcctgtcag 1800
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860
 gctggccttt tgctcacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcgcgccgc 1920
 gatatcgcta gacaacgcca tcctcgacca cagcaaggac acgcaccgct tcggctacgg 1980
 tatccagatc ggataaatat tataaccgcc ctccgctct ctttttcttt tttgctcgtc 2040
 tggatgccag actaaggagt ccttgctcct ctgcgcaagg ctgctcacc cagagtctctg 2100
 cctgtggttg agcgeccacc aacaggttaa agcgaaccag ggccgccccg ttgccgctgc 2160
 gatgtcgtg ctcttgagag actcttcatt agatcggcgg aatgctgccg caggactgac 2220

ES 2 678 997 T3

cgctctctog ttcgttcggt tgtacgcgag cgggtgcgagc ggcttcggtg ttggcagata 2280
ggcagaacgc gagcagttca cgtttctttg cagctttatc tatccgcaa ttcgcctcag 2340
cgtctgcaac tttccggtga ggacagcaga gctgcagttc tgatcgtctc catcttttgg 2400
agcgcagatgc gacgtcccc agctcgtctc cgtctcccc ggagtggacg gtctctttca 2460
cagtgcctgg gtgcggccat ttccctaaat aggttgcgca gccgagtttc cttaaactgg 2520
cctggtccgc gtgcttccgc cttactacct gaacgcgcag tagctcggcg cgtgcgcctt 2580
taaggcgggc ggggtggctg ctcttgctta cgccaggcgc gtacgtcagc agcgcggcg 2640
ccatgctgcc catagcggcc acagaatcgt aggcgctgca atcgggaact gccaaagtgg 2700
caatcgagac gatccccaa aagtggacaa gcaccgtcaa agtaacctgg ctgatgatgg 2760
ccgggaccgc ctggtgacgg ccagccggca aaacoggaat ctatcacgag gactgggcag 2820
atcaagggcc tagtgctagc gagcagctcg agcgaaagaa gcgcgccagc agcgcaggca 2880
cgccatggcc aagttgacca gtgccgttcc ggtgctcacc gcgcggagc tcgccggagc 2940
ggtcgagttc tggaccgacc ggctcgggtt ctcccgggac ttcgtggagg acgacttcgc 3000
cgggtgtggtc cgggacgacg tgaccctggt catcagcgcg gtccaggacc aggtggtgcc 3060
ggacaacacc ctggcctggg tgtgggtgcg cggcctggac gagctgtacg ccgagtggtc 3120
ggaggtcgtg tccacgaact tcgggacgc ctccgggccc gccatgaccg agatcggcga 3180
gcagccgtgg gggcgggagt tcgccctgcg cgaaccggcc ggcaactgcg tgcacttcgt 3240
ggccgaggag caggactgac acgtgctacg agatttcgat tccacggccg ccttctatga 3300
aaggttgggc ttcggaatcg tttccggga cgccggctgg atgatcctcc agcgcgggga 3360
tctcatgctg gagttcttcg cccaccccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia 3420
ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagttg 3480
tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctga attccggggg atoctctaga 3540
gtcgacctgc aggcattgca gottggcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga 3600
aaacctggc gttacccaac ttaatcgct tgcagcacat cccctttcg ccagctggcg 3660
taatagcgaa gaggcccga ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga 3720
atggcgctg atgcggtatt ttctccttac gcactctgtc ggtatttcac accgcatata 3780
tggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat gccgatagt taagccagcc ccgacacccg 3840
ccaacacccg ctgacggcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacia 3900
gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc 3960
gcga 3964

<210> 32
<211> 4319
<212> ADN
<213> *Thraustochytrium* sp.

5

<400> 32

ES 2 678 997 T3

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatfff tataggttaa tgatcatgata ataatggfff 60
cttagacgtc aggtggcact ttctggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgfffatfff 120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgtca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgctgcctt attcctfff 240
ttgcggcatt ttgccttct gttttgtct acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
tccttgagag tttctgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gaggactfff aaagttctgc 420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcgtt cgcgcatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcaac agaaaagcat cttagcgtg 540
gcatgacagt aagagaatta tgcatgtctg ccataaccat gagtgataac actgcccaca 600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgttttttg cacaaatgg 660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg 780
gogaactact tactctagct tcccgcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggccttc cggctggtg gtttattgct gataaatctg 900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggcccagat ggtaagccct 960
cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
agatcgtgta gataggtgcc tcaactgatta agcattggtt actgtcagac caagtttact 1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc attttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaactgta gtttctgtc cactgagcgt 1200
cagaccccgat agaaaagatc aaaggatctt cttagatcc ttttttctg cgcgtaatct 1260
gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgtggtt ttgtttgccc gatcaagagc 1320
taccactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
tcgctctgct aatcctgta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
ggttgactc aagacgatag ttaccggata agcgcagcgc gtcgggctga acggggggtt 1560
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
agcattgaga aagcgcacg cttcccgaag ggagaaagc ggacaggtat ccggtaaagc 1680
gcagggctcg aacaggagag cgcacagggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt 1740
atagctctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtc atttttgtga tgctcgtcag 1800

ES 2 678 997 T3

gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860
 gctggccttt tgctcacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcgcgccgc 1920
 gatatcgcta gacaacgcca tctctgacca cagcaaggac acgcaccgct tcggctacgg 1980
 tatccagatc ggataaatat tataaccgcc cttccgctct ccttttcttt tttgctctgc 2040
 tggatgccag actaaggagt ccttgctcct ctgcgcaagg ctgctcacc agagtctctg 2100
 cctgtggttg agcggcccacc aacaggttaa agcgaaccag ggccgccccg ttgccgctgc 2160
 gatgtcgtc ctcttgcgag actcttcatt agatcggcgg aatgctgccg caggactgac 2220
 cgectcttcg ttcttctgtt tgtacgcgag cggctgcgagc ggcttcgttg ttggcagata 2280
 ggcagaacgc gacgagttca cgtttctttg cagctttatc tatccgcaa ttcgctcag 2340
 cgtctgcaac tttccggtga ggacagcaga gctgcagttc tgatcgtctc catcttttgg 2400
 agcgcattgc gacgtcccc agctcgtctc cgtctcccc ggagtggagc gtctctttca 2460
 cagtgcctgg gtgcggccat ttccctaaat aggttgccga gccgagtttc cttaaactg 2520
 cctggtccgc gtgcttccgc cttactacct gaacggcag tagctcggcg cgtgccgctt 2580
 taaggcgggc ggggtggctg ctcttgctta cggcaggcgc gtacgtcagc agcggcggcg 2640
 ccatgctgcc catagcggcc acagaatcgt aggcgctgca atcgggaact gccaaagtgg 2700
 caatcgagac gatcccccaa aagtggacaa gcaccgtcaa agtaacctgg ctgatgatgg 2760
 ccgggaccgc ctggtgacgg ccagccggca aaaccggaat ctatcacgag gactgggag 2820
 atcaagggcc tagtgctagc gagcagctcg agcgaagaa gcgcgccagc agcgcaggca 2880
 cgatgagtaa aggagaagaa cttttcactg gagttgtccc aattcttgtt gaattagatg 2940
 gtgatgtaa tgggcacaaa ttttctgtca gtggagaggg tgaaggatg gcaacatacg 3000
 gaaaacttac ccttaaattt atttgacta ctggaaaact acctgttcca tggccaacac 3060
 ttgtcactac tttcacttat ggtgttcaat gcttttcaag atacccagat catatgaagc 3120
 ggcacgactt cttcaagagc gccatgcctg agggatacgt gcaggagag 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 tggagcgtt caactagcag 3420
 accattatca acaaaatact ccaattggcg atggccctgt ccttttacca gacaaccatt 3480
 acctgtccac acaatctgcc ctttcgaaag atcccaacga aaagagagac cacatggtcc 3540
 ttcttgagtt tgtaacagct gctgggatta cacatggcat ggatgaacta tacaataag 3600
 gtacctctac gcgtcacgtg ctaagagatt tcgattccac cggcgcttc tatgaaaggt 3660

ES 2 678 997 T3

tgggcttogg aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca 3720
tgctggagtt ctccgccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt taaaaataaa 3780
gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catttttttc actgcattct agttgtggtt 3840
tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctgaattcc cggggatcct ctagagtcga 3900
cctgcaggca tgcaagcttg gcactggccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc 3960
ctggcgttac ccaacttaat cgccttgca gacatcccc tttccgcagc tggcgtaata 4020
gggaagaggg ccgcaccgat cgccttccc aacagttgag cagcctgaat ggogaatggc 4080
gcctgatgag gtattttctc cttacgcacg tgtgaggat ttacacaccg atataggtg 4140
caactcagc acaatctgct ctgatgcgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac 4200
accgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt 4260
gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcga 4319

5 <210> 33
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 33

gagcagctcg agcgaagaa gcgcgccagc agcgcaggca cgatgagtaa aggagaagaa 60
cttttcaactg gagttgtc 78

15 <210> 34
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 34

gtgacgcga gaggfacct atttgatag tcatccatg ccatgtgtaa tccc 54

25 <210> 35
 <211> 7032
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

30 <400> 35

agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa 60
gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta attgcgttgc 120
gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc 180
aacgcgcggg gagaggcggg ttgogtattg ggcgctcttc cgcttctctg ctcaactgact 240

ES 2 678 997 T3

cgctgcgctc ggtogttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtataac 300
 ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 360
 aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcggtgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg 420
 acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa 480
 gataaccagc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcoctgttccg accctgcgcg 540
 ttacoggata cctgtccgcc tttotccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac 600
 gctgtaggta totcagttcg gtgtaggtcg ttogctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 660
 cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaacccgg 720
 taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt 780
 atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 840
 cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 900
 cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggtt ttttgttgc aagcagcaga 960
 ttacggcgag aaaaaagga totcaagaag atoccttgat cttttctacg gggctcgacg 1020
 ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat gaattaattc ttagaaaaac 1080
 tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt 1140
 tgaaaaagcc gttttctgta tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca 1200
 agatocctgg atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 1260
 ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagttag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt 1320
 gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc 1380
 tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacccaa ccgttattca ttcgtgattg cgocctgagcg 1440
 agacgaaata cgcgatcgtt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 1500
 cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata 1560
 acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta 1620
 cggataaaat gcttgatggt cgggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 1680
 atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 1740
 gcacgggct tcccatacaa tcgatagatt gtogcacctg attgcccgac attatcgca 1800
 gccatttat acccatataa atcagcatcc atggttggaa ttaatcgcg cctagagcaa 1860
 gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccocctgtat tactgtttat gtaagcagac 1920
 agttttattg ttcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaa 1980
 atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctcgaca gttaccaatg 2040
 cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcaccca tagttgcctg 2100
 actccccgct gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctg 2160

ES 2 678 997 T3

aatgataccg cgagaaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 2220
cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 2280
ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc 2340
cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtogtttggg atggcttcat tcagctccgg 2400
ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 2460
cttcggctct ccgatogttg tcagaagtaa gttggccgca gtggtatcac tcatggttat 2520
ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 2580
tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttggcc 2640
ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 2700
aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat 2760
gtaaccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 2820
gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga cacggaaatg 2880
ttgaatactc atactottcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 2940
catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 3000
atttccccga aaagtgccac ctgacgcgcc ctgtagcgcc gcattaagcg cggcgggtgt 3060
ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcgcc ctctttctgc 3120
ttctttccct tcctttctcg ccacgttctgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg 3180
gctcccttta ggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gacccccaaa aacttgatta 3240
gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gttttctgcc ctttgacgtt 3300
ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat 3360
ctcggcttat tcttttgatt tataagggat tttgcccatt tgggcctatt ggttaaaaa 3420
tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc 3480
cattcgccat tcaggetgcg caactggttg gaagggcgat cggtgccggc ctcttcgcta 3540
ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaagggcat taagttgggt aacgccaggg 3600
ttttcccagt cacgacggtg taaaacgacg gccagtgat tgtgcccggc cgagctcggg 3660
ccccacacg tgtggtctag agctagccta ggctcgagaa gcttgccctg tctcccttg 3720
ccatccattg cgctgcggaa gcattggatt gcgaactgcg tcggccagat cgcttggttt 3780
cccaacatga gacgcctct gtccgcaaga ccatttccgc ccccgcttt gctcacaacc 3840
aactcgtagt agattttgta aagaacactg caogtctgac tgctcccagc ccgcacgcac 3900
tgcgcttggc agcctcggtc ccaaaccgtc acggtcgtg cccggtccac gggaaaaaat 3960
aacttttgtc cgcgagcggc cgttcaaggc gcagcccgca gcgtgccaac cgtccgtccc 4020

ES 2 678 997 T3

gcattctttt cccaatgttg gattcattca ttcttgccag gccagatcat ctgtgcctcc 4080
ctcgcgtgcc ctctcttagc gtgcgcagat ctcttcttcc cagagccgcg cgcggccttc 4140
gtggagtccg cgtccatgtc atgcgcgcgc ggcgtcttga cccctcggc ccctttggtt 4200
cgcggctcgc caacgagccg tttcacgcca ttgcgaccaa ccgcgcgcta aaatcggatt 4260
ggccggttga cgcgcatttt gcagcacctc tgggctgtga gggacgaccg tccactttta 4320
cccgcacaga gtggactttc accccctcac tccactgaag ccaacttttc gccgtcttcc 4380
caacccaaag tttatgctag cctcatgcc gcaacggagc tcacccccat ttccaactggc 4440
gacgtgggga cctggggcga ataaggcgcg agaaggaaat tacgacggca cactggggcc 4500
agaagagggc actaggagcg gcaaccact ggcgcggcac agcggtttgg cgcggggatc 4560
aaagcaaac ccggctcatc cagagcaaac ccgaatcagc ctccagacgg tcgtgcctaa 4620
caacaogccg ttctaccccg ccttcttgc gtccctogcc tccccgagc ccaagtcttc 4680
cgcgcgtcc taacgccaac caagcaagat ggccaagtg accagtgcg ttccggtgct 4740
caccgcgcgc gacgtcgcg gagcggctga gttctggacc gaccggctcg ggttctcccg 4800
ggacttcgtg gaggacgact tcgccggtg ggtccgggac gacgtgacc tgttcatcag 4860
cgcggctccg gaccaggtg tgcgggacaa caccctggc tgggtgtggg tgccggcct 4920
ggacgagctg tacgccgagt ggtcggaggt cgtgtccacg aacttcggg acgcctccg 4980
gccggccatg accgagatcg gcgagcagcc gtggggcgcg gagttcgcgc tgccgcacc 5040
ggccggcaac tcgctgcaact tcgtggccga ggagcaggac taacacgtgc tacgagattt 5100
cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt gggcttcgga atcgttttcc gggacgccg 5160
ctggatgato ctccagcgcg gggatctcat gctggagtcc ttgccacc ccaacttgtt 5220
tattgcaget tataatggtt acaataaag caatagcatc acaatttca caataaagc 5280
atTTTTTca ctgcattcta gttgtggtt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt 5340
ctgagggccc gactgttcg gagggccgca cttattagag ttgaagcaa gtaagatggt 5400
gagtcatgat aattgagcag atcgccttgt tggagcgatg aatcgttga gtttctgcc 5460
catcagttgt cgacggtagt gtattggact acggtgacta taacgggtga cggggagtta 5520
gggctcgaact ccggagaggg agcctgagag acggctacca catccaagga aggcagcagg 5580
cgcgtaaatt acccaatgtg gactccacga ggtagtgaag agaaatatca atgcggggcg 5640
cttcgcgtct tgctattgga atgagagcaa tgtaaaacc tcatogagga tcaactggag 5700
ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca gaagcgtatg ctaaagttgt 5760
tgcaagttaa aagctcgtag ttgaatttct ggggcgggag ccccggtctt tgccgcactg 5820
cgctctgttt gccgagcggc tctctgccca tctctgcctc ttttttagt ggcgtcgttc 5880
actgtaatta aagcagagt ttccaagcag gtcgtatgac ctggatgttt attatgggat 5940

ES 2 678 997 T3

gatcagatag ggctcgggtg ctattttgtt ggtttgcaca tctgagtaat gatgaatagg 6000
aacagttggg ggtattcgta ttagaggact 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 tgaacttaa aggaattgac ggaagggcac caccaggagt 6300
ggagcctgog gcttaatttg actcaacacg ggaaaactta ccaggtocag acataggtag 6360
gattgacaga ttgagagctc tttcttgatt ctatgggtgg tggtgcatgg ccgttcttag 6420
ttggtggagt gatttgtctg gttaattccg ttaacgaacg agacctggc ctactaaata 6480
gcggtgggta tggcgacata cttgcgtacg cttcttagag ggacatgttc ggtatacgag 6540
caggaagttc gaggcaataa caggtctgtg atgcccttag atgttctggg ccgcacgcgc 6600
gctacactga tgggttcaac ggtggtcat cgttgctcgc agcgaggtgc tttgccgaa 6660
ggcatggcaa atcctttcaa cgccatcgt gctggggcta gatttttgca attattaatc 6720
tccaacgagg aattcctagt aaacgcaagt catcagcttg cattgaatac gtcctgccc 6780
tttgtacaca ccgccgctc caoctaccga ttgaacggtc cgatgaaacc atgggatgac 6840
cttttgagcg tttgttcgcg aggggggtca gaactcgggt gaatcttatt gtttagagga 6900
aggtgaagtc gtaacaaggt ttccgtagtg aatcacgaat tctggatccg atacgtaacg 6960
cgtctgcagc atgcgtggta ccgagctttc cctatagtga gtcgtattag agcttggcgt 7020
aatcatggtc at 7032

5 <210> 36
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 36
ggtctagagc tagcctagcc tcgagaagct tggcctgtct ccttggcca tcc 53

15 <210> 37
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 37
ggaacggcac tggcaactt ggccatctg ctgggtggc gttaggagcg g 51

25 <210> 38
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 38
 ccgctcctaa cgccaaccaa gcaagatggc caagtgacc agtgccgtc c 51

<210> 39
 <211> 55
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 39
 ggccctcccg aacagtcggg ccctcagaca tgataagata cattgatgag ttgg 55

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

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 40
 ggccaagtg accagtcgag 20

<210> 41
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 41
 35 cagtcctgct cctcgccac 20

<210> 42
 <211> 19
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 42
 45 catgaccgag atcggcgag 19

<210> 43
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 43
 55 ccgtcgacaa ctgatggggc 20

<210> 44

ES 2 678 997 T3

<211> 7360
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

5 <400> 44

```

agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa      60
gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta attgcgttgc      120
gctcaactgcc ogctttccag togggaaacc tgtcgtgccca gctgcattaa tgaatcggcc      180
aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgattg ggogctcttc cgcttcctcg ctcaactgact      240
cgctgcgctc ggctcgttcgg ctgcgggcag cggtatcagc tcaactcaaag gcggaataac      300
ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa      360
aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcggttc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg      420
acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccogaca ggactataaa      480
gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgtttccg accctgccgc      540
ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac      600
gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac      660
ccccggtca gcccgaccgc tgcgccttat ccggaacta tcgtcttgag tccaaccggg      720
taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt      780
atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga      840
cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct      900
cttgatcggg caaaciaaac accgctggta gcggtggttt ttttgtttc aagcagcaga      960
ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctac gggctcgacg      1020
ctcagtgga cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat gaattaattc ttagaaaaac      1080
tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt      1140
tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactaccga ggcagttcca taggatggca      1200
agatcctggt atcggctctc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc      1260
ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gaggtagcag tgaatccggt      1320
gagaatggca aaagtttatg catttcttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc      1380
tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaa cogttattca ttogtgattg cgcctgagcg      1440
    
```

ES 2 678 997 T3

agacgaaata cgcgatcget gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 1500
 cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata 1560
 acctggaatg ctgttttccc ggggatcgcga gtgggtgagta accatgcac c atcaggagta 1620
 cggataaaat gcttgatggg cggagagggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 1680
 atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 1740
 gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtgcgacctg attgcccagc attatcgcga 1800
 gcccatttat accatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcggg cctagagcaa 1860
 gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgat tactgtttat gtaagcagac 1920
 agttttattg ttcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaa 1980
 atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctcgaca gttaccaatg 2040
 cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg 2100
 actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctgc 2160
 aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 2220
 cggaggggcc gagcgcagaa gtggctctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 2280
 ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc 2340
 cattgetaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggg atggettcat tcagctccgg 2400
 tteccaaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 2460
 ctccggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 2520
 ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 2580
 tgagtactca accaagctcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgcce 2640
 ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 2700
 aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccc ctgttgagat ccagttcgat 2760
 gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttacca gcgtttctgg 2820
 gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgga 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 tgccagcggc ctagcggccg ctctttcgc 3120
 tttcttccct tctttctcgc ccaogttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg 3180
 gctcccttta gggttcogat ttagtcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 3240
 ggggtgatggg tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacggt 3300

ES 2 678 997 T3

ggagtcacg ttctttaata gtggactott gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat 3360
 ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa 3420
 tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc 3480
 cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggtgccggc ctcttcgcta 3540
 ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 3600
 ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tgtgcggccg cgagctcggg 3660
 cccccacagc tgtggtctag agctagccta ggctcgagaa gcttggcctg tctcccttgg 3720
 ccatccattg cgtgcggaa gcattggatt gcgaactgcg tcggccagat cgcttggttt 3780
 cccaacatga gacgcgctct gtggcaaga ccatttcgc ccccgcttt gctcacaacc 3840
 aactcgtagt agattttgta aagaacactg cacgtctgac tgctccagc ccgcacgcat 3900
 tgcgcttggc agcctcggtc ccaaaccgtc acggtcgtg cccggtccac gggaaaaaat 3960
 aacttttgtc cgcgagcggc cgttcaagc gcagccgca gcgtgccaac cgtccgtccc 4020
 gcattctttt ccaatggtg gattcattca ttcttgccag gccagatcat ctgtgcctcc 4080
 ctgcgctgcc ctctcttagc gtgcgcagat ctctcttcc cagagcccgc gggcgcttc 4140
 gtggagtccg cgtccatgct atgcgcgcgc ggcgtcttga ccccctcggc ccctttggtt 4200
 cgcggtcgc caacgagccg tttcacgcca ttgcgacca ccgcgcgcta aaatcggatt 4260
 ggccgttgc cgcgatttt gcagcacctc tgggtgtgta gggacgaccg tccactttta 4320
 cccgcacaga gtggactttc accccctcac tccactgaag ccaactttc gccgtcttcc 4380
 caaccxaaag tttatgctag ccctcatgcc gcaaccgacg tcaccccat ttccactggc 4440
 gacgtgggga cctgggcgca ataaggcgcg agaaggaaat tacgacggca cactggggcc 4500
 agaagagggc actaggagcg gcaaccact ggcgcggcac agcggtttg cgcggggatc 4560
 aaagcaaac ccggtcatc cagagcaaac ccgaatcagc cttcagacgg tcgtgcctaa 4620
 caacagccg ttctacccc ccttcttgc gtccctgcc tccccgagc ccaagtctc 4680
 cgcgcgtcc taacgccaac caagcaagat ggccaagttg accagtgcg ttccggtgct 4740
 caccgcgcgc gacgtcgcg gagcggctga gttctggacc gaccggctcg ggttctccc 4800
 ggacttcgtg gaggacgact tcgccggtgt ggtccgggac gacgtgacc tgttcatcag 4860
 cgcggtccag gaccaggtg tgcgggaaa caccctggc tgggtgtggg tgcgcggcct 4920
 ggacgagctg tacgcccagt ggtcggaggt cgtgtccacg aacttccgg acgcctccgg 4980
 gccggccatg accgagatcg gcgagcagcc gtggggcgg gagttcgc cgcgcgacc 5040
 ggccggcaac tgcgtgcaact tcgtggccga ggagcaggac taaatgcatt cgcaggtctc 5100
 cgcaccacca cacaccacc cccctcttct ttcttgcctc actcgatcca tagccactta 5160
 cctgcccctt cctctacca ctgccacgtg cggcgtatga gcgcgcttgc accgcaacc 5220

ES 2 678 997 T3

ttctctctag ttgttcacaa ttacacccgc tatcaatact cacgcattca tcttcccctt 5280
 tttttctact ttaogtaccg gtgctcactt acttacacct gcccgcttg ttcattcatt 5340
 cttctcgatg acaacggcag gctctgcttg cggcgcgcgc acgcatccct tactccgocg 5400
 cgcaccgaca agcctgcgca aaaaacaaaa aaaacttatc ttogctcgcg gctccgatgt 5460
 cgcggcgggc tgcgagaccg cgccgagttc cgcccgccat gogategaga gtctctctcg 5520
 taggagcggg accgcgagcg acttcgggtc ctccgatagc cagctgggct tctagaccgg 5580
 ctgggggacc gcccgcgggc tacctctgcg cttcgggtggc ccttaaaagg ctgatcgtgg 5640
 aaaaggctcg tctccagtct gcggtttagc ggagggcccg actgttcggg agggccgcac 5700
 ttattagagt tgaagccaag taagatggtg agtcatgata attgagcaga tcgcttgttt 5760
 ggagcgatga atcgtttgag tttctgcccc atcagttgtc gacggtagtg tattggacta 5820
 cggtgactat aacgggtgac ggggagttag ggctcgactc cggagagggg gcctgagaga 5880
 cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc gcgtaaatta cccaatgtgg actccacgag 5940
 gtagtgacga gaaatatcaa tgccggggcg ttcgctctt gctattgaa tgagagcaat 6000
 gtaaaacct 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
 gtttgacat ctgagtaatg atgaatagga acagttgggg gtattcgtat ttaggagcta 6360
 gaggtgaaat tcttgattt ccgaaagacg aactacagcg aaggcattta ccaagcatgt 6420
 tttcattaat caagaacgaa agtctgggga tcgaagatga ttagatacca tcgtagtcta 6480
 gaccgtaaac gatgccgact tgcgattgcg ggggtgtttgt attggaccct cgcagcagca 6540
 catgagaaat caaagtcttt gggttccggg gggagtatgg tcgcaaggct gaaacttaaa 6600
 ggaattgacg gaagggcacc accaggagtg gagcctgcgg ctttaattga ctcaacacgg 6660
 gaaaacttac caggtccaga cataggtagg attgacagat tgagagctct tcttgattc 6720
 tatgggtggt ggtgcatggc cgttcttagt tggtggagtg atttgtctgg ttaattccgt 6780
 taacgaacga gacctcgcc tactaaatag cggtggtgat ggcgacatac ttgcgtacgc 6840
 ttottagagg gacatgttcg gtatacgagc aggaagttcg aggcaataac aggtctgtga 6900
 tgcccttaga tgttctgggc cgcacgcgcg ctacactgat gggttcaacg ggtggtcatc 6960
 gttgttcgca gcgaggtgct ttgccggaag gcatggcaaa tctttcaac gcccatcgtg 7020
 ctggggctag atttttgcaa ttattaatct ccaacgagga attcctagta aacgcaagtc 7080

ES 2 678 997 T3

	atcagcttgc attgaatagc tcctgcccct ttgtacacac cgcccgtcgc acctaccgat	7140
	tgaacgggtcc gatgaaacca tgggatgacc ttttgagcgt ttgttcgcga ggggggtcag	7200
	aactcgggtg aatccttattg tttagaggaa ggtgaagtcg taacaaggtt tccgtagtga	7260
	atcacgaatt ctggatccga tacgtaacgc gtctgcagca tgcgtggtac cgagctttcc	7320
	ctatagtgag tcgtattaga gcttggcgta atcatggtca	7360
5	<210> 45 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 45 ggtcgggagc catgcgaatg catttagtcc tgctcctcgg ccacgaag	48
15	<210> 46 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 46 cttcgtggcc gaggagcagg actaaatgca ttgcatggc tccgcacc	48
25	<210> 47 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 47 ggccctcccg aacagtcggg cctcctcgcta aaccgcagac tggagagcg	49
35	<210> 48 <211> 7199 <212> ADN <213> <i>Thraustochytrium</i> sp. ONC-T18	
40	<400> 48	
	agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa	60
	gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaatac gactgagcta actcacatta attgcgttgc	120
	gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgctcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc	180
	aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact	240
	cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgogggcag cggtatcagc tcaactcaaag gcgtaatac	300

ES 2 678 997 T3

ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 360
 aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgccccctg 420
 acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa 480
 gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg acctgcccg 540
 ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgtttct catagctcac 600
 gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttogctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 660
 cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaaccgg 720
 taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactgtaa caggattagc agagcagagt 780
 atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 840
 cagtatttgg tatctgocct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 900
 cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcgggtggtt ttttgttgc aagcagcaga 960
 ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat ctttctacg ggtctgacg 1020
 ctcagtgga cgaaaactca cgtaaggga ttttggctat gaattaattc ttagaaaaac 1080
 tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt 1140
 tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcacga ggcagttcca taggatggca 1200
 agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 1260
 ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgcgac tgaatccggt 1320
 gagaatggca aaagtttatg catttcttct cagacttgtt caacaggcca gccattacgc 1380
 tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacccaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 1440
 agacgaaata cgcgatcgtt gttaaaagga caattacaaa caggaaatcga atgcaaccgg 1500
 cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata ttcttctaat 1560
 acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc atcaggagta 1620
 cggataaaat gcttgatggt cgggaagaggc ataaattcgg tcagccagtt tagtctgacc 1680
 atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 1740
 gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtgcacctg attgcccgac attatcgga 1800
 gccatttat acccatataa atcagcatcc atggttgaat ttaatcggg cctagagcaa 1860
 gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgtat tactgtttat gtaagcagac 1920
 agttttattg ttcagagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaa 1980
 atgaagtttt aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg 2040
 cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgt ctgtctattt cgttcatcca tagttgctg 2100
 actccccgct gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgtctc 2160
 aatgataccg cgagaccac gtcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 2220

ES 2 678 997 T3

cggaaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 2280
 ttgttgccgg gaagctagag taagtagtgc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc 2340
 cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg 2400
 ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 2460
 ctteggtoct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggcgca gtgttatcac tcatggttat 2520
 ggcagcactg cataattctc ttactgcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 2580
 tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 2640
 ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 2700
 aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat 2760
 gtaaccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 2820
 gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga cacggaaatg 2880
 ttgaatactc atactcttc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 2940
 catgagcggga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 3000
 atttccccga aaagtgccac ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt 3060
 ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgc ctagcgcgcc ctctttcgc 3120
 tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg 3180
 gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 3240
 gggatgaggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt 3300
 ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat 3360
 ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt toggcctatt ggttaaaaaa 3420
 tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc 3480
 cattcgccat tcaggctgog caactgttg gaagggcgat cggtgccggc ctcttcgcta 3540
 ttacgccagc tggcgaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 3600
 ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgat tgtgcccgg cgagctcggg 3660
 cccccacacg tgtggtctag agetagccta ggctcgagaa gcttgacctg tctccctgg 3720
 ccatccattg cgctgcgaa gcattggatt gcgaactgog toggccagat cgcttggttt 3780
 cccaacatga gagcgcctct gtcggcaaga ccatttcgc ccccgcttt gctcacaacc 3840
 aactcgtagt agattttgta aagaacactg cacgtctgac tgctcccagc ccgcacgcat 3900
 tgcgcttggc agcctcggtc ccaaacgctc acggctcgtg cccggtccac gggaaaaaat 3960
 aacttttgtc cgcgagcggc cgttcaaggc gcagccgcga gcgtgccaac cgctccgtcc 4020
 gcattctttt cccaatgttg gattcattca ttcttgccag gccagatcat ctgtgcctcc 4080

ctgcggtgcc cttccttagc gtgcgcagat ctcttcttcc cagagcccgc gcggcgcttc 4140
 gtggagtccg cgtccatgtc atgcgcgcgc ggcgtcttga ccccctcggc ccctttggtt 4200
 cgcggctgcg caacgagccg tttcacgcca ttgcgaccaa ccgcgcgcta aaatcggatt 4260
 ggcggttca cgcgatttt gcagcacctc tgggctgtga gggacgaccg tccactttta 4320
 cccgcacaga gtggactttc accccctcac tccactgaag ccaacttttc gccgtcttcc 4380
 caaccctaaag tttatgctag ccctcatgcc gcaacggacg tcacccccat ttccactggc 4440
 gacgtgggga cctgggcgca ataaggcgcg agaaggaaat tacgacggca cactggggcc 4500
 agaagagggc actaggagcg gcaaccctact ggcgcggcac agcggtttgg cgcggggatc 4560
 aaagcaaac ccggctcatc cagagcaaac ccgaatcagc cttcagacgg tcgtgcctaa 4620
 caacacgccc ttctaccocg ccttccttgc gtccctcggc tcccccgagc ccaagtcttc 4680
 cgcgccctcc taacgccaac caagcaagat ggccaagtg accagtgcg ttccgggtgt 4740
 caccgcgcgc gacgtcgcg gagcggctga gttctggacc gaccggctcg ggttctcccg 4800
 ggacttcgtg gaggacgact tcgcgggtgt ggtccgggac gacgtgacc tgttcatcag 4860
 cgcggtccag gaccaggtgg tgccggacaa caccctggcc tgggtgtggg tgccggcct 4920
 ggacgagctg tacgccgagt ggtcggaggt cgtgtccacg aacttccggg acgcctccgg 4980
 gccggccatg accgagatcg gcgagcagcc gtggggcgcg gagttcgccc tgcgcgaccc 5040
 ggccggcaac tgctgtcact tcgtggccga ggagcaggac taagcgctt caggcaggct 5100
 gatccctact gtgggggctc tgacggacgg ccggtctttg tacgtaaca ggcgcttctt 5160
 cgcggccccc cgaggggggc ggcaacgagc cgggtggcgt ggcacggaca aggcaagagc 5220
 ctttccatcc cgcataaagt gatgcacat tttgacctg ttgategttt ttgtgtgttt 5280
 agagcggccc cgtgcgggta ggcgaagtgc gcttctgagc aaggaagaga gaggtgcagc 5340
 ttcttcttga tcagtgtggt aatcttcaac ggccacgctc gcttattoga tacctgtaaa 5400
 gctaccggtg caccctgca agttgggcac cacgtagtgt tactggtgaa tccaaatgtt 5460
 agccgctagc ttggtgccct tttcgacagc aagggtcttg tgaaaagccg agggcccgc 5520
 tgttcgggag ggccgcactt attagagttg aagccaagta agatggtgag tcatgataat 5580
 tgagcagatc gcttgtttgg agcgatgaat cgtttgagtt totgccccat cagttgtcga 5640
 cggtagtgta ttggactacg gtgactataa cgggtgacgg ggagttaggc ctcgactccg 5700
 gagagggagc ctgagagacg gctaccacat ccaaggaagc cagcaggcgc gtaaattacc 5760
 caatgtggac tccacgaggt agtgacgaga aatatcaatg cggggcgctt cgcgtcttgc 5820
 tattggaatg agagcaatgt aaaaccctca tcgaggatca actggagggc aagtctggtg 5880
 ccagcagccg cggtaattcc agctccagaa gcgtatgcta aagttgttgc agttaaag 5940
 ctcgtagtgt aatttctggg gcgggagccc cggctcttgc gcgactgcgc tctgtttgcc 6000

ES 2 678 997 T3

gagcggctcc tctgccatcc tcgcctcttt ttttagtggc gtcggtcact gtaattaaag 6060
 cagagtgttc caagcaggtc gtatgacctg gatgtttatt atgggatgat cagatagggc 6120
 tcgggtgcta ttttgttggg ttgcacatct gagtaatgat gaataggaac agttgggggt 6180
 attcgtattht aggagctaga ggtgaaattht ttggattthc gaaagacgaa ctacagcgaa 6240
 ggcatttacc aagcatgttht 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
 agagctcttht ctgattcta tgggtggtgg tgcattggccg ttcttagttg gtggagtgat 6600
 ttgtctggtht aattccgtha acgaacgaga cctcggccta ctaaatagcg gtgggtatgg 6660
 cgacatactt gcgtacgctt cttagaggga catgttccgt atacgagcag gaagtccgag 6720
 gcaataacag gtctgtgatg cccttagatg ttctgggccc caccgcccgt aactgatgg 6780
 gttcaacggg tggatcatct tgttcgcagc gaggtgcttht gccggaaggc atggcaaatc 6840
 ctttcaacgc ccatcgtgct ggggctagat ttttgcaatt attaatctcc aacgaggaat 6900
 tcttagtaaa ccgaagtcct cagcttgcat tgaatacgtc cctgcccttht gtacacaccg 6960
 cccgtcgcac ctaccgattg aacggtccga tgaaaccatg ggatgacctt ttgagcgttht 7020
 gttcgcgagg ggggtcagaa ctccgggtgaa tcttattgtht tagaggaagg tgaagtcgta 7080
 acaaggthtcc cgtagtgaat cacgaattct ggatccgata cgtaaccccgt ctgcagcatg 7140
 ccgtggtaccg agctthtccc atagtgagtc gtattagagc ttggccgtaat catggtcat 7199

5 <210> 49
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 49
 gggatcagcc tgcctgaagg cccttagtcc tgcctcctgg ccacgaag 48

15 <210> 50
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 50
 cttcgtggcc gaggagcagg actaagccc ttcaggcagg ctgatccc 48

25 <210> 51
 <211> 48

ES 2 678 997 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 51
 ggccctcccg aacagtcggg ccctcggcct tcaccaagc ccttcctg 48

10 <210> 52
 <211> 6526
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp. ONC-T18

15 <400> 52

```

    agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa      60
    gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta attgcggtgc      120
    gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgcctgcca gctgcattaa tgaatcggcc      180
    aacgcgcggg gagagggcgg ttgcgtattg ggcgctcttc cgettcctcg ctcactgact      240
    cgctgcgctc ggtcgctcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag gcggtaatac      300
    ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa      360
    aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcggttc tggcgTTTTT ccataggctc cgcctccctg      420
    acgagcatca caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa      480
    gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc      540
    ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac      600
    gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttogctccaa gctgggctgt gtgcacgaac      660
    cccccgttca gccgcaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg      720
    taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt      780
    atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga      840
    cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct      900
    cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggtt tttgtttgc aagcagcaga      960
    ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgacg      1020
    ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcoat gaattaattc ttagaaaaac      1080
    tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt      1140
    tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcacoga ggcagttcca taggatggca      1200
    agatcctggg atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc      1260
  
```

ES 2 678 997 T3

ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcacccat gagtgcgac tgaatccggt 1320
 gagaatggca aaagtttatg cttttctttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc 1380
 tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacccaaa ccggtattca ttcgtgattg cgcctgagcg 1440
 agacgaaata cgcgatcgcg gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 1500
 cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata 1560
 acctggaatg ctgttttccc ggggatcgcg gtggtgagta accatgcac atcaggagta 1620
 cggataaaat gcttgatggt cgggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 1680
 atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 1740
 gcatcgggct tccatacaa tcgatagatt gtgcacactg attgcccgc attatcgcga 1800
 gccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg octagagcaa 1860
 gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgat tactgtttat gtaagcagac 1920
 agttttattg ttcgatgat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 1980
 atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg 2040
 cttaatcagt gaggcaacta tctcagcgat ctgtctattt cgttcaccca tagttgcctg 2100
 actccccgtc gtgtagataa ctacgatcgc ggagggctta ccatctggcc ccagtctgc 2160
 aatgataccg cgagacccac gtcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 2220
 cgggaaggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 2280
 ttggtgcccg gaagctagag taagtagtcc gccagttaat agtttgccga acgttgctgc 2340
 cattgctaca ggcacgtgg tgtcaogctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg 2400
 ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgate ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 2460
 cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 2520
 ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 2580
 tgagtaacta accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 2640
 ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 2700
 aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat 2760
 gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 2820
 gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga cacggaaatg 2880
 ttgaatactc atactcttc tttttcaata ttattgaagc atttatcag gttattgtct 2940
 catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataa caaatagggg ttccgcgcac 3000
 atttccccga aaagtccac ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt 3060
 ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgc ctagcgcgg ctctttcgc 3120
 tttcttccct tctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg 3180

ES 2 678 997 T3

gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 3240
gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacggt 3300
ggagtccacg ttctttaata gtggactcct gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat 3360
ctcggctctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa 3420
tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc 3480
cattcgccat tcaggctgog caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta 3540
ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 3600
ttttccagc cagcagcttg taaaacgacg gccagtgaat tgtgcggccg cgagctcggg 3660
ccccacacg tgtggtctag agctagccta ggctcgagaa gcttcgoggc ttcccgtctc 3720
caagcttcgt ctcggtagag attctatctt cgcocggcag cccgcgcgcg tccggcaagt 3780
gtagaacggc agaaagccca cttgcacgga acgcccgaca agttgacgaa agcggcccgc 3840
aagtgcggca gcccggtgg tttttcctcg cggcgaggcc aaaccgcaa gccaccaag 3900
ccagacacca ggtatgtgcc gcacgcgcgc ccgcacgcga gcccgcagga tgcccgtac 3960
gcgctgacgc ctttctcgc cccgcgcgcg agaagacgcg ctccggcaac ggcgggagcc 4020
gagcgaacgg gcgaggattg atcgagtagc tgcaggttga gaaaaagga aaaccgcga 4080
gatggacaac ggctggatgg acgagaagac gcacgaggac gcgaggactg acgatgatca 4140
cgtgcgcagc aagacttgaa aagaagcaag gaaggtagaa aaaaaagaag aatcaagca 4200
agatggcaa gttgaccagt gccgttcgcg tgctcaccgc gcgcgacgtc gccggagcgg 4260
tcgagttctg gaccgaccgg ctcgggttct cccgggactt cgtggaggac gacttcgccg 4320
gtgtggtccg ggacgacgtg accctgttca tcagcgcggt ccaggaccag gtggtgccgg 4380
acaacaccct ggcctgggtg tgggtgcgog gcctggacga gctgtacgcc gagtggtcgg 4440
aggtcgtgtc cacgaacttc cgggacgcct cccggccggc catgaccgag atcggcgagc 4500
agccgtgggg gcgggagttc gccctgcgog acccggccgg caactgcgtg cacttcgtgg 4560
ccgaggagca ggactaacac gtgctacgag atttcgattc caccgcgcgc ttctatgaaa 4620
ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc 4680
tcatgctgga gttcttcgcc caccocaact tgtttattgc agcttataat ggttaciaat 4740
aaagcaatag catcaciaat ttacaciaata aagcattttt ttactgcat tctagttgtg 4800
gtttgtccaa actcatcaat gtatcttctc atgtctgagg gcccgactgt tcgggagggc 4860
cgcacttatt agagttgaag ccaagtaaga tggtgagtca tgataattga gcagatcgct 4920
tgtttgagc gatgaatcgt ttgagttctt gcccacacg ttgtcgacgg tagtgtattg 4980
gactacggtg actataacgg gtgacgggga gttagggtct gactccggag agggagcctg 5040

ES 2 678 997 T3

agagacggct accacatcca aggaaggcag caggcgcgta aattacccaa tgtggactcc 5100
 acgaggtagt gacgagaaat atcaatgcgg ggcgcttgcg gtcttgctat tggaatgaga 5160
 gcaatgtaaa accctcatcg aggatcaact ggagggcaag tctggtgcca gcagccgagg 5220
 taattccagc tccagaagcg tatgctaaag ttgttgcaat taaaaagctc gtagttgaat 5280
 ttctggggcg ggagccccgg tctttgcgag actgcgctct gtttgccgag cggctcctct 5340
 gccatocctcg cctctttttt tagtgcgctc gttcactgta attaaagcag agtgttccaa 5400
 gcaggtcgtg tgacctggat gtttattatg ggatgatcag atagggctcg ggtgctattt 5460
 tgttggttg cacatctgag taatgatgaa taggaacagt tgggggtatt cgtatttagg 5520
 agctagaggt gaaattcttg gatttcgaa agacgaacta cagcgaaggc atttaccag 5580
 catgttttca ttaatcaaga acgaaagtct ggggatcgaa gatgattaga taccatcgta 5640
 gtctagaccg taaacgatgc cgacttgca ttgcgggggtg tttgtattgg accctcgag 5700
 cagcacatga gaaatcaaag tctttgggtt ccggggggag tatggtcgca aggctgaaac 5760
 ttaaaggaat tgacggaagg gcaccaccag gaggggagcc tgoggcttaa tttgactcaa 5820
 cacgggaaaa cttaccaggt ccagacatag gtaggattga cagattgaga gctctttctt 5880
 gattctatgg gtgggtgtgc atggccgttc ttagttggtg gaggatttg tctggttaat 5940
 tccgttaacg aacgagacct cggcctaact aatagcggtg ggtatggcga catacttgcg 6000
 tacgcttctt agagggacat gttcgggtata cgagcaggaa gttcaggca ataacaggtc 6060
 tgtgatgcc ttatgatgtc tgggcccgcac gcgcgctaca ctgatgggtt caacgggtgg 6120
 tcatcgttgt tcgcagcgag gtgctttgcc ggaaggcatg gcaaatcctt tcaacgccc 6180
 tcgtgctggg gctagatttt tgcaattatt aatctccaac gaggaattcc tagtaaacgc 6240
 aagtcacag cttgcattga atacgtccct gccctttgta cacaccgcc 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

5 <210> 53
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 53
 ggtctagagc tagcclagc togagaagct tocgggcttc ccgtctc 47

15 <210> 54
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 678 997 T3

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 54
 ggaacggcac tggcaactt ggccatcttg ctgattctt tctttttt ctacctcc 59

10 <210> 55
 <211> 7374
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp.

<400> 55

agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa 60

gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta attgcggttg 120

gctcaactgcc cgctttccag tgggaaacc tgtcgtgcc gctgcattaa tgaatcggcc 180

aacgcgcggg gagagcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcaactgact 240

cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaag gcgtaatac 300

ggttatccac agaatcagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa gccagcaaa 360

aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc gccccccctg 420

acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa 480

gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccc 540

ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac 600

gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 660

ccccggttca gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccogg 720

taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactgtaa caggattagc agagcgaggt 780

atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 840

cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 900

cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggtt tttgtttgc aagcagcaga 960

ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctac ggtctgacg 1020

ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga tttgtgcat gaattaattc ttagaaaaac 1080

tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt 1140

tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca 1200

agatcctggt atcggctcgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 1260

ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aatcaccat gagtgacgac tgaatccggt 1320

gagaatggca aaagttatg catttcttcc cagacttggt caacaggcca gccattacgc 1380

15

ES 2 678 997 T3

togtcatcaa aatcactogc atcaacccaaa cggttattca ttcgtgattg cgcoctgagcg 1440
 agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 1500
 cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata 1560
 acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtgggtgagta accatgcac c atcaggagta 1620
 cggataaaat gcttgatggt cgggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 1680
 atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 1740
 gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtgcacactg attgcccgc attatcgcga 1800
 gccatttat acccatataa atcagcatcc atggttgaat ttaatcggc cctagagcaa 1860
 gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca cccottgtat tactgtttat gtaagcagac 1920
 agttttattg ttcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaa 1980
 atgaagtttt aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg 2040
 cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcacca tagttgcctg 2100
 actccccgtc gtgtagataa ctacgatagc ggagggccta ccatctggc ccagtctgc 2160
 aatgataaccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 2220
 cgggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtetattaa 2280
 ttggtgccg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcca acgtgttgc 2340
 cattgctaca ggcacgtgg tgcaacgctc gtogtttgg atggcttcat tcagctccgg 2400
 ttcccaacga tcaaggogag ttacatgac cccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc 2460
 ottcggctc cggatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 2520
 ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgcttt ctgtgactgg 2580
 tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttccc 2640
 ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 2700
 aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat 2760
 gtaaccact cgtgaccca actgatcttc agcatcttt actttacca gcgtttctgg 2820
 gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccc aaaaaagga ataagggcga cacggaatg 2880
 ttgaatactc atactcttc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 2940
 catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataa caaatagggg ttccgcgcac 3000
 atttccccga aaagtccac ctgacgcgc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt 3060
 ggtggttaag cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgc ctagcgcgc ctctttctgc 3120
 tttcttccct tcctttctcg ccacgctgc cggcttccc cgtcaagctc taaatcgggg 3180
 gctccctta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 3240

ES 2 678 997 T3

gggatgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt 3300
 ggagtccacg ttctttaata gtggactcct gttccaaact ggaacaacac tcaacctat 3360
 ctoggtctat tcttttgatt tataagggat tttgcccatt tcggcctatt ggttaaaaaa 3420
 tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc 3480
 cattcgccat tcaggctgcg caactggttg gaagggcgat cggtgccggc ctcttcgcta 3540
 ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 3600
 ttttcccagt cacgacgttg taaaaacgc gccagtgaat tgtgcccggc cgagctcggg 3660
 cccccacacg tgtggtctag agctagccta ggctcgagaa gcttggcctg tctcccttgg 3720
 ccatccattg cgctgcggaa gcattggatt gcgaactgcg tcggccagat cgcttggttt 3780
 cccaacatga gacgcgctct gtcggcaaga ccatttccgc ccccgcttt gtcacaacc 3840
 aactcgtagt agattttgta aagaacactg cacgtctgac tgctcccagc ccgcaacgat 3900
 tgcgcttggc agcctcggtc ccaaacctgc acggtcctg cccggtccac gggaaaaaat 3960
 aacttttgc cgcgagcggc cgttcaaggc gcagccgcga gcgtgccaac cgtccgtccc 4020
 gcattctttt cccaatgttg gattcattca ttcttgccag gccagatcat ctgtgcctcc 4080
 ctgcgctgcc ctcccttagc gtgcgcagat ctctctctcc cagagcccgc gcggcgcttc 4140
 gtggagtcgg cgtccatgct atgcgcgcgc ggcgtcttga ccccctcggc ccctttggtt 4200
 cgcggctgcg caacgagccg tttcacgcca ttgcgacca ccgcgcgcta aaatcggatt 4260
 ggccgttgca cgcgatttt gcagcacctc tgggctgtga gggacgaccg tccactttta 4320
 ccgcacaga gtggactttc acccctcac tccactgaag ccaactttc gccgtcttcc 4380
 caaccctaaag tttatgctag ccctcatgcc gcaacggacg tcaccccat ttccactggc 4440
 gagtgggga cctgggcgca ataaggcgcg agaaggaaat tacgacggca cactggggcc 4500
 agaagagggc actaggagcg gcaaccact ggcgcggcac agcggtttg cgcggggatc 4560
 aaagcaaac cggctcatc cagagcaaac ccgaatcagc cttcagacgg tcgtgcctaa 4620
 caacacgcg ttctaccocg ccttcttgc gtccctcgc tccccgagc ccaagtcttc 4680
 cgcctctcc taacgccaac caagcaagat gagtaaagga gaagaacttt tcaactggagt 4740
 tgtcccaatt cttgttgaat tagatggtga tgtaaatggg cacaatttt ctgtcagtgg 4800
 agaggtgaa ggtgatgcaa catacggaaa acttaccctt aaatttattt gcactactgg 4860
 aaaactacct gttccatggc caacacttgt cactacttcc acttatggtg ttcaatgctt 4920
 ttcaagatac ccagatcata tgaagcggca cgacttcttc aagagcgcca tgctgaggg 4980
 atacgtgcag gagaggacca tctctttcaa ggaagcggg aactacaaga cacgtgctga 5040
 agtcaagttt gagggagaca ccctcgtcaa caggatcgag ctttaaggaa tcgatttcaa 5100
 ggaggacgga aacatcctcg gccacaagtt ggaataaac tacaactccc acaactgata 5160

ES 2 678 997 T3

catcacggca gacaaacaaa agaattggaat 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 cgcgcgcctt 5460
ctatgaaagg ttgggcttct gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcoctcagcg 5520
cggggatctc atgctggagt tcttcgccca cccaacttg tttattgcag cttataatgg 5580
ttacaaataa agcaatagca tcacaaatth cacaaataaa gcattttttt cactgcattc 5640
tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgagggc cggactgttc 5700
gggagggccc cacttattag agttgaagcc aagtaagatg gtgagtcatg ataattgagc 5760
agatcgcttg tttggagcga tgaatcgttt gagtttctgc cccatcagtt gtcgacggta 5820
gtgtattgga ctacgggtgac tataacgggt gacggggagt tagggctcga ctccggagag 5880
ggagcctgag agacggctac cacatccaag gaaggcagca ggcgcgtaaa ttacccaatg 5940
tggactccac gaggtagtga cgagaaatat caatgcgggg cgcttcgctt cttgctattg 6000
gaatgagagc aatgtaaaac cctcatcgag gatcaactgg agggcaagtc tgggtccagc 6060
agccgcggta attcagctc cagaagcgtg tgctaaaagt gttgcagta aaaagctcgt 6120
agttgaatth ctggggcggg agccccggtc tttgcgcgac tgcgctctgt ttgcccagcg 6180
gtcctctgac catcctcgcc tcttttttta gtggcgtcgt tcaactgtaat taaagcagag 6240
tgttccaagc aggtcgtatg acctggatgt ttattatggg atgatcagat agggctcggg 6300
tgctatthttg ttggthttgca catctgagta atgatgaata ggaacagttg ggggtattcg 6360
tatttaggag ctagagggtga aattccttga tttccgaaag acgaaactaca gcgaaggcat 6420
ttaccaagca tgthttcatt aatcaagaac gaaagtctgg ggatcgaaga tgattagata 6480
ccatcgtagt ctagaccgta aacgatgcg acttgcgatt gcgggggtgt tgtattggac 6540
cctgcgagca gcacatgaga aatcaaagtc tttgggttcc ggggggagta tggctgcaag 6600
gctgaaactt aaaggaattg acggaagggc accaccagga gtggagcctg cggottaatt 6660
tgactcaaca cgggaaaact taccaggtcc agacataggt aggattgaca gattgagagc 6720
tctttcttga ttctatgggt ggtggtgcat ggccttctt agttggtgga gtgatttgtc 6780
tggttaattc cgthaacgaa cgagacctcg gcctactaaa tagcggggg tatggcgaca 6840
tacttgcgta cgcttcttag agggacatgt tccgtatacg agcaggaagt tcgaggcaat 6900
aacaggtctg tgatgccctt agatgttctg ggcgcacgc gcgctacact gatgggttca 6960
acgggtggtc atcgttggtc gcagcgaggt gctttgccgg aaggcatggc aaatcctthc 7020

ES 2 678 997 T3

aacgcccatac gtgctggggc tagatttttg caattattaa tctccaacga ggaattccta 7080
 gtaaacgcaa gtcatacagct tgcattgaat acgtccctgc cctttgtaca caccgcccgt 7140
 cgcacctacc gattgaacgg tccgatgaaa ccatgggatg accttttgag cgtttgttcg 7200
 cgaggggggt cagaactcgg gtgaatctta ttgttttagag gaaggtgaag tcgtaacaag 7260
 gtttccgtag tgaatcacga attctggatc cgatacgtaa cgcgtctgca gcatgcgtgg 7320
 taccgagctt tcctatagt gagtcgtatt agagcttggc gtaatcatgg tcat 7374

5 <210> 56
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 56
 ccagtgaaaa gttctctcc ttactcacc ttgcttgggt ggcgttagga gggg 54

15 <210> 57
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 57
 ccgctcctaa cgccaaccaa gcaagatgag taaaggagaa gaactttca ctgg 54

25 <210> 58
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 58
 ggtggaatcg aaatctcgta gcacgtgta ttgtatagt tcatccatgc catg 54

35 <210> 59
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 59
 catggcatgg atgaactata caaataacac gtgctacgag atttcgattc cacc 54

50 <210> 60
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

ES 2 678 997 T3

<400> 60
 cgtcctcctt gaaatcgatt ccc 23

5
 <210> 61
 <211> 6011
 <212> ADN
 <213> *Thraustochytrium* sp.

10
 <400> 61

gacgaaagg	cctcgtgata	cgcctat	tatagg	tgatgata	ataatg	60
cttagacgc	aggtggcact	tttcggg	atgtgcg	aaccctatt	tgtttat	120
tctaaataca	ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	180
aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgctgccctt	attccctttt	240
ttgcggcatt	ttgccttctc	gtttttgctc	accagaaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	300
ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	360
tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacggt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagtctctgc	420
tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	480
actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	540
gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgctg	ccataacat	gagtgataac	actgcgcca	600
acttacttct	gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	660
gggatcatgt	aactcgcctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	720
acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	780
gogaactact	tactctagct	tcccgcaac	aattaataga	ctggatggag	gcgataaag	840
ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggccttc	eggctggctg	gtttattgct	gataaatctg	900
gagccgggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	960
cccgatcgt	agttatctac	acgaocggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	1020
agatcgctga	gataggtgcc	tactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	1080
catatatact	ttagattgat	ttaaaaactc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	1140
tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	1200
cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	ttttttctg	cgcgtaatct	1260
gctgcttgca	aacaaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgt	ttgtttgccg	gatcaagagc	1320
taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	1380
ttctagtgt	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	1440

ES 2 678 997 T3

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggtctg ctgccagtg gataaagtcg tgtcttaccg 1500
 ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtccggctga accggggggtt 1560
 cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
 agcattgaga aagcggccacg cttccogaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagcg 1680
 gcagggctcg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt 1740
 atagtctctg cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860
 gctggccttt tgcacacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcggggcccg 1920
 gatatcgcta gctcagagtg accaaaagcc gtgaacgggc gtggccgagg ctacagcacg 1980
 cagcgggtgt ctctgcgtat tatatTTTTT gcaaggtttc ccgacggctg gtccgcgtgc 2040
 ccgcgcccg cgcacgctct cactagacgt tggcatgag tgtttcagat caagacctcg 2100
 gagaagaatt ggggcgcaca ccttccgtgc gcgcaccctt gccactgtat accgtgcgta 2160
 ccccaccaga cagaaggta caccctgctc tctcttcgct agctataccg tgtgctgtag 2220
 atcgtcgcag gattcgggtt gtgcacaccg cgtcctgtgg gctggggggc ctggcgcggc 2280
 ggcttccctag gatatagtct ataaaaccct gcgaatttta cacacagagc ggttcatttg 2340
 cgtgggtcc ggtgcgcaat ttccggggc acgctgcagc tttacatcga cgtaacagcc 2400
 acagtcacgc tgcaccgctt cttcggcctt cccaccgacc cggctgctgc ccgccttctt 2460
 ggctggctga tgaactatcg cggcctgctt ggcacgtacg tgcccctccc atttctcccc 2520
 ggtcctccag aatgcgcct ccggcccca tgaagcagc cgttggccat gcgggcggcg 2580
 acatctgggt cctcgcgcct tctttgatga catcgtcctc atcgtcgtcg gcgacctggt 2640
 cttcgtgatc gcttgttgat cacgcgcttg gcatcttgcg aggagaaccg tctgcactct 2700
 tttggcggg ccgaggtgcc ttccgggggtg caggccagtc gccagaccag acctgctgca 2760
 aagccgaac atgcgcgtcg aggtagacca ttaggtacgt acgtacgcac gtottcatga 2820
 tcgacgccaa cgtcatgcgg tcgatgcccc gccacgcgat ggcgctagca gccaggagcg 2880
 cgtgtgtacg ggcgcggagc ttcgtctgca agcaaagctg ggcgcttggg ccggggatcg 2940
 ggccactact tggacgaacg aacgaaacgc atgacgtcat ccttggcagt aaatcttgcc 3000
 ggagcgcgca aaaccaggc tggacgcgct gggcgcgatt gagaaccgca agctttggag 3060
 cctttcactg agcaggggga actgacgctg gagcgcgca ccgtaggca aggaatttga 3120
 tcgaagtagg caggactgcc cgcaggggtc aggccatggc caagttgacc agtgccgttc 3180
 cggctctcac cgcgcggac gtgcgggag cggctogagtt ctggaccgac cggctcgggt 3240
 tctccggga cttcgtggag gacgacttc ccgggtgtgt ccgggacgac gtgaccctgt 3300

ES 2 678 997 T3

tcatcagcgc ggtccaggac caggtggtgc cggacaacac cctggcctgg gtgtgggtgc 3360
 ggggcctgga cgagctgtac gccgagtggc cggaggtcgt gtccacgaac ttccgggacg 3420
 cctccgggcc ggcctgacc gagatcggcg agcagccgtg ggggcgggag ttccgcctgc 3480
 gcgacccggc cggcaactgc gtgcacttcg tggccgagga gcaggactga cacgtgctac 3540
 gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg 3600
 acgcccggctg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gccaccccca 3660
 acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa 3720
 ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt 3780
 atcatgtctg aattcccggg gatcctctag agtcgagaag cttgtcgcag aattcagatg 3840
 tagtcatacg ctcgtctcaa agattaagcc atgcatgtgt aagtataagc gattatactg 3900
 tgagactgcg aacggctcat tataatcagtt atgatttctt cggatatttc tttatatgga 3960
 tacctgcagt aattctggaa ttaatacatg ctgagagggc cgcactgttc gggagggcgg 4020
 cacttattag agttgaagcc aagtaagatg gtgagtcatg ataattgagc agatcgcttg 4080
 tttggagcga tgaatcgttt gagtttctgc cccatcagtt gtcgacgta gtgtattgga 4140
 ctacggtgac tataacgggt gacggggagt tagggctcga ctccggagag ggagcctgag 4200
 agacggctac cacatccaag gaaggcagca ggcgcgtaaa ttaccaatg tggactccac 4260
 gaggtagtga cgagaaatat caatgcgggg cgccttcgct cttgctattg gaatgagagc 4320
 aatgtaaaac cctcatcgag gatcaactgg agggcaagtc tgggtgccagc agccgcggta 4380
 attccagctc cagaagcgtg tgctaaagtt gttgcagta aaaagctcgt agttgaattt 4440
 ctggggcggg agccccggtc tttgcgcgac tgcgctctgt ttgccgagcg gctcctctgc 4500
 catcctcgcc tcttttttta gtggcgtcgt tcaactgtaat taaagcagag tgttccaagc 4560
 aggtcgtatg acctggatgt ttattatggg atgatcagat agggctcggg tgctattttg 4620
 ttggtttgca catctgagta atgatgaata ggaacagttg ggggtattcg tatttaggag 4680
 ctagaggtga aattcttggg tttccgaaag acgaactaca gcgaaggcat ttaccaagca 4740
 tgttttcatt aatcaagaac gaaagtctgg ggatcgaaga tgattagata ccatcgtagt 4800
 ctagaccgta aacgatgcgg acttgcgatt gcgggggtgt 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
 cgtaaacgaa cgagacctcg gcctactaaa tagcgggtggg tatggcgaca tacttgcgta 5160
 cgcttcttag agggacatgt tcggtatacg agcaggaagt tcgaggcaat aacaggtctg 5220

ES 2 678 997 T3

tgatgccctt agatgttctg ggccgcacgc gcgctacact gatgggttca acgggtggtc 5280
 atcgttggtc gcagcgaggt gctttgccgg aaggcatggc aaatcctttc aacgcccate 5340
 gtgctggggc tagatTTTTG caattattaa tctccaacga ggaattccta gtaaacgcaa 5400
 gtcacacagct tgcattgaat acgtccctgc cctttgtaca cacogccogt cgcacctaacc 5460
 gattgaacgg tccgatgaaa ccatgggatg accttttgag cgtttgttcg cgaggggggt 5520
 cagaactcgg gtgaatctta ttgtttagag gaaggtgaag tcatcacgaa ttctggatcc 5580
 gatacgtaac gcgctctgcag catgcaagct tggcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg 5640
 actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca 5700
 gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcacog atcgccttc ccaacagttg cgcagcctga 5760
 atggcgaatg gcgcctgatg cgtatTTTTc tccttaogca tctgtgcggt atttcacaacc 5820
 gcatatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc goatagttaa gccagccccg 5880
 acaccgccca acaccgcgtg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta 5940
 cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc 6000
 gaaacgcgcg a 6011

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

5

<400> 62

gacgaaagg cctcgtgata cgcctatTTTt tataggttaa tgtcatgata ataatggTTt 60
 cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccocctatt tgtttatTTt 120
 tctaaataca ttcaaatatg tatocgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
 aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctTTt 240
 ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
 ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
 tccttgagag ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gagcactTTt aaagttctgc 420
 tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgcgcatac 480
 actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
 gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtc ccataaccat gagtgataac actgcccgcc 600
 acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgctTTTTtG cacaacatgg 660
 gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
 acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780
 gcgaactact tactctagct tccgggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

10

ES 2 678 997 T3

ttgcaggacc acttctgogc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900
 gagccgggtga gcgtgggtct cgcgggtatca ttgcagcaact ggggccagat ggtaagccct 960
 ccogtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
 agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
 catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
 tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttogtto cactgagcgt 1200
 cagacccogt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
 gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc 1320
 taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
 ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
 tcgctctgct aatcctgta ccagtggtctg ctgccagtgg cgataagtog tgtcttaccg 1500
 ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt 1560
 cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
 agcattgaga aagcgcacag cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccgtaagcg 1680
 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttcacag gggaaacgcc tggtatcttt 1740
 atagtctgt cgggtttcgc cactctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgetctcag 1800
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggtc ctggcctttt 1860
 gctggccttt tgctcacatg tgtgctgggc ccagccggcc agatctgagc tcgcggccgc 1920
 gatatcgcta gacaacgcca tcctcgacca cagcaaggac acgcaccgct tcggctacgg 1980
 tatccagatc ggataaatat tataaccgcc cttccgctct ccttttcttt tttgctcgtc 2040
 tggatgccag actaaggagt ccttgctcct ctgcgcaagg ctgctcacc agagtctctg 2100
 cctgtggttg agcgcaccac aacaggtaa agcgaaccag ggccgccccg ttgccgctgc 2160
 gatgtcgtg ctcttgogag actcttcatt agatcgccgg aatgctgccg caggactgac 2220
 cgcctcttcg ttogttogtt tgtacgcgag cgggtgcgagc ggcttcggtg ttggcagata 2280
 ggcagaacgc gagcagttca cgtttctttg cagctttatc tatccgcaaa ttccctcag 2340
 cgtctgcaac tttccggtga ggacagcaga gctgcagttc tgatcgtctc catcttttgg 2400
 agccatgctc gacgtcccc agctcgtctc cgtctcccct ggagtggacg gtctctttca 2460
 cagtgcctgg gtgcggccat ttccctaaat aggttgccga gccgagttc cttaaacgtg 2520
 cctggtccgc gtgcttccgc ctactacct gaacgcgcag tagctcggcg cgtgccgctt 2580
 taaggcgggc ggggtggtg ctcttgctta cgcagcgcg gtacgtcagc agcgcggcg 2640
 ccatgctgcc catagcggcc acagaatcgt aggcgctgca atcgggaact gccaaatgg 2700

ES 2 678 997 T3

caatcgagac gatccccaa aagtggacaa gcaccgtcaa agtaacctgg ctgatgatgg 2760
 cggggaccgc 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 ttgggtctog gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 3060
 cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cccaacttg tttattgcag ottataatgg 3120
 ttacaaataa agcaatagca tcacaaatct cacaaataaa gcattttttt cactgcattc 3180
 tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgaattc ctcgttggag 3240
 attaataatt gcaaaaatct agccccagca cgatgggctg tgaaaggatt tgccatgcct 3300
 tccggcaaag cacctcgctg cgaacaacga tgaccaccgg ttgaaccat cagtgtagcg 3360
 cgctgcggc ccagaacatc taaggcatc acagacctgt tattgcctcg aacttcctgc 3420
 togtataacc aacatgtccc tctaagaagc gtacgcaagt atgtcgccat acccaccgct 3480
 atttagtagg ccgaggtctc gttcgtaac ggaattaacc agacaaatca ctccaccaac 3540
 taagaacggc catgcaccac caccataga atcaagaaag agctctcaat ctgtcaatcc 3600
 tacctatgtc tggacctggt aagtttccc gtgttgagtc aaattaagcc gcaggctcca 3660
 ctctgtggtg tgccctcog tcaattcctt taagtttcag ccttgcgacc atactcccc 3720
 cggaacccaa agactttgat ttctcatgtg ctgctgcgag ggtccaatac aaacaccccg 3780
 caatcgcaag tggcatcgt ttacggtcta gactacgatg gtatctaata atcttcgatc 3840
 ccagacttt cgttcttgat taatgaaac atgcttggtta aatgccttgg ctgtagttog 3900
 tctttcggaa atccaagaat ttcacctcta gctcctaata acgaataccc ccaactgttc 3960
 ctattcatca ttactcagat gtgcaaacca acaaaatagc acccgagccc tatctgatca 4020
 tcccataata aacatccagg tcatacgacc tgcttggaa actctgcttt aattacagtg 4080
 aacgacgcca ctaaaaaaag aggcgaggat ggcagaggag ccgctcggca aacagagcgc 4140
 agtcgcgcaa agaccggggc tcccgccca gaaattcaac tacgagcttt ttaactgcaa 4200
 caactttagc atacgcttct ggagctgaa ttaccgcggc tgctggcacc agacttgccc 4260
 tocagttgat cctcgatgag ggttttacat tgctctcatt ccaatagcaa gacgcgaagc 4320
 gccccgatt gatatttctc gtcaactacct cgtggagtcc acattgggta atttacgcgc 4380
 ctgctgcctt ccttgatgt ggtagcgcgc tctcaggctc cctctccgga gtcgagccct 4440
 aactccccgt cacccttat agtcaccgta gtccaataca ctaccgtoga caactgatgg 4500
 ggcagaaact caaacgattc atcgtccaa acaagcgatc tgctcaatta tcatgactca 4560
 ccacttact tggcttcaac tctaataagt gcggccctcc cgaacagtcg ggcctcaga 4620

ES 2 678 997 T3

catgataaga tacattgatg agtttgaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaaaaatg 4680
 ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttga accattataa gctgcaataa 4740
 acaagtggg gtggggcgaag aactccagca tgagatcccc gcgctggagg atcatccagc 4800
 cggcgtcccc gaaaacgatt ccgaagccca acctttcata gaaggcggcg gtggaatcga 4860
 aatctcgtag cacgtgtag tctgctcct cggccacgaa gtgcacgcag ttgccggccg 4920
 ggtcgcgcag ggcgaactcc cgccccacg gctgctcgc gatctcggtc atggccggcc 4980
 cggaggcgtc ccggaagtcc gtggacacga cctccgacca ctcggcgtac agctcgtcca 5040
 gggcgcgcac ccacaccag gccagggtgt tgtccggcac cacctggtcc tggaccgcgc 5100
 tgatgaacag ggtcacgtcg tcccggacca caccggcga gtcgtcctcc acgaagtccc 5160
 gggagaacct gagccggtcg gtccagaact cgaccgctcc ggcgacgtcg cgcgcggtga 5220
 gcaccggaac ggcactggtc aacttgcca tcttgcttg ttggcgttag gagcgggcgg 5280
 aagacttggg ctcgggggag gcgaggagc caaggaagc ggggtagaac ggcgtgtgt 5340
 taggcacgac cgtctgaagg ctgattcggg tttgctctgg atgagcggg ttttgcttg 5400
 atccccgcgc caaacgcgtg tgccgcgcca gtgggttgc gctcctagt ccctctctg 5460
 gccccagtgt gccgtcgtaa tttccttctc gcgccttatt gcgcccaggt cccacgtcg 5520
 ccagtgyaaa tgggggtgac gtccgttgc gcatgagggc tagcataaac tttgggttg 5580
 gaagacggcg aaaagtggc ttcagtggag tgagggggtg aaagtccact ctgtgcgggt 5640
 aaaagtggac ggtcgtccct cacagcccag aggtgctgca aaatcggcgt gcaacggcca 5700
 atccgatttt agcgcgcggt tggtcgcaat ggcgtgaaac ggctcgttc gcagccgca 5760
 accaaagggg ccgagggggt caagacgccc gcgcgcgatg acatggacgc cgaactccagc 5820
 aagcgcgcgc cgggctctgg gaagaagaga tctgcgcacg ctaaggaagg gcacgcgagg 5880
 gaggcacaga tgatctggcc tggcaagaat gaatgaatcc aacattgga aaagaatgcg 5940
 ggacggacgg ttggcacgct cgcggctgcg ccttgaacgg ccgctcgcgg acaaaagtta 6000
 tttttcccg tggaccggc agcgaccgtg acggtttggg accgaggctg ccaagcgcga 6060
 tgcgctcggg ctgggagcag tcagacgtgc agtgttcttt acaaaatcta ctacgagttg 6120
 gttgtgagca aagccgggg cggaatggt cttgcgcaca gacgcgtct catgttggga 6180
 aaccaagcga tctggccgac gcagttcga atccaatgct tccgcagcgc aatggatggc 6240
 caaggagac aggccaagct tggcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa 6300
 ccctggcgtt acccaacta atgccttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa 6360
 tagcgaagag gcccgaccg atcgccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg 6420
 gcgcctgatg cggatatttc tcttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg 6480

ES 2 678 997 T3

	tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgccca	6540
	acacccgctg acgcgcocctg acgggcttgt ctgctccccg catccgctta cagacaagct	6600
	gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggtttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg	6660
	a	6661
5	<210> 63 <211> 85 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 63	
	ttatacgcgt ggacatatgg cagcatgcgc ttcgcgagtt ttcgaagggg gatcctaaca	60
	cgtgctacga gatttcgatt ccacc	85
15	<210> 64 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 64	
25	atatccaocg gtaccggtac cgccactagt ctggccatg gogtgccctgc gctgctggc	59
30	<210> 65 <211> 3670 <212> ADN <213> <i>Thraustochytrium</i> sp. <400> 65	
	gacgaaaggg cctcgtgata ogcctatddd tataggttaa tgtcatgata ataatggttt	60
	cttagacgctc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgcg aacocctatt tgtttatddd	120
	tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat	180
	aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtogccctt attcctddd	240
	ttgcggcatt ttgccttccct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg	300
	ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga	360
	tccttgagag ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gaggactddd aaagttctgc	420
	tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg ccgccatac	480
	actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg	540
	gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgoggcca	600
	acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttddddg cacaacatgg	660

ES 2 678 997 T3

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
 gagccggatga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggocagat ggtaagccct 960
 cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
 agatocgtga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagttact 1080
 catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
 tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
 cagaccccgat agaaaagatc aaaggatcct cttagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
 gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccc gatcaagagc 1320
 taccaactct ttttcogaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
 ttctagtgtg gcgtagtga ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccc cctacatacc 1440
 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
 ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt 1560
 cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
 agcattgaga aagcgcacag cttcccgaag ggagaaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc 1680
 gcagggctcg aacaggagag cgcacgagg agcttccagg gggaaacgcc tggatcctt 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 tataccgcc cttccgctct ccttttcttt tttgctcgtc 2040
 tggatgccag actaaggagt ccttgctcct ctgcgcaagg ctgctcaacc agagtctctg 2100
 cctgtggttg agcgcaccac aacaggttaa agcgaaccag ggccgccccg ttgccgctgc 2160
 gatgtcgtct ctcttgcgag actcttcatt agatcggcgg aatgctgccg caggactgac 2220
 cgctcttcg ttcgttcgtt tgtacgcgag cgggtgcgagc ggcttcggtg ttggcagata 2280
 ggcagaacgc gagcagttca cgtttctttg cagctttatc taccgcaaa ttgcctcag 2340
 cgtctgcaac tttccggtga ggacagcaga gctgcagttc tgatcgtctc catcttttgg 2400
 agcgcctgct gacgtcccc agctcgtctc cgtctccctt ggagtggagc gtctctttca 2460
 cagtgcctgg gtgcggccat ttccctaaat aggttgcgca gccgagtttc cttaaacgtg 2520
 cctggtcgcg gtgcttcgcg ctactacct gaacgcgcag tagctcggcg cgtgccgctt 2580

ES 2 678 997 T3

taaggcgggc ggggtggctg ctcttgctta cgccaggcgc gtacgtcagc agcgccggcg 2640
 ccatgctgcc catagcggcc acagaatcgt aggcgctgca atcggaact gccaaagatgg 2700
 caatcgagac gatccccaa 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 gaagggggat octaacacgt gctacgagat ttogattcca ccgcccctt 3000
 ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tctccagcg 3060
 cgggatctc atgctggagt tcttcgcca cccaacttg tttattgcag cttataatgg 3120
 ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaataaa gcattttttt cactgcattc 3180
 tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgaattc ccggggatcc 3240
 tctagagtgc acctgcaggc atgcaagctt ggcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga 3300
 ctgggaaaac cctggcgtta cccaacttaa togccttgca gcacatcccc ctttcgccag 3360
 ctggcgtaat agcgaagagg ccgcaccga togcccttcc caacagttgc gcagcctgaa 3420
 tggcgaatgg cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggtg tttcacaccg 3480
 catatatggt gcaactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagccccga 3540
 caccgccaa caccgctga cgcgcctga cgggcttgc tgctcccggc atccgcttac 3600
 agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcacaccg 3660
 aaacgcgcga 3670

- 5 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 66
 ggccaagttg accagtgccg 20
- 15 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 67
 cagtctctct cctcggccac 20
- 25 <210> 68
 <211> 1724
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 678 997 T3

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 68

5

```

dgtagtcata cgctcgtctc aaagattaag ccatgcatgt gtaagtataa gcgattatac      60
tgtgagactg ogaacggctc attatatacag ttatgatttc ttcggtatth tctttatatg      120
gatacctgca gtaattctgg aattaataca tgctgagagg gcccgactgt tcgggagggc      180
cgcaacttatt agagttgaag ccaagtaaga tggtagtca tgataattga gcagatcgct      240
tgthtgagc gatgaatcgt ttgagthct gccccatcag ttgtcgacgg tagtgattg      300
gactacggtg actataacgg gtgacgggga gttagggtc gactccggag agggagcctg      360
agagacggct accacatcca aggaaggcag caggcgcgta aattaccaa tgtggactcc      420
acgaggtagt gacgagaaat atcaatcggg ggocctcgc gtcttgctat tggaaatgaga      480
gcaatgtaaa accctcatcg aggatcaact ggaggcaag tctggtgca gcagccggg      540
taattccagc tccagaagcg tatgctaaag ttgttgacgt taaaaagctc gtagttgaat      600
ttctggggcg ggagccccgg tctttgcgag actcgcctct gttgcogag cggctcctct      660
gccatcctcg cctctthttt tagtgcgctc gttcactgta attaaagcag agtgthcaa      720
gcaggtcgta tgacctgat gthtattatg ggatgatcag atagggtcag ggtgctatth      780
tgthgthtg cacatctgag taatgatgaa taggaacagt tgggggtatt cgtatthagg      840
agctagaggt gaaattcttg gatttcgaa agacgaacta cagcgaaggc attaccaag      900
catgthttca ttaatcaaga acgaaagtct ggggatcga gatgattaga taccatgta      960
gtctagaccg taaacgatgc cgaactgcga ttgcgggtg thtgattgg accctcgcag      1020
cagcacatga gaaatcaaag tctthggth cgggggggag tatggtcga aggtgaaac      1080
ttaaaggaat tgacggaagg gcaccaccag gagtggagcc tgcgcttaa thtgactcaa      1140
cacgggaaaa cthaccaggt ccagacatag gtaggattga cagattgaga gctctthct      1200
gattctatgg tggtggtgc atggccttc thagthgtg gagtgattg tctgthtaat      1260
tccgthaacg aacgagacct cggcctacta aatagcgtg ggtatggcga catactgcg      1320
tacgctctct agaggacat gthcgtata cgagcaggaa gthcaggca ataacaggtc      1380
tgtgatgcc thagatgthc tggccgcac gcgcctaca ctgatggth caacgggtg      1440
tcatcgtht tcgcagcag gtgctthgc ggaaggcatg gcaaatcct tcaacgcca      1500
tcgtgctgg gctagattht tgcaattatt aatctcaac gaggaatcc tagtaaacgc      1560
aagtcacag cthgcatgata atagctcct gccctthgta cacaccgcc gtgcacct      1620

ccgattgaac ggtccgatga aacctggga tgaccttht agcgtthgt cgcgagggg      1680
gtcagaactc gggthaatct thtgthtag aggaaggth agtc      1724

```

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende el promotor de un gen de *Thraustochytrium* que comprende una secuencia nucleotídica idéntica en al menos un 80 % a la SEQ ID NO: 10, y el terminador de un gen de *Thraustochytrium*.
5
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la secuencia nucleotídica del terminador es idéntica en al menos un 80 % a la SEQ ID NO: 14.
- 10 3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la secuencia nucleotídica del terminador es idéntica en al menos un 80 % a la SEQ ID NO: 18.
4. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una secuencia heteróloga unida operativamente al promotor del gen de *Thraustochytrium* y al terminador del gen de
15 *Thraustochytrium*.
5. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 4, en la que la molécula de ácido nucleico comprende adicionalmente un gen de resistencia a zeocina.
- 20 6. Una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4 o 5.
7. La célula de la reivindicación 6, en la que la célula hospedadora es una célula de *Thraustochytrium*.
8. La célula de la reivindicación 7, en la que la célula de *Thraustochytrium* contiene adicionalmente una o más
25 modificaciones en uno o más genes que codifican un polipéptido enzimático o parte de un complejo de polipéptidos enzimáticos implicados en la vía biosintética de AGPI de *Thraustochytrium*.
9. La célula de la reivindicación 8, en la que la célula produce al menos un AGPI a un nivel superior en al menos un 36 % a una célula de *Thraustochytrium* no modificada por ingeniería genética cuando se cultivan en condiciones
30 comparables.
10. La célula de la reivindicación 8, en la que el polipéptido enzimático o complejos de polipéptidos enzimáticos se seleccionan de entre el grupo que consiste en ácido graso sintasa (FAS), $\Delta 5$ elongasa, $\Delta 12$ elongasa, $\Delta 4$ desaturasa, policétido AGPI sintasa (PKS), $\Delta 9$ desaturasa y omega-3 desaturasa.
35
11. Un método para proporcionar un AGPI, comprendiendo el método:
proporcionar una célula de *Thraustochytrium* que está modificada en comparación con una célula de
40 *Thraustochytrium* de referencia en que la célula modificada contiene al menos un promotor de *Thraustochytrium* que comprende una secuencia nucleotídica idéntica en al menos un 80 % a la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 10 y al menos un terminador de célula de *Thraustochytrium* que comprende una secuencia nucleotídica idéntica en al menos un 80 % a la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 18 y, opcionalmente, 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
45 cultivar la célula de *Thraustochytrium* modificada en condiciones y durante un tiempo suficiente para conseguir la producción de los uno o más AGPI.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la célula de *Thraustochytrium* modificada contiene al menos un polipéptido heterólogo expresado, en el que el al menos un polipéptido heterólogo se expresa a partir de un gen que
50 está unido operativamente al promotor de un gen de *Thraustochytrium*, el terminador de *Thraustochytrium* o ambos.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el al menos un polipéptido heterólogo comprende al menos un polipéptido de biosíntesis de AGPI heterólogo y, opcionalmente, en el que la modificación genética comprende al menos una mutación de nucleótidos que aumenta la expresión o actividad de un polipéptido de biosíntesis de AGPI
55 endógeno o heterólogo.
14. El método de la reivindicación 11, en el que el promotor de *Thraustochytrium* comprende una secuencia nucleotídica idéntica en al menos un 80 % a la SEQ ID NO: 10 y el terminador de *Thraustochytrium* comprende una secuencia nucleotídica idéntica en al menos un 80 % a la SEQ ID NO: 18.
60

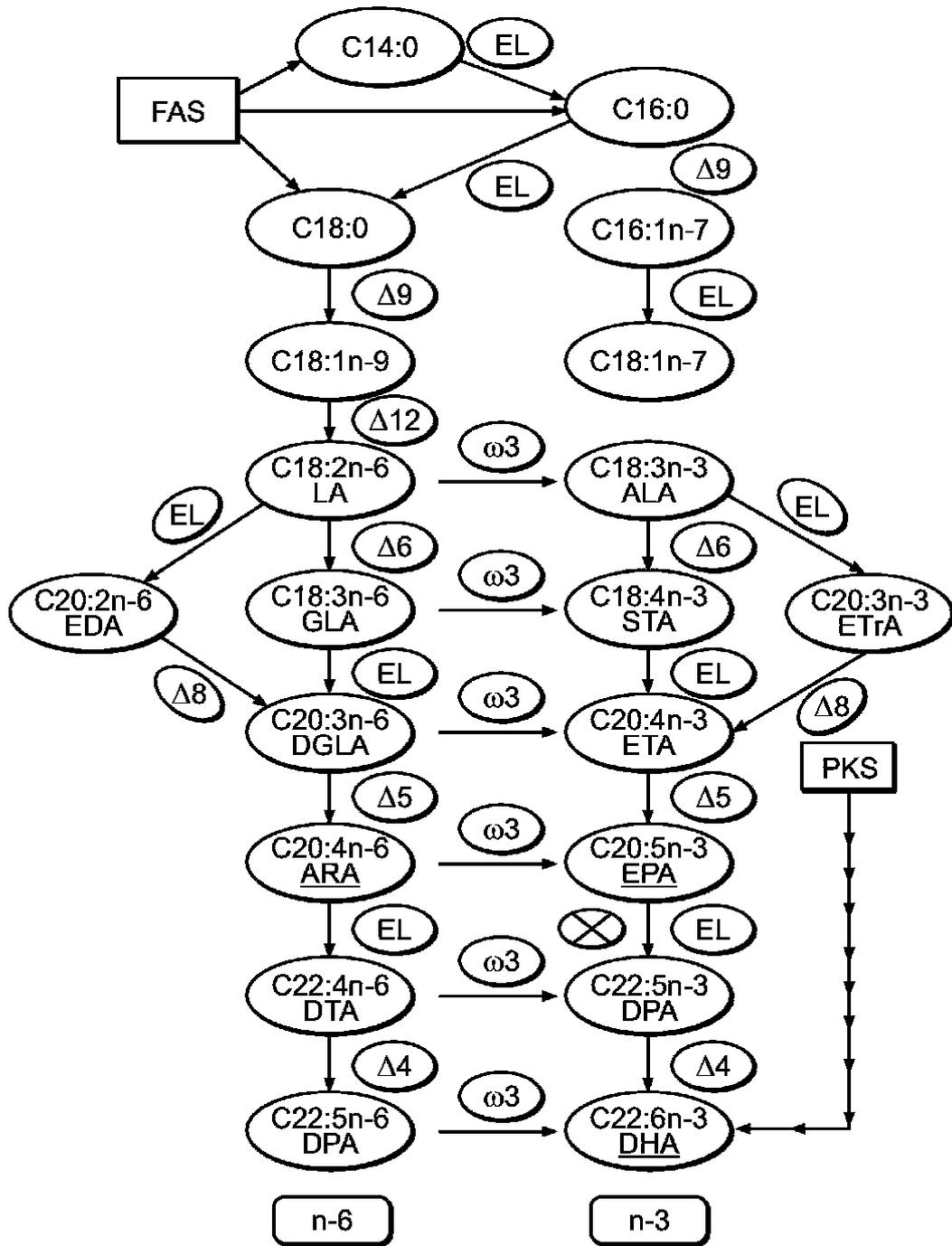


FIG. 1

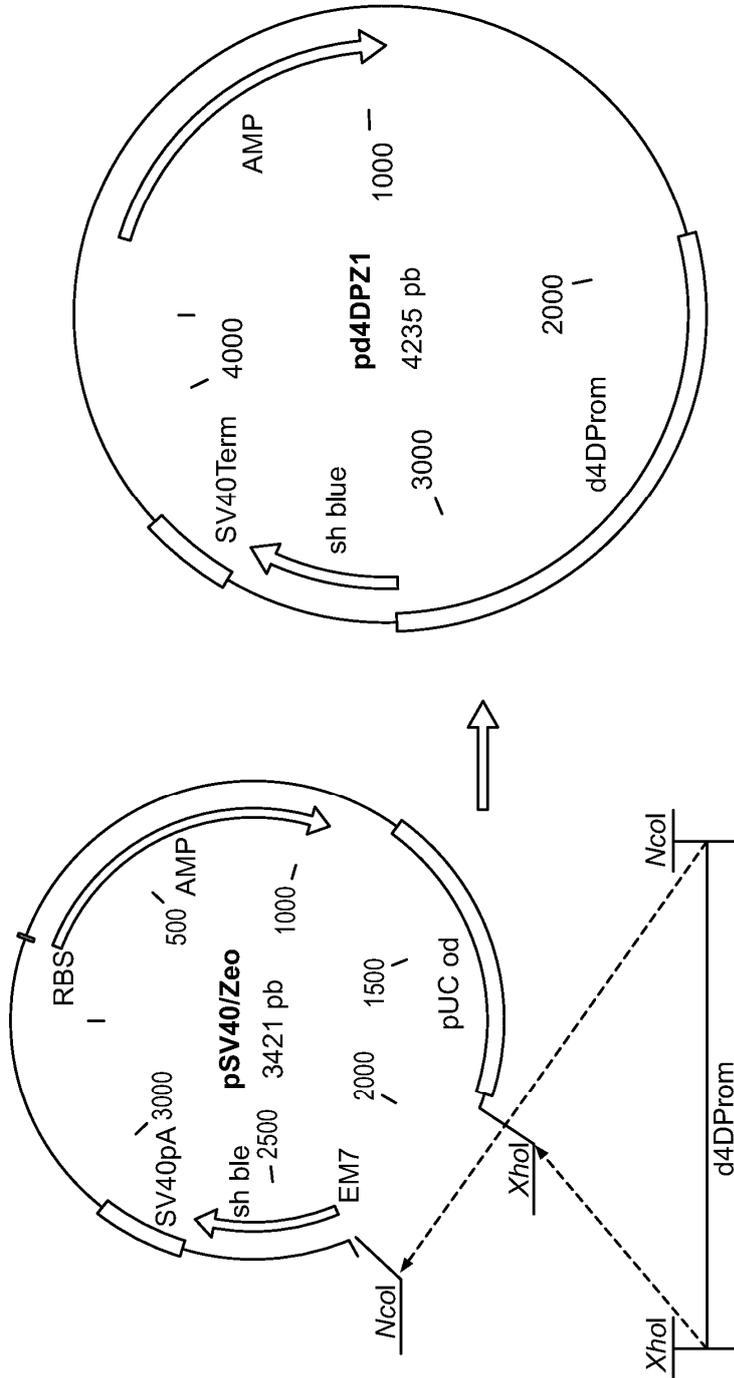


FIG. 2

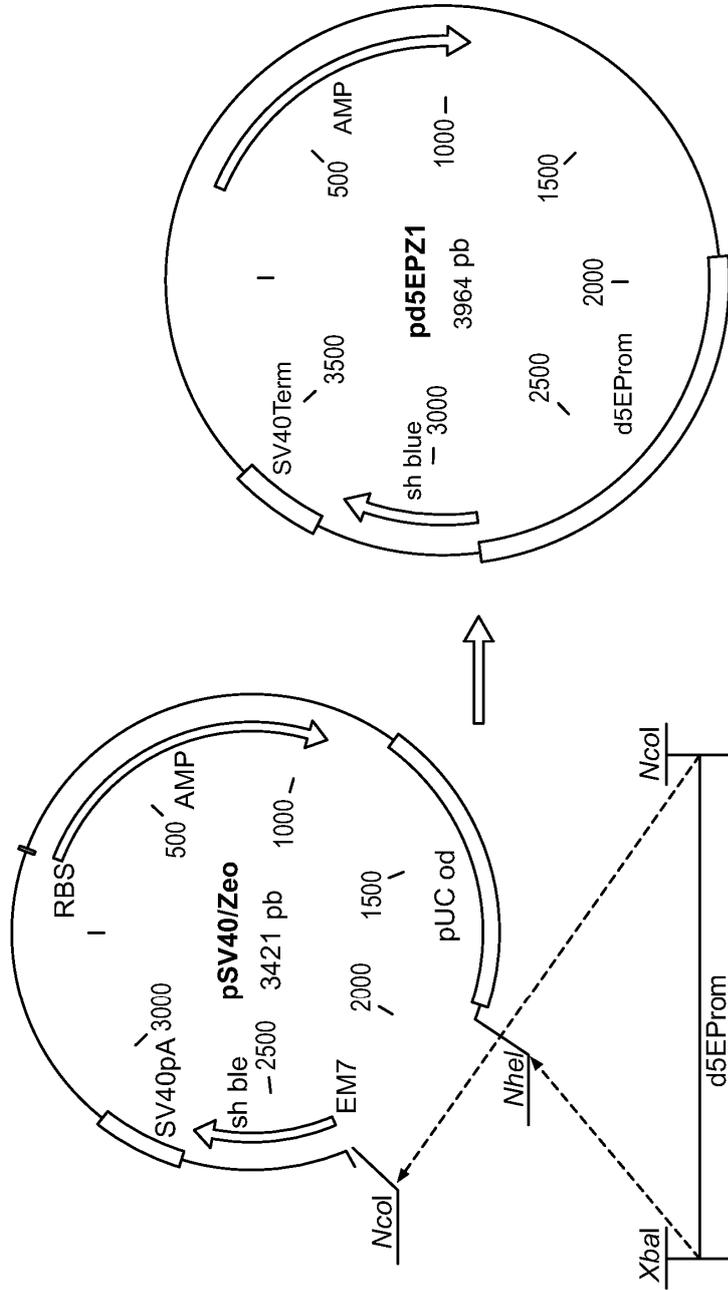


FIG. 3

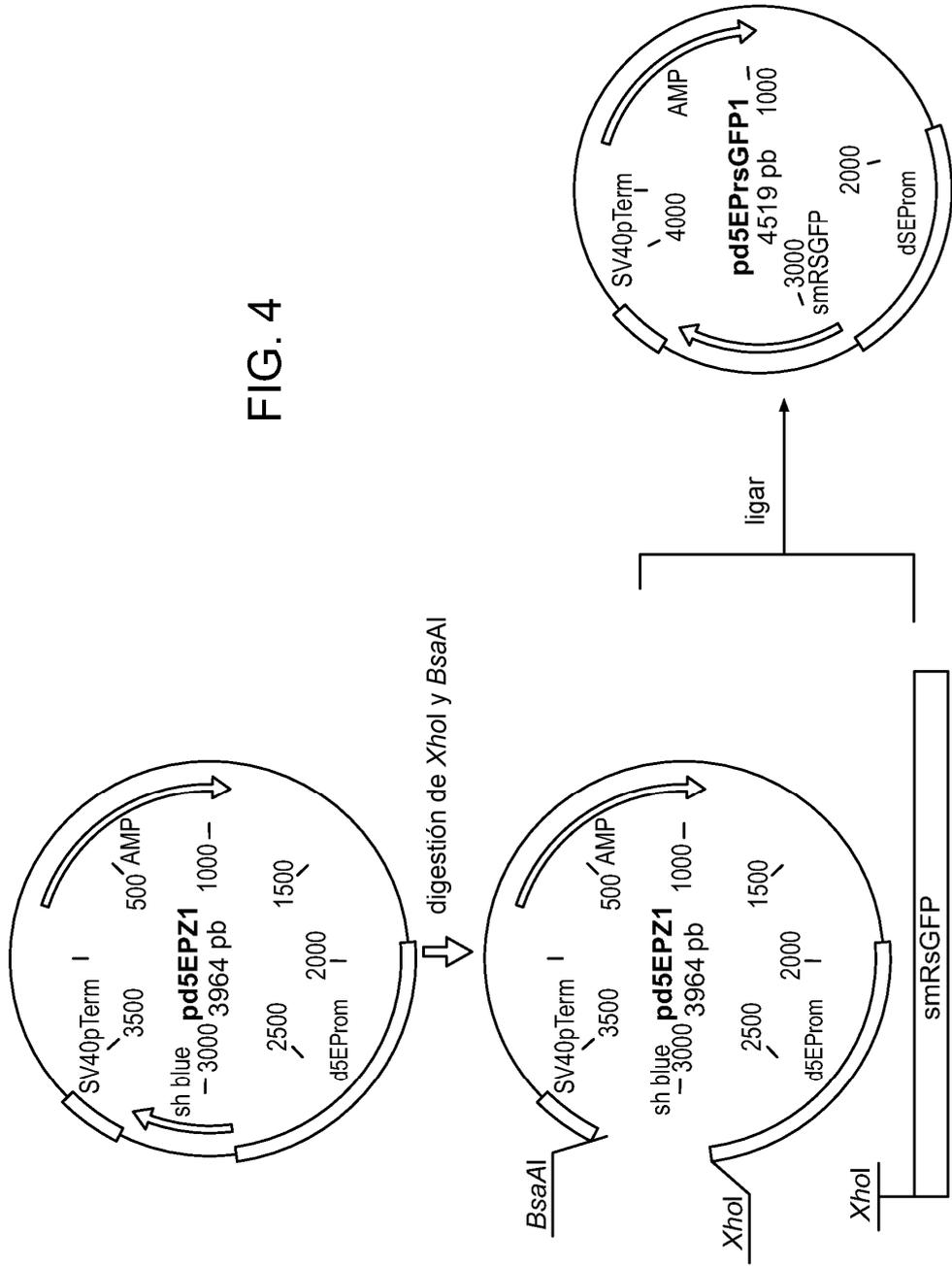


FIG. 4

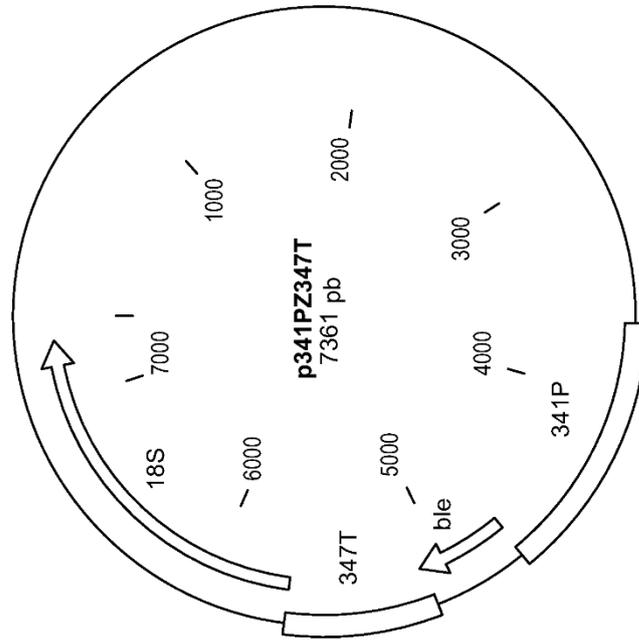


FIG. 6

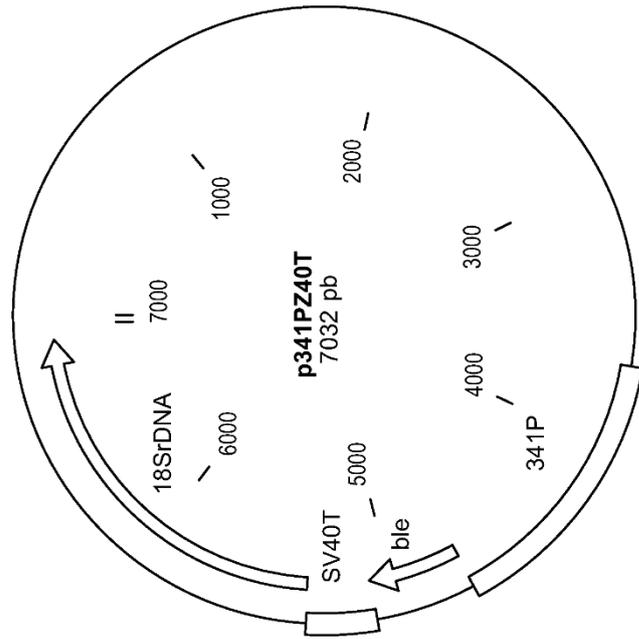


FIG. 5

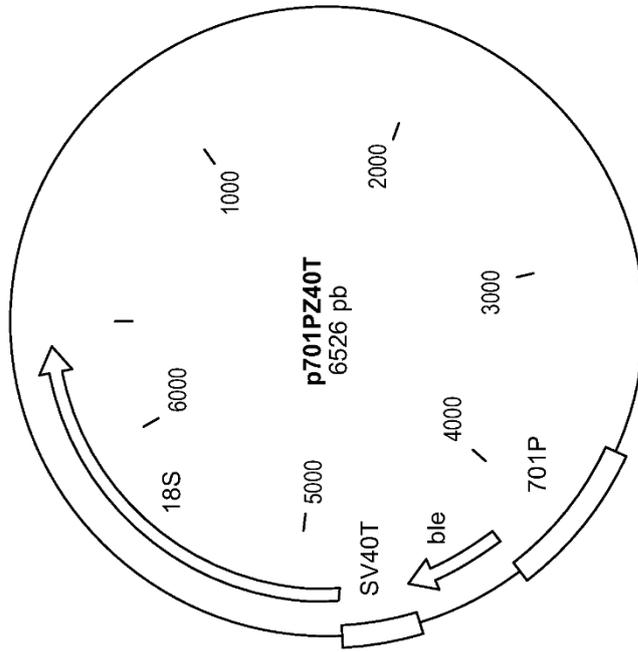


FIG. 8

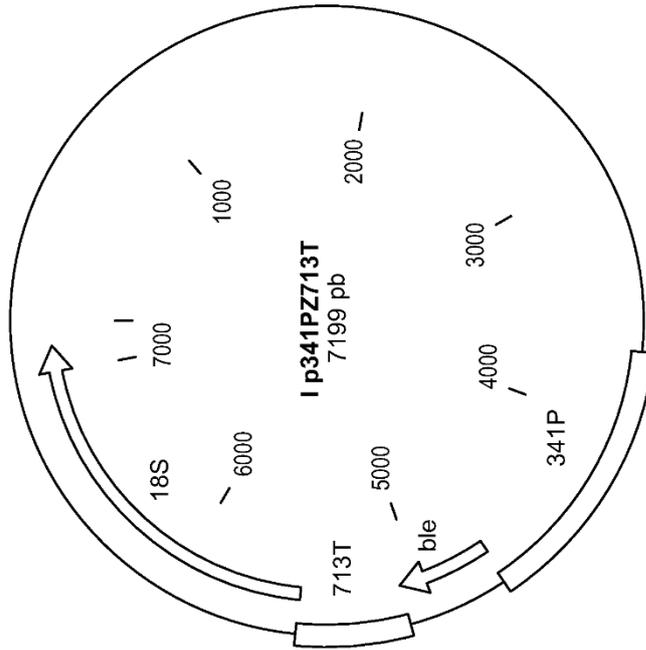


FIG. 7

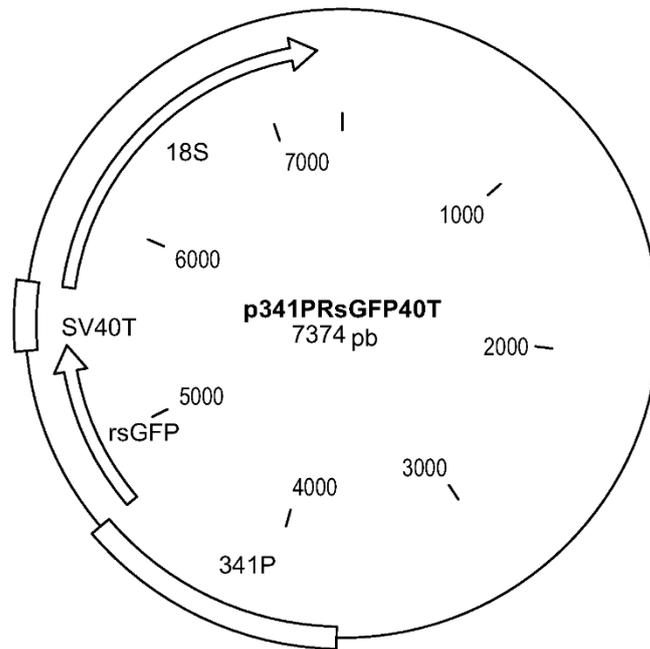
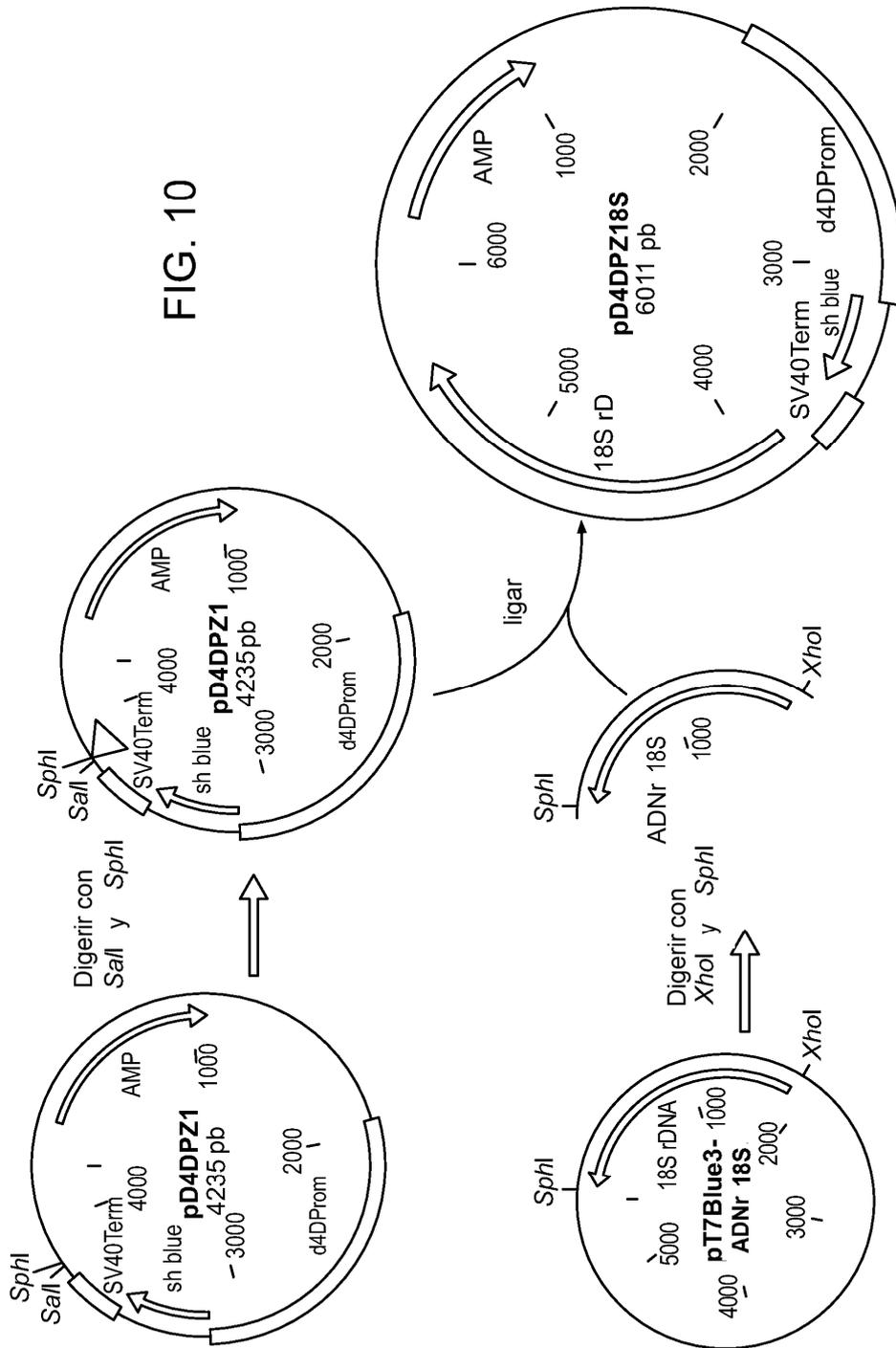


FIG. 9

FIG. 10



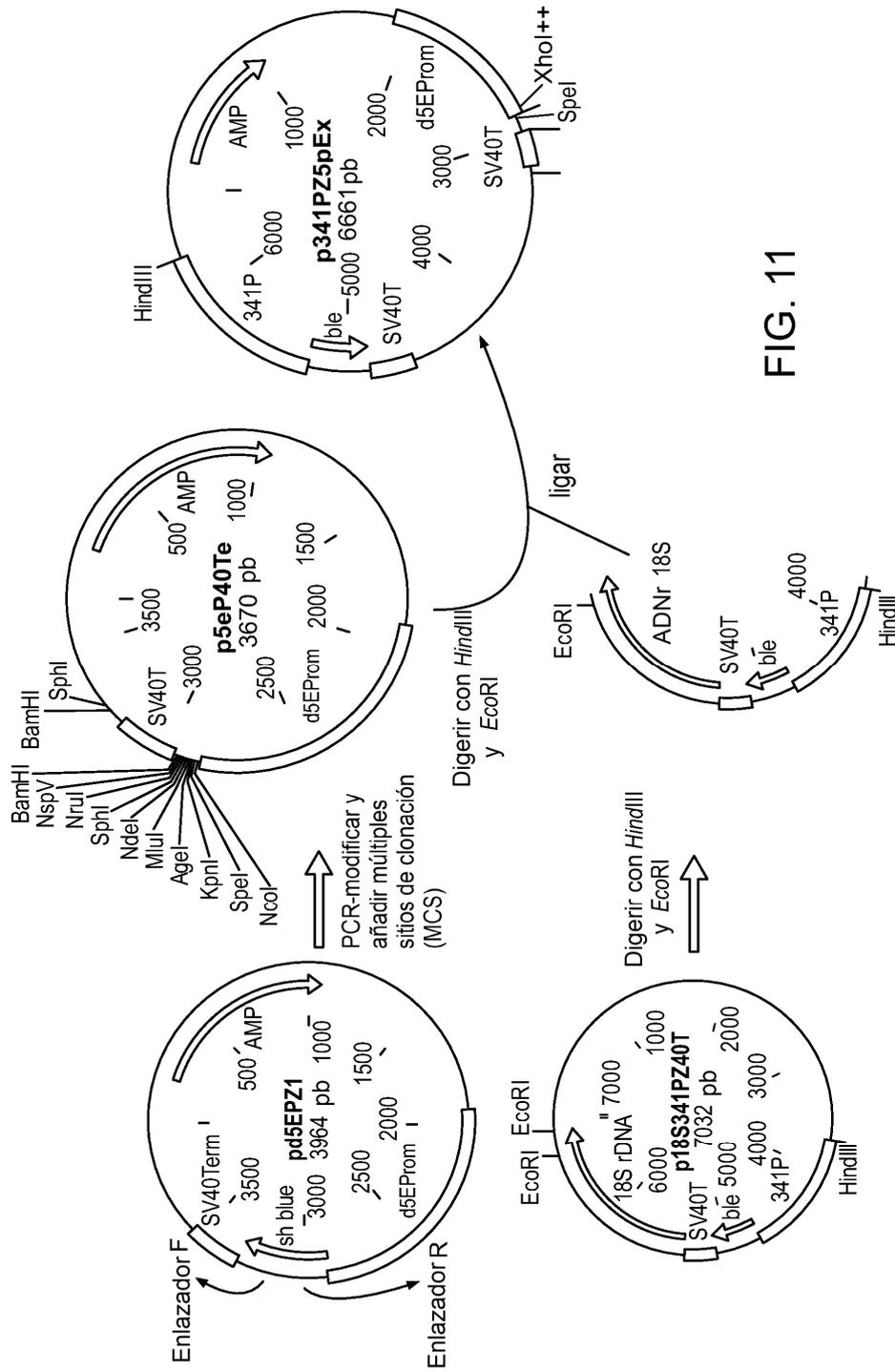


FIG. 11

Tasa de crecimiento con varias concentraciones de sal y zeocina

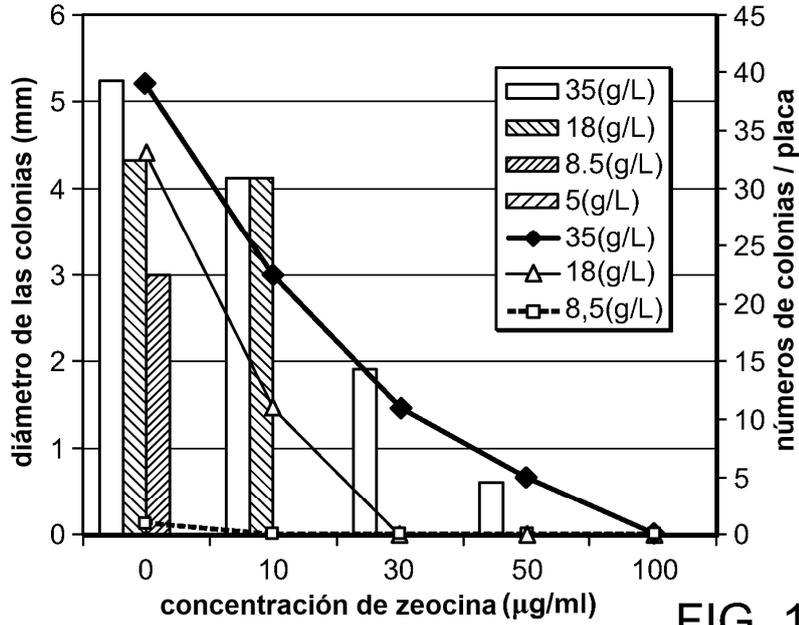


FIG. 12

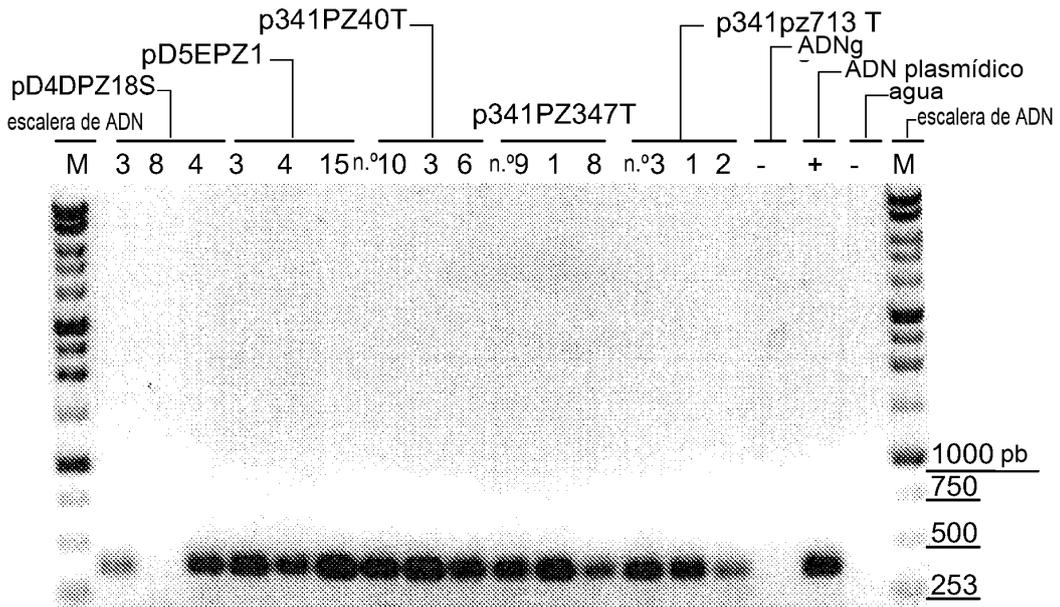


FIG. 13

FIG. 14A	FIG. 14B
----------	----------

FIG. 14

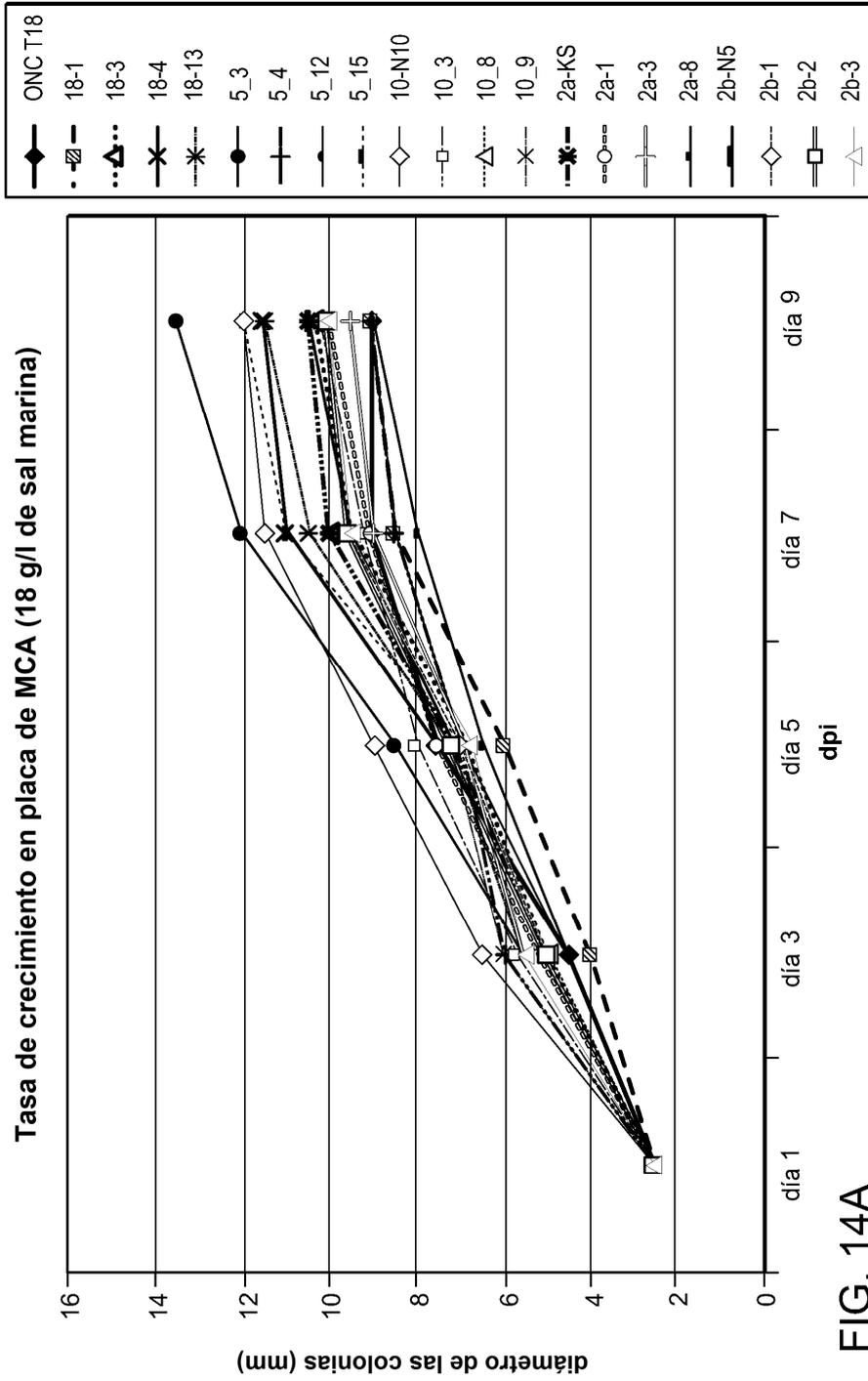


FIG. 14A

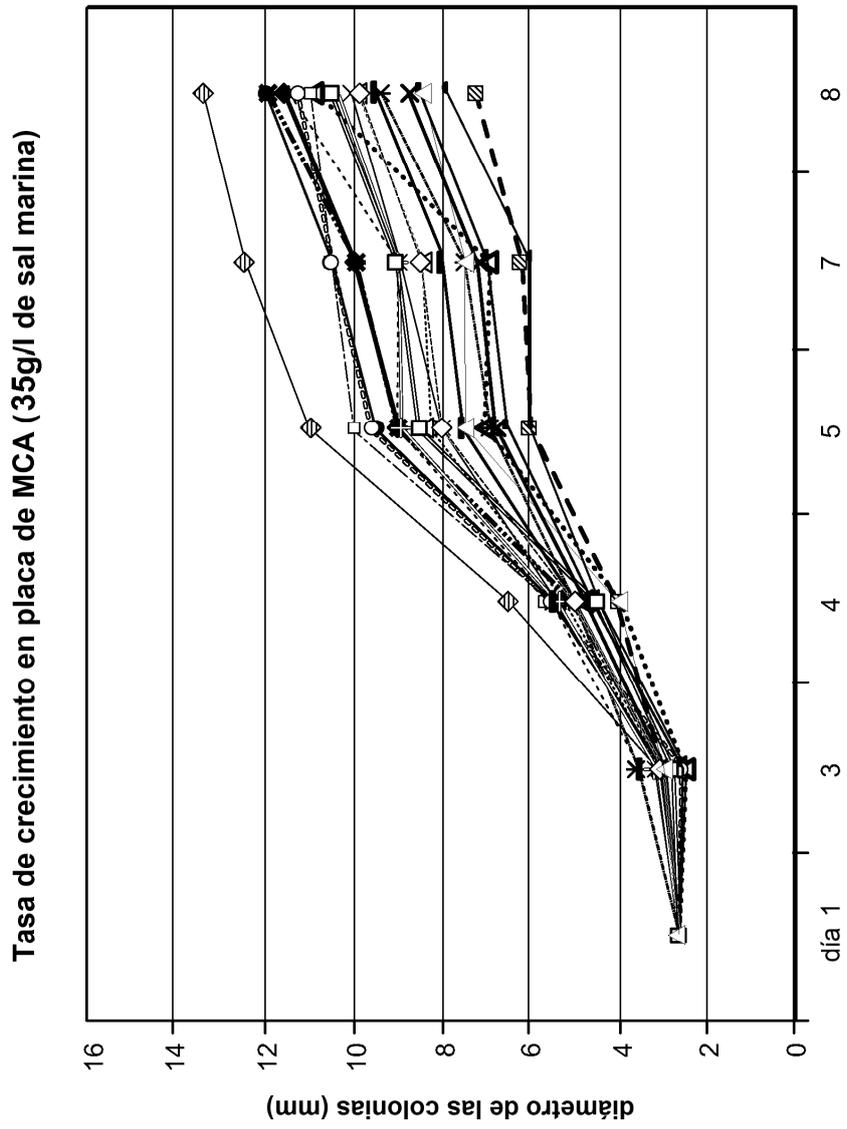
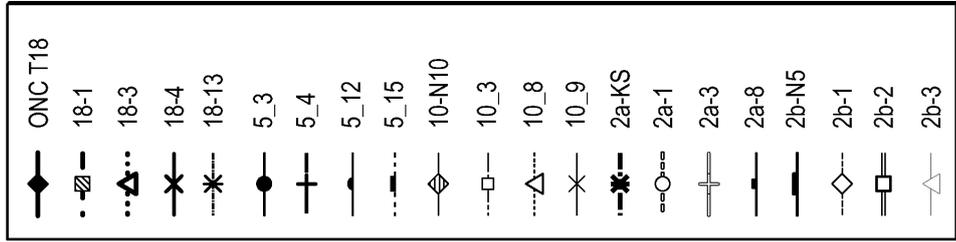


FIG. 14B

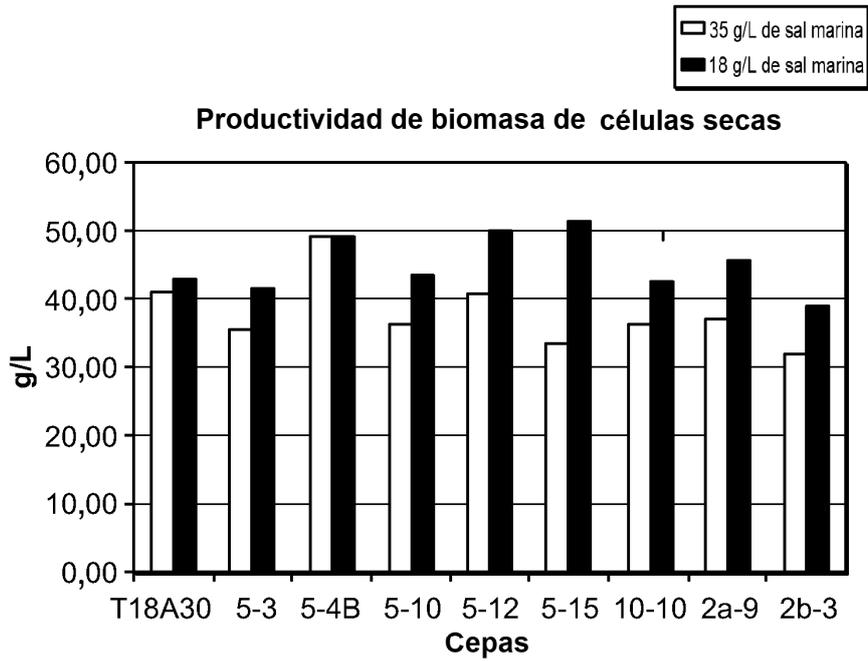


FIG. 16

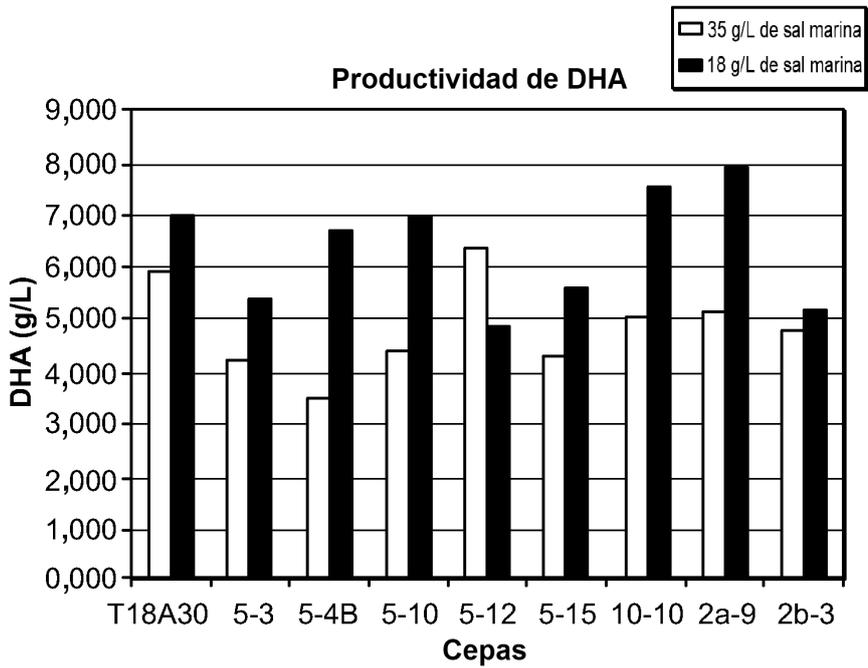


FIG. 17A

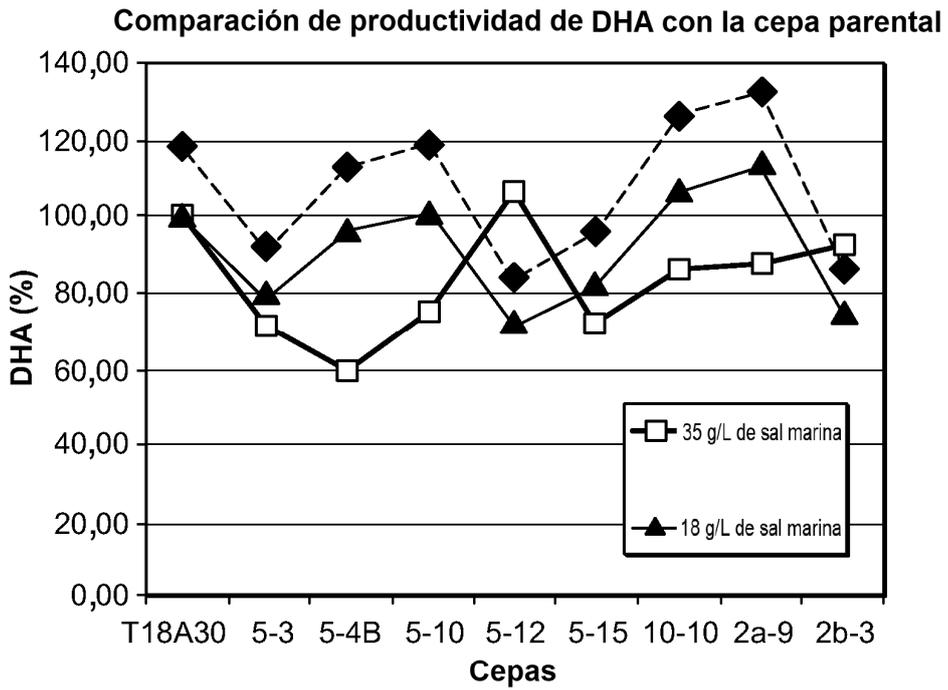


FIG. 17B

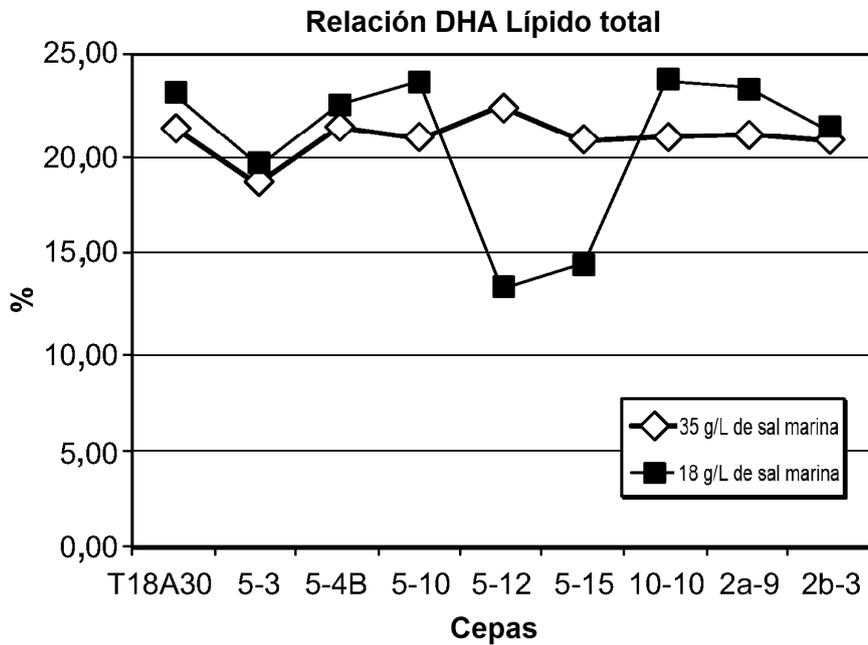


FIG. 17C

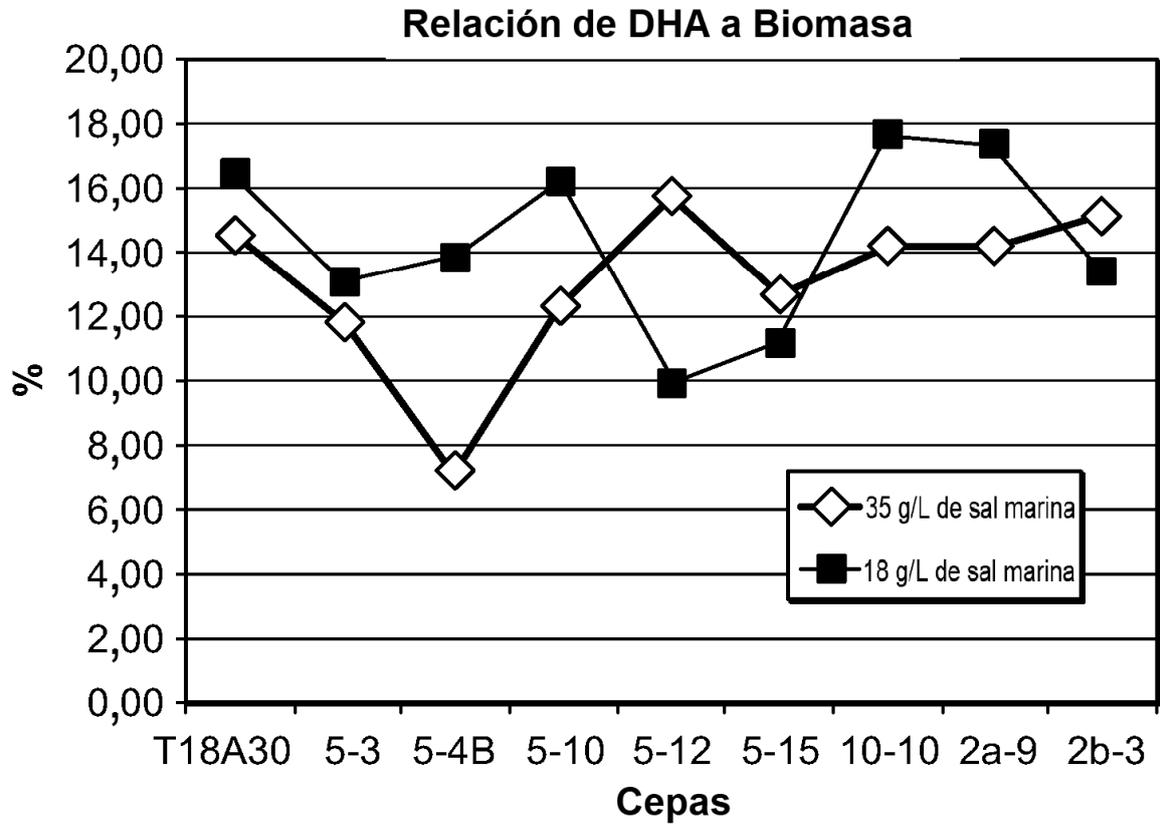


FIG. 17D

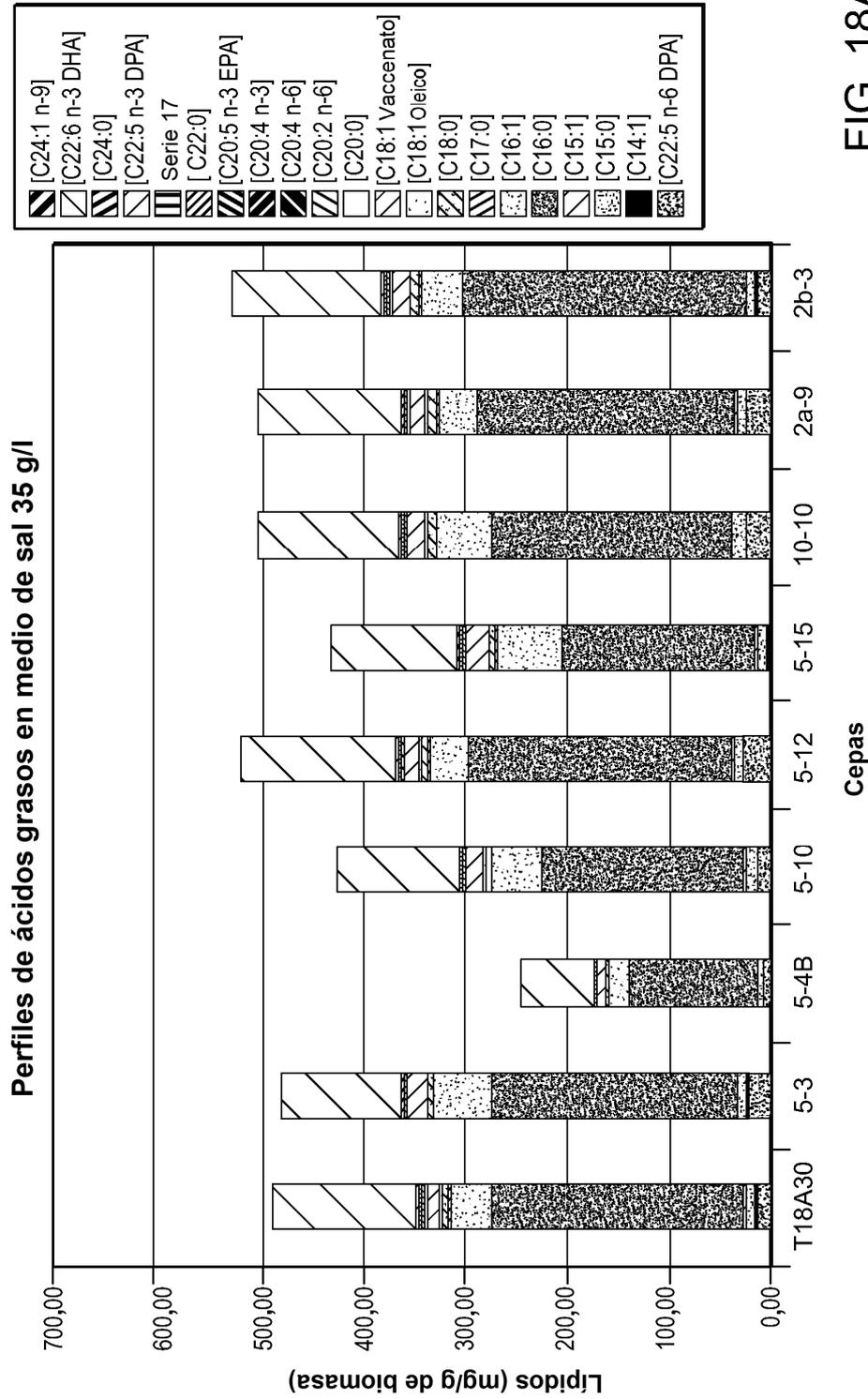


FIG. 18A

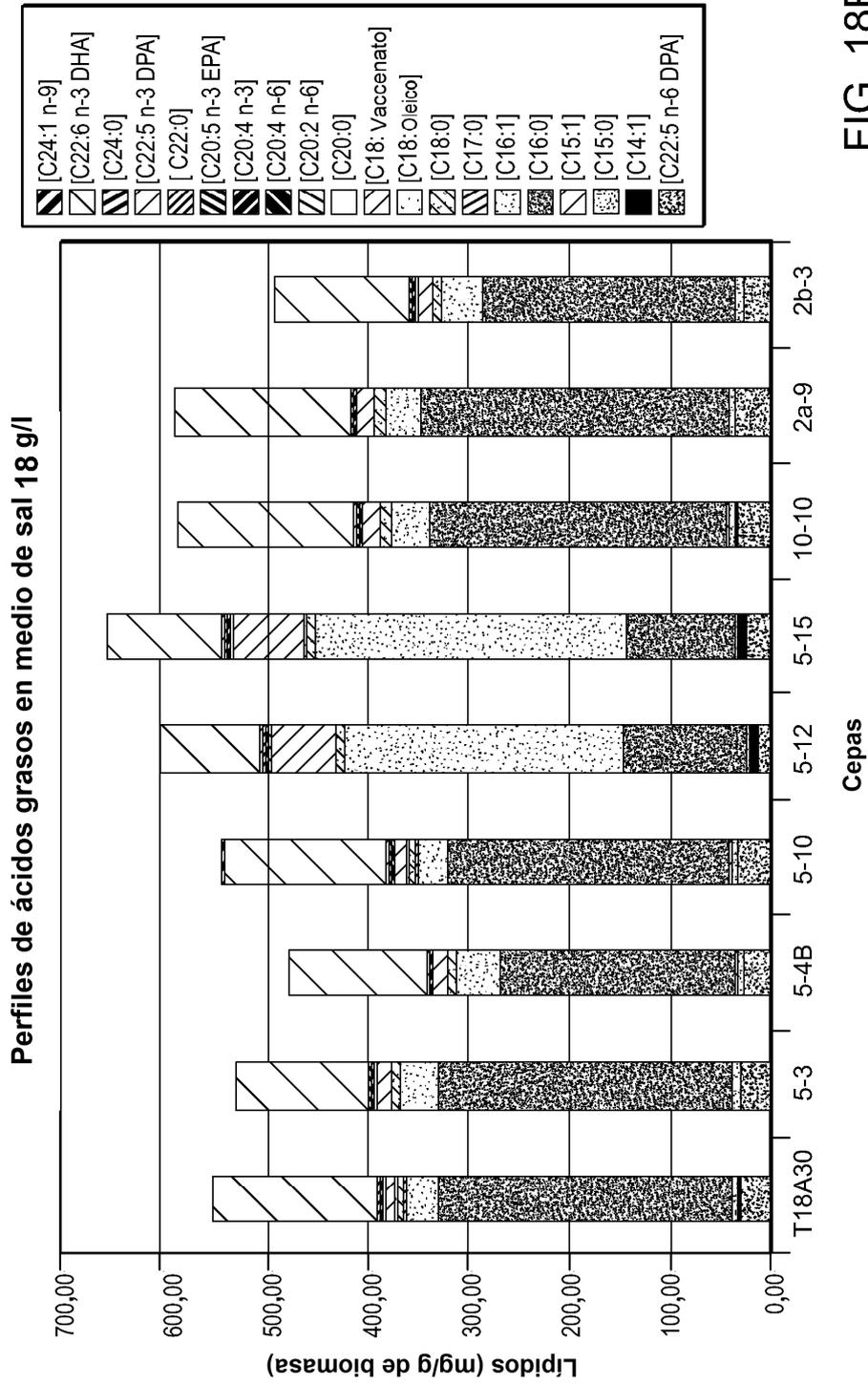


FIG. 18B

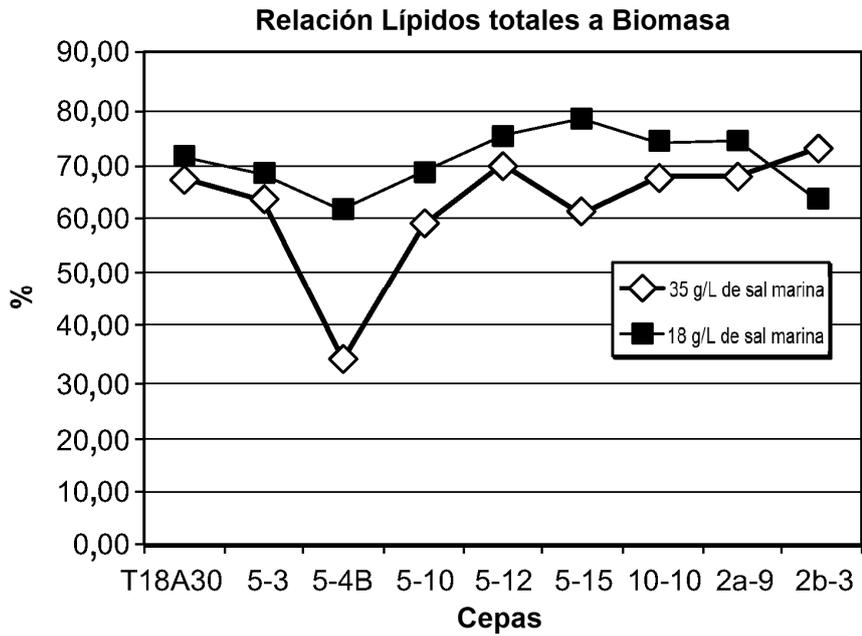


FIG. 18C

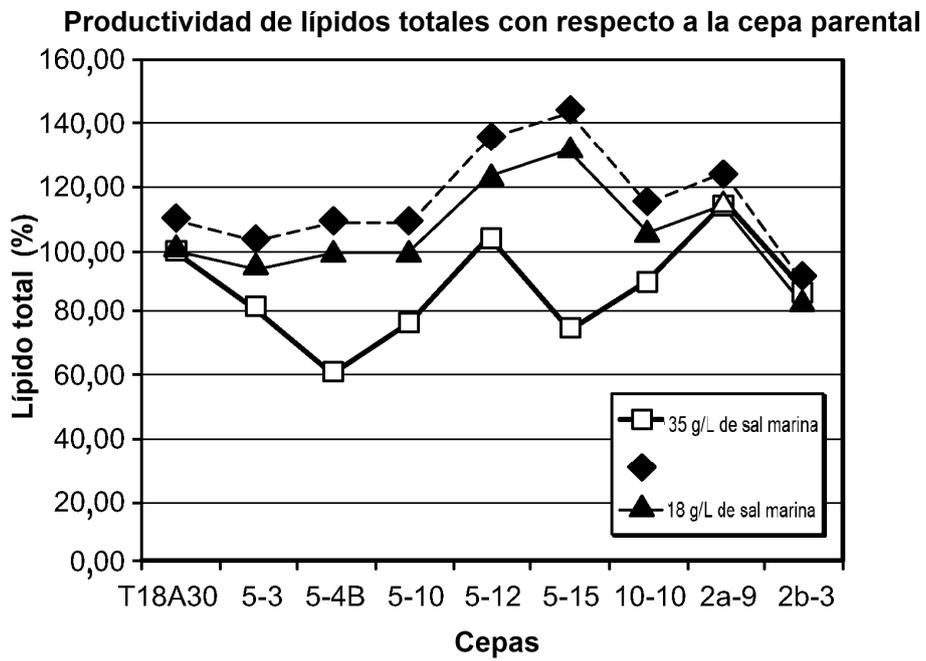


FIG. 18D

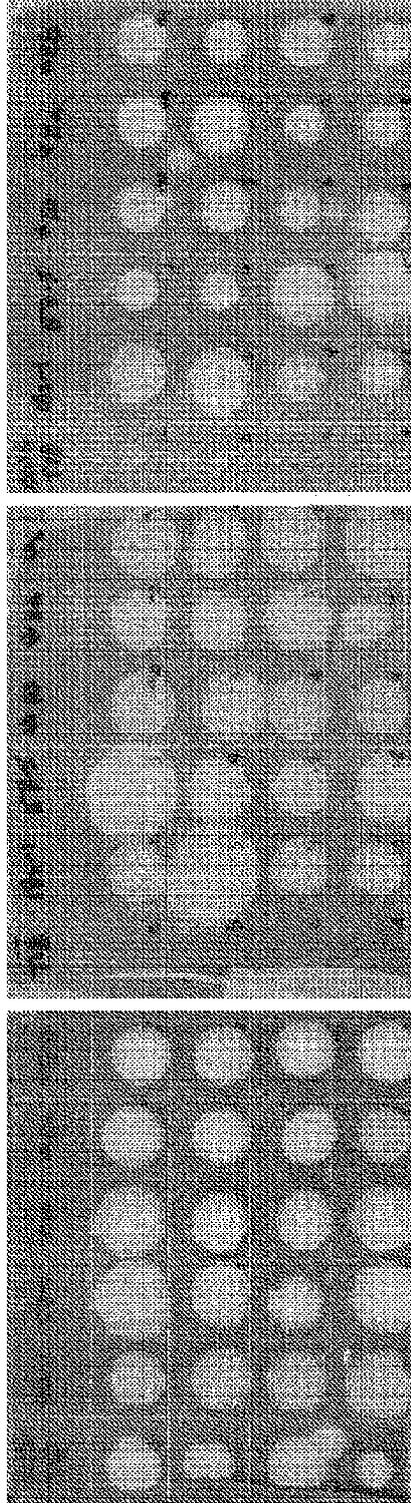


FIG. 19

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 pueden 5 excluirse errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la divulgación

- 10 • WO IB2006003977 • US 5340742 A
 • US 20090117194 A • US 6607900 B
 • US 20090117194 A1 • WO 1B2007004553 A

Literatura diferente de patentes citada en la divulgación

- 15 • **CARMONA et al.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003, vol. 67 (4), 884-888
 • **SMITH; WATERMAN.** *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482
 • **NEEDLEMAN; WUNSCH.** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443
 • **PEARSON; LIPMAN.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1988, vol. 85, 2444
 20 • Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
 • Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, 1998
 • **UMEZAWA et al.** *New antibiotics, bleomycin A and B. Journal of Antibiot.*, 1966, vol. 19, 200-209
 • **SIKIC et al.** *Bleomycin Chemotherapy.* Academic Press, 1985
 • **POVIRK et al.** *Nucleic Acids Research*, 1977, vol. 4, 3573-3580
 25 • **SANFORD et al.** *Part. Sci. Technol.*, 1987, vol. 5, 27
 • **SANFORD, J. C.** *Trends Biotech.*, 1988, vol. 6, 299
 • **SANFORD, J. C.** *Physiol. Plant*, 1990, vol. 79, 206
 • **KLEIN et al.** *Biotechnology*, 1992, vol. 10, 268
 • **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
 30 • **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
 • **DUMAS et al.** *The three-dimensional structure of a bleomycin resistance protein. EMBO J.*, 1994, vol. 242 (5), 595-601
 35 • **GATIGNOL et al.** *Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. FEBS Letters*, 1988, vol. 230, 171-175
 • **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
 • **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
 40 • **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
 • **JEPSON et al.** *Pesticide Science*, 1998, vol. 54 (4), 360-367
 • **LEONARD, A.; PEREIRA, S.; SPRECHER, H.; HUANG, Y.-S.** *Elongation of long-chain fatty acids. Progress in Lipid Research*, 2004, vol. 43, 36-54
 45 • **LI et al.** *Plant Sciences*, 2005, vol. 169 (3), 463-469
 • **PARK; MORSCHHÄUSER.** *Eukaryotic cell*, 2005, vol. 4 (8), 1328-1342
 • **RAGHUKUMAR S.** *Thraustochytrid Marine Protists: Production of PUFAs and Other Emerging Technologies. Mar. Biotech.*, 2008, vol. 10, 631-640
 • **ZHANG, S. C.; WEGE, C.; JESKE, H.** *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*, 2001, vol. 290 (2), 249-60