



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 226 215** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 12 N 15/09, 15/29, 15/82**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ
ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 99123057/13 , 03.04.1998
(24) Дата начала действия патента: 03.04.1998
(30) Приоритет: 04.04.1997 US 60/042,666
04.04.1997 US 60/042,941
(46) Дата публикации: 27.03.2004
(56) Ссылки: ADVANCES IN APPLIED
MICROBIOLOGY, 1995, 40, p.289-321. EP
0120578 A, 03.10.1984.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 04.11.1999
(86) Заявка РСТ:
US 98/06589 (03.04.1998)
(87) Публикация РСТ:
WO 98/45424 (15.10.1998)
(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25,
стр. 3, ООО "Юридическая фирма
Городиский и Партнеры", пат.пов.
Н.Г.Лебедевой

(72) Изобретатель: ВИКС Дональд П. (US),
ВАНГ Ксиао-Зуо (US), ХЕРМАН Патриция
Л. (US)
(73) Патентообладатель:
БОРД ОФ РИДЖЕНТС ОФ ЮНИВЕРСИТИ
ОФ НИБРАСКА (US)
(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) **МОЛЕКУЛА ДНК, КОДИРУЮЩАЯ ДИКАМБА-РАЗРУШАЮЩУЮ ОКСИГЕНАЗУ, И ЕЕ
ПРИМЕНЕНИЕ**

(57)
Изобретение относится к генной
инженерии растений. Трансформация клеток
организмов ДНК, кодирующей
дикамба-разрушающую оксигеназу, приводит

к экспрессии в них фермента, разрушающего
дикамбу. Это может быть использовано для
борьбы с сорняками на плантациях
дикамба-разрушающих растений. 9 с. и 14
з.п. ф-лы, 1 ил.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 226 215** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 15/09, 15/29, 15/82**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99123057/13 , 03.04.1998

(24) Effective date for property rights: 03.04.1998

(30) Priority: 04.04.1997 US 60/042,666
04.04.1997 US 60/042,941

(46) Date of publication: 27.03.2004

(85) Commencement of national phase: 04.11.1999

(86) PCT application:
US 98/06589 (03.04.1998)

(87) PCT publication:
WO 98/45424 (15.10.1998)

(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25,
str. 3, OOO "Juridicheskaja firma
Gorodisskij i Partnery", pat.pov.
N.G.Lebedevoj

(72) Inventor: VIKS Donal'd P. (US),
VANG Ksiao-Zuo (US), KhERMAN
Patritsija L. (US)

(73) Proprietor:
BORD OF RIDZhENTS OF JuNIVERSITI OF
NIBRASKA (US)

(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) **DNA MOLECULE ENCODING DICAMBA-DESTROYING OXYGENASE AND ITS USING**

(57) **Abstract:**

FIELD: genetic engineering of plants,
biochemistry. SUBSTANCE: transformation of
cells of organisms with DNA encoding
dicamba-destroying oxygenase results to

expression of enzyme in cells that destroys
dicamba. This can be used for control of
weeds in plantations with dicamba-destroying
plants. EFFECT: valuable properties of DNA.
23 cl, 1 dwg, 3 ex

Текст описания в факсимильном виде (см. графическую часть).

Формула изобретения:

1. Выделенная молекула ДНК, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, выбранную из группы, состоящей из: а) дикамба-разрушающей оксигеназы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO : 4; б) фрагмента SEQ ID NO : 4, обладающего активностью дикамба-разрушающей оксигеназы; и с) дикамба-разрушающей оксигеназы, имеющей аминокислотную последовательность, которая, по крайней мере, на 65% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO : 4 и которая обладает активностью дикамба-разрушающей оксигеназы.

2. Молекула ДНК по п.1, отличающаяся тем, что кодируемая ею дикамба-разрушающая оксигеназа имеет аминокислотную последовательность, которая, по крайней мере, на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO : 4 и которая обладает активностью дикамба-разрушающей оксигеназы.

3. Молекула ДНК по п.1, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO : 4.

4. Молекула ДНК по п.3, включающая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO : 3.

5. ДНК-конструкция, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, функционально присоединенную к регулирующим экспрессию последовательностям, при том, что указанная дикамба-разрушающая оксигеназа выбрана из группы, состоящей из: а) дикамба-разрушающей оксигеназы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO : 4; б) фрагмента SEQ ID NO : 4, обладающего активностью дикамба-разрушающей оксигеназы; и с) дикамба-разрушающей оксигеназы, имеющей аминокислотную последовательность, которая, по крайней мере, на 65% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO : 4 и которая обладает активностью дикамба-разрушающей оксигеназы.

6. ДНК-конструкция по п.5, отличающаяся тем, что указанная дикамба-разрушающая оксигеназа имеет аминокислотную последовательность, которая, по крайней мере, на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO : 4 и которая обладает активностью дикамба-разрушающей оксигеназы.

7. ДНК-конструкция по п.5, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO : 4.

8. ДНК-конструкция по п.7, включающая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO : 3.

9. ДНК-конструкция по п.5, являющаяся вектором.

10. ДНК-конструкция по любому из пп.5-9, отличающаяся тем, что она предназначена для встраивания в трансгенную клетку-хозяин.

11. ДНК-конструкция по любому из пп.5-9,

отличающаяся тем, что она предназначена для встраивания в клетку растения.

12. ДНК-конструкция по любому из пп.5-9, отличающаяся тем, что она предназначена для встраивания в микроорганизм.

13. ДНК-конструкция по любому из пп.5-9, отличающаяся тем, что она предназначена для встраивания в трансгенное растение или часть растения.

14. ДНК-конструкция по любому из пп.5-9, отличающаяся тем, что она предназначена для встраивания в широколистное растение, которое толерантно к дикамбе, как следствие экспрессии дикамба-разрушающей оксигеназы, или в часть широколистного растения, которое толерантно к дикамбе вследствие экспрессии дикамба-разрушающей оксигеназы.

15. Выделенная дикамба-разрушающая оксигеназа, выбранная из группы, состоящей из: а) дикамба-разрушающей оксигеназы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO : 4; б) фрагмента SEQ ID NO : 4, обладающего активностью дикамба-разрушающей оксигеназы; и с) дикамба-разрушающей оксигеназы, имеющей аминокислотную последовательность, которая, по крайней мере, на 65% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO : 4 и которая обладает активностью дикамба-разрушающей оксигеназы.

16. Дикамба-разрушающая оксигеназа по п.15, отличающаяся тем, что указанная дикамба-разрушающая оксигеназа выделена и, по крайней мере, частично очищена из дикамба-разрушающих бактерий, включает кластер атомов "железо-сера" и катализирует окисление дикамбы с образованием 3,6-дихлорсалициловой кислоты (3,6-DCSA).

17. Дикамба-разрушающая оксигеназа по п.15 или 16, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO : 4.

18. Способ борьбы с сорняками на плантации трансгенного растения, включающего ДНК-конструкцию по любому из пп.5-9, включающий нанесение на плантацию количества дикамбы, эффективного в борьбе с сорняками на плантации.

19. Способ очистки материала, содержащего дикамбу, включающий контактирование трансгенного микроорганизма, включающего ДНК-конструкцию по любому из пп.5-9, с материалом в количестве, эффективном для разрушения, по крайней мере, части дикамбы, содержащейся в материале.

20. Способ очистки материала, содержащего дикамбу, включающий нанесение дикамба-разрушающей оксигеназы по любому из пп.15-17 на материал в количестве, эффективном для разрушения, по крайней мере, части дикамбы, содержащейся в материале.

21. Способ отбора трансформированных растительных клеток, включающих ДНК-конструкцию по любому из пп.5-9, включающий: а) трансформацию, по крайней мере, части растительных клеток в популяции растительных клеток ДНК-конструкцией по любому из пп.5-9 и б) выращивание полученной в результате популяции растительных клеток в культуральной среде, содержащей дикамбу в концентрации, выбранной таким образом, что трансформированные растительные клетки

будут расти, а нетрансформированные растительные клетки не будут расти.

22. Способ отбора трансформированных растений, включающих ДНК-конструкцию по любому из пп.5-9, включающий: а) получение популяции растений, у которых предполагается присутствие указанной ДНК-конструкции; и б) нанесение количества дикамбы на растения, выбранного таким образом, что она подавляет рост нетрансформированных растений.

23. Способ отбора или скрининга трансформированных клеток-хозяев, целых организмов и частей организмов,

включающих ДНК-конструкцию по любому из пп.5-9, включающий: а) получение популяции клеток-хозяев, целых организмов или частей организмов, у которых предполагается присутствие указанной ДНК-конструкции; б) контактирование клеток-хозяев, целых организмов или частей организмов с дикамбой и с) оценка наличия или уровня флуоресценции, обусловливаемой 3,6-дихлорсалициловой кислотой, которая образуется в трансформированных клетках-хозяевах, целых организмах или частях организмов в результате разрушения дикамбы.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается трансгенных организмов, которые способны разрушать гербицид дикамбу, включая трансгенные растения, которые могут быть толерантными к дикамбе. Также изобретение касается дикамба-разрушающих ферментов и молекул ДНК и ДНК-конструкций, кодирующих дикамба-разрушающие ферменты. Также изобретение касается способа борьбы с сорняками на плантациях толерантных к дикамбе трансгенных растений и способа удаления дикамбы из загрязнённого им материала (процесс биоремедиации). Наконец, изобретение касается способов отбора трансформантов на основе толерантности к дикамбе или на выявлении флуоресценции 3,6-дихлорсалициловой кислоты, образующейся в процессе разрушения дикамбы.

Предпосылки

Гербициды широко применяются в сельскохозяйственном производстве. Их эффективность часто определяется способностью подавлять рост сорняков в посевах культурных растений и толерантностью культурных растений к такому гербициду.

Если же культурное растение не толерантно к гербициду, то гербицид обуславливает либо снижение продуктивности данной культуры, либо вообще приводит к её полному уничтожению. С другой стороны, если гербицид не является достаточно мощным, то он может сохранять такой уровень роста сорняков на плантации культурного растения, который, со своей стороны, обусловит снижение продуктивности данного культурного растения. Соответственно, с экономической точки зрения желательным является создание сельскохозяйственных культурных растений, которые бы были толерантными к гербицидам. С точки зрения защиты вод и параметров внешней среды в районах расположения сельскохозяйственных угодий также было бы желательно развивать технологии, которые бы обеспечивали разрушение гербицидов в случае аварийных выбросов гербицидов или в случаях неприемлемо высокого уровня загрязнения почвы и вод.

Гены, кодирующие ферменты, которые инактивируют гербициды и другие соединения-ксенобиотики, ранее были выделены у различных прокариотических и эукариотических организмов. В некоторых случаях эти гены были успешно экспрессированы у растений с применением методов генетической инженерии. С использованием такого подхода были сформированы растения, которые являются толерантными к гербицидам 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте (Streber & Willmitzer, 1989, Bio/Technol., 7, 811-816: 2,4-D), бромоксилилу (Stalker et al., 1988, Science, 242, 419-423: торговая марка Буктрил),

глифозату (Comai et al., 1985, Nature, 317, 741-744: торговая марка Раунд-Ал) и фосфинотрицину (De Block et al., 1987, EMBO J., 6, 2513-2518: торговая марка Баста).

Дикамба (торговая марка Банвель) используется в качестве пре-эмерджентного и пост-эмерджентного гербицида для борьбы с одно- и многолетними широколистными сорняками и некоторыми злаковыми сорняками в посевах кукурузы, сорго, зерновых культур, кормовых культур, сенокосных трав, пастбищных культур, сахарного тростника, спаржи, дерновых и семенных травяных культур: см., Crop Protection Ref., pp. 1803-1821 (Chemical & Pharmaceutical Press Inc., New York, NY, 11th ed., 1995). К сожалению, дикамба способна повреждать многие сельскохозяйственные культуры (включая бобы, сою, хлопчатник, горох, картофель, подсолнечник, помидор, табак и фруктовые деревья), декоративные растения и деревья, а также другие широколиственные растения тогда, когда они соприкасаются с этим гербицидом. Дикамба характеризуется химической стабильностью и в ряде случаев может сохраняться во внешней среде.

Дикамба представляет класс гербицидов на основе бензойной кислоты. Было подтверждено, что растения, толерантные к бензойно-кислотным гербицидам, включая дикамбу, могут быть созданы путём внесения в растения антисмыслового гена, кодирующего синтазу 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АСС), антисмыслового гена оксидазы АСС, гена АСС-деаминазы или их сочетаний: см. заявку на патент Канады № 2165036

(опубликована 16 июня 1996 г.). Однако, в этой заявке не представлены никакие экспериментальные данные по анализу такой толерантности.

Известны бактерии, которые способны метаболизировать дикамбу: см. патент США № 5445962; Krueger et al., 1989, J. Agricult. Food Chem., 37, 534-538; Cork & Krueger, 1991, Adv. Appl. Microbiol., 38, 1-66; Cork & Khalil, 1995, Adv. Appl. Microbiol., 40, 289-320. Было выдвинуто предположение, что конкретные гены, участвующие в метаболизме дикамбы, осуществляемом этими бактериями, могут быть выделены и использованы для создания резистентных к дикамбе растений и других организмов: см. цитированное выше и Yang et al., 1994, Anal. Biochem., 219, 37-42. Однако, до настоящего изобретения такие гены не были идентифицированы и выделены.

Резюме изобретения

Настоящее изобретение представляет выделенную и по крайней мере частично очищенную О-деметилазу, участвующую в разрушении дикамбы, выделенную и по крайней мере частично очищенную оксигеназу, участвующую в разрушении дикамбы, выделенный и по крайней мере частично очищенный ферредоксин, участвующий в разрушении дикамбы, и выделенную и по крайней мере частично очищенную редуктазу, участвующую в разрушении дикамбы: все они определены и описаны ниже.

Также настоящее изобретение представляет выделенную

молекулу ДНК, включающую последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, и выделенную молекулу ДНК, включающую последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин. Также настоящее изобретение представляет ДНК-конструкцию, включающую последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, функционально присоединённую к регулирующим экспрессию последовательностям, и ДНК-конструкцию, включающую последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин, функционально присоединённую к регулирующим экспрессию последовательностям.

Также настоящее изобретение представляет трансгенную клетку-хозяин, несущую ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, функционально присоединённую к регулирующим экспрессию последовательностям, и трансгенную клетку-хозяин, несущую ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин, функционально присоединённую к регулирующим экспрессию последовательностям. Трансгенная клетка-хозяин может нести ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу и дикамба-разрушающий ферредоксин так, что обе они функционально присоединены к регулирующим экспрессию последовательностям. Трансгенная клетка-хозяин может быть растительной клеткой или прокариотическим или эукариотическим микроорганизмом.

Кроме того, настоящее изобретение представляет трансгенное растение или часть растения, включающие одну или большее число клеток, несущих ДНК, кодирующих дикамба-

разрушающую оксигеназу, функционально присоединённую к регулирующим экспрессию последовательностям. Кроме того, одна или большее число клеток растения или части растения могут дополнительно нести ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин, функционально присоединённую к регулирующим экспрессию последовательностям. Трансгенное растение или часть растения толерантно к дикамбе или характеризуется усилением имеющейся толерантности к дикамбе в результате экспрессии дикамба-разрушающей оксигеназы или экспрессии дикамба-разрушающих оксигеназы и ферредоксина.

Также настоящее изобретение представляет способ борьбы с сорняками на плантации трансгенных растений, толерантных к дикамбе, в соответствии с настоящим изобретением. Способ включает применение такого количества дикамбы на данной плантации, которое будет эффективно с точки зрения борьбы с сорняками.

Также настоящее изобретение представляет способы очистки материала, содержащего дикамбу. В одном из вариантов такой способ включает применение эффективного количества трансгенного микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением, способного разрушать дикамбу, в отношении загрязнённого ею материала. В другом варианте такой способ включает применение эффективного количества дикамба-разрушающей О-деметилазы или сочетания дикамба-разрушающей оксигеназы, дикамба-разрушающего ферредоксина и дикамба-разрушающей редуктазы в отношении загрязнённого материала.

Также настоящее изобретение представляет способ отбора клеток трансформированного растения и трансформированных растений с использованием толерантности к дикамбе в качестве селективного маркера. В одном из вариантов такой способ включает трансформирование по крайней мере нескольких растительных клеток в популяции растительных клеток с использованием ДНК-конструкции по настоящему изобретению и выращивание полученной в результате популяции растительных клеток в культуральной среде, содержащей дикамбу в концентрации, выбираемой таким образом, чтобы трансформированные растительные клетки росли в ней, а нетрансформированные растительные клетки - нет. В другом варианте такой способ включает применение дикамбы в отношении популяции растений, предположительно несущих ДНК-конструкцию по настоящему изобретению, которые обеспечивают разрушение дикамбы, при том, что дикамбу применяют в таком количестве, чтобы трансформированные растения могли расти, а рост нетрансформированных растений подавлялся бы.

Наконец, настоящее изобретение представляет способ отбора или скрининга трансформированных клеток-хозяев, целых организмов и частей организмов. Способ включает получение популяции клеток-хозяев, целых организмов или частей организмов, предположительно несущих ДНК-конструкцию по настоящему изобретению, обеспечивающую разрушение дикамбы, и оценка присутствия или количественного уровня флуоресценции, обусловливаемой 3,6-дихлорсалициловой кислотой. 3,6-

Дихлорсалициловая кислота образуется в трансформированных клетках-хозяевах, целых организмах или частях организмов в результате разрушения дикамбы, но не может образовываться в нетрансформированных клетках-хозяевах, целых организмах или частях организмов.

Краткое описание рисунков

Фигура 1. Схема предполагаемого транспорта электронов для О-деметилазы дикамбы. Электроны от НАД последовательно переносятся с редуктазы дикамбы на ферредоксин дикамбы и затем на оксигеназу дикамбы. Реакция кислорода с являющейся субстратом дикамбой с образованием 3,6-дихлорсалициловой кислоты катализируется оксигеназой дикамбы. Обозначения: "окис" -окисленный; "восст" - восстановленный.

Подробное описание представляемых предпочтительных вариантов изобретения

Предыдущие исследования (Cork & Krueger, 1991, Adv. Appl. Microbiol., 36, 1-56 и Yang et al., 1994, Anal Biochem., 219, 37-42) показали, что почвенная бактерия-псевдомонада *Pseudomonas maltophilia* штамма DI-6 способна нарушать гербицидную активность дикамбы в результате одно-этапной реакции, в которой дикамба (3,6-дихлор-2-метоксибензойная кислота) конвертируется в 3,6-дихлорсалициловую кислоту (3,6-DCSA). 3,6-DCSA не обладает гербицидной активностью и для неё не было ранее установлено на-

личия какого-либо отрицательного действия на растения. Кроме того, 3,6-DCSA легко разрушается активностью нормальной бактериальной флоры, присутствующей в почве.

Описанные в данном тексте эксперименты подтвердили гипотезу Янга с соавт. (Yang et al., цит. выше), согласно которой О-деметилаза контролирует конверсию дикамбы с образованием 3,6-DCSA с участием *P.maltophilia* штамма DI-6, и позволили установить, что О-деметилаза является 3-компонентной ферментной системой, включающей редуктазу, ферредоксин и оксигеназу. См. пример 1, который описывает в подробностях выделение, очистку и охарактеризование О-деметилазы *P.maltophilia* и трёх её компонентов. Схема реакции, катализируемой этими тремя компонентами О-деметилазы дикамбы, представлена на фиг.1. Как показано на фиг.1, электроны от НАД переносятся по короткой электронной цепочке, включающей редуктазу и ферредоксин, на конечную оксигеназу, которая катализирует окисление дикамбы с образованием 3,6-DCSA.

В первом варианте настоящее изобретение представляет выделенные и по крайней мере частично очищенные дикамба-разрушающие ферменты. Понятие "выделенные" по использованию в данном тексте обозначает то, что эти ферменты по меньшей мере отделены от клеток, в которых они вырабатываются (т.е., они находятся в составе клеточного лизата). Понятие "по крайней мере частично очищенные" по использованию в данном тексте обозначает то, что эти ферменты по крайней

мере частично были отделены от других компонентов клеточного лизата. Предпочтительно, чтобы ферменты были очищены до такой степени, чтобы полученные ферментные препараты были гомогенными по крайней мере примерно в 70%-ной степени.

В частности, настоящее изобретение представляет выделенную и по крайней мере частично очищенную дикамба-разрушающую О-деметилазу. По использованию в данном тексте "дикамба-разрушающая О-деметилаза" обозначает комбинацию дикамба-разрушающей оксигеназы, дикамба-разрушающего ферредоксина и дикамба-разрушающей редуктазы: все они определены ниже.

Также настоящее изобретение представляет выделенную и по крайней мере частично очищенную дикамба-разрушающую оксигеназу. По использованию в данном тексте термин "дикамба-разрушающая оксигеназа" обозначает оксигеназу, очищенную из *P.maltophilia* штамма DI-6, и оксигеназы, аминокислотные последовательности которых гомологичны на уровне по крайней мере примерно 65%, предпочтительно гомологичны на уровне по крайней мере примерно 85% по отношению к оксигеназе *P.maltophilia*, которые могут участвовать в разрушении дикамбы. "Дикамба-разрушающие оксигеназы" включают мутантные оксигеназы, характеризующиеся аминокислотной последовательностью оксигеназы *P.maltophilia*, при том, что одна или несколько аминокислот добавлены, удалены или замещены в составе последовательности оксигеназы *P.maltophilia*. Активность дикамба-разрушающих оксигеназ может быть определена

так, как это описано в примере 1.

Также настоящее изобретение представляет выделенный и по крайней мере частично очищенный дикамба-разрушающий ферредоксин. По использованию в данном тексте термин "дикамба-разрушающий ферредоксин" обозначает ферредоксин, очищенный из *P.maltophilia* штамма DI-6, и ферредоксины, аминокислотные последовательности которых гомологичны на уровне по крайней мере примерно 65%, предпочтительно гомологичны на уровне по крайней мере примерно 85% по отношению к ферредоксину *P.maltophilia*, которые могут участвовать в разрушении дикамбы. "Дикамба-разрушающие ферредоксины" включают мутантные ферредоксины, характеризующиеся аминокислотной последовательностью ферредоксина *P.maltophilia*, при том, что одна или несколько аминокислот добавлены, удалены или замещены в составе последовательности ферредоксина *P.maltophilia*. Активность дикамба-разрушающих ферредоксинов может быть определена так, как это описано в примере 1.

Также настоящее изобретение представляет выделенную и по крайней мере частично очищенную дикамба-разрушающую редуктазу. По использованию в данном тексте термин "дикамба-разрушающая редуктаза" обозначает редуктазу, очищенную из *P.maltophilia* штамма DI-6, и редуктазы, аминокислотные последовательности которых гомологичны на уровне по крайней мере примерно 65%, предпочтительно гомологичны на уровне по крайней мере примерно 85% по отношению к редуктазе *P.maltophilia*, которые могут участвовать в разрушении ди-

камбы. "Дикамба-разрушающие редуктазы" включают мутантные редуктазы, характеризующиеся аминокислотной последовательностью редуктазы *P.maltophilia*, при том, что одна или несколько аминокислот добавлены, удалены или замещены в составе последовательности редуктазы *P.maltophilia*. Активность дикамба-разрушающих редуктаз может быть определена так, как это описано в примере 1.

Способы определения степени гомологии аминокислотных последовательностей хорошо известны в данной области техники. Например, компьютерная программа FASTA, разработанная Генетико-компьютерной группой Висконсинского университета (Genetics Computing Group - GCG: University of Wisconsin, Madison, WI) может быть использована для сравнения последовательностей из состава различных белковых баз данных, например, Швейцарской Базы данных по белкам.

Дикамба-разрушающие ферменты по настоящему изобретению могут быть выделены и очищены так, как это описано в примере 1, из *P.maltophilia* или других организмов. Другие подходящие организмы включают другие, помимо *P.maltophilia* штамма DI-6, бактерии, которые разрушают дикамбу. Некоторые штаммы таких бактерий известны: см. патент США № 5445962; Krueger et al., 1989, J. Agricult. Food Chem., 37, 534-538; Cork & Krueger, 1991, Adv. Appl. Microbiol., 38, 1-66; Cork & Khalil, 1995, Adv. Appl. Microbiol., 40, 289-320. Другие способные к разрушению дикамбы штаммы бактерий могут быть выделены с применением методов, известных в данной области

техники.

Предпочтительными, однако, являются дикамба-разрушающие ферменты по настоящему изобретению, которые были получены с применением технологий рекомбинантной ДНК (см. ниже). В частности, мутантные ферменты, характеризующиеся аминокислотной последовательностью фермента P.maltophilia, при том, что одна или несколько аминокислот добавлены, удалены или замещены по отношению к аминокислотной последовательности P.maltophilia, получают в данном случае с использованием, например, опосредуемого олигонуклеотидами мутагенеза, мутагенеза на основе метода "сканирования линкером", мутагенеза на базе полимеразной цепной реакции и подобного: см. Ausubel et al. (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Intersci., 1990 и McPherson (ed.), "Directed Mutagenesis: A Practical Approach", IRL Press, 1991.

Во втором варианте настоящее изобретение представляет выделенные молекулы ДНК, кодирующие дикамба-разрушающие ферменты по настоящему изобретению. Термин "выделенные" по использованию в данном тексте обозначает, что молекула ДНК была изъята из ее естественной среды или же не является естественно встречающейся молекулой ДНК. Способы получения таких молекул ДНК хорошо известны в данной области техники: см., например, Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, NY, 1982; Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold

Spring Harbor, NY, 1989.

Например, молекулы ДНК по настоящему изобретению могут быть выделенными кДНК или геномными клонами. Идентификация и выделение клонов, кодирующих дикамба-разрушающие оксигеназу и ферредоксин *P.maltophilia* штамма DI-6 описаны в примерах 2 и 3. Дополнительные клоны, кодирующие дикамба-разрушающие ферменты, включая клоны, кодирующие дикамба-разрушающие редуктазы, могут быть получены сходным образом. Выделенные клоны или их фрагменты могут быть использованы в качестве зондов, предназначенных для идентификации и выделения дополнительных клонов из тех организмов, которые отличаются от организмов, из которых такие клоны были исходно выделены. Подходящие организмы включают бактерии, способные разрушать дикамбу. Как отмечалось выше, вдобавок к *P.maltophilia* штамма DI-6, известны некоторые другие бактериальные штаммы, способные разрушать дикамбу: см. патент США № 5445962; Kruger et al., 1989, J. Agricult. Food Chem., 37, 534-538; Cork & Kruger, 1991, Adv. Appl. Microbiol., 38, 1-66; Cork & Khalil, 1995, Adv. Appl. Microbiol., 40, 289-320.

Молекулы ДНК по настоящему изобретению также могут быть химически синтезированы с использованием последовательностей выделенных клонов. Такие методики хорошо известны в данной области техники. Например, последовательности ДНК могут быть синтезированы с помощью метода фосфоамидитного синтеза с применением автоматического ДНК-синтезатора.

Химический синтез имеет ряд достоинств. В частности, химический синтез является желательным, потому что для оптимизации экспрессии в составе последовательности ДНК могут быть выбраны кодоны, которые желательны с точки зрения их предпочтительности организмом-хозяином. Улучшение параметров экспрессии не требует изменения всех кодонов, однако предпочтительным является изменение тех кодонов, которые редко используются в геноме организма-хозяина. Высокий уровень экспрессии может быть достигнут путём изменения более чем примерно 50% кодонов, более предпочтительно более чем по крайней мере примерно 80% кодонов на кодоны, предпочитаемые организмом-хозяином. Таблицы предпочтительности кодонов различными организмами, известны: см., например, "Maximizing Gene Expression", pp. 225-285, Reznikoff & Gold (eds.), 1986, заявки на международные патенты WO 97/31115, WO 97/11086, европейские патенты EP 646643, EP 553494 и патенты США №№ 5689052, 5567862, 5567600, 5552299 и 5017692. Параметры предпочтительности кодонов у других клеток-хозяев могут быть определены с помощью методов, известных в данной области техники. Также, используя химический синтез, последовательности молекулы ДНК или кодируемого ею белка могут быть легко изменены с целью, например, оптимизации экспрессии (например, путём удаления тех пространственных структур молекулы мРНК, которые могут являться помехами для транскрипции и трансляции), добавления уникальных рестрикционных сайтов по стандартным положениям, удаления сайтов расщепле-

ния протеазами и т.п.

В третьем варианте настоящее изобретение представляет ДНК-конструкции, включающие ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий фермент, функционально присоединённую к регулирующим экспрессию последовательностям. По использованию в данном тексте понятие "ДНК-конструкции" определяет конструируемые (т.е. не встречающиеся естественно) молекулы ДНК, применимые для внесения ДНК внутрь клеток-хозяев, и при этом данный термин охватывает химерные гены, экспрессионные кассеты и векторы.

По использованию в данном тексте термин "функционально присоединённый" обозначает связывание последовательностей ДНК (включая такие параметры как порядок расположения последовательностей, ориентацию последовательностей и относительный размер отдельных последовательностей) таким образом, чтобы обеспечить экспрессию кодируемых ими белков. Способы функционального присоединения контролирующих экспрессию последовательностей к кодирующим последовательностям хорошо известны в данной области техники: см., например, Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, NY, 1982; Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, NY, 1989.

"Контролирующими экспрессию последовательностями" являются последовательности ДНК, вовлечённые в осуществляемое любым путём регулирование транскрипции или трансляции у

прокариот и эукариот. Подходящие контролирующие экспрессию последовательности и способы создания и использования их хорошо известны в данной области техники.

Контролирующие экспрессию последовательности должны включать промотор. Промотором может быть любая последовательность ДНК, которая проявляет транскрипционную активность в выбранных клетке-хозяине или организме. Промотор может быть индуцибельным или конститутивным. Он может быть естественно встречающимся (нативным), может включать фрагменты различных нативных промоторов или может быть частично или полностью синтетическим. Руководство для конструирования промоторов формируется на основании исследований промоторов, таких как работа Harley & Reynolds, 1987, Nucl. Acids Res., 15, 2343-2361. Также может быть оптимизовано расположение промотора по отношению к сайту инициации транскрипции: см., например, Roberts et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 760-764. Разнообразные промоторы, подходящие для использования у прокариот и эукариот, хорошо известны в данной области техники.

Например, конститутивные промоторы, подходящие для использования у растений, включают: промоторы растительных вирусов, такие как промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (Odell et al., 1985, Nature, 313, 810-812), промоторы генов метилтрансферазы вируса хлореллы (патент США № 5563328) и полноразмерный транскрипционный промотор вируса мозаики листьев инжира (патент США № 5378619); промоторы

таких генов как гена актина риса (McElroy et al., 1990, Plant Cell, 2, 163-171), гена убихитина (Christensen et al., 1989, Plant Mol. Biol., 12, 619-632 и Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol., 18, 675-689), pEMU (Last et al., 1991, Theor. Appl. Genet., 81, 581-588), MAS (Velten et al., 1984, EMBO J., 3, 2723-2730), гена гистона H3 кукурузы (Lepetit et al., 1992, Mol. Gen. Genet., 231, 276-285; и Atanassova et al., 1992, Plant J., 2 (3), 291-300), гена ALS33 репы Brassica napus (заявка на международный патент WO 97/41228); промоторы различных генов Agrobacterium (см. патенты США №№ 4771002, 5102796, 5182200, 5428147).

Индукцибельные промоторы, подходящие для использования в растениях, включают: промотор системы ACE1, контролируемый медью (Mett et al., 1993, PNAS, 90, 4567-4571), промотор гена In2 кукурузы, контролируемый бензолсульфонамидным гербицидом сафенером (Hershey et al., 1991, Mol. Gen. Genet., 227, 229-237; и Gatz et al., 1994, Mol. Gen. Genet., 243, 32-38), и промотор Tet-репрессорной системы Tn10 (Gatz et al., 1991, Mol. Gen. Genet., 227, 229-237). Конкретным предпочтительным индукцибельным промотором для использования в растениях является один из тех промоторов, которые контролируются таким индуцирующим агентом, на который в норме растения не реагируют. Примером индукцибельного промотора такого типа является индукцибельный промотор гена стероидного гормона: его транскрипционная активность индуцируется глюкокортикостероидным гормоном (Schena et al., 1991, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10421). Другие индуцибельные промоторы для использования в растениях описаны в европейском патенте EP 332104 и заявках на международный патент WO 93/21334 и WO 97/02269.

Промоторы, подходящие для использования в бактериях, включают промотор гена мальтогенной амилазы палочки *Bacillus stearothermophilus*, гена α -амилазы *Bacillus licheniformis*, гена BAN-амилазы *Bacillus amyloliquefaciens*, гена щелочной протеазы сенной палочки *Bacillus subtilis*, гена ксилозидазы *Bacillus pumilis*, промоторы фагов λ -P_R и λ -P_L и промоторы оперонов *lac*, *trp* и *tac* кишечной палочки *Escherichia coli*. См. заявки WO 96/23898 и WO 97/42320.

Промоторы, подходящие для использования в дрожжевых клетках-хозяевах, включают промоторы генов гликолитического пути дрожжей, промоторы генов алкогольдегидрогеназы, промотор *TPH1* и промотор *ADH2-4C*. См. заявку WO 96/23898.

Промоторы, подходящие для использования в нитчатых грибах, включают промотор *ADH3*, промотор *tpiA*, промоторы генов, кодирующих TAKA-амилазу *Aspergillus oryzae*, аспарто-протеазу *Rhizomucor miehei*, нейтральную α -амилазу *Aspergillus niger*, кислую стабильную α -амилазу *A.niger*, глюкоамилазу *A.niger* или *Aspergillus awamori*, триозофосфатизомеразу *A.oryzae* и ацетамидазу *Aspergillus nidulans*. См. заявку WO 96/23898.

Промоторы, подходящие для использования в клетках млекопитающих, включают промотор SV40, промотор гена металло-

тионеина, промотор вируса опухоли молочной железы мышей, промотор вируса саркомы Рауса и базовый поздний промотор аденовируса-2. См. заявки WO 97/42320 и WO 96/23898.

Промоторы, подходящие для использования в клетках насекомых, включают промотор полиэдрина, промотор P10, промотор гена основного белка вируса полиэдроза ядер *Autographa californica*, бакуловирусный промотор немедленно раннего гена-1 и бакуловирусный промотор отсроченного раннего гена 39K. См. заявку WO 96/23898.

Наконец, могут быть использованы промоторы, составленные из частей других промоторов, а также частично или полностью синтетические промоторы: см., например, Ni et al., 1995, Plant J., 7, 661-676 и заявку WO 95/14098, описывающие такие промоторы в связи с их использованием в растениях.

Промотор может включать, или быть так модифицированным чтобы включать, один или большее число энхансеров. Предпочтительно, чтобы промотор включал целую серию энхансерных элементов. Промоторы, несущие энхансерные элементы, обеспечивают более высокий уровень транскрипции по сравнению с промоторами, в которых таких элементов нет. Энхансерные элементы, подходящие для использования в растениях, включают энхансерный элемент 35S из генома вируса мозаики цветной капусты (патенты США № 5106739 и 5164316) и энхансерный элемент вируса мозаики инжира (Maiti et al., 1997, Transgenic Res., 6, 143-156). Известны и другие энхансеры,

подходящие для использования в других типах клеток. См. заявку WO 96/23898 и "Enhancers and Eukaryotic Expression", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1983.

Для обеспечения эффективности экспрессии кодирующие последовательности предпочтительно функционально соединяют с 3'-нетранслируемой последовательностью. 3'-Нетранслируемая последовательность включает последовательности терминации транскрипции и (или) трансляции. 3'-Нетранслируемый сегмент может быть выделен из фланкирующих сегментов генов бактериальных, растительных и других эукариотических клеток. Для использования в прокариотах 3'-нетранслируемый сегмент должен включать последовательность терминации транскрипции. Для использования в растениях и других эукариотах 3'-нетранслируемая последовательность должна включать последовательность терминации транскрипции и полиадениловый сигнал. 3'-Нетранслируемые последовательности, подходящие для использования в растениях, включают последовательности гена 35S вируса мозаики цветной капусты, гена запасющего белка семян фасоли (фазеолина), гена малой субъединицы фермента E9 Rubisco (рибулозобифосфаткарбоксилазы) гороха, гена запасющего белка 7S сои, гена октопинсинтазы и гена нопалинсинтазы.

В растениях и других эукариотах также используется 5'-нетранслируемая последовательность, 5'-нетранслируемая последовательность является частью молекулы мРНК, которая простирается от 5'-"кэп"-сайта до кодона инициации трансля-

ции. Этот участок мРНК необходим для инициации трансляции у эукариот и играет важную роль в регуляции экспрессии гена. Подходящие для использования в растениях 5'-нетранслируемые сегменты включают последовательности вируса мозаики люцерны, гена капсидного белка вируса мозаики огурца и вируса мозаики табака.

Как отмечалось выше, ДНК-конструкцией может быть вектор. Вектор может включать одну или большее число реплицирующихся систем, которые обеспечивают его репликацию в пределах клеток-хозяев. Само-реплицирующиеся векторы - это плазмиды, космиды и векторы на основе вирусов. С другой стороны, вектор может быть интегрирующимся вектором, который обеспечивает встраивание в хромосому клетки-хозяина последовательности, кодирующей дикамба-разрушающий фермент по настоящему изобретению. Также желательно, чтобы вектор включал уникальные рестрикционные сайты, необходимые для встраивания последовательностей ДНК. Если вектор не имеет уникальных рестрикционных сайтов, то он может быть модифицирован с целью внесения или удаления рестрикционных сайтов так, чтобы сделать его более пригодным для дальнейших манипуляций.

ДНК-конструкции по настоящему изобретению могут быть использованы для трансформации различных клеток-хозяев (см. ниже). Генетический маркер должен быть использован для отбора трансформированных клеток-хозяев ("селективный маркер"). Селективные маркеры обычно позволяют проводить отбор

трансформированных клеток по "негативному типу" (т.е. происходит подавление роста тех клеток, которые не несут селективный маркер) или делать это путём скрининга продукта, кодируемого селективным маркером.

Наиболее часто используемым в трансформации растений геном, являющимся селективным маркером, является ген неомизинфосфотрансферазы-II (nptII), выделенный из Tn5, который, в случае помещения его под контроль растительных регуляторных сигналов, обеспечивает резистентность к канамицину (Fraley et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4803). Другой обычно используемый в качестве селективного маркера ген - ген гигромицинфосфотрансферазы, который обуславливает резистентность к антибиотику гигромицину (Vanden Elzen et al., 1985, Plant Mol. Biol., 5, 299).

Другие рассматриваемые в качестве селективных маркеров гены бактериального происхождения, которые обуславливают резистентность к антибиотикам, включают ген гентамицинацетилтрансферазы, ген стрептомицинфосфо-трансферазы, ген аминогликозид-3'-аденилтрансферазы и ген резистентности к блеомицину (Hayford et al., 1988, Plant Physiol, 86, 1216; Jones et al., 1987, Mol. Gen. Genet., 210, 86; Svab et al., 1990, Plant Mol. Biol, 14, 197; Hille et al., 1986, Plant Mol. Biol, 7, 171). Другие являющиеся селективными маркерами гены обуславливают резистентность к гербицидам, таким как глифозат, глюфозинат или бромксинил (Comai et al., 1985, Nature, 317, 741-744; Gordon-Kamm et al., 1990, Plant

Cell, 2, 603-618; и Stalker et al., 1988, Science, 242, 419-423).

Другие используемые в качестве селективных маркёров гены, пригодные для трансформации растений, имеют небактериальное происхождение. Эти гены включают, например, ген дигидрофолатредуктазы мыши, ген растительной 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы и растительной ацетолактатсинтазы (Eichholtz et al., 1987, Somatic Cell Mol. Genet., 13, 67; Shah et al., 1986, Science, 233, 478; Charest et al., 1990, Plant Cell Rep., 8, 643).

Гены, обычно используемые для скрининга предположительно трансформированных клеток, включают ген β -глюкуронидазы (GUS), β -галактозидазы, люциферазы и хлорамфениколацетилтрансферазы (Jefferson, 1987, Plant Mol. Biol. Rep., 5, 387; Teeri et al., 1989, EMBO J., 8, 343; Koncz et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 131; De Block et al., 1984, EMBO J., 3, 1681), ген зелёного флуоресцирующего белка (GFP) (Chalfie et al., 1994, Science, 263, 802; Haseloff et al., 1995, TIG, 11, 328-329 и заявка WO 97/4128). Другой подход к идентификации относительно редких случаев трансформации основан на использовании гена, который кодирует доминантный конститутивный регулятор метаболического пути антоциановой пигментции у кукурузы (Ludwig et al., 1990, Science, 247, 449).

Также хорошо известны селективные маркёры, пригодные для использования в прокариотах и эукариотах, помимо расте-

ний: см., например, заявки WO 96/23898 и WO 97/42320. Например, в качестве селективного маркера может быть использована резистентность к антибиотикам (ампициллину, канамицину, тетрациклину, хлорамфениколу, неомицину или гигромицину).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, толерантность к дикамбе может быть использована в качестве селективного маркера для растений и растительных клеток. Понятие "толерантности" обозначает, что трансформированные растительные клетки способны расти (выживать и регенерировать в растения) тогда, когда их помещают в культуральную среду, содержащую такое количество дикамбы, которое предотвращает рост нетрансформированных клеток. Также понятие "толерантности" обозначает, что трансформированные растения способны расти после применения в отношении них такого количества дикамбы, которое подавляет рост нетрансформированных растений.

Способы отбора трансформированных растительных клеток хорошо известны в данной области техники. Вкратце, по крайней мере некоторые растительные клетки в популяции растительных клеток (например, эксплантата или эмбриональной суспензионной культуры) трансформируются ДНК-конструкцией в соответствии с настоящим изобретением для обеспечения разрушения дикамбы. Полученную в результате популяцию растительных клеток помещают в культуральную среду, содержащую дикамбу в концентрации, выбранной таким образом, чтобы при

ней трансформированные растительные клетки могли расти, а нетрансформированные растительные клетки - нет. Подходящие концентрации дикамбы могут быть определены эмпирически способами, известными в данной области техники.

Способы отбора трансформированных растений также известны в данной области техники. Вкратце, дикамбу применяют в отношении популяции растений, которые предположительно несут ДНК-конструкцию в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивающую разрушение дикамбы. Количество дикамбы выбирают таким образом, чтобы трансформированные растения могли расти, а рост нетрансформированных растений подавлялся бы. Степень подавления должна быть настолько выраженной, чтобы трансформированные и нетрансформированные растения могли быть легко различимы (т.е. подавление должно быть статистически значимым). Такие количества могут быть определены эмпирически способами, известными в данной области техники.

Далее, образование 3,6-DCSA в результате разрушения дикамбы может быть использовано для проведения отбора и скрининга. Образование 3,6-DCSA может быть легко выявлено путём наблюдения флуоресценции этого соединения, что позволяет осуществлять отбор и скрининг трансформированных клеток-хозяев, целых организмов и частей организмов (например, микроорганизмов, растений, частей растений и растительных клеток). В этом отношении настоящее изобретение обеспечивает проведение отбора и скрининга трансформированных клеток-

хозяев, целых организмов и частей организмов тем же путём, что и в случае с зелёным флуоресцентным белком (GFP): см. патенты США № 5162227 и 5491084 и заявки на международный патент WO 96/-27675, WO 97/11094, WO 97/41228 и WO 97/42320: все они включены здесь в виде библиографической ссылки. В частности, соединение 3,6-DCSA может быть выявлено в трансформированных клетках-хозяевах, целых организмах и частях организмов с использованием стандартных спектрофотометрических методов. Например, микроскопы могут быть оснащены подходящими наборами фильтров, необходимых для идентификации флуоресценции. Для работы в полевых условиях можно использовать лампы-переноски (см. пример 1). Может быть также применена сортировка активированных по флуоресценции клеток. Возбуждение 3,6-DCSA происходит при длинах волн 312-313 нм при максимальной эмиссионной длине волны 424 нм.

"Части" организмов включают органы, ткани или любые другие части. "Части растений" - это семена, пыльца, эмбрионы, цветки, плоды, побеги, листья, корни, стебли, эксплантаты и т.п.

Отбор, основанный на толерантности к дикамбе или разрушении дикамбы, может быть использован в получении толерантных к дикамбе растений или разрушающих дикамбу микроорганизмов, причём в этом случае использование другого селективного маркера перестаёт быть необходимым. Отбор, основанный на толерантности к дикамбе или разрушении дикамбы, также может быть использован при получении трансгенных клеток

или организмов, которые экспрессируют другие представляющие интерес гены. Многие из таких генов известны и включают гены, кодирующие белки, имеющие промышленное значение, и гены, которые обуславливают улучшение хозяйственно-полезных признаков растений (см., например, заявку WO 97/41228, полное содержание которой включено в данный текст в виде библиографической ссылки).

ДНК-конструкции по настоящему изобретению могут быть использованы для трансформации различных клеток-хозяев, включая прокариоты и эукариоты. Последовательности ДНК, кодирующие дикамба-разрушающий фермент (ферменты) и селективный маркер (если используется отдельный селективный маркер), могут входить в состав одной и той же или разных ДНК-конструкций. Предпочтительно, чтобы они были расположены в одной ДНК-конструкции в общей транскрипционной единице так, чтобы все кодирующие последовательности экспрессировались вместе. Также представляющий интерес ген (гены) и последовательности ДНК, кодирующие дикамба-разрушающий фермент (ферменты), в случае когда толерантность к дикамбе или разрушение дикамбы используется в качестве селективного признака, могут находиться в составе одной и той же или разных ДНК-конструкций. Такие конструкции получают тем же образом, что и описанные выше конструкции.

Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические и эукариотические микроорганизмы (например бактерии, включая *Agrobacterium tumefaciens* и *Escherichia coli*, дрожжи, вклю-

чая *Saccharomyces cerevisiae*, и другие грибы, включая *Aspergillus* sp.), растительные клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Предпочтительно клеткой-хозяином должна быть такая клетка, которая в норме не способна разрушать дикамбу. Однако, настоящее изобретение также может быть использовано для увеличения уровня разрушения дикамбы в клетках-хозяевах, которые в норме способны разрушать дикамбу.

Таким образом, "трансгенные" клетки и организмы настоящего изобретения включают клетки и организмы, которые в норме не разрушают дикамбу, но которые были трансформированы в соответствии с настоящим изобретением так, чтобы они приобрели способность разрушать этот гербицид. "Трансгенные" клетки и организмы по настоящему изобретению также включают клетки и организмы, которые в норме разрушают дикамбу, но которые были трансформированы в соответствии с настоящим изобретением так, чтобы они приобрели способность разрушать этот гербицид с большей интенсивностью или разрушать этот гербицид с большей эффективностью.

Способы трансформации прокариотических и эукариотических клеток-хозяев хорошо известны в данной области техники: см., например, Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, NY, 1982; Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, NY, 1989; заявки WO 96/23898 и WO 97/42320.

Например, были разработаны многочисленные методы

трансформации растений, включая методики трансформации биологическими и физическими путями: см., например, Miki et al., 1993, "Procedures for introducing foreign DNA into plants", In "Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology", B.R.Glick & J.E.Thompson (eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 67-88. Кроме того, известны векторы и методы культивирования *in vitro* для растительных клеток или трансформации тканей и регенерации растений: см., например, Gruber et al., 1993, "Vectors for plant transformation", In "Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology", B.R.Glick & J.E.Thompson (eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 89-119.

Наиболее широко распространённый метод внесения экспрессирующего вектора в растения основан на естественной трансформационной системе почвенных бактерий *Agrobacterium*: см., например, Horsch et al., 1985, *Science*, 227, 1229. Виды *A.tumefaciens* и *A.rhizogenes* являются патогенными почвенными бактериями, которые генетически трансформируют растительные клетки. Плазмиды Ti и Ri из *A.tumefaciens* и *A.rhizogenes*, соответственно, несут гены, контролирующие генетическую трансформацию растения: см., например, Kado, 1991, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 10, 1. Описания векторных систем *Agrobacterium* и методы опосредуемого *Agrobacterium* переноса генов представлены многочисленными публикациями, включая Gruber et al. (цит. выше), Miki et al. (цит. выше), Moloney et al., 1989, *Plant Cell Rep.*, 8, 239 и патенты США

№№ 4940838 и 5464763.

Базовым методом трансформации растений является трансформация, базирующаяся на бомбардировке микрочастицами ("микроснарядами"), при том, что ДНК находится на поверхности этих микрочастиц. Экспрессирующий вектор вносится в растительные ткани с помощью балистических устройств, которые обеспечивают ускорение микрочастиц до скоростей, достаточных для проникновения через клеточные стенки и мембраны (Sanford et al., 1987, Part. Sci. Technol., 5, 27; Sanford, 1988, Trends Biotechnol., 6, 299; Sanford, 1990, Physiol. Plant, 79, 206; Klein et al., 1992, Biotechnology, 10, 268).

Другой метод физической доставки ДНК в растения - обработка клеток-мишеней ультразвуком (Zhang et al., 1991, Biotechnology, 9, 996). С другой стороны слияние липосом и сферопластов может быть использовано для внесения экспрессирующих векторов в растения (Deshayes et al., 1985, EMBO J., 4, 2731; Christou et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3962). Также имеются сообщения о прямом внесении ДНК в протопласты с использованием хлорида кальция, преципитации, обработки поливиниловым спиртом или поли-L-орнитином (Hain et al., 1985, Mol. Gen. Genet., 199, 161; и Draper et al., 1982, Plant Cell Physiol., 23, 451). Также была описана электропорация протопластов и целых клеток и тканей (Donn et al., 1990, In "Abstr. VII Intern. Congr. Plant Cell & Tissue Culture IAPTC, A2-38, p. 53; D'Halluin

et al., 1992, Plant Cell, 4, 1495-1505; и Spencer et al., 1994, Plant Mol. Biol., 24, 51-61).

В соответствии с настоящим изобретением могут быть получены трансгенные толератные к дикамбе растения любого типа. В частности, широколистные растения (включая бобы, сою, хлопчатник, горох, картофель, подсолнечник, помидор, табак, фруктовые деревья и декоративные растения и деревья), для которых хорошо известна поражаемость дикамбой, могут быть трансформированы так, чтобы они стали толерантными к этапу гербицида. Другие растения (такие как кукуруза, сорго, зерновые культуры, сахарный тростник, спаржа и травы), которые обычно являются толерантными к дикамбе, могут быть трансформированы так, чтобы стать более толерантными к этому гербициду. "Толерантность" обозначает то, что трансформированные растения могут расти в присутствии такого количества дикамбы, которое подавляет рост нетрансформированных растений.

Предполагается, что дикамба-разрушающие оксигеназы по настоящему изобретению могут функционировать в разрушении дикамбы с участием эндогенных редуктаз и ферредоксинов, обнаруживаемых в трансгенных клетках-хозяевах и организмах. В частности, богатыми редуктазами и ферредоксинами являются хлоропласты растений. Соответственно, предпочтительный вариант создания трансгенных толерантных к дикамбе растений основан на использовании последовательности, кодирующей пептид, который обеспечит доставку дикамба-разрушающей ок-

сигеназы в хлоропласты ("последовательность, мишенью которой являются хлоропласты"). ДНК, кодирующая такую последовательность, мишенью которой являются хлоропласты, предпочтительно располагают выше (с 5'-стороны) от последовательности, кодирующей дикамба-разрушающую оксигеназу, однако она может располагаться и ниже (с 3'-стороны) кодирующей последовательности, или с обеих сторон от кодирующей последовательности. Примеры последовательностей, мишенью которых являются хлоропласты, включают сигнальную последовательность cab-m7 кукурузы (см. Backer et al., 1992, Plant Mol. Biol., 20, 49; и заявка WO 97/41228) и сигнальная последовательность глутатионредуктазы гороха (Creissen et al., 1991, Plant J., 2, 129; и заявка WO 97/41228). Другой предпочтительный вариант связан с прямой трансформацией хлоропластов с использованием конструкции, включающей промотор, функционирующий в хлоропластах, что обеспечивает экспрессию оксигеназы именно в хлоропластах (см., например, заявку WO 95/24492 и патент США № 5545818).

Ещё в одном варианте настоящее изобретение представляет способ борьбы с сорняками на плантациях, на которых выращиваются трансгенные толерантные к дикамбе растения. Способ включает применение эффективного количества дикамбы на такой плантации с целью уничтожения сорняков. Способы применения дикамбы и определение эффективного количества дикамбы для борьбы с различными видами сорняков известны (см. "Crop Protection References", Chem. & Pharm. Press Inc.,

New York, NY, 11th ed, 1995, pp. 1803-1821).

В другом варианте настоящее изобретение представляет способ разрушения дикамбы, присутствующей в некоем объекте, таком как почва, вода или отходы предприятия по производству дикамбы. Такое разрушение может быть осуществлено с применением дикамба-разрушающих ферментов по настоящему изобретению. Ферменты могут быть очищены из микроорганизмов, которые их экспрессируют в природе (см. пример 1), или могут быть очищены из вырабатывающих их трансгенных клеток. Если эти ферменты используются в таких способах, то также могут быть применены различные кофакторы (см. пример 1). Эффективные количества могут быть определены эмпирически, что хорошо известно в данной области техники (см. пример 1). С другой стороны, трансгенные прокариотические и эукариотические микроорганизмы могут быть использованы для разрушения дикамбы в таких материалах. Трансгенные прокариотические и эукариотические микроорганизмы могут быть созданы так, как это описано выше, а эффективные количества могут быть определены эмпирически так, как это известно в данной области техники.

Дикамба постоянно попадает в окружающую среду в больших количествах. Элиминация дикамбы в значительной степени зависит от действия ферментных систем, которые обнаруживаются в микроорганизмах, обитающих в почвах и водах Земли. Расшифровка этих ферментных систем, включая дикамба-разрушающие О-деметилазы и их три компонента, является важ-

ной составляющей усилий по эксплуатации естественных и генетически модифицированных микроорганизмов для целей биоремедиации и восстановления загрязнённых почв, вод и других материалов. Таким образом, дикамба-разрушающие ферменты, молекулы ДНК, ДНК-конструкции и т.п. по настоящему изобретению могут быть использованы в качестве исследовательских материалов в изучении разрушения дикамбы и биоремедиации.

В конечном счёте, дикамба-разрушающие ферменты по настоящему изобретению могут быть использованы в тесте на выявление дикамбы. Образец, предположительно загрязнённый дикамбой, смешивают с дикамба-разрушающей О-деметилазой или с сочетанием дикамба-разрушающей оксигеназы, дикамба-разрушающего ферредоксина и дикамба-разрушающей редуктазы. Подходящие тесты описаны в примере 1. В частности, пригодным для стандартного теста является выявление или количественный анализ флуоресценции, связанной с образованием 3,6-DCSA.

Примеры

Пример 1

Очистка и охарактеризование компонентов дикамба-О-деметилазы *Pseudomonas maltophilia* штамма DI-6

Методы и материалы

Бактерии и условия выращивания. Бактерии-псевдомонады *Pseudomonas maltophilia*, штамм DI-6 (Kreuger et al., 1989, J. Agricult. Food Chem., 37, 534-538) были выделены из участка почвы, постоянно подвергающегося загрязнению дикамбой.

Бактерии были предоставлены Д-ром Дугласом Корком (D. Cork) из Технологического института штата Иллинойс (Чикаго) и поддерживались в восстановленной хлоридной среде (Kreuger, 1989, Ph.D.Thesis, Illinois Inst. Technol., Chicago, IL) с добавлением либо дикамбы (2 мг/мл), либо смеси глюкозы (2 мг/мл) и свободных аминокислот (2 мг/мл). Источники углерода были стерилизованы фильтрованием и добавлены в культуральную среду после их автоклавирования. Плотную культуральную среду получали путем добавления 1% (вес/объем) Gelrite (Scott Laboratories, West Warwick, RI).

Химикаты и реагенты. Дикамба, 3,6-DCSA и ^{14}C -дикамба (U-фенил- ^{14}C : 42,4 мКи/ммоль - радиохимическая чистота более 98%) были предоставлены Sandoz Agro Inc. (Des Plaines, IL). Для повышения растворимости базовые растворы дикамбы и 3,6-DCSA получали путём титрования едким калием (KOH) до pH=7,0. Все химикаты были приобретены в Sigma Chemical Co. (S.Louis, MO), помимо специально оговоренных. Супероза-12, Mono-Q, Q-сефароза (Fast Flow) и фенилсефароза (CL-4B) для упаковки колонок в аппарате ЖХБР (FPLC: жидкостная хроматография быстрого разрешения) были получены от Pharmacia (Milwaukee, WI). Амфолиты для pH=4-6 и амфолиты для pH=4-9 были приобретены у Serva (Heidelberg, Германия). Акриламид, β -меркаптоэтанол, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) и персульфат аммония (APS) получены от Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Пластины для тонкослойной хроматографии (ТСХ) были изготовлены из силикагеля (толщиной 250 мкм) с

индикатором УФ-254 и приобретены у J.T.Baker Chem. Co. (Phillipsburg, NJ).

Тесты на активность ферментов. Активность дикамба-О-деметилазы оценивали путём измерения уровня образования ^{14}C -3,6-DCSA из ^{14}C -дикамбы. Вкратце, активность смесей компонентов фермента определяли при 30°C в стандартной реакционной смеси в количестве 300 мкл, включающей 25 мМ калий-фосфатного буфера (pH=7.0), 10 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ НАД (восстановленная форма β -никотинамидадениндинуклеотида), 0,5 мМ сульфат железа, 50 мкМ холодной дикамбы, 2,5 мкМ меченной ^{14}C -дикамбы (конечная специфическая активность радиоактивной дикамбы - 1,9 мКи/ммоль) и различное количество клеточного лизата или частично очищенного фермента. Все тесты на ферментную активность в своих конечных этапах проводили в фосфатном буфере, поскольку было установлено, что оптимальная величина pH для дикамба-О-деметилазы находится в средней части диапазона, характерного для фосфатных буферов, и что более высокая активность этого фермента наблюдается именно в фосфатном буфере в сравнении с буфером Трис-HCl [трис(гидроксиметил)аминометангидрохлорид] при pH=7,0. Реакции инициировали добавлением соответствующего субстрата - дикамбы. В определённое время реакции останавливали добавлением 50 мкл 5%-ного (объёмные проценты) раствора серной кислоты. Затем экстракцию дикамбы и метаболитов дикамбы осуществляли дважды одним объёмом эфира и экстракты выпаривали досуха. Эффективность выделения (средняя величина $\pm$

стандартное отклонение) для процедуры экстракции составила $87 \pm 2\%$ для дикамбы и $85 \pm 3\%$ для 3,6-DCSA (Yang et al., 1994, Anal. Biochem., 219, 37-42).

Помеченные ^{14}C -дикамбу и ^{14}C -метаболиты дикамбы разделяли с помощью тонкослойной хроматографии (TLC). Экстрагированные эфиром дикамбу и её метаболиты вновь растворяли в 50 мкл эфира с последующим раскапыванием на пластинку для TLC. Для проведения TLC использовали сольвентную систему, представленную смесью хлороформа-этанола-уксусной кислоты при их объёмном соотношении 85:10:5. Полученные при повторном растворении продукты визуализовали и оценивали количественно путем помещения пластины для TLC на фосфорный экран на 24 часа с последующим сканированием полученной на экране картины с помощью PhosphorImager SF (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Оценки уровня радиоактивности в конкретном пятне на пластине TLC определяли путём сравнения общего числа пикселей данного пятна по сравнению с пятном, расположенном на той же пластине и характеризующимся известным количеством ^{14}C -дикамбы. Единицу активности определяли как такое количество фермента, которое катализирует образование 1 наноля 3,6-DCSA из дикамбы за 1 минуту при 30°C . Специфические активности определяли по отношению к общей концентрации белка в тестируемой смеси.

Активность редуктазного компонента дикамба-О-деметилазы оценивали путём измерения уровня восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола (DCIP) с использованием спектро-

фотометра Hitachi U-2000. Реакционная смесь включала 0,5 мМ НАД, 0,2 мМ ФАД (флавинадениндинуклеотид), 50 мкМ DCIP, 20 мМ Трис-буфера (pH=8,0) и 10-100 мкл образца фермента при общем объеме 1 мл. Изменение поглощения во времени при длине волны 600 нм определяли при комнатной температуре. Специфическую активность рассчитывали с использованием коэффициента затухания при 600 нм - $21,0 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ - для восстановленного DCIP. Специфическую активность выражали в пикомолях восстановленного DCIP в минуту на 1 мг белка.

Кроме того, тест с DCIP *in situ* был использован для выявления и картирования редуктазной активности в белковых препаратах, отделённых в геле при изоэлектрическом фокусировании (IEF). После электрофореза белков в IEF-геле вырезанные из геля полоски промывали в 20 мл холодного 20 мМ буфера Трис-HCl (pH=8,0). Низкоплавкую агарозу растворяли с нагреванием в 10 мл 20 мМ буфера Трис-HCl (pH=8,0) при конечной концентрации 1,5% (весовые проценты). Когда агароза охлаждалась до примерно комнатной температуры, к ней добавляли 0,2 мМ ФАД, 50 мкМ DCIP и 0,5 мМ НАД. Полученную для тестирования смесь переносили на стеклянную пластину и оставляли до застывания. Пластинку геля помещали на верхушку застывшей реакционной смеси и оставляли при комнатной температуре на 15 минут. Если пластинка геля содержит белок, обладающий редуктазной активностью, то образуются бесцветные полосы восстановленного DCIP при сохранении голубого фона исходного DCIP.

Клеточные лизаты. Клетки выращивали до оптической плотности 1,3–1,5 при 550 нм в жидкой редуцированной хлоридной среде, включающей смесь глюкозы и свободных аминокислот, с использованием шейкера (250 об/мин при 30°C). Клетки собирали центрифугированием, дважды промывали холодным раствором 100 мМ хлорида магния и снова центрифугировали. Клеточные центрифугаты либо сразу использовали, либо быстро замораживали на жидком азоте и сохраняли при -80°C. Во время проведения очистки фермента 25 г замороженных клеток растаивали и ресуспендировали в 50 мл изоляционного буфера, включающего 25 мМ буфера Трис (pH=7,0), 10 мМ MgCl₂ и 0,5 мМ EDTA. Фенилметилсульфонидфторид и дитиотреитол добавляли до конечных концентрациях 0,5 мМ и 1 мМ, соответственно. После добавления 10 мг лизоцима и 1 мг ДНКазы клетки взбалтывали в течение 10 минут на льду и разрушали ультразвуком (ультразвуковая установка XL2020: Heat Systems) на льду в установке для культуральной среды (setting-5) при 12 20-секундных импульсах и 40-секундных промежутках для "отдыха". Полученные в результате клеточные лизаты разводили в 90 мл изоляционного буфера и центрифугировали при 76000g в течение 1 часа при 4°C. Надосадочную фракцию использовали в качестве источника осветлённого клеточного лизата.

Очистка ферментов. Помимо специально оговорённых случаев, все процедуры были выполнены при 4°C. Твёрдый сульфат аммония медленно добавляли в 90-мл объём осветлённого клеточного лизата до достижения 40%-ного насыщения (весовые

проценты) при постоянном взбалтывании. После 15-минутного встряхивания смеси центрифугировали при 15400g в течение 15 минут и удаляли образовавшийся преципитат. Вновь добавляли твёрдый сульфат аммония до достижения 70%-ного насыщения (весовые проценты) при постоянном взбалтывании надосадочной фракции. После 15-минутного встряхивания смеси центрифугировали в тех же условиях, что были описаны выше. Надосадочную фракцию удаляли, а осадок ресуспендировали в минимальном объеме буфера А (20 мМ Трис - pH=8,0; 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ EDTA, 5 объёмных % глицерина и 1 мМ дитиотреитола).

Фракцию сульфата аммония "40-70%" затем загружали в фенил-сефарозную колонку (2,5x10 см), связанную с аппаратом для ЖХБР (Pharmacia), и элюировали в уменьшающемся линейном градиенте сульфата аммония от 10% до 0% (в обоих случаях - весовые проценты). Колонку предварительно уравнивали буфером-А, включающем 10% (весовые проценты) сульфата аммония. Скорость потока составила 1 мл/мин. Концентрацию белка непрерывно контролировали при A280 в ходе элюции колонки. Колонку промывали 120 мл буфера-А, включающего 10% (весовые проценты) сульфат аммония до достижения исходной линии считывания A280. Связанные белки элюировали уменьшенным градиентом сульфата аммония в буфере-А [от 10 до 0% сульфата аммония (весовые проценты) при общем объеме 210 мл]. Были собраны 2-мл фракции. Аликвоты по 10 мкл были отобраны из каждой фракции и добавлены к стандартной смеси, изготовленной для тестирования дикамба-О-деметилазы так, как это было

описано выше, за исключением того, что в качестве субстрата использовали радиоактивно непо меченную дикамбу. Активность дикамба-О-демети л азы определяли путём контроля превращения дикамбы в 3,6-DCSA, являющуюся продуктом с интенсивным уровнем флуоресцентной активности, с помощью переносной ультрафиолетовой лампы (312 нм: Fotodyne) в тёмной комнате.

Эта процедура позволила разделить дикамба-О-демети л азу на три пула, включающих отдельные компоненты (обозначенные как компоненты I, II и III). Каждый из этих компонентов был необходим для проявления активности дикамба-О-демети л азы (см. ниже). Когда проводилось тестирование отдельного компонента, то другие два компонента включались в избытке. Были отобраны фракции, включающие единичный тип активности: компонент I - фракции 128-145; компонент II - несвязанные фракции 12-33; компонент III - фракции 62-92.

(1) Очистка компонента I. Фракции, включающие активность компонента I (элюированные из фенил-сефарозной колонки при 0 М сульфата аммония: фракции 128-145) были отобраны так, чтобы их общий объём составил 34 мл. Собранные образцы концентрировали до 10 мл центрифугированием с использованием прибора Centriprep-10 (Amicon) и затем загружали в Q-сефарозную колонку (Fast Flow) для ЖХВР (Pharmacia) (2,5x6 см), уравновешенную буфером-А, и промывали 80 мл буфера-А. Белки, связанные с колонкой, элюировали 100 мл линейного градиента от 0 до 0,6 М КСl в буфере-А при скорости потока 1 мл/мин. Фракции отбирали с интервалом в 1,5 минуты. Те

фракции, которые проявляли активность компонента I (фракции 29-37), отбирали, подвергали диализу против буфера-А в течение ночи при 4°C и загружали в анион-обменную колонку Mono-Q HR-5/5 для ЖХБР в буфере-А. Белки элюировали при скорости 1 мл/мин с использованием 50 мл градиента увеличивающейся концентрации KCl (от 0 до 0,5 М). Фракции, проявлявшие активность компонента I (фракции 19-25), отбирали и концентрировали до 0,4 мл центрифугированием в приборе Centricon-10. Затем концентрированный образец подвергали хроматографическому анализу в колонке с суперозой-12 для ЖХБР (1,6x50 см) при скорости потока 0,2 мл/мин с буфером-А, включающем 100 мМ KCl. Фракции 7-10, проявлявшие активность компонента I, отбирали и концентрировали центрифугированием с использованием прибора Centricon-10.

Частично очищенный компонент I растворяли с холодным 1%-ным глицином (весовые проценты) и концентрировали центрифугированием в приборе Centricon-10 ещё трижды с целью обессаливания для анализа с помощью изоэлектрического фокусирования (IEF). Обессоленный концентрированный образец затем загружали в 6%-ный (весовые проценты) гель для IEF (pH=4-6) и подвергали электрофорезу в течение 1,5 часов при 4°C (см. ниже). После проведения электрофореза гель промывали холодным 25мМ фосфатным буфером (pH=7,0) в течение 5 минут и затем каждую вырезанную пластинку геля нарезали маленькими кусочками (6x4 мм). Белок элюировали из нарезанных фрагментов геля путём измельчения их кончиком пипетки в

присутствие 10 мкл 25 мМ фосфатного буфера (рН=7,0). Белок из каждого сегмента смешивали с избытком компонентов II и III и тестировали на активность дикамба-О-деметилазы. Гелевый сегмент, который проявляет активность компонента I (который также имел красновато-коричневое окрашивание) загружали в 12,5%-ный (весовые проценты) полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ) для проверки чистоты образца.

(2) Очистка компонента II. Компонент II, выделенный из хроматографической фенил-сефарозной колонки, подвергали диализу против буфера-А в течение ночи при 4°C и загружали в Q-сефарозную колонку для ЖХБР (2,5x6 см). Условия элюции образца были идентичны тем условиям, которые были описаны выше для компонента I, за исключением того, что параметры элюционного градиента были такие - от 0 до 1 М KCl в буфере-А. Фракции, проявлявшие активность компонента II (фракции 30-37), отбирали, диализовали против буфера-А, концентрировали до 0,4 мл и загружали в колонку с суперозой-12 для ЖХБР (1,6x50 см). Процедуры загрузки и элюции образцов были идентичны тем, которые были описаны выше для компонента I. Фракции, проявлявшие активность компонента II (фракции 3-6), отбирали, растворяли равным объемом буфера-А и загружали в колонку Mono-Q для ЖХБР. Белки элюировали из этой колонки с использованием того же градиента хлористого калия, который использовался для компонента I. Фракции 20-25 проявили активность компонента II. Частично очищенный

компонент II далее был подвергнут очистке с помощью изо-электрического фокусирования (pH=4-6) с использованием тех же условий, которые были описаны для компонента I. Вырезанные сегменты геля, которые проявляли активность компонента II, загружали в 12,5%-ный гель (весовые проценты) для дальнейшего анализа с помощью электрофореза в SDS-ПААГ.

(3) Очистка компонента III. Компонент III, выделенный из хроматографической фенил-сефарозной колонки, подвергали диализу против буфера-А в течение ночи при 4°C и загружали в Q-сефарозную колонку для ЖХБР (2,5x6 см). Условия были идентичными тем, которые были описаны выше для компонента I. Фракции, проявлявшие активность компонента III (фракции 26-38), подвергали диализу против буфера-В [10 mM Трис-HCl (pH=7,5), 2,5 mM MgCl₂, 5% (объёмные проценты) глицерина, 1 mM дитиотреитола] и концентрировали до 5 мл. Аффинный к голубому красителю матрикс [Cibacron Blue 3GA 3000 (Sigma)] упаковывали в колонку для ЖХБР (1x5 см) и предварительно уравнивали 20 мл буфера-В. Концентрированный компонент III загружали в колонку с голубым красителем и промывали 20 мл буфера-В при скорости потока 0,2 мл/мин до тех пор, когда будет достигнут уровень базовой линии колонки A280. Затем связанный белок элюировали с использованием 3 mM НАД в буфере-В. Фракции, обладающие редуктазной активностью, были выявлены путём тестирования активности дикамба-О-деметилазы в присутствии избытка компонентов I и II, а также путём оценки способности каждой фракции восстанавливать DCIP в

присутствие НАД. Фракции, характеризующиеся сильной редуктазной активностью в обоих тестах, отбирали и диализовали против буфера-А, включающего 100 мМ KCl, концентрировали до 0,2 мл и загружали в колонку с суперозой-12 для ЖХБР. Для прохождения суперозной колонки были применены те же условия, которые были описаны для компонента I. Фракции, включающие белки, которые катализируют восстановление DCIP, отбирали, диализовали против буфера-А и загружали в колонку Моно-Q для ЖХБР. Белки элюировали с использованием тех же условий, которые были описаны для компонента I. Частично очищенный компонент III дальше очищали с использованием изоэлектрического фокусирования (pH=4-6). Редуктазную активность белков в составе IEF-геля выявляли путём тестирования по восстановлению DCIP в агарозном геле, полученном так же, как это было описано выше. Гелевый сегмент, который проявлял активность компонента II, загружали в 12,5%-ный гель (весовые проценты) для дальнейшего анализа с помощью электрофореза в SDS-ПААГ.

Определение NH₂-концевых аминокислотных последовательностей. Белковые бэнды, идентифицированные в IEF-геле как проявляющие активности компонента I, компонента II или компонента III, вырезали и помещали в лунки 12,5%-ного (весовые проценты) SDS-полиакриламидного геля. После проведения электрофореза вырезанные пластинки геля, содержащие очищенные белки, раскапывали на поливинилидендифторидную мембрану (Millipore) в транс-блот-камеру (BioRad, Richmond, CA) при

25 В на 16 часов. В качестве блоттингового буфера использовали раствор 20% (объёмные проценты) метанола с 10 мМ CAPS [3-(циклогексиламино)-1-пропансульфоная кислота] - pH=10,0. Секвенирование осуществляли с использованием аппарата Applied Biosystems Inc., модель 420-H по методу расщепления Эдмана (Edman & Henschen, 1975, In "Protein Sequence Determination", S.B.Needleman (ed.), 2d ed., Springer-Verlage, New York).

Определение концентрации белка. Концентрации белков были определены с помощью метода Брэдфорда (Bradford, 1976, Anal. Biochem., 72, 248-254) с использованием сывороточного бычьего альбумина в качестве стандарта.

SDS-ПААГ. Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ) был проведён в соответствии с модифицированным методом Лэммли (Laemmli, 1970, Nature, 227, 680-685). Пластины 12,5%-ного SDS-геля размером 85x65x0,75 мм были приготовлены следующим образом: проточный гель - 2,5 мл 40%-ного (весовые проценты) раствора бис-акриламида (37:5:1), 1 мл раствора проточного буфера [3 М Трис-HCl (pH=8,8), 0,8% SDS (весовые проценты)], 4,5 мл воды, 5 мкл TEMED и 40 мкл 10% (весовые проценты) APS; гель-концентратор - 0,5 мл 40%-ного (весовые проценты) раствора бис-акриламида, 0,5 мл раствора концентрирующего буфера [1 М Трис-HCl (pH=6,8), 0,8% SDS (весовые проценты)], 3 мл воды, 5 мкл TEMED и 12,5 мкл 10% (весовые проценты) APS. Состав проточного буфера - 25 мМ Трис-HCl (pH=8,3), 0,2 М

глицина и 0,1% (весовые проценты) SDS. Буфер для образца включал 0,25 мл концентрирующего буфера, 0,6 мл 20% (весовые проценты) SDS, 0,2 мл β -меркаптоэтанола и 0,95 мл 0,1%-ного бромфенолового синего (весовые проценты) в 50%-ном (объемные проценты) глицерине. Электрофорез проводили при напряжении 80 В в устройстве BioRad Mini-Gel до тех пор, когда след красителя достигал участка в 0,5 см от анодного края геля. Белки окрашивали 0,1%-ным (весовые проценты) ку-масси бриллиантовым голубым R-250 в смеси с изопропанолом, водой, уксусной кислотой в объемном соотношении 3:6:1. Обескрашивание проводили смесью метанола, воды и уксусной кислоты в объемном соотношении 7:83:10. В качестве стандартов использовали следующие белки (Gibco BRL): миозин (214,2 кД), фосфорилазу-В (111,4 кД), бычий сывороточный альбумин (74,25 кД), овальбумин (45,5 кД), карбоангидразу (29,5 кД), β -лактоглобулин (18,3 кД) и лизоцим (15,4 кД).

Определение молекулярной массы. Молекулярную массу (Мм) белков, помещаемых в денатурирующие условия, определяли с использованием электрофореза в SDS-ПААГ. Молекулярные массы нативных компонентов I, II и III оценивали с помощью гель-фильтрационной хроматографии через колонку с супер-озой-12 HR-10/30 для ЖХБР (Pharmacia), скорость потока 0,2 мл/мин, в буфере-А, включающем 100 мМ KCl. В качестве белков для проведения гель-фильтрования использовали следующие стандарты производства фирмы BioRad: бычий тиреоглобулин (670 кД), бычий γ -глобулин (158 кД), овальбумин цыпленка

(44 кД), миоглобин лошади (17 кД) и витамин В₁₂ (1,35 кД). Свободный объём хроматографической колонки с суперозой-12 определяли с использованием голубого декстрана (молекулярная масса 2000 кД: Sigma).

IEF. Гель-электрофорез на основе изоэлектрического фокусирования (IEF) проводили в вертикальной минн-гель камере (модель № MGV-100) производства C.B.S. Scientific Co. (Del Mar, CA). Полиакриламидный 6%-ный (весовые проценты) гель для IEF размером 70x90x1 мм готовили путём следующего смешения: 1,6 мл 30% (весовые проценты) бисакриламида (37:5:1), 0,8 г глицерина, 0,32 мл амфолита для диапазона pH=4-6 (Serva), 0,08 мл амфолита для диапазона pH=4-9 (Serva), 5,2 мл воды, 10 мкл TEMED и 80 мкл 10% (весовые проценты) APS. Катодным буфером являлся 100 мМ β-аланин, а анодным буфером – 100 мМ уксусная кислота. Образцы белка в приблизительно 1-10 мкл 1%-ного глицина (весовые проценты) смешивали с равным количеством буфера образца [50% (объёмные проценты) глицерина, 1,6; (объёмные проценты) амфолита для pH=4-9, 2,4% (объёмные проценты) амфолита pH=4-6]. Образцы загружали с катодного конца геля и оставляли передвигаться при напряжении в 200 В на 1,5 часа и при 400 В ещё в течение 1,5 часов. Белки окрашивали кумасси бриллиантовым голубым R-250 с применением процедуры, описанной выше для SDS-полиакриламидных гелей. Были использованы следующие маркёры (Sigma) для IEF: амилогликозидаза (pI=3,6), глюкозооксидаза (pI=4,2), ингибитор трипсина (pI=4,6), β-

лактоглобулин-А (pI=5,1), карбоангидраза-II (pI=5,4), карбоангидраза-II (pI=5,9) и карбоангидраза-I (pI=6,6).

Кинетический анализ. Кинетические параметры реакции деметилирования, катализируемой дикамба-О-деметилазой, анализировали с помощью определения исходных скоростей данной реакции в присутствии постоянной концентрации фермента и увеличивающейся концентрации субстрата, которым является дикамба. Реакционные смеси включают 25 мМ калий-фосфатного буфера (pH=7,0), 10 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ НАД, 0,5 мМ $FeSO_4$, 25 мкг частично очищенной О-деметилазы [аммоний-сульфатная фракция 40-70% (весовые проценты), выделенная из осветлённого клеточного лизата], различные концентрации дикамбы (от 0,5 до 50 мкМ) и различные концентрации (от 0,025 до 2,5 мкМ) меченной ^{14}C -дикамбы (U-фенил- ^{14}C - 42,4 мКи/ммоль) при общем объёме 300 мкл. Для проведения теста в диапазоне концентрации дикамбы от 0,5 мкМ до 1 мкМ объём реакционной смеси увеличивали до 900 мкл для того, чтобы гарантировать присутствие количества радиоактивно помеченной дикамбы и её метаболитов, достаточного для выявления. В этих реакционных смесях количество всех остальных компонентов реакции утраивали. Превращение ^{14}C -дикамбы в ^{14}C -3,6-DCSA определяли в различные моменты времени для каждой концентрации дикамбы с использованием фосфорного сканера PhosphorImager SF, считывающего уровень радиоактивности фосфорных экранов, которые соприкасали с хроматографическими пластинами TLC в течение 24 часов. Единицу активности определяли как количество фер-

мента, которое образует 1 нмоль 3,6-DCSA за минуту при 30°C. Исходные скорости каждой из реакций определяли путём нанесения данных по скоростям реакций на ось времени для каждой концентрации субстрата. Данные анализировали по параметрам кинетики Михаэлиса-Ментена, а величины K_m и V_{max} определяли путём построения кривой по графику Lineweaver-Burk с использованием Sigma-Plot® (Jandel Scientific, Corte Madera, CA).

Потребность в кислороде. Предварительные эксперименты с использованием кислородного электрода Кларка продемонстрировали потребление кислорода в ходе стандартного теста по активности дикамба-О-деметилазы при использовании дикамбы в качестве субстрата. Для проверки потребности в кислороде в реакции О-деметиличования дикамбы с участием дикамба-О-деметилазы реакции проводили в анаэробной камере, содержание кислорода в которой составляет менее 1ppm (частей на миллион). Процедуры замещения кислорода в реакционной смеси были осуществлены при 4°C. Лишённые фермента реакционные смеси помещали в сосуд и закрывали резиновой крышкой. Для замещения кислорода сосуд дважды подвергали откачке вакуумом и каждый раз заполняли азотом. После третьей откачки сосуд закачивали смесью 90% азота и 10% водорода. Раствор фермента также был освобожден от кислорода (со вниманием к тому, чтобы раствор фермента не закипал). И реакционные смеси, и растворы фермента переносили в анаэробную камеру ("атмосфера" которого состояла из 95% азота и 5% водорода). Двести

сорок микролитров осветлённого клеточного лизата инъецировали через резиновую пробку с помощью микрошприца и тщательно перемешивали с 960 мкл бескислородной реакционной смеси. Реакции проводили при 30°C.

Оценка продуктов реакции на пластинках TLC показала, что скорость образования ^{14}C -3,6-DCSA из ^{14}C -дикамбы в анаэробных условиях оказалась существенно меньшей, чем скорость реакций с тем же количеством фермента, проводившихся в аэробных (кислородных) условиях. В анаэробных условиях по виртуальной оценке превращение дикамбы в 3,6-DCSA в течение 1 часа не происходило. Однако, когда в параллельном эксперименте реакционную смесь брали из анаэробной камеры через 30 минут и инкубировали в воздухе, то существенное количество одного из компонентов дикамба-О-деметиلاзного каталитического комплекса оказалось представлено оксигеназой.

Следует заметить, что превращение ^{14}C -дикамбы в ^{14}C -3,6-DCSA *in vitro* имитирует конверсию *in vivo*, описанную ранее (Cork & Kreuger, 1991, Adv. Appl. MicrobioL, 36, 1-66; Yang et al., 1994, Anal. Biochem., 219, 37-42). В этих экспериментах DCSA была идентифицирована, как продукт реакции, и при тонкослойной хроматографии, и при капиллярном электрофорезе. Точная идентификация первого основного компонента разрушения дикамбы как DCSA и *in vivo*, и *in vitro* была установлена с помощью газ-хроматографического и масс-спектрометрического анализа.

Потребности в компонентах и кофакторах. После исходно-

го разделения трёх компонентов дикамба-О-деметилазы путём хроматографии в фенил-сефарозных колонках частично очищенные препараты были взяты индивидуально благодаря дополнительно очистке, осуществлявшейся в Q-сефарозной колонке (2,5х6 см). Образцы были загружены в Q-сефарозу (Fast Flow) в колонке для скоростной жидкостной хроматографии белков (Pharmacia) в буфере-А и элюированы 100 мл линейного градиента от 0 до 0,6 М KCl (для оксигеназного компонента) или от 0 до 1,0 М KCl (для ферредоксинового и редуктазного компонентов) в 1,5-мл фракциях. Подходящие собранные фракции отдельных колонок для очистки оксигеназы (фракции 29-37), для очистки ферредоксина (фракции 30-37) или для очистки редуктазы (фракции 26-38) были использованы для определения потребностей в компонентах и кофакторах.

Три компонента были тестированы на О-деметилазную активность в различных сочетаниях с целью определения потребности в разных компонентах.

Для определения потребности в кофакторах О-деметилазную активность определяли с использованием смеси трёх компонентов с ^{14}C -дикамбой в течение 30 минут при 30°C. Количества частично очищенного белка (представленных в оптимизованном соотношении) в реакционных смесях составили 85 мкг оксигеназы, 55 мкг ферредоксина и 50 мкг редуктазы. Концентрация кофакторов, использовавшихся в реакционных смесях, составляли 0,5 мМ НАД, 0,2 мМ ФАД, 0,5 мМ FeSO_3 , 10 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ НАДФ и 0,2 мМ флавинмононуклеотида.

Результаты

Компонент I. Компонент дикамба-О-деметилазы, который наиболее тесно связывается с фенил-сефарозной колонкой (исходно обозначенный как компонент I и, соответственно, определённый как оксигеназа) характеризовался отчётливым красновато-коричневым цветом. Это соответствует вероятному присутствию белка или белков, имеющих кластер атомов "железо-сера" или группу гема. Фракции из фенил-сефарозной колонки, характеризующиеся активностью компонента I, подвергали дальнейшей очистке с помощью хроматографии в Q-сефарозной (Fast Flow) и Mono-Q хроматографии и затем разделяли на разделяющей по размеру колонке с суперозой-12. Затем белок, идентифицированный как компонент I, был дополнительно очищен в геле для IEF.

Белок из основной полосы IEF-геля (соответствующей величине pI на уровне приблизительно 4,6) вырезали и отделяли от любых других оставшихся минорных загрязнителей с помощью электрофореза в SDS-ПААГ. Белок, соответствующий основному компоненту I, полученный после очистки с помощью IEF, проявил более чем 90%-ную чистоту, что подтверждается при денситометрическом анализе данного SDS-полиакриламидного геля, окрашенного кумасси голубым.

Была определена N-концевая аминокислотная последовательность основного белка, характеризующегося молекулярной массой около 40000 Д. Результаты аминокислотного секвенирования показали, что первые 29 аминокислот N-концевого сег-

мента присутствуют в следующей последовательности (аминокислотные остатки, взятые в скобки, являются наиболее вероятными):

Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu

Pro Glu Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr

Ile Leu Asp (Asp или Thr) (Pro) (SEQ ID NO 1)

Сравнение аминокислотных последовательностей, включенных в различные базы данных, показало незначительную гомологию или вообще отсутствие гомологии с NH₂-концевыми последовательностями, приведёнными для других монооксигеназ или диоксигеназ.

Компонент II. Белковая фракция, которая не связывалась с фенил-сефарозной колонкой, была обозначена как компонент II. Поскольку эта фракция, характеризующаяся желтоватой окраской, может быть замещена ферредоксином клостридия *Clostridium pasteurianum* (но при меньшей скорости реакции), когда тесты проводили в сочетаниях компонентов I и III, она была экспериментально обозначена как ферредоксин-содержащая фракция. Ферредоксин клостридия отчётливо функционировал вместо компонента II, но, с учётом очень высокой степени неочищенности естественного компонента II, использованного в этих экспериментах, эффективность фермента клостридия была существенно ниже, чем эффективность предполагаемого ферредоксина штамма DI-6. В частности, 55 мкг частично очищенного компонента II, смешанного с избыточными количествами компонентов I и III, катализировали превращение

дикамбы в 3,6-DCSA со скоростью приблизительно 5 нмоль в минуту на 1 мг, в то время как 100 мкг высокоочищенного ферредоксина клостридия обуславливает активность на уровне лишь 0,6 нмоль в минуту на 1 мг.

Этапы очистки, связанные с применением Q-сефарозной (Fast Flow) хроматографии, гель-фильтрации через суперозу-12 и хроматографию в Mono-Q приводили к получению приблизительно 1 мг очищенного белка из исходных 25 г клеточного центрифугата. Эта фракция была очищена сходным образом в отношении оксигеназного компонента с помощью электрофореза в IEF-геле с последующим электрофорезом активной IEF-фракции в SDS-полиакриламидном геле.

Анализ активности компонента II в белках, элюированных из сегментов IEF-геля, показал, что фракция, характеризующаяся изоэлектрической точкой приблизительно 3,0, содержит активный белок, соответствующий компоненту II. Белок из этого вырезанного геля элюировали и подвергали электрофорезу в SDS-ПААГ. Окрашивание геля с использованием кумасси голубого показало наличие одного отчётливого белкового бэнда наряду с пятном низкомолекулярных белков. Отчётливый белок с молекулярной массой приблизительно 28 кД был перенесён путём блоттинга на поливинилидендифторидную мембрану.

Аминокислотное секвенирование показало следующую N-концевую последовательность, включающую 20 аминокислот:

Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Xaa Ile Lys Xaa Lys

Tyr Met Asp Xaa Val Glu Val Xaa (SEQ ID NO 2)

Компонент III. Компонент III дикамба-О-деметилазы оставался на фенил-сефарозной колонке при высокой концентрации сульфата аммония: его элюировали при приблизительно 4% сульфата аммония (весовые проценты). Эта светло-жёлтая фракция была точно определена как содержащая редуктазу фракция на основе её способности восстанавливать окисленный цитохром-с и DCIP в присутствие НАД, а также благодаря тому, что она может быть замещена редуктазой цитохрома-с из сердца свиньи (тип 1: Sigma) в тестах, в которых анализировали компоненты I и II. В этом наборе реакций использование 50 мкг частично очищенного компонента III обуславливало скорость реакции на уровне приблизительно 5 нмоль в минуту на 1 мг, в случае смешивания с избытком компонентов I и II. Высокоочищенная редуктаза цитохрома-с показала специфическую активность на уровне приблизительно 2,6 нмоль в минуту на 1 мг - т.е. активность, отчетливо уступающую таковой у компонента III, причём даже с учётом недостаточной чистоты сырого компонента III, использовавшегося в этих тестах. Также компонент III проявлял редуктазную активность в случае инкубирования его с цитохромом-с или с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (DCIP) в присутствие НАД. В обоих этих тестах на редуктазную активность ни компонент I, ни компонент II активности не проявили.

Дополнительная очистка данной фракции с помощью

хроматографии на колонках, содержащих Q-сефарозу (Fast Flow), аффинный по голубому красителю матрикс, суперозу-12 и Mono-Q, приводит в результате к получению малого количества белка во фракциях, проявляющих редуктазную активность. Белок-компонент III характеризовался чистотой на уровне примерно 70%, что подтверждалось денситометрическим анализом активного белка фракции после разделения с помощью электрофореза в SDS-ПААГ и окрашивания кумасси голубым.

В связи с дальнейшим усилением очистки компонента III было обнаружено, что две различные белковые фракции, выделенные на колонке Mono-Q, включали редуктазную активность, выявляемую при тестировании с добавлением ферредоксинового и оксигеназного компонентов. Дальнейшая очистка этих двух фракций с помощью электрофореза в IEF-геле показала, что редуктазные активности этих двух фракций характеризуются отчётливо дифференцированными изоэлектрическими точками (pI). Это было продемонстрировано путём вырезания пластинок, содержащих каждую из двух редуктазных фракций, из IEF-геля и помещение срезов на верхушку подушечки низкоплавкой агарозы, содержащей реакционную смесь DCIP. Редуктазная активность обоих гелевых срезов была идентифицирована с помощью НАД-зависимого восстановления DCIP до утраты им окрашенности, что характерно для его восстановленной формы. Редуктаза в составе фракции 35 характеризовалась изоэлектрической

точкой приблизительно $pI=5,6$, в то время как редуктаза в составе фракции 27 проявила изоэлектрическую точку приблизительно $pI=4,8$.

Обе редуктазные активности, выделенные из срезов IEF-геля, были нестабильными и присутствовали в очень небольшом количестве. Действительно, только редуктаза из состава фракции 35, выделенной из колонки Моно-Q, сохраняла достаточную концентрацию белка и активность, позволяющие проводить дальнейшие очистку и охарактеризование. Срез IEF-геля, содержащий редуктазную активность, был элюирован и отделён от загрязняющих белков с помощью электрофореза в SDS-ПААГ. Доминирующим белковым компонентом этого геля оказался белок, характеризующийся молекулярной массой приблизительно 45 кД. Разделяющая по размеру хроматография (гель-фильтрационная хроматография) позволила определить приблизительную молекулярную массу на уровне 50 кД для компонента III в его нативной форме.

Биохимическая характеристика дикамба-О-деметилазы. Активность дикамба-О-деметилазы была измерена в ходе инкубации *in vitro* в температурном диапазоне от 20°C до 50°C и в диапазоне значений pH от 6 до 9. Отчётливый пик активности наблюдался при 30°C, а более размытый пик активности был выявлен в диапазоне pH=6,5-7,5. Каталитическая активность оказалась зависимой от используемого для поддержания pH буфера. При pH=7, например, активность была приблизительно на 40% меньше в буферах на основе Трис

в сравнении с фосфат-содержащими буферами.

Значения K_m и V_{max} для дикамба-О-деметиلاзы были определены с использованием SigmaPlot® с целью создания кривых лучшего соответствия, обобщающих данные графиков Михаэлиса-Ментена и Лайнвивера-Бурка по экспериментам, проведенным в двух повторностях. Величина константы Михаэлиса K_m для дикамбы была оценена приблизительно в $9,9 \pm 3,9$ мкМ, а величина V_{max} для реакции была оценена приблизительно в 108 ± 12 нмоль/мин·мг.

Три компонента были тестированы по их дикамба-О-деметилазной активности в различных сочетаниях. Ни один из этих компонентов не проявил ожидаемой каталитической активности в вариантах их тестирования поодиночке. Действительно, существенный уровень дикамба-О-деметилазной активности может быть обнаружен только тогда, когда все три компонента комбинировались друг с другом. Смесь компонентов I и II проявляла очень слабый уровень каталитической активности, что может объясняться наличием следовых количеств компонента III во фракции компонента I.

И НАД, и НАДФ поддерживают каталитическую активность, при том, что НАД оказывается существенно более эффективным в сравнении с НАДФ. Ионы магния Mg^{2+} являлись необходимыми для проявления каталитической активности. Ионы железа Fe^{2+} , флавинадениндинуклеотид (ФАД) и флавин-моноклеотид (ФМН) либо проявляли слабый стимулирующий эффект в отношении каталитической активности, либо не проявляли его вовсе при

анализе частично очищенных белковых препаратов в описанных экспериментах. Наивысший уровень активности был выявлен при использовании сочетания НАД, Fe^{2+} , Mg^{2+} и ФАД.

Обсуждение

Дикамба-О-деметилаза *Pseudomonas maltophilia* штамма DI-6 является трёхкомпонентной оксигеназой (Wang X.-Z., 1996, Ph.D.Thesis, Univ. Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE), связанной с конверсией гербицида дикамбы (2-метокси-3,6-дихлорбензойной кислоты) в 3,6-дихлорсалициловую кислоту (3,6-DCSA: 2-гидрокси-3,6-дихлорбензойная кислота). Были разработаны такие схемы очистки, которые бы позволили выделить каждый из трёх компонентов в гомогенном или близком к гомогенному виде.

Исходное разделение трёх компонентов было достигнуто путём применения хроматографии на фенил-сефарозной колонке. Каталитические активности и другие характеристики частично очищенных компонентов позволили осуществить точную идентификацию компонентов как редуктазу, ферредоксин и оксигеназу - состав, сходный с таковым, который ранее был обнаружен в ряде других исследованных гем-несущих и лишённых гема многокомпонентных оксигеназ (Batie et al., 1992, In "Chemistry & Biochemistry of Flavoenzymes", F.Muller (ed.), Vol. III, CRC Press, Boca Raton, pp. 543-565; Harayama et al., 1992, Annu. Rev. Microbiol., 46, 565-601; Mason & Cammack, 1992, Annu. Rev. Microbiol., 46, 277-305; Rosche et al., 1995, Biochem. Biophys. Acta, 1252,

177-179). Компонент III, выделенный из фенил-сефарозной колонки, катализировал НАД-зависимое восстановление и цитохрома-с, и красителя DCIP. Кроме того, его способность обеспечивать превращение дикамбы в 3,6-DCSA в случае комбинирования с компонентами I и II может быть замещена отчасти цитохром-с-редуктазой. Компонент II может быть замещён добавлением ферредоксина клостридия *Clostridium pasteurianum* в реакции, уже содержащие компоненты I и III.

Инвариантная необходимость в присутствии молекулярного кислорода для поддержания реакции О-деметилования показала, что оставшимся компонентом является оксигеназа.

Оксигеназа_{дик}. Компонент I дикамба-О-деметилазы (обозначенный как оксигеназа_{дик}) был очищен до гомогенного состояния и подвергнут N-концевому аминокислотному секвенированию. Полученная в результате последовательность из 29 аминокислотных остатков не позволила выявить сколько-нибудь существенной гомологии с аминокислотными последовательностями других белков, присутствующих в различных базах данных. Однако, информация, полученная в анализе этой аминокислотной последовательности, позволяет конструировать вырожденные олигонуклеотидные зонды, которые могут быть успешно использованы для выявления и клонирования гена, кодирующего компонент I (см. пример 2). Кроме того, сравнение аминокислотной последовательности, расшифрованной по нуклеотидной последовательности в составе такого клона, с аминокислотными последовательностями белка

в базе данных показал наличие существенной гомологии с другими оксигеназами (см. пример 2).

Вероятная молекулярная масса оксигеназы_{дик}, оцененная с помощью электрофореза в SDS-полиакриламидном геле, составила приблизительно 40 кД. Очищенные оксигеназные препараты проявляли только одну основную полосу в SDS-полиариламидном геле, окрашенном кумасси голубым, а расщепление по Эдману белка, находящегося в составе этой гелевой полосы, показало присутствие только одной N-концевой формы. Оценки, полученные в анализе поведения нативной оксигеназы_{дик} с помощью гель-фильтрации, подтвердили наличие молекулярного размера на уровне приблизительно 90 кД. Все эти данные подтверждают, что в нативной форме эта оксигеназа является гомодимером.

Оксигеназно-гидроксилазный компонент ряда многокомпонентных систем составлен комплексом субъединиц $(\alpha\beta)_n$ -типа, в котором большая α -субъединица имеет молекулярную массу приблизительно 50 кД, а малая β -субъединица имеет молекулярную массу приблизительно 20 кД (Harayama et al., 1992, Annu. Rev. Microbiol., 46, 565-601). С другой стороны, оксигеназный компонент дикамба-О-деметилазы, по-видимому, включает единственную субъединицу, имеющую молекулярную массу приблизительно 40 кД, которая в нативной форме может образовывать димерную структуру. Этот комплекс субъединиц $(\alpha)_n$ -типа сходен с таким комплексом, который ранее был хорошо изучен и охарактеризован у других

оксигеназ, таких как 4-хлорфенилацетат-3,4-диоксигеназа псевдомонад *Pseudomonas* sp. штамма CBS (Markus et al., 1986, J. Biol. Chem., 261, 12883-12888), фталатдиоксигеназы *Pseudomonas cepacia* (Batie et al., 1987, J. Biol. Chem., 262, 1510-1518), 4-сульфобензоат-3,4-диоксигеназы *Comamonas testosteroni* (Locher et al., 1991, Biochem. J., 274, 833-842), 2-оксо-1,2-дигидрохинолин-8-монооксигеназы *Pseudomonas putida* 86 (Rosche et al., 1985, Biochem. Biophys. Acta, 1252, 177-179), диоксигеназы 4-карбоксифенилового эфира *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Dehmel et al., 1995, Arch. Microbiol., 163, 35-41) и 3-хлорбензоат-3,4-диоксигеназы *Pseudomonas putida* (Nakatsu et al., 1995, Microbiology [Reading], 141, 485-495).

Ферредоксин_{дик.} Компонент II дикамба-О-деметилазы (обозначенный как ферредоксин_{дик.}) был очищен до практически полной гомогенности путём колоночной хроматографии и изоэлектрического фокусирования, проводившихся в несколько этапов. Окончательная очистка с помощью электрофореза в SDS-ПААГ позволила получить единственный белковый бэнд (молекулярная масса приблизительно 28 кД) и группу несколько меньших белков, которые могут представлять продукты частичного распада очищенного ферредоксина.

Сравнение N-концевой последовательности, включающей 20 аминокислотных остатков, полученной на основании основного белкового бэнда, с другими аминокислотными последовательностями, входящими в состав различных баз

данных белков, на основании пакетов программ, разработанных группой компьютерной генетики GCG (University of Wisconsin, Madison, WI), показал наличие высокого уровня гомологии с рядом дикластерных бактериальных ферредоксинов. Например, сопоставление и сравнение первых 20 аминокислот ферредоксинов *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter capsulatus* и *Azotobacter vinelandii* показало, что эти ферредоксины характеризуются идентичностью на уровне 65%, 65%, 65% и 60% по отношению к N-концевой последовательности белка *Pseudomonas maltophilia* штамма DI-6. Идентичность четырех остатков, обозначенных в предполагаемой последовательности ферредоксина как Хаа, была неочевидной. Основываясь на расположении добавочных пиков на хроматограммах, полученных для продуктов расщепления по Эдману, наиболее вероятным считается, что остатки Хаа на самом деле являются остатками пропионилцистеина, образовавшимися в результате алкилирования остатков цистеина с участием акриламида в ходе осуществления электрофореза в SDS-ПААГ (Brune, 1992, Anal. Biochem., 207, 285-290). Если же все четыре остатка Хаа являются остатками цистеина, то идентичность последовательностей бактериальных ферредоксинов по сравнению с ферредоксином *Pseudomonas maltophilia* достигает 85%, 85%, 85% и 80%, соответственно.

Четыре дикластерных ферредоксина, которые проявляют высокий уровень гомологии с ферредоксином_{дик}, включают

кластер [3Fe-4S], за которым расположен кластер [4Fe-4S], находящиеся в N-концевой области данного белка. Это подтверждает, что ферредоксин_{дик} отчётливо дифференцирован от ферредоксиновых компонентов, включающих кластер [2Fe-2S], который, как правило, связан с многокомпонентными оксигеназами, не включающими гем (Harayama et al., 1992, *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 565-601; Mason & Cammack, 1992, *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 277-305; Rosche et al., 1995, *Biochem. Biophys. Acta*, 1252, 177-179). Действительно, анализ EPR-спектров (спектров электропарамагнитного резонанса) (которые будут подробно охарактеризованы в представленной для опубликования статье Qiao F., Wang X.-Z., Herman P.L., Weeks D.P. & Golbek J.H.) показал, что кластер [3Fe-4S], расположенный с N-конца ферредоксина_{дик}, является окислительно-восстановительным центром, активным по осуществлению транспорта электронов.

Ферредоксин_{дик} характеризуется параметрами, типичными для других бактериальных ферредоксов, таких как низкое значение изоэлектрической точки (т.е. pI=3 или немного ниже). Низкое значение pI обычно приводит к аномальной миграции этих белков при проведении электрофореза в SDS-поли-акриламидном геле и в процессе гель-фильтрации (O'Keefe et al., 1991, *Biochemistry*, 30, 447-455). При тестировании ферредоксина_{дик}, оценки молекулярной массы на основе параметров подвижности белка в ходе электрофореза в SDS-ПААГ дали значение приблизительно 28 кД. Также при

применении гель-фильтрации было показано, что молекулярная масса нативного ферредоксина_{дик} составляет приблизительно 28 кД. Эта величина молекулярной массы оказывается существенно выше, чем величины, характерные для ферредоксинов в составе других многокомпонентных оксигеназ бактерий - например, 8-13 кД (Batie et al., 1992, In "Chemistry & Biochemistry of Flavoenzymes", F.Muller (ed.), Vol. III, CRC Press, Boca Raton, pp. 543-565; Harayama et al., 1992, Annu. Rev. Microbiol., 46, 565-601).

Редуктаза_{дик}. Компонент III дикамба-О-деметилазы (обозначенный как редуктаза_{дик}) является наиболее трудным с точки зрения очистки среди трёх компонентов этого фермента. Это обусловлено тем, что этот компонент является нестабильным и содержится в малом количестве в лизатах клеток штамма DI-6. Несмотря на это, белок был очищен с определением точной молекулярной массы, составившей 45 кД. Эта величина сходна с молекулярной массой в приблизительно 50 кД, полученной при тестировании с помощью гель-фильтрации, и подтверждает, что редуктаза_{дик} существует в своей нативной форме в виде мономера. Очистка редуктазного компонента также затруднена из-за того, что хроматография с применением колонок Моно-Q и изоэлектрическое фокусирование разделяют очищенные препараты редуктазы на две активности, характеризующиеся отчётливо различающимися величинами изоэлектрической точки pI. Обе фракции, выделенные с колонки Моно-Q, в сочетании с очищенными ферредоксином_{дик} и

оксигеназой_{дик} функциональны в обеспечении дикамба-О-деметиلاзной активности. Присутствие у *Sphingomonas* sp. штамма RW1 двух сходных флавопротеинов, которые равно функционируют как редуктазные компоненты в составе трёх-компонентной дибензофуран-4,4а-диоксигеназы, было недавно сообщено Бюнцом и Куком (Bunz & Cook, 1993, J. Bacteriol., 175, 6467-6475). Считается интересным, что обе редуктазы характеризуются молекулярной массой по 44 кД, что сходно с молекулярной массой редуктазы_{дик} - 45 кД. Множественные компоненты леггемоглобинредуктазы также были выявлены в корневых клубеньках люпина при использовании метода изоэлектрического фокусирования (Топунов и др., 1982, Биохимия, 162, 378-379; цит. по англ. изд.). В этом случае IEF показало наличие четырёх отдельных компонентов, проявляющих НАД-зависимую редуктазную активность. Решение проблемы, связанной с тем, имеется ли только одна редуктаза_{дик}, которая существует в двух формах, или у штамма DI-6 имеются две редуктазы, позволит усовершенствовать процедуры выделения увеличенного количества белков и (или) клонировать и секвенировать участвующие в их кодировании гены.

Характеристики дикамба-О-деметилазы. В дополнение к физическим и биохимическим свойствам отдельных компонентов, обозначенных выше, анализ каталитических активностей показал, что О-деметилазная система характеризуется высоким уровнем аффинности ($K_m \approx 10$ мкМ) в отношении её субстрата,

а величина $V_{\max}$ составляет приблизительно 100-110 нмоль/мин/мг. Как и ожидается для почвенной бактерии, обитающей в умеренной климатической зоне, максимальная каталитическая активность была выявлена при температуре около 30°C. В то время как оптимумы pH для данной ферментной системы находились в диапазоне pH=6,5-7,5, активность, измеренная для данного ферментного препарата, в значительной степени зависела от типа использовавшейся для поддержания pH буферной системы. Активность в присутствии Трис-буферов была по крайней мере на 40% ниже, чем в фосфатных буферах, при сравнении при одинаковых величинах pH.

Схема реакции, катализируемой тремя компонентами дикамба-О-деметилазы, показана на фиг.1. Электроны от НАД переносятся по короткой электронной цепочке, включающей редуктазу и ферредоксин, к конечной оксигеназе, которая и катализирует окисление дикамбы. Сходство между дикамба-О-деметилазой и некоторыми многокомпонентными диоксигеназами предполагает, что дикамба-О-деметилаза может проявлять скрытую диоксигеназную активность. Ясно, однако, что этот фермент не входит в класс диоксигеназ, которые расщепляют молекулярный кислород O_2 и включают один атом кислорода в состав основного субстрата, а другой атом - в малый органический субстрат, такой как α -кетоглутарат (Fukumori & Hausinger, 1993, J. Biol. Chem., 268, 24311-24317). Действительно, комбинирование высокоочищенных редуктазы и ди-

ферредоксина_{дик} и оксигеназы_{дик} для проявления своей активности нуждается только в O₂, НАД, Mg²⁺, Fe²⁺ и дикамбе.

Пример 2

Идентификация и секвенирование клона, кодирующего оксигеназу дикамба-О-деметилазы *Pseudomonas maltophilia* DI-6

Как отмечалось в примере 1, были определены первые 29 аминокислот N-концевой части аминокислотной последовательности оксигеназы_{дик} (остатки в скобках приведены как наиболее вероятные):

Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu
Pro Glu Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr
Ile Leu Asp (Asp или Thr) (Pro) (SEQ ID NO 1)

Эта последовательность позволяет конструировать олигонуклеотидные зонды, которые синтезировали на фирме Operon (Alameda, CA). В частности, провели смешение 32 зондов, длина каждого из которых - 17 нуклеотидов: были использованы все возможные нуклеотидные последовательности, которые могли кодировать аминокислотную последовательность, выделенную в вышеприведённой последовательности жирным шрифтом. Олигонуклеотидные зонды были помечены по 3'-концу с использованием дигоксигенина (DIG) в соответствии с инструкциями фирмы Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN).

DIG-помеченные зонды были, во-первых, гибридизованы с геномной ДНК *P.maltophilia* штамма DI-6, которую расщепляли

различными сочетаниями ректриктаз, разгоняли в 1%-ном агарозном геле и вымакивали на нейлоновый фильтр. Основываясь на полученных результатах, фракционированная по размеру геномная библиотека была сконструирована с использованием вектора pBluescript-II KS+: им осуществляли трансформацию компетентных клеток DH5 α кишечной палочки E.coli. Геномная библиотека включала фрагменты длиной 1-2 тысячи пар нуклеотидов, вырезанные XhoI/HindIII. Олигонуклеотидные DIG-помеченные зонды гибридизовали с серией бактериальных колоний, нанесёнными полосами на нейлоновые фильтры. Плазмидную ДНК выделяли из дававших позитивный ответ колоний и субклонировали. Обе цепи каждого субклона подвергали секвенированию с применением приборов для секвенирования ДНК в лаборатории университета штата Небраска в Линкольне. Гибридизация и выявление DIG-помеченных зондов были осуществлены в соответствии с методиками, представляемыми фирмой Boehringer Mannheim.

Были идентифицированы клоны геномной ДНК, кодирующие оксигеназудик. Нуклеотидная последовательность и расшифрованная аминокислотная последовательность полной оксигеназыдик показаны в списке последовательностей, приведённом ниже, под №№ SEQ ID NO 3 и SEQ ID NO 4, соответственно.

Сравнение аминокислотной последовательности, расшифрованной по нуклеотидной последовательности данного клона, с последовательностями белков, включёнными в

швейцарскую базу данных Swiss Protein Database, показали наличие гомологии с другими оксигеназами. Гомология была установлена с использованием программы FASTA, разработанной группой GCG. Наиболее значительная гомология отмечена при сравнении с оксигеназным компонентом ваниллатдеметилазы *Pseudomonas* sp. (ATCC № 19151): уровень идентичности - 33,8%.

Пример 3

Идентификация и секвенирование клона, кодирующего ферредоксин дикамба-О-деметилазы *Pseudomonas maltophilia* DI-6

Как отмечалось в примере 1, первые 20 аминокислот N-концевой части аминокислотной последовательности ферредоксинадик определены следующим образом:

Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Xaa Ile Lys Xaa

Lys Tyr Met Asp Xaa Val Glu Val Xaa (SEQ ID NO 2)

Эта последовательность позволяет конструировать вырожденные олигонуклеотидные зонды. В частности, была использована смесь 16 зондов, длина каждого из которых - 17 нуклеотидов, включая все возможные нуклеотидные последовательности, которые могли кодировать аминокислотную последовательность, выделенную выше жирным шрифтом (принимая во внимание, что Хаа представляет собой Cys).

DIG-помеченные зонды были использованы для скрининга геномной библиотеки так, как это было описано в примере 2,

за исключением того, что геномная библиотека несла фрагменты длиной 2-3 тысячи пар нуклеотидов, вырезанных рестриктазами XhoI/EcoRI. Нуклеотидная последовательность клона ферредоксинадик и расшифрованная аминокислотная последовательность полного ферредоксинадик приведены ниже в списке последовательностей под №№ SEQ ID NO 5 и SEQ ID NO 6, соответственно.

Сравнение аминокислотной последовательности, расшифрованной по нуклеотидной последовательности данного клона, с последовательностями белков в Swiss Protein Database, было выполнено с использованием программы FASTA, разработанной группой GCG. Это сравнение показало наличие существенной гомологии с другими ферредоксинами, включая ферредоксины, выделенные у *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter capsulatus*, *Azotobacter vinelandii* и *Rhodospirillum rubrum* (см. выше раздел "Обсуждение" в примере 1).

RU 2 2 2 6 2 1 5 C 2

RU 2 2 2 6 2 1 5 C 2

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) БАЗОВАЯ ИНФОРМАЦИЯ

(i) ЗАЯВИТЕЛЬ: Weeks Donald P.

Wang Xiaozhuo

Herman Patricia L.

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: "Способы и материалы для создания и применения трансгенных организмов, разрушающих дикамбу"

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 6

(iv) АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

(A) АДРЕСАТ: Sheridan Ross P.C.

(B) УЛИЦА: 1700 Lincoln str., Suite 3500

(C) ГОРОД: Denver

(D) ШТАТ: CO

(E) СТРАНА: Соединённые Штаты Америки

(F) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС: 80203

(v) ФОРМА, ПРИГОДНАЯ ДЛЯ КОМПЬЮТЕРА

(A) ТИП НОСИТЕЛЯ: дискета

(B) КОМПЬЮТЕР: IBM-PC совместимый

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

(D) ПРОГРАММА: Patentin Release 1.0, vers. 1.30

(vi) ТЕКУЩИЕ ПАРАМЕТРЫ ЗАЯВКИ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ:

(B) ДАТА ПОДАЧИ:

(C) КЛАССИФИКАЦИЯ:

(vii) ДАННЫЕ ПРИОРИТЕТА ЗАЯВКИ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ: US 60/042666

(B) ДАТА ПОДАЧИ: 4 апреля 1997 г.

(vii) ДАННЫЕ ПРИОРИТЕТА ЗАЯВКИ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ: US 60/042941

(B) ДАТА ПОДАЧИ: 4 апреля 1997 г.

(viii) ИНФОРМАЦИЯ О ПАТЕНТНОМ ПОВЕРЕННОМ/агенте

(A) ИМЯ: Crook Wannell M.

(B) НОМЕР РЕГИСТРАЦИИ: 31071

(C) РЕЕСТРОВЫЙ НОМЕР: 3553-18-РСТ

(ix) ТЕЛЕКОММУНИКАЦИОННАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(A) ТЕЛЕФОН: (1-303) 863-9700

(B) ФАКС: (1-303) 863-0223

2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 1

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 29 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(ix) СВОЙСТВА:

(A) ИМЯ/КЛЮЧ: сегмент

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 28

(C) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ: заметка: наиболее

вероятно Хаа = Asp ли Thr

(ix) СВОЙСТВА:

(A) ИМЯ/КЛЮЧ: сегмент

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 29

(C) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ: заметка: наиболее
вероятно Хаа = Pro

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 1

Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu

1 5 10 15

Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Xaa Xaa

20 25

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 2

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 20 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(И) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(ix) СВОЙСТВА:

(A) ИМЯ/КЛЮЧ: сегмент

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 8

(C) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ: заметка: наиболее
вероятно Хаа = Cys

(ix) СВОЙСТВА:

(A) ИМЯ/КЛЮЧ: сегмент

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 11

(C) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ: заметка: наиболее
вероятно Хаа = Cys

(ix) СВОЙСТВА:

(A) ИМЯ/КЛЮЧ: сегмент

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 16

(C) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ: заметка: наиболее вероятно Xaa = Cys

(ix) СВОЙСТВА:

(A) ИМЯ/КЛЮЧ: сегмент

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 20

(C) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ: заметка; наиболее вероятно Xaa = Cys

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 2

Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Xaa Ile Lys Xaa Lys Tyr Met

1 5 10

Asp Xaa Val Glu Val Xaa

15 20

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 3

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 1020 нуклеотидов

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(ix) СВОЙСТВА:

(A) ИМЯ/КЛЮЧ: CDS

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 1...1020

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 3

RU 2226215 C2

RU 2226215 C2

ATG ACC TTC GTC CGC AAT GCC TGG TAT GTG GCG GCG CTG CCC GAG GAA	48
Met Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu	
1 5 10 15	
CTG TCC GAA AAG CCG CTC GGC CGG ACG ATT CTC GAC ACA CCG CTC GCG	96
Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu Ala	
20 25 30	
CTC TAC CGC CAG CCC GAC GGT GTG GTC GCG GCG CTG CTC GAC ATC TGT	144
Leu Tyr Arg Gin Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile Cys	
35 40 45	
CCG CAC CGC TTC GCG CCG CTG AGC GAC GGC ATC CTC GTC AAC GGC CAT	192
Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly His	
50 55 60	
CTC CAA TGC CCC TAT CAC GGG CTG GAA TTC GAT GGC GGC GGC CAG TGC	240
Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gin Cys	
65 70 75 80	
GTC CAT AAC CCG CAC GGC AAT GGC GCC CGC CCG GCT TCG CTC AAC GTC	288
Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn Val	
85 90 95	
CGC TCC TTC CCG GTG GTG GAG CGC GAC GCG CTG ATC TGG ATC TGG CCC	336
Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp Pro	
100 105 110	
GGC GAT CCG GCG CTG GCC GAT CCT GGG GCG ATC CCC GAC TTC GGC TGC	384
Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly Cys	
115 120 125	
CGC GTC GAT CCC GCC TAT CGG ACC GTC GGC GGC TAT GGG CAT GTC GAC	432
Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val Asp	
130 135 140	
TGC AAC TAC AAG CTG CTG GTC GAC AAC CTG ATG GAC CTC GGC CAC GCC	480
Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His Ala	
145 150 155 160	
CAA TAT GTC CAT CGC GCC AAC GCC CAG ACC GAC GCC TTC GAC CGG CTG	528
Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg Leu	
165 170 175	
GAG CGC GAG GTG ATC GTC GGC GAC GGT GAG ATA CAG GCG CTG ATG AAG	576
Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met Lys	
180 185 190	
ATT CCC GGC GGC ACG CCG AGC GTG CTG ATG GCC AAG TTC CTG CGC GGC	624
Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg Sly	
195 200 205	
GCC AAT ACC CCC GTC GAC GCT TGG AAC GAC ATC CGC TGG AAC AAG GTG	672
Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys Val	
210 215 220	

[illegible]

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 4

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(А) ДЛИНА: 340 аминокислот

(В) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(И) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 4

Met Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu
1 5 10 15
Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu Ala
20 25 30

RU 2226215 C2

Leu	Tyr	Arg	Gln	Pro	Asp	Gly	Val	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Asp	Ile	Cys
		35					40					45			
Pro	His	Arg	Phe	Ala	Pro	Leu	Ser	Asp	Gly	Ile	Leu	Val	Asn	Gly	His
		50				55					60				
Leu	Gln	Cys	Pro	Tyr	His	Gly	Leu	Glu	Phe	Asp	Gly	Gly	Gly	Gln	Cys
65					70					75					80
Val	His	Asn	Pro	His	Gly	Asn	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Ser	Leu	Asn	Val
				85					90					95	
Arg	Ser	Phe	Pro	Val	Val	Glu	Arg	Asp	Ala	Leu	Ile	Trp	Ile	Trp	Pro
			100					105					110		
Gly	Asp	Pro	Ala	Leu	Ala	Asp	Pro	Gly	Ala	Ile	Pro	Asp	Phe	Gly	Cys
		115				120					125				
Arg	Val	Asp	Pro	Ala	Tyr	Arg	Thr	Val	Gly	Gly	Tyr	Gly	His	Val	Asp
	130					135					140				
Cys	Asn	Tyr	Lys	Leu	Leu	Val	Asp	Asn	Leu	Met	Asp	Leu	Gly	His	Ala
145				150					155						160
Gln	Tyr	Val	His	Arg	Ala	Asn	Ala	Gln	Thr	Asp	Ala	Phe	Asp	Arg	Leu
			165					170						175	
Glu	Arg	Glu	Val	Ile	Val	Gly	Asp	Gly	Glu	Ile	Gln	Ala	Leu	Met	Lys
		180					185					190			
Ile	Pro	Gly	Gly	Thr	Pro	Ser	Val	Leu	Met	Ala	Lys	Phe	Leu	Arg	Gly
	195					200					205				
Ala	Asn	Thr	Pro	Val	Asp	Ala	Trp	Asn	Asp	Ile	Arg	Trp	Asn	Lys	Val
	210					215					220				
Ser	Ala	Met	Leu	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Ala	Pro	Glu	Gly	Thr	Pro	Lys
225				230						235					240
Glu	Gln	Ser	Ile	His	Ser	Arg	Gly	Thr	His	Ile	Leu	Thr	Pro	Glu	Thr
			245						250					255	
Glu	Ala	Ser	Cys	His	Tyr	Phe	Phe	Gly	Ser	Ser	Arg	Asn	Phe	Gly	Ile
		260						265				270			
Asp	Asp	Pro	Glu	Met	Asp	Gly	Val	Leu	Arg	Ser	Trp	Gln	Ala	Gln	Ala
	275					280					285				
Leu	Val	Lys	Glu	Asp	Lys	Val	Val	Val	Glu	Ala	Ile	Glu	Arg	Arg	Arg
	290				295						300				
Ala	Tyr	Val	Glu	Ala	Asn	Gly	Ile	Arg	Pro	Ala	Met	Leu	Ser	Cys	Asp
305				310						315					320
Glu	Ala	Ala	Val	Arg	Val	Ser	Arg	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Glu	Gln	Leu
			325					330						335	

RU 2226215 C2

Glu Ala Ala *
340

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 5

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 339 нуклеотидов
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(ix) СВОЙСТВА:

- (A) ИМЯ/КЛЮЧ: CDS
(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 1...339

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 5

ATG ACC TAT GTC GTC ACC GAC GCC TGC ATC AAG TGC AAG TAC ATG GAC	48
Met Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Cys Ile Lys Cys Lys Tyr Met Asp	
1 5 10 15	
TGC GTG GAA GTC TGC CCT GTG GAC TGC TTC TAC GAA GGC GAG AAC ATG	96
Cys Val Glu Val Cys Pro Val Asp Cys Phe Tyr Glu Gly Glu Asn Met	
20 25 30	
CTC GTC ATC AAT CCC AGT GAA TGC ATC GAC TGC GGC GTC TGC GAA CCG	144
Leu Val Ile Asn Pro Ser Glu Cys Ile Asp Cys Gly Val Cys Glu Pro	
35 40 45	
GAA TGC CCA GCC GAA GCC ATC CTT CCC GAC ACC GAA AGC GGT CTC GAG	192
Glu Cys Pro Ala Glu Ala Ile Leu Pro Asp Thr Glu Ser Gly Leu Glu	
50 55 60	
CAG TGG ATG GAA CTG AAC ACG AAG TAC TCG GCC GAG TGG CCG AAT CTC	240
Gln Trp Met Glu Leu Asn Thr Lys Tyr Ser Ala Glu Trp Pro Asn Leu	
65 70 75 80	
ACG TCC AAG AAA GAT TCG CCG GAA GAT GCC GAC GAG TAC AAG GGC GTG	288
Thr Ser Lys Lys Asp Ser Pro Glu Asp Ala Asp Glu Tyr Lys Gly Val	
85 90 95	

GAA GGC AAG TTC GAG AAG TTC TTC TCG CCC GAG CCC GGC GAG GGC GAC	336
Glu Gly Lys Phe Glu Lys Phe Phe Ser Pro Glu Pro Gly Glu Gly Asp	
100 105 110	
TGA	339
*	

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 6

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 113 аминокислот

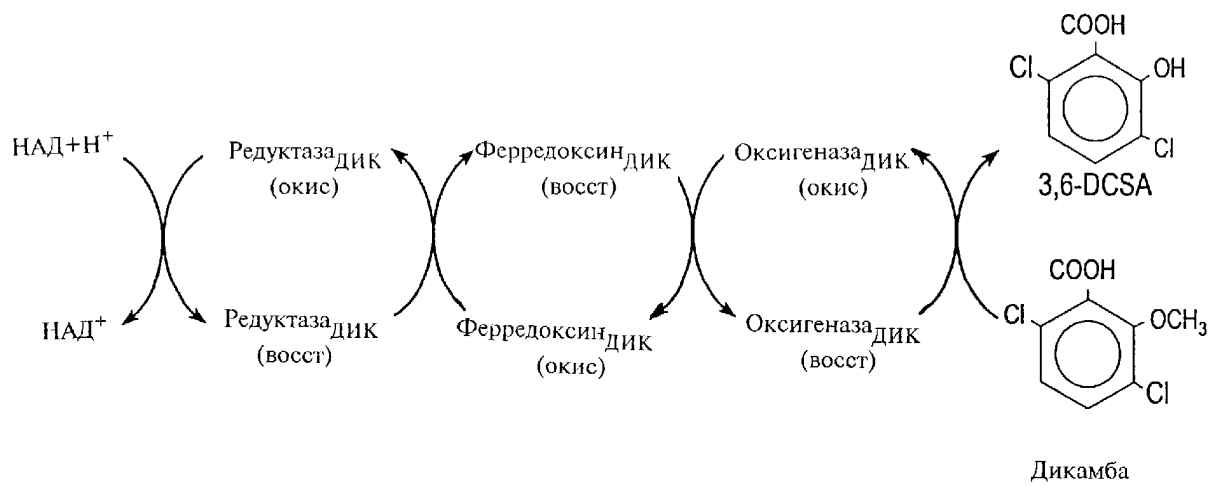
(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 6

Met Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Cys Ile Lys Cys Lys Tyr Met Asp	
1 5 10 15	
Cys Val Glu Val Cys Pro Val Asp Cys Phe Tyr Glu Gly Glu Asn Met	
20 25 30	
Leu Val Ile Asn Pro Ser Glu Cys Ile Asp Cys Gly Val Cys Glu Pro	
35 40 45	
Glu Cys Pro Ala Glu Ala Ile Leu Pro Asp Thr Glu Ser Gly Leu Glu	
50 55 60	
Gln Trp Met Glu Leu Asn Thr Lys Tyr Ser Ala Glu Trp Pro Asn Leu	
65 70 75 80	
Thr Ser Lys Lys Asp Ser Pro Glu Asp Ala Asp Glu Tyr Lys Gly Val	
85 90 95	
Glu Gly Lys Phe Glu Lys Phe Phe Ser Pro Glu Pro Gly Glu Gly Asp	
100 105 110	



RU 2 2 2 6 2 1 5 C 2

RU 2 2 2 6 2 1 5 C 2