

Настоящее изобретение относится к трансформации эукариотических клеток, в частности растительных клеток, экзогенной ДНК, а также к получению трансгенных организмов, тканей и культур из таких клеток.

Было разработано несколько методов интродукции молекул экзогенной ДНК в растительные клетки, что позволяет использовать общезвестные преимущества применения метода рекомбинантной ДНК для получения трансгенных растений. Эти методы включают использование модифицированных биологических систем, таких как опосредуемый *Agrobacterium* перенос Т-ДНК в растительные клетки, и физических небиологических систем, таких как электропорация, микропинъекция, опосредуемое фосфатом кальция или полиэтиленгликолем (ПЭГ) поглощение ДНК или слияние клеток и бомбардировка микроснарядами (общий обзор методов и некоторые конкретные данные см., например, в разделах 2 и 3 "Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory Manual", ред. Draper J. и др., изд. Blackwell Scientific Publications (1988); см. также у Potrykus и др., "Direct Gene Transfer: State of the Art and Future Potential", Plant. Mol. Biol. Rep. 3: 117-128 (1985)).

Разработанные методы позволяют стабильно трансформировать экзогенной ДНК широкий спектр видов растений. В частности, развитие физических методик позволило преодолеть известные ограничения, связанные с диапазоном хозяев и характерные для биологических систем. Однако общим недостатком этих физических методов является то, что они не дают возможность осуществлять направленную интеграцию введенной ДНК в геном растительной клетки. Поэтому эти методы должны зависеть от неконтролируемой интеграции введенной ДНК посредством недостаточно понятных механизмов, вследствие чего экзогенную ДНК необходимо интегрировать в виде многочисленных копий случайных фрагментов в один сайт в геноме растительной клетки.

Увеличение предсказуемости случаев стабильной трансформации при использовании физических методов интродукции экзогенной ДНК в растительную клетку должно значительно улучшить пригодность и общую эффективность этих способов для получения генетически стабильных трансформированных растений, обладающих способностью стабильно экспрессировать трансгены. Одним из подходов, принятых для достижения этой цели, было сочетание протеинов, обеспечивающих трансформацию и/или интеграцию в биологических системах, с небиологическими методами введения. Для достижения требуемого эффекта представлялось необходимым связать эти протеины с молекулами экзогенной ДНК перед введением в трансформируемую клетку-мишень, имитируя при этом по возможности наиболее точно био-

логическую систему, из которой получены протеины (WO 95/05471 и WO 95/34647).

Известен целый ряд протеинов, которые обеспечивают стабильную интегративную трансформацию эукариотических клеток экзогенной ДНК, которые производятся вне эукариотической клетки и вводятся в комбинации с экзогенной ДНК. В основе настоящего изобретения лежит открытие того факта, что для таких протеинов не требуется их получение и связывание с экзогенной ДНК вне эукариотической клетки, как это осуществляют обычно для усиления стабильной интегративной трансформации. В отличие от этого введение в эукариотическую трансформируемую клетку-мишень транслируемой РНК или химерного гена, кодирующего такой протеин, также может обеспечить эффективную стабильную интегративную трансформацию совместно введенной экзогенной ДНК.

Согласно настоящему изобретению предлагается прежде всего улучшенный способ стабильной трансформации растительных клеток с помощью экзогенной ДНК, который объединяет положительные характеристики опосредуемого *Agrobacterium tumefaciens* переноса Т-ДНК и интеграции с небиологическими методами введения.

Этот способ включает введение в растительную клетку фрагмента экзогенной ДНК, предназначенного для интеграции в геном растительной клетки, связанного с пограничными последовательностями Т-ДНК, вместе с, по крайней мере, одной вспомогательной последовательностью ДНК или РНК, обеспечивающей экспрессию в растительной клетке одного или нескольких белков, опосредующих интеграцию экзогенной ДНК, кодируемой участком vir T1 или R1 - плазмид агробактерий, таким образом, чтобы указанные белки присутствовали в клетке в достаточном количестве после проникновения экзогенной ДНК в клетку и до того, как произойдет интеграция экзогенной ДНК в геном растительной клетки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения экзогенную ДНК и вспомогательные последовательности ДНК и РНК вводят в растительную клетку одновременно. В альтернативном варианте подлежащая трансформации растительная клетка может быть получена из растения или культуры клеток, которые предварительно были стабильно трансформированы с помощью химерного(ых) гена(ов), предназначенного(ых) для экспрессии белков, опосредующих интеграцию.

Один или несколько белков, опосредующих интеграцию, в соответствии с настоящим изобретением, могут кодироваться участком VirD1, VirD2, VirC1, VirC2 или VirE2. Предпочтительно используют один участок VirD2, или комбинацию VirD1 и VirD2, или комбинацию VirD1, VirD2 и VirE2.

В еще одном предпочтительном варианте экзогенная ДНК, связанная с пограничными областями Т-ДНК агробактерий, представляет собой фрагмент растительного вирусного вектора.

Фрагментом растительного вирусного вектора может быть только вспомогательная последовательность ДНК или РНК.

Возможен также вариант, когда и экзогенная последовательность, связанная с пограничными последовательностями Т-ДНК агробактерий, и вспомогательная последовательность ДНК или РНК представляют собой фрагмент растительного вирусного вектора.

Предпочтительно используют растительную клетку, которая представляет собой клетку двудольного растения, предпочтительно выбранного из группы, включающей табак, хлопчатник, масличный рапс и сою.

Однако возможен вариант, когда растительная клетка представляет собой клетку однодольного растения, которое предпочтительно выбирают из группы, включающей кукурузу, пшеницу и рис.

Экзогенная ДНК может представлять собой любой фрагмент ДНК, который требуется интегрировать в геном растительной клетки в интактной форме, например, химерный ген, сконструированный для экспрессии в растительной клетке или трансгенном растении, или в культуре растительных клеток определенной биологически активной РНК (например, антисмысловой РНК или рибозима) или представляющего интерес белка.

Предпочтительно, чтобы экзогенная ДНК, связанная с пограничными последовательностями Т-ДНК агробактерий, и вспомогательная последовательность ДНК были фрагментами одной молекулы ДНК.

Другим объектом изобретения является способ получения фертильного трансгенного растения с интегрированной в геном экзогенной ДНК, связанной с пограничными последовательностями Т-ДНК агробактерий, включающий интеграцию экзогенной ДНК в геном растительной клетки в соответствии с описанным выше способом и регенерацию фертильного трансгенного растения из трансформированной растительной клетки.

С помощью данного способа возможно получение фертильных трансгенных растений, предпочтительно выбранных из группы, включающей табак, хлопчатник, масличный рапс, сою, кукурузу, пшеницу и рис.

Наиболее предпочтительно из группы, включающей кукурузу, пшеницу, овес, рожь, сорго, рис, ячмень, просо, дернообразующие и кормовые травы, а также хлопчатник, сахарный тростник, сахарную свеклу, масличный рапс, бананы, тополь, орех, табак и сою.

Ниже приведены пояснения некоторых определений для лучшего понимания настоящего изобретения.

**Интеграция.** В контексте настоящего описания понятие “интеграция” в целом применяют по отношению к процессу, посредством которого молекула экзогенной ДНК, введенная в эукариотическую клетку, стабильно включается в геномную ДНК эукариотической клетки.

**Бомбардировка микроснарядами.** В контексте настоящего описания понятие “бомбардировка микроснарядами” применяют для обозначения общего метода введения нуклеиновых кислот, включая ДНК и РНК, в живую клетку путем нанесения нуклеиновых кислот на микроснаряд и внедрения микроснаряда с нанесенным покрытием в живую клетку (см., например, примеры 1-4 патента США 5036006; WO 91/02071 (в которых описано применение этого метода для трансформации растений и их клеток); см. также патент США 5302523; Koziel и др., Biotechnology 11: 194-200 (1993) (в которых описана трансформация элитных инбредных линий кукурузы с помощью бомбардировки частицами); Vasil и др., Biotechnology 11:1553-1558 (1993); Weeks и др., Plant Physiol. 102: 1077-1084 (1993); Tanaka T. и др., “Successful expression in pollen of various plant species of in vitro synthesized mRNA introduced by particle bombardment”, Plant Mol. Biol. 28: 337-341 (1995); Vasil и др., Biotechnology 10: 667-674 (1992); R. и др.; Walker L. и др., “GUS Messenger RNA Delivery and Expression in Plant Cell via Particle Bombardment”, In Vitro Cell Dev. Biol. 26: 70A-№ 218 (1990); Iida A. и др., Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 560-563 (1990); Gordon-Kamm и др., Plant Cell 2: 603-618 (1990); Fromm и др., Biotechnology, 8:833-839 (1990); Morikawa H. и др., Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:320-322 (1989)).

**Инъекция с помощью струи аэрозоля.** В контексте настоящего описания понятие “инъекция с помощью струи аэрозоля” применяют для обозначения физического метода введения в живые клетки нуклеиновых кислот в форме струи аэрозоля (см., например, патент США 5240842).

**Электропорация.** В контексте настоящего описания понятие “электропорация” применяют для обозначения метода введения биологических молекул, в частности, нуклеиновых кислот, таких как ДНК и РНК, в живые клетки, заключающегося в том, что на клетки воздействуют электрическим импульсом или разрядом в присутствии биологических молекул (см., например, патент США 5231019; главу 3.3 “Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory Manual”, ред. Draper J. и др., изд. Blackwell Scientific Publications (1988); Saul M.W. и др., “Direct DNA Transfer to Protoplasts With and Without Electroporation”, Plant Molecular Biology Manual A1: 1-16, (1988);

Okada K. и др., "Introduction of Functional RNA into Plant Protoplasts by Electroporation", *Plant Cell Physiol.*, 27(4): 619-626 (1986); Shillito R.D. и др., "High Efficiency Direct Gene Transfer to Plants", *Biotechnology* 3: 1099-1103 (1985); EP-292435 (на имя Ciba-Geigy), EP-392225 (на имя Ciba-Geigy) и WO 93/07278 (на имя Ciba-Geigy)).

**Микроинъекция.** В контексте настоящего описания понятие "микроинъекция" применяют для обозначения метода механической инъекции биологического вещества, в частности, ДНК или РНК, непосредственно в живую клетку (см., например, главу 3.4 "Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory Manual, выше; Graessmann M. и др., "Microinjection of Tissue Culture Cell", *Methods in Enzymology* 101:482-492 (1993)).

**Индуцируемое поглощение.** В контексте настоящего описания понятие "индуцируемое поглощение" в целом применяют для обозначения методов, которые индуцируют поглощение биологических веществ, в частности, нуклеиновых кислот, живыми клетками (см., например, раздел "Предпосылки создания изобретения" в патенте США 5036066). Такие методы включают, в частности, поглощение, опосредуемое полиэтиленгликолем (ПЭГ) (см., например, раздел 3.2 "Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory Manual, ред. Draper J. и др., изд. Blackwell Scientific Publications (1988); Saul M.W. и др., "Direct DNA Transfer to Protoplasts With and Without Electroporation", см. выше; Negruțiu и др., *Plant Mol. Biol.* 8:363-373 (1987)) и обработку тепловым шоком (см. патент США 5231019).

**VirD.** В контексте настоящего описания понятие "VirD" относится к генам или протеинам, происходящим из вирулентного (Vir) D-оперона Ti- или Ri-плазмиды, которые обеспечивают функции, необходимые для переноса Т-ДНК (см. обзор Zambryski P.C., "Chronicles from the Agrobacterium-plant cell DNA transfer story", *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 465-490 (1992)). Конкретные гены и соответствующие протеины из этого участка обозначают номерами в зависимости от их расположения в опероне VirD. Например, первый ген в вирулентном D-опероне обозначают "VirD1", второй ген обозначают "VirD2" и т.д.

Вирулентный участок ДНК в норме не переносится в растительную клетку и не интегрируется в геном растения во время опосредуемого Agrobacterium переноса Т-ДНК. В отличие от этого продукты гена vir в естественных условиях обеспечивают непосредственный перенос элемента Т-ДНК от бактериальной Ti- или Ri-плазмиды в геном растения. Т-участок и vir-участок могут находиться на различных плазмидах без потери функций (De Framond A.J. и др., *Bio/Technology* 1:262-269 (1983); Hoekema и

др., *Nature* 303:179-180 (1983); Bevan M. *Nucleic Acids Res.* 12:8711-8721 (1984)).

Два полипептида VirD1 и VirD2, кодируемых 5'-половиной локуса VirD, играют основную роль в инициации процессинга ДНК при переносе Т-ДНК из *Agrobacterium* в растительные клетки. Протеины VirD1 и VirD2 кодируются соответственно первым геном и вторым геном оперона VirD (Stachel S.E. и Nester E.W. "The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*", *EMBO J.* 5:1445-1454 (1986)). Генетические исследования показали, что образование Т-цепи опосредовано продуктами оперона VirD (Yanofsky и др., *Cell* 47:471-477 (1986); Stachel и др., *EMBO J.* 6:857-863 (1987)). В частности, было показано, что первый и второй гены оперона VirD кодируют полипептиды, необходимые для расщепления пограничной последовательности Т-ДНК (De Vos и Zambryski, *Mol. Plant Microbe Inter.* 2: 43-52 (1989); Filichkin и Gelvin, *Mol. Microbiol.* 8: 915-926 (1993); Jayaswal и др., *J. Bacteriol.* 169: 5035-5045 (1987); Porter и др., *Nucleic Acids Res.* 15: 7503-7515 (1987); Stachel и др., *EMBO J.* 6: 857-863 (1987)). Эта активность приводит к образованию одноцепочечных разрывов (ников) внутри пограничных последовательностей Т-ДНК (Stachel S.E. и др., "Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stage of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells", *Nature (London)* 322: 706-712 (1986); Yanofsky и др., *Cell* 47: 471-477 (1986); Wang и др., *Science* 235: 587-591 (1987); Albright и др., *J. Bacteriol.* 169: 1046-1055 (1987)). VirD1/VirD2 расщепляют пограничную последовательность Т-ДНК между третьим и четвертым основаниями. Как только образуются эти разорванные молекулы, наблюдается образование свободных линейных копий одноцепочечной ДНК (ssДНК) нижней цепи Т-ДНК (Т-цепь) (Stachel S.E. и др., *Nature (London)* 322: 706-712 (1986); Stachel и др., *EMBO J.* 6: 857-863 (1987)). VirD2 остается ковалентно присоединенным к 5'-концу Т-ДНК (см. обзор Zupan J. R. и Zambryski P. "Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell", *Plant Physiol.* 107: 1041-1047 (1995)).

Изучение мутанта virD2, у которого отсутствует С-концевая половина (50%) VirD2, показало, что для разрыва пограничных последовательностей Т-ДНК необходима только N-концевая половина (50%) VirD2. Однако этот мутант не обладает способностью вызывать опухоли в инфицированных растениях. Таким образом, можно предположить, что С-конец играет определенную роль в переносе Т-ДНК в растительные клетки (данные обобщены в обзоре Zambryski P.C., "Chronicles from the Agrobacterium-plant cell DNA transfer story", *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 465-490 (1992)). Этот домен содержит состоящий из двух частей сигнал ядерной локализации (NLS)

(Howard и др., *Cell* 68: 109-118 (1992)). Биологическая роль последовательностей NLS была подтверждена данными о том, что у *Agrobacterium* в значительной степени снижается онкогенность, когда удаляют 2 основные структуры состоящего из двух частей NLS (*Shurvinton, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 11837-11841 (1992)).

Один VirD2 вызывает *in vitro* сайтспецифическую реакцию расщепления-соединения одноцепочечной ДНК, что свидетельствует о том, что этот протеин обладает катализитической активностью, обеспечивающей разрезание ДНК (Pansegrouw и др., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11538-11542 (1993)). У Scheiffle и др. в *J. Biol. Chemistry* 270: 1269-1276 (1995) говорится, что объединение в pTiC58 VirD1 и VirD2 оказалось достаточным для катализа *in vitro* расщепления, специфического по отношению к Т-пограничной последовательности (см. также у Jasper и др., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 694-698 (1994)).

У экстрактов, содержащих VirD1, обнаружена топоизомеразная активность типа I (Ghai и Das, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 319-3113 (1989)). Эта активность связана с VirD1 и, вероятно, необходима для релаксации ДНК с целью ее подготовки к расщеплению с помощью VirD2. Однако более высоко очищенный протеин VirD1 не проявил топоизомеразной активности (Scheiffle и др. в *J. Biol. Chemistry* 270:1269-1276 (1995)).

Анализ последовательности VirD2 у штаммов *Agrobacterium*, несущих октопиновый, нопалиновый или ризогеновый тип плазмид показал, что N-конец этой последовательности консервативен на 85% (Hirayama и др., *Mol. Gen. Genet.* 213: 229-237 (1988); Wang и др., *J. Bacteriol.* 172: 4432-4440 (1990); Yanofsky и др., *Cell* 47: 471-477 (1986)). С-конец консервативен только на 25%, причем наибольшее сходство с сигнальными последовательностями NLS обнаружено для последних 30 аминокислот (см. обзор Zambryski, 1992).

VirE. В контексте настоящего описания понятие "VirE" относится к генам или соответствующим протеинам, происходящим из вирулентного (Vir) E-оперона Ti- или Ri-плазмиды, которые обеспечивают функции, необходимые для переноса Т-ДНК. Понятие "VirE2" в контексте настоящего описания относится к связывающему одноцепочечную ДНК (ssДНК) протеину, который был идентифицирован как продукт гена VirE2 на опероне VirE (Gielt C. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 9006-9010 (1987); Citovsky и др., *Science* 240: 501-504 (1988)). Вероятно, VirE2 может покрывать Т-цепь вдоль ее длины. Взаимодействие этого протеина с одноцепочечной ДНК является неспецифическим. Нопалиновый протеин VirE2 (Hirooka и др., *J. Bacteriol.* 169: 1529-1536 (1987)) и октопиновый протеин VirE2 (Winans и др., *Nucleic Acids Res.*

15: 825-837 (1987)) содержат сигналы ядерной локализации. Вероятно, протеин VirE2 является основной частью Т-комплекса, и он может принимать участие в транспорте в ядро (см. обзор Zupan и Zambryski, *Plant Physiol.* 107:1041-1047 (1995)). Трансгенные растения, экспрессирующие продукт гена virE2, способны дополнять мутантов VirE у *Agrobacterium*, подтверждая тем самым, что протеин VirE2 играет важную роль в растительной клетке (см. обзор Zupan и Zambryski, *Plant Physiol.* 107: 1041-1047 (1995)).

VirC. В контексте настоящего описания понятие "VirC" относится к локусу VirC Ti- и Ri-плазмиды, который кодирует два полипептида VirC1 и VirC2 (Yanofsky M.F. и Nester E.W. "Molecular characterization of a host-range-determining locus from *Agrobacterium tumefaciens*", *J. Bacteriol.* 168: 237-243 (1986)). Было показано, что этот локус усиливает разрыв пограничной последовательности Т-ДНК в *Agrobacterium* (Toro N. и др., "Role of the overdrive sequence in T-DNA border cleavage in *Agrobacterium*", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 85(22): 8558-8562 (1988)). Также было показано, что VirC1 усиливает производство Т-цепи в гетерологичной системе *E.coli*, если ограничено количество продуктов генов VirD1 и VirD2 (De Vos G. и Zambryski P., "Expression of *Agrobacterium* nopaline specific VirD1, VirD2 and VirC1 and their requirement for T-strand production in *E.coli*", *Molec. Plant Microbe Inter.* 2: 42-52 (1989)). Хотя с помощью аффинной хроматографии ДНК было показано, что VirC1 взаимодействует с октопиновыми, усиливающими перенос (overdrive) последовательностями, точная функция VirC1 остается неизвестной. Он может связываться с VirD1 и VirD2 или с повтором пограничной последовательности и/или с усиливающей перенос последовательностью, способствуя разрыву и производству Т-цепи (Toro N. и др., "The *Agrobacterium tumefaciens* virC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer", *J. Bacteriol.* 171: 6845-6849 (1989)).

Пограничные последовательности Т-ДНК. В контексте настоящего описания понятие "пограничные последовательности Т-ДНК" относится к неполным прямым повторам последовательностей ДНК длиной приблизительно 25 пар оснований, которые благодаря своему присутствию на обоих концах фрагмента ДНК приводят к тому, что фрагмент распознается как Т-ДНК, и действуют аналогично протеинам *Agrobacterium*. Пограничные последовательности Т-ДНК, расположенные на каждом из концов Т-ДНК, условно обозначают как "левая" и "правая". Консенсусная последовательность для правой пограничной последовательности представляет собой 5'-GNNTGNCAAGTATATNNNN NNNGTNAN-3' (SEQ ID NO:1), а консенсусная последовательность для левой пограничной последовательности представляет собой 5'-

GGTGGCAGGATATNNNNNTGTAAC-3' (SEQ ID NO:2) (Jouanin и др., *Plant Mol. Biol.* 12: 75-85 (1989)). Любой фрагмент ДНК между этими пограничными последовательностями переносится из *Agrobacterium* в растительную клетку (см. обзор Zambryski P.C., "Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story", *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 465-490 (1992)).

Изучение Т-ДНК различных трансформированных линий растений позволило установить, что интеграция Т-ДНК в геном растения часто происходит на этих повторах пограничных последовательностей (для правой пограничной последовательности) или около них (для левой пограничной последовательности) (Slightom и др., *EMBO J.* 4: 3069-3077 (1985); Gheysen и др., *Genes & Dev.* 5: 287-297 (1991); Mayerhofer и др., *EMBO J.* 10: 697-704 (1991); Ohta и др., *Plant J.* 7: 157-164 (1995); Koncz и др., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 8467-8471 (1989)).

Несмотря на структурные сходства между левой и правой пограничными последовательностями исследования функций пограничных последовательностей показало, что пограничные последовательности Т-ДНК функционируют по-разному. Делеция или инверсия правой пограничной последовательности приводит к практически полному прекращению переноса Т-ДНК, тогда как делеция повтора левой пограничной последовательности практически не оказывает на него влияния (Shaw C.H. и др., "The right hand copy of the nopaline Ti plasmid 25 bp repeat is required for tumor formation", *Nucleic Acids Res.* 12: 6031-6041 (1984); Jen G.C. и Chilton M-D, "The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border in promoting T-DNA transformation", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 83: 3895-3899 (1986)). Генетический анализ показал, что перенос Т-ДНК является полярным, причем полярность определяется ориентацией повторов пограничной последовательности (Wang и др., *Cell* 38: 455-462 (1984); Peralta и Ream, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 5112-5116 (1985)). Вероятно, это обусловлено тем фактом, что Т-цепь формируется в направлении справа налево (Albright и др., "Processing of the T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* generates border nicks and linear, single-stranded T-DNA", *J. Bacteriol.* 16: 1046-1055 (1987)).

Последовательности-“контексты”, окружающие пограничные последовательности Т-ДНК, оказывают сильное влияние на их активность. Последовательности, окружающие правую пограничную последовательность, усиливают, а последовательности, окружающие левую пограничную последовательность, ослабляют полярный перенос ДНК (Wang K. и др., "Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells", *Mol. Gen. Genet.* 210:

338-346 (1987)). Цис-активная последовательность длиной 24 пары оснований, называемая усилителем переноса, расположена рядом с правой пограничной последовательностью октопиновой плазмида (Peralta и др., *EMBO J.*, 5: 1137-1142 (1986); Shurviton и Ream, *J. Bacteriol.* 173: 5558-5563 (1991)). Усилитель переноса стимулирует перенос Т-ДНК даже в том случае, когда он расположен на расстоянии нескольких тысяч пар оснований от пограничной последовательности (Van Haaren M.J.J. и др., "Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *A. tumefaciens*", *Nucleic Acids Res.* 15: 8983-8997 (1987)). Однако он сам по себе не может опосредовать перенос Т-ДНК (Peralta E.G. и др., "overdrive", a T-DNA transmission enhancer on the *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid", *EMBO J.*, 5: 1137-1142 (1986); Van Haaren M.J.J. и др., "Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti-plasmid left and right border fragment", *Plant Mol. Biol.* 8: 95-104 (1987)). Усиливающая перенос последовательность первоначально локализована на участке справа от повтора левой пограничной последовательности TL-ДНК октопиновой Ti-плазмида. Аналогичные последовательности присутствуют рядом с повтором правой пограничной последовательности TR-области октопиновой Ti-плазмида (pTi) и TL- и TR-областей агропиновой Ri-плазмида (pRi) (Slightom и др., "Nucleotide sequence analysis of TL-DNA *Agrobacterium rhizogenes* type plasmid. Identification of open reading frames", *J. Biol. Chem.* 261: 108-121 (1986); Jouanin и др., "Analysis of TR-DNA/Plant junctions in the genome of a *Convolvulus arvensis* clone transformed with *Agrobacterium rhizogenes* strain A4", *Plant Mol. Biol.* 12: 75-85 (1989)). Сравнение последовательностей вблизи правой пограничной последовательности позволило выявить участок длиной 8 пар оснований, названный коровой (сердцевинной) последовательностью (5'-TGTGTTGTT-3') и располагающийся на различных расстояниях справа от каждого повтора правой пограничной последовательности. Правая пограничная последовательность Т-ДНК плазмида pRi8196 маннопинового типа не содержит никакой последовательности, сходной с усиливающей перенос последовательностью, но содержит другую последовательность длиной 8 пар оснований (5'-ATTAGTTC-3'), повторяющуюся 6 раз (Hansen G. и др., "Agrobacterium rhizogenes pRi8196 T-DNA: Mapping and DNA sequence of functions involved in manopin synthesis and hairy root differentiation", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 88: 7763-7767 (1991)). Вероятно, эта последовательность функционально эквивалентна усилителю переноса (Hansen G. и др., "A T-DNA transfer enhancer sequence in the vicinity of the right border of *Agrobacterium rhizogenes* pRi8196", *Plant Mol. Biol.* 20: 113-122 (1992)). Из литературы неизвестно о существо-

вании последовательности, очень похожей на усиливающую перенос последовательность вблизи нопалиновых пограничных последовательностей Т-ДНК (Wang K. и др., “Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells”, Mol. Gen. Genet. 210: 338-346 (1987)), но это не исключает того, что некоторая последовательность, присутствующая на этом участке, играет аналогичную роль.

Используемая в примерах правая пограничная последовательность длиной 25 пар оснований получена из pTiAch5 (Van Haaren M.J.J., Plant Mol. Biol. 13: 523-531 (1989)). Левая пограничная последовательность, присутствующая в плазмиде pNeoRBLuc, получена из pTiT37 (Bevan, Nucleic Acids Res. 12: 8711-8721 (1984)).

Хотя было показано, что последовательности, соседние с правой пограничной последовательностью, могут усиливать перенос ДНК в растительную клетку, в экспериментах, описанных в примерах, выбирали минимальную длину правой пограничной последовательности с той целью, чтобы минимизировать возможное нарушение экспрессии гена люциферазы. Однако могут быть использованы и более длинные правые пограничные последовательности, содержащие последовательность, которая подобна энхансерной последовательности, такую как усилитель переноса.

Химерные гены, обладающие способностью продуцировать в эукариотической клетке протеин, который обеспечивает интеграцию представляющей интерес ДНК, могут быть сконструированы с использованием стандартных методов генетической инженерии, как это описано в примерах. Такой химерный ген должен состоять из последовательности ДНК, кодирующей протеин и функционально связанной с соответствующими регуляторными сигнальными последовательностями (например, с промотором, лидерной последовательностью, терминатором транскрипции, сайтом полиаденилирования), которые управляют экспрессией функционально связанной кодирующей последовательности в эукариотической клетке. Такие кодирующие последовательности и регуляторные сигнальные последовательности хорошо известны в данной области. Для улучшения экспрессии обеспечивающего интеграцию протеина можно использовать синтетический вариант кодирующей последовательности, оптимизированной для экспрессии в эукариотической клетке-мишени.

мРНК, обладающие способностью продуцировать в эукариотической клетке обеспечивающий интеграцию протеин, могут быть сконструированы с использованием стандартных систем, предназначенных для получения транслируемых кэпированных транскриптов поли-(A)-мРНК, кодирующих требуемый протеин, как это проиллюстрировано в примерах.

Для специалиста в данной области очевидно, что экзогенная ДНК и химерный(ые) ген(ы) или РНК, кодирующие протеин(ы), которые обеспечивают стабильную интеграцию экзогенной ДНК, могут быть введены в растительную клетку различными путями с использованием стандартных методов, применяемых в данной области. Конкретный способ, с помощью которого эти компоненты вводятся в эукариотическую клетку, не имеет решающего значения, поскольку протеин(ы), которые обеспечивают стабильную интеграцию экзогенной ДНК, производятся в той же самой клетке фрагментом экзогенной ДНК в течение соответствующего периода времени, как описано ниже.

Для достижения положительного эффекта, а именно, для обеспечения стабильной интеграции фрагмента экзогенной ДНК в интактной форме, не является необходимым, чтобы протеины, обеспечивающие этот эффект, производились в эукариотической клетке либо до того, как фрагмент экзогенной ДНК введен в эукариотическую клетку, либо после того, как экзогенная ДНК была интегрирована в эукариотическую клетку. Единственным необходимым требованием, которым должны удовлетворять эти протеины, является их производство в растительной клетке таким образом, чтобы они присутствовали в достаточных количествах во время переходного периода после того, как фрагмент экзогенной ДНК введен в эукариотическую клетку, и до того, как экзогенная ДНК была интегрирована. Может быть применен любой метод переноса химерного гена или транслируемой РНК в эукариотическую клетку, который обеспечивает производство кодируемого протеина в течение соответствующего периода времени.

Как видно из представленных в настоящем описании примеров, один из способов, позволяющих достичь производства достаточных количеств этих протеинов в течение соответствующего периода времени, состоит в интродукции кодирующего протеин химерного гена или транслируемой РНК в эукариотическую клетку вместе с экзогенным фрагментом ДНК (т.е. одновременный перенос компонентов). Этот способ является предпочтительным потому, что он включает однократный перенос молекул нуклеиновых кислот (ДНК или ДНК и РНК) в эукариотическую клетку, предназначенную для трансформации. Другое потенциальное преимущество этого способа состоит в том, что он может использоваться для кратковременного производства обеспечивающего интеграцию протеина в течение соответствующего периода времени, а не для стабильного производства, что может оказывать вредное воздействие на нормальный рост и развитие эукариотической клетки.

Одним из объектов настоящего изобретения является способ достижения стабильной

трансформации растительной клетки с помощью интактного фрагмента экзогенной ДНК, связанного с пограничными последовательностями Т-ДНК, в результате чего имитируется опосредуемая Т-ДНК *Agrobacterium* трансформация. В соответствии с этим объектом изобретения в растительную клетку, подлежащую трансформации, вводятся следующие компоненты:

а) фрагмент представляющей интерес экзогенной ДНК, подлежащий интегрированию в геном растительной клетки, причем этот фрагмент связан с одной или более пограничными последовательностями Т-ДНК (для эффективного переноса Т-ДНК, в частности, кольцевой Т-ДНК, у которой одна пограничная последовательность может выполнять функции как правой, так и левой пограничной последовательности, может оказаться достаточно одной пограничной последовательности Т-ДНК), и

б) по крайней мере, один химерный ген или РНК, причем каждый такой химерный ген или РНК способен(а) продуцировать в растительной клетке протеин, который происходит из *Agrobacterium* и который либо индивидуально, либо в комбинации с другими такими протеинами обеспечивает стабильную интеграцию фрагмента экзогенной ДНК в интактной форме.

Происходящий из *Agrobacterium* протеин, который продуцируется в растительной клетке в соответствии с этим объектом изобретения, включает протеины, происходящие из вирулентного участка Ti- или Ri-плазмиды *Agrobacterium*, но не ограничен ими. В частности, он включает VirC1, VirC2, VirD1, VirD2 и VirE2. Предпочтительно продуцируемый(ые) протеин(ы) представляет(ют) собой протеин VirD2 или комбинацию VirD2 либо с одним из VirD1, VirE2, либо с обоими VirD1 и VirE2. Экспрессия протеина(ов), происходящего(их) из *Agrobacterium*, в растительной клетке приводит к предсказуемой целевой интеграции экзогенной ДНК в виде ее интактного фрагмента. Образовавшаяся трансформированная растительная клетка содержит фрагмент экзогенной ДНК, сходный с Т-ДНК *Agrobacterium* и интегрированный в ее геном.

Химерные гены, способные продуцировать происходящий из *Agrobacterium* протеин, могут быть сконструированы с использованием стандартных методов генетической инженерии, как это проиллюстрировано в примерах. Такой химерный ген должен состоять из последовательности ДНК, кодирующей происходящий из *Agrobacterium* протеин и функционально связанной с соответствующими регуляторными сигнальными последовательностями (например, с промотором, лидерной последовательностью, терминатором транскрипции, сайтом полиаденилирования), которые управляют экспрессией функционально связанной кодирующей последовательности в растительной клетке. Такие

кодирующие последовательности и регуляторные сигнальные последовательности хорошо известны в данной области. Кодирующие последовательности VirD1 и VirD2, которые были использованы в примерах, помещены в GenBank и имеют регистрационный номер M14762.

РНК, обладающие способностью продуцировать в растительной клетке происходящий из *Agrobacterium* протеин по изобретению, могут быть сконструированы с использованием стандартных систем, предназначенных для получения транскриптов транслируемой кэпированной поли-(А)-мРНК, кодирующих требуемый протеин, как это проиллюстрировано в примерах.

Фрагмент экзогенной ДНК, предназначенный для интеграции в соответствии с этим объектом изобретения, может представлять собой любой фрагмент ДНК, который требуется интегрировать в интактной форме в геном растительной клетки, такой как химерный ген, сконструированный для экспрессии определенной биологически активной РНК (например, антисмысловой РНК или рибозима) или представляющего интерес протеина в растительной клетке или в образовавшемся растении либо в культуре клеток растения. Единственным требованием является то, чтобы фрагмент был связан с одной или более пограничными последовательностями Т-ДНК таким образом, чтобы его можно было распознать и чтобы на него могли действовать протеины VirD1 и VirD2. Присоединение таких пограничных последовательностей Т-ДНК к фрагменту экзогенной ДНК описано в примере 1.

Любой эукариотический организм, восприимчивый к переносу нуклеиновых кислот с помощью одного или более различных механизмов, известных в данной области, может быть использован в качестве мишени для трансформации в соответствии с настоящим изобретением. Он включает грибы, дрожжи, клетки животных и, прежде всего, растительные клетки. Для дрожжей был описан перенос Т-ДНК (см. Piers и др., Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 1613-1618 (1996)). Для клеток животных была описана локализация VirD1 и VirD2 (после модификации их сигналов локализации) в клеточных ядрах (см. Guralnick и др., Plant Cell 8: 363-373 (1996)). Методы переноса нуклеиновых кислот в различные клетки животных хорошо известны в данной области (см., например, "Current Protocols in Molecular Biology", т. 1-3, ред. Ausubel F.M. и др., изд. John Wiley & Sons, Inc. (1995); см., в частности, главу 9 "Introduction of DNA into Mammalian Cells").

Описанный способ трансформации приводит к получению полного набора или коллекции трансформированных клеток, обычно выявляемых по экспрессии маркерного гена. Последующая регенерация клеток в растения приводит к получению полного набора или коллекции

трансформированных растений. Полный набор как трансформированных растительных клеток, так и регенерированных из них трансформированных растений может быть охарактеризован на основе данных о природе случаев их интеграции. Набор клеток или растений в соответствии с настоящим изобретением характеризуется тем, что более 5% отдельных растительных клеток или растений включают представляющую интерес ДНК, соединенную с геномной ДНК с помощью правых пограничных последовательностей Т-ДНК *Agrobacterium*, как если бы их трансформировали с использованием опосредуемого *Agrobacterium* заражения (агроинфекции). Предпочтительно указанное количество составляет более 10%. Обычно это количество составляет 5-70%, более предпочтительно 10-50%. Набор трансформированных растительных клеток или растений обычно базируется на 10 или более независимых случаях трансформации. Один из предпочтительных экспериментов по физической трансформации приводит к получению более чем 20, 30, 40 или 50 независимых случаев трансформации. Наборы трансформированных клеток и растений, а также потомство индивидуальных растительных клеток или растений составляют еще один объект настоящего изобретения.

Растения, представляющие собой потенциальные мишени, включают как однодольные, так и двудольные растения или их растительные клетки соответственно, в частности важные в сельскохозяйственном отношении культурные растения, такие, как кукуруза и другие зерновые культуры, например, пшеница, овес, рожь, сорго, рис, ячмень, просо, дернообразующие и кормовые травы и т.п., а также хлопчатник, сахарный тростник, сахарная свекла, масличный рапс, бананы, тополь, орех, табак и соя.

Любой тип или источник растительных клеток, которые могут служить в качестве мишени для трансформации с помощью одного или нескольких различных биологических и небиологических механизмов переноса, известных в данной области, может служить в качестве мишени для трансформации в соответствии с настоящим изобретением. Они включают, но не ограничены ими, незрелые и зрелые зародыши, пыльцу, протопласти, суспензионную культуру клеток, клетки каллюса, семядоли или другой семянной материал, части проростков и листья или кусочки листьев.

Трансформированные растительные клетки, полученные с использованием способа по изобретению, должны содержать интегрированную интактную экзогенную представляющую интерес ДНК. Эта интегрированная экзогенная ДНК может включать части пограничных последовательностей Т-ДНК, обычно сохраняющиеся на интегрированной ДНК после осуществления встраивания Т-ДНК. Трансформированные растительные клетки, полученные с исполь-

зованием способа по изобретению, могут использоваться для получения культур трансгенных растительных клеток и фертильных трансгенных растений в соответствии со стандартными методами, хорошо известными в данной области.

Таким образом, еще одним объектом изобретения является способ получения фертильного трансгенного растения, несущего фрагмент экзогенной ДНК, связанный с пограничными последовательностями Т-ДНК и стабильно интегрированный в интактной форме в геном растения, включающий:

- а) трансформацию или интеграцию экзогенной ДНК в геном растительной клетки в соответствии со способом по изобретению и
- б) регенерацию растительной клетки, полученной на стадии а), с получением фертильного трансгенного растения.

Предпочтительно фертильное трансгенное растение выбирают из группы, включающей табак, хлопчатник, масличный рапс, сою, кукурузу, пшеницу и рис.

Генетические особенности, созданные в трансгенных растениях и полученных от них семенах с помощью методов генетической инженерии, передаются при половом размножении или вегетативном росте и, таким образом, могут сохраняться и передаваться по наследству потомству этих растений. Обычно это сохранение и передачу по наследству осуществляют с использованием известных сельскохозяйственных методов, таких как обработка почвы, посев или сбор урожая, разработанных специально с учетом этих целей. Также могут применяться специальные способы, такие как гидропоника или методы культивирования в закрытом грунте. Поскольку выращиваемая сельскохозяйственная культура подвержена нападению и повреждениям, вызванным насекомыми или инфекциями, а также конкуренции со стороны сорных растений, с целью повысить урожайность должны быть предприняты соответствующие меры для борьбы с сорными растениями, болезнями растений, насекомыми, нематодами и другими вредными воздействиями. Они включают механические способы, такие как обработка почвы или удаление сорняков и зараженных растений, а также внесение средств защиты растений, таких как гербициды, фунгициды, гаметоциды, нематоциды, регуляторы роста, агенты, способствующие созреванию, и инсектициды.

Полезные генетические свойства трансгенных растений и семян по изобретению далее могут быть использованы при селекции растений с целью создания растений с улучшенными свойствами, такими как устойчивость к вредителям, гербицидам или стрессу, улучшенная питательная ценность, повышенная урожайность или улучшенное строение, вызывающее снижение потерь от полегания или осыпания. Различные стадии селекции, такие как отбор

подлежащих скрещиванию линий, направленное опыление родительских линий или отбор соответствующих растений-потомков, характеризуются продуманным вмешательством человека. В зависимости от требуемых свойств выбирают различные методы селекции. Пригодные методики хорошо известны в данной области и включают гибридизацию, инбридинг, обратное возвратное скрещивание, скрещивание многих линий, смешивание сортов, межвидовую гибридизацию, методы анеуплоидии и т.д., но не ограничены ими. Методы гибридизации также включают стерилизацию растений с получением стерильных мужских или женских растений с использованием механических, химических или биохимических способов. Перекрестное опыление стерильного мужского растения пыльцой другой линии обеспечивает то, что геном стерильного мужского, но фертильного женского растения неизменно приобретет свойства обеих родительских линий. Так, трансгенные семена и растения в соответствии с изобретением вследствие изменения их генетических свойств могут применяться для селекции улучшенных линий растений, которые позволяют, например, увеличить эффективность обычных методов, таких как обработка гербицидом или пестицидом, или исключить применение этих методов. В альтернативном варианте могут быть получены новые культурные растения с улучшенной устойчивостью к стрессу, которые вследствие их оптимизированного генетического "оснащения" дают урожай продуктов лучшего качества по сравнению с растениями, которые не обладают сопоставимой способностью сопротивляться вредным условиям при их развитии.

При производстве семян качество прорастания и однородность семян являются важными характеристиками продукта, в то время как для семян, собираемых и продаваемых фермером, качество прорастания и однородность не являются важными. Поскольку трудно выращивать культурное растение вне контакта с семенами другого культурного и сорного растения, для борьбы болезнями, которые передаются с семенами, и для получения семян с хорошим прорастанием производителями, занимающимися выращиванием, кондиционированием и продажей чистых семян, разработаны многочисленные и продуманные способы производства семян. Так, обычно фермер практикует покупку сертифицированного семенного материала, удовлетворяющего определенным стандартам качества, а не использует семенной материал, полученный от его собственной культуры. Материал для размножения, который используют в качестве семенного материала, обычно обрабатывают защитным покрытием, включающим гербициды, инсектициды, фунгициды, бактерициды, нематоциды, моллюскициды или их смеси. Обычно применяемые защитные покрытия

включают такие соединения, как каптан, карбоксин, тирам (TMTD<sup>®</sup>), металаксил (Apron<sup>®</sup>) и пиримифосметил (Actellic<sup>®</sup>). При необходимости эти соединения изготавливают в виде препартивной формы вместе с дополнительными носителями, поверхностно-активными веществами или способствующими нанесению адьювантами, обычно применяемыми в технике приготовления препартивных форм, предназначенных для защиты от повреждения, вызванного бактериями, грибами или вредителями. Защитные покрытия могут быть нанесены путем пропитывания материала для размножения жидкой композицией или путем покрытия комбинированной влажной или сухой композицией. Также возможны другие способы нанесения, такие как обработка почек или плодов.

Еще одним объектом настоящего изобретения являются новые сельскохозяйственные методы, такие как методы, примеры которых приведены выше, характеризующиеся использованием трансгенных растений, материала трансгенного растения или трансгенных семян в соответствии с настоящим изобретением.

Для специалиста в данной области техники очевидно, что компоненты, применяемые при реализации этого способа (т.е. экзогенная ДНК и химерные гены или РНК, кодирующие протеины, которые обеспечивают интеграцию экзогенной ДНК) могут быть введены в растительную клетку различными путями с использованием стандартных методов, применяемых в данной области. Конкретный метод, с помощью которого эти компоненты вводятся в растительную клетку, не имеет решающего значения, поскольку протеин(ы), который(е) обеспечивает(ют) стабильную интеграцию экзогенной ДНК, продуцируется(ются) в течение соответствующего периода времени, как описано выше.

Точное количество каждого компонента, вводимого в растительную клетку, также не имеет решающего значения и может варьироваться в зависимости от способа и формы, в которой введен компонент. При необходимости специалист в данной области может на основе общизвестных способов изменять количество каждого вводимого компонента, определяя оптимальный уровень для каждой применяемой определенной системы переноса. В примере 1 описана эффективная комбинация, которая может служить в качестве исходной точки для дальнейшей оптимизации.

Введение компонентов в соответствии с этим способом в растительную клетку может быть осуществлено с помощью различных методик, применяемых в данной области для введения нуклеиновых кислот в растительную клетку, включающих биологические механизмы, такие как опосредуемая *Agrobacterium* трансформация Т-ДНК (см., например, WO 95/35388, озаглавленную "Plant Genetic Transformation Methods and Transgenic Plants"), и

небиологические механизмы, такие как бомбардировка микроснарядами, электропорация, мицроинъекция, индуцированное поглощение и инъекция с помощью струи аэрозоля, но необязательно ограниченных ими.

В предпочтительном варианте для введения в растительную клетку-реципиент всех компонентов в соответствии с этим способом (т.е. экзогенной ДНК и химерных генов или РНК, кодирующих протеины, которые обеспечивают интеграцию экзогенной ДНК) используется метод одновременного переноса.

Предполагается, что мРНК, кодирующая обеспечивающий интеграцию протеин, вводимый в соответствии с изобретением, будет производить кодируемый протеин в растительной клетке в течение конечного периода времени до его расщепления. Предполагается, что протеин, продуцируемый этой мРНК, сохраняется в этой растительной клетке в течение конечного периода времени до того, как он также будет расщеплен в результате обычных клеточных процессов. Таким образом, в соответствии с предлагаемым способом эти протеины могут вводиться в растительную клетку на ограниченный период времени в форме РНК. Кратковременное введение этих протеинов может осуществляться в тех случаях, когда постоянное присутствие таких протеинов может оказывать нежелательные воздействия. Такого же эффекта можно достичь путем введения химерного гена, кодирующего протеин, обеспечивающий интеграцию, в форме, которую нельзя легко интегрировать в геном растительной клетке в функциональном активном состоянии.

В тех случаях, когда обеспечивающие интеграцию протеины вводятся в клетку посредством химерного гена, соответствующие химерные гены предпочтительно вводятся совместно с фрагментом экзогенной ДНК в виде отдельных молекул ДНК, хотя различные компоненты могут быть объединены и введены в виде одной молекулы ДНК. Перенос в виде отдельных молекул ДНК позволяет изменять и оптимизировать соотношение химерного гена и фрагмента экзогенной ДНК. По-видимому, также может оказаться более целесообразным создание этих конструкций на отдельных молекулах.

Можно предположить, что стабильное включение таких химерных генов в геном посредством случайной интеграции будет происходить с частотой, соизмеримой с таковой для направленной интеграцией экзогенной ДНК, связанной с пограничными последовательностями Т-ДНК. С целью облегчить отделение таких вариантов случайной интеграции от направленной интеграции экзогенной ДНК химерные гены, кодирующие обеспечивающие интеграцию протеины, предпочтительно могут быть введены в виде индивидуальной молекулы ДНК отдельно от экзогенной ДНК. При использовании этого подхода копии химерных генов, веро-

ятно, будут интегрироваться в локусы, отличные от таковых при направленной интеграции экзогенной ДНК, связанной с пограничными последовательностями Т-ДНК. В результате с помощью последующей селекции растений, полученных из трансформированных растительных клеток, более легко осуществить отделение случаев направленной интеграции с использованием экзогенной ДНК от случайным образом интегрированных генов VirD1 и VirD2.

В предпочтительном варианте осуществления в качестве переносчика для введения химерного гена или РНК, кодирующей обеспечивающий интеграцию протеин, в растительную клетку ДНК используют вектор, представляющий собой растительный вирус.

Такие векторы могут быть сконструированы из репликонов ДНК растительного вируса, таких как репликоны геминивирусов (Ugaki M., Nucleic Acids Research, 19: 371-377 (1984)), и векторов на основе РНК-содержащих вирусов (Sablowski R.W., Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 6901-6907 (1995)) для включения и экспрессии требуемой ДНК или РНК в растительной клетке. В результате того, что эти векторы обычно реплицируются в растительной клетке-мишени, происходит амплификация химерного гена или РНК, встроенных в такие векторы, и увеличение количества продуцируемого ими протеина. Также можно предположить, что вирусные векторы этого типа не будут интегрироваться в геном растительной клетки, поскольку вирусные репликоны, от которых они происходят, обычно не способны к этому. Таким образом, преимуществом этого метода является ограниченное по времени производство больших количеств обеспечивающих интеграцию протеинов, что снижает риск интеграции химерных генов, кодирующих такие протеины. Также преимуществом может являться системное применение таких вирусных векторов для предварительного заражения подлежащих трансформации растительных клеток. Этот подход позволяет вводить экзогенную ДНК, предназначенную для интеграции, в больших количествах, избегая тем самым необходимости совместного переноса ДНК или РНК, кодирующей обеспечивающий интеграцию протеин или протеины.

Вектор, представляющий собой растительный вирус, также может использоваться в качестве переносчика для введения подлежащего интеграции фрагмента экзогенной ДНК в растительную клетку. Поскольку эти векторы обычно реплицируются в растительной клетке-мишени, при таком их применении происходит амплификация матриц фрагмента экзогенной ДНК в количестве, пригодном для интеграции.

Когда вектор, представляющий собой растительный вирус, применяют для введения в растительную клетку как фрагмента экзогенной ДНК, подлежащего интеграции, так и химерного гена, кодирующего обеспечивающий инте-

грацию протеин, то для введения обоих компонентов может использоваться один и тот же вирусный вектор или могут применяться два отдельных вирусных вектора. Когда для введения вирусного(ых) вектора(ов) в растительную клетку применяют метод опосредуемой *Agrobacterium* трансформации, этот подход называют "агроинфекцией" (см. Grimsley и др., *Nature*, 325: 177-179 (1987)).

В качестве варианта, альтернативного совместному введению химерных генов, кодирующих обеспечивающие интеграцию протеины, и экзогенной ДНК, последняя может быть введена в трансгенную растительную клетку, уже содержащую эти химерные гены, стабильно включенные в ее геном. В качестве источника таких трансгенных растительных клеток могут использоваться трансгенные растения или культуры клеток трансгенных растений, полученные путем трансформации с использованием стандартных методов с помощью молекул ДНК, включающих химерные гены, кодирующие обеспечивающие интеграцию протеины. При использовании этого подхода случаи направленной интеграции введенной экзогенной ДНК могут быть отделены от стабильно интегрированных химерных генов путем последующей селекции растений, полученных из трансформированных растительных клеток (см., например, Peerbolte R. и др., "Transformation of plant protoplasts with DNA: cotransformation of non-selected calf thymus carrier DNA and meiotic segregation of transforming DNA sequences", *Plant. Mol. Biol.* 5(4): 235-246 (1985)).

Несмотря на то, что настоящее изобретение изложено в данном описании с использованием понятий трансформации одной растительной клетки, для специалиста в данной области очевидно, что способы введения, на которых основано изобретение (за исключением метода микроинъекции), обычно применяют для популяции растительных клеток в виде культуры клеток, каллюса или ткани, полученной из целого растения. Вследствие этого были разработаны различные методики, пригодные для использования вместе с этими методами введения, для идентификации и/или отбора стабильно трансформированных растительных клеток из смешанной популяции трансформированных и не-трансформированных растительных клеток (см. Dekeyser R. и др., "Evaluation of selectable markers for rice transformation", *Plant Physiol.*, 90(1): 217-223 (1989)). Таким образом, эти методики также могут использоваться в данном изобретении. Предполагается, что по отношению к такому компоненту, как экзогенная ДНК, трансформация растительных клеток в соответствии со способом по настоящему изобретению с использованием небиологических методов переноса должна приводить к двум основным типам случаев интеграции: (1) простая инсертация интактного фрагмента экзогенной ДНК, связан-

ного с пограничными последовательностями Т-ДНК, направляемая присутствием протеина(ов), обеспечивающих такие случаи интеграции, и (2) случайная инсертация различных частей и перестановка экзогенной ДНК, характерных для применяемого небиологического метода переноса. Эти два типа случаев интеграции могут быть легко различены при применении к геномной ДНК трансформированных растительных клеток стандартных аналитических методов молекулярной биологии, таких как гибридизация методом Саузерн-блоттинга расщепленной геномной ДНК с использованием фрагмента экзогенной ДНК или его субфрагмента в качестве зонда, и методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), предназначенные для обнаружения присутствия фрагмента экзогенной ДНК в интактной форме. При использовании растительных клеток, которые содержат оба типа случаев инсертации, эти типы могут быть разделены в полученных из них трансгенных растениях с помощью традиционных методов селекции. С использованием этих методов трансгенные растительные клетки или растения, имеющие простую инсертацию интактного фрагмента экзогенной ДНК, связанного с пограничными последовательностями Т-ДНК, полученные в соответствии с описанием настоящего изобретения, могут быть идентифицированы и применяться для получения культур клеток трансгенных растений и/или трансгенных растений и их потомства.

Следует отметить, что настоящее изобретение не ограничено улучшенными системами интеграции, основанными на системе переноса Т-ДНК *Agrobacterium*. Для увеличения частоты случаев простой интеграции в эукариотической клетке, подлежащей трансформации, в соответствии с настоящим изобретением могут быть модифицированы дополнительные системы, в которых используются обеспечивающие интеграцию протеины и узнаваемые последовательности, аналогичные протеинам Vir и пограничным последовательностям Т-ДНК. Например, накопленные данные позволяют предположить, что существует тесная зависимость между переносом Т-ДНК из *Agrobacterium* в растения и опосредуемый плазмидой бактериальной конъюгацией. Было обнаружено сходство последовательностей между: (I) участками одноцепочечных разрывов (ников) Т-пограничных последовательностей и началом переноса *incP*, (II) кластерами генов оперона *VirD* и оперона релаксазы (*TraI/TraJ*). *TraI* и *VirD2*, а также их мишени - участок одноцепочечного разрыва *RP4 oriT* и повторы Т-пограничной последовательности соответственно - обладают значительным сходством (см. WO 88/03564, озаглавленную "Plant Transformation"). В опытах *in vitro* было установлено, что каждого из *TraI* и *VirD2* достаточно для образования одноцепочечных разрывов в одноцепочечных олигонуклеотидах, несущих

соответствующие родственные сайты одноцепочечных разрывов (см. Pansegrouw и др., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90: 11538-11542 (1993)). В присутствии избытка продуктов расщепления TraI и VirD2 также могут катализировать обратную реакцию, соединяя два участка одноцепочечной ДНК. VirD2 также способен катализировать расщепление oriT. Функциональное сходство также обнаружено между протеинами геминивириуса Rep или протеинами, участвующими в репликации бактериальных фагов и плазмид по типу разматывающегося рулона, а также между протеинами, участвующими в переносе ДНК при бактериальной коньюгации или в переносе и интеграции Т-ДНК из *Agrobacterium* в геном растения (Heyraud-Nitschke F. и др., Nucl. Acids Res. 910-916 (1995)).

#### Описание чертежей

На фиг. 1 (А-Б) приведены структуры плазмид, применяемых в экспериментах, описанных в примере 1. Компоненты этих плазмид описаны в разделе “Материалы и методы” примера 1. RB обозначает правую пограничную последовательность длиной 25 пар оснований. Сайты рестрикции обозначены следующим образом: E = EcoRI; P = PstI.

На фиг. 2 представлена схематическая диаграмма плазмиды pNeoRBLuc. LB обозначает левую пограничную последовательность, а RB обозначает правую пограничную последовательность. Прямоугольниками над диаграммой обозначены зонды, применяемые для анализа трансформантов методом Саузерн-блоттинга. Сайты рестрикции обозначены следующим образом: E = EcoRI; P = PstI; X = XbaI; H = HindIII. “NOS” обозначает промотор нопалинсинтазы. “NPTII” обозначает открытую рамку считывания неомицинфосфотрансферазы II. “NOS T” обозначает терминатор нопалинсинтазы. “CaMV 35S” обозначает промотор вируса 35S мозаики цветной капусты (CaMV). “LUC” обозначает открытую рамку считывания люциферазы. “35S T” обозначает терминатор транскрипта CaMV 35S.

На фиг. 3 представлен анализ последовательности сайтов растительной ДНК-мишени после трансформации с помощью плазмид pNeoRBLuc, p35SD1 и p35SD2. Номера соответствуют номерам, обозначающим клонамишени. Правая пограничная последовательность, входящая в pNeoRBLuc, написана прописными буквами (ряд соединительного участка Rb). Растительные последовательности-мишени фрагментов 1, 2а, 3 и 5 соответственно обладают 100%-ной гомологией с PSII10 табака (X62426; 908 нуклеотидов), 100%-ной гомологией с NtpII табака (X70088; 573 нуклеотида), 100%-ной гомологией с рибулозо-1,5-бифосфаткарбоксилазой табака (X02353; 2174 нуклеотида) и 80%-ной гомологией с хлорофиллсвязывающим протеином петуни (M21317; 1013 нуклеотидов).

На фиг. 4 (А-Е) представлены карты плазмид, применяемых в примерах 3 и 4. Используемые сокращения описаны в разделе “Материалы и методы” примера 3.

На фиг. 5 (А-Б) представлены схематические изображения плазмиды pwAdhD1, pwAdhD2, pwBarRBLuc и pBARRBLuc, применяемых в примере 5.

На фиг. 6 - схематическое изображение плазмиды pCIB1711 (см. пример 1).

На фиг. 7 - схематическое изображение плазмиды pCIB1711deltaB (см. пример 7).

На фиг. 8 - схематическое изображение плазмиды pCIB1711deltaB-H,N (см. пример 7).

На фиг. 9 - схематическое изображение плазмиды pCIB1711-H,N-B (см. пример 7).

На фиг. 10 - схематическое изображение плазмиды pCIB1711-H,N (см. пример 7).

На фиг. 11 - схематическое изображение плазмиды pBS-NC (см. пример 7).

На фиг. 12 - схематическое изображение плазмиды pBS-NC-RB (см. пример 7).

На фиг. 13 - схематическое изображение плазмиды UbiPATdl (см. пример 7).

На фиг. 14 - схематическое изображение плазмиды LB.UbiPATdl (см. пример 7).

На фиг. 15 - схематическое изображение плазмиды pAVM1 (см. пример 7).

На фиг. 16 - схематическое изображение плазмиды p35SD2 (см. пример 8).

На фиг. 17 (А-Б) - схематическое изображение получения фрагментов А-С из EcoRI-фрагмента p35SD2, содержащего открытую рамку считывания virD2 (см. пример 8).

На фиг. 18 - схематическое изображение плазмиды pTC182 (см. пример 8).

На фиг. 19 - схематическое изображение плазмиды pTC182-A (см. пример 8).

На фиг. 20 - схематическое изображение плазмиды pTC182-A-B (см. пример 8).

На фиг. 21 - схематическое изображение плазмиды pUC21 (см. пример 8).

На фиг. 22 - схематическое изображение плазмиды pC21-X (см. пример 8).

На фиг. 23 - схематическое изображение плазмиды pUC21-C (см. пример 8).

На фиг. 24 - схематическое изображение плазмиды pUC21-virD2 (см. пример 8).

На фиг. 25 - схематическое изображение плазмиды T7polyA (см. пример 8).

На фиг. 26 - схематическое изображение плазмиды T7virD2polyA (см. пример 8).

#### Примеры

В настоящем описании использованы стандартные методики рекомбинантной ДНК и молекулярного клонирования, хорошо известные в данной области и описанные у J. Sambrook, E.F. Fritsch и T. Maniatis, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989), и у T.J. Silhavy, M.L. Berman и L.W. Enquist, “Experiments with Gene Fusions”, Cold

Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984).

Пример 1. “Агролистическая” трансформация растительных клеток: интеграция Т-цепей, образованных в растении после биобаллистического введения генов VirD1 и VirD2 и пограничного с Т-ДНК селектируемого маркерного гена.

#### А. Краткое содержание.

Вирулентные гены VirD1 и VirD2 необходимы для вырезания Т-цепей из Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* перед введением в растительные клетки-хозяева, где Т-ДНК встраивается в ядерную ДНК растения. Для выявления связывания и/или сайтспецифического одноцепочечного расщепления пограничной последовательности Т-ДНК в растениях с помощью VirD1 и VirD2 применяли биобаллистическое введение плазмидных ДНК. Золотые микроснаряды покрывали смесью трех плазмид, содержащих соответственно кодирующие области VirD1 и VirD2, находящиеся под контролем промотора CaMV35S, и тестируемый ген, содержащий правую пограничную последовательность, встроенную между промотором CaMV35S и кодирующей областью люциферазы. Для оценки целостности и способности к транскрипции тестируемого гена измеряли кратковременную экспрессию гена люциферазы. В клетках табака и кукурузы кратковременная экспрессия гена люциферазы в значительной степени ингибировалась при совместном введении плазмид, содержащих VirD1 и VirD2. Ингибирование возрастало при увеличении соотношения плазмид, содержащих гены VirD, и плазмиды, содержащей тестируемый ген. Выраженное ингибирование происходило только при одной ориентации пограничной последовательности, т.е. при ориентации, которая могла привести к одноцепочечному разрыву с помощью VirD2 цепи ДНК, которая является матрицей для мРНК люциферазы. Действие одного VirD1 или одного VirD2 оказалось менее выраженным. Биобаллистическое введение трансформирующего вектора с селектируемым маркером и тестируемым геном люциферазы вместе со смесью плазмид, содержащих VirD, привела к получению среднего количества “агролистических” вставок (инсерций), у которых правые участки на стыке с ДНК растения имели точно такую же последовательность, которая ожидалась для случаев Т-ДНК-вставки. В некоторых трансформированных линиях были обнаружены как биобаллистические вставки, так и “агролистические” вставки.

#### Б. Введение.

Введение гена с помощью бомбардировки частицами стала общепринятым методом, который нашел широкое применение при трансформации растений (см. обзор Ahl Goy и Duesing, 1995). Например, с помощью этого метода была получена кукуруза, устойчивая к мотыльку ку-

курузному (Koziel и др., 1993). При создании продукта должно учитываться строение и количество копий трансгенов, а также их стабильность. Наиболее предпочтительный продукт должен иметь одну простую вставку и не иметь чужеродных ДНК плазмидных векторов. Однако при трансформации растения путем бомбардировки частицами наблюдается тенденция к интеграции множественных копий интродуцированных генов, включая плазмидные векторы (Klein и др., 1988; Klein и др., 1989; Gordon-Kamm W.J. и др., 1990; Vasil и др., 1992; Wan Y. и Lemaux P. 1994). Этот способ, вероятно, обеспечивает конкатемеризацию плазмиды, либо до, либо во время интеграции. Множественные копии, встроенные при биобаллистической трансформации, обычно являются генетически связанными и не могут быть расщеплены при последующей селекции.

Множественные копии трансгенов могут привести к нестабильности их экспрессии в результате действия нескольких механизмов (см. обзор Matzke M. и Matzke A., 1995): множественные копии трансгенов могут взаимодействовать, инактивируя друг друга и родственные гены-хозяева с помощью эпигенетических механизмов, называемых, либо “косупрессией”, либо “генетическим молчанием”. Кроме того, гомологичная рекомбинация может привести к генетической нестабильности множественных копий. По этим причинам снижение количества копий встроенных трансгенов должно быть пригодным для поддержания точности воспроизведения интродуцированных генов.

Схема интеграции чужеродных генов, интродуцированных посредством опосредуемой *Agrobacterium* трансформации, обычно значительно отличается от таковой, получаемой при бомбардировке растительных клеток частицами (обзор Chilton, 1993). Количество копий интактных и преобразованных трансгенов, получаемых при биобаллистическом введении, превышает, часто очень значительно, количество копий трансгенов, интродуцированных в растения с помощью системы *Agrobacterium*. *Agrobacterium* обладает развитым механизмом, с помощью которого переносимые гены локализуются на плазмидах, называемых опухолеродными (Ti) или индуцирующими избыточное разрастание корней (Ri) плазмидами (см. обзор Kado, 1993). Определенный сегмент ДНК Ti- или Ri-плазмиды, называемый Т-ДНК (переносимая ДНК), который flankирован на Ti/Ri-плазмиде пограничными последовательностями, состоящими из прямых повторов длиной 25 пар оснований, переносится от бактерии в ядро растительной клетки и интегрируется в хромосомную ДНК растения. Сложный механизм переноса ДНК кодируется серией вирулентных (vir-) генов (см. обзор Zambryski, 1992). Активация vir-генов приводит к образованию сайтспецифических одноцепочечных разрывов внутри

повторов пограничной последовательности Т-ДНК и продуцирует линейную одноцепочечную молекулу ДНК (Т-цепь), соответствующую нижней цепи Т-ДНК. Для образования одноцепочечных разрывов требуются два полипептида, кодируемые опероном VirD: VirD1 и VirD2 (Stachel и Nester, 1986; Stachel и др., 1987; Herrera-Estrella и др., 1988; De Vos и Zambryski, 1989; Durrenberger и др., 1989; Howard и др., 1989; Koukolikova-Nicola и др., 1993). VirD1 проявляет ДНК-релаксирующую активность (Ghai и Das, 1990; Filichkin и Gelvin, 1993), тогда как VirD2 обладает эндонуклеазной активностью, с помощью которой расщепляется нижняя цепь пограничной последовательности (Stachel и др., 1986; Yanofsky и др., 1986; Wang и др., 1987; Albright и др., 1987). В опытах *in vitro* также показано, что очищенный VirD2 специфично расщепляет одноцепочечную ДНК (Pansegrouw и др., 1993; Jasper и др., 1994). Ни суперспиральная, ни релаксированная двухцепочечная ДНК не являются субстратом для расщепления одним VirD2 в опытах *in vitro* (Jasper и др., 1994).

VirD2 оказывается ковалентно присоединенным к 5'-концу ДНК, имеющей одноцепочечный разрыв (Ward и Barnes, 1988; Young и Nester, 1988; Howard и др., 1989), через тирозиновый остаток в положении 29 (Durrenberger и др., 1989; Vogel и Das, 1992; Pansegrouw и др., 1993). Второе расщепление левой пограничной последовательности приводит к высвобождению Т-цепи. Кроме того, Т-цепь покрыта по всей ее длине одноцепочечным связывающим протеином VirE2. VirD2 и VirE2 содержат сигналы ядерной локализации (NLS), которые, по-видимому, управляют Т-цепью в ядре растительной клетки (Herrera-Estrella, 1990; Howard и др., 1992; Shurwinton и др., 1992; Tinland и др., 1992; Rossi и др., 1993). NLS генов VirD2 и VirE2 выявлены в табаке и в кукурузе (Citovsky и др., 1992), но их эффективность зависит от стадии развития ткани. Современные данные подтверждают мнение, что VirD2 может участвовать в лигировании 5'-конца Т-цепи с ДНК растения (Tinland и др., 1995).

В настоящем исследовании предложен новый способ трансформации растения, который объединяет определенные преимущества системы *Agrobacterium* и биобаллистической и других систем введения, для которых доказана высокая эффективность для широкого спектра культурных растений. Он предназначен для интеграции представляющего интерес гена без векторной последовательности, такой как Т-ДНК-вставка, и для контроля за количеством копий. Этот подход состоит в применении растительных кассет экспрессии для совместного введения генов VirD1 и VirD2 и трансформирующей плазмиды, содержащей пограничные последовательности Т-ДНК, фланкирующие селектируемый маркер. Было установлено, что

после биобаллистического введения экспрессируемые в течение определенного периода времени продукты генов VirD1 и VirD2 действительно могут расщеплять пограничные последовательности Т-ДНК в растении и вызывать инсерции Т-ДНК-типа ("агролистические" инсерции).

В. Материалы и методы.

1. Плазмиды.

Строение всех плазмидных вставок, использованных в данном исследовании, представлены на фиг. 1.

Плазмиды pCIB1711 происходят из плазмиды pUB и содержат ген люциферазы светляка, контролируемый промотором вируса мозаики 35S цветной капусты (CaMV35S).

Конструирование pCIB1711

Плазмиды pCIB1711 содержат ген люциферазы, связанный с сигналами экспрессии 35S. Родительский вектор pCIB710 (Rothstein и др., 1987) модифицировали до инсерции гена люциферазы, удаляя уникальные сайты рестрикции PstI и NarI. Сайт PstI, локализованный против хода транскрипции относительно промотора CaMV, удаляли путем расщепления в соседних сайтах рестрикции Sall и SphI и лигирования с синтезированным линкером [5'-TCGACATG-3'] для восстановления сайта Sall и удаления сайтов SphI и PstI. Сайт NarI, локализованный на 3'-конце полиаденилированных последовательностей CaMV, удаляли путем расщепления с помощью NarI и NdeI, вырезая фрагмент длиной 52 пары оснований, с последующим разложением фрагментом Кленова и лигированием тупых концов. Плазмиды pJD204 (Ow и др., Science, 234: 856-859 (1986)) и pDO0432 (De Wet и др., Mol. Cell Biol., 7(2): 725-737 (1987)) были получены от Dr. Donald Helinski и Dr. Steve Howell соответственно. Фрагмент HindIII-BamHI длиной 1826 пар оснований из pJD204, содержащий ген люциферазы, фрагмент длиной 22 пары оснований 5'-UTR ДНК гена люциферазы, фрагмент длиной 130 пар оснований 3'-конца этого гена, лигировали с синтетическим линкером, созданным из олигонуклеотидов 5'-GATCCCTGCAGA-3' (SEQ ID NO: 3) и 5'-AGCTTCTGCAGG-3' (SEQ ID NO: 4) в сайте BamHI плазмиды pCIB710 таким образом, чтобы он находился между промотором 35S и сигналами полиаденилирования.

В результате инсерции фрагмента гена люциферазы в модифицированный вектор pCIB710 получали pCIB1701. Плазмиду pCIB1711 конструировали путем разложения pCIB1701 с помощью PstI и NarI и лигирования образовавшейся плазмиду с линкером R5B1, содержащим лидерную последовательность и 5'-конец гена.

Линкер R5B1 состоит из фрагмента, полученного из следующих комплементарных олигомеров:

5'-ATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTCCCTCT  
ATATAAGGAAGTTCATTTCAATTGGAGAGGGATCCCTGCAGGACACGCTGAAATCACCAG  
TCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATG-3'  
(SEQ ID NO: 5) and  
5'-GATCCATAGAGAGAGATAGATTCTGAGAGAGACTGGTGATTTCAGCGTGCTCTGCAGG  
GATCCCTCTCCAAATGAAATGAACCTCTTATATAGAGGAAGGGCTTGCGAAGGGATAG  
GGGATTCGCTCATCCCTTACGTCAGTGGAGAT-3'  
(SEQ ID NO: 6).

Для интродукции пограничных последовательностей Т-ДНК два синтетических олигонуклеотида, соответствующих правой пограничной последовательности LBA5269 (Van Haaren и др., 1989), ренатурировали, получая дуплекс: 5'-ATCCGGCAGGATATACCGTTGTAATTCTGCA-3' (SEQ ID NO: 7). Этот дуплекс, flankированный сайтами BamHI-PstI, встраивали в соответствующие сайты pCIB1711 между промотором и последовательностью, кодирующей люциферазу, получая pRB(+)Luc. В плазмиду pRB(-)Luc интродуцировали правую пограничную последовательность в обратной ориентации относительно промотора. Плазмida pNeoRBLuc была сконструирована для стабильной трансформации супензионных клеток табака, и она содержит левую пограничную последовательность, ген неомицинфосфотрансферазы (nptII) и ген люциферазы вместе с правой пограничной последовательностью, встроенной между промотором и кодирующей областью люциферазы из pRB(+)Luc (фиг. 2). Ген nptII, находящийся под контролем промотора nos (ногалинсингтаза), вырезали из плазмиды pBin19 в виде фрагмента SacII-HindIII длиной 2,2 т.п.н. (Bevan, 1984). Левую пограничную последовательность вырезали из плазмиды pBin19 в виде фрагмента BglII-EcoRI. Оба эти фрагмента встраивали в сайты XbaI-HindIII плазмиды pRB(+)Luc. Плазмida pNeoLuc эквивалентна плазмиде pNeoRBLuc, но у нее отсутствует правая пограничная последовательность, встроенная между промотором CaMV35S и кодирующей областью люциферазы.

Гены VirD1 и VirD2 из плазмиды pTiA6 склонировали в векторе экспрессии pMF6 (Callis и др., 1987), состоящем из промотора CaMV35S (0,5 т.п.н.) и первого интрана Adh1 (0,5 т.п.н.) и области полиденилирования ногалинсингтазы (nos) (0,25 т.п.н.) (фиг. 1). Фрагмент EcoRI-PstI длиной 0,6 т.п.н. из pAD1187 (Ghai и Das, 1989), соответствующий кодирующей последовательности VirD1, клонировали в векторе pMF6, получая p35SAdhD1. Кодирующую последовательность VirD2 вырезали в виде EcoRI-фрагмента длиной 1,8 т.п.н. из pAD1190 (Ghai и Das, 1989) и клонировали в pMF6. Полученные плазмиды p35SAdhD2 и p35SAdhD2(rev) несли кодирующую область VirD2 либо в смысловой, либо в антисмысловой ориентации. Для опытов с тканями табака последовательность первого интрана Adh1 изымали путем делеции из p35SAdhD1, p35SAdhD2 и p35SAdhD2(rev), создавая плазмиды p35SD1, p35SD2 и p35SD2(rev) соответственно.

Плазмida pGUS происходит из pUC и содержит кодирующую последовательность гена β-глюкуронидазы (GUS) под контролем промотора CaMV35S и интрана гена каталазы клещевины обыкновенной (Ohta и др., 1990).

## 2. Растворительный материал.

### Супензионные клетки кукурузы

Супензионные культуры кукурузы (*Zea mays* L.) первоначально получали из хранившегося в криогенных условиях эмбриогенного каллюса типа II, взятого из незрелых зародышей элитной линии, родственной B73. Приблизительно 1 г хранившегося в криогенных условиях каллюса (DiMaio и Shillito, 1992) добавляли к 50 мл жидкой среды N6 (Chu и др., 1975), дополненной 30 г/л сахарозы и 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты (2,4-Д) (2N63S). Культуры инкубировали при 25°C в темноте на орбитальном шейкере при 150 об/мин. Супензионные культуры пересевали каждые 7 дней путем переноса 1 мл клеточной массы в 50 мл свежей жидкой среды 2N63S.

Супензии клеток кукурузы для опытов с использованием бомбардировок отбирали из 3-дневных культур, выращенных ускоренным методом. Перед бомбардировкой приблизительно 0,5 мл клеточной массы фильтровали под вакуумом через 7-сантиметровые фильтры (Whatman №4). Затем фильтры переносили на отверженную герлитом среду N6, содержащую 120 г/л сахарозы. Посеянные клетки выдерживали перед бомбардировкой в течение 4 ч при 25°C. После бомбардировки пластины инкубировали при 25°C в течение 24 ч.

### Супензионные клетки табака

Линию клеток *Nicotiana tabacum* NT-1 (An, 1985) выращивали в среде Murasiga и Skoog (Murashige и Skoog) (MS-среда), дополненной 2 мл/л 2,4-Д и сахарозой (30 г/л) (MS3S). Клетки пересевали один раз в неделю, добавляя 5 мл инокулята к 100 мл свежей среды в колбы объемом 500 мл. Колбы инкубировали при 27°C на роторном шейкере при 125 об/мин. Аликовты по 0,5 мл четырехдневных культур наносили на стерильные фильтры (Whatman №4), которые затем переносили на MS-среду, дополненную 12% сахарозы, и выдерживали перед бомбардировкой при комнатной температуре в течение 4 ч.

## 3. Бомбардировка растительных клеток.

Ткани подвергали бомбардировке золотыми микроснарядами, на которые была осаждена смесь плазмид. ДНК плазмиды pGUS применяли в качестве внутреннего контроля во всех экспериментах с использованием клеток кукурузы и табака. Для экспериментов по совместной трансформации использовали золотые частицы, которые несли либо равную массу ДНК всех плазмид (по 0,5 мкг ДНК каждой плазмиды на пластину-мишень), либо смесь плазмид, несущих гены VirD1 и VirD2, и плазмиды-субстрата

в молярном соотношении 2:1. Для экспериментов по стабильной трансформации использовали смеси для совместной трансформации, содержащие смесь плазмид, несущих гены VirD1 и VirD2, и плазмиды с отбиаемым геном pntII в молярном соотношении 5:1. Каждая аликвота смеси плазмид, которой бомбардировали пластину-мишень, состояла из 0,1 мкг селектирующего маркера и по 0,5 мкг каждой из ДНК плазмид p35SD1 и p35SD2. Соответствующие количества каждой ДНК смешивали в полном объеме 10 мкл и осаждали с помощью 50 мкл 2,5М CaCl<sub>2</sub> и 20 мкл 0,1М свободного от спермидина основания для осаждения на 50 мкл золотых микроносителей размером 1,0 мкм (60 мг/мл). Бомбардировку микроснарядами проводили с помощью биобаллистического приспособления типа PDS-1000 He (фирма DuPont) с использованием дисков, разрушаемых при давлении 1500 фунтов/кв. дюйм, помещая образец на 8 см ниже задерживающей экранирующей полки.

4. Стабильная трансформация суспензионных клеток табака.

Через 24 ч после бомбардировки клетки табака переносили на пластины со средой MS3S с 300 мкг/мл канамицина. Отдельные микрокаллюсы, появившиеся приблизительно через 3 недели после бомбардировки, переносили на пластины со свежей средой, дополненной 300 мкг/мл канамицина. После двух пересевов на эту же среду инициировали рост суспензионных культур, инокулируя приблизительно 100 мкг клеток табака в 25 мл жидкой среды, дополненной 300 мкг/мл канамицина.

5. Оценки кратковременной экспрессии.

Люциферазу анализировали в экстрактах ткани в соответствии с рекомендацией поставщика (Luciferase assay system, фирма Promega).  $\beta$ -Глюкуронидазную активность определяли хемолюминисцентным методом с помощью набора GUS-Light (фирма Tropix). Люциферазную и  $\beta$ -глюкуронидазную активности выражали в виде единиц света, обнаруживаемого прибором Analytical Luminescence model 2001 Luminometer, проинтегрированного в течение 10 с при 25°C.

6. Экстракция ДНК и гибридизация методом Саузерн-блоттинга.

Культуры клеток собирали фильтрацией через 10 дней после инокуляции и замораживали в жидком азоте. ДНК выделяли, как описано у Hall и др., 1991.

Для разложения с помощью EcoRI использовали приблизительно 5 мкг геномной ДНК. После разделения на 0,7%-ном агарозном геле ДНК переносили на генное сито плюс мембрану и гибридизацию проводили в соответствии с условиями, описанными у производителя (NEN Research Products, DuPont). ДНК-зонды метили с помощью [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]дЦТФ, используя набор для метки олигонуклеотидов фирмы Pharmacia. Зонд

neo соответствовал PstI-фрагменту длиной 2 т.п.н. гена pntII (фиг. 2). Зонд luc соответствовал XbaI-EcoRI-фрагменту длиной 0,7 т.п.н. гена люциферазы (фиг. 2). Для удаления зондов мембранны промывали 0,1%-ным раствором ДСН (додецилсульфат натрия) при 100°C в течение 5 мин.

7. Клонирование соединительных участков Т-ДНК/растительная ДНК.

ДНК (30 мкг) из каллюса трансгенной линии табака разлагали с помощью EcoRI и подвергали препартивному электрофорезу на 1%-ном агарозном геле Sea-plaque (агароза с малой степенью эндоосмоса и пониженными температурами плавления и затвердевания) (FMC). Из геля вырезали кусочки агарозы, соответствующие по размеру фрагментам, предназначенным для клонирования, и ДНК экстрагировали из агарозы с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (фирма Qiagen). Затем фрагменты клонировали в дефосфорилированном сайте EcoRI плазмиды pUC19. Для трансформации клеток E.coli HB101 с помощью электропорации применяли лигированные смеси. Колонии, содержащие плазмиды с правильной инсерцией, выявляли с помощью гибридизации колонии на фильтре, используя в качестве зонда фрагмент длиной 0,5 т.п.н. промотора CaMV35S. Последовательность участка на стыке ДНК донорной плазмиды и растительной ДНК анализировали, используя праймер 5'-CCACTATCCTTCGC AAGACC-3' (SEQ ID NO: 8), локализованный в промоторе CaMV35S на расстоянии 106 пар оснований от правой пограничной последовательности.

Г. Результаты.

1. Экспериментальное конструирование.

Для изучения вопроса о том, могут ли продукты генов VirD1 и VirD2 вызывать одноцепочечный разрыв в пограничной последовательности Т-ДНК при экспрессии в растительной клетке, конструировали плазмиду pRB(+)-Luc, содержащую между промотором и кодирующей последовательностью гена люциферазы пограничную последовательность Т-ДНК, являющуюся субстратом. Инсерция правой пограничной последовательности между промотором CaMV35S и кодирующей последовательностью гена люциферазы не влияет на экспрессию гена люциферазы в растительных тканях (данные не приведены). Пограничную последовательность располагали таким образом, чтобы сайтспецифический одноцепочечный разрыв, вызванный продуктами генов VirD1 и VirD2, мог привести к разрыву цепи ДНК, являющейся матрицей для мРНК люциферазы, и тем самым снизить производство транскрипта люциферазы и фермента. После совместной бомбардировки растительных клеток плазмидой pRB(+)-Luc и плазмидами, несущими гены virD, любые одноцепочечные разрывы в пограничной последовательности могли быть количественно оценены путем из-

мерения люциферазной активности. Однако любое уменьшение люциферазной активности также может быть объяснено присоединением продуктов генов VirD1 и VirD2 к пограничной последовательности, локализованной между промотором и кодирующей последовательностью, что может ингибировать транскрипцию гена люциферазы. С целью определить, какое из двух предположений имеет место, изучали плазмиду pRB(-)Luc, которая содержит пограничную последовательность в обратной ориентации по отношению к промотору. Если уменьшение люциферазной активности является результатом связывания продукта(ов) гена(ов) VirD с пограничной последовательностью, то это снижение, вероятно, должно наблюдаться даже тогда, когда пограничная последовательность находится в обратной ориентации.

Поскольку протеины VirD1 и VirD2 должны продуцироваться в течение небольшого промежутка времени в подвергнутых бомбардировке растительных клетках до того, как они могут вызвать одноцепочечный разрыв пограничной последовательности, любой такой одноцепочечный разрыв, по-видимому, должен иметь место после того, как транскрипция гена люциферазы уже началась. Следовательно, измерения люциферазной активности, вероятно, могут занижать оценку активности VirD1 и VirD2 в растительных клетках.

Для экспрессии генов VirD1 и VirD2 в растительных клетках соответствующие им открытые рамки считываивания (OPC) помещали под контроль промотора CaMV35S. В качестве контроля OPC гена VirD2 также встраивали в антисмысловой ориентации по отношению к промотору. Поскольку известно, что присутствие инtrona 1 спиртовой дегидрогеназы 1 кукурузы увеличивает экспрессию генов кукурузы (Callis и др., 1987), для использования в экспериментах по кратковременной экспрессии в клетках кукурузы также были сконструированы плазмиды p35SAdhD1 и p35SAdhD2 (содержащие инtron, встроенный между промотором и кодирующей областью OPC генов VirD1 и VirD2 соответственно). Плазмиду, экспрессирующую ген  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS), pGUS, включали в каждую бомбардировку в качестве внутреннего стандарта для контроля эффективности переноса ДНК. Во всех случаях активность репортерного гена выражали в виде отношения активностей люциферазы и GUS с целью скорректировать с учетом вариабельности оценку эффективности введения ДНК.

2. Анализ кратковременной экспрессии для изучения расщепления пограничной последовательности продуктами генов VirD1 и VirD2 в растении.

Клетки кукурузы и табака сначала подвергали кратковременной трансформации с помощью тестируемой плазмиды, вводимой совместно с одним из генов VirD1 и VirD2, для изуче-

ния их способности по отдельности влиять на транскрипцию через пограничную последовательность Т-ДНК. После совместного введения либо ДНК p35SD1, либо ДНК p35SAdhD1 и ДНК pRB(+)Luc в тканях табака и кукурузы наблюдали 80%-ную активность по сравнению с контрольным уровнем активности люциферазы относительно GUS (табл. 1 и 2; см. ниже). Совместное введение ДНК p35SD2 (табак) или ДНК p35SAdhD2 (кукуруза) и ДНК pRB(+)Luc привела к 50%-ной и 80%-ной активности по сравнению с контрольным уровнем активности люциферазы относительно GUS (табл. 1 и 2; см. ниже).

Таблица 1  
Активность VirD1 и VirD2 в супензионных клетках табака

Плазмиды+pGUS	Среднее значение	$\pm$ CO	% от контроля
pRB(+)LUC	1,36	$\pm$ 0,06	-
pRB(+)LUC+p35SD1	0,98	$\pm$ 0,03	72
pRB(+)LUC+p35SD2	0,69	$\pm$ 0,07	50
pRB(+)LUC+p35SD1+p35SD2 (1:1:1)	0,27	$\pm$ 0,05	20
pRB(+)LUC+p35SD1+p35SD2 (1:2:2)	0,14	$\pm$ 0,05	10
pRB(+)LUC+p35SD1+p35SD2(rev) (1:1:1)	1,08	$\pm$ 0,13	80
pRB(+)LUC+p35SD1+p35SD2(rev) (1:2:2)	1,13	$\pm$ 0,08	83
pRB(-)LUC	1,40	$\pm$ 0,14	-
pRB(-)LUC+p35SD1	1,33	$\pm$ 0,13	95
pRB(-)LUC+p35SD2	1,19	$\pm$ 0,12	85
pRB(-)LUC+p35SD1+p35SD2	1,56	$\pm$ 0,38	112

Таблица 1. Активность VirD1 и VirD2 в клетках табака. Конструкции плазмид представлены на фиг. 1, их вводили в клетки табака с помощью устройства для биобаллистического введения. Числа в скобках показывают молярное соотношение плазмид. После инкубации в течение 24 ч ткани гомогенизировали и определяли ферментативные активности. Активности выражали в виде отношения активностей люциферазы (Luc) и  $\beta$ -глюкуронидазы (Glu). Проводили анализ независимых бомбардировок и данные выражали в виде средних значений  $\pm$  повторностям  $\pm$  стандартное отклонение (CO). Значения в % к контролю определяли из отношения активностей люциферазы и  $\beta$ -глюкуронидазы к этим же активностям, полученным для контрольной плазмиды.

Таблица 2  
Активность VirD1 и VirD2 в супензионных клетках кукурузы

Плазмиды+pGUS	Среднее значение	$\pm$ CO	% от контроля
pRB(+)LUC	1,26	$\pm$ 0,27	-
pRB(+)LUC+p35AdhD1	1,32	$\pm$ 0,28	105
pRB(+)LUC+p35AdhD2	1,02	$\pm$ 0,15	81
pRB(+)LUC+p35AdhD1+p35AdhD2 (1:1:1)	0,11	$\pm$ 0,03	8,7
pRB(+)LUC+p35AdhD1+p35AdhD2 (1:2:2)	0,006	$\pm$ 0,007	0,5
pRB(+)LUC+p35AdhD1+p35AdhD2(rev) (1:1:1)	0,99	$\pm$ 0,20	78,6

pRB(+)LUC+p35AdhD1+ p35AdhD2(rev) (1:2:2)	0,96	$\pm 0,26$	76
----------------------------------------------	------	------------	----

Таблица 2. Активность VirD1 и VirD2 в клетках кукурузы. Активности выражены в соответствии со сноской к табл. 1.

Два гена *vir* вместе, по-видимому, обладают синергетическим действием. Совместное введение с помощью биобаллистического устройства равных количеств ДНК pRB(+)Luc и обеих плазмид, несущих гены VirD1 и VirD2 (соотношение 1:1:1), привело к уменьшению люциферазной активности по сравнению с контролем приблизительно на 20% в клетках табака (табл. 1) и на 10% в клетках кукурузы (табл. 2). При более высоком соотношении плазмид, несущих VirD1 и VirD2, и тестируемой плазмиды (2:2:1) люциферазная активность в клетках табака снижалась еще больше, приблизительно до 10% (табл. 1), и до 1% в клетках кукурузы (табл. 2). Аналогичные эксперименты, проведенные с использованием контрольной плазмиды p35SD2(rev) (табак) или p35SAdhD2(rev) (кукуруза) или плазмиды, несущей кодирующую последовательность VirD2 в антисмысловой ориентации, как и ожидалось, дали результаты, аналогичные таковым, полученным при использовании одного VirD1 (табл. 1 и 2). Это свидетельствует о том, что применяемый в качестве внутреннего стандарта ген GUS обеспечивал эффективный контроль за любыми результатами изменения концентрации введенной общей ДНК.

Изменение ориентации пограничной последовательности Т-ДНК в тестируемой плазмиде полностью устраняет или в значительной степени снижает любое воздействие генов VirD1 и/или VirD2 на кратковременную экспрессию гена люциферазы. Когда ДНК плазмиды pRB(-)Luc вводили в ткани табака путем совместной бомбардировки с ДНК плазмид p35SD1 и p35SD2, то не наблюдали заметного снижения люциферазной активности. Совместное введение pRB(-)Luc с каждой из p35SD1 или p35SD2 по отдельности также не привела к заметному снижению люциферазной активности (табл. 1). Эти данные явно свидетельствуют о том, что снижение люциферазной активности, наблюдаемое при использовании тестируемой плазмиды pRB(+)Luc и генов VirD1 и VirD2, являлось результатом специфического для цепи одноцепочечного разрыва на правой пограничной последовательности продуктами гена *vir* аналогично тому, что наблюдалось при использовании *Agrobacterium* (см. обзор Zambryski, 1992).

### 3. Анализ стабильных трансформантов.

Далее осуществляли стабильную трансформацию супензионных клеток табака для определения влияния активности продуктов генов VirD1 и VirD2 на схему интеграции ДНК после совместного введения этих генов с их

ДНК-субстратом с помощью устройства для биобаллистического введения. Для этих экспериментов применяли плазмиду pNeoRBLuc, которая содержит левую пограничную последовательность Т-ДНК, пртII в качестве селектируемого маркера и ген 35SRB(+)Luc, у которого правая пограничная последовательность Т-ДНК встроена между промотором и кодирующей областью люциферазы. В разделе “Результаты” и в приведенном ниже их обсуждении понятием “агролистические случаи” обозначены такие инсерции ДНК в геном табака, которые могут произойти в результате воздействия VirD1 и VirD2 на пограничные последовательности с получением Т-цепи. В противоположность этому понятием “биобаллистические случаи” обозначены такие инсерции ДНК, которые представляют собой процесс, обычно происходящий после введения гена в растительные клетки с помощью устройства для биобаллистического введения. Первым критерием, позволяющим отличить биобаллистические случаи от предполагаемых агролистических случаев, было отсутствие люциферазной активности в трансформированном клоне вследствие исключения кодирующей области Luc при вырезании Т-ДНК из pNeoRBLuc. На молекулярном уровне трансгенны, представляющие собой результат агролистического случая, должны гибридизоваться с зондом neo, но не гибридизоваться с зондом luc. Кроме того, в агролистическом случае последовательность соединительного участка между интродуцированной ДНК и растительной ДНК должна точно соответствовать правому пограничному концу Т-цепи. Оба типа случаев могут иметь место в одной и той же растительной клетке, но такие клоны должны рассматриваться генетически как биобаллистические случаи, поскольку в них присутствует люциферазная активность. Частоту инсерции каждого типа как биобаллистических, так и предполагаемых агролистических случаев исследовали с помощью Саузерн-гибридизации. Супензионные клетки табака подвергали бомбардировке микроснарядами, покрытыми ДНК плазмиды pNeoRBLuc вместе с ДНК p35SD1 и p35SD2 в соотношении 1:5:5. В качестве контроля для бомбардировки также использовали одну плазмиду pNeoRBLuc, а не содержащую пограничных последовательностей контрольную плазмиду pNeoLuc использовали для совместной бомбардировки с p35SD1 и p35SD2. Стабильных трансформантов отбирали на основе их способности расти на среде, содержащей канамицин. В среднем выявлено 40 устойчивых к канамицину клонов на один подвергнутый бомбардировке фильтр, но только один или два каллюса на пластину подвергали дальнейшему анализу. Близкое количество устойчивых к канамицину каллюсов получали после бомбардировки с использованием ДНК только контрольных плазмид pNeoRBLuc или pNeoLuc вместе с ДНК p35SD1 и ДНК p35SD2.

Грубая оценка частоты агролистических случаев может быть сделана по величине отношения общего количества устойчивых к канамицину каллюсов, которые не экспрессируют люциферазу, к общему количеству проанализированных каллюсов. В соответствии с этим критерием частота агролистических случаев составила приблизительно 10%; из 32 проанализированных линий каллюса 3 не проявили люциферазной активности. Как обсуждалось ранее, по-видимому, это количество занижает количество агролистических случаев, поскольку агролистические случаи и биобаллистические случаи могут иметь место в одной и той же клетке.

4. Анализ методом Саузерн-блоттинга контрольных "биобаллистических" случаев.

Проводили гибридизацию методом Саузерн-блоттинга с использованием ДНК из контрольных устойчивых к канамицину линий каллюса, полученных после бомбардировки (I) одной плазмидой pNeoRBLuc и (II) после совместной бомбардировки ДНК плазмиды pNeoLuc вместе с ДНК плазмид p35SD1 и p35SD2. Геномную ДНК разлагали с помощью EcoRI, в результате чего из плазмиды pNeoRBLuc получали фрагмент длиной 3,9 т.п.н., который гомологичен обоим зондам neo и luc (фиг. 2). Когда продукты разложения геномной ДНК гибридизовали с зондом neo, во всех зонах была обнаружена полоса гибридизации предсказанного размера (3,9 т.п.н.), а количество копий интактного фрагмента, полученное на основе сравнения интенсивности гибридизации с таковой для копий в контрольных зонах, варьировало от 1 до более 10 на ядро. Анализ методом Саузерн-блоттинга трансформированных линий, полученных после совместной бомбардировки с использованием ДНК p35SD1 и ДНК p35SD2 и лишенной пограничных последовательностей контрольной плазмиды pNeoLuc, примененных в качестве зондов, показал наличие в этих линиях как интактных, так и преобразованных копий гена pntII. Такие преобразования часто наблюдаются в трансформантах, полученных с помощью устройства для биобаллистического введения.

5. Анализ методом Саузерн-блоттинга возможных агролистических случаев.

Методом Саузерн-блоттинга также проводили анализ мДНК из 16 устойчивых к канамицину линий каллюса, полученных после совместной бомбардировки плазмидой pNeoRBLuc с использованием ДНК плазмид p35SD1 и p35SD2 в качестве зондов гибридизации. Для анализа методом Саузерн-блоттинга случайным образом отбирали 13 линий каллюса из 32, давших положительные результаты в отношении люциферазной активности, а также три клона, для которых было обнаружено, что они не экспрессируют люциферазу. ДНК из положительных в отношении люциферазной активности линий каллюса содержала полосу предсказанного размера

(3,9 т.п.н.), гибридизирующуюся с зондом neo. Количество копий интактного гена pntII, полученное на основе сравнения интенсивности гибридизации с таковой для копий в контрольных зонах, варьировало от 1 до 10 на ядро. Количество обнаруженных копий было существенно меньшим в каллюсах, трансформированных ДНК pNeoLuc совместно с ДНК плазмид p35SD1 и p35SD2.

В ДНК из всех трансгенных каллюсов, которые подвергали бомбардировке ДНК p35SD1 и p35SD2 вместе с pNeoRBLuc, обнаружили полосу, соответствующую 3,4 т.п.н. Было обнаружено, что в этих линиях фрагмент такого размера гибридизуется с зондом VirD2. Фрагмент, использованный для зонда neo, содержал участок терминирующей последовательности, который также присутствовал в конструкциях p35SD1 и p35SD2, и, хотя он представляет собой только 1,2% меченого зонда, в нем может быть большое количество копий вставок гена VirD, и это может дать сигнал заметной величины.

Когда блотты гибридизовали с зондом luc, можно было различить три группы трансгенных линий каллюса: (I) линии каллюса, имеющие вставки, гибридизующиеся с зондом neo и зондом luc, (II) линии каллюса, в которых некоторые вставки, гибридизующиеся только с зондом neo, и некоторые вставки, гибридизующиеся с обоими зондами neo и luc, и (III) линии каллюса, имеющие вставки гибридизующиеся только с зондом neo. Первая группа каллюсов, по-видимому, не содержит агролистических случаев. Вторая группа каллюсов, по-видимому, содержит два типа случаев: наличие агролистических случаев доказывается по присутствию фрагментов длиной 4,8 т.п.н., 4,6 т.п.н. и 5 т.п.н., гибридизующихся с зондом neo, а наличие биобаллистических случаев доказывается по присутствию фрагмента длиной 3,9 т.п.н., гибридизующегося с зондом luc. Третья группа каллюсов содержит только предполагаемые агролистические случаи, что подтверждается их способностью гибридизоваться только с зондом neo. К этой группе относятся три линии каллюса; одна, содержащая полосу гибридизации, соответствующую 3,2 т.п.н., вторая, содержащая две полосы гибридизации, соответствующие 3,8 т.п.н. и 5 т.п.н., и третья, содержащая одну полосу, соответствующую 5,5 т.п.н. Эти три схемы гибридизации были уникальными, ясно характеризующими независимые случаи трансформации отдельной клетки.

Из 16 трансгенных линий табака, проанализированных с использованием Саузерн-гибридизации, в 10 обнаружены биобаллистические случаи, в 3 обнаружены предполагаемые агролистические случаи и в 3 обнаружены оба этих варианта.

6. Молекулярный анализ предполагаемых агролистических случаев.

Природу предполагаемых случаев агролистической инсекции окончательно подтверждают путем определения последовательности соединительного участка между интегрированной ДНК и растительной ДНК в линиях каллюсов, у которых обнаружены схемы гибридизации, согласующиеся с такими предполагаемыми случаями. Клонировали и секвенировали фрагменты ДНК из этих линий каллюсов, содержащие эти соединительные участки, расположенные снаружи от внутренних пограничных последовательностей Т-ДНК (см. описание методов). Анализ нуклеотидных последовательностей подтвердил, что каждый из этих фрагментов содержал последовательность, характерную для соединительного участка: правая пограничная последовательность/растительная ДНК. Правый конец Т-ДНК был идентичен сайту одноцепочечного разрыва правой пограничной последовательности Т-ДНК.

Растительная нуклеотидная последовательность в четырех случаях из пяти точно совпадала с последовательностями соединительных участков табака, которые ранее были описаны в кДНК другими авторами. Интересно отметить, что во всех четырех случаях правую пограничную последовательность Т-ДНК встраивают с промотором CaMV35S, ориентированным в антисмысловом направлении относительно растительных генов в областях с высоким содержанием АТ, расположенных около сайта полиденилирования в 5'-нетранслируемой области гена. В сайтах правых соединительных участков не обнаружено ни дополнительных нуклеотидов, ни повторяющихся последовательностей. Не представляется возможным определить, имели ли место какие-либо делеции сайтов-мишней, поскольку не проводили секвенирования левой пограничной последовательности вставки.

В качестве контроля также клонировали фрагменты ДНК, включающие правую пограничную последовательность и участки, прилегающие к ней с каждой стороны, из линий каллюсов, у которых обнаружены схемы гибридизации, согласующиеся с биобаллистическими случаями для фрагментов ДНК. В нуклеотидной последовательности в этих случаях не выявлено никакого соединительного участка на стыке правой пограничной последовательности и растительной ДНК, а правая пограничная последовательность имела практически полную длину и предполагаемую расположенную за ней кодирующую последовательность люциферазы.

#### Д. Заключение.

Вирулентные протеины VirD1 и VirD2, кодируемые Ti-плазмидой, необходимы для образования Т-цепей в *Agrobacterium*. Получено доказательство того, что после интродукции с помощью устройства для биобаллистического введения двух вирулентных генов VirD1 и VirD2 под контролем промотора CaMV35S вместе с плазмидой, несущей пограничные последовательности, происходит образование Т-ДНК в растениях и интеграция в растительные клетки. Приблизительно у 10% трансформированных каллюсов табака обнаружены агролистические инсекции, т.е. ДНК интегрировалась только после воздействия продуктов генов VirD1 и VirD2. Приблизительно у такой же части трансформированных каллюсов обнаружены как случаи агролистических инсекций, так и биобаллистических инсекций. В соединительных участках на стыке трансгена и растительной ДНК в агролистических случаях обнаружено сайтспецифическое расщепление внутри правой пограничной последовательности, что согласуется с известными данными, свидетельствующими о том, что правая пограничная последовательность Т-ДНК заканчивается сразу за первыми тремя нуклеотидами повтора длиной 25 пар оснований (Gheysen и др., 1991; Mayerhofer и др., 1991; Ohba, 1995). Точность интеграции была интерпретирована как результат непосредственного участия VirD2 в процессе рекомбинации в ядре растительной клетки (Tinland и др., 1995).

В настоящем исследовании установлено, что сайты интеграции в агролистических случаях находятся в транскрибуемых областях, и это подтверждает данные о том, что Т-ДНК предпочтительно интегрируется в потенциально транскрибуемые локусы генома у различных видов растений (Koncz и др., 1989; Hermann и др., 1990; Kerbundit и др., 1991), причем Т-ДНК-вставки распределены случайным образом в хромосомах растений (Chu и др., 1986; Wallroth и др., 1986). Хотя интеграция Т-ДНК обычно не коррелирует с большими преобразованиями растительной ДНК, в процессе Т-ДНК трансформации ДНК могут иметь место делеции, инверсии и дубликации последовательностей ДНК растения-мишени. Для изученных в настоящем описании агролистических случаев не было отмечено существенного преобразования сайтов растения-мишени.

Представляет интерес постоянная схема агролистических интеграций, которые происходят рядом с сигнальной последовательностью полиденилирования известных индуцируемых светом и/или фотосинтезирующих генов табака с промотором CaMV35S на правой пограничной последовательности, расположенным в обратной ориентации по отношению к открытой рамке считывания. При такой ориентации инсекция структуры Т-ДНК может привести к образованию антисмылового транскрипта, который может инактивировать экспрессию соответствующего гена табака. Однако указанные фотосинтезирующие гены не требуются для нефотосинтезирующей культуры клеток, такой как NT1.

Данные экспериментов по кратковременной экспрессии, при которой расщепление на правой пограничной последовательности, вероятно, происходит с высокой частотой, показывают, что, по-видимому, был расщеплен боль-

шой процент молекул-субстратов. Неожиданно было обнаружено, что это процентное соотношение не сохраняется при стабильной трансформации. Это может быть объяснено реакцией лигирования правой пограничной последовательности после расщепления VirD2, причем в опытах *in vitro* было установлено, что VirD2 катализирует сайтспецифическую реакцию расщепления-соединения в одноцепочечных олигонуклеотидах, содержащих пограничные последовательности Т-ДНК (Pansegrouw и др., 1993). Другим объяснением может быть отсутствие одноцепочечного связывания VirE2, необходимого для эффективной опосредуемой *Agrobacterium* трансформации. Хотя можно предположить, что имеется эквивалент неспецифическому протеину VirE2, связывающему одну цепь в растительных клетках, который может связывать и защищать Т-цепь, введение гена *virE2* вместе с *VirD1* и *VirD2* может улучшить эффективность выявления агролистических случаев. Следует отметить также недостаток, состоящий в том, что при совместном введении обоих генов *VirD1* и *VirD2* и трансформирующей плазмида с использованием биобаллистического способа введения, они, вероятно, с высокой частотой интегрируются в одних и тех же трансформированных линиях: совместная трансформация происходит очень эффективно при использовании устройства для биобаллистического введения. Эти нежелательные гены представляют собой другой тип чужеродной ДНК. Однако можно предположить, что вследствие своего уникального механизма инсертции они не связываются с "агролистической" вставкой и могут быть удалены при последующей селекции трансгенного растения. Это предположение не может быть изучено при использовании указанных трансгенных клеток NT1, которые не обладают способностью к регенерации.

Система агролистической трансформации обладает несколькими выраженнымими преимуществами: (I) Она может быть непосредственно применена к любой растительной ткани-мишени, чувствительной к способам биобаллистической трансформации. (II) Встроенная ДНК не несет чужеродную векторную ДНК. (III) В этом случае встраивают меньшее количество копий представляющего интерес гена, чем в случае, когда ДНК вводят без генов *VirD1* и *VirD2*. Это должно свести к минимуму наличие гомологичных областей, которые могут вызвать нестабильность.

Таким образом, агролистический подход объединяет лучшие особенности биобаллистического введения с "изяществом" и точностью механизма встраивания Т-ДНК *Agrobacterium*, что позволяет получить новую широко применимую технологию получения трансгенных культурных растений, имеющих сельскохозяйственное значение.

Пример 2. Конструирование растительных кассет экспрессии.

Для создания химерного гена сначала последовательности генов, предназначенные для экспрессии в трансгенных растениях или растительных клетках, объединяют в кассетах экспрессии за соответствующим промотором и в обратном направлении от соответствующего терминатора транскрипции. Затем эти кассеты экспрессии могут быть легко перенесены в растительные трансформирующие векторы, аналогично тому, как описано ниже в примере 3.

#### Выбор промотора

Выбор промотора, применяемого в кассетах экспрессии или в химерных генах, должен определить пространственную и временную схему экспрессии трансгена в трансгенном растении. Выбранные промоторы должны обеспечивать экспрессию трансгенов в определенных типах клеток (таких как эпидермальные клетки листа, мезофильные клетки, клетки коры корня) или в определенных тканях или органах (например, в корнях, листьях или цветках), и этот выбор должен отражать требуемую локализацию экспрессии трансгена. В другом варианте выбранный промотор может обеспечивать экспрессию гена под контролем индуцируемого светом или другого промотора, который регулируется в зависимости от времени. Еще в одном варианте выбранный промотор может регулироваться химическими факторами. Это должно обеспечить возможность индуцировать экспрессию трансгена только тогда, когда это требуется, и вызывать ее путем обработки химическим индуктором.

#### Терминаторы транскрипции

Для применения в кассетах экспрессии пригодны различные терминаторы транскрипции. Они ответственны за окончание транскрипции за трансгеном и за его правильное появления. Пригодными терминаторами транскрипции являются таковые, для которых известно, что они функционируют в растениях, и они включают терминатор 35S CaMV, терминатор *tml*, терминатор нопалинсингтазы, терминатор *E9 rbcS* гороха. Они могут применяться как в однодольных, так и в двудольных растениях.

#### Последовательности для усиления или регуляции экспрессии

Известны многочисленные последовательности, обладающие способностью усиливать экспрессию единицы транскрипции гена, и эти последовательности могут применяться в сочетании с генами по изобретению для усиления их экспрессии в трансгенных растениях.

Было показано, что различные интронные последовательности усиливают экспрессию, в частности в клетках однодольных растений. Например, было обнаружено, что интроны гена *Adh1* кукурузы при интродукции в клетки кукурузы значительно усиливают экспрессию гена

дикого типа под контролем родственного ему промотора. Было обнаружено, что инtron 1 является особенно эффективным и усиливает экспрессию в гибридных конструкциях при слиянии с геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (Callis и др., *Genes Develop.*, 1: 1183-1200 (1987)). В этой же экспериментальной системе инtron гена *bronze1* кукурузы проявляет аналогичное действие по усилению экспрессии (Callis и др., см. выше). Последовательности интрана включали общепринятыми способами в растительные трансформирующие векторы, обычно в составе нетранслируемой лидерной последовательности.

Также известно большое количество нетранслируемых лидерных последовательностей, происходящих из вирусов, которые усиливают экспрессию. В частности было показано, что лидерные последовательности из вируса табачной мозаики (TMV, "омега-последовательность"), вируса хлорозной пятнистости кукурузы (MCMV) и вируса мозаики люцерны (AIMV) эффективно усиливают экспрессию (см. Gallie и др., *Nucl. Acids Res.*, 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski и др., *Plant Molec. Biol.*, 15: 65-79 (1990)).

Пример 3. Способ "попал и убежал" ("Hit and Run") для эффективной сайтспецифической рекомбинации введенной биобаллистическим методом ДНК: совместное введение мРНК рекомбиназы.

#### А. Краткое содержание.

Описан метод совместного введения ДНК и мРНК в растительные клетки с использованием устройства для биобаллистического введения. Методом гель-электрофореза была показана стабильность и способность восстанавливаться ДНК и РНК, осажденных на микроснаряды, в различных условиях. Для введения активной мРНК оказалось эффективным осаждение с помощью одного  $\text{CaCl}_2$  или  $\text{CaCl}_2$  плюс спермидин плюс трис-буфер, тогда как незабуференный спермидин приводил к фрагментации РНК.

С использованием эффективных методов осаждения и биобаллистического введения в клетки кукурузы и табака была доказана экспрессия синтезированной *in vitro* кэпированной полиаденилированной мРНК, кодирующей люциферазу светляка. Кинетические исследования показали, что экспрессия мРНК люциферазы достигает максимума раньше, чем происходит кратковременная экспрессия одновременно введенной 35S/ДНК люциферазы.

С целью продемонстрировать активность введенной биобаллистическим методом мРНК, кодирующей сайтспецифическую рекомбиназу *Zygosaccharomyces rouxii* (R), ее вводили в клетки кукурузы совместно со субстратной плазмидой, содержащей обратный промотор 35S, фланкированный инвертированными копиями мишень-специфического сайта рекомбиназы (RS) длиной 31 пары оснований, с расположе-

ными далее областями лидера 35S, гена люциферазы и терминатора 35S. Тогда как при введении только одной субстратной плазмиды не происходило значительной экспрессии люциферазы, при ее совместном введении с мРНК R ее промотор 35S удалялся рекомбиназой, что приводило к продуцированию фермента люциферазы.

В этом примере описана также возможность применения систем на основе сайтспецифической рекомбиназы в виде мРНК для контроля инсерции трансгена и экспрессии с учетом их преимуществ, связанных с кратковременной интродукцией рекомбиназной активности.

#### Б. Введение.

Когда для введения генов в растительные клетки применяют бомбардировку частицами, трансгенная ДНК встраивается в геном случайным образом, обычно в отдельный сайт, содержащий множественные копии (Klein и др., 1988; Klein и др., 1989; Gordon-Kamm W.J. и др., 1990; Vasil и др., 1992; Wan Y. и Lemaux P., 1994). Особенности конструкции, положение вставки и часто возникающее большое количество копий трансгенов могут привести к нестабильности экспрессии в результате нескольких механизмов: например, в результате того, что взаимодействие множественных копий трансгенов инактивирует друг друга посредством антисмыловых механизмов или вследствие метилирования или в результате действия других "приводящих к молчанию" механизмов, которые пока недостаточно изучены (см. обзор Matzke M. и Matzke A., 1995). Поскольку множественные копии трансгенов связаны с одним сайтом инсерции, не представляется возможным снизить количество копий посредством их расщепления в следующих поколениях растений. Как для фундаментальных исследований экспрессии трансгенов, так и для коммерческого производства трансгенных культурных растений для сельскохозяйственного применения улучшение конструкции и экспрессии интродуцированных генов имеет очень большое значение. Сайтспецифические системы рекомбинации могут служить пригодными средствами упрощения схемы инсерции трансгена и даже позволяют направлять их в предварительно выбранный сайт в геноме растения (Albert и др., 1995).

Было показано, что несколько сайтспецифических рекомбиназ обладают активностью в растительных клетках (см. обзор Odell и Russell, 1994): система Cre/lox бактериофага P1, рекомбинантная система FLP/FRT из 2 $\mu$  плазмиды *Saccharomyces cerevisiae* и система R/RS из плазмиды pSR1 *Zygosaccharomyces rouxii* (Matsuzaki и др., 1988). Эти системы обладают потенциальной возможностью для применения вследствие их простоты; являясь полностью работоспособными, они нуждаются только в

одном протеине рекомбиназе (Cre, FLP, R) и в соответствующей им мишени, в определенном коротком сайте рекомбинации (lox, FLP, RS соответственно). Кроме того, частота их рекомбинаций является исключительно высокой. Рекомбиназа посредством реакции рекомбинации может опосредовать три типа преобразований ДНК в зависимости от локализации и ориентации сайтов узнавания. Если фрагмент ДНК связан с двумя сайтами узнавания, которые являются инвертированными по отношению друг к другу, то происходит инверсия внедряющейся ДНК. Если два сайта узнавания находятся в одинаковой ориентации, то происходит вырезание и циркуляризация внедряющейся ДНК. Если сайты узнавания находятся на различных молекулах ДНК, то происходит генетический обмен, а если один из них является круговым, то молекула линейным образом интегрируется в другую.

Сайтспецифическая рекомбиназная активность может применяться для упрощения и направленного встраивания трансгенов, интродуцированных в растения. Однако если эта активность является постоянной, то она может привести к нестабильности рекомбинантной структуры. Поэтому целесообразно, чтобы экспрессия рекомбинантной активности была лишь кратковременной. Это было достигнуто в современных исследованиях, в которых показана направленная интеграция lox-содержащего трансгена в сайт lox в трансгенном растении, экспрессирующем Cre (Albert и др., 1995). Поскольку сайт lox был расположен между промотором и кодирующей последовательностью гена cre, сайтспецифическая рекомбинация инактивировала экспрессию Cre, приводя к стабилизации продукта. По результатам, полученным с помощью Саузерн-гибридизации, все исследованные случаи интеграции были однокопийными. В настоящем исследовании сайтспецифическая рекомбиназная система R/RS была адаптирована для применения вместе с устройством для биобаллистического введения гена. Было показано, что система R/RS эффективно функционирует в клетках табака: когда ген R кратковременно трансформировали в протопласты, продукт этого гена с помощью сайтспецифической инверсии или вырезания ДНК активировал криптический ген глюкуронидазы (GUS) (Onouchi и др., 1992). Согласно настоящему описанию R-рекомбиназа, введенная в клетки кукурузы и табака биобаллистическим методом, функционирует аналогичным образом, хотя и с более низкой эффективностью (эффективность может быть повышена с помощью оптимизации параметров), активируя криптический ген люциферазы путем удаления его промотора. Кроме того, применение мРНК, а не ДНК для продуцирования рекомбиназы гарантирует то, что она будет быстро продуцироваться после интродукции ДНК-субстрата в клетку. Сайт-мишень RS

содержит палиндромную нуклеотидную последовательность длиной 31 пара оснований, состоящую из двух инвертированных повторов длиной 14 пар оснований, разделенных асимметричным центральным участком длиной 3 пары оснований (Matsuzaki и др., 1988). Для получения трансгенных растений целесообразно использовать рекомбиназную мРНК, а не ДНК с той целью, чтобы избежать встраивания R-гена в геном растения и таким образом гарантировать только кратковременную экспрессию рекомбиназы в течение ранних стадий трансформации. Ниже представлен способ совместной интродукции мРНК, кодирующей R-рекомбиназу, и мишени: RS-содержащей конструкции ДНК криптической люциферазы, что вызывает кратковременную рекомбиназную активность, активирующую экспрессию гена люциферазы.

#### В. Материалы и методы.

##### 1. Растительный материал

###### Клетки кукурузы

Суспензионные культуры кукурузы (*Zea mays* L.) первоначально получали из хранившегося в криогенных условиях эмбриогенного каллюса типа II, взятого из незрелых зародышей элитной линии, родственной B73. Хранившиеся в криогенных условиях каллюсы (DiMaio и Shillito, 1992) подвергали быстрому оттаиванию и приблизительно 1 г этого продукта добавляли к 50 мл жидкой среды N6 (Chi и др., 1975), дополненной 30 г/л сахарозы и 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты (2,4-Д) (2N63S). Культуры инкубировали при 25°C в темноте на орбитальном шейкере при 150 об/мин. Суспензионные культуры пересевали каждые 7 дней путем переноса 2 мл клеточной массы в 50 мл свежей жидкой среды 2N63S.

Аликвоты, содержащие по 200 мг клеток, равномерно наносили на стерильные фильтры типа Durapore и помещали на среду 2N6, дополненную 12% сахарозы в качестве осморегулятора. Посевные клетки выдерживали в течение 4 ч при комнатной температуре до бомбардировки и в течение 24 ч после бомбардировки.

###### Клетки табака

Линию клеток *Nicotiana tabacum* NT-1 (An, 1985) выращивали в среде Murashige и Skoog (Murashige и Skoog), дополненной 2 м/л 2,4-Д и сахарозой (30 г/л) (MS3S). Клетки пересевали один раз в неделю, добавляя 5 мл инокулята к 100 мл свежей среды в колбы объемом 500 мл. Колбы инкубировали при 27°C на роторном шейкере при 125 об/мин. Аликвоты по 0,5 мл четырехдневных культур после пересева наносили на стерильные фильтры (Whatman № 4). Затем фильтры переносили на MS-среду, дополненную 12% сахарозы, и выдерживали при комнатной температуре в течение 4 ч до бомбардировки и в течение 24 ч после бомбардировки.

## 2. Плазмиды.

T7LUCA50-матрицу (фиг. 4А) для транскрипции *in vitro* мРНК люциферазы светляка конструировали путем присоединения сначала гена *luc* к промотору T7 с последующим встраиванием фрагмента T7/*luc* в плазмиду, полученную из pUC18, с поли-(A)-вставкой. Для присоединения промотора T7 к кодирующей области *luc* вырезали промотор T7 из pET3 (Rosenberg и др., 1987) в виде *Bgl*III-фрагмента и клонировали в сайте *Bam*HI плазмида pUC19, получая pAT26. Последовательность от +9 до +26 нуклеотида замещали сайтом *Bam*HI путем делеции, осуществляемой с помощью ПЦР, получая pAT27. Фрагмент 35S-лидер-люцифераза, вырезанный из плазмиды pCIB1711 (фиг. 4В, см. ниже), интродуцировали в виде фрагмента *Bam*HI/*Asp*718 в pAT27, получая T7/*luc*. Вставку T7/*luc* из этой плазмиды встраивали в плазмиду pUC18A50X в виде *Xba*I/*Asp*718-фрагмента. Плазмиды pUC18A50X, полученная из плазмиды pUC18, содержит олигонуклеотидную пару с 50 А-остатками, фланкированными выступающими концами *Asp*718(5') и *Hind*III(3'), в которых сайт *Eco*RI превращен в сайт *Xba*I с помощью синтетического олигонуклеотида.

pT7RecA50 (фиг. 4Б) получена из плазмиды pUC18A50X и помимо своей поли-(A)-кодирующей области содержит промотор T7, лидерную последовательность 35S и кодирующую область рекомбиназы. Лидер 35S/фрагмент рекомбиназы из pRec (см. ниже) вырезали в виде фрагмента *Bam*HI/*Asp*718 и лигировали с pAT27, получая pT7Rec. Фрагмент *Xba*I/*Kpn*I из pT7Rec затем встраивали в pUC18A50X, получая pT7RecA50.

pCIB1711 (фиг. 4В) получена из плазмиды pCIB710 (Rothstein и др., 1987), в которую интродуцировали кодирующую область люциферазы из плазмиды pJD204 (De Wet и др., 1987) в виде *Hind*III-*Bam*HI-фрагмента в сайт *Bam*HI вектора с олигонуклеотидным адаптором *Bam*HI/*Pst*I/*Hind*III на 5'-конце, получая pCIB701. У фрагмента промотор 35S/лидер образовавшейся плазмиды обрезали "хвост" до положения сайта *Bam*HI точно в точке инициации транскрипции, замещая его *Eco*RV-*Bam*HI-фрагментом из плазмиды pDO435 (Ow и др., 1986) и получая pCIB1700. Гибрид лидер 35S (50 пар оснований)/лидер люциферазы (22 пары оснований) из pCIB1700 был удален в виде *Pst*I-*Nar*I гена *luc* и замещен синтетическим олигонуклеотидом, соответствующим лидеру 35S длиной 58 пар оснований и началу ОРС гена *luc* (для уточнения деталей этой конструкции см. Carozzi и др., в печати).

pRec (фиг. 4Г) получена из плазмиды pCIB1711, и в ней сохранены промотор 35S, лидер и терминирующая последовательность, но в ней кодирующую область люциферазы заменена кодирующей областью рекомбиназы. Для осуществления этого 5'-конец гена рекомбиназы

из pGAHR (Onouchi и др., 1991) клонировали в виде фрагмента *Bam*HI/*Bgl*III в соответствующих сайтах pSP72 (фирма Promega) и ДНК между сайтами вектора *Xho*I и вставки *Pvu*II замещали на олигонуклеотид 5'-TCGAGTTGCATGCAG-3' (SEQ ID NO: 9) таким образом, что стартовый кодон рекомбиназы (подчеркнут) превращался в сайт *Sph*I. Вектор pCIB1711 был аналогичным образом модифицирован для встраивания сайта *Sph*I на конце лидера 35S следующим образом: фрагмент *Pst*I/*Eco*RI, содержащий промотор 35S/лидерную последовательность, субклонировали в векторе pSGpoly11 для создания уникального сайта *Bam*HI. После разложения с помощью *Bam*HI/*Xba*I интродуцировали линкер, содержащий сайт *Sph*I 5'-GATCGCAGCATG C(CTAG)-3' (SEQ ID NO: 10; указанная в скобках часть соответствует последовательности, комплементарной цепи олигонуклеотида). Образовавшийся модифицированный фрагмент *Pst*I/*Eco*RI возвращали в каркас pCIB1711 с помощью тройного лигирования. Далее ген рекомбиназы интродуцировали вместо гена *luc* с помощью двух последовательных лигирований вследствие наличия внутреннего сайта *Sph*I.

p1RSLuc (фиг. 4Д) получена из плазмиды pCIB1711, и в нее был интродуцирован сайт RS длиной 31 пара оснований между промотором 35S и лидером 35S гена люциферазы. Фрагмент промотора между сайтами *Hind*III и *Pst*I сначала субклонировали в pSGpoly7, получая pSG35S, и в уникальном сайте *Bam*HI лигировали олигонуклеотидную пару, соответствующую следующей последовательности, в которую входит RS (выделена жирным шрифтом) и сайт *Hind*III (подчеркнут):

5'-GATCAAGCTTTGATGAAAGAATACGTTTAT TCTTTCATCAA(GATC)-3' (SEQ ID NO: 11).

Выбирали клон, в котором встроенный олигонуклеотид по данным секвенирования имел по ходу часовой стрелки указанное выше строение, а его RS-содержащий субфрагмент *Xba*I/*Pst*I возвращали в каркас pCIB1711 с помощью тройного лигирования, получая p1RSLuc.

p2RSLuc (фиг. 4Е) получена из плазмиды pCIB1711, и в нее были интродуцированы синтетические сайты RS по обеим сторонам промотора 35S в противоположной ориентации, а встроенный промотор 35S имел противоположную ориентацию по отношению к остальной части гена *luc*. Описанный выше субклон pSG35S промотора 35S разлагали с помощью *Hind*III/*Xba*I и интродуцировали олигонуклеотидную пару, соответствующую следующей последовательности, в которую входит RS (выделена жирным шрифтом) и сайт *Pst*I (подчеркнут):

5'-AGCTACTGCAGTTGATGAAAGAATACGTTTAT TCTTTCATCAA(CTAG)-3' (SEQ ID NO: 12).

Образовавшийся клон разлагали с помощью *Bam*HI и вторую копию RS интродуциро-

вали лигированием в олигонуклеотидную пару, описанную в предыдущем параграфе. Выбирали клон, в котором ориентация второго сайта RS была противоположной таковой первого сайта (т.е. 5'-GATCAAGCTTTGATGAAAG-AATA CGTTATTCTTCATCAA(GATC)-3' (SEQ ID NO: 13, в ориентации против часовой стрелки). Ориентацию палиндромной последовательности RS определяют по подчеркнутому центрально-му асимметричному тринуклеотиду CGT (или ACG на другой цепи). Из образовавшегося клона промотора 2RS вырезали фрагмент HindIII/PstI и возвращали в каркас pCIB1711 с помощью двойного лигирования, изменяя ориентацию фрагмента промотора 35S, с получением p2RSLuc.

#### 3. Синтез мРНК.

Плазмиды T7lucA50 и pT7RecA50 (фиг. 4А и 4Б) линеаризовали с помощью HindIII, делая разрезы сразу после участка поли-(A) по ходу транскрипции. Линеаризованную ДНК экстрагировали фенолом/хлороформом и затем осаждали этанолом. Транскрипцию *in vitro* линеаризованной ДНК проводили с использованием полимеразы T7 из набора T7 Cap-Scribe, содержащего [ $m^7G(5')ppp(5')$ ] (фирма Boehringer). В некоторых экспериментах продукт транскрипции сразу же обрабатывали РНКазой, свободной от ДНКазы (0,03 ед./мл, фирма Worthington Biochemical), в присутствии rRNasin (1 ед./мл, фирма Promega) в течение 5 мин при 37°C и окончательно экстрагировали фенолом/хлороформом и осаждали этанолом. Целостность и концентрацию мРНК определяли с помощью гель-электрофореза на агарозе.

#### 4. Стерилизация биобаллистических носителей.

Частицы золота (размером 1,0 мкм - фирма Biorad, 0,3 мкм - фирма Heraeus) стерилизовали, помещая 60 мг частиц в 100%-ный этанол и 0,1%-ный DEPC. Частицы трижды промывали водой, свободной от РНКазы, и затем ресуспензировали в 1 мл воды, свободной от РНКазы, или в 1 мл лишенного РНКазы 50%-ного раствора глицерина. Для 6 выстрелов использовали аликвоты приготовленных частиц объемом 50 мкл. Макроносители погружали в 100%-ный этанол и 0,1%-ный DEPC, затем трижды промывали в 100%-ном этаноле и сушили на воздухе. Задерживающие экраны автоклавировали.

#### 5. Осаждение нуклеиновой кислоты.

ДНК осаждали на 50 мкл супензии золотых частиц (60 мг/мл) в соответствии с инструкциями фирмы BioRad. мРНК осаждали на 50 мкл супензии золотых частиц в различных, указанных в описании условиях. Все реагенты для осаждения не содержали РНКазы и их добавляли к супензии золотых частиц при непрерывном перемешивании при 4°C. По завершении добавления всех реагентов перемешивание продолжали в течение 3 мин, после чего части-

цы подвергали седиментации путем кратковременного микротрифугирования (1 мин). Супернатант удаляли и частицы однократно промывали холодным 100%-ным этанолом и ресуспензировали в 60 мкл 100%-ного этанола. Эту смесь перемешивали и аликвоты объемом 10 мкл наносили с помощью пипетки на диск макроносителя и давали высохнуть на воздухе в вытяжном шкафу с ламинарным потоком воздуха.

#### 6. Введение микроснарядов в растительные клетки.

Микроснаряды вводили в растительные клетки с помощью ускорителя частиц (прибор типа PDS-1000/He) с использованием дисков, разрушаемых при давлении 1100-1500 фунтов/кв. дюйм, помещая образец на расстоянии 5,5 см от пусковой установки. Экран из нержавеющей стали с размерами пор 100 мкм помещали на середине расстояния между задерживающей пластиною и тканью. Пластины-мишени подвергали бомбардировке 1 раз (клетки табака) или 2 раза (клетки кукурузы).

#### 7. Анализ люциферазы.

Люциферазу определяли в экстрактах ткани с использованием системы для анализа люциферазы фирмы Promega в соответствии с рекомендациями поставщика. Люциферазную активность выражали в виде единиц света, обнаруживаемого прибором Analytical Luminescence модели 2001 Luminometer, при интегрировании в течение 10 с при 25°C. Для вычисления удельной активности определяли концентрацию протеина, используя набор для анализа протеина фирмы Bio-Rad.

#### Г. Результаты.

##### 1. Осаждение интактной мРНК на золотые частицы.

С целью оптимизировать введение мРНК и последующую экспрессию были опробованы несколько методов осаждения мРНК на золотые частицы и проанализированы условия и восстановление мРНК в осадке и супернатанте с помощью электрофореза в агарозных гелях. Фракции были обозначены как "супернатант" (снят пипеткой непосредственно после начальной реакции осаждения), "золотая" (золотые частицы, супензированные в воде после осаждения мРНК) и "водный элюат" (супернатант, полученный после центрифугирования покрытых мРНК золотых частиц, супензированных в воде). Водный элюат оценивали с целью определить насколько легко осажденная мРНК может повторно растворяться после введения в растительную клетку.

При использовании метода осаждения ДНК фирмы DuPont с использованием 1,0M CaCl<sub>2</sub> и 16мM спермидина мРНК сильно разлагалась (данные не приведены). Свободное от спермидина основание, вероятно, вызывает щелочной гидролиз РНК. Поэтому для осаждения мРНК на золотые частицы были изучены раз-

личные концентрации  $\text{CaCl}_2$  (1,0М, 0,3М и 0,07М) без спермидина. При использовании 1,0М  $\text{CaCl}_2$  были получены лучшие результаты и было установлено, что инкубация в течение ночи золотых частиц, покрытых РНК, в 1,0М  $\text{CaCl}_2$  при  $-20^{\circ}\text{C}$  повысила эффективность до 90-100%. мРНК более легко смывалась с частиц в водный элюат после двух промывок этанолом, чем после одной, вероятно, вследствие удаления  $\text{CaCl}_2$ .

2. Кратковременная экспрессия мРНК люциферазы после биобаллистического введения.

С целью определить, может ли мРНК, осажденная на золотые частицы при использовании этого способа, "выжить" после процесса биобаллистического введения и сможет ли она функционировать в растительных клетках в течение короткого промежутка времени, в растительные клетки вводили синтезированную *in vitro* мРНК люциферазы. Лидерную последовательность CaMV35S и поли-(A)-хвост с 50 остатками аденина включали в конструкцию матрицы T7LucA50 для усиления экспрессии люциферазы в растительных клетках. Кэпированную мРНК люциферазы осаждали на золотые частицы с помощью 1,0М  $\text{CaCl}_2$  и инкубировали в течение ночи при  $-20^{\circ}\text{C}$ , а затем частицами бомбардировали суспензии клеток кукурузы и табака. Анализ люциферазной активности проводили через 2, 6 и 24 ч после введения. Результаты приведены ниже в табл. 3. Через 2 ч была выявлена выраженная люциферазная активность. Активность увеличилась через 6 ч, но снизилась через 24 ч. В отличие от этого кратковременная экспрессия ДНК плазиды, содержащей 35S-ген люцифразы (pC1B1711), осажденной на золотые частицы с использованием режима для ДНК фирмы BioRad, оказалась наиболее высокой через 24 ч.

Таблица 3  
Данные о люциферазной активности в клетках табака и в клетках кукурузы после бомбардировки РНК люциферазы. Приведены результаты измерений люциферазной активности (единицы света/мкг протеина) через 2, 6 и 24 ч после бомбардировки

	Название	Время	Табак	Кукуруза
РНК люциферазы	РНК	2 ч	980	2100
		6 ч	5300	2400
		24 ч	700	400
ДНК pC1B1711	ДНК люциферазы	2 ч	78500	1000
		6 ч	198000	6900
		24 ч	1034600	14800
ДНК T7-LucA50	только матрица	6 ч	30	300
без РНК-ДНК		24 ч	0	100

3. Подтверждение функционирования рекомбиназной системы R/RS в кукурузе: инвертированный промотор удаляют, активируя кратковременную экспрессию люциферазы.

С целью изучить, будет ли сайтспецифическая рекомбиназная система R/RS из *Z. rouxii*

функционировать в кукурузе так же, как и по литературным данным она функционирует в табаке (Onouchi и др., 1991), был проведен анализ кратковременной парной экспрессии, при котором рекомбиназа R, экспрессируемая в течение короткого периода времени в клетках кукурузы, требовалась для удаления промотора для того, чтобы активировать кратковременную экспрессию совместно введенного криптического гена люциферазы. В качестве положительного контроля был проведен анализ кратковременной парной экспрессии в клетках табака. Плазиду pRec (фиг. 4Г), содержащую фрагмент 35S-ген рекомбиназы, совместно вводили путем бомбардировки микроснарядами в клетки кукурузы вместе с плазмидой p2RLuc (фиг. 4Е), содержащей криптический ген люциферазы. Удаление промотора из p2RS должно сохранить копию RS (длиной 31 пара оснований) между промотором и геном luc, действие которой на экспрессию luc было неизвестно. Поэтому также конструировали плазмиду p1RSLuc, являющуюся положительным контролем (фиг. 4Д), с целью имитировать ожидаемый продукт p2RSLuc, инвертированный с помощью рекомбиназы. p1RSLuc содержит промотор CaMV35S, ориентированный в нужном направлении, но отделенный одним сайтом RS от лидера и последовательности, кодирующей люциферазу. Было установлено, что уровень экспрессии p1RSLuc близок к таковому для pC1B1711 как в табаке, так и в кукурузе (данные не приведены); таким образом, RS-“след” в гене оказывает только небольшое воздействие на экспрессию luc.

Смесь плазмид p2RSLuc и pRec, а также контрольные плазмиды: одну p2RSLuc, p1RSLuc и p1RSLuc плюс pRec осаждали на золотые частицы в соответствии с протоколом фирмы BioRad и вносили с использованием бомбардировки в клетки табака и кукурузы (табл. 4). В то время как рекомбиназа R в клетках табака активировала ген luc с эффективностью, составляющей через 24 ч, по крайней мере, 4% (ср. 26000 и 597000 ед. света/мкг протеина), в кукурузе, вероятно, процесс был существенно менее эффективным, и его эффективность составляла только 0,27% (ср. 53 и 20000 ед. света/мкг протеина). Обнаружено, что очень низкая активность, выявленная в клетках кукурузы, является достоверной и воспроизводимой. Причины, ограничивающие рекомбиназную активность в кукурузе в этом эксперименте, могут быть ядерного происхождения (медленная транскрипция, сайты неправильного сплайсинга, неспособность мРНК проникнуть в ядро) или цитоплазматического происхождения (прекращение трансляции, использование редкого кодона, нестабильность мРНК и т.д.). Если проблема связана с ядром, можно предположить, что она может быть преодолена с помощью биобаллистического введения мРНК рекомбиназы, которое, вероятно, должно обеспечить

введение транскрипта непосредственно в цитоплазму.

Таблица 4  
Рекомбиназная активность в клетках табака и кукурузы после бомбардировки

Результаты представлены в виде среднего значения со стандартным отклонением люциферазной активности (ед. света/мкг протеина), полученных по 6 повторностям для клеток табака и по 3 повторностям для клеток кукурузы.

	Табак	Кукуруза
без ДНК	16	<1
p2RS <sup>+</sup> luc	1300±2300	4±1
p2RS <sup>+</sup> pRec	26100±2600	53±4
p1RS <sup>+</sup> luc	852000±91000	15700±4100
p1RS <sup>+</sup> pRec	597000±122000	20700±2600

Сайт-мишень для рекомбиназы *Z. rouxii* был предварительно укорочен до области длиной 58 пар оснований (Matsuzaki и др., Molecular and Cellular Biology, 8: 955-962 (1988)), включающей примененную в настоящем описании палиндромную последовательность длиной 31 пара оснований. Полученные результаты свидетельствуют о том, что палиндром длиной 31 пара оснований является достаточным для опосредуемого R-геном удаления промотора криптической люциферазной конструкции по изобретению. Таким образом, эта укороченная последовательность RS является достаточной для сайтспецифической рекомбинации как в клетках табака, так и в клетках кукурузы.

4. Кратковременная экспрессия ДНК люциферазы с помощью рекомбиназной активности мРНК.

мРНК рекомбиназы совместно осаждали с ДНК p2RS<sup>+</sup>luc на золотые частицы в условиях, оптимальных для восстановления РНК: 1,0М CaCl<sub>2</sub> и инкубация в течение ночи при -20°C. Частицы вводили в клетки кукурузы с помощью бомбардировки и люциферазную активность измеряли через 2 и 24 ч после этого. Результаты приведены ниже в табл. 5. Экспрессия люциферазы через 2 ч после бомбардировки была незначительной. Через 24 ч экспрессия люциферазы стала заметной как в случае обработки с использованием мРНК рекомбиназы, так и в случае обработки с использованием ДНК фрагмента с 35S-геном рекомбиназы, полученным из плазмида 2RS с криптическим геном люциферазы. Когда реакция инверсии достигала равновесия, то в этом стационарном состоянии 50% промоторов имели ориентацию "on" и 50% имели ориентацию "off". Таким образом, максимальный ожидаемый уровень экспрессии люциферазы должен составлять 50% от активности в плазмиде p1RS<sup>+</sup>luc. Удаление промотора, контролируемое мРНК, позволило достичь неожиданно высокой эффективности, составляющей 67% от этого теоретического максимума. Эффективность контролируемой ДНК инверсии

также существенно улучшилась, однако чрезвычайно низкий уровень экспрессии p1RS<sup>+</sup>luc показал, что разработанный для мРНК метод осаждения оказался очень неэффективным для ДНК. Поэтому были изучены дополнительные условия осаждения с целью подбора оптимальных компромиссных условий, эффективных как для ДНК, так и для РНК.

Таблица 5  
Активность рекомбиназной мРНК в клетках кукурузы  
Люциферазная активность выражена в виде ед. света/мкг протеина и была измерена через 2 и 24 ч после бомбардировки.

	Название	2 часа	24 часа
p2RS <sup>+</sup> luc	только матрица	5,3	6,4
p2RS <sup>+</sup> luc+pRec	мишень+только матрица	4,5	7,8
p2RS <sup>+</sup> luc+pRec	мишень+рекДНК	6,7	34,8
p2RS <sup>+</sup> luc+pRec	мишень+рекРНК	5,0	15,6
p1RS <sup>+</sup> luc	положительный контроль	37,4	89,6

#### 5. Эффективное совместное осаждение мРНК и ДНК на золотые частицы.

С целью улучшить эффективность совместного введения ДНК и мРНК было пересмотрено применение спермидина в смеси для осаждения, при этом дополнительно был включен трис-буфер с более низким значением pH, по-видимому, позволяющий избежать разложения РНК. В присутствии 50мМ трис-буфера с pH 7,5 ДНК и мРНК совместно осаждали на частицы, используя 1,0М CaCl<sub>2</sub> и 2, 4, 10 или 16мМ спермидин. Эффективность осаждения нуклеиновых кислот оценивали с помощью гель-электрофореза на агарозе, как описано выше. Интактные ДНК и мРНК эффективно осаждались на частицы при всех концентрациях спермидина (данные не приведены). Самая низкая концентрация позволяла достичь большей эффективности при повторном смыве ДНК и мРНК с частиц в воду, что может оказаться предпочтительным для кратковременной экспрессии и трансформации.

Для окончательного уточнения изменения концентрации трис-буфера и при этом определяли эффективность по критерию биологической активности: мРНК Luc осаждали, используя 2мМ спермидин и 5мМ (обработка А) или 50мМ (обработка Б) трис-буфера с pH 7,5, и с помощью бомбардировки вводили в клетки кукурузы. Через 5 ч после бомбардировки уровни кратковременной экспрессии составляли 1,091 и 8000 ед. света/мкг протеина для обработок А и Б соответственно. Более высокая активность мРНК, достигнутая с использованием 50мМ трис-буфера, свидетельствует о 3-4-кратном улучшении осаждения по сравнению с осаждением, проведенным в предыдущих условиях с использованием 1,0М CaCl<sub>2</sub> и инкубации при -20°C в течение ночи (табл. 1).

Обработки А и Б применяли для осаждения мРНК рекомбиназы с ДНК p2RSLuc и их вводили с помощью бомбардировки в клетки кукурузы и табака. Люциферазную активность измеряли через 24 ч, и полученные результаты приведены ниже в табл. 6. Экспрессия ДНК улучшилась при использовании как 5мМ, так и 50мМ трис-буфера, но эти уровни были ниже таковых, достигнутых при использовании процедуры осаждения, рекомендованной фирмой BioRad (табл. 4). При оптимальных для экспрессии мРНК условиях, а именно, при использовании 50мМ трис-буфера, была достигнута наиболее высокая эффективность рекомбиназной активности, которая составила 18,9 и 9,4% для кукурузы и табака соответственно. Хотя рекомбиназная активность оказалась ниже, чем таковая, приведенная в табл. 5, более высокий уровень экспрессии ДНК важен для достижения стабильной трансформации. Сделано заключение о том, что для более высокой экспрессии РНК и ДНК может применяться низкая концентрация спермидина, забуференного трис.

Таблица 6  
Экспрессия мРНК рекомбиназы в клетках табака и кукурузы

мРНК (4 мкг/6 выстрелов), ДНК p2RSLuc (2 мкг/6 выстрелов) и ДНК p1RSLuc (2 мкг/6 выстрелов) вводили с помощью бомбардировки в клетки табака и кукурузы. В контрольных экспериментах использовали мРНК, синтезирующуюся на генах  $\beta$ -глюкуронидазы. Люциферазная активность выражена в виде ед. света/мкг протеина и была измерена через 24 ч после бомбардировки.

	Табак		Кукуруза	
	5мМ	50мМ	5мМ	50мМ
p2RSLuc+ рек мРНК	139±2,8	311±18	19±1,7	20±0,07
p2RSLuc+ мРНК	57±10	34±2	3,5±0,2	3,8±0,9
p1RSLuc+ мРНК	16683± 1460	6644± 1565	426±5	211±40

#### Д. Обсуждение.

В настоящем описании представлен способ совместного введения мРНК и ДНК с помощью бомбардировки частицами, что позволяет осуществить кратковременное действие кодирующего мРНК протеина на молекулу ДНК. Совместное введение мРНК и ДНК позволяет интродуцировать в клетку компоненты, обладающие кратковременным действующими функциями, без осуществления постоянной экспрессии, происходящей при стабильной трансформации. Кодируемая мРНК рекомбиназа активна только в течение короткого периода во время введения. Это подход может использоваться для сайтспецифической интродукции донорной ДНК в сайт RS в геноме растения без осложнения, связанного с экспрессией рекомбиназы в образовавшемся растении.

Как исследования на агарозном геле, так и изучение экспрессии люциферазы показывают,

что условия, предпочтительные для введения ДНК, не являются оптимальными для мРНК и наоборот. Выбирая различные условия осаждения, можно отдавать предпочтение любой из двух нуклеиновых кислот, достигая оптимальных уровней преобразования ДНК в растительной клетке-мишени. Электрофоретический анализ нуклеиновой кислоты на золотых частицах после ее осаждения оказался "изящным" способом количественной и качественной оценки эффективности различных условий осаждения. Этот подход может применяться для дальнейшего окончательного уточнения условий введения нуклеиновой кислоты с помощью бомбардировки частицами. Однако окончательным критерием должна быть биологическая активность, поскольку гель-электрофорез позволяет выявить только крупные повреждения.

Интродуцируемые экзогенные молекулы ДНК по настоящему изобретению конструировали с учетом трех особенностей, которые, как известно, играют определенную роль в эффективной экспрессии транскрипта. К 5'-концу добавляли кэп с той целью, чтобы он действовал в качестве сайта узнавания при связывании эукариотического фактора инициации, наиболее ранней и существенной стадии трансляции. Во время транскрипции *in vitro* на 3'-конце синтезировали поли-(А)-хвост, состоящий из 50 остатков остатков аденина, поскольку неаденилированные мРНК транслируются приблизительно в 100-200 раз менее эффективно по сравнению с их аденилированными копиями в подвергнутых электропорации протопластах табака, моркови, кукурузы и риса (Gallie и др., *Plant cell*, 1989). Также было показано, что эффективность полиаденилированной мРНК усиливается на порядок в присутствии 5'-кэпа (Gallie, 1991). Было показано, что включение нетранслируемой лидерной последовательности CaMV35S усиливает экспрессию в клетках как табака, так и кукурузы (Gallie и др., *Plant cell*, 1989; Dawson Day и др., 1993).

Непосредственное введение мРНК в растительные клетки создает преимущества при изучении клеточных функций. Стабильность мРНК и трансляционная эффективность может быть оценена *in vivo* независимо от факторов транскрипции, процессинга и транспорта в цитоплазму. Доказано, что пригодными и эффективными методами интродукции мРНК в протопласты растений являются электропорация (Higgs и Colbert, 1993) и применение полизиэтиленгликоля (Gallie, *Plant cell reports*, 1993). Однако эти методы введения ограничены протопластами, в то время как биобаллистическое введение широко применимо для многих типов растительных клеток и органов. Протеины, которые могут оказаться ненужными или даже вредными при их стабильной экспрессии в трансгенном растении, могут кратковременно экспрессироваться мРНК, введенной биобаллистическим методом.

Экспрессия рекомбиназы, например, в растениях типа R/RS, может привести к мозаичным схемам эксцизии, тогда как генетические скрещивания, проводимые между растениями, содержащими ген рекомбиназы, и растениями, содержащими сайт-мишень, часто приводят к химерной рекомбинантной активности и мозаичной экспрессии в растениях первого поколения ( $F^1$ ) (Russell и др., 1992; Onouchi и др., 1995).

Для получения улучшаемых в последующем трансгенных конструкций для культурных растениях может быть использована система R/RS для замены новым(и) геном(ами) старых генов точно в месте расположения последних. Таким образом, первая трансгенная кассета и ее селектируемый маркер (фланкированный сайтами RS) могут быть замещены второй кассетой с другим селектируемым маркером. В свою очередь вторая кассета может быть замещена третьей с использованием вновь первого селектируемого маркера. Этот подход должен уменьшить количество требуемых селектируемых маркеров и должен позволить избежать влияния изменения положения трансгенной кассеты.

Применение сайтспецифических систем рекомбинации в растениях открывает возможность лучшего контроля за инсерцией и экспрессией трансгена. Рекомбиназные системы позволяют осуществлять инсерцию в заранее определенное место в геноме и могут позволить избежать так называемых "влияний месторасположения" (Fukushige и Sauer, 1992; Lakso и др., 1992; O'Gorman и др., 1991). Опосредуемые рекомбиназой случаи делеций и инверсий трансгенов дают возможность контролировать экспрессию гена и удалять селектируемые маркерные гены (см. обзор Odell и Russell, 1994). Интродукция рекомбиназной активности в форме мРНК может расширить это применение, увеличивая встречаемость случаев рекомбинации на ранней стадии процесса трансформации и снижая риск возникновения мозаичности. Кроме того, введение мРНК может обеспечить большую степень свободы при конструировании сайтспецифических схем интеграции, что позволяет избежать интродукции рекомбиназной генетической информации в геном.

Пример 4. Совместная бомбардировка с использованием мРНК, кодирующей обеспечивающие интеграцию протеины VirD1 и VirD2, и ДНК в клетки табака и кукурузы.

Как указывалось в разделе "Подробное описание изобретения", можно ожидать, что обеспечивающие интеграцию протеины, введенные в эукариотическую клетку, предназначеннную для трансформации с помощью транслируемой РНК, будут продуцироваться в течение ограниченного периода времени до тех пор, пока не будет разложена транслируемая РНК. Можно ожидать, что полученные с помощью

этой РНК протеины сохранятся в растительной клетке в течение ограниченного периода времени до тех пор, пока они также не будут разложены в результате нормальных клеточных процессов. Такое введение обеспечивающих интеграцию протеины в форме транслируемой РНК представляет собой способ кратковременного введения таких протеинов. Кратковременное введение таких протеинов может оказаться предпочтительным в тех случаях, когда продолжительное присутствие этих протеинов может оказывать нежелательные воздействия. В следующем примере описано такое введение протеинов VirD1 и VirD2 в растительные клетки вместе с фрагментом ДНК, связанным с пограничными последовательностями Т-ДНК. Полученные результаты показывают, что эти протеины Vir обладают способностью продуцироваться и им присуща активность, обеспечивающая интеграцию фрагмента ДНК.

#### Использованный растительный материал Клетки кукурузы

Суспензионные культуры кукурузы (*Zea mays* L.) вначале получали из хранившегося в криогенных условиях эмбриогенного каллюса типа II, взятого из незрелых зародышей элитной линии (2717), родственной B73, и выращивали в жидкой среде N6 (Chu и др., 1975), дополненной 30 г/л сахарозы и 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты (2,4-Д) (2N63S). Культуры инкубировали при 25°C в темноте на орбитальном шейкере при 150 об./мин. Суспензионные культуры пересевали каждые 7 дней путем переноса 1 мл клеточной массы в 50 мл свежей жидкой среды 2N63S. Суспензии клеток кукурузы, применяемые для экспериментов по бомбардировке, были взяты из 3-дневных выращенных ускоренным методом культур. Перед бомбардировкой приблизительно 0,5 мл клеточной массы фильтровали под вакуумом на 7-сантиметровых фильтрах (Whatman № 4).

#### Клетки табака

Линию клеток *Nicotiana tabacum* NT-1 выращивали в среде Мурасига и Скуга (MS-среда), дополненной 2 мг/л 2,4-Д и сахарозой (30 г/л). Клетки пересевали один раз в неделю, добавляя 5 мл инокулята к 100 мл свежей среды в колбы объемом 500 мл. Колбы инкубировали при 27°C на роторном шейкере при 125 об./мин. Аликвоты по 0,5 мл четырехдневных культур после пересева наносили на стерильные фильтры (Whatman № 4). Фильтры затем переносили на MS-среду.

#### Конструирование плазмид

1. Конструирование вектора, содержащего промотор T7 и поли-(A)-хвост.

Полилинкер (*Sph*I-*Eco*RI-*Nhe*I-*Clal*-*Bgl*III-*Asp*718-*Hind*III-*Xho*I-*Hind*\*III, инактивирующий сайт *Hind*III) встраивали в сайты *Sph*I-*Hind*III плазмиды *pT7RecA50* (см. пример 3). Затем в соответствующие сайты встраивали олигонук-

леотид Asp718-A(50)-DraI-HindIII, получая рT7-A50.

2. Конструирование рT7D1A50.

Фрагмент EcoRI-BglIII, содержащий кодирующую область virD1 и предварительно клонированный во фрагменте EcoRI-BamHI плазмида pSG5 (из фрагмента EcoRI-BamHI p35SAdh1D1), встраивали в рT7-A50, разложенную с помощью EcoRI и BglII.

3. Конструирование рT7D2A50.

Два фрагмента EcoRI-BamHI (5'-конец) и BamI-ClaI (3'-конец) кодирующей области virD2 клонировали в EcoRI-ClaI плазмида pT7-A50. 3'-конец сначала клонировали в виде фрагмента BamHI-HaeIII во фрагменте BamHI-EcoRV плазмида pSK, полученной из pBluescript, для его превращения во фрагмент BamI-ClaI.

Синтез мРНК

Плазмида T7D1A50 и T7D2A50 линеаризовали с помощью XhoI, делая разрезы сразу после участка поли-(A) по ходу транскрипции. Линеаризованную ДНК экстрагировали фенолом/хлороформом и затем осаждали этанолом. Транскрипцию *in vitro* линеаризованной ДНК проводили, используя полимеразу T7 из набора T7 Cap-Scribe, содержащего [ $m^7G(5')ppp(5')$ ] (фирма Boehringer). Целостность и концентрацию мРНК, кодирующей VirD1 и VirD2, определяли с помощью гель-электрофореза на агарозе.

Стерилизация биобаллистических носителей

Частицы золота (размером 0,3 мкм - фирма Negaeus) стерилизовали, помещая 60 мг частиц в 100%-ный этанол и 0,1%-ный DEPC. Частицы промывали трижды водой, свободной от РНКазы, и затем ресуспендировали в 1 мл свободного от РНКазы 50%-ного раствора глицерина. Для 6 выстрелов использовали аликвоты объемом 50 мкл приготовленных частиц. Макроносители погружали в 100%-ный этанол и 0,1%-ный DEPC, а затем трижды промывали в 100%-ном этаноле и сушили на воздухе. Задерживающие экраны автоклавировали.

Осаждение нуклеиновой кислоты

ДНК (1 мкг) и мРНК (приблизительно 8 мкг: 4 мкг virD1 и 4 мкг virD2 или 8 мкг неспецифической мРНК в качестве контроля) осаждали на 50 мкл суспензии золотых частиц (60 мг/мл; 0,3 мкм), добавляя последовательно 0,5 мкл трикс-буфера (1М), 50 мкл  $CaCl_2$  (2,5М) и 2,5 мкл 0,1М спермидина. По завершении добавления всех реагентов перемешивание продолжали в течение 3 мин, после чего частицы подвергали седиментации путем кратковременного микротитрифирования (1 мин). Супернатант удаляли и частицы однократно промывали холодным 100%-ным этанолом и ресуспендировали в 60 мкл 100%-ного этанола. Эту смесь перемешивали и аликвоты объемом 10 мкл наносили с помощью пипетки на диск макроносителя и давали высоконуть на воздухе в вытяжном шкафу с ламинарным потоком воздуха.

Введение микроснарядов в растительные клетки

Микроснаряды вводили в растительные клетки с помощью ускорителя частиц (прибор типа PDS-1000/He; DuPont) с использованием дисков, разрушаемых при давлении 1100 фунтов/кв. дюйм, помещая образец на расстоянии 5,5 см от пусковой установки. Экран из нержавеющей стали с размерами пор 100 мкм помещали на середине расстояния между задерживающей пластины-мишени подвергали бомбардировке 2 раза.

Анализ люциферазы

Люциферазу определяли в экстрактах ткани с использованием системы для анализа люциферазы фирмы Promega в соответствии с рекомендациями поставщика. Люциферазную активность выражали в виде единиц света, обнаруживаемого прибором Analytical Luminescence модели 2001 Luminometer, проинтегрированного в течение 10 с при 25°C. Для вычисления удельной активности определяли концентрацию протеина, используя набор для анализа протеина фирмы Bio-Rad.

Результаты

Анализ люциферазной активности проводили через 24 ч после бомбардировки. мРНК virD1 и virD2 вводили с помощью совместной бомбардировки с использованием плазмида p35SRBLuc, которая содержит правую пограничную последовательность, встроенную между промотором 35S и кодирующей последовательностью люциферазы. В контролльном эксперименте p35SRBLuc вводили в результате совместной бомбардировки с неспецифической мРНК. Результаты первого эксперимента приведены ниже в табл. 7. Результаты следующего эксперимента описаны в примере 8 и приведены в табл. 14.

Таблица 7  
Бомбардировка растительных клеток мРНК virD1 и virD2

Числа в скобках обозначают молярное соотношение плазмид и мРНК. В каждом эксперименте с помощью совместной бомбардировки также вводили pGUS. После инкубации в течение 24 ч ткани гомогенизировали и определяли активность ферментов. Активность выражали в виде отношения активности люциферазы (Luc) к активности  $\beta$ -глюкуронидазы (Glu). Анализировали независимые бомбардировки и данные представлены в виде средних значений по 3 повторностям  $\pm$  стандартное отклонение (CO).

	Табак		Кукуруза	
	Среднее значение	$\pm$ CO	Среднее значение	$\pm$ CO
pRB(+)Luc	9,3	$\pm$ 0,4	8,6	$\pm$ 1,0
pRB(+)Luc+ D1 мРНК	7,6	$\pm$ 0,5	8,6	$\pm$ 0,2
pRB(+)Luc+ D2 мРНК	8,4	$\pm$ 0,1	8,3	$\pm$ 0,1

pRB(+)Luc+D1 мРНК+D2 мРНК (1:1:1)	5,6	$\pm 0,1$	6,5	$\pm 0,9$
pRB(+)Luc+D1 мРНК+D2 мРНК (1:2:2)	4,3	$\pm 0,2$	4,7	$\pm 0,4$
pCIB1711	8,8	$\pm 0,8$	10,5	$\pm 1,4$
pCIB1711+D1 мРНК+D2 мРНК (1:1:1)	9,2	$\pm 0,5$	8,9	$\pm 0,3$
pCIB1711+D1 мРНК+D2 мРНК (1:2:2)	8,6	$\pm 0,4$	11,8	$\pm 1,9$

### Заключение

В этом эксперименте наблюдали 50%-ное снижение люциферазной активности после совместного введения мРНК virD1 и мРНК virD2 с ДНК pRB(+)Luc (табл. 7). Введенные в растения в виде мРНК два гена vir, по-видимому, обладают синергетическим действием. Эти данные убедительно доказывают, что обнаруженное снижение люциферазной активности являлось результатом цепьспецифического одноцепочечного разрыва на правой пограничной последовательности, вызванного протеинами VirD1 и VirD2.

Пример 5. Вызванная в растении интеграция Т-цепи в геном кукурузы.

### Краткое содержание

Разработан новый способ трансформации растений, названный в контексте настоящего описания “агролистическим” и позволяющий интегрировать только представляющий интерес ген без всякой векторной последовательности, в виде Т-ДНК-вставок, и регулировать количество копий. Способ состоит в применении растительных кассет экспрессии для вирулентных генов, вводимых совместно с помощью устройства для биобаллистического введения с вектором, содержащим пограничные последовательности Т-ДНК, flankирующие селектируемый маркер. В настоящем исследовании вирус карликовости пшеницы (WDV) выбран в качестве реплицирующего вектора для интродукции экспрессируемых в растении вирулентных генов (virD1, virD2 и virE2) и селектируемого маркера, flankированного левой и правой пограничными последовательностями, в клетки кукурузы. Было обнаружено, что продукты генов virD1 и virD2 действительно могут расщеплять пограничные последовательности Т-ДНК в растении и после биобаллистического введения вызывать случаи инсертции Т-ДНК-типа (“агролистические” случаи).

### Введение

Agrobacterium широко применяют в качестве инструмента для генетической манипуляции или конструирования растительных клеток путем трансформации. Определенную область ее патогенной плазмида, Т-ДНК, переносят и осуществляют интеграцию в геном растения. Т-ДНК ограничена последовательностями прямых повторов длиной 25 пар оснований, называемы-

ми пограничными последовательностями (см. обзор Zupan и Zambryski, 1995). Любая последовательность ДНК, расположенная между Т-пограничными последовательностями, может быть эффективно перенесена из *Agrobacterium* в растительные клетки. Однако перенос и интеграция Т-ДНК ограничены спектром хозяев бактерии, что позволяет эффективно трансформировать большинство двудольных растений и только лишь небольшое число видов однодольных растений (см. обзор Chilton, 1994).

Для устранения недостатка, связанного с ограниченным спектром хозяев *Agrobacterium*, требуется разработать эффективные методы генетической трансформации однодольных растений. Один из возможных методов состоит в получении в растении Т-комплекса путем снабжения растительных клеток всеми “инструментами”, необходимыми для реконструкции комплекса. Этими “инструментами” являются: 1) представляющий интерес ген, flankированный пограничной последовательностью, и 2) вирулентные гены, находящиеся под контролем растительной кассеты экспрессии. Продукты генов virD1 и virD2 необходимы для ключевой стадии процессинга Т-ДНК (см. обзор Zupan и Zambryski, 1995). Протеин VirD2 представляет собой цепьспецифическую эндонуклеазу и при помощи VirD1 специфично узнает пограничные последовательности. После осуществления разреза VirD2 остается ковалентно присоединенным к 5'-концу одноцепочечной ДНК или к Т-цепи. Т-цепь защищена одноцепочечным связывающим протеином virE2. Образовавшийся нуклеопротеиновый комплекс экспортируют в растительную клетку. VirD2 содержит локализованные в ядре сигналы, которые направляют Т-цепь в ядро растительной клетки. VirD2 может участвовать в лигировании 5'-конца Т-цепи с геном растения (Tinland и др., 1995).

В настоящем исследовании вирус карликовости пшеницы (WDV; Ugaki и др., 1987) выбран в качестве реплицирующегося в растениях вектора с целью изучить образование Т-цепей в растении и их интеграцию в геном растения. Причиной использования такого вектора является то, что геминивирусы размножаются в ядрах растительных клеток, давая большое количество копий и обеспечивая высокий уровень экспрессии.

### Материалы и методы

Плазмиды (см. схематическое изображение на фиг. 5)

Плазмиду pCIB1711 получали из плазмиды pUC, и она содержит ген люциферазы светляка, находящийся под контролем промотора вируса 35S мозаики цветной капусты (CaMV35S). Это описано в примере 3.

Для стабильной трансформации супензационных клеток кукурузы конструировали плазмиду pwBarRBLuc, содержащую левую погра-

ничную последовательность, ген Bar (Thompson и др., 1987), находящийся под контролем промотора CaMV35S, и ген люциферазы, причем правая пограничная последовательность встроена между промотором и кодирующей областью гена люциферазы. Ген bar вырезали из pCIB3064 (Koziel и др., 1993) в виде HindIII-EcoRI-фрагмента. Левую пограничную последовательность вырезали из pBin19 в виде BgIII-EcoRI-фрагмента (Bevan, 1984).

Гены virD1 и virD2 из плазиды pTiA6 сначала субклонировали в векторах экспрессии pMF6 (Callis и др., 1987), состоящих из промотора CaMV35S (0,5 т.п.н.), первого интрана Adh1 (0,5 т.п.н.) и области полиаденилирования нопалинсингтазы (nos) (0,25 т.п.н.). Фрагмент EcoRI-PstI длиной 0,6 т.п.н. из pAD1187 (Vogel и Das, 1992) и фрагмент длиной 1,8 т.п.н. из pAD1190 клонировали в векторе pMF6, получая p35SAdhD1 и p35SAdhD2 соответственно. Фрагмент XbaI-NotI из p35SAdhD1, включающий ген virD1 под контролем промотора 35S, субклонировали в сайтах NheI-NotI модифицированной pwi-11. Полилинкер (NheI-NotI-SpeI-KpnI-BglII) интродуцировали в уникальные сайты BamHI-SalII pwi-11 (Ugaki и др., 1987). Фрагмент NotI из p35SAdhD2, содержащий кодирующую область virD2 под контролем промотора 35S, субклонировали в уникальном сайте NotI pwi-11.

Кодирующую область virE2 вырезали из pw108, содержащей фрагмент XhoI длиной 3 т.п.н. из Ti-плазиды pTiA6 Agrobacterium (регистрационный номер X04784) (Winans и др., 1987). Фрагмент SacI-SmaI длиной 687 пар оснований из pw108 сначала клонировали в соответствующих сайтах pBluescript KS- (фирма Stratagene, Inc.), получая pKS3'E2. Фрагмент HaeIII-SacI длиной 924 пары оснований из pw108 объединили с фрагментом SacI-PstI из pKS3'E2 и ренатурированной парой олигонуклеотидов ДНК, flankированных "липкими" концами, образованными при помощи EcoRI, и тупыми концами (5'-AATTCATGGATCTTTCTGGCAATGAGAAATCCAGG-3'; (SEQ ID NO: 14) и клонировали в сайтах EcoRI-PstI pBluescript KS-, получая pKSE2. Фрагмент XhoI-PstI, который включал полную кодирующую область virE2, затем субклонировали в XhoI-PstI вектора pMF6, получая p35SAdhE2. Фрагмент NotI-XbaI, содержащий промотор 35S, инtron Adh1, кодирующую область virE2 и терминатор Nos, клонировали в сайтах NotI-NheI pwi-11.

Плазида pGUS получена из плазиды pUC и содержит кодирующую последовательность гена GUS  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS) под контролем промотора CaMV35S и инtron гена каталазы клещевины обыкновенной (Ohta и др., 1990).

#### Суспензионные клетки кукурузы

Суспензионные культуры кукурузы Zea mays L. сорта Black Mexican Sweet (BMS) вы-

держивали в среде N6 (Chu и др., 1975), дополненной 30 г/л сахарозы и 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты (2,4-Д) (2N63S). Суспензии клеток кукурузы, применяемые для экспериментов по бомбардировке, были взяты из 3-дневных выращенных ускоренным методом культур. Перед бомбардировкой приблизительно 0,5 мл клеточной массы фильтровали под вакуумом на 7-санитметровых фильтрах (Whatman № 4). Посевные клетки выдерживали в течение 4 ч при 25°C до бомбардировки на отвердевшей с помощью фитоагара среде 2N6, содержащей 120 г/л сахарозы. Последовательные переносы фильтров на свежую среду с повышающимися концентрациями Баста (гербицид) осуществляли с 8-дневными интервалами до тех пор, пока большинство клеток в культуре не прекращало роста. Это обычно происходило после 4-6 недель селекции на пластинах, содержащих 8-10 мг/л Баста. Отдельные развившиеся на фильтре каллюсы затем переносили на отвердевшую с помощью фитоагара среду, дополненную Баста (10 мг/л). Для выделения ДНК после двух пересевов на такую же среду суспензионные культуры инициировали, инокулируя приблизительно 100 мл клеток кукурузы в 25 мл жидкой среды, дополненной Баста (10 мг/л).

#### Бомбардировка растительных клеток

Ткани бомбардировали золотыми микроснарядами, на которые была осаждена смесь плазид. ДНК плазиды pGUS использовали в качестве внутреннего контроля в экспериментах по кратковременной экспрессии. Для экспериментов по совместной трансформации использовали золотые частицы, на которые осаждали равную массу ДНК всех плазид (по 0,5 мкг ДНК каждой плазиды на пластину-мишень). Для экспериментов по стабильной трансформации использовали смеси для совместной трансформации, содержащие плазиды, несущие вирулентные гены, и плазиду, несущую селектируемый ген bar, в молярном соотношении 1:1 или 2:1. Каждая аликовта смеси плазид, которую использовали для бомбардировки пластины-мишени, состояла из 0,4 мкг селектируемого маркера и 0,4 или 0,8 мкг каждой из ДНК плазид pwi35SAdhD1 и pwiAdh35SD2 и/или pwiAdh35SE2. Соответствующие количества каждой ДНК смешивали в полном объеме 10 мкл и осаждали с помощью 50 мкл 2,5M CaCl<sub>2</sub> и 20 мкл 0,1M свободного от спермидина основания для осаждения на 50 мкл золотых микроносителей размером 0,3 мкм (60 мг/мл). Бомбардировку микроснарядами проводили с помощью биобаллистического приспособления типа PDS-1000 He (фирма DuPont) с использованием дисков, разрушаемых при давлении 1100 фунтов/кв. дюйм, помещая образец на 8 см ниже задерживающей экранирующей полки.

### Оценки кратковременной экспрессии

Люциферазу анализировали в экстрактах ткани в соответствии с рекомендацией поставщика (Luciferase assay system, фирма Promega).  $\beta$ -Глюкуронидазную активность определяли хемолюминисцентным методом с помощью набора GUS-Light (фирма Tropix). Люциферазную и  $\beta$ -глюкуронидазную активности выражали в виде единиц света, обнаруживаемого прибором Analytical Luminescence model 2001 Luminometer, проинтегрированного в течение 10 с при 25°C.

### Экстракция ДНК и гибридизация методом Саузерн-блоттинга

Культуры клеток собирали фильтрацией через 10 дней после инокуляции и замораживали в жидком азоте. ДНК выделяли, как описано у Hall и др., 1991.

Для разложения с помощью EcoRI использовали приблизительно 10 мкг геномной ДНК. После разделения на 0,7%-ном агарозном геле ДНК переносили на генное сито типа Amersham Hybond плюс мембрана и гибридизацию проводили в соответствии с условиями, описанными у производителя (фирма Amersham). ДНК-зонды метили с помощью [ $\alpha^{32}$ P]дЦТФ, используя набор для мечения олигонуклеотидов фирмы Pharmacia. Зонд Bar соответствовал BgIII-фрагменту длиной 0,5 т.п.н. гена Bar. Зонд luc соответствовал XbaI-EcoRI-фрагменту длиной 0,7 т.п.н. гена люциферазы. Для удаления зондов мембранные промывали 0,1%-ным раствором ДСН при 100°C в течение 5 мин.

### Клонирование соединительных участков Т-ДНК/растительная ДНК

ДНК (30 мкг) из каллюсов трансгенной линии кукурузы разлагали с помощью EcoRI и подвергали препартивному электрофорезу на 0,8%-ном агарозном геле. Кусочки агарозы, соответствующие по размеру фрагментам, предназначенным для клонирования, вырезали из геля и ДНК экстрагировали из агарозы с использованием набора для очистки геля. Затем фрагменты клонировали в дефосфорилированном сайте EcoRI плазмидах pUC18. Для трансформации клеток *E.coli* HB101 с помощью электропорации применяли смеси для лигирования. Колонии, содержащие плазмида с правильной инсерцией, выявляли с помощью гибридизации колоний на фильтре, используя в качестве зонда фрагмент Bar длиной 0,5 т.п.н. ДНК из положительных клонов затем разлагали с помощью BamHI-EcoRI. BamHI сайт локализован на расстоянии 3 пары оснований от правой пограничной последовательности. Фрагмент повторно клонировали в соответствующих сайтах pUC18. Последовательность в соединительном участке на стыке ДНК плазмида-донора и растительной ДНК анализировали с использованием универсального праймера.

### Результаты

Анализ кратковременной экспрессии для изучения расщепления пограничной последовательности продуктами генов virD1 и virD2 в растении

С целью установить, могут ли продукты генов virD1 и virD2 вызывать одноцепочечные разрывы пограничной последовательности Т-ДНК при экспрессии в растительных клетках, изучали опытные плазмида pwiRBLuc и pRBLuc. Они содержали пограничную последовательность Т-ДНК, являющуюся субстратом, и расположенную между промотором и кодирующей последовательностью гена люциферазы. pRBLuc получали из плазмида pUC, где pwi представляет собой вектор, происходящий из вируса карликовости кукурузы (WDV), который может реплицироваться в клетках кукурузы и состоит из двух комплементарных смысловых ОРС: C1 и C2, необходимых для репликации вируса, а p15A является областью начала репликации, происходящей из *E.coli*. Этот вектор не содержит ОРС V1 и ОРС V2, участвующих в распространении вируса и проявлении симптомов развития заболевания (Ugaki и др., 1991). Сайтспецифический одноцепочечный разрыв, интродуцированный продуктами генов virD1 и virD2, должен привести к разрыву цепи ДНК, являющейся матрицей для мРНК люциферазы, и тем самым снизить количество получаемого транскрипта люциферазы и фермента. После совместной бомбардировки растительных клеток плазмидой pRBLuc или pwiRBLuc и плазмидами, несущими гены virD под контролем промотора CaMV35S, любые одноцепочечные разрывы на пограничной последовательности могут быть количественно оценены путем измерения люциферазной активности.

При бомбардировке ДНК pRBLuc или ДНК pwiRBLuc достигали высокого уровня экспрессии гена люциферазы в клетках кукурузы. При совместном введении в клетки кукурузы ДНК pwiD1 и ДНК pwiD2 и ДНК pRBLuc или ДНК pwiRBLuc получили 10-кратное снижение активности люциферазы по отношению к активности GUS (табл. 8). Совместное введение ДНК pwiD2 вместе с ДНК pwiRBLuc также привела к 10-кратному снижению активности люциферазы по отношению к активности GUS. Этот результат может быть объяснен тем фактом, что геном WDV состоит из одной кольцевой одноцепочечной ДНК. Вирус размножается в ядре зараженных клеток посредством двухцепочечного промежуточного продукта, который последовательно используется в качестве матрицы при репликации вирусной цепи ДНК по типу разматывающегося рулона (Saunders и др., 1991; Stenger и др., 1991). Было показано, что VirD2 расщепляет *in vitro* одноцепочечный олигонуклеотид (Pansegrouw и др., 1993; Jasper и др., 1994). Таким образом, VirD1 не требуется для

расщепления форм одноцепочечной ДНК (ssДНК) геминивируса.

#### Анализ стабильных трансформантов

Осуществляли стабильную трансформацию суспензионных клеток кукурузы для определения влияния активности продуктов генов *virD1* и *virD2* на схему интеграции ДНК после совместного введения этих генов с их ДНК-субстратом с помощью устройства для биобаллистического введения. Для этих экспериментов применяли плазмиды *pwiBarRBLuc* и *pBarRBLuc*, которые содержат левую пограничную последовательность Т-ДНК, *Bar* в качестве селектируемого маркера и ген *35SRBLuc*, у которого правая пограничная последовательность Т-ДНК встроена между промотором и кодирующей областью люциферазы. Критерием случаев интеграции, опосредуемых генами *virD*, служило отсутствие люциферазной активности в трансформированном клоне, причиной которого было исключение кодирующей области *Luc* посредством вырезания Т-ДНК из *pBarRBLuc* или из *pwiBarLuc*. Такие случаи, которые могут произойти в результате воздействия продуктов генов *vir* на пограничные последовательности с получением Т-цепи, называются “агролистическими случаями”. В противоположность этому понятием “биобаллистические случаи” обозначены такие инсерции в геном кукурузы, которые представляют собой процесс, обычно происходящий после введения гена в растительные клетки с помощью устройства для биобаллистического введения.

Суспензионные клетки кукурузы бомбардировали микроснарядами, покрытыми ДНК плазмиды *pBarBLuc* или *pwiBarBLuc* вместе с ДНК *pwiD1* и *pwiD2* в соотношении 1:1:1 или 1:2:2. В качестве контроля также осуществляли бомбардировку по отдельности плазмидой *pwiBarBLuc* и *pBarBLuc*. Стабильных трансформантов селектировали на основе их способности расти на среде, содержащей Баста. В среднем через 3-4 недели после бомбардировки выявлено 8-10 устойчивых к Баста клонов на один фильтр, но только один подклон на каждой пластине подвергали дальнейшему анализу. Когда ДНК плазмиды *p35AdhE2* вводили совместно с другими вирулентными генами, было обнаружено несколько большее количество каллюсов на каждом фильтре (12-15).

Грубая оценка частоты агролистических случаев может быть сделана по величине отношения общего количества устойчивых к Баста каллюсов, которые не экспрессируют люциферазу, к общему количеству проанализированных каллюсов, выращенных на среде с добавлением Баста. В соответствии с этим критерием частота агролистических случаев составила приблизительно 20%, когда *pBarRLuc* вводили совместно с ДНК плазмид *pwi35SAdhD1* и *pwi35SAdhD2*. Частота возросла до приблизительно 40%, когда использованная плазмида-мишень представляла

собой *pwiBarRBLuc*. Эта частота возросла до приблизительно 50%, когда *pwi35SAdhE2* вводили совместно с указанными выше плазмидами.

#### Анализ методом Саузерн-блоттинга

На молекулярном уровне вставки, представляющие собой результат агролистического случая, должны гибридизоваться с зондом *Bar*, но не гибридизоваться с зондом *Luc*. Кроме того, в агролистическом случае последовательность соединительного участка на стыке между интродуцированной ДНК и растительной ДНК должна точно соответствовать правому пограничному концу Т-цепи. Оба типа случаев могут иметь место в одной и той же растительной клетке, но такие клоны должны рассматриваться генетически как биобаллистические случаи, поскольку в них присутствует люциферазная активность. Как биобаллистические, так и предполагаемые агролистические случаи исследовали с помощью Саузерн-гибридизации для оценки частоты вставки каждого типа.

Проводили гибридизацию методом Саузерн-блоттинга с использованием ДНК из контрольных устойчивых к Баста линий каллюса, полученных после бомбардировки (I) ДНК *pwiBarRBLuc*, (II) ДНК *pwiBarRBLuc*, *pwiD1* и *pwiD2*, (III) ДНК *pwiBarRBLuc*, *pwiD1*, *pwiD2* и *pwiE2*, (IV) ДНК *pBarRBLuc* и (V) ДНК *pBarRBLuc*, *pwiD1* и *pwiD2*.

Анализ blotтов выявил три группы трансгенных линий каллюсов, что обобщено в табл. 9: (I) линии каллюсов, гибридизующиеся как с зондом *bar*, так и с зондом *neo*, (II) линии каллюсов, в которых некоторые вставки гибридизовались только с зондом *bar*, а некоторые вставки гибридизовались с обоими зондами, и (III) линии каллюсов, вставки которых гибридизовались только с зондом *bar*. Первая группа каллюсов, вероятно, не содержала случаев агролистических вставок. Вторая группа каллюсов, вероятно, содержала оба типа случаев: агролистические случаи и биобаллистические случаи. Третья группа каллюсов содержала только предполагаемые агролистические случаи. Например, среди 10 проанализированных трансгенных линий кукурузы, полученных в экспериментах по трансформации с использованием плазмид *pwiBarRBLuc*, *pwiD1* и *pwiD2*, 3 содержали биобаллистические случаи, 6 содержали предполагаемые агролистические случаи и 1 содержала оба варианта. Схемы гибридизации отдельных линий были уникальными, свидетельствуя о том, что линии каллюсов представляли собой независимые случаи трансформации.

#### Молекулярный анализ предполагаемых агролистических случаев

Природу предполагаемых агролистических случаев выявляли путем определения последовательности соединительного участка на стыке между интегрированной ДНК и растительной ДНК. Анализ нуклеотидной последовательности

показал, что каждый из этих фрагментов содержал соединительный участок на стыке правой пограничной последовательности и растительной ДНК. Правый конец встроенного фрагмента был идентичен сайту одноцепочечного разрыва правой пограничной последовательности Т-ДНК, как и ожидалось для агролистического случая.

Таблица 8

Активность virD1 и virD2 в клетках кукурузы

Плазмиды	Среднее значение	±СО
pwi35SRBLuc	15,0	±1,2
pwi35SRBLuc + pwi35SAdhD1 (1:1)	8,1	±1,1
pwi35SRBLuc + pwi35SAdhD2 (1:1)	0,7	±0,3
pwi35SRBLuc + pwi35SAdhD1 + pwi35SAdhD2 (1:1:1)	0,2	±0,1
p35SRBLuc	17,6	±1,2
p35SRBLuc + pwi35SAdhD1 + pwi35SAdhD2 (1:1:1)	0,8	±0,1
p35SRBLuc + p35SAdhD1 + p35SAdhD2 (1:1:1)	1,0	±0,2
без ДНК	0,2	

ДНК вводили в клетки кукурузы с помощью устройства для биобаллистического введения. Числа в скобках обозначают соотношение плазмид. После инкубации в течение 24 ч ткани гомогенизировали и определяли ферментативные активности. Плазмиды, экспрессирующие β-глюкуронидазу (GUS), т.е. pGUS, включали в каждую бомбардировку в качестве контроля эффективности переноса ДНК и активность репортерного гена выражали в виде отношения люциферазной активности к активности GUS. Независимые бомбардировки анализировали и данные выражали в виде средних значений по 3 повторностям ± стандартное отклонение (СО).

Таблица 9

Анализ устойчивых к Баста каллюсов, полученных после бомбардировки BMS-клеток одной плазмидой-мишенью и/или с генами vir

Плазмиды	Каллюс	Активность люциферазы	Саузерн	Тип случая
pwiBarRBLuc (0,2 мкг)	16	15 Luc(+) 1 Luc(-)	5	5Б
pwiBarRBLuc+ pwiD1+pwiD2 (0,4 мкг+0,4 мкг+0,4 мкг)	19	10 Luc(-) 9 Luc(+)	10 9	3Б, 6А, 1А+Б 8Б, 1Б+А
pwiBarRBLuc+ pwiD1+pwiD2 (0,4 мкг+0,8 мкг+0,8 мкг)	11	8 Luc(-) 3 Luc(+)	4 1	1Б, 2А, 1Б+А 1Б
pwiBarRBLuc+ pwiD1+ pwiD2+pwiE2 (0,4 мкг+0,4 мкг+0,4 мкг+0,4 мкг)	21	10 Luc(-) 11 Luc(+)	4 5	1Б, 2А 5Б
pBarRBLuc (0,4 мкг)	10	9 Luc(+)	2	2Б
pBarRBLuc+p wiD1+pwiD2 (0,4 мкг+0,4 мкг+0,4 мкг)	38	7 Luc(-) 31 Luc(+)	4 5	4Б 4Б, 1Б+А

Числа в скобках обозначают концентрацию ДНК, использованную для экспериментов по трансформации, "Б" обозначает биобаллистический случай, "А" обозначает предполагаемый агролистический случай, "Саузерн" обозначает количество каллюсов, проанализированных методом Саузерн-блоттинга, "Каллюс" обозначает количество каллюсов, проанализированных в отношении люциферазной активности.

Пример 6. Экспрессия VirD1 и VirD2 с помощью одного промотора в клетках кукурузы и табака.

Для достижения экспрессии бактериальных генов в растительных клетках индивидуальные кодирующие области бактериальных генов должны быть слиты с отдельными растительными промоторами, поскольку прокариотические промоторы не обеспечивают транскрипцию в растительных клетках. Хотя и имеется возможность слияния каждого гена с отдельным промотором, это может привести к определенным трудностям: например, к появлению "молчящих" генов, если один и тот же промотор применяют для различных генов. Представленная в настоящем примере стратегия состоит в слиянии в tandem двух генов всего лишь с одним растительным промотором. Этот полигенный переносчик содержит две кодирующие последовательности virD1 и virD2, принадлежащие оперону virD Agrobacterium.

Эти два полипептида, кодируемые 5'-половиной оперона virD, играют ключевую роль в инициации процессинга ДНК при переносе Т-ДНК из Agrobacterium в растительные клетки. VirD2 представляет собой цепьспецифическую эндонуклеазу, которой для расщепления пограничных последовательностей Т-ДНК между третьим и четвертым основаниями помогает VirD1. VirD2 остается ковалентно присоединенным к 5'-концу Т-ДНК и, вероятно, служит для направления Т-ДНК в растительные клетки и участвует в лигировании 5'-конца Т-ДНК с растительным геномом. Было показано, что эти два протеина должны быть сцеплены с растительным геномом, чтобы они могли обладать способностью функционировать в растительных клетках.

В данном примере конструировали экспрессирующий комплекс, который состоит из генов virD1 и virD2, регулируемых одним растительным промотором, и для которого была показана функциональная экспрессия в растении. Индивидуальные гены объединяли либо в виде транскрипционного гибрида (слияния), либо в виде трансляционных гибридов, и в последнем случае было установлено, что они сохраняют ферментативную активность в растительных клетках.

### Материалы и методы

#### Конструкция гибридов D1-D2 или D2-D1

Конструировали два типа гибридов:

##### 1) Транскрипционный гибрид

Использовали последовательность кодирующих областей virD1 и virD2 с небольшим промежуточным участком (33 нуклеотида) между кодирующей областью virD1 и virD2. Фрагмент NotI-PstI плазиды p35SD1 длиной 1,1 т.п.н. и фрагмент PstI-XbaI плазиды p35D2 длиной 1,5 т.п.н. клонировали в сайтах NotI-SpeI плазиды pSK+, получая p35StpD1D2.

##### 2) Трансляционные гибриды

Вирулентные гены virD1 и virD2 также сливали с помощью интрана, сконструированного для обеспечения свободного движения обоих протеинов и чувствительного к посттрансляционному расщеплению. В p35SD1D2 кодирующая область virD1 находится на 5'-конце гибрида, тогда как p35SD2D1 содержит область virD2 непосредственно за промотором. Все модификации подтверждены с помощью секвенирования ДНК.

#### Конструирование p35SD1D2

Для создания гибрида virD1-virD2, кодируемого virD1 и virD2, удаляли стоп-кодон virD1 и инициирующий кодон virD2. Это осуществляли путем клонирования во фрагменте EcoRI-HindIII плазиды pUC21 ренатурированной пары олигонуклеотидов ДНК, фланкированных “липкими” BanI- и “липкими” PvuI-концами со стороны EcoRI-BanI-фрагмента плазиды p35SD1 длиной 0,48 т.п.н. и PvuI-HindIII-фрагмента плазиды p35SD2 длиной 0,25 т.п.н. Ренатурированная пара состояла из следующих олигонуклеотидов:

5'-GTGCGCTTGCTTCTAATCCCCAACTCCCTCTCCCTAGCACGCCCTCCGACACCTAGCCCCGG  
AT-3' (SEQ ID NO: 15) и  
5'-CGGGCTTAGGTGCGGAGCCGTGCTAGGAGAGGGAGTGGGGAGTAGAAGGCCAAG-3'  
(SEQ ID NO: 16).

Фрагмент EcoRI-PstI этой конструкции, включающий кодирующую область virD1, линкер и 5'-конец кодирующей области virD2, затем встраивали в сайты EcoRI-PstI плазиды p35SD2, получая p35SD1D2.

#### Конструирование p35SD2D1

Аналогичным образом плазиду pD2D1, содержащую кодирующую область virD2 на 5'-конце pD2D1, сшивали в рамке считывания с кодирующей областью virD1 через тот же инtron. N-концевую кодирующую последовательность virD1 сначала реконструировали из перекрывающихся олигонуклеотидов для создания сайта EcoRI на 5'-конце и для делекции первого кодона virD1. (5'-AATTCTCAAAACACACAGAGTCACGTCGAGTGAGACTGCCATCAACCA GCAT-3'; SEQ ID NO: 17). Эти ренатурированные олигонуклеотиды клонировали в pBluescript KS+ (фирма Stratagen, Inc.), получая pKS5'D1. Фрагмент SacII-BfaI длиной 1,3 т.п.н. из p35SD2 и фрагмент SacII-EcoRI, вырезанный из ДНК плазиды pKS5'D1, затем соединяли с линкером, содержащим на 5'-конце сайт BfaI, изме-

ненный таким образом, что он был лишен нативного стоп-кодона virD2

(5'-TATCCCTCTAATCCCCAACTCCCTCTCCCTAGCACGCCCTCCGACAC-CTAGC-  
3' (SEQ ID NO: 18) и 5'-AATTGGCTAGGTGCGGAGGGCTAGGAGAG-  
GGAGTTGGGGAGTAGAAGGA-3' (SEQ ID NO: 19)).

Фрагмент EcoRI-ClaI, включающий кодирующую область virD2, линкер и 5'-конец кодирующей области virD1, затем клонировали в сайтах EcoRI-ClaI плазиды p35SD1, получая p35SD2D1.

#### Конструирование тестируемых плазид

Конструирование pwBarRBLuc, pRBLuc описано в примере 5.

#### Растительный материал

Получение супензационных клеток кукурузы (происходящих из линии B73) и табака (NT-1), предназначенных для бомбардировки с помощью устройства для биобаллистического введения, описано в предыдущих примерах.

#### Бомбардировка растительных клеток

Ткани бомбардировали золотыми микроснарядами, на которые была осаждена смесь плазид. Для экспериментов по совместной трансформации использовали золотые частицы, которые несли 0,5 мкг или 1 мкг тестовой плазиды вместе с общим количеством 2 мкг или 4 мкг плазид-хелперов для клеток табака и кукурузы соответственно. Соответствующее количество ДНК плазиды pUC18 смешивали таким образом, чтобы сохранить постоянную массу плазидных ДНК в смеси (см. табл. 10 и табл. 11). ДНК осаждали с помощью 2,5M CaCl<sub>2</sub> и 0,1M свободного от спермидина основания на 50 мкл золотых микроносителей размером 0,3 мкм (60 мг/мл). Бомбардировку микроснарядами проводили с помощью биобаллистического приспособления типа PDS-1000 He (фирма DuPont) с использованием дисков, разрушаемых при давлении 1550 фунтов/кв. дюйм, помещая образец на 8 см ниже задерживающей экранирующей полки.

#### Оценки кратковременной экспрессии

Люциферазу анализировали в экстрактах ткани в соответствии с рекомендацией поставщика (Luciferase assay system, фирма Promega). Люциферазную активность выражали в виде единиц света, обнаруживаемого прибором Analytical Luminescence model 2001 Luminometer, проинтегрированного в течение 10 с при 25°C. Для оценки удельной активности концентрацию протеина определяли с использованием набора для анализа протеина фирмы Bio-Rad.

#### Результаты и их обсуждение

##### Стратегия конструирования гибридов

Гены virD1 и virD2 происходили из октопиновой pTiA6-плазиды Agrobacterium tumefaciens. Транскрипционный гибрид, входящий в p35StpD1D2, содержит кодирующую область virD1 и virD2 вместе с нативным интраном, присутствующим в опероне virD.

Трансляционные гибриды, входящие в p35SD1D2 и в p35SD2D1, содержат кодирующую области virD1 и virD2, слитые с инtronом, сконструированным для обеспечения свободного движения обоих протеинов и чувствительным к посттрансляционному расщеплению.

Функциональная экспрессия полигена в растении

С целью оценить функциональную экспрессию транскрипционного и трансляционного гибридов плазмида p35StpD1D2, p35SD1D2 и p35SD2D1 вводили в растительные клетки совместно с тестируемой плазмидой с помощью устройства для биобаллистического введения. Тестируемая плазмида содержала правую пограничную последовательность, встроенную между промотором и кодирующей областью гена люциферазы таким образом, что сайтспецифическое расщепление внутри этой последовательности должно было приводить к снижению экспрессии люциферазы. В клетках кукурузы анализировали два типа тестируемых плазмид: плазмиду pRBLuc, происходящую из плазмида pUC, и плазмиду pwBarRBLuc, происходящую из плазмида геминивириуса карликовости пшеницы.

Клетки кукурузы и табака сначала кратковременно трансформировали с помощью тестируемой плазмиды, совместно введенной с генами virD1 и virD2, каждый из которых находился под контролем отдельного промотора, для определения их способности влиять на транскрипцию через пограничную последовательность Т-ДНК. После совместного введения ДНК p35SD1 и ДНК p35SD2 и ДНК pRBLuc или pwBarRBLuc активность люциферазы в тканях табака и кукурузы составляла 0,3 и 1% от контрольного уровня (табл. 10, 11 и 12).

Два гена vir, объединенные в транскрипционный гибрид, по-видимому, были малоактивны. Совместное введение с помощью устройства для биобаллистического введения одинаковых количеств ДНК pRBLuc и p35StpD1D2 (соотношение 1:1) приводило к снижению люциферазной активности до приблизительно 57% от контроля в клетках табака (табл. 12) и до 60-80% в клетках кукурузы (табл. 10 и 11). При более высоком соотношении плазмиды p35StpD1D2 и тестируемой плазмиды (2:1) не происходило дальнейшего снижения люциферазной активности.

Аналогичные эксперименты, проведенные с использованием плазмида p35SD1D2, несущей трансляционный гибрид, выявили снижение люциферазной активности до приблизительно 12% от контроля в клетках табака (табл. 12) и до 22-47% в клетках кукурузы (табл. 10 и 11). При более высоком соотношении плазмиды p35SD1D2 и тестируемой плазмиды (2:1) люциферазная активность во всех случаях снизилась до приблизительно 2-5%.

Изменение ориентации вирулентных генов в трансляционном гибридце p35SD2D1 привело к результатам, сходным с таковыми, полученными при использовании p35SD1D2 (табл. 10, 11 и 12).

Эти данные убедительно доказывают, что трансляционные гибриды проявили способность функционировать в растении.

Таблица 10

Активность транскрипционного и трансляционного гибридов в клетках кукурузы при использовании в качестве тестовой плазмиды вектора, происходящего из pUC

Плазмиды, введенные в клетки кукурузы	Люциферазная активность	% контроля
pRBLuc+pUC18 (1 мкг+4 мкг)	12333±543	100
pRBLuc+p35SD1+p35SD2 (1 мкг+2 мкг+2 мкг)	182±43	1,5
pRBLuc+p35SD1D2+pUC18 (1 мкг+2 мкг+2 мкг)	5744±290	47
pRBLuc+p35SD1D2 (1 мкг+4 мкг)	300±12	2,4
pRBLuc+p35SD2D1+pUC18 (1 мкг+2 мкг+2 мкг)	5920±813	48
pRBLuc+p35SD2D1 (1 мкг+4 мкг)	329±59	2,6
pRBLuc+p35StpD1D2+pUC18 (1 мкг+2 мкг+2 мкг)	7312±1091	60
pRBLuc+p35StpD1D2 (1 мкг+4 мкг)	6436±615	52

Таблица 10. ДНК вводили в клетки кукурузы с помощью устройства для биобаллистического введения. Числа в скобках обозначают соотношение плазмид. После инкубации в течение 24 ч ткани гомогенизировали и определяли люциферазную активность, которую выражали в виде единиц света/мкг протеина. Независимые бомбардировки анализировали и данные выражали в виде средних значений по 3 повторностям ± стандартное отклонение.

Таблица 11

Активность транскрипционного и трансляционного гибридов в клетках кукурузы при использовании в качестве тестовой плазмиды вектора, происходящего из геминивириуса

Плазмиды, введенные в клетки кукурузы	Люциферазная активность	% контроля
pwBarRBLuc+pUC18 (1 мкг+4 мкг)	531±38	100
pwBarRBLuc+p35SD1+p35SD2 (1 мкг+2 мкг+4 мкг)	5±31	1
pwBarRBLuc+p35SD1D2+pUC18 (1 мкг+2 мкг+2 мкг)	115±23	22
pwBarRBLuc+p35SD1D2	32±4	6
pwBarRBLuc+p35SD2D1+pUC18 (1 мкг+2 мкг+2 мкг)	60±10	1
pwBarRBLuc+p35SD2D1 (1 мкг+4 мкг)	19±3	3,6
pwBarRBLuc+p35StpD1D2+pUC18 (1 мкг+2 мкг+2 мкг)	431±115	81
pwBarRBLuc+p35StpD1D2 (1 мкг+4 мкг)	380±53	72

Таблица 11. См. пояснение к табл. 10.

Таблица 12  
Активность транскрипционного и трансляционного гибридов в клетках табака

Плазмиды, введенные в клетки табака	Люциферазная активность	% контроля
pRBLuc+pUC18 (0,5 мкг+2 мкг)	21611±760	100
pRBLuc+p35SD1+p35SD2 (0,5 мкг+1 мкг+1 мкг)	60±1	10,3
pRBLuc+p35SD1D2+ pUC18 (0,5 мкг+1 мкг+1 мкг)	2494±44	12
pRBLuc+p35SD1D2 (0,5 мкг+2 мкг)	1179±183	5,4
pRBLuc+p35SD2D1+pUC18 (0,5 мкг+1 мкг+1 мкг)	1603±422	7,4
pRBLuc+p35SD2D1 (0,5 мкг+2 мкг)	1071±113	5
pRBLuc+p35StpD1D2+ pUC18 (0,5 мкг+1 мкг+1 мкг)	12240±1417	57
pRBLuc+p35StpD1D2 (0,5 мкг+2 мкг)	11627±2491	54

Таблица 12. См. пояснение к табл. 10.

#### Пример 7. Роль VirE2 в эффективности трансформации.

В клетках кукурузы оценивали способность “лечащего” вектора повышать частоту агролистических случаев. Использованный вектор содержал сигнал полиаденилирования внутренней структуры Т-ДНК слева от правой пограничной последовательности.

Во второй части эксперимента virE2 вводили совместно с генами virD1 и virD2. Как было показано, этот протеин необходим для эффективного переноса Т-ДНК, но не для производства Т-ДНК (Stachel и др., 1986). VirE2 кооперативно и неспецифично связывается *in vitro* с одноцепочечной ДНК. VirE2 может участвовать в защите Т-цепи. Протеин virE2 является протеином, который продуцируется *Agrobacterium tumefaciens* в наибольшем количестве после индукции вирулентных генов (Stachel и др., 1986). Поскольку virE2 несет сигналы ядерной локализации, которые распознаются в растениях (см. обзор Zupan и Zambryski, 1995), высокие скорости трансформации являются ожидаемыми, когда этот ген интродуцируют в растение.

#### Материал и методы

Конструкция pAVM1: Вектор, содержащий сигнал полиаденилирования в правой пограничной последовательности (см. фиг. 6-15)

#### Часть А: Конструирование pCIB1711-HN

pCIB1711 разлагали с помощью BamHI и повторно лигировали, получая 1711deltaB, в которой сайт EcoRI (не уникальный) вырезали и разрушали встраиванием олигонуклеотида, одновременно создавая сайты HindIII и NotI. В результате анализа последовательности был выявлен клон, в котором эти сайты находились в следующей ориентации (после сайта SacI): KpnI, а затем HindIII. Для восстановления отсутствующих частей исходной плазмиды снача-

ла встраивали большой фрагмент BamHI, несущий кодирующую область Luc в правильной ориентации, получая 1711-HN-B, а затем заменили его XbaI-вставку соответствующей частью исходной плазмиды pCIB1711, повторно интродуцируя отсутствующую лидерную последовательность.

Часть Б: Для интродукции синтетической олигонуклеотидной пограничной последовательности между сайтами EcoRI и BamHI на конце кодирующей области Luc субклонировали фрагмент NotI/ClaI в pBluescript, превращая сайты EcoRI и BamHI вставки в уникальные сайты. После встраивания пограничного олигонуклеотида с получением pBS-NC-RB возвращали ее модифицированный встроенный фрагмент NotI/ClaI в каркас pCIB1711-HN, получая pCIB1711-HN-RB.

Часть В: Встраивание левой пограничной последовательности в pUbiPATdeltaI

Для удаления нежелательного сайта EcoRI в инtronе pUCIAC разлагали плазмиду (выращенную в *dam-minus* штамме SCS110) с помощью ClaI, удаляя два небольших фрагмента, включающих сайт EcoRI. Затем интродуцировали олигонуклеотид, удаляющий сайт ClaI, и создавали сайт SphI, образуя плазмиду pUbiPATdeltaI. В новом уникальном сайте EcoRI на конце химерного гена PAT клонировали EcoRI-фрагмент плазмиды pTiT37 (Ti-плазмиды нопалинового типа) размером 29 пар оснований, несущий левую пограничную последовательность Т-ДНК на расстоянии 68 пар оснований от одного конца (Yadav N.S., Vanderleyden J., Bennet D., Barnest W.M. и Chilton M.-D, 1982, Short direct repeats flank the T-DNA on nopaline Ti Plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6322-6326), получая LB-UbiPATdeltaI.

#### Часть Г: Сборка pAVM1

Встроенный фрагмент HindIII плазмиды pCIB1711-HN-RB вырезали и лигировали в сайты HindIII плазмиды LB-UbiPATdeltaI. С помощью картирования выявлена конструкция, в которой левая и правая пограничные последовательности flankируют ген PAT и находятся в правильной ориентации для переноса. Образовавшаяся плазмиды имеет промотор гена Luc и кодирующую область снаружи от Т-ДНК, но ее терминатор расположен как раз внутри правой пограничной последовательности.

#### Суспензионные клетки кукурузы

Суспензионные культуры кукурузы *Zea mays* сорта Black Mexican Sweet (BMS) выдерживали в среде N6 (Chu и др., 1975), дополненной 30 г/л сахарозы и 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксуксусной кислоты (2,4-Д) (2N63S). Суспензии клеток кукурузы, применяемые для экспериментов по бомбардировке, были взяты из 3-дневных выращенных ускоренным методом культур. Перед бомбардировкой приблизительно 0,5 мл клеточной массы фильтровали под вакуумом на 7-сантиметровых

фильтрах (Whatman № 4). Посеянные клетки выдерживали в течение 4 ч при 25°C до бомбардировки на отвердевшей с помощью фитоагара среде 2N6, содержащей 120 г/л сахарозы. Для стабильной трансформации фильтры переносили на отвердевшую среду 2N63S через 24 ч после бомбардировки. Последовательные переносы фильтров на свежую среду с повышающимися концентрациями Баста осуществляли с 8-дневными интервалами до тех пор, пока большинство клеток в культуре не прекращало роста. Это обычно происходило после 4-6 недель селекции на пластинах, содержащих 8-10 мг/л Баста. Отдельные развивающиеся на фильтре каллюсы затем переносили на отвердевшую с помощью фитоагара среду, дополненную Баста (10 мг/л). Для выделения ДНК после двух пересевов на такую же среду суспензионные культуры инициировали, инокулируя приблизительно 100 мг клеток кукурузы в 25 мл жидкой среды, дополненной Баста (10 мг/л).

#### Бомбардировка растительных клеток

Ткани бомбардировали золотыми микроснарядами, на которые была осаждена смесь плазмид. Смеси для совместной трансформации содержали плазмиды, несущие вирулентные гены, и плазмиду, несущую селективный маркер *bar*, в соотношении 1:1,3. Каждая аликвота смеси плазмид, которую использовали для бомбардировки пластины-мишени, состояла из 0,6 мкг селектирующего маркера и 0,8 мкг ДНК каждой из плазмид p35SAdhD1 и pAdh35SD2 и/или p35SAdhE2. Соответствующие количества каждой ДНК смешивали в полном объеме 10 мкл и осаждали с помощью 50 мкл 2,5М CaCl<sub>2</sub> и 20 мкл 0,1М свободного от спермилина основания для осаждения на 50 мкл золотых микроносителей размером 0,3 мкм (60 мг/мл). Бомбардировку микроснарядами проводили с помощью биобаллистического приспособления типа PDS-1000 He (фирма DuPont) с использованием дисков, разрушаемых при давлении 1100 фунтов/кв. дюйм, помещая образец на 8 см ниже задерживающей экранирующей полки.

#### Экстракция ДНК и гибридизация методом

##### Саузерн-блоттинга

Культуры клеток собирали фильтрацией через 10 дней после инокуляции и замораживали в жидком азоте. ДНК выделяли, как описано у Hall и др., 1991.

Для разложения с помощью EcoRI использовали приблизительно 10 мкг геномной ДНК. После разделения на 0,7%-ном агарозном геле ДНК переносили на генное сите типа Amersham Hybond плюс мембрана и гибридизацию проводили в соответствии с условиями, описанными у производителя (фирма Amersham). ДНК-зонды метили с помощью [<sup>32</sup>P]дЦТФ с использованием набора для мечения олигонуклеотидов фирмы Pharmacia. Зонд PAT соответствовал *Pst*-фрагменту длиной 0,7 т.п.н. гена *rat*. Зонд *luc* соответствовал *Xba*I-EcoRI-фрагменту длиной

0,7 т.п.н. гена люциферазы. Для удаления зондов мембранны промывали 0,1%-ным раствором ДСН при 100°C в течение 5 мин.

#### Результаты

##### Анализ стабильных трансформантов

Для оценки воздействия вектора pAVM1 на эффективность трансформации после совместного введения этого вектора с вирулентными генами с помощью устройства для биобаллистического введения осуществляли стабильную трансформацию суспензионных клеток кукурузы. Указанный вектор имел промотор 35S внутри правой пограничной последовательности в такой ориентации, которая позволяет легко осуществлять антисмысловую экспрессию гена, в который встроена Т-цепь. В этом новом типе вектора промотор 35S внутри правой пограничной последовательности замещен терминатором 35S, ориентированным таким образом, чтобы "лечащий" ген-мишень мог быть встроен на 3'-конце.

Для этих экспериментов использовали вектор pAVM1, содержащий левую пограничную последовательность Т-ДНК, РАТ в качестве селективного маркера, терминатор 35S, правую пограничную последовательность Т-ДНК и ген люциферазы снаружи от Т-ДНК-подобной структуры. Понятием "агролистические случаи" инсерции обозначены такие инсерции ДНК в геном кукурузы, которые могут произойти в результате воздействия продуктов генов *vir* на пограничные последовательности с получением Т-цепи. В противоположность этому понятием "биобаллистические случаи" инсерции обозначены такие инсерции ДНК, которые представляют собой процесс, обычно происходящий после введения гена в растительные клетки с помощью устройства для биобаллистического введения. Первым критерием, позволяющим отличить биобаллистические случаи от предполагаемых агролистических случаев, было отсутствие люциферазной активности в трансформированном клоне вследствие исключения кодирующей области *Luc* при вырезании Т-ДНК из pAVM1.

Суспензионные клетки кукурузы бомбардировали микроснарядами, покрытыми ДНК плазмиды pAVM1 вместе с ДНК p35SAdhD1 и p35SAdhD2 и/или p35SAdhE2. В качестве контроля также осуществляли бомбардировку одной плазмидой pAVM1. Стабильные трансформанты отбирали на основе их способности расти на среде, содержащей Баста. После бомбардировки одной плазмидой pAVM1 может быть образовано приблизительно 5-8 каллюсов на фильтр. После бомбардировки клеток кукурузы ДНК плазмид pAVM1, p35SAdhD1, p35SAdhD2 и p35SAdhE2 через 4-5 недель после бомбардировки может быть образовано в среднем 10 устойчивых к Баста клонов на фильтр. Для дальнейшего анализа отбирали только по несколько клонов с пластины. На фильтре, который под-

вергали бомбардировке с помощью ДНК плазмид pAVM1, p35SAdhD1 и p35SAdhD2, было получено примерно 2-3 каллюса. Это различие может быть обусловлено наличием гена virE2, который кодирует связывающий одноцепочечную ДНК протеин, участвующий в защите Т-цепи. Было показано, что этот протеин необходим для эффективного переноса Т-ДНК, но не для производства Т-ДНК (Stachel и др., 1986).

Частота агролистических случаев может быть оценена по величине отношения общего количества устойчивых к Баста каллюсов, которые не экспрессируют люциферазу, к общему количеству проанализированных устойчивых к Баста каллюсов. В соответствии с этим критерием частота агролистических случаев, когда pAVM1 вводили совместно с ДНК p35SAdhD1 и p35SAdhD2, составляла приблизительно 25%. Эта частота слегка возрастила до приблизительно 50%, когда совместно с указанными выше плазмидами вводили pwiE2.

#### Анализ методом Саузерн-блоттинга

На молекулярном уровне трансгены, представляющие собой агролистический случай, должны гибридизоваться с зондом Bar, но не гибридизоваться с зондом luc. Оба типа случаев могут иметь место в одной и той же растительной клетке, но такие клони должны рассматриваться генетически как биобаллистические случаи, поскольку в них присутствует люциферазная активность. Как биобаллистические, так и предполагаемые агролистические случаи исследовали с помощью Саузерн-гибридизации для оценки частоты инсерции каждого типа. Гибридизацию методом Саузерн-блоттинга проводили с использованием ДНК из линий каллюсов, устойчивых к Баста, полученных после бомбардировки (I) ДНК pAVM1 и (II) ДНК pAVM1, p35SAdhD1, p35SAdhD2 и p35SAdhE2. Полученные результаты обобщены ниже в таблице 13.

Таблица 13

Анализ устойчивых к Баста каллюсов, полученных после бомбардировки клеток кукурузы pAVM1 с генами vir или без них

Плазмиды	Каллюс	Люциферазная активность	Саузерн	Тип случая
pAVM1	14	14 Luc(+)	3	3Б
pAVM1+D1+D2	10	2 Luc(-) 8 Luc(+)	не анализировали	
pAVM1+D1+D2+E2	44	14 Luc(-) 30 Luc(+)	7 3	4А, 1А+Б, 2Б 3Б

#### Выводы

- Соотношение агролистических случаев и биобаллистических случаев составляет приблизительно 35% при использовании pAVM1, при этом обнаруженные минимальные и максимальные значения обычно составляют 20-40%.
- Присутствие VirE2 может улучшить эффективность трансформации.

Поскольку virE2 несет сигналы ядерной локализации, которые распознаются в растениях (см. обзор Zupan и Zambryski, *Plant Physiol.*, 107: 1041-1047 (1995)), высокие скорости трансформации являются ожидаемыми, когда этот ген интродуцируют в растение. Трансгенные растения, экспрессирующие ген virE2, способны дополнять мутации virE в *Agrobacterium*, доказывая тем самым, что протеин VirE2 играет важную роль в растительных клетках.

Пример 8. Введение мРНК VirD1 и VirD2 в клетки кукурузы в результате бомбардировки.

В этом примере описано введение в растительные клетки генов virD1 и virD2 в виде мРНК и их влияние на пограничные последовательности Т-ДНК.

#### Материалы и методы

##### Клетки кукурузы

Суспензионные культуры кукурузы (*Zea mays L.*) первоначально получали из хранившегося в криогенных условиях эмбриогенного каллюса типа II, взятого из незрелых зародышей элитной линии, родственной B73, и выращивали в жидкой среде N6 (Chu и др., 1975), дополненной 30 г/л сахарозы и 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты (2,4-Д) (2N63S). Культуры инкубировали при 25°C в темноте на орбитальном шейкере при 150 об/мин. Суспензионные культуры пересевали каждые 7 дней путем переноса 1 мл клеточной массы в 50 мл свежей жидкой среды 2N63S. Суспензии клеток кукурузы, применяемые для экспериментов по бомбардировке, были взяты из 3-дневных культур, выращенных ускоренным методом. Перед бомбардировкой приблизительно 0,5 мл клеточной массы фильтровали под вакуумом на 7-сантиметровых фильтрах (Whatman № 4).

##### Клетки табака

Линию клеток *Nicotiana tabacum* NT-1 выращивали в среде Мурасига и Скуга (MS-среда), дополненной 2 мг/л 2,4-Д и сахарозой (30 г/л). Клетки пересевали один раз в неделю, добавляя 5 мл инокулята к 100 мл свежей среды в колбы объемом 500 мл. Колбы инкубировали при 27°C на роторном шейкере при 125 об/мин. Аликовты по 0,5 мл четырехдневных культур после пересева наносили на стерильные фильтры (Whatman № 4). Фильтры затем переносили на MS-среду.

##### Конструирование плазмид

Конструирование вектора, содержащего промотор T7 и поли-(A)-хвост

Полилинкер, содержащий следующие сайты рестрикции: SphI-EcoRI-NheI-ClaI-BglII-Asp718-HindIII-XbaI-Hind\*III, где последний сайт HindIII представляет собой сайт-киллер, встраивали в сайты SphI-HindIII pT7RecA50. Затем в соответствующие сайты встраивали олигонуклеотид Asp718-A(50)-DraI-HindIII, получая pT7-A50. Комплементарные цепи этого

олигомера имеют следующую последовательность:

5' - CGAATTTCGCTAGCATCGATAGATCTGGTACCCAAGCTTCTCGAGT - 3'   
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||   
 3' - GTACCGCTTAAGCGATCGTAGCTATCTAGACCCATGGTTTCGAAGAGCTCATCGA - 5'   
 (SEQ ID NO: 21)

#### Конструирование рT7D1A50

Фрагмент EcoRI-BgIII из кодирующей области D1 предварительно клонировали во фрагменте EcoRI-BamHI плазиды pSG5 (из фрагмента EcoRI-BamHI p35SAdh1D1).

#### Конструирование рT7D2polyA: (см. фиг. 16-26)

А. Выделение фрагментов с полиаденильным хвостом.

Кодирующую область virD2 вырезали из p35SD2 путем обработки EcoRI и выделяли с помощью препартивного гель-электрофореза и экстракции ДНК из агарозы. Внутренние сайты, необходимые для образования полиаденильных хвостов на 5'- и 3'-концах virD2, должны быть получены на субфрагментах. Фрагмент HindIII/EcoRI, выделенный из 5'-конца, обрабатывали PvuI, получая фрагмент А. Фрагмент BamHI/EcoRI, выделенный из 3'-конца, обрабатывали HaeIII, получая фрагмент С. Центральный фрагмент В получали с помощью разложения HindIII/BamHI.

#### Б. Клонирование фрагментов А и В.

Вектор pTC182 разлагали с помощью HindIII и SphI и фрагмент А вместе с олигонуклеотидами-адапторами для SphI-конца (который восстанавливает стартовый кодон) лигировали вместе, получая pTC182-А. Эту плазиду разлагали с помощью HindIII и BamHI и фрагмент В лигировали с 3'-концом фрагмента А. Объединенный фрагмент АВ вырезали и после разложения полученной плазиды pTC182-А-В с помощью BamHI/SphI очищали гель-электрофорезом.

В. Клонирование фрагментов АВ и С в модифицированном векторе pUC21.

Часть полилинкера pUC21 между сайтами BamHI и XbaI удаляли и замещали олигонуклеотидной парой, которая восстанавливала большинство сайтов, добавляя в конструкцию необходимый сайт BgIII. Образовавшуюся плазиду pUC21-X разлагали с помощью BamHI и EcoRV и фрагмент С лигировали с вектором, получая pUC21-С. Далее этот продукт разлагали с помощью BamHI и SphI и лигировали с выделенным выше фрагментом АВ, реконструируя virD2. После разложения образовавшейся плазиды pUC21-virD2 с помощью SphI и BgIII путем гель-хроматографии очищали фрагмент ABC, содержащий OPC virD2 с полиаденильным хвостом.

Г. Клонирование virD2 в векторе транскрипции фага T7.

Описанный выше вектор транскрипции T7polyA разлагали с помощью SphI и BgIII и фрагмент ABC (=virD2) лигировали за промотором T7 и перед блоком из 42 А-остатков.

#### Синтез мРНК

Плазиды T7D1A50 и T7D2A50 линеаризовали с помощью Xhol, делая разрезы сразу после участка поли-(А) по ходу транскрипции. Линеаризованную ДНК экстрагировали фенолом/хлороформом и затем осаждали этанолом. Транскрипцию *in vitro* линеаризованной ДНК проводили с использованием полимеразы T7 из набора T7 Cap-Scribe, содержащего [ $m^7G(5')ppp(5')$ ] (фирма Boehringer). Целостность и концентрацию мРНК определяли с помощью гель-электрофореза на агарозе.

#### Стерилизация биобаллистических носителей

Частицы золота (размером 0,3 мкм - фирма Heraeus) стерилизовали, помещая 60 мг частиц в 100%-ный этанол и 0,1%-ный DEPC. Частицы трижды промывали водой, свободной от РНКазы, и затем ресуспензировали в 1 мл свободного от РНКазы 50%-ного раствора глицерина. Для 6 выстрелов использовали аликовты приготовленных частиц объемом 50 мкл. Макроносители погружали в 100%-ный этанол и 0,1%-ный DEPS, затем трижды промывали в 100%-ном этаноле и сушили на воздухе. Задерживающие экраны автоклавировали.

#### Осаждение нуклеиновой кислоты

ДНК (1 мкг) и мРНК (приблизительно 8 мкг: 4 мкг D1 и 4 мкг D2 или 8 мкг неспецифической мРНК) осаждали на 50 мкл супензии золотых частиц (60 мг/мл; 0,3 мкм), добавляя последовательно 0,5 мкл трис-буфера (1M), 50 мкл  $CaCl_2$  и 2,5 мкл 0,1M спермидина. По завершении добавления всех реагентов перемешивание продолжали в течение 3 мин, после чего частицы подвергали седиментации путем кратковременного микротрифугирования (1 мин). Супернатант удаляли и частицы однократно промывали холодным 100%-ным этанолом и ресуспензировали в 60 мкл 100%-ного этанола. Эту смесь перемешивали, аликовты объемом 10 мкл наносили с помощью пипетки на диск макроносителя и давали высохнуть на воздухе в вытяжном шкафу с ламинарным потоком воздуха.

#### Доставка микроснарядов в растительные клетки

Микроснаряды вводили в растительные клетки с помощью ускорителя частиц (прибор типа PDS-He1000; DuPont) с использованием дисков, разрушаемых при давлении 1550 фунтов/кв. дюйм, помещая образец на расстоянии 5,5 см от пусковой установки. Экран из нержавеющей стали с размерами пор 100 мкм помещали на середине расстояния между задерживающей пластиной и тканью. Пластины-мишени подвергали бомбардировке 2 раза.

#### Анализ люциферазы

Люциферазу и GUS исследовали в экстрактах ткани с использованием системы для анализа люциферазы фирмы Promega в соответствии с рекомендациями поставщика. Люциферазную и  $\beta$ -глюкуронидазную активность выражают в виде единиц света, обнаруживаемого

прибором Analytical Luminescence модели 2001 Luminometer, проинтегрированного в течение 10 с при 25°C.

### Результаты

Анализ люциферазной активности проводили через 24 ч после бомбардировки. мРНК D1 и D2 вводили в результат совместной бомбардировки с плазмидой p35SRBLuc, которая содержит правую пограничную последовательность, встроенную между промотором 35S и кодирующей последовательностью люциферазы. В контролльном эксперименте p35SRBLuc вводили в результате совместной бомбардировки с неспецифической мРНК или мРНК D1 и D2 вместе с ДНК pLUC, не содержащей никаких пограничных последовательностей. Полученные результаты приведены ниже в табл. 14.

Таблица 14

Совместное введение мРНК D1 и D2 вместе с плазмидой-мишенью в клетки кукурузы

Плазмиды-мишени ± мРНК	Среднее значение	±СО	% контроля
pRB(+)Luc	3,2	±0,3	100%
pRB(+)Luc+мРНК D1	2,7	±0,2	84%
pRB(+)Luc+мРНК D2	1,4	±0,2	44%
pRB(+)Luc+мРНК D1+мРНК D2 (1:1:1)	0,6	±0,2	18%
pRB(+)Luc+мРНК D1+мРНК D2 (1:2:2)	0,4	±0,1	12%
pRB(+)Luc+p35SAdhD1+p35SAdhD2 (1:1:1)	0,1	±0,1	3%
pLuc	3,6	±0,2	100%
pLuc+мРНК D1+мРНК D2 (1:1:1)	3,7	±0,3	102%

После инкубации в течение 24 ч ткани гомогенизировали и определяли ферментативные активности. Плазмиду, экспрессирующую β-глюкуронидазу (GUS), т.е. pGUS, включали в каждую бомбардировку в качестве контроля эффективности переноса ДНК и активность репортерного гена выражали в виде отношения люциферазной активности к активности GUS. Независимые бомбардировки анализировали и данные выражали в виде средних значений по 3 повторностям ± стандартное отклонение (СО). Значения в % к контролю определяли из отношения активностей люциферазы и β-глюкуронидазы к этим же активностям, полученным для контрольной плазиды.

### Выводы

После совместного введения мРНК D1 и мРНК D2 и ДНК плазиды pRB(+)Luc наблюдалось 10-кратное снижение люциферазной активности. Введенные в растения в виде мРНК два гена vir, по-видимому, обладают синергетическим действием. Эти данные убедительно доказывают, что обнаруженное снижение люциферазной активности являлось результатом цепьспецифического одноцепочечного разрыва на правой пограничной последовательности, вызванного продуктами генов vir.

Преимущество введения в виде мРНК состоит в том, что это воздействие, как это и тре-

буется, является кратковременным. В плазмидах-хеллерах отсутствуют какая-либо чужеродная ДНК.

Пример 9. “Агролистические” случаи в протопластах.

Методы трансформации представляют собой важный инструмент для генетического манипулирования и улучшения видов культурных растений (Raskin, 1996). Различные системы трансформации позволяют непосредственно переносить чужеродный генетический материал в клетки, способные дать фертильные растения. Эти системы включают введение ДНК в протопласти с помощью электропорации или непосредственного поглощения ДНК, микроинъекцию в клетки и перенос гена с помощью бомбардировки покрытыми ДНК микроснарядами (см. обзор Morrish и Fromm, 1992). Применяемые в настоящее время системы введения имеют тенденцию к интеграции множественных копий чужеродного гена. Существует необходимость в подходе, который позволяет получить простую схему интеграции чужеродного гена без использования векторных последовательностей.

Представленный в настоящем описании способ трансформации, названный “агролистическим”, дает возможность получить трансгенный материал с помощью простой схемы инсертации чужеродного гена и исключает применение векторных последовательностей. Этот подход состоит в использовании растительных кассет экспрессии для вирулентных генов, которые играют ключевую роль в образовании и защите Т-ДНК (virD1, virD2 и virE2), вводимых совместно с плазмидой, содержащей пограничные последовательности Т-ДНК, flankирующие селективный маркер. Как следует из приведенных выше примеров, эта методика работает, когда все указанные элементы вводят в растительную клетку с помощью устройства для биобаллистического введения.

В данном примере для введения всех этих элементов использованы способы непосредственного введения ДНК в протопласти. Обнаружено, что продукты генов virD1 и virD2, введенные этим способом, действительно могут продуцировать случаи инсертации Т-ДНК-типа и что включение продукта гена virE2 может увеличить частоту трансформации.

### Материалы и методы

#### Плазмиды

Плазмиды pCIB1711 получена из плазмиды pUC и содержит ген люциферазы светляка, находящийся под контролем промотора вируса мозаики 35S цветной капусты (CaMV35S), и она описана в примере 3. Для интродукции пограничной последовательности Т-ДНК два синтетических олигонуклеотида, соответствующих правой пограничной последовательности LBA5269 (Van Haaren и др., 1989), ренатурировали, получая дуплекс:

5'-ATCCGGCAGGATATACCGTTGTAAT TCTGCA-3' (SEQ ID NO: 22). Этот дуплекс, flankированный сайтами BamHI-PstI, встраивали в соответствующие сайты pCIB1711 между промотором и последовательностью, кодирующей люциферазу, получая pRBLuc (см. фиг. 2). Плазмида pNeoRBLuc содержит левую пограничную последовательность, ген неомицинфотрансферазы (nptII) и ген люциферазы вместе с правой пограничной последовательностью, встроенной между промотором и кодирующей областью люциферазы из pRB(+)Luc. Ген nptII, находящийся под контролем промотора nos (нopalинсигнатаза) вырезали из плазмида pBin19 в виде фрагмента SacII-HindIII длиной 2,2 т.п.н. Левую пограничную последовательность вырезали из плазмида pBin19 в виде фрагмента BglIII-EcoRI. Оба эти фрагмента встраивали в сайты XbaI-HindIII плазмида pRB(+)Luc. Плазмида pNeoLuc эквивалентна плазмиде pNeoRBLuc, но у нее отсутствует правая пограничная последовательность, встроенная между промотором CaMV35S и кодирующей областью люциферазы.

Гены virD1 и virD2 из плазмиды pTiA6 склонировали в векторе экспрессии pMF6 (Callis и др., 1987), состоящем из промотора CaMV35S (0,5 т.п.н.) и первого интрана Adh1 (0,5 т.п.н.) и области полиаденилирования нopalинсигнатазы (nos) (0,25 т.п.н.) (фиг. 1). Фрагмент EcoRI-PstI длиной 0,6 т.п.н. из pAD1187, соответствующий кодирующей последовательности virD1, склонировали в векторе pMF6, получая p35SAdhD1. Кодирующую последовательность virD2 вырезали в виде EcoRI-фрагмента длиной 1,8 т.п.н. из pAD1190 (Ghai и Das, 1989) и склонировали в pMF6, получая p35SAdhD2. Кодирующую последовательность virD2 склонировали из плазмида pw108, которая содержит XhoI-фрагмент длиной 3 т.п.н. Ti-плазмиды Agrobacterium pTiA6 (регистрационный номер X04784) (Winans и др., 1987). Фрагмент SacI-SmaI длиной 687 пар оснований плазмиды pw108 сначала склонировали в соответствующих сайтах pKS(-), получая pKS3'E2. Фрагмент HaeIII-SacI длиной 924 пары оснований из pw108 объединяли с фрагментом SacI-PstI из pKS3'E2 и с ренатурированной парой олигонуклеотидов ДНК, flankированных "липким" EcoRI- и тупым концами (5'-AATTCATGGATCTTCTGGCAATGAGAAAT CCAGG-3'; SEQ ID NO: 23) и склонировали в сайтах EcoRI-PstI pBluescript KS- (фирмы Stratagene, Inc.), получая pKSE2. Затем склонировали фрагмент XhoI-PstI, включающий всю кодирующую область virE2, в XhoI-PstI плазмиды pMF6, получая p35SAdhE2.

#### Растительный материал

##### Суспензионные клетки кукурузы

Суспензионную культуру кукурузы Zea mays сорта Black Mexican Sweet (BMS) выращивали в среде N6 (Chu и др., 1975), дополненной

30 г/л сахарозы и 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты (2,4-Д) (2N63S). Суспензии клеток кукурузы, применяемые для экспериментов, были взяты из 3-дневных культур, выращенных ускоренным методом.

Протопласти выделяли из суспензионной культуры клеток инбредной линии кукурузы BMS (Black mexican sweet), как описано в "Black Mexican sweet corn: its use for tissue cultures. Maize for biological research", ред. W.F. Sheridan, Charlottesville, Va. Plant Molecular Biology Association, 1982, стр. 385-388). Через 2 дня после трансформации в среду вносили паромомицин (200 мг/л). Отдельные появившиеся приблизительно через 4 недели после трансформации микрокаллюсы переносили на пластины со свежей средой, дополненной паромомицином (200 мкг/л). После двух пересевов на такую же среду суспензионные культуры инициировали, инокулируя приблизительно 100 мг клеток кукурузы в 25 мл жидкой среды, дополненной паромомицином (200 мкг/л). Протопласти трансформировали различными концентрациями ДНК pNeoRBLuc с или без p35SAdhD1, p35SAdhD2 и/или p35SAdhE2, как указано в табл. 15.

#### Экстракция ДНК и гибридизация методом Сауэрн-блоттинга

Культуры клеток собирали фильтрацией через 10 дней после инокуляции и замораживали в жидком азоте. ДНК выделяли, как описано у Hall и др., 1991.

Для разложения с помощью EcoRI использовали приблизительно 10 мкг геномной ДНК. После разделения на 0,7%-ном агарозном геле ДНК переносили на генное сито типа Hybond плюс мембрана и гибридизацию проводили в соответствии с условиями, описанными у производителя (фирма Amersham). ДНК-зонды метили с помощью [ $\alpha^{32}$ P]дЦТФ с использованием набора для мечения олигонуклеотидов фирмы Pharmacia. Зонд leo соответствовал PstI-SphI-фрагменту длиной 0,3 т.п.н. Зонд luc соответствовал XbaI-EcoRI-фрагменту длиной 0,7 т.п.н. гена люциферазы. Для удаления зондов мембранные промывали раствором 0,5%-ного ДСН при 100°C в течение 5 мин.

#### Результаты

##### Экспериментальное конструирование

Конструировали вектор, позволяющий с помощью генетического теста отбирать опосредуемые VirD1 и VirD2 случаи инсерции. Вектор pNeoRBLuc содержит естественную левую пограничную последовательность из Ti-плазмиды, nos-NPTII-nos (химерный ген неомицинфотрансферазы II с промотором нopalинсигнатазы и последовательностями-терминаторами), промотор 35S, синтетическую правую пограничную последовательность и кодирующую область люциферазы. Устойчивые к паромомицину каллюсы кукурузы, трансформированные с использованием обычного механизма, должны

практически всегда содержать ген люциферазы и экспрессировать люциферазу. В противоположность этому клоны, которые не способны экспрессировать люциферазу, вероятно, представляют собой продукты опосредуемого VirD1 и VirD2 вырезания и интеграции Т-цепи. Для экспрессии генов virD1, virD2 и virE2 в растительных клетках соответствующие им открытые рамки считываания (OPC) помещали под контроль промотора CaMV35S.

#### Анализ стабильных трансформантов

Протопласти трансформировали с помощью ДНК плазмида pNeoRBLuc вместе с ДНК плазмид p35SAdhD1, p35SAdhD2 и/или p35SAdhE2 в различных соотношениях. В качестве контроля также вводили одну плазмиду pNeoRBLuc. Стабильных трансформантов отбирали на основе их способности расти на среде, содержащей паромомицин. В среднем выявлено 120 устойчивых к паромомицину клонов на одну пластину, когда плазмиду pNeoRBLuc совместно трансформировали с генами virD1 и virD2, но только 30 каллюсов отбирали для дальнейшего анализа. Количество устойчивых к паромомицину каллюсов могло достигать 250, когда к группе вирулентных генов добавляли virE2.

В каждой серии экспериментов анализировали тридцать устойчивых к паромомицину клонов, и было обнаружено, что приблизительно 10-40% из них не экспрессирует люциферазу, позволяя предположить, что частота опосредуемых virD1-virD2 случаев интеграции составляет примерно 10-40%. Это значение вероятно занижает частоту "агролистических" случаев, поскольку клоны, содержащие обе вставки, должны быть включены в 90%-ную группу, дающую положительные результаты в отношении люциферазной активности. Не было обнаружено достоверного различия в частоте встречаемости каллюсов, не экспрессирующих люциферазу, полученных в экспериментах с использованием гена virE2 или без него.

#### Анализ методом Саузерн-блоттинга трансформированных клонов

Проводили гибридизацию методом Саузерн-блоттинга с использованием ДНК из контрольных устойчивых к паромомицину линий каллюса, полученных после бомбардировки (I) одной плазмидой pNeoRBLuc, (II) при совместной трансформации ДНК плазмиды pNeoRBLuc с ДНК p35SAdhD1 и p35SAdhD2 и (III) при совместной трансформации ДНК плазмиды pNeoRBLuc с ДНК p35SAdhD1, p35SAdhD2 и p35SAdhE2.

Геномную ДНК разлагали с помощью EcoRI, в результате чего получали из плазмиды pNeoRBLuc фрагмент длиной 3,9 т.п.н., который гомологичен обоим зондам neo и luc. EcoRI имеет один сайт внутри части pNeoRBLuc, имеющей структуру Т-ДНК, и второй сайт в кодирующей области люциферазы.

Контрольные трансформанты, полученные после трансформации протопластов одной плазмидой pNeoRBLuc, имели EcoRI-фрагмент ожидаемого размера 3,9 т.п.н., гибридизующийся с обоими зондами luc и neo. Количество копий этого фрагмента больше 5, и, кроме того, обнаружены множественные копии преобразованной и/или фрагментированной ДНК.

Анализ методом Саузерн-блоттинга устойчивых к паромомицину линий каллюса, полученных после совместного введения ДНК pNeoRBLuc с ДНК плазмид p35SAdhD1, p35SAdhD2 и/или p35SAdhE2, представлен в табл. 15. Для анализа методом Саузерн-блоттинга выбирали линии каллюсов, которые давали отрицательные результаты в отношении люциферазной активности. Например, среди 8 трансгенных линий кукурузы, полученных в эксперименте № 8 и проанализированных методом Саузерн-блоттинга, 4 содержат биобаллистические случаи и 4 содержат предполагаемые агролистические случаи. Выявленное количество копий гена NPTII обычно составляло 1 или 2 на трансформированный геном, что подтверждено сравнением с количеством копий стандартов, включенных в тот же самый фильтр для гибридизации. В линиях каллюса, которые содержали геномную ДНК, гибридизирующуюся с зондом neo и с зондом luc, выявлено меньшее количество копий, чем в линиях каллюсов, полученных при трансформации только ДНК pNeoRBLuc.

Таблица 15  
Эксперименты по трансформации

№ эксп.	Плазмида-мишени=гены vir	Каллюс	Luc(-)/30	Саузерн	Тип случая
№ 1	PNeoRBLuc (5 мкг)	3			
№ 2	PNeoRBLuc (10 мкг)	20			
№ 3	PNeoRBLuc (20 мкг)	85		4[luc+]	4Б
№ 4	PNeoRBLuc+ p35AdhD1+ p35AdhD2 (5 мкг+20 мкг+20 мкг)	101	5Luc(-)	2	1НТ, 1Б
№ 5	PNeoRBLuc+ p35AdhD1+ p35AdhD2 (10 мкг+20 мкг+20 мкг)	123	5Luc(-)		1Б+ А, 3Б, 1НТ
№ 6	PNeoRBLuc+ p35AdhD1+ p35AdhD2 (10 мкг+20 мкг+20 мкг)	147	6Luc(-)	6	1А, 2Б, 3НТ
№ 7	PNeoRBLuc+ p35AdhD1+ p35AdhD2+ p35AdhE2 (5 мкг+20 мкг+20 мкг+20 мкг)	219	9Luc(-)	5	2А, 1Б, 1НТ

№ 8	PNtoRBLuc+ p35 AdhD1+ p35 AdhD1+ p35 AdhD2+ p35 AdhE2 (10 мкг+20 мкг+20 мкг+20 мкг)	245	14 Luc(-)	9	4A, 4B, 1NT
№ 9	PNeoRBLuc+ p35 AdhD1+ p35 AdhD2+ p35 AdhE2 (20 мкг+20 мкг+20 мкг+20 мкг)	268	7Luc(-)	1	1A

Таблица 15. Количество отдельных каллюсов, проанализированных через 4 недели после трансформации.

#### Вывод

Полученные результаты ясно показывают, что этот метод может упростить схему интеграции чужеродного гена, введенного в протопласти. Частота опосредуемой VirD1-VirD2 интеграции составляла приблизительно 20-30%. Кроме того, добавление virE2 улучшало эффективность трансформации. Этот метод может способствовать получению трансформированных растений с помощью простой схемы интеграции представляющего интерес гена и без использования чужеродной ДНК.

Пример 10. Трансформация генотипа кукурузы CG00526 путем непосредственной бомбардировки незрелых зиготических зародышей и выделение трансформированного каллюса с помощью фосфинотрицина в качестве селектирующего агента.

Подготовка ДНК для бомбардировки с использованием устройства для биобаллистического введения (Bioblastic®).

Незрелые зародыши или каллюсы типа I кукурузы могут быть трансформированы согласно тому, как это описано у Koziel и др., Biotechnology, 11: 194-200, 1993, причем соответствующие части этой работы включены в настоящее описание в качестве ссылки.

ДНК подготавливали для бомбардировки микроснарядами путем химического осаждения в присутствии частиц золота, размер которых близок к микрону (обычно диаметром 1,0 мкм или 0,3 мкм), в основном в соответствии с опубликованным способом. Кроме частиц золота, могут применяться другие твердые частицы, размер которых близок к микрону, такие как частицы вольфрама или платины. В одной из модификаций способа сначала получали сами частицы, сусpendingя их в воде и подвергая их ультразвуковому облучению. Затем облученные частицы пеллетировали путем центрифугирования и ресуспенсирования в водном растворе 50%-ного глицерина. Затем аликовотные количества полученных таким образом частиц вносили в отдельные пробирки, таким образом, чтобы они содержали приблизительно 3 мг золотых

частиц на пробирку объемом 50 мкл. В каждую пробирку добавляли различное количество ДНК, которое зависит от количества примененных плазмид, их размера и требуемой конечной концентрации ДНК.

Далее в каждую пробирку при перемешивании в течение приблизительно 3 мин добавляли приблизительно 50 мкл 2,5M CaCl<sub>2</sub> и приблизительно 20 мкл 0,1M спермидина в указанном порядке. Затем комплекс ДНК/золотые частицы осторожно центрифугировали. Супернатант удаляли. Частицы однократно промывали 250 мкл абсолютного этанола, вновь пеллетировали и затем ресуспенсировали в приблизительно 75 мкл свежего абсолютного этанола. Полученного таким образом комплекса ДНК/золотые частицы в каждой пробирке достаточно для 6 "выстрелов" с помощью устройства PDS-1000/He. 10 мкл тщательного суспенсированного комплекса ДНК/золотые частицы наносили с помощью пипетки на лист макроносителя в условиях полного отсутствия вибраций.

В устройстве PDS-1000/He выброс гелия вызывают путем разрушения пластикового диска, прочность которого рассчитана на различные уровни давления. Например, могут быть получены отдельные диски или комбинации дисков, которые разрушаются при давлении гелия 200, 450, 650, 900, 1100, 1350, 1550, 1800, 2000 и 2200 фунтов/кв. дюйм. Этот выброс газа двигает лист макроносителя, который останавливается экраном из нержавеющей стали. Экран может иметь различные размеры пор, такие как 10x10, 16x16, 24x24 и т.д. Другими регулируемыми параметрами являются расстояние полета макроносителя, размер зазора и расстояние полета частиц. Эти регулируемые параметры подробно описаны в инструкции по применению производителя. Обычно используют размер зазора, составляющий приблизительно 5,5 мм, расстояние полета макроносителя приблизительно 10 мм и расстояние полета частиц приблизительно от 6 до 9 см. Кроме того, на пути полета частиц между задерживающим экраном и пластиной-мишенью может быть установлен экран или щит. Этот экран или щит разрушает ударную волну от расширяющегося газа, уменьшая тем самым повреждение мишени. В одном из примеров применяют экраны из нержавеющей стали с размером отверстия 100 мкм. Могут применяться другие размеры отверстий и иная композиция материала.

Незрелые зародыши или эмбриогенные каллюсы типа I могут быть размещены на пластине-мишени по различной схеме. С помощью серии экспериментов разрабатывают оптимальные схемы для незрелых зародышей. В одной из оптимальных схем незрелые зародыши размещают по кольцевой схеме с диаметром кольца приблизительно 2 см. Незрелые зародыши помещают по периферии кольца. На каждую пластину-мишень помещают приблизительно 25

незрелых зародышей. Кроме того, пластина-мишень может быть установлена под углом к пусковой установке. Это обеспечивает максимальное насыщение базипетальной части незрелого зародыша выбрасываемыми частицами. Именно базипетальная часть незрелого зародыша приводит к получению эмбриогенной реакции.

В одном из примеров бомбардировки эмбриогенных каллюсов типа I каллюсы помещают в питательную среду по периферии кольца диаметром приблизительно 1 см. Механические регулируемые параметры устройства для бомбардировки могут быть выбраны подобными или идентичными таковым, описанным для бомбардировки незрелых зародышей.

Следует отметить, что схема расположения на мишени и параметры пушки взаимосвязаны. Иными словами, использование других механических регулируемых параметров устройства для бомбардировки микроснарядами может потребовать других оптимальных расположений ткани-реципиента на пластине-мишени. Настоящее изобретение включает также другие комбинации иных механических регулируемых параметров и иные схемы расположения на мишени.

#### Трансформация

Незрелые зародыши получали приблизительно через 14 дней после самоопыления. Незрелые зиготические зародыши распределяли на различные пластины-мишени, содержащие среду, способную индуцировать и поддерживать образование эмбриогенных каллюсов из расчета по 25 незрелых зародышей на пластину. Незрелые зиготические зародыши подвергали бомбардировке смесью плазмид p35SAdhD1, p35SAdhD2 и Т-ДНК плазмиды-мишени (pbarRBluc или pAVM1), используя устройство типа PDS-1000/He фирмы BioRad. Также может быть включена экспрессируемая ДНК гена virE2. Плазмиды осаждали на золотые частицы размером 0,3 или 1 мкм в основном в соответствии с описанной выше и опубликованной процедурой. Каждую пластину-мишень обстреливали дважды препаратом на основе плазмиды и золотых частиц, используя давление для выброса 1100-1300 фунтов/кв. дюйм.

Поскольку плазмида pbarRBluc содержит химерный ген, кодирующий устойчивость к фосфинотрицину (ФФТ), это вещество применяют для отбора *in vitro* трансформированных клеток. Этот селектирующий фактор вносили в концентрации 3 мг/л через 1 день после бомбардировки и поддерживали этот уровень на протяжении всех 8-12 недель. Полученный таким образом эмбриогенный каллюс регенерировали в присутствии 1 мг/л фосфинотрицина.

Все каллюсы исследовали на устойчивость к ФФТ с помощью теста на основе хлорфенола красного (Clorophenol Red (CR)), как описано в заявке на патент США 07/759243, поданной 13

сентября 1991, соответствующие части которой включены в настоящее описание в качестве ссылки. В этом методе анализа используют чувствительный к значению pH индикатор-краситель, который показывает, какие клетки растут в присутствии ФФТ. Растущие клетки вызывают изменение значения pH в среде и возвращают индикатору хлорфенолу красному желтый цвет (из красного). С помощью этого теста легко выявить растения, экспрессирующие ген устойчивости к ФФТ. Растения, дающие положительную реакцию в соответствии с CR-тестом, исследуют с помощью ПЦР на присутствие гена bar.

Растения, содержащие селектируемый маркерный ген, исследовали в отношении экспрессии гена люциферазы. Отсутствие люциферазной активности является индикатором того, что каллюс может представлять собой агролистический случай. Агролистический случай является таковым, при котором интеграция ДНК в ДНК кукурузы происходит способом, аналогичным встраиванию Т-ДНК, но без участия в этом *Agrobacterium*. Растения, которые давали отрицательную реакцию в отношении экспрессии гена люциферазы, анализировали с помощью Саузерн-блоттинга. Картина полос, получаемых с помощью Саузерн-блоттинга, показывает, какие трансформанты являются агролистическими по своей природе.

Пример 11. Трансформация генотипа кукурузы A188 путем непосредственной бомбардировки незрелых зиготических зародышей и выделение трансформированных растений с помощью фосфинотрицина в качестве селектирующего агента.

Початок кукурузы генотипа A188 подвергали самоопылению и приблизительно через 12-14 дней после этого получали незрелые зиготические зародыши. Незрелые зиготические зародыши помещали в среду 2JMS+5Dc с добавлением  $\text{AgNO}_3$ . Через 16-20 ч незрелые зиготические зародыши переносили в эту же среду, но содержащую 12% сахарозы. Через 3-5 ч незрелые зиготические зародыши подвергали бомбардировке смесью плазмид p35SAdhD1, p35SAdhD2 и Т-ДНК плазмиды-мишени (pbarRBluc или pAVM1), используя устройство типа PDS-1000/He. Также может быть включена экспрессируемая ДНК гена virE2. Плазмиды осаждали на золотые частицы размером 0,3 или 1 мкм в основном в соответствии с описанной выше и опубликованной процедурой фирмы BioRad. Частицы вводили, используя давление для выброса 1100-1300 фунтов/кв. дюйм. Каждую пластину-мишень обстреливали дважды препаратом на основе плазмиды и золотых частиц. После инкубации в течение ночи незрелые зародыши переносили в свежую поддерживающую среду, содержащую 2% сахарозы и фосфинотрицин в концентрации 5-10 мг/л, и пересевали приблизительно каждые две недели на такую

же среду. Полученный таким образом эмбриогенный каллюс регенерировали в присутствии 1 мг/л фосфинотрицина.

Все регенерированные растения исследовали на устойчивость к ФФТ с помощью теста на основе хлорфенола красного (CR). В этом методе анализа использовали чувствительный к значению pH индикатор-краситель, который показывает, какие клетки растут в присутствии ФФТ. Кусочки листьев, которые обладают устойчивостью к ФФТ, вызывают изменение значения pH в среде и возвращают индикатору желтый цвет (из красного). С помощью этого теста легко выявить растения, экспрессирующие ген устойчивости к ФФТ. Растения, давшие положительную реакцию в соответствии с CR-тестом, исследовали с помощью ПЦР на присутствие гена *bar*.

Растения, содержащие селектируемый маркерный ген, исследовали в отношении экспрессии гена люциферазы. Отсутствие люциферазной активности является индикатором того, что каллюс может представлять собой агролистический случай. Агролистический случай является таковым, при котором интеграция ДНК в ДНК кукурузы происходит способом, аналогичным встраиванию Т-ДНК, но без участия в этом *Agrobacterium*. Растения, которые дали отрицательную реакцию в отношении экспрессии гена люциферазы, анализировали с помощью Саузерн-блоттинга. Картина полос, получаемых с помощью Саузерн-блоттинга, показывает, какие трансформанты являются агролистическими по своей природе.

Пример 12. Трансформация генотипа кукурузы CG00526 путем бомбардировки каллюса типа I, полученного из незрелых зиготических зародышей, и выделение трансформированного каллюса с помощью фосфинотрицина в качестве селектирующего агента.

Каллюс типа I получали из незрелых зиготических зародышей, используя стандартные методы культивирования. Для экспериментов по введению гена приблизительно 300 мг каллюса типа I получали путем измельчения с помощью лезвия скальпеля, затем трехкратно промывали стандартной культуральной средой, содержащей 18% сахарозы, и немедленного помещали на полутвердую культуральную среду, также содержащую 18% сахарозы. Приблизительно через 4 ч ткань подвергали бомбардировке, используя устройство типа PDS-1000/He фирмы BioRad. Плазмида осаждали на золотые частицы размером 0,3 или 1 мкм в основном в соответствии со стандартным протоколом фирмы BioRad. Приблизительно через 16-20 ч после введения гена каллюс переносили в свежую стандартную культуральную среду, содержащую 2% сахарозы и 10 мг/мл фосфинотрицина в виде Баста. Каллюс для селекции пересевали в течение 8 недель, после чего выжившие и выросшие каллюсы переносили на стандартную

регенерирующую среду для получения растений.

Все регенерированные растения исследовали на устойчивость к ФФТ с помощью теста на основе хлорфенола красного (CR). В этом методе анализа используют чувствительный к значению pH индикатор-краситель, который показывает, какие клетки растут в присутствии ФФТ. Растущие клетки вызывают изменение значения pH в среде и возвращают индикатору хлорфенолу красному желтый цвет (из красного). С помощью этого теста легко выявить растения, экспрессирующие ген устойчивости к ФФТ. Растения, давшие положительную реакцию в соответствии с CR-тестом, исследовали с помощью ПЦР на присутствие гена *bar*.

Каллюсы, содержащие селектируемый маркерный ген, исследовали в отношении экспрессии гена люциферазы. Отсутствие люциферазной активности является индикатором того, что каллюс может представлять собой агролистический случай. Агролистический случай является таковым, при котором интеграция ДНК в ДНК кукурузы происходит способом, аналогичным встраиванию Т-ДНК, но без участия в этом *Agrobacterium*. Растения, которые дали отрицательную реакцию в отношении экспрессии гена люциферазы, анализировали с помощью Саузерн-блоттинга. Картина полос, получаемых с помощью Саузерн-блоттинга, показывает, какие трансформанты являются агролистическими по своей природе.

Пример 13. Трансформация каллюса кукурузы, генотип которой получен из B73, путем бомбардировки рыхлой суспензионной культуры клеток, полученной из незрелых зиготических зародышей, и выделение трансформированного каллюса с помощью фосфинотрицина в качестве селектирующего агента.

Рыхлый каллюс получали путем посева на пластинах незрелых зародышей с генотипом, полученным из B73 в соответствии с патентом США 5350689, который включен в настоящее описание в качестве ссылки. Суспензионные культуры еженедельно пересевали в среду N6. Через 3-5 дней после пересева клетки собирали путем фильтрации их через фильтр из нержавеющей стали с размером пор 710 мкм, а затем их распределяли по поверхности мембраны типа Durapore (см. CGC1280/81). По поверхности каждой мембраны диаметром 47 мм распределяли приблизительно 0,4 г клеток. Мембранные помещали в среду N6, содержащую 12% сахарозы, за 3-5 ч до бомбардировки смесью плазмид, несущих гены *vir* (p35SAdhD1, p35SAdhD2) и Т-ДНК плазмида-мишени (pbarRB1uc или pAVM1), используя устройство типа PDS-1000/He. В клетки вводили либо одинаковые количества (1:1:1) *VirD1*, *VirD2* и Т-ДНК плазмида-мишени, содержащей ген 35S-*bar* (в сумме по 1,3 мкг каждого компонента за 2 выстрела), либо избыток генов *vir* (2:2:1 мкг за 2 выстрела).

стрела). Также может быть включена экспрессируемая ДНК гена *virE2*.

Плазмида осаждали на золотые частицы размером 0,3 или 1 мкм в основном в соответствии с описанной выше и опубликованной процедурой фирмы BioRad. Частицы вводили, используя давление гелия для выброса 1100-1300 фунтов/кв. дюйм. Каждую пластины-мишень обстреливают дважды. После инкубации в течение ночи мембранны с каллюсами переносили в свежую поддерживающую среду, содержащую 2% сахарозы и фосфинотрицин в концентрации 3 мг/л. Через 3 недели клетки с каждого фильтра распределяли по поверхности 3 пластин со средой 2N6, содержащей 10 мг/л Баста. Через 4 недели выросшие колонии переносили в свежую среду 2N6, содержащую 3 мг/л Баста, и через неделю полученные таким образом каллюсы исследовали на устойчивость к ФФТ с помощью теста на основе хлорфенола красного (CR). В этом методе анализа используют чувствительный к значению pH индикатор-краситель, который показывает, какие клетки растут в присутствии ФФТ. Растущие клетки вызывают изменение значения pH в среде и возвращают индикатору желтый цвет (из красного). С помощью этого теста легко выявить каллюсы, экспрессирующие ген устойчивости к ФФТ. Образцы, которые давали положительную реакцию, изменили цвет среды либо на желтый, либо на оранжевый, что свидетельствует по крайней мере о некотором уровне устойчивости к ФФТ, и их помещали в среду 2N6, содержащую 5 мг/л Баста.

Каллюсы, давшие положительную реакцию в соответствии с CR-тестом, исследовали с помощью ПЦР на присутствие гена *bar*.

Таблица 16

Выявление трансформированных линий каллюсов кукурузы

Обработка	Желтый	Оранжевый
контроль(1)	0	1
контроль(2)	0	0
2:2:1	0	1*
1:1:1(1)‡	21	2§
1:1:1(2)	4	0

Таблица 16:

‡ - (1) и (2) подвергали двум повторным обработкам;

\* - эта колония давала положительную реакцию в отношении люциферазы;

§ - один из этих вариантов представлял собой предполагаемый агролистический случай.

Линии каллюсов, содержащие селектируемый ген-маркер, исследовали в отношении экспрессии гена люциферазы. Отсутствие люциферазной активности являлось индикатором того, что каллюс может представлять собой агролистический случай. Агролистический случай является таковым, при котором интеграция ДНК в ДНК кукурузы происходит способом, аналогич-

ным встраиванию Т-ДНК, но без участия в этом *Agrobacterium*. Линии каллюсов, которые давали отрицательную реакцию в отношении экспрессии гена люциферазы, анализировали с помощью Саузерн-блоттинга. Картина полос, получаемых с помощью Саузерн-блоттинга (см. чертеж), показала, какие трансформанты являлись агролистическими по своей природе.

Таблица 17

Анализ линий каллюсов кукурузы, полученных после бомбардировки клеток кукурузы конструкциями, пригодными для введения Т-ДНК-вставок в клетки кукурузы

Анализ люциферазы	Проанализировано (Саузерн)	Агролистические (предполагаемые)	Биобаллистические	Агробиобаллистические
luc+ 12	6		6	
luc- 11	9	4	3	2
не анализировали				

Из таблицы видно, что из 23 линий клеток, проанализированных в этом эксперименте, 11 лишены люциферазной активности, а в 9 из них, проанализированных с помощью Саузерн-блоттинга, 4 содержали только Т-ДНК-подобные вставки и 2 содержали как Т-ДНК-подобные вставки, так и типичные вставки, получаемые после использования небиологического (в данном случае биобаллистического) метода введения ДНК.

Пример 14. Трансформация каллюса кукурузы, имеющей генотип CG00526, путем бомбардировки клеток каллюса типа I, полученных из незрелых зиготических зародышей, и выделение трансформированного каллюса с помощью фосфинотрицина в качестве селектирующего агента.

Каллюсы получали путем посева на пластинах незрелых зародышей генотипа CG00526, как описано у Koziel и др., *Biotechnology*, 11: 194-200, 1993.

Культуры еженедельно пересевали в поддерживающую среду (2DG4 + 0,5 мг/л 2,4-Д) и колонии клеток, взятых через 2-3 дня после пересева, помещали на 3-5 ч на среду 2DG4, содержащую 12% сахарозы. 16 кусочков каллюса-мишени на пластину размещали в виде кольца диаметром 8-10 мм. Каллюс подвергали бомбардировке смесью плазмид, несущих гены *vir* (p35SAdhD1, p35SAdhD2) и Т-ДНК плазмиды-мишени (pbarRBluc или pAVM1), используя устройство типа PDS-1000/He. В клетки вводили либо одинаковые количества (1:1:1) VirD1, VirD2 и 35S-bar Т-ДНК-мишени (в сумме по 1,3 мкг каждого компонента на 2 выстрела), либо избыток генов *vir* (2:2:1 мкг на 2 выстрела). Также может быть включена экспрессируемая ДНК гена *virE2*.

Плазмида осаждали на золотые частицы размером 0,3 или 1 мкм в основном в соответст-

вии с описанной выше и опубликованной процедурой фирмы BioRad. Частицы вводили, используя давление гелия для выброса 650 фунтов/кв. дюйм. Каждую пластины-мишень обстреливали дважды. После инкубации в течение ночи мембранны с каллюсами переносили в свежую поддерживающую среду, содержащую 2% сахарозы. Еще через 2 недели требуемый каллюс (имеющий морфологическое строение, типичное для типа I) пересевали в поддерживающую среду, содержащую 120 мг/л Баста (ФФТ). Через 4 недели выросший каллюс переносили в свежую поддерживающую среду, содержащую 30 мг/л Баста.

Каллюс для селекции пересевали в течение полных 8 недель, после чего выживший и выросший каллюс переносили на стандартную регенерирующую среду для получения растений.

Все регенерированные растения исследовали на устойчивость к ФФТ с помощью теста на основе хлорфенола красного (CR). В этом методе анализа используют чувствительный к значению pH индикатор-краситель, который показывает, какие клетки растут в присутствии ФФТ. Растущие клетки вызывают изменение значения pH в среде и возвращают индикатору желтый цвет (из красного). С помощью этого теста легко выявить растения, экспрессирующие ген устойчивости к ФФТ. Растения, которые дали положительную реакцию в соответствии с CR-тестом, исследовали с помощью ПЦР на присутствие гена *bar*.

Растения, содержащие селектируемый маркерный ген, исследовали в отношении экспрессии гена люциферазы. Отсутствие люциферазной активности является индикатором того, что каллюс может представлять собой агролистический случай. Агролистический случай является таковым, при котором интеграция ДНК в ДНК кукурузы происходит способом, аналогичным встраиванию Т-ДНК, но без участия в этом *Agrobacterium*. Растения, которые давали отрицательную реакцию в отношении экспрессии гена люциферазы, анализировали с помощью Саузерн-блоттинга. Картина полос, полученных с помощью Саузерн-блоттинга, показала, какие трансформанты являются агролистическими по своей природе.

#### Пример 15.

Трансформация протопластов кукурузы генами *vir* и последовательностью Т-ДНК-мишенью.

Способы получения протопластов из суспензионных культур *Zea mays* и трансформации с помощью ДНК описаны в патенте США 5350689.

ДНК, применяемые для трансформации протопластов, состоят, например, из смеси ДНК плазмид p35SAdhD1, p35SAdhD2 и Т-ДНК плазмиды-мишени (pbarRBluc или pAVM1). Также может быть включена экспрессируемая ДНК гена *virE2* (см. пример 7). Каллюс получа-

ли из протопластов и растения регенерировали, как описано выше, с использованием фосфинотрицина в качестве селектирующего агента. Клетки, полученные из трансформированных протопластов, обычно отбирают, подвергая селекции с 3-5 мг/л ФФТ через 10 дней после обработки с помощью ДНК.

Все регенерированные растения исследовали на устойчивость к ФФТ с помощью теста на основе хлорфенола красного (CR). В этом методе анализа используют чувствительный к значению pH индикатор-краситель, который показывает, какие клетки растут в присутствии ФФТ. Растущие клетки вызывают изменение значения pH в среде и возвращают индикатору желтый цвет (из красного). С помощью этого теста легко выявить растения, экспрессирующие ген устойчивости к ФФТ. Растения, которые дали положительную реакцию в соответствии с CR-тестом, исследовали с помощью ПЦР на присутствие гена *bar*.

Растения, содержащие селектируемый маркерный ген, исследовали в отношении экспрессии гена люциферазы. Отсутствие люциферазной активности является индикатором того, что каллюс может представлять собой агролистический случай. Агролистический случай является таковым, при котором интеграция ДНК в ДНК кукурузы происходит способом, аналогичным встраиванию Т-ДНК, но без участия в этом *Agrobacterium*. Растения, которые давали отрицательную реакцию в отношении экспрессии гена люциферазы, анализировали с помощью Саузерн-блоттинга. Картина полос, полученных с помощью Саузерн-блоттинга, показала, какие трансформанты имели Т-ДНК-подобную вставку. Для подтверждения природы вставок может быть проведено клонирование и секвенирование пограничных последовательностей.

Хотя выше подробно описано лишь некоторое количество типовых вариантов осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области очевидно, что в эти варианты могут быть внесены различные изменения, не выходящие за объем настоящего изобретения. Предполагается, что все такие модификации включены в объем настоящего изобретения.

#### Библиография ссылок, указанных в примерах

- Ahl Goy P. и Duesing J.H., (1995), Bio/Technology, 13, 454-458.  
 Albert H., Dale E.C., Lee E. и Ow D.W., (1995), Plant J., 7, 649-659.  
 Albright L.M., Yanosky M.F., Leroux B., Ma D. и Nester E.W., (1987), J. Bacteriol., 169, 1046-1055.  
 An G., (1985), Plant Physiol., 79, 568-570.  
 Bevan M., (1984), Nucleic Acids Res., 12, 8711-8721.  
 Callis J., Fromm M.E., Walbot V., (1987), Genes & Dev., 1, 1183-1200.

- Chilton M-D., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90, 3119-3120.
- Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S., Hsu C., Yin K.G., Chu C.Y. и Bi F.Y., (1975), Sci. Sin., 18, 659-668.
- Chyi Y.S., Jorgensen R.A., Golstein D., Tanksley S.D. & Loaiza-Figueroa F., (1986), Mol. Gen. Genet., 204, 64-69.
- Citovsky V., Warnick D. & Zambryski P., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 91, 3210-3214.
- deWet J.R., Wood K.V., DeLuca M., Helsinki D.R. и Subramani S., (1987), "Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells", Mol. Cell. Biol., 7, 725-737.
- DiMaio J.J. и Shillito R.D., (1992), J. Tissue Cult. Methods, 12, 163-169.
- Dowson Day M.J., Ashurst J.L., Mathias S.F., Watts J.W., Wilson T.M.A. и Dixon R.A., (1993), Plant Mol. Biol., 23, 97-109.
- Durrenberger F., Cramer F., Hohn B. и Koukolikova-Nicola Z., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86, 9154-9158.
- Filichkin S.A. и Gelvin S.B., (1993) Mol. Microbiol., 8, 915-926.
- Fukushige S. и Sauer B., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89, 7905-7909.
- Gallie D.R., Lucas W.J. и Walbot V., (1989), Plant Cell, 1, 301-311.
- Gallie D.R., (1991), Genes & Dev., 5, 2108-2116.
- Gallie D.R., (1993), Plant Cell reports, 13, 119-122.
- Ghai J. и Das A., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 8, 3109-3113.
- Gheysen G., Villaroel R. и Van Montagu M., (1991), Genes & Dev., 5, 287-297.
- Gordon-Kamm W.J., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R.J., Start W.G., O'Brien J.V., Chambers S.A., Adams R.A., Willets N.G., Rice T.B., Mackey C.J., Krueger R.W., Kausch A.P. и Lemaux P.G., (1990), Plant Cell, 2, 603-618.
- Hall G., Allen G.C., Loer D.S., Thompson W.F. и Spiker S., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 88, 9320-9324.
- Herman L., Jacobs A., Van Montagu M. и Depicker A., (1990), Mol. Gen. Genet., 224, 248-256.
- Herrera-Estrella A., Chen Z., Van Montagu M. и Wang K., (1988), EMBO J., 7, 4055-4062.
- Herrera-Estrella A., van Montagu M. и Wang K., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 87, 9534-9537.
- Higgs D.C. и Colbert J.T., (1993), Plant Cell reports, 12, 445-452.
- Howard E.A., Winsor B., De Vos G. и Zambryski P., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86, 4017-4021.
- Howard E.A., Zupan J.R., Citovsky и Zambryski P., (1992), Cell, 68, 109-118.
- Jasper F., Koncz C., Schell J. и Steinbiss H.-H., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 91, 694-698.
- Kado C.I., (1993), в Bacterial conjugation, ред. Clewell D.B., (Plenum, New York), стр. 243-254.
- Kertbundit S., De Greve H., Deboeck F., Van Montagu M. и Hernalsteens J.-P. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 88, 5212-5216.
- Klein T.M., Harper E.C., Svab Z., Sanford J.C., Fromm M.E. и Maliga P., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 85, 8502-8505.
- Klein T.M., Kornstein L., Sanford J.C. и Fromm M.E., (1989), Plant Physiol., 91, 440-444.
- Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Zs., Körber H., Redei G.P. и Schell J., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86, 8467-8471.
- Koukolikova-Nicola Z., Raineri D., Stephens K., Ramos C., Tinland B., Nester E. и Hohn B., (1993), J. Bacteriol., 175, 723-731.
- Koziel M.G., Beland G.L., Bowman C., Carozzi N.B., Grenshaw R., Grossland L., Dawson J., Desai N., Hill M., Kadwell S., Launis K., Lewis K., Maddox D., McPherson K., Meghji M.R., Merlin E., Rhodes R., Warren G.W., Wright M. и Evola S.V., (1993), Bio/Technology, 11, 194-200.
- Lakso M., Sauer B., Mosinger B., Lee E.J., Manning R.W., Yu S.H., Mulder K.L. и Westphal H., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86, 6232-6236.
- Matsuzaki H., Araki H. и Oshima Y., (1988), Mol. Cell Biol., 8, 955-962.
- Matsuzaki H., Nakajima R., Nishiyama J., Araki H. и Oshima Y., (1990), J. Bacteriology, 172, 610-618.
- Matzke M.A. и Matzke A.J.M., (1995), Plant Physiol., 107, 679-685.
- Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Bakkeren G., Cramer A., Angelis K., Redei G.P., Schell J., Hohn B. и Koncz C., (1991), EMBO J., 10, 697-704.
- Morrish F.M. и Fromm M.E., 1992, Current Opinion in Biotechnology, 3, 141-146.
- Murashige T. и Skoog F., (1962), Physiol. Plant, 15, 473-497.
- Odell J.T. и Russell S.H., (1994), в Homologous Recombination and gene Silencing in Plants, ред. Paszkowski J., (Kluwer Academic Publishers), стр. 219-270.
- O'Gorman S., Fox D.T. и Wahl G.M., (1991), Science, 251, 1351-1355.
- Ohba T., Yoshioka Y., Machida C. и Machida Y., (1995), Plant J., 7, 157-164.
- Ohta S., Mita S., Hattori T. и Nakamura K., (1990), Plant Cell Physiol., 31, 805-813.
- Onouchi H., Yokoi K., Machida C., Matsuzaki H., Oshima Y., Matsuoka K., Nakamura K. и Machida Y., (1991), Nucleic Acids Res., 19, 6373-6378.

Onouchi H., Nishihama R., Kudo M., Machida Y. и Machida C., (1995), Mol. Gen. Genet., 247, 653-660.

Ow D.W., Wood K.V., DeLuca M., deWet J.R., Helinski D.R. и Howell S.H., (1986), Science, 234, 856-859.

Pansegrouw W., Schoumacher F., Hohn B. и Lanka E., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90, 11538-11542.

Raskin I., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 93, 3164-3166.

Rothstein S.J., Lahmers K.N., Lotstein R.J., Carozzi N.B., Jayne S.M. и Rice D.A., (1987), Gene, 53, 153-161.

Rosenberg A.H., Lade B.N., Chui D-S., Lin S-W., Dun J.J., Studier F.W., (1987), Gene, 125-135.

Rossi L., Hohn B. и Tinland B., (1993), Mol. Gen. Genet., 239, 345-353.

Russell S.H., Hoopes J.L. и Odell J.T., (1992), Mol. Gen. Genet. 234, 49-59.

Saunders K., Lucy A. и Stanley J., (1991), Nucleic Acids Research, 19, 2325-2330.

Shurvinton C.E., Hedges L. и Ream W., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89, 11837-11841.

Stachel S.E., Timmermann B. и Zambryski P., (1986), Nature, (London), 322, 706-712.

Stachel и др., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 83, 379-383, (1986).

Stachel S., Timmerman B. и Zambryski P., (1987), EMBO J., 6, 857-863.

Stenger D.C., Revington G.N., Stevenson M.C. и Bisaro D.M., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 88, 8029-8033.

Thompson C.J., Movva N.R., Tizard R., Crameri R., Davies J.E., Lauweereyes M. и Botterman J., (1987), EMBO J., 6, 2519-2523.

Tinland B., Koukolikova-Nicola Z., Hall M.N. и Hohn B., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89, 8000-8004.

Tinland и др., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 91, 8000-8004, (1994).

Tinland B., Schoumacher F., Gloeckler V., Bravo Angel A.M.B. и Hohn B., (1995), EMBO J., 14, 3585-3595.

Ugaki M., Ueda T., Timmermans M.C.P., Vieira J., Elliston K.O. и Messing J., (1991), Nucleic Acids Research, 19, 371-377.

Van Haaren M.J.J., Sede N.J.A., De Boer H.A., Schilperoort R.A. и Hooykaas P.J.J., (1989), Plant Mol. Biol., 13, 523-531.

Vasil V., Castillo A.M., Fromm. и Vasil I.K., (1992), Bio/Technology, 10, 667-674.

Vogel A.M. и Das A., (1992), J. Bacteriol., 174, 303-312.

Wallroth M. и др., Mol. Gen. Genet., 202, 6-15, (1986).

Wan Y. и Lemaux P.G., (1994), Plant Physiol., 104, 37-48.

Wang K., Stachel S.E., Timmerman B., Van Montagu M. и Zambryski P., (1987), Science, 235, 587-591.

Ward E.R. и Barnes W.M., (1988), Science, 242, 927-930.

Winans и др., Nucl. Acids Res., (1987), 15, 825-837.

Yanofsky M.F., Porter S.G., Young C., Albright L.M., Gordon M.P. и Nester E.W., (1986), Cell, 47, 471-477.

Young C. и Nester E.W., (1988), J. Bacteriol. 8, 3367-3374.

Yusibov V. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 91, 2994-2998, (1994).

Zambryski P., (1992), Annu. Rev. Plant. Physiol., 43, 465-490.

Zupan J.R. и Zambryski P., (1995), Plant Physiol., 107, 1041-1047.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

### (1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

#### (i) ЗАЯВИТЕЛЬ:

(A) НАИМЕНОВАНИЕ: CIBA-GEIGY AG

(B) УЛИЦА: Klybeckstrasse 141

(C) ГОРОД: Базель

(E) СТРАНА: Швейцария

(F) ПОЧТОВЫЙ КОД (ZIP): 4002

(G) ТЕЛЕФОН: +41 61 691111

(H) ТЕЛЕФАКС: +41 61 6967976

(I) ТЕЛЕКС: 962 991

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Улучшенный способ интеграции экзогенной ДНК, введенной в эукариотические клетки

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 23

(iv) ФОРМА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ДЛЯ КОМПЬЮТЕРА:

(A) ТИП НОСИТЕЛЯ: флоппи-диск

(B) КОМПЬЮТЕР: IBM PC, совместимый

(C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS

(D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: PatentIn Release #1.0, версия #1.25 (EPO)

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 27 пар оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: двухцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 1:

GNNTGNCAGG

ATATATNNNN

NNGTNAN

27



(Б) ТИП: нуклеиновая кислота  
(С) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная  
(Д) ТОПОЛОГИЯ: линейная  
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет  
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 9:  
TCGAGTTGCA TGCAG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 10:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 17 пар оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: двухцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 10:

GATCGCAGCA TGCCTAG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 11:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 45 пар оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: двухцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 11:

GATCAAGCTT TTGATGAAAG

AATACGTTAT TCTTTCATCA AGATC 45

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 12:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 46 пар оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: двухцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 12:

AGCTACTGCA GTTGATGAAA  
GAATACGTTA TTCTTTCATC AACTAG 46

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 13:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 45 пар оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: двухцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет  
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 13:  
GATCAAGCTT TTGATGAAAG  
AATACGTTAT TCTTTCATCA AGATC 45

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 14:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 35 пар оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: двухцепочечная

почечная

- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)
- (iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 14:  
AATTCATGGA TCTTTCTGGC  
AATGAGAAATCCAGG 35

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 15:  
(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
(A) ДЛИНА: 62 пары оснований  
(B) ТИП: нуклеиновая кислота  
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: однозначная

последовательности: SEQ ID NO: 15:

- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)
- (iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 15:

GTCGCTTGCC TTCTTACTCC CCAACTCCCT CTCCCTAGCAC GCTCTGGACA CCTAGGCGCG 60  
AT 62

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 16:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 56 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: однозначная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)
- (iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет  
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 16:

CGGGCTTACG TCTGGAGGCG GTCCTAGAG AGGGAGTTGG GGGAGTAGAA CGCAAG 56

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 17:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 53 пары оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: двухцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)
- (iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 17:

ATTTCTCAA ACACACAGA GTCACGTCGA GTGAGACTGC CAGCAACAGC CAT 53

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 18:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 51 пара оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)
- (iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 18:

TATCTCTATA CTCCCCAAC TCCCTCTCT ACCAGGCTTC CGACACCTAG C 51

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 19:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 54 пары оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)
- (iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 19:

AAATGGCTAG GTATGGAGG CCTCTAGGA GAGGGAGTTG GGGAGTAGA AGGA 54

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 20:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 45 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)  
 (iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
 (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет  
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 20:

CGAATTTCGCT AGCATCGATA GATCTGGTAC CAAAGCTTCT CGAGT 45

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 21:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 53 пары оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)
- (iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 21:

AGCTCTCGA GAAGCTTTCG TACCCAGATCT ATCGATGCTA CGGAATTCCG ATG 53

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 22:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 33 пары оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: двухцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)
- (iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 22:

ATCCGGCAGG ATATATACCG 33

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 23:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 35 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: двухцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)
- (iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 23:

AATTCAATGGA TCTTCTGGC AATGAGAAAT CCAGG 35

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ интеграции экзогенной ДНК в геном растительной клетки, отличающийся тем,

что включает трансформацию этой клетки указанной ДНК, связанной с пограничными последовательностями Т-ДНК, и, по крайней мере, одной вспомогательной последовательностью ДНК или РНК, обеспечивающей экспрессию в растительной клетке одного или более белков, опосредующих интеграцию экзогенной ДНК, причем эти белки кодируются участком *vir* Ti или *Ri*-плазмид агробактерий таким образом, чтобы данные белки присутствовали в растительной клетке в достаточном количестве после проникновения экзогенной ДНК в растительную клетку и до того, как произойдет интеграция экзогенной ДНК в геном растительной клетки.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что экзогенную ДНК и вспомогательные последовательности ДНК или РНК вводят в растительную клетку одновременно.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что один или несколько белков, опосредующих интеграцию экзогенной ДНК, кодируются участком *VirD1*, *VirD2*, *VirC1*, *VirC2* или *VirE2*.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что один или несколько белков, опосредующих интеграцию экзогенной ДНК, кодируются участком *VirD2*, или комбинацией *VirD1* и *VirD2*, или комбинацией *VirD1*, *VirD2* и *VirE2*.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что один или несколько белков, опосредующих интеграцию экзогенной ДНК, кодируются участком *VirD2*.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что экзогенная ДНК, связанная с пограничными областями Т-ДНК агробактерий, представляет собой фрагмент растительного вирусного вектора.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что вспомогательная последовательность ДНК представляет собой фрагмент растительного вирусного вектора.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что экзогенная ДНК, связанная с пограничными последовательностями Т-ДНК агробактерий, и вспомогательная последовательность ДНК представляют собой фрагмент растительного вирусного вектора.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что растительная клетка представляет собой клетку двудольного растения.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что двудольное растение выбирают из группы, включающей табак, хлопчатник, масличный рапс и сою.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что растительная клетка представляет собой клетку однодольного растения.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что однодольное растение выбирают из группы, включающей кукурузу, пшеницу и рис.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что экзогенная ДНК представляет собой химерный ген.

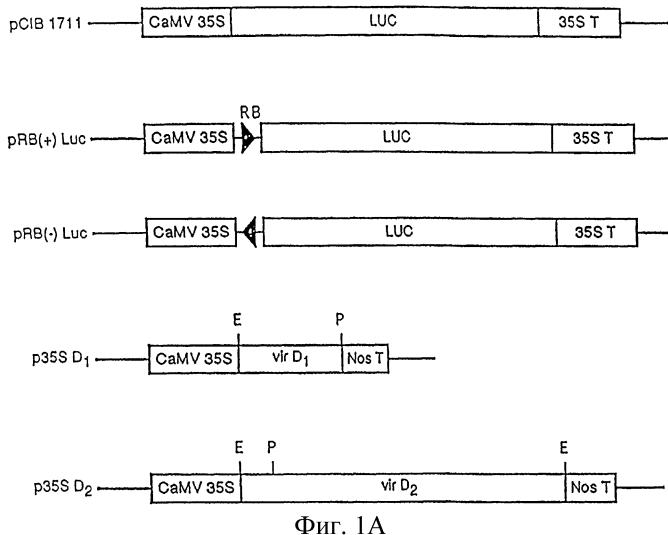
14. Способ по п.13, отличающийся тем, что химерный ген обеспечивает экспрессию белка в растительной клетке.

15. Способ по п.2, отличающийся тем, что экзогенная ДНК, связанная с пограничными последовательностями Т-ДНК агробактерий, и вспомогательная последовательность ДНК являются фрагментами одной молекулы ДНК.

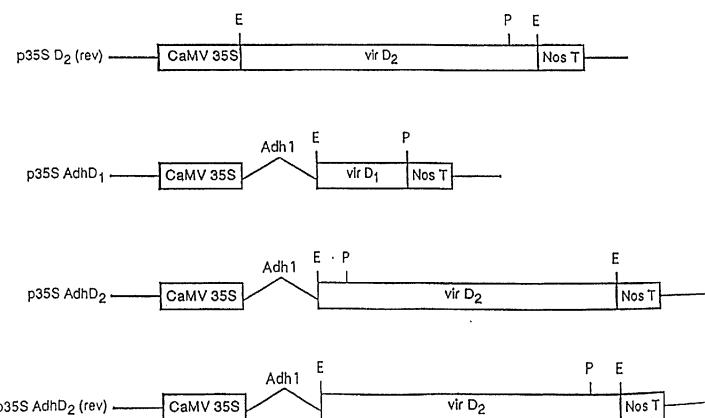
16. Способ получения фертильного трансгенного растения с интегрированной в геном экзогенной ДНК, связанной с пограничными последовательностями Т-ДНК агробактерий, включающей интеграцию экзогенной ДНК в геном растительной клетки в соответствии со способом по п.1 и регенерацию фертильного трансгенного растения из трансформированной растительной клетки.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что получают фертильное трансгенное растение, выбранное из группы, включающей табак, хлопчатник, масличный рапс, сою, кукурузу, пшеницу и рис.

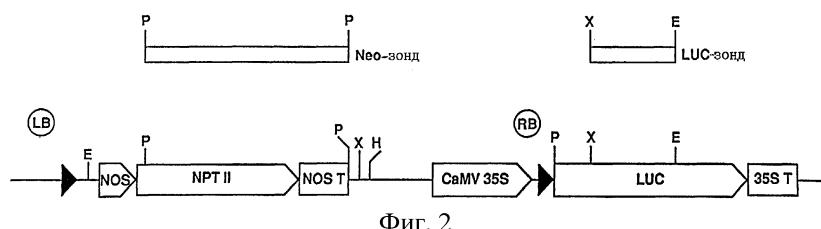
18. Способ по п.16, отличающийся тем, что получают фертильное трансгенное растение, выбранное из группы, включающей кукурузу, пшеницу, овес, рожь, сорго, рис, ячмень, просо, дернообразующие и кормовые травы, а также хлопчатник, сахарный тростник, сахарную свеклу, масличный рапс, бананы, тополь, орех, табак и сою.



Фиг. 1А



Фиг. 1Б



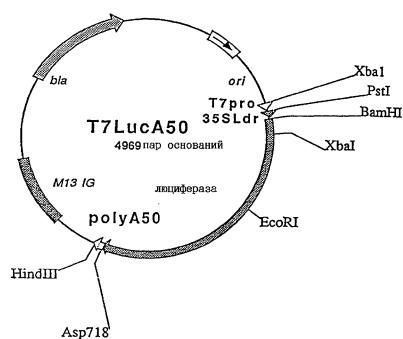
Фиг. 2

Приемлемый: \*. Соединительный участок 4 августа 1995 13:25

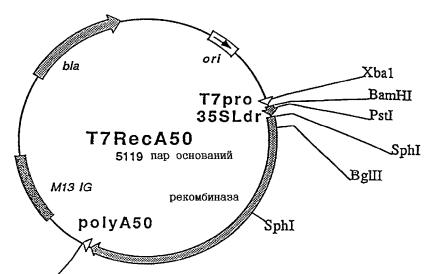
1.	Соед.уч-окт	1	GGATCCGGCA	AAGAAAATAT	TATATTATTA	ACATTAGCTT	CCTCCAAACAA	50
2a.	—"		GGATCCGGCA	TTATGTTAA	TATATCCACA	GTTAAATCAC	ACCAATTACAA	
2b.	—"		GGATCCGGCC	CAGTAAAGAT	TGTTTCATAG	ATATCAATCA	AGAAAAGAGT	
3.	—"		GGATCCGGGCA	AACAAAGCAC	CAAATCATAA	TTATTATTAG	TTCTCTACAAAC	
5.	—"		GGATCCGGCA	TGAGTAGAA	TGCATTCAAA	ATCTTGAaTC	ATCATTACAT	
Rb.	—"		GGATCCGGCA	cgatatac	ccgtttaat	cTGCA.....		

Соед.уч-ок - соединительный участок

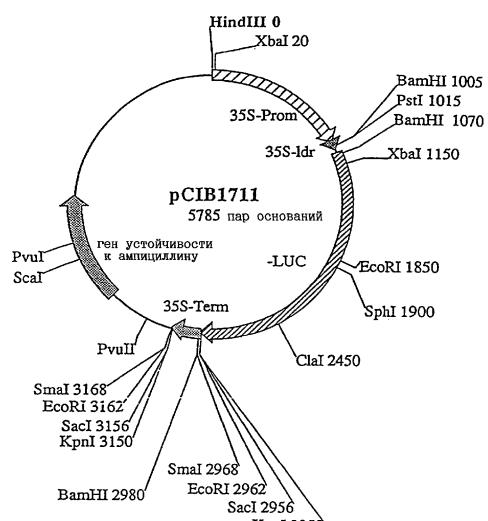
Фиг. 3



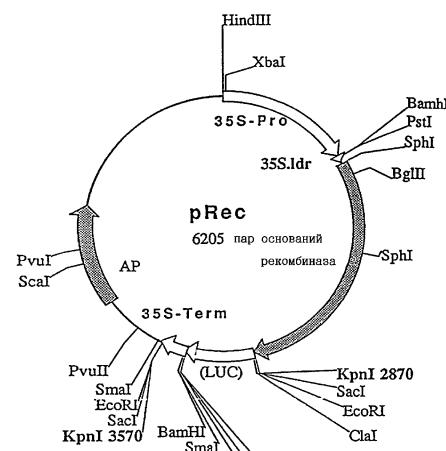
Фиг. 4А



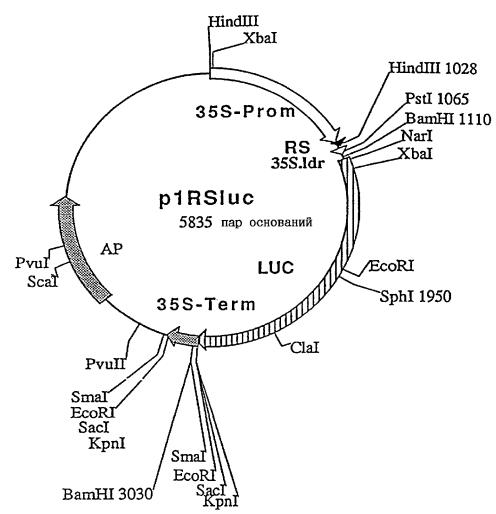
Фиг. 4Б



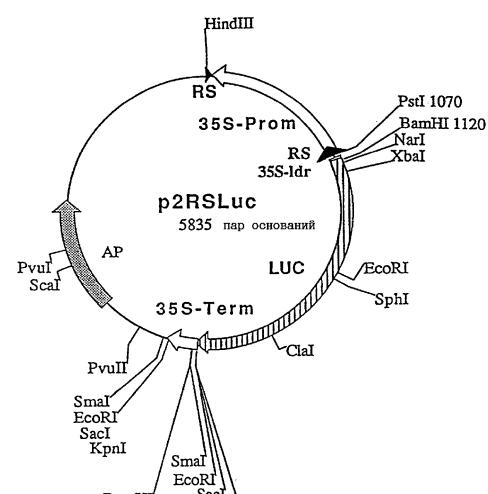
Фиг. 4В



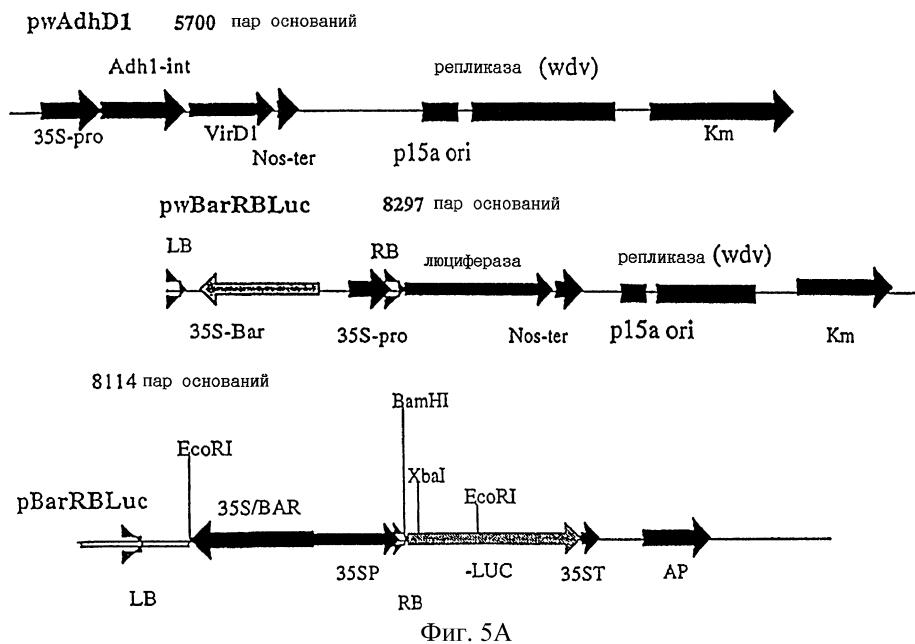
Фиг. 4Г



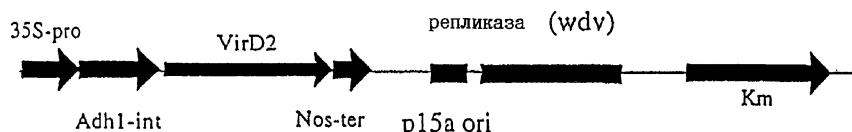
Фиг. 4Д



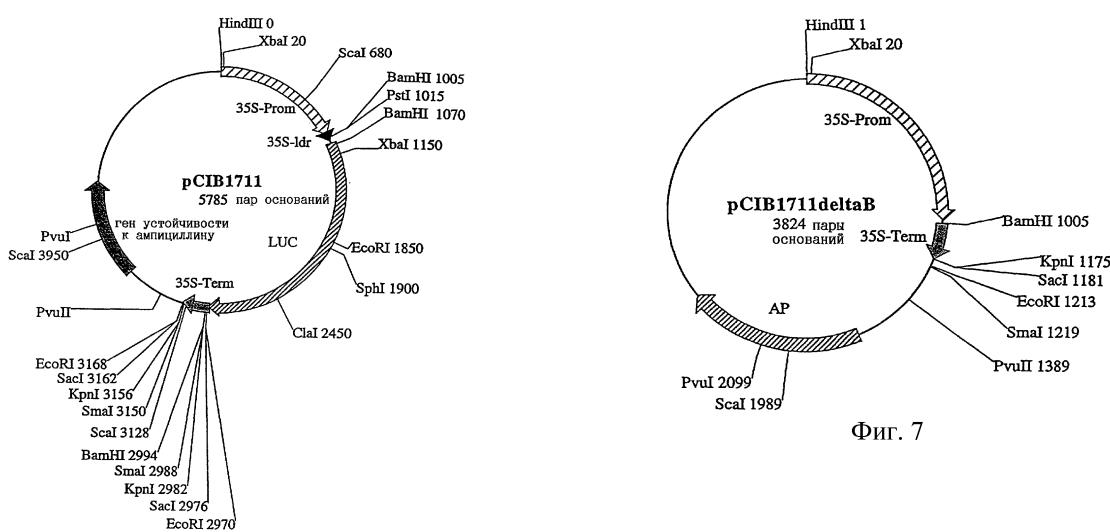
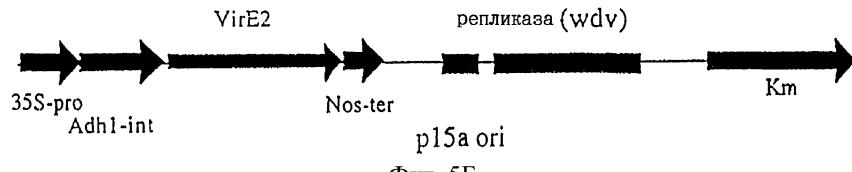
Фиг. 4Е



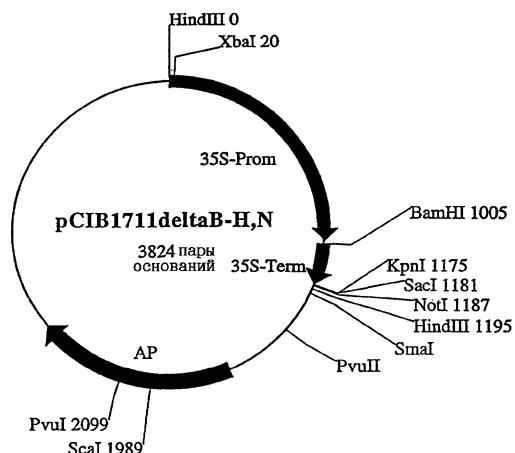
**pwAdhD2** 6297 пар оснований



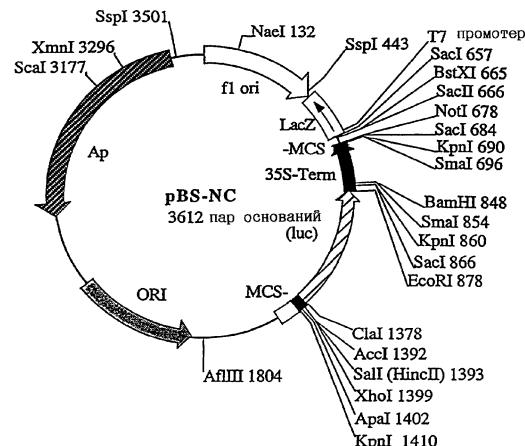
**pwAdhE2** 6100 пар оснований



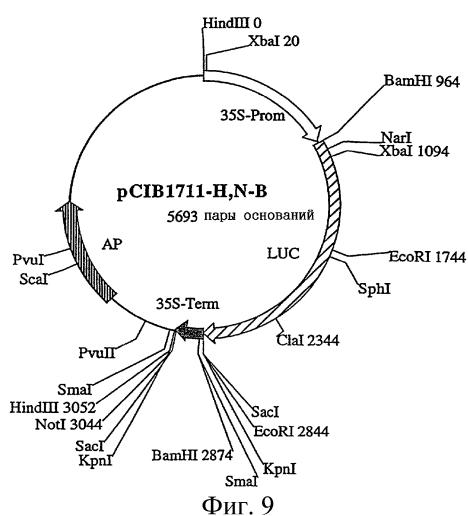
Фиг. 6



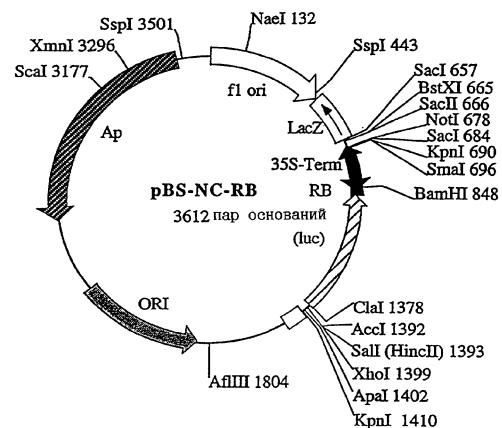
Фиг. 8



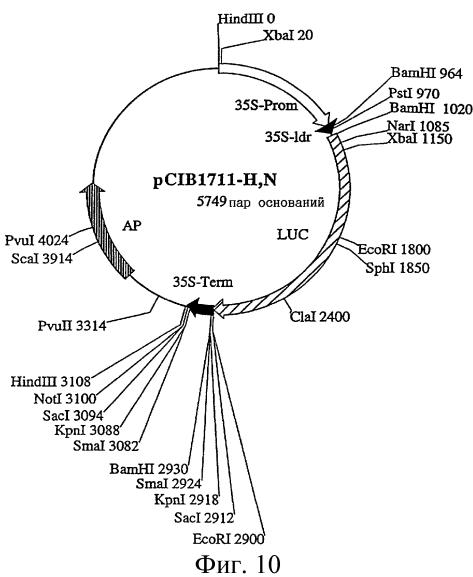
Фиг. 11



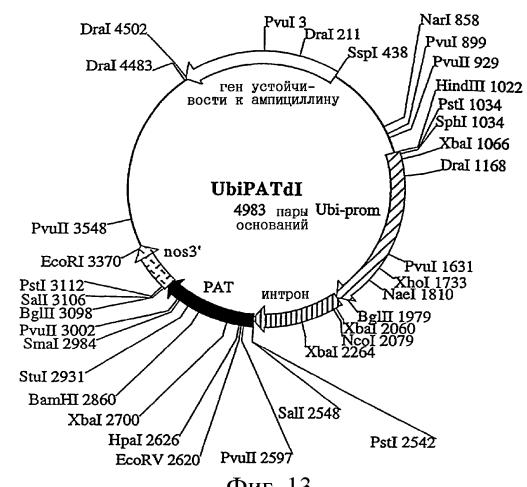
Фиг. 9



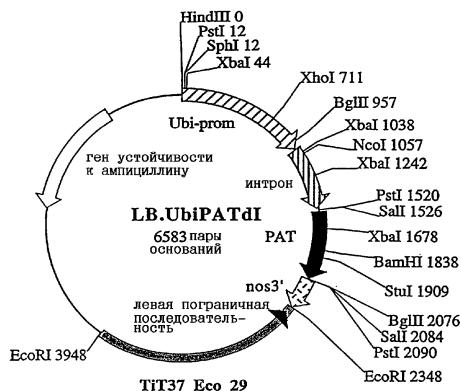
Фиг. 12



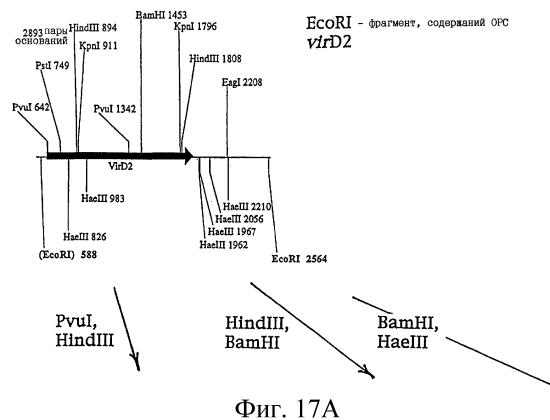
Фиг. 10



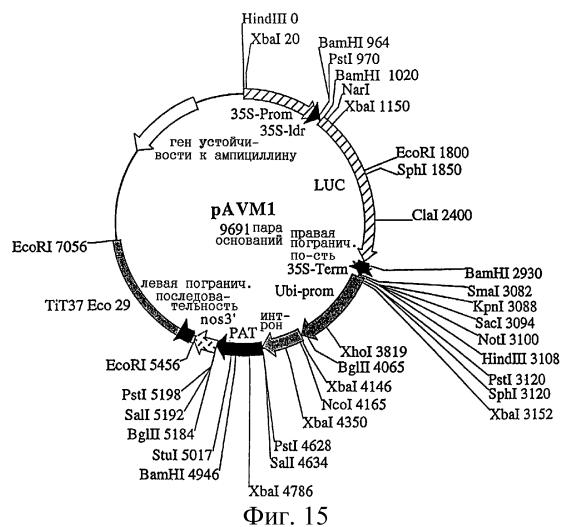
Фиг. 13



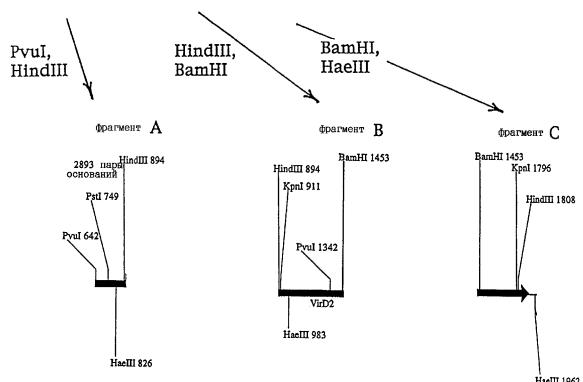
Фиг. 14



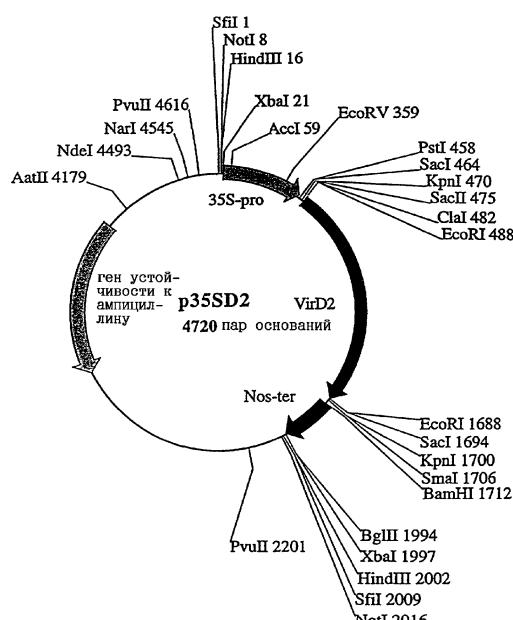
Фиг. 17А



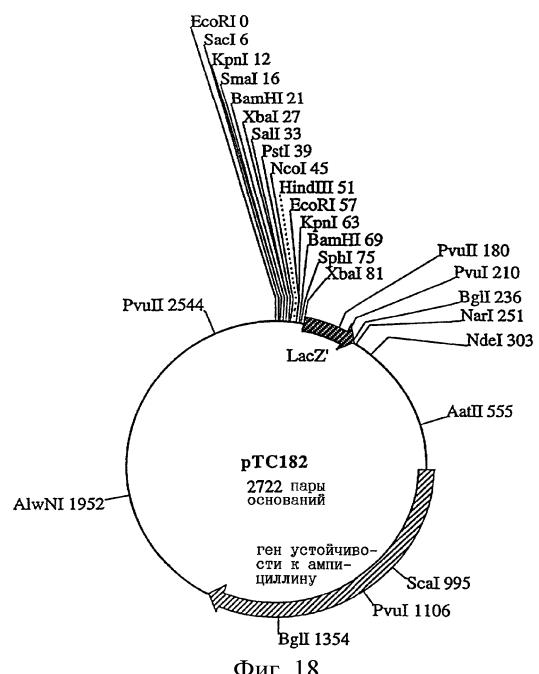
Фиг. 15



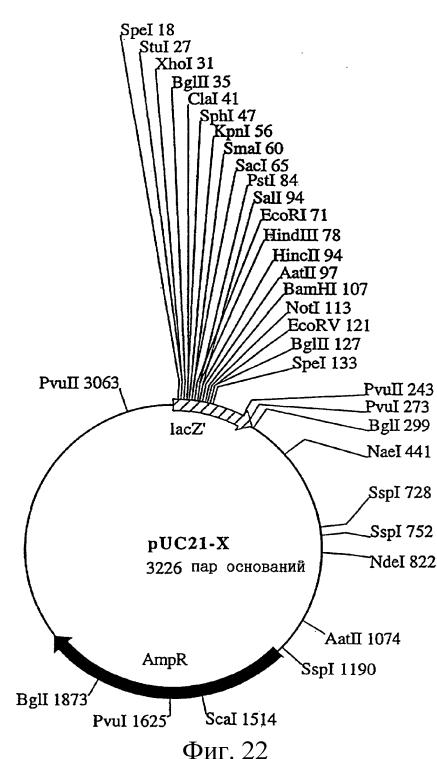
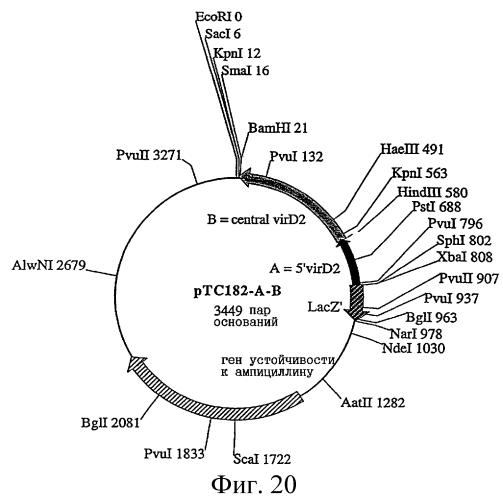
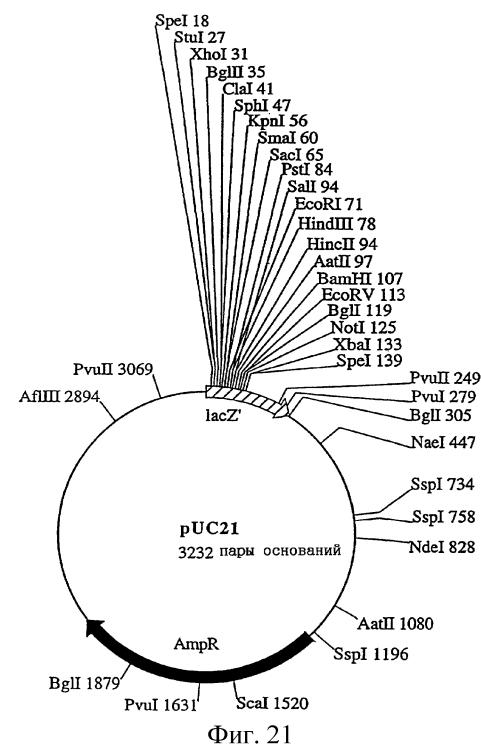
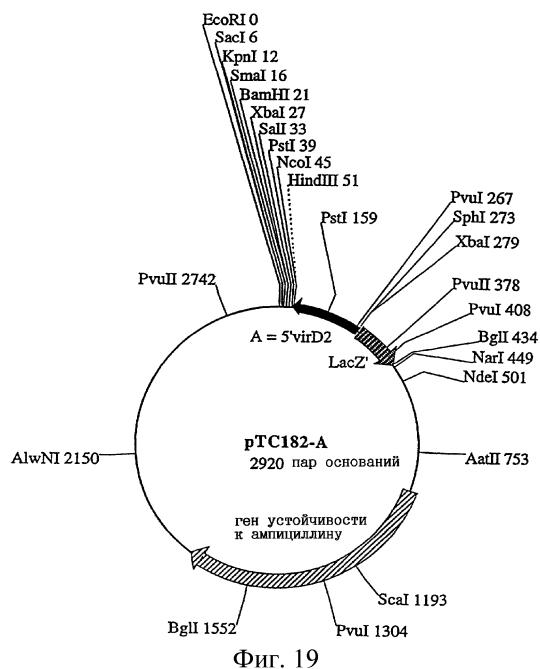
Фиг. 17Б

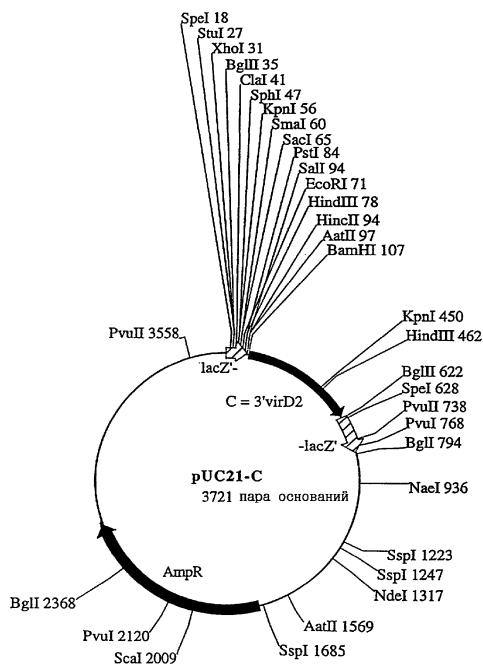


Фиг. 16

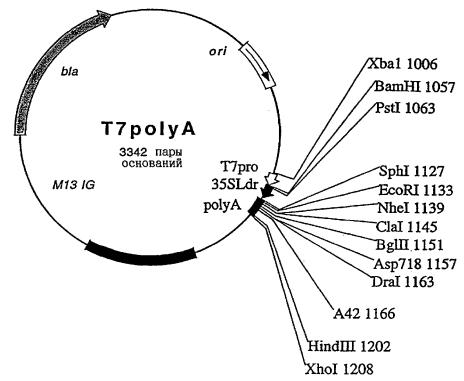


Фиг. 18

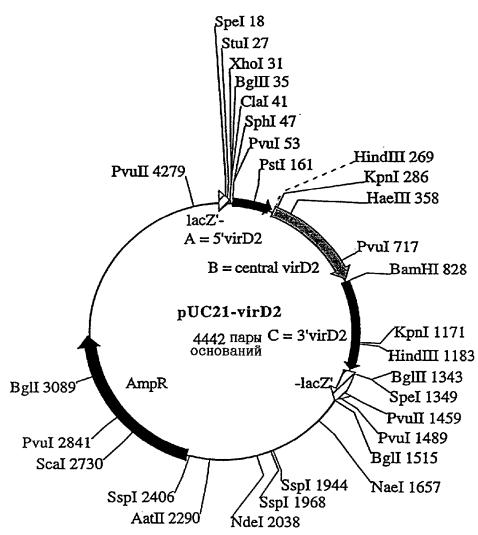




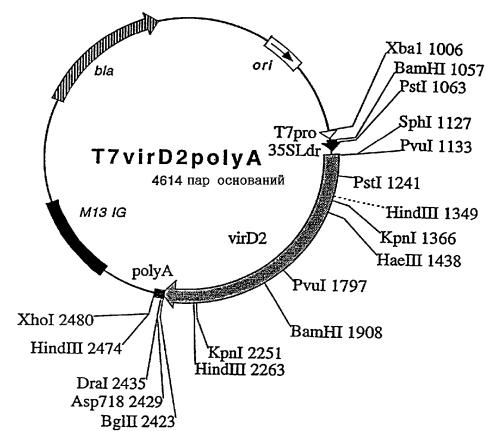
Фиг. 23



Фиг. 25



Фиг. 24



Фиг. 26

